



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

• ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ

Διευθύντρια: Βασιλική Μαλάμου-Μήτση

*«Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου PRMT1 (Protein Arginine
Methyltransferase 1) (πρωτεϊνική μεθυλοτρανσφεράση αργινίνης
1) στον καρκίνο του παχέος εντέρου»*

Κωνσταντίνα Μαθιουδάκη

Διδακτορική διατριβή

Ιωάννινα 2009

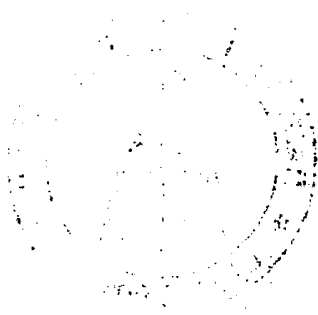


ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000321983

12



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)



Ημερομηνία αίτησης της κ. Μαθιουδάκη Κωνσταντίνα: 15-2-2002

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 467^α/2-4-2002

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Αγνάντη Νίκη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Στεφάνου Δημήτριος -Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ταλιέρη Μαρουλιώ Ερευνήτρια στο Κέντρο Ογκολογικής Έρευνας «Γ. Παπανικολάου»- Π.Α.Ο.Ν.Α- «Άγιος Σάββας»

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 12-4-2002

«Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου PRMT-1 (protein -Arginin-Methyltransferase-1) (πρωτεΐνο -μεθυλο-τρανσφεράση-1) στον καρκίνο του παχέος εντέρου»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 646^α/22-10-2008

Αγνάντη Νίκη	τ. Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βουγιουκλάκης Θεόδωρος	Καθηγητής Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στεφάνου Δημήτριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γούσια Άννα	Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπατιστάτου Άννα	Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σύρρου Μαρίκα	Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας -Ιατρικής Γενετικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

- Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 31-10-2008

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας



Ευχαριστίες

Θα ήθελα να πω ένα πολύ θερμό ευχαριστώ στη Δρ. Μαρουλιώ Ταλιέρη για όλα αυτά τα δημιουργικά χρόνια που είχα τη χαρά και την τιμή να περάσω δίπλα της. Η καθοδήγηση, συμπαράσταση και βοήθειά της υπήρξε ανεκτίμητη. Ευχαριστώ πολύ και τα άλλα δυο μέλη της τριμελούς επιτροπής, την Καθηγήτρια κ. Νίκη Αγνάντη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Στεφάνου, για την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπό μου και τις δυνάμεις μου. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ανδρέα Σκορίλα, ο οποίος υπήρξε ουσιώδης συνεργάτης σε όλη την πορεία αυτής της εργασίας. Ευχαριστίες αξίζουν στη Δρ. Νίκη Αρνογιαννάκη, για τη βοήθειά της στη συλλογή του υλικού, στο Δρ. Ανδρέα Καραμέρη και τον τεχνικό κ. Γιώργο Βηλαρά για την αρωγή τους στα πειράματα ανοσοϊστοχημείας, καθώς και στη Δρ. Πέγκυ Λυμπέρη για τον καθαρισμό των αντισωμάτων. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Ανδρέα Ανδρουλακάκη για τη βοήθειά του στην παραγωγή των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω τον Δρ. Παναγιώτη Πρέζα και την υποψήφια διδάκτωρ κ. Κατερίνα Ράπτη, γιατί οι συμβουλές τους, η έμπρακτη συμπαράστασή τους και η φιλία τους υπήρξαν πολυτιμότεα εφόδια. Τέλος, ευχαριστώ πολύ τους γονείς μου και τον αδερφό μου, γιατί είναι σε μεγάλο βαθμό «συνένοχοι» για την πρόοδο μου τόσο ως επιστήμονα όσο και ως άνθρωπο.



Πρόλογος

Ο καρκίνος αποτελεί μια από τις σοβαρότερες νόσους που καλείται να αντιμετωπίσει ο άνθρωπος στις μέρες μας. Ο αριθμός των ατόμων που προσβάλλονται έχει αυξηθεί κατακόρυφα. Οι απαιτήσεις λοιπόν όσον αφορά τις θεραπευτικές μεθόδους, αλλά και την πρόληψη είναι αρκετά υψηλές. Η δε αναζήτηση δεικτών έχει μετατραπεί σε αγώνα δρόμου για τους ερευνητές.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια ακόμα προσπάθεια ανακάλυψης προγνωστικών δεικτών που αφορούν τον καρκίνο. Χρησιμοποιήθηκαν σύγχρονες τεχνικές μοριακής βιολογίας, όπως η PCR, καθώς και τεχνικές όπως ο ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός προκειμένου να εξερευνηθεί ο ρόλος του γονιδίου της πρωτεϊνικής μεθυλοτρανσφεράσης αργινίνης 1 (PRMT1) στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Είναι η πρώτη φορά που το γονίδιο αυτό μελετάται σε σχέση με τον καρκίνο και προσπαθεί να γίνει συσχετισμός της έκφρασής του με τον καρκινικό φαινότυπο. Η βοήθεια της στατιστικής επιστήμης υπήρξε πολυτιμότερη στην εξαγωγή συμπερασμάτων σε αυτή τη μελέτη.

Με την ολοκλήρωση των πειραματικών διαδικασιών και αφού χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που αφορούν τα χαρακτηριστικά των όγκων, καθώς και την επιβίωση των ασθενών, καταλήξαμε σε ένα αρνητικό συσχετισμό μεταξύ έκφρασης και εξέλιξης της νόσου. Τα συμπεράσματα αυτά βέβαια είναι μάλλον προκαταρκτικά, αν αναλογιστούμε τα δεδομένα που πρέπει να έχουμε στα χέρια μας μέχρι να καταλήξουμε στη χρήση του συγκεκριμένου γονιδίου σαν δείκτη πρόγνωσης για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Αυτό που απαιτείται τώρα είναι μια πιο βαθιά διερεύνηση αυτής της σχέσης, καθώς και διεύρυνση της μελέτης σε άλλες μορφές καρκίνου.

Επιπλέον, όσον αφορά το κομμάτι της εργασίας που περιλαμβάνεται στην πιο βασική έρευνα, ο εντοπισμός δηλαδή του πρωτεϊνικού προϊόντος που προκύπτει από την έκφραση του γονιδίου, θα μπορούσε επίσης να μελετηθεί σε μεγαλύτερο βάθος. Καλό θα ήταν να γίνει μια προσπάθεια ως προς τον εντοπισμό συγκεκριμένων ισομορφών της πρωτεΐνης, όπως και

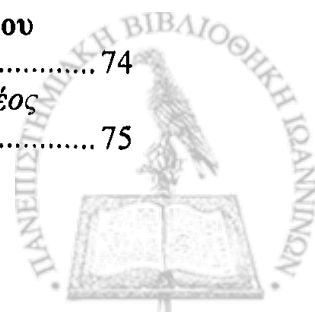


χρήση άλλων τεχνικών (πέραν της ανοσοϊστοχημείας), ώστε να καταλήξουμε σε πιο ασφαλή συμπεράσματα.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
ΚΑΤΑΤΑΞΗ	3
ΧΑΡΑΚΗΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	4
ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	11
ΑΙΤΙΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ	12
ΠΡΩΤΟ-ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	13
Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΣΚΟΠΙΑ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ	16
2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	21
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	21
ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	22
ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	22
FAP ΚΑΙ ΜΟΝΟΠΑΤΙ WNT	23
ΜΟΝΤΕΛΟ ΠΟΛΥΣΤΑΔΙΑΚΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ.....	27
ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΣ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΟΥ ΔΕ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΠΟΛΥΠΟΔΕΣ.....	29
ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	30
3. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ.....	32
4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ – ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	35
5. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΜΕΘΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ	37
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ	39
PRMT1 (HRMT1L2, IR1B4)	43
ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ PRMT1 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ	55
6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	57
Βιολογικό υλικό	57
Μέθοδοι	57
Ομογενοποίηση ιστού	57
Απομόνωση ολικού RNA.....	58
Υπολογισμός συγκέντρωσης απομονωμένων δειγμάτων	58
Καθαρισμός RNA από προσμίξεις.....	59
Μετατροπή του RNA σε cDNA	59
Έλεγχος επιτυχίας της αντίστροφης μεταγραφής.....	60
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.....	61
Πολλαπλασιασμός του cDNA του PRMT1.....	62
Απομόνωση γονιδίου από πήκτωμα αгарόζης.....	63
Υπολογισμός συγκέντρωσης σε πήκτωμα	64
Παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων.....	65
Υπολογισμός τίτλου αντισωμάτων.....	66
Συλλογή και καθαρισμός αντισώματος	68
Υπολογισμός συγκέντρωσης αντισώματος.....	69
Ταυτοποίηση ανοσοσφαιρινών	69
Ανοσοϊστοχημεία.....	71
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
Μελέτη των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου PRMT1	73
Μελέτη της έκφρασης του PRMT1 σε επίπεδο mRNA στον καρκίνο του παχέος εντέρου	74
Α. Συσχέτιση της έκφρασης των mRNA του PRMT1 σε δείγματα του παχέος εντέρου με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους.....	75



<i>B. Συσχέτιση της ημι-ποσοτικής έκφρασης των mRNA του PRMT1 με την ελευθέρα νόσου επιβίωση.</i>	79
Κυτταρικός εντοπισμός του πρωτεϊνικού προϊόντος του PRMT1 με ανοσοϊστοχημεία	86
8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	91
9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	97
10. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	98
11. SUMMARY.....	100
12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	101
13. ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΑΡΘΡΑ	113



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος σαν όρος περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό πολλών και διαφορετικών μεταξύ τους νοσημάτων, τα οποία μπορούν να εμφανιστούν σε οποιοδήποτε σύστημα οργάνων οποιουδήποτε οργανισμού του ζωικού βασιλείου. Το μοναδικό χαρακτηριστικό του καρκίνου είναι ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, κατά τρόπο που διαφέρει από τη φυσιολογική ανάπτυξη του οργανισμού [1]. Τα καρκινικά κύτταρα σπάνε τους πιο βασικούς κανόνες συμπεριφοράς, βάσει των οποίων οι πολυκύτταροι οργανισμοί δημιουργούνται και συντηρούνται, εκμεταλλευόμενα κάθε ευκαιρία προς αυτή την κατεύθυνση. Ο πολλαπλασιασμός μπορεί να είναι ταχύς ή αργός, η συσσώρευση των κυττάρων να είναι μαζική ή μηδαμινή. Η ουσία, όμως, του θέματος είναι ότι κύτταρα που παρουσιάζουν εκτροπή, από τη συνήθη εξέλιξη των κυτταρικών τύπων, εμφανίζονται και συσσωρεύονται. Ο καρκίνος, συνεπώς, διαφέρει από την υπερτροφία και την υπερπλασία, οι οποίες αφορούν φυσιολογικά κύτταρα [1].

Ένα απομονωμένο - μη φυσιολογικό - κύτταρο που δεν πολλαπλασιάζεται περισσότερο από τα φυσιολογικά γειτονικά του κύτταρα, δεν προκαλεί ιδιαίτερη ζημιά, ανεξάρτητα από τις υπόλοιπες δυσάρεστες ιδιότητες που μπορεί να έχει. Εάν όμως ο πολλαπλασιασμός ξεφύγει από τον έλεγχο, θα δώσει γένεση σε έναν όγκο ή νεοπλασία. Όσο τα νεοπλασματικά κύτταρα παραμένουν σε μια ενιαία μάζα, ο όγκος ονομάζεται καλοήγητος. Σε αυτό το στάδιο, η πλήρης ίαση είναι συνήθως δυνατή με χειρουργική αφαίρεση του όγκου. Ένας όγκος θεωρείται καρκίνος μόνο αν είναι κακοήγητος που σημαίνει ότι τα κύτταρα που τον αποτελούν έχουν αποκτήσει την ικανότητα να διηθούν γειτονικούς ιστούς [2].

ΚΑΤΑΤΑΞΗ

Τα διάφορα είδη καρκίνου κατατάσσονται με βάση τον ιστό και τον κυτταρικό τύπο από τα οποία προέρχονται. Οι καρκίνοι που προκύπτουν από επιθηλιακά κύτταρα ονομάζονται καρκινώματα (carcinomas). Εκείνοι που προέρχονται από το συνδετικό ιστό ή τα μυϊκά κύτταρα ονομάζονται σαρκώματα (sarcomas). Τα είδη εκείνα που δεν μπορούν να συμπεριληφθούν σε καμία από τις δυο αυτές μεγάλες κατηγορίες περιλαμβάνουν τα διάφορα είδη λευχαιμίας (προέρχονται από τα αιμοποιητικά κύτταρα) και τους καρκίνους που προέρχονται από τα κύτταρα



του νευρικού ιστού. Κάθε μια από τις ευρείες κατηγορίες έχει πολλές υποκατηγορίες σύμφωνα με τον κυτταρικό τύπο, τη θέση στο σώμα και τη δομή του όγκου.

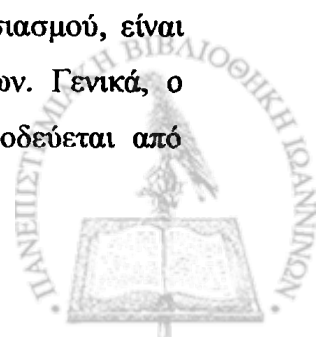
Παράλληλα με την ομάδα των ονομάτων που αφορούν τους κακοήθεις όγκους υπάρχει και μια αντίστοιχη ομάδα ονομάτων που αφορά τους καλοήθεις όγκους. Για παράδειγμα, το αδένωμα είναι ένας καλοήθης επιθηλιακός όγκος, με αδενώδη οργάνωση, ενώ ο αντίστοιχος τύπος κακοήθους όγκου ονομάζεται αδenoκαρκίνωμα.

Κάθε καρκίνος έχει χαρακτηριστικά που ανταναικλούν την καταγωγή του. Τα κύτταρα ενός μελανώματος για παράδειγμα, τα οποία έχουν προκύψει από ένα μελανοκύτταρο του δέρματος, συνήθως συνεχίζουν να παράγουν κοκκία μελανίνης. Οι καρκίνοι που ξεκινούν από διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, είναι εν γένει πολύ διαφορετικές μεταξύ τους ασθένειες [2].

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα καρκινικά κύτταρα επομένως έχουν ιδιότητες που τα διακρίνουν από τα φυσιολογικά και οι γενετικές αλλαγές που φέρουν επάγουν την ογκογένεση. Τα διάφορα είδη καρκίνου στον άνθρωπο, παρά το γεγονός ότι εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία, έχουν ορισμένες κοινές θεμελιώδεις ιδιότητες. Κάθε είδος τις εκφράζει σε διαφορετικό βαθμό. Επιπλέον αυτές οι ιδιότητες μπορούν να αποκτηθούν βήμα-βήμα και να γίνουν εμφανείς σε διαφορετικά στάδια κατά τη διάρκεια εξέλιξης του καρκίνου. Η πλειονότητα αυτών των χαρακτηριστικών, ξεχωριστά το καθένα, μπορούν να βρεθούν και σε άλλες ασθένειες, ενώ ορισμένα εμφανίζονται και κατά τη διάρκεια φυσιολογικών προσαρμοστικών αποκρίσεων. Παρόλα αυτά ο συνδυασμός του ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της αλλαγμένης διαφοροποίησης και μεταβολισμού, η γενετική αστάθεια και ικανότητα εξάπλωσης με ενδεχόμενη μετάσταση, είναι μοναδικός και καθορίζει τον καρκίνο.

Η πιο προφανής ιδιότητα των όγκων είναι ο αυξημένος και αυτόνομος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, δηλαδή η αύξηση πέρα των φυσιολογικών μέτρων. Στην πραγματικότητα, ο όρος «όγκος», όταν χρησιμοποιείται με την ευρεία έννοια, δηλώνει κάθε μη φυσιολογικά μεγάλη δομή στο ανθρώπινο σώμα, συμπεριλαμβανομένου του οιδήματος ή των γεμάτων υγρού κυστών. Έτσι, για να γίνουμε πιο ακριβείς, ο καρκίνος ανήκει σε εκείνους τους όγκους, οι οποίοι πρωτογενώς δημιουργούνται λόγω αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού, είναι δηλαδή μια μόνιμη και διαρκής αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Γενικά, ο αυξημένος αριθμός κυττάρων σε ένα ιστό (υπερπλασία), όταν συνοδεύεται από



επιπρόσθετες αλλαγές, όπως αυτές που αφορούν τη διαφοροποίηση, οδηγεί στη δημιουργία δυσπλασίας. Η δυσπλασία θεωρείται σαν καλοήθης όγκος και συχνά φαίνεται να προηγείται του κακοήθους όγκου. Αυτό, όμως, που καθορίζει έναν κακοήθη ή καρκινικό όγκο είναι οι ουσιώδεις αλλαγές στη δομή του ιστού και συγκεκριμένα η παρουσία της διήθησης των κυττάρων του όγκου. Τα όρια μεταξύ υπερπλασίας, καλοήθους όγκου και καρκίνου είναι συχνά εμφανή με μικροσκοπική ή ακόμα και μακροσκοπική παρατήρηση, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις επιπλέον κριτήρια ή δείκτες πρέπει να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να γίνει η διάκριση. Ο υπερ-πολλαπλασιασμός στον καρκίνο εκδηλώνεται λόγω της διαφοροποιημένης απόκρισης σε εξωγενή σήματα ρύθμισης της αύξησης. Από τη μια, τα καρκινικά κύτταρα συχνά είναι υπερευαίσθητα σε σήματα επαγωγής της αύξησης και κάποια αποκτούν σε μεγάλο βαθμό ανεξαρτησία από αυτά. Από την άλλη μεριά, η ευαισθησία σε σήματα επαγωγής της αύξησης συνήθως εκμηδενίζεται. Αυτές οι μετατροπές, όσον αφορά την απόκριση, έχουν σαν αποτέλεσμα την αυτονομία στην αύξηση που χαρακτηρίζει τον καρκίνο. Επιπλέον, συνήθως αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής του.

Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται επίσης από ανεπαρκή απόπτωση. Η απόπτωση είναι αυτό που ονομάζεται προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός στον καρκίνο μπορεί να προκληθεί από το συνδυασμό τριών παραγόντων: 1) Ο ρυθμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ενισχύεται από την αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που έχουν ενεργό κυτταρικό κύκλο. 2) Ο ρυθμός του κυτταρικού θανάτου είναι συχνά μειωμένος, λόγω της σχετικά ελαττωμένης απόπτωσης. Σε ορισμένες περιπτώσεις καρκίνου, αυτό είναι η δύναμη που ωθεί την αυξημένη κυτταρική διαίρεση. Σε άλλες, ο ρυθμός της απόπτωσης ενισχύεται συγκρινόμενος με αυτόν του φυσιολογικού ιστού, αλλά όχι επαρκώς, ώστε να αντισταθμίσει την αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας. 3) Στο φυσιολογικό ιστό, τα διαδοχικά στάδια διαφοροποίησης συνδέονται συνήθως με την προοδευτική μείωση της ικανότητας πολλαπλασιασμού και / ή με την απόπτωση των πλήρως διαφοροποιημένων κυττάρων. Επομένως, η παρεμπόδιση της διαδικασίας διαφοροποίησης είναι αρκετή σε ορισμένες περιπτώσεις να επιφέρει αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού.

Πολλά είδη καρκίνου αποτελούνται από κύτταρα που μοιάζουν με τα πρόδρομα κύτταρα του ιστού από τον οποίο προέρχονται και τα οποία δεν έχουν ξεκινήσει τη φυσιολογική πορεία διαφοροποίησης, ενώ άλλα επιδεικνύουν ιδιότητες

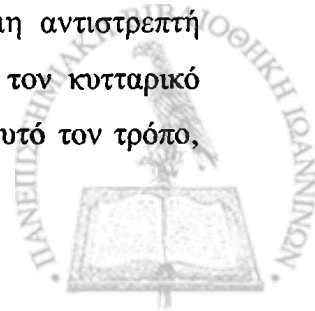


κυττάρων που βρίσκονται σε ενδιάμεσα στάδια διαφοροποίησης. Παρόλα αυτά, υπάρχουν είδη που αποτελούνται από πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα, με τη βασική διαφορά ότι συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Σε αυτές τις τελευταίες μορφές καρκίνου δεν είναι δύσκολο να γίνει η αναγνώριση του προγονικού κυττάρου, εύρημα σημαντικό για τη διάγνωση. Επιπλέον, υπάρχουν και είδη που εκφράζουν δείκτες που δεν υπάρχουν στον ιστό προέλευσης. Συχνά, τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν πρωτεϊνικά μόρια που φυσιολογικά ανιχνεύονται μόνο σε εμβρυϊκά κύτταρα (όπως το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο στον καρκίνο του παχέος εντέρου) ή ακόμα και πρωτεΐνες που ποτέ δεν συνθέτονται από τα φυσιολογικά κύτταρα του ιστού προέλευσης (όπως τα CTA (*cancer testis antigens*) στο μελάνωμα). Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται έκτοπη έκφραση.

Επίσης, σε ορισμένες μορφές καρκίνου, τα κύτταρα αλλάζουν το φαινότυπό τους, ώστε να μοιάζουν σε κύτταρα κάποιου άλλου ιστού, μια διαδικασία που ονομάζεται μεταπλασία. Κάποιος μπορεί να σκεφτεί ότι η μεταπλασία είναι καθαρό χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου, αλλά είναι ένα φαινόμενο που συναντάται επίσης και σε ορισμένες «ακίνδυνες» καταστάσεις. Στην πραγματικότητα, σαν φαινόμενο μπορεί να προηγείται της ανάπτυξης καρκίνου, ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις που εμφανίζεται στα τελικά στάδια της νόσου.

Υπάρχουν αλλαγές στην κυτταρική διαφοροποίηση που εξαλείφουν τον αρχικό κυτταρικό φαινότυπο τόσο ισχυρά, ώστε είναι δύσκολο να εξακριβωθεί η πρωταρχική θέση μιας μετάστασης. Δυο τέτοιοι γενικοί κυτταρικοί τύποι είναι: α) ένα μικρό κύτταρο που μοιάζει με επιθηλιακό, με μεγάλη αναλογία πυρήνα / κυτταροπλάσματος και β) ένα ακτινωτό κύτταρο που μοιάζει με μεσεγχυματικό ινοβλάστη. Αυτοί οι καρκινικοί τύποι αποτελούν τελικά σημεία στην ανάπτυξη του καρκίνου σε ορισμένες περιπτώσεις καρκινωμάτων, συνήθως πολύ επιθετικών μορφών, για αυτό και εντοπίζονται σε μεταστάσεις.

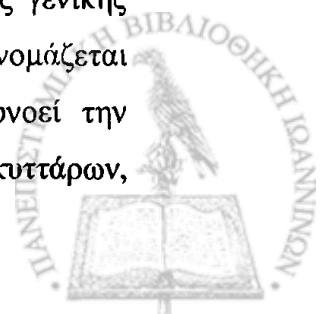
Επομένως, η τροποποιημένη διαφοροποίηση αποδίδει στα καρκινικά κύτταρα ιδιότητες που αλλιώς εντοπίζονται σε πρόδρομα κύτταρα, εμβρυϊκά κύτταρα ή κύτταρα άλλων ιστών, ενώ σαν διαδικασία σχετίζεται και με τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο έλεγχος της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού είναι στενά συνδεδεμένος στους φυσιολογικούς ιστούς. Τα τελικά στάδια της διαφοροποίησης πολλών φυσιολογικών ιστών σχετίζονται με τη μη αντιστρεπτή απώλεια της ικανότητάς τους να πολλαπλασιάζονται ή ακόμα και τον κυτταρικό θάνατο. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται τελική διαφοροποίηση. Με αυτό τον τρόπο,



διατηρείται μια σταθερή κατάσταση ανάμεσα στη δημιουργία και την απώλεια κυττάρων, η οποία παύει να υφίσταται εάν η διαφοροποίηση αποτύχει σε ένα καρκίνο.

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, είτε φυσιολογικός είτε μη φυσιολογικός, απαιτεί ανάλογες αλλαγές όσον αφορά τον κυτταρικό μεταβολισμό. Η βιοσύνθεση του DNA απαιτεί δεοξυριβονουκλεοτίδια. Επομένως τα ένζυμα που χρειάζονται για τη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων (και ειδικά των δεοξυριβονουκλεοτιδίων) επάγονται και ενεργοποιούνται στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Άλλα κυτταρικά συστατικά, όπως μεμβράνες και κυτταρικά οργανίδια, επίσης χρειάζεται να διπλασιαστούν. Για αυτό το λόγο, η βιοσύνθεση των λιπιδίων αυξάνεται στα καρκινικά κύτταρα, πιθανώς γιατί δεν είναι σε θέση να αποκτήσουν αρκετά λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια και χοληστερόλη από τις λιποπρωτεΐνες που προμηθεύουν το έντερο και το συκώτι. Σαν συνέπεια των παραπάνω, η έκφραση και η ενεργότητα ενζύμων – κλειδιών, όπως η συνθετάση λιπαρών οξέων και η υδροξυμεθυλγλουταρική συνένζυμο Α ρεδουκτάση, να αυξάνονται στα καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, η βιοσύνθεση της πορφυρίνης συχνά αυξάνεται, ενώ, όπως και ο Warburg είχε παρατηρήσει ήδη από τη δεκαετία του 1930, πολλά κύτταρα όγκων αλλάζουν το μεταβολισμό της γλυκόζης από αερόβιο σε αναερόβιο.

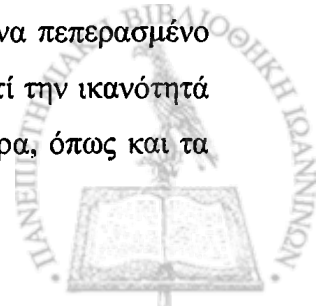
Κύρια απαίτηση για την κυτταρική ανάπτυξη είναι η αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση, η οποία είναι εμφανής σε διάφορα επίπεδα από τους ενισχυμένους σε μέγεθος και αριθμό πυρηνίσκους, ενισχυμένη έκφραση παραγόντων έναρξης της μεταγραφής και αυξημένη φωσφορυλίωση ριβοσωμικών πρωτεϊνών. Μια ιδιαίτερα ισχυρή ώθηση στη σύνθεση πρωτεϊνών μπορεί να απαιτείται κατά τη διήθηση και τη μετάσταση. Πάνω από όλα, η ανάπτυξη του καρκίνου θέτει υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις στον ασθενή, οι οποίες αυξάνονται με την αύξηση του όγκου. Επιπρόσθετα, τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν τα παραπροϊόντα του μεταβολισμού τους, όπως το γαλακτικό οξύ, στα οποία το σώμα πρέπει να αντεπεξέλθει. Αυτές είναι δυστυχώς μερικές μόνο από τις επιδράσεις του καρκίνου. Τα καρκινικά κύτταρα επίσης εκκρίνουν ένζυμα και ορμόνες που έχουν επίδραση στον οργανισμό, συχνά μάλιστα τοξική. Συγκεκριμένα, κυτοκίνες όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNFα) μπορούν να προκαλέσουν την εκδήλωση μιας γενικής κατάπτωσης στη μεταβολική λειτουργία, με ορατή απώλεια, η οποία ονομάζεται καχεξία, και καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία ευνοεί την ανάπτυξη των ευκαιριακών λοιμώξεων. Άλλα προϊόντα των καρκινικών κυττάρων,



όπως το FAS, μπορούν να καταστρέψουν ευαίσθητα όργανα σαν το συκώτι, ενώ εκτοπικά παραγόμενες ορμόνες μπορούν να εμπλακούν στις διαδικασίες ομοιόστασης του οργανισμού. Τέτοιου είδους έμμεσες διαταραχές της ομοιόστασης του σώματος από του καρκινικούς όγκους, οι οποίες χαρακτηρίζονται σαν παρανεοπλασματικά συμπτώματα, μπορούν να αποβούν τόσο προβληματικά για την υγεία και την επιβίωση του ασθενή όσο η ίδια η κακοήθης ανάπτυξη.

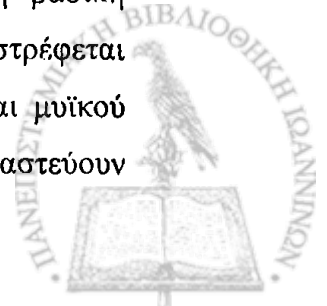
Ένας καθαρός τρόπος διάκρισης μεταξύ καρκινικού και μη-καρκινικού κυτταρικού πολλαπλασιασμού αφορά τη γενετική αστάθεια. Τα καρκινικά κύτταρα κατά κανόνα περιέχουν πολλές γενετικές και επιγενετικές αλλαγές. Η πολυπλοκειδία μπορεί να ανακαλυφθεί με τη μέτρηση του γενετικού περιεχομένου ενός κυττάρου, ενώ η ανευπλοειδία αποκαλύπτεται με κυτταρογενετικές μεθόδους. Αυτές οι παρεκκλίσεις από το φυσιολογικό αριθμό χρωμοσωμάτων συχνά είναι δυνατό να αποκαλυφθούν μετά από μικροσκοπική παρατήρηση του καρκινικού ιστού, λόγω του διαφορετικού μεγέθους και σχήματος των πυρήνων των καρκινικών κυττάρων και των παρεκκλινόντων μιτωτικών μορφών. Σε άλλες μορφές καρκίνου, τα κύτταρα παραμένουν διπλοειδή, αλλά περιέχουν σημειακές μεταλλάξεις ή / και αλλαγμένα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA. Καθώς ο καρκίνος εξελίσσεται, ο αριθμός των αλλαγών στο γενετικό τους υλικό τείνει να αυξάνεται. Για αυτό το λόγο άλλωστε, οι καρκινικοί όγκοι, παρά το ότι εξωτερικά φαίνονται «ομογενείς», συνήθως αποτελούνται από κυτταρικούς κλώνους που διαφέρουν έστω και ελάχιστα στη γενετική τους σύσταση. Οι διαφορετικοί κλώνοι υπόκεινται σε μια διαρκή επιλεκτική διαδικασία στηριζόμενη στην ταχύτητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων, την ικανότητα ανοχής των δυσμενών συνθηκών, την ικανότητα να αποφεύγουν την ανοσολογική απόκριση κτλ, με αποτέλεσμα ο καλύτερα προσαρμοσμένος κυτταρικός κλώνος να είναι και αυτός που επικρατεί των άλλων και αναπτύσσεται. Αυτή η ποικιλότητα γίνεται ιδιαίτερα εμφανής κατά τη χημειοθεραπεία του όγκου, η οποία ασκεί πολύ ισχυρή εξελικτική πίεση στους διάφορους κυτταρικούς κλώνους, με αποτέλεσμα να προωθούνται αλλαγές που επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να επιβιώνουν και να συνεχίζουν να εξαπλώνονται, παρά τη θεραπεία.

Πολλά καρκινικά κύτταρα «αθανατοποιούνται», γεγονός που σημαίνει ότι είναι σε θέση, θεωρητικά τουλάχιστον, να πολλαπλασιάζονται έπ' άπειρον. Τα περισσότερα κύτταρα στο ανθρώπινο σώμα μπορούν να υποστούν ένα πεπερασμένο αριθμό διαιρέσεων, συνήθως περί τις 60-80, πριν χάσουν ανεπιστρεπτί την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται. Είναι προφανές ότι τα γεννητικά κύτταρα, όπως και τα



βλαστικά κύτταρα (*stem cells*) των ιστών, εξαιρούνται αυτού του περιορισμού. Για παράδειγμα, τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών μπορούν να μεταμοσχευτούν επιτυχώς σε πολλούς λήπτες και να παραμείνουν ικανά να αναδομήσουν ολόκληρο το αιμοποιητικό σύστημα, αίμα και αμυντικά κύτταρα. Η αθανασία αυτών των κυττάρων διατηρείται από συγκεκριμένους μηχανισμούς, όπως η έκφραση της τελομεράσης, που επίσης συναντάται σε καρκίνους. Επιπρόσθετα, ορισμένα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν σε κυτταροκαλλιέργειες ή σαν μοσχεύματα σε ζώα (τα οποία χαρακτηρίζονται σαν *xenografts*) για πολλές διαδοχικές γενιές, από όσο μπορούμε να πούμε, πιθανότατα και για πάντα. Πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι δεν είναι απολύτως βέβαιο πως όλοι οι άνθρωποι καρκίνοι είναι αθανатоποιημένοι, καθώς υπάρχουν πολλοί από αυτούς που δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε καλλιέργειες ούτε σαν *xenografts*. Ακόμα και η έκφραση της τελομεράσης δεν είναι οικουμενική. Προκειμένου βέβαια ο καρκίνος να γίνει επίφοβος για τη ζωή, δεν απαιτείται να αποτελείται από κύτταρα με απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού. Ένα μοναδικό αρχικό κύτταρο, μετά από 50 κύκλους πολλαπλασιασμού θα αποδώσει 2^{49} καρκινικά κύτταρα, τα οποία αναλογούν σε περίπου 10^{13} με 10^{14} φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα. Οι θανατηφόροι όγκοι είναι πολύ μικρότεροι από αυτό.

Μια ιδιότητα πιο άμεσα προφανής στους ανθρώπινους καρκίνους είναι η ικανότητά τους για διήθηση των γειτονικών ιστών και μετάσταση. Η διήθηση και η μετάσταση είναι τα καθοριστικά κριτήρια που διαχωρίζουν ένα καλοήγη από ένα κακοήγη όγκο (η έκφραση «κακοήθης όγκος» είναι συνώνυμη με τον καρκίνο). Επιπλέον, η διήθηση και η μετάσταση, μαζί με την καχεξία και την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, φέρουν την ευθύνη για το μέγιστο της θνησιμότητας των ανθρώπινων καρκίνων. Κατά τη διήθηση, τα καρκινικά κύτταρα εξαπλώνονται από τη θέση δημιουργίας τους σε διαφορετικά στρώματα και μέρη του ίδιου ιστού και τελικά αναπτύσσονται πέρα και μέσα σε γειτονικές δομές. Η διήθηση περιλαμβάνει πολλαπλά βήματα και συχνά σημαντική αναμόρφωση της δομής του ιστού από τα καρκινικά κύτταρα, από άλλα κύτταρα του ιστού που αποκρίνονται σε σήματα των καρκινικών κυττάρων και από κύτταρα που συμμετέχουν στην ανοσολογική και φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού. Τυπικά, στα καρκινώματα, η βασική μεμβράνη που χωρίζει τα επιθηλιακά από τα μεσεγχυματικά κύτταρα καταστρέφεται και προεκτάσεις των όγκων προεκβάλλουν στα στρώματα συνδετικού και μυϊκού ιστού. Σε ορισμένα είδη καρκίνου, τα κύτταρα αποχωρίζονται και μεταναστεύουν



μέσω γειτονικών ιστών είτε σαν μεμονωμένα κύτταρα είτε σαν μικρά κυτταρικά συσσωματώματα.

Η διήθηση συχνά συνοδεύεται από φλεγμονή, επομένως λεμφοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα και μακροφάγα είναι παρόντα στον διηθημένο ιστό και την καρκινική μάζα. Ένα σημαντικό γεγονός της κακοήθους ανάπτυξης είναι η επαγωγή της αγγειογένεσης. Η παροχή θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου από προϋπάρχοντα αγγεία συνήθως δεν επαρκεί για να στηρίξει την ανάπτυξη των όγκων, πέρα από μερικά χιλιοστά σε μέγεθος. Έτσι, οι καρκινικοί όγκοι, αλλά και ορισμένοι καλοήθεις, επάγουν την αγγειογένεση, η οποία συνίσταται από την ανάπτυξη νέων τριχοειδών αγγείων και την αναδόμηση των ήδη υπαρχόντων αγγείων. Τα λεμφαγγεία επίσης αναδομούνται ή δημιουργούνται εκ νέου.

Κατά τη μετάσταση, τα καρκινικά κύτταρα αποχωρίζονται από τον πρωτογενή όγκο και μεταναστεύουν με το αίμα ή τη λέμφο σε διαφορετικά όργανα, όπου και σχηματίζουν νέους όγκους. Ανάλογα με την πορεία, η αιματογενής μετάσταση, η οποία συνήθως οδηγεί σε μεταστάσεις σε απομακρυσμένα όργανα, διαχωρίζεται από τη λεμφογενή μετάσταση, η οποία οδηγεί αρχικά στο σχηματισμό μετάστασης στους λεμφαδένες «αδειάζοντας» την περιοχή από την οποία ξεκίνησε ο καρκίνος. Η μετάσταση, όπως συμβαίνει και με τη διήθηση, είναι μια διαδικασία που συμβαίνει σε πολλά στάδια. Επομένως, ο αριθμός των κυττάρων που εισέρχονται στο αίμα ή τη λέμφο είναι μεγαλύτερος από τον αριθμό των μεταστάσεων που τελικά σχηματίζονται. Τα καρκινικά κύτταρα αντιμετωπίζουν σημαντικά εμπόδια στην προσπάθεια να εγκαταλείψουν τα αγγειακά σύστημα, να διαπεράσουν τα τριχοειδή και να καταφέρουν να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν στο μικροπεριβάλλον ενός διαφορετικού ιστού. Στην πραγματικότητα, μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα ή μικρές ομάδες κυττάρων μπορεί να καταλήξουν σε ένα διαφορετικό ιστό και να επιβιώσουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα, χωρίς να αυξηθεί ο όγκος τους. Αυτές οι μικρομεταστάσεις δεν είναι ανιχνεύσιμες με τις παρούσες τεχνικές απεικόνισης, παρόλο που μπορεί να ανιχνευθούν βιοχημικά μέσω πρωτεϊνών που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα. Με την πάροδο του χρόνου, μπορεί να προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον και να επεκταθούν σε μεγαλύτερες μεταστάσεις, θέτοντας σε κίνδυνο τη ζωή του ασθενή. Αυτό είναι δυνατό να συμβεί αρκετά χρόνια μετά την αφαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου. Οι διάφοροι τύποι καρκίνου διαφέρουν ως προς την έκταση και τις θέσεις μετάστασης. Γενικά, προτιμώνται για μετάσταση όργανα που διαθέτουν



εκτεταμένο σύστημα τριχοειδών αγγείων, όπως το συκώτι, ο πνεύμονας και τα οστά [3].

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Για να καταφέρει ένα μη φυσιολογικό κύτταρο να οδηγήσει στη δημιουργία ενός όγκου, θα πρέπει να μεταβιβάσει την «ανωμαλία» αυτή στους απογόνους του. Η διαταραχή δηλαδή θα πρέπει να είναι κληρονομήσιμη. Ένα από τα βασικά προβλήματα όσον αφορά την κατανόηση του καρκίνου είναι να ανακαλυφθεί εάν η κληρονομήσιμη εκτροπή οφείλεται σε γενετικές αλλαγές (αλλαγές στην αλληλουχία του DNA του κυττάρου) ή σε επιγενετικές αλλαγές (αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης του γονιδίου που δε συνοδεύονται από αλλαγές στην αλληλουχία του DNA).

Τα δεδομένα βέβαια δείχνουν ότι η συντριπτική πλειονότητα των καρκίνων έχουν σαν έναρξη τις γενετικές αλλαγές. Καταρχήν, μπορεί να καταδειχθεί ότι τα κύτταρα διάφορων μορφών καρκίνου παρουσιάζουν ανωμαλίες στην αλληλουχία του DNA τους, οι οποίες και τα διαχωρίζουν από τα φυσιολογικά κύτταρα που περιβάλλουν τον όγκο, όπως συμβαίνει στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία.

Επιπλέον, πολλοί από τους παράγοντες που είναι γνωστοί για την ικανότητά τους να προκαλούν την εμφάνιση καρκίνου, προκαλούν επίσης και γενετικές αλλαγές. Φαίνεται δηλαδή ότι η καρκινογένεση είναι άμεσα συνδεδεμένη με την μεταλλαξογένεση.

Τέλος, το συμπέρασμα ότι οι σωματικές μεταλλάξεις αποτελούν τη βάση για την ανάπτυξη του καρκίνου υποστηρίζεται από έρευνες σε άτομα τα οποία κληρονομούν μια ισχυρή ευαισθησία όσον αφορά την ασθένεια. Σε ένα σημαντικό ποσοστό των περιπτώσεων, η τάση για εμφάνιση καρκίνου μπορεί να ανιχνευθεί ως κάποιου είδους γενετική βλάβη στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA αυτών των ατόμων, γεγονός που επιτρέπει τη συσσώρευση μεταλλάξεων με αυξημένο ρυθμό.

Μια όμως και μοναδική μετάλλαξη δεν είναι σε θέση να προκαλέσει την εμφάνιση καρκίνου. Αν η μια αυτή μετάλλαξη ήταν ικανή να μετατρέψει ένα υγιές κύτταρο σε καρκινικό, δεν θα υπήρχαν βιώσιμοι οργανισμοί. Πολλά στοιχεία υποδηλώνουν ότι η γένεση του καρκίνου απαιτεί την πραγματοποίηση πολλών ανεξάρτητων, σπάνιων ατυχημάτων στη γενεαλογική σειρά ενός κυττάρου. Μια τέτοια ένδειξη προκύπτει από επιδημιολογικές μελέτες που αφορούν τη συσχέτιση



της εμφάνισης καρκίνου με την ηλικία. Εάν μια μόνο μετάλλαξη ήταν υπεύθυνη, με βάση ότι συμβαίνει με συγκεκριμένο ρυθμό κάθε έτος, η πιθανότητα να αναπτύξει κάποιος καρκίνο σε οποιοδήποτε χρόνο θα ήταν ανεξάρτητο της ηλικίας. Στην πραγματικότητα, όμως, στα περισσότερα είδη καρκίνου η συχνότητα αυξάνεται κατακόρυφα με την ηλικία, ακριβώς όπως αναμένεται για την περίπτωση που η ασθένεια προκύπτει σαν αποτέλεσμα της αργής συσσώρευσης τυχαίων μεταλλάξεων, σε μια κυτταρική γραμμή.

Σήμερα που ένας μεγάλος αριθμός συγκεκριμένων μεταλλάξεων έχει ταυτοποιηθεί σαν υπεύθυνος για την ανάπτυξη καρκίνου, μπορούμε να ελέγξουμε άμεσα για την παρουσία τους σε μια συγκεκριμένη περίπτωση. Τέτοιοι έλεγχοι έχουν αποκαλύψει ότι ένα μεμονωμένο κακόηθες κύτταρο συνήθως φέρει πολλαπλές μεταλλάξεις. Μοντέλα ζώων έχουν επίσης επιβεβαιώσει ότι μια και μόνη τέτοιου είδους γενετική αλλαγή είναι ανεπαρκής, όσον αφορά την πρόκληση καρκίνου. Γενετικά τροποποιημένα ποντίκια, στα οποία έχει προκληθεί μια μόνο μετάλλαξη, εμφανίζουν μικρές μόνο ανωμαλίες στην ανάπτυξη των ιστών, οι οποίες περιστασιακά ακολουθούνται από την ανάπτυξη τυχαία διασκορπισμένων καλοήθων όγκων. Η πλειονότητα, όμως, των κυττάρων του μεταλλαγμένου ζώου παραμένουν μη καρκινικά.

Το σκεπτικό ότι η ανάπτυξη καρκίνου απαιτεί μεταλλάξεις σε πολλά γονίδια (πιθανόν περισσότερα από δέκα) ταιριάζει με ένα μεγάλο αριθμό πληροφοριών, προερχόμενων από μελέτες ετών, που αφορούν το φαινόμενο της ανάπτυξης όγκων, με το οποίο μια αρχική ήπια δυσλειτουργία της κυτταρικής συμπεριφοράς εξελίσσεται σταδιακά σε πλήρους ανάπτυξης καρκίνο [2].

ΑΙΤΙΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΜΕΤΑΜΑΛΛΑΞΕΩΝ

Οι μεταλλάξεις που αποτελούν το έναυσμα και προωθούν τη δημιουργία όγκων μπορούν να προκληθούν από ένα αριθμό διαδικασιών. Εν συντομία, οι παράγοντες που εμπλέκονται είναι οι εξής:

1. Εγγενείς αλλαγές της γενετικής πληροφορίας. Υπάρχουν πολλές ενδογενείς διαδικασίες που αλλάζουν το πληροφοριακό περιεχόμενο του DNA. Αυτές οι διαδικασίες είναι αδιαχώριστες από τη λειτουργία και τα χαρακτηριστικά ενός οργανισμού και επηρεάζονται μόνο από εξωτερικούς παράγοντες σε μικρή έκταση.



2. Λάθη κατά την αντιγραφή του DNA. Η διαδικασία της αντιγραφής δεν πραγματοποιείται με απόλυτη ακρίβεια, αλλά έχει μια εσωτερική ανακρίβεια. Ο ρυθμός λάθους κατά την ενσωμάτωση των νουκλεοτιδίων στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA είναι περίπου μια λάθος ενσωμάτωση ανά $10^6 - 10^8$ σωστά τοποθετούμενα νουκλεοτίδια.

3. «Αυθόρμητες» βλάβες στο DNA. Το DNA έχει περιορισμένη σταθερότητα στις συνθήκες θερμοκρασίας και pH που επικρατούν στους ζωντανούς οργανισμούς. Στην πρώτη θέση των παραγόντων που μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA είναι το ενεργό οξυγόνο, ειδικά με τη μορφή του υπεροξειδικού ανιόντος και των ριζών υδροξυλίου. Πολλά χημικά συστατικά, με τα οποία μπορεί να αντιδράσει το DNA, περιέχονται επίσης σαν συστατικά στις τροφές που καταναλώνουμε. Επιπλέον, τέτοιου είδους συστατικά τροφών μπορούν να μετατραπούν μέσω του μεταβολισμού σε ενώσεις με υψηλό δυναμικό πρόκλησης βλαβών στο DNA.

4. Εξωτερικές βλάβες στο DNA. Ένας αριθμός εξωτερικών παραγόντων μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA και επομένως και μεταλλάξεις. Σε αυτούς τους παράγοντες περιλαμβάνονται χημικές ουσίες με καρκινογενετική δράση, η υπεριώδης ακτινοβολία, οι ακτίνες X, καθώς και άλλου είδους ακτινοβολίες με υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο (π.χ. ραδιενέργεια).

5. Ιοί. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός RNA και DNA ιών που σχετίζονται άμεσα με τη δημιουργία όγκων. Οι μηχανισμοί που κατά κύριο λόγο είναι υπεύθυνοι είναι τρεις: α) η εισαγωγή ιικών ογκογονιδίων στο γονιδίωμα του ξενιστή β) η αλληλεπίδραση με ειδικές ιικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες-σινιάλα του κυττάρου ξενιστή γ) ο έλεγχος της έκφρασης πρωτο-ογκογονιδίων από ένα ιικό υποκινητή [4].

ΠΡΩΤΟ-ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

Τα μιτογόνα σινιάλα που ένας οργανισμός χρησιμοποιεί για τον έλεγχο της διαδικασίας διαίρεσης των διαφόρων κυττάρων «καταγράφονται» από τους αντίστοιχους υποδοχείς και μετατρέπονται σε ενδοκυτταρικές αλυσίδες μηνυμάτων. Τα μηνύματα τελικά συναντιούνται στο σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Εκεί, αποφασίζεται εάν το κύτταρο θα διαιρεθεί ή όχι. Είναι επομένως αναμενόμενο ότι οι μεταλλάξεις, συσσωρευόμενες σε μια διαδικασία πολλών σταδίων στη μετάβαση ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό, θα είναι ιδιαίτερα ορατές σε γονίδια που εμπλέκονται στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης.

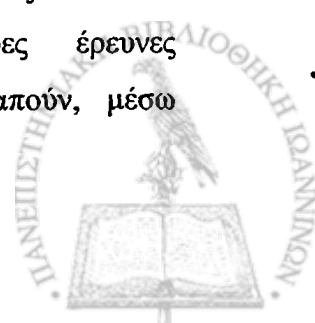


Η αναπτυξιακή συμπεριφορά ενός φυσιολογικού κυττάρου καθορίζεται από την ισορροπία μεταξύ θετικών επιρροών (που προωθούν τον πολλαπλασιασμό) και αρνητικών επιρροών (που αποτρέπουν τον πολλαπλασιασμό) και αυτή η σχέση είναι προσαρμοσμένη στη λειτουργία του κυττάρου εντός του οργανισμού. Ελαττώματα στη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης μπορεί να προκύψουν από λάθη σε θετικά, αλλά και σε αρνητικά σήματα. Εάν τα σήματα που προωθούν τη διαίρεση είναι υπερβολικά ενεργά, τα επηρεαζόμενα κύτταρα αποκτούν ένα αναπτυξιακό πλεονέκτημα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα και ευνοείται ο σχηματισμός όγκου. Το ίδιο αποτέλεσμα επιτυγχάνεται εάν τα αρνητικά, κατασταλτικά στοιχεία των μονοπατιών μιτογόνων σημάτων δε λειτουργούν πλέον. Ανεπάρκεια σε κατασταλτικά σήματα που ελέγχουν αρνητικά την αύξηση οδηγεί σε πλεόνασμα θετικών σημάτων και επομένως προωθεί την ανάπτυξη όγκου.

Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο δίκτυο του ελέγχου της ανάπτυξης, δεν είναι παράξενο ότι πολλά γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί, τα οποία, όταν είναι μεταλλαγμένα ή μη λειτουργικά, οδηγούν σε λάθη κατά τον έλεγχο της ανάπτυξης και συσχετίζονται με τη δημιουργία όγκων. Τα γονίδια αυτά χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες: τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση την επίδραση της μετάλλαξης στη λειτουργία.

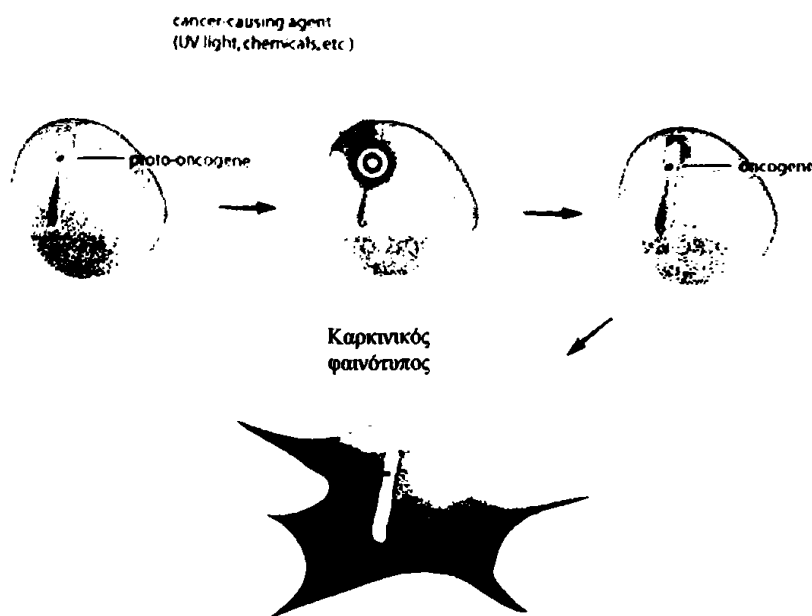
Ο όρος ογκογονίδιο δημιουργήθηκε σε σχέση με την έρευνα σε ρετροϊούς για παράγοντες που προκαλούν όγκους. Οι ρετροϊοί είναι εκείνη η κατηγορία ιών που περιλαμβάνουν σαν γενετικό υλικό RNA, το οποίο και μεταγράφουν σε DNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Ορισμένοι από τους αντιπροσώπους των ρετροϊών προκαλούν όγκους σε ζώα, όπως το ποντίκι και η κότα. Η ανακάλυψη των ογκογονιδίων ξεκίνησε από το γονίδιο *src* του ιού που προκαλεί το σάρκωμα του Rous και το οποίο αναγνωρίστηκε σαν ο παράγοντας ο υπεύθυνος για την πρόκληση όγκου από τον συγκεκριμένο ιό. Οι γονιδιακές περιοχές των ρετροϊών που ευθύνονται για το σχηματισμό όγκων ονομάστηκαν ογκογονίδια.

Σύντομα μετά την ανακάλυψη των ογκογονιδίων, ανακαλύφθηκε ότι τα ιικά ογκογονίδια αποτελούν τις μεταλλαγμένες μορφές γονιδίων κυτταρικών πρωτεϊνών που είναι επίσης ενεργά σε φυσιολογικά κύτταρα. Οι κυτταρικές μορφές των ιικών ογκογονιδίων ονομάστηκαν πρωτο-ογκογονίδια. Μεταγενέστερες έρευνες αποκάλυψαν ότι πρωτο-ογκογονίδια μπορούν επίσης να μετατραπούν, μέσω



μεταλλάξεων, σε ογκογονίδια, χωρίς τη μεσολάβηση ιών. Ο όρος λοιπόν ογκογονίδιο επεκτάθηκε και απέκτησε πιο γενικό ορισμό.

Τα ογκογονίδια είναι γονίδια που μπορούν να δώσουν ένα μετασχηματισμένο ή αθανатоποιημένο φαινότυπο, όπως έχει αποδειχθεί σε πειραματικούς μετασχηματισμούς μοντέλων κυτταρικών συστημάτων. Τα ογκογονίδια προκύπτουν από ενεργοποιητικές μεταλλάξεις πρόδρομων γονιδίων, των πρωτο-ογκογονιδίων. Τα πρωτο-ογκογονίδια είναι συνήθως άμεσα εμπλεκόμενα στη ρύθμιση της ανάπτυξης των φυσιολογικών κυττάρων. Τα ογκογονίδια έχουν συνήθως επικρατή χαρακτήρα (Εικόνα 1). Η μετάλλαξη ενός πρωτο-ογκογονιδίου σε ογκογονίδιο είναι φαινοτυπικά εμφανής όταν ένα μόνο από τα δυο αντίγραφα του γονιδίου ενός διπλοειδούς οργανισμού έχει επηρεαστεί από αυτή. Η επικρατής μετάλλαξη συνοδεύεται από μια ενισχυμένη λειτουργικότητα (*gain of function*) που οδηγεί συνήθως σε πολλαπλασιασμό ή αύξηση της απόδοσης μιας λειτουργίας όσον αφορά τη ρύθμιση της αύξησης.



Εικόνα 1: Διαδικασία μετατροπής πρωτο-ογκογονιδίου (*proto-oncogene*) σε ογκογονίδιο (*oncogene*) (Πηγή: <http://www.scq.ubc.ca>)

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι γονίδια που έχουν μια αρνητική, κατασταλτική επίδραση στη δημιουργία όγκων και κατ' επέκταση βοηθούν στην αποτροπή του σχηματισμού όγκων. Οι μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια



έχουν συνήθως υπολειπόμενο χαρακτήρα. Η μετάλλαξη ενός αλληλόμορφου ενός γονιδίου, αφήνει το άλλο αλληλόμορφο ανέπαφο να επιτελεί την ογκοκατασταλτική λειτουργία του. Μόνο όταν και τα δυο αλληλόμορφα έχουν ανενεργοποιηθεί το ογκοκατασταλτικό γονίδιο παύει να λειτουργεί. Μέσω αυτής της ιδιότητας, η ανενεργοποίηση γειτονικών γονιδίων-δεικτών κατά την ογκογένεση έχει βοηθήσει στην αναγνώριση ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

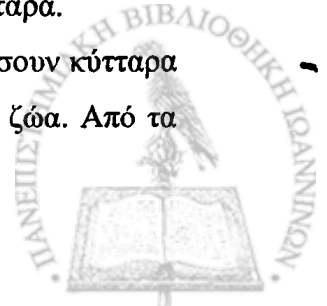
Οι όροι ογκογονίδιο και ογκοκατασταλτικό γονίδιο δεν παρέχουν καμία πληροφορία για την πραγματική λειτουργία του γονιδίου ή της πρωτεΐνης την οποία κωδικοποιούν. Τα γονίδια και των δυο αυτών κατηγοριών συνδέονται με ένα περίπλοκο τρόπο σε διαφορετικά σημεία του δικτύου που αφορά τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων [4].

Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΣΚΟΠΙΑ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Έχει ήδη αναφερθεί ότι μεταλλάξεις σε δυο μεγάλες τάξεις γονιδίων, τα πρωτο-ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, παίζουν κεντρικό ρόλο στην προαγωγή του καρκίνου. Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν πολλά είδη πρωτεϊνικών μορίων, τα οποία βοηθούν στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στην πραγματικότητα, όλοι οι όγκοι που συναντώνται στον άνθρωπο έχουν ανενεργοποιούσες μεταλλάξεις σε γονίδια, τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες ενεργούν σε διάφορα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου προκειμένου να διακόψουν την πρόοδό του. Εάν κάποιο από τα βήματα που προηγήθηκαν ήταν λανθασμένο ή το γενετικό υλικό του κυττάρου, το DNA, έχει υποστεί βλάβη. Για παράδειγμα, οι περισσότεροι καρκίνοι έχουν τέτοιου τύπου μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν για μια ή περισσότερες πρωτεΐνες, οι οποίες φυσιολογικά εμποδίζουν την εξέλιξη πέρα από τη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου. Για τον ίδιο λόγο, ένα διαρκώς ενεργό *Ras* ή άλλο πρωτεϊνικό προϊόν μεταγωγής σήματος βρίσκεται σε πολλούς τύπους ανθρώπινων όγκων που έχουν διαφορετικές προελεύσεις.

Στην ακολουθία των γεγονότων που οδηγούν στην ανάπτυξη ενός όγκου, τα ογκογονίδια συνδυάζονται με τα μεταλλαγμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια και έτσι δημιουργείται όλο το φάσμα των ιδιοτήτων που έχουν τα καρκινικά κύτταρα.

Τα ογκογονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες ικανές να μετασχηματίζουν κύτταρα σε κυτταροκαλλιέργειες ή να προκαλέσουν την ανάπτυξη καρκίνου σε ζώα. Από τα

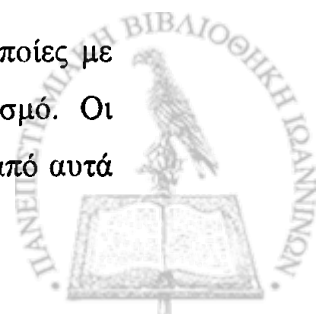


πολλά γνωστά ως τις μέρες μας ογκογονίδια, όλα, με ελάχιστες εξαιρέσεις, έχουν προκύψει από φυσιολογικά κυτταρικά γονίδια, των οποίων τα προϊόντα προωθούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Για παράδειγμα, το γονίδιο *ras* που ήδη αναφέρθηκε, είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο που κωδικοποιεί μια ενδοκυτταρική πρωτεΐνη μεταγωγής σήματος. Το μεταλλαγμένο γονίδιο *rasD*, είναι ένα ογκογονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που προκαλεί υπερβολική ή ανεξέλεγκτη ανάπτυξη. Άλλα πρωτο-ογκογονίδια κωδικοποιούν μόρια που λειτουργούν σαν σήματα προώθησης της ανάπτυξης και τους υποδοχείς τους, αντι-αποπτωτικές (κυτταρικής επιβίωσης) πρωτεΐνες, καθώς επίσης και κάποιους μεταγραφικούς παράγοντες.

Μετατροπή ή ενεργοποίηση ενός πρωτο-ογκογονιδίου σε ογκογονίδιο γενικά αφορά μια μετάλλαξη απόκτησης λειτουργίας (*gain-of-function*). Υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερις μηχανισμοί που μπορούν να παράγουν ογκογονίδια από τα αντίστοιχά τους πρωτο-ογκογονίδια: 1) Σημειακή μετάλλαξη σε ένα πρωτο-ογκογονίδιο που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ενός διαρκώς ενεργού πρωτεϊνικού προϊόντος, 2) Χρωμοσωμική μετατόπιση που συντήκει δυο γονίδια παράγοντας ένα υβριδικό γονίδιο που κωδικοποιεί για μια χιμαιρική πρωτεΐνη, της οποίας η ενεργότητα, σε αντίθεση με τις αρχικές πρωτεΐνες, είναι συχνά αδιάκοπη, 3) Χρωμοσωμική μετατόπιση που φέρει ένα γονίδιο που ρυθμίζει την ανάπτυξη κάτω από τον έλεγχο ενός διαφορετικού υποκινητή, προκαλώντας άτοπη έκφραση του γονιδίου, 4) Διπλασιασμός ενός τμήματος DNA που περιλαμβάνει ένα πρωτο-ογκογονίδιο, έτσι ώστε να υπάρχουν πολλά αντίγραφα που οδηγούν σε υπερπαραγωγή της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης.

Ένα ογκογονίδιο που προκύπτει με κάποιον από τους δυο πρώτους μηχανισμούς κωδικοποιεί μια «ογκοπρωτεΐνη» που διαφέρει από τη φυσιολογική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το αντίστοιχο πρωτο-ογκογονίδιο. Αντιθέτως, οι άλλοι δυο μηχανισμοί δημιουργούν ογκογονίδια, των οποίων τα πρωτεϊνικά προϊόντα είναι πανομοιότυπα με τα φυσιολογικά. Η ογκογενετική τους δράση οφείλεται στην πάνω από το φυσιολογικό παραγωγή των πρωτεϊνών ή στην παραγωγή τους σε κύτταρα που φυσιολογικά δεν παράγονται. Με οποιονδήποτε τρόπο κι αν προκύπτουν, οι μεταλλάξεις απόκτησης λειτουργίας που μετατρέπουν πρωτο-ογκογονίδια σε ογκογονίδια είναι επικρατείς, από γενετική άποψη.

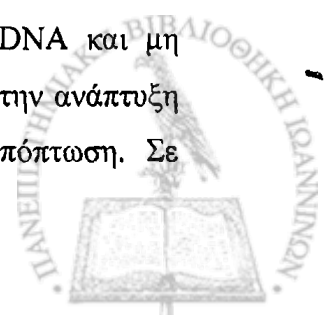
Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια γενικά κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες με τον ένα ή τον άλλο τρόπο καταστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας (*loss-of-function*) σε ένα ή περισσότερα από αυτά



τα κυτταρικά «φρένα» συντελούν στην ανάπτυξη πολλών μορφών καρκίνου. Υπάρχουν πέντε μεγάλες κατηγορίες πρωτεϊνικών μορίων που αναγνωρίζονται σαν προϊόντα των ογκοκατασταλτικών γονιδίων: 1) Ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν ή αναστέλλουν την εξέλιξη μέσω ενός συγκεκριμένου σταδίου του κυτταρικού κύκλου, 2) Υποδοχείς ή μεταγωγείς σημάτων για εκκρινόμενες ορμόνες ή αναπτυξιακά σήματα που αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, 3) Πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζουν τα σημεία ελέγχου που σταματούν τον κυτταρικό κύκλο σε περίπτωση κατεστραμμένου DNA ή μη φυσιολογικών χρωμοσωμάτων, 4) Πρωτεΐνες που προωθούν την απόπτωση, 5) Ένζυμα που συμμετέχουν στις διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA. Παρά το γεγονός ότι τα επιδιορθωτικά ένζυμα δεν εμπλέκονται άμεσα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κύτταρα τα οποία έχουν χάσει την ικανότητα να επιδιορθώνουν λάθη, κενά ή σπασμένα άκρα στο DNA, συσσωρεύουν μεταλλάξεις σε πολλά γονίδια, συμπεριλαμβανομένων αυτών που παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού. Επομένως, οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας σε γονίδια που κωδικοποιούν τα επιδιορθωτικά ένζυμα, δεν επιτρέπουν στα κύτταρα να επιδιορθώσουν τις μεταλλάξεις που ανενεργοποιούν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια ή ενεργοποιούν τα ογκογονίδια.

Εφόσον, γενικά, ένα αντίγραφο ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου επαρκεί για τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, θα πρέπει και τα δυο αντίγραφα ενός τέτοιου γονιδίου να χαθούν ή να χάσουν την ενεργότητά τους, ώστε να προκαλέσουν ανάπτυξη ενός όγκου. Οι μεταλλάξεις λοιπόν που λαμβάνουν χώρα σε ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι υπολειπόμενες. Σε πολλά είδη καρκίνου, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια παρουσιάζουν ελλείψεις ή σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες αποτρέπουν την παραγωγή οποιασδήποτε πρωτεΐνης ή οδηγούν στη δημιουργία μη λειτουργικών πρωτεϊνικών προϊόντων. Ένας επιπλέον μηχανισμός για την ανενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι η μεθυλίωση καταλοίπων κυτοσίνης στον υποκινητή ή άλλα στοιχεία ελέγχου του γονιδίου. Τέτοιο πρότυπο μεθυλίωσης εμφανίζεται συχνά σε μη μεταγραφόμενες περιοχές του DNA.

Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης, πολλά κύτταρα προορίζονται για προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, διαδικασία γνωστή και ως απόπτωση. Πολλές ανωμαλίες, όπως λάθη κατά τη μίτωση, καταστροφή του DNA και μη φυσιολογικός, υπερβολικός αριθμός κυττάρων που δε χρειάζονται για την ανάπτυξη ενός λειτουργικού οργάνου, μπορούν επίσης να διεγείρουν την απόπτωση. Σε



ορισμένες περιπτώσεις, ο κυτταρικός θάνατος φαίνεται να είναι μια «εξ ορισμού» διαδικασία, στην οποία απαιτούνται σήματα για τη διασφάλιση της κυτταρικής επιβίωσης. Τα κύτταρα μπορούν να λάβουν οδηγίες για να ζήσουν και οδηγίες για να πεθάνουν. Κι ένα πολύπλοκο ρυθμιστικό σύστημα αφομοιώνει τα διάφορα είδη πληροφοριών.

Εάν τα κύτταρα δεν πεθάνουν τη χρονική στιγμή που πρέπει, αλλά συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται, μπορεί να οδηγήσουν στο σχηματισμό ενός όγκου. Για παράδειγμα, η χρόνια λεμφοβλαστική λευχαιμία (CLL) εμφανίζεται γιατί τα κύτταρα επιβιώνουν ενώ θα έπρεπε να πεθαίνουν. Αυτά τα κύτταρα εμφανίζουν χρωμοσωμικές μετατοπίσεις που ενεργοποιούν το γονίδιο *Bcl-2*, γνωστό παρεμποδιστή της απόπτωσης. Η υπερπαραγωγή πρωτεϊνικών μορίων *Bcl-2*, λόγω της παραπάνω μετάλλαξης, αποτρέπει την απόπτωση και επιτρέπει την επιβίωση αυτών των κυττάρων. Πολλά ακόμα πρωτο-ογκογονίδια που φυσιολογικά εμπλέκονται στην αρνητική ρύθμιση της απόπτωσης έχουν υποστεί μεταλλάξεις που τα μετέτρεψαν σε ογκογονίδια. Υπερπαραγωγή των πρωτεϊνικών τους προϊόντων αποτρέπει την απόπτωση, ακόμα κι όταν είναι αναγκαίο να σταματήσουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων.

Αντιστρόφως, γονίδια των οποίων τα πρωτεϊνικά προϊόντα διεγείρουν την απόπτωση συμπεριφέρονται σαν ογκοκατασταλτικά. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο *PTEN*, το οποίο κωδικοποιεί μια φωσφατάση υπεύθυνη για την αποφωσφορυλίωση της 3,4,5-τριφωσφορικής φωσφατυδηλοϊνοσιτόλης. Η ένωση αυτή λειτουργεί σαν «δεύτερο μήνυμα» στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης B. Η απουσία της *PTEN* φωσφατάσης οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνικής κινάσης B, η οποία προωθεί την κυτταρική επιβίωση και αποτρέπει την απόπτωση, μέσω διαφόρων μονοπατιών.

Το πιο γνωστό προ-αποπτωτικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εμπλέκεται στον ανθρώπινο καρκίνο είναι το *p53*. Όταν τα κύτταρα εμφανίζουν εκτεταμένες βλάβες στο γενετικό υλικό, η έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών που προάγεται από το *p53* οδηγεί στη γρήγορη εξαφάνισή τους. Παρά το γεγονός ότι φαίνεται σαν δραστική απόκριση στην καταστροφή του DNA, αποτρέπει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων που έχουν πιθανότητα να συσσωρεύσουν πολλαπλές μεταλλάξεις. Όταν το *p53* χάσει τη λειτουργικότητά του, δεν είναι δυνατή η επαγωγή της απόπτωσης και η συσσώρευση μεταλλάξεων που απαιτούνται για την ανάπτυξη καρκίνου είναι πιο πιθανή. Οι όγκοι που χαρακτηρίζονται από απώλεια του *p53* ή



άλλου αναγκαίου για την απόπτωση γονιδίου είναι δύσκολο να αντιμετωπιστεί θεραπευτικά με χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία, εφόσον η προκαλούμενη βλάβη στο γενετικό υλικό δεν μεταφράζεται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο [5].



2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Το παχύ έντερο συνιστά το τελικό τμήμα του πεπτικού σωλήνα και χωρίζεται ανατομικά στα εξής μέρη: το τυφλό, το ανιόν, το εγκάρσιο, το κατión, το σιγμοειδές κόλον και το ορθό. Μικροσκοπικά αποτελείται από τέσσερις χιτώνες, το βλεννογόνο, τον υποβλεννογόνο, το μυϊκό και τον ορογόνο. Το παχύ έντερο είναι η θέση ανάπτυξης των περισσότερων πρωτοπαθών νεοπλασμάτων από οποιοδήποτε άλλο όργανο του σώματος. Εδώ παρατηρούνται επίσης και μη νεοπλασματικά πολυποειδή μορφώματα [6].

Τα καρκινώματα του κόλον και του ορθού (που συμπεριλαμβάνονται στον όρο καρκίνος του παχέος εντέρου) είναι από τους κυρίαρχους τύπους καρκίνου στις δυτικές βιομηχανοποιημένες χώρες. Αρκετά κληρονομικά σύνδρομα αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισής του, ενώ έχει αποκαλυφθεί και το βασικό βιολογικό μονοπάτι που εμπλέκεται στην ανάπτυξή του. Αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα καρκίνου που μπορεί να προκληθεί από διάφορους μηχανισμούς.

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί την τρίτη αιτία θανάτου από καρκίνο, τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες, στις χώρες του δυτικού κόσμου. Η σημασία του όμως είναι πολύ μικρότερη στις χώρες του αναπτυσσόμενου κόσμου, στις πλουσιότερες χώρες της Ασίας, αλλά και στην Νότια Ευρώπη. Στις ΗΠΑ ευθύνεται για το 10-11% των συνολικών κρουσμάτων, αλλά και θανάτων από καρκίνο, ενώ στην Ελλάδα το ποσοστό επί των θανάτων από καρκίνο πέφτει στο 7,5% [7]. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια υπάρχει πτωτική τάση σε αυτά τα ποσοστά, κυρίως χάρη στη βελτίωση της έγκαιρης διάγνωσης και θεραπείας και την αύξηση της αφαίρεσης πολυπόδων που μπορεί να καταλήξουν σε καρκίνο του εντέρου.

Οι διαφορές αυτές είναι ενδεικτικές της σημασίας του τρόπου ζωής στην αιτιολογία του καρκίνου του παχέος εντέρου. Ο βασικός παράγοντας κινδύνου για καρκίνο του παχέος εντέρου είναι η ηλικία. Περισσότερο από 90% των κρουσμάτων αφορούν ασθενείς μεγαλύτερους των 50 ετών. Ο κίνδυνος αυξάνεται όταν υπάρχει ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό καρκίνου ή πολυπόδων στο παχύ έντερο, ή ακόμη και ατομικό ιστορικό φλεγμονής στο έντερο. Το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, η απουσία φυσικής δραστηριότητας, η πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά και κόκκινο κρέας διαίτα, η ελλιπής κατανάλωση φρούτων και λαχανικών και το μεγάλο βάρος



αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου. Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν τον προστατευτικό ρόλο της ορμονοθεραπείας με οιστρογόνα και προγεστίνες και της κατανάλωσης μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, όπως η ασπιρίνη.

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η πραγματοποίηση εξετάσεων για διάγνωση καρκίνου του παχέος εντέρου συνίσταται μετά την ηλικία των 50 ετών. Οι εξετάσεις αυτές περιλαμβάνουν το fecal occult blood test (FOBT) ή fecal immunochemical test (FIT), τη σιγμοειδοσκοπία (FSIG), το κλύσμα βαρίου διπλής αντίθεσης (double-contrast) και την κολονοσκόπηση [7].

Η χειρουργική αφαίρεση είναι ο συνηθέστερος τρόπος αντιμετώπισης του καρκίνου του εντέρου. Σπάνια είναι η ανάγκη δημιουργίας μόνιμης κολονοστομίας. Χημειοθεραπεία ή / και ακτινοθεραπεία χορηγείται πριν ή μετά το χειρουργείο, σε περιπτώσεις όπου έχει διεισδύσει βαθιά στα τοιχώματα του εντέρου ή έχει κάνει μεταστάσεις στους λεμφαδένες. Οι ουσίες που χορηγούνται σήμερα περιλαμβάνουν οξαλαπλατίνη, 5-φλουορουρακίλη και λευκοβορίνη (oxalaplatin, 5-fluorouracil/5-FU και leucovorin/LV), ενώ δύο νέες στοχευμένες θεραπείες έχουν αναπτυχθεί με χρήση των σκευασμάτων Avastin (bevacizumab), που αναστέλλει την ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων στον όγκο, και Erbitux (cetuximab) που παρεμποδίζει τη δράση των ορμονικών παραγόντων που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Η πρόγνωση γίνεται πολύ χειρότερη όταν ο όγκος έχει επεκταθεί στους λεμφαδένες, το ήπαρ, τους πνεύμονες ή άλλα όργανα. Στην περίπτωση αυτή, η εγχείρηση και η χημειοθεραπεία συνήθως απλώς επιμηκύνουν την επιβίωση [3].

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Έχει αποδειχθεί, τόσο μορφολογικά όσο και μοριακά, ότι η ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου παρουσιάζει αρκετά πρόδρομα στάδια. Τα πρώτα από αυτά περιλαμβάνουν την ανάπτυξη υπερ- ή δυσπλαστικών κρυπτών και αδενωματωδών πολυπόδων. Οι πολύποδες εμφανίζονται ως μονήρεις καλοήθεις όγκοι που προεκβάλλουν προς την κοιλότητα του εντέρου και αποτελούνται από πεπαχυμένο, αποδιοργανωμένο επιθήλιο. Πολλαπλοί πολύποδες μπορούν επίσης να

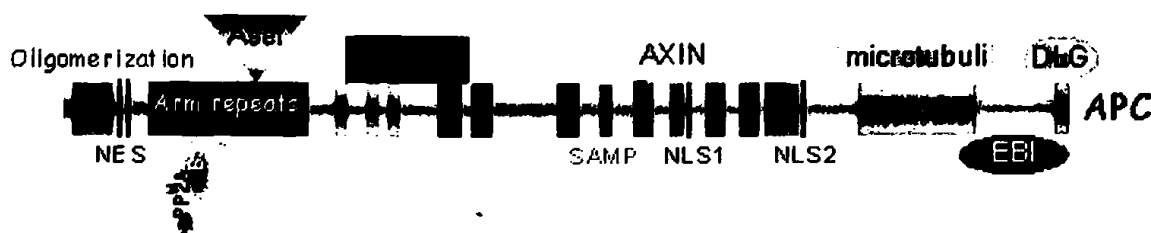


αναπτυχθούν σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως στο κληρονομικό σύνδρομο οικογενούς αδενωματοώδους πολυποδίασης (*familial adenomatous polyposis coli*, FAP). Η διείσδυση των καρκινικών κυττάρων δια μέσου της βασικής μεμβράνης στο υπερκείμενο μεσέγχυμα αποτελεί το διαγνωστικό κριτήριο του καρκίνου [8].

FAP ΚΑΙ ΜΟΝΟΠΑΤΙ WNT

Το σύνδρομο FAP κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονομικότητας. Η νόσος εμφανίζεται στην εφηβεία ή στην αρχή της ενήλικης ζωής, όπου ανακαλύπτονται άφθονοι αδενωματοώδεις πολύποδες (500-2500) να επικαλύπτουν όλο το βλεννογόνο [6]. Αποτελεί το κυριότερο από τα σύνδρομα που αυξάνουν τον κίνδυνο για καρκίνο του παχέος εντέρου. Αυτά τα σύνδρομα διακρίνονται από το είδος των όγκων και τις αναπτυξιακές ατέλειες που εμφανίζονται σε άλλα όργανα πλην του εντέρου. Ασθενείς με τυπικό σύνδρομο FAP αναπτύσσουν εκατοντάδες αδενωματοώδεις (δηλ. καλοήθεις) όγκους στο κόλον, το ορθό, το δωδεκαδάκτυλο, αλλά και το στομάχι, από πολύ νεαρή ηλικία. Τελικά, κάποιοι από τους πολύποδες γίνονται κακοήθεις, οπότε αναπτύσσονται καρκινώματα, συνήθως στην τρίτη ή τέταρτη δεκαετία ζωής. Η συνολική πιθανότητα για ανάπτυξη καρκίνου σε όλη τη διάρκεια της ζωής προσεγγίζει το 100%.

Το γονίδιο που ευθύνεται για το FAP, αλλά και το συγγενές σύνδρομο Gardner, ταυτοποιήθηκε το 1991 και ονομάστηκε APC (*Adenomatous Polyposis Coli*). Είναι ένα μεγάλο γονίδιο στο χρωμόσωμα 5q21 από το οποίο παράγεται πρωτεΐνη που περιέχει αλληλουχίες πρόσδεσης διάφορων πρωτεϊνών (όπως β-κατενίνη, συνθετάση του γλυκογόνου 3β/GSK3β, αξίνη, αξίνη 2, EB1 και DLG) και ολιγομερισμού (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Το γονίδιο APC και οι προσδεδεμένοι παράγοντες (Πηγή: *Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology*, <http://atlasgeneticsoncology.org>)

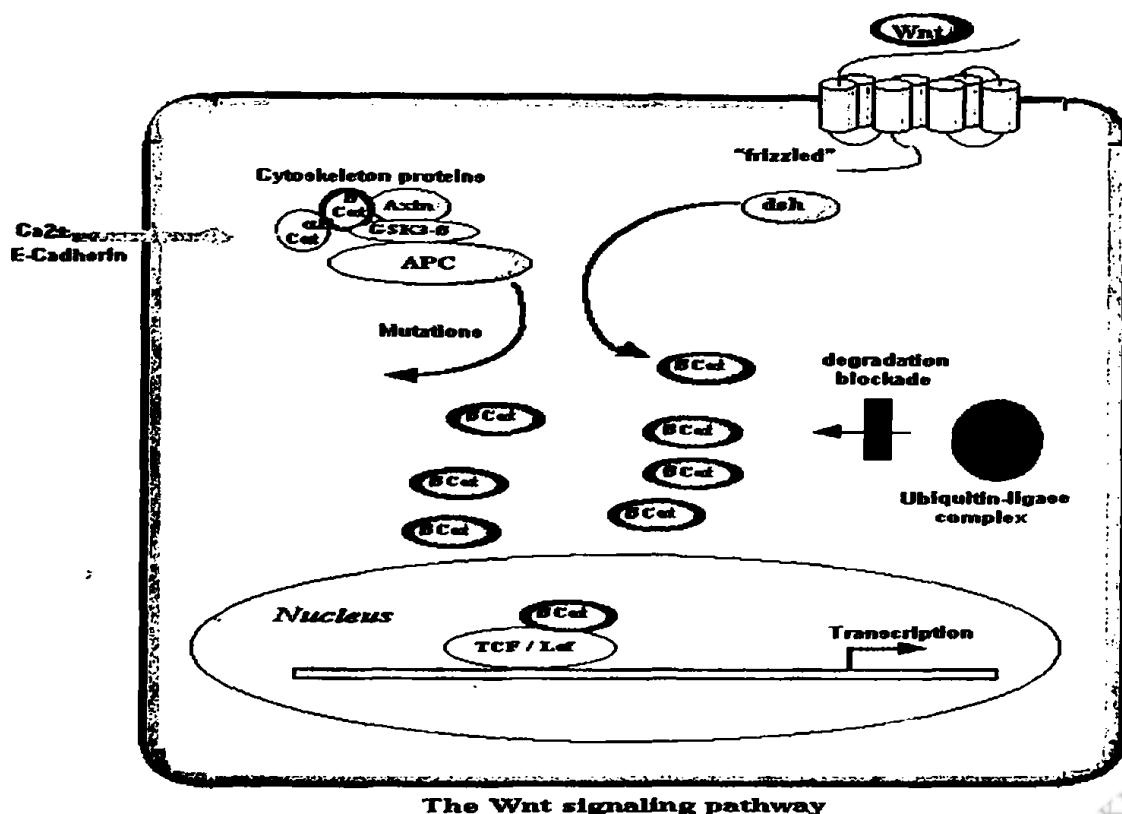


Υπάρχουν ενδείξεις ότι η λειτουργία του APC εντοπίζεται στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση. Απώλεια της λειτουργίας αυτής ευνοεί την ανάπτυξη ανευπλοειδιών στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Οι ασθενείς με FAP κληρονομούν μια μετάλλαξη σε ένα αλληλόμορφο APC. Οι περισσότερες είναι μεταλλάξεις χωρίς νόημα (*non-sense mutations*) που σχηματίζουν κολοβωμένη ή ασταθή πρωτεΐνη. Η θέση κάθε μετάλλαξης φαίνεται να καθορίζει το φάσμα των οργάνων όπου θα αναπτυχθούν υπερπλασίες και όγκοι και κατ' επέκταση το ποιο σύνδρομο θα παρουσιαστεί [9].

Η παρατήρηση ότι ελλείψεις και απώλεια της ετεροζυγωτίας (*loss of heterozygosity*, LOH) στο χρωμόσωμα 5q είναι από τις συχνότερες αλλοιώσεις στον καρκίνο του παχέος εντέρου, σε συνδυασμό με την ενοχοποίηση των μεταλλάξεων του APC για το σύνδρομο FAP, οδήγησε στην εκτεταμένη μελέτη των σποραδικών καρκινωμάτων για μεταλλάξεις στο γονίδιο. Σήμερα, θεωρείται ότι στο 70-80% των καρκίνων του παχέος εντέρου, ανεξάρτητα από το αν είναι κληρονομικοί ή σποραδικοί, και τα δύο αλληλόμορφα γονίδια αδρανοποιούνται από σημειακές μεταλλάξεις, ελλείψεις / ανασυνδυασμό ή υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου. Επιπλέον, η συχνότητα των μεταλλάξεων του APC είναι σχεδόν η ίδια σε όλα τα στάδια του όγκου. Έτσι, το ογκοκατασταλτικό αυτό γονίδιο θεωρείται θεμελιώδες για την ανάπτυξη καρκίνου στο παχύ έντερο. Ο κρίσιμος ρόλος του ενισχύεται από την παρατήρηση ότι το ~20% των καρκίνων που διατηρούν μια πλήρως λειτουργική APC πρωτεΐνη περιέχουν σχεδόν πάντα μεταλλάξεις σε άλλα συστατικά του συμπλόκου APC / β-κατενίνης / Αξίνης / GSK3β. Σε όλες τις περιπτώσεις υπάρχει διαταραχή του μονοπατιού μεταγωγής σήματος Wnt (*Wingless pathway*) [10].

Περισσότερες από 20 πρωτεΐνες ανήκουν στην οικογένεια των αυξητικών παραγόντων Wnt. Οι πρωτεΐνες, αφού γλυκοζυλιωθούν και συνδεθούν ομοιοπολικά με λιποφιλικές ομάδες, εκκρίνονται στο εξωκυττάριο στρώμα και προσδένονται στις κυτταρικές μεμβράνες. Έτσι, λειτουργούν ως παρακρινείς ή αυτοκρινείς παράγοντες. Κατά την ανάπτυξη, οι πρωτεΐνες Wnt καθοδηγούν την μορφογένεση διάφορων οργάνων, κυρίως υαλακωτών και σωληνοειδών επιθηλιακών δομών στο νεφρό και το έντερο. Εμπλέκονται επίσης στην ανάπτυξη των άκρων, την ομοιόσταση των ιστών και τον έλεγχο των βλαστικών κυττάρων, π.χ. στο γαστρεντερικό σύστημα. Οι παράγοντες Wnt αναγνωρίζονται από μία ομάδα σπειροειδών πρωτεϊνικών υποδοχέων (*frizzled receptor proteins*, FZD) στην κυτταρική επιφάνεια, με τη

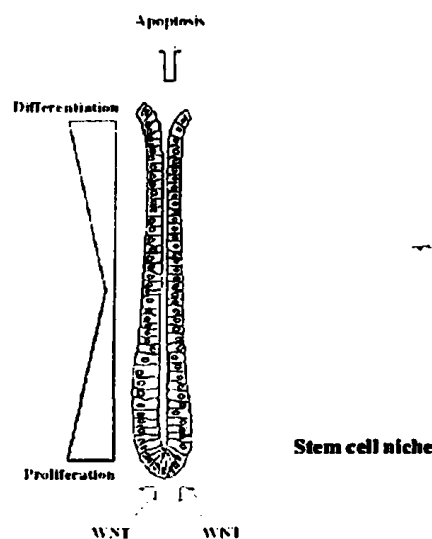
βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών FRP (FRP5 και FRP6) που αναγνωρίζουν τις λιπιδικές ομάδες των Wnt. Οι υποδοχείς FZD διαφέρουν μεταξύ τους όχι μόνο ως προς το ποια Wnt προσδέουν, αλλά και ως προς το ποιο ενδοκυτταρικό μονοπάτι ενεργοποιούν. Τουλάχιστον τρία τέτοια μονοπάτια είναι γνωστά, αλλά μόνο το ένα είναι καλά χαρακτηρισμένο. Σε αυτό, που ονομάζεται μονοπάτι Wnt / β-κατενίνης (Εικόνα 3), ενεργοποίηση του FZD ενεργοποιεί την πρωτεΐνη DSH, η οποία στη συνέχεια αναστέλλει τη δράση της GSK3β. Φυσιολογικά, η κινάση αυτή σχηματίζει σύμπλοκο με την APC και την Αξίνη, το οποίο δεσμεύει τη β-κατενίνη. Χωρίς σήμα από Wnt, η β-κατενίνη φωσφορυλιώνεται από την GSK3β. Η φωσφορυλίωση επιτρέπει στη β-κατενίνη να αναγνωριστεί από σύμπλοκα ουμπικιτίνης. Αναστολή της GSK3β ως συνέπεια ενός σήματος Wnt, προκαλεί συσσώρευση της β-κατενίνης [11,12]. Η πρωτεΐνη τότε μεταναστεύει στον πυρήνα, όπου προσδέει και ενεργοποιεί παράγοντες μεταγραφής (TCF), ιδιαίτερα τον TCF4, στα εντερικά κύτταρα. Έτσι, επάγεται η μεταγραφή των γονιδίων-στόχων των TCF παραγόντων, μεταξύ των οποίων βρίσκονται γονίδια που εμπλέκονται άμεσα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως τα CCDN1 και MYC [13].



Εικόνα 3: Το μεταβολικό μονοπάτι Wnt - β-κατενίνης (Πηγή: *Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology*, <http://atlasgeneticsoncology.org>)

Η συνεχής ενεργοποίηση του εν λόγω μονοπατιού είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Η απορύθμισή του προκαλείται είτε από την απώλεια λειτουργίας των αρνητικών ρυθμιστών, όπως το APC και η αξίνη, είτε από μεταλλάξεις που ενεργοποιούν τη β-κατενίνη. Για το λόγο αυτό το APC συμπεριφέρεται ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο.

Η απαίτηση για συνεχή ενεργότητα του μονοπατιού Wnt στον καρκίνο του παχέος εντέρου πιθανώς να σχετίζεται με την οργάνωση του εντερικού ιστού (Εικόνα 4). Το επιθήλιο του κόλον είναι ένας ιστός που συνεχώς ανανεώνεται. Τα κύτταρά του προέρχονται από ένα μικρό αριθμό βλαστικών κυττάρων, τα οποία εδρεύουν στη βάση της κρύπτης και διαιρούνται μη συμμετρικά. Από τα δύο θυγατρικά κύτταρα κάθε διαίρεσης, το ένα διατηρεί τον χαρακτήρα αρχέγονου κυττάρου ενώ το άλλο εισέρχεται σε διαδικασία διαφοροποίησης, ενώ παράλληλα μετακινείται προς το πάνω μέρος της κρύπτης και χάνει την ικανότητα πολλαπλασιασμού. Τα κύτταρα που φτάνουν στην επιφάνεια αποκολλώνται ή υφίστανται απόπτωση. Η δράση του μονοπατιού Wnt φαίνεται να είναι βασική σε αυτήν τη διαδικασία. Οι παράγοντες Wnt παράγονται από μεσεγχυματικά κύτταρα κοντά στη θέση των αρχέγονων κυττάρων, επιτρέποντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαίωση του πληθυσμού τους. Καθώς τα θυγατρικά κύτταρα απομακρύνονται από την πηγή των παραγόντων, επάγονται κυτταρικά προγράμματα πολλαπλασιασμού και απόπτωσης [14].



Εικόνα 4: Οργάνωση και πολλαπλασιασμός των κρυπών του κόλον (Πηγή: "Molecular Biology of Human Cancers, Chapter 13: Colon Cancer" Schulz WA, Springer Science, c 2005)



* Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία διαφοροποίησης παίζουν οι πρωτεΐνες εφρίνες (*ephrens*) και οι υποδοχείς τους, που καταστέλλονται από το μονοπάτι Wnt. Η συνεχής δράση αυτού του μονοπατιού, εμποδίζει τη διαφοροποίηση και την απόπτωση και επάγει συμπεριφορά βλαστικού κυττάρου στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, ανεξαρτήτως της θέσης τους στον ιστό.

ΜΟΝΤΕΛΟ ΠΟΛΥΣΤΑΔΙΑΚΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ

Γίνεται κατανοητό λοιπόν από το σύνδρομο FAP, ότι η αδρανοποίηση και των δύο αλληλόμορφων APC επαρκεί για το σχηματισμό καλοηθών αδеноματωδών πολυπόδων στο έντερο. Για τη μετάβαση, όμως, σε κακοήθεια, απαιτούνται επιπλέον γενετικές αλλαγές. Οι προχωρημένοι καρκίνοι του παχέος εντέρου φέρουν ποικίλες γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις, εκτός από ελλείψεις στο χρωμόσωμα 5q και μεταλλάξεις του APC ή του CTNNB1. Κάποιες από αυτές τις αλλαγές είναι καλά χαρακτηρισμένες [15].

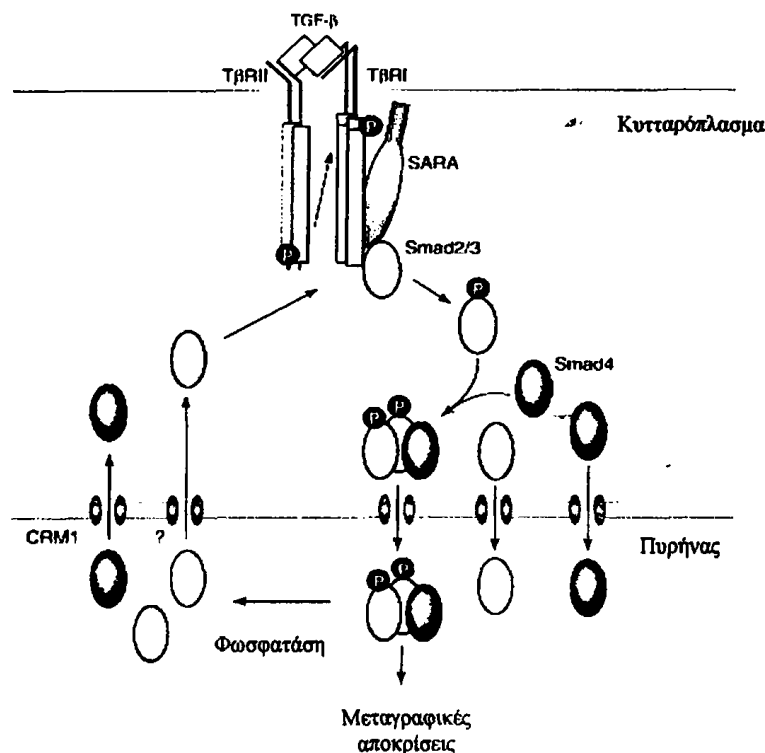
Οι πρωτεΐνες *ras* λειτουργούν ως μεταγωγείς σήματος σε αρκετά μονοπάτια (MAPK και PI3K μονοπάτια, ρύθμιση της δομής του κυτταροσκελετού), συμμετέχοντας σε πολλές κρίσιμες κυτταρικές λειτουργίες. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, το πρωτο-ογκογονίδιο K-*ras* ενεργοποιείται από σημειακές μεταλλάξεις που εμποδίζουν τη δράση της GTPάσης του *ras* και επιμηκύνουν την ενεργό κατάσταση, κατά την οποία η πρωτεΐνη μετάγει σήματα. Οι μεταλλάξεις αυτές ανιχνεύονται στο 30-70% όλων των καρκίνων του παχέος εντέρου, ενώ είναι συχνότερες στα καρκινώματα από ό,τι στα αδενώματα. Πιθανώς διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του όγκου, ευνοώντας τη μετάβαση από αδένωμα σε καρκίνωμα. Επιπροσθέτως, η επίδραση του *ras* στον κυτταροσκελετό και την πρωτεϊνοσύνθεση πιθανώς αυξάνει το διηθητικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων [16].

Η δράση ογκογονιδίων, όπως τα Ras και Myc, ισοσταθμίζεται στα φυσιολογικά κύτταρα από τη λειτουργία της κυτταρικής γήρανσης και της απόπτωσης. Ένας σημαντικός μηχανισμός περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του p14^{ARF1} από τα παραπάνω και άλλα ογκογονίδια. Το p14^{ARF1} προκαλεί ενεργοποίηση και σταθεροποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Έτσι εξηγείται η παρατήρηση ότι σε πολλούς προχωρημένους καρκίνους του παχέος εντέρου έχει απολεσθεί η λειτουργικότητα του p53. Η απώλεια του λειτουργικού p53 καταστέλλει επίσης την κυτταρική αντίδραση σε άλλες μορφές κυτταρικού στρες, όπως βλάβες

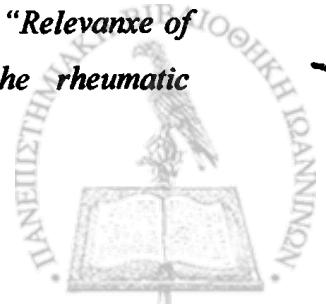


του DNA, ανευπλοειδία κ.α. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, η απώλεια αυτή συσχετίζεται με την εξέλιξη του όγκου, ενώ παράλληλα εξασθενεί σημαντικά τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, με αποτέλεσμα να διευκολύνονται οι μεταλλάξεις στο K-Ras και να αυξάνεται η γενωμική αστάθεια [10, 17].

Στα επιθηλιακά κύτταρα, το μονοπάτι που ενεργοποιείται από τον TGFβ μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγει τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις με το εξωκυττάριο στρώμα (Εικόνα 5). Έτσι δικαιολογείται η παρατήρηση ότι το παραπάνω μονοπάτι αδρανοποιείται συχνότατα στους πολύ διηθητικούς καρκίνους. Επιπλέον, η έκκριση του TGFβ από τα καρκινικά κύτταρα τροποποιεί την αλληλεπίδρασή τους με τα κύτταρα του στρώματος και του ανοσοποιητικού συστήματος στη θέση του πρωτογενούς όγκου και κατά τη διάρκεια της μετάστασης. Η παύση της μεταγωγής σήματος από τον TGFβ στον καρκίνο του παχέος εντέρου μπορεί να προκαλείται από διάφορες γενετικές βλάβες. Αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν κολοβωμένες μεταλλάξεις του υποδοχέα TGFβRII, έλλειψη αλληλόμορφου στη χρωμοσωμική περιοχή 18q, όπου εδρεύουν τα γονίδια SMAD2 και SMAD4, ή σημειακές μεταλλάξεις και ελλείψεις των ίδιων γονιδίων [18, 19].



Εικόνα 5: Μεταβολικό μονοπάτι *tgfβ-smad* (Πηγή: Zvaifler NJ "Relevance of the stroma and epithelial-mesenchymal transition (EMT) for the rheumatic diseases" *Arthritis Res Ther* 2006, 8(3):210)



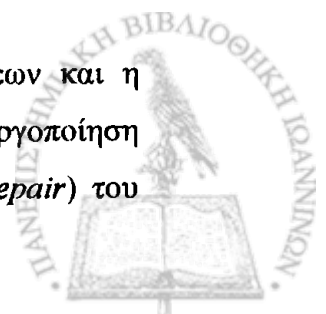
Έτσι, κατά την εξέλιξη ενός όγκου στο παχύ έντερο σε διηθητικό μεταστατικό καρκίνο, συσσωρεύονται διάφορες γενετικές αλλοιώσεις. Οι ελάχιστες απαραίτητες συνθήκες για αυτή τη μετάβαση μπορεί να περιλαμβάνουν τη συνεχή ενεργότητα του μονοπατιού Wnt, την ενεργοποίηση της μεταγωγής σήματος από το Ras, την απώλεια της λειτουργίας του p53 και την απενεργοποίηση της μεταγωγής σήματος από τον TGFβ. Καθεμία από τις παραπάνω αλλαγές πιθανώς να προαπαιτεί περισσότερες γενετικές ή επιγενετικές μεταβολές. Συνεπώς, τουλάχιστον 5-7 τέτοιες αλλαγές φαίνεται να χρειάζονται για την μετάβαση του όγκου σε πλήρη κακοήθεια, αλλά ο αριθμός αυτός ίσως να είναι αρκετά μεγαλύτερος.

ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΣ ΟΡΘΟΚΟΛΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΟΥ ΔΕ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΠΟΛΥΠΟΔΕΣ

Στο FAP και άλλες κληρονομικές νόσους, πολλαπλοί πολύποδες αναπτύσσονται στο παχύ έντερο, από τους οποίους προκύπτουν τελικά καρκινώματα. Σε άλλη περίπτωση κληρονομικού καρκίνου του εντέρου, που κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο, δεν παρατηρείται σχηματισμός πολυπόδων. Το σύνδρομο αυτό ονομάζεται Κληρονομικός ορθοκολικός καρκίνος που δε σχετίζεται με πολύποδες (*Hereditary non-polyposis colon carcinoma*, HNPCC), είναι πολύ συχνότερο από το FAP και η μελέτη του μπορεί να φωτίσει τους μηχανισμούς καρκινογένεσης στο παχύ έντερο και σε άλλα όργανα.

Οι καρκίνοι του παχέος εντέρου που σχετίζονται με το HNPCC συνήθως εντοπίζονται σε ανώτερα τμήματα του κόλον και έχουν καλύτερη πρόγνωση από εκείνους που σχετίζονται με το σύνδρομο FAP. Η βασικότερη διαφορά, όμως, έγκειται στον τύπο των μεταλλάξεων που συναντώνται στα καρκινώματα HNPCC. Σημειακές μεταλλάξεις, αντικαταστάσεις βάσεων, ελλείψεις και προσθήκες μικρής έκτασης είναι οι συνηθέστερες αλλαγές, ενώ οι χρωμοσωμικές αλλοιώσεις είναι αρκετά σπανιότερες. Ένα άλλο φαινόμενο που παρατηρείται συχνά είναι αυτό της μικρο-δορυφορικής αστάθειας (*microsatellite instability*, MSI) που εκδηλώνεται ως επέκταση ή σμίκρυνση μιας μικρο-δορυφορικής αλληλουχίας και προκαλείται από μεταλλάξεις προσθήκης ή έλλειψης, αντίστοιχα [8].

Η αυξημένη συχνότητα πραγματοποίησης σημειακών μεταλλάξεων και η αστάθεια των μικρο-δορυφορικών αλληλουχιών οφείλονται σε απενεργοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση κακής ζεύξης (*mismatch repair*) του



DNA. Ένας από τους πιο σημαντικούς επιδιορθωτικούς μηχανισμούς αναγνωρίζει τα λάθη στο ταίριασμα των συμπληρωματικών βάσεων και διαφορές στον αριθμό των βάσεων ανάμεσα στις δύο αλυσίδες του DNA, που προκαλούνται από ενσωμάτωση λάθος βάσης ή «γλίστρημα» της DNA πολυμεράσης. Η αναγνώριση του σφάλματος πραγματοποιείται από ετεροδιμερείς πρωτεΐνες που σχηματίζονται από τις MSH2 και MSH6 ή τις MSH3 και MSH6 υπομονάδες. Στη συνέχεια, άλλα τμήματα του συμπλόκου, στα οποία συμμετέχουν οι πρωτεΐνες PMS1, PMS2 και MLH1, απομακρύνουν τα λάθος νουκλεοτίδια, μια επιδιορθωτική DNA πολυμεράση συνθέτει τη σωστή αλληλουχία και μια DNA δεσμάση ενώνει τα δύο τμήματα της διορθωμένης αλυσίδας [20].

Στους ασθενείς με HNPCC ανιχνεύονται πολύ συχνά μεταλλάξεις στα γονίδια MSH1, MLH1, PMS1, PMS2 ή MSH6 ή άλλα γονίδια των επιδιορθωτικών μηχανισμών. Είναι σημαντικό ότι η μετάλλαξη που κληρονομείται από το ένα αλληλόμορφο δεν επαρκεί για να προκαλέσει καταστολή του επιδιορθωτικού μηχανισμού. Για να συμβεί αυτό, απαιτείται μετάλλαξη ή επιγενετική απενεργοποίηση και του δεύτερου αλληλόμορφου. Όταν συμβεί αυτό, καταστέλλεται ο επιδιορθωτικός μηχανισμός και αυξάνει ο ρυθμός μεταλλαξογένεσης. Τελικά, οι μεταλλάξεις θα επηρεάσουν γονίδια που είναι βασικά για την ανάπτυξη καρκίνου. Αυτή η αλληλουχία γεγονότων μπορεί να εξηγήσει γιατί στις περιπτώσεις με HNPCC η διαδικασία καρκινογένεσης δε σταματά στο στάδιο του αδενώματος, όπως συμβαίνει με το σύνδρομο FAP, αλλά συνεχίζει ως το στάδιο του καρκινώματος.

ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Έχει παρατηρηθεί υψηλή συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου σε ασθενείς με χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου. Οι αιτίες για την αύξηση του κινδύνου σε αυτά τα άτομα είναι μάλλον πολύπλοκες. Για παράδειγμα, η χρόνια βλάβη της βλεννώδους μεμβράνης μπορεί να επιταχύνει την εξαλλαγή των επιθηλιακών κυττάρων. Ο αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός των βλαστικών κυττάρων πιθανώς αυξάνει τον κίνδυνο για κακοήγη μετασχηματισμό. Η εύκολη πρόσβαση καρκινογόνων ουσιών από το έντερο επίσης μπορεί να αυξάνει τον κίνδυνο. Ανεξαρτήτως αιτίας, όμως, οι φλεγμονές θεωρούνται βασική αιτία για τον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου.



• Τα κύτταρα που συμμετέχουν στη φλεγμονή, όπως τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα, απελευθερώνουν ενεργές μορφές οξυγόνου (*reactive oxygen species*) και ένα πλήθος κυτοκινών, πρωτεασών και άλλων ενζύμων που επηρεάζουν τη τοπική δομή των ιστών, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Αυτό εξηγεί την παρατήρηση ότι κοινά αντιφλεγμονώδη φάρμακα, όπως το ακετυλ-σαλικυλικό οξύ (ασπιρίνη) μειώνουν τον κίνδυνο του καρκίνου του παχέος εντέρου. Μάλιστα, η προστατευτική δράση των ουσιών αυτών δεν περιορίζεται μόνο στους πάσχοντες από χρόνιες φλεγμονές του εντέρου.

Ο πιο κοινός στόχος των φαρμάκων αυτών, που περιγράφονται ως μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs), είναι οι κυκλοοξυγενάσες, ένζυμα που μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνες. Οι αντιδράσεις αυτές παράγουν ενεργές μορφές οξυγόνου ως παραπροϊόν. Υπάρχουν δύο είδη κυκλοοξυγενασών. Η COX1 είναι συνεχώς ενεργή, ενώ η COX2 επάγεται από κυτοκίνες κατά τη φλεγμονή. Το ένζυμο αυτό βρέθηκε ότι ενεργοποιείται στον καρκίνο του παχέος εντέρου, κυρίως σε ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και σε καρκινικά κύτταρα.. Η έκφρασή του τροποποιεί την επαφή των κυττάρων και μειώνει την απόπτωση [21]. Φάρμακα που αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου αυτού, όπως το *cylindac* και το *celocoxib*, είναι πολύ αποτελεσματικά στην προστασία των ασθενών υψηλού κινδύνου και την καθυστέρηση της ανάπτυξης του καρκίνου [22, 23]. Η φαρμακολογική έρευνα συνεχίζεται και μπορεί στο μέλλον να δώσει ακόμα πιο αποτελεσματικά φάρμακα, ενώ μελετάται και η προστατευτική δράση ορισμένων ουσιών που περιέχονται σε φυτά.



3. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Η σταδιοποίηση είναι μια μέθοδος αξιολόγησης της εξέλιξης του καρκίνου σε έναν ασθενή. Για να καθοριστεί το στάδιο της νόσου, πρέπει να είναι γνωστό το ιστορικό του ασθενή και να γίνει διεξοδική εξέταση, η οποία περιλαμβάνει και τα αποτελέσματα μιας σειράς εξετάσεων. Ο ιατρός έχοντας όλες τις απαραίτητες πληροφορίες καθορίζει το κλινικό στάδιο του ασθενή. Αυτό βοηθάει σε μεγάλο βαθμό και τον καθορισμό της θεραπευτικής αγωγής που πρέπει να ακολουθηθεί, καθώς και την πρόγνωση.

Για τη σταδιοποίηση του καρκίνου του παχέος εντέρου υπάρχουν διάφορα συστήματα ταξινόμησης. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ταξινόμησης του Duke, το οποίο τοποθετούσε τους ασθενείς σε τρεις κατηγορίες (A, B, C) ενώ αργότερα προστέθηκε και μια τέταρτη (D) (*Πίνακας 1*) [24]. Αυτό το σύστημα στη συνέχεια τροποποιήθηκε από τους Astler και Coller (1954) (*Πίνακας 2*), ενώ οι Gunderson και Sosin το τροποποίησαν ξανά το 1978.

Το 1983 προτάθηκε από την Αμερικάνικη (AJCC) και τη Γαλλική (UICC) Αντικαρκινική Ένωση το σύστημα TNM, σύμφωνα με το οποίο οι ασθενείς τοποθετούνται σε ένα από τέσσερα στάδια (στάδιο I-IV) (*Πίνακας 3*). Η ταξινόμηση στηρίζεται στο μέγεθος του όγκου (T: tumor size), την κατάσταση των τοπικών λεμφαδένων (N: nodes) και την παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (M: metastasis), όπως αυτά φαίνονται στον *Πίνακα 4*.

Στάδιο A	Ο όγκος περιορίζεται στο εντερικό τοίχωμα
Στάδιο B	Ο όγκος διηθεί το εντερικό τοίχωμα
Στάδιο C	Ανάμιξη λεμφαδένων
Στάδιο D	Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

Πίνακας 1: Ταξινόμηση κατά Duke



Στάδιο A	Ο όγκος αναπτύσσεται στο βλεννογόνο
Στάδιο B1	Ο όγκος διηθεί μέχρι την έξω μυική στιβάδα χωρίς να επεκτείνεται πέραν αυτής (όχι λεμφαδένες)
Στάδιο B2	Ο όγκος διηθεί ολόκληρη την έξω μυική στιβάδα (όχι λεμφαδένες)
Στάδιο C1	Ο όγκος περιορίζεται ακόμα στο τοίχωμα, όμως διηθεί λεμφαδένες
Στάδιο C2	Ο όγκος διασπά τον ορογόνο και διηθεί λεμφαδένες
Στάδιο D	Απομακρυσμένες μεταστάσεις

Πίνακας 2: Ταξινόμηση κατά Astler-Coller

Στάδιο 0	(Tis, No, Mo)
Στάδιο I	Ο όγκος δεν υπερβαίνει τα 2cm (όχι λεμφαδένες) (T ₁ , No, Mo)
Στάδιο II	Ο όγκος είναι μεταξύ 2cm και 5cm και υπάρχει διήθηση στους λεμφαδένες IIA: (T ₀ , N ₁ , Mo), (T ₁ , N ₁ , Mo), (T ₂ , No, Mo) IIB: (T ₂ , N ₁ , Mo), (T ₃ , No, Mo)
Στάδιο III	IIIA: Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από 5cm ή μικρότερος των 5cm, αλλά έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες, οι οποίοι έχουν αναπτυχθεί ο ένας μέσα στον άλλο (T ₀ , N ₂ , Mo), (T ₁ , N ₂ , Mo), (T ₂ , N ₂ , Mo), (T ₃ , N ₁₋₂ , Mo) IIIB: Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε γειτονικούς ιστούς (τοπικά) και τους λεμφαδένες (T ₄ , οποιοδήποτε N, Mo), (οποιοδήποτε T, N ₃ , Mo)
Στάδιο IV	Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες και σε απομακρυσμένες περιοχές του σώματος (οποιοδήποτε T, οποιοδήποτε N, M ₁)

Πίνακας 3: Σταδιοποίηση κατά TNM



Πρωτοπαθής όγκος (T)	
T _x	Ο όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
T ₀	Απουσία όγκου
T _{is}	Καρκίνωμα <i>in situ</i>
T ₁	Όγκος σε βλεννογόνο ή υποβλεννογόνο χιτώνα
T ₂	Ο όγκος διηθεί τον μυικό χιτώνα (δεν τον διασπά)
T ₃	Ο όγκος επεκτείνεται σε ολόκληρο το μυικό τοίχωμα, διασπά τον ορογόνο, διηθεί το περικολικό λίπος ή κοντινά όργανα
T ₄	Διήθηση περιτόναιου, διήθηση άλλων οργάνων
Διήθηση λεμφαδένων (N)	
N _x	Επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν
N ₀	Δε διηθούνται λεμφαδένες
N ₁	Διήθηση σε 1-3 επιχώριους λεμφαδένες
N ₂	Διήθηση σε 4 ή περισσότερους λεμφαδένες
N ₃	Διήθηση λεμφαδένων κατά μήκος της μεσεντέριας αρτηρίας ή στους εσωτερικούς μαστικούς αδένες
Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M)	
M _x	Μεταστάσεις δεν μπορούν να ανιχνευθούν
M ₀	Δεν υπάρχουν μεταστάσεις
M ₁	Υπαρξη μεταστάσεων

Πίνακας 4: Ταξινόμηση TNM



4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ – ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι βιολογικοί δείκτες είναι ουσίες που χρησιμεύουν σαν ενδείξεις μιας βιολογικής κατάστασης. Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ότι υφίσταται δυνατή η αντικειμενική μέτρηση και αξιολόγησή τους σαν δείκτες φυσιολογικών βιολογικών διαδικασιών, παθογόνων διαδικασιών ή φαρμακολογικών αποκρίσεων σε μια θεραπευτική αγωγή.

Σαν σημαντικές βιολογικές ενδείξεις της κατάστασης και της εξέλιξης του καρκίνου για τη φυσιολογική κατάσταση του κυττάρου σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή, οι βιολογικοί δείκτες αντιπροσωπεύουν πολύ ισχυρά εργαλεία για την παρακολούθηση της πορείας του καρκίνου και την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας των νέων θεραπευτικών παραγόντων [25].

Οι καρκινικοί δείκτες είναι μόρια τα οποία αντιπροσωπεύουν βιολογικές μεταβολές στη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία που συνδέονται με την κακοήγη διαδικασία. Αυτές οι ουσίες είναι κατά κύριο λόγο πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες, αλλά επιπλέον φωσφολιπίδια, DNA ή RNA μόρια μπορούν να παραχθούν απευθείας από τον όγκο ή το σώμα σαν απόκριση στην παρουσία του όγκου. Οι καρκινικοί δείκτες μπορούν να αξιολογηθούν στον ιστό ή τα κύτταρα του οργάνου, σε αποξυσμένα ή διασκορπισμένα κύτταρα ή, στην περίπτωση διαλυτών δεικτών, στον ορό ή το πλάσμα ή άλλα βιολογικά υγρά (ούρα, σάλιο, εγκεφαλονωτιαίο υγρό) ή εκκρίσεις [1].

Ο πρώτος σύγχρονος καρκινικός δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση καρκίνου ήταν η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG). Η ελπίδα στην αναζήτηση καρκινικών δεικτών ήταν ότι όλες οι μορφές καρκίνου θα μπορούσαν κάποια μέρα να ανιχνεύονται με μια απλή εξέταση αίματος. Η πρώτη επιτυχία στην ανάπτυξη μιας τέτοιας εξέτασης για ένα ευρέως διαδεδομένο τύπο καρκίνου ήλθε το 1965, όταν το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (CEA) βρέθηκε στο αίμα ορισμένων ασθενών με καρκίνο του εντέρου. Μέχρι τις μέρες μας, ο μόνος καρκινικός δείκτης που χρησιμοποιείται σε ευρεία κλίμακα για τον πληθυσμιακό έλεγχο είναι η εξέταση για το ειδικό προστατικό αντιγόνο (*prostate-specific antigen, PSA*), από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 [7].

Οι καρκινικοί δείκτες χρησιμεύουν στον πληθυσμιακό έλεγχο και την πρόωπη ανίχνευση του καρκίνου, τη διάγνωση του καρκίνου, τον καθορισμό της προοπτικής ορισμένων μορφών καρκίνου και της αποτελεσματικότητας της θεραπείας, την



ανίχνευση επανεμφανιζόμενου καρκίνου [7]. Οι δείκτες καρκίνου λοιπόν κατανέμονται σε έναν αριθμό κατηγοριών:

- 1) Δείκτες επικινδυνότητας (παρέχουν τις πιο πρώιμες ενδείξεις για τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε άτομα που δεν έχουν διαγνωστεί ακόμα με την ασθένεια, π.χ. BRCA1 και APC)
- 2) Δείκτες πληθυσμιακού ελέγχου (αποτελούν εξετάσεις, οι οποίες όταν εφαρμόζονται συστηματικά στον πληθυσμό, αναγνωρίζουν ασυμπτωματικά άτομα σε επαρκή κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, ώστε να δικαιολογείται η χρήση επιπλέον δεικτών ή κλινικής παρέμβασης, π.χ. τεστ Παπανικολάου)
- 3) Δείκτες πρώιμης διάγνωσης (υποδεικνύουν την παρουσία καρκίνου στα αρχικά στάδια ή την σχεδόν 100% βεβαιότητα εμφάνισής του σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, π.χ. PSA)
- 4) Δείκτες πρόγνωσης (κλινικά, ιστοπαθολογικά ή μοριακά χαρακτηριστικά των όγκων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην πρόγνωση της έκβασης της ασθένειας, όπως το μέγεθος του όγκου και ο βαθμός κακοήθειας)
- 5) Δείκτες θεραπείας και απόκρισης (αποτελούν δείκτες πρόβλεψης της πιθανότητας ενός ασθενή να ανταποκριθεί και κατ' επέκταση να ωφεληθεί από μια συγκεκριμένη θεραπεία, π.χ. επίπεδο έκφρασης του c-erbB-2)
- 6) Δείκτες υποτροπής και μετάστασης (π.χ. CEA για τον καρκίνο του παχέος εντέρου)
- 7) Διαγνωστικοί δείκτες [1].

Τα χαρακτηριστικά του ιδανικού καρκινικού δείκτη θα πρέπει να περιλαμβάνουν τις εξής ιδιότητες: 1) ειδική παραγωγή από τον προ-κακοήθη ή κακοήθη ιστό στα αρχικά στάδια εξέλιξης της νόσου, 2) να παράγεται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα σε όλους τους ασθενείς με τη συγκεκριμένη κακοήθεια, 3) έκφραση με οργανοειδικό τρόπο, 4) ενδείξεις της παρουσίας του σε σωματικά υγρά που μπορούν να ληφθούν χωρίς χειρουργική επέμβαση ή σε εύκολα προσβάσιμο ιστό, 5) επίπεδα που να συνδέονται ποσοτικά με το μέγεθος του όγκου, τη βιολογική συμπεριφορά ή την εξέλιξη της νόσου, 6) σχετικά μικρός χρόνος ημιζωής, 7) ύπαρξη τυποποιημένης, υψηλής επαναληψιμότητας και τεκμηριωμένης αντικειμενικής και ποσοτικής μεθόδου [1].



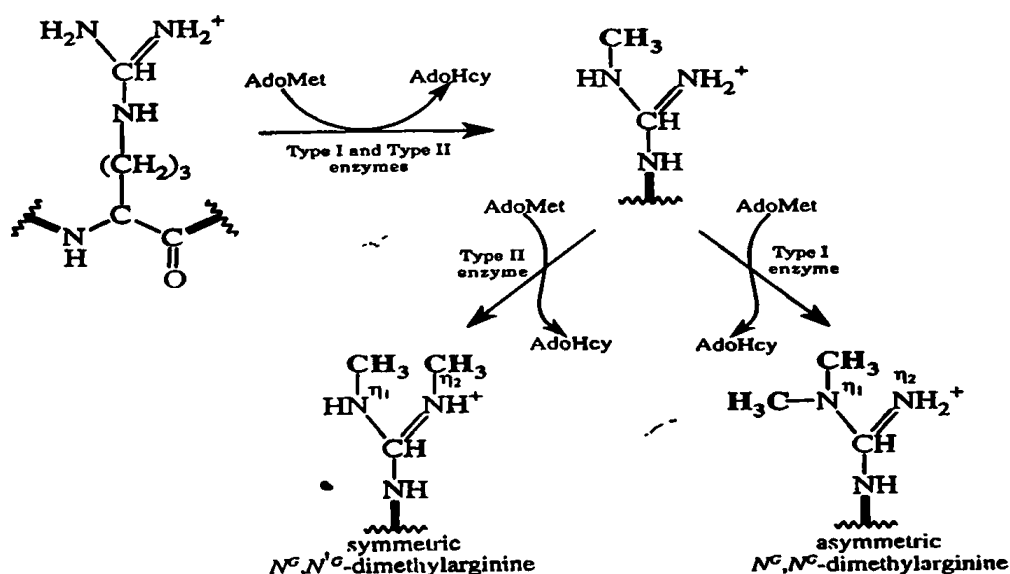
5. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΜΕΘΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ ΑΡΓΙΝΙΝΗΣ

Τα τελευταία χρόνια γίνεται όλο και πιο προφανές ότι η λειτουργικότητα των πρωτεϊνικών μορίων εξαρτάται από ομοιοπολικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των 20 αμινοξικών καταλοίπων που ενσωματώνονται στις πρωτεΐνες από τα ριβοσώματα, κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνοσύνθεσης. Ορισμένες από αυτές τις τροποποιήσεις είναι αντιστρεπτές. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι αντιδράσεις φωσφορυλίωσης. Αντίθετα, υπάρχουν τροποποιήσεις, οι οποίες φαίνονται να είναι μη αντιστρεπτές και είναι σε θέση να δημιουργήσουν αποτελεσματικά νέα είδη αμινοξέων προκειμένου να διευρύνουν τη χημική ποικιλομορφία των πολυπεπτιδίων. Σε αυτή την τελευταία ομάδα τροποποιήσεων ανήκουν οι αντιδράσεις μεθυλίωσης [26]. Η μεθυλίωση πρωτεϊνών αφορά τη μεταφορά μεθυλικών ομάδων από το μόριο της S-αδενοσυλμεθειονίνη σε ομάδες-δέκτες πάνω στα πρωτεϊνικά υποστρώματα. Οι διάφορες πρωτεΐνες μπορούν να μεθυλιωθούν σε κατάλοιπα αργινίνης, λυσίνης, ιστιδίνης ή ακόμα και σε καρβοξυλικά κατάλοιπα [27]. Επιπλέον, όταν κάποια κατάλοιπα ασπαρτικού μετατρέπονται σε ισοασπαρτικό σαν αποτέλεσμα της πρωτεϊνικής γήρανσης, τα κύτταρα χρησιμοποιούν έναν μηχανισμό μεθυλίωσης για να αντιστρέψουν αυτή τη διαδικασία [28].

Η μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης στις πρωτεΐνες εμφανίζεται στα περισσότερα κύτταρα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών [29], καθώς και σε κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως το τρυπανόσωμα [30, 31], μέχρι τις μέρες μας, όμως, δεν έχει βρεθεί σε προκαρυωτικούς οργανισμούς. Η μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε ένα είτε και στα δυο τελικά άτομα αζώτου της γουανιδίνης, δίνοντας τρία πιθανά προϊόντα: 1) μονομεθυλαργινίνη, 2) N^G, N^G - διμεθυλαργινίνη, στην οποία και οι δυο μεθυλικές ομάδες βρίσκονται στο ίδιο άτομο αζώτου (ασύμμετρη διμεθυλαργινίνη) και 3) N^G, N'^G - διμεθυλαργινίνη, στην οποία κάθε άτομο αζώτου λαμβάνει μια μεθυλική ομάδα (συμμετρική διμεθυλαργινίνη) [27, 32]. Έχουν εντοπιστεί τουλάχιστον τρεις διακριτές τάξεις πρωτεϊνικών N - μεθυλοτρανσφερασών αργινίνης. Το ένζυμο τύπου I καταλύει το σχηματισμό της N^G - μονομεθυλαργινίνης, καθώς και των ασύμμετρων καταλοίπων N^G, N^G - διμεθυλαργινίνης. Το ένζυμο τύπου II καταλύει επίσης το σχηματισμό της N^G - μονομεθυλαργινίνης, αλλά και των συμμετρικών καταλοίπων N^G, N'^G - διμεθυλαργινίνης (Εικόνα 6). Τέλος, το ένζυμο τύπου III καταλύει τη μονομεθυλίωση του εσωτερικού ατόμου αζώτου της γουανιδίνης προς σχηματισμό του καταλοίπου ω-



N^G – μονομεθυλαργινίνης [33]. Η ακριβής σημασία της συμμετρικής ή ασύμμετρης μεθυλίωσης της αργινίνης, όσον αφορά την κυτταρική λειτουργία, είναι ένα ακόμα ερώτημα που πρέπει να διευκρινιστεί. Είναι σημαντικό να θυμόμαστε ότι το μεταβολικό κόστος της διαδικασίας μεθυλίωσης είναι υψηλό (η καθαρή ενέργεια που χρησιμοποιείται για το σχηματισμό ενός μεθυλιωμένου παραγώγου αγγίζει τα 12 ATP) κι επομένως το πλεονέκτημα που προσφέρει αυτή η αντίδραση θα πρέπει να ξεπεράσει το ενεργειακό της κόστος, ώστε να καταφέρει να διατηρείται μέσα από τις εξελικτικές διαδικασίες.



Εικόνα 6: Οι δομές και τα βήματα για τη σύνθεση μεθυλιωμένων καταλοίπων αργινίνης σε πρωτεϊνικά μόρια (Πηγή: Gary JD, Clarke S "RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation" *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* 1998, 61:65-131)

Μέχρι τις μέρες μας έχουν απομονωθεί και κλωνοποιηθεί 9 διακριτά, αλλά πολύ συγγενικά μεταξύ τους μόρια μεθυλοτρανσφερασών αργινίνης, από ιστούς θηλαστικών, τα οποία είναι τα εξής: PRMT1 (HRMT1L2) [34], PRMT2 (HRMT1L1) [35], PRMT3 [36], CARM1 (PRMT4) [37], JBP1 (PRMT5) [38], PRMT6 [39], PRMT7 [40], PRMT8 [41] και PRMT9 [42].



Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ

Έχει γίνει αντιληπτό από πολύ παλιά η σημασία της μεθυλίωσης των πρωτεϊνών όσον αφορά το χημειοτακτισμό των βακτηρίων [43]. Συγκεκριμένοι ρόλοι για την καρβοξυ-μεθυλίωση πρωτεϊνών, όπως οι Ras, έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σημάτων, ενώ επίσης πειραματικά δεδομένα έχουν εμπλέξει συγκεκριμένες πρωτεϊνικές μεθυλοτρανσφεράσες αργινίνης σε άλλα μονοπάτια μεταγωγής σημάτων (παρά το γεγονός ότι σε πολλές περιπτώσεις ο ακριβής ρόλος της πρωτεϊνικής μεθυλίωσης και τα σχετικά πρωτεϊνικά υποστρώματα δεν έχουν αναγνωριστεί).

Τις τελευταίες δεκαετίες, αρκετές θεμελιώδεις παρατηρήσεις υπέδειξαν ότι η μεθυλίωση πρωτεϊνικών μορίων είναι πολύ πιθανό να υπόκειται σε δυναμικά ρυθμιστικά γεγονότα, τα οποία αφορούν την επαγόμενη μέσω μορίων μεταγωγή σημάτων [27]. Τα καθαρότερα ίσως αποδεικτικά στοιχεία όσον, αφορά τις Τύπου I μεθυλοτρανσφεράσες αργινίνης και το ρόλο τους στη μεταγωγή σημάτων, προέρχονται από τις παρατηρήσεις του τρόπου με τον οποίο τα αντίστοιχα γονίδια των θηλαστικών κατάφεραν να κλωνοποιηθούν. Το γονίδιο PRMT1 στον αρουραίο ανακαλύφθηκε μέσω της αλληλεπίδρασής του με τα TIS21 και BTG1 σε ένα διυβριδικό σύστημα στη ζύμη. Οι παρατηρήσεις αυτές, όσον αφορά τη μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης σαν «μεσολαβητή» σε γεγονότα μεταγωγής σημάτων, έγιναν από τους *Lin et al (1996)* [34]. Καθώς η μεθυλίωση των πρωτεϊνών είχε προηγούμενα αναγνωριστεί σαν ένας από τους μηχανισμούς μεταγωγής σημάτων σε διάφορα βιολογικά συστήματα, ο *Lin* συνέχισε τα πειράματα πάνω στην μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης από το PRMT1, με τη μεσολάβηση της οικογένειας πρωτεϊνών TIS21/BTG και θεωρείται σαν ένα επιπλέον μονοπάτι της επαγόμενης μέσω μορίων μεταγωγής σημάτων.

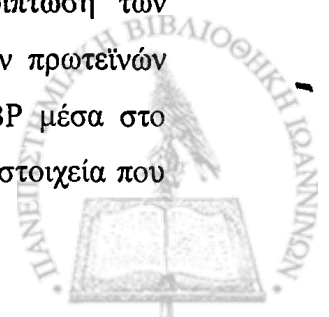
Έχουν υπάρξει διάφορες αναφορές που συσχετίζουν τη μεταγωγή σημάτων με πιθανές αλλαγές στη μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης σε μη ταυτοποιημένα πρωτεϊνικά μόρια. Για παράδειγμα, η διέγερση των πρόδρομων Β λεμφοκυττάρων από λιποπολυσακχαρίτες έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της μεθυλίωσης των μεμβρανικών πρωτεϊνών [44], ενώ οι παράγοντες EGF (*epidermal growth factor*) και NGF (*nerve growth factor*) διεγείρουν τη μεθυλίωση σε κύτταρα PC12 [45]. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι η αύξηση που προκαλείται στη μεθυλίωση των πρωτεϊνών συνδέεται με κατάλοιπα αργινίνης.



Βασιζόμενοι στη μέχρι τώρα αποκτηθείσα γνώση, η μεθυλίωση από τις πρωτεϊνικές μεθυλοτρανσφεράσες αργινίνης (PRMTs) μπορεί να αποτελεί μια σημαντική ρυθμιστική τροποποίηση για τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μετα-μεταφραστική ρύθμιση και την ωρίμανση του mRNA. Σύμφωνα και πάλι με τη μελέτη του *Lin* [34], η ρύθμιση του ματίσματος του RNA φαίνεται να είναι ένας πιθανός στόχος για την επαγόμενη από το PRMT1 μεταγωγή σήματος, εφόσον το hnRNP A1, το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για το PRMT1, παίζει ρόλο-κλειδί στον καθορισμό του εναλλακτικού ματίσματος του mRNA. Η προσαρμογή των επιπέδων του hnRNP A1 μπορεί να ρυθμίσει την επιλογή της 5' περιοχής ματίσματος κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του mRNA. Έτσι, φαίνεται πιθανό ότι ο έλεγχος της μεθυλίωσης του hnRNP A1 μπορεί να τροποποιεί το μάτισμα του mRNA *in vivo* [34]. Επιπλέον, έχει καταδειχθεί ότι ανασυνδιασμένες hnRNP A1 πρωτεΐνες, από τις οποίες λείπουν τα RGG boxes, δεν είναι σε θέση να προσδεθούν πάνω σε μονόκλιωνα RNA μόρια ούτε να προωθήσουν το εναλλακτικό μάτισμα [46].

Το πιο κοινό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν τμήματα GAR (*glycine- and arginine-rich domain, GAR domain*), δηλαδή πλούσια σε γλυκίνη και αργινίνη, είναι η ικανότητά τους να προσδένονται σε μονόκλιωνα νουκλεϊκά οξέα. Το καρβοξυτελικό άκρο των hnRNP A1 περιλαμβάνει ένα τέτοιο τμήμα το οποίο είναι απαραίτητο για το εναλλακτικό μάτισμα και τη σταθερή πρόσδεση της πρωτεΐνης στο RNA. Η ικανότητα αυτή πρόσδεσης μέσω του τμήματος GAR φαίνεται να στηρίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των θετικά φορτισμένων καταλοίπων αργινίνης και της αρνητικά φορτισμένης «ραχοκοκαλιάς» φωσφορικών του νουκλεϊκού οξέος. Ακόμα πιο ειδικές αλληλεπιδράσεις μπορεί να προκύψουν μέσω δημιουργίας συγκεκριμένων δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στα άτομα αζώτου της γουανιδίνης και το νουκλεϊκό οξύ [47].

Μια άλλη πρόταση που έχει γίνει είναι ότι η μεθυλίωση της αργινίνης πιθανόν να ρυθμίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών [27, 48]. Η μεθυλίωση θα μπορούσε να οδηγήσει στη διαμόρφωση και σταθεροποίηση μιας τέτοιας αλληλεπίδρασης ή ακόμα θα μπορούσε να διακόψει μια ήδη υπάρχουσα αλληλεπίδραση. Η μεθυλίωση των καταλοίπων αργινίνης θα μπορούσε να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων, όπως στην περίπτωση των πρωτεϊνών MBP (*Myelin Basic Proteins*). Στην περίπτωση αυτών των πρωτεϊνών πιθανολογείται ότι η μεθυλίωση σταθεροποιεί την εισαγωγή των MBP μέσα στο μυελινικό περίβλημα [49, 50]. Επίσης, υπάρχουν συνεχώς αυξανόμενα στοιχεία που



δείχνουν ότι τα hnRNPs (*heterogenous nuclear ribonucleoproteins*) μπορούν να αλληλεπιδράσουν με μια ποικιλία κυτταρικών παραγόντων, εκτός από το να προσδένονται πάνω στο πρόδρομο mRNA. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η μεθυλίωση μπορεί να παίζει ρόλο στη ρύθμιση αυτών των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων. Τέλος, η μεθυλίωση αυτών των πρωτεϊνών θα μπορούσε να ρυθμίσει την σταθερότητά τους, καθώς και το χρόνο ημιζωής τους, καθώς έχει αποδειχτεί ότι τα μεθυλιωμένα μόρια hnRNP A1 είναι πιο επιρρεπή στην πέψη με θρυψίνη από τα μη μεθυλιωμένα μόρια [51]. Επιπλέον, οι *Bedford et al. (2000)* έχουν δείξει ότι η μεθυλίωση της hnRNP K παίζει ρόλο στον έλεγχο μιας συγκεκριμένης τάξης αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών. Θεώρησαν πιθανό ότι οι πρωτεΐνες που «ντύνουν» το πρόδρομο mRNA και το συνοδεύουν έξω από τον πυρήνα, απαιτούν την πολλαπλών επιλογών προστασία που παρέχει η μεθυλίωση της αργινίνης, προκειμένου να αντεπεξέλθουν στη μάχη τόσο εναντίον της πρωτεολυτικής πέψης όσο και της διατήρησης από τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που φέρουν την SH3 περιοχή, επιτρέποντας έτσι στις παλινδρομούσες πρωτεΐνες να ταξιδέψουν με ασφάλεια πίσω στον πυρήνα [52].

Η μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης έδειξε να υποβοηθάει την έξοδο συγκεκριμένων hnRNPs από τον πυρήνα. Οι *Shen et al. (1998)* έχουν δώσει αποδείξεις ότι αυτού του τύπου η μεθυλίωση μπορεί άμεσα ή έμμεσα να διευκολύνει την έξοδο ορισμένων hnRNP πρωτεϊνών, πιθανώς αποτρέποντας την πέψη από τη θρυψίνη και άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα [53]. Επομένως, είναι κατανοητό ότι οι μη μεθυλιωμένες πρωτεΐνες που εξέρχονται από τον πυρήνα υπόκεινται σε πρωτεολυτική διάσπαση στο κυτταρόπλασμα.

Μια άλλη εργασία, η οποία αφορούσε την πρόσδεση μιας πρωτεΐνης στην αλυσίδα IFNAR1 του συμπλόκου του υποδοχέα IFN- α/β και πειράματα με antisense ολιγονουκλεοτίδια, παρείχε αποδείξεις ότι η μεθυλοτρανσφεράση εμπλέκεται στη διαμεσολάβηση της αντι-πολλαπλασιαστικής δράσης του IFN- α/β [54]. Η πρόσδεση στο τμήμα IFNAR1-IC μπορεί να ρυθμίσει την ενεργότητα του PRMT1 και να λειτουργήσει σαν μεσολαβητής μηνυμάτων που σχετίζονται με την αντιαποπτωτική δράση των IFN ή γενικότερα με τον τρόπο με τον οποίο οι IFN τροποποιούν την έκφραση γονιδίων, όπως τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα οποία είναι ρυθμιστές της κυτταρικής ανάπτυξης.

Όπως έχει προταθεί από τους *Strahl and Allis (2000)*, η παρουσία συγκεκριμένων θέσεων μεθυλίωσης καταλοίπων λυσίνης και αργινίνης κοντά σε

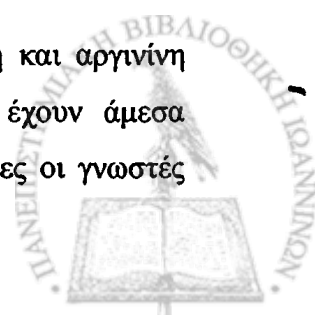


θέσεις ακετυλίωσης και φωσφορυλίωσης των αμινοτελικών άκρων των ιστονών, υποδηλώνουν πιθανή συνεργασία μεταξύ των διαφόρων τύπων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών, ώστε να καθορίζεται η δομή της χρωματίνης και κατ' επέκταση να ρυθμίζεται η μεταγραφή των γονιδίων. Συγκεκριμένοι συνδυασμοί ομοιοπολικών τροποποιήσεων μπορούν να διασπούν και / ή να ενισχύουν την αλληλεπίδραση ανάμεσα στις ουρές των ιστονών, το DNA και άλλες πρωτεΐνες. Η μεθυλίωση θα μπορούσε επίσης να επηρεάσει την επάρκεια με την οποία πραγματοποιούνται άλλου είδους ομοιοπολικές τροποποιήσεις στα μόρια των ιστονών [55]. Πιθανοί μηχανισμοί για την προτιμώμενη μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης της ενεργής χρωματίνης υποδηλώνονται από τα αποτελέσματα πειραμάτων επιμόλυνσης, στα οποία φαίνεται η φυσική και λειτουργική σχέση ανάμεσα στους διάφορους συν-ενεργοποιητές πυρηνικών υποδοχέων [56]. Το γεγονός ότι τα CARM1 και PRMT1 έχουν ειδική δραστηριότητα μεθυλοτρανσφεράσης αργινίνης δείχνει ότι η μεθυλίωση των πρωτεϊνών μπορεί να εμπλέκεται στη δράση τους σαν συν-ενεργοποιητές. Ο ακριβής ρόλος της μεθυλίωσης των ιστονών σε κατάλοιπα αργινίνης, όσον αφορά τη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης και της μεταγραφής, δεν έχει ακόμα καθοριστεί, αλλά η πιθανότητα οι μεθυλοτρανσφεράσες αργινίνης να συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση των γονιδίων μέσω της μεθυλίωσης πρωτεϊνικών υποστρωμάτων μαζί με τις ιστόνες πρέπει να διερευνηθεί.

Ένα άλλο στοιχείο, ενδεικτικό της σημασίας της μεθυλίωσης της αργινίνης στην ενεργοποίηση των γονιδίων, είναι ότι η ανάλυση μεταλλάξεων και η χρήση αναστολέων μεθυλοτρανσφερασών, όπως η MTA (*5'-methyl-thioadenosine*), αποκάλυψε ότι η μεθυλίωση της STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) είναι αναγκαία για την ενεργοποίηση της μεταγραφής [57].

Επιπλέον, το γεγονός ότι η κύρια μεθυλοτρανσφεράση αργινίνης των κυττάρων των θηλαστικών, η PRMT1, απαιτείται στα πολύ πρώιμα στάδια ανάπτυξης του ποντικού, δηλώνει το θεμελιώδη ρόλο της στην ανάπτυξη. Σε μια μελέτη που εκπονήθηκε από τους Pawlak *et al.* (2000) έγινε φανερό ότι το ένζυμο είναι ουσιώδες για τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης, αποτελεί σημαντική πηγή ενεργότητας μεθυλοτρανσφεράσης στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (Es) και επιπρόσθετα δε είναι αναγκαία για τη βιωσιμότητα των κυττάρων [58].

Υπάρχουν πολλά παραδείγματα όπου τα πλούσια σε γλυκίνη και αργινίνη τμήματα, αλλά ακόμα και τα μεθυλιωμένα τμήματα πρωτεϊνών, έχουν άμεσα εμπλακεί στην προώθηση της πυρηνικής εισόδου ουσιών. Σχεδόν όλες οι γνωστές



πρωτεΐνες που περιέχουν ασύμμετρα κατάλοιπα μεθυλιωμένης αργινίνης εντοπίζονται στον κυτταρικό πυρήνα και ακόμα πιο ειδικά στον πυρηνίσκο [32]. Πολλές μελέτες έχουν γίνει γύρω από τον καθορισμό του σήματος για την πυρηνική είσοδο. Οι πλειονότητα των πρωτεϊνών του πυρήνα, οι οποίες εισάγονται ενεργά σε αυτόν, περιέχουν ειδικές αμινοξικές αλληλουχίες που ονομάζονται NLSs (*nuclear localization sequences*). Από αυτές, οι πρωτεΐνες που προορίζονται για τον πυρηνίσκο συχνά περιέχουν επιπλέον αλληλουχίες για αυτό το σκοπό [59]. Τα τμήματα GAR πολλών προτεινόμενων υποστρωμάτων για τη δράση πρωτεϊνικής μεθυλοτρανσφεράσης αργινίνης Τύπου I, έχει εξακριβωθεί ότι διαθέτουν την ικανότητα να προωθούν την εγκατάσταση στον πυρήνα ή τον πυρηνίσκο. Η εισαγωγή της πρωτεΐνης nucleolin στον κυτταρικό πυρήνα απαιτεί την παρουσία αλληλουχίας NLS, αλλά η τελική της τοποθέτηση στον πυρηνίσκο απαιτεί επιπλέον το τμήμα GAR και τα γειτονικά τμήματα που είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση στο RNA [60, 61]. Παρόλο που, σύμφωνα με τα παραπάνω παραδείγματα, φαίνεται ότι το τμήμα GAR παίζει επικουρικό ρόλο στις διαδικασίες εισαγωγής στον πυρήνα και τον πυρηνίσκο, ένας κύριος ρόλος για το τμήμα αυτό, καθώς και για την ασύμμετρη μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης εντός της περιοχής, έχει δειχθεί ότι απαιτείται για την περίπτωση της εισόδου στον πυρήνα της μεγαλομοριακής μορφής του κύριου παράγοντα ανάπτυξης ινοβλαστών, του bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*). Η μορφή του bFGF με μέγεθος 18kDa, βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ οι μεγαλύτερες όμως ισομορφές εντοπίζονται, κατά προτίμηση, στον πυρήνα και περιέχουν ασύμμετρα διμεθυλιωμένα κατάλοιπα αργινίνης [62-65].

Η πυρηνική μετατόπιση του κύριου παράγοντα ανάπτυξης ινοβλαστών, μπορεί επίσης να υπόκειται στη μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης [66]. Η παρουσία ενός αναστολέα μεθυλοτρανσφεράσης, δεν επιτρέπει την μεθυλίωση της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα η τελευταία να μη βρίσκεται στον κυτταρικό πυρήνα.

PRMT1 (HRMT1L2, IR1B4)

Το πρώτο γονίδιο θηλαστικών που κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική N-μεθυλοτρανσφεράση αργινίνης ταυτοποιήθηκε με μια τεχνική διπλού υβριδισμού ζύμης [67, 68], η οποία ήταν ειδικά σχεδιασμένη για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών που μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν με την πρωτεΐνη TIS21 των τρωκτικών, που αποτελεί ένα πρωτεϊνικό προϊόν άμεσης-πρώιμης απόκρισης [69-71], καθώς και με το

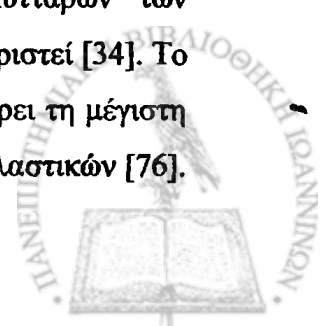


πολύ συγγενικό γονιδιακό προϊόν του BTG1 τρωκτικών [72, 73]. Από μια cDNA βιβλιοθήκη αρουραίου, ένας μοναδικός κλώνος, ο 3G, βρέθηκε να αλληλεπιδρά ειδικά και με τις δυο δεσμευτικές πρωτεΐνες στη διαδικασία διπλού υβριδισμού, όπως και σε *in vitro* πειράματα πρόσδεσης. Τα αποτελέσματα πειραμάτων, στα οποία χρησιμοποιήθηκε το πρωτεϊνικό προϊόν της σύντηξης GST-3G (*glutathione S transferase fusion protein*), απέδειξαν ότι το 3G cDNA, που προέρχεται από το mRNA του αρουραίου, κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική N-μεθυλοτρανσφεράση αργινίνης Τύπου I (ή τουλάχιστον την καταλυτική υπομονάδα αυτού του ενζύμου) [34]. Το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί αυτή την πρωτεΐνη ονομάστηκε PRMT1 (*Protein Arginine MethylTransferase 1*). Οι ομόλογες πρωτεΐνες στον άνθρωπο ταυτοποιήθηκαν, σε δυο διαφορετικές μελέτες [54, 74]. Αυτό το ένζυμο απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1988 από τον εγκέφαλο μόσχου [75]. Το ανθρώπινο PRMT1, το οποίο επίσης ονομάζεται HRMT1L2 ή IR1B4 [35, 54], είναι σε ποσοστό 96% όμοιο με το αντίστοιχο του αρουραίου, σε επίπεδο αμινοξέων [34].

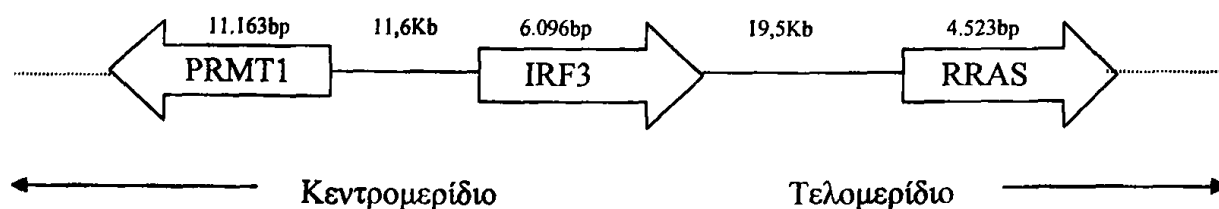


Εικόνα 7: Πρωτεϊνικό μόριο PRMT1 (με κίτρινο χρώμα σημειώνεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου).

Η πρωτεϊνική N-μεθυλοτρανσφεράση αργινίνης του ανθρώπου (Εικόνα 7) ήταν η πρώτη Τύπου I μεθυλοτρανσφεράση αργινίνης των κυττάρων των θηλαστικών, η οποία κατέστη δυνατό να κλωνοποιηθεί και να χαρακτηριστεί [34]. Το PRMT1 είναι το κυρίαρχο ένζυμο Τύπου I στους ιστούς και συνεισφέρει τη μέγιστη δράση πρωτεϊνικής μεθυλοτρανσφεράσης Τύπου I στα κύτταρα των θηλαστικών [76].



Το γονίδιο PRMT1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 (γενετικός τόπος 19q13.3). Ο χάρτης περιορισμού του χρωμοσώματος 19 για το ένζυμο *Eco* RI [77] σε συνδυασμό με PCR μεγάλου μήκους, ήταν τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή μιας συνεχόμενης περιοχής, η οποία περιελάμβανε τη γενωμική περιοχή που μας ενδιαφέρει. Τα εργαλεία της βιοπληροφορικής επίσης επιστρατεύτηκαν για την πρόβλεψη της παρουσίας νέων γονιδίων στην περιοχή ενδιαφέροντος και με αυτό τον τρόπο εντοπίστηκε μια πιθανή μεθυλοτρανσφεράση αργινίνης [78]. Το BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) [79], σε συνδυασμό με την ανάλυση περιορισμού μετά από πέψη με *Eco* RI, της αλληλουχίας ενός γειτονικού κλώνου BAC (*bacterial artificial chromosome*) (R31181), επέτρεψε την ταυτοποίηση της σχετικής θέσης αυτού του γονιδίου μεθυλοτρανσφεράσης, καθώς και άλλων γονιδίων που είχαν ανακαλυφθεί νωρίτερα (RRAS και IRF3), κατά μήκος της ίδιας χρωμοσωμικής περιοχής (19q13.3) [78]. Το γονίδιο εκτείνεται σε μια γενωμική περιοχή μήκους 11,163 ζευγών βάσεων και αποτελείται από 12,11 ή 10 εξώνια, εφόσον εντοπίζονται τρεις ισομορφές του γονιδίου στους υγιείς ιστούς. Η θέση του PRMT1 σε σχέση με τα άλλα δυο γονίδια φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί (Εικόνα 8). Το RRAS (*related RAS viral oncogene homolog*) είναι το πιο τελομερικό, ακολουθούμενο από το IRF3 (*interferon regulatory factor 3*) και το PRMT1, αντίστοιχα. Το PRMT1 μεταγράφεται με κατεύθυνση αντίθετη από αυτή της μεταγραφής των άλλων δύο γονιδίων. Η απόσταση μεταξύ των RRAS και IRF3 έχει υπολογιστεί σε 19.5kb, ενώ το PRMT1 βρίσκεται κατά 11.6kb κεντρομερικά του IRF3 [78].



Εικόνα 8: Χάρτης της χρωμοσωμικής περιοχής 19q13.3 και σχετική θέση του PRMT1. Η φορά του βέλους δείχνει την κατεύθυνση της μεταγραφής.

Το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου έχει υπολογιστεί στα 40.5kDa, με βάση την πρωτεϊνική αλληλουχία που προκύπτει από το cDNA [34]. Παρόλα αυτά, η ενεργότητα πρωτεϊνικής μεθυλοτρανσφεράσης αργινίνης από ιστούς διάφορων θηλαστικών και κυτταρικών σειρών, όπως αυτή υπολογίζεται μετά από φιλτράρισμα



σε ειδικές στήλες, φαίνεται να εντοπίζεται σε μόρια με εύρος μεγέθους μεταξύ 150 και 500kDa [34, 48, 75, 80].

Μελέτες ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού υποδηλώνουν ότι το πρωτεϊνικό προϊόν του PRMT1 συναντάται κατά κύριο λόγο στον πυρήνα. Για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης, κύτταρα RAT1 (ινοβλάστες), μετά την καλλιέργειά τους, σταθεροποιήθηκαν και έγιναν διαπερατά με τη βοήθεια παραφορμαλδεΐδης και Triton-X, ενώ χρησιμοποιήθηκε για τη χρώση αντι-PRMT1 ή ορός προ-ανοσοποίησης. Η ειδική χρώση για το PRMT1 εντοπίστηκε κυρίως στον πυρήνα, ενώ το κυτταρόπλασμα χρωματίστηκε μόνο ελαφρά. Επιπλέον, έγιναν μελέτες ανοσοφθορισμού σε σταθεροποιημένα κύτταρα RAT1, των οποίων η διαπερατότητα επιτεύχθηκε με μεθανόλη στους -20°C , προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων. Κι αυτή η δεύτερη σειρά πειραμάτων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη PRMT1 εντοπίζεται στον πυρήνα, ενώ η παρουσία της στο κυτταρόπλασμα είναι ελάχιστη [36].

Παρά το γεγονός ότι η PRMT1 εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα, πειράματα των Araya N et al. (2005) έδειξαν ότι η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Σε μια μελέτη που αφορά την πρωτεΐνη EWS (*Ewing's sarcoma protein*), ένα μέλος της μεγάλης οικογένειας των πρωτεϊνών που προσδένονται στο RNA, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη αυτή μεθυλιώνεται από την PRMT1 και το γεγονός αυτό επηρεάζει την κατανομή της EWS από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Πέρα από την πρώτη απόδειξη της εξαρτώμενης από μεθυλίωση μέσω PRMT1 εξαγωγής μορίων από τον πυρήνα, σε κύτταρα θηλαστικών, η μελέτη αυτή παρείχε και αποδείξεις της παρουσίας της PRMT1 στο κυτταρόπλασμα, υπονοώντας τη διαρκή μετακίνησή της από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα [81].

Επιπλέον, πειράματα που έγιναν για τη διερεύνηση της θέσης, κινητικότητας και αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης PRMT1 σε ζωντανά κύτταρα [82], έδειξαν ότι η πρωτεΐνη συναντάται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Σε αυτή την περίπτωση, η ποσοτικοποίηση της PRMT1 έγινε με μικροσκοπικές μελέτες και πειράματα βιοχημικής κατάτμησης, αποκαλύπτοντας ότι η ενδογενής PRMT1 και η PRMT1-EGFP είναι 6 φορές πιο άφθονη στο κυτταρόπλασμα σε σχέση με τον πυρήνα. Έτσι, παρόλο που τα περισσότερα γνωστά υποστρώματα της PRMT1 είναι πυρηνικά, το ένζυμο δεν βρίσκεται κατά προτίμηση στον πυρήνα, γεγονός συμβατό με την έλλειψη λειτουργικού σήματος πυρηνικού εντοπισμού στην αμινοξική του αλληλουχία [82].



Την απόδειξη της καταλυτικής ικανότητας των πρωτεϊνών PRMT1 την παρείχαν τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξήχθησαν από τους *Lin et al* (1996). Μετά την απομόνωση του κλώνου 3G (τον οποίο συναντήσαμε και πιο πριν), έλεγχος της αλληλουχίας που έγινε με τη βοήθεια του BLAST αποκάλυψε ομοιότητες ανάμεσα την πρωτεΐνη PRMT1 και το ένζυμο το οποίο μεθυλιώνει την ριβοσωμική πρωτεΐνη L11 στην *E. coli*, υποδηλώνοντας ότι η πρωτεΐνη πιθανόν να έχει ικανότητα μεθυλοτρανσφεράσης. Αφού αποκλείστηκε η πιθανότητα η πρωτεΐνη PRMT1 να είναι καρβοξυλική μεθυλοτρανσφεράση (εφόσον δεν ήταν σε θέση να μεθυλιώσει τα αντίστοιχα υποστρώματα), διερευνήθηκε αν ήταν σε θέση να μεθυλιώσει άτομα αζώτου σε πρωτεΐνες [34]. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα συνθετικό πεπτίδιο, το πεπτίδιο R1, το οποίο περιέχει τη θέση μεθυλίωσης της πρωτεΐνης fibrillarin [83]. Κατά την επώαση του πεπτιδίου R1 με την πρωτεΐνη GST-PRMT1 και [³H]AdoMet (*S*-adenosyl-[methyl-³H]-L-methionine), το πεπτίδιο μεθυλιώθηκε επαρκώς. Επιπλέον, ελέγχθηκε και η ικανότητα της πρωτεΐνης να μεθυλιώνει τόσο ιστόνες όσο και την ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη hnRNP A1, και εφόσον και αυτός ο έλεγχος βγήκε θετικός, οι ερευνητές οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη PRMT1 είναι μια λειτουργική μεθυλοτρανσφεράση αργινίνης [34].

Η πρωτεΐνη PRMT1 δείχνει μια προτίμηση στη μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης σε περιοχές που είναι πλούσιες σε γλυκίνη. Αυτές οι περιοχές βρίσκονται σε πολλές πρωτεΐνες, οι οποίες προσδένονται στο RNA και εμπλέκονται σε διάφορες διεργασίες του μεταβολισμού του RNA, όπως είναι η ιστόνη H4, καθώς και τα hnRNPs. Πρόσφατες μελέτες έχουν υποδείξει σαν επιπλέον υπόστρωμα για την PRMT1 την πρωτεΐνη STAT1 [57].

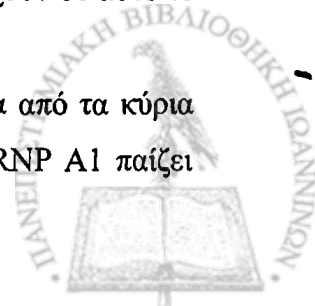
hnRNPs: Τα πρωταρχικά μετάγραφα που προκύπτουν από τη δράση της ευκαρυωτικής RNA Πολυμεράσης II φέρουν το όνομα πρόδρομο mRNA ή αλλιώς hnRNA. Αυτά τα μόρια υφίστανται μια σειρά από τροποποιήσεις στον πυρήνα του κυττάρου προκειμένου να μετατραπούν σε λειτουργικά, κυτταροπλασματικά μόρια ώριμου mRNA. Αμέσως μετά τη μεταγραφή τα μόρια του πρόδρομου mRNA συνδέονται με τουλάχιστον 20 πρωτεΐνες, οι οποίες συνολικά ονομάζονται ετερογενείς πυρηνικές νουκλεοπρωτεΐνες (hnRNPs). Αυτό το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα παραμένει προσδεδεμένο στο πρόδρομο mRNA καθ' όλη τη διάρκεια παραμονής του στον πυρήνα. Πολλά από τα hnRNPs είναι όσο άφθονες είναι και οι ιστόνες στον πυρήνα. Παρόλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους, καθώς και το συνολικό εύρος των λειτουργιών των hnRNPs δεν είναι ακόμα γνωστά [84, 85]. Πολλές από τις



αλληλεπιδράσεις μεταξύ των hnRNPs και του πρόδρομου και ώριμου mRNA είναι δυναμικές, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρόσδεση και η αποσύνδεσή τους από τα RNA και άλλες πρωτεΐνες βρίσκονται υπό ρυθμιστικό έλεγχο. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις μπορεί να ελέγχονται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και τα περισσότερα από τα hnRNPs έχουν στην πραγματικότητα βρεθεί να είναι τροποποιημένα μετα-μεταφραστικά. Στις τροποποιήσεις αυτές περιλαμβάνονται η γλυκοζυλίωση [86], η φωσφορυλίωση [87] και η μεθυλίωση [88]. Πρώιμες μελέτες στα hnRNPs έχουν δείξει ότι πολλά από αυτά περιέχουν ένα ασυνήθιστο τροποποιημένο αμινοξικό κατάλοιπο, την N^G, N^G -διμεθυλαργινίνη. Η αργινίνη είναι το μοναδικό γνωστό ως σήμερα μεθυλιωμένο αμινοξικό κατάλοιπο στα hnRNPs [88, 89]. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η N^G, N^G -διμεθυλαργινίνη είναι το κύριο μεθυλιωμένο παράγωγο. Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι τα hnRNPs περιέχουν περίπου το 65% της συνολικής N^G, N^G -διμεθυλαργινίνης που συναντάται στον κυτταρικό πυρήνα και περίπου το 12% των καταλοίπων αργινίνης στο σύνολο των hnRNPs εμφανίζεται να είναι μεθυλιωμένα [90].

Έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 30 διαφορετικά πρωτεϊνικά μόρια, τα οποία συμμετέχουν σε συμπλέγματα των hnRNPs στον πυρήνα των ανθρώπινων κυττάρων [91]. Οι πρωτεΐνες hnRNP A αποτελούνται από αμινοτελικά και καρβοξυτελικά μείζονα δομικά τμήματα. Το αμινοτελικό τμήμα, το οποίο αποτελεί το 50-60% του πρωτεϊνικού μορίου, περιέχει δυο υψηλά συντηρημένες περιοχές πρόσδεσης στο RNA του τύπου RRM (RBD) αποτελούμενες από 90-100 αμινοξέα. Τα αμινοτελικά τμήματα των πρωτεϊνών hnRNP A1 και A2 παρουσιάζουν ~80% ταυτότητα σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας. Η ομοιότητα στο αμινοξικό επίπεδο μεταξύ hnRNP A1 και A2 είναι χαμηλότερη (58%) στην πλούσια σε γλυκίνη περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου, αλλά η συνολική οργάνωση του υποτμήματος είναι συντηρημένη [92]. Συγκεκριμένα, το καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών hnRNP A περιλαμβάνει μια υποπεριοχή πλούσια σε γλυκίνη και αργινίνη, η οποία περιέχει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες αργινίνης-γλυκίνης-γλυκίνης (RGG) [93]. Το μοτίβο RGG αποτελείται από επαναλαμβανόμενα διπεπτίδια γλυκίνης, διασπαρμένα με αργινίνες και αρωματικά κατάλοιπα και εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις του τύπου RNA:RNA και RNA:πρωτεΐνες [78]. Οι αργινίνες που συμμετέχουν σε αυτό το μοτίβο αποτελούν συχνά στόχο για ασύμμετρη διμεθυλίωση.

Η πρωτεΐνη hnRNP A1 είναι ένα 34kDa πολυπεπτίδιο και ένα από τα κύρια συστατικά του 40S ριβονουκλεοπρωτεϊνικού σωματιδίου [89]. Η hnRNP A1 παίζει



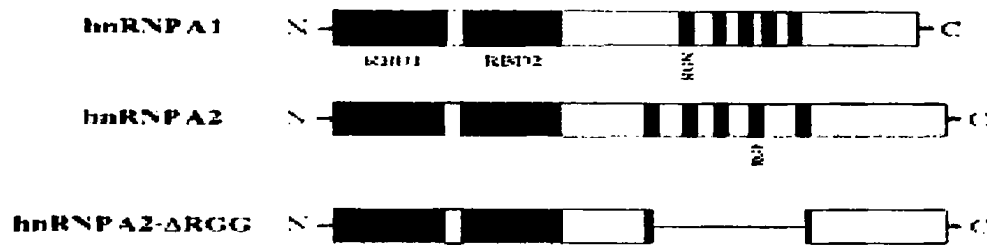
ρόλο στη διαφορική επιλογή της 5' θέσης ματίσματος [46, 94], ενώ *in vitro* μπορεί να προάγει την εναλλακτική παράλειψη εξωνίων, σε συγκεκριμένες κατασκευές (constructs) [94]. Η πρωτεΐνη hnRNP A1 εντοπίζεται στον πυρήνα, αλλά έχει τη δυνατότητα να μετακινείται και προς το κυτταρόπλασμα [95, 96].

Ο Scott με τους συνεργάτες του (1988) διενήργησαν πειράματα για να εξετάσουν την ικανότητα μεθυλίωσης των ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών HRMT1L1 (PRMT2) και HRMT1L2 (PRMT1), χρησιμοποιώντας σαν υποστρώματα τα Nr13p από τις ζύμες και hnRNP A1 από τα θηλαστικά. Τόσο η πρωτεΐνη Nr13p όσο και η hnRNP A1 μεθυλιώθηκαν *in vitro* από την HRMT1L2, ενώ κανένα από τα δυο υποστρώματα που εξετάστηκαν δεν μεθυλιώθηκαν από την HRMT1L1 [35].

Σε όλες τις κυτταρικές σειρές που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα (HEK-293, NIH-3T3, HeLa, PC12), η ενδογενής hnRNP A2 βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα και σε μικρές μόνο ποσότητες στο κυτταρόπλασμα [97]. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από μεταγενέστερες μελέτες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι εντοπισμού [98]. Προηγούμενες μελέτες κατέδειξαν ότι οι αργινίνες που βρίσκονται στα μόρια των hnRNP A λειτουργούν σαν στόχοι ασύμμετρης διμεθυλίωσης [34]. Η RGG περιοχή (R191-G253) της πρωτεΐνης hnRNP A2 περιέχει πέντε αργινίνες, τέσσερις από τις οποίες υπάρχουν εσωτερικά σε RGG αλληλουχίες ενώ η πέμπτη είναι σε μια RGF αλληλουχία (Εικόνα 9). Ανασυνδιασμένες hnRNP A1 και hnRNP A2 εκφράστηκαν σαν πρωτεΐνες σύντηξης με GST (*glutathione S transferase*) σε βακτήρια, καθαρίστηκαν σε ειδικές κολώνες γλουταθειόνης-σεφαρόζης και μεθυλιώθηκαν με ανασυνδιασμένο ένζυμο GST-PRMT1, παρουσία [³H]AdoMet. Σε αυτά τα πειράματα και οι δύο πρωτεΐνες μεθυλιώθηκαν από το PRMT1. Είναι προφανές ότι οι θέσεις μεθυλίωσης της πρωτεΐνης hnRNP A2 από το GST-PRMT1 βρίσκονται στο καρβοξυτελικό άκρο, εφόσον απουσία της καρβοξυτελικής περιοχής δεν επιτυγχανόταν μεθυλίωση της πρωτεΐνης [98].

Επιπλέον, όταν σαν υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ένα μεταλλαγμένο παράγωγο της hnRNP A2, το οποίο διέθετε μόνο ένα RGG μοτίβο από ολόκληρο το RGG τμήμα, η μεθυλίωση μειωνόταν αισθητά (5%), υποδηλώνοντας ότι οι αργινίνες που παρέμεναν στο μεταλλαγμένο τύπο μεθυλιώνονταν ελάχιστα σε σχέση με αυτό που συμβαίνει στο φυσιολογικό τύπο [98].



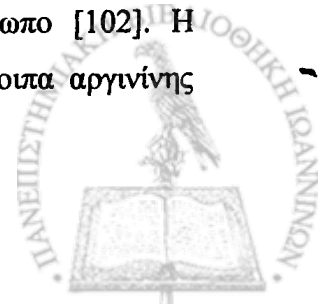


Εικόνα 9: Η δομή των ανθρώπινων hnRNP A1, hnRNP A2 και hnRNP A2-DRGG, όπου φαίνεται η πρωτοταγής δομή των πρωτεϊνών hnRNP A1 και hnRNP A2, καθώς και η περιοχή που λείπει από την μεταλλαγμένη hnRNP A2-DRGG. (RBD: RNA binding domain, θέση πρόσδεσης του RNA) (Πηγή: Nichols RC, Wang XW, Tang J, Hamilton BJ, High FA, Herschman HR, Rigby WF "The RGG domain in hnRNP A2 affects subcellular localization" *Exp Cell Res* 2000, 256:522-532)

Ιστονή H4: Οι ιστόνες είναι βασικές πρωτεΐνες του κυτταρικού πυρήνα, υπεύθυνες για τη δομή του νουκλεοσώματος των ινιδίων χρωματίνης των ευκαρυωτικών οργανισμών. Τα νουκλεοσώματα θεωρούνται το πρώτο επίπεδο οργάνωσης της χρωματίνης. Κάθε νουκλεόσωμα περιέχει περίπου 200 ζεύγη βάσεων DNA, τα οποία οργανώνονται από ένα οκταμερές μικρών βασικών πρωτεϊνών, γνωστές σαν ιστόνες, σε μια δομή που μοιάζει με χάντρα. Το οκταμερές των ιστονών συγκροτείται από 2 αντίγραφα από κάθε είδος ιστόνης, H2A, H2B, H3 και H4 (ιστόνες πυρήνα, *core histones*).

Στα νουκλεοσώματα, οι αμινοτελικές ουρές των ιστονών εκτείνονται εκτός της διπλής έλικας του DNA, η οποία τυλίγεται γύρω από τον πυρήνα του νουκλεοσώματος που συγκροτείται από τις καρβοξυτελικές περιοχές των μορίων των ιστονών. Στη μη τροποποιημένη τους μορφή, οι αμινοτελικές ουρές των ιστονών είναι φορτισμένες θετικά και αλληλεπιδρούν με τον αρνητικά φορτισμένο σκελετό του DNA ή τις εσωτερικές περιοχές του οκταμερούς του ίδιου ή γειτονικών νουκλεοσωμάτων. Αυτή η αλληλεπίδραση συντελεί στο να γίνει πιο συμπαγής η χρωματίνη [99, 100].

Οι ομοιοπολικές τροποποιήσεις των άκρων των ιστονών που συγκροτούν το οκταμερές παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της χρωματίνης [55]. Ένας τύπος τέτοιας τροποποίησης είναι η μεθυλίωση [101], η οποία έχει παρατηρηθεί σε πολύ διαφορετικούς οργανισμούς, από τις ζύμες μέχρι τον άνθρωπο [102]. Η μεθυλίωση στην περίπτωση των ιστονών περιλαμβάνει τόσο κατάλοιπα αργινίνης όσο και λυσίνης [32].



Για την ταυτοποίηση των ενζύμων που εμπλέκονται στη μεθυλίωση των ιστονών του νουκλεοσώματος, απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες του κυτταρικού πυρήνα από κύτταρα HeLa και διαχωρίστηκαν σε κλάσματα, με τη βοήθεια φυγοκεντρήσεων και χρωματογραφίας στήλης. Τα κλάσματα που προέκυψαν με την παραπάνω διαδικασία εξετάστηκαν ως προς της ικανότητά τους για μεθυλίωση, χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα το οκταμερές των ιστονών. Σε αυτή τη διαδικασία παρατηρήθηκε η ύπαρξη δραστηριότητας μεθυλοτρανσφεράσης, με ειδικότητα έναντι των ιστονών H3 και H4. Στην ίδια σειρά πειραμάτων, απομονώθηκε το πρωτεϊνικό μόριο με δραστηριότητα μεθυλοτρανσφεράσης ιστονών, με εξειδίκευση στην ιστόνη H4. Το πεπτίδιο το υπεύθυνο για αυτή την ενζυμική δραστηριότητα, βρέθηκε, μετά από χρωματογραφία στήλης σε υδροξυαπατίτη, ότι είναι μεγέθους 42kDa [103]. Η ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας [103] αποκάλυψε ότι το πολυπεπτίδιο αυτό ήταν η πρωτεΐνη PRMT1 του ανθρώπου [35]. Η θέση μεθυλίωσης της ιστόνης H4 είναι η Αργινίνη 3 ενώ η μεθυλίωση της H4 από την PRMT1 διεγείρει την περαιτέρω ακετυλίωσή της από το ένζυμο p300 [103]. Παρά το γεγονός ότι η μεθυλίωση της H4 σε αυτό το κατάλοιπο είναι μια από τις λιγότερο χαρακτηρισμένες τροποποιήσεις που μπορούν να συμβούν στην ουρά των ιστονών, φαίνεται να συνδέονται με την ενεργοποίηση πυρηνικών υποδοχέων, ενώ σε τελευταίες μελέτες φαίνεται ότι η μεθυλίωση αυτή παρέχει επιγενετική μεταγραφική μνήμη κατά την κυτταρική διαφοροποίηση [104].

STAT1: Οι πρωτεΐνες STAT (*signal transducers and activators of transcription*) είναι μια οικογένεια λανθανόντων κυτταροπλασματικών μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ενεργοποιούνται από εξωκυτταρικά μηνύματα, όπως οι παράγοντες αύξησης ή οι κυτοκίνες [105]. Επτά μέλη της οικογένειας STAT των θηλαστικών έχουν περιγραφεί και παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία σε επίπεδο αμινοξέων, σε διάφορες διακριτές περιοχές. Κοινό σε όλα τα πρωτεϊνικά μόρια της οικογένειας STAT είναι μια SH₂ περιοχή και ένα συντηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης, του οποίου η φωσφορυλίωση, σε απόκριση ενεργοποίησης υποδοχέα, μεσολαβεί στον ομο- και ετερο-διμερισμό των πρωτεϊνών STAT, μέσω της αλληλεπίδρασης της φωσφοτυροσίνης και της SH₂ περιοχής [106]. Τα διμερή συσσωρεύονται στον πυρήνα, αναγνωρίζουν συγκεκριμένα στοιχεία DNA στους υποκινητές των γονιδίων και ενεργοποιούν τη μεταγραφή [107].

Ευθυγράμμιση των αμινοτελικών άκρων των επτά STAT των θηλαστικών αποκαλύπτει μια περιοχή υψηλής ομολογίας και ένα αμετάβλητο κατάλοιπο



αργινίνης στη θέση 31 (*Arg-31*), το οποίο υποδηλώνει τη λειτουργική σημασία αυτού του καταλοίπου. Σε μια μελέτη *in vitro* μεθυλίωσης, δείχθηκε ότι στο μόριο της GST-STAT(NH₂) μεθυλιώνεται επαρκώς η *Arg-31*, ειδικά παρουσία της ανασυνδιασμένης PRMT1. Μια πρωτεΐνη σύντηξης με GST, η οποία περιείχε τα 129 αρχικά αμινοξέα της STAT1, χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα *in vitro* μεθυλίωσης από ανασυνδιασμένες PRMT1 ή PRMT3. Η ανασυνδιασμένη PRMT1 κατάφερε να μεθυλίώσει σε μέγιστο βαθμό τη STAT1 ενώ η συγγενική της PRMT3 σε σημαντικά μικρότερο ποσοστό. Μετάλλαξη στο πρωτεϊνικό μόριο GST-STAT(NH₂), κατά την οποία η αργινίνη στη θέση 31 μετατράπηκε σε αλανίνη, είχε σαν αποτέλεσμα την πλήρη απώλεια μεθυλίωσης τόσο από την PRMT1 όσο και από την PRMT3, αποδεικνύοντας ότι η *Arg-31* είναι ο πραγματικός στόχος της μεθυλίωσης από την PRMT1 [57]. Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι η αλληλουχία που περιβάλλει την *Arg-31* μοιάζει λίγο μόνο με την προτεινόμενη πλούσια σε γλυκίνη αλληλουχία που παρατηρείται σε άλλες πρωτεΐνες που μεθυλιώνονται σε κατάλοιπα αργινίνης [26, 32].

Με τη χρήση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων, καθώς και διαφόρων μεταλλαγμένων STAT1 πρωτεϊνών, έγινε φανερό ότι η μεθυλίωση της STAT1 πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα και απαιτεί την παρουσία λειτουργικής STAT1-SH₂ περιοχής, αλλά είναι ανεξάρτητη της φωσφορυλίωσης κατάλοιπων τυροσίνης στη STAT1. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι μόνο το 5-10% του συνολικού ποσού κυτταρικής STAT1 βρέθηκε στον πυρήνα, μετά από διέγερση του IFN α , υποδεικνύοντας ότι μόνο ένα μικρό τμήμα της STAT1 υφίσταται φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης και μετατόπιση στον πυρήνα. Παρόλα αυτά, περισσότερο από το 60% της μεθυλιωμένης μορφής της STAT1 βρέθηκε στον πυρήνα, γεγονός που δηλώνει ότι η στοιχειομετρία της μεθυλίωσης είναι σημαντικά υψηλότερη στην πυρηνική πίσίνα των μορίων STAT1 που διαθέτουν φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης [57].

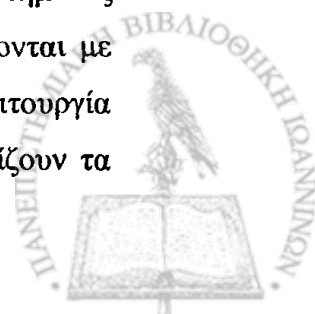
Σύμφωνα, όμως, με μια πιο πρόσφατη μελέτη από τους *Komyod et al. (2005)*, στην οποία πραγματοποιήθηκαν *in vitro* πειράματα μεθυλίωσης με χρήση GST-PRMT1, δεν παρατηρήθηκε μεθυλίωση του καταλοίπου αργινίνης 31 της πρωτεΐνης STAT1, ενώ και το σύνολο των αποτελεσμάτων των μελετών της συγκεκριμένης ομάδας έρχονται σε αντίθεση με το μέχρι σήμερα προτεινόμενο μοντέλο μεθυλίωσης της Αργινίνης 31 των STAT [108]. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ανάγκη για



περαιτέρω μελέτη όσον αφορά την αναγκαιότητα μεθυλίωσης αυτού του καταλοίπου για τη λειτουργικότητα των STAT.

Άλλες αλληλεπιδράσεις: Μια κατηγορία πρωτεϊνών, της ομάδας των πρωτεϊνικών μορίων που προσδένονται στην αλληλουχία ARRE-2 (*antigen receptor response element 2*), είναι και οι παράγοντες ενίσχυσης πρόσδεσης της ιντερλευκίνης (*interleukin enhancer-binding factor proteins, ILF*) [109]. Αυτή η ομάδα πρωτεϊνών περιλαμβάνει την ILF1 [109], τον πυρηνικό παράγοντα 45 (NF45 ή ILF2) [102, 110] και το πυρηνικό παράγοντα 90 (NF90) [111]. Η πρωτεΐνη ILF3, με φαινομενική βιοριακή μάζα περίπου 110kDa [112], έχει πολύ συγγενική αλληλουχία με αυτή της NF90. Η ILF3 υπερφωσφορυλιώνεται κυκλικά στη φάση Μ του κυτταρικού κύκλου, κατά τη διάρκεια της μίτωσης, και είναι γνωστή επίσης με το όνομα φωσφοπρωτεΐνη 4 Μ φάσης (*M phase phosphoprotein 4, MMP4*) [113]. Ένας έλεγχος διυβριδικής αλληλεπίδρασης στη ζύμη για πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την PRMT1 πραγματοποιήθηκε με σκοπό την αναγνώριση πρωτεϊνών που πιθανόν να σχετίζονται με την PRMT1 στα κύτταρα και τη μελέτη της ρύθμισης της PRMT1 [114]. Με αυτή τη μελέτη αναγνωρίστηκε η ILF3 σαν μια πρωτεΐνη που θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με την PRMT1. Η ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ των ILF3 και PRMT1 έχειδειχθεί με τέσσερα διαφορετικά πρωτόκολλα εργασίας: ανάλυση διυβριδικής αλληλεπίδρασης, συνεντοπισμός ανοσοθφορισμού, πειράματα με GST και συντονισμού της ενζυμικής δραστηκότητας της PRMT1. Παρά το γεγονός ότι είναι δυνατό μέσω της υπερέκφρασης να ενισχυθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων, οι ενδογενείς πρωτεΐνες PRMT1 και ILF3 φαίνεται να βρίσκονται στα ζωντανά κύτταρα σαν μακρομοριακά συμπλέγματα. Σε αυτή την ίδια μελέτη, τέλος, δείχθηκε ότι τα 287 αμινοξικά κατάλοιπα του καρβοξυτελικού άκρου του πρωτεϊνικού μορίου ILF3 είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών ILF3/PRMT1, για την μεθυλίωση της αργινίνης της ILF3 από την PRMT1 και για τον έλεγχο της ενεργότητας της PRMT1 από την ILF3 [114].

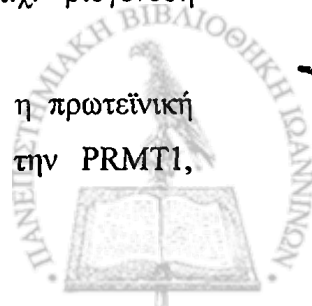
Οι ιντερφερόνες Τύπου Ι (IFN-α και IFN-β) επιδρούν με ποικίλους τρόπους στα κύτταρα, όπώς η αποτροπή του πολλαπλασιασμού των ιών (αντι-ική δράση) και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (αντι-ογκογενετική δράση), καθώς και συντονισμού της λειτουργίας των κυττάρων του ανοσοβιολογικού συστήματος (ανοσορυθμιστική δράση). Αυτές οι πολλαπλές δράσεις των IFN συσχετίζονται με μορφολογικές και βιοχημικές τροποποιήσεις των κυττάρων [115, 116]. Η λειτουργία διαφόρων κυτταρικών γονιδίων ελαττώνεται από τις IFN, οι οποίες καθορίζουν τα



επίπεδα των αντίστοιχων μορίων mRNA τόσο μέσω μεταγραφικού όσο και μέσω μετα-μεταγραφικού ελέγχου [117]. Οι ιντερφερόνες ασκούν τη δράση τους μέσω υποδοχέων ειδικών για κάθε είδος οργανισμού. Για τις ιντερφερόνες Τύπου I, έχουν ταυτοποιηθεί δυο διαμεμβρανικοί υποδοχείς, οι IFNAR1 [118] και IFNAR2-2 (ή IFNAR2-c) [119, 120], οι οποίοι αποτελούν μια επιμηκυσμένη μορφή του IFN-α/βR [121]. Οι IC περιοχές των υποδοχέων ιντερφερόνης Τύπου I λειτουργούν σαν θέσεις πρόσδεσης για πολλές πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται σε διαδικασίες φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης. Διυβριδικός έλεγχος με ολόκληρη την IC περιοχή του υποδοχέα IFNAR1, οδήγησε στην ταυτοποίηση της πρωτεΐνης PRMT1 σαν πρωτεϊνικό μόριο που αλληλεπιδρά με τον IFNAR1 [54].

Ο συνενεργοποιητής του υποδοχέα γ των υπεροξεισωμάτων PGC-1α (*peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α*) είναι ένας μεταγραφικός συνενεργοποιητής πολλών πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων (NR), όπως ο PPARγ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*), ο υποδοχέας θυρεοειδικών ορμονών (TR), οι υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR) και ο υποδοχέας οιστρογόνων (ER). Επιπλέον, μπορεί να λειτουργήσει σε συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στο DNA, όπως ο NRF-1 (*nuclear respiratory factor 1*) [122, 123]. Ο PGC-1α εμπεριέχει πλούσιες σε λευκίνη αλληλουχίες, με τις οποίες προσδένεται σε ορμονο-ενεργοποιημένους NRs. Ο PGC-1α αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της κυτταρικής ομοιόστασης και για αυτό υπόκειται σε πολύ αυστηρό έλεγχο της μεταγραφής του [122-124], ενώ η δραστηριότητά του φαίνεται να ελέγχεται κι από μια ποικιλία μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων και αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες. Με βάση τα αποτελέσματα των μελετών των *Teyssier et al.* (2005), η μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης από την PRMT1 αποτελεί ένα ρυθμιστικό μηχανισμό που καθορίζει την ενεργότητα του PGC-1α. Τα ευρήματα αυτών των μελετών καταδεικνύουν ότι η μεθυλίωση από την PRMT1 των δυο ή τριών καταλοίπων αργινίνης στην αλληλουχία RERQR, η οποία εντοπίζεται στην πλούσια σε Γλουταμινικό περιοχή E του C-τελικού άκρου του PGC-1α, παίζει σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του σαν συνενεργοποιητής και στην ικανότητά του να δρα συνεργατικά με την PRMT1, όπως φαίνεται να συμβαίνει σε διάφορες μεταβολικές διαδικασίες (π.χ. βιογένεση μιτοχονδρίων) [125].

Επίσης, σύμφωνα με μια μελέτη των *Duong et al.* (2005), η πρωτεϊνική φωσφατάση PPA2 (*Protein Phosphatase A 2*) αλληλεπιδρά με την PRMT1,



παρεμποδίζοντας την ενζυματική της δραστηριότητα, όπως φαίνεται σε *in vitro* πειράματα. Αυτή η αλληλεπίδραση γίνεται φανερή από την απουσία μεθυλίωσης των πρωτεϊνικών μορίων STAT1, έναν από τους βασικότερους στόχους μεθυλίωσης των PRMT1 μορίων [126].

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ PRMT1 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

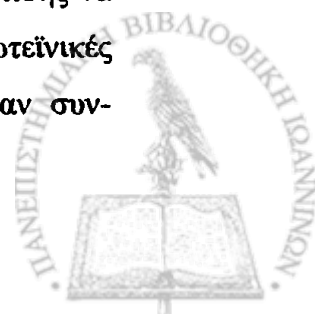
• Το φαινόμενο της μεθυλίωσης (νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών) έχει συνδεθεί κατά καιρούς με την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών. Η μεθυλίωση της MBP (*myelin basic protein*) εμπλέκεται στη διατήρηση της ακεραιότητας του περιβλήματος μυελίνης των νευρικών κυττάρων. Η αναστολή της μεθυλίωσής της οδηγεί σε μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από τον εκφυλισμό του μυελινικού περιβλήματος (subacute combined degeneration) [127, 128].

Στην περίπτωση του συστηματικού ερυθματώδους λύκου, φαίνεται ότι η παρουσία συμμετρικά διμεθυλωμένων καταλοίπων αργινίνης αυξάνει τη συγγένεια των anti-Sm αυτοαντισωμάτων προς τον αντιγονικό τους επίτοπο [129].

Επιπλέον, ανακαλύφθηκε ότι η ενεργότητα της πρωτεΐνης NS3 του HCV (*hepatitis C virus*) καθορίζεται από τη μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης που αυτή περιέχει [130].

Υπάρχουν δεδομένα που καταδεικνύουν πιθανή σχέση της λειτουργία του πρωτεϊνικού προϊόντος του PRMT1 με τον καρκίνο. Τέτοια δεδομένα αποτελούν η υπερέκφραση ορισμένων από τα υποστρώματα του ενζύμου σε ορισμένους όγκους, καθώς και η δραματική αύξηση της κυτταρικής μεθυλίωσης καταλοίπων αργινίνης, όπως έχει αναφερθεί σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου [131-133].

Τα γεγονότα μεθυλίωσης φαίνονται να συνδέονται με τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Τα ένζυμα που καταλύουν αυτές τις διαδικασίες, στην περίπτωση των ιστών είναι ιδιαίτερα σημαντικά όσον αφορά τη διατήρηση ενός συγκεκριμένου μεταγραφικού προγράμματος και τον καθορισμό της κυτταρικής ταυτότητας και «μοίρας». Ακόμα, η δράση μεθυλοτρανσφεράσης αργινίνης εμφανίζεται αντιστρόφως ανάλογη της κυτταρικής ανάπτυξης και ογκογένεσης [34, 54]. Δεν πρέπει επίσης να ξεχνάμε ότι πολλοί καρκίνοι είναι ορμονοεξαρτώμενοι και, καθώς οι πρωτεϊνικές μεθυλοτρανσφεράσες αργινίνης είναι γνωστές για τη λειτουργία τους σαν συν-



ενεργοποιητές πυρηνικών υποδοχέων, αποτελούν υποψήφια μόρια για μελέτη προς αυτή την κατεύθυνση.

Τέλος, δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι η παραγωγή εναλλακτικών μεταγράφων μπορεί να αποτελεί συνέπεια της εμφάνισης ασθενειών, όπως ο καρκίνος [134], καθώς και το γεγονός ότι περίπου το 10–30% των ανθρώπινων γονιδίων που υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα έχουν ιστοειδικά μετάγραφα [135]. Σε πολλές περιπτώσεις, οι δραματικές αλλαγές στα πρότυπα εναλλακτικού ματίσματος σχετίζονται με τις νεοπλασίες και τη μετάσταση [136, 137].

Για όλους λοιπόν τους παραπάνω λόγους, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η διερεύνηση της σχέσης ανάμεσα στο γονίδιο PRMT1 και τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Καθώς, επίσης, και η αναζήτηση του αν η σχέση αυτή επεκτείνεται και σε άλλους επιθηλιακούς ιστούς, όπως αυτός του μαστού.



6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Βιολογικό υλικό

Τα δείγματα για τη μελέτη προέρχονται από ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στα νοσοκομεία «Αγ. Σάββας» και «Ελπίς». Ο αριθμός των δειγμάτων του εντέρου ανέρχεται στα 120, εκ των οποίων τα 60 είναι ζεύγη θετικών – αρνητικών ενώ τα υπόλοιπα 60 είναι μόνο θετικά δείγματα. Επιπλέον, μελετήθηκαν και 24 δείγματα φλεγμονώδους εντέρου. Εκτός αυτών, χρησιμοποιήθηκαν και 62 θετικά δείγματα καρκίνου του μαστού. Σαν θετικά χαρακτηρίζονται τα δείγματα που προέρχονται από το κύριο σώμα του όγκου ενώ σαν αρνητικά αυτά που προέρχονται από την υγιή περιοχή του εξαιρεθέντος ιστού. Το υλικό μεταφέρεται από το χειρουργείο με πάγο στο παθολογοανατομικό τμήμα. Ο παθολογοανατόμος αφαιρεί τα προς μελέτη δείγματα, τα τοποθετεί σε ειδικά φιαλίδια (cryovials) και τα βάζει αμέσως σε υγρό άζωτο. Στη συνέχεια μεταφέρονται και φυλάσσονται μακροχρόνια στους -80°C . Η όλη διαδικασία αποσκοπεί στον να προφυλακτούν τα δείγματα από τη δράση των κυτταρικών ενζύμων, τα οποία μπορεί να καταστρέψουν τα συστατικά των κυττάρων που χρειαζόμαστε (όπως DNA, RNA, πρωτεΐνες).

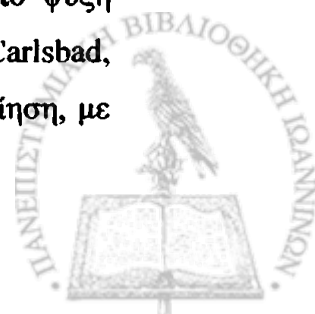
Χρησιμοποιήθηκαν επίσης 2 λευκά κουνέλια (New England White Rabbits) για την παραγωγή αντισωμάτων ειδικών έναντι της πρωτεΐνης που παράγεται κατά την έκφραση του γονιδίου PRMT1.

Μέθοδοι

Ομογενοποίηση ιστού

Η ομογενοποίηση είναι μια διαδικασία που μας επιτρέπει να σπάσουμε τα κύτταρα, από τα οποία αποτελείται ο ιστός, και να λάβουμε το γενετικό υλικό ή οποιοδήποτε άλλο ενδοκυτταρικό συστατικό χρειαζόμαστε για τη μελέτη. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η ομογενοποίηση είναι το πρώτο βήμα για την απομόνωση του ολικού RNA.

Ο ιστός κόβεται σε μικρά κομμάτια, με τη βοήθεια νυστεριού, υπό ψύξη (πάγος και υγρό άζωτο). Στη συνέχεια προστίθεται TRIzol[®] (Invitrogen, Carlsbad, ΗΠΑ), σε αναλογία 1ml / 100mg ιστού, και πραγματοποιείται η ομογενοποίηση, με



μηχανικό τρόπο, με τη συσκευή Polytron (Kinematica AG, Ελβετία). Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε στείρες συνθήκες.

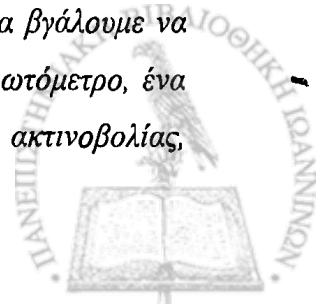
Απομόνωση ολικού RNA

Στις περιπτώσεις εκείνες που ένα κύτταρο χρειάζεται σε αυξημένη ποσότητα ένα πρωτεϊνικό προϊόν, το πρώτο που μπορεί να κάνει είναι να αυξήσει το ρυθμό μεταγραφής του αντίστοιχου γονιδίου. Όσο περισσότερα αντίγραφα διαθέτει, τόσο μεγαλύτερες ποσότητες της αντίστοιχης πρωτεΐνης μπορεί να παράγει. Η ποσότητα λοιπόν του mRNA που προκύπτει από τη μεταγραφή ενός γονιδίου είναι συνήθως ενδεικτική του ρυθμού έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου. Προκειμένου λοιπόν να μελετήσουμε την έκφραση του PRMT1 χρειαζόμαστε το RNA των κυττάρων του καρκινικού όγκου.

Ο ομογενοποιημένος ιστός φυγοκεντρείται στις 13.000 στροφές το λεπτό (rpm) για 10 λεπτά στους 4°C, σε φυγόκεντρο της εταιρείας Hettich Zentrifugen (Γερμανία). Το υπερκείμενο μεταφέρεται και αφήνεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθενται 200μl χλωροφόρμιο / 1ml TRIzol® που προστέθηκε αρχικά, γίνεται έντονη ανακίνηση για 15sec και αφήνεται το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, λαμβάνεται η ανώτερη υδατική φάση, η οποία περιέχει το RNA. Προστίθενται απόλυτη αιθανόλη σε αναλογία 500μl / 1ml TRIzol®, παραμένει το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και μετά φυγοκεντρείται 13.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Το RNA καταβυθίζεται σαν ίζημα στο κάτω μέρος του σωλήνα. Ακολούθως, το ίζημα ξεπλένεται με 1ml κρύου διαλύματος 75% αιθανόλης, φυγοκεντρείται στις 10.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C και αφήνεται να στεγνώσει. Στο τέλος, το ίζημα επαναδιαλύεται σε DEPC treated H₂O (νερό απαλλαγμένο από νουκλεολυτικά ένζυμα), επωάζεται στους 55°C για 10 λεπτά και φυλάσσεται στους -80°C.

Υπολογισμός συγκέντρωσης απομονωμένων δειγμάτων

Η γνώση της συγκέντρωσης του ολικού RNA, καθώς και της καθαρότητας του απομονωμένου υλικού, είναι απαραίτητη, ώστε τα αποτελέσματα που θα βγάλουμε να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούμε το φωτόμετρο, ένα όργανο το οποίο μετράει την απορρόφηση από το δείγμα υπεριώδους ακτινοβολίας,



συγκεκριμένου μήκους κύματος. Ο βαθμός απορρόφησης μπορεί στη συνέχεια με τη χρήση κατάλληλων μαθηματικών τύπων να μετατραπεί σε περιεκτικότητα.

Λαμβάνονται 5μl από το απομονωμένο δείγμα και αραιώνονται σε 995μl απιονισμένου νερού (dH₂O). Στη συνέχεια, το δείγμα φωτομετρείται στα 260nm και στα 280nm και μετράται η απορρόφηση σε αυτά τα μήκη κύματος. Τα συγκεκριμένα μήκη κύματος επιλέχθηκαν λόγω του ότι το RNA παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 260nm. Ο λόγος A_{260nm} / A_{280nm} μας δίνει την καθαρότητα του δείγματος σε RNA. Ο ιδανικός λόγος είναι 1,7 – 1,9 (τα δείγματα περιέχουν σχεδόν αποκλειστικά RNA). Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε σε φωτόμετρο Hitachi UV-VIS (U-2000) (ΗΠΑ).

Καθαρισμός RNA από προσμίξεις

Ο καθαρισμός του δείγματος κρίνεται αναγκαίος σε περιπτώσεις που ο λόγος A_{260nm} / A_{280nm} ξεφεύγει των τιμών 1,7 – 1,9. Τιμές απορρόφησης είτε μεγαλύτερες είτε μικρότερες αυτών των ορίων υποδεικνύουν επιμόλυνση του δείγματος είτε με DNA είτε με πρωτεΐνες. Αυτά τα συστατικά μπορούν να παρεμποδίσουν την πραγματοποίηση διαδικασιών που θα γίνουν σε επόμενα στάδια ή να δώσουν ψευδή αποτελέσματα.

Το προς καθαρισμό δείγμα αραιώνεται με προσθήκη DEPC treated H₂O ως τελικού όγκου 200μl. Προστίθενται 400μl μίγματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (αναλογία 24:1) και το δείγμα ανακινείται έντονα. Μετά από παραμονή 2 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Λαμβάνεται η υπερκείμενη υδατική φάση, στην οποία προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος CH₃COONa 0,3M (pH 5,5) και τριπλάσιος όγκος απόλυτης αιθανόλης. Το δείγμα τοποθετείται στους -20°C για 30 λεπτά και ακολούθως στους -80°C για ακόμα 30 λεπτά. Μετά το πέρας της ώρας, το δείγμα φυγοκεντρείται στις 12.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα στεγνώνεται και διαλύεται σε DEPC treated H₂O.

Μετατροπή του RNA σε cDNA

Για να γίνει δυνατή η χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι αναγκαίο το RNA που έχει απομονωθεί να μετατραπεί σε cDNA. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται το ένζυμο αντίστροφη



μεταγραφάση (*reverse transcriptase*), το οποίο έχει την ικανότητα σύνθεσης DNA έχοντας σαν καλούπι το RNA. Με τη χρήση μάλιστα κατάλληλων μορίων-εκκινητών, υπάρχει η δυνατότητα μετατροπής συγκεκριμένων μορίων RNA σε DNA. Έτσι, χρησιμοποιώντας *oligo(dTs)*, μετατρέπονται μόνο τα μόρια ώριμου mRNA σε cDNA.

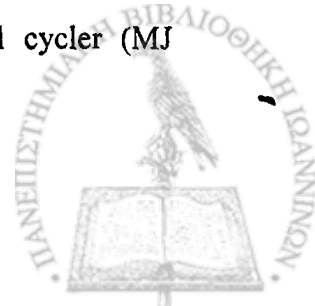
Σε σωλήνα τύπου *erppendorf* τοποθετούνται 2μg ολικού RNA και 10μl από το Mix I. Το δείγμα επωάζεται στους 70°C για 10 λεπτά και αμέσως τοποθετείται σε πάγο για τουλάχιστον 1 λεπτό. Στη συνέχεια, προστίθενται 7μl από το Mix II και γίνεται καλή ανάμιξη. Το δείγμα επωάζεται στους 42°C για 5 λεπτά, προστίθεται 1μl ενζύμου *Thermoscript®RT* (Invitrogen, ΗΠΑ) (αντίστροφη μεταγραφάση) 15U/μl και επωάζεται στους 42°C για 50 λεπτά και στους 70°C για 15 λεπτά. Μετά το τέλος της επώασης, τοποθετείται σε πάγο και προστίθεται 1μl ενζύμου *RNaseH* (Invitrogen, ΗΠΑ) 2U/μl, για τον κατακερματισμό του RNA. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 20 λεπτά και φύλαξη του δείγματος στους -20°C.

Mix I	Mix II
9μl DEPC treated H ₂ O	2μl 5x cDNA Synthesis Buffer (Invitrogen, ΗΠΑ)
1μl <i>oligo(dTs)</i> 0,5μg/μl	2μl MgCl ₂ 25mM
	1μl dNTPs mix 10mM
	2μl DTT 0,1M

Έλεγχος επιτυχίας της αντίστροφης μεταγραφής

Προκειμένου να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας μετατροπής του RNA σε cDNA, πολλαπλασιάζεται ένα *house keeping gene*, με τη βοήθεια της μεθόδου της PCR. Τα *house keeping genes* είναι γονίδια τα οποία εκφράζονται σε όλους τους ιστούς ανεξαιρέτως και με την ίδια ένταση (π.χ. *ακτίνη*). Η παρουσία λοιπόν των μεταγράφων ενός τέτοιου γονιδίου στο δείγμα είναι ενδεικτική της επιτυχίας της μεθόδου.

Σε σωλήνα τύπου *erppendorf* τοποθετούνται 40,4μl από το *mastermix* και 1,2μl του cDNA. Το δείγμα τοποθετείται στη συσκευή PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Inc., ΗΠΑ) και εκτελεί το πρόγραμμα που ακολουθεί:



95°C για 15 λεπτά
 95°C για 30sec
 62°C για 60sec
 72°C για 60sec
 72°C για 10 λεπτά
 4°C για πάντα

} 35 κύκλοι

Αλληλουχία μορίων-εκκινητών (primers) για ακτίνη		
Forward	5'-ATCTCGCACCACACCTTCTA-3'	372bp
Reverse	5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTG-3'	

Mastermix (1x)
32μl dH ₂ O
4μl 10x PCR Buffer (Invitrogen, ΗΠΑ)
0,8μl dNTP mix 10mM
1,6μl MgCl ₂ 50mM
0,8μl εκκινητής F 0,5mg/ml
0,8μl εκκινητής R 0,5mg/ml
0,4μl Platinum Taq DNA πολυμεράση (Invitrogen, ΗΠΑ)

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά το τέλος της διαδικασίας του PCR, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης προκειμένου να «οπτικοποιηθεί» το αποτέλεσμα της διαδικασίας. Η συγκέντρωση του πηκτώματος σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Επιπλέον, το πήκτωμα περιέχει ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου, μια ουσία που μπλέκεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και φθορίζει όταν πέσει πάνω της υπεριώδης ακτινοβολία. Με αυτό τον τρόπο, μπορούμε να γνωρίζουμε την ακριβή θέση του τμήματος DNA πάνω στο πήκτωμα και να καθορίσουμε το μέγεθός του με τη βοήθεια ενός δείκτη μοριακού βάρους, ο οποίος κινείται παράλληλα με το δείγμα.

Στο προϊόν της PCR προστίθενται 8μl διάλυμα φόρτωσης (0.025 gr Μπλε Βρωμοφαινόλης, 2 gr Φικόλη, 2 ml 0,5M EDTA + dH₂O ως τα 10 ml) και τοποθετείται



σε πήκτωμα 1,5% αγαρόζης (1.5 gr αγαρόζη + TBE ως τελικό όγκο 100ml, 10μl βρωμιούχο αιθίδιο 5μg / μl), μαζί με κατάλληλο δείκτη μοριακού βάρους (100bp DNA ladder, Ivitrogen, ΗΠΑ) και ηλεκτροφορεύεται στα 130Volts, μέσα σε διάλυμα TBE (10,8 gr Tris base, 55 gr Βορικό οξύ, 40 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0 + dH₂O ως τελικό όγκο 1L). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης Hybaid (ΗΠΑ), με τη χρήση του τροφοδοτικού PS 305 (Gibco BRL Life Technologies, ΗΠΑ). Το διάλυμα φόρτωσης επιτρέπει την τοποθέτηση του δείγματος σωστά μέσα στο πήκτωμα και την αποφυγή διάχυσής του στο περιβάλλον υγρό, καθώς επίσης και την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφίζεται.

Πολλαπλασιασμός του cDNA του PRMT1

Ο αριθμός των αντιγράφων ενός γονιδίου είναι συνήθως πολύ μικρός για να είναι ανιχνεύσιμος. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται η μέθοδος της PCR, ώστε να παραχθεί αριθμός αντιγράφων ικανός να ανιχνευθεί και να μελετηθεί.

Σε σωλήνα τύπου eppendorf τοποθετούνται 40,4μl από το mastermix και 1,5μl του cDNA. Το δείγμα τοποθετείται στη συσκευή PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Inc., ΗΠΑ) και εκτελεί το πρόγραμμα που ακολουθεί:

95°C για 15 λεπτά	
95°C για 30sec	} 40 κύκλοι
64,5°C για 60sec	
72°C για 60sec	
72°C για 10 λεπτά	
4°C για πάντα	

Μετά το τέλος της διαδικασίας του PCR, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης, μαζί με κατάλληλο δείκτη μοριακού μεγέθους (100bp DNA ladder, Ivitrogen, ΗΠΑ) και ανιχνεύονται οι ισομορφές που εκφράζονται.

Αλληλουχία μορίων-εκκινήτων (primers) για PRMT1	
Forward	5'-GAGGCCGCGAACTGCATCAT-3'
Reverse	5'-TGGCTTTGACGATCTTCACC-3'



Mastermix (1x)
32μl dH ₂ O
4μl 10x PCR Buffer (Invitrogen, ΗΠΑ)
0,8μl dNTP mix 10mM
1,6μl MgCl ₂ 50mM
0,8μl εκκινητής F 0,1mg/ml
0,8μl εκκινητής R 0,1mg/ml
0,4μl Platinum Taq DNA πολυμεράση (Invitrogen, ΗΠΑ)

Απομόνωση γονιδίου από πήκτωμα αγαρόζης

Ένα τμήμα DNA είναι δυνατό, μετά την ηλεκτροφόρηση, να απομονωθεί από το πήκτωμα, να καθαριστεί και να χρησιμοποιηθεί για μελέτη. Αυτή η διαδικασία ακολουθείται όταν το δείγμα πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας, όπως απαιτείται για παράδειγμα σε περιπτώσεις αλληλούχησης γονιδίων (*sequencing*) ή ενσωμάτωσης σε φορέα κλωνοποίησης.

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό του τμήματος DNA που έχει ηλεκτροφορηθεί, είναι δυνατό να ακολουθηθούν δυο πρωτόκολλα: α)εργαστηριακό β)βιομηχανικό.

Α) Εργαστηριακό πρωτόκολλο.

Το δείγμα ηλεκτροφορείται σε 1,5% πήκτωμα αγαρόζης στα 60Volts, μαζί με κατάλληλο δείκτη μοριακού βάρους (100bp DNA ladder, Ivitrogen, ΗΠΑ). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το τμήμα της αγαρόζης που περιέχει το DNA που μας ενδιαφέρει κόβεται με αποστειρωμένο νυστέρι και το κομμάτι του πηκτώματος τοποθετείται σε σωλήνα τύπου erpendorf. Προστίθεται 1ml διαλύματος GE1 (0,3M Οξικό νάτριο, 1mM EDTA, pH 7.0), επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά και ακολούθως το πήκτωμα τοποθετείται σε απορροφητικό χαρτί για 4sec. Στη συνέχεια, τοποθετείται σε ειδικό σωληνάκι με φίλτρο (Costar spin-X centrifuge tube filter, Corning). Το σωληνάκι τοποθετείται στους -80°C για 15 λεπτά και αμέσως μετά στους 37°C για 20 λεπτά. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται άλλες δυο φορές (συνολικά τρεις κύκλοι ψύξης-τήξης) και έπειτα το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ο όγκος του διαλύματος που



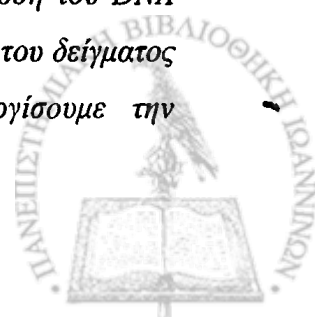
προκύπτει μετά τη φυγοκέντρωση μετράται και προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης. Το δείγμα ανακινείται έντονα (με vortex) για 30sec και φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Λαμβάνεται η υπερκείμενη υδατική φάση και σε αυτή προστίθεται 1/50 του όγκου GE2 (1M $MgCl_2$, 10% οξικό οξύ) και τριπλάσιος όγκος απόλυτης αιθανόλης. Ακολουθεί σύντομη ανάδευση και ψύξη στους $-20^{\circ}C$ για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 15 λεπτά στους $4^{\circ}C$. Το ίζημα που λαμβάνεται ξεπλένεται μια φορά με διάλυμα 70% αιθανόλης, αφήνεται να στεγνώσει και διαλύεται σε 15μl dH_2O .

B) Βιομηχανικό πρωτόκολλο.

Το πρωτόκολλο αυτό πραγματοποιείται με ειδικό kit της εταιρίας Qiagen (Maryland, USA). Το δείγμα ηλεκτροφορείται σε 1% πήκτωμα αγαρόζης στα 60Volts, μαζί με κατάλληλο δείκτη μοριακού βάρους (100bp DNA ladder, Invitrogen, ΗΠΑ). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το τμήμα αγαρόζης που περιέχει το DNA που μας ενδιαφέρει κόβεται με αποστειρωμένο νυστέρι και το κομμάτι του πηκτώματος, το οποίο δεν πρέπει να ξεπερνά τα 400mg, τοποθετείται σε σωλήνα τύπου errendorf. Προστίθεται τριπλάσιος όγκος διαλύματος QG και γίνεται επώαση στους $50^{\circ}C$ για 10 λεπτά. Μετά την πλήρη διάλυση του πηκτώματος προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης και γίνεται ανάμειξη. Το διάλυμα που έχει προκύψει τοποθετείται σε φίλτρο και φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, απομακρύνεται το υγρό και το φίλτρο ξεπλένεται με 500μl διαλύματος QG. Ακολούθως, προστίθενται στο φίλτρο 750μl διαλύματος PE και πραγματοποιείται διπλή φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες, προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα κατάλοιπα αιθανόλης που υπάρχουν στο φίλτρο. Τέλος, προσθέτουμε στο φίλτρο 30-50μl dH_2O ή διαλύματος EB και φυγοκεντρούμε στις 13.000rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να αποδεσμεύσουμε το DNA από τη μεμβράνη και να το συλλέξουμε.

Υπολογισμός συγκέντρωσης σε πήκτωμα

Ένας τρόπος ημιποσοτικού υπολογισμού της συγκέντρωσης του DNA σε ένα δείγμα είναι η ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης μαζί με ένα δείκτη μοριακού μεγέθους, για τον οποίο ταυτόχρονα γνωρίζουμε τη συγκέντρωση του DNA που περιέχει κάθε ζώνη του δείκτη. Συγκρίνοντας λοιπόν τη φωτεινότητα του δείγματος με αυτή της αντίστοιχης ζώνης του δείκτη μπορούμε να υπολογίσουμε την περιεκτικότητα του δείγματος.



Ποσότητα δείγματος ίση με 1μl αραιώνεται με dH₂O ως τελικού όγκου 5μl. Στη συνέχεια προστίθεται ποσότητα διαλύματος φόρτωσης και το δείγμα τοποθετείται σε πήκτωμα 1% αгарόζης, μαζί με δείκτη μοριακού βάρους κατάλληλο για ποσοτικοποίηση και ηλεκτροφορείται στα 110Volts. Ο δείκτης που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι ο Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, ΗΠΑ). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, φωτογραφίζεται και γίνεται σύγκριση της φωτεινότητας των ζωνών, προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση του δείγματος.

Παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων

Τα αντισώματα είναι πρωτεϊνικά μόρια μεγάλου μοριακού βάρους, τα οποία παράγονται από διαφοροποιημένα Β-λεμφοκύτταρα. Η ιδιότητα που διαθέτουν τα αντισώματα και η οποία τα κάνει μοναδικά είναι η εξειδίκευση που παρουσιάζουν. Παράγονται κατά την ευαισθητοποίηση του οργανισμού από ένα αντιγόνο και μπορούν να δεσμεύσουν «ειδικά» μόνο το συγκεκριμένο αντιγόνο που προκάλεσε την παραγωγή τους. Αυτό το πετυχαίνουν προσαρμόζοντας κάθε φορά την μεταβλητή τους περιοχή, ώστε να ταιριάζει με το αντιγόνο όπως το κλειδί με την κλειδαριά. Τα πολυκλωνικά αντισώματα (παραγωγή από πολλούς διαφορετικούς κλώνους Β-λεμφοκυττάρων) μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην εργαστηριακή πρακτική για τον εντοπισμό ενός βιολογικού μορίου, εφόσον λόγω εξειδίκευσης μπορούν να προσδεθούν αποκλειστικά στο μόριο για το οποίο έχουν δημιουργηθεί, «αγνοώντας» τα υπόλοιπα.

Για την παραγωγή αντισωμάτων εναντίον της πρωτεΐνης *prmt1* έγινε σύνθεση ενός πεπτιδίου, το οποίο αποτελεί τμήμα του πρωτεϊνικού της μορίου. Η επιλογή του συγκεκριμένου τμήματος έγινε με βάση το γεγονός ότι βρίσκεται επιφανειακά στο μόριο και είναι κοινό τμήμα όλων των ισομορφών της πρωτεΐνης. Η αλληλουχία του πεπτιδίου που χρησιμοποιήθηκε είναι η εξής:

FGTIGMRPNAKNNRDLDFTI

Το πεπτίδιο συντέθηκε από την εταιρία Invitrogen (ΗΠΑ).



Σύμβολο	Ονομασία Αμινοξέος	Σύμβολο	Ονομασία Αμινοξέος
F	L-Φαινυλαλανίνη	P	L-Προλίνη
G	Γλυκίνη	N	L-Ασπαραγίνη
T	L-Θρεονίνη	A	L-Αλανίνη
I	L-Ισολευκίνη	K	L-Λυσίνη
M	L-Μεθειονίνη	D	L-Ασπαρτικό οξύ
R	L-Αργινίνη	L	L-Λευκίνη

Στη συνέχεια, έγινε προσδιορισμός του φορτίου και της υδροφοβικότητας του μορίου, προκειμένου να καθοριστεί ο κατάλληλος διαλύτης (το πεπτίδιο φυλάσσεται σε λυοφυλιωμένη μορφή). Για να διαλυθεί ένα πεπτίδιο σε νερό θα πρέπει να περιέχει υδρόφιλα αμινοξέα σε ποσοστό τουλάχιστον 25%, ενώ εάν περιέχει υδρόφοβα αμινοξέα σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% για την διάλυση απαιτείται οργανικός διαλύτης (π.χ. DMSO, ισοπροπυλική αλκοόλη). Λόγω της παρουσίας υδρόφιλων αμινοξέων σε ποσοστό 25% και υδρόφοβων 20% ο διαλύτης που επιλέχθηκε ήταν το dH₂O.

Σαν πειραματόζωα για την παραγωγή των αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκαν 2 κουνέλια (New England white rabbits) 3,5kg το καθένα. Το πεπτίδιο εισάγεται με υποδόρια ένεση στο κουνέλι υπό μορφή διαλύματος που αποτελείται από τα εξής:

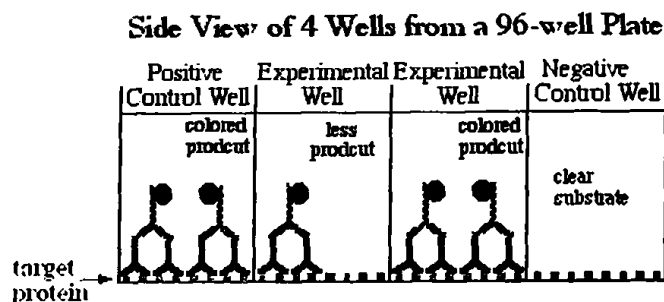
- ❖ 500μg πεπτιδίου + 400 μl dH₂O + 400μl Freund's Adjuvant Complete (Sigma-Aldrich, ΗΠΑ) (1^η ένεση)
- ❖ 200μg πεπτιδίου + 400 μl dH₂O + 400μl Freund's Adjuvant Incomplete (Sigma-Aldrich, ΗΠΑ) (2^η - 6^η ένεση)

Η 2^η ένεση έγινε δυο εβδομάδες μετά την πρώτη ενώ όλες οι επόμενες με διαφορά τριών εβδομάδων μεταξύ τους.

Υπολογισμός τίτλου αντισωμάτων

Ο έλεγχος της συγκέντρωσης των αντισωμάτων, ώστε η συλλογή τους να γίνει στο *optimum* της αντίδρασης, γίνεται με τη βοήθεια της τεχνικής ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Η τεχνική αυτή είναι η πλέον κατάλληλη γιατί συνδυάζει την ειδικότητα των αντισωμάτων με την ευαισθησία των ενζυμικών αντιδράσεων. Η γενική αρχή της μεθόδου φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:





Πριν από κάθε ένεση στα πειραματόζωα, γίνεται λήψη 1ml αίματος (Bleeds). Το αίμα αυτό φυγοκεντρείται στις 5.000rpm για 5 λεπτά στους 4°C και συλλέγεται η υπερκείμενη φάση (ορός), στην οποία περιέχονται και τα αντισώματα. Η πρώτη λήψη γίνεται πριν την εισαγωγή για πρώτη φορά του αντιγόνου (Bleed 0) και το δείγμα αυτό λειτουργεί σαν δείγμα-αναφοράς για τον υπολογισμό του τίτλου των αντισωμάτων, μετά από σύγκριση με τις επόμενες λήψεις (Bleed 1: πριν τη δεύτερη ένεση, Bleed 2: πριν την Τρίτη ένεση κτλ).

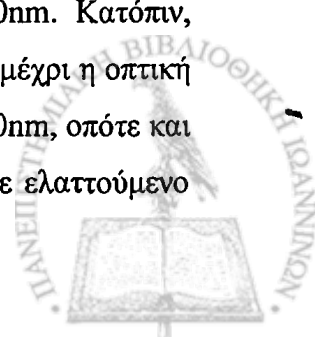
Σε ένα 96-well plate γίνεται επίστρωση με το πεπτίδιο σε συγκέντρωση 1μg/well. Για την αραίωση του πεπτιδίου στην επιθυμητή συγκέντρωση και την επίστρωση χρησιμοποιείται ειδικό διάλυμα επίστρωσης (coating buffer: 50mM Tris (pH 7.8)). Η τελική ποσότητα του διαλύματος επίστρωσης σε κάθε πηγάδι του πιάτου επίστρωσης είναι 100μl. Για να μπορέσει να προσδεθεί το πεπτίδιο στη βάση του πηγαδιού, αφήνεται για 3 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια γίνεται διπλή πλύση με ειδικό διάλυμα (wash buffer: 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 0,5mL/L Tween 20, 0,01% Αζίδιο του νατρίου). Τα Bleeds αραιώνονται σε 6%BSA (*Bovine Serum Albumin*, αλβουμίνη ορού βοειδών), κατά 1.000, 10.000 και 100.000 φορές και τοποθετούνται στα αντίστοιχα πηγάδια. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30-60 λεπτά και μετά πλύσιμο (6 φορές), για την απομάκρυνση του πλεονάζοντος αντισώματος. Για την ανίχνευση του δεσμευθέντος αντισώματος χρησιμοποιείται δεύτερο αντίσωμα, συζευγμένο με υπεροξειδάση HRP (*Horse Radish Peroxidase*). Το δεύτερο αυτό αντίσωμα λαμβάνεται έτοιμο από την εταιρία Dako Cytomation (Denmark) και πρόκειται για πολυκλωνική ανοσοσφαιρίνη που έχει παραχθεί σε αίγα (Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulin/HRP). Πριν τη χρήση του αραιώνεται 1:2000, με 0,05M Tris-HCl (pH 7.2). Ακολούθως, τοποθετείται στα πηγάδια και επωάζεται για 30-60 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιούνται 6 πλύσεις και προστίθενται 100μl TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) και επωάζονται για 30 λεπτά. Το TMB είναι ένα χρωμογόνο που αναγνωρίζει την υπεροξειδάση και από την αντίδραση προκύπτει ένα μπλε

χρώμα. Μετά το τέλος της επώασης, η αντίδραση σταματάει με προσθήκη H_2SO_4 , οπότε και το περιεχόμενο των πηγαδιών, στα οποία πραγματοποιήθηκε η αντίδραση γίνεται κίτρινο. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 450nm σε ειδικό μηχάνημα (Eliza Reader, Sunrise™, TECAN Trading AG, Switzerland) και καθορισμός του τίτλου από τη σύγκριση των Bleeds με το Bleed 0.

Συλλογή και καθαρισμός αντισώματος

*Για την απομόνωση των ανοσοσφαιρινών που παράχθηκαν από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που βρίσκονται στον ορό του αίματος, η τεχνική που χρησιμοποιείται είναι της χρωματογραφίας συγγένειας. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό βιολογικών μιγμάτων, βασιζόμενη σε υψηλά εξειδικευμένες βιολογικές αλληλεπιδράσεις, όπως στην περίπτωση μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος, και εκμεταλλευόμενη τη συγγένεια που παρουσιάζουν μεταξύ τους αυτά τα μόρια. Τα μόρια που ενδιαφερόμαστε να απομονώσουμε, δηλαδή οι ανοσοσφαιρίνες τάξης IgG, παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια ως προς την πρωτεΐνη A και σε αυτή ακριβώς την ιδιότητα στηρίζεται όλη η τεχνική. Η πρωτεΐνη A αποτελεί συστατικό της επιφάνειας του βακτηρίου *Staphylococcus aureus* και έχει την ικανότητα να αντιδρά με τις IgG, μέχρι και να δημιουργεί αδιάλυτα πλέγματα. Αυτά τα πρωτεϊνικά μόρια συνδέονται με σφαιρίδια Sepharose και χρησιμοποιούνται για να δημιουργήσουν τη στατική φάση μιας χρωματογραφικής στήλης. Η στήλη ουσιαστικά λειτουργεί σαν παγίδα για τις ανοσοσφαιρίνες ενώ τα υπόλοιπα μόρια απλά περνάνε από τη στήλη, αφού δεν διαθέτουν τις απαιτούμενες ιδιότητες πρόσδεσης.*

Τοποθετούνται 1,5g πρωτεΐνης A-Sepharose σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Na_3PO_4) συγκέντρωσης 0,1M (pH 8.0) για 30 λεπτά. Τα σφαιρίδια ενυδατώνονται, διογκώνονται και τελικά δημιουργούνται 5ml πηκτώματος. Το πήκτωμα τοποθετείται στη στήλη χρωματογραφίας και κατόπιν διαβιβάζεται το ανωτέρω διάλυμα φωσφορικών, για εξισορρόπηση. Στη συνέχεια τοποθετείται στη στήλη 1mL ορού και αφήνεται να διεισδύσει με αργό ρυθμό. Μετά το πέρας της διείσδυσης του ορού διαβιβάζεται και πάλι διάλυμα φωσφορικών, έως ότου η οπτική πυκνότητα των κλασμάτων έκλουσης ελαττωθεί στο 0,05 στα 280nm. Κατόπιν, διαβιβάζεται διάλυμα κιτρικού νατρίου συγκέντρωσης 0,1M (pH 6.0), μέχρι η οπτική πυκνότητα των κλασμάτων έκλουσης γίνει μικρότερη από 0,05 στα 280nm, οπότε και γίνεται έκλυση των IgG. Με τη διαδοχική διαβίβαση διαλυμάτων με ελαττούμενο



pH (διάλυμα κιτρικού νατρίου 0,1M, pH 4.5, διάλυμα οξικού οξέος 0,1N, pH 3.0) πραγματοποιείται έκλυση και των υπόλοιπων ανοσοσφαιρινών. Η στήλη εξουδετερώνεται με το αρχικό διάλυμα φωσφορικών, το οποίο περιέχει και αζίδιο του νατρίου (NaN_3) 0,02% (σαν συντηρητικό και μικροβιοκτόνο), και τοποθετείται στους 4°C . Οι ανοσοσφαιρίνες που εκλύονται εξουδετερώνονται με διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 1M (pH 6.0).

Υπολογισμός συγκέντρωσης αντισώματος

- Μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους υπολογισμού της συγκέντρωσης πρωτεϊνών είναι η μέθοδος Lowry (Lowry et al., 1951). Ανήκει στην κατηγορία των χρωματομετρικών μεθόδων και περιλαμβάνει δυο τέτοιου είδους αντιδράσεις (ιόντα Cu^{+2} και αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu). Ο συνδυασμός αυτών των αντιδραστηρίων έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός μπλε χρώματος, κατά την παρουσία πρωτεϊνικών μορίων.

Ετοιμάζονται μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων που περιέχουν BSA στις εξής ποσότητες: 0μg, 37μg, 75μg, 150μg, 300μg, σε τελικό όγκο 1,2ml (με προσθήκη νερού). Αυτοί οι σωλήνες χρησιμεύουν για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς. Στη συνέχεια ετοιμάζονται μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων με τις προς μέτρηση ανοσοσφαιρίνες, σε διαφορετικές αραιώσεις. Ο τελικός όγκος και αυτών των διαλυμάτων είναι 1,2ml. Προστίθεται σε κάθε σωλήνα 6ml διαλύματος ACR (1 mL 1% (w/v) CuSO_4 , 1 mL 2 % (w/v) τρυγικό νάτριο, 98 mL 2 % (w/v) Na_2CO_3 σε 0.1 M NaOH) και πραγματοποιείται καλή ανάμιξη. Ακολουθείται επώαση 10 λεπτών και ακολούθως προστίθενται 300ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (Merck, Germany) και γίνεται καλή ανάμιξη. Μετά το πέρας 30 λεπτών το περιεχόμενο των σωλήνων φωτομετρείται σε μήκος κύματος 500nm έναντι «τυφλού» δείγματος (το «τυφλό» δείγμα περιέχει το σύνολο των αντιδραστηρίων εκτός της πρωτεΐνης). Από τις μετρήσεις των δοκιμαστικών σωλήνων με τις γνωστές ποσότητες BSA, δημιουργείται η καμπύλη αναφοράς. Βάσει αυτής υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των προς μέτρηση δειγμάτων ανοσοσφαιρινών που απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν.

Ταυτοποίηση ανοσοσφαιρινών

- Προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση απομονωμένων πρωτεϊνών, αυτές πρέπει να συγκριθούν με ήδη γνωστά πρωτεϊνικά μόρια. Η μέθοδος που ακολουθείται συνήθως



είναι η SDS PAGE ηλεκτροφόρηση (*Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Σαν τεχνική είναι γρήγορη και χαμηλού κόστους. Οι πρωτεΐνες που ηλεκτροφορούνται διαχωρίζονται κυρίως λόγω διαφορετικού MB. Το SDS είναι ένα ανιονικό «απορρυπαντικό», το οποίο καταστρέφει τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνικών μορίων και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο. Χωρίς αυτή την επίδραση, πρωτεΐνες με παρόμοιο MB, αλλά διαφορετική αναδίπλωση στο χώρο, θα διαχωρίζονταν διαφορετικά, καθώς κάποιες θα περνούσαν ευκολότερα το πήκτωμα από άλλες. Το SDS «ξεδιπλώνει» τις πρωτεΐνες, ώστε να διαχωριστούν μόνο με βάση το MB τους.

Συναρμολογείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-Protean (Bio-Rad, ΗΠΑ) και στη συνέχεια φτιάχνεται το πήκτωμα, το οποίο αποτελείται από δύο τμήματα, το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) και το πήκτωμα επιστίβαξης (stacking gel). Για το πήκτωμα διαχωρισμού (12,5%) αναμιγνύονται 4,17ml διαλύματος A (solution A: 30% (w/v) ακρυλαμίδα, 0,8% (w/v) bis-ακρυλαμίδα) με 25ml διαλύματος B (solution B: 1,5M Tris-HCl (pH 8.8), 0,4% SDS) και 3,33ml νερού. Ακολούθως προστίθενται 50μl TEMED (*N,N,N',N'*-τετραμεθύλενο-αιθυλενοδιαμίνη) και 50μl διαλύματος 10% Ammonium Persulfate και γίνεται ανάμιξη. Το μίγμα τοποθετείται στη συσκευή μέχρι η επάνω επιφάνεια να απέχει περίπου 1,5cm από το άνω άκρο των τζαμιών. Το πήκτωμα αφήνεται για 45-60 λεπτά να πολυμεριστεί. Αφού αφαιρεθεί το νερό που καλύπτει το πήκτωμα διαχωρισμού, τοποθετείται επάνω από αυτό το πήκτωμα επιστίβαξης (5%). Το δεύτερο πήκτωμα αποτελείται από 0,67ml διαλύματος A, 1ml διαλύματος C (solution 0,5M Tris-HCl (pH 6.8), 0,4% SDS), 23ml νερό, 30μl 10% Ammonium Persulfate και 5μl TEMED. Τα συστατικά αναμιγνύονται καλά και το μίγμα καλύπτει το προηγούμενο, μέχρι την κορυφή του τζαμιού. Τοποθετείται «κτενάκι», ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων και το πήκτωμα αφήνεται να πολυμεριστεί για 30 λεπτά περίπου. Μετά το πέρας του πολυμερισμού, αφαιρείται το «κτενάκι» και φορτώνονται τα δείγματα. Κάθε δείγμα έχει όγκο 20μl και σε αυτό προστίθενται 5μl 5x Sample Buffer (60mM Tris-HCl (pH 6.8), 25% γλυκερόλη, 2% SDS, 14,4mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 0,1% μπλε της βρωμοφαινόλης), θερμαίνεται στους 100°C για 3-5 λεπτά και τοποθετείται στο πήκτωμα. Μαζί με τα άγνωστα δείγματα, τοποθετείται και δείκτης μοριακού μεγέθους και δείγματα άλλων πρωτεϊνών και ανοσοσφαιρινών (BSA, IgG από άνθρωπο). Γεμίζει η δεξαμενή της συσκευής με διάλυμα ηλεκτροφόρησης SDS 1x

(3g Tris, 14,4g γλυκίνη, 1g SDS + dH₂O ως 1L) και εφαρμόζεται ρεύμα έντασης 150Volts. Όταν η ηλεκτροφόρηση τελειώσει, το πήκτωμα αφαιρείται από τη συσκευή και τοποθετείται σε 20ml διαλύματος Coomassie Gel Stain (1g Coomassie Blue R-250, 450ml μεθανόλη, 450ml dH₂O, 100ml οξικό οξύ), για 15 λεπτά περίπου, προκειμένου να χρωματιστούν οι πρωτεΐνες. Στη συνέχεια ξεπλένεται 2-3 φορές με dH₂O και τοποθετείται σε 50ml διαλύματος Coomassie Gel Destain (100ml μεθανόλη, 100ml οξικό οξύ, 800ml dH₂O) για περίπου 60 λεπτά, προκειμένου να καθαριστεί το πήκτωμα. Στο τέλος της διαδικασίας εμφανίζονται έντονα βαμμένες μπλε μπάλες, ορατές στο φως και το πήκτωμα φωτογραφίζεται.

Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια μέθοδος εντοπισμού πρωτεϊνικών μορίων στο εσωτερικό των κυττάρων, όπως αυτά φαίνονται σε τομές ιστών. Σε αυτή την τεχνική εκμεταλλευόμαστε την ικανότητα που έχουν τα αντισώματα για εξειδικευμένη πρόσδεση σε αντιγόνα. Με το τρόπο αυτό, πέραν της παρουσίας ή όχι ενός αντιγόνου σε έναν ιστό, μπορεί να επιτευχθεί και ακριβής προσδιορισμός της θέσης του μέσα στο κύτταρο. Το εξειδικευμένο αντίσωμα σημαίνεται (με φθορίζουσα ουσία, ένζυμο, ραδιενεργό στοιχείο κ.ά.), ώστε να μπορεί να γίνει οπτικός εντοπισμός του προς αναζήτηση μορίου.

Τομές καρκινικών ιστών εντέρου και μαστού από μπλοκ παραφίνης, πάχους 5μm, από επιλεγμένους ασθενείς που εξέφραζαν την PRMT1, τοποθετούνται πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Μετά από θέρμανση των πλακών στους 65°C, αυτές ενυδατώνονται με διαδοχικές εμβάπτσεις (διπλές) διάρκειας 5 λεπτών σε λουτρά που περιέχουν αρχικά ξυλόλη, ακολούθως ξυλόλη και αιθανόλη (1:1) και τέλος αιθανόλη σε διάφορες συγκεντρώσεις με σειρά: 100%, 96%, 80% και 70%. Στη συνέχεια, ακολουθεί εμβάπτιση των πλακών σε διάλυμα κιτρικού νατρίου περιεκτικότητας 10mmol και θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για 10-12 λεπτά. Οι τομές ξεπλένονται σε διάλυμα TBS (*Tris Buffer Saline*), pH 7,6 (0,15 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,02% (w/v) NaN₂) και επωάζονται για 15 λεπτά σε διάλυμα 3% H₂O₂ σε μεθανόλη (διαδικασία απαραίτητη προκειμένου να αποφευχθεί η δράση της ενδογενούς υπεροξειδάσης). Ακολουθεί επιπλέον ξέπλυμα των τομών με TBS, ενώ ακολούθως επωάζονται αρχικά με 200μl φυσιολογικό ορό αλόγου (*normal blocking serum*) για 15-20 λεπτά και μετά με 200μl πρωτογενούς πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της ανθρώπινης



πρωτεϊνικής μεθυλοτρανσφεράσης αργινίνης 1 για 30 λεπτά. Σε αυτό το στάδιο, τα αρνητικά δείγματα επώάζονται με PBS (10x: 0,137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄). Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, οι τομές ξεπλένονται με TBS και επώάζονται με 200μl βιοτινιλιωμένου δευτερογενούς αντισώματος για 25 λεπτά, ενώ ακολουθεί κι επιπλέον ξέπλυμα. Ακολουθεί επώαση με 200μl αντιδραστηρίου AB complex/HRP (Dako Cytomation, Denmark) 1:100 για άλλα 25 λεπτά, ξέπλυμα με TBS και επώαση με DAB (3,3'-*Diaminobenzidine tetrahydrochloride*) (Sigma-Aldrich, ΗΠΑ) για 10 λεπτά. Μετά το πλύσιμο με TBS και νερό, οι πλάκες βυθίζονται σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 2 λεπτά, αφυδατώνονται με αιθανόλη και ξυλόλη και καλύπτονται με κόλλα DPX και καλυπτρίδα. Τελικά, οι τομές μελετούνται σε μικροσκόπιο και φωτογραφίζονται ορισμένες περιοχές, μετά από επιλογή. Το ψηφιακό φωτογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Nikon Digital Sight DS-L1 (Ιαπωνία).



7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μελέτη των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου PRMT1

Κατά τη διαδικασία πολλαπλασιασμού των cDNA του PRMT1, ανακαλύψαμε ότι εκτός από τα τρία προϊόντα PCR που έπρεπε να πάρουμε, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και τους συγκεκριμένους εκκινητές, λαμβάναμε κι ένα επιπλέον. Τα τρία προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος (*splice variants*) που αναμένονταν έχουν μεγέθη 331bp (v1), 385bp (v2) και 502bp (v3) [78]. Τα μεγέθη αυτά αφορούν τη χρήση του συγκεκριμένου ζεύγους μορίων-εκκινητών και η διαφορά στο μέγεθος οφείλεται στην παρουσία ή απουσία των εξωνίων 2 και 3. Συγκεκριμένα, στην v3 υπάρχουν και τα δυο εξώνια, στην v2 απουσιάζει το εξώνιο 3 ενώ στην v1 δεν υπάρχει ούτε το εξώνιο 2 ούτε το εξώνιο 3. Εμείς ανακαλύψαμε την παρουσία ενός επιπλέον προϊόντος, το οποίο είχε μέγεθος μικρότερο από 300bp. Μετά από sequencing, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα επιπλέον προϊόν εναλλακτικού ματίσματος, μεγέθους 283bp, το οποίο ονομάσαμε v4. Η πλήρης αλληλουχία του ώριμου mRNA του προϊόντος v4 είναι η εξής:

```

1  gtgggcagcc gaggccgcga actgcatcat ggaggtgtcc tgtggccagg cggaaagcag
61  tgagaagccc aacgctgagg acatgacatc caaagattac tactttgact cctacgcaca
121 ctttg* gcaac tccatgttc ataaccggca cctcttcaag gacaaggtgg tgctggacgt
181 eggctcgggc accggcatcc tctgcatgtt tgetgccaag gccggggccc gcaaggtcat
241 cgggatcgtg tgtccagta tctctgatta tgcggtgaag atcgtcaaag ccaacaagtt
301 agaccacgtg gtgaccatca tcaaggggaa ggtggaggag gtggagctcc cagtggagaa
361 ggtggacatc atcatcagcg agtggatggg ctactgcctc ttctacgagt ccatgctcaa
421 caccgtgctc tatgcccggg acaagtggct ggcgcccgat ggcctcatct tccagaccg
481 ggccacgtg tatgtgacgg ccacgagga ccggcagtac aaagactaca agatccactg
541 gtgggagaac gtgtatggct tcgacatgtc ttgcatcaaa gatgtggcca ttaaggagcc
601 cctagtggat gtcgtggacc ccaaacagct ggtcaccaac gcctgcctca taaaggaggt
661 ggacatctat accgtcaagg tggaagacct gaccttcacc tccccgttct gcctgcaagt
721 gaagcggaat gactacgtgc acgccctggg ggcctacttc aacatcgagt tcacacgtg
781 ccacaagagg accggcttct ccaccagccc cgagtccccg tacacgcact ggaagcagac
841 ggtgttctac atggaggact acctgaccgt gaagacgggc gaggagatct tcggcaccat
901 cggcatgcgg cccaacgcca agaacaaccg ggacctggac ttaccatcg acctggactt
961 caagggccag ctgtgcgagc tgtcctgtc caccgactac cggatgcgt gaggccccgc

```



```

1021 tctcccgccc tgcacgagcc caggggctga gcgttcctag gcggttccgg ggctccccct
1081 tcctctccct ccctcccgca gaaggggggt ttaggggcct gggctggggg gatggggagg
1141 gcacatcgtg actgtgtttt tcataactta tgttttata tgggtgcatt tacgccaata
1201 aatcctcagc tggg

```

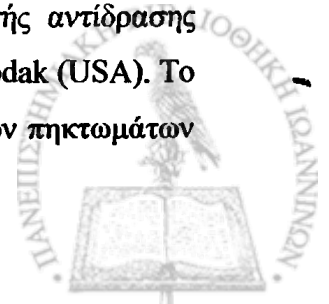
Το νέο αυτό εναλλακτικό μετάγραφο του γονιδίου PRMT1 είναι μικρότερο κατά 48 νουκλεοτίδια συγκρινόμενο με την ισομορφή v1. Τα νουκλεοτίδια φαίνονται να απουσιάζουν από τα όρια του τέταρτου και πέμπτου εξωνίου του γονιδίου (σημειώνεται με κόκκινο αστερίσκο στην παραπάνω αλληλουχία, *). Επιπλέον, με έντονα γράμματα και κίτρινη υπογράμμιση ορίζονται τα όρια της κωδικοποιούσας περιοχής του mRNA (atg: κωδικόνιο έναρξης, tga: κωδικόνιο λήξης), ενώ η γαλάζια υπογράμμιση υποδηλώνει την περιοχή του mRNA που κωδικοποιεί για το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Το νέο αυτό προϊόν του εναλλακτικού ματίσματος του mRNA του PRMT1 καταχωρήθηκε στο PubMed με αριθμό καταχώρησης (accession number) AY775289.

Η σύγκριση του μεταγράφου που ανακαλύψαμε με τα ήδη γνωστά έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST. Το BLAST είναι ένας αλγόριθμος που χρησιμεύει στη σύγκριση της πρωτοταγούς δομής βιολογικών μορίων, όπως τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες. Δίνει τη δυνατότητα στον ερευνητή να συγκρίνει μια αλληλουχία με μια βάση δεδομένων αλληλουχιών και να εντοπίσει αλληλουχίες παρόμοιες με την υπό εξέταση, καθώς επίσης να βρει και το βαθμό ομοιότητάς τους. Το πρόγραμμα αυτό σχεδιάστηκε από τους Eugene Myers, Stephen Altschul, Warren Gish, David J. Lipman και Webb Miller, σε συνεργασία με το NIH (National Institute of Health) των ΗΠΑ [138].

Μελέτη της έκφρασης του PRMT1 σε επίπεδο mRNA στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου PRMT1 μελετήθηκαν υπό το πρίσμα της κλινικής σημασίας που αυτά μπορεί να παρουσιάζουν.

Το πρώτο στάδιο αυτής της μελέτης αφορά την ημι-ποσοτική μέτρηση της έκφρασης του PRMT1, με τη βοήθεια της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και της συσκευής Gel Logic 100 Imaging System της Kodak (USA). Το σύστημα αυτό επιτρέπει τη λήψη φωτογραφιών υψηλής ανάλυσης των πηκτωμάτων



αγαρόζης, ενώ με τη βοήθεια του λογισμικού που το συνοδεύει (1D Image Analysis Software, version 3.6) είναι δυνατή η μέτρηση της φωτεινότητας των ζωνών (ανάλογη της ποσότητας των μορίων), μέσω pixels, με μεγάλη ακρίβεια. Αυτό επιτρέπει τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των μεταγράφων που μετρώνται.

Τα μόρια εκκινητές που σχεδιάστηκαν υβριδοποιούνται με το πρώτο (2732bp έως 2751bp) και το έκτο εξώνιο (7583bp έως 7603bp) του γονιδίου. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ανίχνευση όλων των ισομορφών, εφόσον το εναλλακτικό μάτισμα αφορά το δεύτερο και τρίτο εξώνιο (καθώς και το τέταρτο και πέμπτο για την ισομορφή που ανακαλύψαμε), ενώ η περιοχή που κωδικοποιεί για το ενεργό κέντρο των παραγόμενων ενζύμων εντοπίζεται στο πέμπτο εξώνιο (αλληλουχία που υπάρχει και στις τέσσερις ισομορφές).

Το κάθε μετάγραφο εντοπίζεται στο πήκτωμα αγαρόζης και η ποσότητά του υπολογίζεται με μέτρηση της φωτεινότητας κάθε ζώνης. Η τιμή αυτή συγκρίνεται με την αντίστοιχη του γονιδίου αναφοράς και ο λόγος που προκύπτει μας βοηθάει να κατατάξουμε το δείγμα σαν υψηλής ή χαμηλής έκφρασης.

A. Συσχέτιση της έκφρασης των mRNA του PRMT1 σε δείγματα του παχέος εντέρου με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους.

Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα παχέος εντέρου και συγκεκριμένα 120 θετικά (κύριο σώμα του όγκου), 84 αρνητικά (60 επί φυσιολογικού ιστού και 24 φλεγμονώδους ιστού), καθώς και 14 αδενώματα. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ο λόγος της έκφρασης του mRNA του PRMT1 προς την έκφραση του mRNA του γονιδίου της β-ακτίνης, το οποίο είναι γονίδιο σταθερής έκφρασης (*housekeeping gene*). Η ποσοτικοποίηση αυτής της έκφρασης πραγματοποιήθηκε μέσω της μέτρησης της έντασης των ζωνών PRMT1 και β-ακτίνης, με τη βοήθεια του λογισμικού 1D Image Analysis Software, έκδοση 3.6 (Eastman Kodak, USA).

Στον Πίνακα 5 φαίνονται τα χαρακτηριστικά των ατόμων που απαρτίζουν τη συγκεκριμένη ομάδα μελέτης.



Μεταβλητή	Μέση τιμή $\pm$ ΤΣ	Εύρος	Εκατοστημόρια				
			10	25	50 (Διάμεσος)	75	90
Ηλικία (χρόνια)	67.5 $\pm$ 1.1	31-92	51.6	60.0	70.0	76.0	81.0
Μέγεθος όγκου (cm)	4.48 $\pm$ 0.17	1.80-12.0	2.57	3.50	4.20	5.05	6.50
Ελευθέρα νόσου επιβίωση (μήνες)	37.3 $\pm$ 2.8	0.0-132.0	0.0	0.0	48.0	58.0	64.0
Ολική επιβίωση (μήνες)	46.7 $\pm$ 2.4	1.0-132.0	12.0	26.0	48.0	58.7	65.0

ΤΣ: Τυπικό σφάλμα

Πίνακας 5: Κατανομή των αριθμητικών μεταβλητών της μελέτης

Το γονίδιο της πρωτεϊνικής μεθυλοτρανσφεράσης της αργινίνης 1 εμφανίζει τέσσερα διαφορετικά μόρια ώριμου mRNA, σαν αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος του πρόδρομου mRNA που προκύπτει κατά τη μεταγραφή του. Αυτές οι τέσσερις ισομορφές παρουσιάζουν μια ποικιλότητα στο πρότυπο έκφρασης, τόσο ως προς την ποσότητα όσο και ως προς το είδος των παραγόμενων ώριμων mRNA. Στον Πίνακα 6 απεικονίζεται αυτό το πρότυπο έκφρασης των διαφόρων ισομορφών. Για καθεμία από αυτές συσχετίζεται η έκφραση (υψηλή ή χαμηλή) με το είδος του ιστού που παρατηρείται (φυσιολογικός, αδενωματικός, καρκινικός).

Η σχέση μεταξύ της έκφρασης των ισομορφών του PRMT1 και του ιστού αναλύθηκε με την εφαρμογή του τεστ χ^2 . Από τον Πίνακα 6 φαίνεται ότι η υψηλή έκφραση της PRMT1-v1 σχετίζεται στατιστικά με τον καρκινικό φαινότυπο ($p < 0.001$). Για τις υπόλοιπες ισομορφές δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά έκφρασης μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού.



Ίστός	Σύνολο	Αριθμός ασθενών (%)		Τιμή p ¹
		Χαμηλή έκφραση ² PRMT1-v1	Υψηλή έκφραση ² PRMT1-v1	
Φυσιολογικός	83	72 (86.7)	11 (13.3)	<0.001
Αδένωμα	14	11 (78.6)	3 (21.4)	
Καρκινικός	120	63 (52.5)	57 (47.5)	
Χαμηλή έκφραση ² PRMT1-v2 Υψηλή έκφραση ² PRMT1-v2				
Φυσιολογικός	83	78 (94.0)	5 (6.0)	0.25
Αδένωμα	14	13 (92.9)	1 (7.1)	
Καρκινικός	116	101 (87.1)	15 (12.9)	
• Χαμηλή έκφραση ² PRMT1-v3 Υψηλή έκφραση ² PRMT1-v3				
Φυσιολογικός	84	68 (81.0)	16 (19.0)	0.57
Αδένωμα	14	11 (78.6)	3 (21.4)	
Καρκινικός	120	103 (85.8)	17 (14.2)	
~ Χαμηλή έκφραση ² PRMT1-v4 Υψηλή έκφραση ² PRMT1-v4				
Φυσιολογικός	81	60 (74.1)	21 (25.9)	0.057
Αδένωμα	14	13 (92.9)	1 (7.1)	
Καρκινικός	120	103 (85.8)	17 (14.2)	

¹ Τεστ χ^2 ² PRMT1/ β -ακτίνη

Πίνακας 6: Πρότυπο έκφρασης των ισομορφών του PRMT1 σε ιστούς εντέρου

Επιπλέον, η σχέση των επιπέδων έκφρασης κάθε ισομορφής του PRMT1 και της κατάστασης των λεμφαδένων, όπως και του σταδίου κατά TNM, αναλύθηκαν με εφαρμογή του παραμετρικού Fisher's Exact Test. Η σχέση μεταξύ του βαθμού κακοήθειας και της έκφρασης του mRNA για κάθε ισομορφή αναλύθηκε με εφαρμογή του τεστ χ^2 . Ο Πίνακας 7 δείχνει τη στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας υψηλής έκφρασης του PRMT1-v1 σε όγκους προχωρημένου σταδίου κατά TNM ($p=0.001$), καθώς και σε όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας ($p=0.005$). Επίσης, παρατηρείται ασθενέστερη συσχέτιση της υψηλής έκφρασης PRMT1-v1 ως προς την παρουσία θετικών λεμφαδένων στους ασθενείς ($p=0.042$).

Η έκφραση των υπόλοιπων ισομορφών δεν φαίνεται να παρουσιάζει κάποια ιδιαίτερα στατιστικά σημαντική σχέση με κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους. Εμφανίζεται μόνο μια ελαφρά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην υψηλή έκφραση PRMT1-v2 και το προχωρημένο κατά TNM στάδιο της νόσου ($p=0.06$).



Μεταβλητή	Σύνολο	Αριθμός ασθενών (%)		Τιμή p
		Χαμηλή έκφραση ^b PRMT1-v1	Υψηλή έκφραση ^b PRMT1-v1	
<u>Κατάσταση λεμφαδένων</u>				
Αρνητικοί	40	27 (67.5)	13 (32.5)	0.042^a
Θετικοί	61	28 (45.9)	33 (54.1)	
<u>Στάδιο TNM</u>				
I	44	31 (70.5)	13 (29.5)	0.001^a
II-III	44	15 (34.1)	29 (65.9)	
<u>Βαθμός κακοήθειας</u>				
I	9	6 (66.7)	3 (33.3)	0.005^c
II	36	26 (72.2)	10 (27.8)	
III	46	17 (37.0)	29 (63.0)	
Χαμηλή έκφραση ^b PRMT1-v2 Υψηλή έκφραση ^b PRMT1-v2				
<u>Κατάσταση λεμφαδένων</u>				
Αρνητικοί	40	36 (90.0)	4 (10.0)	0.75 ^a
Θετικοί	57	49 (86.0)	8 (14.0)	
<u>Στάδιο TNM</u>				
I	44	41 (93.2)	3 (6.8)	0.06^a
II-III	40	31 (77.5)	9 (22.5)	
<u>Βαθμός κακοήθειας</u>				
I	9	8 (88.9)	1 (11.1)	0.12 ^c
II	36	34 (94.4)	2 (5.6)	
III	42	33 (78.6)	9 (21.4)	
Χαμηλή έκφραση ^b PRMT1-v3 Υψηλή έκφραση ^b PRMT1-v3				
<u>Κατάσταση λεμφαδένων</u>				
Αρνητικοί	40	32 (80.0)	8 (20.0)	0.26 ^a
Θετικοί	61	54 (88.5)	7 (11.5)	
<u>Στάδιο TNM</u>				
I	44	42 (95.5)	2 (4.5)	0.67 ^a
II-III	44	40 (90.9)	4 (9.1)	
<u>Βαθμός κακοήθειας</u>				
I	9	9 (100.0)	0 (0.0)	0.59 ^c
II	36	34 (94.4)	2 (5.6)	
III	46	42 (91.3)	4 (8.7)	
Χαμηλή έκφραση ^b PRMT1-v4 Υψηλή έκφραση ^b PRMT1-v4				
<u>Κατάσταση λεμφαδένων</u>				
Αρνητικοί	40	35 (87.5)	5 (12.5)	0.59 ^a
Θετικοί	61	53 (86.9)	8 (13.1)	
<u>Στάδιο TNM</u>				
I	44	37 (84.1)	7 (15.9)	0.50 ^a
II-III	44	38 (86.4)	6 (13.6)	
<u>Βαθμός κακοήθειας</u>				
I	9	6 (66.7)	3 (33.3)	0.25 ^c
II	36	32 (88.9)	4 (11.1)	
III	46	39 (84.8)	7 (15.2)	

Πίνακας 7: Συσχέτιση της έκφρασης των ισομορφών του PRMT1 και άλλων παραμέτρων σε ασθενείς καρκίνου εντέρου ^a Fisher's Exact Test ^b PRMT1/β-ακτίνη ^c Τεστ χ^2

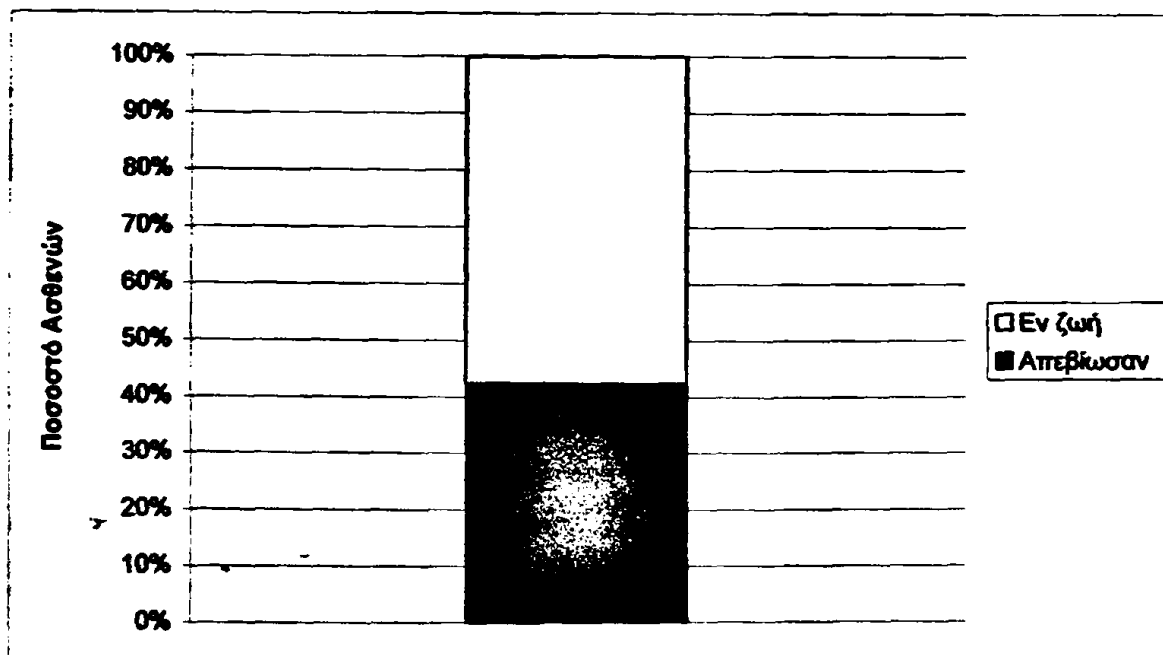


Β. Συσχέτιση της ημι-ποσοτικής έκφρασης των mRNA του PRMT1 με την ελεύθερα νόσου επιβίωση.

Ο χρόνος επιβίωσης για έναν ασθενή καθορίζεται σαν το χρονικό διάστημα μεταξύ της διάγνωσης της ασθένειας και της υποτροπής (χρόνος επιβίωσης ελεύθερος νόσου, disease free survival-DFS) ή του θανάτου (ολική επιβίωση, overall survival-OS). Η ανάλυση επιβίωσης αποτελεί μια εκτίμηση της πιθανότητας επιβίωσης ενός ατόμου για δεδομένο χρόνο.

Σαν συνέχεια του πρώτου σταδίου της μελέτης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση επιβίωσης με χρήση του μοντέλου γραμμικής παλινδρόμησης του Cox [139]. Η ανάλυση αφορά τόσο την ολική επιβίωση (OS) όσο και την ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) των ασθενών και συμπεριλαμβάνει τη διακριτή μεταβλητή του επιπέδου έκφρασης όλων των ισομορφών του PRMT1, καθώς και κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους (στάδιο κατά TNM, ηλικία ασθενούς, ιστολογική διαβάθμιση του όγκου).

Στους Πίνακες 8 και 9 φαίνονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης επιβίωσης. Χρησιμοποιήθηκαν τα στοιχεία 113 ασθενών, εκ των οποίων οι 48 απεβίωσαν ενώ οι 65 ήταν εν ζωή μέχρι τη στιγμή της καταγραφής (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Ποσοστά ασθενών που απεβίωσαν/βρίσκονταν εν ζωή κατά τη διάρκεια της μελέτης σε σχέση με το σύνολο των ασθενών.



Στην ανάλυση μιας μεταβλητής, φαίνεται να υπάρχει σημαντική συσχέτιση της υψηλής έκφρασης του PRMT1-v1 με την ολική επιβίωση (OS) (Hazard ratio= 2.24, $p=0.008$), όπως επίσης, σε μικρότερο βαθμό, και με την ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) (Hazard ratio= 3.81, $p=0.011$). Τα Hazard ratios σε αυτές τις περιπτώσεις δείχνουν το ρυθμό εμφάνισης ενός γεγονότος. Επομένως εδώ παρουσιάζεται η κατά 2,24 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα θανάτου, όπως και η κατά 3,81 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής σε ασθενείς με υψηλή έκφραση PRMT1-v1. Επιπλέον, παρουσιάζεται αρκετά σημαντική συσχέτιση της υψηλής έκφρασης του PRMT1-v2 με την ολική επιβίωση (OS) (Hazard ratio= 2.41, $p=0.026$) (Πίνακας 8).

Μεταβλητή	Επιβίωση Ελευθέρα Νόσου			Ολική Επιβίωση		
	HR ¹	95% CI ²	Τιμή p	HR ¹	95% CI ²	Τιμή p
<i>Ανάλυση μιας μεταβλητής</i>						
PRMT1-v1						
Χαμηλή έκφραση	1.00			1.00		
Υψηλή έκφραση	3.81	1.35-10.73	0.011	2.24	1.23-4.09	0.008
PRMT1-v2						
Χαμηλή έκφραση	1.00			1.00		
Υψηλή έκφραση	1.66	0.38-7.32	0.49	2.41	1.11-5.22	0.026
PRMT1-v3						
Χαμηλή έκφραση	1.00			1.00		
Υψηλή έκφραση	1.59	0.45-5.57	0.46	1.26	0.56-2.83	0.57
PRMT1-v4						
Χαμηλή έκφραση	1.00			1.00		
Υψηλή έκφραση	0.81	0.23-2.81	0.73	0.48	0.17-1.35	0.16

¹ Hazard ratio (HR) υπολογισμένο σύμφωνα με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox

² Διάστημα εμπιστοσύνης (confidence interval) του υπολογιζόμενου Hazard ratio

Πίνακας 8: Συσχέτιση των ισομορφών του PRMT1 με την ολική και την ελεύθερα νόσου επιβίωση, με βάση το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης μιας μεταβλητής του Cox.

Στην ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών, κανένα αποτέλεσμα για την έκφραση των ισομορφών του PRMT1 δεν παραπέμπει στη δυνατότητα χρησιμοποίησής του σαν προγνωστικό δείκτη (Πίνακας 9).



Μεταβλητή	Επιβίωση Ελευθέρα Νόσου			Ολική Επιβίωση		
	HR ¹	95% CI ²	Τιμή p	HR ¹	95% CI ²	Τιμή p
<i>Ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών³</i>						
PRMT1-v1						
Χαμηλή έκφραση	1.00			1.00		
Υψηλή έκφραση	1.69	0.54-5.32	0.37	0.84	0.366-1.94	0.69
PRMT1-v2						
Χαμηλή έκφραση	1.00			1.00		
Υψηλή έκφραση	0.38	0.041-3.61	0.41	0.98	0.35-2.71	0.97
PRMT1-v3						
Χαμηλή έκφραση	1.00			1.00		
Υψηλή έκφραση	0.78	0.087-6.99	0.82	0.50	0.13-1.88	0.31
PRMT1-v4						
Χαμηλή έκφραση	1.00			1.00		
Υψηλή έκφραση	1.15	0.31-4.24	0.83	1.05	0.35-3.15	0.93

¹ Hazard ratio (HR) υπολογισμένο σύμφωνα με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης Cox

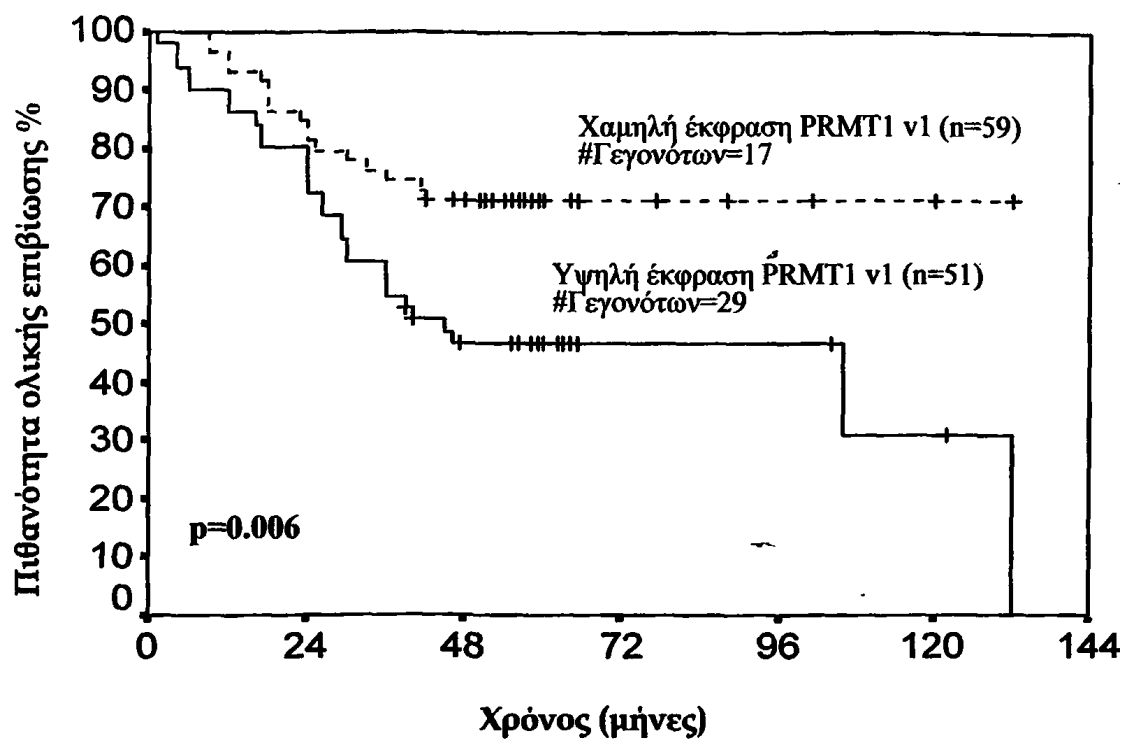
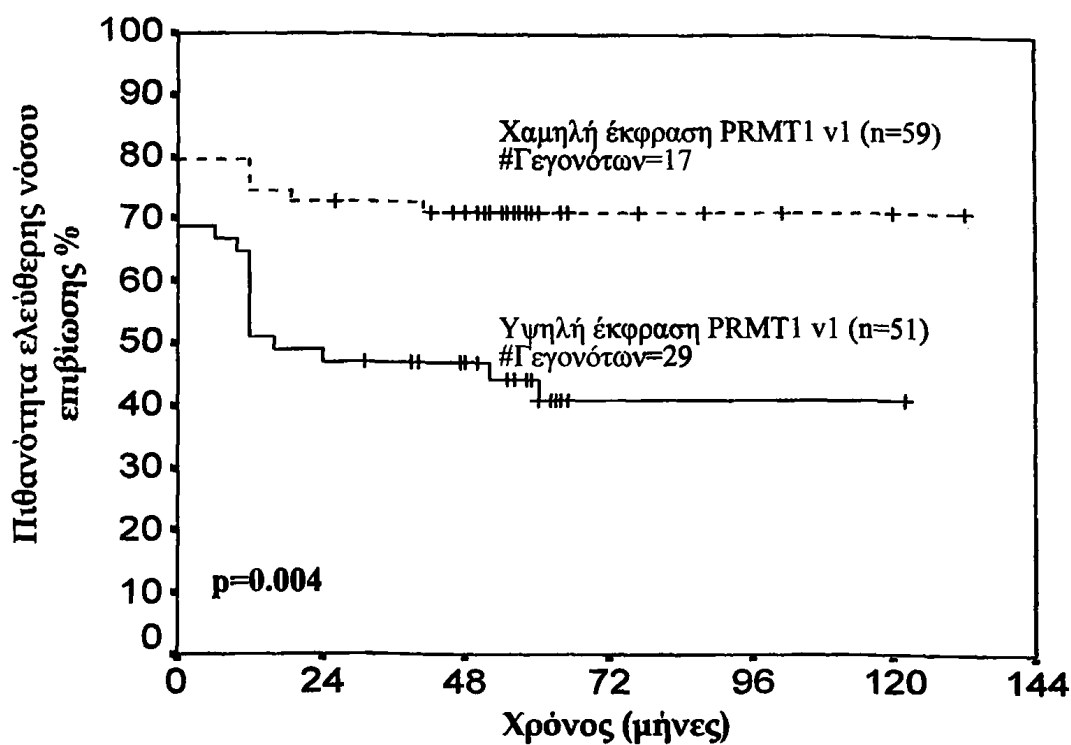
² Διάστημα εμπιστοσύνης (confidence interval) του υπολογιζόμενου Hazard ratio

³ Το πολυπαράγοντικό μοντέλο προσαρμόστηκε με το στάδιο κατά TNM, την ηλικία του ασθενούς και την ιστολογική διαβάθμιση του όγκου

Πίνακας 9: Συσχέτιση των ισομορφών του PRMT1 με την ολική και την ελευθέρα νόσου επιβίωση, με βάση το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης πολλαπλών μεταβλητών του Cox.

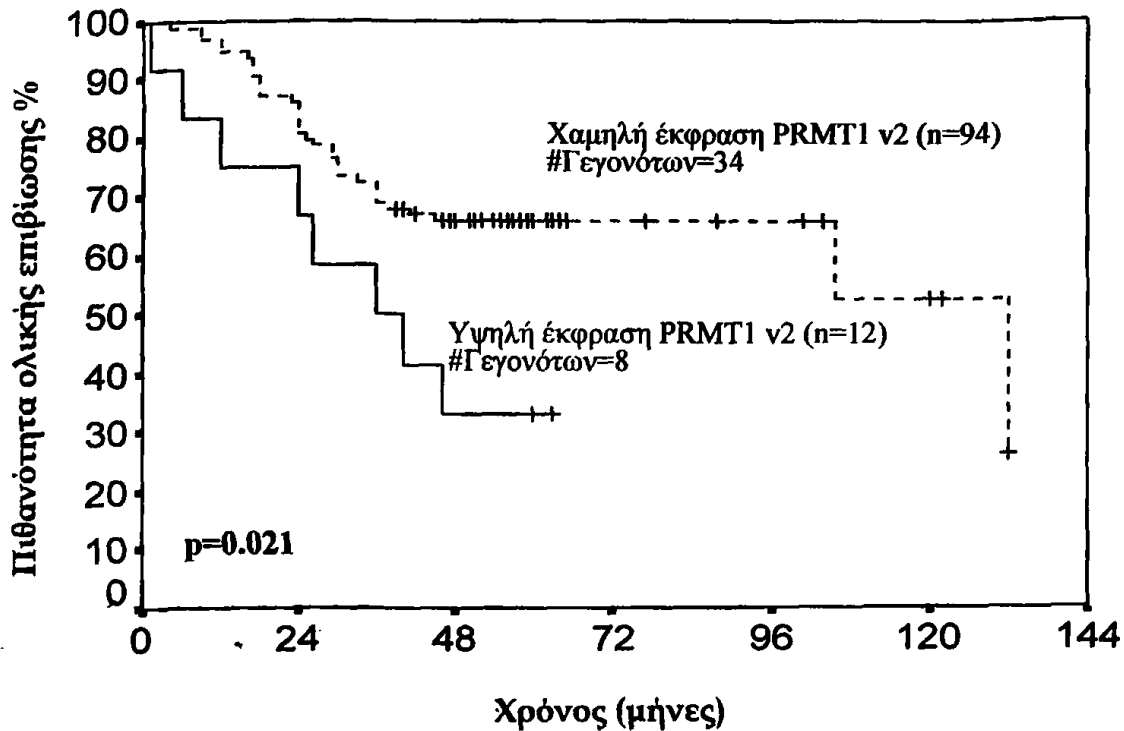
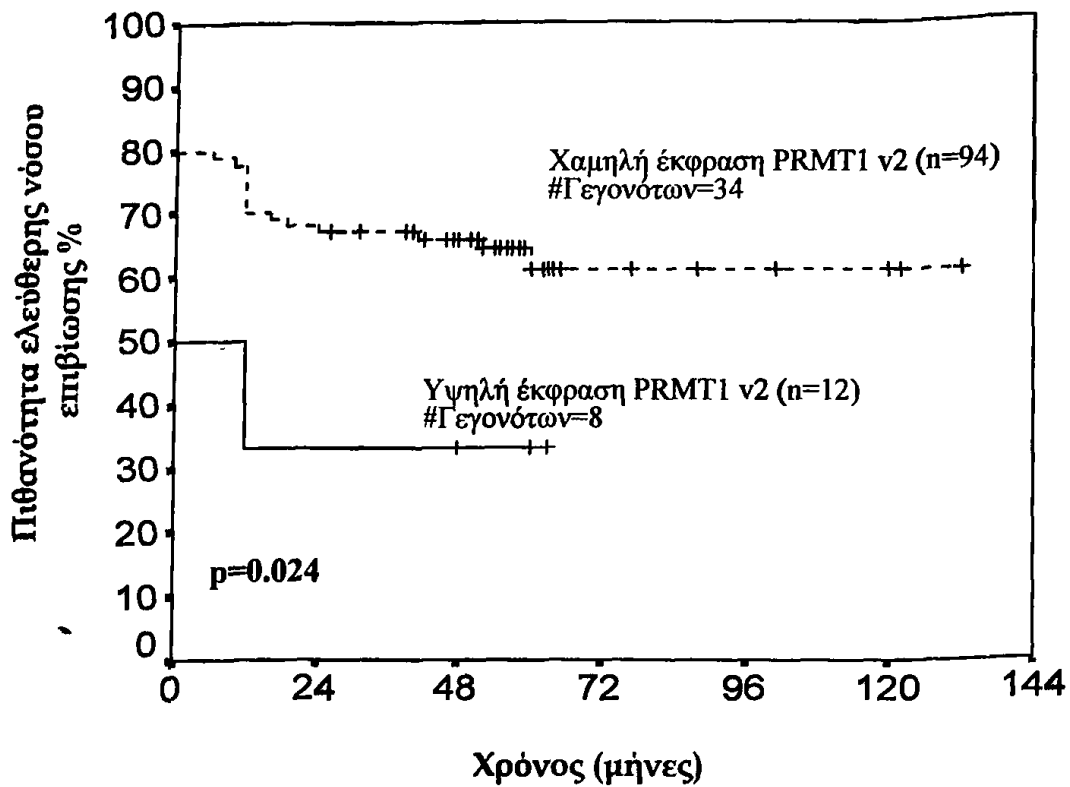
Στην ανάλυση επιβίωσης σύμφωνα με τη μέθοδο Kaplan-Meier φαίνεται η σημαντικά χειρότερη πρόγνωση για τους ασθενείς που παρουσιάζουν υψηλή έκφραση του PRMT1-v1 σε σχέση με αυτούς στους οποίους η έκφραση είναι χαμηλή. Τα αποτελέσματα αυτά αφορούν τόσο στην ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) ($p=0.004$) όσο και στην ολική επιβίωση (OS) ($p=0.006$) (Σχήμα 2). Επιπλέον, δυσμενής φαίνεται να είναι η πρόγνωση και για τους ασθενείς που εμφανίζουν υψηλή έκφραση του PRMT1-v2, σε σχέση με την ολική επιβίωση (OS) ($p=0.021$), αλλά και με την ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) ($p=0.024$) (Σχήμα 3). Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης των άλλων δυο ισομορφών, PRMT1-v3 και PRMT1-v4, δεν φαίνεται να σχετίζονται σημαντικά με τον κίνδυνο υποτροπής ή θανάτου (Σχήμα 4, Σχήμα 5).





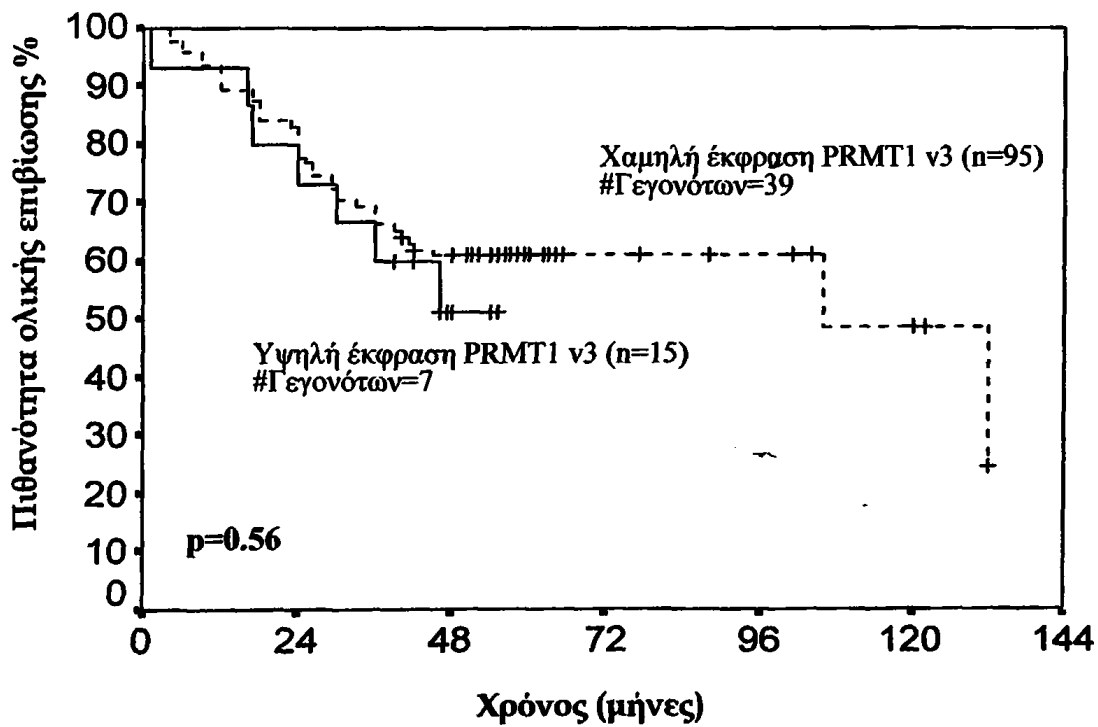
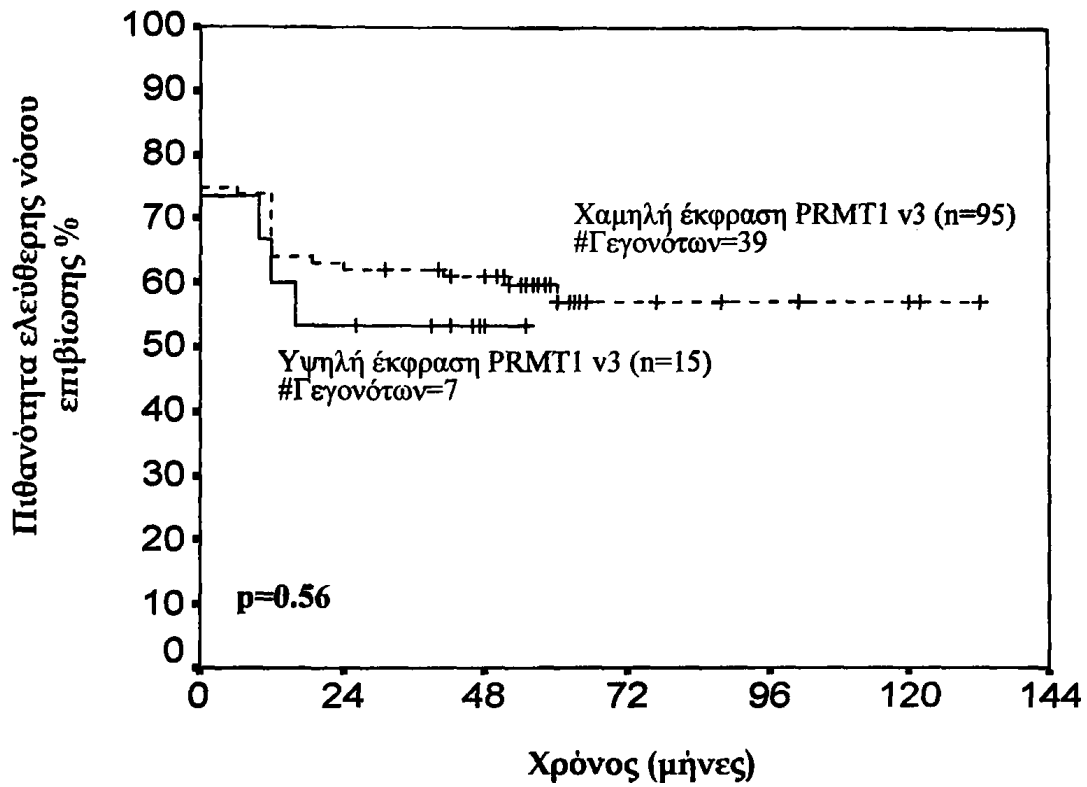
Σχήμα 2: Προγνωστική σημασία της έκφρασης του PRMT1-v1 σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. (Η τιμή p υπολογίστηκε με τη μέθοδο log rank. Οι κάθετες γραμμές υποδηλώνουν τις περικομμένες περιπτώσεις - censored)





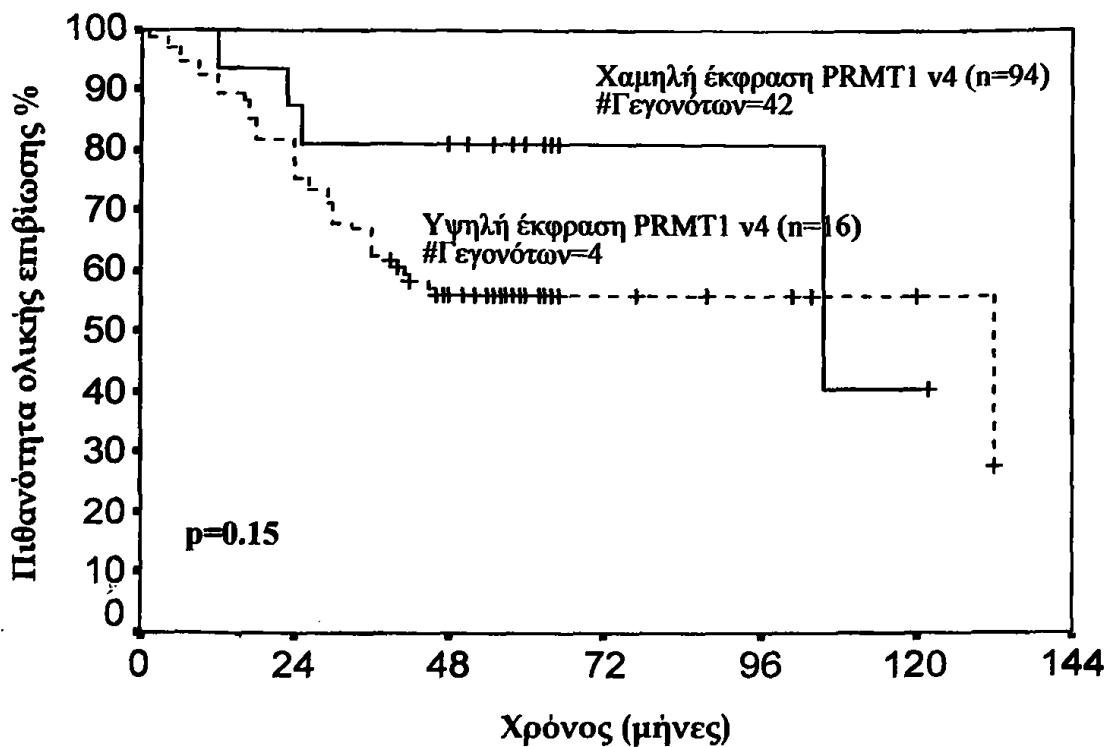
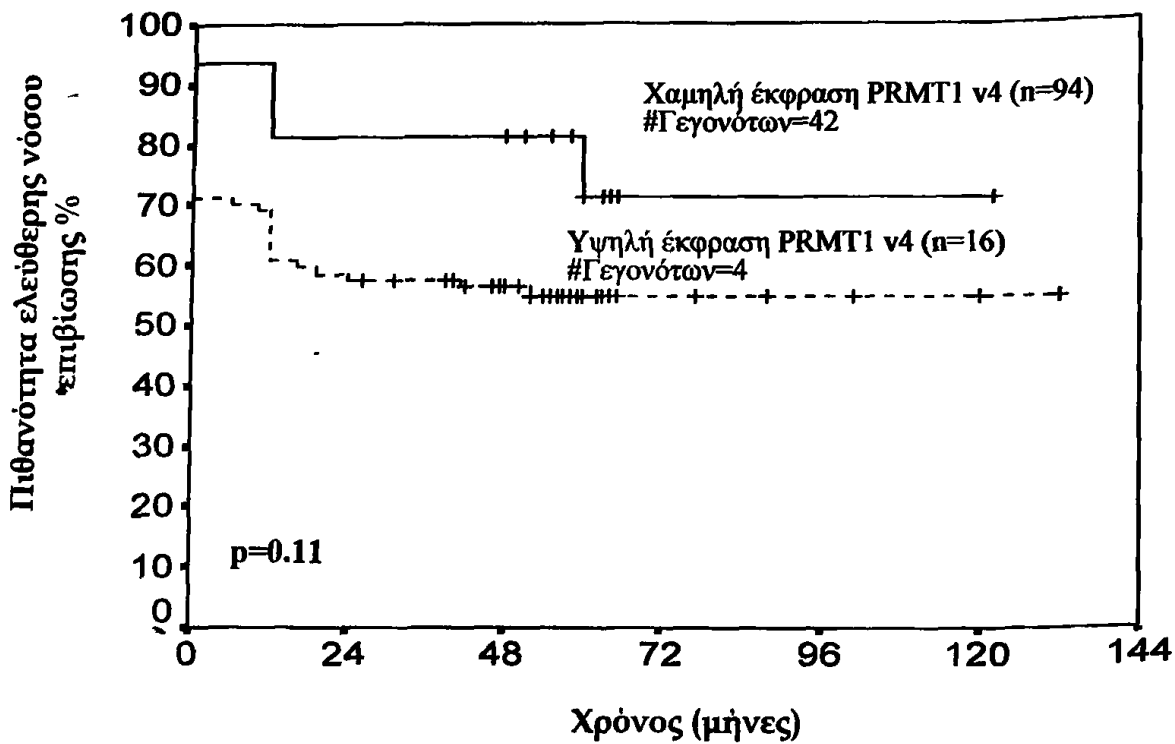
Σχήμα 3: Προγνωστική σημασία της έκφρασης του PRMT1-v2 σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. (Η τιμή p υπολογίστηκε με τη μέθοδο log rank. Οι κάθετες γραμμές υποδηλώνουν τις περικομμένες περιπτώσεις - censored)





Σχήμα 4: Προγνωστική σημασία της έκφρασης του PRMT1-v3 σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. (Η τιμή p υπολογίστηκε με τη μέθοδο log rank. Οι κάθετες γραμμές υποδηλώνουν τις περικομμένες περιπτώσεις - censored)

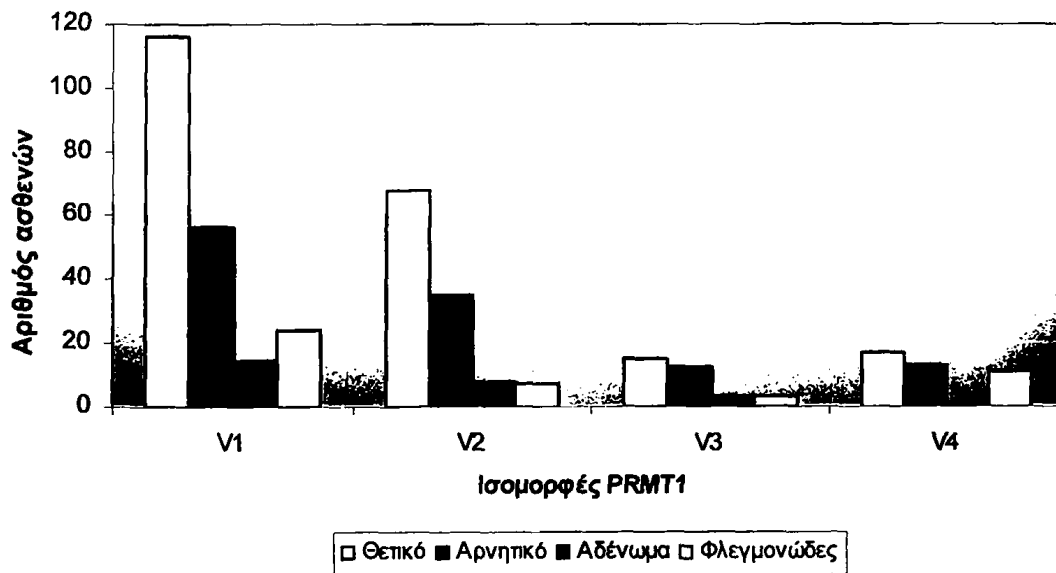




Σχήμα 5: Προγνωστική σημασία της έκφρασης του PRMT1-v4 σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. (Η τιμή p υπολογίστηκε με τη μέθοδο log rank. Οι κάθετες γραμμές υποδηλώνουν τις περικομμένες περιπτώσεις - censored)



Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της ποιοτικής έκφρασης των διαφόρων ισομορφών του γονιδίου PRMT1, μπορούμε να τα παραστήσουμε γραφικά με το Σχήμα 6. Σε αυτό απεικονίζεται ο αριθμός των ασθενών που εκφράζουν την κάθε ισομορφή, κάνοντας διαχωρισμό στο είδος του ιστού που μελετήθηκε, δηλαδή περιλαμβάνει όχι μόνο τα καρκινικά δείγματα (θετικά), αλλά και τα μη καρκινικά, είτε αυτά είναι εντελώς φυσιολογικά είτε πρόκειται για άλλες παθολογικές καταστάσεις που αφορούν το παχύ έντερο (αδενώματα, φλεγμονές).



Σχήμα 6: Συγκεντρωτικός πίνακας έκφρασης των ισομορφών του PRMT1 σε διάφορες κατηγορίες εντερικού ιστού

Κυτταρικός εντοπισμός του πρωτεϊνικού προϊόντος του PRMT1 με ανοσοϊστοχημεία

Ο ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός μορίων είναι συνήθης πειραματική πρακτική προκειμένου να εκτιμηθεί η προγνωστική αξία διαφόρων μορίων στον καρκίνο [140], καθώς και πως σχετίζεται η έκφραση αυτή τόσο με την ίδια τη νόσο όσο και με άλλους παράγοντες που αφορούν την ανάπτυξη του όγκου [141].

Οι μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα και αφορούν τον κυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης που προκύπτει από την έκφραση του γονιδίου PRMT1 έχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Μελέτες ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού που έγιναν από τον Tang και τους συνεργάτες του [36] σε κύτταρα RAT1 (ινοβλάστες)

υποδηλώνουν ότι το πρωτεϊνικό προϊόν του PRMT1 συναντάται κατά κύριο λόγο στον πυρήνα.

Μεταγενέστερη μελέτη από τον Araya και τους συνεργάτες του [82] έδειξε ότι η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα HEK293T (ανθρώπινα εμβρυονικά κύτταρα νεφρού) και πέραν των αποδείξεων της παρουσίας της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα, υπήρξαν και ενδείξεις για τη διαρκή μετακίνησή της από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα.

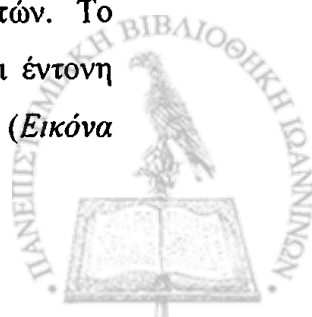
Σε παρόμοια συμπεράσματα καταλήγει και η μελέτη των Herrmann F et al. (2005), στην οποία χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HEK293 για την *in vivo* μελέτη της κινητικότητας του πρωτεϊνικού προϊόντος του PRMT1. Σε αυτή αποδεικνύεται ότι η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί ένα ιδιαίτερα δυναμικό ένζυμο, το οποίο εμφανίζει μια ποικιλοότητα ως προς την κινητικότητά του και τον υποκυτταρικό εντοπισμό. Υπό κανονικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας, οι οποίες επιτρέπουν την πλήρη μεθυλίωση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, η PRMT1 συμπεριφέρεται ως πλήρως διαλυτή πρωτεΐνη, με χαρακτηριστικά διάχυσης ενός ολιγομερούς συμπλόκου τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα [82].

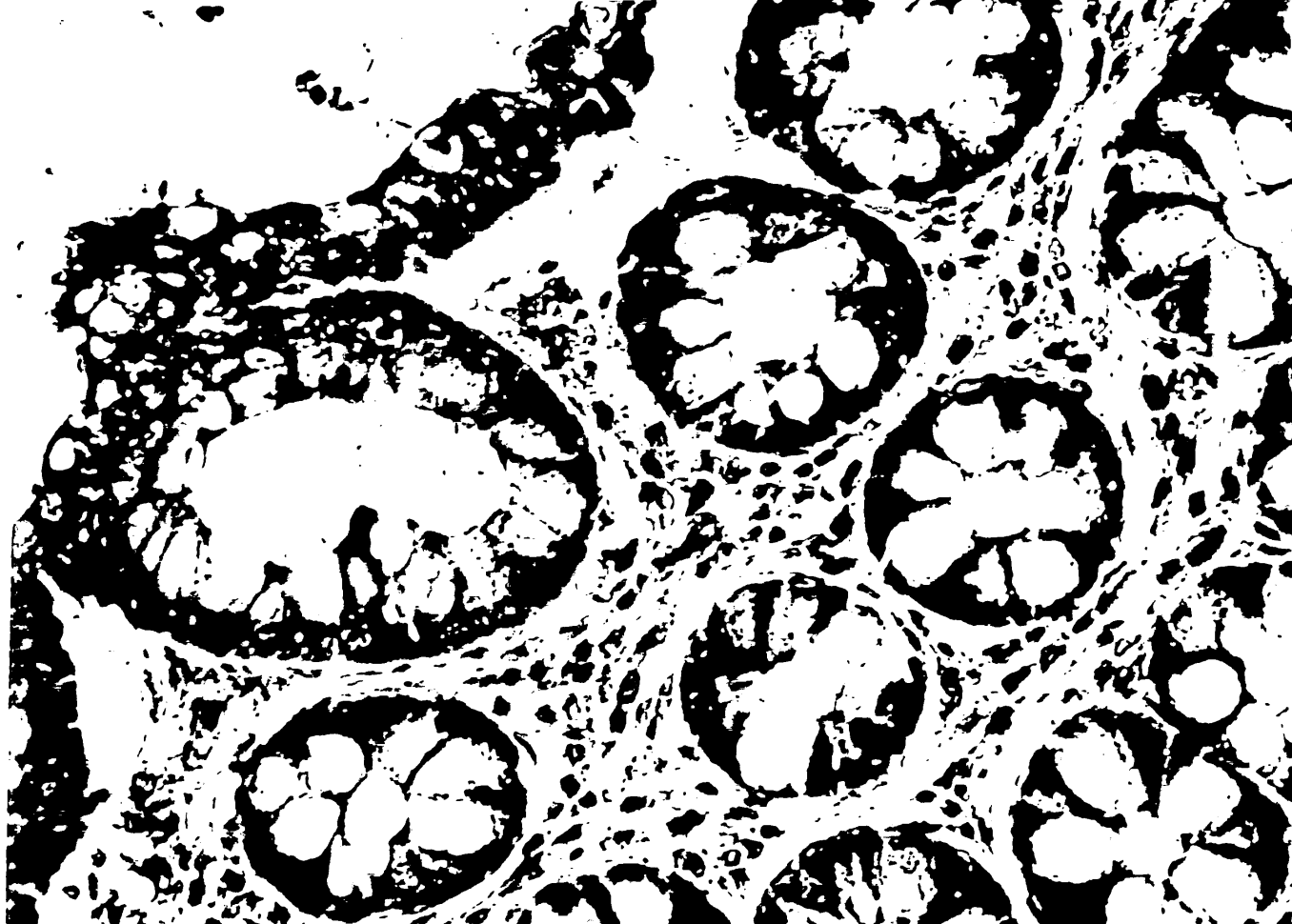
Το τελικό κομμάτι της παρούσας μελέτης αφορούσε τον ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό της πρωτεΐνης PRMT1 σε καρκινικούς ιστούς του παχέος εντέρου. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε και σύγκριση με καρκινικούς ιστούς προερχόμενους από μαστό.

Παρατηρούμε κατά τη χρώση με το αντίσωμα έναντι του PRMT1 (αντι-PRMT1 IgG) που παρασκευάσαμε στο εργαστήριο στα καρκινικά δείγματα του παχέος εντέρου έντονη καφέ χρώση στο κυτταρόπλασμα, ενδεικτική της παρουσίας της προς εντοπισμό πρωτεΐνης (Εικόνες 11, 12 και 13). Η χρώση αυτή δεν παρατηρείται στους πυρήνες, παρά μόνο σε λίγες περιπτώσεις.

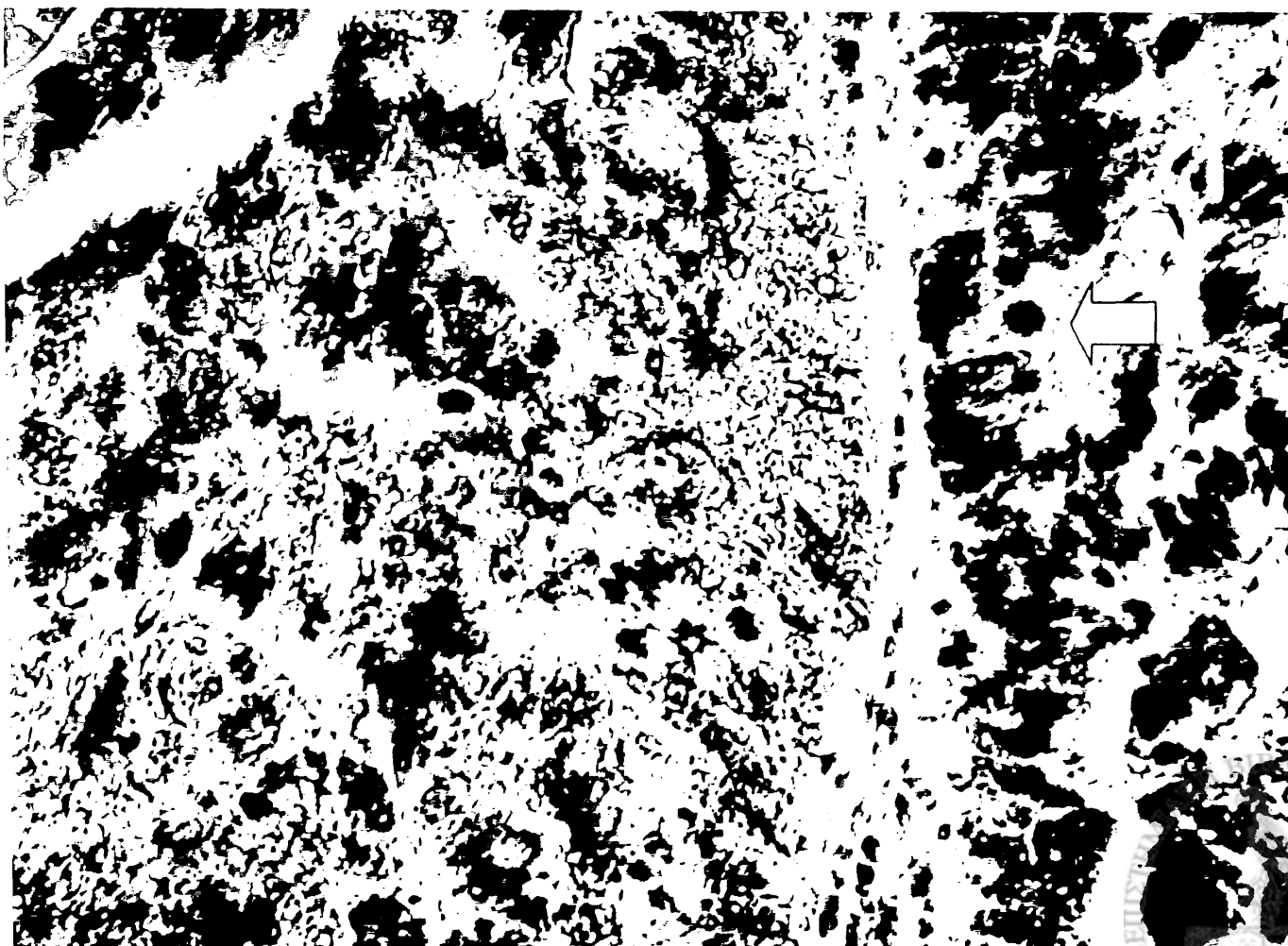
Τα φυσιολογικά δείγματα από ιστό παχέος εντέρου εμφανίζουν το ίδιο πρότυπο χρώσης με το αντι-PRMT1 (Εικόνα 10), δηλαδή έντονη κυτταροπλασματική χρώση και διάσπαρτους μόνο πυρήνες.

Επιπλέον, δοκιμάσαμε το αντίσωμα σε καρκινικά δείγματα που προέρχονται από μαστό, προκειμένου να γίνει μια σύγκριση μεταξύ των δύο ιστών. Το κυτταρόπλασμα στα καρκινικά κύτταρα από το μαστό επίσης παρουσιάζει έντονη καφέ χρώση και μόνο κάποιοι σποραδικοί πυρήνες φαίνονται να βάφονται (Εικόνα 14).

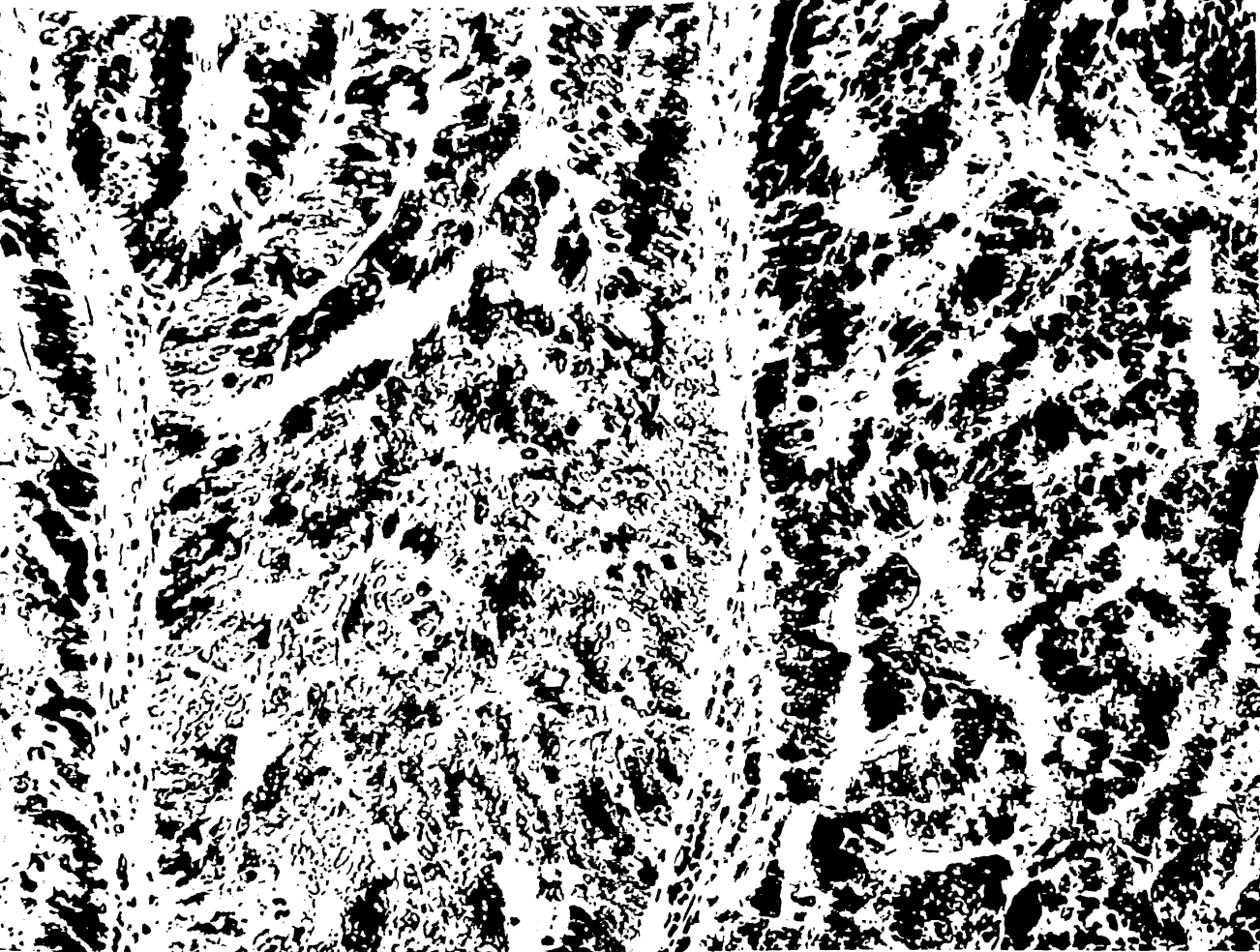




Εικόνα 10. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της πρωτεΐνης PRMT1 σε φυσιολογικό ιστό του παχέος εντέρου (μεγέθυνση x400).



Εικόνα 11. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της πρωτεΐνης PRMT1 σε καρκίνο του παχέος εντέρου (μεγέθυνση x400). Το βέλος υποδεικνύει βλαστήματα — κύτταρα.



Εικόνα 12: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της πρωτεΐνης PRMT1 σε καρκίνου παχέος εντέρου (μεγέθυνση x200). Φαίνεται η έντονη κυτταροπλασματική χρώση.



Εικόνα 13: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της πρωτεΐνης PRMT1 σε καρκίνου παχέος εντέρου (μεγέθυνση x150). Φαίνεται η έντονη κυτταροπλασματική χρώση.

8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος ως ασθένεια είναι το αποτέλεσμα γενετικών αλλαγών που συμβαίνουν σε κυτταρικό επίπεδο. Η κακοήθης τροποποίηση των κυττάρων είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται σε πολλά στάδια, καθοδηγούμενη από τη συσσώρευση μεταλλάξεων σε γονίδια υπεύθυνα για τη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση και λειτουργία.

Οι κακοήθεις όγκοι χαρακτηρίζονται από μια πληθώρα ιδιαίτερων χαρακτηριστικών. Από τις πιο σημαντικές τους ιδιότητες είναι η ικανότητά τους να διηθούν γειτονικούς ιστούς και να δημιουργούν εστίες μετάστασης, γεγονότα που καθορίζουν την επιβίωσή τους και την ανάπτυξή τους σε δευτερογενείς θέσεις. Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από προοδευτικές αλλαγές στο γονιδίωμά τους, ιδιαίτερα σε γονίδια που ρυθμίζουν και κωδικοποιούν πρωτεϊνικά προϊόντα σημαντικά για την απόκτηση συγκεκριμένων φαινοτυπικών ιδιοτήτων. Τα καρκινικά κύτταρα δεν είναι ιδιαίτερα σταθερά, από γενετική άποψη, χάνουν τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού τους και αποδιαφοροποιούνται.

Οι μεταλλάξεις, όπως αναφέρθηκε, είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση του καρκινικού φαινότυπου. Μάλιστα, δεν αρκεί μια και μοναδική μετάλλαξη για την ανάπτυξη καρκίνου. Οι παράγοντες που οδηγούν σε αυτό το φαινόμενο ποικίλουν, από ιδιότητες που κληρονομήθηκαν από τους προγόνους, λάθη που πραγματοποιούνται κατά την επιτέλεση κυτταρικών διαδικασιών, μέχρι την ύπαρξη περιβαλλοντικών παραγόντων (ακτινοβολίες, χημικές ουσίες, ιοί) που έχουν σαν αποτέλεσμα την πρόκληση βλαβών στο DNA των κυττάρων.

Τα γονίδια τα οποία έχουν κατά κύριο λόγο κατηγορηθεί για την εμφάνιση της νόσου είναι τα πρωτο-ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Αυτά εμπλέκονται άμεσα στις διαδικασίες της κυτταρικής ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού. Ένα πρωτο-ογκογονίδιο δημιουργεί πρόβλημα όταν μετατρέπεται σε ογκογονίδιο και αποκτά μια νέα λειτουργία που σχετίζεται με την αδιάκοπη παρουσία του στο κύτταρο. Αντίθετα, ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο προκαλεί προβλήματα όταν χάνει την ιδιότητα που έχει, η οποία σχετίζεται με την παύση της διαδικασίας της κυτταροδιαίρεσης.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη κακοήθειας στο εντερικό επιθήλιο ή το κυτταρικό στρώμα που καλύπτει τον εντερικό αυλό. Υπάρχουν αρκετά μορφολογικά και μοριακά στοιχεία, τα οποία συγκλίνουν



στο ότι ο καρκίνος του παχέος εντέρου αναπτύσσεται μέσω αρκετών πρόδρομων σταδίων. Τα στάδια αυτά διακρίνονται ιστολογικά και ποικίλουν από την υπερπλασία μέχρι διάφορα καλοήγη αδενώματα και από το τοπικά διηθητικό καρκίνωμα μέχρι τη συστηματική μεταστατική νόσο [3].

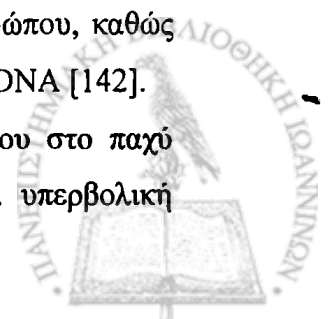
Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί εξαιρετικό παράδειγμα του γεγονότος ότι η ανάπτυξη όγκων μπορεί να επιτευχθεί μέσω μιας πληθώρας διαφορετικών μηχανισμών. Παρόλο που επικρατεί το δόγμα ότι ο καρκίνος στον άνθρωπο έχει σαν έναρξη τις μεταβολές που γίνονται σε διάφορα διακριτά γονίδια και ρυθμιστικά μεταβολικά μονοπάτια, στην περίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου, πολλές από αυτές τις μεταβολές έχουν ταυτοποιηθεί. Επιπλέον, μπορούν να προσδοθούν σε συγκεκριμένα στάδια της ανάπτυξης του όγκου και να συσχετιστούν με συγκεκριμένες ιστολογικές αλλαγές. Το μοριακό μοντέλο καρκινογένεσης στο παχύ έντερο έχει συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση των υποκείμενων βιολογικών διαδικασιών [3].

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου, στις περισσότερες των περιπτώσεων, ξεκινάει λόγω της παρουσίας γενετικών αλλαγών στα «μηνύματα» που προκύπτουν από τη λειτουργία των μονοπατιών Wnt (*Wingless*) και Hh (*Hedgehog*), εφόσον και τα δυο αυτά μεταβολικά μονοπάτια αφορούν την παραγωγή εκκριτικών πρωτεϊνών-σινιάλων [142]. Γενετικές αλλοιώσεις που αφορούν το μονοπάτι Wnt έχουν καταγραφεί στο 85% των σποραδικών καρκίνων του παχέος εντέρου και σε ποσοστό μεγαλύτερο του 95% σε περιπτώσεις FAP καρκίνου του παχέος εντέρου [11].

Η παρουσία διάφορων κληρονομικών συνδρόμων καρκίνου αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου στο έντερο λίγο ή πολύ ειδικά. Τέτοια σύνδρομα αποτελούν της οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης (FAP), ο κληρονομικός ορθοκολικός καρκίνος που δε σχετίζεται με πολύποδες (HNPCC), το σύνδρομο Peutz-Jeghers (PJS) και η ασθένεια του Cowden [3].

Περαιτέρω βήματα στην πρόοδο του καρκίνου σχετίζονται με μεταλλάξεις που ενεργοποιούν το γονίδιο KRAS, προκαλούν απώλεια λειτουργίας του TP53 και ανενεργοποίηση της κυτταρικής απόκρισης στον TGF [3]. Επιπλέον, έχουν ανακαλυφθεί επικρατή πρωτο-ογκογονίδια της πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης που σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου στο παχύ έντερο του ανθρώπου, καθώς και σύνδεση της καρκινογένεσης στο κόλον με την υπερμεθυλίωση του DNA [142].

Δεν πρέπει τέλος να ξεχνάμε ότι στην ανάπτυξη του καρκίνου στο παχύ έντερο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο ο παράγοντας περιβάλλον (π.χ. υπερβολική



κατανάλωση κόκκινου κρέατος, τρόπος προετοιμασίας φαγητών), καθώς και η ηλικία του ατόμου.

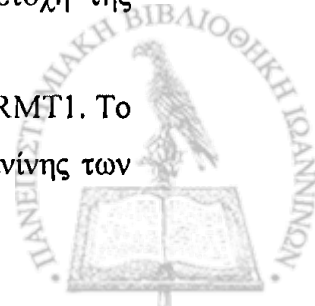
Παρά το γεγονός βέβαια της εκτεταμένης μελέτης του καρκίνου του παχέος εντέρου, τα δεδομένα είναι αντικρουόμενα, όσον αφορά την προγνωστική σημασία των γονιδίων που κατά κύριο λόγο εμπλέκονται στην παθογένεση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Πιθανές αιτίες για αυτή την αντίφαση περιλαμβάνουν τις διαφορετικές μεθόδους μελέτης και εργαστηριακές τεχνικές, τη διαφορετική διάρκεια μετεγχειρητικής παρακολούθησης των ασθενών, την ετερογένεια των υπό μελέτη πληθυσμών. Σε μελλοντικές μελέτες οι ερευνητές πρέπει να υιοθετήσουν προτυποποιημένα πρωτόκολλα προκειμένου να προσδιορίσουν κλινικά σχετιζόμενες γενετικές παρατηρήσεις [143].

Η μελέτη λοιπόν μορίων που εμπλέκονται, άμεσα ή έμμεσα, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου είναι ουσιώδης στην έρευνα του καρκίνου. Μια από τις διαδικασίες που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, σε διάφορα επίπεδα, είναι η μεθυλίωση. Η διαδικασία μεθυλίωσης πρωτεϊνικών μορίων αφορά διάφορα αμινοξικά κατάλοιπα, μεταξύ των οποίων και η αργινίνη.

Η μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης είναι μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση που εμφανίζεται συχνά στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και πραγματοποιείται από μια οικογένεια πρωτεϊνικών μορίων, αυτή των πρωτεϊνικών μεθυλοτρανσφερασών αργινίνης (*Protein Arginine Methyltransferases, PRMT*). Η λειτουργία αυτών των μορίων έγκειται στη μεταφορά μεθυλικών ομάδων από το μόριο της S-αδενοσυλ-μεθειονίνης (AdoMet) σε συγκεκριμένα κατάλοιπα αργινίνης συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μορίων.

Η μεθυλίωση των πρωτεϊνών έχει εμπλακεί σε διάφορες ρυθμιστικές λειτουργίες του κυττάρου. Φαίνεται να αποτελεί μια σημαντική ρυθμιστική τροποποίηση για τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μετα-μεταφραστική ρύθμιση και την ωρίμανση του mRNA [34] και να συμμετέχει στην επαγόμενη μέσω μορίων μεταγωγή σημάτων [27]. Επιπλέον, έδειξε να υποβοηθάει την έξοδο συγκεκριμένων hnRNPs από τον πυρήνα [53], να ρυθμίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών [27, 48, 52], να συμμετέχει στην ενεργοποίηση της μεταγραφής [57] και στην επιδιόρθωση του DNA [144]. Τέλος, υπάρχουν στοιχεία για την συμμετοχή της διαδικασίας σε αναπτυξιακά γεγονότα στους οργανισμούς [58].

Σε αυτή τη διατριβή ασχοληθήκαμε με την έκφραση του γονιδίου PRMT1. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την κύρια πρωτεϊνική μεθυλοτρανσφεράση αργινίνης των

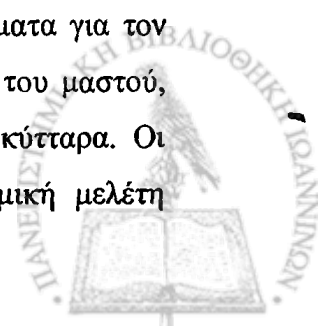


θηλαστικών. Ανακαλύφθηκε από τρεις ανεξάρτητες μεταξύ τους ερευνητικές ομάδες σαν πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τους παράγοντες TIS21 και BTG1 [34], σαν πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της IFN α [54] και λόγω ομολογίας με το ήδη κλωνοποιημένο ομόλογο μόριο στη ζύμη [35]. Τα υποστρώματα που προτιμάει να μεθυλιώνει περιλαμβάνουν πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη χρωματίνη (π.χ. ιστόνη H4), hnRNPs και άλλες πρωτεΐνες ματίσματος (π.χ. NSAP1), πρωτεΐνες που προσδένονται στο mRNA (π.χ. Sam68), πρωτεΐνες απόκρισης βλαβών του DNA (π.χ. Mre11), ιικές πρωτεΐνες (π.χ. Hepatitis-NS3), πρωτεΐνες μεταγωγής σημάτων (π.χ. STATs) [145]. Δεν προξενεί έκπληξη το γεγονός ότι είναι η πρώτη πρωτεϊνική μεθυλοτρανσφεράση αργινίνης στον άνθρωπο που απομονώθηκε, κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε, ως προς τα υποστρώματα και το πρότυπο μεθυλίωσης που ακολουθεί, εφόσον αποτελεί τον πολυπληθέστερο εκπρόσωπο της οικογένειας στα θηλαστικά.

Λόγω εναλλακτικού ματίσματος του πρόδρομου mRNA που προκύπτει από τη μεταγραφή του PRMT1 προκύπτουν τρεις ισομορφές [35, 78] που έχουν χαρακτηριστεί ως v1, v2 και v3. Κατά τη διάρκεια της μελέτης μας ανακαλύψαμε ένα ακόμα προϊόν εναλλακτικού ματίσματος, το οποίο και χαρακτηρίσαμε ως v4. Το προϊόν αυτό αποτελείται συνολικά από 1214bp και είναι μικρότερο από τα άλλα τρία μετάγραφα.

Το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου PRMT1 αποτελεί αντικείμενο διαφωνίας ως προς τον υποκυτταρικό εντοπισμό του. Σύμφωνα με τους *Tang et al.* (1998) η πρωτεΐνη εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στον πυρήνα και ελάχιστα στο κυτταρόπλασμα [36]. Μεταγενέστερα, οι *Araya N et al.* (2005) υποστήριξαν την έντονη παρουσία της στο κυτταρόπλασμα και τη διαρκή μετακίνηση του μορίου μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος [81]. Μια ακόμα μελέτη του 2005, από τους *Herrmann F et al.*, η οποία πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα HEK293 (ανθρώπινα εμβρυονικά κύτταρα νεφρού) ισχυρίζεται την πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα (6 φορές περίπου μεγαλύτερη από ό,τι στον πυρήνα), γεγονός, όμως, που εξαρτάται από την παρουσία μη μεθυλιωμένων υποστρωμάτων [82].

Στη μελέτη μας παράγαμε και χρησιμοποιήσαμε ειδικά αντισώματα για τον εντοπισμό του μορίου, σε τομές από καρκίνο του παχέος εντέρου και του μαστού, αντίθετα με τις προηγούμενες μελέτες που αφορούσαν φυσιολογικά κύτταρα. Οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν προκειμένου να γίνει ανοσοϊστοχημική μελέτη



αυτών των ιστών, βασίστηκαν σε προηγούμενες αντίστοιχες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο [146, 147]. Η επιλογή του δεύτερου ιστού, δηλαδή του μαστού, έγινε με βάση 2 κριτήρια. Πρώτον, γιατί πρόκειται για έναν ακόμα επιθηλιακό ιστό. Δεύτερον, λόγω της ανακάλυψης μεταβολικών μονοπατιών που συνδέουν τα δυο αυτά είδη καρκίνου, δηλαδή τις μεταλλάξεις στα γονίδια MLH1, MLH2 και LKB1. Στην περίπτωση του παχέος εντέρου, η παρουσία της πρωτεΐνης ήταν ιδιαίτερα έντονη στο κυτταρόπλασμα και πολύ αμυδρή στον πυρήνα. Στην πραγματικότητα, βρέθηκαν ελάχιστοι πυρήνες χρωσμένοι, γεγονός που υποδεικνύει την προτίμηση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα, τουλάχιστον σε ό,τι αφορά τον εντοπισμό της. Στην περίπτωση του μαστού, η εικόνα που πήραμε ήταν ανάλογη με αυτή του εντέρου. Επιπλέον, δεν βρέθηκε να υπάρχει διαφορά μεταξύ του φυσιολογικού ιστού του μαστού και του καρκινικού.

Η έκφραση του γονιδίου PRMT1 μετρήθηκε ημι-ποσοτικά μέσω της πληθώρας μορίων mRNA που παράγονται για κάθε ισομορφή. Η συσχέτιση της έκφρασης με μια σειρά από κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, όπως η ηλικία, η διαφοροποίηση, η κατάσταση των λεμφαδένων και η σταδιοποίηση κατά TNM, μας οδήγησαν σε συμπεράσματα, όσον αφορά τη χρηστικότητα του συγκεκριμένου γονιδίου σαν προγνωστικό εργαλείο.

Στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων από τα πειράματά μας δε λάβαμε υπόψη μας τη θέση εμφάνισης του καρκίνου, δηλαδή αν το δείγμα προέρχεται από το ανιόν ή το κατιόν κόλον. Η επιλογή αυτή έγινε, γιατί, παρά το γεγονός ότι υπάρχουν κάποια επιδημιολογικά δεδομένα που συνδέουν τη θέση του καρκινώματος με το είδος του συνδρόμου (π.χ. HNPCC ή FAP), τα αποτελέσματα των μέχρι τώρα μελετών είναι κάπως αντικρουόμενα [148].

Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα των μετρήσεών μας φαίνεται να υπάρχει μια στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στην υψηλή έκφραση της ισομορφής PRMT1-v1 και τον καρκινικό ιστό, συγκρινόμενη με αυτό που επικρατεί στο φυσιολογικό ιστό για το παχύ έντερο.

Περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων μας καταδεικνύει πως η υψηλή έκφραση του PRMT1-v1 σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την παρουσία θετικών λεμφαδένων στον ασθενή, όπως και με το υψηλό στάδιο κατά TNM (στάδια II και III) και την μεγάλη επιθετικότητα του καρκίνου. Με τα στάδια II και III κατά TNM σχετίζεται επίσης η υψηλή έκφραση του PRMT1-v2, ενώ οι άλλες δυο ισομορφές,



PRMT1-v3 και PRMT1-v4, φαίνονται να είναι ανεξάρτητες των κλινικών παραμέτρων.

Η ανάλυση επιβίωσης έδωσε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα όσον αφορά την ισομορφή PRMT1-v1 και την επιβίωση των ασθενών. Σύμφωνα λοιπόν με την ανάλυση μιας μεταβλητής με βάση το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης του Cox η υψηλή έκφραση του PRMT1-v1 παρουσιάζει ισχυρή συσχέτιση τόσο με την ελεύθερα νόσου επιβίωση όσο και με την ολική επιβίωση των ασθενών. Ανάλογη φαίνεται να είναι και η σχέση μεταξύ υψηλής έκφρασης PRMT1-v2 και ολικής επιβίωσης των ασθενών.

Προς την ίδια κατεύθυνση συγκλίνουν και τα αποτελέσματα της ανάλυσης σύμφωνα με τη μέθοδο Kaplan-Meier. Οι καμπύλες επιβίωσης έδειξαν ότι η υψηλή έκφραση του PRMT1-v1 σχετίζεται με χαμηλή πιθανότητα επιβίωσης για τον ασθενή, όπως και μικρή πιθανότητα εξάλειψης της νόσου, χωρίς την εμφάνιση μεταστάσεων. Η υψηλή έκφραση του PRMT1-v2 επίσης συνδέεται με τη χαμηλή πιθανότητα επιβίωσης (ολικής και ελεύθερας νόσου), αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με την PRMT1-v1. Οι ισομορφές PRMT1-v3 και PRMT1-v4 παρουσιάζονται άνευ σημασίας στην ανάλυση επιβίωσης, με χρήση του ενός ή του άλλου μοντέλου.

Οι ενδείξεις επομένως που παίρνουμε από την ανάλυση επιβίωσης και με τις δύο προαναφερθείσες μεθόδους συγκλίνουν στην πιθανή δυνατότητα χρήσης της έκφρασης του PRMT1-v1 (και σε μικρότερο βαθμό του PRMT1-v2) σαν δείκτη κακής εξέλιξης, όσον αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου.



9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Είναι γνωστό ότι οι αλλαγές στα πρότυπα εναλλακτικού ματίσματος των πρόδρομων μορίων RNA μπορούν να λειτουργήσουν σαν ενδείξεις μεταβολής της κατάστασης του κυττάρου, στην περίπτωση ασθένειας, ακόμα και αν τα γονίδια δεν αποτελούν τμήμα του πρωτογενούς μηχανισμού της νόσου, έχοντας το δυναμικό να παράσχουν διαγνωστικές και προγνωστικές πληροφορίες. Η παρούσα μελέτη υποδεικνύει ότι η έκφραση του ενός εκ των τεσσάρων εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *PRMT1*, συγκεκριμένα του *PRMT1-v1*, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης κακής πρόγνωσης για τους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. Για να μπορέσουν βέβαια να αξιοποιηθούν τα αποτελέσματα που αναλύθηκαν και να αναπτυχθεί μια μέθοδος πρόγνωσης, ως προς την πορεία της νόσου, αλλά και να διευρυνθεί η χρήση της μεθόδου σε όλες τις μορφές καρκίνου, θα πρέπει αρχικά η μετρήσεις να γίνουν ποσοτικά. Επιπρόσθετα, θα πρέπει να επεκταθεί η μελέτη και σε άλλες μορφές καρκίνου, έτσι ώστε να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων και να καθοριστεί το αν πρόκειται για γενικευμένο φαινόμενο ή αφορά μόνο τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Ακόμη, θα μπορούσε να γίνει ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός σε μεγαλύτερο αριθμό τομών και από μεγαλύτερη ποικιλία ιστών, προκειμένου να διερευνηθεί το αν η θέση του πρωτεϊνικού προϊόντος είναι ιστοειδική. Τέλος, θα μπορούσαν να διεξαχθούν πειράματα σχετικά με την κινητικότητα της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο, καθώς και να ξεκαθαριστεί με ποιον τρόπο μπορεί να εμπλέκεται σε μεταβολικά γεγονότα άμεσα σχετιζόμενα με την καρκινογέννεση.



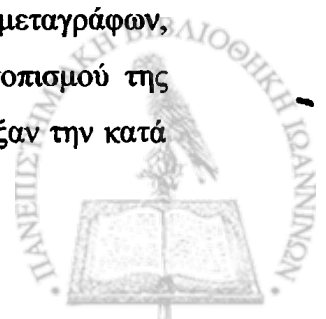
10. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια, με σημαντικά υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Ιδιαίτερα ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί την τρίτη συχνότερα εμφανιζόμενη μορφή καρκίνου σε γυναίκες και άνδρες. Θεωρείται η ασθένεια του Δυτικού πολιτισμού, εφόσον πέραν των γενετικών αλλαγών που είναι υπεύθυνες για την εμφάνισή της, πολύ σημαντικό ρόλο παίζει ο τρόπος ζωής (κακή διατροφή, κάπνισμα, έλλειψη άσκησης).

Η αναγκαιότητα ανακάλυψης νέων βιολογικών δεικτών έχει γίνει πλέον προφανής και γίνονται μεγάλες προσπάθειες προς αυτή την κατεύθυνση. Η ανακάλυψη τέτοιων μορίων θα μπορούσε να προσφέρει όχι μόνο έγκαιρη διάγνωση, αλλά και καθαρότερη εικόνα όσον αφορά την εξέλιξη της νόσου. Επιπρόσθετα, θα μπορούσε να συνεισφέρει στην εφαρμογή νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Προς αυτή την κατεύθυνση κινήθηκε και η παρούσα διδακτορική διατριβή.

Εκτός από τα γνωστά βιολογικά μονοπάτια που συνδέονται άμεσα με την εμφάνιση του καρκίνου του παχέος εντέρου, υπάρχουν γονίδια τα οποία ναι μεν δεν έχουν τόσο εμφανή σχέση με τον καρκίνο, αλλά μπορεί να δώσουν πληροφορίες για την πρόοδο της νόσου. Ένα τέτοιο γονίδιο θεωρήσαμε ότι είναι κι αυτό της πρωτεϊνικής μεθυλοτρανσφεράσης αργινίνης 1 (*PRMT1*). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται σε ποικίλα και σημαντικά σημεία του κυτταρικού μεταβολισμού, μέσω της μεθυλίωσης καταλοίπων αργινίνης συγκεκριμένων μορίων. Η συμμετοχή του πρωτεϊνικού προϊόντος του *PRMT1* στον μεταβολισμό έδωσε την ώθηση στο να μελετηθεί και να συσχετιστεί με τον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Η παρούσα μελέτη αφορά τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του *PRMT1* σε ιστούς ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του παχέος εντέρου, ιστούς προερχόμενους από αδενώματα και φλεγμονές του παχέος εντέρου, καθώς και φυσιολογικούς ιστούς του παχέος εντέρου. Κατά τη διάρκεια της μελέτης ανακαλύφθηκε ένα επιπλέον μετάγραφο που προκύπτει από το εναλλακτικό μάτισμα του πρόδρομου mRNA του γονιδίου. Επίσης, κατά τη συσχέτιση της έκφρασης με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους προέκυψε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των παραμέτρων και της έκφρασης ενός εκ των τεσσάρων εναλλακτικών μεταγράφων, του v1. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού της πρωτεΐνης, με αντίσωμα που φτιάχτηκε στο εργαστήριό μας, και υπέδειξαν την κατά



κύριο λόγο κυτταροπλασματική παρουσία της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συγκλίνουν προς τον χαρακτηρισμό της υψηλής έκφρασης του μεταγράφου v1 ως δείκτη κακής πρόγνωσης όσον αφορά τους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου.



11. SUMMARY

“Expression study of PRMT1 gene in colon cancer” by Konstantina
Mathioudaki

Cancer is a multidimensional disease with high mortality rates. Especially colon cancer is the third most common type of cancer in both males and females. Cancer is considered a disease of the Western civilisation since, beyond the genetic alterations responsible for its occurrence, life style also plays an important role (bad nutrition, smoking, lack of exercise).

It is now evident the necessity of discovering new biological markers and great efforts are being made towards this direction. The discovery of such molecules could significantly assist on prompt diagnosis and provide a clear picture of disease progression. Additionally, it could contribute on the application of new therapeutic approaches. This has been the main aspect during the course of the present thesis.

Besides the main biological processes directly connected to colon cancer, there are many genes that could offer a great deal of information on the disease progression. We thought that Protein Arginine Methyltransferase 1 gene (*PRMT1*) is one of them. This gene encodes an enzyme implicating in many important aspects of cell metabolism via arginine methylation of certain protein molecules. *PRMT1*'s participation in metabolism made us consider studying this molecule and correlating its expression to colon cancer.

In the present study, the expression levels of *PRMT1* splice variants were calculated in a variety of colon tissues (normal, cancerous, adenomas, inflamed tissue) using mainly RT-PCR. In the course of our study, we discovered an additional splice variant (*PRMT1-v4*) and we were also able to correlate the expression levels of *PRMT1-v1* with clinical and pathological parameters. Moreover the experiments of immunohistochemical localisation of the *PRMT1* protein, using an in-house produced anti-*PRMT1* antibody, indicated a mainly cytoplasmic presence. The results of this study converge to the characterisation of the high expression of *PRMT1-v1* as a marker of unfavourable prognosis for colon cancer patients.

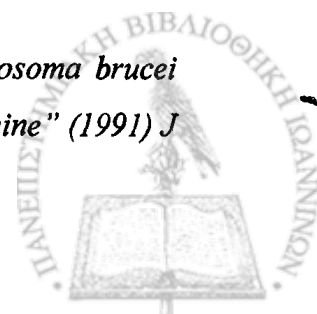


12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

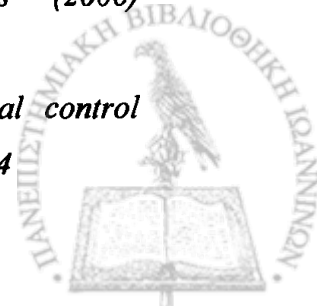
1. Kufe, Donald W, Pollock, Raphael E, Weichselbaum, Ralph R et al. "Cancer Medicine" 6th ed, Hamilton (Canada), BC Decker Inc, c 2003
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al "Molecular Biology of the Cell" New York, Garland Publishing, c2002
3. Schulz WA "Molecular Biology of Human Cancers" Springer Science, c 2005
4. Krauss G "Biochemistry of Signal Transduction and Regulation" 2nd ed, Wiley-VCH Verlag GmbH, c 2001
5. Lodish H, Berk A, Zipurski SL et al "Molecular Cell Biology" New York, WH Freeman and Co, c 1999
6. Αγγάντη ΝΙ, Μαλάμου-Μήτση Β, Στεφάνου Δ "Ειδική παθολογική ανατομική" Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, c2004
7. American Cancer Society (2005) Colorectal Cancer facts and figures special edition, Atlanta: American Cancer Society, 2005
8. Lucci-Cordisco E, Zito I, Gensini F et al "Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and related conditions" (2003) Am J Med Genet A 122(4), 325-334
9. Kinzler KW, Vogelstein B "Lessons from hereditary colorectal cancer" (1996) Cell 87,159-170
10. Thiagalingam S, Laken S, Willson JK et al "Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers" (2001)Proc Natl Acad Sci USA 98(5), 2698-2702
11. Taipale J, Beachy PA "The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer" (2001) Nature 411,349-354
12. Van Es, Barker N, Clevers H "You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway" (2003) Curr Opin Genet Devel 13, 28-33
13. Van de Wetering M, Sancho E, Verweij C et al "The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells" (2002) Cell 111(2),241-250
14. Lustig B, Behrens J "The Wnt signaling pathway and its role in tumor development" (2003) J Cancer Res Clin Oncol 129,199-221
15. Grady WM, Markowitz SD "Genetic and epigenetic alterations in colon cancer" (2002) Annu Rev Genomics Hum Genet 3,101-128



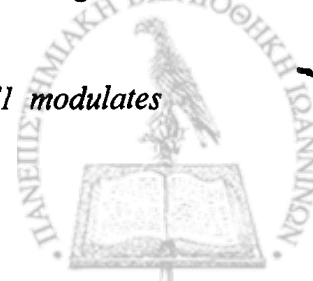
16. Bar-Sagi D, Hall A "Ras and Rho GTPases: a family reunion" (2000) *Cell* 103,227-238
17. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ "Surfing the p53 network" (2000) *Nature* 408,307-310
18. Attisano L, Wrana JL "Signal transduction by the TGF-beta superfamily" (2002) *Science* 296, 1646-1647
19. Siegel PM, Massagué J "Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer" (2003) *Nat Rev Cancer* 3,807-820
20. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP et al "Mechanisms of human DNA repair: an update" (2003) *Toxicology* 193,3-34
21. Koehne CH, Dubois RN "COX-2 inhibition and colorectal cancer" (2004) *Semin Oncol* 31 Suppl. 7, 12-21
22. Gupta RA, Dubois R "Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2" (2001) *Nat Rev Cancer* 1, 11-21
23. Reddy BS, Rao CV "Novel approaches for colon cancer prevention by cyclooxygenase-2 inhibitors" (2002) *J Enviro Pathol Toxicol Oncol* 21,155-164
24. Dukes CE "The classification of cancer of the rectum" (1932) *J Path Bact* 35, 323
25. Cho WC "Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery" (2007) *Molecular cancer* 6, 25
26. Clarke S "Protein methylation" (1993) *Curr Opin Cell Biol* 5,977-983
27. Aletta JM, Cimato TR, Ettinger MJ "Protein methylation: a signal event in post-translational modification" (1998) *Trends Biochem Sci* 23, 89-91
28. Najbauer J, Orpiszewski J, Aswad DW "Molecular aging of tubulin: accumulation of isoaspartyl sites in vitro and in-vivo" (1996) *Biochem* 35, 5183-5190
29. Kakimoto Y, Matsuoka Y, Miyake M et al "Methylated amino acid residues of proteins of brain and other organs" (1975) *J Neurochem* 24, 893
30. Paolantonacci P, Lawrence F, Lederer F et al "Protein methylation and protein methylases in *Leishmania donovani* and *Leishmania tropica* promastigotes" (1986) *Mol Biochem Parasitol* 21, 47
31. Yarlett N, Quamina A, Bacchi CJ "Protein methylases in *Trypanosoma brucei* brucei: activities and response to DL-alpha-difluoromethylornithine" (1991) *J Gen Microbiol* 137, 717



32. Gary JD, Clarke S "RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation" (1998) *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* 61, 65-131
33. Zobel-Thropp P, Gary JD, Clarke S "delta-N-methylarginine is a novel posttranslational modification of arginine residues in yeast proteins" (1998) *J Biol Chem* 273, 29283-29286
34. Lin WJ, Gary JD, Yang MC et al "The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase" (1996) *J Biol Chem* 271, 15034-15044
35. Scott HS, Antonarakis SE, Lalioti MD et al "Identification and characterization of two putative human arginine methyltransferases (HRMT1L1 and HRMT1L2)" (1998) *Genomics* 48, 330-340
36. Tang J, Gary JD, Clarke S et al "PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation" (1998) *J Biol Chem* 273, 16935-16945
37. Chen D, Ma H, Hong H et al "Regulation of transcription by a protein methyltransferase" (1999) *Science* 284, 2174-2177
38. Pollack BP, Kotenko SV, He W et al "The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity" (1999) *J Biol Chem* 274, 31531-31542
39. Frankel A, Yadav N, Lee J et al "The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity" (2002) *J Biol Chem* 277, 353-3543
40. Miranda TB, Miranda M, Frankel A et al "PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity" (2004) *J Biol Chem* 279(22), 22902-22907
41. Lee J, Sayegh J, Daniel J et al "PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family" (2005) *J Biol Chem* 280(38), 32890-32896
42. Cook JR, Lee J-H, Yang Z-H et al "FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues" (2006) *Bioch Biophys Res Com* 342, 472-481
43. Springer M, Goy M, Adler J "Protein methylation in behavioural control mechanisms and in signal transduction" (1979) *Nature* 280, 279-284



44. Law RE, Stimmel JB, Damore MA et al "Lipopolysaccharide-induced NF-kappa B activation in mouse 70Z/3 pre-B lymphocytes is inhibited by mevinolin and 5'-methylthioadenosine: roles of protein isoprenylation and carboxyl methylation reactions" (1992) *Mol Cell Biol* 12(1), 103-11
45. Kujubu DA, Stimmel JB, Law RE et al "Early responses of PC-12 cells to NGF and EGF: effect of K252a and 5'-methylthioadenosine on gene expression and membrane protein methylation" (1993) *J Neurosci Res* 36(1), 58-65
46. Mayeda A, Munroe SH, Caceres JF et al "Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins" (1994) *EMBO J* 13, 5483
47. Calnan BJ, Tidor B, Biancalana S et al "Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork" (1991) *Science* 252(5010), 1167-71
48. Liu Q, Dreyfuss G "In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins" (1995) *Mol Cell Biol* 15, 2800-2808
49. Brostoff S, Eylar EH "Localization of methylated arginine in the A1 protein from myelin" (1971) *Proc Natl Acad Sci USA* 68, 765-769
50. Carnegie PR "Amino acid sequence of the encephalitogenic basic protein from human myelin" (1971) *Biochem J* 123, 57-67
51. Rajpurohit R, Paik WK, Kim S "Effect of enzymic methylation of heterogeneous ribonucleoprotein particle A1 on its nucleic-acid binding and controlled proteolysis" (1994) *Biochem J* 304, 903-909
52. Bedford MT, Frankel A, Yaffe MB et al "Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains" (2000) *J Biol Chem*, 275(21), 16030-16036
53. Shen EC, Henry MF, Weiss VH et al "Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins" (1998) *Genes Dev* 12, 679-691
54. Abramovich C, Yakobson B, Chebath J et al "A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor" (1997) *EMBO J* 16, 260-266
55. Strahl BD, Allis CD "The language of covalent histone modifications" (2000) *Nature* 403, 41
56. Stallcup MR "Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation" (2001) *Oncogene* 20, 3014-3020
57. Mowen KA, Tang J, Zhu W et al "Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription" (2001) *Cell* 104, 731-741



58. Pawlak MR, Scherer CA, Chen J et al "Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable" (2000) *Mol Cell Biol* 20(13), 4859-4869
59. Girard JP, Bagni C, Caizergues-Ferrer M et al "Identification of a segment of the small nucleolar ribonucleoprotein-associated protein GAR1 that is sufficient for nucleolar accumulation" (1994) *J Biol Chem* 269(28), 18499-506
60. Messmer B, Dreyer C "Requirements for nuclear translocation and nucleolar accumulation of nucleolin of *Xenopus laevis*" (1993) *Eur J Cell Biol* 61(2), 369-82
61. Schmidt-Zachmann MS, Nigg EA "Protein localization to the nucleolus: a search for targeting domains in nucleolin" (1993) *J Cell Sci* 105, 799-806
62. Burgess WH, Bizik J, Mehlman T et al "Direct evidence for methylation of arginine residues in high molecular weight forms of basic fibroblast growth factor" (1991) *Cell Reg* 2(2), 87-93
63. Florkiewicz RZ, Baird A, Gonzalez AM "Multiple forms of bFGF: differential nuclear and cell surface localization" (1991) *Growth Factors* 4(4), 265-75
64. Renko M, Quarto N, Morimoto T et al "Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth factor species" (1990) *J Cell Physiol* 144(1), 108-14
65. Sommer A, Moscatelli D, Rifkin DB "An amino-terminally extended and post-translationally modified form of a 25kD basic fibroblast growth factor" (1989) *Biochem Biophys Res Commun* 160(3), 1267-74
66. Pintucci G, Quarto N, Rifkin DB "Methylation of high molecular weight fibroblast growth factor-2 determines post-translational increases in molecular weight and affects its intracellular distribution" (1996) *Mol Biol Cell* 7, 1249-1258
67. Fields S, Song O "A novel genetic system to detect protein-protein interactions" (1989) *Nature (London)* 340, 245
68. Fields S, Sternglanz R "The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions" (1994) *Trends Genet* 10, 286
69. Bradbury A, Possenti R, Shooter EM et al "Molecular cloning of PC3, a putatively secreted protein whose mRNA is induced by nerve growth factor and depolarization" (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3353



70. Fletcher BS, Lim RW, Varnum BC et al "Structure and expression of TIS21, a primary response gene induced by growth factors and tumor promoters" (1991) *J Biol Chem* 266, 14511
71. Varnum BC, Reddy ST, Koski RA et al "Synthesis, degradation, and subcellular localization of proteins encoded by the primary response genes TIS7/PC4 and TIS21/PC3" (1994) *J Cell Physiol* 158, 205
72. Rimokh R, Berger F, Cornillet P et al, "Break in the BCL1 locus is closely associated with intermediate lymphocytic lymphoma subtype" (1990) *Genes Chromosom Cancer* 2, 223
73. Rouault JP, Samarut C, Duret L et al " Sequence analysis reveals that the BTG1 anti-proliferative gene is conserved throughout evolution in its coding and 3' non-coding regions " (1993) *Gene* 129, 303
74. Nikawa J, Nakano H, Ohi N "Structural and functional conservation of human and yeast HCPI genes which can suppress the growth defect of the *Saccharomyces cerevisiae* ire15 mutant" (1996) *Gene* 171, 107
75. Ghosh SK, Paik WK, Kim S "Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain. Myelin basic protein- and histone-specific enzyme" (1988) *J Biol Chem* 271, 12585-12594
76. Tang J, Frankel A, Cook RJ et al "PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells" (2000) *J Biol Chem* 275, 7723-7730
77. Ashworth LK, Batzer MA, Brandriff B et al "An integrated metric physical map of human chromosome 19" (1995) *Nat Genet* 11, 422-7
78. Scorilas A, Black MH, Talieri M et al "Genomic organization, physical mapping, and expression analysis of the human protein arginine methyltransferase 1 gene" (2000) *Biochem Biophys Res Comm* 278, 349-359
79. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA et al "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs" (1997) *Nucleic Acid Res* 25, 3389-3402
80. Rawal N, Rajpurohit R, Paik WK et al "Purification and characterization of S-adenosylmethionine-protein-arginine N-methyltransferase from rat liver" (1994) *Biochem J* 300, 483-489



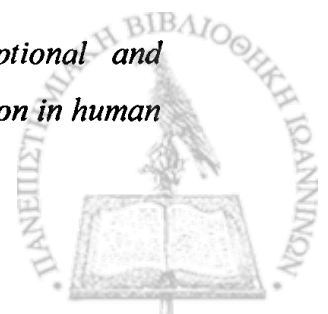
81. Araya N, Hiraga H, Kako K et al "Transcriptional down-regulation through nuclear exclusion of EWS methylated by PRMT1" (2005) *Bioch Biophys Res Com* 329, 653-660
82. Herrmann F, Lee J, Bedford MT et al "Dynamics of human protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in vivo" (2005) *J Biol Chem* 280(45), 38005-38010
83. Najbauer J, Johnson BA, Young AL et al "Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins" (1993) *J Biol Chem* 268(14), 10501-10509
84. Dreyfuss G, Matunis MJ, Piñol-Roma S et al "hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA" (1992) *Annu Rev Biochem* 62, 289-321
85. Piñol-Roma S, Dreyfuss G "hnRNP proteins: localization and transport between the nucleus and the cytoplasm" (1993) *Trends Cell Biol* 3, 151-155
86. Soulard M, Veronique DV, Siomi MC et al "hnRNP G: sequence and characterization of a glycosylated RNA-binding protein" (1993) *Nucleic Acids Res* 21, 4210-4217
87. Cobianchi F, Calvio C, Stoppini M et al "Phosphorylation of human hnRNP protein A1 abrogates in vitro strand annealing activity" (1993) *Nucleic Acids Res* 21, 949-955
88. Wilk HE, Wer RH, Friedrich D et al "The core proteins of 35S hnRNP complexes. Characterization of nine different species" (1985) *Eur J Biochem* 146, 71-81
89. Beyer AL, Christensen ME, Walker BW et al "Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hnRNP particles" (1977) *Cell* 11, 127-138
90. Boffa LC, Karn J, Vidali G et al "Distribution of NG, NG,-dimethylarginine in nuclear protein fractions" (1977) *Biochem Biophys Res Commun* 74, 969-976
91. Krecic AM, Swanson MS "hnRNPs complexes: composition, structure and function", (1999) *Curr Op Cell Biol* 11, 363-371
92. Burd CG, Swanson MS, Gorlach M et al "Primary structures of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2, B1, and C2 proteins: a diversity of RNA binding proteins is generated by small peptide inserts" (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 8403-8437



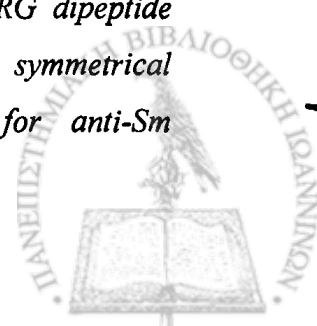
93. Kiledjian M, Dreyfuss G "Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box" (1992) *EMBO J* 11, 2655-2664
94. Mayeda A, Helfman DM, Krainer AR "Modulation of exon skipping and inclusion by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and pre-mRNA splicing factor SF2/ASF" (1993) *Mol Cell Biol* 13, 2993
95. Piñol-Roma S, Dreyfuss G "Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm" (1992) *Nature (London)* 355, 730
96. Piñol-Roma S, Dreyfuss G "Cell cycle-regulated phosphorylation of the pre-mRNA-binding (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) C proteins" (1993) *Mol Cell Biol* 13, 5762
97. Hoek KS, Kidd Gj, Carson JH et al "hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA" (1998) *Biochemistry* 37, 7021-7029
98. Nichols RC, Wang XW, Tang J et al "The RGG domain in hnRNP A2 affects subcellular localization" (2000) *Exp Cell Res* 256, 522-532
99. Luger K, Mäder AW, Richmond RK et al "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution" (1997) *Nature* 389, 251-260
100. Luger K, Richmond TJ "The histone tails of the nucleosome" (1998) *Curr Opin Genet Dev* 8, 140-146
101. Murray K "The occurrence of epsilon-n-methyl lysine in histones" (1964) *Biochemistry* 3, 10
102. Strahl BD, Ohba R, Cook RG et al "Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*" (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14967
103. Wang H, Huang ZQ, Xia L et al "Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor" (2001) *Science* 293, 853-857
104. Balint B, Szanto A, Madi A et al "Arginine methylation provides epigenetic transcription memory for retinoid-induced differentiation in myeloid cells" (2005) *Mol Cell Biol* 25(13), 5648-5663
105. Schindler C, Darnell JE Jr "Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway" (1995) *Annu Rev Biochem* 64, 621-651



106. Heim MH, Kerr IM, Stark GR et al "Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway" (1995) *Science* 267, 1347-1349
107. Bromberg JF "Activation of STAT proteins and growth control" (2001) *Bioessays* 23, 161-169
108. Komyod W, Bauer U-M, Heinrich PC et al "Are STATS arginine-methylated?" (2005) *J Biol Chem* 280(23), 21700-21705
109. Li C, Lusk AJ, Sparkes R et al "Characterization and chromosomal mapping of the gene encoding the cellular DNA binding protein HTLF" (1992) *Genomics* 13, 658-664
110. Kao PN, Chen L, Brock GNJ et al "Cloning and expression of cyclosporin A- and FK506-sensitive nuclear factor of activated T-cells: NF45 and NF90" (1994) *J Biol Chem* 269, 20691-20699
111. Marcoulatos P, Kossidis G, Mamuris Z et al "Mapping interleukin enhancer binding factor 2 gene (ILF2) to human chromosome 1 (1q11-qter and 1p11-p12) by polymerase chain reaction amplification of human-rodent somatic cell hybrid DNA templates" (1996) *J Interferon Cytokine Res* 16, 1035-1038
112. Buaas FW, Lee K, Edelhoff S et al "Cloning and characterization of the mouse interleukin enhancer binding factor 3 (Ilf3) homolog in a screen for RNA binding proteins" (1999) *Mamm Genome* 10, 451-456
113. Matsumoto-Taniura N, Pirollet F, Monroe R et al "Identification of novel M phase phosphoproteins by expression cloning" (1996) *Mol Biol Cell* 7, 1455-1469
114. Tang J, Kao PN, Herschman HR "Protein-arginine methyltransferase 1, the predominant protein-arginine methyltransferase in cells, interacts with and is regulated by interleukin enhancer-binding factor 3" (2000) *J Biol Chem* 275(26), 19866-19876
115. Tamm I, Lin SL, Pfeffer LM et al "Interferons alpha and beta as cellular regulatory molecules" (1987) *Interferon* 9, 13-74
116. Revel M (1984) *The interferon system in man: nature of the interferon molecules and mode of action*, pp. 357-433
117. Friedman RL, Manly SP, McMahon M et al "Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells" (1984) *Cell* 38, 745-755



118. Uze G, Lutfalla G, Gresser I "Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA" (1990) *Cell* 60, 225-234
119. Domanski P, Witte M, Kellum M et al "Cloning and expression of a long form of the beta subunit of the interferon alpha beta receptor that is required for signaling" (1995) *J BiolChem* 270, 21606-21611
120. Lutfalla G, Holland SJ, Cinato E et al "Mutant U5A cells are complemented by an interferon-alpha beta receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster" (1995) *EMBO J* 14, 5100-5108
121. Novick D, Cohen B, Rubinstein M "The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning" (1994) *Cell* 77, 391-400
122. Knutti D and Kralli A "PGC-1, a versatile coactivator" (2001) *Trends Endocrinol Metab* 12, 360-365
123. Puigserver P and Spiegelman BM "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator" (2003) *Endocr Rev* 24, 78-90
124. Kelly D.P. and Scarpulla R.C "Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function" (2004) *Genes & Dev* 18, 357-368
125. Teyssier C, Ma H, Emter R et al "Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1alpha by arginine methylation" (2005) *Gen & Dev* 19, 1466-1473
126. Duong FH, Christen V, Berke JM et al "Upregulation of protein phosphatase 2Ac by hepatitis C virus modulates NS3 helicase activity through inhibition of protein arginine methyltransferase 1" (2005) *J Vir* 79(24), 15342-15350
127. Scott JM, Dinn JJ, Wilson P et al "Pathogenesis of subacute combined degeneration: a result of methyl group deficiency" (1981) *Lancet* 2(8242), 334-337
128. Dinn JJ, Weir DG, McCann S et al "Methyl group deficiency in nerve tissue: a hypothesis to explain the lesion of subacute combined degeneration" (1980) *Ir J Med Sci* 149(1), 1-4
129. Brahms H, Raymackers J, Union A et al "The C-terminal RG dipeptide repeats of the spliceosomal Sm proteins D1 and D3 contain symmetrical dimethylarginines, which form a major B-cell epitope for anti-Sm autoantibodies" (2000) *J Biol Chem* 274, 17122-17129



130. Rho J, Choi S, Seong YR et al "PRMT5, which forms distinct homo-oligomers, as a member of the protein-arginine methyltransferase family" (2001) *J Biol Chem* 276(14), 11393-11401
131. Shin DM, Chiao PJ, Sacks PG et al "Activation of ribosomal protein S2 gene expression in a hamster model of chemically induced oral carcinogenesis" (1993) *Carcinogenesis* 14, 163-166
132. Li C, Ai AS, Lin CH et al "Protein N-arginine methylation in adenosine dialdehyde-treated lymphoblastoid cells" (1998) *Arch Biochem Biophys* 351, 53-59
133. Gu H, Park SH, Park GH et al "Identification of highly methylated arginine residues in an endogenous 20-kDa polypeptide in cancer cells" (1999) *Life Sci* 65, 737-745
134. Mercatante D, Kole R "Modification of alternative splicing pathways as a potential approach to chemotherapy" (2000) *Pharmacol Ther* 85, 237-243
135. Xu Q, Modrek B, Lee C "Genome-wide detection of tissue-specific alternative splicing in the human transcriptome" (2002) *Nucleic Acids Res* 30, 3754-3766
136. Philips AV, Cooper TA "RNA processing and human disease" (2000) *Cell Mol Life Sci* 57, 235-249
137. Nissim-Rafinia M, Kerem B "Splicing regulation as a potential genetic modifier" (2002) *Trends Genet* 18, 123-127
138. Altschul SF, Gish W, Miller W et al "Basic local alignment search tool" (1990) *J Mol Biol*, 215(3), 403-410
139. Cox DR "Regression models and life tables" (1972) *J R Stat Soc B* 34, 187-220
140. Ioachim EE, Goussia AC, Machera M et al "Immunohistochemical evaluation of cathepsin D expression in colorectal tumours: a correlation with extracellular matrix components, p53, pRb, bcl-2, c-erbB-2, EGFR and proliferation indices" (1999) *Anticancer Res* 19(3A), 2147-55
141. Ioachim EE, Goussia AC, Agnantis NJ et al "Prognostic evaluation of metallothionein expression in human colorectal neoplasms" (1999) *J Clin Pathol*. 52(12), 876-9
142. Neiberghs HL, Hein DW, Spratt JS "Genetic profiling of colon cancer" (2002) *J Surg Onc* 80,204-213



143. *Anwar S, Frayling IM, Scott NA et al "Systemic review of genetic influences on the prognosis of colorectal cancer" (2004) Br J Surg 91(12), 1654*
144. *Bedford MT, Richard S "Arginine methylation: an emerging regulator of protein function" (2005) Mol Cell 18, 263-272*
145. *Bedford MT "Arginine methylation at a glance" (2007) J Cell Sci 120(24), 4243-4245*
146. *Papadopoulou S, Scorilas A, Arnogianaki N et al "Expression of gelatinase-A (MMP2) in human colon cancer and normal colon mucosa" (2001) Tumour Biol 22(6), 283-289*
147. *Talieri M, Papadopoulou S, Scorilas A et al "Cathepsin B and cathepsin D expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma" (2004) Cancer Letters 205, 97-106*
148. *Iacopetta B "Are there two sides to colorectal cancer?" (2002) Int J Cancer 101, 403-408*



13. ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΑΡΘΡΑ

- ✓ *Talieri M., Diamandis EP., Gourgiotis D., Mathioudaki K., Scorilas A.*
"Expression analysis of the human kallikrein 7 (KLK7) in breast tumors: a
new potential biomarker for prognosis of breast carcinoma", Thrombosis and
Haemostasis 2004 Jan; 91(1):180-186
- ✓ *Mathioudaki K., Arnogianaki N., Yotis J., Scorilas A., Agnanti N., Talieri*
M. "Expression analysis of protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1)
gene in breast cancer" Iatriki Epikairotitia 2004 Apr; 7(11): 2622-2624
- ✓ *Mathioudaki K., Scorilas A., Papadokostopoulou A., Xynopoulos D.,*
Arnogianaki N., Agnanti N., Talieri M. "Expression analysis of BCL2L12, a
new member of apoptosis-related genes, in colon cancer", Biological
Chemistry 2004 Sep; 385(9):779-783
- ✓ *Mathioudaki K., Leotsakou T., Papadokostopoulou A., Paraskevas E.,*
Ardavanis A., Talieri M., Scorilas A. "SR-A1, a member of the human pre-
mRNA splicing factor family, and its expression in colon cancer progression",
Biological Chemistry 2004 Sep; 385(9):785-7
- ✓ *Mathioudaki K., Papadokostopoulou A., Scorilas A., Xynopoulos D., Agnanti*
N., Talieri M. "The PRMT1 gene expression pattern in colon cancer" British
Journal of Cancer 2008 Dec; 99(12):2094-9

