

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

Η ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΕΞΑΛΛΑΓΗ ΩΣ ΜΟΡΙΑΚΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ

1.1 Γενικά

Η καρκινική εξαλλαγή ενός κυττάρου είναι αποτέλεσμα μιας πολυσταδιακής διαδικασίας κατά την οποία πολλαπλοί γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες απαιτούνται για τη μετάβαση από την κατάσταση φυσιολογικού ελέγχου της κυτταρικής αύξησης και διαίρεσης, σε μια κατάσταση απώλειας ελέγχου. Οι αλλαγές που συμβαίνουν όταν ένα κύτταρο γίνεται καρκινικό ομαδοποιούνται σε τρεις κατηγορίες: αθανατοποίηση (immortalization), η οποία είναι η ιδιότητα της συνεχούς διαίρεσης και αύξησης, χωρίς υποχρεωτικά άλλες φαινοτυπικές αλλαγές. Μετασχηματισμός (transformation), που είναι η έλλειψη των φυσιολογικών περιορισμών της αύξησης (ανάγκη για πρόσδεση σε στερεό υπόστρωμα, αναστολή αύξησης από επαφή, ανάγκη ύπαρξης αυξητικών παραγόντων στο θρεπτικό υλικό). Μετάσταση (metastasis), που είναι η ιδιότητα των κυττάρων μόνο των κακοήθων όγκων να μεταναστεύουν σε άλλους ιστούς σχηματίζοντας νέες αποικίες.

Ένας κακοήθης όγκος μπορεί να αναπτυχθεί από επιθηλιακά κύτταρα (οπότε πρόκειται για καρκίνωμα), μεσεγχυματικά κύτταρα (σάρκωμα), ή αιμοποιητικά κύτταρα (λευχαιμίες). Το 90% περίπου των κακοήθων νεοπλασιών του ανθρώπου αναφέρεται σε καρκινώματα. Οι περισσότεροι όγκοι παρουσιάζουν κλωνική προέλευση, ξεκινούν δηλαδή από ένα κύτταρο. Απαιτείται ωστόσο μια σειρά

διαδοχικών γενετικών αλλοιώσεων για τη δημιουργία νεοπλασίας (πολυσταδιακή φύση του καρκίνου) οι οποίες αφορούν τη μη φυσιολογική ποιοτική και ποσοτική λειτουργία συγκεκριμένων γονιδίων (Σπαντίδος, 1992). Τα γονίδια αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της αύξησης και διαφοροποίησης του κυττάρου και κατατάσσονται σε δύο βασικές κατηγορίες: τα ογκογονίδια (oncogenes), ιικά (v-onc) και κυτταρικά γονίδια (πρωτο-ογκογονίδια, c-onc) που μεταπίπτουν σε ογκογονίδια μετά από ενεργοποίηση, και τα ογκο-κατασταλτικά γονίδια (onco-suppressor genes). Επιπλέον, πρόσφατα ταυτοποιήθηκε και η κατηγορία των γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA (mismatch repair genes) (Watson et al, 1989-Lewin, 1990-Σπαντίδος, 1992). Γενικά, κατά την ογκογένεση διαταράσσεται η λειτουργία διαφόρων τύπων γονιδίων, ανάλογα με το μηχανισμό που ακολουθείται.

1.2 DNA ογκογόνοι ιοί

Οι DNA ογκογόνοι ιοί είναι οι papoma ιοί (papilloma (HPV)-ιός του θηλώματος, polyoma-ιός του πολυώματος και simian virus (SV40)-ιός του πιθήκου) και οι αδενοιοί. Η αντίδραση των κυττάρων στη μόλυνση από τον ιό τα διακρίνει σε αυτά που μολύνονται παραγωγικά (permissive cells) και σε αυτά που δε μολύνονται παραγωγικά (non permissive cells). Στην πρώτη περίπτωση, η μόλυνση οδηγεί σε λύση των κυττάρων και απελευθέρωση ιών. Στη δεύτερη, η μόλυνση μπορεί να οδηγήσει σε μετασχηματισμό των κυττάρων με ενσωμάτωση του ιικού DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου και έκφραση των πρώιμων ιικών γονιδίων. Στον SV40 τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν τα αντιγόνα T και t, ενώ στον αδενοϊό τις E1A και E1B πρωτεΐνες. Λίγοι καρκίνοι του ανθρώπου προκαλούνται από ογκογονίδια DNA ιών (για παράδειγμα ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας από τον ιό HPV, το λέμφωμα Burkitt και το ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα από τον ιό EBV).

1.3 RNA ογκογόνοι ιοί (ρετροιοί)

Η ογκογένεση από ρετροιούς είναι πολυπλοκότερη διαδικασία από ό,τι από DNA ιούς. Γενικά, οι ρετροιοί μετασχηματίζουν κύτταρα με δύο μηχανισμούς: με μεταγωγή κυτταρικών πρωτο-ογκογονιδίων (μεταγωγικοί ιοί-transducing viruses) και με αργή δράση (slow-acting viruses).

Στην περίπτωση των μεταγωγικών ρετροιών, υπάρχει στο γονιδίωμά τους ένα ογκογονίδιο, ομόλογο κυτταρικού πρωτο-ογκογονιδίου. Μετά από αντίστροφη μεταγραφή του ιικού RNA σε DNA και ενσωμάτωση αυτού κοντά σε πρωτο-ογκογονίδιο, ακολουθούν πολύπλοκες ανακατατάξεις που οδηγούν στην ενσωμάτωση του κυτταρικού γονιδίου στο γονιδίωμα του ιού και τη μετατροπή αυτού σε ογκογονίδιο. Η μετατροπή του πρωτο-ογκογονιδίου σε ογκογονίδιο μπορεί να οφείλεται, είτε στο ότι το πρωτο-ογκογονίδιο ευρίσκεται σε περιβάλλον έντονης μεταγραφικής δραστηριότητας, λόγω των ρυθμιστικών στοιχείων του ρετροιού, είτε σε μεταλλαγή ή απώλεια τμήματος της αλληλουχίας του πρωτο-ογκογονιδίου. Παράδειγμα μεταγωγικού ρετροιού είναι ο ιός του Harvey που προκαλεί σαρκώματα και ο οποίος οδήγησε στην εντόπιση της οικογένειας των *ras* ογκογονιδίων.

Στην περίπτωση των ρετροιών αργής δράσης, η ενεργοποίηση του πρωτο-ογκογονιδίου γίνεται μετά από ενσωμάτωση του ιικού DNA κοντά σε αυτό, λόγω εισδοχής υποκινητών ή ενισχυτών που προκαλούν την αυξημένη μεταγραφή του.

1.4 Χημικά καρκινογόνα και ακτινοβολία

Τα χημικά καρκινογόνα είναι υπεύθυνα για το μεγαλύτερο ποσοστό καρκίνων. Ο μεταβολισμός τους δημιουργεί ηλεκτρονιόφιλα κέντρα που αντιδρούν με το DNA προκαλώντας μεταλλάξεις. Μεταλλαγές παράγονται και κατά τη διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA.

Η ιονίζουσα ακτινοβολία προκαλεί θραύσεις στο σκελετό του DNA, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση χρωμοσωμικών τμημάτων και την ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων. Επίσης, κατά την επιδιόρθωση του DNA γίνονται σφάλματα-μεταλλαγές του DNA. Έχουν εντοπισθεί δύο τύποι καρκίνοι του ανθρώπου που οφείλονται σε βλάβες συστημάτων επιδιόρθωσης και επαγωγή άλλων, επιρρεπών σε λάθη. Πρόκειται για το ξηρόδερμα pigmentosum και την αταξία τελαγγειεκτασία, που χαρακτηρίζονται από ευαισθησία των ασθενών σε υπεριώδη και ιονίζουσα ακτινοβολία, αντίστοιχα.

1.5 Κυτταρικά ογκογονίδια

Τέλος, στα παραδείγματα μετάπτωσης των πρωτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια που προαναφέραμε, πρέπει να συμπεριληφθεί και η ενεργοποίησή τους μετά από μετατόπιση, συνήθως στη θέση των γονιδίων των αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών, που οδηγεί σε υπερέκφραση των ογκογονιδίων (για παράδειγμα: λέμφωμα Burkitt-μετατόπιση του *myc* γονιδίου).

Τέλος, ενεργοποίηση μετά από υπερέκφραση έχουμε και στην περίπτωση της γονιδιακής επέκτασης πρωτο-ογκογονιδίων, η οποία οδηγεί σε πολλαπλό αριθμό αντιγράφων των γονιδίων.

1.6 Τα ογκογονίδια και οι πρωτείνες τους-ομαδοποίηση και γενικά χαρακτηριστικά

Γενικά, τα περισσότερα ογκογονίδια φαίνεται να ελέγχουν την κυτταρική αύξηση και διαίρεση. Τέσσερεις τύποι πρωτεϊνών μετέχουν στη διαδικασία αυτή: οι αυξητικοί παράγοντες, οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων, οι ενδοκυτταρικοί διαβιβαστές μηνυμάτων και οι ρυθμιστικές πρωτείνες της

μεταγραφής. Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα ογκογονιδίων περιγράφονται στη συνέχεια.

1.6.1 Αυξητικοί παράγοντες

Στην κατηγορία αυτή ανήκει το ογκογονίδιο *sis*, το οποίο κωδικοποιεί μια μορφή του αυξητικού παράγοντα που παράγεται από αιμοπετάλια (PDGF) και μετασχηματίζει κύτταρα που έχουν τον υποδοχέα του PDGF. Έχουν παρατηρηθεί και περιπτώσεις αυτοκρινούς επαγωγής, δηλαδή αυτοδιέγερσης της αύξησης λόγω παραγωγής και έκκρισης του συνδέτη (ligand) από κύτταρα που φέρουν τον αντίστοιχο υποδοχέα.

1.6.2 Υποδοχείς ορμονών και αυξητικών παραγόντων

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης και οι ενδοκυτταρικοί υποδοχείς.

Σε ό,τι αφορά τα γονίδια που κωδικοποιούν για υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, αυτά μεταπίπτουν σε ογκογονίδια όταν μεταλλαχθούν με τέτοιο τρόπο ώστε οι υποδοχείς που κωδικοποιούν να παραμένουν ενεργοί ακόμη και απουσία του συνδέτη. Παραδείγματα: ErbB1 πρωτεΐνη-υποδοχέας του EGF χωρίς την εξωκυτταρική περιοχή αυτού, ErbB2-συγγενής μορφή του υποδοχέα EGF με σημειακή μετάλλαξη, Ros-συγγενής μορφή του υποδοχέα της ινσουλίνης.

Παράδειγμα ογκοπρωτεΐνης-ενδοκυτταρικού υποδοχέα είναι η πρωτεΐνη ErbA, που συναγωνίζεται τον υποδοχέα της θυρεοειδούς ορμόνης.

1.7 Ενδοκυτταρικοί διαβιαστές μηνυμάτων

Τα προϊόντα ογκογονιδίων αυτής της τάξης διακρίνονται στις κατηγορίες που ακολουθούν:

1.7.1 Κινάσες τυροσίνης

Διακρίνονται σε κυτταροπλασματικές, όπως οι πρωτεΐνες Src, Abl, Yes, και σε πυρηνικές, όπως οι Abl, Met.

1.7.2 Κινάσες σερίνης/ θρεονίνης

Κυτταροπλασματικές κινάσες σερίνης-θρεονίνης, όπως οι Raf και Mos.

1.7.3 G-πρωτεΐνες

Κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που δεσμεύουν νουκλεοτίδια γουανίνης, όπως οι Ras.

1.7.4 Συγγενείς της φωσφολιπάσης C

Κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες με ομολογία με τη φωσφολιπάση C, όπως η Crk.

1.8 Ρυθμιστικές πρωτεΐνες της μεταγραφής

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν προϊόντα ογκογονιδίων που αποτελούν πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι οι Myc, Myb, Ski, που αποτελούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες της μεταγραφής και ευρίσκονται οι μεν δύο πρώτες στον πυρηνοσκελετό, η δε τρίτη στο πυρηνόπλασμα. Ακόμη, οι πρωτεΐνες Jun, Fos, που ευρίσκονται στο πυρηνόπλασμα και συναποτελούν το μεταγραφικό παράγοντα AP-1.

1.9 Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια αποτελούν μία ιδιαίτερη τάξη γονιδίων που δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές των νεοπλασιών και των οποίων η απενεργοποίηση οδηγεί σε ανάπτυξη όγκων. Σε αντίθεση με τα ογκογονίδια που δρουν ως επικρατή, τα ογκο-κατασταλτικά γονίδια παρουσιάζουν υπολειπόμενη ογκογενετική δράση, υπό την έννοια ότι απαιτείται μετάλλαξη ή έλλειψη και στα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου για καταστολή της φυσιολογικής δράσης τους.

Η απώλεια ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity, LOH), φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα είτε ενδιάμεσων ελλείψεων, είτε απάλειψης χρωμοσώματος, είτε μη φυσιολογικών μιτωτικών ανασυνδυασμών και αποτελεί σύνηθες χαρακτηριστικό πολλών κακοήθων νόσων. Θεωρείται ότι αντικατοπτρίζει την απώλεια ενός ή περισσότερων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, τα οποία εντοπίζονται στην περιοχή του ομόλογου χρωμοσώματος που έχει χαθεί.

Οι πιο γνωστοί αντιπρόσωποι αυτής της τάξης γονιδίων είναι το p53 και το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος Rb. Το γονίδιο p53 κωδικοποιεί για μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, που προσδένεται στο DNA και ενεργοποιεί τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων. Τα επίπεδα της P53 πρωτεΐνης δεν παραμένουν σταθερά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Μεταλλάξεις του γονιδίου p53, οι οποίες είτε αυξάνουν τον χρόνο ημίσειας ζωής της πρωτεΐνης, είτε αναστέλλουν την ενεργοποίηση της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων από την πρωτεΐνη, προσδίδουν στο γονίδιο την ικανότητα μετασχηματισμού κυτταρικών σειρών *in vitro*. Απενεργοποίηση του γονιδίου p53 εμφανίζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου του ανθρώπου, όπως του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του οστεοσαρκώματος, ενώ μεταλλάξεις του γονιδίου σε γεννητική κυτταρική σειρά (germline) φαίνεται να συνδέονται με το σύνδρομο του κληρονομικού καρκίνου Li-Fraumeni. Λεπτομέρειες για το ρόλο του p53 στην καρκινογένεση θα αναφερθούν σε σχετικό κεφάλαιο.

Το γονίδιο Rb κωδικοποιεί για μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που έχει ικανότητα πρόσδεσης στο DNA. Το επίπεδο της πρωτεΐνης είναι σταθερό κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, αλλάζει όμως το επίπεδο φωσφορυλίωσής της. Φαίνεται ότι η αποφωσφορυλιωμένη μορφή είναι αυτή που εμπλέκεται στη φυσιολογική καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μέσω δέσμευσης του παράγοντα E2F που είναι απαραίτητος για τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων και καταστολής της δράσης των RNA πολυμερασών I και II (Nasmyth, 1996). Απενεργοποίηση του γονιδίου παρατηρείται κυρίως στο ρετινοβλάστωμα καθώς και σε καρκίνους της ουροδόχου κύστεως και του πνεύμονα.

Άλλα ογκο-κατασταλτικά γονίδια είναι: το γονίδιο APC (του οποίου η μετάλλαξη σε κύτταρα της γεννητικής σειράς έχει ως αποτέλεσμα προδιάθεση για καρκίνο του παχέος εντέρου, Su et al, 1993), το γονίδιο MCC, το γονίδιο DCC και το γονίδιο *nm23*, το οποίο εμπλέκεται στον καρκίνο του μαστού και του τραχήλου της μήτρας. Το γονίδιο *nm23* κλωνοποιήθηκε αρχικά ως γονίδιο-καταστολέας της μετάστασης (Steege et al, 1988). Πρόσφατα εντοπίστηκε στην περιοχή του χρωμοσώματος 9p21 το γονίδιο MTS1, το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη p16, μια κινάση εξαρτώμενη από κυκλίνες. Έλλειψη του ογκο-κατασταλτικού αυτού γονιδίου εμφανίζεται συχνά σε κυτταρικές σειρές από όγκους του πνεύμονα, του μαστού, του δέρματος, των ωοθηκών και των λεμφοκυττάρων (Kamb et al, 1994).

Τα ογκο-κατασταλτικά γονίδια είναι γενικά λιγότερο μελετημένα από ό,τι τα ογκογονίδια και ο ακριβής ρόλος τους δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος. Ωστόσο, είναι βέβαιο ότι τα πρωτεϊνικά τους προϊόντα δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές της κυτταρικής αύξησης και αλληλεπιδρούν με πυρηνικές πρωτεΐνες-προϊόντα ογκογονιδίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ *ras* ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ

2.1 Γενικά

Σκοπό της μοριακής έρευνας του καρκίνου αποτελεί η ταυτοποίηση γονιδίων που είναι ενεργοποιημένα σε διάφορους τύπους καρκίνου και η αποσαφήνιση του ρόλου τους στην ογκογένεση. Μια συχνά απαντώμενη οικογένεια στον καρκίνο του ανθρώπου είναι αυτή των *ras* ογκογονιδίων (Barbacid, 1987, Bos et al, 1989).

Τα πρώτα γονίδια *ras* που ταυτοποιήθηκαν ήταν ιικά ογκογονίδια (*v-ras*) ρετροϊών με οξεία εξαλλακτική ικανότητα. Η ανακάλυψη ότι τα ογκογονίδια των ρετροϊών έχουν προέλθει από φυσιολογικά κυτταρικά γονίδια, συνοδεύτηκε από τη διαπίστωση ότι πολλά γονίδια με ικανότητα μετασχηματισμού μετά από επιμόλυνση των κυττάρων NIH 3T3 (ινοβλάστες ποντικού), αντιπροσωπεύουν κυτταρικά γονίδια που έχουν ενεργοποιηθεί με σημειακή μετάλλαξη. Ένα από αυτά ήταν και το ογκογονίδιο *ras*, του οποίου η ενεργοποιημένη μορφή ανιχνεύθηκε σε καρκινική σειρά κυττάρων ουροδόχου κύστεως EJ (Reddy et al, 1982).

Τα γονίδια *ras* βρίσκονται ενεργοποιημένα σε πολλούς τύπους καρκίνου του ανθρώπου (Bos et al, 1989), καθώς και σε όγκους ζώων που έχουν προκληθεί πειραματικά από χημικά καρκινογόνα (Barbacid, 1987), με συχνότητα που διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στους διάφορους τύπους καρκίνου. Φυσιολογικά, το πρωτεϊνικό προϊόν των *ras* γονιδίων παίζει βασικό ρόλο στη διαβίβαση ενδοκυτταρικών μηνυμάτων.

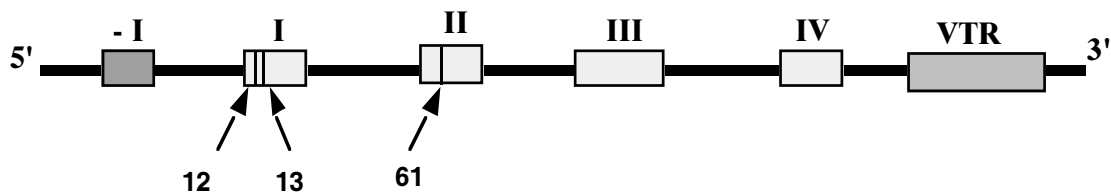
Οι πρωτεΐνες Ras έχουν μοριακό βάρος 21KDa και καλούνται p21. Δεσμεύουν νουκλεοτίδια γουανίνης (GTP και GDP) με μεγάλη συγγένεια και έχουν δράση GTPάσης, γεγονός που δεικνύει ότι ο μηχανισμός της δράσης τους θα πρέπει να είναι ανάλογος με αυτόν άλλων πρωτεϊνών που δεσμεύουν νουκλεοτίδια γουανίνης (G proteins). Η ταυτοποίηση παραγόντων που ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των p21 και πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην οδό διαβίβασης ενδοκυτταρικών μηνυμάτων της Ras πρωτεΐνης, επιτείνουν το ενδιαφέρον γύρω από τα γονίδια *ras*.

2.2 Δομή των γονιδίων *ras*

Τα γονίδια *ras* απαντώνται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και των ζυμών και παρουσιάζουν σημαντική δομική ομολογία (Lowy and Willumsen, 1993).

Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί τρία γονίδια *ras*:: το *H-ras*, στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 11 (11p15.1-p15.5), το *K-ras*, στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 12 (12p12.1-pter) και το *N-ras*, στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 1 (1p22-p32). Έχουν επίσης ταυτοποιηθεί και δύο μη λειτουργικά ψευδογονίδια, τα *H-ras-2* και *K-ras-1*. Και τα τρία *ras* γονίδια έχουν ένα 5' μη κωδικοποιό εξώνιο (εξώνιο -I ή \emptyset), τέσσερα κωδικοποιά εξώνια (I-IV) και μία περιοχή πολλαπλών, διαδοχικά επαναλαμβανόμενων μεταβλητών αλληλουχιών (VTR) στο μη μεταγραφόμενο 3' άκρο του γονιδίου (Εικ. 2.1) (Ishii et al, 1985). Τα μήκη των αντίστοιχων εξωνίων είναι παρόμοια, ενώ τα μήκη των εσωνίων διαφέρουν αρκετά, με αποτέλεσμα τα συνολικά μήκη των τριών *ras* γονιδίων να είναι διαφορετικά: το *K-ras* έχει μήκος περίπου 50 Kb, το *H-ras* 6.4 kb και το *N-ras* 10 Kb. Το *K-ras* φέρει δύο εναλλακτικά τέταρτα εξώνια, τα 4A και 4B, (*K-ras* A και *K-ras* B αντίστοιχα). Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα *K-ras* A, *H-ras* και

N-ras αποτελούνται από 189 αμινοξέα, ενώ του *K-ras B* αποτελείται από 188 αμινοξέα, διότι το 4B εξώνιο έχει ένα κωδικόνιο λιγότερο.



Εικόνα 2.1: Σχηματική παρουσίαση της δομής των γονιδίων *ras*. Με -I σημειώνεται το μη κωδικοποιό εξώνιο και με I έως IV τα κωδικοποιά εξώνια. Σημειώνεται επίσης η περιοχή VTR στο 3' άκρο του γονιδίου, καθώς και τα κωδικόνια 12, 13 και 61, στα οποία απαντώνται συχνότερα μεταλλάξεις στις νεοπλασίες του ανθρώπου.

2.3 Ενεργοποίηση των πρωτο-ογκογονιδίων *ras*

Ενεργοποίηση των γονιδίων *ras* μπορεί να επιτευχθεί είτε α) με σημειακές μεταλλάξεις (ποιοτική αλλαγή), είτε β) με υπερέκφραση του προϊόντος του γονιδίου (ποσοτική αλλαγή). Επίσης, έχει αναφερθεί διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης των ογκογονιδίων *ras* σε όγκους του ανθρώπου (Vechtenheim et al, 1994) καθώς και πολυμορφισμός των αλληλομόρφων του *ras* (Krontiris et al, 1993).

2.3.1 Ενεργοποίηση μέσω σημειακών μεταλλάξεων

Οι ενεργοποιημένες πρωτεΐνες Ras έχουν συνήθως αλλαγές σε αμινοξέα που είναι σημαντικά για την πρόσδεση των νουκλεοτιδίων γουανίνης. Η αλλαγή της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης καθιστά προβληματική την υδρόλυση και την ανταλλαγή του νουκλεοτιδίου γουανίνης με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να βρίσκεται διαρκώς στην ενεργό της μορφή.

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *ras* που έχουν παρατηρηθεί στους διάφορους τύπους όγκων του ανθρώπου, αφορούν κυρίως τα κωδικόνια 12, 13 και 61, τα οποία κωδικοποιούν αμινοξέα που στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης ευρίσκονται στην περιοχή πρόσδεσης του GTP. Με πειράματα κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης βρέθηκαν και άλλα κωδικόνια (εκτός των 12, 13 και 61) των οποίων η μετάλλαξη οδηγεί σε ενεργοποίηση του γονιδίου, μεταλλάξεις όμως σε αυτά παρατηρούνται σπάνια ή και καθόλου σε όγκους του ανθρώπου.

Η ανίχνευση των σημειακών μεταλλάξεων επιτυγχάνεται με μεθόδους μοριακής βιολογίας, όπως είναι ο εκλεκτικός υβριδισμός με ολιγο-νουκλεοτιδικούς ιχνηθέτες και η πέψη με RNAση A των σημείων ατελούς ομολογίας (χρησιμοποιώντας έναν RNA ιχνηθέτη). Πρόσφατα, η ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων έγινε ευκολότερη και πολύ πιο ευαίσθητη, με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR), ακολουθούμενης είτε από ανάλυση αλληλουχίας (sequencing), είτε από ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP), είτε από ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονής έλικας (SSCP).

Μεταλλάξεις των γονιδίων *ras* έχουν αναφερθεί στους περισσότερους τύπους νεοπλασιών του ανθρώπου. Η συχνότητα των μεταλλάξεων των γονιδίων *ras* καθώς και το μέλος της οικογένειας που βρίσκεται ενεργοποιημένο, διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων τύπων καρκίνου. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *H-ras* απαντώνται συχνότερα σε όγκους του ουροποιητικού συστήματος, ενώ το *K-ras* ευρίσκεται συχνά ενεργοποιημένο σε καρκινώματα του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του παγκρέατος, του τραχήλου της μήτρας και του ενδομητρίου. Ενεργοποίηση του γονιδίου *N-ras* μέσω σημειακής μετάλλαξης, φαίνεται να επικρατεί σε μελανώματα και νεοπλασίες του αιμοποιητικού συστήματος. Υπάρχουν ωστόσο τύποι όγκων που δεν παρουσιάζουν συγκεκριμένη εξειδίκευση ως προς το μέλος της οικογένειας *ras* που είναι ενεργοποιημένο, όπως είναι ο

καρκίνος του θυρεοειδούς (Lemoine et al, 1989), ενώ σε άλλους τύπους, όπως στον καρκίνο του μαστού (Koffa et al, 1994), ή το μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (MDS-Paquette et al, 1993), οι μεταλλάξεις των γονιδίων *ras* είναι σπάνιες. Η ενεργοποίηση διαφορετικού μέλους της οικογένειας *ras* πιθανά οφείλεται στην ύπαρξη διαφορετικού τύπου κυττάρου από το οποίο προέρχεται κάθε είδος όγκου, ενώ είναι επίσης πιθανό, η σημειακή μετάλλαξη ενός γονιδίου *ras* να προδιαθέτει το κύτταρο προς ένα συγκεκριμένο τύπο όγκου.

Η ύπαρξη μεταλλάξεων στα γονίδια *ras* φαίνεται να σχετίζεται με το κλινικό στάδιο του όγκου (Stage), μια και σε ένα μεγάλο αριθμό μελετών έχει αναφερθεί αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων σε όγκους προχωρημένου σταδίου. Για ορισμένους τύπους καρκίνου, όπως του παχέος εντέρου, οι μεταλλάξεις αυτές θεωρούνται πρώιμο γεγονός, ενώ για άλλους τύπους, όπως αυτός του πνεύμονα, θεωρούνται όψιμο γεγονός της καρκινογένεσης (Sugio et al, 1994).

Ακόμη, η παρουσία μεταλλάξεων των γονιδίων *ras* έχει συσχετισθεί και με την πρόγνωση και εξέλιξη της νόσου. Μεταλλάξεις του γονιδίου *N-ras* σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο συνδέονται με αυξημένη πιθανότητα υποτροπής σε οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία (AML) καθώς και με μικρότερο χρόνο επιβίωσης (Paquette et al, 1993). Ακόμη, σε ασθενείς με AML, μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου *N-ras* έχουν συσχετισθεί με "βαρύτερη" κλινική εικόνα και μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής. Επιπλέον, σε καρκίνους της ουροδόχου κύστεως, μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *H-ras* έχουν συσχετισθεί με αυξημένη πιθανότητα υποτροπής. Τέλος, σε ό,τι αφορά τους καρκίνους του πνεύμονα, (Sugio et al, 1992) του παγκρέατος (Kondo et al, 1994) και του ενδομητρίου (Mizuuchi et al, 1992), μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *K-ras* σχετίζονται με κακή πρόγνωση. Ωστόσο, αρκετές μελέτες απαιτούνται ακόμη για τη συσχέτιση των μεταλλάξεων με την πορεία της νόσου, ώστε να μπορέσουν αυτές να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά ως δείκτες πρόγνωσης και διάγνωσης.

2.3.2 Ενεργοποίηση μέσω υπερέκφρασης

Ο δεύτερος τρόπος ενεργοποίησης των γονιδίων *ras* είναι η υπερπαραγωγή του πρωτεϊνικού προϊόντος τους, η οποία μπορεί να οφείλεται είτε σε γονιδιακή επέκταση, οπότε το γονίδιο ευρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα στο κύτταρο, είτε σε απώλεια της μεταγραφικής ρύθμισης, που μπορεί να είναι συνέπεια μετατόπισης του γονιδίου, ενσωμάτωσης ιικών αλληλουχιών στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου ή υπερέκφρασης κάποιου ρυθμιστικού παράγοντα της μεταγραφής.

Η υπερέκφραση μπορεί να ανιχνευθεί σε επίπεδο mRNA, με ανάλυση κατά Northern ή με συνδυασμό αντίστροφης μεταγραφής και PCR (RT-PCR) (Kotsinas et al, 1994), καθώς και σε επίπεδο πρωτεΐνης, με ανάλυση κατά Western ή με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους.

Επίπεδα της p21 υψηλότερα του φυσιολογικού φαίνεται να συσχετίζονται με την καρκινική εξαλλαγή. Μελέτες κυττάρων σε καλλιέργεια (ινοβλάστες τρωκτικών) έδειξαν ότι εισαγωγή σε φυσιολογικά κύτταρα του μεταλλαγμένου T24 αλληλομόρφου του H-*ras*, μπορεί να προκαλέσει αθανатоποίηση των κυττάρων, ενώ εάν το T24 μεταφερθεί σε συνδυασμό με ενισχυτές της μεταγραφής ή με κάποιο ορμονικά επαγόμενο σύστημα παρουσία ορμόνης, προκαλεί πλήρη μεταλλαγή των κυττάρων σε καρκινικά (Spandidos and Wilkie, 1984, Spandidos, 1986, Egan et al, 1987). Επιπλέον, και το φυσιολογικό *ras* γονίδιο, όταν εισαχθεί σε ινοβλάστες με τη βοήθεια οχημάτων (vectors) που εξασφαλίζουν την υψηλή έκφρασή του, μπορεί να προκαλέσει αθανатоποίηση των κυττάρων (Spandidos and Wilkie, 1984), ενώ σε μικρότερα ποσά αποκαθιστά τον καρκινικό φαινότυπο που επάγεται από μεταλλαγμένα *ras* γονίδια, δρώντας σαν ογκοκατασταλτικό γονίδιο (Spandidos et al, 1990). Ακόμη, υπερέκφραση του H-*ras*

έχει σχετισθεί και με την ικανότητα καρκινικών κυττάρων για μετάσταση (Egan et al, 1987).

Μελέτες σε όγκους του ανθρώπου, σε επίπεδο RNA ή πρωτεΐνης, δεικνύουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των *ras* γονιδίων σε μια ποικιλία καρκινικών ιστών, σε σχέση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς. Έχει δειχθεί υπερπαραγωγή της p21 στους σπάνιους όγκους του λεπτού εντέρου σε ποσοστό 85% (Spandidos et al, 1993), σε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα σε ποσοστό 60% (Tiniakos et al, 1989), σε γαστρικά καρκινώματα (Bos et al, 1986) και σε όγκους του μαστού (Spandidos and Agnantis, 1984). Ακόμη, υπερέκφραση του γονιδίου *K-ras* έχει αναφερθεί σε υψηλό ποσοστό μη-μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (Lorenz et al, 1994) και υπερέκφραση του *H-ras* παρατηρήθηκε σε όγκους της κεφαλής και του τραχήλου (Sheng et al, 1990). Η υπερπαραγωγή της p21 έχει συσχετισθεί με διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, ωστόσο περισσότερη μελέτη απαιτείται για την εξαγωγή αναμφισβήτητων συμπερασμάτων.

Τα γονίδια *ras* μπορούν να δράσουν συνεργιστικά κατά την πολυσταδιακή διαδικασία της καρκινογένεσης με άλλα πρωτο-ογκογονίδια, όπως το *myc* (Spandidos and Lang, 1989), με προϊόντα ιών, για παράδειγμα με το αντιγόνο E1A του αδενοϊού (Marshall et al, 1991, Lin et al, 1995), με ορμόνες και με μεταλλαγμένα προϊόντα ογκο-κατασταλτικών γονιδίων. Έχει δειχθεί συνεργασία του T24 *H-ras* ογκογονιδίου με τα γλυκοκορτικοειδή στο μετασχηματισμό κυτταρικών σειρών κυττάρων μαστού (Marshall et al, 1991), καθώς και των μεταλλαγμένων *H-ras* και *K-ras* γονιδίων με τα οιστρογόνα, στην ανάπτυξη όγκων του μαστού στους αρουραίους (Kumar et al, 1990). Επιπλέον, μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης p53 συνεργάζονται με το *ras* στον κυτταρικό μετασχηματισμό (Hinds et al, 1989, 1990).

Η ταυτοποίηση των σημαντικότερων παραγόντων που συμμετέχουν στις οδούς μεταγωγής σήματος του *ras* ,πιθανά έχει σημαντική εφαρμογή στη διάγνωση και

θεραπεία του καρκίνου. Συνθετικά πεπτιδικά παράγωγα (πεπτιδομιμητικά) είναι δυνατόν να μπλοκάρουν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών της οδού μεταγωγής του *ras*, οι οποίες οδηγούν σε μη φυσιολογική ανάπτυξη και συμπεριφορά. Η πρόσφατη ένδειξη ότι τα συνθετικά παράγωγα που μιμούνται το Ras C-τελικό CAAX μοτίβο, είναι καταστολείς των κυττάρων που έχουν μετασχηματισθεί από το *ras*, δημιουργεί ελπίδες για μία τέτοια προσέγγιση (Brugge, 1993).

2.4 Ρύθμιση της έκφρασης του c-H-ras πρωτο-ογκογονιδίου

Με δεδομένο το ρόλο των γονιδίων *ras* στη διαβίβαση ενδοκυτταρικών μηνυμάτων κάτω από φυσιολογικές συνθήκες κυτταρικής αύξησης, καθώς και την εμπλοκή αυτών, μέσω μη ομαλών επιπέδων έκφρασης, σε πολλά είδη νεοπλασιών του ανθρώπου, γίνεται αντιληπτή η σπουδαιότητα της μελέτης της ρύθμισης της έκφρασής τους. Στη συνέχεια θα αναφερθούμε στη μεταγραφική ρύθμιση του H-*ras*, το οποίο είναι το καλύτερα μελετημένο μέλος της οικογένειας. Ως όρια του H-*ras* γονιδίου έχουν ορισθεί αυτά του BamHI τμήματος, το οποίο ανιχνεύθηκε κατά την υβριδοποίηση κατά Southern του DNA του γονιδιώματος του ανθρώπου με τον ιχνηθέτη ν-H-*ras* (1-6460) και η αρίθμηση αρχίζει από το BamHI άκρο (Caron et al, 1983).

2.4.1 Ρύθμιση από αλληλουχίες που ομοιάζουν με υποκινητή (promoter-like sequences)

Οι βιοχημικοί μηχανισμοί με τους οποίους η RNA πολυμεράση II ξεκινά τη μεταγραφή ενός ευκαρυωτικού γονιδίου δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί εντελώς (Alberts et al, 1989- Lewin, 1990- Watson et al, 1989). Οι DNA αλληλουχίες και οι πυρηνικοί παράγοντες που απαιτούνται για το σχηματισμό του συμπλόκου

έναρξης της μεταγραφής έχουν καθορισθεί με κάποιες λεπτομέρειες μόνο για μια κατηγορία γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτείνες, αυτή των γονιδίων που περιέχουν στοιχείο TATA (TATA box). Γενικά, ο απλούστερος υποκινητής περιλαμβάνει ένα στοιχείο TATA και ένα σημείο έναρξης της μεταγραφής (transcription start site), ή μόνο ένα TATA στοιχείο (Breathnach et al, 1981). Η μεταγραφή αρχίζει περίπου 30 ζεύγη βάσεων "δεξιά" (downstream) του στοιχείου TATA στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ενώ στους μύκητες δεν υπάρχει τέτοια καθορισμένη απόσταση. Είναι γνωστό ότι στο στοιχείο TATA προσδένεται η πρωτεΐνη TFIID (transcription factor IID), που είναι γενικός παράγοντας μεταγραφής (Dyhan et al, 1985). Ειδική μεταλλαξογένεση της TATA αλληλουχίας συνεπάγεται μείωση της συχνότητας έναρξης της μεταγραφής και συχνά ενεργοποίηση αυτής από ετερογενείς αλληλουχίες. Οι περιβάλλουσες το σημείο έναρξης της μεταγραφής αλληλουχίες σχηματίζουν μία ασθενή συναινετική αλληλουχία 5'-PyPyCAPyPyPyPyPy-3' (Py: Πυριμιδίνη), με τη μεταγραφή να αρχίζει στην Αδενίνη (Corden et al, 1980). Ωστόσο, τόσο σε ζύμες όσο και σε γονίδια ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών, η αλληλουχία του σημείου έναρξης της μεταγραφής δεν είναι σημαντική για την έκφραση του γονιδίου (Myers et al, 1986). Επιπροσθέτως, σε ποσοστό 15-20% των γονιδίων που έχουν εξετασθεί, έχουν βρεθεί δύο ακόμη περιοχές ομολογίας που αποτελούν θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνών (Von Hippel et al, 1984). Τα γονίδια αυτά έχουν στη θέση -75 ως προς το σημείο έναρξης της μεταγραφής την συναινετική αλληλουχία GG(T/C)CAATCT, η οποία είναι γνωστή σαν στοιχείο CAAT (CAAT box) και αποτελεί στοιχείο πρόσδεσης ειδικών παραγόντων μεταγραφής. Ακόμη, στη θέση -100 ως προς το σημείο έναρξης της μεταγραφής, υπάρχει η συναινετική αλληλουχία GGGCGG, η οποία συνιστά το στοιχείο GC (GC box) και αποτελεί θέση πρόσδεσης της Sp1 πρωτεΐνης (Stimulatory protein 1-Kadonaga et al, 1986).

Υπάρχει όμως και μια άλλη κατηγορία γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτείνες, αυτή των γονιδίων που δεν περιέχουν στοιχείο TATA. Οι υποκινητές των γονιδίων αυτών διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, σε αυτούς που είναι πλούσιοι σε βάσεις Γουανίνης και Κυτοσίνης (GC rich) και σε αυτούς που δεν έχουν στοιχείο TATA και δεν είναι GC πλούσιοι. Στους δεύτερους περιλαμβάνονται υποκινητές γονιδίων που ενεργοποιούνται μεταγραφικά σε συγκεκριμένα στάδια διαφοροποίησης του κυττάρου και χαρακτηρίζονται από ένα ή λίγα σημεία έναρξης της μεταγραφής, διατεταγμένα κοντά το ένα με το άλλο. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν για παράδειγμα τα ομοιοτικά γονίδια της Δροσόφιλας (*ultrabithorax*, *antennapedia*, *engrailed*), τα οποία εκφράζονται κατά τη διαφοροποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος των θηλαστικών, καθώς και το γονίδιο της δεοξυνουκλεοτιδικής τρανσφεράσης του ανθρώπου (Smale and Baltimore, 1989).

Σε ό,τι αφορά τους GC πλούσιους υποκινητές, αυτοί απαντώνται πρωταρχικά σε γονίδια που εκφράζονται συνεχώς, σε όλους τους ιστούς και δίνουν σταθερή ποσότητα μετάγραφου, τα λεγόμενα διατηρητέα (*housekeeping*) γονίδια, τα πρωτεϊνικά προϊόντα των οποίων είναι συνεχώς απαραίτητα σε συγκεκριμένες ποσότητες για την ομαλή κυτταρική λειτουργία (Sehgal et al, 1988). Επιπλέον, οι GC πλούσιοι υποκινητές έχουν αρκετά σημεία έναρξης της μεταγραφής, διασκορπισμένα σε σχετικά μεγάλη έκταση, και αρκετές πιθανές θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1. Το πρωτο-ογκογονίδιο *H-ras* που αποτελεί το αντικείμενο της παρούσας μελέτης, ανήκει στην κατηγορία των *housekeeping* γονιδίων και ο υποκινητής του έχει όλα τα χαρακτηριστικά των τυπικών GC πλούσιων υποκινητών που προαναφέραμε (Ishii et al, 1985).

Έχουν γίνει πολλές απόπειρες να καθορισθούν στοιχεία ρυθμιστικά της μεταγραφής του πρωτο-ογκογονιδίου *H-ras* του ανθρώπου και έχουν χρησιμοποιηθεί τεχνικές δημιουργίας τμημάτων του γονιδίου που φέρουν εσωτερικές ελλείψεις και χρησιμοποίηση αυτών σε δοκιμασίες CAT (CAT assays)

σε ποικιλία κυτταρικών σειρών, τεχνικές δημιουργίας σημειακών μεταλλαγών και πειράματα προστασίας του DNA από μεθυλιωτικούς παράγοντες και νουκλεάσες, με αποτελέσματα που διαφοροποιούνται μεταξύ τους.

Από τους Ishii et al (1986), ανιχνεύθηκαν έξι GC στοιχεία-θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης Sp1, με τα τρία πιο κοντινά στα σημεία έναρξης της μεταγραφής να είναι τα σημαντικότερα. Οι Honkawa et al (1987), προσδιόρισαν ως υποκινητή ένα τμήμα μήκους 51 ζευγών βάσεων, περιεκτικότητας 78% σε GC, το οποίο περιλαμβάνει ένα GC στοιχείο. Από τους Jones et al (1987) και τους Lowndes et al (1989), προσδιορίστηκαν ένα ισχυρό και ένα ασθενές στοιχείο CCAAT (CCAAT box), τα οποία αποτελούν θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα CTF ή NFI (CAAT Transcription Factor ή Nuclear Factor I). Δύο GC στοιχεία και το CCAAT στοιχείο προσδιορίζουν και οι Trimble and Hozumi (1987) ως στοιχεία απαραίτητα για υψηλά επίπεδα έκφρασης του *H-ras*. Επιπλέον, από τους Nagase et al (1990), ανιχνεύθηκε και ένα CACCC στοιχείο που συμμετέχει στην ενεργότητα του υποκινητή του *H-ras* γονιδίου. Επίσης, έχουν ανιχνευθεί αλληλουχίες πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 (Spandidos et al, 1988). Ακόμη, από τους Pintzas et al (1991), παρατηρήθηκε η ύπαρξη μιας επιπλέον GC αλληλουχίας στη θέση 680 του μεταλλαγμένου T24 *H-ras* γονιδίου, σε σχέση με το φυσιολογικό γονίδιο, η οποία θα μπορούσε να συνεισφέρει στην ερμηνεία των υψηλότερων επιπέδων έκφρασης του μεταλλαγμένου ως προς το φυσιολογικό υποκινητή του *H-ras*. Η πιο πρόσφατη βιβλιογραφική αναφορά (Lee and Keller, 1991) περιγράφει ακόμη ένα μη συναινετικό GC στοιχείο και ένα γειτονικό CCGGAA στοιχείο (θέση 280-300 του *H-ras*).

Γενικά, θεωρείται ότι ο υποκινητής του *H-ras* περιέχεται στο τμήμα που προκύπτει από πέψη του γονιδίου με την περιοριστική ενδονουκλεάση SstI (211-1054) και περιλαμβάνει το -I εξώνιο και τμήμα του πρώτου εσωνίου (Spandidos et

al, 1988). Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι ο υποκινητής του *H-ras* μπορεί να δρα και με τους δύο προσανατολισμούς (Lowndes et al, 1989).

Τέλος, σε ό,τι αφορά τον αριθμό και τη θέση των σημείων έναρξης της μεταγραφής, υπάρχουν αποκλίσεις στα πειραματικά αποτελέσματα, με την κύρια ομάδα (cluster) σημείων έναρξης της μεταγραφής να ευρίσκονται στη θέση 447 του γονιδίου, κατά τους Lee and Keller (1991).

2.4.2 Ρύθμιση από αλληλουχίες που ευρίσκονται στο πρώτο εσώνιο του *H-ras* γονιδίου

Είναι γνωστός ο γενικός ρόλος των εσώνιων, ως μηχανισμού που προσδίδει στο γονιδίωμα σταθερότητα από μετατοπίσεις (translocations) και προστασία από μεταλλάξεις που αλλάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης (reading frame, Lewin, 1990). Ακόμη, αρκετά συχνά αλληλουχίες-ενισχυτές της μεταγραφής ευρίσκονται σε εσώνια γονιδίων (Slater et al, 1985).

Το πρώτο εσώνιο του γονιδίου *H-ras*, περιλαμβάνει μια υψηλά συντηρημένη στον άνθρωπο και τα τρωκτικά αλληλουχία (Hashimoto-Gotoh et al, 1992). Επιπλέον, περιέχει αλληλουχίες "θετικές" και "αρνητικές", που ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, πιθανά στα στάδια της ωρίμανσης του m-RNA και της μετάφρασης (Hashimoto-Gotoh et al, 1988).

2.4.3 Ρύθμιση από διαδοχικές πολλαπλά επαναλαμβανόμενες μεταβλητές αλληλουχίες (Variable Tandem Repeats, VTR), στο 3' άκρο του γονιδίου

Το μικροδορυφορικό DNA (VTR), είναι πολυμορφική δομή που χαρακτηρίζεται από διαδοχικές επαναλείψεις μικρών αλληλουχιών (14-100 ζεύγη βάσεων), διασκορπισμένων στο γονιδίωμα των ανώτερων σπονδυλωτών (Watson et al, 1989-Lewin, 1990). Ανάλογα επαναλαμβανόμενα στοιχεία παρατηρούνται σε ιούς,

για παράδειγμα του Epstein-Barr, και χρησιμεύουν στην πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων για ενίσχυση της μεταγραφής.

Το VTR του *H-ras* γονιδίου ευρίσκεται 1kb δεξιά του σημείου πολυαδενυλίωσης και αποτελείται από 30-100 αντίγραφα μιας συναινετικής αλληλουχίας μήκους 28 ζευγών βάσεων (Caron et al, 1983). Αποδείχθηκε ότι το VTR του *H-ras* έχει ιδιότητες ενισχυτή της μεταγραφής οι οποίες είναι ανεξάρτητες της θέσης και του προσανατολισμού του (Cohen et al, 1987-Spandidos and Holmes, 1987). Αντίθετα όμως με τους κλασσικούς ενισχυτές, η δράση του φαίνεται να εξαρτάται από το είδος του υποκινητή, δεδομένου ότι ενισχύει τη μεταγραφή από τον υποκινητή του *H-ras* και της ϵ -σφαιρίνης (Cohen et al, 1987-Spandidos and Holmes, 1987), όχι όμως και από αυτόν της κινάσης της θυμιδίνης του ιού HSV (Cohen et al, 1987). Η δράση του VTR του *H-ras* φαίνεται να επιτυγχάνεται μέσω πρόσδεσης στην 28 bp επαναλαμβανόμενη αλληλουχία μελών της οικογένειας των *rel/NF-κB* πρωτεϊνών (Trepicchio and Krontiris, 1992).

2.4.4 Μεθυλίωση της 5' περιοχής του *H-ras* ογκογονιδίου

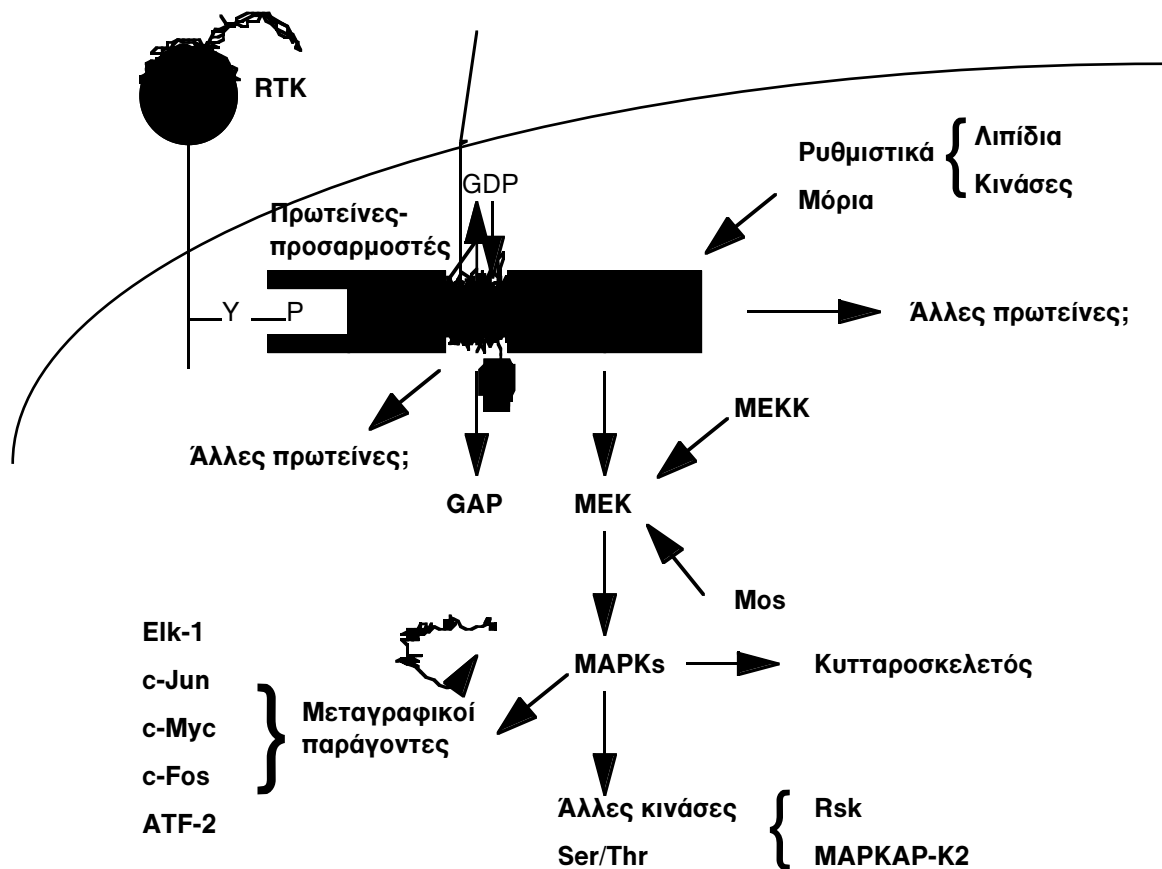
Γενικά, η υπομεθυλίωση του DNA φαίνεται να είναι αναγκαία αλλά όχι ικανή συνθήκη για τη γονιδιακή έκφραση. Η μεθυλίωση συγκεκριμένων βάσεων Κυτοσίνης (5^{m}C G) σε αλληλουχίες υποκινητή ή ενισχυτή του γονιδίου δρα ανασταλτικά στη μεταγραφή, είτε άμεσα, για παράδειγμα εμποδίζοντας την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα AP-2 (Comb and Goodman, 1990), είτε έμμεσα, μέσω πρόσδεσης της πρωτεΐνης MDBP (Methylated DNA Binding Protein), η οποία αναγνωρίζει το μεθυλιωμένο DNA και παρεμποδίζει στερεοχημικά την πρόσδεση άλλων παραγόντων (Boyes and Bird, 1991).

Τέλος, στην περίπτωση του *H-ras* γονιδίου, έχει δειχθεί ότι η μεθυλίωση προκαλεί ελάττωση της έκφρασής και του ογκογόνου δυναμικού του (Borrello et al, 1987-Counts and Goodmann, 1993).

2.5 Ο ρόλος της p21 στη διαβίβαση ενδοκυτταρικών μηνυμάτων

Η πρωτεΐνη p21 συμμετέχει στη διαβίβαση μηνυμάτων που προέρχονται από υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης (receptor tyrosine kinases, RTKs) και παίζει πρωτεύοντα ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Abdellatif et al, 1994, Winston et al, 1996, Gillies McKenna et al, 1996), ανήκει δε στην κατηγορία των G πρωτεϊνών.

Το μονοπάτι διαβίβασης μηνυμάτων στο οποίο μετέχει η p21, έχει σε γενικές γραμμές περιγραφεί (Avruch et al, 1994, Marshall MS, 1995, Macara et al, 1996). Το εξωκυτταρικό ερέθισμα, για παράδειγμα ένας αυξητικός παράγοντας ή μια πεπτιδική ορμόνη, προσδέεται στο εξωκυτταρικό τμήμα του διαμεμβρανικού υποδοχέα RTK και ενεργοποιεί αλλοστερικά το ενδοκυτταρικό του τμήμα, το οποίο εμφανίζει δράση κινάσης και φωσφορυλιώνει ένα κατάλοιπο τυροσίνης του υποδοχέα. Αποτέλεσμα της αυτοφωσφορυλίωσης είναι η αλληλεπίδραση του υποδοχέα, μέσω πρωτεϊνών "προσαρμοστών" (adaptors) με την p21. Η p21, η οποία έχει προσδεμένο ADP, ανταλλάσσει ADP με ATP και αλληλεπιδρώντας με τη ρυθμιστική υπομονάδα (CR-1) της κινάσης Raf-1 ενεργοποιεί ένα καταρράκτη κινασών Σερίνης-Θρεονίνης. Ακολούθως, λόγω της ενδογενούς ιδιότητας GTPάσης που έχει η p21, το ATP υδρολύεται σε ADP και η p21 ανενεργοποιείται. Η Raf-1 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την MEK (mitogen extracellular kinase), αυτή φωσφορυλιώνει τις p42/p44 MAPKs (mitogen-activated protein kinases) οι οποίες ακολούθως δρουν σε μια πληθώρα στόχων (Abdellatif et al, 1994), ανάμεσα στους οποίους περιλαμβάνονται και προϊόντα άλλων πρωτο-ογκογονιδίων (Εικ. 2.2).



Εικ. 2.2: Πρότυπο για τη μεταγωγή μηνυμάτων από υποδοχέα κινάσης τυροσίνης μέσω του καταρράκτη κινασών της Ras πρωτεΐνης. Ενεργοποίηση του RTK οδηγεί σε φωσφορυλίωση ενός κατάλοιπου Τυροσίνης (Y) και μέσω πρωτεϊνών-προσαρμοστών σε ανάκτηση της Ras στο σύμπλοκο. Ακολούθως, η Ras ενεργοποιεί την Raf-1 κινάση και ξεκινά έναν καταρράκτη κινασών που διαδίδουν το μήνυμα στο εσωτερικό του κυττάρου.

Χάρη στην ύπαρξη αυτού του καταρράκτη κινασών αυξάνεται ο αριθμός των σταδίων στα οποία και άλλα μόρια-ρυθμιστές μπορούν να επέμβουν επιτυγχάνοντας ακριβέστερη ρύθμιση της όλης διαδικασίας. Επιπλέον, ο

καταρράκτης κινασών αυξάνει τον αριθμό των κατευθύνσεων στις οποίες μπορεί να διοχετευθεί το μιτωτικό σήμα, έτσι ώστε να υπάρχει ταυτόχρονος έλεγχος όλων των συστημάτων που συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση και να εξασφαλίζεται ότι όλα τα συστήματα λειτουργούν σωστά πριν το τελικό "εντάξει" για τη μιτωτική διαδικασία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

3.1 Εισαγωγή

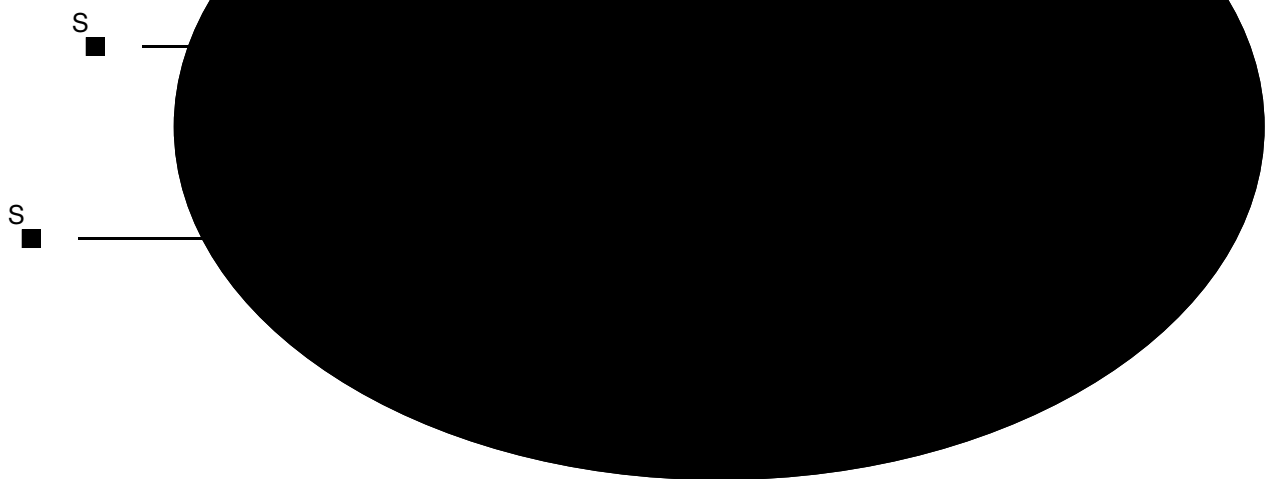
Η υπεροικογένεια των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων περιλαμβάνει τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών, δηλαδή τους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptor, GR), των οιστρογόνων (estrogen receptor, ER), των ανδρογόνων (AR), της προγεστερόνης (PR) και των αλατοκορτικοειδών (MR). Ακόμη, περιλαμβάνει τους υποδοχείς της θυροειδούς ορμόνης (TR), της βιταμίνης D (VDR), του ρετινοϊκού οξέος (RAR), του 9-cis ρετινοϊκού οξέος (RXR), της εκδυσόνης (EcR) και μια πληθώρα άλλων των οποίων ο συνδέτης (ligand)-ορμόνη δεν είναι γνωστός και ονομάζονται "ορφανοί" (orphan receptors, Mangelsdorf et al, 1995, Tsai et al, 1994). Ακόμη, έχουν ανιχνευθεί και ισομορφές των TR, RAR, RXR, ER, PR και EcR.

Στο παρόν κεφάλαιο η περιγραφή θα εστιαστεί στους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών και ιδιαίτερα στους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών και των οιστρογόνων.

3.2 Γενικός μηχανισμός δράσης των στεροειδών ορμονών

Οι στεροειδείς ορμόνες συντίθενται και εκκρίνονται από κύτταρα ενδοκρινών αδένων. Μέσω της κυκλοφορίας του αίματος φτάνουν στα κύτταρα-στόχους, εισέρχονται σε αυτά με απλή ή διευκολυνόμενη διάχυση και προσδένονται με ειδικότητα στον αντίστοιχο υποδοχέα (Εικόνα 3.1). Οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών είναι ενδοκυτταρικοί ορμονοεξαρτώμενοι μεταγραφικοί παράγοντες που ευρίσκονται σε μη ενεργή μορφή στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα. Μετά την

πρόσδεση της ορμόνης, οι υποδοχείς ενεργοποιούνται, μεταφέρονται στο πυρήνα, προσδένονται ειδικά σε συγκεκριμένες γονιδιακές DNA αλληλουχίες που ονομάζονται "στοιχεία αποκρινόμενα σε ορμόνη" (response elements-HREs) και ενεργοποιούν μεταγραφικά τα αντιστοιχούμενα γονίδια (Schorf et al, 1995, Beato et al, 1995, Beato M, 1989, Tsai et al, 1995).



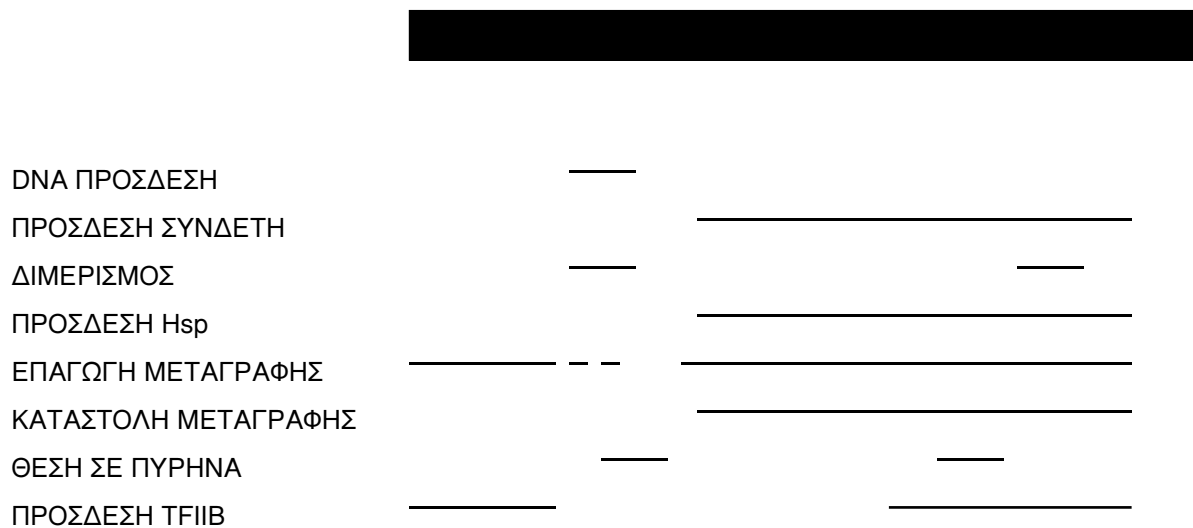
Εικ.3.1: Απλοποιημένο πρότυπο του μηχανισμού δράσης των στεροειδών ορμονών. S: στεροειδής ορμόνη, R_c: υποδοχέας στεροειδούς ορμόνης, HRE: στοιχείο αποκρινόμενο σε ορμόνη.

Ακολούθως θα αναφερθούν λεπτομέρειες σχετικά με την αλληλεπίδραση του υποδοχέα των στεροειδών με το DNA, με το μηχανισμό δράσης των υποδοχέων

στην ενεργοποίηση αλλά και καταστολή γονιδίων-στόχων και με την εμπλοκή αυτών στην καρκινογένεση.

3.3 Δομή του υποδοχέα των στεροειδών ορμονών

Οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών δομούνται από λειτουργικές περιοχές (domains), όπως σχηματικά παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.2 (Tsai et al, 1994).



Εικ. 3.2: Λειτουργικές περιοχές (domains) του υποδοχέα των στεροειδών ορμονών. Διακρίνεται στις λειτουργικές περιοχές A-F και η λειτουργία κάθε περιοχής απεικονίζεται με μία γραμμή.

Η N-τελική A/ B λειτουργική περιοχή, είναι υψηλά μεταβλητή σε μήκος και αλληλουχία. Σε αυτή εντοπίζεται η λειτουργία του υποδοχέα να επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (Miesfeld 1989, Burnstein and Cidlowski 1989)

(περιοχή τ1), ενώ η ιδιότητα αυτή εντοπίζεται και σε τμήμα (τ2) της E περιοχής (Hollenberg et al 1987, Hollenberg and Evans 1988). Στην τ1 οφείλεται η ικανότητα του υποδοχέα να ενεργοποιείται και από μη ορμονικά ερεθίσματα (Beato et al, 1995). Η A/ B περιοχή αναγνωρίζεται από τα περισσότερα αντισώματα.

Η περιοχή C, περιέχει δύο δάκτυλους ψευδαργύρου (zinc fingers), οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την πρόσδεση του υποδοχέα στο DNA και τον διμερισμό. Είναι ιδιαίτερα συντηρημένη (Caderond 1992, Evans 1988) και περιέχει εννέα κυστεΐνες τέλεια συντηρημένες, οι οποίες σχηματίζουν δύο δάκτυλους ψευδαργύρου, κάθε ένας από τους οποίους αποτελείται από 12-13 αμινοξέα και διαχωρίζεται από τον άλλο με συνδετική περιοχή 13-15 αμινοξέων (Beato et al, 1995). Τμήμα της που αποκαλείται κουτί P (P-box), συνεπικουρούμενο από τον πρώτο δάκτυλο ψευδαργύρου, αναγνωρίζει ειδικά τις βάσεις μέσα στη μεγάλη αύλακα του DNA, με τις οποίες θα αλληλεπιδράσει ο GR. Ο δεύτερος δάκτυλος συμμετέχει, αφενός στη δημιουργία μιας α-έλικας κατά μήκος του άξονα του DNA, αφετέρου στην οργάνωση του κουτιού D (D-box), που είναι υπεύθυνο, μερικώς, για το διμερισμό του υποδοχέα (Beato et al 1995).

Δεξιότερα της C ευρίσκεται μια μεταβλητή συνδετική περιοχή, η D, η οποία επιτρέπει στην πρωτεΐνη να αλλάζει στερεοδιάταξη και περιέχει τη λειτουργική περιοχή που δίνει το "σήμα" για εντοπισμό του υποδοχέα στον πυρήνα (GR, PR), (Caderond et al, 1992).

Η περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη (ligand binding domain, LBD ή E) είναι λειτουργικά πολύπλοκη και υψηλά συντηρημένη, αν και όχι τόσο όσο η περιοχή C (Miesfeld, 1989). Περιλαμβάνει περιοχές απαραίτητες για σύνδεση του υποδοχέα με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins), για διμερισμό, για ορμονοεξαρτώμενη επαγωγή της μεταγραφής και για καταστολή της μεταγραφής. Ακόμη, περιέχει το σήμα για μεταφορά του υποδοχέα στον πυρήνα

και τη λειτουργική περιοχή στην οποία προσδένεται η ορμόνη (Webster et al, 1988, Beato et al, 1995, Beato M, 1989, Tsai et al, 1994). Αν και οι περισσότερες από τις δραστηριότητες αυτές απαιτούν μόνο μικρές περιοχές της πρωτεΐνης, η λειτουργική περιοχή πρόσδεσης της ορμόνης απαιτεί όλη σχεδόν την περιοχή E, όπως δείχθηκε με πειράματα μεταλλαξογένεσης (Evans 1988, Miesfeld 1989). Η κύρια περιοχή διμερισμού ευρίσκεται στο C-τελικό άκρο της E και περιλαμβάνει αλληλουχίες πλούσιες σε Λευκίνη, ικανές να σχηματίσουν "φερμουάρ" Λευκίνης κατά τον διμερισμό του υποδοχέα (Fawell et al, 1990).

Τέλος, στο C-τελικό άκρο ορισμένων υποδοχέων (ER), ευρίσκεται μια μεταβλητή περιοχή F της οποίας ο λειτουργικός ρόλος δεν έχει προσδιοριστεί (Tsai et al, 1994).

3.4 Ενεργοποίηση του υποδοχέα των στεροειδών ορμονών

Οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών όταν δεν είναι συνδεδεμένοι με την ορμόνη, εντοπίζονται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα, με εξαίρεση τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που πρωταρχικά εντοπίζεται στον πυρήνα (Brink et al, 1992).

Σε αντίθεση με τους υπόλοιπους πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών, όλοι οι μη συνδεδεμένοι με ορμόνη υποδοχείς στεροειδών ορμονών είναι ενωμένοι σε ένα σύμπλεγμα 8-10S (300-400kDa) με πρωτεΐνες θερμικού σοκ, οι οποίες διατηρούν τους υποδοχείς σε ανενεργή αλλά "φιλική" προς την ορμόνη μορφή (Bohen et al, 1993, Pratt, 1993, Pratt et al, 1992). Η περισσότερο μελετημένη από αυτές είναι η φωσφοπρωτεΐνη hsp90, η οποία είναι ιδιαίτερα συντηρημένη, υπάρχει σε αφθονία στο κύτταρο και συνδέεται ως διμερές στην E περιοχή του υποδοχέα. Ακόμη, στο σύμπλεγμα με τον υποδοχέα συμμετέχουν και οι hsp70, hsp56 και η p23.

Η πρόσδεση του στεροειδούς στον υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα αλλαγή της στερεοδομής στη λειτουργική περιοχή E, απομάκρυνση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ και αποκάλυψη της λειτουργικής περιοχής του υποδοχέα που είναι υπεύθυνη για το διμερισμό (Tsai et al, 1994). Υπάρχουν ακόμη ενδείξεις για φωσφορυλίωση του μορίου (Miller-Diener 1985). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι απομάκρυνση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ απουσία στεροειδούς, με θέρμανση ή με αύξηση της ιοντικής ισχύος, δεν είναι αρκετή για την ενεργοποίηση ορισμένων υποδοχέων (PR), (Bagchi et al, 1991), πιθανόν λόγω του ότι δεν επάγεται η κατάλληλη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα, η οποία θα επιτρέψει το διμερισμό και τη μεταφορά του στον πυρήνα. Γενικά, πιστεύεται ότι οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών προσδένονται στο DNA και δρουν ως διμερή, αν και έχει δείχθει ότι ο υποδοχέας των οιστρογόνων μπορεί να δράσει και ως μονομερές (Glass, 1994).

Τέλος, το διμερές του υποδοχέα μεταφέρεται στον πυρήνα με έναν μηχανισμό που δε φαίνεται να περιλαμβάνει στοιχεία του κυτταροσκελετού (Akner et al 1995) και προσδένεται στο DNA του γονιδίου-στόχος.

3.5 Αλληλεπιδράσεις του υποδοχέα των στεροειδών με το DNA

Μοναδική για τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών είναι η ιδιότητα τους να προσδένονται σε παλίνδρομες DNA αλληλουχίες (HREs). Οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών, των αλατοκορτικοειδών, της προγεστερόνης και των ανδρογόνων αναγνωρίζουν την αλληλουχία 5'-GGTACANNNTGTTCT-3', ενώ ο υποδοχέας των οιστρογόνων την 5'-AGGTCANNNTGACCT-3', η οποία ταυτίζεται με αυτή που αναγνωρίζουν μη στεροειδείς πυρηνικοί υποδοχείς (Boulicas, 1994). Με έντονα γράμματα εικονίζονται τα υψηλά συντηρημένα νουκλεοτίδια (Tsai et al, 1994, Beato et al, 1995).

Είναι φανερό ότι δημιουργείται πρόβλημα ειδικότητας, λόγω του ότι πολλοί υποδοχείς αναγνωρίζουν την ίδια συναινετική αλληλουχία. Πιστεύεται ότι κυτταροειδικές συνθήκες, όπως η ύπαρξη μεταγραφικών παραγόντων που ενεργοποιούν την πρόσδεση του ορμονικού υποδοχέα στο DNA μέσω αναδιάταξης της χρωματίνης, ώστε να είναι προσιτό το HRE στον υποδοχέα, επηρεάζουν την αναγνώριση του HRE από τον κατάλληλο υποδοχέα (Yoshinaga et al, 1992, Bruggemeler et al, 1991). Επίσης, υπάρχουν συγκεκριμένες βάσεις στα σημεία όπου συνδέονται οι υποδοχείς, αλλαγές των οποίων επηρεάζουν την πρόσδεσή τους (Vedeckis, 1992). Τέλος, και άλλοι παράγοντες όπως η ιστοειδικότητα στην παρουσία των υποδοχέων (Vedeckis, 1992), αλληλουχίες που περιβάλλουν τα HREs (Lucas and Granner, 1992), κ.λπ., πιθανά διαδραματίζουν κάποιο ρόλο.

3.6 Ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων

Η ενεργοποίηση της μεταγραφής μέσω πρόσδεσης στο DNA οφείλεται στη διευκόλυνση της συγκέντρωσης στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου μεταγραφικών παραγόντων που ευρίσκονται σε περιοριστικές ποσότητες στο κύτταρο, καθώς και στη σταθεροποίηση του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής, μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με την A/ B περιοχή του υποδοχέα (Halachmi et al, 1994, McEwan et al, 1993). Επιπλέον, ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών συνεργάζεται με τα ομοδιμερή της Jun πρωτεΐνης για την ενεργοποίηση υποκινητών που ρυθμίζονται από τον AP-1 μεταγραφικό παράγοντα (Teurich et al, 1995). Μεταγραφική ενεργοποίηση από στεροειδή μπορεί να γίνει ακόμα και από στοιχεία που ευρίσκονται αρκετά kb μακριά από την περιοχή του υποκινητή του γονιδίου (Jantzen et al, 1987, Schatt et al, 1990), και σε

αλληλουχίες εσωνίων (γονίδιο της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης, Slater et al, 1985).

Έχουν παρατηρηθεί πολλαπλά HREs, χωρίς ωστόσο ο μηχανισμός δράσης τους να είναι όμοιος. Για παράδειγμα, στην περίπτωση της αμινοτρανσφεράσης της τυροσίνης (TAT), τα δύο GREs δρουν συνεργιστικά (Jantzen et al 1987), ενώ σε ό,τι αφορά την οξυγενάση της τυροσίνης, τα δύο GREs έχουν ανεξάρτητη, αθροιστική αλλά όχι ισότιμη δράση (Danesch et al 1987). Επιπλέον, έχουν δειχθεί ρυθμιστικές αλληλουχίες που πιθανά δρουν συνεργιστικά με HREs, όπως η αλληλουχία CACCC (Lucas et al, 1992).

Θετική ρύθμιση από στεροειδή έχει δειχθεί για πολλά κυτταρικά γονίδια (Karin et al, 1984, Fan et al, 1992, Renkawitz et al, 1984, Slater et al, 1985, Jantzen et al, 1987, Schatt et al, 1990), για ρυθμιστικές περιοχές ιικών γονιδίων (Payvar et al, 1983, Spandidos et al, 1990b, Buetti et al, 1986, Ghosh, 1992) καθώς και για τα πρωτο-ογκογονίδια που κωδικοποιούν πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* (Musgrove et al, 1994, Gordeladzer et al, 1994, Hyder et al, 1994). Στην παρούσα μελέτη δεικνύεται ρύθμιση από στεροειδή και του *H-ras* πρωτο-ογκογονιδίου (Zachos et al, 1995, Zachos et al, 1996a).

3.7 Αρνητική ρύθμιση γονιδίων από στεροειδή

Οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών είναι επίσης ικανοί καταστολείς της γονιδιακής έκφρασης. Η καταστολή οφείλεται, είτε σε συναγωνισμό για θέση πρόσδεσης στο DNA, είτε σε συναγωνισμό για συμπαράγοντες, είτε σε εγκλωβισμό μεταγραφικών παραγόντων σε ανενεργές μεταγραφικά μορφές (Beato et al, 1995). Ο τελευταίος μηχανισμός έχει παρατηρηθεί στις αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών με τους μεταγραφικούς παράγοντες AP-1 (Konig et al, 1992, Saatcioglu et al, 1994), NFκ-B

(Stein et al, 1995, Scheinman et al, 1995) και GATA-1 (Blobel et al, 1995). Η αναστολή της μεταγραφής φαίνεται να είναι ορμονοεξαρτώμενη, δεν απαιτεί πρωτεϊνοσύνθεση και γίνεται μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών καταστέλλει τη δράση των ετεροδιμερών Fos-Jun (Teurich et al, 1995, Beato et al, 1995), γεγονός που υποδηλώνει ότι αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση του μορίου είναι υπεύθυνες για τη διπλή δράση των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών, ως επαγωγείς αλλά και καταστολείς της μεταγραφής. Το φαινόμενο ισχύει και αντίστροφα, δηλαδή ο AP-1 (Fos-Jun) μεταγραφικός παράγοντας εμποδίζει τη μεταγραφή γονιδίων αποκρινόμενων σε γλυκοκορτικοειδή, μέσω αλληλεπίδρασης με τον GR (Saatcioglu et al, 1994). Δείχθηκε ακόμη η ύπαρξη "ορφανών" υποδοχέων, οι οποίοι δεν προσδένονται στο DNA, και αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος και της ορμόνης του θυρεοειδούς, εμποδίζοντας τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων από αυτούς (Seol et al, 1996).

Επιπλέον, έχουν περιγραφεί αρνητικά HREs, τα οποία καταστέλλουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων μέσω ειδικής πρόσδεσης του υποδοχέα στο DNA, ωστόσο τα αποτελέσματα δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητά (Heck et al, 1994, Ponta et al, 1992).

3.8 Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την ενεργότητα του υποδοχέα

Υπάρχουν και κάποιοι άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την ενεργότητα του υποδοχέα, όπως η φωσφορυλίωση, η οποία γίνεται κυρίως μετά την πρόσδεση του μορίου στο DNA (Tsai et al, 1994). Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ενεργοποίηση του υποδοχέα από άλλα μόρια εκτός του συνδέτη, τα οποία δρουν μέσω οδών φωσφορυλίωσης, όπως η ντοπαμίνη για τον ER του ανθρώπου (Tsai et al, 1994).

3.9 Στεροειδή και γυναικολογικός καρκίνος

Γενικά, τα στεροειδή θεωρούνται προαγωγοί της καρκινογένεσης (Sekeris, 1991). Οι ορμόνες του φύλου, τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη, φαίνεται να εμπλέκονται άμεσα στην αιτιολογία του γυναικολογικού καρκίνου και υψηλά επίπεδα οιστρογόνων σε συνδυασμό με χαμηλά επίπεδα προγεστερόνης, συνδέονται με αυξημένη πιθανότητα καρκίνου του ενδομητρίου και της ωοθήκης (Deslypere et al, 1995, Lauritzen, 1994). Τα οιστρογόνα δημιουργούν ένα περιβάλλον διέγερσης της κυτταρικής αύξησης και διαίρεσης στα όργανα-στόχους, φαινόμενα που συναρτώνται με το μέγεθος και τη διάρκεια της χορηγούμενης δόσης των στεροειδών. Θεωρείται πιθανό οι μεταλλάξεις των γονιδίων *ras* να οφείλονται σε ορμονική μεταλλαξογένεση, δηλαδή, λόγω του ότι ο κυκλικός πολλαπλασιασμός των κυττάρων είναι χαρακτηριστικό φαινόμενο του ενδομητρίου των θηλαστικών, η δημιουργία τυχαίων αλλοιώσεων του DNA δύναται ευκολότερα να μετατραπεί σε μόνιμη μετάλλαξη. Τα οιστρογόνα μπορούν με αυτόν τον τρόπο να διεγείρουν την ογκογένεση, αυξάνοντας το δυναμικό πολλαπλασιασμού του ιστού του ενδομητρίου. Αντίθετα, περιοδική χορήγηση προγεστερόνης επάγει τη διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μέσω μείωσης των επιπέδων των υποδοχέων των οιστρογόνων, μετατροπής της οιστραδιόλης σε οιστρόνη, μείωσης του ενδοκυτταρικού μεταβολισμού και ελάττωσης της αγγειακής διαπερατότητας στα όργανα-στόχους. Αντίστοιχη εμφανίζεται η δράση των στεροειδών ορμονών και στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού.

Τα επίπεδα των στεροειδών ορμονών επηρεάζουν τους ρυθμούς θεραπείας και την επιβίωση γυναικών με νεοπλασίες του γεννητικού συστήματος (Geisler et al, 1995, Nyholm et al, 1995, Morris et al, 1995). Επίσης, γυναίκες που για την ανακούφιση των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης παίρνουν οιστρογόνα, έχουν υψηλό κίνδυνο να εμφανίσουν καρκίνο του ενδομητρίου και της ωοθήκης, εάν δεν

λαμβάνουν σύγχρονα και προγεστερόνη για "αντιστάθμισμα" (Palacios, 1994, Grandy, 1995, Breckwoldt, 1995).

Επιπλέον, υπάρχει συσχετισμός μεταξύ επιπέδων ορμονικών υποδοχέων και πρόγνωσης της ασθένειας (Nyholm et al, 1995, Morris et al, 1995), χωρίς όμως να υπάρχει κάποιο σαφές συμπέρασμα, όπως για τον καρκίνο του μαστού όπου υψηλά επίπεδα ορμονικών υποδοχέων σχετίζονται με καλή πρόγνωση (Schwartz, 1994, Esteban et al, 1994, Taylor, 1996). Φαίνεται ωστόσο να υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στα αυξημένα επίπεδα υποδοχέων στεροειδών ορμονών και την καρκινική εξαλλαγή, σε όγκους του ενδομητρίου (Nyholm et al, 1995, Zachos et al, 1996a, b) και της ωοθήκης (Zachos et al, 1996a,b).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ P53

4.1 Εισαγωγή

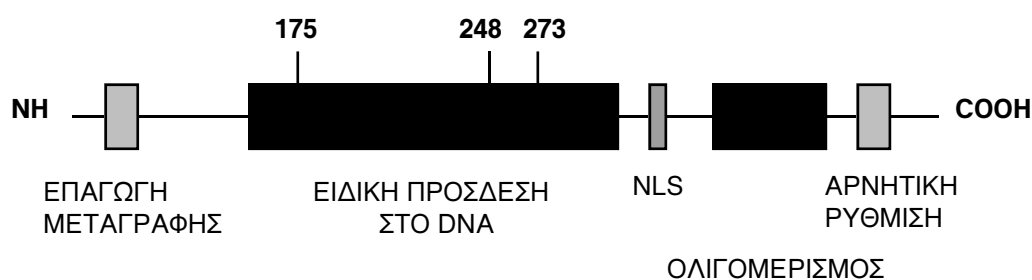
Το ογκο-κατασταλτικό γονίδιο p53, είναι το γονίδιο που "ενοχοποιείται" συχνότερα σε όγκους του ανθρώπου (Harris, 1993, Friend, 1994, Bargonetti et al, 1991, Kern et al, 1991). Ευρίσκεται στο 17q13 χρωμόσωμα και κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη 393 αμινοξικών καταλοίπων και μοριακού βάρους 53 kb. Η πρωτεΐνη P53, δρα ως παράγοντας μεταγραφής, ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων απαραίτητων για την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση, την επιδιόρθωση του DNA μετά από βλάβες και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση), με κύριο στόχο δράσης της την καταστολή της ογκογένεσης που προκαλείται από γενοτοξικούς παράγοντες (χημικά, ακτινοβολίες, κ.λπ.). Οι δραστηριότητες αυτές πραγματώνονται από τη μη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη, μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες και πρόσδεσης σε ειδικές αλληλουχίες γονιδίων. Οι μηχανισμοί απενεργοποίησης της P53 πρωτεΐνης κατά την καρκινογένεση περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου, απενεργοποίηση της πρωτεΐνης από ιικά και κυτταρικά προϊόντα, διαταραχές στη θέση της μέσα στο κύτταρο και αναστολή από κυτταρικά ρυθμιστικά μόρια (Donehower and Bradley, 1993, Levine et al, 1994, Rotter et al, 1994, Wyllie, 1995, Zambetti and Levine, 1993, Hainaut, 1995).

4.2 Δομή και βασικές βιοχημικές ιδιότητες της "φυσικού τύπου" και της μεταλλαγμένης P53 πρωτεΐνης

4.2.1 Δομή της πρωτεΐνης P53

Η πρωτεΐνη P53 απαρτίζεται από 4 λειτουργικές περιοχές, οι οποίες περιλαμβάνουν:

1. μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής, στο όξινο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (Sang et al, 1994), 2. μια περιοχή ειδικής πρόσδεσης στο DNA (αμινοξέα 102-290), υψηλά συντηρημένη, με την οποία η πρωτεΐνη δένεται στο DNA γονιδίων (Pavletish et al, 1993, Bargonetti et al, 1993), 3. μια περιοχή ολιγομερισμού (αμινοξέα 319-360), υπεύθυνη για το σχηματισμό τετραμερών P53 (Clore et al, 1994), και 4. μια βασική περιοχή στο καρβόξυ-τελικό άκρο, που πιθανά έχει αρνητικές ρυθμιστικές λειτουργίες (για παράδειγμα εμποδίζει την πρόσδεση της πρωτεΐνης στο DNA, Hupp et al, 1993). Στην Εικόνα 4.1 φαίνεται η δομή της P53 πρωτεΐνης, καθώς και τρία από τα συχνότερα μεταλλαγμένα κωδικόνια σε όγκους του ανθρώπου (Zambetti and Levine, 1993, Levine et al, 1994).



Εικ. 4.1: Δομή της πρωτεΐνης P53. Απεικονίζονται οι λειτουργικές περιοχές που είναι υπεύθυνες για την επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων, την ειδική πρόσδεση στο DNA, τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στον πυρήνα (Nuclear Localization Signal, NLS), τον ολιγομερισμό και

την αρνητική ρύθμιση της πρόσδεσης στο DNA. Στα κωδικόνια 175, 248 και 273 εντοπίζεται το 6.1%, 9.6% και 8.8% των μεταλλάξεων που οδηγούν σε ογκογένεση στο άνθρωπο.

Η κρυσταλλική δομή της περιοχής πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο DNA έχει λυθεί (Cho et al, 1994). Η περιοχή αυτή συνίσταται από ένα "σκελετό" από δύο αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, πάνω στον οποίο ευρίσκεται η επιφάνεια πρόσδεσης στο DNA. Αυτή περιλαμβάνει δύο φουρκέττες (loops) τις L2, L3, οι οποίες συγκρατούνται από ένα άτομο ψευδαργύρου και μία δομή φουρκέττα-β-πτυχωτή επιφάνεια-α-έλικα, πλευρικά του "σκελετού". Η L3 αλληλεπιδρά με τη μεγάλη κοιλότητα του DNA (major groove) και περιλαμβάνει την Arg248. Η δομή φουρκέττα-β-πτυχωτή επιφάνεια-α-έλικα αλληλεπιδρά με τη μικρή αύλακα του DNA (minor groove) και περιλαμβάνει την Arg 273, ενώ η Arg 175 ευρίσκεται στην L2, που έχει δομικό ρόλο. Συνεπώς, μεταλλάξεις στα κωδικόνια 248 και 273 επηρεάζουν άμεσα την ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο DNA, ενώ μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 175 επηρεάζουν την ικανότητά της να προσδέεται στο DNA μέσω αλλαγής της στερεοδομής του μορίου (Arrowsmith and Morin, 1996).

4.2.2 Βασικές βιοχημικές ιδιότητες της πρωτεΐνης P53

Γενικά, η "φυσικού τύπου", μη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη P53, έχει πολύ μικρό χρόνο ημίσειας ζωής, περίπου 30min (Gronostajski et al, 1984), εμποδίζει την αύξηση καρκινικών κυττάρων σε καλλιέργεια (Mercer et al, 1991, Chen et al, 1990, Martinez et al, 1991), εμποδίζει τη μεταμόρφωση ινοβλαστών από ογκογονίδια που δρουν συνεργιστικά (Finlay et al, 1989) και δεν αναγνωρίζεται από το

μονοκλωνικό αντίσωμα Pab240, το οποίο είναι ειδικό για πολλά είδη μεταλλαγμένων πρωτεϊνών (Gannon et al, 1990).

Αντίθετα, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη P53, έχει χρόνο ημιζωής αρκετές ώρες (Finlay et al, 1988, Hinds et al, 1990), δεν καταστέλλει την αύξηση των καρκινικών κυττάρων (Mercer et al, 1991, Chen et al, 1990, Martinez et al, 1991) και δεν καταστέλλει τη μεταμόρφωση ινοβλαστών από ογκογονίδια (Finlay et al, 1989). Ακόμη, μεταλλαγμένες μορφές της P53 συνεργάζονται με το ενεργοποιημένο ογκογονίδιο *ras* στον κυτταρικό μετασχηματισμό (Hinds et al, 1990).

4.2.3 Πρόσδεση της P53 σε ειδικές DNA αλληλουχίες

Θεμελιώδης βιοχημική ιδιότητα της φυσικού τύπου P53 πρωτεΐνης είναι η ικανότητά της να σχηματίζει τετραμερή (Halazonetis and Kandil, 1993, Halazonetis et al, 1993) και να προσδένεται ειδικά σε αλληλουχίες του DNA που περιέχουν αντίγραφα του δεκανουκλεοτιδίου 5'-(Pu)₃C(A/T)(T/A)G(Py)₃-3', τα οποία ευρίσκονται σε απόσταση 0 έως 13 νουκλεοτίδια μεταξύ τους, όπου Pu: Πουρίνη και Py: Πυριμιδίνη (Tokino et al, 1994). Μη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη που έχει συντεθεί *in vitro*, προσδένεται ειδικά σε ολιγονουκλεοτίδια που φέρουν τη συναινετική αλληλουχία παρουσία πυρηνικού εκχυλίσματος ακόμη και από μη φέροντα το γονίδιο p53 κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει μετα-μεταφραστική τροποποίηση της πρωτεΐνης προκειμένου να γίνει ενεργή για πρόσδεση σε DNA (Funk et al, 1992). Αντίθετα, απουσία πυρηνικού εκχυλίσματος, ειδική πρόσδεση της P53 σε DNA παρατηρείται εάν προστεθεί αντίσωμα Pab421. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει το καρβόξυ-τελικό άκρο του πρωτεϊνικού μορίου (Wade-Evans and Jenkins, 1985) και ενισχύει την ικανότητα πρόσδεσης της P53 στο DNA, πιθανά αποκαλύπτοντας την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (Hupp et al, 1992, Funk et al, 1992) και καλύπτοντας την αρνητική ρυθμιστική περιοχή. Απουσία κυτταρικού εκχυλίσματος ή αντισώματος Pab421 η πρόσδεση της P53 στο DNA

είναι πολύ ασθενέστερη και ορισμένες φορές πρακτικά δεν παρατηρείται (Funk et al, 1992, Halazonetis et al, 1993a, b, Halazonetis, 1992). Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η παρατηρούμενη πρόσδεση της P53 στο DNA είναι συνάρτηση και του είδους της ολιγονουκλεοτιδικής αλληλουχίας-ιχνηθέτη που χρησιμοποιείται, δεδομένου ότι έχουν συντεθεί ολιγονουκλεοτίδια που αναγνωρίζονται από την P53 απουσία υποβοηθητικών παραγόντων, όπως είναι το BC-S21 (Halazonetis, 1992). Τέλος, ενεργοποίηση της P53 για ειδική πρόσδεση στο DNA παρατηρείται με αφαίρεση των τελευταίων 30 αμινοξικών καταλοίπων (Δ364-393) με αποτέλεσμα, λόγω ελλείψεως της αρνητικής ρυθμιστικής περιοχής, η διαμόρφωση της πρωτεΐνης να "μετατοπίζεται" προς την ενεργό για πρόσδεση σε DNA μορφή (Halazonetis et al, 1993a, b, Watermam et al, 1995).

Αντίθετα, οι μεταλλαγμένες μορφές της P53 δεν προσδένονται στο DNA και δεν ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων (Zambetti and Levine, 1993). Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές για μεταλλαγμένες μορφές της P53 που παρουσιάζουν ικανότητα ειδικής πρόσδεσης στο DNA και μεταγραφικής ενεργοποίησης γονιδίων (Chen et al, 1993, Zhang et al, 1993a, b, Zhang et al, 1994, Park et al, 1994, Niewolik et al, 1995). Περισσότερες λεπτομέρειες για την ικανότητα της φυσικού τύπου και της μεταλλαγμένης P53 πρωτεΐνης να επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων, θα δοθούν σε επόμενες παραγράφους.

4.2.4 Αλληλεπιδράσεις της P53 με πρωτεΐνες

Ακόμη, η P53 προσδένεται σε μια σειρά από πρωτεΐνες, ανάμεσα στις οποίες συμπεριλαμβάνονται κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες, παράγοντες αντιγραφής του DNA, ιικά πρωτεϊνικά προϊόντα και προϊόντα ογκογονιδίων (Pietenpol and Vogelstein, 1993).

Στους μεταγραφικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με την P53 συμπεριλαμβάνεται η πρωτεΐνη που προσδένεται στο στοιχείο TATA (TATA-box

binding protein, TBP), μια υπομονάδα του βασικού μεταγραφικού παράγοντα TFIID. Η TBP προσδένεται στο αμινο-τελικό άκρο της P53 και μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης η μη μεταλλαγμένη P53 πρωτεΐνη καταστέλλει την έκφραση γονιδίων που δεν διαθέτουν αλληλουχία πρόσδεσης της P53 (Liu et al, 1993, Ragimov et al, 1993). Παράδειγμα τέτοιων γονιδίων αποτελούν τα *c-jun*, *c-fos*, β-ακτίνη, IL-6 και η συνθετάση του νιτρικού οξέος, το οποίο είναι μεταλλαξογόνος παράγοντας (Ginsberg et al, 1991, Subler et al, 1992, Forrester et al, 1996). Ακόμη, η πρωτεΐνη P53 αλληλεπιδρά με τον παράγοντα αντιγραφής του DNA, RPA, μια πρωτεΐνη που προσδένεται σε μονόκλωνο DNA. Η πρόσδεση αυτή αποτελεί το πρώτο βήμα για την αντιγραφή του DNA. Η αλληλεπίδραση RPA-P53 πιστεύεται ότι εμποδίζει την έναρξη της S φάσης (Dutta et al, 1993).

Επιπλέον, η πρωτεΐνη P53 αναγνωρίζει μονόκλωνα νουκλεϊκά οξέα (Oberolser et al, 1993, Bakalkin et al, 1994), DNA ελικάσες (Oberolser et al, 1993) και εμπλέκεται στη επανασύνδεση των DNA αλυσίδων (Bakalkin et al, 1994), ιδιότητες που ενοχοποιούν και άμεσα την P53 πρωτεΐνη στη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA. Ακόμη, η μη μεταλλαγμένη P53, έχειδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη RAD51 και την ομόλογή της στους προκαρυωτικούς οργανισμούς RecA, οι οποίες εμπλέκονται στον ομόλογο ανασυνδυασμό του DNA, καταστέλλει τη δράση τους και προστατεύει και άμεσα το κύτταρο από χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Sturzbecher et al, 1996).

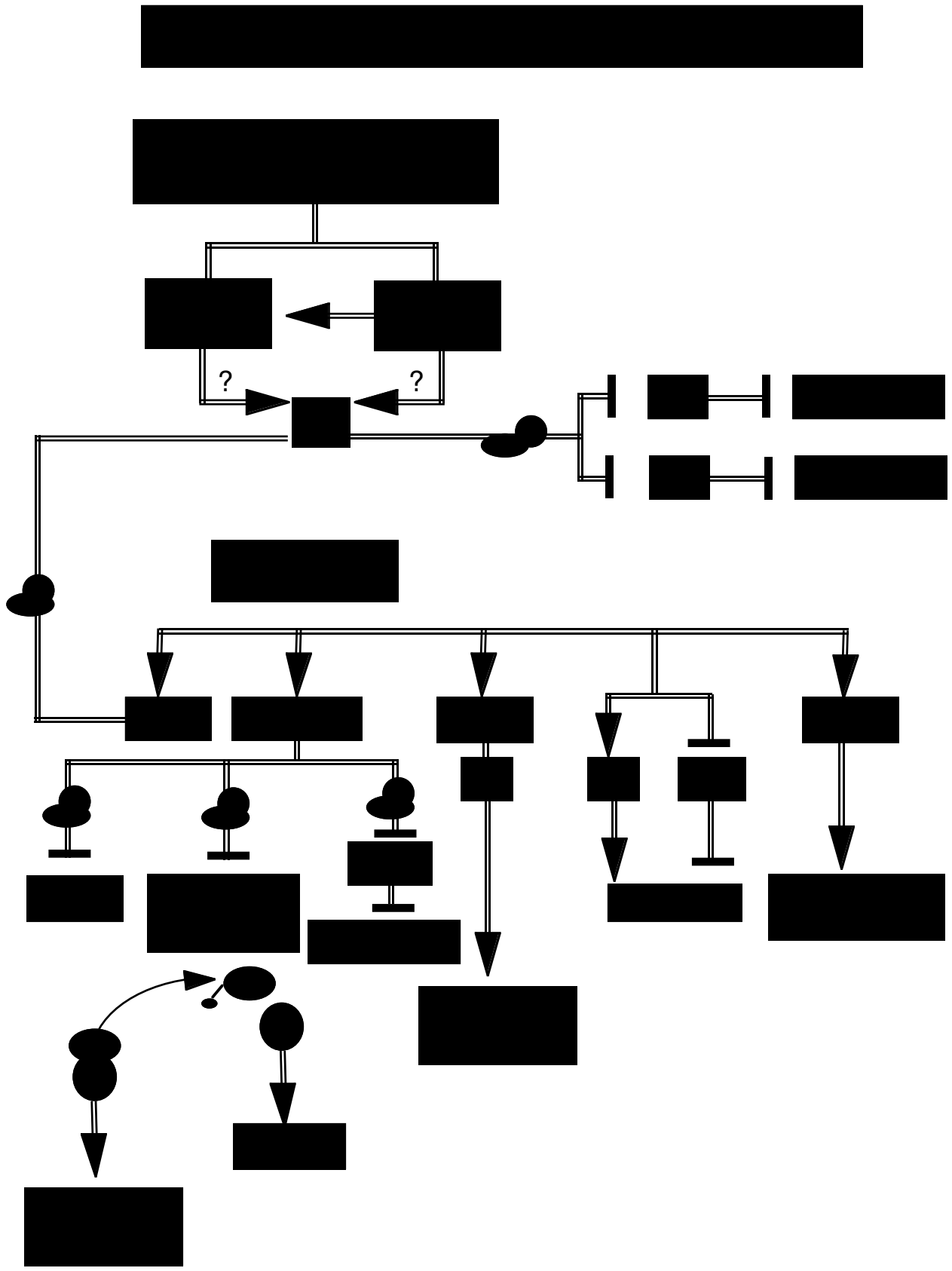
Τέλος, η φυσικού τύπου P53 δημιουργεί συμπλέγματα με το μεγάλο T αντιγόνο του ιού SV40 (Lane and Crawford, 1979), με την πρωτεΐνη E1B του Αδενοϊού 5 (Sarnow et al, 1982), με την πρωτεΐνη E6 των ιών του θηλώματος του ανθρώπου HPV 16 και HPV 18 (Werness et al, 1990) και με το προϊόν του ογκογονιδίου *mdm-2* (Chen et al, 1994). Οι αλληλεπιδράσεις με τα ιικά και κυτταρικά προϊόντα, έχουν ως συνέπεια την καταστολή της δράσης της μη μεταλλαγμένης πρωτεΐνης P53 και την προαγωγή της καρκινογένεσης.

4.3 Ο ρόλος της P53 στην καρκινογένεση

Γενικά, ο ρόλος της πρωτεΐνης P53, ως προϊόν ογκο-κατασταλτικού γονιδίου, έγκειται στο να προλαμβάνει τη δημιουργία ογκογενετικών μεταλλαγών στο DNA του κυττάρου, ως αποτέλεσμα έκθεσης σε χημικούς μεταλλαξογόνους παράγοντες, ιονίζουσα και υπεριώδη ακτινοβολία. Όταν, για κάποια αιτία, συσσωρευθούν βλάβες στο DNA του κυττάρου, τα επίπεδα της P53 αυξάνουν και το μόριο δρα ώστε να διακοπεί προσωρινά ο κυτταρικός κύκλος στη φάση G1 (G1 growth arrest), να εμποδιστεί δηλαδή ο διπλασιασμός του DNA του κυττάρου, έως ότου οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του κυττάρου προλάβουν να δράσουν και να αποκαταστήσουν τη βλάβη του γενετικού υλικού, προκειμένου να αποφευχθεί η δημιουργία ογκογόνου μετάλλαξης. Εάν οι βλάβες που έχουν συσσωρευθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου είναι εκτεταμένες, σε βαθμό μη επιδιορθώσιμο, η P53 δρα ώστε να οδηγηθεί το κύτταρο σε προγραμματισμένο θάνατο, απόπτωση (apoptosis), ώστε οι γενετικές αλλοιώσεις να μην "περάσουν" σε θυγατρικές κυτταρικές σειρές (Zambetti and Levine, 1993, Hainaut, 1995, Levine et al, 1994).

Ο μηχανισμός με τον οποίο η P53 "ανιχνεύει" τη βλάβη του DNA δεν είναι ακόμη κατανοητός. Πιστεύεται ότι η πρωτεΐνη μπορεί άμεσα να ανιχνεύει το κατεστραμμένο DNA με πρόσδεσή της με συγγένεια σε μονόκλωνο DNA (Brain and Jenkins, 1994). Ακόμη, είναι δυνατόν το σήμα για την ενεργοποίηση της δράσης της P53 να είναι ο μεταβολισμός νουκλεοτιδίων (Kastan et al, 1991). ή η δημιουργία ενεργών ριζών (Hainaut and Milner, 1993). Τέλος, το stress του κυττάρου μπορεί να επηρεάζει την P53 μέσω ενός καταρράκτη κινασών που καταλήγει σε φωσφορυλίωση ειδικών αμινοξικών καταλοίπων της πρωτεΐνης (Milne et al, 1994). Η αύξηση των επιπέδων της P53 πρωτεΐνης, πραγματοποιείται με αύξηση του χρόνου ημιζωής του μορίου, μέσω κάποιας μετα-μεταφραστικής τροποποίησης (Kastan et al, 1991).

Η επαγωγή σταματήματος του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση ή απόπτωσης μέσω της P53 πρωτεΐνης, περιλαμβάνει καταστολή της έκφρασης γονιδίων μέσω αλληλεπίδρασης της P53 με μεταγραφικούς παράγοντες και απενεργοποίηση των τελευταίων, καθώς και ενεργοποίηση γονιδίων με DNA πρόσδεση της P53 και επαγωγή της μεταγραφής, όπως αποδίδεται στην Εικόνα 4.2 (Hainaut 1995, Zambetti and Levine, 1993). Στους μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στην P53 περιλαμβάνονται η TBP, με αποτέλεσμα την καταστολή πολλών γονιδίων, και η RPA πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα τη διακοπή της αντιγραφής του DNA του κυττάρου. Στο μεταγραφικό επίπεδο, η P53 έχει δειχθεί ότι επάγει την έκφραση: 1. Του γονιδίου *mdm-2*, το προϊόν του οποίου δένεται στην P53 και την αδρανοποιεί (αυτορύθμιση). 2. Του γονιδίου *p21/waf-1/cip-1*, το προϊόν του οποίου (p21) προσδένεται και αναστέλλει τη δράση του PCNA (Proliferating-cell nuclear antigen), μιας ρυθμιστικής υπομονάδας των DNA πολυμερασών δ και ϵ , η οποία είναι απαραίτητη για την αντιγραφή αλλά και επιδιόρθωση του DNA. Ακόμη, η p21, αναστέλλει τη δράση των SAPKs (stress-activated protein kinases), οι οποίες ενεργοποιούνται σε συνθήκες κυτταρικού stress, για παράδειγμα μετά από βλάβη του DNA (Shim et al, 1996). Τέλος, η p21 αναστέλλει τη δράση των συμπλόκων G1 κυκλίνης/Cdk. Αυτό εμποδίζει την απενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης μορίων όπως τα pRb (προϊόν του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος), p107 και p130. Έτσι, οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας E2F παραμένουν ενωμένοι με την pRb και δεν μπορούν να επάγουν την έκφραση γονιδίων απαραίτητων στη μετάβαση από τη G1 στη φάση S. 3. Του γονιδίου *gadd45*, το οποίο συμμετέχει στο σταμάτημα στη G1 φάση με άγνωστο ακόμη τρόπο. 4. Του γονιδίου *bax*, το οποίο ενεργοποιεί την απόπτωση, όταν ο λόγος των πρωτεϊνών *bcl-2/bax* μετατοπιστεί προς τη *bax*. 5. Του γονιδίου PCNA, γεγονός συμβατό με το ρόλο της P53 στην επιδιόρθωση του DNA.



Εικ. 4.2: Πρότυπο του μηχανισμού δράσης της πρωτεΐνης P53 μετά από ενεργοποίηση από βλάβες του DNA. Η πρόκληση κυτταρικού stress και βλαβών στο DNA από μεταλλαξογόνους παράγοντες προκαλεί αύξηση των επιπέδων της P53. Η συσσώρευση της πρωτεΐνης P53 επάγει το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση, ή την απόπτωση, μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες και μεταγραφικής ενεργοποίησης γονιδίων. Το σταμάτημα στην G1 φάση επάγεται από δέσμευση των TBP, RPA, αναστολή των PCNA, *waf-1/cip-1* και ενεργοποίηση του *gadd45*. Η απόπτωση ενεργοποιείται από μετατόπιση του λόγου των πρωτεϊνών *bcl-2/ bax*, προς τη *bax*.

4.4 Γονίδια που ρυθμίζονται μεταγραφικά από την πρωτεΐνη P53

Πρόσφατα, έχουν ταυτοποιηθεί αρκετά γονίδια που ρυθμίζονται μεταγραφικά από την πρωτεΐνη P53, ανάμεσα στα οποία περιλαμβάνονται τα *gadd45*, *waf-1/cip-1*, η δυάδα *bcl2/bax*, το *mdm-2* και το *H-ras*.

4.4.1 Το γονίδιο *gadd45*

Το γονίδιο *gadd45* ενεργοποιείται από την P53, περιέχει στοιχείο πρόσδεσης της P53 και καταστέλλει, μαζί με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Zhan et al, 1994). Ο ακριβής τρόπος δράσης του γονιδίου δεν έχει αποσαφηνιστεί.

4.4.2 Το γονίδιο *p21/waf-1/cip-1*

Το γονίδιο *waf-1/cip-1* περιέχει στοιχείο πρόσδεσης της P53 (El-Deiry et al, 1993) και κωδικοποιεί για την p21, η οποία ανήκει στην κατηγορία των αναστολέων των πρωτεϊνικών κινάσων που εξαρτώνται από την κυκλίνη (cyclin-dependent protein kinase (Cdk) inhibitors) και εμποδίζει την υπερφωσφορυλίωση του προϊόντος του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος, pRb. Ακόμη, η p21, δένεται

και εμποδίζει τη δράση του PCNA (proliferating cell nuclear antigen), μιας υπομονάδας της DNA πολυμεράσης δ (Hainaut, 1995).

4.4.3 Τα γονίδια *bcl-2/bax*

Η πρωτεΐνη P53 επάγει την έκφραση του γονιδίου *bax*, το οποίο διαθέτει στοιχείο πρόσδεσης της P53 (Miyashita and Reed, 1995), και καταστέλλει την έκφραση του *bcl-2* (Miyashita et al, 1994). Η πρωτεΐνη *bcl-2* προάγει την επιβίωση των κυττάρων, ενώ η *bax* την απόπτωση, μέσω αναστολής της δράσης της *bcl-2*. Ο ενδοκυτταρικός λόγος των δύο πρωτεϊνών καθορίζει τη δέσμευση ή όχι του κυττάρου για απόπτωση και η P53 επάγει τον κυτταρικό θάνατο ωθώντας την ισορροπία προς τη *bax*.

4.4.4 Το γονίδιο *mdm-2*

Το γονίδιο *mdm-2* ρυθμίζεται θετικά από την P53 μέσω ενός στοιχείου που ευρίσκεται στο πρώτο εσώνιο του γονιδίου (Wu et al, 1993). Η πρωτεΐνη *mdm-2* δένεται στο N-άκρο της P53, εμποδίζοντας τη δράση της. Έτσι, δημιουργείται ένας ρυθμιστικός μηχανισμός που μπορεί να ξεπεράσει το G1 block, οδηγώντας σε επανέναρξη του κυτταρικού κύκλου (Wu et al, 1993).

4.4.5 Το γονίδιο PCNA

Η επαγωγή του PCNA γίνεται με ειδική πρόσδεση της "φυσικού τύπου" P53 σε αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου (Morris et al, 1996). Με αυτόν τον τρόπο η P53 συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA, ενώ πιθανά η ενδοκυτταρική συγκέντρωση της P53 είναι αυτή που καθορίζει την (έμμεση) καταστολή ή την (άμεση) επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου από την P53 (Morris et al, 1996).

4.4.6 Το γονίδιο H-ras

Τα πειραματικά μας αποτελέσματα δεικνύουν θετική ρύθμιση της έκφρασης του πρωτο-ογκογονιδίου H-ras από την P53, μέσω ενός στοιχείου που ευρίσκεται στο πρώτο εσώνιο του H-ras (Spandidos et al, 1995, Zoumpourlis et al, 1995). Η σημασία της ρύθμισης αυτής δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί.

4.5 Οι μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης P53

Ο γενετικός τύπος του γονιδίου p53 εμφανίζεται μεταλλαγμένος στο 60% των κακοήθων νεοπλασιών του ανθρώπου, συνήθως με σημειακές μεταλλάξεις στην περιοχή που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση της πρωτεΐνης στο DNA (Hainaut, 1995). Γενικά, οι μεταλλαγμένες μορφές της P53 συσσωρεύονται στα καρκινικά κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει πως τα κύτταρα αυτά επιλέγονται για μεταλλάξεις του γονιδίου p53. Οι μεταλλαγμένες P53 δεν αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες που προαναφέρθηκαν για τη φυσικού τύπου πρωτεΐνη και διαταράσσεται η ικανότητά τους να προσδένονται με ειδικό τρόπο στο DNA. Σε κύτταρα που περιέχουν ένα αλληλόμορφο φυσικού τύπου και ένα μεταλλαγμένο, η επιλογή οφείλεται στην ικανότητα της μεταλλαγμένης P53 να σχηματίζει ολιγομερή με τη φυσικού τύπου πρωτεΐνη και να εμποδίζει τη φυσιολογική της δράση (dominant negative inhibition). Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα δεικνύουν ότι η μεταλλαγμένη P53 έχει και από μόνη της ογκογενετική δράση (gain of function), ενισχύοντας το ογκογόνο δυναμικό κυττάρων με έλλειψη του γονιδίου p53 (Zhang et al, 1993a, b, Park et al, 1994, Dittmer et al, 1993, Muller et al, 1996).

Κατ' αρχήν, μεταλλαγμένες μορφές της P53 ενεργοποιούν μεταγραφικά το γονίδιο *MDR 1* (multidrug-resistance), το οποίο προσδίδει στο κύτταρο αντίσταση σε αντιβιοτικά. Δεδομένου ότι ο υποκινητής του *MDR 1* δεν περιέχει αλληλουχία πρόσδεσης της P53, φαίνεται πως το φαινόμενο είναι έμμεσο, περιλαμβάνει

δηλαδή και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Zastawny et al, 1993). Επιπλέον, μεταλλαγμένες μορφές της P53 συνεργάζονται με την πρωτεϊνική κινάση C στην ενεργοποίηση της έκφρασης του αυξητικού παράγοντα ενδοθηλιακών αγγείων (vascular endothelial growth factor), προτείνοντας τη συμμετοχή της μεταλλαγμένης P53 στην αγγειογένεση, διαδικασία συνδεδεμένη με την προώθηση της ογκογένεσης (Kieser et al, 1994). Τέλος, είναι πιθανό μεταλλαγμένες P53 να συμμετέχουν στην οργάνωση της χρωματίνης του κυττάρου και συνεπώς σε διαδικασίες όπως είναι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και η πυρηνοδιαίρεση (Muller et al, 1996).

Βέβαια, μεταλλαγμένα p53 αλληλόμορφα, κωδικοποιούν για πρωτεΐνες με διαφορετικές ιδιότητες (Park et al, 1994, Chevillard et al, 1996). Για παράδειγμα, η μεταλλαγμένη μορφή His 273 παρουσιάζει ικανότητα ειδικής πρόσδεσης στο DNA και επαγωγής της μεταγραφής, ενώ οι μορφές Pro 156, His 175, Gln 248, Trp 248 δεν παρουσιάζουν αυτές τις ιδιότητες. Υπάρχουν ακόμη περιπτώσεις μεταλλαγμένων μορφών της P53 που προσδέονται στο DNA με ειδικότητα, αλλά δεν ενεργοποιούν τη μεταγραφή (Leu 223), καθώς και περιπτώσεις που μεταλλαγμένες μορφές δρουν διαφορετικά, ανάλογα με την κυτταρική σειρά στην οποία εκφράζονται (η His 273 σε κύτταρα A 431 δεν προσδέεται στο DNA και δεν επάγει μεταγραφή).

Τα δεδομένα αυτά μας δείχνουν την πολυπλοκότητα του φαινομένου των μεταλλάξεων του γονιδίου p53 σε όγκους του ανθρώπου. Επιπλέον, το γεγονός πως η μεταλλαγμένη P53, πέρα από την ικανότητα της να καταστέλλει τη δράση της φυσικού τύπου πρωτεΐνης, παρουσιάζει ιδιότητες μεταγραφικής ενεργοποίησης γονιδίων, τόσο μέσω άλλων πρωτεϊνικών παραγόντων, όσο και μέσω πρόσδεσης σε ειδικές αλληλουχίες του DNA, οδήγησε στη θεωρία ότι η P53 παρουσιάζει μια ελαστικότητα σε ό,τι αφορά τη στερεοδομή της. Έχει προταθεί (Halazonetis et al, 1993) ότι η φυσικού τύπου P53 πρωτεΐνη ευρίσκεται σε

ισορροπία μεταξύ δύο μορφών με διαφορετική στερεοδιαμόρφωση: της κανονικής μορφής και της μορφής που είναι προσδεδμεμένη σε DNA, η οποία μοιάζει στη στερεοδιαμόρφωση με μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης. Μετατόπιση της ισορροπίας λόγω σημειακής μετάλλαξης, έχει ως συνακόλουθο την απορρύθμιση της λειτουργίας του μορίου. Ωστόσο, η τριτοταγής δομή του μορίου επιτρέπει τη λειτουργία του ολιγομερισμού, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ολιγομερών μεταξύ μεταλλαγμένης και φυσικού τύπου P53 πρωτεΐνης.

4.6 Μηχανισμοί διατάραξης της λειτουργίας της πρωτεΐνης P53

Πέρα από τις σημειακές μεταλλάξεις, υπάρχει μια σειρά άλλων παραγόντων που αναστέλλουν την ικανότητα της φυσικού τύπου P53 να δρα ογκοκατασταλτικά.

4.6.1 Δέσμευση της P53 από ιικά και γονιδιακά πρωτεϊνικά προϊόντα

Η φυσικού τύπου P53 δημιουργεί συμπλέγματα με το μεγάλο T αντιγόνο του ιού SV40 (Lane and Crawford, 1979), με τις πρωτεΐνες E1B και E4orf6 του Αδενοϊού (Sarnow et al, 1982, Dobner et al, 1996) και με την πρωτεΐνη E6 των ιών HPV 16 και HPV 18 (Werness et al, 1990), τα οποία την απενεργοποιούν.

Επιπλέον, η P53 αλληλεπιδρά και με το προϊόν του ογκογονιδίου *mdm-2* (Chen et al, 1994). Υπερέκφραση του *mdm-2* ξεπερνά την καταστολή της κυτταρικής αύξησης από τη μη μεταλλαγμένη P53. Έχουν βρεθεί σαρκώματα του ανθρώπου όπου υπερεκφράζεται το *mdm-2*, ενώ τα αλληλόμορφα του p53 παραμένουν μη μεταλλαγμένα (Oliner et al, 1992).

4.6.2 Διαταραχή της θέσης της P53 στο κύτταρο

Οι ογκο-κατασταλτικές ιδιότητες της P53 μπορούν να επηρεαστούν λόγω διαταραχών της υποκυτταρικής εντόπισής της. Έχουν ανιχνευθεί περιπτώσεις καρκινωμάτων του μαστού που εκφράζουν υψηλές ποσότητες μη μεταλλαγμένης P53, η οποία όμως εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, όπου δεν μπορεί βέβαια να δράσει ως ρυθμιστής της μεταγραφής (Moll et al, 1992). Ο μηχανισμός της κυτταροπλασματικής εντόπισης της P53, δεν είναι ακόμη κατανοητός.

4.6.3. Αναστολή της δράσης της P53 από ρυθμιστικά μόρια

Τέλος, έχει περιγραφεί περίπτωση αυξημένων επιπέδων της P53 πρωτεΐνης, η οποία ευρίσκεται στον πυρήνα των κυττάρων ασθενή με προδιάθεση στον καρκίνο (Barnes et al, 1992). Στην περίπτωση αυτή, η πρωτεΐνη P53, αν και εμφανίζεται σαν φυσικού τύπου με όλα τα κριτήρια, δεν φαίνεται λειτουργική. Μια πιθανότητα είναι ότι κάποιος αρνητικός ρυθμιστής της ενεργότητας της P53 ευρίσκεται στον πυρήνα των κυττάρων αυτών. Εναλλακτικά, κάποια οδός που δρα μετά την P53 (downstream), μπορεί να έχει διακοπεί.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

A. Μέθοδοι

5.1 Κυτταροκαλλιέργεια

Οι κυτταρικές σειρές LATK⁻, HeLa και Saos-2 που χρησιμοποιήθηκαν, είναι αθανатоποιημένες και αναπτύσσονται υποχρεωτικά σε στερεό υπόστρωμα. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε αποστειρωμένες, πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιέργειας (Bibby), η βάση των οποίων είναι επιστρωμένη με κολλαγόνο και αποτελεί το απαραίτητο στερεό υπόστρωμα. Η καλλιέργεια γίνεται σε θερμοκρασία 37⁰C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ και σχετική υγρασία 95%. Το υγρό θρεπικό υλικό (DMEM, RPMI) περιέχει 10% ορό εμβρύου μόσχου (Foetal Calf Serum, FCS), ο οποίος παρέχει απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες, και αντιβιοτικά, προς αποφυγή βακτηριακών μολύνσεων (στρεπτομυκίνη 50mg/ml και πενικιλίνη 300mg/ml).

Η ανακαλλιέργεια (χωρισμός και μεταφορά σε νέες φιάλες) γίνεται με θρυψινοποίηση: τα κύτταρα εκπλένονται με διάλυμα PE, αποκολλώνται με διάλυμα θρυψίνης (απαιτείται επώαση στους 37⁰C για 5-10 min), φυγοκεντρώνται (1500 rpm, 5 min), επαναιωρούνται σε θρεπικό υλικό και μοιράζονται σε κατάλληλο αριθμό φιαλών. Για την αποθήκευση των κυττάρων ακολουθείται η ίδια διεργασία, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1 ml διαλύματος

κατάψυξης και μεταφέρονται σε πλαστικά φιαλίδια (ampoules-Nalgene) και διατηρούνται σε υγρό άζωτο. Η κατάψυξη γίνεται σταδιακά για να εξασφαλιστεί η βέλτιστη βιωσιμότητα των κυττάρων. Αντίθετα, η απόψυξη γίνεται γρήγορα στους 37°C, το περιεχόμενο του πλαστικού φιαλιδίου αραιώνεται σε 5 ml θρεπτικό υλικό, φυγοκεντρείται, το υπερκείμενο αποχύνεται και τα κύτταρα, απαλλαγμένα από το DMSO που είναι τοξικό, αφού επαναιωρηθούν σε 10-20 ml θρεπτικού υλικού, μεταφέρονται σε φιάλη καλλιέργειας.

- Διάλυμα PE: 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4mM Na₂HPO₄, 1,5mM NaH₂PO₄, 1mM EDTA.
- Διάλυμα θρυψίνης: 0,01% θρυψίνη σε PE.
- Διάλυμα κατάψυξης κυττάρων: 10% DMSO, 20% ορός εμβρύου μόσχου, 70% θρεπτικό υλικό.

5.2 Διαδικασία μετασχηματισμού βακτηρίων (transformation)

Για την απόκτηση ικανής ποσότητας των πλασμιδίων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά τα πειράματα επιμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων, έγινε μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων με κάθε πλασμίδιο και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με υπερφυγοκέντριση σε κλίση πυκνότητας χλωριούχου καισίου. Αναλυτικά, η διαδικασία είναι η εξής:

5.2.1 Προετοιμασία βακτηρίων επιδεκτικών μετασχηματισμού (competent)

Προκειμένου βακτήρια του στελέχους DH5a του *E. coli* να καταστούν επιδεκτικά μετασχηματισμού, ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία: 100 μl εναιωρήματος βακτηρίων εμβολιάζονται σε 100 ml θρεπτικού μέσου L-Broth και επωάζονται στους 37°C υπό ισχυρή ανάδευση, έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας φθάσει την τιμή 0.6, μετρώμενη σε μήκος κύματος 600 nm. Με αυτόν

τον τρόπο εξασφαλίζεται ότι η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης της. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια μεταφέρεται ασηπτικά σε αποστειρωμένους σωλήνες φυγοκέντρου και φυγοκεντρείται για 15 min, στις 2000 rpm, 4°C. Το υπερκείμενο αποχύνεται ενώ το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 20 ml διαλύματος μετασχηματισμού (transformation buffer) και παραμένει στον πάγο για 30 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min, στις 2000 rpm, 4°C, και το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 2 ml διαλύματος αποθήκευσης (storage buffer). Το εναιώρημα μοιράζεται ανά 100 μl σε αποστειρωμένους σωλήνες errendorf και στη συνέχεια καταψύχεται στους -70°C. Τα βακτήρια είναι έτοιμα για μετασχηματισμό αμέσως μετά την απόψυξή τους.

- L-Broth (θρεπτικό υλικό βακτηρίων): 1% τρυπτόνη, 0.5% εκχύλισμα ζύμης, 1% NaCl.
- Διάλυμα μετασχηματισμού (transformation buffer): 100mM CaCl₂, 250mM KCl, 5mM MgCl₂, 10mM RbCl, 5mM Tris-HCl pH: 7.6.
- Διάλυμα αποθήκευσης (storage buffer): 100mM CaCl₂, 250mM KCl, 5mM MgCl₂, 10mM RbCl, 5mM Tris-HCl pH: 7.6, 15% γλυκερόλη.

5.2.2 Μετασχηματισμός βακτηρίων του στελέχους DH5a

Τα πλασμίδια εισέρχονται σε βακτήρια του στελέχους DH5a του *E coli*, επιδεκτικά μετασχηματισμού, με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat-shock). Το θερμικό σοκ που υφίστανται τα βακτηριακά κύτταρα, καθώς και η επίδραση των ιόντων χλωρίου, καλίου, ασβεστίου, μαγνησίου και ρουβιδίου που περιέχονται στο διάλυμα μετασχηματισμού, διευκολύνουν τη διέλευση του πλασμιδιακού DNA από την κυτταρική μεμβράνη, μέσω διαστολής των πόρων (Sambrook et al, 1989). Συγκεκριμένα, 10-20 ng πλασμιδιακού DNA αναμιγνύονται με 100 μl εναιωρήματος βακτηρίων και επωάζονται για 30 min στον πάγο. Ακολουθεί θέρμανση στους 42°C για 40 sec, ψύξη στον πάγο για 2 min και προσθήκη 0.9 ml

διαλύματος SOC. Μετά από επώαση μίας ώρας στους 37°C υπό ανακίνηση, το εναιώρημα των βακτηρίων επιστρώνεται σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο (L-άγαρ) που περιέχει 100 μg/ml αμπικιλίνη. Ύστερα από επώαση στους 37°C για 16-20 ώρες εμφανίζονται αποικίες βακτηρίων ανθεκτικές στην αμπικιλίνη (οι οποίες φέρουν και το επιθυμητό πλασμίδιο το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη).

- Διάλυμα SOC (θρεπτικό υλικό βακτηρίων): 2% Τρυπτόνη, 0.5% εκχύλισμα ζύμης, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM γλυκόζη.
- L-άγαρ (ημιστερεό θρεπτικό υλικό βακτηρίων): L-Broth, 1.5% άγαρ.
- Διάλυμα αμπικιλίνης: 1% αμπικιλίνη, 0.025M NaOH.

5.2.3 Υγρή καλλιέργεια βακτηρίων

Οι υγρές καλλιέργειες βακτηρίων γίνονται σε θρεπτικό υλικό L-Broth, στους 37°C, υπό συνεχή ανακίνηση. Όταν τα βακτήρια έχουν μετασχηματισθεί με κάποιο πλασμίδιο, το θρεπτικό υλικό περιέχει και αντιβιοτικό επιλογής (αμπικιλίνη 100μg/ml), διότι όλα τα χρησιμοποιηθέντα πλασμίδια φέρουν το γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλίνη (β-λακταμάση).

5.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργειες βακτηρίων

Για την απομόνωση υψηλής καθαρότητας πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διαχωρισμού σε κλίση πυκνότητας χλωριούχου καισίου με υπερφυγοκέντρηση, παρουσία βρωμιούχου εθιδίου (EtBr). Η μέθοδος βασίζεται στη διαφορετική κινητικότητα των πλασμιδιακού DNA, χρωμοσωμικού DNA και RNA σε κλίση CsCl, ως αποτέλεσμα διαφορών στον αριθμό των μορίων του EtBr που προσδένονται σε αυτά (Sambrook et al, 1989). Συνοπτικά, βακτήρια που φέρουν το επιθυμητό πλασμίδιο συλλέγονται με φυγοκέντρηση από καλλιέργεια 500 ml. Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 20 ml διαλύματος I, στο οποίο

προστίθενται 100mg λυσοζύμης, για τη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και την απομάκρυνση των πλασμιδίων από τις θέσεις σύνδεσης με την κυτταρική μεμβράνη. Ακολουθεί προσθήκη 40 ml διαλύματος II και παραμονή στον πάγο, για την αποδιάταξη του χρωμοσωμικού DNA και σαπωνοποίηση λιπών, και πρωτεϊνών του λυμένου βακτηρίου. Στη συνέχεια, γίνεται εξουδετέρωση με 30 ml όξινο διάλυμα οξικού καλίου, ώστε να επαναδιαταχθεί μόνο το πλασμιδιακό DNA και όχι αυτό του γονιδιώματος. Τα νουκλειικά οξέα κατακρημνίζονται σε ισοπροπανόλη και επαναδιαλύονται σε διάλυμα Tris-EDTA 10:1mM που περιέχει 0.95 g/ml CsCl και 0.28 mg/ml EtBr. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 40000 rpm, στους 20°C, για 40 h, και απομόνωση της ζώνης του πλασμιδιακού κλειστού κυκλικού DNA. Ο καθαρισμός του DNA γίνεται με εκχύλιση του βρωμιούχου εθιδίου με βουτανόλη κορεσμένη σε νερό και διαπίδυση μέσω ημιπερατής μεμβράνης σε διάλυμα Tris-EDTA 10: 1mM για την απομάκρυνση του χλωριούχου καισίου. Το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη 2.5 όγκων ψυχρής (-20°C) απόλυτης αιθανόλης και 0.1 όγκων διαλύματος οξικού αμμωνίου στους -20°C για 16 ώρες, ή στους -70°C για 1 ώρα και ανακτάται με φυγοκέντρηση για 20 min, 12000 rpm, 4°C, αφήνεται να στεγνώσει και αναδιαλύεται σε απεσταγμένο νερό.

- Διάλυμα I: 50mM γλυκόζη, 25mM Tris-HCl pH: 8, 10mM EDTA pH: 8.
- Διάλυμα II: 0.2M NaOH, 1% SDS.
- Διάλυμα οξικού καλίου (CH₃COOK): 3M, pH: 4.8.
- Διάλυμα βρωμιούχου εθιδίου (EtBr): 0.3%.
- Διάλυμα Tris-EDTA 10: 1mM: 5mM Tris-HCl pH: 7.8, 0.5mM EDTA.
- Διάλυμα οξικού αμμωνίου (CH₃COONH₄): 7.5M.

5.3 Επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA (Transfection)

Πλασμίδια εισήχθησαν σε κυτταρικές σειρές ώστε να μελετηθεί το πρωτεϊνικό προϊόν της έκφρασής τους σε πειράματα καθυστέρησης πρωτεϊνών, ή για την πραγματοποίηση δοκιμασιών CAT. Η εισαγωγή τους στα ευκαρυωτικά κύτταρα (επιμόλυνση) επιτεύχθηκε με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου (Graham et al, 1973, Spandidos and Wilkie, 1984) η οποία βασίζεται στο σχηματισμό συμπλέγματος φωσφορικού ασβεστίου-DNA, το οποίο μπορεί να εισέλθει μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο κύτταρο. Η διαδικασία απαιτεί πολύ αργή ανάμιξη διαλύματος DNA και ασβεστίου που περιέχει 40 µg DNA, με ίσο όγκο διαλύματος φωσφορικών (2xHBS). Το τελικό μίγμα προστίθεται στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων, όπου παραμένει 8-12 ώρες, και μετά αποχύνεται για να προστεθεί νέο θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα συλλέγονται 48 ώρες αργότερα, διάστημα στο οποίο το πλασμίδιο έχει εκφραστεί.

- Διάλυμα DNA και ασβεστίου (CaCl_2): 0.8µg/ µl DNA, 0.25M CaCl_2 .
- Διάλυμα φωσφορικών (2x HBS): 280mM NaCl, 10mM KCl, 50mM Hepes, 1.5mM Na_2HPO_4 , pH 7.1.

5.4 Παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων

Ως πηγή πρωτεϊνών στις δοκιμασίες καθυστέρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, χρησιμοποιούνται πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων ή ιστών.

5.4.1 Παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα

Τα κύτταρα εκπλένονται και συλλέγονται σε διάλυμα PBS με ξύσιμο (scrapping). Μετά από φυγοκέντρηση, επαναιωρούνται σε 2 ml υπότονου διαλύματος και ομογενοποιούνται σε γυάλινο ομογενοποιητή Thomas Scientific

USA. Οι ανέπαφοι πυρήνες φυγοκεντρούνται στις 2500 rpm, για 5 min, στους 4⁰C. Το ίζημα ξεπλένεται 3 φορές με 2 ml ισότονου διαλύματος. Οι πυρηνικές μεμβράνες διασπώνται με επώαση σε διάλυμα εκχύλισης για 30 min, στους 4⁰C, υπό συνεχή ανακίνηση και απομακρύνονται με υπερφυγοκέντρηση στις 25000 rpm για 1 h στους 4⁰C, σε κεφαλή Beckman 50 Ti. Το υπερκείμενο διάλυμα που περιέχει τις πυρηνικές πρωτεΐνες φυλάσσεται στους -70⁰C. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πυρηνικών πρωτεϊνών γίνεται με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976).

- Διάλυμα PBS (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων): 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4mM Na₂HPO₄, 1,5mM NaH₂PO₄.
- Υπότονο διάλυμα: 25mM Tris-Cl pH 7,5, 5mM KCl, 0.5mM MgCl₂, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF.
- Ισότονο διάλυμα: 25mM Tris-Cl pH 7.5, 5mM KCl, 0.5mM MgCl₂, 0.2M Σακχαρόζη, 0.5mM DTT, 1mM PMSF.
- Διάλυμα εκχύλισης: 20% γλυκερόλη, 25mM Tris-Cl pH 7.5, 1mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.6 M KCl, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF.

5.4.2 Παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων από ιστούς

Ακολουθείται η διαδικασία της προηγούμενης παραγράφου, με τη διαφορά ότι πριν την ομογενοποίηση οι ιστοί κόβονται με νυστέρι σε πολύ μικρά κομμάτια, πάνω σε ξηρό πάγο (-70⁰C).

5.5 Δοκιμασία καθυστέρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (gel retardation assay)

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην πρόσδεση πρωτεϊνικών μορίων σε ειδικές DNA αλληλουχίες ραδιοσημασμένων δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων (ιχνηθετών,

probes) και στη διαφορετική κινητικότητα του συμπλέγματος πρωτεΐνη-ιχνηθέτης σε σχέση με τα μη προσδεμένα ραδιοσημασμένα ολιγονουκλεοτίδια, κατά την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Προκειμένου να ταυτοποιηθεί η ειδικότητα του συμπλέγματος ιχνηθέτης-πρωτεΐνη, γίνονται πειράματα ανταγωνισμού του ιχνηθέτη με περίσσεια μη σημασμένων δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων, καθώς και χρήση αντισωμάτων έναντι του πρωτεϊνικού μορίου. Στα πειράματα ανταγωνισμού, εάν οι μη σημασμένοι ανταγωνιστές έχουν ειδικότητα προς την πρωτεΐνη, η εισαγωγή τους στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως συνακόλουθο τη μείωση της έντασης της ζώνης πρωτεΐνη-ιχνηθέτης. Κατά τη χρήση αντισωμάτων, εάν το αντίσωμα αλληλεπιδρά με την περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο DNA, η εισαγωγή του στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της έντασης της ζώνης πρωτεΐνη-ιχνηθέτης. Εάν αλληλεπιδρά με άλλη περιοχή του πρωτεϊνικού μορίου, παρατηρείται ανύψωση της ζώνης αντίσωμα-πρωτεΐνη-ιχνηθέτης, ως προς τη ζώνη πρωτεΐνη-ιχνηθέτης, λόγω αύξησης του μοριακού βάρους του συμπλόκου.

5.5.1 Σύνθεση και προετοιμασία δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων

Η σύνθεση των μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων πραγματοποιείται σε συσκευή αυτόματης σύνθεσης DNA (DNA synthesizer) της Applied Biosystems. Τα ολιγονουκλεοτίδια καθίστανται δίκλινα με θέρμανση στους 95⁰C ισομοριακής ποσότητας των δύο αλυσίδων DNA, παρουσία 0.125mM NaCl, για 5 min και αργή ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου.

5.5.2 Ραδιοσήμανση ολιγονουκλεοτιδίων

Τα ολιγονουκλεοτίδια σημαίνονται στο 5' άκρο με γ -³²P-ATP με τη δράση της T4 πολυνουκλεοτιδικής κινάσης (End labelling-σήμανση άκρου, Maniatis et al, 1989). Για μονόκλωνο DNA, η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 37⁰C για 2 ώρες

παρουσία 10 U T4 πολυνουκλεοτιδικής κινάσης, 10mM MgCl₂, 20mM Tris-HCl pH 7.8, 5mM DTT, 2.5 pmoles από κάθε αλυσίδα DNA και 30 μCi γ-³²P-ATP. Ακολούθως, τα σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια καθίστανται δίκλωνα. Για δίκλωνο DNA, η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 37⁰C για 30 min, παρουσία 10 U T4 πολυνουκλεοτιδικής κινάσης, 10mM MgCl₂, 20mM Tris-HCl pH 7.8, 30mM DTT, 0.2 μg δίκλωνου DNA και 30 μCi γ-³²P-ATP. Ακολουθεί επώαση στους 70⁰C, 10 min, στους 37⁰C, 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου, 5 min, στους 0⁰C, 5 min.

Στη συνέχεια, το σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 8% , 29 w/w ακρυλαμίδιο: 1 w/w 1,2-διυδροξυ-αιθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο (bis), για να διαχωριστεί από το μη ενσωματωμένο γ-³²P-ATP και εκχυλίζεται από το πολυακρυλαμίδιο με 500μl ddH₂O, στους 37⁰C, για 12 ώρες.

5.5.3 Αντίδραση πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο μόριο ιχνηθέτη

Ο ιχνηθέτης (200 cps) και οι πυρηνικές πρωτεΐνες (20 μg) επωάζονται σε διάλυμα πρόσδεσης (binding buffer) για 30 min στους 0⁰C. Τα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 4%-6% (ακρυλαμίδιο: bis= 29: 1), σε 0.5X TBE (150V, θερμοκρασία δωματίου, 3-4 ώρες). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα ξηραίνεται και εκτίθεται σε φιλμ ακτίνων X (RX Fuji, Japan) στους -70⁰C. Το διάλυμα πρόσδεσης (binding buffer) περιλαμβάνει συνήθως ρυθμιστικό διάλυμα (Tris-HCl), γλυκερόλη για το "φόρτωμα" στο πήκτωμα, αναγωγικούς παράγοντες (DTT), αναστολείς των πρωτεασών (PMSF), μη ειδικό DNA για αύξηση της ειδικότητας πρόσδεσης -poly (dl-dC)- και άλατα. Η ακριβής σύστασή του καθορίζεται ανάλογα με το είδος της πρωτεΐνης και του ιχνηθέτη που αλληλεπιδρούν. Χρησιμοποιήθηκαν τρία είδη διαλυμάτων πρόσδεσης: το διάλυμα I στα πειράματα που σχετίζονταν με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, το διάλυμα II στα πειράματα που σχετίζονταν με την

πρωτεΐνη P53 και το διάλυμα III για τα πειράματα τα σχετικά με τον υποδοχέα των οιστρογόνων.

- Διάλυμα πρόσδεσης I (Zachos et al, 1995): 50mM Hepes pH 8.0, 500mM NaCl, 0.5mM PMSF, 0.5μg/ ml BSA, 20% γλυκερόλη, 1mM EDTA, 1mM DTT και 150mg/ml poly (dl-dC).
- Διάλυμα πρόσδεσης II (Halazonetis et al, 1993a): 50mM NaCl, 10mM Tris pH 8.0, 0.1mM οξικός ψευδάργυρος (ZnOAc), 1mM DTT, 5% γλυκερόλη, 150mg/ml poly (dl-dC).
- Διάλυμα πρόσδεσης III (Ali et al, 1993): 10mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5mM EDTA, 80mM KCl, 5% γλυκερόλη, 0.5mM DTT και 150mg/ml poly (dl-dC).

5.5.4 Πειράματα ανταγωνισμού-χρήση αντισωμάτων

Η αντίδραση σύνδεσης λαμβάνει χώρα και παρουσία ανταγωνιστών (competitors) για έλεγχο της ειδικότητας της αντίδρασης, ή αντισωμάτων για ταυτοποίηση των προσδεδεδμένων πρωτεϊνών. Στις περιπτώσεις αυτές, οι πρωτεΐνες προεπιάζονται με τους ανταγωνιστές ή τα αντισώματα για 10-20 min και ακολουθεί η προσθήκη των ιχνηθετών. Οι ανταγωνιστές είναι μη σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια, ομόλογα ή μη με τους ανιχνευτές, που προστίθενται στο μίγμα της αντίδρασης σε μεγάλη περίσσεια ως προς τους ανιχνευτές (1:50- 1:300).

5.6 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου προκύπτει από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του bis-ακρυλαμιδίου, παρουσία ελευθέρων ριζών, με τη βοήθεια καταλύτη. Συνήθως, ως δότης ελευθέρων ριζών χρησιμοποιείται το υπερθειικό αμμώνιο (APS) και ως καταλύτης η τετραμέθυλ-αιθυλεν-διαμίνη (TEMED). Για την παρασκευή ενός πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου 4%, όγκου 55 ml προστίθενται

τα εξής: 7.35 ml από stock διάλυμα πολυακρυλαμιδίου 30%, 6.05 ml 5X TBE, 40.85 ml απεσταγμένο ύδωρ και 500 μl υπερθειικό αμμώνιο 10%. Το μίγμα αναδεύεται, διηθείται μέσω φίλτρου με διάμετρο πόρου 0.45 μm και απαερώνεται με αντλία κενού. Στη συνέχεια προστίθενται 50 μl TEMED. Το μίγμα αφήνεται να πολυμερισθεί για 20 περίπου min και στη συνέχεια τα δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα αφού αναμιχθούν με 1/10 του όγκου διαλύματος φόρτωσης (loading buffer). Πριν την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα προτρέχεται για 15 min.

5.7 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης διαλύεται σε διάλυμα 0.5 x TBE και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για 5 min περίπου. Αφήνεται να κρυώσει έως τους 60°C και προστίθεται βρωμιούχο εθίδιο (EtBr) σε τελική συγκέντρωση 0.5 μg/ml. Το στερεοποιημένο πήκτωμα μετά την αφαίρεση της "κτένας", η οποία δημιουργεί τα "πηγάδια" για το φόρτωμα των δειγμάτων, εμβαπτίζεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 0.5 X TBE. Τα δείγματα φορτώνονται αφού αναμιχθούν με 1/10 του όγκου διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) και εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

- Διάλυμα TBE: 10.8g/l Tris, 5.5g/l βορικό οξύ, 0.002M EDTA.
- Διάλυμα φόρτωσης (loading buffer): 0.25% μπλέ της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλενίου, 25% φικόλη.

5.8 Εκχύλιση DNA από νωπούς ιστούς

Για την εκχύλιση χρωμοσωμικού DNA από νωπούς ιστούς, οι οποίοι διατηρούνται στους -70°C έως ότου να χρησιμοποιηθούν, προηγείται τεμάχισμα

του όγκου σε πολύ μικρά τμήματα με νυστέρι, τα οποία μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf 1.5 ml και στη συνέχεια προστίθενται 400 μl διαλύματος λύσης και πρωτεΐνάση K. Τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια προστίθεται ξανά πρωτεΐνάση K και τα δείγματα επωάζονται για άλλες 24 ώρες. Η απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης K γίνεται με βρασμό των δειγμάτων για 10 min ή με εκχύλιση των δειγμάτων με φαινόλη-χλωροφόρμιο. Στην υδατική φάση προστίθεται 1/20 του όγκου 5 M NaCl και 2.5 όγκοι ψυχρής (-20°C) απόλυτης αιθανόλης για την κατακρήμνιση του DNA. Το DNA επανακτάται με φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 15 min στους 4°C, πλένεται με ψυχρή αιθανόλη 70%, αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε 30 μl απεσταγμένου ύδατος.

- Διάλυμα λύσης: 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 25mM EDTA, 0.5% SDS και 100μg/ml πρωτεΐνάση K.

5.9 Εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο

Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από υδατικά διαλύματα DNA. Το υδατικό διάλυμα αναμιγνύεται με ίσο όγκο φαινόλης, φυγοκεντρείται (12000 rpm, 1 min) ώστε να διαχωριστεί η υδατική φάση από την οργανική και στη συνέχεια η υδατική φάση μεταφέρεται σε καινούργιο erpendorf και επανεκχυλίζεται με ίσο όγκο μίγματος φαινόλης/ χλωροφορμίου 1:1. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και η υδατική φάση επανεκχυλίζεται με ίσο όγκο χλωροφορμίου. Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη και NaCl.

5.10 Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση είναι μια *in vitro* ενζυμική σύνθεση τμημάτων DNA με τη βοήθεια δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων (primers) που

ευρίσκονται εκατέρωθεν της περιοχής του δίκλωνου DNA που πρόκειται να επιμηκυνθεί (Saiki et al, 1988).

Η αντίδραση PCR (50 μ l) που χρησιμοποιήθηκε για το γονίδιο p53 περιλαμβάνει: 250 ng DNA γονιδιώματος, 0.4 μ M από κάθε εκκινητή, 2.5 units Taq πολυμεράση, 5 μ l ρυθμιστικού διαλύματος 10X και 0.3mM dNTPs. Οι αντιδράσεις αρχικά αποδιατάχτηκαν στους 98 $^{\circ}$ C, για 10 min, και ψύχθηκαν στους 90 $^{\circ}$ C. Ακολούθως, προστέθηκε η πολυμεράση και το DNA ενισχύθηκε για 30 κύκλους: 95 $^{\circ}$ C για 1 min, 58 $^{\circ}$ C για 1 min, 70 $^{\circ}$ C για 4 min. 5 μ l δείγματος αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και παρατηρήθηκαν με υπεριώδη ακτινοβολία.

5.11 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με ζεύγη εκκινητών που ευρίσκονται το ένα εσωτερικά του άλλου (nested PCR)-ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονής αλύσου (SSCP analysis)

Κατά το nested PCR, το μεγάλο τμήμα DNA που παρήχθη από το πρώτο PCR χρησιμοποιείται ως μήτρα για δεύτερο PCR, με ζεύγος εκκινητών ευρισκόμενο εσωτερικά του πρώτου. Με αυτή τη μέθοδο αυξάνεται η ειδικότητα του προϊόντος που ενισχύεται, διότι, μετά το πρώτο PCR, τα μη ειδικά προϊόντα που ίσως έχουν παραχθεί είναι απίθανο να έχουν ικανό ποσοστό συμπληρωματικότητας με το δεύτερο ζεύγος εκκινητών, συνεπώς η αλληλουχία στόχος ενισχύεται επιλεκτικά.

Μετά το πρώτο PCR (μέγεθος ενισχυμένου DNA 2.9 kb), 1 μ l από το μίγμα αντίδρασης αναμιγνύεται με 5 μ l 10X ρυθμιστικού διαλύματος Taq πολυμεράσης, 0.3mM dNTPs. 2.5 units Taq πολυμεράσης και 0.4 μ M από κάθε εκκινητή. Χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για τα εξώνια 5, 6 και 7 του γονιδίου p53. Ακολούθως, 5 μ l από το προϊόν προστέθηκαν σε ίσο όγκο διαλύματος λήξης. Τα δείγματα αποδιατάχθηκαν στους 95 $^{\circ}$ C για 10 min,

τοποθετήθηκαν αμέσως σε πάγο για να μην επαναδιαταχθούν οι αλυσίδες του DNA και ηλεκτροφορήθηκαν σε 8% πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (19: 1, ακρυλαμίδιο: bis ακρυλαμίδιο), σε θερμοκρασία δωματίου. Παρατήρηση του πηκτώματος έγινε μετά από χρώση αυτού με νιτρικό άργυρο.

- Ρυθμιστικό διάλυμα *Taq* πολυμεράσης 10X(Advanced Biotechnologies): 20mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 75mM Tris-HCl pH 9.0, 0.01% (w/v) Tween 20. Το MgCl_2 προστίθεται στη συνέχεια σε συγκέντρωση 2.25-2.5mM.

- Διάλυμα λήξης (United States Biochemicals, Ohio): 95% φορμαμίδιο, 20mM EDTA, 0.05% κυανό της βρωμοφαινόλης, 0.05% κυανό του ξυλενίου.

5.12 Χρώση DNA με νιτρικό άργυρο (silver staining)

Με τη χημική αναγωγή ιόντων αργύρου επιτυγχάνεται η ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων σε ποσότητες ng. Ακολουθήθηκε η μέθοδος φωτοχημικής αναγωγής του αργύρου, κάτω από αλκαλικές συνθήκες (Bassam et al, 1991).

Αναλυτικά, το πήκτωμα βυθίζεται σε διάλυμα μονιμοποίησης (fixer), για 10 min. Ακολούθως, επωάζεται για 10 min σε διάλυμα νιτρικού αργύρου, απουσία φωτός. Ακολουθούν δύο στιγμιαία ξεπλύματα με νερό και προσθήκη διαλύματος ανάπτυξης (developer), έως ότου εμφανιστούν οι επιθυμητές ζώνες. Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου, για 15 min. Όλες οι επωάσεις γίνονται υπό ανάδευση.

- Διάλυμα μονιμοποίησης: 10% αιθανόλη, 0.5% οξικό οξύ.
- Διάλυμα νιτρικού αργύρου: 0.1% νιτρικός άργυρος.
- Διάλυμα ανάπτυξης: 0.3M NaOH, 0.15% φορμαλδεύδη.
- Διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3): 7mM Na_2CO_3 .

5.13 Δοκιμασία εκκρινόμενης αλκαλικής φωσφατάσης (SEcreted Alkaline Phosphatase assay, SEAP assay)

Για τον καθορισμό των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης χρησιμοποιούνται διάφορες μεθοδολογίες οι οποίες στηρίζονται στην κατασκευή με μεθόδους γενετικής μηχανικής πλασμιδίων αναφοράς που περιλαμβάνουν γονίδια αναφοράς συντηγμένα με την υπό έλεγχο αλληλουχία (υποκινητής, ενισχυτής, κλ.π.). Ως τέτοιο γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιείται αυτό της εκκρινόμενης μορφής της αλκαλικής φωσφατάσης (SEAP) του ανθρώπινου πλακούντα (φυσιολογικά το ένζυμο δεν εκκρίνεται από τα ευκαρυωτικά κύτταρα), (Berger et al, 1988). Το ένζυμο μπορεί να μετρηθεί με χρωματομετρική μέθοδο.

48 ώρες μετά από επιμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων με το πλασμιδιακό DNA (10 μg από τα pSV2 πλασμίδια και 20 μg από το πλασμίδιο αναφοράς), 1 ml από το υπερκείμενο θρεπτικό μέσο λαμβάνεται, θερμαίνεται στους 65⁰C για 10 min, για αναστολή ενεργότητας τυχόν ενδογενούς ενζύμου, και φυγοκεντρείται, 13000 στροφές ανα λεπτό (rpm), για 10 min. 100 μl υγρού αναμιγνύονται με 10x ρυθμιστικού διαλύματος SEAP, μέχρι τελικού όγκου 200 μl. Ακολουθεί προεπάση στους 37⁰C, για 10 min και προσθήκη 20 μl διαλύματος υποστρώματος. Μετά από 1 min μετρείται η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 405 nm.

- Ρυθμιστικό διάλυμα SEAP 10x: 10M διεθανολαμίνη pH 9.8, 5mM MgCl₂, 100mM L-ομοαργινίνη.
- Διάλυμα υποστρώματος: 120mM π-νιτρο-φαινυλ-φωσφορικό οξύ (NPP), σε ρυθμιστικό διάλυμα SEAP.

5.14 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Οι ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών γίνονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, κάτω από συνθήκες που ευνοούν το διαχωρισμό των πρωτεϊνών στις πολυπεπτιδικές τους υπομονάδες. Συνήθως χρησιμοποιούνται το ανιονικό απορρυπαντικό θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο (SDS) σε συνδυασμό με κάποιο αναγωγικό παράγοντα και θέρμανση, για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών πριν την ηλεκτροφόρηση. Τα αποδιαταγμένα πολυπεπτίδια προσδένουν το SDS σε ποσότητα ανάλογη του μοριακού τους βάρους και αποκτούν φορτίο αρνητικό. Με αυτόν τον τρόπο, κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, τα συμπλέγματα πολυπεπτιδίων-SDS μετακινούνται στο πήκτωμα σε αποστάσεις ανάλογες των μοριακών τους βαρών.

Το διάλυμα των πρωτεϊνών αναμιγνύεται με ίσο όγκο 2X διαλύματος φόρτωσης SDS πήκτωματος, θερμαίνεται στους 95⁰C, για 10 min και φορτώνεται στην κορυφή κατακόρυφου αποδιατακτικού πήκτωματος SDS πολυακρυλαμιδίου, 10%, 29: 1, ακρυλαμίδιο: bis ακρυλαμίδιο. Για την παρασκευή ενός πήκτωματος SDS πολυακρυλαμιδίου 10%, όγκου 10 ml, προστίθενται τα εξής: 3.3 ml από stock διάλυμα πολυακρυλαμιδίου 30%, 2.5 ml 1.5M Tris pH 8.8, 0.1 ml SDS 10% , 4 ml απεσταγμένο ύδωρ, 100 μl υπερθειϊκό αμμώνιο 10% και 10 μl TEMED. Πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού (separating) προστίθεται πήκτωμα συμπύκνωσης (stacking), το οποίο χρησιμεύει στην ταυτόχρονη είσοδο όλων των πολυπεπτιδίων στο πήκτωμα διαχωρισμού. Για την παρασκευή ενός πήκτωματος συμπύκνωσης 5%, όγκου 3 ml, προστίθενται τα εξής: 0.5 ml από stock διάλυμα πολυακρυλαμιδίου 30%, 0.38 ml 1M Tris pH 6.8, 0.03 ml SDS 10% , 2.1 ml απεσταγμένο ύδωρ, 30 μl υπερθειϊκό αμμώνιο 10% και 3 μl TEMED. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση για 45 min, 300 Volts, σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης Tris-γλυκίνης. Το πήκτωμα δεν προτρέχεται για να μην καταστραφεί η ασυνέχεια του pH των

πηκτωμάτων συμπύκνωσης- διαχωρισμού. Ακολουθεί χρώση ή μεταφορά πρωτεϊνών κατά Western.

- Διάλυμα φόρτωσης SDS πηκτώματος 2X (2X SDS gel- loading buffer): 100mM Tris pH 6.8, 200mM Διθειοθρεϊτόλη (DTT), 4% SDS, 0.2% κυανό της βρωμοφαινόλης, 20% γλυκερόλη.
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης Tris-γλυκίνης: 25mM Tris, 0.1% SDS, 250mM γλυκίνη.

5.15 Μεταφορά πρωτεϊνών κατά Western

Με την τεχνική αυτή οι πρωτεΐνες μετά την ηλεκτροφόρηση μεταφέρονται σε στερεό υπόβαθρο (φύλλα νιτροκυτταρίνης), ώστε να ακολουθήσει ανοσοσύτωση (Towbin et al, 1979).

Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα τοποθετείται σε επαφή με φύλλο νιτροκυτταρίνης, μέσα σε πλέγμα ευρισκόμενο σε ηλεκτρικό πεδίο, με τη νιτροκυτταρίνη προς το θετικό πόλο, ως εξής: πλέγμα-χαρτί Whatman 3MM-πήκτωμα-νιτροκυτταρίνη-χαρτί Whatman 3MM-πλέγμα. Πριν την τοποθέτηση, το πήκτωμα ξεπλένεται με απεσταγμένο ύδωρ. Κατά την τοποθέτηση πρέπει μεταξύ πηκτώματος-νιτροκυτταρίνης να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρα. Χρησιμοποιείται διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) και εφαρμόζεται ρεύμα 1 mA/ cm², για 3 ώρες. Μετά τη μεταφορά, οι πρωτεΐνες γίνονται ορατές πάνω στη νιτροκυτταρίνη με χρώση 1 min με διάλυμα Ponceau S, υπό ανάδευση και ξέπλυμα με απεσταγμένο ύδωρ.

- Διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer): 39mM γλυκίνη, 48mM Tris, 0.037% SDS, 20% μεθανόλη.
- Διάλυμα Ponceau S: 0.2% Ponceau S, 3% τριχλωροξικό οξύ (TCA).

5.16 Ανοσοσύπωση πρωτεϊνών (Immunoblotting)

Μετά τη μεταφορά, ακολουθεί ανοσοσύπωση για την ανίχνευση του επίτοπου μιας πρωτεΐνης έναντι του αντισώματος ελέγχου. Η τεχνική περιλαμβάνει τρία στάδια: κατάληψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης, επώαση με το αντίσωμα ελέγχου και επώαση με ένα δεύτερο αντίσωμα έναντι της συντηρημένης σε όλα τα IgG αντισώματα Fc περιοχής του πρώτου, το οποίο φέρει κάποιο μόριο ιχνηθέτη, για παράδειγμα ένζυμο που δίνει έγχρωμο προϊόν, ραδιοϊσότοπο, κ.λπ. Μεταξύ των σταδίων γίνονται πλυσίματα της μεμβράνης.

Κατά την παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε δεύτερο αντίσωμα, έναντι του IgG του ποντικού, ενωμένο με υπεροξειδάση αγριοραφανίδας (horseradish peroxidase) και η ανίχνευση έγινε με χημειοφωταύγεια, με τη βοήθεια του ECL kit (Amersham). Αρχικά, η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα σκόνης γάλακτος με χαμηλά λιπαρά 5% σε διάλυμα TBS-T, για 1 ώρα και ξεπλένεται με TBS-T, τρεις φορές, 1X 15 min και 2X 5 min. Ακολούθως, επωάζεται με το πρώτο, αντι-p53 DO-1 αντίσωμα, 1:200 σε TBS-T, για 12 ώρες, στους 4⁰C και ξεπλένεται με TBS-T, 1X 15 min, 2X 5 min. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με δεύτερο αντίσωμα, αραιωμένο 1:2000 σε TBS-T, για 2 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου, και ξεπλένεται με TBS-T, 1X 15 min, 4X 5 min. Τέλος, γίνεται η ανίχνευση του συμπλέγματος αντιγόνο-αντι-p53 αντίσωμα με ανάμιξη των αντιδραστηρίων 1 και 2 του kit, 0.125 ml/ cm², 1 min, έκθεση της μεμβράνης σε φιλμ ακτίνων X και εμφάνιση 2-3 min αργότερα. Το αντιδραστήριο 1 περιέχει υπεροξειδίο, το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για το ένζυμο, και το 2 λουμινόλη και ενισχυτή για τη φωταύγεια.

- Διάλυμα TBS-T pH 7.6: 20mM Tris, 137mM NaCl, 1M HCl, 0.1% Tween-20.

5.17 Σάρωση σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (Computer scanning)

Η σάρωση της αλληλουχίας του *c-H-ras1* γονιδίου (Caron et al, 1983) σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (H/Y) έγινε με πρόγραμμα ανάλυσης αλληλουχίας Cyborg/Pustell, σε H/Y Macintosh Quadra 840 AV. Χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες 5'-TGTTCT-3' και η συμπληρωματική 5'-AGAACA-3' για τα GREs, οι αλληλουχίες 5'-TGACCT-3' και 5'-AGGTCA-3' για τα EREs και η αλληλουχία 5'-RRRCWWGYYY-3', για τα στοιχεία που προσδέουν την p53 πρωτεΐνη.

B. Υλικά

5.18 Κυτταρικές σειρές-βακτηριακά στελέχη

- Χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα ανθρώπου, από επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας (HeLa), καρκινικά κύτταρα ινοβλαστών του ποντικού (LTK⁻) και κύτταρα από οστεοσάρκωμα του ανθρώπου (Saos-2).
- Βακτήρια *Escherichia coli*, DH5a-BRL.

5.19 Υλικό βιοψίας

- Οι ιστοί ενδομητρίων και ωοθηκών προήλθαν από το νοσοκομείο "Αλεξάνδρα", Αθήνα.
- Οι ιστοί μαστών προήλθαν από το νοσοκομείο "Ελενα", Αθήνα.
- Οι ιστοί κεφαλής και τραχήλου προήλθαν από το "Ιπποκράτειο" νοσοκομείο, Αθήνα.

5.20 Ολιγονουκλεοτίδια

Για τα πειράματα που αφορούν τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία έχουν Hind III άκρα: ολιγονουκλεοτίδιο μάρτυρας hMTIIA, που περιέχει το GRE του υποκινητή του γονιδίου της μεταλλοθειονίνης IIA του ανθρώπου: 5'-AGCTTGGTACACTG-TGTCCTGAATTCA-3' (Karin et al, 1984). Ολιγονουκλεοτίδιο ras GRE που περιέχει το H-ras GRE: 5'- AGCTTTCCGCCGTGGCCAGAC-CTGTTCTGGAGGACA-3' (Zachos et al, 1995).

Για τον υποδοχέα των οιστρογόνων, χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία έχουν Hind III άκρα: ολιγονουκλεοτίδιο μάρτυρας Vitellogenin ERE, που περιέχει το ERE του γονιδίου της μεταλλοθειονίνης A2 του *Xenopus*: 5'-AGCTTC-AAAGTCAGGTCACAGGTACCTGATCAAAGA-3' (Kumar et al, 1988). Ολιγονουκλεοτίδιο ras ERE, που περιέχει το H-ras ERE: 5'-AGCTTGGGCCCCGGG-CCACCCTGACCTTTGAGGGGA-3' (Zachos et al, 1995).

Για την p53 πρωτεΐνη, χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια: ολιγονουκλεοτίδιο μάρτυρας BC που περιέχει το p53 στοιχείο: 5'-CCGGGCATGTCCGGGCATGTCCGGGCATGT-3' (Halazonetis et al, 1993b). Ολιγονουκλεοτίδιο μάρτυρας BC-S21, που έχει 21 βάσεις διάστημα ανάμεσα στα p53 μισά τμήματα: 5'-TATGGGCATGTCCTATATATATATGCGTATATATATGGGCATGTCCTAT-3' (Halazonetis et al, 1993b). Ολιγονουκλεοτίδιο MDM-2, που περιέχει το p53 στοιχείο του γονιδίου *mdm-2*: 5'-GGCTGGTCAAGTTGCGTCCGGCGTCCGGCTGTCCGAGGAGCTAAGTCCTGACATGTCTCCAG-3' (Juven et al, 1993). Ολιγονουκλεοτίδιο Ep21, που περιλαμβάνει το p53 στοιχείο του γονιδίου *p21/waf 1/ cip 1*: 5'-CCCGAACATGTCCCAACATGTTGGGG-3' (El-Deiry et al, 1992). Ολιγονουκλεοτίδιο Eras 2HS, που περιλαμβάνει τα δύο συνεχόμενα p53 μισά τμήματα του H-ras, με Hind III συμβατά άκρα: 5'-AGCTTGGCACTAGCCTGCCCGGGCACGCCGTGGCGA-3' (Zoumpourlis et al, 1995). Ολιγονουκλεοτίδιο Eras 3HS, που περιλαμβάνει και τις τρεις p53 επαναλήψεις: 5'-GCGGGGCCTGCA-GGCTGGCACTAGCCTGCCCGGGCACGCCGTGG-3' (Spandidos et al, 1995).

Ακόμη, στα πειράματα ανταγωνισμού, χρησιμοποιήθηκαν ως μη ειδικοί ανταγωνιστές τα ακόλουθα ολιγονουκλεοτίδια:

Σε ό,τι αφορά τους ορμονικούς υποδοχείς, το ολιγονουκλεοτίδιο SP-1, που περιλαμβάνει αλληλουχίες πρόσδεσης του Sp-1 μεταγραφικού παράγοντα στον υποκινητή των πρώιμων γονιδίων του ιού HSV: 5'-GATCTTGGTCCGCGCCCCGCC-

pGEMhr53Δ364-393 (Waterman et al, 1995), που κωδικοποιούν την "φυσικού τύπου" p53 πρωτεΐνη του ανθρώπου και μία μορφή της από την οποία λείπουν τα τελευταία 30 αμινοξέα, αντίστοιχα. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pGEMhr53His175B, pGEMhr53His273B, pGEMhr53Gln248B και pGEMhr53Trp248B, που κωδικοποιούν μορφές της πρωτεΐνης με σημειακές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 175, 273 και 248, αντίστοιχα (Waterman et al, 1995). Τα πλασμίδια pSV2hr53B και pSV2hr53BHis273 διαφέρουν στο φορέα από τα αντίστοιχα pGEM (Halazonetis et al, 1993a). Το πλασμίδιο pBC12/PLseap, περιέχει τις κωδικές αλληλουχίες του γονιδίου της εκκρινόμενης αλκαλικής φωσφατάσης του ανθρώπου (SEAP), χωρίς αλληλουχίες υποκινητή ή ενισχυτή (Berger et al, 1988). Το πλασμίδιο pTKseap περιλαμβάνει τον υποκινητή της κινάσης της θυμιδίνης μπροστά από τις SEAP κωδικές αλληλουχίες (Halazonetis, 1992). Τέλος, τα πλασμίδια pEr21/TKseap και pEras3HS/TKseap, περιέχουν ένα αντίγραφο των ολιγονουκλεοτιδίων Er21 και Eras3HS, αντίστοιχα, κλωνοποιημένο μπροστά από τον υποκινητή της κινάσης της θυμιδίνης του πλασμιδίου pTKseap (Spandidos et al, 1995).

5.23 Αντισώματα

- Αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών του ανθρώπου: BuGR2 (PA1-510, Affinity Bioreagents).
- Αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των οιστρογόνων του ανθρώπου: (F3, προσφορά του Δρ L Tora, IGBMC, Στρασβούργο, Γαλλία).
- Αντισώματα έναντι της p53 πρωτεΐνης του ανθρώπου: DO-1 (προσφορά του Δρ D Lane), Pab 1801 (Oncogene Science, Inc. Manhasset, NY), Pab 421 (Oncogene Science, Uniondale, NY).

Τα σχήματα της διατριβής έγιναν με τη βοήθεια του προγράμματος Aldus Super Paint 3.0 και Power Point 3.0.

5.24 Χημικά και εταιρία προέλευσης

1,2-διυδροξυ-αιθύλενο-δισ-ακρυλαμίδιο (Bis-acrylamide) - BDH

γ-³²P-ATP υδατικό διάλυμα 6000 Ci/mmol - Amersham

Άγαρ (Agar) - Difco

Αγαρόζη (Agarose) - BRL

Αιθανόλη (Ethanol) - BDH

Αιθυλο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA) - BDH

Ακέτυλο-συνένζυμο-A (Acetyl-CoA) - Sigma

Ακρυλαμίδιο (Acrylamide) -BDH

Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin) -Sigma

Αμπικιλίνη - Sigma

Αναστολείς πρωτεασών: Απροτινίνη (aprotinin), πεπστατίνη (pepstatin), αντιπαΐνη (antipain) και λευπεπτίνη (leupeptin) - Sigma

Αντιβιοτικά για τα θρεπτικά υλικά της κυτταροκαλλιέργειας: Στρεπτομυκίνη (Streptomycin), Πενικιλίνη (Penicillin) - Φαρμακείο Α. Βυζά

Αντιδραστήριο (χρωστική) Bradford - Biorad

Βορικό οξύ (Boric Acid) - BDH

Βρωμιούχο εθίδιο (Ethidium Bromide) - Sigma

Γλυκερόλη (Glycerol) -BRL

Γλυκόζη (Glucose) - Sigma

dNTPs - Boehringer Mannheim

Διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol, DTT) - Sigma

Διμέθυλο- σουλφοξειδίο- (DMSO, Dimethyl sulfoxide) - Sigma

ECL kit-Amersham

Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract) - Difco

Ένζυμα περιορισμού (Restriction enzymes):

BamHI - New England Biolabs

EcoRI - New England Biolabs

HindIII - New England Biolabs

HaeIII - New England Biolabs

Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιέργειας:

RPMI- Gibco

DMEM- Gibco

Θειικό αμμώνιο (Ammonium Sulphate) - Fluka

Θρυψίνη (Trypsin) 0.25% από πάγκρεας χοίρου - Gibco - BRL

Ισοπροπανόλη (Isopropanol) - BDH

Κυανό της βρωμοφαινόλης (Bromophenol Blue) -Sigma

Λάδι PCR (Mineral Oil) - Sigma

Λιγάση (Ligase) -NEB

Λυσοζύμη (Lysozyme) - Sigma

Μεθανόλη (Methanol) - Fluka

Μεμβράνες διαπίδυσης με διάμετρο πόρου 10mm (Dialysis Tubes) -Sigma

Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (cellulosenitrat(e)) - Schleicher & Schuell

Νιτρικός άργυρος (Silver nitrate)-Sigma

Οξικό κάλιο (Potassium acetate) - BDH

Οξικός ψευδάργυρος (Zinc Acetate) - (Sigma)

Ορός εμβρύου μόσχου (Foetal Calf Serum) - Gibco

Poly (dl dC)-Sigma

Πρωτεϊνάση-K (Proteinase K) - Sigma

Σακχαρόζη (Sucrose) - Sigma
SEAP kit - Sigma
SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) - BDH
T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση - Boeringer
Taq πολυμεράση - Advanced Biotechnologies
Τετραμέθυλ-αιθυλεν-διαμίνη (TEMED) - Sigma
Τρυπτόνη (Tryptone) - Difco
Tris βάση- BDH
Triton X-100 - Sigma
Τρυβλία Petri - Αναπλιώτης
Tween-20 - Sigma
4-(2-Υδροξυαιθύλ)-1-πιπεραζίν-αιθύλο-θειικό οξύ (Hepes) - Boehringer Mannheim
Υδροξείδιο του νατρίου (Sodium Hydroxide) - BDH
Υδροχλωρικό οξύ (Hydrochloric Acid) - BDH
Υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium Persulfate) - BRL
Φορμαλδεύδη (Formaldehyde)-Sigma
Φαινύλ-μεθύλ-σουλφόνυλο-φθορίδιο (PMSF) (phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride) -
Sigma
Φικόλλη (Ficoll)- Sigma
Φιλμ αυτοραδιογραφίας (hyperfilm β-max) - Amersham
Φιλμ ακτίνων Χ- Fuji
Φιλμ υπεριώδους ακτινοβολίας - Polaroid
Φίλτρα με διάμετρο πόρου 0.22 και 0.45 μm - Millipore
Φαινόλη (Phenol) - BDH
Φωσφορικό ασβέστιο, άνυδρο (Calcium Phosphate-Anhydrous) -BRL
Φωσφορικό όξινο και δισόξινο νάτριο, (Sodium hydrogen-dihydrogen Phosphate)-
BDH

Χλωριούχο ασβέστιο (Calcium Chloride) -BDH
Χλωριούχο καίσιο (Caesium Chloride) - BRL
Χλωριούχο κάλιο (Potassium Chloride) - Fluca
Χλωριούχο μαγνήσιο (Magnesium Chloride) - Fluca
Χλωριούχο νάτριο (Sodium Chloride) - Fluca
Χλωριούχο ρουβίδιο (Rubidium Chloride)- Sigma
Χλωροφόρμιο (Chloroform) - Fluka

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής

Το πρωτο-ογκογονίδιο *H-ras* εμπλέκεται σε πολλούς τύπους νεοπλασιών του ανθρώπου, τόσο μέσω μετάλλαξης, όσο και μέσω διαταραχών των επιπέδων έκφρασης. Μελέτες σε κυτταροκαλιέργεια έδειξαν άμεση σχέση μεταξύ της υπερέκφρασης του *H-ras*, μεταλλαγμένου ή όχι, και της ικανότητας των κυττάρων να μεταπίπτουν σε καρκινικά (Spandidos and Wilkie, 1984, Spandidos, 1986, Egan et al, 1987). Μελέτες σε όγκους του ανθρώπου δείχνουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των *ras* γονιδίων σε μια ποικιλία καρκινικών ιστών, σε σχέση με τον φυσιολογικό (Spandidos, 1991). Κατά συνέπεια, η διερεύνηση των μηχανισμών και των παραγόντων που ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου *H-ras*, δύναται να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την ογκογένεση στον άνθρωπο.

Κατά την παρούσα μελέτη, ανιχνεύθηκαν στην αλληλουχία του *H-ras*, στοιχεία που προσδίδουν ρύθμιση α) από στεροειδείς ορμόνες και συγκεκριμένα από τους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών και των οιστρογόνων, και β) από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν, κατ' αρχήν, η μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης του πρωτο-ογκογονιδίου *H-ras* από τους εν λόγω πρωτεϊνικούς παράγοντες με πειράματα σε κυτταρικές σειρές και, εν συνεχεία, η διερεύνηση της επίδρασής τους στην έκφραση του γονιδίου σε καρκινικούς ιστούς ανθρώπου, σε σύγκριση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό.

A. Ρύθμιση του γονιδίου *H-ras* από τους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών και των οιστρογόνων

Μελετήθηκε η πρόσδεση των υποδοχέων στις αντίστοιχες, ειδικές αλληλουχίες του *H-ras* καθώς και η ενεργότητα αυτών στον γυναικολογικό καρκίνο (Zachos et al, 1995, Zachos et al, 1996a, b).

6.2 Σάρωση της αλληλουχίας του *H-ras1* με ηλεκτρονικό υπολογιστή

Σάρωση της αλληλουχίας του γονιδίου *H-ras1* του ανθρώπου με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή για το μοτίβο στο οποίο προσδέεται ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών 5'-TGTTCT-3' και για το συμπληρωματικό του 5'-AGAACA-3', έδειξε μία μόνο θέση με 100% ομοιότητα με το υψηλά συντηρημένο εξανουκλεοτίδιο, στη θέση 1261, στο πρώτο εσώνιο του *H-ras* γονιδίου (Zachos et al, 1995). Αντίστοιχα, ανάλυση της αλληλουχίας του *H-ras* για την αλληλουχία 5'-TGACCT-3' και τη συμπληρωματική της 5'-AGGTCA-3', στις οποίες προσδέεται ο υποδοχέας των οιστρογόνων, έδειξε ένα πιθανό ERE με 90% ομοιότητα με τη συναινετική αλληλουχία, στη θέση 3016, στο τέταρτο εσώνιο του γονιδίου (Zachos et al, 1995). Η οργάνωση του γονιδίου *c- H-ras1*, η θέση των GRE και ERE και η ομοιότητα της αλληλουχίας τους με τα συναινετικά ολιγονουκλεοτίδια, φαίνονται στην Εικόνα 6.1.

ERE Συναινετική
Αλληλουχία
RAS ERE

c-H-ras

RAS GRE
GRE Συναινετική
Αλληλουχία



Εικ. 6.1: Οργάνωση του γονιδίου *c-H-ras1* του ανθρώπου και θέση των GRE και ERE του *H-ras*. Τα εξώνια απεικονίζονται σαν τετράγωνα, οι κωδικές αλληλουχίες σκιασμένες και το VTR με γραμμώσεις. Οι αστερίσκοι δηλώνουν ομολογία των HREs του *H-ras* με τις αντίστοιχες συναινετικές αλληλουχίες.

6.3 Αναγνώριση των αντίστοιχων πιθανών στοιχείων του *H-ras* από τους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών και των οιστρογόνων

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών προσδένονται με ειδικότητα στα αντίστοιχα στοιχεία του *H-ras*, έγιναν πειράματα καθυστέρησης των πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (gel retardation

assays), όπως περιγράφεται από τους Zachos et al, 1995). Αποδείχθηκε ότι οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών και των οιστρογόνων αναγνωρίζουν με ειδικότητα τις αλληλουχίες του γονιδίου *H-ras*, οι οποίες είχαν προβλεφθεί με χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή.

6.3.1 Πρόσδεση στο *H-ras* του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Τα ολιγονουκλεοτίδια RAS GRE και hMTIIA GRE, τα οποία περιλαμβάνουν το GRE του *H-ras* και το χαρακτηρισμένο GRE του γονιδίου της μεταλλοθειονίνης IIA του ανθρώπου αντίστοιχα, σημάνθηκαν με ^{32}P και χρησιμοποιήθηκαν ως ιχνηθέτες (probes). Πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa και LATK⁻ χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR).

Στην Εικόνα 6.2, φαίνεται η αλληλεπίδραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με το *H-ras* GRE. Οι ιχνηθέτες hMTIIA GRE και RAS GRE επώαστηκαν με πυρηνικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa απουσία (διαδρομές 1 και 7 αντίστοιχα) ή παρουσία περίσσειας μη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων-ανταγωνιστών. Οι ιχνηθέτες ανταγωνίστηκαν με τον εαυτό τους (διαδρομές 2 και 8), μεταξύ τους (διαδρομές 3 και 9) και με τα μη ειδικά σε ό,τι αφορά τα GRE ολιγονουκλεοτίδια SP-1 (διαδρομές 4 και 10), NF-1 (διαδρομές 5 και 11) και HIV-1LTR AP-1 (διαδρομές 6 και 12). Μια κοινή ζώνη παρατηρήθηκε στις διαδρομές 1 και 7, ως αποτέλεσμα της δημιουργίας συμπλέγματος DNA-GR. Η ζώνη αυτή εξαφανίστηκε παρουσία περίσσειας ολιγονουκλεοτιδίων-ανταγωνιστών που σχετίζονταν με GRE, παρέμεινε όμως με αμείωτη ένταση στην περίπτωση των SP-1, NF-1 και HIV-1LTR AP-1. Αντίστοιχη εικόνα προέκυψε και για τον ιχνηθέτη hMTIIA GRE. Η Εικόνα 6.2 δείχνει ότι ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών προσδένεται στο στοιχείο του *H-ras* (κοινή ζώνη στις διαδρομές 1 και 7) και ότι η πρόσδεση αυτή είναι ειδική, δεδομένου ότι η ζώνη GR-DNA εξαφανίζεται μόνο από ανταγωνιστές σχετικούς με GRE.

Μια επιπρόσθετη απόδειξη της ειδικότητας στην αλληλεπίδραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με το *H-ras* GRE, παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.3. Το RAS GRE μόριο-ιχνηθέτης επώαστηκε με πυρηνικό εκχύλισμα κυττάρων HeLa, απουσία (διαδρομή 3), ή παρουσία (διαδρομές 4-6) αυξανόμενων ποσοτήτων πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών του ανθρώπου. Το ολιγονουκλεοτίδιο-μάρτυρας (control) hMTIIA GRE επώαστηκε και αυτό απουσία (διαδρομή 1) ή παρουσία (διαδρομή 2) αντί-GR αντισώματος. Η εισαγωγή αντισώματος στο μίγμα της αντίδρασης είχε ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση της ειδικής ζώνης, δείκνυοντας την ειδική αλληλεπίδραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με το *H-ras* στοιχείο.

Επιπλέον, οι ιχνηθέτες hMTIIA GRE και RAS GRE, επώαστηκαν με αυξανόμενες ποσότητες πυρηνικών εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa (Εικόνα 6.4, διαδρομές 6-11) και LATK⁻ (διαδρομές 1-5), που περιέχουν GR. Παρατηρήθηκε μία κοινή ζώνη GR-DNA, η ένταση της οποίας αυξάνεται με την αύξηση της ποσότητας του πυρηνικού εκχυλίσματος.

Εικ. 6.2: Ειδική πρόσδεση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στο στοιχείο του *H-ras*. Τα μίγματα αντίδρασης περιελάμβαναν εκχύλισμα πυρηνικών πρωτεϊνών κυττάρων HeLa, τους ραδιοσημασμένους ιχνηθέτες hMTIIA GRE (διαδρομές 1-7), RAS GRE (διαδρομές 8-12) και 150X περίσσεια μη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων-ανταγωνιστών (διαδρομές 2-6 και 8-12). Τα συμπλέγματα πρωτεΐνης-DNA διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και έγιναν ορατά με αυτοραδιογραφία. Το σύμπλεγμα GR-RAS GRE δεικνύεται με βέλος.

Εικ. 6.3: Ταυτοποίηση του συμπλέγματος GR-RAS GRE με τη χρήση αντισώματος. Τα μίγματα της αντίδρασης περιείχαν εκχύλισμα πυρηνικών πρωτεϊνών κυττάρων HeLa, τους ραδιοσημασμένους ιχνηθέτες hMTIIA GRE (διαδρομές 1 και 2) και RAS GRE (διαδρομές 3-6) και πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (διαδρομές 2, 4-6).

Εικ. 6.4: Πρόσδεση στο H-*ras* GRE του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών από δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Χρησιμοποιήθηκαν οι ιχνηθέτες hMTIIA GRE (διαδρομές 1-3 και 6-8), RAS GRE (διαδρομές 4, 5 και 9-11) και διαφορετικές ποσότητες πυρηνικών εκχυλισμάτων κυττάρων LATK⁻ (διαδρομές 1-5) και HeLa (διαδρομές 6-11), όπως απεικονίζεται.

6.3.2 Πρόσδεση στο H-*ras* του υποδοχέα των οιστρογόνων

Οι ραδιοσημασμένοι ιχνηθέτες RAS ERE και VITELLOGENIN ERE, οι οποίοι περιλαμβάνουν την αλληλουχία ERE του H-*ras*, και την αλληλουχία που αποκρίνεται σε οιστρογόνα του γονιδίου της Βιτελλογενίνης A2 του *Xenopus*

αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα πρόσδεσης του υποδοχέα των οιστρογόνων. Οι ιχνηθέτες RAS ERE και VITELLOGENIN ERE επώαστηκαν με πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa, απουσία (Εικόνα 6.5, διαδρομές 1 και 5, αντίστοιχα) ή παρουσία περίσσειας μη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων-ανταγωνιστών. Οι ιχνηθέτες ανταγωνίστηκαν για πρόσδεση του υποδοχέα των οιστρογόνων, με ERE-σχετικά (διαδρομές 2 και 6) και μη σχετικά (διαδρομές 3, 4, 7, 8) ολιγονουκλεοτίδια. Μια κοινή ζώνη ER-DNA εντοπίστηκε στις διαδρομές 1 και 5, η οποία εξαφανίστηκε μόνο παρουσία περίσσειας ERE-σχετικών ολιγονουκλεοτιδίων-ανταγωνιστών, δεικνύοντας ειδική πρόσδεση του υποδοχέα των οιστρογόνων στο στοιχείο του *H-ras*.

Εικ. 6.5: Πρόσδεση του υποδοχέα των οιστρογόνων στο ERE του *H-ras*. Το μίγμα αντίδρασης περιείχε τους ραδιοσημασμένους ιχνηθέτες VITELLOGENIN ERE (διαδρομές 1-4), RAS ERE

(διαδρομές 5-8) και πυρηνικό εκχύλισμα πρωτεϊνών από κύτταρα HeLa. Περίσσεια μη σημασμένων ανταγωνιστών RAS ERE (διαδρομή 2) και VITELLOGENIN ERE (διαδρομή 6), καθώς και των μη σχετικών με ERE NF-1 (διαδρομές 3, 7), HIV-1LTR AP-1 (διαδρομές 4, 8) χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανταγωνισμού. Το σύμπλεγμα ER-RAS ERE δεικνύεται με βέλος.

6.4 Έλεγχος των επιπέδων πρόσδεσης των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών από όγκους ενδομητρίου και ωοθήκης του ανθρώπου στα αντίστοιχα στοιχεία του *H-ras*, σε σύγκριση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό

Ακολούθως, χρησιμοποιώντας πυρηνικά εκχυλίσματα από όγκους ενδομητρίου και ωοθήκης του ανθρώπου και από παρακείμενο φυσιολογικό ιστό σε πειράματα καθυστέρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, εξετάστηκαν τα επίπεδα πρόσδεσης των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών και των οιστρογόνων στα αντίστοιχα στοιχεία του *H-ras*. Δείχθηκε αυξημένη πρόσδεση των υποδοχέων στο *H-ras* DNA σε καρκινικό ιστό, σε σύγκριση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό, προτείνοντας εμπλοκή του *H-ras* στον καρκίνο του γυναικείου γεννητικού συστήματος μέσω διαταραχών της ορμονικής ρύθμισης του γονιδίου (Zachos et al, 1996a, b).

6.4.1 Ενεργότητα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε νεοπλασίες του ενδομητρίου και της ωοθήκης

Κατ' αρχήν, εξετάστηκαν τα επίπεδα πρόσδεσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στο αντίστοιχο στοιχείο του *H-ras*, από όγκους ενδομητρίου και ωοθήκης, σε σύγκριση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Το

ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο RAS GRE επώαστηκε με πυρηνικά εκχυλίσματα από καρκινικό (tumor, T) και από γειτονικό φυσιολογικό (normal, N) ιστό ενδομητρίου (Εικόνα 6.6). Σε 10/ 11 ζεύγη καρκινικού-γειτονικού φυσιολογικού ιστού που ελέγχθηκαν, παρατηρήθηκε αυξημένη πρόσδεση του υποδοχέα στο H-ras GRE στον καρκινικό, σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό.

Επιπλέον, σε 10/ 10 ζεύγη όγκων ωοθήκης (T)-γειτονικού φυσιολογικού ιστού (N), παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα πρόσδεσης του GR στο *ras* GRE στον καρκινικό, σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό (Εικόνα 6.7).

Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της ηλικίας του ασθενούς, του σταδίου (stage) και του βαθμού (grade) διαφοροποίησης του καρκινικού ιστού στα δείγματα ενδομητρίου και ωοθήκης που ελέγχθηκαν. Όλοι οι κακοήθεις όγκοι ήταν επιθηλιακής προέλευσης. Με τον όρο "φυσιολογικός ιστός", εννοείται μακροσκοπικά φυσιολογικός ιστός που μικροσκοπικά φαίνεται ομοιόμορφης σύστασης, αποτελούμενος από καλοήγη ιστό.

Προκειμένου να αποδειχθεί η ειδικότητα της αλληλεπίδρασης του RAS GRE από τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, έγιναν πειράματα ανταγωνισμού και χρήσης αντισωμάτων. Το σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο-μάρτυρας hMTIIA GRE και το RAS GRE, επώαστηκαν με πυρηνικό εκχύλισμα καρκινικού ιστού ωοθήκης (Εικόνα 6.8). Η πρόσδεση GR-DNA ανταγωνίστηκε από 200X περίσσεια μη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων που περιείχαν αλληλουχίες πρόσδεσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (διαδρομές 2, 3 και 6, 7), όχι όμως και από το ολιγονουκλεοτίδιο SP-1, το οποίο δεν έχει τέτοια αλληλουχία (διαδρομές 4 και 8).

Ακόμη, οι ραδιενεργοί ιχνηθέτες hMTIIA GRE και RAS GRE επώαστηκαν με πυρηνικό εκχύλισμα από καρκινικό ιστό ενδομητρίου (Εικόνα 6.9). Μία κοινή ζώνη παρατηρήθηκε (διαδρομές 1 και 3), η οποία εξαφανίστηκε παρουσία ποσότητας αντί-GR αντισώματος (διαδρομές 2 και 4), αποδεικνύοντας την ειδικότητα της αλληλεπίδρασης GR-RAS GRE. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα

ανταγωνισμού και χρήσης αντισωμάτων σε πυρηνικά εκχυλίσματα ενδομητρίου και ωοθήκης, αντίστοιχα, με ανάλογα αποτελέσματα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Εικ. 6.6: Αυξημένη πρόσδεση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στο GRE του *H-ras*, σε όγκους ενδομητρίου του ανθρώπου, σε σύγκριση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Το ³²P-σημασμένο μόριο-ιχνηθέτης RAS GRE επώαστηκε με πυρηνικά εκχυλίσματα από όγκους ενδομητρίου του ανθρώπου και από παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. T, καρκινικός ιστός, N, φυσιολογικός ιστός.

Εικ. 6.7: Αυξημένη πρόσδεση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στο GRE του *H-ras*, σε όγκους ωθήκης του ανθρώπου, σε σύγκριση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Το ³²P-σημασμένο μόριο-ιχνηθέτης RAS GRE επώαστηκε με πυρηνικά εκχυλίσματα από όγκους ωθήκης του ανθρώπου και από παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. T, καρκινικός ιστός, N, φυσιολογικός ιστός.

Εικ. 6.8: Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών του ανθρώπου προσδένεται στο GRE του *H-ras* με ειδικότητα. Οι ραδιοσημασμένοι ιχνηθέτες RAS GRE (διαδρομές 1-4) και hMTIIA GRE (διαδρομές 5-8), επώαστηκαν με πυρηνικό εκχύλισμα από καρκινικό ιστό ωοθήκης. 200X περίσσεια μη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων-ανταγωνιστών προστέθηκαν στο μίγμα αντίδρασης (διαδρομές 2-4 και 6-8).

Εικ. 6.9: Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών του ανθρώπου προσδένεται στο GRE του *H-ras* με ειδικό τρόπο. Οι ραδιοσημασμένοι ιχνηθέτες RAS GRE (διαδρομές 3 και 4) και hMTIIA GRE (διαδρομές 1 και 2), επώαστηκαν με πυρηνικό εκχύλισμα από καρκινικό ιστό ενδομητρίου. Στην αντίδραση προστέθηκε 0.5 μg αντί-GR αντισώματος (διαδρομές 2 και 4).

6.4.2 Ενεργότητα του υποδοχέα των οιστρογόνων σε νεοπλασίες της ωθήκης

Ακολουθως, με ανάλογα πειράματα, εξετάσθηκαν τα επίπεδα πρόσδεσης του υποδοχέα των οιστρογόνων από καρκινικό ιστό ωθήκης του ανθρώπου στο *H-ras*

ERE, σε σύγκριση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Το ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο RAS ERE επώαστηκε με πυρηνικά εκχυλίσματα από καρκινικό (T) και από γειτονικό φυσιολογικό (N) ιστό ωθήκης (Εικόνα 6.10). Σε 5/ 5 ζεύγη καρκινικού-γειτονικού φυσιολογικού ιστού που ελέγχθηκαν, παρατηρήθηκε αυξημένη πρόσδεση του υποδοχέα στο H-*ras* ERE στον καρκινικό, έναντι του φυσιολογικού ιστού.

Προκειμένου να αποδειχθεί η ειδικότητα του συμπλόκου ER-RAS ERE, το σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο-μάρτυρας VITELLOGENIN ERE και το RAS ERE, επώαστηκαν με πυρηνικό εκχύλισμα καρκινικού ιστού ωθήκης (Εικόνα 6.11), απουσία (διαδρομές 1 και 5), ή παρουσία 200X περίσσειας μη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων-ανταγωνιστών. Η πρόσδεση ER-DNA ανταγωνίστηκε από ολιγονουκλεοτίδια που περιείχαν αλληλουχίες πρόσδεσης του υποδοχέα των οιστρογόνων (διαδρομές 2, 3 και 6, 7), όχι όμως και από μη σχετικά με ERE ολιγονουκλεοτίδια (διαδρομές 4 και 8).

Τέλος, οι ραδιενεργοί ιχνηθέτες VITELLOGENIN ERE και RAS ERE επώαστηκαν με πυρηνικό εκχύλισμα από καρκινικό ιστό ωθήκης (Εικόνα 6.12). Παρουσία ποσότητας αντί-ER αντισώματος, η κοινή ζώνη εμφανίστηκε ανυψωμένη, λόγω αύξησης του μοριακού βάρους του συμπλόκου πρωτεΐνες-DNA (διαδρομές 2 και 4), αποδεικνύοντας την ειδικότητα της αλληλεπίδρασης ER-RAS ERE.

Εικ. 6.10: Αυξημένη πρόσδεση του υποδοχέα των οιστρογόνων στο ERE του *H-ras*, σε όγκους ωοθήκης του ανθρώπου, σε σύγκριση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Το ^{32}P -σημασμένο μόριο-ιχνηθέτης RAS ERE επώαστηκε με πυρηνικά εκχυλίσματα από όγκους ωοθήκης του ανθρώπου και από παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. T, καρκινικός ιστός, N, φυσιολογικός ιστός.

Εικ. 6.11: Ο υποδοχέας των οιστρογόνων του ανθρώπου προσδένεται στο ERE του *H-ras* με ειδικότητα. Οι ραδιοσημασμένοι RAS ERE (διαδρομές 1-4) και VITELLOGENIN ERE (διαδρομές 5-8) ιχνηθέτες, επώαστηκαν με πυρηνικό εκχύλισμα από καρκινικό ιστό ωοθήκης. 200X περίσσεια μη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων-ανταγωνιστών προστέθηκε στο μίγμα αντίδρασης (διαδρομές 2-4 και 6-8).

Εικ. 6.12: Ο υποδοχέας των οιστρογόνων του ανθρώπου προσδένεται στο ERE του H-*ras* με ειδικό τρόπο. Οι ραδιοσημασμένοι ιχνηθέτες RAS ERE (διαδρομές 3 και 4) και VITELLOGENIN ERE (διαδρομές 1 και 2), επώαστηκαν με πυρηνικό εκχύλισμα από καρκινικό ιστό ωοθήκης. Στο μίγμα αντίδρασης προστέθηκε 0.5 μg αντί-ER αντισώματος F3 (διαδρομές 2 και 4).

Επιπλέον, 4 ζεύγη καρκινικού-γειτονικού φυσιολογικού ιστού μαστού, τα οποία είχαν χαρακτηριστεί ως ER αρνητικά με το τεστ McGuire (McGuire, 1975) χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες σε πειράματα πρόσδεσης στον ιχνηθέτη

RAS ERE, για έλεγχο. Δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές στα επίπεδα πρόσδεσης του υποδοχέα στο DNA, στον καρκινικό έναντι του φυσιολογικού ιστού (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

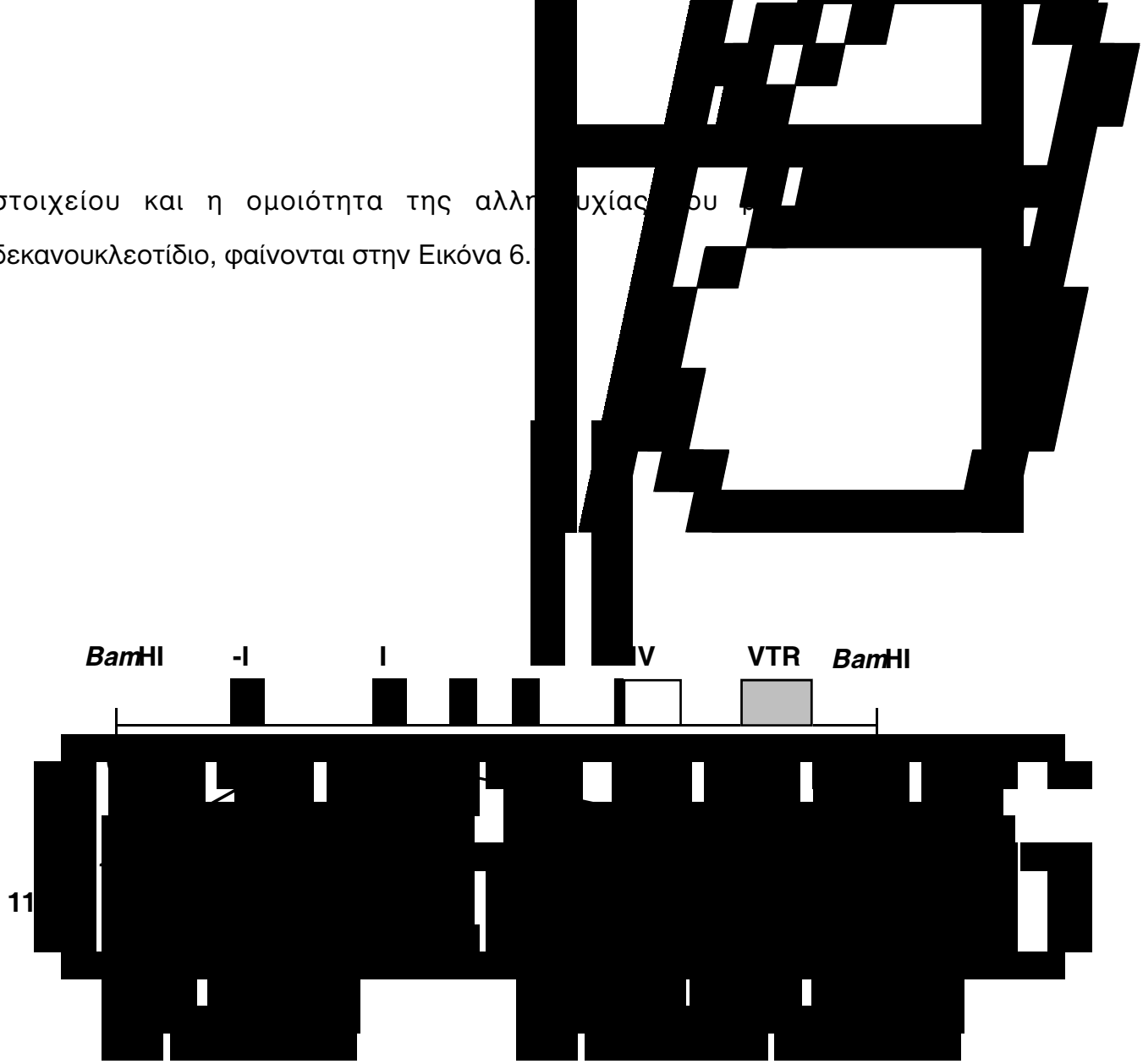
B. Ρύθμιση του γονιδίου *H-ras* από την πρωτεΐνη P53

Μελετήθηκε η πρόσδεση της P53 σε ειδική αλληλουχία του *H-ras*, το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης P53-*H-ras* DNA στην έκφραση του γονιδίου και η ενεργότητα της P53 σε όγκους του ανθρώπου (Spandidos et al, 1995. Zoumpourlis et al, 1995).

6.5 Σάρωση της αλληλουχίας του *H-ras1* με ηλεκτρονικό υπολογιστή

Με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η αλληλουχία του γονιδίου *c-H-ras1*, σαρώθηκε για το δεκανουκλεοτίδιο 5'-RRRCWWGYYY-3 που επαναλαμβανόμενο προσδίδει ρύθμιση στο γονίδιο με απευθείας πρόσδεση της P53. Βρέθηκαν δύο τέτοια συνεχόμενα πεντανουκλεοτίδια που είναι όμοια με τη συναινετική αλληλουχία που αναγνωρίζει η P53 και άλλα τέσσερα με υψηλή ομολογία, τα οποία συνολικά σχηματίζουν τρία δεκανουκλεοτίδια αναγνώρισης της P53. Τα δύο είναι συνεχόμενα (θέση 1218-1237) και το τρίτο ευρίσκεται 8 νουκλεοτίδια πιο "αριστερά" (upstream), στη θέση 1198. Και τα τρία αυτά δεκανουκλεοτίδια ευρίσκονται στο πρώτο εσώνιο του *H-ras* γονιδίου και αποτελούν ένα πιθανό ρυθμιστικό στοιχείο που αναγνωρίζει η πρωτεΐνη P53 (Spandidos et al, 1995, Zoumpourlis et al, 1995). Η οργάνωση του γονιδίου *c-H-ras1*, η θέση του p53

στοιχείου και η ομοιότητα της αλληλουχίας του με το
 δεκανουκλεοτίδιο, φαίνονται στην Εικόνα 6.



Εικ. 6.13: Οργάνωση του γονιδίου H-ras του ανθρώπου και θέση του p53 στοιχείου. Τα εξώνια παρουσιάζονται σαν τετράγωνα, οι κωδικές αλληλουχίες σκιασμένες και το VTR με γραμμώσεις. Φαίνεται ακόμη η νουκλεοτιδική αλληλουχία του p53 στοιχείου. Ομολογία αυτής με τη συναινετική αλληλουχία που αναγνωρίζει η P53 δηλώνεται με αστερίσκους. R: Pu, W: A/T, Y: Py.

6.6 Αναγνώριση του πιθανού στοιχείου του H-ras από την πρωτεΐνη P53

Η ικανότητα της φυσικού τύπου πρωτεΐνης P53, καθώς και μεταλλαγμένων μορφών της, να αναγνωρίζουν με ειδικότητα την αλληλουχία του p53 στοιχείου του H-ras, μελετήθηκε με πειράματα καθυστέρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Δείχθηκε ότι η φυσικού τύπου P53, καθώς και μια μεταλλαγμένη μορφή της (His273) αναγνωρίζουν με ειδικότητα το στοιχείο του H-ras., σε αντίθεση με τις άλλες μεταλλαγμένες μορφές της P53 πρωτεΐνης που ελέγχθηκαν.

6.6.1 Αναγνώριση του πιθανού στοιχείου του H-ras από τη μη μεταλλαγμένη P53

Δείχθηκε (Spandidos et al, 1995) πως καθαρή πρωτεΐνη P53 μετά από *in vitro* μετάφραση, προσδένεται σε ραδιοσημασμένο ιχνηθέτη που περιέχει και τα τρία δεκανουκλεοτίδια του H-ras (Εικόνα 6.14). Η πρόσδεση ενισχύεται παρουσία του αντισώματος Pab421 που αλλάζει τη στερεοδιαμόρφωση της πρωτεΐνης προς τη μορφή που αναγνωρίζει με μεγαλύτερη συγγένεια το DNA. Επιπλέον, το Pab421 προκαλεί και ανύψωση της ζώνης P53-Eras3HS, δεικνύοντας ότι η πρωτεΐνη που προσδέθηκε στο H-ras DNA είναι η P53. Για να ελεγχθεί εάν η πρόσδεση είναι ειδική, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε παρουσία 500X περίσσειας μη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων-ανταγωνιστών. Η πρόσδεση ανταγωνίστηκε από το ολιγονουκλεοτίδιο Er21, το οποίο είναι p53-ειδικό και από το Eras3HS, όχι όμως και από το TF3, το οποίο δεν περιέχει p53 DNA στοιχείο. Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν όταν χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης το ολιγονουκλεοτίδιο-μάρτυρας Er21 (Εικόνα 6.14).

Ακόμη, το πείραμα επαναλήφθηκε με πρωτεΐνη που παράχθηκε μέσα σε κύτταρα και πιθανά προσομοιάζει περισσότερο την *in vivo* κατάσταση (Zoumpourlis et al,

1995). Καρκινικά κύτταρα οστεοσαρκώματος του ανθρώπου (Saos-2), τα οποία δεν περιέχουν ενδογενές γονίδιο p53, επιμολύνθηκαν με πλασμίδια που κωδικοποιούσαν για τη φυσικού τύπου (wild-type) P53, για πρωτεΐνη από την οποία λείπουν τα τελευταία 30 αμινοξικά κατάλοιπα (Δ364-393) και για τη μεταλλαγμένη His273. Παράχθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα τα οποία ελέγχθηκαν με ανοσοστύπωση για την παρουσία της P53, με χρήση του αντί-P53 αντισώματος DO-1 (Εικόνα 6.15). Εκχύλισμα από κύτταρα που δεν είχαν επιμολυνθεί χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας (διαδρομή 1). Τα εκχυλίσματα από κύτταρα που είχαν επιμολυνθεί με φυσικού τύπου P53 (διαδρομή 2), P53 (Δ364-393) (διαδρομή 3) και His273 (διαδρομή 4), έδειξαν ανιχνεύσιμη ποσότητα της πρωτεΐνης.

Ακολούθως, τα πυρηνικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα καθυστέρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Οι ιχνηθέτες BC (μάρτυρας) και Eras 2HS, που περιέχει τα δύο συνεχόμενα δεκανουκλεοτίδια του p53 στοιχείου του *H-ras*, επώαστηκαν με πυρηνικό εκχύλισμα κυττάρων που περιείχε φυσικού τύπου P53 (Εικόνα 6.16). Μια κοινή ζώνη ανιχνεύθηκε, ως αποτέλεσμα της δημιουργίας συμπλέγματος P53-DNA. Η ζώνη αυτή εξαφανίστηκε παρουσία του DO-1 αντισώματος (διαδρομές 2 και 5) καθώς και με ανταγωνισμό με 50X περίσσεια p53-ειδικών μη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων (διαδρομές 3 και 6). Η ενεργοποιημένη για DNA πρόσδεση P53 (Δ364-393), αντέδρασε όμοια με τους ιχνηθέτες BC (διαδρομή 7) και Eras 2HS (διαδρομή 9) και το σύμπλεγμα P53-DNA εξαφανίστηκε παρουσία του αντισώματος DO-1 (διαδρομές 8 και 10).

Εικ. 6.14: Η φυσικού τύπου P53 αναγνωρίζει ένα στοιχείο στο γονίδιο H-*ras*. *In vitro* μεταφρασμένη πρωτεΐνη P53 φυσικού τύπου, επώαστηκε με τους ραδιοσημασμένους ιχνηθέτες Eras3HS και Ep21. Όπου δεικνύεται, 500X περίσσεια μη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων ειδικών (Ep21) ή όχι (TF3) και/ ή αντίσωμα Pab421 προστέθηκαν στο μίγμα αντίδρασης. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων και αυτοραδιογραφία.

Εικ. 6.15: Ανίχνευση της πρωτεΐνης P53 σε πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων Saos-2 με ανοσοσύτρωση, μετά από επιμόλυνση με τα αντίστοιχα πλασμίδια. Ελέγχθηκαν πυρηνικά εκχυλίσματα που περιείχαν φυσικού τύπου P53 (διαδρομή 2), P53 (Δ364-393) (διαδρομή 3) και τη μεταλλαγμένη His273 (διαδρομή 4). Εκχύλισμα κυττάρων που δεν είχαν επιμολυνθεί χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας (διαδρομή 1). Χρησιμοποιήθηκε το αντί-P53 αντίσωμα DO-1.

Εικ. 6.16: Ειδική πρόσδεση της μη μεταλλαγμένης P53 στο στοιχείο του *H-ras*. Μετά από επιμόλυνση κυττάρων Saos-2, ολόκληρη (διαδρομές 1-6) και κομμένη (διαδρομή 7-10) μορφή της μη μεταλλαγμένης πρωτεΐνης P53, χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα καθυστέρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Το μίγμα αντίδρασης περιείχε πυρηνικό εκχύλισμα κυττάρων, τους ιχνηθέτες BC (διαδρομές 1-3 και 7, 8) και *Eras* 2HS (διαδρομές 4-6 και 9, 10), αντί-P53 αντίσωμα (διαδρομές 2, 5, 8, 10) και περίσσεια μη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων-ανταγωνιστών (διαδρομές 3 και 6).

6.6.2 Αναγνώριση του πιθανού στοιχείου του H-ras από μεταλλαγμένες μορφές της P53

Με δεδομένη την υψηλή συχνότητα μετάλλαξης του γονιδίου p53 σε όγκους του ανθρώπου (Hainaut, 1995), καθώς και την ικανότητα μεταλλαγμένων μορφών να παρουσιάζουν "gain of function" δραστηριότητες (Zhang et al, 1993a, b, Park et al, 1994, Dittmer et al, 1993), ελέγχθηκαν κάποιες μεταλλαγμένες μορφές της P53 που απαντώνται συχνά σε όγκους του ανθρώπου ("hot spot" mutations) για την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν το p53 στοιχείο του H-ras. Συντέθηκαν με πειράματα *in vitro* πρωτεινοσύνθεσης οι μεταλλαγμένες μορφές His175, Gln248, Trp248 και His273 και ελέγχθηκαν σε πειράματα καθυστέρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (Spandidos et al, 1995, Εικόνα 6.17). Τα ονόματά τους δεικνύουν το αμινοξικό κατάλοιπο που κωδικοποιείται από το μεταλλαγμένο κωδικόνιο και τον αριθμό του κωδικονίου. Καμμία μεταλλαγμένη μορφή δεν προσδέθηκε στον Eras 3HS ιχνηθέτη, ακόμα και παρουσία του αντισώματος Pab421.

Ωστόσο, όταν χρησιμοποιήθηκαν σε αντίστοιχα πειράματα πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων Saos-2 που είχαν επιμολυνθεί με πλασμίδια που κωδικοποιούσαν για μεταλλαγμένες μορφές της P53, ευρέθη ειδική πρόσδεση της His273 στο p53 στοιχείο του H-ras (Zoumpourlis et al, 1995, Εικόνα 6.18). Πυρηνικό εκχύλισμα που περιείχε την His273 πρωτεΐνη επώαστηκε με τον ιχνηθέτη-μάρτυρα BC (διαδρομή 1) και τον Eras 2HS (διαδρομή 5) και δείχθηκε πρόσδεση της πρωτεΐνης στο H-ras DNA. Η ζώνη πρωτεΐνης-DNA, τόσο με το ολιγονουκλεοτίδιο BC, όσο και με το Eras2HS, εξαφανίστηκε μετά από ανταγωνισμό με 50X περίσσεια των p53-σχετικών ανταγωνιστών BC-S21 (διαδρομές 2 και 6), MDM2 (διαδρομές 3 και 7), Eras 2HS (διαδρομή 4) και BC (διαδρομή 8), δεικνύοντας την ειδικότητα της πρόσδεσης της His273 στο H-ras στοιχείο.

Εικ. 6.17: Μεταλλαγμένες μορφές της P53 δεν προσδένονται στο p53 στοιχείο του H-ras. Φυσικού τύπου P53 πρωτεΐνη και μεταλλαγμένες μορφές της που συντέθηκαν με *in vitro* πρωτεϊνοσύνθεση, επώαστηκαν με το ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο Eras 3HS. Όπου αναφέρεται, οι αντιδράσεις πρόσδεσης έγιναν παρουσία αντισώματος Pab421.

Εικ. 6.18: Ειδική πρόσδεση της μεταλλαγμένης His273 στο H-*ras* DNA. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη παράχθηκε μετά από επιμόλυνση κυττάρων Saos-2 με το αντίστοιχο πλασμίδιο. Το μίγμα αντίδρασης περιείχε πυρηνικό εκχύλισμα πρωτεϊνών, τους ραδιοσημασμένους ιχνηθέτες BC (διαδρομές 1-4) και Eras 2HS (διαδρομές 5-8) και 50X περίσσεια ολιγονουκλεοτιδίων-ανταγωνιστών.

6.7 Το p53 στοιχείο του H-ras λειτουργεί ως ενισχυτής της μεταγραφής

Είναι γνωστό ότι η μη μεταλλαγμένη P53 λειτουργεί ως ενισχυτής της μεταγραφής, μέσω DNA πρόσδεσης (Levine et al, 1994). Δεδομένου ότι το H-ras στοιχείο αναγνωρίζεται με ειδικότητα από την P53, εξετάστηκε κατά πόσον μπορεί το στοιχείο αυτό να λειτουργήσει ως P53-εξαρτώμενος ενισχυτής της μεταγραφής (Srandidos et al, 1995). Χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια αναφοράς που περιείχαν το p53 στοιχείο του H-ras, το στοιχείο του γονιδίου p21/ *waf1/ cip1*, ή κανένα p53 στοιχείο, "αριστερά" (upstream) από τον υποκινητή της κινάσης της θυμιδίνης (TK), ο οποίος προκαλούσε την έκφραση της εκκρινόμενης αλκαλικής φωσφατάσης. Ακολούθησε συνεπιμόλυνση κυττάρων Saos-2 με καθένα από αυτά τα πλασμίδια και με πλασμίδιο που κωδικοποιούσε για φυσικού τύπου ή για μεταλλαγμένη μορφή της P53. Παρατηρήθηκε ενίσχυση της μεταγραφής των πλασμιδίων αναφοράς από τη φυσικού τύπου P53, τόσο αυτών που περιείχαν ως ενισχυτή το στοιχείο του H-ras, όσο και αυτών που περιείχαν το στοιχείο του p21 (Πίνακας 6.1). Αντίθετα, οι μεταλλαγμένες πρωτείνες απέτυχαν να ενισχύσουν τη μεταγραφή οποιουδήποτε πλασμιδίου αναφοράς. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι το στοιχείο του H-ras μπορεί να λειτουργήσει ως ενισχυτής της μεταγραφής γονιδίων, εξαρτώμενος από την P53.

Πίνακας 6.1: Το p53 στοιχείο του H-ras λειτουργεί ως P53-εξαρτώμενος ενισχυτής της μεταγραφής.

Ενισχυτής/ Υποκινητής	Μεταφραζόμενη πρωτεΐνη	Ενεργότητα
Eras 3HS/TK	Φυσικού τύπου P53	175.7±3.0
	P53 His273	59.7±2.0
	P53 Trp248	62.3±13.0
	Όχι πρωτεΐνη	40.0±2.6
Er21/TK	Φυσικού τύπου P53	1797.3±420.7
	P53 His273	91.3±7.2
	P53 Trp248	84.0±3.2
	Όχι πρωτεΐνη	49.7±7.7
Όχι/TK	Φυσικού τύπου P53	32.0±4.0
Όχι/Όχι	Φυσικού τύπου P53	0.0±0.0

Η φυσικού τύπου P53 πρωτεΐνη και οι μεταλλαγμένες μορφές της, His273 και Trp248, δοκιμάστηκαν για την ικανότητά τους να ενεργοποιούν τη μεταγραφή από πλασμίδια αναφοράς που περιείχαν τα ολιγονουκλεοτίδια Eras 3HS και Er21 σε θέση ενισχυτή της μεταγραφής. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν pSV2 πλασμίδια που δεν κωδικοποιούσαν για πρωτεΐνη, καθώς και πλασμίδια αναφοράς χωρίς ενισχυτή ή υποκινητή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν μέσοι όροι ± την τυπική απόκλιση. TK: κινάση της θυμιδίνης (thymidine kinase).

6.8 Έλεγχος των επιπέδων πρόσδεσης της πρωτεΐνης P53 από όγκους κεφαλής και τραχήλου του ανθρώπου στο p53 στοιχείο του H-ras, σε σχέση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό

Ελέγχθηκαν τα επίπεδα πρόσδεσης της P53 από 5 ζεύγη όγκων κεφαλής και τραχήλου του ανθρώπου-παρακείμενου φυσιολογικού ιστού, στο στοιχείο του H-ras. Με βάση την εικόνα που προέκυψε, ακολούθησε ανάλυση των όγκων με PCR-SSCP ανάλυση (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονής αλυσίδας), προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η πρωτεΐνη κάθε καρκινικού δείγματος είναι μεταλλαγμένη ή όχι (Zoumpourlis et al, 1995).

6.8.1 Πρόσδεση της P53 στο στοιχείο του H-ras, από 5 ζεύγη καρκινικού ιστού κεφαλής και τραχήλου του ανθρώπου-παρακείμενου φυσιολογικού ιστού

Αρχικά, όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν με ανοσοσύτωση πρωτεϊνών και ταυτοποιήθηκε ότι περιέχουν ανιχνεύσιμη ποσότητα πρωτεΐνης P53 (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Ακολούθως, πυρηνικά εκχυλίσματα καρκινικών-γειτονικών φυσιολογικών ιστών επώαστηκαν με το ραδιοσημασμένο ιχνηθέτη Eras 2HS, σε πείραμα καθυστέρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (Εικόνα 6.19). Παρατηρήθηκε μια κοινή ζώνη η οποία δείχνει την πρόσδεση της P53 στο H-ras DNA, στην πλειοψηφία των δειγμάτων. Ωστόσο, σε δύο καρκινικά δείγματα (στα 4 και 5, διαδρομές 7 και 9, αντίστοιχα), δεν ανιχνεύθηκε πρόσδεση της πρωτεΐνης P53.

Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της ηλικίας του ασθενούς, του σταδίου (stage) και του βαθμού (grade) διαφοροποίησης του καρκινικού ιστού στα δείγματα κεφαλής και τραχήλου που ελέγχθηκαν. Ο όρος "φυσιολογικός ιστός", περιγράφει ιστό που μακροσκοπικά φαίνεται φυσιολογικός και μικροσκοπικά φαίνεται να έχει ομοιόμορφη σύσταση, αποτελούμενος από καλοήγη ιστό.

Η ειδικότητα της παρατηρούμενης αλληλεπίδρασης P53-H-*ras* DNA, αποδείχθηκε με πειράματα ανταγωνισμού (Εικόνα 6.20) και με τη χρήση αντί-P53 αντισώματος (Εικόνα 6.21). Στην Εικόνα 6.20, χρησιμοποιήθηκε πυρηνικό εκχύλισμα από καρκινικό ιστό του ασθενή Νο 1. Το σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο-μάρτυρας BC-S21 (διαδρομές 1-3) και το Eras 2HS ολιγονουκλεοτίδιο (διαδρομές 4-6), επώαστηκαν με το εκχύλισμα πρωτεϊνών παρουσία 50X περίσσειας ολιγονουκλεοτιδίων-ανταγωνιστών (διαδρομές 2, 3 και 5, 6). Το σύμπλεγμα πρωτεΐνης-ιχνηθέτη εξαφανίστηκε στην περίπτωση p53-σχετικών ανταγωνιστών (διαδρομές 2, 4), όχι όμως στην περίπτωση του μη ειδικού ανταγωνιστή SP-1 (διαδρομές 3, 5). Στην Εικόνα 6.21, εξετάσθηκε η αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-DNA μεταξύ των ιχνηθετών Eras 2HS και BC-S21 (διαδρομές 1 και 3, αντίστοιχα) και P53 πρωτεΐνης από φυσιολογικό ιστό του ασθενή Νο 1. Εισαγωγή του αντισώματος έναντι της P53 1801, οδήγησε σε εξαφάνιση της ειδικής ζώνης (διαδρομές 2 και 4).

Εικ. 6.19: Πρόσδεση της ενδογενούς πρωτεΐνης P53 από όγκους κεφαλής και τραχήλου του ανθρώπου και από παρακείμενο φυσιολογικό ιστό στο p53 στοιχείο του γονιδίου H-ras. Πυρηνικά εκχυλίσματα καρκινικών-γειτονικών φυσιολογικών ιστών επωάστηκαν με τον ιχνηθέτη Eras 2HS (διαδρομές 1-10). T: καρκινικός, N: φυσιολογικός ιστός.

Εικ. 6.20: Επίδραση ανταγωνισμού σε δοκιμασία ηλεκτροφορητικής κινητικότητας σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Πυρηνικό εκχύλισμα από όγκο κεφαλής και τραχήλου (ασθενής No 1), επώαστηκε με τους ραδιοσημασμένους ιχνηθέτες BC-S21 (διαδρομές 1-3) και Eras 2HS (διαδρομές 4-6). Σε πειράματα ανταγωνισμού, 50X περίσσεια "κρύου" ανταγωνιστών Eras 2HS (διαδρομές 2, 5) και SP-1 (διαδρομές 3, 6) εισήχθη στο μίγμα αντίδρασης.

Εικ. 6.21: Επίδραση του αντί-p53 1801 αντισώματος σε δοκιμασία ηλεκτροφορητικής κινητικότητας σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Πυρηνικό εκχύλισμα από φυσιολογικό ιστό κεφαλής και τραχήλου (ασθενής Νο 1), επώαστηκε με τους Eras 2HS (διαδρομές 1 και 2) και BC-S21 (διαδρομές 3 και 4) ιχνηθέτες. Το αντίσωμα Pab1801 έναντι της P53 εισήχθη στο μίγμα αντίδρασης (διαδρομές 2 και 4).

6.8.2 Ανάλυση της κατάστασης της P53 (μεταλλαγμένης ή μη) από όγκους κεφαλής και τραχήλου του ανθρώπου

Ακολουθως, τα καρκινικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα καθυστέρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, εξετάσθηκαν με nested PCR και SSCP ανάλυση για μεταλλάξεις στα εξώνια 5-7 του γονιδίου p53, δεδομένου ότι η πλειοψηφία των μεταλλάξεων του p53 σε όγκους του ανθρώπου εντοπίζονται στην περιοχή αυτή (Levine et al, 1994). Μετά από ενίσχυση με nested PCR, το 2.9 kb τμήμα του γονιδίου p53 που προέκυψε, αναλύθηκε με SSCP και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στη Εικόνα 6.22. Τρία από τα πέντε καρκινικά δείγματα που αναλύθηκαν (ασθενείς No 1, 4, 5) έδειξαν διαφορετικό πρότυπο ζωνών σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Στα δείγματα 2 και 3 δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις με τη μέθοδο αυτή.

Συνεκτιμώντας λοιπόν τα αποτελέσματα της SSCP ανάλυσης και της μελέτης των όγκων κεφαλής και τραχήλου του ανθρώπου με πειράματα DNA πρόσδεσης της πρωτεΐνης, προέκυψαν τα ακόλουθα στοιχεία (Πίνακας 6.2): σε δύο ζεύγη καρκινικού-παρακείμενου φυσιολογικού ιστού, δεν παρουσιάστηκε διαφορά στα επίπεδα πρόσδεσης της P53 στο *H-ras* DNA και στα ζεύγη αυτά δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη στο γονίδιο p53 με SSCP ανάλυση (ασθενείς No 2 και 3). Σε δύο ζεύγη καρκινικού-γειτονικού φυσιολογικού ιστού, εμφανίστηκε σύμπλεγμα P53-DNA μόνο στο φυσιολογικό ιστό, ενώ στον καρκινικό ανιχνεύθηκε μετάλλαξη του p53 γονιδίου (ασθενείς No 3 και 4), γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματά μας από τις κυτταρικές σειρές. Τέλος, σε ένα ζευγάρι καρκινικού-φυσιολογικού ιστού, παρατηρήθηκε αυξημένη πρόσδεση στο DNA της μεταλλαγμένης P53 του καρκινικού, σε σχέση με την πρωτεΐνη του φυσιολογικού ιστού (ασθενής No 1).

Εικ. 6.22: SSCP ανάλυση των εξωνίων 5, 6 και 7 του γονιδίου p53 σε δείγματα κεφαλής και τραχήλου του ανθρώπου. Τα προϊόντα PCR από το DNA του καρκινικού ιστού έδωσαν διαφορετικό πρότυπο ζωνών σε σχέση με το DNA από γειτονικό φυσιολογικό ιστό (A: εξώνιο 6, B: εξώνιο 5, C: εξώνιο 7). Τα βέλη δεικνύουν τις διαφορετικές ζώνες.

Πίνακας 6.2: Πρόσδεση της πρωτεΐνης P53 στο στοιχείο του *H-ras* σε όγκους κεφαλής και τραχήλου του ανθρώπου, σε καρκινικό έναντι του φυσιολογικού ιστού

Νο	ΑΣΘΕΝΟΥΣ	ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ P53	ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΣΤΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ ΤΟΥ <i>H-ras</i>
1		μεταλλαγμένη	+
2		φυσικού τύπου	-
3		φυσικού τύπου	-
4		μεταλλαγμένη	όχι πρόσδεση
5		μεταλλαγμένη	όχι πρόσδεση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΒΔΟΜΟ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1 Σύνοψη των αποτελεσμάτων

Το αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής έγκειται στη μελέτη πρωτεϊνικών παραγόντων που, μέσω πρόσδεσής τους στο *H-ras* DNA, ρυθμίζουν την έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου και ενεργοποιούν το ογκογόνο δυναμικό του σε νεοπλασίες του ανθρώπου.

Κατά την παρούσα μελέτη, δείχθηκε η αλληλεπίδραση και ρύθμιση του πρωτο-ογκογονιδίου *H-ras*, μέσω συγκεκριμένων αλληλουχιών που ευρίσκονται στο πρώτο και τέταρτο εσώνιο του γονιδίου, από τους ορμονικούς υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών και των οιστρογόνων και από το προϊόν του ογκο-κατασταλτικού γονιδίου p53 (Εικόνα 7.1).

Ακόμη, έγινε προσπάθεια να μελετηθεί η επίδραση των παραγόντων αυτών στη ρύθμιση του γονιδίου *H-ras* σε καρκινικούς ιστούς του ανθρώπου. Συγκρίθηκαν τα επίπεδα πρόσδεσης των πρωτεϊνικών παραγόντων στα αντίστοιχα στοιχεία του *H-ras* σε καρκινικό, σε σχέση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα πρόσδεσης των ογκοπρωτεϊνών στο DNA του γονιδίου μεταξύ καρκινικού-γειτονικού φυσιολογικού ιστού, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το *H-ras* εμπλέκεται σε είδη νεοπλασιών του ανθρώπου μέσω διαταραχών στη ρύθμιση της έκφρασής του από τους συγκεκριμένους πρωτεϊνικούς παράγοντες.

Κατά συνέπεια, από τη μελέτη αυτή προκύπτουν νέοι μηχανισμοί ρύθμισης της έκφρασης του *H-ras* και εμπλοκής του στην καρκινογένεση στον άνθρωπο και προτείνονται δείκτες πρόγνωσης και θεραπείας.



Εικ. 7.1: Οργάνωση του πρωτο-ογκογονιδίου *c-H-ras1* του ανθρώπου και θέση των ρυθμιστικών στοιχείων του γονιδίου που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GRE), των οιστρογόνων (ERE) και την πρωτεΐνη P53. Τα εξώνια απεικονίζονται με τετράγωνα, οι κωδικές αλληλουχίες είναι σκιασμένες και το VTR με γραμμές.

7.2 Ρύθμιση της έκφρασης του *c-H-ras1* από τους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών και των οιστρογόνων

Αναλυτικότερα, από τη μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης του *H-ras* από τους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών και των οιστρογόνων, προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα.

Κατ' αρχήν, οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών και των οιστρογόνων αναγνωρίζουν στοιχεία που ευρίσκονται σε εσώνια του γονιδίου, προτείνοντας ένα ρυθμιστικό ρόλο για τις αλληλουχίες των εσωνίων Έχουν ταυτοποιηθεί στοιχεία αποκρινόμενα σε ορμόνες σε εσώνια και άλλων γονιδίων (Slater et al, 1985). Επιπλέον, το γεγονός ότι τα GRE, ERE του *H-ras*, ευρίσκονται αρκετές εκατοντάδες ζεύγη βάσεων μακριά από τον "υποκινητή" του γονιδίου, προτείνει τη συνεργασία των στοιχείων αυτών με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες,

προκειμένου να επιτευχθεί η ρυθμιστική τους δράση (Lucas et al, 1992). Με ανάλυση με ηλεκτρονικό υπολογιστή ανιχνεύθηκαν κάποιες πιθανές ρυθμιστικές αλληλουχίες στην περιοχή κοντά στο *H-ras* GRE, όπως CACCC και CAAT στοιχεία (Zachos et al. 1995), ενώ και η διαμόρφωση της χρωματίνης στο χώρο μπορεί να φέρει τα HREs σε λειτουργική επαφή με ρυθμιστικά στοιχεία που ευρίσκονται σε μεγάλη απόσταση μεταξύ τους στην νουκλεοτιδική αλληλουχία (Hainaut, 1995).

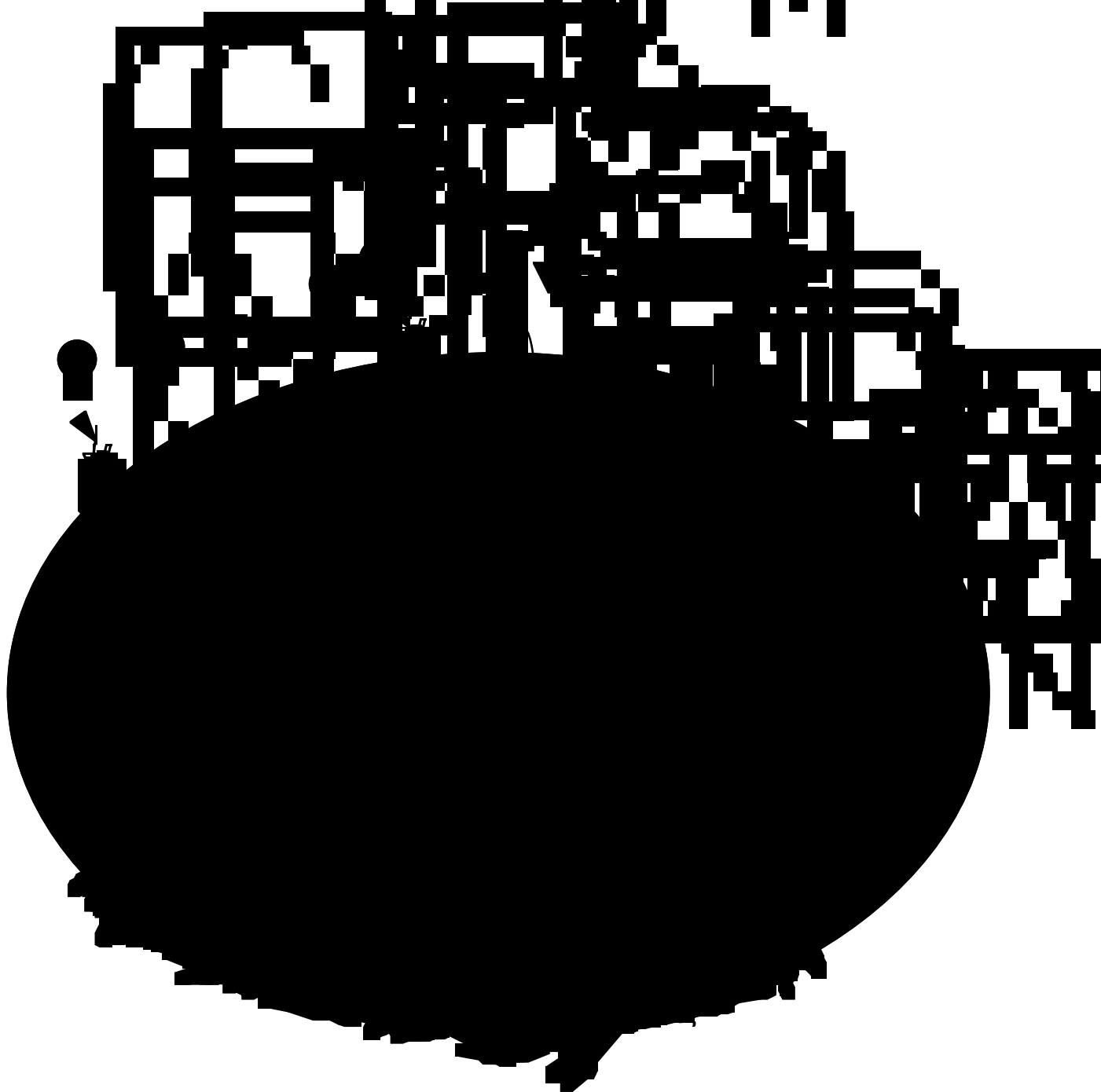
Είναι γνωστό ότι το γονίδιο *H-ras* κωδικοποιεί για μια G-πρωτεΐνη, η οποία συμμετέχει σε οδούς διαβίβασης πληροφοριών, τα οποία ξεκινούν από διαμεμβρανικούς υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και πεπτιδικών ορμονών με δραστηριότητα κινάσης Τυροσίνης και περιλαμβάνουν "καταρράκτες" κινασών Σερίνης/ Θρεονίνης (Avruch et al, 1994, Marshall, 1995). Αντίθετα, οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών συμμετέχουν σε διαφορετικούς μηχανισμούς διαβίβασης πληροφοριών, οι οποίοι περιλαμβάνουν μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων από διμερή συμπλόκων υποδοχέα-ορμόνη (Beato, 1989). Η ορμονική ρύθμιση του γονιδίου *H-ras*, δίνει δεδομένα για άμεση αλληλεπίδραση των δύο αυτών ενδοκυτταρικών οδών διαβίβασης μηνυμάτων, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό στο κύτταρο να διαθέτει έναν επιπλέον μοριακό "διακόπτη" ελέγχου της κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης, μέσω ορμονικής ρύθμισης των επιπέδων των G-πρωτεϊνών σε μεταγραφικό επίπεδο (Εικόνα 7.2, Zachos et al, 1996a). Επιπλέον, τα πρωτο-ογκογονίδια θεωρούνται καλά ενδιάμεσα μόρια για την πραγμάτωση των ποικίλων βιολογικών λειτουργιών των στεροειδών ορμονών, δεδομένου ότι έχουν καθορισμένα χρονικά πρότυπα έκφρασης κατά τη διαφοροποίηση, συμμετέχουν στη μεταγωγή μηνυμάτων και ρυθμίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων με ένα μηχανισμό "καταρράκτη" (Bishop, 1991). Έχει βρεθεί ορμονική ρύθμιση πυρηνικών πρωτο-ογκογονιδίων, που κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες (Hyder et al, 1994), είναι όμως η πρώτη φορά που

δεικνύεται ορμονική ρύθμιση κυτταρικού ογκογονιδίου που κωδικοποιεί για G-πρωτεΐνη (Εικόνα 7.2).

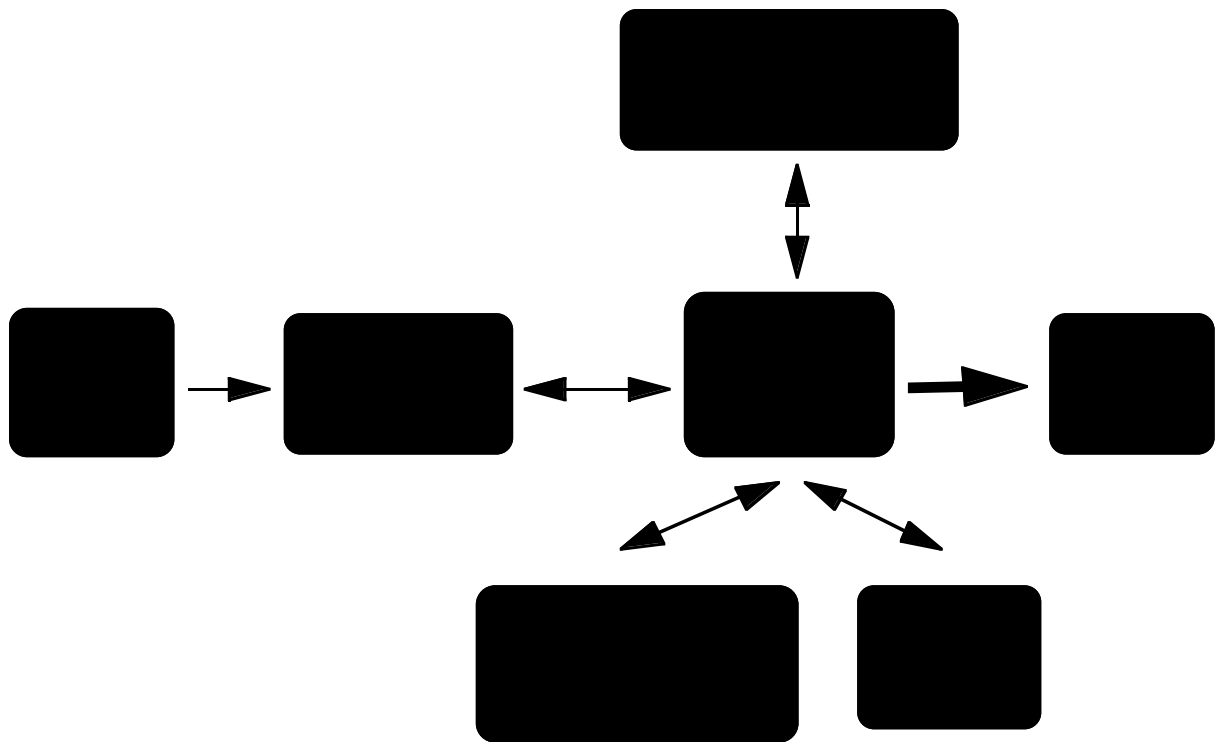
Ως γνωστόν, οι στεροειδείς ορμόνες δρουν ως προαγωγοί της καρκινογένεσης και η μεταγραφική ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων έχει προταθεί ως μία ερμηνεία αυτής της ιδιότητας (Hyder et al, 1994). Επιπλέον, υπερέκφραση της Ras p21 έχει βρεθεί σε καρκινικούς ιστούς ωθήκης του ανθρώπου, σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς (Katsaros et al, 1995, Van Dam et al, 1994). Συνδυάζοντας τα δεδομένα αυτά, εξετάστηκαν τα επίπεδα πρόσδεσης των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών στα αντίστοιχα HREs του *H-ras* σε όγκους του ενδομητρίου και της ωθήκης του ανθρώπου, σε σύγκριση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό (Zachos et al, 1996b). Σε όλα σχεδόν τα ζεύγη που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε αυξημένη πρόσδεση του ορμονικού υποδοχέα στο αντίστοιχο στοιχείο του *H-ras*, στον καρκινικό σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό, γεγονός που προτείνει εμπλοκή του *H-ras* στις γυναικολογικές νεοπλασίες μέσω διαταραχών στην ορμονική ρύθμιση του γονιδίου, και είναι σύμφωνο με προηγούμενα αποτελέσματα που δείχνουν συνεργασία στεροειδών-*H-ras* στον κυτταρικό μετασχηματισμό (Marshall et al, 1991, Kumar et al, 1990).

Το ενδομήτριο και η ωθήκη του ανθρώπου είναι κύριοι στόχοι δράσης των γλυκοκορτικοειδών και των ορμονών φύλου. Αυτό πιθανόν οδηγεί σε έναν αυξημένο αριθμό ενεργοποιημένων από ορμόνη υποδοχέων των στεροειδών ορμονών, οι οποίοι προσδένονται στο *H-ras* DNA και επάγουν υψηλά επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου, με αποτέλεσμα ένα αυξημένο ογκογόνο δυναμικό. Έτσι, τα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου και της ωθήκης έχουν μια "προδιάθεση", λόγω της ορμονικά επαγόμενης υπερέκφρασης του *H-ras*, στην ανάπτυξη νεοπλαστικών ανωμαλιών με την επίδραση ενός δεύτερου ογκογόνου παράγοντα, για παράδειγμα μιας ιικής μόλυνσης ή μιας μετάλλαξης ενός πρωτο-ογκογονιδίου (Εικόνα 7.3, Zachos et al, 1996a).

Τέλος, προτείνεται ότι η δοκιμασία καθυστέρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου που χρησιμοποιήθηκε, δύναται να εφαρμοστεί γενικότερα, για τον προσδιορισμό των επιπέδων των ορμονικών υποδοχέων σε όγκους του ανθρώπου που αποκρίνονται σε ορμόνες, δεδομένου ότι δίνει πληροφορίες για το τμήμα των μορίων του υποδοχέα που είναι ενεργοποιημένο από την ορμόνη και λειτουργικά ικανό για DNA πρόσδεση. Άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των επιπέδων των υποδοχέων (Nyholm et al, 1995, Morris et al, 1995), τα οποία φαίνεται να έχουν κλινική σημασία, όπως είναι η δοκιμασία πρόσδεσης του συνδέτη (ligand binding assay, LBA) και η ανοσοδοκιμασία με ένζυμο (enzyme immunoassay, EIA), δεν παρέχουν πληροφορίες κατά πόσο τα μετρούμενα μόρια είναι ικανά για μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων μέσω DNA πρόσδεσης, ή έχουν απενεργοποιηθεί από μεταλλάξεις, κυτταρικούς παράγοντες ή με αποκλεισμό από τον πυρήνα. Συνεπώς, η τεχνική της καθυστέρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρέχει ακριβέστερες πληροφορίες για το ογκογόνο δυναμικό των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών που μετρούνται.



Εικ. 7.2: Πρότυπο της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου από τα στεροειδή. Επιπλέον της κλασσικής μεταγραφικής ενεργοποίησης πρωτο-ογκογονιδίων που κωδικοποιούν για πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες, προτείνεται μεταγραφική ρύθμιση του πρωτο-ογκογονιδίου *H-ras*, το οποίο κωδικοποιεί για μια G-πρωτεΐνη (p21). S: στεροειδές, GF: αυξητικός παράγοντας, P: πεπτίδιο, SR: υποδοχέας στεροειδών ορμονών, Rc: διαμεμβρανικός υποδοχέας κυτταρικής επιφάνειας, Y: αμινοξικό κατάλοιπο Τυροσίνης, P: φώσφορος, c-onc: πρωτο-ογκογονίδιο.



Εικ. 7.3: Η ορμονική ρύθμιση του γονιδίου *H-ras* ως μοντέλο καρκινογένεσης σε όγκους του ανθρώπου που αποκρίνονται σε στεροειδή. Η αυξημένη ενεργοποίηση του *H-ras* από τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών επάγει αύξηση του "ογκογόνου δυναμικού" του κυττάρου, με αποτέλεσμα το κύτταρο να μεταπίπτει σε καρκινικό με την επίδραση ενός δευτέρου ογκογόνου παράγοντα (ιική μόλυνση, μετάλλαξη πρωτο-ογκογονιδίου, απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικού γονιδίου).

7.3 Ρύθμιση της έκφρασης του *c-H-ras1* από την πρωτεΐνη P53

Σε ό,τι αφορά τη μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης του πρωτο-ογκογονιδίου *H-ras* από το προϊόν του ογκο-κατασταλτικού γονιδίου *p53*, προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα.

Πρώτα από όλα, δείχθηκε ότι η μη μεταλλαγμένη P53 αναγνωρίζει με ειδικότητα και συγγένεια ένα στοιχείο στο πρώτο εσώνιο του γονιδίου *H-ras*. Αντίθετα, μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης που απαντώνται συχνά σε όγκους του ανθρώπου δεν αναγνώρισαν το στοιχείο του *H-ras*, με εξαίρεση την His273. Επιπλέον, το στοιχείο του *H-ras*, λειτούργησε ως ενισχυτής της μεταγραφής εξαρτώμενος από τη μη μεταλλαγμένη P53 πρωτεΐνη, στο περιβάλλον ενός τεχνητού πλασμιδίου αναφοράς. Φαίνεται λοιπόν πως η P53 είναι ρυθμιστής της έκφρασης του *H-ras*.

Το γεγονός της ενεργοποίησης της έκφρασης του *H-ras* από την P53 φαίνεται, κατ' αρχήν, παράδοξο, δεδομένου ότι το *p53* είναι ογκο-κατασταλτικό γονίδιο και το *H-ras*, πρωτο-ογκογονίδιο. Ωστόσο, έχει ήδη αποδειχθεί ρύθμιση του πρωτο-ογκογονιδίου *mdm-2* από την P53 (Zauberman et al, 1995), το πρωτεϊνικό προϊόν του οποίου εμποδίζει τις ογκο-κατασταλτικές δραστηριότητες, τόσο της P53 (Wu et al, 1993), όσο και της Rb πρωτεΐνης (Xiao et al, 1995). Συνεπώς, η φυσικού τύπου P53 επάγει την έκφραση δύο πρωτο-ογκογονιδίων που εμπλέκονται συχνά στον καρκίνο του ανθρώπου, του *mdm-2* και του *H-ras*.

Η λίστα των γονιδίων που έχει δείχθει ότι ρυθμίζονται από την P53 με ειδική πρόσδεση αυτής στο DNA, περιλαμβάνει τα *p21*, *gadd45*, *bax*, *mdm2* και *H-ras*. Το *p21* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στο σταμάτημα της κυτταρικής αύξησης (Harper et al, 1993). Το *gadd45* συμμετέχει στην κυτταρική απόκριση ματά από βλάβη του DNA (Kastan et al, 1992) και το *bax* ενεργοποιεί την απόπτωση (Miyashita et al, 1995). Κανένα από αυτά δεν ενεργοποιεί τον κυτταρικό

πολλαπλασιασμό, σε αντίθεση με τα *mdm-2* και *H-ras*. Είναι αξιοσημείωτο ότι υπάρχουν ορισμένες ομοιότητες στην οργάνωση των p53 στοιχείων των δύο πρωτο-ογκογονιδίων, οι οποίες δεν παρατηρούνται στα στοιχεία των υπόλοιπων γονιδίων που ρυθμίζονται από την P53 (Spandidos et al, 1995). Στο *H-ras*, υπάρχουν τρία μισά τμήματα (δεκανουκλεοτίδια), τα οποία αναγνωρίζει η P53 (Εικόνα 7.3). Τα δύο από αυτά είναι συνεχόμενα, ενώ το τρίτο ευρίσκεται 8 νουκλεοτίδια αριστερότερα (upstream) των δύο πρώτων. Στο γονίδιο *mdm-2*, υπάρχουν επίσης τρία δεκανουκλεοτίδια, τα δύο συνεχόμενα και το τρίτο 28 νουκλεοτίδια δεξιότερα (downstream) των δύο πρώτων. Αντιθέτως, τα δεκανουκλεοτίδια στα p53 στοιχεία των *p21*, *gadd45* και *bax* είναι συνεχόμενα. Η οργάνωση των δεκανουκλεοτιδίων επηρεάζει την ικανότητα της P53 να αναγνωρίζει τα στοιχεία αυτά. Η μη μεταλλαγμένη P53 ευρίσκεται σε δύο στερεομορφές, οι οποίες είναι σε δυναμική ισορροπία μεταξύ τους: μια ανενεργό, με διεδρική συμμετρία που δεν αναγνωρίζει συνεχόμενα δεκανουκλεοτίδια και μια ενεργό, χωρίς διεδρική συμμετρία, που αναγνωρίζει ακόμη και συνεχόμενες "μισές" θέσεις πρόσδεσης (Waterman et al, 1995, Halazonetis et al, 1993). Φαίνεται λοιπόν ότι η παρουσία μη συνεχόμενων δεκανουκλεοτιδίων στα p53 στοιχεία των *H-ras* και *mdm-2* γονιδίων, επιτρέπουν στα γονίδια αυτά να ρυθμίζονται ακόμα και από την P53 που ευρίσκεται σε ανενεργό μορφή.

Ακόμη, το p53 στοιχείο του *H-ras* ευρίσκεται στο πρώτο εσώνιο του γονιδίου. Η βιολογική σημασία του γεγονότος αυτού δεν είναι προς το παρόν κατανοητή. Θα πρέπει ωστόσο να αναφερθεί ότι το p53 στοιχείο του *mdm-2*, ευρίσκεται επίσης στο πρώτο εσώνιο του γονιδίου (Wu et al, 1993). Η μεταγραφή του *mdm-2* γίνεται, είτε από ένα υποκινητή αριστερά (upstream) του πρώτου εξωνίου, είτε από έναν εσωτερικό υποκινητή, μέσα στο πρώτο εσώνιο του γονιδίου. Η P53 ενεργοποιεί τη μεταγραφή μόνο από τον εσωτερικό υποκινητή (Juven et al, 1993). Τα μετάγραφα και των δύο ειδών περιέχουν ολόκληρη την κωδική αλληλουχία, διαφέρουν όμως

στην ακρίβεια καθορισμού του κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης, με αποτέλεσμα τα μετάγραφα που περιλαμβάνουν το πρώτο εξώνιο να δίνουν συνήθως πρωτεΐνη με έλλειψη λίγων αμινοξέων στο N-τελικό άκρο (Barak et al, 1994). Μόνο η πλήρης πρωτεΐνη μπορεί να αλληλεπιδρά με την P53 (Wu et al, 1993). Θα πρέπει να διερευνηθεί εάν και στην περίπτωση του γονιδίου *H-ras* η P53 ενεργοποιεί τη μεταγραφή από κάποιον υποκινητή στο εσώνιο του γονιδίου και εάν τέτοια πιθανά μετάγραφα έχουν βιολογικό ρόλο.

Τέλος, μελετήθηκε η ικανότητα της P53 να ενεργοποιεί, μέσω πρόσδεσης στο p53 στοιχείο, το ογκογόνο δυναμικό του *H-ras* σε ορισμένα ζεύγη καρκινικού-γειτονικού φυσιολογικού ιστού από όγκους κεφαλής και τραχήλου του ανθρώπου. Η βιολογική ερμηνεία των αποτελεσμάτων, στηρίζεται στη φύση της P53 στους όγκους αυτούς. Στην περίπτωση 1, η αυξημένη πρόσδεση της P53 στο στοιχείο του *H-ras* στον καρκινικό σε σχέση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό, πιθανόν σχετίζεται με υπερέκφραση της μεταλλαγμένης μορφής σε σχέση με τη φυσιολογική πρωτεΐνη. Παράλληλα, αυτή η μεταλλαγμένη μορφή φαίνεται να διατηρεί την ικανότητα της φυσικού τύπου πρωτεΐνης να προσδένεται με ειδικό τρόπο στο DNA, γεγονός που είχε παρατηρηθεί και κατά τα πειράματά μας για την πρωτεΐνη His273, όταν η ικανότητά της να προσδένεται στο *H-ras* DNA είχε μελετηθεί σε κυτταρικό περιβάλλον (Zoumpourlis et al, 1995). Στις περιπτώσεις 2 και 3, δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη στο γονίδιο p53, πιθανότατα λοιπόν η πρωτεΐνη είναι φυσικού τύπου τόσο στον καρκινικό, όσο και στον φυσιολογικό ιστό, γεγονός που ερμηνεύει τα αντίστοιχα επίπεδα πρόσδεσης της P53 και στα δύο είδη ιστών. Τέλος, στις περιπτώσεις 4 και 5, η μεταλλαγμένη μορφή της P53 δεν έχει ικανότητα αναγνώρισης του *H-ras* DNA, ενώ η περίπτωση έλλειψης και των δύο αλληλομόρφων στον καρκινικό ιστό πρέπει να αποκλειστεί διότι είχε ανιχνευθεί έκφραση του γονιδίου σε όλα τα δείγματα με ανοσοσύτωση πρωτεϊνών (Zoumpourlis et al, 1995).

H-ras

GGGCC TGCAG GCTGGCAC TAGCC TGCCC GGGCA CGCCG

TGGCGCGCTCCGCCGTGGCC *AGACC TGTTC*

mdm-2

GGTCA AGTTG GGACA CGTCC GGCGTCGGCTGTCGGAG *GAGCTA*

AGTCC TGACA TGTCT

p21

GAACA TGTCC CAACA TGTTG

gadd45

GAACA TGTCT AAGCA TGCTG

bax

TCACA AGTTA G AGACA AGCCT

Εικ. 7.3: Οργάνωση των H-ras, mdm-2, p21, gadd45 και bax p53 στοιχείων. Τα επαναλαμβανόμενα πεντανουκλεοτίδια που αναγνωρίζει η P53 με ειδικό τρόπο, εμφανίζονται υπογραμμισμένα. Τα p53 στοιχεία των H-ras και mdm-2, έχουν και ένα τέταρτο δεκανουκλεοτίδιο (εικονίζεται με πλάγους χαρακτήρες), του οποίου η σημασία δεν έχει ακόμη ερμηνευτεί.

7.4 Επίλογος

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να παρατεθούν ενδεικτικά ορισμένα δεδομένα που σχετίζονται με τη ρύθμιση του πρωτο-ογκογονιδίου *H-ras* και τη μοριακή φύση της καρκινογένεσης. Η κατανόηση και διερεύνηση των μηχανισμών με τους οποίους πολλαπλοί γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες συμβάλλουν στη δημιουργία και εξέλιξη της νόσου, δύναται να έχει σημαντικές κλινικές εφαρμογές στην πρόγνωση, την πρόωπη διάγνωση, αλλά και θεραπεία.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν αρκετές προσπάθειες κλινικής εφαρμογής των αποτελεσμάτων της μοριακής ανάλυσης των μηχανισμών της καρκινογένεσης. Για παράδειγμα, έχειδειχθεί ότι κληρονομούμενες μεταλλάξεις του γονιδίου *BRCA1* επιφέρουν πιθανότητα έως 90% εμφάνισης καρκίνου του μαστού ή των ωοθηκών στο άτομο-φορέα, μέχρι την ηλικία των 70 ετών. Προτείνεται λοιπόν προγεννητικός έλεγχος, ο οποίος σε συνδυασμό με άλλα στοιχεία επικινδυνότητας, παραδείγματος χάριν κληρονομικού χαρακτήρα, δύναται να χρησιμεύσει στην ορθή ενημέρωση των γονέων από τον ιατρικό τους σύμβουλο (Lancaster et al, 1996). Βέβαια, μια ανάλογη προοπτική απαιτεί την επίλυση πολλαπλών ηθικών και νομικών διλημάτων πριν καταστεί κοινωνικά αποδεκτή και ωφέλιμη.

Συγχρόνως, πραγματοποιούνται προσπάθειες εξεύρεσης τρόπων γονιδιακής θεραπείας. Παραδείγματα τέτοιων μεθόδων που αφορούν τον γυναικολογικό καρκίνο, δίνονται πιο κάτω. Σε πειράματα που γίνονται σε κυτταρικές σειρές, χρησιμοποιούνται αντικωδικά ολιγονουκλεοτίδια που προκαλούν τοξικότητα σε κύτταρα με μετάλλαξη των γονιδίων *p53* ή *c-myc* (καρκινικά), αλλά όχι σε αυτά που έχουν φυσιολογικά αλληλόμορφα (Janicek et al, 1996). Ακόμη, με τη βοήθεια κατασκευών του Αδενοϊού, που περιλαμβάνουν τον υποκινητή του ιού CMV και την κωδική αλληλουχία του γονιδίου *p53* και δημιουργούνται με μεθόδους

γενετικής μηχανικής, επιτυγχάνεται σε κυτταροκαλλιέργεια αναστολή της αύξησης καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων ωθήκης, ενώ τα φυσιολογικά δεν επηρεάζονται (Santoso et al, 1995). Τέλος, τοξικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία ελέγχονται σε κυτταροκαλλιέργειες για την αποτελεσματικότητά τους και την ικανότητά τους να διακρίνουν ανάμεσα στα καρκινικά και τα φυσιολογικά κύτταρα (Havrilesky et al, 1995).

Βέβαια, απαιτούνται πολλά ακόμη *in vivo* πειράματα πριν τα δεδομένα από την βασική και κλινική έρευνα αξιοποιηθούν στην καθημερινή κλινική πρακτική, ωστόσο, η πιθανότητα πρακτικής εφαρμογής τους προβάλλει ιδιαίτερα ελπιδοφόρα και ελκυστική.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdellatif M, MacLellan WR and Schneider MD: p21 Ras as a governor of global gene expression. *J Biol Chem* 269: 15423-15426, 1994.
- Akner G, Wikstrom A-C and Gustafsson J-A: Subcellular distribution of the glucocorticoid receptor and evidence for its association with microtubules. *J Steroid Biochem Molec Biol* 52: 1-16, 1995.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson J: *Molecular biology of the cell*. Garland publishing Inc, 2nd Edition, Κεφ 9 και 10, 1989.
- Ali S, Lutz Y, Bellocq JP, Chenard-Neu MP, Rouyter N and Mertzger D: Production and characterization of monoclonal antibodies recognising defined regions of the human oestrogen receptor. *Hybridoma* 12: 391-405, 1993.
- Arrowsmith CH and Morin P: New insights into p53 function from structural studies. *Oncogene* 12: 1379-1385, 1996.
- Avruch J, Zhang X and Kyriakis JM: Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *TIBS* 19: 279-283, 1994.
- Bagchi MK, Tsai SY, Tsai MJ and O' Malley BW: Progesterone enhanced target gene transcription by receptor free of heat shock proteins hsp 90, hsp 56 and hsp 70. *Mol Cell Biol* 11: 4998-5004, 1991.
- Bakalkin G, Yakolev T, Selivanova G, Magnusson KP, Szekely L, Kiseleva E, Klein G, Terenius L and Wiman KG: p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 413-417, 1994.
- Barbacid M: *ras* genes. *Annu Rev Biochem* 56: 779-827, 1987.
- Bargonetti J, Manfredi JJ, Chen X, Marshak DR and Prives C: A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev* 7: 2565-2574, 1993.
- Barnes DM, Hanby AM, Gillett CE, Mohammed S, Hodgson S, Bobrow LG, Leigh IM, Purkis T, MacGeoch C, Spurr NK, Bartek J, Vojtesek B, Picksley SM and Lane DP: Abnormal expression of wild-type p53 protein in normal cells of a cancer family patient. *Lancet* 340: 259-263, 1992.

- Barak Y, Gottlieb E, Juven-Gershon T and Oren M: Regulation of *mdm2* expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev* 8: 1739-1749, 1994.
- Bassam BJ, Caetano-Anolles G and Gresshoff PM: Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 196: 80-83, 1991.
- Beato M, Herrlich P and Schutz G: Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83: 851-857, 1995.
- Beato M: Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56: 335-344, 1989.
- Berger J, Hauber J, Hauber R, Geiger R and Cullen BR: Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene* 66: 1-10, 1988.
- Bishop JM: Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64: 235-248, 1991.
- Globel GA, Sieff CA and Orkin SH: Ligand-dependent repression of the erythroid transcription factor GATA-1 by the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 15: 3147-3153, 1995.
- Bohen SP and Yamamoto KR: Isolation of Hsp90 mutants by screening for decreased steroid receptor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11424-11428, 1993.
- Borello MG, Pierotti MA, Bongarzone I, Donghi R, Mondellini P and Porta GD: DNA methylation affecting the transforming activity of the human *Ha-ras* oncogene. *Cancer Res* 47: 75-79, 1987.
- Bos JL: Ras oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res* 49: 4682-4689, 1989.
- Boyes J and Bird A: DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* 64: 1123-1134, 1991.
- Boulikas T: A compilation and classification of DNA binding sites for protein transcription factors from vertebrates. *Crit Rev Eukar Gene Expr* 4: 117-321, 1994.
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
- Brain R and Jenkins JR: Human p53 directs DNA strand reassociation and is photolabelled by 8-azido ATP. *Oncogene* 9: 1775-1780, 1994.
- Breathnach R and Chambon P: Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* 50: 349-363, 1981.

- Breckwoldt M, Keck C and Karck U: Benefits and risks of hormone replacement therapy (HRT). *J Steroid Biochem Mol Biol* 53: 205-208, 1995.
- Brink M, Humbel BM, DeKloet ER and Vandriel R: The unliganded glucocorticoid receptor is localized in the nucleus, not in the cytoplasm. *Endocrinology* 130: 3575-3580, 1992.
- Brugge JS: New intracellular targets for therapeutic drug design. *Science* 260: 918-919, 1993.
- Bruggemeler U, Kalff M, Franke S, Scheidereit C and Beato M: Ubiquitous transcription factor OTF-1 mediates induction of the MMTV promoter through synergistic interaction with hormone receptors. *Cell* 64: 565-572, 1991.
- Buetti E and Kuhnel B: Distinct sequence elements involved in the glucocorticoid regulation of the mouse mammary tumor virus promoter identified by linker scanning mutagenesis. *J Mol Biol* 190: 379-389, 1986.
- Burnstein KL and Cidlowski JA: Regulation of gene expression by glucocorticoids. *Annu Rev Physiol* 51: 683-699, 1989.
- Cadepond F, Gasc J-F, Delahaye F, Jibard N, Schweizer-Groyer G, Segard-Maurel I, Evans R, and Baulieu E-E: Hormonal regulation of the nuclear localization signals of the human glucocorticoid receptor. *Exp Cell Res* 201: 99-108, 1992.
- Capon DJ, Chen EY, Levinson AD, Seeburg PH and Goeddel DV: Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* 302: 33-37, 1983.
- Chen CY, Oliner JD, Zhan Q, Fornace AJ, Vogelstein B and Kastan MB: Interactions between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle check-point pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2684-2688, 1994.
- Chen J-Y, Funk WD, Wright WE, Shay JW and Minna JD: Heterogeneity of transcriptional activity of mutant p53 proteins and p53 target sequences. *Oncogene* 8: 2159-2166, 1993.
- Chen P-L, Chen Y, Bookstein R and Lee W-H: Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 250: 1576-1579, 1990.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD and Pavletich NP: Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265: 346-355, 1994.
- Clore GM, Omichinski JG, Sakaguchi K, Zembrano N, Sakamoto H, Appella E and Gronenborn AM: High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multi-dimensional NMR. *Science* 265: 386-391, 1994.

- Cohen JB, Maureen VW and Levinson AD: A repetitive sequence element 3' of the human c-Ha-*ras*1 gene has enhancer activity. *J Cell Physiol (Suppl)* 5: 75-81, 1987.
- Comb M and Goodman HM: CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res* 18: 3975-3982, 1990.
- Corden J, Wasylyk B, Buchwalder A, Sassone-Corsi P, Kedinger C and Chambon P: Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. *Science* 209: 1405-1414, 1980.
- Counts JL and Goodman JI: Comparative analysis of the methylation status of the 5' flanking region of Ha-*ras* in B6C3F1, C3H/He and C57BL/6 mouse liver. *Cancer Lett* 75: 129-136, 1993.
- Deslypere JP: Obesity and Cancer. *Metabolism (Suppl)* 44: 24-27, 1995.
- Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky A, Moore M, Finlay K and Levine A: Gain of function mutation of p53. *Nat Genet* 4: 42-45, 1993.
- Dobner T, Horikoshi N, Rubenwolf S and Shenk T: Blockage by Adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science* 272: 1470-1473, 1996.
- Donehower LA and Bradley A: The tumor suppressor p53. *Biochem Biophys Acta* 1155: 181-205, 1993.
- Dynan WS and Tjian R: Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature* 316: 774-778, 1985.
- Dutta A, Ruppert JM, Aster JC and Winchestewr E: Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature* 365: 79-82, 1993.
- Egan SE, McClarty GA, Jarolim L, Wright JA, Spiro I, Hager G and Greenberg AH: Expression of H-*ras* correlates with metastatic potential: evidence for direct regulation of the metastatic phenotype in 10T1/2 and NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 7: 830-837, 1987.
- Ei-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW and Vogelstein B: Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1: 45-49, 1992.
- Ei-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW and Vogelstein B: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817-825, 1993.
- Esteban JM, Felder B, Ahn C, Simpson JF, Battifora H and Shively JE: Prognostic relevance of carcinoembryonic antigen and estrogen receptor status in breast cancer patients. *Cancer* 74: 1575-1583, 1994.

- Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895, 1988.
- Fan W, Trifiletti R, Cooper T and Norris JS: Cloning of a μ -class glutathione S-transferase gene and identification of the glucocorticoid regulatory domains in its 5' flanking sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6104-6108, 1992.
- Fawell SE, Lees JA, White R, Parker MG: Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell* 60: 953-962, 1990.
- Field JK, Zoumpourlis V, Spandidos DA and Jones AJ: p53 expression and mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck: Expression correlates with the patients' use of tobacco and alcohol. *Cancer Detect Prev*, 18: 197-208, 1994.
- Finlay CA, Hinds PW and Levine AJ: The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57: 1083-1093, 1989.
- Finlay CA, Hinds PW, Tan T-H, Eliyahu D, Oren M and Levine AJ: Activating mutations from transformation by p53 produce a gene product that forms an hsp70-p53 complex with an altered half life. *Mol Cell Biol* 8: 531-539, 1988.
- Forrester K, Ambs S, Lupold SE, Kapust RB, Spillare EA, Weinberg WC, Felley-Bosco E, Wang XW, Geller DA, Tzeng E, Billiar TR and Harris CC: Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2442-2447, 1996.
- Funk WD, Pak DT, Karas RH, Wright WE and Shay JW: A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol* 12: 2866-2871, 1992.
- Gannon JV, Greaves R, Iggo R and Lane DP: Activating mutations in p53 produce common conformational effects: a monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 9: 1595-1602, 1990.
- Geisler JP, Wiemann MC, Miller GA, Zhou Z and Geisler HE: Estrogen and progesterone receptors in malignant mixed mesodermal tumors of the ovary. *J Surg Oncol* 59: 45-47, 1995.
- Ghosh D: Glucocorticoid receptor-binding site in the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *J Virol* 66: 586-590, 1992.
- Gillies McKenna W, Bernhard EJ, Markiewicz DA, Rudoltz MS, Maity A and Muschel RJ: Regulation of radiation-induced apoptosis in oncogene-transfected fibroblasts: influence of H-ras on the G2 delay. *Oncogene* 12: 237-245, 1996.

- Ginsberg D, Mechter F, Yaniv M and Oren M: Wild-type p53 can down modulate the activity of various promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9979-9983, 1991.
- Glass CK: Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers and heterodimers. *Endocrine Rev* 15: 391-407, 1994.
- Gordeladzer JO, Johansen PW, Paulssen RH, Paulssen EJ and Gautvik KM: G-proteins: implications for pathophysiology and disease. *Eur J Endocrinol* 131: 557-574, 1994.
- Grady D, Gebredsadik T, Kerlikowske K, Ernster V and Pettiti D: Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 85: 304-313, 1995.
- Graham FL and Van der Eb: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirous 5 DNA. *Virology* 52: 456-467, 1973.
- Gronostajski RM, Goldberg AJ and Pardee AB: Energy requirement for degradation of tumor-associated protein p53. *Mol Cell Biol* 4: 442-448, 1984.
- Hainaut P and Milner J: Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding in vitro. *Cancer Res* 53: 4469-4473, 1993.
- Hainaut P: The tumor suppressor protein p53: a receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival. *Curr Opin Oncol* 7: 76-82, 1995.
- Halachmi S, Marden E, Martin G, MacKay A, Abbonanza C and Brown M: Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* 264: 1455-1458, 1994.
- Halazonetis TD and Kandil AN: Conformational shifts propagate from the oligomerization domain of p53 to its tetrameric DNA binding to select p53 mutants. *EMBO J* 12: 5057-5064, 1993a.
- Halazonetis TD, Davis LJ and Kandil AN: Wild-type p53 adopts a "mutant"-like conformation when bound to DNA. *EMBO J* 12: 1021-1028, 1993b.
- Halazonetis TD: An enhancer "core" DNA-binding and transcriptional activity is induced upon transformation of rat embryo fibroblasts. *Anticancer Res* 12: 285-292, 1992.
- Hard T, Kellenbach E, Boelens R, Maler BA, Dahlman K, Freedman LP, Carlstedt-Duke J, Yamamoto KR, Gustafsson JA and Kaptein C: Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Science* 249: 157-160, 1990.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K and Elledge SJ: The p21 cdk-interacting protein Cip 1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805-816, 1993.

- Hashimoto-Gotoh T, Kikuno R, Takahashi M and Honkawa H: Possible role of the first intron of *c-H-ras* in gene expression: anti-cancer elements in oncogenes. *Anticancer Res* 8: 851-860, 1988.
- Hashimoto-Gotoh T, Takahashi M, Kikuno R, Ishihara H and Tezuka K: Unusual sequence conservation in intron-1 of *c-H-ras* oncogene and its effect on p21 protein synthesis. In: *Current Perspectives of Molecular Cellular Oncology*. Spandidos DA (ed). London, JAI Press pp211-230, 1992.
- Havrilesky LJ, Elbendary A, Hurteau JA, Whitaker RS, Rodriguez GC and Berchuck A: Chemotherapy-induced apoptosis in epithelial ovarian cancers. *Obstet Gynecol* 85: 1007-1010, 1995.
- Heck S, Kullmann M, Gast A, Panda H, Rahmisdorf J Herrlich P and Cato ACB: A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J* 13: 4087-4095, 1994.
- Hinds P, Finlay C and Levine AJ: Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the *ras* oncogene and transformation. *J Virol* 63: 739-746, 1989.
- Hinds P, Finlay CA, Quartin RS, Buker SJ, Fearon ER, Vogelstein B and Levine AJ: Mutant p53 cDNA from human colorectal carcinomas can cooperate with *ras* in transformation of primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell Growth Diff* 1: 571-580, 1990.
- Hollenberg SM and Evans RM: Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 55: 899-906, 1988.
- Hollenberg SM, Giguère V, Segui P and Evans RM: Co-localization of DNA binding and transcriptional activation function in the human glucocorticoid receptor. *Cell* 49: 39-46, 1987.
- Honkawa H, Masahashi W, Hashimoto S and Hashimoto-Gotoh T: Identification of the principal promoter sequence of the *c-Ha-ras* transforming oncogene: deletion analysis of the 5' flanking region by focus formation assay. *Mol Cell Biol* 7: 2933-2940, 1987.
- Hyder SM, Stancel GM and Loose-Mitchell DS: Steroid hormone-induced expression of oncogene encoded nuclear proteins. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 4: 55-116, 1994.
- Hupp T, Meek D, Midgley G and Lane D: Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* 71: 875-866, 1992.
- Hupp TR, Meek DW, Midgley CA and Lane DP: Activation of the cryptic DNA binding function of mutant forms of p53. *Nucleic Acids Res* 21: 3167-3174, 1993.

- Ishii S, Kadonaga JT, Tjian R, Brandy JN, Merlino GT and Pastan I: Binding of the Sp1 transcription factor by the human Harvey *ras1* proto-oncogene promoter. *Science* 232: 1410-1413, 1986.
- Ishii S, Merlino GT and Pastan I: Promoter region of the human Harvey *ras* proto-oncogene: Similarity to the EGF receptor proto-oncogene promoter. *Science* 230: 1378-1381, 1985.
- Janicek MF, Sevin BU, Nguyen HN and Averette HE: Combination anti-gene therapy targeting c-myc and p53 in ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol* 59: 87-92, 1996.
- Jantzen HM, Strahle U, Gloss, B, Stewart F, Schmid W, Boshart M, Ksicek R and Schutz G: Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene. *Cell* 49: 29-38, 1987.
- Jones KA, Kadonaga JT, Rosenfeld PJ, Kelly TJ and Tjian R: A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell* 48: 79-89, 1987.
- Juven T, Barak Y, Zauberman A, George DL and Oren M: Wild-type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the *mdm2* gene. *Oncogene* 8: 3411-3416, 1993.
- Kadonaga JT, Jones KA and Tjian R: Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Sp1. *TIBS* 11: 20-23, 1986.
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshmann K, Tavitigian SV, Stockert E, Day RS, Johnson BE and Scklonick MH: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumour types. *Science* 264: 436-440, 1994.
- Karin M, Haslinger A, Holtgreve H, Richards RI, Krauter P, Westphal HM and Beato M: Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene. *Nature* 308: 513-519, 1984.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B and Craig RW: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51: 6304-6311, 1991.
- Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B and Fornace Jr AJ: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71: 587-597, 1992.
- Katsaros D, Theillet C, Zola P, Iouason G, Sanfilippo B, Isaia E, Arisio R, Giardina G and Sismondi P: Concurrent abnormal expression of *erbB-2*, *myc* and *ras* genes is

- associated with poor outcome of ovarian cancer patients. *Anticancer Res* 15: 1501-1510, 1995.
- Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marmé D and Kolch W: Mutant p53 potentiates kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 9: 963-969, 1994.
- Koffa M, Malamou-Mitsi V, Agnantis NJ and Spandidos DA: Mutational activation of *K-ras* oncogene in human breast tumors. *Int J Oncol* 4: 573-576, 1994.
- Kondo H, Sugano K, Fukayama N, Kyogoku A, Nose H, Shimada K, Ohkura H, Ohtsu A, Yoshida S and Shimosato Y: Detection of point mutations in the *K-ras* oncogene at codon 12 in pure pancreatic juice for diagnosis for pancreatic carcinoma. *Cancer* 73: 1589-1594, 1994.
- Konig H, Ponta H, Rahmsdorf HJ and Herrlich P: Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation *in vivo*. *EMBO J* 11: 2241-2246, 1992.
- Kotsinas A, Kiaris H and Spandidos DA: A method to detect and quantitate the expression of normal versus mutant *H-ras* transcripts at codon 12. *Int J Oncol* 5: 479-483, 1994.
- Krontiris TG, Devlin B, Karp DD, Robert NJ and Risch N: An association between the risk of cancer and mutations in the *HRAS* 1 minisatellite locus. *N Eng J Med* 329: 517-523, 1993.
- Kumar R, Sukumar S and Barbacid M: Activation of *ras* oncogenes preceding the onset of neoplasia. *Science* 248: 1101-1104, 1990.
- Kumar V and Chambon P: The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 55: 145-150, 1988.
- Lancaster JM, Wiseman RW and Berchuck A: An inevitable dilemma: prenatal testing for mutations in the *BRCA1* breast- ovarian susceptibility gene. *Obstet Gynecol* 87: 306-309, 1996.
- Lane DP and Crawford LV: T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 278: 261-263, 1979.
- Lauritzen C: Cancer risk under hormone therapy. *Ther Umsch* 51: 755-766, 1994.
- Lee W and Keller EB: Regulatory elements mediating transcription of the human *Ha-ras* gene. *J Mol Biol* 220: 599-611, 1991.
- Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Williams ED, Goyns M, Stringer B and Wynford-Thomas D: High frequency of *ras* oncogene mutation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene* 4: 159-164, 1989.

- Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M and Welsh D: The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* 69: 409-416, 1994.
- Lewin B: *Genes* IV. John Wiley and Sons (ed), Κεφ 12-16 και 29-31, 1990.
- Lin H-JL, Eviner V, Prendergast GC and White E: Activated H-*ras* rescues E1A-induced apoptosis and cooperates with E1A to overcome p53-dependent growth arrest. *Mol Cell Biol* 15: 4536-4544, 1995.
- Liu X, Miller CW, Koeffler PH and Berk AJ: The p53 activation domain binds the TATA box-binding polypeptide in holo-TFIID, and a neighbouring p53 domain inhibits transcription. *Mol Cell Biol* 13: 3291-3300, 1993.
- Lorenz J, Friedberg T, Oesch F and Ferlinz R: Oncogene overexpression in non-small cell lung cancer tissue: prevalence and clinicopathological significance. *Clin Invest* 72: 156-163, 1994.
- Lowndes NF, Paul J, Wu J and Allan M: c-Ha-*ras* gene bidirectional promoter expressed *in vitro*. *Mol Cell Biol* 9: 3758-3770, 1989.
- Lowy DR and Willumsen BM: Function and regulation of *ras*. *Annu Rev Biochem* 62: 851-891, 1993.
- Lucas PC and Granner DK: Hormone response domains in gene transcription. *Annu Rev Biochem* 61: 1131-1173, 1992.
- Macara IG, Lounsbury KM, Richards SA, McKiernan C and Bar-Sagi D: The Ras superfamily of GTPases. *FASEBJ* 10: 625-630, 1996.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Scutz G, Umesoto K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P and Evans RM: The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839, 1995.
- Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J: *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Marshall H, Martens I, Svensson C, Akusjarvi G and Linder S: Glucocorticoid hormones may partially substitute for adenovirus E1A in cooperation with *ras*. *Exp Cell Res* 194: 35-41, 1991.
- Marshall MS: Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J* 9: 1311-1318, 1995.
- Martinez J, Georgoff I, Martinez J and Levine AJ: Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature sensitive p53 protein. *Genes Dev* 5: 151-159, 1991.
- McEwan IJ, Wright APH, Dahlman-Wright K, Carlstedt-Duke J and Gustafsson J: Direct interaction of the $\tau 1$ transactivation domain of the human glucocorticoid receptor with the basal transcriptional machinery. *Mol Cell Biol* 13: 399-407, 1993.

- McGuire WL: Quantitation of estrogen receptor in mammary carcinoma. *Methods in Enzymology*, Academic Press (ed), vol 36, 1975.
- Mercer WE, Shields MT, Lin D, Appella E and Ullrich SJ: Growth suppression induced by selective down-regulation of proliferating-cell antigen expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1958-1962, 1991.
- Miesfeld RL: The structure and function of steroid receptor proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 24: 101- 117, 1989.
- Mizuuchi H, Nasim S, Kudo R, Silverberg SG, Greenhouse S and Garrett CT: Clinical implications of *K-ras* mutations in malignant epithelial tumors of the endometrium. *Cancer Res* 52: 2777-2781, 1992.
- Miller-Diener A, Schmidt TJ and Litwack G: Protein kinase activity associated with the purified rat hepatic glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4003-4007, 1985.
- Milne DM, Campbell DG, Caudwell FB and Meek DW: Phosphorylation of the tumor suppressor protein p53 by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 269: 9253-9260, 1994.
- Miyashita T and Reed JC: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell* 80: 293-299, 1995.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewski M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B and Reed JC: Tumor suppressor p53 is a regulator of *bcl-2* and *bax* gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 9: 1799-1805, 1994.
- Moll UM, Riou G and Levine AJ: Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7262-7266, 1992.
- Morris GF, Bischoff JR and Mathews MB: Transcriptional activation of the human proliferating-cell nuclear antigen promoter by p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 895-899, 1996.
- Morris PC, Anderson JR, Anderson B and Buller RE: Steroid hormone receptor content and lymph node status in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 56: 406-411, 1995.
- Muller BF, Paulsen D and Deppert W: Specific binding of MAR/ SAR DNA-elements by mutant p53. *Oncogene* 12: 1941-1952.
- Musgrove EA and Sutherland RL: Cell cycle control by steroid hormones. *Semin Cancer Biol* 5: 381-389, 1994.
- Myers RM, Tilly K and Maniatis T: Fine structure genetic analysis of a β -globin promoter. *Science* 232: 613-618, 1986.

- Nagase T, Ueno Y and Ishii S: Transcriptional control of the human Harvey *ras* proto-oncogene: role of multiple elements in the promoter region. *Gene* 94: 249-253, 1990.
- Nasmyth K: Retinoblastoma protein: another role rolls in. *Nature* 382: 28-29, 1996.
- Niewolik D, Vojtesek B and Kovaric J: P53 derived from human tumour cell lines and containing distinct point mutations can be activated to bind its consensus target sequence. *Oncogene* 10: 881-890, 1995.
- Nyholm HC, Nielsen AL, Lyndrup J, Greene GL and Thorpe SM: Estrogen receptor determination in endometrial carcinoma: ligand binding assay versus enzyme immunoassay. *Anticancer Res* 15: 649-654, 1995.
- Oberolser P, Hloch P, Ramsperger U and Stahl H: p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. *EMBO J* 12: 2389-2396, 1993.
- Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer, PS, George D and Vogelstein B: Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Lancet* 340: 259-263, 1992.
- Palacios S: Cancer surveillance during HRT. *Int J Fertil Menopausal Stud* 39: 93-98, 1994.
- Paquette RL, Landaw EA, Pierre RV, Kahan J, Lubbert M, Lazcano O, Isaac G, McCormick F and Koeffler P: *N-ras* mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome. *Blood* 82: 590-599, 1993.
- Park DJ, Nakamura H, Chumakov AM, Said JW, Miller CW, Chen DL and Koeffler HP: Transactivational and DNA binding abilities of endogenous p53 in p53 mutant cell lines. *Oncogene* 9: 1899-1906, 1994.
- Payvar F, DeFranco, D, Firestone GL, Edgar B, Wrange O, Okret S, Gustafsson JA and Yamamoto KR: Sequence-specific binding of glucocorticoid receptor to MMTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region. *Cell* 35: 381-392, 1983.
- Pavletich NP, Chambers KA and Pabo CO: The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev* 7: 2556-2564, 1993.
- Pietenpol JA and Vogelstein B: No room at the p53 inn. *Nature* 365: 17-18, 1993.
- Pintzas A and Spandidos DA: Sp1 specific binding sites within the human *H-ras* promoter: potential role of the 6 bp deletion sequence in the T24 *H-ras1* gene. *Anticancer Res* 11: 2067-2070, 1991.

- Pocard M, Chevillard S, Villaudy J, Poupon MF, Dutrillaux B and Remvikos Y: Different p53 mutations produce distinct effects on the ability of colon carcinoma cells to become blocked at the G1/ S boundary after irradiation. *Oncogene* 12: 875-882, 1996.
- Ponta H, Cato ACB and Herrlich P: Interference of pathway specific transcription factors. *Biochim Biophys Acta* 1129: 255-261, 1992.
- Pratt WB, Hutchison KA and Scherrer LC: Steroid receptor folding by heat-shock proteins and composition of the receptor heterocomplex. *Trends Endocrinol Metab* 3: 326-333, 1992.
- Pratt WB: The role of heat shock proteins in regulating the function, folding and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 268: 21455-21458, 1993.
- Ragimov N, Krauskopf A, Navot N, Rotter V, Oren M and Aloni Y: Wild-type but not mutant p53 can repress transcription initiation *in vitro* by interfering with the binding of basal transcription factors to the TATA motif. *Oncogene* 8: 1183-1193, 1993.
- Reddy P, Reynolds RK, Santos E and Barbacid M: A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300: 149-152, 1982.
- Renkawitz R, Schutz G, Dietmar von der Ahe and Beato M: Sequences in the promoter region of the chicken lysozyme gene required for steroid regulation and receptor binding. *Cell* 37: 503-510, 1984.
- Rotter V, Aloni-Grinstein, Schwartz D, Elkind NB, Simons A, Wolkowicz R, Lavigne M, Beserman P, Kapon A and Goldfinger A: Does wild-type p53 play a role in normal cell differentiation? *Seminars in Cancer Biology* 5: 229-236, 1994.
- Saatcioglu F, Claret FX and Karin M: Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. *Semin Cancer Biol* 5: 347-359, 1994.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn GT, Mullis K and Erlich H: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491, 1988.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- Sang BC, Chen JY, Minna J and Barbosa MS: Distinct regions of p53 have a differential role in transcriptional activation and repression functions. *Oncogene* 9: 853-859, 1994.
- Santoso JT, Tang DC, Lane SB, Hung J, Reed DJ, Muller CY et al. Adenovirus-based p53 gene therapy in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 59:169-170, 1995.

- Sarnow P, Ho YS, Williams J and Levine AJ: Adenovirus E1B-58 Kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54kD cellular protein in transformed cells. *Cell* 28: 387-394, 1982.
- Schatt MD, Rusconi S and Schaffner W: A single DNA-binding transcription factor is sufficient for activation from a distant enhancer and/ or from a promoter position. *EMBO J* 9: 481-487, 1990.
- Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA and Baldwin AS Jr: Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- κ B activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 15: 943-953, 1995.
- Schwartz MR: Carcinoembryonic antigen and estrogen receptor: a prognostic duo in breast cancer? *Cancer* 74: 1519-1522, 1994.
- Sehgal A, Patil N and Chao M: A constitutive promoter directs expression of the nerve growth factor receptor gene. *Mol Cell Biol* 8: 3160-3167, 1988.
- Sekeris CE: Hormonal steroids act as tumor promoters by modulating oncogene suppression. *J Cancer Res Clin Oncol* 117: 96-101, 1991.
- Seol W, Choi H-S and Moore DD: An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science* 272: 1336-1339, 1996.
- Sheng ZM, Barrois M, Klijanienko J, Micheau C, Richard JM and Riou G: analysis of c-Ha-ras-1 gene for deletion, mutation, amplification and expression in lymph node metastasis of human head and neck carcinomas. *Br J Cancer* 62: 398-404, 1990.
- Shim J, Lee H, Park J, Kim H and Chol E-J: A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases. *Nature* 381: 804-807, 1996.
- Slater EP, Rabenau O, Karin M, Baxter JD and Beato M: Glucocorticoid receptor binding and activation of a heterologous promoter by dexamethasone by the first intron of the human growth hormone gene. *Mol Cell Biol* 5: 2984-2992, 1985.
- Smale ST and Baltimore D: The "initiator" as a transcriptional control element. *Cell* 57: 103-113, 1989.
- Σπαντίδος ΔΑ: Μοριακή και κυτταρική ογκολογία. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, 1992.
- Spandidos DA and Agnantis NJ: Human malignant tumors of the breast, as compared to their respective normal tissue, have elevated expression of the Harvey ras oncogene. *Anticancer Res* 4: 269-272, 1984.

- Spandidos DA and Holmes L: Transcriptional enhancer activity in the variable tandem repeat DNA sequence downstream of the human Ha-*ras1* gene. FEBS Lett 218: 41-46, 1987.
- Spandidos DA and Lang J: immortalization by truncated *ras* or *myc* genes and synergism between *myc* and *ras* in cell transformation. Anticancer Res 9: 1149-1152, 1989.
- Spandidos DA and Wilkie NM: Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. Nature 310: 469-475, 1984.
- Spandidos DA, Zoumpourlis V, Zachos G, Toas SH and Halazonetis TD: Specific recognition of a transcriptional element within the human H-*ras* proto-oncogene by the p53 tumor suppressor. Int J Oncol 7: 1029-1034, 1995.
- Spandidos DA, Zoumpourlis V, Kotsinas A, Tsiriyotis C and Sekeris CE: Response of human immunodeficiency virus long terminal repeat to growth factors and hormones. Anticancer Res 10: 1241-1246, 1990.
- Spandidos DA, Frame M and Wilkie NM: Expression of the normal H-*ras1* gene can suppress the transformed and tumorigenic phenotypes induced by mutant *ras* genes. Anticancer Res 10: 1543-1554, 1990.
- Spandidos DA, Liloglou T, Arvanitis D and Gourtsoyiannis NC: Ras gene activation in human small intestinal tumors. Int J Oncol 2: 513-518, 1993.
- Spandidos DA, Nichols RAB, Wilkie NM and Pintzas A: Phorbol ester-responsive H-*ras1* gene promoter contains multiple TPA-inducible/ AP-1-binding consensus sequence elements. FEBS Lett 240: 191-195, 1988.
- Spandidos DA: The human T24 Ha-*ras1* oncogene: a study of the effects of overexpression of the mutated *ras* gene product in rodent cells. Anticancer Res 6: 259-262, 1986.
- Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE and Liotta LA: Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. J Natl Cancer Inst 80: 200-204, 1988.
- Stein B and Yang MX: Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF- κ B and C/EBP β . Mol Cell Biol 15: 4971-4979, 1995.
- Su LK, Vogelstein B and Kinzler KW: Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. Science 262: 1734-1737, 1993.
- Sturzbecher H-W, Donzelmann B, Henning W, Knippschilts U and Buchhop S: p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/ RecA protein interaction. EMBOJ 15: 1992-2002, 1996.

- Subler M, Martin D and Deb S: Inhibition of viral and cellular promoters by human wild-type p53. *J Virol* 66: 4757-4762, 1992.
- Sugio K, Ishida T, Yokoyama H, Inoue T, Sugimachi K and Sadazuki T: *ras* gene mutations as a prognostic marker in adenocarcinoma of the human lung without lymph node metastasis. *Cancer Res* 52: 2903-2906, 1992.
- Sugio K, Kishimoto Y, Virmani AK, Hung JY and Gazdar AF: K-*ras* gene mutations are a relatively late event in the pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res* 54: 5811-5815, 1994.
- Taylor CR: Paraffin section immunocytochemistry for estrogen receptor: the time has come. *Cancer* 77: 2419-2422, 1996.
- Teurich S and Angel P: The glucocorticoid receptor synergises with Jun homodimers to activate AP-1-regulated promoters lacking GR binding sites. *Chem Senses* 20: 251-255, 1995.
- Tiniakos D, Spandidos DA, Kakkanas A, Pintzas A, Pollice L and Tiniakos G: Expression of *ras* and *myc* oncogenes in human hepatocellular carcinoma and non-neoplastic liver tissues. *Anticancer Res* 9: 715-722, 1989.
- Tokino T, Thiayalingam S, El-Deiry WS, Waldman T, Kinzler KW and Vogelstein B: p53 sites from human genomic DNA. *Hum Mol Gen* 3: 1537-1542, 1994.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 76: 4350-4358, 1979.
- Trepicchio WL and Krontiris TG: Members of the *rel*/NF κ B family of transcriptional regulatory proteins bind the *HRAS1* minisatellite DNA sequence. *Nucleic Acids Res* 20: 2427-2434, 1992.
- Trimble WS and Hozumi N: Deletion analysis of the c-Ha-*ras* oncogene promoter. *FEBS Lett* 219: 70-74, 1987.
- Tsai MJ and O'Malley BW: Molecular mechanisms of action of steroid/ thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63: 451-486, 1994.
- Van Dam PA, Vergote IB, Lowe DG, Watson JV, van Damme P, van der Auwera JC and Sphepherd JH: Expression of c-*erbB-2*, c-*myc* and c-*ras* oncoproteins, insulin-like growth factor receptor I, and epidermal growth factor receptor in ovarian carcinoma. *J Clin Pathol* 47: 914-919, 1994.
- Vechtenheim J, Horakova I and Novotna H: Hypomethylation of CCGG sites in the 3' region of the H-*ras* proto-oncogene is frequent and associated with H-*ras* allele loss in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 54: 1145-1148, 1994.

- Vedeckis WV: Nuclear receptors, transcriptional regulation and oncogenesis. *Exp Biol Med* 5: 1-12, 1992.
- Von Hippel PH, Bear DG, Morgan WD and McSwiggen JA: Protein-nucleic acid interactions in transcription: a molecular analysis. *Annu Rev Biochem* 53: 389-446, 1984.
- Wade-Evans A and Jenkins JR: Precise epitope mapping of the murine transformation-associated protein p53. *EMBO J* 4: 699-706, 1985.
- Waterman JLF, Shenk JL and Halazonetis TD: The dihedral symmetry of the p53 tetramerization domain mandates a conformational switch upon DNA binding. *EMBO J* 14: 512-519, 1995.
- Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz Argetsinger J and Weiner AM: *Molecular Biology of the gene*. The Benjamin Cummings Publishing Company, 2nd Edition, Vol 1, Κεφ 9, 10, 1989.
- Webster NJG, Green S, Jin J and Chambon P: The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell* 54: 199-207, 1988.
- Werness BA, Levine AJ and Howley PM: Association of human papilloma virus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248: 76-79, 1990.
- Wylie AH: The genetic regulation of apoptosis. *Curr Op Gen Dev* 5: 97-104, 1995.
- Wu X, Bayle JH, Olson D and Levine AJ: The p53-*mdm2* autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7: 1126-1132, 1993.
- Winston JT, Coats SR, Wang Y-Z and Pledger WJ: Regulation of the cell cycle machinery by the oncogenic *ras*. *Oncogene* 12: 127-134, 1996.
- Xiao ZX, Chen J, Levine AJ, Modjtahedi N, Xing J, Sellers WR and Livingston DM: Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* 375: 694-698, 1995.
- Yoshinaga SK, Peterson CL, Herkowitz I and Yamamoto KR: Roles of SWI1, SWI2 and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science* 258: 1598-1604, 1992.
- Zachos G, Zoumpourlis V, Sekeris CE and Spandidos DA: Binding of the glucocorticoid and estrogen receptors to the human H-*ras* oncogene sequences. *Int J Oncol* 6:595-600, 1995.
- Zachos G, Varras M, Koffa M, Ergazaki M and Spandidos DA: The association of the H-*ras* oncogene and steroid hormone receptors in gynecological cancer (Review). *J Exp Ther Oncol*, in press.

- Zachos G, Varras M, Koffa M, Ergazaki M and Spandidos DA: Glucocorticoid and estrogen receptors have elevated activity in human endometrial and ovarian tumors as compared to the adjacent normal tissues and recognize elements of the H-ras proto-oncogene. *Jpn J Cancer Res* 87: 916-922, 1996b.
- Zambetti GP and Levine AJ: A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEB J* 7: 855-865, 1993.
- Zastawny RK, Salvino R, Chen J, Benhimol S and Ling V: The core promoter region of the p-glycoprotein gene is sufficient to confer differential responsiveness to wild-type and mutant p53. *Oncogene* 8: 1529-1535, 1993.
- Zauberman A, Flusberg D, Haupt Y, Barak Y and Oren M: A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human *mdm2* gene. *Nucleic Acids Res* 23: 2584-2592, 1995.
- Zhan Q, Lord KA, Alamo I, Hollander MC, Carrier F, Ron D, Hohn K, Hoffman B, Liebermann DA and Fornace AJ: The gadd and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth. *Mol Cell Biol* 14: 2361-2371, 1994.
- Zhang W, Funk WD, Wright WE, Shay JW and Deisseroth AB: Novel DNA binding of p53 mutants and their role in transcriptional activation. *Oncogene* 8: 2555-2559, 1993a.
- Zhang W, Guo X-Y, Hu G-Y, Liu W-B, Shay JW and Deisseroth AB: A temperature-sensitive mutant of human p53. *EMBO J* 13: 2535-2544, 1994.
- Zhang W, Shay JW and Deisseroth A: Inactive p53 mutants may enhance the transcriptional activity of wild-type p53. *Cancer Res* 53: 4472-4775, 1993b.
- Zoumpourlis V, Ergazaki M and Spandidos DA: AP-1 recognizes sequence elements on HIV-1 LTR in human epithelial tumor cell lines. *Oncol Rep* 1: 397-401, 1994.
- Zoumpourlis V, Zachos G, Halazonetis TD, Ergazaki M and Spandidos DA: Binding of wild-type and mutant forms of P53 protein from human tumors to a specific DNA sequence of the first intron of the H-ras oncogene. *Int J Oncol* 7: 1035-1041, 1995.