

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΕΛΕΝΗ ΒΑΚΩΝΑΚΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ  
ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ p63 ΚΑΙ p73  
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012**

Στους γονείς μου  
και στην αδερφή μου

Στη μνήμη του παππού μου

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### Προσωπικές Πληροφορίες:

---

**Όνομα:** Βακωνάκη Ελένη  
**Ημερ. Γέννησης:** 5 Δεκεμβρίου 1979  
**Τόπος Γέννησης:** Ηράκλειο Κρήτης  
**Εθνικότητα** Ελληνική  
**Διεύθυνση:** 1<sup>η</sup> πάροδος Αθηνών 6, Άγιος Ιωάννης, Ηράκλειο, Κρήτης  
**Τηλ:** (+30) 6945080983  
**E-mail:** evakonaki@gmail.com

### Εκπαίδευση:

---

- 2008-2011** **Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής**  
*Θέμα:* “Μελέτη της έκφρασης και των μηχανισμών ρύθμισης των γονιδίων p63 και p73 στον καρκίνο του ενδομητρίου ”.  
**Υπεύθυνος καθηγητής: Δρ. Δ.Α Σπαντίδος**  
Εργαστήριο Ιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- 1998-2008** **Πτυχίο Βιολογίας**  
Scienze Biologiche II, Federico II, Napoli, Italy (Βαθμός πτυχίου: 82/110)
- 2005-2007** **Πτυχιακή Εργασία**  
*Θέμα:* “Ο ρόλος του πολυμορφισμού στο codon 72 της p53 και της μόλυνσης από τον ανθρώπινο ιό του παπιλώματος (HPV), στην ανάπτυξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.  
Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Seconda universita degli studi di Napoli, Medicina e chirurgia, Napoli
- 2010** EUROTOX Basic Toxicology Course.
- 2011** EUROTOX Advance Toxicology Course
-

## **Εργαστηριακή εμπειρία:**

---

### **Εργαστήριο Medicina di Laboratorio (Εργαστηριακής Ιατρικής), Τμήμα Ιατρικής, Seconda Università Degli Studi di Napoli**

- ⇒ Διαγνωστικές εξετάσεις για την ανίχνευση των ιών HPV
- ⇒ Ανίχνευση των μεταλλάξεων MSH-2 και MLH-1 και στην ανίχνευση της μετάλλαξης BRCA1 και BRCA2
- ⇒ Εξακρίβωση μιας νέας μεταβλητής του splicing της survivina.

### **Εργαστήριο Ιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης**

- ⇒ Ανίχνευση τροφοβλαστικών κυττάρων στο έξω τραχηλικό στόμιο εγκύων γυναικών με τη χρήση αυτοματοποιημένου συστήματος FISH. Διερεύνηση της συμβολής των αποτελεσμάτων της μελέτης στη δημιουργία μεθόδου μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου.
- ⇒ Ανίχνευση του HPV σε παιδιά με ενεργή αναπνευστική θηλωμάτωση
- ⇒ Ανίχνευση του HPV στο μητρικό γάλα
- ⇒ Ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με καρδιαγγειακές νόσους.
- ⇒ Διαγνωστικές εξετάσεις για την ανίχνευση των ιών HPV, CMV, HSV, EBV.

### **Εργαστήριο Τοξικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης**

- ⇒ Ανίχνευση πολυμορφισμών συσχετιζόμενων με την κατάθλιψη σε χρήστες απαγορευμένων ουσιών
- ⇒ Test πατρότητας και ταυτοποιήσεις γενετικού υλικού.
- ⇒ Διαγνωστικές εξετάσεις για τοξικές ουσίες σε βιολογικά δείγματα.
- ⇒ Ανίχνευση αντισωμάτων για οπιούχα σε χρόνιους χρήστες.

## **Δημοσιεύσεις σε περιοδικά:**

- 
- Mammias IN, Sourvinos G, Vakonaki E, Giamarelou P, Michael C, Spandidos DA. Novel human papilloma virus (HPV) genotypes in children with recurrent respiratory papillomatosis. . Eur J Pediatr. 2010. 169(8):1017-21.
  - Vakonaki E, Soultzis N, Sifakis S, Papadogianni D, Koutroulakis D, Spandidos DA. Overexpression and ratio disruption of ΔNp63 and TAp63 isoform equilibrium in endometrial adenocarcinoma: correlation with obesity, menopause, and grade I/II tumors. J Cancer Res Clin Oncol. 2012 Mar 24. [Epub ahead of print]

### **Άρθρα σε βιβλία:**

---

- Genetic susceptibility to organophosphates pesticides. Vakonaki E, Androutsopoulos V, Tsatsakis AM. Eurotox, Basic Toxicology Course, 2010

### **Βραβεία:**

---

3<sup>ο</sup> διαπανεπιστημιακό διανοσοκομειακό συνέδριο μαιευτικής γυναικολογίας. Βραβείο καλύτερης ελεύθερης ανακοίνωσης για την εργασία με τίτλο «Ανίχνευση εμβρυικών κυττάρων σε ενδοτραχηλικό επίχρισμα στην διάρκεια του πρώτου τριμήνου κύησης

### **Συμμετοχή σε συνέδρια:**

---

- SHFM 2009. Fetal cells detection by endocervical sampling at first gestation trimester. Stavros Sifakis, Apostolos Zaravinos, Satish Ghatpande, Antti Seppo, Elena Vakonaki, Michael W Kilpatrick, Triantaphyllos Tafas, Petros Tsiouras.
- 14<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 12<sup>th</sup> International Symposium on molecular medicine. Human papilloma virus (HPV) and recurrent respiratory papillomatosis in childhood: Clinical, histological and molecular characteristics. I. Mamas, G. Sourvinos, P. Giamarelou, E. Vakonaki, C. Michael, D.A. Spandidos
- 14th World Congress on Advances in Oncology and 12<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine. Comparison of different molecular methodologies for the detection of human papilloma virus (HPV). Zaravinos A, Mamas I, Vakonaki E, Zafiroopoulos A, Sourvinos G, Spandidos DA.
- 15<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 13<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine. Multiple human papilloma virus (HPV) infection with novel HPV types 13 and 39 in a 5-year-old child with recurrent respiratory papillomatosis. I. Mamas, G. Sourvinos, E. Vakonaki, P. Giamarelou, C. Michael, A. Zaravinos, D.A. Spandidos
- 15<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 13<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine. Expression of HDAC1-3 in endometrial cancer. V.

Androutsopoulos, S. Sifakis, E. Vakonaki, D. Koutroulakis, G. Koutoulakis, A. Pitarokoilis, D.A. Spandidos, A.M. Tsatsakis

- 15<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 13<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine. Methylation and expression profile of p73 in endometrial carcinoma. E. Vakonaki, N. Soultziz, D. Papadogianni, S. Sifakis, D.A. Spandidos
- 15<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology and 13<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine. Human papilloma virus and recurrent respiratory papillomatosis in children in Greece: A retrospective study. I.N. Mamas, G. Sourvinos, P. Giamarelou, E. Vakonaki, C. Michael, A. Zaravinos, D.A. Spandidos
- Nestoros, I.<sup>1</sup>; Alegakis, A.<sup>2</sup>; Vakonaki, E.<sup>2</sup>; Christakis-Hampsas, M.<sup>2</sup>; Tsatsakis, A.<sup>3</sup> Short term memory impairment and Schizophrenia-like symptoms are associated with cannabinoids in head hairs in chronic heavy cannabis users **Source:** Toxicology Letters Volume: 205 Supplement: 1 Pages: S27-S27 DOI: 10.1016/j.toxlet.2011.05.1024 Published: AUG 28 2011
- Mamas Ioannis N.; Sourvinos George; Vakonaki Elena; et al. Breastfeeding and transmission of maternal human papillomavirus to infants International Journal Of Molecular Medicine Volume: 28 Supplement: 1 Pages: S42-S42 Meeting Abstract: 252 Published: 2011
- Ntaoukakis Markos; Vakonaki Elena; Sarchianaki Emmanouela; et al. Detection of a CCR5 gene polymorphism in patients with Lichen Planus International Journal Of Molecular Medicine Volume: 28 Supplement: 1 Pages: S73-S73 Meeting Abstract: 376 Published: 2011
- Vakonaki Eleni; Soultziz Nikolaos; Sifakis Stavros; et al. Overexpression and ratio disruption of Delta Np63 and TAp63 isoforms in endometrial adenocarcinoma International Journal Of Molecular Medicine Volume: 28 Supplement: 1 Pages: S75-S75 Meeting Abstract: 383 Published: 2011
- Tzatzarakis M, Morozova V, Vakonaki E, Petrochenko S, Myagkova M, Barbounis E, Kanaki A, Belivanis S, Tsatsakis A. Antibodies to opiates in serum as markers of chronic drug use. 3rd Russian-Hellenic Symposium. Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Problems and Safety Issues. Heraklio, Agapi Beach, May 6-13, Crete, Greece.
- Michalakis M, Tzatzarakis NM, Alegakis KA, Kavvalakis M, Vakonaki E, Heretis I, Gubandru M, Tsatsakis A. Pesticides levels (DDTs, HCHs and DAPs) in blood and hair samples of children diagnosed with hypospadias. 48th Congress of the European

Societies of Toxicology (EUROTOX 2012) June 17-20, 2012, Stockholm, Sweden (poster).

- Tzatzarakis M, Morozova V, Vakonaki E, Petrochenko S, Myagkova M, Barbounis E, Kanaki A, Belivanis S, Tsatsakis A. Detection of antibodies in serum of drug users after an abstinence period of opiates use. 48th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2012) June 17-20, 2012, Stockholm, Sweden (poster).

---

### **Ξένες γλώσσες:**

---

**Αγγλική Γλώσσα:** Πολύ καλή γνώση αγγλικής γλώσσας, επίπεδο Advanced

**Ιταλική Γλώσσα:** Άριστη γνώση Ιταλικής γλώσσας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική διατριβή μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν να την φέρω εις πέρας και κυρίως τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Δ.Α. Σπαντίδο, για την ευκαιρία που μου έδωσε.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής αυτής της διατριβής, Καθηγητή κ. Γ. Σαμώνη για τις συμβουλές, αλλά και για την ηθική και υλική υποστήριξη που μου παρείχε, καθώς επίσης και τον Καθηγητή κ. Α. Μακρυγιαννάκη για το ενδιαφέρον του. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, Καθηγητή κ. Α. Τσατσάκη, Αναπλ. Καθηγητή κ. Γ. Σουρβίνο, Επικ. Καθηγητή κ. Α. Ζαφειρόπουλο και Αναπλ. Καθηγητή κ. Χ. Τσατσάνη, για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης, όλα τα μέλη του εργαστηρίου Κλινικής Ιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης για την συνεργασία τους και ειδικά τον κ. Νίκο Σουλιτζή για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια της διατριβής, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Τοξικολογίας για την ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν.

Δεν θα παρέλπισα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους μου και ιδιαίτερα τους: Ρένα, Μανώλη, Βασίλη, Αντιγόνη, Μάρκο, Εμμανουέλλα, Ματθαίο, Γιώργο, Πέρσα, Μαρία για την υποστήριξη και τη συμπαράσταση τους, όλο αυτό το διάστημα.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	11
<b>ABSTRACT</b>	14
<b>1. Εισαγωγή</b>	
1.1. Ο καρκίνος του ενδομητρίου	16
1.1.1. Ενδομήτριο	16
1.1.2. Τύποι καρκίνου του ενδομητρίου	17
1.1.3. Παράγοντες κινδύνου	18
1.1.4. Γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεση του καρκίνου του ενδομητρίου	19
1.2. Το γονίδιο p53 και ο ρόλος του στον καρκίνο του ενδομητρίου.	21
1.4. Η οικογένεια των γονιδίων της p53	25
1.4.1 Δομή του γονιδίου p63	26
1.4.2 Δομή του γονιδίου p73	30
1.5.1. Ο ρόλος του γονιδίου p63 στην εμβρυική ανάπτυξη και στον καρκίνο	34
1.5.2. Ο ρόλος του γονιδίου p73 στην εμβρυική ανάπτυξη και στον καρκίνο	35
1.5.3. Ο ρόλος των γονιδίων p63 και p73 συλλογικά στην εμβρυική ανάπτυξη και στον καρκίνο	37
1.6.1. Ο ρόλος του γονιδίου p63 στην απόπτωση	38
1.6.2. Ο ρόλος του γονιδίου p63 στον ανθρώπινο καρκίνο	40
1.7.1 Ο ρόλος του γονιδίου p73 στην απόπτωση	41
1.7.2 Ο ρόλος του γονιδίου p73 στον καρκίνο	43
<b>2. Σκοπός και σημασία</b>	
2.1 Σκοπός και σημασία της προτεινόμενης διδακτορικής διατριβής	45
<b>3. Υλικά και Μέθοδοι</b>	
3.1 Δείγματα	46
3.1.1 Συλλογή δειγμάτων όγκων ενδομητρίου	46
3.1.2 Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων	46
3.2 Μέθοδοι	49

3.2.1 Απομόνωση ολικού RNA από τους ιστούς	49
3.2.2 Απομόνωση ολικού DNA από τους ιστούς	50
3.2.3 Προσδιορισμός της ποσότητας και καθαρότητας του RNA και DNA	50
3.2.4 Κατεργασία με δισουλφιδικό νάτριο	50
3.2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης MSP (Methylation-specific PCR)	51
3.2.6 Εκτέλεση ηλεκτροφόρησης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο	54
3.2.7 Προετοιμασία cDNA	54
3.2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)	55
3.3 Στατιστική ανάλυση	58
3.4 Διαλύματα	59
<b>4. Αποτελέσματα</b>	
4.1.1 Τα επίπεδα mRNA των ισομορφών TAp63 και ΔNr63 στον καρκίνο του ενδομητρίου	60
4.1.2 Συσχετισμός αποτελεσμάτων της έκφρασης των δύο ισομορφών TAp63 και ΔNr63 με τα κλινικοπαθολογικά στοιχεία των ασθενών	64
4.2.1 Τα επίπεδα mRNA των ισομορφών TAp73 και ΔNr73 στον καρκίνο του ενδομητρίου	67
4.2.2. Μελέτη μεθυλίωσης των υποκινητών P1 και P2 του γονιδίου p73 στον καρκίνο του ενδομητρίου	70
4.2.3. Συγκριτικά αποτελέσματα της έκφρασης και της μελέτης της μεθυλίωσης της ΔNr73	73
<b>5. Συζήτηση</b>	
5.1. Συζήτηση αποτελεσμάτων για το γονίδιο p63 στον καρκίνο	75
5.2. Συζήτηση αποτελεσμάτων για το γονίδιο p73 στον καρκίνο του ενδομητρίου	80
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	84

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεΐνη **p63** παίζει σημαντικό ρόλο σε αρκετές ενδοκυτταρικές διεργασίες, όπως η ενεργοποίηση της μεταγραφής και η απόπτωση. Το γονίδιο p63 έχει δύο αμινοτελικές ισομορφές, τις TAp63 και ΔNp63. Οι TAp63 ισομορφές έχουν παρόμοιες λειτουργίες με την p53, ενώ οι ΔNp63 ισομορφές λειτουργούν ανασταλτικά και θεωρούνται ογκογόνες. Παρόλο που η p63 και οι ισομορφές της υπερεκφράζονται σε ευρύ φάσμα ανθρώπινων νεοπλασιών, όπως οι καρκίνοι του τραχήλου της μήτρας, του μαστού και του πνεύμονα, ο ρόλος τους στον καρκίνο του ενδομητρίου δεν έχει ακόμη διερευνηθεί.

Μετρήσαμε με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) την έκφραση του mRNA των ισομορφών TAp63 και ΔNp63 σε καρκινικά και παρακείμενα φυσιολογικά δείγματα 20 ασθενών με αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου.

Αναγνωρίστηκε υπερέκφραση της TAp63 και ΔNp63 ισομορφής στα καρκινικά δείγματα κατά 1.8 και 4.3 φορές, αντίστοιχα. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι η αναλογία των ισομορφών ΔN/TA μετατοπίστηκε από 0.5 στα φυσιολογικά δείγματα στο 1.2 στα καρκινικά δείγματα. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η έκφραση της TAp63 ισομορφής σχετίζεται με υψηλό δείκτη μάζας σώματος ( $p=0.034$ ), με καθυστερημένη έναρξη της

εμμηνόπαυσης ( $p=0.020$ ) και με όγκους μέσης και υψηλής διαφοροποίησης ( $p=0.034$ ). Η έκφραση της ΔNr63 ισομορφής σχετίζεται επίσης με όγκους μέσης και υψηλής διαφοροποίησης ( $p=0.044$ ).

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι και οι δύο αμινοτελικές ισομορφές της πρωτεΐνης p63, και ιδιαίτερα η ΔNr63, πιθανά κατέχουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη των αδενοκαρκινωμάτων ενδομητρίου μέσης και υψηλής διαφοροποίησης, ιδιαίτερα σε παχύσαρκες και καθυστερημένες εμμηνόπαυσης γυναίκες.

Η πρωτεΐνη **p73** παίζει σημαντικό ρόλο στις αναπτυξιακές διεργασίες του ανθρώπινου οργανισμού. Οι υποκινητές του γονιδίου P1 και P2 παράγουν δύο διαφορετικές ισομορφές, τις TAp73 και ΔNr73, αντίστοιχα. Η TAp73 έχει παρόμοιες λειτουργίες με την p53, ενώ η ΔNr63 λειτουργεί ως αναστολέας των διεργασιών αυτών. Η p73 υπερεκφράζεται σε ανθρώπινες νεοπλασίες, όπως ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα, και των ωοθηκών, αλλά ο ρόλος της στον καρκίνο του ενδομητρίου δεν έχει διερευνηθεί.

Χρησιμοποιήθηκαν καρκινικοί και παρακείμενοι φυσιολογικοί ιστοί 20 ασθενών με αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου. Η έκφραση του mRNA των TAp73 και ΔNr73 μετρήθηκε με Real-Time PCR (qPCR), ενώ η μεθυλίωση των υποκινητών P1 και P2 εξετάστηκε με methylation-specific PCR (MSP).

Ο υποκινητής P1 δεν ήταν μεθυλιωμένος ούτε στα φυσιολογικά ούτε στα καρκινικά δείγματα, ενώ τα επίπεδα έκφρασης της TAp73 ισομορφής ήταν αυξημένα στο 35% και μειωμένα στο 15% των καρκινικών δειγμάτων, αντίστοιχα. Αντιθέτως, ο υποκινητής P2 ήταν μεθυλιωμένος στο 50% των δειγμάτων και μη-μεθυλιωμένος μόνο στον καρκινικό ιστό σε 6/20 (30%) δείγματα. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με την έκφραση της ΔNr73 ισομορφής, η οποία

δεν εκφράζεται στο 50% των δειγμάτων, ενώ σε 7/20 (35%) δείγματα εκφράζεται μόνο στον καρκινικό ιστό. Η στατιστική ανάλυση αποκάλυψε ότι η απομεθυλίωση του P2 υποκινητή σχετίζεται με εμφάνιση της νόσου σε μικρότερη ηλικία ( $56.2 \pm 3.9$  έναντι  $64.3 \pm 2.1$  έτη,  $p=0.048$ ). Παρόμοια, η έκφραση της ΔNr73 ισομορφής σχετίζεται θετικά με εμφάνιση της νόσου σε ασθενείς ηλικίας  $<60$  έτη ( $p=0.035$ ).

Η απομεθυλίωση του υποκινητή P2 και η επακόλουθη έκφραση της ΔNr73 ισομορφής πιθανά κατέχει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη του καρκίνου του ενδομητρίου.

## **ABSTRACT**

**p63** plays an important role in several intracellular processes such as transcription activation and apoptosis. p63 has two N-terminal isoforms, TAp63 and DNp63. TAp63 isoform has p53-like functions, while DNp63 acts as a dominant negative inhibitor of the p53 family and is considered oncogenic. Although p63 and its isoforms are overexpressed in a wide variety of human malignancies such as cervical, head and neck, and lung cancer, their role in endometrial carcinoma has not been investigated.

We measured by quantitative real-time polymerase chain reaction the mRNA expression of TAp63 and DNp63 in a series of 20 endometrioid adenocarcinomas paired with adjacent normal tissue.

TAp63 isoform exhibited 1.8-fold overexpression in malignant samples, while DNp63 was 4.3-fold overexpressed in cancer specimens. Further analysis revealed that the DN/TA isoform ratio shifted from 0.5 in normal samples to 1.2 in tumor specimens. Statistical analysis also revealed an association of TAp63 expression with high body mass index ( $p = 0.034$ ), late menopause ( $p = 0.020$ ), and lower tumor grade ( $p = 0.034$ ). DNp63 was also correlated with grade I/II tumors ( $p = 0.044$ ).

These results indicate that both p63 isoforms and especially DNp63 play an important role in the development and progression of

grade I/II endometrial adenocarcinoma, especially in obese and late-menopause women.

**p73** plays an important role in several intracellular processes such as transcription activation and apoptosis. Its promoters, P1 and P2, produce two different classes of proteins: those containing the transactivation domain (TAp73) and those lacking it ( $\Delta$ Np73). TA-isoforms exhibit p53-like functions, while  $\Delta$ N- isoforms act as dominant negative inhibitors of both wild-type p53 and TAp73. p73 is overexpressed in a wide variety of human tumors such as breast, lung, colon, bladder and ovarian cancer.

We investigated the role of p73 isoforms in endometrial adenocarcinoma in a series of 20 tumor and adjacent normal tissue samples. Mrna expression of TAp73 and  $\Delta$ Np73 was measured by real-time PCR, while the methylation profile of promoters P1 and P2 was examined by methylation-specific PCR (MSP).

Methylation analysis showed that P1 promoter was unmethylated in all normal and malignant samples, while TAp73 expression levels were higher in 7/20 (35%), lower in 3/20 (15%) and normal in 10/20 (50%) tumor specimens. On the contrary, P2 promoter was methylated in 10/20 (50%), unmethylated in 2/20 (10%) and unmethylated only in the tumor specimen in 6/20 (30%) samples, respectively. This finding was in accordance with  $\Delta$ Np73 mRNA expression, since  $\Delta$ Np73 was not expressed in 10/20 (50%) samples, while in 7/20 (35%) samples it was only expressed in the tumor specimen.

From the above results we deduce that the demethylation of P2 promoter and the subsequent expression of  $\Delta$ Np73 in tumor specimens is a key event in the development and progression of endometrial cancer.

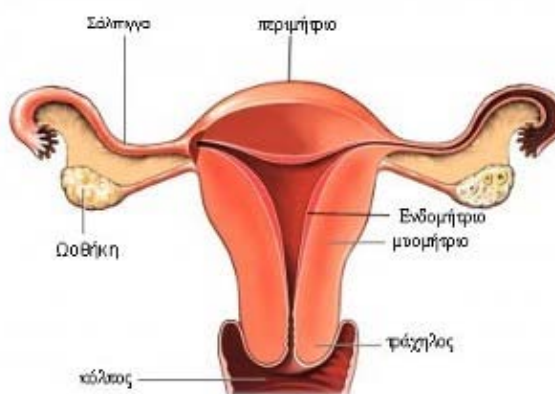
## 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.3. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ

#### 1.3.1. ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟ

Η μήτρα είναι το κοίλο μυϊκό όργανο του γυναικείου γεννητικού συστήματος σε σχήμα αχλαδιού, που διασφαλίζει τη φιλοξενία, τη διατροφή και την ακεραιότητα του εμβρύου σε όλη την φάση της εμβρυικής του ζωής. Βρίσκεται ανάμεσα στην ουροδόχο κύστη και στο παχύ έντερο, το μήκος της κυμαίνεται στα 6 με 8 εκατοστά ενώ το πλάτος της δεν ξεπερνά τα 5 εκατοστά. Η μήτρα αποτελείται από δύο μέρη, το σώμα, που είναι το πιο ογκώδες μέρος της και βρίσκεται προς τα πάνω, και τον τράχηλο, που είναι το λεπτότερο μέρος της και βρίσκεται προς τα κάτω. Το τοίχωμα της αποτελείται από τρία στρώματα (Εικόνα 1).

- Το ενδομήτριο, όπως ονομάζεται το επιφανειακό στρώμα πλούσιο σε αδένες που επενδύει εσωτερικά την μήτρα,
- Το μυομήτριο, το εξωτερικό δηλαδή μυϊκό στρώμα της μήτρας,
- Το περιμήτριο, η εξωτερική λεπτή επένδυση της μήτρας.



Εικόνα 1. Ανατομία της μήτρας.



### **1.3.2. ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ**

Ο καρκίνος του ενδομητρίου είναι η τέταρτη πιο διαδεδομένη μορφή καρκίνου μετά από αυτή του μαστού, του πνεύμονα και του εντέρου. Αποτελεί την πιο διαδεδομένη μορφή γυναικολογικού καρκίνου στο δυτικό κόσμο, ενώ υπολογίζεται ότι 35.000 νέα περιστατικά διαγιγνώσκονται ετησίως στις Η.Π.Α. (Delahanty et al., 2011).

Ο καρκίνος του ενδομητρίου μπορεί να διακριθεί σε δύο τύπους με βάση τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά του (Bokhman et al., 1983). Ο τύπος I είναι και ο πιο συχνός, καλύπτει το 85% περίπου των περιπτώσεων και εμφανίζει συχνά ER θετικό (οιστρογόνο-εξαρτώμενος). Οι όγκοι αυτού του τύπου εμφανίζονται συχνότερα σε γυναίκες προ- και περί -εμμηνοπαυσιακές, είναι καλά διαφοροποιημένοι, χαμηλού κινδύνου και με καλή πρόγνωση. Ο τύπος II καλύπτει το υπόλοιπο 15% των περιπτώσεων ενώ εμφανίζεται σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση. Στον τύπο αυτό εντάσσεται το ορώδες και το διαυγοκυτταρικό ενδομητριακό καρκίνωμα που προκύπτει από το ατροφικό ενδομήτριο. Είναι ER αρνητικός (ορμονο-ανεξάρτητος), ελάχιστα διαφοροποιημένος, υψηλού κινδύνου και με κακή πρόγνωση. Οι όγκοι του τύπου αυτού είναι υπεύθυνοι για το 50% του συνόλου των υποτροπών (Gehrig, 2009), και παρά το γεγονός ότι έχει γίνει μεγάλη πρόοδος στην θεραπεία του, η πενταετής επιβίωση των ασθενών εξακολουθεί να κυμαίνεται κάτω από το 15% των περιπτώσεων.

### **1.3.3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ**

Ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου αυξάνεται με το πέρασ της ηλικίας, από την θεραπευτική χρήση οιστρογόνων, καθώς επίσης και από την μεγάλη συγκέντρωση οιστρογόνων μετά την εμμηνόπαυση. Η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου επηρεάζεται με την παρουσία μεταβολικών συνδρόμων όπως ο διαβήτης, σε άτομα με ιστορικό καρκίνου μαστού καθώς και με μακροχρόνια θεραπεία με Tamoxifen (Denschlag et al., 2010). Η παρουσία HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colon Cancer) ευθύνεται για το 10% των περιπτώσεων καρκίνου του ενδομητρίου και αυξάνει κατά 10% την πιθανότητα να νοσήσουν τα άτομα με HNPCC σε σχέση με τα υγιή (Uccella et al., 2011).

Ένας επιπλέον παράγοντας που οδηγεί στην εμφάνιση της νόσου είναι η θεραπεία διάρκειας μικρότερης των 12-14 ημερών για την υποκατάσταση των ορμονών με προγεστερόνη. Η υπερπλασία του ενδομητρίου καθώς και το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών φαίνεται να είναι συνδεδεμένα με τον καρκίνο του ενδομητρίου (McCormick et al., 2011). Η έλλειψη κυήσεων και η παρατεταμένη αιμορραγία κατά την έμμηνο ρύση αποτελούν προδιαθεσιακούς παράγοντες για την νόσο (Denschlag et al., 2010).

Παρά τον σποραδικό χαρακτήρα των περισσότερων μορφών καρκίνου του ενδομητρίου, από τους παράγοντες κινδύνου δεν μπορεί να απουσιάζει και η κληρονομική προδιάθεση ιδιαίτερα σε ηλικίες κάτω των 55 ετών. Εκτιμάται ότι το 5% των γυναικών που εμφάνισαν τη νόσο σε νεαρή ηλικία έχουν βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό (Gruber et al., 1996). Τα τελευταία χρόνια με την πρόοδο στην μελέτη του ανθρώπινου γονιδιώματος, βρέθηκαν επιπλέον παράγοντες σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο που είναι άμεσα συνδεδεμένοι με την εμφάνιση της νόσου.

#### **1.3.4. ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ**

Από μοριακής άποψης η πιο συχνή μετάλλαξη που σχετίζεται με τον πρώτο τύπο του καρκίνου του ενδομητρίου εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10 και πιο συγκεκριμένα στο γονίδιο PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog). Το γονίδιο PTEN ανήκει στα ογκοκατασταλτικά γονίδια, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή ενδοκυτταρικών σημάτων μέσω της οδού PIP3, ενώ λειτουργεί ρυθμιστικά στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Li et al., 2011). Λόγο του ρυθμιστικού του ρόλου εμπλέκεται στις αποπτωτικές διαδικασίες του κυττάρου μιας και ενεργοποιεί την κινάση της σερίνης-θρεονίνης (Mutter et al., 2000). Μεταλλάξεις του γονιδίου παρουσιάζονται στο καρκίνο του ενδομητρίου σε ποσοστό 34-83%.

Ένα άλλο εμπλεκόμενο γονίδιο με τον καρκίνο του ενδομητρίου είναι και το k-Ras. Μεταλλάξεις του γονιδίου έχουν βρεθεί στο 19-46% του καρκίνου του ενδομητρίου, με τις περισσότερες να ανιχνεύονται στο κωδικόνιο 12 και 13 και σπανιότερα στο κωδικόνιο 61 (Lagarda et al., 2001, Semczuk et al., 2001). Το γονίδιο k-ras κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης με λειτουργία GTPασης παίζοντας έτσι ζωτικό ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση και ανάπτυξη.

Ένα άλλο μόριο που παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση καρκίνου του ενδομητρίου είναι η β-κατενίνη (beta-catenin), η οποία βοηθάει στην σύνδεση των ινών της ακτίνης, ενώ παράλληλα μειώνει και την ενεργοποίηση της αντιγραφής που ελέγχεται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο APC (Li et al., 2011). Συσσώρευση της στο κυτόπλασμα προκαλεί απορύθμιση σε διάφορα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Η έκφρασή της ανιχνεύεται στο 16-38% των περιπτώσεων καρκίνου του ενδομητρίου (Mutter et al., 2000).

Στον δεύτερο τύπο του καρκίνου του ενδομητρίου δεν συναντάμε συνήθως μεταλλάξεις, ενώ τα γονίδια επιδιόρθωσης βλαβών (mismatch repair genes) είναι ανενεργά ή έχουν κατασταλεί μέσω της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου MLH-1 (Seeber et al., 2010). Το γονίδιο Her2/neu, που κωδικοποιεί έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των κυττάρων και σχετίζεται με τον καρκίνο του ενδομητρίου, καθώς είναι συνήθως υπερεκφρασμένο στη συγκεκριμένη νεοπλασία (Chakravarty et al., 2010).

Έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει προσελκύσει και το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, το οποίο εμφανίζεται μεταλλαγμένο σε ποσοστό >90% των καρκίνων του ενδομητρίου, τύπου II (Albertini et al., 2012, Merritt et al., 2011).

#### **1.4. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ P53 ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ.**

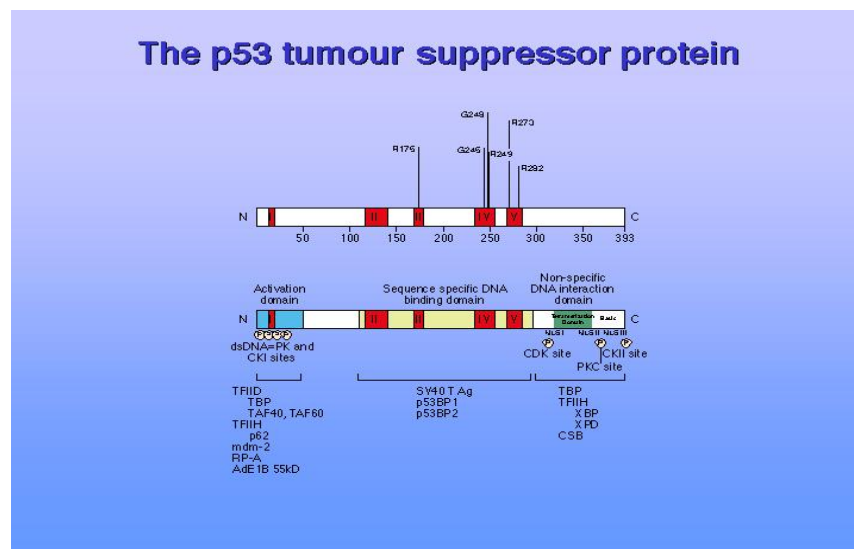
Το γονίδιο *p53* περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1979 σε μία μελέτη του ιού SV40 (*Virus Simian 40*) και αποτολεί το πρώτο και πιο πολυσυζητημένο ογκοκατασταλτικό γονίδιο (Lane DP et al., 1979; Linzer DI et al., 1979). Το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17p13.1, αποτελείται από 11 εξώνια και 10 ιντρόνια και το μέγεθος του είναι 20 Kb, ενώ κωδικοποιεί μια φωσφοπρωτεΐνη που αποτελείται από 393 αμινοξέα. Η *p53* φαίνεται να λειτουργεί σαν μεταγραφικός παράγοντας και εμπλέκεται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση, στην γήρανση, στην ανάπτυξη, στην διαφοροποίηση, στην μεταγραφή, στην αναπαραγωγή, στην επιδιόρθωση του DNA και στην διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας (Sturzbecher HW et al., 1994; Soussi T<sup>1</sup> et al., 1995; Kastan MB<sup>1</sup> et al., 1991; Kastan MB<sup>2</sup> et al., 1995).

Η πρωτεΐνη *p53* δομικά αποτελείται από πέντε περιοχές διαφορετικές τόσο στην δομή τους όσο και στην λειτουργία τους (Εικόνα 2).

- Την όξινη αμινοτελική περιοχή, (αμινοξέα 1-44), παρουσιάζει την περιοχή έναρξης της μεταγραφής
- Την περιοχή πλούσια σε προλίνες (αμινοξέα 62-94),
- Την περιοχή δέσμευσης του DNA (αμινοξέα 110-292),
- Την περιοχή τετραμερισμού (αμινοξέα 325-363),
- Την καρβοξυτελική περιοχή, που εμπλέκεται στην ρύθμιση του δεσμού με το DNA (αμινοξέα 363-393)

Για το μεγαλύτερο μέρος των λειτουργιών της *p53* ευθύνεται η αμινοτελική περιοχή. Εκεί γίνεται η έναρξη της μεταγραφής και αντιδρά με πρωτεΐνες όπως η *TATA-BOX δεσμευτική πρωτεΐνη* (TBP) ή η πρωτεΐνη Mdm-2 (Pietenpol JA et al., 1991).

Η περιοχή πλούσια σε προλίνες παρουσιάζει την περιοχή SH3 (*src-homology 3*), η οποία εμπλέκεται στους δεσμούς πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και στην ρύθμιση της μετάφρασης του σήματος. Η περιοχή SH3 εμφανίζεται απαραίτητη για την ενεργοποίηση της απόπτωσης p53-εξαρτούμενης, αλλά όχι στο σταμάτημα της κυτταρικής ανάπτυξης.



Εικόνα 2. Δομή της πρωτεΐνης p53

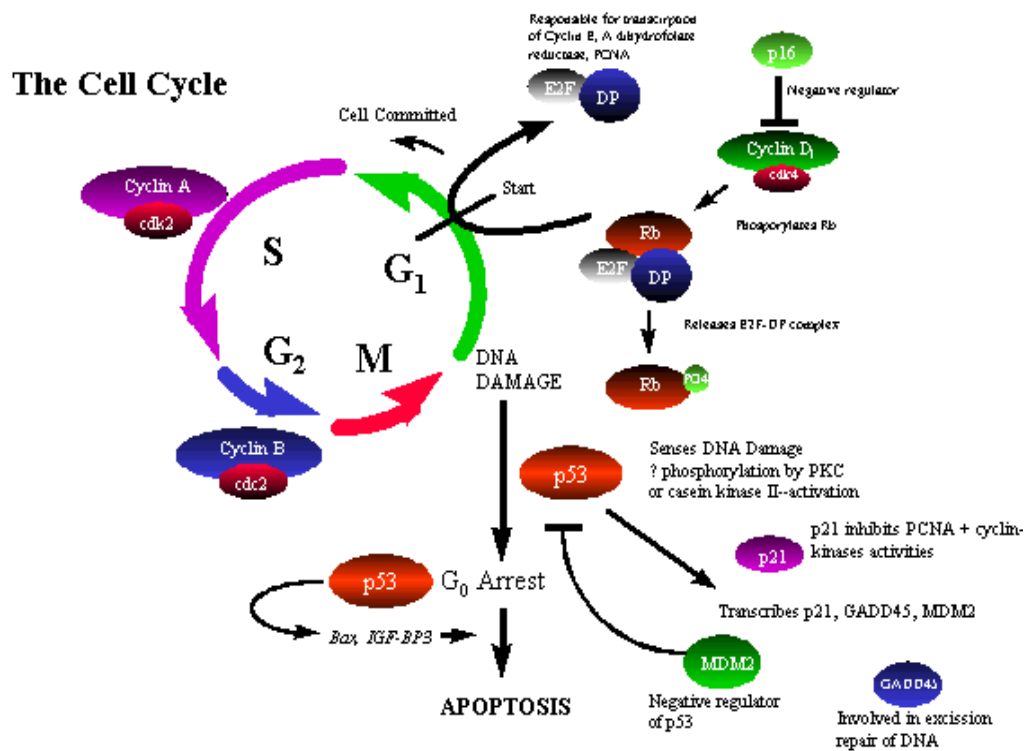
Η περιοχή τετραμερισμού βρίσκεται στην κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης, είναι πλούσια σε ιδρόφοβα αμινοξέα βοηθώντας έτσι στην περιέλιξη του μορίου επιτρέποντας τον δεσμό της πρωτεΐνης με το DNA (Jayaraman J et al., 1995, Levine AJ et al., 1997). Αυτό είναι υπεύθυνο για την διαδικασία που γίνεται δύο λεπτά μετά την σύνθεση της πρωτεΐνης και οδηγεί στον σχηματισμό ενός ενεργού τετραμερούς από την ένωση δύο μη λειτουργικών διμερών .

Τέλος η καρβοξυτελική περιοχή περιέχει το σήμα της εγκατάστασης της πρωτεΐνης στον πυρήνα.

Η πρωτεΐνη p53 εκφράζεται σε όλους τους τύπους κυττάρων και είναι εγκαταστημένη στους πυρήνες των φυσιολογικών κυττάρων, σε χαμηλή συγκέντρωση. Σε φυσιολογικά κύτταρα ο χρόνος ημιζωής της πρωτεΐνης είναι 20 λεπτά, ενώ ο χρόνος ημιζωής της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης είναι αυξημένος, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στα καρκινικά κύτταρα.

Η έκφραση της p53 αυξάνεται σε περιπτώσεις κυτταρικού στρες, όπως βλάβες στο DNA (Komarova E. 1997), ενεργοποίηση ογκογονιδίων ιονίζουσα ή υπεριώδη ακτινοβολία. Στην περίπτωση αυτή ενεργοποιείται η p53, παθαίνοντας μετά-μεταγραφικές τροποποιήσεις και ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων που οδηγούν στο σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση (Εικόνα 3). Πιο συγκεκριμένα η p53 τετραμερίζεται, προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες του DNA ενεργοποιώντας γονίδια στόχους όπως το p21 που οδηγούν στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1 ή G2. Η p53 παρεμβαίνει έτσι σε αυτή την διαδικασία προκαλώντας την μεταγραφή της πρωτεΐνης GADD45 (*Growth Arrest and DNA Damage*) που εμπλέκεται στις διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA.

Εάν το λάθος επιδιορθωθεί, η p53 ενεργοποιεί το *Mdm-2*, του οποίου το προϊόν ενώνεται με την p53 και την απενεργοποιεί (feedback negative). Σε περίπτωση που κατά το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου η βλάβη του DNA δεν επιδιορθωθεί η πρωτεΐνη p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση.



Εικόνα 3. Ο ρόλος της p53 στον κυτταρικό κύκλο και στην απόπτωση.



## **1.5. Η οικογένεια των γονιδίων της p53**

Το γονίδιο p53 ανακαλύφθηκε το 1979 και μόλις το 1997 οι Kaghad et al. ταυτοποίησαν ένα νέο γονίδιο που εδρεύει στο 1p36.3 με μεγάλο ποσοστό ομολογίας με την p53, το γονίδιο αυτό ονομάστηκε p73 (Kaghad et al. 1997). Λίγο αργότερα ένα νέο γονίδιο στην θέση 3q27-29 βρέθηκε και ονομάστηκε με την σειρά του p63.

Τα δύο αυτά γονίδια εμφανίζουν υψηλό ποσοστό ομολογίας με το γονίδιο p53, πιο συγκεκριμένα στην περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης η ομολογία του p63 με το p53 είναι 26% ενώ η ομολογία μεταξύ p73 και p53 είναι 30%. Στην περιοχή δέσμευσης του DNA η ομολογία μεταξύ του p53 και των p63 και p73 είναι 80% και 79% αντίστοιχα. Όσο για την περιοχή ολιγομερισμού η ομολογία είναι 31% μεταξύ p53 και p63, και στο 33% ανάμεσα στο p53 και p73. Χαρακτηριστικό των δύο αυτών γονιδίων είναι ένα παρατεταμένο καρβοξύ-τελικό άκρο το οποίο απουσιάζει από την p53.

Τα υψηλά ποσοστά ομολογίας των δύο αυτών γονιδίων με το p53 αρχικά έδωσε την εντύπωση πως είναι και αυτά τυπικά ογκοκατασταλτικά γονίδια. Μεταγενέστερες μελέτες όμως έδειξαν ότι ο ρόλος των γονιδίων αυτών είναι αρκετά διαφοροποιημένος στην καρκινογένεση, ενώ παράλληλα έχουν και διαφορετικό ρόλο κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα δύο αυτά γονίδια δεν αποτελούν στόχο μεταλλάξεων στον ανθρώπινο καρκίνο (Moll et al. 2004).

### **1.5.1. Δομή του γονιδίου p63.**

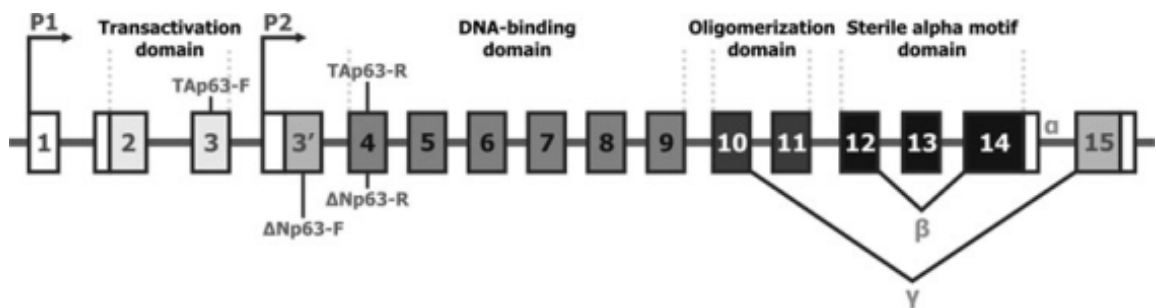
Το γονίδιο p63 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3q27-29 και αποτελείται από 15 εξώνια και έχει μέγεθος 270 kbp (Levrero et al. 2000). Όλα τα μετάγραφα της p63 περιέχουν μια περιοχή δέσμευσης στο DNA, με ομολογία με την p53 περίπου στο 80% και μία περιοχή ολιγομερισμού με ομολογία 31%.

Τα αμινοξέα στην περιοχή δέσμευσης του DNA της p53 που επικοινωνούν απευθείας με το DNA ή μέσω ιόντων ψευδαργύρου που χρειάζονται ώστε να επιτευχθεί η DNA δεσμευτική δραστηριότητα της πρωτεΐνης διατηρούνται και στην περιοχή δέσμευσης του DNA στην p63. Αυτό σημαίνει όχι μόνο ότι έχουμε διατήρηση της ακολουθίας των αμινοξέων αλλά και την διατήρηση της δομής της πρωτεΐνης στην περιοχή αυτή. Οι NMR μελέτες της p53 και p63 στην περιοχή πρόσδεσης του DNA έχουν επιβεβαιώσει μια ταυτόσημη δομή και δευτερεύοντα στοιχεία για τους περιοχές αυτές των πρωτεϊνών (Furrer et al. 2003).

Το γονίδιο p63 διαθέτει δύο υποκινητές, έναν εξωτερικό P1 που βρίσκεται αμέσως πριν το πρώτο εξώνιο και κωδικοποιεί τις TA ισομορφές, οι οποίες περιλαμβάνουν την περιοχή της μεταγραφικής ενεργοποίησης στο αμινοτελικό άκρο τους και έναν εσωτερικό P2 υποκινητή στο εσώνιο 3' που κωδικοποιεί τις ΔN ισομορφές στις οποίες απουσιάζει η περιοχή της μεταγραφικής ενεργοποίησης (Εικόνα 1.4.1).

Τα μετάγραφα της p63 μπορούν να υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα μετά το εσώνιο 10, με αποτέλεσμα να έχουμε μεγάλη ποικιλομορφία. Το εναλλακτικό μάτισμα στο 3' άκρο έχει σαν αποτέλεσμα την ύπαρξη τριών διαφορετικών ισομορφών με

διαφορετικό καρβοξυτελικό άκρο, τις α, β, γ. Το γονίδιο p63 μπορεί να συνθέσει έξι διαφορετικά μετάγραφα, τρία για κάθε ισομορφή. Χαρακτηριστικό είναι ότι στα μετάγραφα α υπάρχει και μια περιοχή Sterile alpha-motif (SAM) η οποία λειτουργεί ως μονάδα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με άλλες πρωτεΐνες και η οποία απουσιάζει στον άνθρωπο (Bokhoven et al. 2002) .



Εικόνα 1.4.1: Η δομή του γονιδίου p63. Ο υποκινητής P1 στο εξώνιο 1 κωδικοποιεί την TAp63 ισομορφή, ενώ ο υποκινητής P2 στο εξώνιο 3 κωδικοποιεί την ΔN ισομορφή. Με διαφορετικά χρώματα εμφανίζονται οι πρωτεϊνικές περιοχές καθώς και οι τρεις κοινές καρβοξυτελικές ισομορφές (α,β,γ), ενώ εμφανίζονται και τα σημεία στα οποία στοχεύουν οι εκκινητές.

Το γονίδιο p63, εκφράζεται σε τουλάχιστον έξι πρωτεϊνικές ισομορφές, οι οποίες χωρίζονται σε δύο ομάδες, σε αυτές που περιέχουν την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (TA ισομορφές) και εκείνες που δεν έχουν αντίστοιχη περιοχή (ΔN ισομορφές).

Οι ισομορφές TA έχουν παρόμοια λειτουργία με την p53 με την έννοια ότι είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων στόχων και να προκαλέσουν αναστολή του κυτταρικού κύκλου με την βοήθεια της p21WAF1 και να οδηγήσουν στην απόπτωση. Η απόπτωση αναφέρεται ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν την απόπτωση παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Ενώ υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα σήματα και τις απαιτούμενες κυτταρικές μεταβολικές εκδηλώσεις για να επάγει την απόπτωση σε διάφορους τύπους κυττάρων, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την απόπτωση είναι εξαιρετικά συντηρημένα (Ebrahimi et al. 2009). Χαρακτηριστικό είναι ότι η TAp63γ είναι μεταγραφικός ενεργοποιητής και λόγω ομολογίας με την p53 έχει το 80% της ενεργητικότητας της, ενώ ενεργοποιεί και την απόπτωση, σε αντίθεση με την TAp63α. Η υπερέκφραση των ισομορφών αυτών σχετίζεται με καρκινογένεση.

Αντιθέτως οι ισομορφές που παράγονται όταν το γονίδιο p63 που μεταγράφεται από τον υποκινητή του ιντρονίου 3 (ΔNp63) έχουν ογκογόνο δράση. Δεν είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν την μεταγραφή και στην πράξη έχουν κυρίαρχη αρνητική στάση αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της μεταγραφής τόσο της p53 όσο και των TA ισομορφών (Wu et al. 2003). Η μειωμένη έκφραση της ΔNp63 σχετίζεται με την μειωμένη έκφραση της β-κατενίνης, γεγονός που υποδηλώνει πιθανό ρυθμιστικό ρόλο της ισομορφής αυτής και ενισχύει της θεώρηση της ΔNp63 ως ογκογόνου πρωτεΐνης.

Η υποέκφραση της ισομορφής TAp63 ή η υπερέκφραση της ισομορφής ΔNr63 οδηγεί στην αναστολή της λειτουργίας των TAp63, p53 και TAp73 και βοηθάει στην ανάπτυξη των επιθετικών καρκίνων.

Η ισομορφή ΔNr63α φαίνεται να είναι η κύρια εκφραζόμενη ισομορφή στα καρκινώματα του πλακώδους επιθηλίου. Η ΔNr63, ιδιαίτερα η ισομορφή β, παίζει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του τράχηλο της μήτρας καθώς και στον καρκίνο του ενδομητρίου.

### **1.5.2. Δομή του γονιδίου p73.**

Το γονίδιο p73 αποτελείται από 15 εξώνια και έχει μέγεθος περίπου 80kbp. Εδρεύει στο χρωμόσωμα 1p36.3 και έχει και αυτό μεγάλο ποσοστό ομολογίας με την 53 (Chen et al. 2000). Πιο συγκεκριμένα στην περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης η ομολογία με το γονίδιο p53 είναι 30%, στην περιοχή δέσμευσης με το DNA το ποσοστό ομολογίας είναι 79% ενώ στην περιοχή ολιγομερισμού είναι 33% (Moll et al. 2004). Το γονίδιο της p73 όπως ακριβώς και το γονίδιο p63 περιέχουν ένα καρβοξύ-τελικό άκρο που απουσιάζει από το γονίδιο της p53.

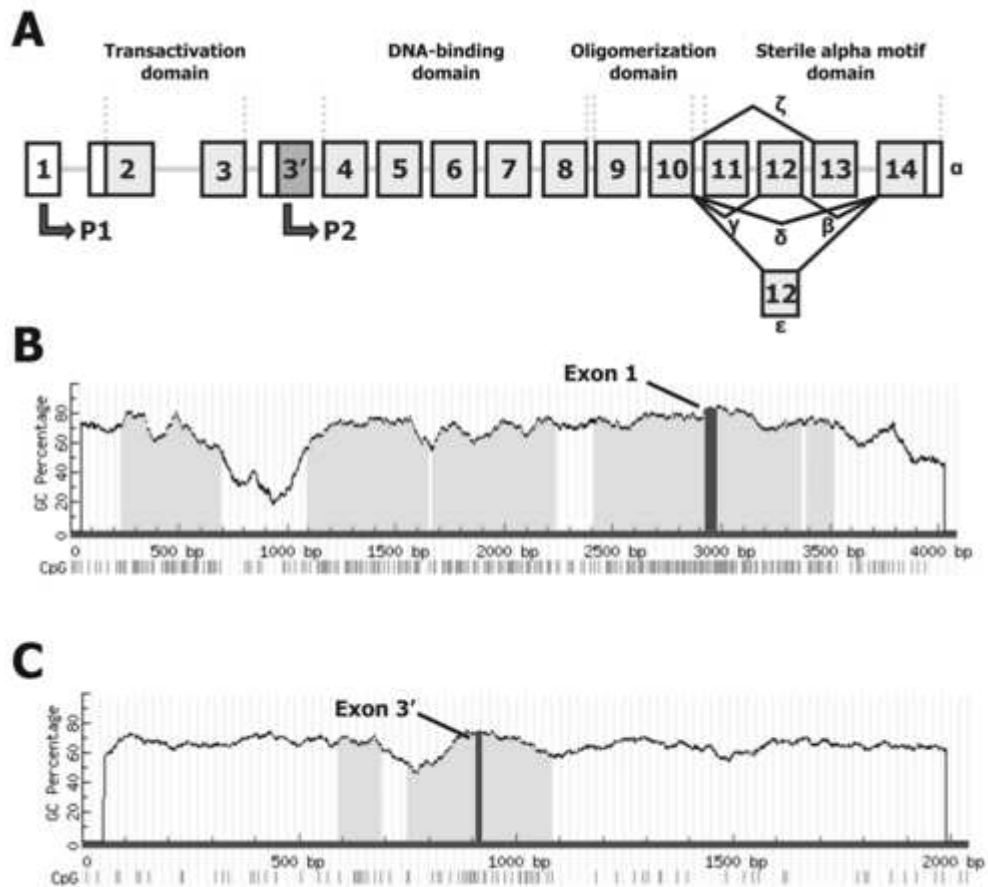
Το γονίδιο της p73 διαθέτει και αυτό με την σειρά του δύο εναλλακτικούς υποκινητές (P1 και P2). Ο P1 εξωτερικός υποκινητής κωδικοποιεί την τάξη των TA ισομορφών, οι οποίες υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα στο 5' άκρο και οδηγούν στην σύνθεση ισομορφών που περιέχουν ένα μόνο τμήμα της περιοχής μεταγραφικής ενεργοποίησης ή δεν την περιέχουν καθόλου (Εικόνα 1.4.2).

Από το εναλλακτικό μάτισμα στο 5' άκρο προκύπτουν 3 διαφορετικές τάξεις μεταγράφων. Στην πρώτη τάξη ανήκουν τα p73Δex2, τα οποία δεν περιλαμβάνουν το εξώνιο 2 και οι πρωτεΐνες οι οποίες μεταφράζουν διαθέτουν ένα μικρό τμήμα της περιοχής

μεταγραφικής ενεργοποίησης, τα p73Δex2/3 τα οποία δεν διαθέτουν τα εξώνια 2 και 3 και οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτές δεν περιλαμβάνουν την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης. Τέλος η Τρίτη τάξη περιλαμβάνει τα μετάγραφα ΔN'p73, τα οποία περιέχουν δύο θέσεις έναρξης της μεταγραφής, στα εξώνια 2 και 3 και ένα κωδικόνιο λήξης στο εξώνιο 3.

Ο P2 υποκινητής στο εσώνιο 3' κωδικοποιεί τις ΔN ισομορφές. Αντίστοιχα με την p63 μετά το εσώνιο 10 τα μετάγραφα p73 υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα δίνοντας 7 διαφορετικές ισομορφές με διαφορετικό καρβοξυ-τελικό άκρο, τις α, β, γ, δ, ε, ζ και η ισομορφές.

Είναι γεγονός πως οι διάφοροι συνδυασμοί αμινο-τελικής και καρβοξύ-τελικής περιοχής στο γονίδιο p73, οδηγούν σε τουλάχιστον 35 διαφορετικά mRNA κωδικοποιώντας 29 διαφορετικές πρωτεϊνικές ισομορφές.



Εικόνα 1.4.2:

A. Απεικόνιση των εξωνίων της p73 και των υποκινητών P1 και P2

B. Με ανοιχτό χρώμα εμφανίζονται οι CpG νησίδες του P1 υποκινητή, ενώ με γκρι εμφανίζεται το εξώνιο 1.

C. Με ανοιχτό χρώμα εμφανίζονται οι CpG νησίδες του P2 υποκινητή, ενώ με γκρι χρώμα εμφανίζεται το εξώνιο 3.



Οι 14 ισομορφές από τις ισομορφές της p73 έχουν μέχρι σήμερα περιγραφεί, οι p73α, p73β και p73δ δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες, ενεργοποιώντας την μεταγραφή γονιδίων που βρίσκονται υπό τον έλεγχο της p53, ενώ η ισομορφή p73γ φαίνεται να μην έχει ιδιότητες μεταγραφικής ενεργοποίησης.

Οι ισομορφές p73α και p73β μπορούν να επάγουν την απόπτωση το ίδιο ισχυρά με την p53 και μάλιστα φαίνεται ότι οι TA-ισομορφές της p73 είναι απαραίτητες για να ενεργοποιήσει η p53 την μεταγραφή αποπτωτικών γονιδίων. Αντίθετα, όπως και οι αντίστοιχες ισομορφές της p63, οι ΔN-ισομορφές της p73 καταστέλλουν με αρνητικό επικρατή τρόπο την λειτουργία τόσο των TA-ισομορφών όσο και της p53.

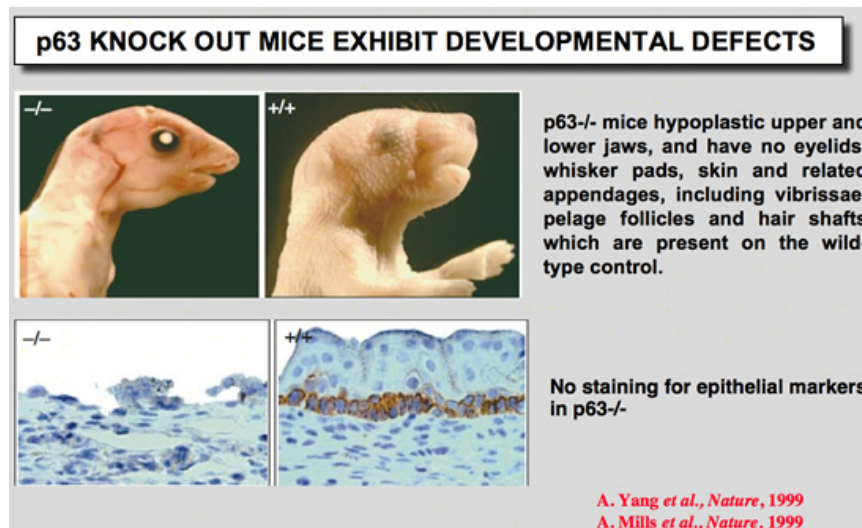
Τα TAp73, ΔNp73 και ΔN'p73 φαίνεται να είναι υπερεκφρασμένα στους γυναικολογικούς καρκίνους, ενώ το ποσοστό υπερέκφρασης είναι ανάλογο με την ηλικία της ασθενούς.

### **1.5.1. Ο ρόλος του γονιδίου p63 στην εμβρυική ανάπτυξη και στον καρκίνο**

Όπως προαναφέρθηκε αρχικά, αμέσως μετά την ανακάλυψη των γονιδίων p63 και p73, θεωρήθηκε ότι οι λειτουργίες τους ήταν αντίστοιχες με αυτές της p53. Στην συνέχεια όμως η υπόθεση αυτή καταρρίφτηκε μιας και τα αποτελέσματα που προήλθαν από τα διαγονιδιακά ποντίκια αποκλίνουν από τα αποτελέσματα που θα έδινε ένα τυπικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο (Bokhoven et al. 2002).

Αρχικά τα αναμενόμενα αποτελέσματα θα έπρεπε να είναι κοινά με της p53. Είναι γνωστό ότι τα διαγονιδιακά ποντίκια p53<sup>-/-</sup> , παρουσιάζουν αυθόρμητους όγκους και καμία απολύτως αναπτυξιακή ανωμαλία, κάτι που δεν συμβαίνει με τα ποντίκια p63<sup>-/-</sup> και p73<sup>-/-</sup> (Zocchi et al. 2008).

Αντίθετα τα ποντίκια p63<sup>-/-</sup> , στα οποία έχει αδρανοποιηθεί η p63, εμφανίζονται σοβαρές αναπτυξιακές ανωμαλίες, οι πιο εντυπωσιακές από αυτές είναι η πλήρης έλλειψη όλων των επιθηλιακών πλακωδών κυττάρων και των παράγωγων τους, συμπεριλαμβανομένης της επιδερμίδας, των μαστικών αδένων, του προστάτη, και άλλων ιστών, ενώ απουσιάζουν οι θύλακες τριχών, δακρυϊκοί αδένες, γαλακτοφόροι αδένες και δεν διαθέτουν θωρακικές πλευρές ή δεν είναι καλά διαφοροποιημένες.



Εικόνα 1.5.1. Διαγονιδιακά ποντίκια p63<sup>-/-</sup>

Από την μελέτη ετερόζυγων αυτή την φορά ποντικών p63<sup>+/-</sup> βρέθηκε ότι τα ποντίκια αυτά παρουσίαζαν ευαισθησία στην δημιουργία όγκων αλλά η ανάλυση των όγκων έδειξε πως είχε συμβεί απώλεια του εναπομεινάντος αλληλομόρφου του άγριου τύπου.

### 1.5.2. Ο ρόλος του γονιδίου p73 στην εμβρυική ανάπτυξη και στον καρκίνο

Αντίστοιχη μελέτη έγινε και για το γονίδιο της p73, ώστε να μπορέσουμε να διασαφηνίσουμε τον ρόλο του στην εμβρυογένεση και στον καρκίνο. Τα διαγονιδιακά ποντίκια p73<sup>-/-</sup> ωστόσο, στα οποία είχε αδρανοποιηθεί η p73, εμφάνισαν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας λόγω γαστρεντερικών και ενδοκρανιακών αιμορραγιών. Πιο συγκεκριμένα τα ποντίκια αυτά ήταν επιρρεπή σε λοιμώξεις και φλεγμονές. Επιπλέον έδειξαν σοβαρές αναπτυξιακές ανωμαλίες στο νευρικό και το ανοσοποιητικό σύστημα, όπως υδροκεφαλία και ιπποκαμπική δυσγενεσία, εμπλέκοντας έτσι την p73 στην διαφοροποίηση των νευρωνικών κυττάρων (Yang et al. 2000). Τέλος έδειξαν αναπαραγωγικές ανωμαλίες μιας και παρουσιάζεται μια

απώλεια σεξουαλικού ενδιαφέροντος των αρσενικών ποντικών για τα θηλυκά και επιθετικότητα απέναντι σε άλλα αρσενικά (Εικόνα 1.4.4.).

Όλα τα παραπάνω όμως δεν οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο αυτό θα μπορούσε να έχει ογκοκατασταλτική δράση, αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα νεογνά  $p73^{-/-}$ , δεν μπορούν να ανταγωνιστούν τα αντίστοιχα ετερόζυγα ή τα αντίστοιχα άγριου τύπου με αποτέλεσμα να πεθαίνουν από ασιτία ( et al. 2009). Στην συνέχεια έγιναν προσπάθειες να δοθούν τα ποντίκια με απενεργοποιημένη την  $p73$  σε θετές μητέρες ώστε να αυξηθεί ο χρόνος ζωής τους και σε αυτή όμως την περίπτωση τα ποντίκια δεν εμφάνισαν ίχνος κακοήθειας.

Από την μελέτη ετερόζυγων αυτή την φορά ποντικών  $p73^{+/-}$  βρέθηκε ότι και αυτά, με την σειρά τους όπως ακριβώς συμβαίνει και με τα ετερόζυγα για το γονίδιο της  $p63$ , έχουν ευαισθησία στην δημιουργία όγκων ενώ η ανάλυση των όγκων έδειξε πως είχε συμβεί απώλεια του εναπομείναντος αλληλομόρφου του άγριου τύπου.



Εικόνα 1.5.2. Διαγονιδιακά ποντίκια  $p73^{-/-}$

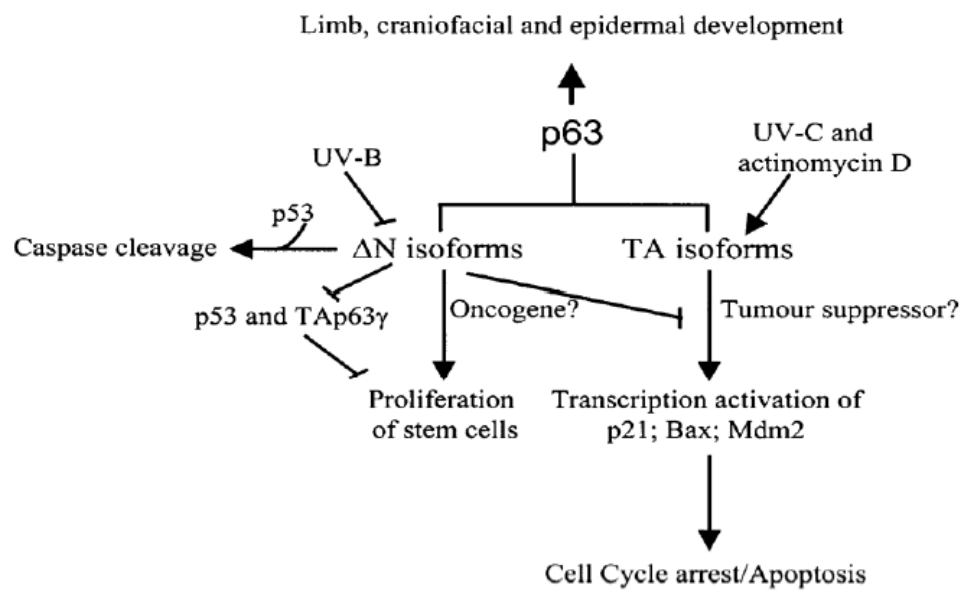
### **1.5.3. Ο ρόλος των γονιδίων p63 και p73 συλλογικά στην εμβρυική ανάπτυξη και στον καρκίνο**

Αξίζει όμως να σημειωθεί πως τα διπλά ετερόζυγα γονίδια p63<sup>+/-</sup> και p73<sup>+/-</sup> παρουσίαζαν όγκους νωρίτερα από τα ετερόζυγα μόνο για το p63 ή το p73 ενώ έδιναν και υψηλότερα ποσοστά μεταστάσεων σε σχέση με τα ετερόζυγα για το γονίδιο της p53 (Flores et al. 2005).

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα δύο αυτά γονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, αλλά δεν φαίνονται να έχουν κανένα ρόλο στην καρκινογένεση, επομένως δεν μπορούν να χαρακτηριστούν σαν τυπικά ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως το p53.

### 1.6.3. Ο ρόλος του γονιδίου p63 στην απόπτωση.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η p63 συμμετέχει στην απόπτωση, αλλά ο ρόλος της στη διαδικασία αυτή παραμένει αμφιλεγόμενος. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης του TP63 έχουν βρεθεί σε καρκινώματα πλακώδους επιθηλίου (κεφαλής/τραχήλου, ενδομητρίου, πνεύμονα, οισοφάγου, ρινοφάρυγγα), σε non-Hodgkin's λεμφώματα και σε καρκινώματα του θύμου αδένα. Οι ισομορφές που διατηρούν τις αλληλουχίες μεταγραφικής ενεργοποίησης (TAp63) έχουν λειτουργίες παρόμοιες με την p53, προσδένονται στο DNA και ενεργοποιούν την μεταγραφή. Μπορούν έτσι να προκαλέσουν το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου με την βοήθεια της p21<sup>WAF</sup> και να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση (Becker et al. 2006) (Εικόνα 1.6.1.). Από τις ισομορφές του p63 η TAp63γ είναι μεταγραφικός ενεργοποιητής και λόγω ομολογίας με την p53 έχει το 80% της ενεργητικότητας της, ενώ ενεργοποιεί και την απόπτωση, σε αντίθεση με την TAp63α και τις ισομορφές ΔNp63α και ΔNp63γ που δεν έχουν καμία ενεργότητα. Οι ισομορφές που παράγονται όταν το γονίδιο p63 μεταγράφεται από τον υποκινητή του ιντρονίου 3 (ΔNp63) μπλοκάρουν την δράση της p53. Η μειωμένη έκφραση της ΔNp63 σχετίζεται με την μειωμένη έκφραση της β-κατενίνης, γεγονός που υποδηλώνει πιθανό ρυθμιστικό ρόλο της ισομορφής αυτής και ενισχύει της θεώρηση της ΔNp63 ως ογκογόνου πρωτεΐνης. Η υποέκφραση της ισομορφής TAp63 ή η υπερέκφραση της ισομορφής ΔNp63 οδηγεί στην αναστολή της λειτουργίας της TAp63, p53, TAp73 και βοηθάει στην ανάπτυξη των επιθετικών καρκίνων.



Εικόνα 1.6.1. Ο ρόλος της p63 στην απόπτωση

#### **1.6.4. Ο ρόλος του γονιδίου p63 στον ανθρώπινο καρκίνο.**

Το γονίδιο p63 σπάνια συναντάται μεταλλαγμένο σε ανθρώπινους όγκους (Irwin et al. 2001). Το μεγαλύτερο μέρος των καρκίνων στον άνθρωπο μπορεί να συσχετιστεί με την έκφραση του γονιδίου p63 και των ισομορφών του. Το γονίδιο της p63 φαίνεται να υπερεκφράζεται σε αρκετά είδη καρκίνου, γεγονός που θα μπορούσε να αποδώσει μία ογκογόνο δράση στο γονίδιο.

Ο βασικός ρόλος του γονιδίου p63 στην καρκινογένεση υποστηρίζεται από το γεγονός ότι το p63 είναι ένα γονίδιο στόχος γονιδιωματικής ενίσχυσης και η υπερέκφραση του σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% στο καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου εκ πλακωδών κυττάρων καθώς και σε άλλες περιπτώσεις νεοπλασιών πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων (Ge et al. 2011).

Οι δύο ισομορφές του γονιδίου εμφανίζονται υπερεκφρασμένες και στους γαστρικούς καρκίνους ενώ στον καρκίνο του πνεύμονα παρατηρείται υπερέκφραση στην ΔN ισομορφή (Lo Iacono et al. 2011), κάτι που παρατηρείται και στον καρκίνο του μαστού (Du et al. 2010).

Σε κάποια όμως είδη καρκίνου έχει αναφερθεί απώλεια της έκφρασης του γονιδίου p63, ενώ η καρκινογένεση φαίνεται ότι επιταχύνεται. Σε *in vitro* μελέτη που έγινε σε κυτταρικές σειρές πλακώδους επιθηλίου στα οποία είχε μπλοκαριστεί η p63, βρέθηκε ότι είχαμε υπερέκφραση γονιδίων με αυξημένη ικανότητα στην εισβολή και στην μετάσταση των όγκων (Ha et al. 2011).



### **1.7.1 Ο ρόλος του γονιδίου p73 στην απόπτωση.**

Το γονίδιο της p73 θα μπορούσε να πει κανείς ότι έχει δύο εντελώς διαφορετικούς ρόλους, η διαφοροποίηση αυτή εξαρτάται από τις ισομορφές του.

Είναι γνωστό ότι οι TA ισομορφές του γονιδίου διαθέτουν περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης η οποία τους προσφέρει μεταγραφική ενεργότητα. Αυτό έχει να αποτέλεσμα να μπορεί να ενεργοποιεί αρκετά γονίδια στόχους από αυτά που ενεργοποιεί η p53, όπως τα BAX, p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, MDM2, IGFBP3. Παράλληλα έχει την δυνατότητα να ενεργοποιεί γονίδια στόχους τα οποία δεν μπορεί να ενεργοποιήσει η p53 και αυτά είναι κυρίως τα νευροαναπτυξιακά. Χαρακτηριστικό όμως των ισομορφών αυτών είναι ότι ενεργοποιούν πολλά γονίδια στόχους τα οποία οδηγούν το κύτταρο στην απόπτωση, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση.

Αντίθετα οι ΔN ισομορφές, λόγω της έλλειψης της μεταγραφικής περιοχής ενεργοποίησης έχουν την δυνατότητα να προσδένονται στα κύτταρα στόχους χωρίς όμως να οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση μιας και δεν μπορούν να ενεργοποιήσει τα γονίδια στόχους. Επομένως δρουν ως ένας επικρατής αρνητικός αναστολέας της απόπτωσης, μιας και με το να ανταγωνίζεται τις θέσεις δέσμευσης της p53 και TAp73 έχει αντιαποπτωτική δράση.

Σε περιπτώσεις βλαβών του DNA το γονίδιο p53 ενεργοποιεί το γονίδιο Scotin, το οποίο σε μεγάλες συγκεντρώσεις προκαλεί στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, με αποτέλεσμα να οδηγήσει το κύτταρο σε απόπτωση. Την ίδια ακριβώς δράση με την p53 έχει και η TA ισομορφή του γονιδίου p63.

Ο δεύτερος τρόπος της αποπτωτικής δράσης της TAp73 ισομορφής είναι μέσω της μιτοχονδριακής οδού. Αρχικά έχουμε την σύνθεση PUMA, μιας πρωτεΐνης με BH3 περιοχή, η πρωτεΐνη αυτή μετατοπίζει την πρωτεΐνη Bax στα μιτοχόνδρια (Lu et al. 2011). Εκεί ακολουθεί η απελευθέρωση του κυτοχρώματος C, που οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση. Αντίθετα οι ισομορφές ΔNp73, αναστέλλουν την άμεση ενεργοποίηση του γονιδίου bax καθώς και την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Bax, παρεμποδίζοντας έτσι την απόπτωση του κυττάρου. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να τονιστεί ότι ο αποπτωτικός ρόλος της TA ισομορφής μέσω αυτού του μονοπατιού δεν είναι τόσο ισχυρός όσο της p53.

Παράλληλα οι TA ισομορφές έχουν την δυνατότητα να ενεργοποιήσουν τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς κυτταρικού θανάτου CD95 ακριβώς όπως το p53, με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασης του CD95 και να οδηγείται το κύτταρο σε απόπτωση.

Η αποπτωτική δράση της TA ισομορφής έχει επιβεβαιωθεί και σε πειράματα με κυτταροσειρές, στις οποίες όσο ήταν απενεργοποιημένο το γονίδιο p53, οι TA ισομορφές αντικαθιστούσαν την δράση του, ενώ όταν επανερχόταν η λειτουργικότητα του γονιδίου, οι TA ισομορφές έπαυαν να δρουν αποπτωτικά.

Η αντιαποπτωτική δράση της ΔN ισομορφής δεν εξαρτάται μόνο από την TAp73 και την p53, αλλά εξαρτάται και από τη δράση που έχουν οι ισομορφές αυτά πάνω σε άλλα γονίδια όπως για παράδειγμα η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη RB, της οποίας την φωσφορυλίωση αυξάνουν οι ισομορφές ΔN. Η αύξηση της φωσφορυλίωσης έχει σαν αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της RB, και κατ'επέκταση την αύξηση της δραστηριότητας του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 με αποτέλεσμα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Bellacchio et al. 2012).

### **1.7.2 Ο ρόλος του γονιδίου p73 στον καρκίνο.**

Οι TA ισομορφές του γονιδίου p73 βρίσκονται υπερεκφρασμένες σε αρκετά είδη καρκίνου. Ανάλογα με το είδος καρκίνου βρίσκονται υπερεκφρασμένες διαφορετικές καρβοξυτελικές παραλλαγές του γονιδίου. Η TAp73γ ισομορφή φαίνεται να είναι η μοναδική TA παραλλαγή που είναι υπερεκφρασμένη στον καρκίνο του πνεύμονα (Logotheti et al. 2010). Η παραλλαγή TAp73a φαίνεται να είναι αυτή που υπερεκφράζεται στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (Liu et al. 2006), ενώ η ίδια παραλλαγή επικρατεί και στον καρκίνο των ωοθηκών (Vikhanskaya et al. 2001).

Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι στην μυελοειδή λευχαιμία το πρότυπο έκφρασης των καρβοξυτελικών περιοχών είναι αρκετά σύνθετο, ενώ παρατηρείται το φαινόμενο να έχουμε υπερέκφραση των πιο μικρών σε μήκος ισομορφών TA, δηλαδή τις γ, δ, ε, ζ. Έντονο ενδιαφέρον έχει και το γεγονός ότι η παραλλαγή ε, υπάρχει μόνο στο λευχαιμικά κύτταρα και απουσιάζει από τα φυσιολογικά μυελοειδή κύτταρα (Tschan et al. 2000).

Αυτό θα μπορούσε να μας οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι όσο μικρότερο είναι το μήκος της TA ισομορφής τόσο περισσότερο υπερεκφρασμένη σε κάποιους όγκους είναι αυτή, επομένως εκτός της TA περιοχής η οποία είναι γνωστό ότι έχει αποπτωτική δράση, ίσως υπάρχει κάποια αντίστοιχη στο καρβοξυτελικό άκρο που να ενισχύει την δράση αυτή, όχι όμως στον ίδιο βαθμό με την TA περιοχή.

Οι ΔN ισομορφές, φαίνονται να έχουν δυνητική ογκογόνο δράση και εμφανίζονται υπερεκφρασμένες σε πολλά είδη καρκίνου (Becker et al. 2006). Πιο συγκεκριμένα μετρήσεις που έγιναν για την μελέτη της έκφρασης της ισομορφής έδειξαν ότι στον καρκίνο του μαστού, και της γυναικείας γενετήσιας οδού έχουμε υπερέκφραση σε

ποσοστό περίπου 73% σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό (Concin et al. 2004). Στον καρκίνο του πνεύμονα το ποσοστό αλλάζει και αγγίζει το 58% .

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ορισμένα είδη καρκίνου όπως ο καρκίνος των ωοθηκών και τα ραβδομυοσαρκώματα, η υπερέκφραση της ΔN ισομορφής συμβαδίζει με την υπερέκφραση της TA ισομορφής (Cam et al. 2006). Από τις μελέτες αυτές όμως προέκυψε ότι η ΔN θα μπορούσε να θεωρηθεί παράγοντας κακής πρόγνωσης, μιας και η έκφραση της αυξάνεται ανάλογα με το πόσο προχωρημένο είναι το στάδιο του καρκίνου.

Δραματικά υπερεκφρασμένη η ΔN ισομορφή φαίνεται να είναι στο HNSCC, το ίδιο βέβαια συμβαίνει και με την TA ισομορφή με αποτέλεσμα το σύνολο των δύο ισομορφών αυτών να αναστέλλει την p73 εξαρτώμενη προαποπτωτική δραστηριότητα (Rocco et al. 2006).

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα υψηλά επίπεδα των ισομορφών ΔN συνδέονται με τα πιο προχωρημένα στάδια του καρκίνου ενώ οι περισσότερες στατιστικές μελέτες συνηγορούν και υπέρ κακής πρόγνωσης του όγκου. Επομένως υπογραμμίζεται η χρησιμότητα της ισομορφής αυτής ως προγνωστικός καρκινικός δείκτης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### 2.1 Σκοπός και σημασία της προτεινόμενης διδακτορικής διατριβής

Ο καρκίνος του ενδομητρίου αποτελεί την τέταρτη πιο διαδεδομένη μορφή καρκίνου σε παγκόσμιο επίπεδο, με τα ποσοστά του να αυξάνονται συνεχώς. Επομένως είναι σημαντική η εύρεση των μοριακών μηχανισμών της νόσου αυτής, με απώτερο σκοπό τη θεραπεία των ασθενών.

Στη παρούσα διδακτορική διατριβή προσδιορίστηκε η έκφραση των γονιδίων p63 και p73 (τόσο των ΤΑ όσο και των ΔΝ ισομορφών τους), ώστε να διαπιστωθεί ποιες ισομορφές και σε τι ποσοστό είναι υπερεκφρασμένες ή υποεκφρασμένες στον καρκίνο του ενδομητρίου.

Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός του μηχανισμού της μεθυλίωσης προκειμένου να διαπιστωθεί εάν παίζει ρόλο στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων. Τα παραπάνω αποτελέσματα συσχετίστηκαν με τα κλινικο-παθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων, με σκοπό να βρεθεί κατά πόσο τα συγκεκριμένα γονίδια μπορούν να αποτελέσουν προγνωστικούς δείκτες της ανάπτυξης και εξέλιξης του καρκίνου του ενδομητρίου.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την προτεινόμενη πειραματική διαδικασία πιστεύουμε ότι θα διασαφηνίσουν τον ρόλο των p63 και p73 στην καρκινογένεση του ενδομητρίου.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

### **Υλικά και Μέθοδοι**

#### **3.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ**

##### **3.1.1 Συλλογή δειγμάτων όγκων ενδομητρίου**

Για την παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν ιστοί από ενδομήτριο οι οποίοι συλλέχθηκαν σε χρονικό διάστημα 1,5 περίπου έτους (2009-2010), από την Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΑΓΝΗ). Τα δείγματα των ιστών που μελετήθηκαν προέρχονται από ολική υστερεκτομή ασθενών, ανεξαρτήτου ηλικίας, με απεικονιστικά κριτήρια κακοήθους νεοπλασίας ενδομητρίου χωρίς προηγουμένως να έχουν λάβει χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή οποιαδήποτε άλλη θεραπεία. Από τις ασθενείς λήφθηκαν δείγματα καρκινικού ιστού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού, τα οποία κρίθηκαν ως φυσιολογικά, μη-κακοήθη. Οι ιστοί μετά τη λήψη τους, χωρίστηκαν σε δύο τμήματα, το ένα στάλθηκε για ιστολογική εξέταση ενώ το άλλο χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση μας. Οι ιστοί καταψύχθηκαν άμεσα στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , μέχρι και τη χρήση τους.

##### **3.1.2 Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων**

Συνολικά μελετήθηκαν 20 καρκινικά και 20 φυσιολογικά δείγματα. Οι ασθενείς ήταν ηλικίας 44-83 ετών, με μέσο όρο ηλικίας  $60,7 \pm 10,1$  έτη (Πίνακας 3.1). Η ηλικία εμμηνόπαυσης των ασθενών κυμαίνεται από τα 43-55 έτη, με μέσο όρο ηλικίας τα  $50,9 \pm 4,5$  έτη. Ο βαθμός διαφοροποίησης των νεοπλασιών στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν στο 40% (8 δείγματα) των δειγμάτων

χαμηλής διαφοροποίησης (Grade I), το 30% (6 δείγματα) μέσης διαφοροποίησης (Grade II) και το υπόλοιπο 30% ήταν υψηλής διαφοροποίησης (Grade III). Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζονται συνοπτικά τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμπεριλήφθησαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

<b>Characteristic</b>	<b>No. of patients (%) (n=20)</b>
<b>Age</b>	
Mean±SD, years	60.7±10.1
Range	43-83
<b>BMI</b>	
Mean±SD, Kg	31.6±5.5
<b>Parity</b>	
1-2	8 (40.0%)
3+	12 (60.0%)
<b>Abortions</b>	
Yes	13 (65.0%)
No	7 (35.0%)
<b>Menopause</b>	
Mean±SD, years	50.9±4.5
Range	43-55
<b>Smoking</b>	
Yes	2 (10.0%)
No	18 (90.0%)
<b>Diabetes</b>	
Yes	9 (45.0%)
No	11 (55.0%)
<b>Hypertension</b>	
Yes	13 (65.0%)
No	7 (35.0%)
<b>Hyperlipidemia, hypercholesterolemia</b>	
Yes	9 (45.0%)
No	11 (55.0%)
<b>Thyroid</b>	
Yes	10 (50.0%)
No	10 (50.0%)
<b>Family Ca history</b>	
Yes	9 (45.0%)
No	11 (55.0%)

<b><i>Previous Ca</i></b>		
Yes		5 (25.0%)
No		15 (75.0%)
<b><i>Tumor Grade</i></b>		
I		8 (40.0%)
II		6 (30.0%)
III		6 (30.0%)
<b><i>Tumor Stage (FIGO 2008)</i></b>		
IA		16 (80.0%)
IB		4 (20.0%)
<b><i>Endometriosis</i></b>		
Yes		7 (35.0%)
No		13 (65.0%)
<b><i>Endometrial Hyperplasia</i></b>		
Yes		12 (60.0%)
No		8 (40.0%)
<b><i>Radiotherapy</i></b>		
Yes		18 (90.0%)
No		2 (10.0%)
<b><i>Chemotherapy</i></b>		
Yes		12 (60.0%)
No		8 (40.0%)

---

Πίνακας 3.1: Κλινικο-παθολογικά στοιχεία των ασθενών που συμπεριλήφθησαν στην παρούσα διατριβή.



## **3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **3.2.1 Απομόνωση ολικού RNA από τους ιστούς**

Η απομόνωση του ολικού RNA από τους κατεψυγμένους ιστούς πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της τροποποιημένης μεθόδου των Chomczynsky and Sacchi (1987) και χρήση του αντιδραστηρίου TRI reagent (Molecular Research Center Inc. Cincinnati, OH), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η μέθοδος βασίζεται στη λύση των κυττάρων με τη χρήση θειοκυανικής γουανιδίνης και την απομάκρυνση των λιπιδίων, πρωτεϊνών και DNA με φαινόλη. Δείγμα 20 mg ιστών ομογενοποιείται με τη βοήθεια ειδικού μηχανικού ομογενοποιητή με έμβολο από τεφλόν, μέσα σε διάλυμα 1ml TRI reagent, σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί προσθήκη επώαση για 15 λεπτά σε 200 μl χλωροφορμίου και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στις 12.000 στροφές σε θερμοκρασία 4 °C. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο διάλυμα που περιέχει RNA, προστέθηκαν 500μl ισοπροπανόλης, αποθηκεύτηκε στους -80°C για μία ώρα και φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 12.000 στροφές σε θερμοκρασία 4°C. Ακολούθησε απομάκρυνση της υπερκείμενης φάσης και προστέθηκε 1ml αιθανόλης 75%. Φυγοκεντρήθηκε για τελευταία φορά στις 12.000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο διάλυμα. Η επαναιώρηση του RNA πραγματοποιήθηκε με νερό ελεύθερο νουκλεασών (20-30 μl) (DEPC-H<sub>2</sub>O) και τα δείγματα RNA αποθηκεύτηκαν στους -80 °C έως τη χρήση τους.

### **3.2.2 Απομόνωση ολικού DNA από τους ιστούς**

Το DNA απομονώθηκε με την χρήση του Quick-gDNA Microprep kit (Zymo Research, Irvine, CA). Συγκεκριμένα, 5 mg ιστού ομογενοποιήθηκαν σε 500μl Genomic Lysis Buffer και φυγοκεντρήθηκαν στις 10.000 στροφές για 1 λεπτό. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε Zymo-Spin IC Column με 200 μl DNA Pre-Wash Buffer και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 1 λεπτό, στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε νέα σωληνάρια. Στην συνέχεια προστέθηκαν 20 μl από το DNA Elution Buffer, έγινε επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 10.000 στροφές. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C έως τη χρήση τους.

### **3.2.3 Προσδιορισμός της ποσότητας και καθαρότητας του RNA και DNA**

Η καθαρότητα και η συγκέντρωση του RNA και DNA προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση σε φωτόμετρο (Nanodrop ND1000) στα 260nm και 280nm. Συγκεκριμένα, η ποσότητα του RNA και DNA προσδιορίζεται στα 260nm, στηριζόμενοι στο γεγονός ότι διάλυμα RNA ή DNA που είναι 40μg/ml ή 50μg/ml αντίστοιχα, έχει απορρόφηση 1 a.u (absorbance units). Το πηλίκο της απορρόφησης 260nm/280nm, αποτελεί μέτρο της καθαρότητας των νουκλεϊνικών οξέων που θέλουμε να μετρήσουμε.

### **3.2.4 Κατεργασία με δισουλφιδικό νάτριο**

Για την κατεργασία με δισουλφιδικό νάτριο χρησιμοποιήθηκε το DNA methylation-GOLD™ Kit (Zymo Research). Από κάθε δείγμα πάρθηκαν 200ng DNA και προστέθηκαν σε αυτό 130μl από το CT

conversion reagent ώστε να προστεθεί μια μεθυλομάδα στον 5 άνθρακα της κυτοσίνης δίνοντας μια μεθυλ-κυτοσίνη με την βοήθεια του ενζύμου μέθυλ-τρασφεράση. Στην συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν, στον θερμοκυκλοποιητή PTC-100TM Programmable thermal-controller (MJ Research Inc, MA), για 10 λεπτά στην θερμοκρασία των 98°C και στην συνέχεια για 2,5 ώρες στους 64 °C. Ακολούθησε προσθήκη M-binding buffer και το διάλυμα μεταφέρθηκε σε IC columns για να φυγοκεντρηθεί για 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 στροφές. Τα δείγματα στην συνέχεια επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά μέσα σε 100μl M-Desulphonation Buffer, ενώ μετά την επώαση τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 30 δευτερόλεπτα στις 10.000 στροφές. Πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικά πλυσίματα με M-Wash buffer, ενώ ακολούθησε η προσθήκη 20μl M-Elution buffer. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 10.000 στροφές και το μεθυλιωμένο DNA φυλάχθηκε στους -80°C έως την χρήση τους.

### **3.2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης MSP (Methylation-specific PCR)**

Η ανίχνευση της μεθυλίωσης των υποκινητών P1 και P2 του γονιδίου της p73, μελετήθηκε με την μέθοδο της MSP-PCR, με την χρήση του Kapa2G™ Robust Hot Start Kit (Kappa Biosystems, Woburn, MA). Η τοποθεσία των CpG νησίδων βρέθηκε με την βοήθεια του MethPrimer software (<http://www.urogene.org/methprimer/intex.html>). Σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών για κάθε υποκινητή, ένα ζευγάρι που αναγνωρίζει το μεθυλιωμένο πρότυπο και ένα ζευγάρι για το μη μεθυλιωμένο πρότυπο (πίνακας 3.2).

Το μείγμα της αλυσιδωτής αντίδρασης, σε τελικό όγκο 25μl, αποτελείται από 200ng DNA, 1μM από 5x Kapa 2G Buffer B, 0.5 μM

MgCl<sub>2</sub>, 1 μM 5× Kapa Enhancer, 0.2 μM dNTPs και 0,5 units από την Kapa 2G Robust Hot Start DNA Polymerase. Στα μείγμα της PCR χρησιμοποιήθηκαν 0,3 μM από τους P1M και P1U εκκινητές για την ανίχνευση της μεθυλίωσης του υποκινητή P1 και 0,5 μM από τους εκκινητές P2M και P2U για την ανίχνευση της μεθυλίωσης του υποκινητή P2.

Η συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τον πρώτο υποκινητή (P1) είναι, αρχική θερμική αποδιάταξη στους 95°C για 3 λεπτά, ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 20 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση των εκκινητών στους 60°C για 20 δευτερόλεπτα (πίνακας 3.2), επιμήκυνση στους 70°C διάρκειας 30 sec.

Για τον δεύτερο υποκινητή (P2) οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι, αρχική θερμική αποδιάταξη στους 95°C για 3 λεπτά, ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 20 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση των εκκινητών στους 63°C για 20 δευτερόλεπτα για τον P2M, και 65°C για τον P2U (πίνακας 3.2) και επιμήκυνση στους 70°C διάρκειας 30 sec.

### Methylation-Specific PCR

Primer Pair	Sequence (5' – 3')	Annealing temperature (°C)	Amplicon size (bp)
P1-M	GGACGTAGCGAAATCGGGGTTC ACCCCGAACATCGACGTCCG	60	60
P1-U	AGGGGATGTAGTGAAATTGGGGTTT ATCACAACCCCAAACATCAACATCCA	60	69
P2-M	GTTGTCGGGCGGTTACGATC TCACACCTACCGTAACGAAATACCG	63	157
P2-U	GGTTTATGTTGTTGGGTGGTTATGATTG CACATCACACCTACCATAACAAAATACCAT AC	65	168

Πίνακας 3.2: Αλληλουχία εκκινητών, θερμοκρασίες annealing και μέγεθος προϊόντων

### **3.2.6 Εκτέλεση ηλεκτροφόρησης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο**

Τα προϊόντα της MSP-PCR, φορτώθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (w/v), με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 10ng/μl. Με την βοήθεια συσκευής ηλεκτροφόρησης σταθερής τάσης 150 Volt, για περίπου 20 λεπτά, οι ζώνες του DNA απομακρύνθηκαν από την θέση φόρτωσης τους με βάση το μοριακό τους βάρος και κατ'επέκταση το μέγεθος του προϊόντος. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 50bp ώστε να γίνει δυνατή η μέτρηση του προϊόντος. Οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) και φωτογραφήθηκε με το AlphaImager™ (Alpha Innotech, Santa Clara, CA) .

### **3.2.7 Προετοιμασία cDNA**

Το αρχικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την δημιουργία cDNA, είναι το RNA, το οποίο μετατρέπεται σε συμπληρωματικό DNA (cDNA), με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase). Για την δημιουργία του, χρησιμοποιήθηκε το PrimeScript 1<sup>st</sup> strand cDNA Synthesis kit (Takara Bio Inc. Japan). Αναλυτικά για την σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκαν 5μM από random 6mers, 4μM dNTPS, 1μg RNA και νερό ώστε να επιτευχθεί τελικός όγκος 10μl, το διάλυμα επώαστηκε για 5 λεπτά στους 65 °C. 5μM από το RNA Primer mixture, 20units από το RNase inhibitor, 5x Primescript™ Buffer, 200 units από το Primescript™ RTase προστέθηκαν το μίγμα της αντίδρασης, με τελικό όγκο 20μl. Το τελικό μίγμα επώαστηκε για 10 λεπτά στους 30 °C για την αποδιάταξη των random hexamers, ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στους 42 °C για την επιμήκυνση της σύνθεσης cDNA. Το ένζυμο στην συνέχεια

απενεργοποιήθηκε με θέρμανση στους 95 °C για 5 λεπτά και την απότομη ψύξη του σε πάγο. Το cDNA που παρασκευάστηκε φυλάχθηκε στους -20 °C μέχρι την χρήση του.

### **3.2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) είναι μια μέθοδος όπου κατά τον πολλαπλασιασμό της επιθυμητής αλληλουχίας, μπορεί να γίνει ποσοτικοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μιας ειδικής χρωστικής, η οποία όταν προσδένεται σε δίκλωνο μόριο DNA, έχει την ικανότητα να φθορίζει. Έτσι, η ποσοτικοποίηση γίνεται με βάση την ένταση φθορισμού του κάθε δείγματος.

Για την ενίσχυση της συγκεκριμένης αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί για mRNA εκκινητές, οι αλληλουχίες των οποίων φαίνονται στον πίνακα 3.3. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να παρεμβάλλεται τουλάχιστον ένα ιντρόνιο ανάμεσα τους, για να αποφευχθεί η ενίσχυση πιθανού εναπομείναντος DNA (Πίνακας 3.3).

Για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων, χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας, το γονίδιο της β-ακτίνης (β-actin).

Για τη Real-time PCR χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο KAPA SYBR FAST qPCR kit (Kapa Biosystems, BO). 1μl cDNA αναμειχθηκε με 1× Kapa Master Mix, 0.4μl από την χρωστική Rox, ενώ για κάθε αντίδραση προστέθηκαν 30nM από τα ζεύγη των εκκινητών TAp73 και ΔNp73 αντίστοιχα. Οι συνθήκες για την Real-Time PCR, για τις δύο ισομορφές του γονιδίου ήταν: 3 λεπτά στους 95 °C, 40 κύκλοι από 3 δευτερόλεπτα στους 95 °C, 25 δευτερόλεπτα στους 62 °C, 1 δευτερόλεπτα στους 72 °C, ενώ ακολούθησε melt-curve ανάλυση.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν από ένα μεμονωμένο παρασκεύασμα ασθενούς.

Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε μίγμα των cDNA όλων των δειγμάτων και με διάφορες αραιώσεις του, δημιουργήθηκαν 6 πρότυπα διαλύματα (standards) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Τα πρότυπα διαλύματα έτρεξαν στην ίδια πλάκα με τα δείγματα στο μηχάνημα Mx3000P Real-Time PCR thermocycler (Stratagene, Santa Clara, CA) για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς. Τα αποτελέσματα συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με τη βοήθεια του Mx3000P Real-time PCR software version 2.00, Build 215, Schema 60 (Stratagene).

Στην συνέχεια τα προϊόντα της PCR έτρεξαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2.5 % (w/v), με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 10ng/μl, ώστε να γίνει η επαλήθευση της αντίδρασης. Το πήκτωμα αγαρόζης στην συνέχεια φωτογραφήθηκε στο AlphaImager™ (Alpha Innotech) UV transilluminator.



### Real-Time PCR

<b>Primer Pair</b>	<b>Sequence (5' – 3')</b>	<b>Annealing temperature (°C)</b>	<b>Amplicon size (bp)</b>
TAp73	CTTCGACCTTCCCCAGTCA	60	98
	CAGATGTAGTCATGCCCTCCA		
$\Delta$ Np73	ATCCTCGGCTCCTGCCTCACT	62	246
	CGCGGCTGCTCATCTGGTC		
b-actin	CGGCATCGTCACCAACTG	60	70
	GGCACACGCAGCTCATTG		
TAp63	AAGATGGTGCGACAAACAAGAT	60	155
	GGGACTGGTGGACGAGGA		
$\Delta$ Np63	TGTACCTGGAAAACAATGCCCA	60	103
	GACGAGGAGCCGTTCTGAATCT		

Πίνακας 3.3: Αλληλουχία εκκινητών, θερμοκρασίες annealing και μέγεθος προϊόντων

### 3.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η κανονικοποιημένη έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων υπολογίστηκε για κάθε παθολογικό ή φυσιολογικό δείγμα. Αυτό έγινε διαιρώντας την τιμή έκφρασης κάθε δείγματος για το γονίδιο στόχο, με την τιμή έκφρασης του ίδιου δείγματος για το γονίδιο αναφοράς, με την χρήση του τύπου:

$$\text{Normalized sample} = (1 + E_{\text{gene}})^{-\Delta\text{Ct}_{\text{gene}}} / (1 + E_{\beta\text{-actin}})^{-\Delta\text{Ct}_{\beta\text{-actin}}}$$

Προκειμένου να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης των εξεταζόμενων γονιδίων στα δύο είδη ιστών, ομαδοποιήθηκαν δείγματα σε δύο κατηγορίες: στα φυσιολογικά (adjacent normal) και σε αυτά που έφεραν καρκινικές αλλοιώσεις (cancer). Στόχος αυτής της ομαδοποίησης ήταν ο προσδιορισμός των διαφορών των καρκινικών δειγμάτων από τα φυσιολογικά, όσον αφορά την έκφραση σε επίπεδο mRNA των υπό μελέτη γονιδίων. Ακολουθώντας, για τη μελέτη του προφίλ έκφρασης κάθε δείγματος (υπερέκφραση, υποέκφραση ή κανονική έκφραση), η κανονικοποιημένη τιμή έκφρασης κάθε παθολογικού δείγματος διαιρέθηκε με την κανονικοποιημένη τιμή του αντίστοιχου φυσιολογικού δείγματος. Εάν το πηλίκο αυτό είναι μεγαλύτερο από δύο, τότε το γονίδιο θεωρείται υπερεκφρασμένο στο συγκεκριμένο δείγμα, εάν το πηλίκο που προκύπτει είναι μικρότερο του 0,5 θεωρείται υποεκφρασμένο και εάν το πηλίκο είναι ανάμεσα στο 2 και 0,5 θεωρείται ότι έχουμε ισοέκφραση του γονιδίου.

Για τη στατιστική ανάλυση αρχικά χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov για να διαπιστωθεί εάν οι τιμές των μετρήσεων ακολουθούν κανονική ή μη-κανονική κατανομή. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων όπως η έκφραση mRNA μεταξύ διαφορετικών ομάδων δειγμάτων (φυσιολογικά-καρκινικά) και κλινικών δεδομένων (ηλικία, BMI κ.α.) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση παραμετρικών και μη παραμετρικών δοκιμασιών (Mann-

Whitney test, T-test) ανάλογα με το αποτέλεσμα της δοκιμασίας Kolmogorov-Smirnov. Η συσχέτιση της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων ανά δύο (συνέκφραση) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των δοκιμασιών Pearson και Spearman, της ανάλογα με το αν ακολουθούν παραμετρική ή μη παραμετρική κατανομή, αντίστοιχα. Η ανάλυση επιβίωσης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Kaplan-Meier, χρησιμοποιώντας το log-rank test. Η δοκιμασία  $\chi^2$  (Chi-Square test,  $\chi^2$  test ) χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί το προφίλ έκφρασης (υπερ-έκφραση, υπο-έκφραση, κανονική έκφραση) του mRNA ανάμεσα στις ομάδες των δειγμάτων. Οι τιμές πιθανοτήτων μικρότερες από 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Η στατιστική επεξεργασία των εργαστηριακών ευρημάτων και των κλινικο-παθολογοανατομικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 11.5.

### **3.4 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

#### **Διαλύματα απομόνωσης RNA, DNA**

- Φαινολικό διάλυμα απομόνωσης RNA, DNA και πρωτεϊνών Tri reagent (Molecular Research Center Inc, Cincinnati, OH)
- Ισοπροπανόλη 100% (Merck)
- EtOH 75% (Merck)

#### **Ηλεκτροφορητικά διαλύματα**

- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (0.5X TBE)

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1.1 Τα επίπεδα mRNA των ισομορφών TAp63 και ΔNr63 στον καρκίνο του ενδομητρίου.

Στην παρούσα μελέτη, μελετήθηκαν τα επίπεδα της έκφρασης των ισομορφών του γονιδίου p63 (TAp63 και ΔNr63) με την μέθοδο της Real-Time PCR, σε 20 γυναίκες που χειρουργήθηκαν για καρκίνο ενδομητρίου.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της Real-Time PCR, για την ισομορφή TAp63, διαπιστώθηκε ότι ήταν υπερεκφρασμένη σε 4 από τις ασθενείς που εξετάστηκαν (20%) στον καρκινικό ιστό, υποεκφρασμένη σε 3 ασθενείς, ενώ ισοέκφραση της ισομορφής στον καρκινικό και στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό είχαμε σε 3 από αυτές. Στις υπόλοιπες 10 ασθενείς, τα αποτελέσματα διαφέρουν μιας και σε 6 από αυτές (30%) η TAp63 εκφράστηκε μόνο στα καρκινικά δείγματα και στις υπόλοιπες δεν είχαμε καμία απολύτως έκφραση της ισομορφής (Πίνακας 4.1, Εικόνα 4.1).

Από την ανάλυση της ισομορφής ΔNr63, βρέθηκε ότι στις 4 ασθενείς (20%) ήταν υπερεκφρασμένη στον καρκινικό ιστό σε σχέση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό και σε 3 (15%) υποεκφρασμένη. Οι υπόλοιπες 13 γυναίκες που εξετάστηκαν βρέθηκαν οι 6 (30%) να εκφράζουν την ΔNr63 μόνο στον καρκινικό ιστό, ενώ δεν βρέθηκε καμία έκφραση της ισομορφής στις υπόλοιπες 7 γυναίκες (35%) (Πίνακας 4.1, Εικόνα 4.1).






Πίνακας 4.1: Ποσοστό της έκφρασης των δύο ισομορφών στον καρκινικό και στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό.

	<b>Overexpression (%)</b>	<b>Normal expression (%)</b>	<b>Reduced expression (%)</b>	<b>No expression (%)</b>
<b>TAp63</b>				
<i>Normal</i>	—	10/20 (50.0)	—	10/20 (50.0) <sup>a</sup>
<i>Tumor</i>	(4+6)/20 (50.0) <sup>a</sup>	3/20 (15.0)	3/20 (15.0)	4/20 (20.0)
<b>ΔNp63</b>				
<i>Normal</i>	—	7/20 (35.0)	—	13/20 (65.0) <sup>b</sup>
<i>Tumor</i>	(4+6)/20 (50.0) <sup>b</sup>	—	3/20(15.0)	7/20 (35.0)

<sup>a</sup> Σε 6 δείγματα η TAp63 εκφράστηκε μόνο στα καρκινικά δείγματα και όχι στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό

<sup>b</sup> Σε 6 δείγματα η ΔNp63 εκφράστηκε μόνο στα καρκινικά δείγματα και όχι στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό

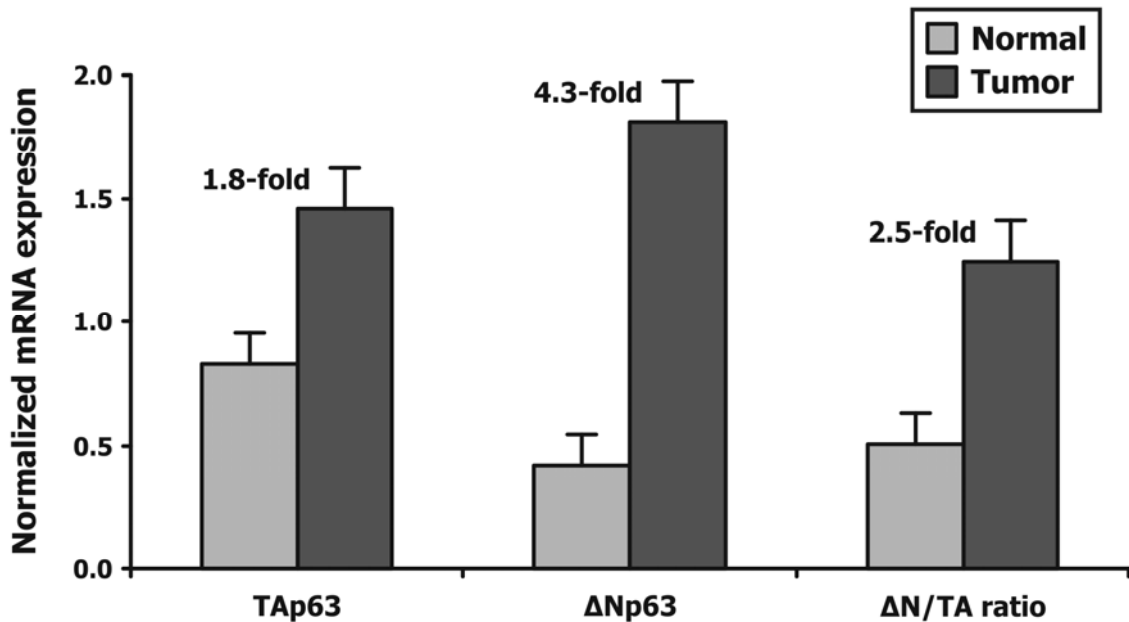
Sample	TAp63	ΔNp63
1	Downregulation	Tumor-only expression
2	Overexpression	Overexpression
3	Overexpression	Tumor-only expression
4	Tumor-only expression	No expression
5	Tumor-only expression	Downregulation
6	Normal expression	Tumor-only expression
7	Normal expression	Overexpression
8	No expression	No expression
9	No expression	No expression
10	No expression	Downregulation
11	Tumor-only expression	Tumor-only expression
12	Overexpression	Tumor-only expression
13	Tumor-only expression	Overexpression
14	Tumor-only expression	No expression
15	Normal expression	Downregulation
16	Overexpression	Tumor-only expression
17	Downregulation	No expression
18	Tumor-only expression	No expression
19	No expression	No expression
20	Downregulation	Overexpression

-  No expression
-  Normal expression
-  Downregulation
-  Overexpression
-  Tumor-only expression

Εικόνα 4.1: Σχηματική απεικόνιση του ποσοστού της έκφρασης των ΔNp63 και TAp63 ισομορφών στον καρκίνο του ενδομητρίου

Περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε για την ισομορφή TAr63, να υπερεκφράζεται κατά 1,8 φορές περισσότερο στα καρκινικά δείγματα από ότι στα φυσιολογικά (από 0,83 στα φυσιολογικά στο 1,45 στα καρκινικά δείγματα). Παράλληλα η ισομορφή ΔNr63, βρέθηκε υπερεκφρασμένη 4,3 φορές στα καρκινικά δείγματα από ότι στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό (από 0,42 στον φυσιολογικό στο 1,81 στον καρκινικό ιστό).

Από την μελέτη της αναλογίας των δύο ισομορφών ΔN/TA, παρατηρήθηκε ότι η αναλογία είχε μετατοπιστεί 2.5 φορές υπέρ της ΔNr63, από 0,5 στα φυσιολογικά δείγματα στο 1,2 στα καρκινικά (Εικόνα 4.2). Επιπλέον από την μελέτη της έκφρασης των δύο ισομορφών TAr63 και ΔNr63, βρέθηκε ότι η έκφραση της ολικής p63 είναι υπερεκφρασμένη στα καρκινικά δείγματα κατά 2,6 φορές. Συγκεκριμένα από 1,24 στα φυσιολογικά δείγματα μετατοπίστηκε στο 3,26 στα καρκινικά (Εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.2: Διάγραμμα κανονικοποιημένης έκφρασης των δύο ισομορφών, καθώς και ο λόγος της έκφρασης ΔN/TA στον φυσιολογικό και στον καρκινικό ιστό αντίστοιχα.

#### 4.1.2 Συσχετισμός αποτελεσμάτων της έκφρασης των δύο ισομορφών TAp63 και ΔNp63 με τα κλινικοπαθολογικά στοιχεία των ασθενών.

Τα αποτελέσματα της έκφρασης των ισομορφών TAp63 και ΔNp63 και στα δύο είδη δειγμάτων, καρκινικό και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό αναλύθηκαν στατιστικά συσχετίστηκαν με τα κλινικοπαθολογικά στοιχεία των υπό εξέταση ασθενών. Από την στατιστική ανάλυση βρέθηκε ότι η ισομορφή TAp63 ήταν υπερεκφρασμένη σε παχύσαρκες γυναίκες ( $1,62 \pm 0,11$ ) σε σχέση με



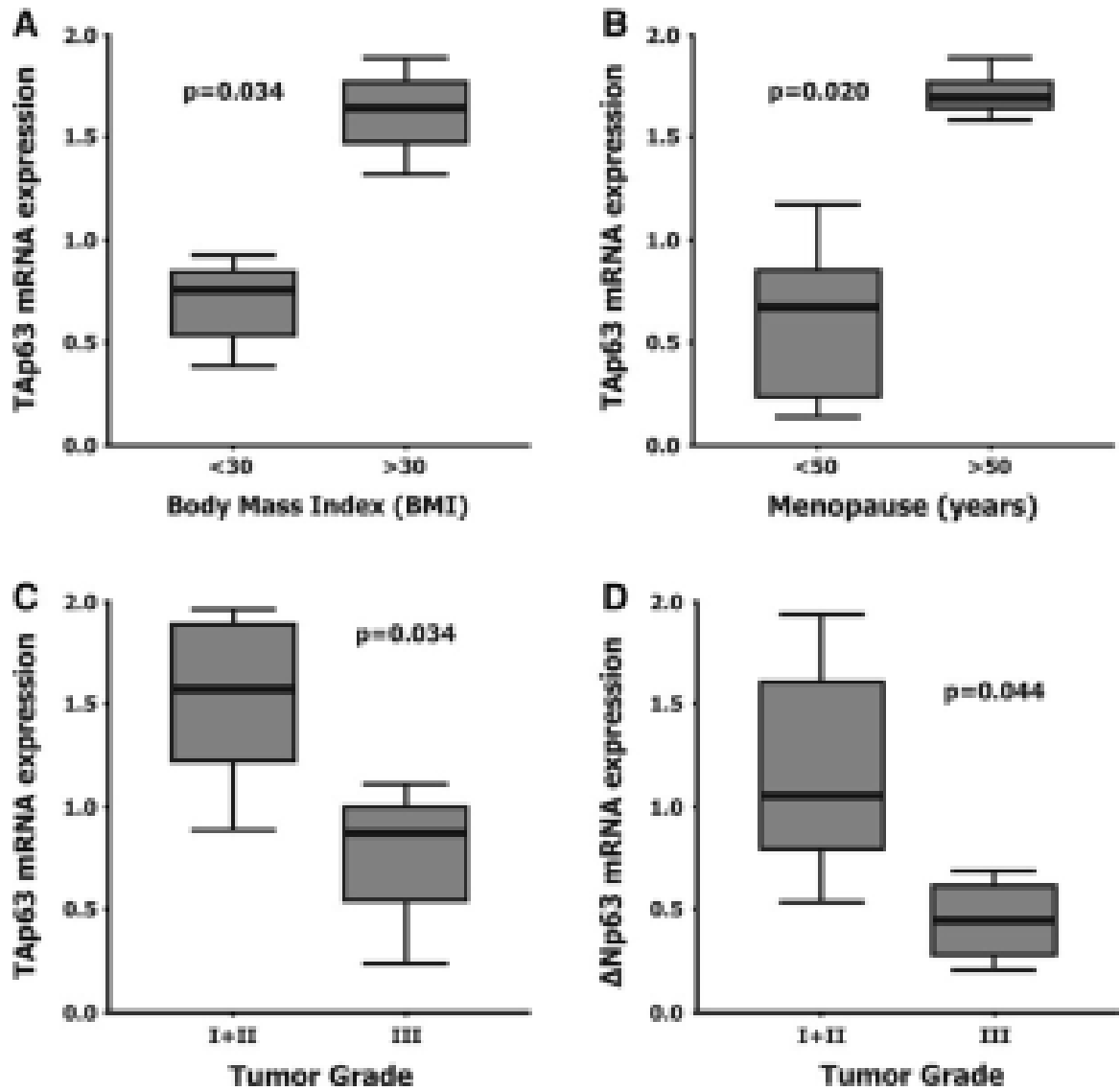
γυναίκες με χαμηλότερο δείκτη μάζας σώματος (BMI) ( $0,64 \pm 0,20$ ) ( $p=0.034$ ).

Αυξημένη έκφραση της ίδιας ισομορφής είχαμε και στις γυναίκες με ηλικία εμμηνόπαυσης άνω των 50 ετών ( $1,72 \pm 0,08$ ), σε σχέση με τις γυναίκες που είχαν εμμηνόπαυση σε νεότερη ηλικία ( $0,67 \pm 0,18$ ) ( $p=0,020$ ).

Παράλληλα βρέθηκε αυξημένη η έκφραση της TAp63 ισομορφής στους όγκους με βαθμό διαφοροποίησης I και II (Grade I και Grade II) ( $2,00 \pm 0,44$ ), σε σχέση με τους όγκους με βαθμό διαφοροποίησης III, ( $0,77 \pm 0,19$ ) ( $p=0.034$ ).

Η έκφραση της ΔNp63 φαίνεται αυξημένη στους όγκους με βαθμό διαφοροποίησης I και II (Grade I και Grade II) ( $1.67 \pm 0.32$ ) σε σχέση με τους όγκους που χαρακτηρίζονται με βαθμό διαφοροποίησης III (Grade III) ( $0,58 \pm 0,14$ ) ( $p=0.044$ ). Περαιτέρω στατιστική ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων σε σχέση με τα κλινικά στοιχεία των ασθενών δεν έδειξε κάποια επιπλέον συσχέτιση (Εικόνα 4.3).

Από την *in silico* ανάλυση των υποκινητών P1 και P2 της p63, βρέθηκε ότι οι δύο υποκινητές είναι φτωχοί σε νησίδες CpG που σημαίνει ότι η έκφραση της p63 και των ισομορφών της δεν ελέγχεται από την μεθυλίωση των υποκινητών τους.



Εικόνα 4.3 : Σχηματική απεικόνιση της συσχέτισης της έκφρασης των ισομορφών με το BMI, την ηλικία εμμηνόπαυσης και τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου.

#### **4.2.1 Τα επίπεδα mRNA των ισομορφών TAr73 και ΔNr73 στον καρκίνο του ενδομητρίου.**

Στην παρούσα μελέτη, μελετήθηκε και η έκφραση των ισομορφών του γονιδίου της p73, TAr73 και ΔNr73 με την μέθοδο της Real-Time PCR. Από τις 20 ασθενείς που νοσηλεύτηκαν μετά από χειρουργική επέμβαση καρκίνου του ενδομητρίου, μετρήθηκε η έκφραση των γονιδίων των δύο ισομορφών, τόσο για τον καρκινικό ιστό, όσο και για τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό.

Η TAr73 ισομορφή, εμφανίζεται υπερεκφρασμένη σε 7 από τις 20 ασθενείς (35%), υποεκφρασμένη σε 3 γυναίκες με καρκίνο ενδομητρίου (15%), ενώ ίση έκφραση της ισομορφής στον καρκινικό ιστό με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό είχαμε στις υπόλοιπες 10 περιπτώσεις (50%) (Πίνακας 4.2). Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι η συγκεκριμένη ισομορφή ήταν εκφρασμένη 2,1 φορές περισσότερο στα καρκινικά δείγματα σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά (από 0,78 στα φυσιολογικά δείγματα στο 1,56 στα καρκινικά δείγματα) (Εικόνα 4.4).

Η ΔNr73 ισομορφή δεν εμφάνισε καμία απολύτως έκφραση στα δύο είδη ιστών, σε 10 από τις 20 (50%) εξεταζόμενες περιπτώσεις. Σε 6 από τα 20 δείγματα (30%), η ΔNr73 ήταν εκφρασμένη μόνο στον καρκινικό ιστό και όχι στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό, ενώ σε μία μόνο από τις εξεταζόμενες περιπτώσεις (5%) είχαμε έκφραση της ισομορφής μονάχα στον φυσιολογικό ιστό και όχι στον αντίστοιχο καρκινικό ιστό. Στις υπόλοιπες 3 από τις 20 περιπτώσεις (15%) είχαμε ίση έκφραση της ΔNr73 και στα δύο είδη δειγμάτων (Πίνακας 4.2). Από την σύγκριση των αποτελεσμάτων της έκφρασης της ισομορφής ΔNr73, βρέθηκε ότι στα καρκινικά δείγματα (2,13) εκφράζεται κατά 6,2 φορές περισσότερο από ότι στον φυσιολογικό ιστό (0,32) (Εικόνα 4.4).

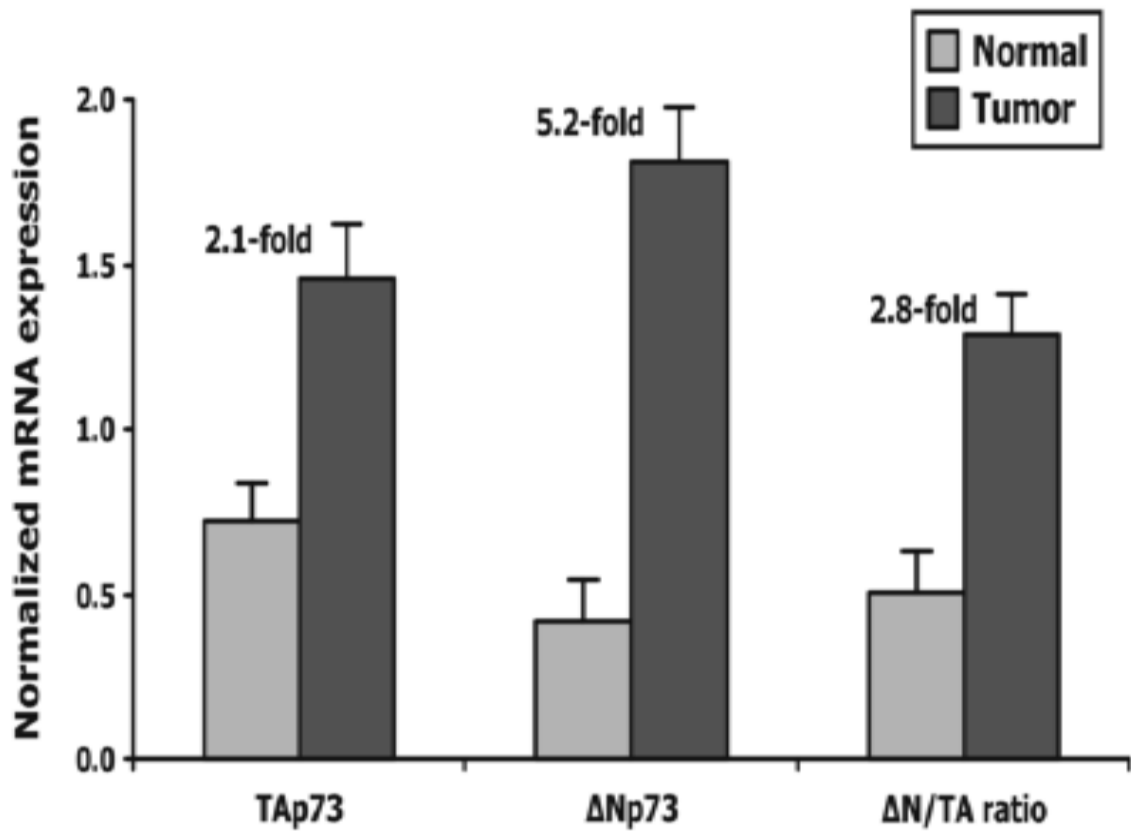
Από την μελέτη της αναλογίας των δύο ισομορφών ΔN/TA, παρατηρήθηκε ότι η αναλογία είχε μετατοπιστεί 3,6 φορές υπέρ της ΔNr73, από 0,4 στα φυσιολογικά δείγματα στο 1,52 στα καρκινικά (Εικόνα 4.4). Επιπλέον από την μελέτη της έκφρασης των δύο ισομορφών TAp63 και ΔNr63, βρέθηκε ότι η έκφραση της ολικής p73 είναι υπερεκφρασμένη στα καρκινικά δείγματα κατά 2,8 φορές. Συγκεκριμένα από 1,07 στα φυσιολογικά δείγματα μετατοπίστηκε στο 3,52 στα καρκινικά (Εικόνα 4.4).

Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα της έκφρασης της TAp73 και ΔNr73 στον καρκινικό και στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό.

	Overexpression (%)	Normal expression (%)	Reduced expression (%)	No expression (%)
<b>TAp73</b>				
<i>Normal</i>	—	20/20 (100.0)	—	
<i>Tumor</i>	7/20 (35.0)	10/20 (10.0)	3/20 (15.0)	
<b>ΔNr73</b>				
<i>Normal</i>	—	(3+1)/20 (20.0) <sup>b</sup>	—	(10+6)/20 (85.0) <sup>a</sup>
<i>Tumor</i>	6/20 (30.0) <sup>a</sup>	3/20 (15.0)	—	(10+1)/20 (55.0) <sup>b</sup>

<sup>a</sup>. Σε 6 δείγματα η ΔNr73 εκφράστηκε μόνο στον καρκινικό ιστό και όχι στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό.

<sup>b</sup>. Σε 1 δείγμα η ΔNr73 εκφράστηκε μόνο στον φυσιολογικό ιστό και όχι στον αντίστοιχο καρκινικό ιστό.



Εικόνα 4.4: Γράφημα που απεικονίζει την κανονικοποιημένη έκφραση της TAp73 και ΔNp73 καθώς και ο λόγος έκφρασης ΔN/TA στον φυσιολογικό και στον καρκινικό ιστό

#### **4.2.2. Μελέτη μεθυλίωσης των υποκινητών P1 και P2 του γονιδίου p73 στον καρκίνο του ενδομητρίου.**

Η ανάλυση της μεθυλίωσης των υποκινητών P1 και P2, έγινε με την βοήθεια της Methylation Specific PCR, στις 20 γυναίκες των οποίων τα δείγματα, καρκινικού ιστού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού, εξετάστηκαν και για τα επίπεδα έκφρασης των ισομορφών του γονιδίου.

Από την ανάλυση μας, φάνηκε ότι ο υποκινητής P1 (TA-υποκινητής), δεν ήταν μεθυλιωμένος ούτε στα καρκινικά δείγματα, ούτε στα φυσιολογικά δείγματα. Αντίθετα ο υποκινητής P2 (ΔN-υποκινητής), βρέθηκε μεθυλιωμένος σε 10 από τα 20 (50%) ζευγάρια δειγμάτων, και μη μεθυλιωμένος σε 2 από αυτά (10%). Από τα υπόλοιπα 10 δείγματα (50%), στα 7 (35%) από αυτά ο υποκινητής μεθυλιωμένος μόνο στα φυσιολογικά δείγματα και μη μεθυλιωμένος στα καρκινικά δείγματα, ενώ σε ένα μόνο δείγμα (5%) ο ΔN υποκινητής ήταν μεθυλιωμένος μόνο στο καρκινικό ιστό και όχι στον παρακείμενο φυσιολογικό του (Πίνακας 4.3) (Εικόνες 4.5 και 4.6)

Πίνακας 4.3: Αποτελέσματα μεθυλίωσης των υποκινητών P1 και P2.

	Methylated (%)	Unmethylated (%)
<b>P1</b>		
<i>Normal</i>	0/20 (0.0)	20/20 (100.0)
<i>Tumor</i>	0/20 (0.0)	20/20 (100.0)
<b>P2</b>		
<i>Normal</i>	16 (10+6)/20 (80.0) <sup>a</sup>	4 (1+3)/20 (20.0) <sup>b</sup>
<i>Tumor</i>	11 (10+1)/20 (55.0) <sup>a</sup>	9 (6+3)/20 (45.0) <sup>b</sup>

- a. Ο υποκινητής P2 εμφανίστηκε μεθυλιωμένος σε 10 ζεύγη δειγμάτων. Παράλληλα σε 6 δείγματα εμφανίστηκε μεθυλιωμένος μόνο στον φυσιολογικό ιστό ενώ σε 1 δείγμα ήταν μεθυλιωμένος μόνο στον καρκινικό ιστό
- b. Ο P2 υποκινητής ήταν μη μεθυλιωμένος σε τρία ζεύγη δειγμάτων. Σε 1 δείγμα βρέθηκε μη μεθυλιωμένος μόνο στον φυσιολογικό ιστό ενώ σε 5 δείγματα βρέθηκε μη μεθυλιωμένος μόνο στον καρκινικό ιστό.

Sample	P1	TAp73	P2	ΔNp73
1N				
1T				
2N				
2T				
3N				
3T				
4N				
4T				
5N				
5T				
6N				
6T				
7N				
7T				
8N				
8T				
9N				
9T				
10N				
10T				
11N				
11T				
12N				
12T				
13N				
13T				
14N				
14T				
15N				
15T				
16N				
16T				
17N				
17T				
18N				
18T				
19N				
19T				
20N				
20T				

- No methylation/Normal expression
- Methylation/Downregulation or no expression
- Overexpression

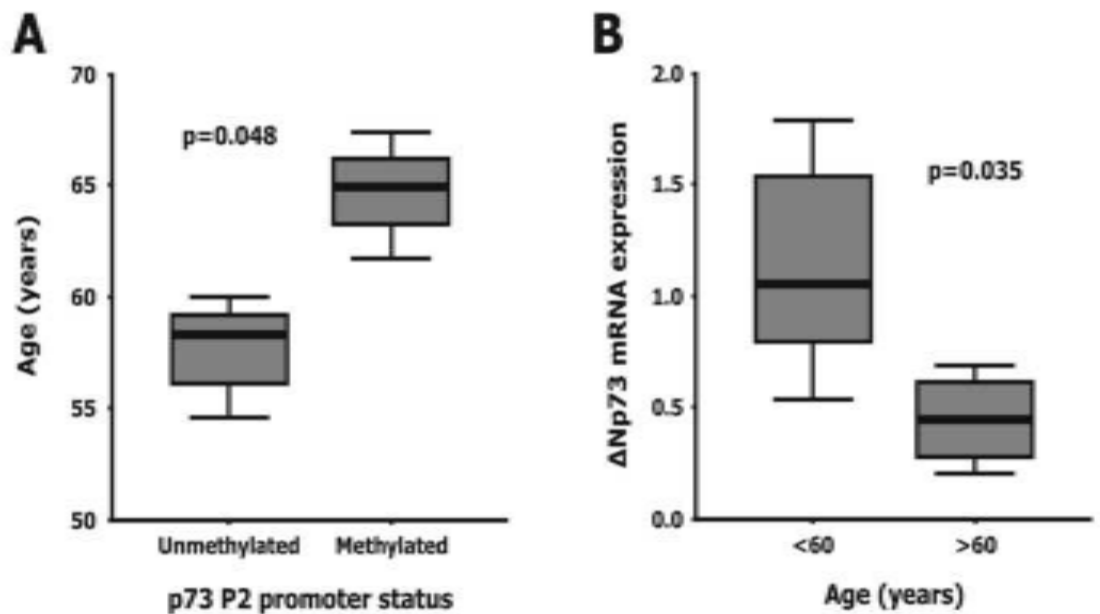
Εικόνα 4.4.: Σχηματική απεικόνιση της μεθυλίωσης των υποκινητών P1 και P2 καθώς και της έκφρασης των ισομορφών ΔNp73 και TAp73 στα καρκινικά και στα φυσιολογικά δείγματα



### **4.2.3. Συγκριτικά αποτελέσματα της έκφρασης και της μελέτης της μεθυλίωσης της ΔNr73.**

Περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων με στατιστική επεξεργασία, βρέθηκε ότι η μη μεθυλίωση του υποκινητή P2 ήταν συνδεδεμένη με την εμφάνιση της νόσου σε μικρότερη ηλικία, με διαφορά από την ηλικία εμφάνισης της νόσου στην μεθυλιωμένη μορφή του υποκινητή P2 τα οκτώ χρόνια ( $56.2 \pm 3.9$  ως  $64.3 \pm 2,1$ ,  $p=0.048$ ).

Παράλληλα παρατηρήθηκε ότι η ισομορφή ΔNr73η εκφράζεται κυρίως σε γυναίκες ηλικίας <60 ετών και όχι στις μεγαλύτερες ηλικίες ( $P=0.035$ ). Επιπλέον στατιστική ανάλυση δεν έδειξε κάποιον άλλο συσχετισμό ανάμεσα στην έκφραση και την κατάσταση της μεθυλίωσης της ισομορφής με τα κλινικοπαθολογικά στοιχεία των ασθενών (Εικόνα 4.5).



Εικόνα 4.5. Σχηματική απεικόνιση της συσχέτισης των ισομορφών της p73 και των υποκινητών της σε ασθενείς με διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά. Α. Η μεθυλίωση του P2 υποκινητή είναι συνδεδεμένη με την εμφάνιση της νόσου σε μικρή ηλικία Β. Η ΔNp73 εκφράζεται κυρίως σε ασθενείς <60 ετών και όχι σε μεγαλύτερους.

## 5. Συζήτηση

### 5.1. Συζήτηση αποτελεσμάτων για το γονίδιο p63 στον καρκίνο του ενδομητρίου

Ο ενδοκυτταρικός ρόλος του γονιδίου της p63 εξαρτάται από την έκφραση των ισομορφών του ΔNp63 και TAp63, πιο συγκεκριμένα η TA ισομορφή φαίνεται να οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση ενώ η ΔN ισομορφή έχει ογκογόνο δράση.

Στην παρούσα μελέτη η έκφραση των δύο ισομορφών TA και ΔN της p63 μετρήθηκε με την μέθοδο της Real Time PCR, σε 20 γυναίκες με καρκίνο του ενδομητρίου. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν υπερέκφραση της TAp63 κατά 1.8 φορές στα καρκινικά δείγματα σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό. Η ισομορφή ΔNp63 παρουσιάζει υπερέκφραση κατά 4.3 φορές περισσότερο στα καρκινικά δείγματα σε σχέση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό, ενώ συνολικά η p63 βρέθηκε υπερεκφρασμένη κατά 2.6 φορές στα καρκινικά δείγματα. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε συσχέτισμό της υπερέκφρασης της TAp63 ισομορφής με την χαμηλή ηλικία εμμηνόπαυσης, με το υψηλό BMI και με τον βαθμό καρκίνου, ένα εύρημα που παρατηρήθηκε και στην ισομορφή ΔNp63.

Η έκφραση του γονιδίου της p63 έχει μελετηθεί σε αρκετές μορφές καρκίνου. Στον καρκίνο του μαστού από τους Koker et al, βρέθηκε υπερέκφραση της ολικής p63 στο 86.7% των ασθενών με μεταπλασία, ενώ στην μη-μεταπλαστική νεοπλασία η υπερέκφραση ήταν μόλις στο 0.6%, ενώ στα θηλώδες καρκινώματα και στα σαρκώματα δεν υπήρχε καμία απολύτως έκφραση της p63 (Koker et al., 2004).

Σύμφωνα με την μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους De Biase et al, η p63 βρέθηκε υπερεκφρασμένη στο 55.5% του βασικού τύπου καρκίνου του μαστού, ενώ η έκφραση της στον luminal-type διηθητικό καρκίνο του μαστού ήταν χαμηλότερη, από 0,6% έως 19,5% (De Biase et al.,2010). Παράλληλα στην ίδια μελέτη η ισομορφή TAp63 βρέθηκε υπερεκφρασμένη στο 75% των δειγμάτων που μελετήθηκαν. Αντίθετα αποτελέσματα έδωσε η μελέτη των Ribeiro-Silva et al., στην οποία παρουσιάστηκε σε εξαιρετικά μικρά ποσοστά υπερέκφραση της p63 στα δείγματα καρκίνου του μαστού (Ribeiro-Silva et al. 2003).

Η συνολική p63 βρίσκεται υπερεκφρασμένη σε αρκετές νεοπλασίες εκτός από τον καρκίνο του μαστού, όπως στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, στον καρκίνο των σιελογόνων αδένων και στον καρκίνο του πνεύμονα (Barbareschi et al. 2001). Στον καρκίνο του πνεύμονα σύμφωνα με την μελέτη των Lewis et al., η p63 βρέθηκε υπερεκφρασμένη σε διάφορους ιστολογικούς τύπους, όπως, πλακώδες καρκίνωμα, υψηλού βαθμού νευροενδοκρινικό καρκίνο (NET) και σάρκωμα, στο 90% περίπου των εξεταζόμενων δειγμάτων (Lewis et al., 2005). Παρόμοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Park et al., στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως όπου βρέθηκε υπερέκφραση της p63 και των ισομορφών της στο 53,2% των καρκινικών δειγμάτων (Park et al. 2000).

Τα αποτελέσματα μας πάνω στην υπερέκφραση της ΔNp63 στο αδenoκαρκινώμα ενδομητρίου έρχονται σε συμφωνία με την μελέτη των Lin et al., όπου το 26,7% των δειγμάτων ενδομητριακού καρκίνου υπερεκφράζουν την ΔN ισομορφή (Lin et al. 2006). Το γεγονός ότι το 30% των δειγμάτων στα οποία υπερεκφράστηκε η ΔNp63 είναι τα καρκινικά δείγματα, είχε παρατηρηθεί και νωρίτερα από τους Basturk et al., σε μελέτη που έκαναν για τον καρκίνο του παγκρέατος. Στην μελέτη αυτή δεν βρέθηκε καμία απολύτως έκφραση της ισομορφής ΔNp63 στα φυσιολογικά δείγματα

παγκρέατος, ενώ όλα τα δείγματα με πλακώδη μεταπλασία έδωσαν έκφραση του δείκτη αυτού (Basturk et al. 2005). Η p63 και ιδιαίτερα η ισομορφή της η ΔNp63, εκφράστηκε σε μεγάλο βαθμό και στα κύτταρα του πλακώδους καρκίνου του οισοφάγου από τους Cao et al., ενώ παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης της ισομορφής αυτής όσο αυξανόταν η απόσταση από την καρκινική περιοχή (Cao et al. 2009).

Υπερέκφραση της ΔNp63, παρατηρήθηκε στο παρελθόν μία μόνο φορά από τους Lin et al., παρόλο που η υπερέκφραση στον καρκινικό ιστό είναι αρκετά συχνή σε άλλα είδη νεοπλασίας και συνδεδεμένη με το προχωρημένο στάδιο της νόσου και με το μικρό διάστημα επιβίωσης (Lin et al. 2006, Gedder et al. 2003, Marchini et al. 2008, Matsubara et al. 2011). Πρόσφατες μελέτες από τους Ruptier et al. (Ruptier et al. 2011) και Yuan et al. (Yuan et al. 2011), έδειξαν ότι ο μηχανισμός που ενεργοποιεί την ΔN ισομορφή της p63, εξαρτάται από την β-catenin και την miR-203 αντίστοιχα και όχι από την υπομεθυλίωση που ενεργοποιεί την p73 (Daskalos et al. 2011) και αλλάζει τον λόγο ΔN/TA των δύο ισομορφών (Arvanitis et al. 2004).

Επιπρόσθετα η εμμηνόπαυση (Sirvidis and Giatromanolaki, 2011) και η παχυσαρκία (Schmandt et al. 2011), φαίνεται να αποτελούν σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του ενδομητρίου. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη μελέτη που συνδέει την έκφραση της p63 και συγκεκριμένα της Tap63 ισομορφής όχι μόνο με την κακοήθεια του ενδομητρίου αλλά γενικότερα με τον καρκίνο.

Παρόλο που υπερέκφραση της p63, παρατηρήθηκε στους όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας όπως τα λεμφώματα (Rushing et al. 2008) και στα μηνιγγιώματα (Pruneri et al. 2005), στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση και των δύο ισομορφών της p63, όχι στον καρκίνο του ενδομητρίου Grade III, αλλά στο Grade I και II. Αυτή η διαφορά των αποτελεσμάτων θα μπορούσε να

αποδοθεί στο διαφορετικό μοριακό προφίλ του καρκίνου του ενδομητρίου από τις προαναφερθείσες κακοήθειες, σε αυτό θα ρίξουν φώς περαιτέρω μελέτες.

Η μελέτη των υποκινητών P1 και P2 έδειξε πως οι υποκινητές δεν είναι πλούσιοι σε CpG νησίδες, αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η υπερέκφραση των ισομορφών ή η έκφραση τους μόνο στα καρκινικά δείγματα, δεν μπορεί να αποδοθεί στα μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης των υποκινητών μιας και το γονίδιο δεν μεθυλιώνεται καθόλου.

Μελέτες πάνω στο γονίδιο και τις ισομορφές του, έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις του, οδηγούν το λιγότερο σε έξι διαφορετικά σύνδρομα όπως EEC, AEC, Rapp-Hodgking Syndrome και Split Hand/Foot Malformation (Sifakis et al. 2001), όμως δεν ήταν πιθανή καμία απολύτως συσχέτιση των μεταλλάξεων του γονιδίου p63 με την υπερέκφραση ή την υποέκφραση του στον καρκίνο (Rinne et al. 2006).

Από τα παραπάνω συμπεράσματα, προκύπτει ότι η έκφραση των ισομορφών της p63 εξαρτώνται από άλλους παράγοντες όπως η φωσφορυλίωση (Deutsch et al. 2001, Kim et al. 2011) ,η ακετυλίωση (Sasaki et al. 2008) ή η αποικοδόμηση του πρωτεοσώματος (Maisse et al. 2003). Συμπληρωματικά στην μελέτη των Panagiannakopoulos et al. βρέθηκε ότι το miR-21 καταστέλλει την έκφραση της TAp63/p53, σχηματίζοντας ένα βρόγχο ανάδρασης (feedback loop) ανάμεσα στο miR-21 και στις TAp63/p53 (Panagiannakopoulos et al. 2008). Με την αύξηση της έκφρασης του ώριμου miR-21, η ΔNp63 καταστέλλει την έκφραση των TAp63, p53 καθώς και των υπολοίπων ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Boominathan 2010).

Στην παρούσα μελέτη καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι οι ισομορφές της p63 είναι υπερεκφρασμένες στα αδενοκαρκινώματα

του ενδομητρίου, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί βαθμού I και II (Grade I και II), σε γυναίκες με μεγάλο δείκτη μάζας σώματος, καθώς και σε γυναίκες που είχαν καθυστερημένη εμμηνόπαυση. Επιπλέον βρέθηκε ότι στα καρκινικά δείγματα η ΔNr63 ισομορφή είναι κατά 2,5 φορές περισσότερο υπερεκφρασμένη από τη TAr63 ισομορφή. Πιστεύουμε ότι το αποτέλεσμα αυτό θα ρίξει στο μοριακό προφίλ του αδενοκαρκινώματος ενδομητρίου και θα μπορούσε να οδηγήσει στο να χαρακτηριστούν οι ΔNr63 και TAr63 ισομορφές ως βιοδείκτες για την έγκαιρη ανίχνευση και θεραπεία του καρκίνου του ενδομητρίου, καθώς και άλλων τύπων καρκίνου.

## **5.2. Συζήτηση αποτελεσμάτων για το γονίδιο p73 στον καρκίνο του ενδομητρίου**

Ο ρόλος του γονιδίου της p73 δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Από μελέτες του παρελθόντος βρέθηκε ότι όσο πιο προχωρημένο ήταν το στάδιο του καρκίνου των ωοθηκών, τόσο υψηλότερη ήταν και η έκφραση του γονιδίου σε σχέση με το αρχικό στάδιο της νόσου. Παρατηρήθηκε ότι το επίπεδο της έκφρασης της p73 σε προχωρημένους όγκους ήταν σχεδόν διπλάσια από την έκφραση του γονιδίου στον φυσιολογικό ιστό, ενώ στα αρχικά στάδια της νόσου η έκφραση ήταν μόνο κατά 1,1 φορές υψηλότερη από εκείνη στον φυσιολογικό ιστό.

Ο Toumi και η ομάδα του (Toumi et al. 2010), διαπίστωσαν ότι η συχνότητα και η ένταση της έκφρασης της p73 αυξάνεται από τον φυσιολογικό βλεννογόνο (26%), στο 75% στους πρωτοπαθείς όγκους και αγγίζει το 97% στους μεταστατικούς καρκίνους. Γενικότερα η p73 συχνά βρίσκεται υπερεκφρασμένη σε αρκετούς τύπους καρκίνου και θα μπορούσε να πει κανείς ότι υπερέκφραση αυτή συνδυάζεται με χαμηλά ποσοστά επιβίωσης (Tennapfel et al. 1999).

Η έκφραση γενικότερα της p73, εξαρτάται από τα επίπεδα έκφρασης των ισομορφών της. Πιο συγκεκριμένα η TAp73 ισομορφή φαίνεται να οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση, ενώ η ΔNp73 παρόλο που διατηρεί την DNA δεσμευτική της ικανότητα, στερείται λειτουργιών, όπως το να αναστείλει την ανάπτυξη και να οδηγήσει το κύτταρο σε απόπτωση, με αποτέλεσμα να λειτουργεί ως ισχυρός αναστολέας της λειτουργίας της p53, χαρακτηρίζοντας έτσι την ισομορφή αυτή ως ογκογόνο ισομορφή (Stiewe et al, 2002)



Στην παρούσα μελέτη η TAr73 ισομορφή, εμφανίζεται υπερεκφρασμένη στο 35% των περιπτώσεων, υποεκφρασμένη στο 15% των όγκων ενώ η έκφραση της στα δύο είδη ιστών, καρκινικό και παρακείμενο φυσιολογικό, παραμένει σταθερή στο 50% των περιπτώσεων, με αποτέλεσμα τα αποτελέσματα αυτά να επιβεβαιώνουν προηγούμενες μελέτες.

Η έκφραση της ισομορφής TAr73, στον καρκίνο των ωοθηκών μελετήθηκε από την ομάδα του Concin, όπου βρέθηκε ότι το 33% των ασθενών παρουσίασαν υπερέκφραση της ισομορφής στα καρκινικά δείγματα (Concin et al. 2005). Παρόμοια μελέτη πραγματοποιήθηκε και από την ομάδα του Oh, οι οποίοι μελέτησαν την έκφραση της TAr73 σε ακτινοευαίσθητους και ακτινοανθεκτικούς όγκους του τραχήλου της μήτρας (Oh et al. 2008). Υπερέκφραση της ισομορφής TAr73 παρατηρήθηκε στο 30.8% των ακτινοευαίσθητων όγκων, ενώ στους ακτινοανθεκτικούς όγκους μόνο το 5.6% εμφάνισε αυξημένα επίπεδα.

Παράλληλα μελετήθηκε και η μεθυλίωση του υποκινητή P1 του p73. Ο υποκινητής βρέθηκε μη μεθυλιωμένος σε όλα τα δείγματα, καρκινικά και φυσιολογικά, το γεγονός αυτό συνδέεται με την έκφραση της p73 σε όλα τα δείγματα ανεξάρτητα από την παθολογία του ιστού. Μελέτες που έλαβαν χώρα σε άλλα είδη καρκίνου έδειξαν διαφορετική κατάσταση του P1 υποκινητή ως προς την κατάσταση της μεθυλίωσης του. Πιο συγκεκριμένα στον γαστρικό καρκίνο το 21% των δειγμάτων εμφάνισαν τον υποκινητή P1 στην μεθυλιωμένη μορφή, ενώ στην ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του παγκρέατος, καθώς και στο μην διηθητικό καρκίνο τα επίπεδα μεθυλίωσης ήταν 2.7% και 5.2% αντίστοιχα (Chang et al 2006, Peng et al 2006).

Από την μελέτη ΔNr73 ισομορφής, βρέθηκε ότι δεν εκφράστηκε καθόλου στο 50% των δειγμάτων, ενώ στο 35% εκφράστηκα μόνο στον καρκινικό ιστό και όχι στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα

αποτελέσματα της ομάδας του Uramoto, η οποία μελετώντας την έκφραση της ΔNp73 ισομορφής στον καρκίνο του πνεύμονα βρήκε ότι υπήρξε έκφραση στο 58.3% των καρκινικών δειγμάτων και όχι στον αντίστοιχο φυσιολογικό ιστό (Uramoto et al. 2006). Επιπλέον από τα αποτελέσματα που έδωσε η ίδια ομάδα βρέθηκε ότι η έκφραση της ΔNp73 ισομορφής είναι αντιστρόφως ανάλογη με την πενταετή επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα.

Από τα πειράματα που έγιναν από την ομάδα του Guan στον προστάτη βρέθηκε ότι η ΔNp73 ήταν υπερεκφρασμένη στο 60.6% των αδενοκαρκινωμάτων του προστάτη ενώ το ποσοστό αυτό αυξανόταν στα δείγματα καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη αγγίζοντας το 70.8% (Guan et al. 2005). Στην μελέτη αυτή επιβεβαιώθηκε η μη έκφραση της ισομορφής αυτής στον φυσιολογικό ιστό των ίδιων ασθενών. Παρόμοια αποτελέσματα δόθηκαν και σε άλλα είδη καρκίνων από τις ομάδες άλλων επιστημόνων (Dominguez et al. 2006, Bozzetti et al. 2007, Dominguez et al. 2006, Cam et al. 2006, Oswald et al. 2008).

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε και η κατάσταση της μεθυλίωσης του P2 υποκινητή του γονιδίου της p73, βρέθηκε ότι το 50% των δειγμάτων ήταν μεθυλιωμένα. Ο υποκινητής αυτός γενικότερα είναι υπερμεθυλιωμένος στον φυσιολογικό ιστό και πλήρως μεθυλιωμένος στο 100% των περιπτώσεων γαγγλιονευρώματος (Banelli et al. 2005). Στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ο υποκινητής P2 φαίνεται μεθυλιωμένος σε περισσότερα από το 40% των δειγμάτων που εξέτασε η ομάδα του Di Vinci et al (Di Vinci et al. 2009).

Από το υπόλοιπο 50% των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, το 10% εμφάνισε τον υποκινητή P2 μη μεθυλιωμένο, τόσο στον καρκινικό ιστό όσο και στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό, ενώ στο 30% των δειγμάτων ήταν μεθυλιωμένος στον φυσιολογικό ιστό και όχι στον αντίστοιχο καρκινικό ιστό. Τα

αποτελέσματα αυτά έρχονται να επιβεβαιώσουν τα επίπεδα έκφρασης της ΔNp73 ισομορφής, μιας και η ισομορφή αυτή δεν έκφράστηκε στα περισσότερα φυσιολογικά και καρκινικά δείγματα, ή ήταν εκφρασμένη μονάχα στα καρκινικά δείγματα.

Συμπερασματικά στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε ότι οι ισομορφές της p73 είναι υπερεκφρασμένες στον καρκίνο του ενδομητρίου. Επίσης βρέθηκε ότι ο υποκινητής P1 είναι συνήθως μη μεθυλιωμένος, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν αναστέλλει την έκφραση της p73.

Αντίθετα η έκφραση της ΔNp73 ισομορφής στον καρκίνο του ενδομητρίου εξαρτάται από την κατάσταση της μεθυλίωσης του P2 υποκινητή. Η απομεθυλίωση του P2 υποκινητή, μόνο στα καρκινικά δείγματα μπορεί να αποτελέσει σημαντικό χαρακτηριστικό κακοήθειας του ενδομητρίου. Τα παραπάνω ευρήματα ρίχνουν νέο φως στον ρόλο της p73 στην καρκινογένεση και σε αυτά θα μπορούσαν να στηριχτούν πιθανές μελλοντικές θεραπευτικές στρατηγικές για ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου και άλλα είδη νεοπλασιών.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **A.**

**Albertini** AF, Devouassoux-Shisheboran M, Genestie C. Pathology of endometrioid carcinoma. *Bull Cancer*. 2012 Jan;99(1):7-12.

**Arvanitis** DA, Lianos E, Soultziz N, Delakas D, Spandidos DA. Deregulation of p73 isoform equilibrium in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Oncol Rep*. 2004 Nov;12(5):1131-7.

### **B.**

**Barbareschi** M, Pecciarini L, Cangi MG, Macrì E, Rizzo A, Viale G, Doglioni C. p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. *Am J Surg Pathol*. 2001 Aug;25(8):1054-60.

**Basturk** O, Khanani F, Sarkar F, Levi E, Cheng JD, Adsay NV. DeltaNp63 expression in pancreas and pancreatic neoplasia. *Mod Pathol*. **2005** Sep;18(9):1193-8.

**Becker** K, Pancoska P, Concin N, et al. Patterns of p73 N-terminal isoform expression and p53 status have prognostic value in gynecological cancers. *Int J Oncol* 2006; 29(4): 889-902.

**Bellacchio** E, Paggi MG. Understanding the targeting of the RB family proteins by viral oncoproteins to defeat their oncogenic machinery. *J Cell Physiol*. 2012 Jun 20. doi: 10.1002/jcp.24137. [Epub ahead of print]

**Bokhman** JV: Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983, 15(1):10-17.

**Bokhoven** H, Brunner H G: Splitting p63, *Am J Hum Genet*. 2002; 71: 1-13.

**Boominathan** L. The tumor suppressors p53, p63, and p73 are regulators of microRNA processing complex. *PLoS One*. 2010 May 12;5(5):e10615.

**Bozzetti** C, Nizzoli R, Musolino A, Martella EM, Crafa P, Lagrasta CA, Camisa R, Bonati A, Lunghi P, Ardizzoni A. J Clin Oncol. 2007 Apr 10;25(11):1451-3; author reply 1453-4.p73 and p53 pathway in human breast cancers.

**C.**

**Cam** H, Griesmann H, Beitzinger M, Hofmann L, Beinoraviciute-Kellner R, Sauer M, Hüttinger-Kirchhof N, Oswald C, Friedl P, Gattenlöhner S, Burek C, Rosenwald A, Stiewe T. p53 family members in myogenic differentiation and rhabdomyosarcoma development. Cancer Cell. 2006 Oct;10(4):281-93.

**Cao** LY, Yin Y, Li H, Jiang Y, Zhang HF. Expression and clinical significance of S100A2 and p63 in esophageal carcinoma. World J Gastroenterol. 2009 Sep 7;15(33):4183-8.

**Chakravarty** D, Gupta N, Goda JS, Srinivasan R, Patel FD, Dhaliwal L. Steroid receptors, HER2/neu and Ki-67, in endometrioid type of endometrial carcinoma: Correlation with conventional histomorphological features of prognosis. Acta Histochem. 2010 Jul;112(4):355-63.

**Chang** MS, Uozaki H, Chong JM, Ushiku T, Sakuma K, Ishikawa S, Hino R, Barua RR, Iwasaki Y, Arai K, Fujii H, Nagai H, Fukayama M. CpG island methylation status in gastric carcinoma with and without infection of Epstein-Barr virus. Clin Cancer Res. 2006 May 15;12(10):2995-3002.

**Chen** CL, Ip SM, Cheng D, Wong LC, Ngan HY. P73 gene expression in ovarian cancer tissues and cell lines. Clin Cancer Res 2000;6:3910-5.

**Concin** N, Hofstetter G, Berger A, Gehmacher A, Reimer D, Watrowski R, Tong D, Schuster E, Hefler L, Heim K, Mueller-Holzner E, Marth C, Moll UM, Zeimet AG, Zeillinger R. Clinical relevance of dominant-negative p73 isoforms for responsiveness to chemotherapy and survival in ovarian cancer: evidence for a crucial p53-p73 cross-talk in vivo. Clin Cancer Res. 2005 Dec 1;11(23):8372-83.

**Concin** N, Becker K, Slade N, Erster S, Mueller-Holzner E, Ulmer H, Daxenbichler G, Zeimet A, Zeillinger R, Marth C, Moll UM. Transdominant DeltaTAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. *Cancer Res.* 2004 Apr 1;64(7):2449-60.

**D.**

**Daskalos** A, Logotheti S, Markopoulou S, Xinarianos G, Gosney JR, Kastania AN, Zoumpourlis V, Field JK, Liloglou T. Global DNA hypomethylation-induced  $\Delta$ Np73 transcriptional activation in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2011 Jan 1;300(1):79-86.

**De Biase** D, Morandi L, Degli Esposti R, Ligorio C, Pession A, Foschini MP, Eusebi V. p63 short isoforms are found in invasive carcinomas only and not in benign breast conditions. *Virchows Arch.* 2010 Apr;456(4):395-401.

**Delahanty** RJ, Beeghly-Fadiel A, Xiang YB, Long J, Cai Q, Wen W, Xu WH, Cai H, He J, Gao YT, Zheng W, Shu XO. Association of Obesity-related Genetic Variants With Endometrial Cancer Risk: A Report From the Shanghai Endometrial Cancer Genetics Study. *Am J Epidemiol.* 2011 Oct 5. [Epub ahead of print]

**Denschlag** D, Ulrich U, Emons G. The diagnosis and treatment of endometrial cancer: progress and controversies. *Dtsch Arztebl Int.* 2010 Aug;108(34-35):571-7.

**Deutsch** GB, Zielonka EM, Coutandin D, Weber TA, Schäfer B, Hannewald J, Luh LM, Durst FG, Ibrahim M, Hoffmann J, Niesen FH, Sentürk A, Kunkel H, Brutschy B, Schleiff E, Knapp S, Acker-Palmer A, Grez M, McKeon F, Dötsch V. DNA damage in oocytes induces a switch of the quality control factor TAp63 $\alpha$  from dimer to tetramer. *Cell.* 2011 Feb 18;144(4):566-76.

**Di Vinci** A, Sessa F, Casciano I, Banelli B, Franzi F, Brigati C, Allemanni G, Russo P, Dominioni L, Romani M. Different intracellular compartmentalization of TA and DeltaNp73 in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol.* 2009 Feb;34(2):449-56.

**Domínguez G**, García JM, Peña C, Silva J, García V, Martínez L, Maximiano C, Gómez ME, Rivera JA, García-Andrade C, Bonilla F. DeltaTAp73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative in vivo network involving p73 isoforms, p53, and E2F-1. *J Clin Oncol.* 2006 Feb 10;24(5):805-15. Epub 2005 Dec 27.

**Domínguez G**, Peña C, Silva J, García JM, García V, Rodríguez R, Cantos B, Citores MJ, España P, Bonilla F. The presence of an intronic deletion in p73 and high levels of ZEB1 alter the TAp73/DeltaTAp73 ratio in colorectal carcinomas. *J Pathol.* 2006 Dec;210(4):390-7.

**Du Z**, Li J, Wang L, Bian C, Wang Q, Liao L, Dou X, Bian X, Zhao RC.

Overexpression of  $\Delta Np63\alpha$  induces a stem cell phenotype in MCF7 breast carcinoma cell line through the Notch pathway. *Cancer Sci.* 2010 Nov;101(11):2417-24.

## **E.**

**Ebrahimi F**, Shtaroodi H, Asadi Sh, Ghazi Nezami B, Ghasemi M, Hashemi M, Doustar Y: Sildenafil decreased cardiac cell apoptosis in diabetic mice, reduction of oxidative stress as a possible mechanism. *Can. Physiol. Pharmacol.* 2009; 87: 556–564.

## **F.**

**Flores E R**, Sengupta S, Miller J B, Newman J J, Bronson R, Crowley D, Yang A, McKeon F, Jacks T: Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73, evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell.* 2005; 7: 363–373.

**Furrer J**, Enthart A, Kuhlewein A, Dehner A., Klein C, Hansen S, Schwaiger M, Kessler H, Gemmecker G: Backbone 1H, 13C and 15N resonance assignments for the 25.8 kDa DNA binding domain of the human p63 protein. *J. Biomol.NMR.* 2003; 26: 377–378.

## **G.**

**Ge L**, Smail M, Meng W, Shyr Y, Ye F, Fan KH, Li X, Zhou HM, Bhowmick NA. Yes-associated protein expression in head and neck squamous cell carcinoma nodal metastasis. *PLoS One*. 2011;6(11):e27529. Epub 2011 Nov 9.

**Geddert H**, Kiel S, Heep HJ, Gabbert HE, Sarbia M. The role of p63 and deltaNp63 (p40) protein expression and gene amplification in esophageal carcinogenesis. *Hum Pathol*. 2003 Sep;34(9):850-6.

**Gruber SB**, Thompson WD. A population-based study of endometrial cancer and familial risk in younger women. Cancer and Steroid Hormone Study Group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996 Jun;5(6):411-7.

**Guan M**, Chen Y. Aberrant expression of DeltaNp73 in benign and malignant tumours of the prostate: correlation with Gleason score. *J Clin Pathol*. 2005 Nov;58(11):1175-9.

## **H.**

**Ha L**, Ponnampereuma RM, Jay S, Ricci MS, Weinberg WC. Dysregulated  $\Delta Np63\alpha$  inhibits expression of Ink4a/arf, blocks senescence, and promotes malignant conversion of keratinocytes. *PLoS One*. 2011;6(7):e21877. Epub 2011 Jul 15.

## **I.**

**Irwin MS**, Kaelin WG Jr. Role of the newer p53 family proteins in malignancy. *Apoptosis*. 2001 Feb-Apr;6(1-2):17-29.

## **J.**

**Jayaraman L**, Prives C. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by short single strands of DNA requires the p53 C-terminus. *Cell* 1995;81:1021-1029.



## **K.**

**Kaghad** M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):809-19.

**Kastan** MB<sup>1</sup>. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51:6304-

**Kastan** MB<sup>2</sup>, Canman CE, Leonard CJ. P53, cell cycle control and apoptosis : implication for cancer. *Cancer Metastasis* 1995; 14:3-15.

**Kim** DA, Lee BL, Suh EK. Ionizing radiation-induced TAp63α phosphorylation at C-terminal S/TQ motifs requires the N-terminal transactivation (TA) domain. *Cell Cycle*. 2011 Mar 1;10(5):840-9. Epub 2011 Mar 1.

**Koker** MM, Klier CG. p63 expression in breast cancer: a highly sensitive and specific marker of metaplastic carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2004 Nov;28(11):1506-12.

**Komarova** E, Zelnick RC, Chin D. et al. Intracellular localization of p53 tumor suppressor protein in irradiated cells is cell regulated and determined by the nucleus. *Cancer Res* 1997;53:5217-5220.

## **L.**

**Lagarda** H, Catusus L, Arguelles R, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 2001; 193(2): 193-199.

**Lane** DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV 40 transformed cells. *Nature* 1978; 278:261-263.

**Levine** AJ, Grierson F, Husen L. P53:the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-331.

- Lewis** JS, Ritter JH, El-Mofty S. Alternative epithelial markers in sarcomatoid carcinomas of the head and neck, lung, and bladder-p63, MOC-31, and TTF-1. *Mod Pathol*. 2005 Nov;18(11):1471-81.
- Li** T, Yang Y, Li X, Xu C, Meng EGFR- and AKT-mediated reduction in PTEN expression contributes to tyrphostin resistance and is reversed by mTOR inhibition in endometrial cancer cells. *L. Mol Cell Biochem*. 2011 Sep 28. [Epub ahead of print].
- Lin** Z, Liu M, Li Z, Kim C, Lee E, Kim I. DeltaNp63 protein expression in uterine cervical and endometrial cancers. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006 Dec;132(12):811-6. Epub 2006 Jun 28.
- Lin** Z, Nan Y, Zhang X, Zhao Y, Kim C, Kim I. Reverse transcription-polymerase chain reaction and western blotting analysis for detection of p63 isoforms in uterine cervical cancers. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 Jul-Aug;16(4):1643-7.
- Liu** SS, Chan KY, Leung RC, Law HK, Leung TW, Ngan HY. Enhancement of the radiosensitivity of cervical cancer cells by overexpressing p73alpha. *Mol Cancer Ther*. 2006 May;5(5):1209-15.
- Lo Iacono** M, Monica V, Saviozzi S, Ceppi P, Bracco E, Papotti M, Scagliotti GV. p63 and p73 isoform expression in non-small cell lung cancer and corresponding morphological normal lung tissue. *J Thorac Oncol*. 2011 Mar;6(3):473-81.
- Logotheti** S, Michalopoulos I, Sideridou M, Daskalos A, Kossida S, Spandidos DA, Field JK, Vojtesek B, Liloglou T, Gorgoulis V, Zoumpourlis V. Sp1 binds to the external promoter of the p73 gene and induces the expression of TAp73gamma in lung cancer. *FEBS J*. 2010 Jul;277(14):3014-27. Epub 2010 Jun 7.
- Lu** H, Yang X, Duggal P, Allen CT, Yan B, Cohen J, Nottingham L, Romano RA, Sinha S, King KE, Weinberg WC, Chen Z, Van Waes C. TNF- $\alpha$  promotes c-REL/ $\Delta$ Np63 $\alpha$  interaction and TAp73 dissociation from key genes that mediate growth arrest and apoptosis in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2011 Nov 1;71(21):6867-77. Epub 2011 Sep 20.

## **M.**

**Maisse** C, Guerrieri P, Melino G. p73 and p63 protein stability: the way to regulate function? *Biochem Pharmacol.* 2003 Oct 15;66(8):1555-61.

**Marchini** S, Marabese M, Marrazzo E, Mariani P, Cattaneo D, Fossati R, Compagnoni A, Fruscio R, Lissoni AA, Broggin M. DeltaNp63 expression is associated with poor survival in ovarian cancer. *Ann Oncol.* 2008 Mar;19(3):501-7. Epub 2007 Nov 12.

**Matsubara** R, Kawano S, Kiyosue T, Goto Y, Hirano M, Jinno T, Toyoshima T, Kitamura R, Oobu K, Nakamura S. Increased  $\Delta$ Np63 expression is predictive of malignant transformation in oral epithelial dysplasia and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2011 Dec;39(6):1391-9. doi: 10.3892/ijo.2011.1151. Epub 2011 Aug 9.

**McCormick** BA, Wilburn RD, Thomas MA, Williams DB, Maxwell R, Aubuchon M. Fertil Steril. Endometrial thickness predicts endometrial hyperplasia in patients with polycystic ovary syndrome. 2011 Jun 30;95(8):2625-7.

**Merritt** MA, Cramer DW. Molecular pathogenesis of endometrial and ovarian cancer. *Cancer Biomark.* 2011;9(1-6):287-305.

**Mills** AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature.* 1999 Apr 22;398(6729):708-13.

**Moll** UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res* 2004; 2(7): 371-386.

**Mundt** HM, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T, Müller M. Dominant negative (DeltaN) p63alpha induces drug resistance in hepatocellular carcinoma by interference with apoptosis signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 May 28;396(2):335-41. Epub 2010 Apr 18.

**Mutter** GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, Weng LP, Eng C. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest

endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Jun 7;92(11):924-30.

## **N.**

**Nemajerova** A, Palacios G, Nowak NJ, Matsui S, Petrenko O. Targeted deletion of p73 in mice reveals its role in T cell development and lymphomagenesis. *PLoS One.* 2009 Nov 11;4(11):e7784.

## **O.**

**Oh** YK, Lee HJ, Jeong MH, Rhee M, Mo JW, Song EH, Lim JY, Choi KH, Jo I, Park SI, Gao B, Kwon Y, Kim WH. Role of activating transcription factor 3 on TAp73 stability and apoptosis in paclitaxel-treated cervical cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2008 Jul;6(7):1232-49.

**Oswald** C, Stiewe T. In good times and bad: p73 in cancer. *Cell Cycle.* 2008 Jun 15;7(12):1726-31. Epub 2008 Jun 16. Review.

## **P.**

**Papagiannakopoulos** T, Shapiro A, Kosik KS. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2008 Oct 1;68(19):8164-72.

**Peng** DF, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, Kitazawa S, Hirohashi S. DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis.* 2006 Jun;27(6):1160-8. Epub 2006 Mar 14.

**Pietenpol** JA. Sequence- specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 91:1998-2002.

**Pruneri** G, Fabris S, Dell'Orto P, Biasi MO, Valentini S, Del Curto B, Laszlo D, Cattaneo L, Fasani R, Rossini L, Manzotti M, Bertolini F, Martinelli G, Neri A, Viale G. The transactivating isoforms of p63 are

overexpressed in high-grade follicular lymphomas independent of the occurrence of p63 gene amplification. *J Pathol*. 2005 Jul;206(3):337-45.

## **R.**

**Ribeiro-Silva** A, Zamzelli Ramalho LN, Garcia SB, Zucoloto S. Is p63 reliable in detecting microinvasion in ductal carcinoma in situ of the breast? *Pathol Oncol Res*. 2003;9(1):20-3. Epub 2003 Apr 18.

**Rinne** T, Hamel B, van Bokhoven H, Brunner HG. Pattern of p63 mutations and their phenotypes--update. *Am J Med Genet A*. 2006 Jul 1;140(13):1396-406. Review.

**Rocco** JW, Leong CO, Kuperwasser N, DeYoung MP, Ellisen LW. p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* 2006; 9: 45-56.

**Ruptier** C, De Gaspéris A, Ansieau S, Granjon A, Tanière P, Lafosse I, Shi H, Petitjean A, Taranchon-Clermont E, Tribollet V, Voeltzel T, Scoazec JY, Maguer-Satta V, Puisieux A, Hainaut P, Cavard C, Caron de Fromental C. TP63 P2 promoter functional analysis identifies  $\beta$ -catenin as a key regulator of  $\Delta$ Np63 expression. *Oncogene*. 2011 Nov 17;30(46):4656-65. doi: 10.1038/onc.2011.171. Epub 2011 Jun 6.

**Rushing** EJ, Olsen C, Man YG. Correlation of p63 immunoreactivity with tumor grade in meningiomas. *Int J Surg Pathol*. 2008 Jan;16(1):38-42.

## **S.**

**Sasaki** Y, Negishi H, Idogawa M, Suzuki H, Mita H, Toyota M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T. Histone deacetylase inhibitor FK228 enhances adenovirus-mediated p53 family gene therapy in cancer models. *Mol Cancer Ther*. 2008 Apr;7(4):779-87

**Schmandt** RE, Iglesias DA, Co NN, Lu KH. Understanding obesity and endometrial cancer risk: opportunities for prevention. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 Dec;205(6):518-25. Epub 2011 Jun 7. Review.

**Seeber** LM, Zweemer RP, Marchionni L, Massuger LF, Smit VT, van Baal WM, Verheijen RH, van Diest PJ. Methylation profiles of endometrioid and serous endometrial cancers. *Endocr Relat Cancer*. 2010 Jun 25;17(3):663-73.

**Semczuk** A, Schneider-Stock R, Berbec H, Marzec B, Jakowicki JA, Roessner A. K-ras exon 2 point mutations in human endometrial cancer. *Cancer Lett*. 2001 Mar 26;164(2):207-12.

**Sifakis** S, Basel D, Ianakiev P, Kilpatrick M, Tsipouras P. Distal limb malformations: underlying mechanisms and clinical associations. *Clin Genet*. 2001 Sep;60(3):165-72. Review.

**Sivridis** E, Giatromanolaki A. The pathogenesis of endometrial carcinomas at menopause: facts and figures. *J Clin Pathol*. 2011 Jul;64(7):553-60. Epub 2011 Feb 17. Review.

**Soussi T**. The p53 tumour suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation in *Molecular Genetics of Cancer* (Cowell JK ed). Bios Scientific 1995; 135-178.

**Sturzbecher** HW, Deppert W. The tumor suppressor protein p53: relationship of structure to function. *Oncology Reports* 1994; 1:301-307.

## **T.**

**Toumi** AA, El Hadj Oel A, Ben Mahmoud LK, Ben Hmida Ael M, Chaar I, Gharbi L, Mzabi S, Bouraoui S. The prognostic value of p73 overexpression in colorectal carcinoma: a clinicopathologic, immunohistochemical, and statistical study of 204 patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010 Mar;18(2):128-36.

**Tannapfel** A, Wasner M, Krause K, Geissler F, Katalinic A, Hauss J, Mössner J, Engeland K, Wittekind C. Expression of p73 and its relation to histopathology and prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Jul 7;91(13):1154-8.

**Tschan** MP, Grob TJ, Peters UR, Laurenzi VD, Huegli B, Kreuzer KA, Schmidt CA, Melino G, Fey MF, Tobler A, Cajot JF. Enhanced p73

expression during differentiation and complex p73 isoforms in myeloid leukemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Oct 14;277(1):62-5.

## **U.**

**Uccella S**, Cha SS, Melton LJ 3rd, Bergstralh EJ, Boardman LA, Keeney GL, Podratz KC, Ciancio FF, Mariani A. Risk factors for developing multiple malignancies in patients with endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2011 Jul;21(5):896-901.

**Uramoto H**, Sugio K, Oyama T, Nakata S, Ono K, Nozoe T, Yasumoto K. Expression of the p53 family in lung cancer. *Anticancer Res.* 2006 May-Jun;26(3A):1785-90.

## **V.**

**Vikhanskaya F**, Marchini S, Marabese M, Galliera E, Broggin M. P73a overexpression is associated with resistance to treatment with DNA-damaging agents in a human ovarian cancer cell line. *Cancer Res.* 2001 Feb 1;61(3):935-8.

## **W.**

**Wu G**, Nomoto S, Hoque MO, Dracheva T, Osada M, Lee CC, Dong SM, Guo Z, Benoit N, Cohen Y, Rechthand P, Califano J, Moon CS, Ratovitski E, Jen J, Sidransky D, Trink B.  $\Delta$ Np63 $\alpha$  and TAp63 $\alpha$  regulate transcription of genes with distinct biological functions in cancer and development. *Cancer Res* 2003; 63(10):2351-2357

## **Y.**

**Yuan Y**, Zeng ZY, Liu XH, Gong DJ, Tao J, Cheng HZ, Huang SD. MicroRNA-203 inhibits cell proliferation by repressing  $\Delta$ Np63 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2011 Feb 7;11:57

**Yang A,** Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*. 1999 Apr 22;398(6729):714-8.

**Yang A,** Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, McKeon F, Caput D. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*. 2000 Mar 2;404(6773):99-103.

## **Z.**

**Zocchi L.,** Bourdon J C, Codispoti A, Knight R, Lane D P, Melino G, Terrinoni Scotin A: A new p63 target gene expressed during epidermal differentiation, *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 367: 271-6.