

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΡΕΝΑ ΛΥΜΠΟΥΡΙΔΟΥ**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ  
ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ *KRAS*, *HRAS* ΚΑΙ *NRAS*, ΤΩΝ  
ΓΟΝΙΔΙΩΝ *AKT*, ΚΑΘΩΣ ΕΠΙΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ p53 ΣΕ  
ΚΑΚΟΗΘΕΙΣ ΟΓΚΟΥΣ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011**

Στην μνήμη της θείας μου Ρούλας

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

**Επώνυμο:** Λυμπουρίδου  
**Όνομα:** Ρένα  
**Όνομα πατρός:** Ανδρέας  
**Ημερ. Γέννησης:** 4 Ιανουαρίου 1984  
**Τόπος Γέννησης:** Λευκωσία Κύπρου  
**Διεύθυνση:** Λεάνδρου 6B, Καϊμακλί, 1036, Λευκωσία, Κύπρος  
**Τηλέφωνο:** +30 6976840314  
**E-mail:** r1\_rena@hotmail.com

### Εκπαίδευση:

- 2001:** Απόφοιτος του Λυκείου Παλουριώτισσας (βαθμός:18<sup>6</sup>/11)
- 2001-2006:** Πτυχιούχος του τμήματος Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Κρήτης. Βαθμός πτυχίου: 6,71 (Λίαν καλώς)
- Πρακτική άσκηση:** Εργαστήριο Ιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Πτυχιακή εργασία:** Γενετικοί Πολυμορφισμοί που σχετίζονται με τη σχιζοφρένια, Εργαστήριο Ιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Υπεύθυνοι: Δ.Α Σπαντίδος, Γ. Σουρβίνος
- 2006-2011:** Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής, Εργαστήριο Ιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης,  
Επιβλέπων καθηγητής Δ.Α Σπαντίδος με θέμα: “Προσδιορισμός γενετικών αλλοιώσεων και μελέτη της έκφρασης των ογκογονιδίων *K-ras*, *H-ras* και *N-ras*, του γονιδίου *Akt* καθώς επίσης και της πρωτεΐνης p53 σε κακοήθεις όγκου του εγκεφάλου”.
- 2008-2011:** Τεχνικός ερευνητικών πρωτοκόλλων, Εργαστήριο Φυσιολογίας, Αναπνευστικού συστήματος, Υπεύθυνοι: Δρ. Κατερίνα Αντωνίου, Δρ. Νικόλαος Σιαφάκας

## Δημοσιεύσεις:

1. Down-regulation of K-ras and H-ras in human brain gliomas. **Lymbouridou R**, Soufla G, Chatzinikola AM, Vakis A, Spandidos DA. Eur J Cancer. 2009
2. Differential mRNA expression of *Akt* family genes, *SDF1* and *CXCR4* in human brain gliomas. Tissue-pair analysis reveals the molecular profile of brain tumors. **Rena Lymbouridou**, Giannoula Soufla, Anthoula M. Chatzinikola, Antonios Vakis and Demetrios A. Spandidos. J Neurosurg (submitted)
3. Detection of polyomaviruses in brain tumors with the use of a highly sensitive semi-nested Real-time PCR method. Anthoula Hatzinikola, Giannoula Soufla, **Rena Lymbouridou**, Antonis Vakis and Demetrios A. Spandidos. Journal of Med Virol (submitted)
4. Expression analysis of angiogenic growth factors and biological axis CXCL12/CXCR4 axis in idiopathic pulmonary fibrosis. Antoniou KM, Soufla G, **Lymbouridou R**, Economidou F, Lasithiotaki I, Manousakis M, Drositis I, Spandidos DA, Siafakas NM. Connect Tissue Res. 2010
5. Role of VEGF-stromal cell-derived factor-1alpha/CXCL12 axis in pleural effusion of lung cancer. Economidou F, Antoniou KM, Soufla G, Lasithiotaki I, Karagiannis K, **Lymbouridou R**, Proklou A, Spandidos DA, Siafakas NM. J Recept Signal Transduct Res. 2010
6. Different activity of the biological axis VEGF-Flt-1 (fms-like tyrosine kinase 1) and CXC chemokines between pulmonary sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis: a bronchoalveolar lavage study. Antoniou KM, Soufla G, Proklou A, Margaritopoulos G, Choulaki C, **Lymbouridou R**, Samara KD, Spandidos DA, Siafakas NM. Clin Dev Immunol. 2009
7. Expression analysis of Akt and MAPK signaling pathways in lung tissue of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Antoniou KM, Margaritopoulos GA,

Soufla G, Symvoulakis E, Vassalou E, **Lymbouridou R**, Samara KD, Kappou D, Spandidos DA, Siafakas NM. J Recept Signal Transduct Res. 2010

8. Investigation of Toll-like receptors in the pathogenesis of fibrotic and granulomatous disorders: a bronchoalveolar lavage study. Margaritopoulos GA, Antoniou KM, Karagiannis K, Samara KD, Lasithiotaki I, Vassalou E, **Lymbouridou R**, Koutala H, Siafakas NM. Fibrogenesis Tissue Repair. 2010

### **Βραβεία:**

1. 1<sup>ο</sup> Βραβείο: Ετήσιο βραβείο "I. ΒΑΜΒΑΣ" για την εργασία: “Ανίχνευση πολυόμων BK και JC σε διάφορους τύπους όγκων εγκεφάλου και σε φυσιολογικό εγκεφαλικό παρέγχυμα με την μέθοδο της real time PCR”. **Ρένα Λυμπουρίδου**, Γιαννούλα Σούφλα, Ανθούλα Μ. Χατζηνικόλα, Αντώνιος Βάκης και Δημήτριος Α. Σπαντίδος. 23ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής, Αλεξανδρούπολη, 2009
2. 1<sup>ο</sup> Βραβείο αναρτημένης εργασίας: “ Έκφραση των Toll-like receptors στις ινωτικές ιδιοπαθείς διάμεσες πνευμονοπάθειες: προκαταρκτικά αποτελέσματα”. Κ. Καραγιάννης, Κ. Αντωνίου, Γ. Μαργαριτόπουλος, Φ. Οικονομίδου, Ε. Κουταλά, Ι. Λασιθιωτάκη, Α. Πρόκλου, **P. Λυμπουρίδου**, Δ. Μωραϊτάκη, Ν Σιαφάκας. 18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Θεσσαλονίκη 2009
3. 2<sup>ο</sup> Βραβείο: “ Διερεύνηση του βιολογικού άξονα CXCR4/stromal cell-derived factor 1a (SDF-1a) στα μεσεγχυματικά κύτταρα μυελού των οστών σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και διάμεση πνευμονική συμμετοχή (RA-ILD)”. Κ. Αντωνίου, Α. Πρόκλου, Κ. Καραγιάννης, **P. Λυμπουρίδου**, Ε. Βασσάλου, Ι. Λασιθιωτάκη, Μ. Καστρινάκη, Ν. Τζανάκης, Δ. Σπαντίδος, Ε. Παπαδάκη, Ν. Σιαφάκας. 18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Θεσσαλονίκη 2009

### **Γραπτές ανακοινώσεις σε συνέδρια:**

1. Υποέκφραση των γονιδίων *K-ras* και *H-ras* σε ανθρώπινα γλοιώματα. **Ρένα Λυμπουρίδου**, Γιαννούλα Σούφλα, Ανθούλα Μ. Χατζηνικόλα, Αντώνιος Βάκης και Δημήτριος Α. Σπαντίδος. “23ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευροχειρουργικής”, Αλεξανδρούπολη, 2009
2. mRNA expression profile of *Akt* family genes, *SDF1* and *CXCR4* in human brain gliomas. **Rena Lymbouridou**, Giannoula Soufla, Anthoula M. Chatzinikola, Antonios Vakis and Demetrios A. Spandidos. 15th World Congress on Advances in Oncology Hersonissos, Crete, Greece, 2010
3. Differential Activity of the biological axis VEGF-Flt- between granulomatous and fibrotic disorders:a bronchial veolarlavage fluid. Antoniou K.M, Soufla G., Proklou A., Samara K., **Lymbouridou R.**, Economidou F., Choulaki C., Spandidos D.A., Siafakas N.M. “13th World Congress on Advances in Oncology”, Hersonissos, Crete, Greece, 2008
4. Impaired VEGF receptor-1, FLT-1 expression in bronchoalveolar lavage fluid in patients with pulmonary sarcoidosis. Economidou F., Antoniou K.M, Soufla G, Proklou A, Samara K, Choulaki C, **Lymbouridou R**, Siafakas NM. 9th WASOG Meeting & 11th Bal International Conference, 2008, Athens, Greece

### **Οργανωτική δραστηριότητα-Μέλος οργανωτικής επιτροπής:**

1. “12th World Congress on Advances in Oncology” και “10th International Symposium on Molecular Medicine”, Hersonissos, Crete, Greece, 2007
2. “13th World Congress on Advances in Oncology” και “11th International Symposium on Molecular Medicine”, Hersonissos, Crete, Greece, 2008
3. “14th World Congress on Advances in Oncology” και “12th International Symposium on Molecular Medicine”, Hersonissos, Crete, Greece, 2009

4. “15th World Congress on Advances in Oncology” και “13th International Symposium on Molecular Medicine”, Hersonissos, Crete, Greece, 2010
5. Ανοιχτή δημόσια συζήτηση με θέμα: “ Ηλεκτρομαγνητική ρύπανση και οι βλαπτικές επιδράσεις της στον ανθρώπινο εγκέφαλο”. Νευροχειρουργική Κλινική ΠΑΓΝΗ, Πειραματικό Γυμνάσιο Ηρακλείου, Γυμνάσιο Θραψανού, Ροδίων Παιδεία, Ηράκλειο Κρήτης, Οκτώβριος 2009

#### **Παρακολούθηση συνεδρίων:**

1. “Brain Plasticity: From Molecules to Behavior”, Foundation for Research and Technology Hellas in Heraklion, Crete, July 2006
2. 8<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο της ομάδας Έρευνας Συνδετικού Ιστού και Εξωκυττάριου Χώρου της Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Απρίλιος 2006, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

#### **Ξένες γλώσσες:**

- Αγγλική Γλώσσα: - G.C.E (General Certificate of Education), (O Level):  
Grade: A
- Γαλλική Γλώσσα: - D.E.L.F (Diplome d'Etudes En Langue Francaise)  
(A1, A2, A3, A4)
- G.C.E (General Certificate of Education), (O Level):  
Grade: A

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική διατριβή μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους με βοήθησαν στην πραγματοποίησή της 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, Επ. Καθηγητή κ. Α. Βάκη για τις συμβουλές, αλλά και για την ηθική και υλική υποστήριξη που μου παρείχε, καθώς επίσης και τον Επ. Καθηγητή κ. Γ. Σουρβίνο για το ενδιαφέρον του. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, Καθηγητές κ. Γ. Σαμώνη, κ. Ο. Ζώρα, Αναπλ. Καθηγητή κ. Α. Ηλιόπουλο και Επ. Καθηγήτρια κ. Μ. Τζαρδή, 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 την κ. Γιάννα Σούφλα για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια της διατριβής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη φίλη και συνεργάτιδα κ. Ανθούλα Χατζηνικόλα για τη βοήθεια και ενδιαφέρον που επέδειξε για την διατριβή μου, καθώς και για την άμογη συνεργασία που είχαμε. Δεν θα παρέλειπα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους μου και ιδιαίτερα τους: Τζοάννα, Βαγγέλη, Χρύσα, Έλενα, Κώστα, Ισμήνη και Εύη, για την υποστήριξη και τη συμπαράστασή τους, όλο αυτό το διάστημα.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου, τους γονείς μου Ανδρέα και Εύη και την αδερφή μου Ράνια, για την αμέριστη αγάπη, βοήθεια, κατανόηση και πρακτική υποστήριξη τους, όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι όγκοι στον εγκέφαλο ορίζονται ως μια ενδοκρανιακή μάζα ανεξέλεγκτα αναπτυσσόμενων κυττάρων, τα οποία είτε βρίσκονται φυσιολογικά στον εγκέφαλο όπως νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα (πρωτογενείς όγκοι εγκεφάλου) είτε είναι μεταστατικά κύτταρα που προέρχονται από άλλα όργανα (δευτερογενείς ή μεταστατικοί όγκοι). Οι περισσότερο συχνοί σε εμφάνιση τύποι κακοήθων όγκων του εγκεφάλου είναι τα γλοιοβλαστώματα και τα μηνιγγιώματα. Αν και η αιτιολογία των κακοήθων όγκων του εγκεφάλου είναι άγνωστη, έχουν βρεθεί διάφορα γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των όγκων, μερικά από τα οποία είναι τα γονίδια *Ras*, *Akt* και το *p53*, τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Σκοπός αυτής της διατριβής ήταν η εκτίμηση της μοριακής παθογένεσης των όγκων του εγκεφάλου. Για το λόγο αυτό, μελετήσαμε την έκφραση σε επίπεδο mRNA των γονιδίων *Ras*, *Akt*, *SDF-1*, *CXCR4* και *p53* με τη μέθοδο της RT-PCR σε δείγματα γλοιομάτων και μηνιγγιωμάτων, καθώς και σε παρακείμενο φυσιολογικό ιστό από τους ίδιους ασθενείς και συσχετίστηκαν με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων. Επίσης, εξετάστηκαν τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της Ras-p21 και συσχετίστηκαν με την έκφραση σε επίπεδο mRNA και έγινε προσπάθεια προσδιορισμού πιθανών γενετικών αλλοιώσεων υπό μορφή μεταλλαγών στα γονίδια *Ras* και *p53*. Στόχος της μελέτης ήταν: α) να ταυτοποιηθεί το προφίλ έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων για να διευκρινιστεί ο ρόλος τους στην κακοήθη εξαλλαγή και εξέλιξη των όγκων του εγκεφάλου, β) να ελεγχθεί η πιθανότητα χρήσης του μοριακού προτύπου έκφρασης των γονιδίων αυτών ως μοριακού δείκτη για τη διάγνωση των εν λόγω κακοηθειών σε πρώιμα στάδια.

Τα αποτελέσματα της μελέτης στα γλοιώματα έδειξαν ότι τα μεταγραφικά επίπεδα του *Kras* είναι αυξημένα στα φυσιολογικά δείγματα, σε σχέση με τα γλοιοβλαστώματα, αναπλαστικά και ιώδη αστροκυτώματα, ενώ τα επίπεδα mRNA του *Hras* είναι αυξημένα στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με τα γλοιοβλαστώματα. Η πρωτεΐνη Ras-p21 δεν ανιχνεύτηκε στα γλοιώματα. Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων χαρακτηρίζεται κυρίως από υποέκφραση στις τρεις ομάδες δειγμάτων. Σε επίπεδο DNA, δεν ανιχνεύτηκε η GGT→GTT (Gly12Val) μεταλλαγή σε κανένα δείγμα για την οικογένεια των *Ras* γονιδίων. Στην οικογένεια των γονιδίων *Akt*, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του *Akt-3* στα φυσιολογικά δείγματα σε σχέση με τα γλοιοβλαστώματα, ενώ τα επίπεδα mRNA των *Akt-1* και *Akt-2*, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Το πρότυπο έκφρασης σε κάθε γονίδιο, έδειξε ότι το *Akt-1* είχε κυρίως κανονική έκφραση, ενώ το *Akt-3* υποέκφραση, στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων. Τα γονίδια *SDF-1α* και *CXCR4* παρουσίασαν υπερέκφραση σε μεγαλύτερο ποσοστό δειγμάτων συγκριτικά με κανονική έκφραση και υποέκφραση στα γλοιοβλαστώματα. Τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου *p53*, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά, ανάμεσα στις ομάδες των δειγμάτων. Η μέθοδος αλληλούχισης δεν ανίχνευσε τη μεταλλαγή CGT→TGT (Arg273Cys) του *p53* γονιδίου σε κανένα από τα δείγματα μας. Η ανάλυση κατά Kaplan-Meier στην ομάδα των πολύμορφων γλοιοβλαστωμάτων έδειξαν ότι ασθενείς που υπερέκφραζαν το εν λόγω γονίδιο, είχαν μικρότερη επιβίωση συγκριτικά με τους ασθενείς που το εξέφραζαν σε φυσιολογικά επίπεδα.

Στην ομάδα των μηνιγγιωμάτων τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *Kras*, *Nras*, *Akt-2* και *p53* είναι αυξημένα σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Η μεταλλαγή GGT→GTT (Gly12Val) στα γονίδια *Ras* και η μεταλλαγή CGT→TGT (Arg273Cys) του γονιδίου *p53*, δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα δείγματα μας.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μας σε δείγματα γλοιωμάτων και μηνιγγιωμάτων, διαπιστώθηκε ότι φαίνεται να κυριαρχούν διαφορετικοί μηχανισμοί ενεργοποίησης που συνοδεύουν την κακοήθη εξαλλαγή σε κάθε τύπο καρκίνου.

## ABSTRACT

Brain tumors are intracranial solid neoplasms of abnormal grown cells, which are created either in the brain itself e.g. from neurons and glial cells (primary brain tumors) or spread from cancers primarily located in other organs (metastatic tumors). The most common brain tumors are glioblastomas and meningiomas. Even though the etiology of the formation of malignant brain tumors is still unknown, a number of genes implicated in the formation and development of tumors, has been found. Some of these genes such as the *Ras*, *Akt* and *p53* genes have been investigated in this study.

The purpose of the present study is to evaluate the molecular mechanisms which are involved in brain carcinogenesis. Therefore, we evaluated the mRNA expression of *Ras*, *Akt*, *SDF-1*, *CXCR4* and *p53* genes by RT-PCR in gliomas and meningiomas tissue samples and in adjacent normal specimens, derived from the same patients. The results were then correlated with the clinicopathological characteristics and survival data of the patients. Furthermore we evaluated the protein levels of Ras-p21 and we examined the correlation with their mRNA expression levels. We also examined the presence of activating mutations of the three *Ras* genes and *p53*. Our goals were: a) to determine the expression profile of the genes of interest to specify their role in malignant transformation of brain cells, b) to examine the possibility of using the expression profile of these genes as a molecular marker for the diagnosis of these malignancies in early stages.

Our results show increased *Kras* transcript levels in normal samples, compared to glioblastomas, anaplastic and fibrillary astrocytomas, while increased *Hras* mRNA levels were observed in normal specimens compared to glioblastomas samples. Western blot analysis did not result in detectable levels of Ras-p21 protein in our samples. The expression profile of these genes is characterized mainly by underexpression in the three sample groups. Sequencing analysis did not detect the GGT->GTT (Gly12Val) mutation in codon 12 of the three *Ras* genes, in any of our samples. In *Akt* family genes, increased *Akt-3* mRNA expression in normal samples compared to glioblastomas was observed, while *Akt-1* and *Akt-2* transcript levels did not show statistical differences between normal and tumor samples. The expression profile of *Akt-1* and *Akt-3* was characterized mainly by normal expression and underexpression, respectively. *SDF-1 $\alpha$*  and *CXCR4* genes were mainly overexpressed in glioblastomas. *P53* transcript levels did not show any statistical difference between the sample groups. Sequencing analysis did not detect the CGT→TGT (Arg273Cys) of the *p53* gene, in any of our samples. Kaplan-Meier survival analysis in glioblastomas revealed that patients who overexpressed *p53* gene, had decreased survival compared to those that normally expressed it. In meningiomas, *Kras*, *Nras*, *Akt-2* και *p53* transcript levels were increased compared to normal tissues. The GGT→GTT (Gly12Val) mutation in *Ras* genes was not detected in any of our samples. In *Akt* family genes, meningiomas were found to have elevated *Akt-2* mRNA levels compared to normal samples. The GGT→GTT (Gly12Val) mutation in *Ras* genes and the CGT→TGT (Arg273Cys) mutation of the *p53* gene were not detected in any of our samples.

Our results in gliomas and meningiomas indicate that different activation mechanisms prevail in malignant transformation of brain cells in each type of cancer.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	i
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	vi
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	vii
ABSTRACT	ix
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	x

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>Σελίδα</b>
-----------------	---------------

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

#### 1. ΟΓΚΟΙ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ

1.1 Γενικά	1
1.2 Γλοιώματα	3
1.3 Μηνιγγιώματα	6

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

#### 2. ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

2.1 Ογκογονίδια	8
2.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια	9

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

#### 3. ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ RAS

3.1 Γενικά	12
3.2 Δομή των γονιδίων <i>Ras</i>	13
3.3 Η πρωτεΐνη RAS-p21	13
3.4 Μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης p21	15
3.5 Ενεργοποίηση των γονιδίων <i>Ras</i>	19
3.6 Μεταλλαγές των γονιδίων <i>Ras</i>	20
3.7 Ογκοκατασταλτική δράση των <i>Ras</i> και συνεισφορά στην απόπτωση	21
3.8 <i>Ras</i> γονίδια και όγκοι εγκεφάλου	22

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

### **4. ΓΟΝΙΔΙΑ AKT**

4.1 Γενικά	23
4.2 Δομή PKB	24
4.3 Ενεργοποίηση της PKB	25
4.4 Ρόλος PKB στον καρκίνο	27
4.5 Διαφορετικός ρόλος PKB ισομορφών	29
4.6 Γενετικές αλλοιώσεις του Akt μονοπατιού στον καρκίνο	30

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

### **5. ΑΞΟΝΑΣ SDF-1/CXCR4**

5.1 Γενικά	31
5.2 Ισομορφές SDF-1	31
5.3 Μηχανισμοί ρύθμισης της ενεργότητας της SDF-1 πρωτεΐνης	33
5.4 SDF-1/CXCR4 και καρκίνος	33
5.5 SDF-1/CXCR4 και όγκοι εγκεφάλου	34

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6**

### **6. ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *p53***

6.1 Γενικά	35
6.2 Δομή του γονιδίου <i>p53</i>	36
6.3 Δομή της πρωτεΐνης <i>p53</i>	36
6.4 Λειτουργίες του <i>p53</i>	37
6.5 Μετα-μεταφραστικές και μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις	40
6.6 Ρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης <i>p53</i>	43
6.7 Μεταλλαγές της <i>p53</i>	43
6.8 <i>p53</i> και όγκοι εγκεφάλου	44

<b>ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ</b>	<b>46</b>
--------------------------------------	-----------

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7**

### **ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **7.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ**

- 7.1.1 Συλλογή δειγμάτων όγκων εγκεφάλου 48
- 7.1.2 Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων 48

#### **7. 2. ΜΕΘΟΔΟΙ**

##### **A. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

- 7.2.1 Απομόνωση ολικού RNA από τους ιστούς 50
- 7.2.2 Απομόνωση ολικού DNA από τους ιστούς 50
- 7.2.3 Προσδιορισμός της ποσότητας και καθαρότητας του RNA και DNA 51
- 7.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) 51
- 7.2.5 Αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) 52
- 7.2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) 52
- 7.2.7 Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικού τμήματος (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 54
- 7.2.8 Αλληλούχιση (Sequencing) 55
- 7.2.9 Χρώση με Βρωμιούχο αιθίδιο 55

##### **B. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

- 7.2.10 Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης από συμπαγείς ιστούς 56
- 7.2.11 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford 56
- 7.2.12 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των πρωτεϊνών 57
- 7.2.13 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western Blot analysis) 57

##### **Γ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

- 7.2.14 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων 58

#### **7.3 ΥΛΙΚΑ**

- 7.3.1 Διαλύματα 59
- 7.3.2 Υλικά και εταιρείες προέλευσης 60

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΑ ΓΛΟΙΩΜΑΤΑ

#### 8.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ *RAS*

8.1.1 Ανίχνευση μεταλλαγών στα γονίδια <i>Ras</i>	62
8.1.2 Ομαδοποίηση σε φυσιολογικά-παθολογικά δείγματα	63
8.1.2.A Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων <i>Ras</i> σε δείγματα όγκων εγκεφάλου	63
8.1.2.B Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) των γονιδίων <i>Ras</i> , σε δείγματα όγκων εγκεφάλου	65
8.1.2.Γ Ανάλυση συνέκφρασης των επιπέδων mRNA των γονιδίων <i>Ras</i>	67
8.1.3 Ομαδοποίηση ανά ζεύγη δειγμάτων (καρκινικός-φυσιολογικός ιστός από τον ίδιο ασθενή)	68
8.1.3.A Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) των γονιδίων <i>Ras</i> , στα ζεύγη δειγμάτων	68
8.1.3.B Ανάλυση συνέκφρασης των επιπέδων mRNA των γονιδίων <i>Ras</i> στα ζεύγη δειγμάτων	69
8.1.4 Ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier (Kaplan-Meiers Survival Analysis)	69
8.1.5.E Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα δείγματα όγκων εγκεφάλου, σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων	70
8.1.6 Μελέτη έκφρασης της πρωτεΐνης Ras-p21 στα γλοιώματα	70

#### 8.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ *AKT*, *SDF-1* ΚΑΙ *CXCR4*

8.2.1 Ομαδοποίηση σε φυσιολογικά-παθολογικά δείγματα	71
8.2.1.A Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων <i>Akt-1</i> , <i>Akt-2</i> , <i>Akt-3</i> , <i>SDF-1α</i> , <i>SDF-1β</i> και <i>CXCR4</i> σε γλοιώματα	71
8.2.1.B Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) των γονιδίων <i>Akt-1</i> , <i>Akt-2</i> , <i>Akt-3</i> , <i>SDF-1α</i> , <i>SDF-1β</i> και <i>CXCR4</i> , σε δείγματα όγκων εγκεφάλου	72
8.2.1.Γ Ανάλυση συνέκφρασης των επιπέδων mRNA των γονιδίων <i>Akt-1</i> , <i>Akt-2</i> , <i>Akt-3</i> , <i>SDF-1α</i> , <i>SDF-1β</i> και <i>CXCR4</i>	74
8.2.2 Ομαδοποίηση ανά ζεύγη δειγμάτων (καρκινικός-φυσιολογικός ιστός από τον ίδιο ασθενή)	77

8.2.2.A Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) των γονιδίων <i>Akt-1</i> , <i>Akt-2</i> , <i>Akt-3</i> , <i>SDF-1α</i> , <i>SDF-1β</i> και <i>CXCR4</i> στα ζεύγη δειγμάτων	77
8.2.2.B Ανάλυση συνέκφρασης των επιπέδων mRNA των γονιδίων <i>Akt-1</i> , <i>Akt-2</i> , <i>Akt-3</i> , <i>SDF-1α</i> , <i>SDF-1β</i> και <i>CXCR4</i> στα ζεύγη δειγμάτων	78
8.2.3 Ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier (Kaplan-Meiers Survival Analysis)	79
8.2.4 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα δείγματα όγκων εγκεφάλου, σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων	79

### **8.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *p53***

8.3.1 Ανίχνευση μεταλλαγών στο γονίδιο <i>p53</i>	80
8.3.2 Ομαδοποίηση σε φυσιολογικά-παθολογικά δείγματα	80
8.3.2.A Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA του γονιδίου <i>p53</i> σε δείγματα όγκων εγκεφάλου	80
8.3.2.B Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) του γονιδίου <i>p53</i> σε δείγματα όγκων εγκεφάλου	81
8.3.2.Γ Ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier (Kaplan-Meiers Survival Analysis)	82
8.3.3 Ομαδοποίηση ανά ζεύγη δειγμάτων (καρκινικός-φυσιολογικός ιστός από τον ίδιο ασθενή)	83
8.3.3.A Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) του γονιδίου <i>p53</i> στα ζεύγη δειγμάτων	83
8.3.3.B Ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier (Kaplan-Meiers Survival Analysis)	83
8.3.3.Γ Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του <i>p53</i> στα δείγματα όγκων εγκεφάλου, σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων	84

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9**

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΑ ΜΗΝΙΓΓΙΩΜΑΤΑ**

#### **9.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ RAS**

9.1.1 Ανίχνευση μεταλλαγών στα γονίδια <i>Ras</i>	85
9.1.2 Ομαδοποίηση σε φυσιολογικά-παθολογικά δείγματα	86
9.1.2.A Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων <i>Ras</i> σε δείγματα	86

όγκων εγκεφάλου	
9.1.2.B Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) των γονιδίων <i>Ras</i> , στα μηνιγγιώματα	88
9.1.2.Γ Ανάλυση συνέκφρασης των επιπέδων mRNA των γονιδίων <i>Ras</i>	89
9.1.3 Ομαδοποίηση ανά ζεύγη δειγμάτων (καρκινικός-φυσιολογικός ιστός από τον ίδιο ασθενή)	90
9.1.3.A Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) των γονιδίων <i>Ras</i> , στα ζεύγη δειγμάτων	90

## **9.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ *AKT*, *SDF-1* ΚΑΙ *CXCR4***

9.2.1 Ομαδοποίηση σε φυσιολογικά-παθολογικά δείγματα	91
9.2.1.A Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων <i>Akt-1</i> , <i>Akt-2</i> , <i>Akt-3</i> , <i>SDF-1α</i> , <i>SDF-1β</i> και <i>CXCR4</i> στα μηνιγγιώματα	91
9.2.1.B Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) των γονιδίων <i>Akt-1</i> , <i>Akt-2</i> , <i>Akt-3</i> , <i>SDF-1α</i> , <i>SDF-1β</i> και <i>CXCR4</i> , στα μηνιγγιώματα	92
9.2.1.Γ Ανάλυση συνέκφρασης των επιπέδων mRNA των γονιδίων <i>Akt-1</i> , <i>Akt-2</i> , <i>Akt-3</i> , <i>SDF-1α</i> , <i>SDF-1β</i> και <i>CXCR4</i>	93
9.2.2 Ομαδοποίηση ανά ζεύγη δειγμάτων (καρκινικός-φυσιολογικός ιστός από τον ίδιο ασθενή)	94
9.2.2.A Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) των γονιδίων <i>Akt-1</i> , <i>Akt-2</i> , <i>Akt-3</i> , <i>SDF-1α</i> , <i>SDF-1β</i> και <i>CXCR4</i> στα ζεύγη μηνιγγιωμάτων	94

## **9.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *p53***

9.3.1 Ανίχνευση μεταλλαγών στο γονίδιο <i>p53</i>	95
9.3.2 Ομαδοποίηση σε φυσιολογικά-παθολογικά δείγματα	95
9.3.2.A Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA του γονιδίου <i>p53</i>	95
9.3.2.B Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) του γονιδίου <i>p53</i> , στα μηνιγγιώματα	96
9.3.3 Ομαδοποίηση ανά ζεύγη δειγμάτων (καρκινικός-φυσιολογικός ιστός από τον ίδιο ασθενή)	97

9.3.3.A Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, 97  
υποέκφραση) του γονιδίου *p53* στα ζεύγη μηγγιωμάτων

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10**

### **ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΑ ΓΛΟΙΩΜΑΤΑ**

#### **10.1 Ογκογονίδια Ras**

10.1.1 Συζήτηση των αποτελεσμάτων της ομαδοποίησης σε φυσιολογικά- 99  
παθολογικά δείγματα

10.1.1.A Συζήτηση των αποτελεσμάτων για την ανίχνευση μεταλλαγών στα 99  
γονίδια *Ras*

10.1.1.B Συζήτηση των αποτελεσμάτων των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης, 99  
καθώς και της ανάλυσης συνέκφρασης στα γονίδια *Ras* στα γλοιώματα

10.1.1.Γ Συζήτηση των αποτελεσμάτων του προτύπου έκφρασης των γονιδίων 100  
*Ras* στα γλοιώματα

10.1.2 Συζήτηση των αποτελεσμάτων της ομαδοποίησης ανά ζεύγη δειγμάτων 100

10.1.3 Συζήτηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης επιβίωσης κατά Kaplan- 101  
Meier και της σύγκρισης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα δείγματα  
όγκων εγκεφάλου, σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των  
δειγμάτων, στις δύο μεθόδους ανάλυσης

#### **10.2 Άξονας AKT/CXCR4**

10.2.1 Συζήτηση των αποτελεσμάτων της ομαδοποίησης σε φυσιολογικά- 103  
παθολογικά δείγματα

10.2.1.A Συζήτηση των αποτελεσμάτων των μεταγραφικών επιπέδων και του 103  
προτύπου έκφρασης των γονιδίων *Akt-1*, *Akt-2*, *Akt-3*, *SDF-1α*, *SDF-1β* και  
*CXCR4* στα γλοιώματα

10.2.1.B Συζήτηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης συνέκφρασης των 104  
μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *Akt-1*, *Akt-2*, *Akt-3*, *SDF-1α*, *SDF-1β* και  
*CXCR4*

10.2.1.Γ Συζήτηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης επιβίωσης κατά Kaplan- 104  
Meier

10.2.1.Δ Συζήτηση των αποτελεσμάτων της σύγκρισης των επιπέδων έκφρασης 105  
των γονιδίων στα δείγματα όγκων εγκεφάλου, σε σχέση με τα

κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων	
10.2.2 Συζήτηση των αποτελεσμάτων της ομαδοποίησης ανά ζεύγη δειγμάτων	105

### **10.3 Γονίδιο p53**

10.3.1 Συζήτηση των αποτελεσμάτων των μεταγραφικών επιπέδων, του προτύπου έκφρασης και της ανάλυσης επιβίωσης κατά Kaplan-Meier	107
---	-----

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11**

### **ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΑ ΜΗΝΙΓΓΙΩΜΑΤΑ**

#### **11.1 Ογκογονίδια *Ras***

11.1.1 Συζήτηση των αποτελεσμάτων για την ανίχνευση μεταλλαγών στα γονίδια <i>Ras</i>	109
---	-----

11.1.2 Συζήτηση των αποτελεσμάτων των επιπέδων mRNA, του προτύπου έκφρασης καθώς και της ανάλυσης συνέκφρασης στα γονίδια <i>Ras</i> στα μηνιγγιώματα	110
---	-----

#### **11.2 Άξονας AKT/CXCR4**

11.2.1 Συζήτηση των αποτελεσμάτων των μεταγραφικών επιπέδων και του προτύπου έκφρασης των γονιδίων <i>Akt-1</i> , <i>Akt-2</i> , <i>Akt-3</i> , <i>SDF-1α</i> , <i>SDF-1β</i> και <i>CXCR4</i> στα μηνιγγιώματα	111
---	-----

#### **11.3 Γονίδιο p53**

11.3.1 Συζήτηση των αποτελεσμάτων των μεταγραφικών επιπέδων και του προτύπου έκφρασης του γονιδίου στα μηνιγγιώματα	113
---	-----

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### ΟΓΚΟΙ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ

#### 1.1 Γενικά

Οι διάφοροι τύποι κακοηθών όγκων εγκεφάλου έχουν μελετηθεί σχετικά λιγότερο από τους υπόλοιπους όγκους τους ανθρωπίνου σώματος. Οι περισσότεροι συχνόι σε εμφάνιση είναι τα γλοιοβλαστώματα και τα αστροκυττώματα (1). Γενικά οι όγκοι εγκεφάλου περιορίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και σπάνια εμφανίζουν μεταστάσεις, σε αντίθεση με άλλους κακοήθεις όγκους (2).

Ο όρος διαφοροποίηση του νεοπλασματικού κυττάρου, θεωρείται ο βαθμός ομοιότητας του με το φυσιολογικό από το οποίο προέρχεται, μορφολογικά και λειτουργικά. Ο βαθμός αυτός είναι αντιστρόφως ανάλογος με το ρυθμό πολλαπλασιασμού του κυττάρου. Δηλαδή, τα καλοήθη νεοπλάσματα είναι συνήθως καλά διαφοροποιημένα, ενώ τα κακοήθη παρουσιάζουν ευρύ φάσμα διαφοροποίησης, όπως επίσης αναπλασία (δομική και λειτουργική παλινδρόμηση των κυττάρων) και κυτταρικά ατυπία (ποικιλομορφία μεγέθους και σχήματος των κυττάρων).

Οι όγκοι εγκεφάλου με βάση τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους κατατάσσονται σε 10 κατηγορίες:

1. Όγκοι από νευροεπιθηλιακό ιστό
2. Όγκοι των κρανιακών και ωτιαίων νεύρων
3. Όγκοι των μηνίγγων
4. Λεμφώματα και αιμοποιητικά νεοπλάσματα
5. Βλαστοκυτταρικοί όγκοι
6. Κύστεις και ογκόμορφες βλάβες
7. Όγκοι περιοχής εφίππιου
8. Τοπικές επεκτάσεις περιφερικών όγκων
9. Μεταστατικοί όγκοι
10. Αταξινόμητοι όγκοι

Οι όγκοι από νευροεπιθηλιακό ιστό χωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

1. Αστροκυτταρικοί όγκοι
2. Ολιγοδενδρογλοιακοί όγκοι
3. Επενδυματικοί όγκοι
4. Μικτά γλοιώματα
5. Όγκοι χοριοειδών πλεγμάτων
6. Όγκοι ασαφούς προέλευσης
7. Νευρωνικοί και μικτοί νευρογλοιακοί όγκοι
8. Επιφυσιακοί όγκοι
9. Εμβρυικοί όγκοι

Οι αστροκυτταρικοί όγκοι οι οποίοι αποτελούν το 60% όλων των πρωτογενών όγκων εγκεφάλου, και ανάλογα με το βαθμό κακοήθειας, σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας, WHO, χωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

1. Πιλοκυτταρικό αστροκύττωμα (βαθμός κακοήθειας I)
2. Υποεπενδυματικό γιγαντοκυτταρικό αστροκύττωμα (οζώδης σκλήρυνση) (βαθμός κακοήθειας I)
3. Αστροκύττωμα (βαθμός κακοήθειας II)
  - 3.1 Ινώδες
  - 3.2 Πρωτοπλασματικό
  - 3.3 Γεμιστοκυτταρικό
4. Πλιομορφικό ξανθοαστροκύττωμα (βαθμός κακοήθειας II ή III)
5. Αναπλαστικό αστροκύττωμα (βαθμός κακοήθειας III)
6. Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (βαθμός κακοήθειας IV)
  - 6.1 Γιγαντοκυτταρικό γλοιοβλάστωμα
  - 6.2 Γλοιοσάρκωμα

Τα δείγματα της παρούσας διατριβής ανήκουν στις κατηγορίες των ινωδών αστροκυττωμάτων, των αναπλαστικών αστροκυττωμάτων και των γλοιοβλαστωμάτων και αναφέρονται γενικά ως γλοιώματα.

Η άλλη κατηγορία όγκων που μελετήθηκε στη συγκεκριμένη διατριβή είναι οι όγκοι των μηνίγγων (μηνιγγιώματα), οι οποίοι κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

1. Όγκοι από μηνιγοθηλιακά κύτταρα
2. Μεσεγχυματικοί όγκοι
3. Πρωτογενείς μελανοκυτταρικές βλάβες
4. Όγκοι μη καθορισμένης ιστογένεσης

Τα ολιγοδενδρογλοιώματα είναι όγκοι βαθμού κακοήθειας II και III, οι οποίοι αποτελούνται από καλά διαφοροποιημένα κύτταρα και μοιάζουν μορφολογικά με τα ολιγοδενδροκύτταρα (3). Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η συχνότητα εμφάνισης τους από 5% σε 25% ανάμεσα στους όγκους της γλοίας. Αυτό είναι λόγω της λανθασμένης κατάταξης μερικών τύπων ολιγοδενδρογλοιωμάτων ή μικτών ολιγοαστροκυττωμάτων, τα οποία προηγουμένως είχαν καταταχθεί ως αστροκυττώματα (4, 5).

Τα επενδυμάτα αν και σπάνια σε σχέση με τους νευροεπιθηλιακούς όγκους, κατέχουν την τρίτη θέση των πιο συχνών όγκων εγκεφάλου στα παιδιά. Συνήθως αυτοί οι όγκοι εμφανίζονται στα παιδιά ενδοκρανιακά, ενώ στους ενήλικες εμφανίζονται ίσα κατανεμημένοι στον εγκέφαλο και στην σπονδυλική στήλη.

Οι εμβρυικοί όγκοι του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως τα μυελοβλαστώματα (MB), είναι οι πιο συχνοί κακοήθεις όγκοι εγκεφάλου στα παιδιά.

## 1.2 ΓΛΟΙΩΜΑΤΑ

Το κακοήθες γλοίωμα είναι ο συχνότερος πρωτοπαθής όγκος του εγκεφάλου, με συχνότητα μεγαλύτερη του 50% στο σύνολο των ενδοκράνιων όγκων. Χαρακτηρίζεται από υψηλή θνησιμότητα και θνητότητα. Προκύπτουν από νευρικά πρωτογενή κύτταρα και/ή από αδιαφοροποίητα αστροκύτταρα (6, 7). Τα κλινικά συμπτώματα είναι η αύξηση της ενδοκρανιακής πίεσης, οι επιληπτικοί σπασμοί, οι εστιακές εκδηλώσεις και οι ψυχικές διαταραχές.

Τα πιλοκυτταρικά αστροκυττώματα είναι βραδείας εξέλιξης όγκοι και εμφανίζονται συνήθως σε παιδιά και νεαρά άτομα. Είναι συνήθως θεραπεύσιμοι εάν εξαιρεθούν και

έχουν διαφορετικό γενετικό προφίλ και διαφορετική κλινική συμπεριφορά, σε σχέση με κακοηθέστερα αστροκυτώματα.

Τα αστροκυτώματα με βαθμό διαφοροποίησης I και II, έχουν βραδεία εξέλιξη, απουσία περιασιακού οιδήματος, απουσία πρόσληψη σκιαγραφικού και απουσία νεκρώσεων.

Τα αναπλαστικά αστροκυτώματα προκύπτουν από χαμηλότερο βαθμό κακοήθειας αστροκυτώματα και έχουν αυξημένη μιτωτική ενεργότητα. Παρουσιάζουν ταχεία κλινική εξέλιξη και χαρακτηρίζονται από περιασιακό οίδημα, κατά τόπους πρόσληψη σκιαγραφικού και απουσία νεκρώσεων.

Τα πολύμορφα γλοιοβλαστώματα είναι οι πιο συχνοί από τους όγκους εγκεφάλου. Είναι όγκοι που είτε εμφανίζονται de novo από κύτταρα γλοίας είτε προέρχονται από εξαλλαγή καλοηθέστερων μορφών όγκων, δηλαδή από αστροκυτώματα ή ολιγονενδρογιώματα. Είναι γλοιώματα υψηλής κακοήθειας και χαρακτηρίζονται από ταχύτατη εξέλιξη. Απεικονιστικά, χαρακτηρίζονται από πρόσληψη σκιαγραφικού, περιασιακό οίδημα και νεκρώσεις στους ιστούς, που οφείλονται στην ταχύτατη εξέλιξη του όγκου. Τα πρωτογενή γλοιοβλαστώματα είναι πιο συχνά σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, σε σχέση με τα δευτερογενή (8).

Ο μέσος χρόνος επιβίωσης για τα αναπλαστικά αστροκυτώματα και τα γλοιοβλαστώματα είναι μικρός (2-5 έτη και 12-14 μήνες, αντίστοιχα). Ασθενείς με πιλοκυτταρικό αστροκύττωμα μπορούν να έχουν πλήρη ίαση, εφόσον ο όγκος εξαιρεθεί ολοκληρωτικά, ενώ στο αστροκύττωμα βαθμού κακοήθειας II μπορεί να υπάρξει ίαση με εξαίρεση του καρκινικού ιστοτεμαχίου, στην περίπτωση που δεν εμφανιστεί υποτροπή.

Η θεραπεία που εφαρμόζεται στους ασθενείς με αστροκύττωμα, εξαρτάται από το βαθμό κακοήθειας του όγκου. Στα αστροκυτώματα βαθμού κακοήθειας I, ο όγκος αφαιρείται χειρουργικά, στα βαθμού κακοήθειας II πραγματοποιείται χειρουργική εξαίρεση του όγκου και στη συνέχεια η θεραπεία εξαρτάται από την κάθε περίπτωση. Στα αστροκυτώματα βαθμού κακοήθειας III και IV, πραγματοποιούνται όλες οι δυνατές θεραπείες.

Τα υψηλού βαθμού κακοήθειας αστροκυτώματα έχουν μεγάλη πιθανότητα υποτροπής και ο όγκος συνήθως εμφανίζεται σε απόσταση-ακτίνα 2cm από το αρχικό σημείο εμφάνισης του (9). Ακόμα, επειδή και τα πιο χαμηλής κακοήθειας γλοιώματα, έχουν μια τάση κακοήθους μετασχηματισμού, ασθενείς μικρότερης ηλικίας με όγκους χαμηλού βαθμού κακοήθειας, μπορεί να υποτροπιάσουν και να δημιουργηθούν όγκοι υψηλής κακοήθειας (8).

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η αυξημένη σηματοδότηση των μονοπατιών που εμπλέκουν υποδοχείς με δράση κινάση τυροσίνης και δυσλειτουργίες στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου σχετίζονται με τη δημιουργία γλοιωμάτων, όπως και σε άλλα είδη όγκων γενικά. (4, 7). Έχει αναγνωριστεί μια πληθώρα αυξητικών παραγόντων με ρόλο στην ανάπτυξη των γλοιωμάτων, όπως: ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF, Platelet-derived growth factor), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF, epidermal growth factor), ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (FGF2, fibroblast growth factor 2), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF, vascular endothelial growth factor) και ο αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης (transforming growth factor-β, TGF-β) (2). Μελέτες αναφέρουν ότι μεγάλο ποσοστό των γλοιοβλαστωμάτων υπερεκφράζουν τον υποδοχέα του EGF, τον EGFR (EGF receptor), ενώ η υπερέκφραση των προσδετών και των υποδοχέων του PDGF παράγοντα, φαίνεται να είναι μια από τις πιο πρώιμες γενετικές αλλοιώσεις στην ανάπτυξη των δευτερογενών γλοιοβλαστωμάτων (10).

Άλλα μόρια που εμπλέκονται στο σχηματισμό των γλοιωμάτων είναι οι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, όπως: η πρωτεΐνη p53, η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRB) και οι πρωτεΐνες p16<sup>INK4A</sup> και p14<sup>ARF</sup>. Ακόμα, στη γλοιοματογένεση εμπλέκονται τα σηματοδοτικά μονοπάτια Ras/MAPK και PI3K/Akt, τα οποία έχουν σχέση με τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης, αντίστοιχα (2).

### 1.2.1 Πρόγνωση για τα γλοιώματα

Η πρόγνωση για τους ασθενείς με κακοήθες γλοιώμα συσχετίζεται με την ηλικία του ασθενούς, το βαθμό κακοήθειας και τον τύπο του όγκου. Γενικά, ασθενείς με μικρότερη ηλικία, χαμηλό βαθμό κακοήθειας του όγκου και μη-αστροκυττωματικό όγκο, παρουσιάζουν καλύτερη πρόγνωση. Συγκεκριμένα, ασθενείς με ολιγοδενδρογλοιώματα γενικά παρουσιάζουν καλύτερη πρόγνωση και σε συνδυασμό με απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) στους χρωμοσωμικούς βραχίονες 1p και 19q, ανταποκρίνονται καλύτερα στη χημιοθεραπεία, ακόμα και μετά από υποτροπή (11, 12).

Στα γλοιοβλαστώματα, οι μεταλλαγές στο γονίδιο της p53 και απώλεια ετεροζυγωτίας στο χρωμοσωμικό βραχίονα 10q, θεωρούνται καλοί και κακοί προγνωστικοί δείκτες, αντίστοιχα. Η απώλεια ετεροζυγωτίας στο βραχίονα 1p σε συνδυασμό με απώλεια ετεροζυγωτίας στο 19q, τα καθιστά λιγότερο κακοήθη και δεν μπορούν να διακριθούν μορφολογικά από τα υπόλοιπα γλοιοβλαστώματα (13).

### 1.3 ΜΗΝΙΓΓΙΩΜΑΤΑ

Τα μηνιγγιώματα αν και αντιπροσωπεύουν τη δεύτερη πιο συχνή κατηγορία όγκων εγκεφάλου στους ενήλικες, δεν είναι αρκετά μελετημένα. Τα μηνιγγιώματα είναι καλοήθεις όγκοι που προέρχονται από μεταλλαγμένα αραχνοειδή κύτταρα μήνιγγας. Τα περισσότερα μηνιγγιώματα εμφανίζονται ως σποραδικοί όγκοι.

Η θεραπεία που εφαρμόζεται σε ασθενείς με μηνιγγίωμα είναι η χειρουργική εξαίρεση του όγκου και ο ασθενής μπορεί να έχει πλήρη ίαση, εφ'όσον ο όγκος εξαιρεθεί ολοκληρωτικά.

Τα περισσότερα καλοήθη μηνιγγιώματα, ανεξάρτητα από το φύλο του ασθενούς, αποκτούν μια πληθώρα από υποδοχείς ορμονών κατά την ογκογένεση, από τους οποίους ο πιο καλά εξακριβωμένος είναι ο υποδοχέας προγεστερόνης (PR). Η σχέση μεταξύ της έκφρασης αυτού του υποδοχέα και των μηνιγγιωμάτων, έχει χρησιμοποιηθεί για να εξηγηθεί η αυξημένη συχνότητα των μηνιγγιωμάτων στις γυναίκες έναντι των ανδρών, όπου η αναλογία είναι 2:1 στον εγκέφαλο και 10:1 στην σπονδυλική στήλη. Αυτή η άποψη υποστηρίζεται από μια μελέτη, κατά την οποία παρατηρήθηκε ότι οι γυναίκες πριν και μετά από την εμμηνόπαυση που έκαναν χρήση μετα-εμμηνοπαυσικών ορμονών (postmenopausal hormones, PMHs), είχαν αυξημένο κίνδυνο δημιουργίας μηνιγγιωμάτων, σε σχέση με τις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση οι οποίες δεν έκαναν χρήση των συγκεκριμένων ορμονών (14). Αυτή η υπόθεση όμως για τις γυναίκες είναι πολύπλοκη και χρίζει περαιτέρω διερεύνησης, αφού τα μηνιγγιώματα στους άνδρες και στα παιδιά μπορεί να εκφράζουν τους ίδιους υποδοχείς.

Γενετικές αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί στα μηνιγγιώματα, έχουν δείξει μια κοινή γενετική αλλοίωση, την απενεργοποίηση του γονιδίου της νευροϊνομάτωσης 2 (neurofibromatosis, *NF-2*), στο χρωμόσωμα 22q (15). Άλλες γενετικές αλλοιώσεις που παρουσιάζουν τα μηνιγγιώματα είναι η απώλεια των χρωμοσωμικών περιοχών των 14q, 1p, 6q και 18q (16).

Γονίδια που έχουν βρεθεί να σχετίζονται με τη δημιουργία των μηνιγγιωμάτων, περιλαμβάνουν, το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53*, το γονίδιο *hTERT*, τον αυξητικό παράγοντα TGF- $\beta$  και τις μεταλλοπρωτεϊνάσες του στρώματος. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί η μεθυλίωση της πρωτεΐνης p14<sub>ARF</sub> (η οποία αναστέλει τον αναστολέα MDM2 της p53), και συνεπώς η απενεργοποίηση της, σε ένα σύνολο ατυπικών και αναπλαστικών μηνιγγιωμάτων, υποστηρίζοντας το γεγονός ότι ενώ η απενεργοποίηση της p53 λόγω μεταλλαγών δεν είναι συχνό φαινόμενο στα μηνιγγιώματα, η απενεργοποίηση της p53

λόγω της απώλειας της p14<sub>ARF</sub> και της MDM2, μπορεί να συνεισφέρει στην δημιουργία των μηνιγγιωμάτων (17).

Η τελομεράση είναι ένα ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση του μήκους του χρωμοσώματος και έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στην ανάπτυξη των όγκων. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα μηνιγγιώματα παρουσιάζουν αυξημένη ενεργότητα της τελομεράσης και αυξημένη έκφραση του mRNA του γονιδίου της (*hTERT*). Επίσης, φαίνεται να σχετίζεται η αυξημένη έκφραση και ενεργότητα της hTERT με την αύξηση του βαθμού κακοήθειας των μηνιγγιωμάτων (18).

Ο αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης (transforming growth factor, TGF-β) επίσης έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στην παθογένεση των μηνιγγιωμάτων. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι ο TGF-β αναστέλει την ανάπτυξη των μηνιγγιωμάτων *in vitro*, μέσω της ρύθμισης του SMAD2/3 μονοπατιού (19).

Ακόμα ένα γονίδιο που φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη των μηνιγγιωμάτων, είναι η σωματοστατίνη (somatostatin, SST), αφού έχει αναφερθεί ότι ρυθμίζει την ανάπτυξη των μηνιγγιωμάτων *in vitro* (20).

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) φαίνεται ότι εμπλέκονται στην παθογένεια των μηνιγγιωμάτων, αφού επικρατεί η άποψη ότι η διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων σχετίζεται με την ισορροπία μεταξύ της έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών του στρώματος και των αναστολέων τους (tissue inhibitors of MMPs, TIMPs). Αυτή η ισορροπία, το πιο πιθανόν να ρυθμίζεται όχι μόνο από ένα μονοπάτι, αλλά από μια συνδυασμένη δράση πολλών μονοπατιών. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP-2 και MMP-9, βρέθηκε ότι εκφράζονται στα μηνιγγιώματα και ότι η έκφραση τους είναι ανάλογη με το βαθμό κακοήθειας (21, 22).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

#### 2.1 ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ

Τα ογκογονίδια προκύπτουν με την εξαλλαγή των πρωτο-ογκογονιδίων, τα οποία μπορεί να είναι φυσιολογικά κυτταρικά ή ιικά γονίδια. Τα ογκογονίδια, θεωρούνται επικρατή, δηλαδή η ενεργοποίηση ενός αλληλομόρφου αρκεί για τη φαινοτυπική έκφραση της κακοήθειας, σε αντίθεση με τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, στην περίπτωση των οποίων πρέπει και τα δύο αλληλόμορφα να απενεργοποιηθούν, έτσι ώστε να χάσουν τη φυσιολογική δράση τους. Ενεργοποιούνται κυρίως στα σωματικά κύτταρα των νοσούντων, επομένως η ενεργοποίησή τους αποτελεί επίκτητο εξαλλακτικό γεγονός (23).

Υπάρχουν αρκετοί τρόποι με τους οποίους ένα πρωτο-ογκογονίδιο μπορεί να μετατραπεί σε ένα ογκογονίδιο. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση ενός ογκογονιδίου μπορεί να πραγματοποιηθεί με σημειακές μεταλλαγές οι οποίες μπορεί να λάβουν χώρα στην περιοχή που κωδικοποιείται το συγκεκριμένο γονίδιο, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός προϊόντος με αυξημένη ενεργότητα. Εάν οι μεταλλαγές συμβούν στην παρακείμενη περιοχή ελέγχου, το γονίδιο υπερεκφράζεται. Άλλος μηχανισμός ενεργοποίησης ενός ογκογονιδίου είναι ο πολλαπλασιασμός (amplification) του γονιδίου σε υψηλό αριθμό αντιγράφων, μετά από λάθη στην αντιγραφή. Επίσης, οι χρωμοσωμικές μετατοπίσεις και η μεταγραφική έκφραση του γονιδίου, αποτελούν μηχανισμούς ενεργοποίησης του. Οι μεταλλαγές και οι χρωμοσωμικές μετατοπίσεις οδηγούν σε απ'ευθείας αλλοίωση του γονιδιακού προϊόντος, ενώ οι υπόλοιποι οδηγούν σε ενεργοποίηση, μέσω παραγωγής του φυσιολογικού προϊόντος σε υπερβολικές ποσότητες (24).

## 2.2 ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν την ικανότητα να ελέγχουν την κυτταρική διαίρεση, να επάγουν την απόπτωση και να καταστέλλουν τις μεταστάσεις. Η απώλεια λειτουργίας ενός τέτοιου γονιδίου, μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία όγκων, λόγω της ανεξέλεγκτης κυτταρικής διαίρεσης. Οι κυριότεροι μηχανισμοί λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι η αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης, η επαγωγή της απόπτωσης, η επιδιόρθωση βλαβών του DNA και η αναστολή των μεταστάσεων. Μερικά γονίδια, όπως η p53 μπορούν έχουν περισσότερους από ένα μηχανισμούς λειτουργίας τους (25).

Ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο μπορεί να χάσει τη δράση του, λόγω μεταλλαγών ή υποέκφρασης και των δύο αλληλομόρφων. Εάν όμως το ένα αλληλόμορφο είναι φυσιολογικό, το ογκοκατασταλτικό γονίδιο μπορεί να δράσει φυσιολογικά (26). Υπάρχουν βέβαια και εξαιρέσεις όπως είναι το p53 και το p27 (27). Πολλά ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι ενεργά σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα, ενώ άλλα όπως η p53, ενεργοποιούνται όταν υπάρχει πιθανός κίνδυνος ογκογένεσης.

### Καταστολή της κυτταρικής διαίρεσης

Η καταστολή της κυτταρικής διαίρεσης είναι ο κύριος μηχανισμός δράσης των περισσότερων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως: η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb), RIZ1, ARF, APC, p15, p16, p18, p19, p21, p27 και p53 (28-40). Η πρωτεΐνη Rb, η οποία είναι το πρώτο ογκοκατασταλτικό μόριο που ανακαλύφθηκε, αναστέλλει τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων, απαραίτητων για τη μίτωση, με τη πρόσδεση της σε μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο E2F, οι οποίοι ρυθμίζουν το κυτταρικό πολλαπλασιασμό (31, 32). Η πρωτεΐνη APC σταθεροποιεί τους μικροσωλινίσκους για την αναστολή της μίτωσης (34). Οι p15, p16, p18, p19, p21 και p27 πρωτεΐνες, αναστέλλουν τις κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες (Cdks) και η Rb ενεργοποιείται για να αναστείλει τη κυτταρική διαίρεση, εμποδίζοντας το κύτταρο να μπει στην φάση S του κυτταρικού κύκλου (30, 41). Η Arf πρωτεΐνη θεωρείται θετικός ρυθμιστής της p53, αφού μπορεί να αναστείλει την πρωτεΐνη Mdm2, η οποία αναστέλλει τη δράση της p53 (42).

Επίσης, μερικοί επιγενετικοί μηχανισμοί μπορεί να έχουν ογκοκατασταλτική λειτουργία. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι οι μεθυλοτρανσφεράσες των ιστών μπορούν

να αναστείλουν κατ' ευθείαν τη μίτωση, αλλάζοντας τη διαμόρφωση των ιστωνών, με αποτέλεσμα να μπλοκάρεται η αποδιάταξη της δίκλωνης έλικας του DNA (43).

### **Επαγωγή της απόπτωσης**

Ογκοκατασταλτικά γονίδια που εμπλέκονται σε αυτό το μηχανισμό είναι: η p53, η APC, το CD95, το Bin1 και το PTEN (44-48). Η APC πρωτεΐνη, επάγει την απόπτωση μέσω της κασπάσης-8, ενώ το μονοπάτι αυτό μπορεί να ανασταλεί με τον αναστολέα της κασπάσης-8 (Z-IETD-FMK) (44). Ο CD95 υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα και δρα ως υποδοχέας, ο οποίος όταν αναγνωρίζεται από ένα προσδέτη των κυτταροτοξικών T-κυττάρων, επάγει την απόπτωση (46, 49). Το Bin1, μπορεί να καταστείλει την ογκογένεση μέσω του c-Myc (47). Οι παραπάνω παράγοντες, επάγουν κατ'ευθείαν την απόπτωση, σε αντίθεση με το PTEN, το οποίο χρησιμοποιεί ένα άλλο μηχανισμό για την προώθηση της απόπτωσης. Συγκεκριμένα, απενεργοποιεί το αντι-αποπτωτικό μόριο PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate), το οποίο βοηθά στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων (48). Παρόλο που μερικοί ογκοκατασταλτικοί παράγοντες, μπορούν να αναστείλουν τη μίτωση και να επάγουν την απόπτωση, η απόπτωση δεν επάγεται απαραίτητα από την αναστολή της μίτωσης (50).

### **Επιδιόρθωση βλαβών του DNA**

Μερικά από τα ογκοκατασταλτικά γονίδια που λαμβάνουν μέρος στην επιδιόρθωση των βλαβών του DNA, είναι το *MSH2* (mutS homolog 2), το *MLH1* (mutL homolog 1), το *ATM* (Ataxia-telangiectasiamutated gene product), το *BRCA* (breast cancer), το *NBS1* (Nijmegen breakage syndrome 1), το *FA* (Fanconi-Anemia-related tumor suppressor) και το *p53* (25, 51-55). Η πρωτεΐνη p53 έχει την ικανότητα να απομακρύνει τα νουκλεοτίδια στην περιοχή του DNA με βλάβες και να επάγει τη σύνθεση του DNA στην αποκομμένη περιοχή, ενώ οι MSH2 και MLH1 είναι υπεύθυνες για την επιδιόρθωση του αταίριαστου ζευγαρώματος βάσεων (mismatch) (25, 51, 52). Η πρωτεΐνη ATM είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση των p53, BRCP, NBS1 και FA με στόχο την ενεργοποίηση της επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA (25, 53). Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι η TDG

πρωτεΐνη, αναγνωρίζει το αταίριαστο ζευγάρι T-G που προκαλείται λόγω της C/T μετάπτωσης, εξαιτίας της μεθυλίωσης και απομακρύνει τη θυμίνη μέσω υδρόλυσης (56).

### **Αναστολή της μετάστασης**

Κατά τη διάρκεια της μεταστατικής διαδικασίας, τα καρκινικά κύτταρα, αλληλεπιδρούν με ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω διαφόρων σημάτων, για επαγωγή της αγγειογένεσης. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια που μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της μετάστασης περιλαμβάνουν τα: *BRMS1* (breast cancer metastasis suppressor 1), *TIMP* (tissue inhibitor of metalloproteinase), *CRSP* (cofactor required for specificity protein 1 activation), *KAL1/CD82* και τη μεταστίνη (57-64). Η μεταστίνη προσδέεται στον υποδοχέα GPR54 (orphan G protein-coupled receptor) με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κινάσης FAK (focal adhesion kinase) και την αναστολή της μετάστασης στα κύτταρα του μελανώματος (57). Η μεταστίνη μπορεί να ενεργοποιηθεί από την *CRSP* (62). Η *BRMS1* ρυθμίζει τη μεταγραφή μέσω της αλληλεπίδρασης του με το σύμπλοκο mSin3 histone deacetylase (HDAC) (59). Οι TIMPs αναστέλουν τις μεταλλοπρωτεϊνάσες του στρώματος (MMPs) και εμποδίζουν τη διείσδυση των καρκινικών κυττάρων στην βασική μεμβράνη των αιμοφόρων αγγείων (60, 61). Η γλυκοπρωτεΐνη CD82 ενεργοποιείται από την p53 και ο μηχανισμός δράσης της για την αναστολή των μεταστάσεων, δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος. Πιθανόν να αναστέλλει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων μέσω του μονοπατιού FAK-Lyn-p130<sup>CAS</sup>-CrkII (63, 64).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ RAS

#### 3.1 Γενικά

Τα πρώτα γονίδια *Ras* που ταυτοποιήθηκαν ήταν ιικά γονίδια ογκογονίδια (*v-ras*) ρετροϊών με οξεία εξαλλακτική ικανότητα. Η ανακάλυψη ότι τα ογκογονίδια των ρετροϊών έχουν προέλθει από φυσιολογικά γονίδια, συνοδεύτηκε από τη διαπίστωση ότι πολλά γονίδια με ικανότητα μετασχηματισμού μετά από επιμόλυνση των κυττάρων NIH 3T3 (ινοβλάστες ποντικίου), αντιπροσωπεύουν γονίδια που έχουν ενεργοποιηθεί με σημειακή μεταλλαγή. Τα ογκογονίδια της οικογένειας *Ras* ανακαλύφθηκαν ως ογκογονίδια που μεταφέρονται από ρετροϊούς, οι οποίοι προκαλούν σάρκωμα στους αρουραίους. Υπάρχουν τρεις μορφές γονιδίων *Ras*: το *Kras* (*v-Ki-ras2* Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), το *Hras* (*v-Ha-ras* Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog και το *Nras* (neuroblastoma RAS viral (*v-ras*) oncogene homolog). Έχουν ταυτοποιηθεί και δύο ψευδογονίδια, το *Hras-2* και το *Kras-1*, τα οποία δεν είναι λειτουργικά (65).

Η οικογένεια των γονιδίων *Ras* είναι μέλος μιας ευρύτερης υπεροικογένειας γονιδίων, που περιλαμβάνουν τις υποοικογένειες των γονιδίων: *rap* (*rap1A*, *rap1B* και *rap2*), *ral* (*ralA* και *ralB*), *rac* (*rac1* και *rac2*), *rho* (*rhoA*, *rhoB* και *rhoC*) και τα *rah/ypt* γονίδια (*rahl*, *rah2*, *rah3A*, *rah3B*, *rab4*, *rub5* και *rah6*) (66).

Τα *Ras* γονίδια κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες ras-p21. Η υπεροικογένεια των Ras αποτελείται από περισσότερες από 100 πρωτεΐνες και μπορεί να κατηγοριοποιηθεί στις εξής κύριες οικογένειες, σύμφωνα με τη δομή, την αλληλουχία και τη λειτουργία τους: Ras, Rad, Rab, Rap, Ran, Rho, Rheb, Rit και Arf. Η κάθε οικογένεια είναι υπεύθυνη για διαφορετικές λειτουργίες του κυττάρου, π.χ η οικογένεια των Ras είναι υπεύθυνη για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, η Rho για τη οργάνωση του κυτταροσκελετού, η Ran για την πυρηνική μεταφορά και η Rab και Arf για τη μεταφορά κυστιδίων (66).

Οι ομοιότητες των πρωτεϊνών Ras με τις G-πρωτεΐνες οδήγησαν στην άποψη τελικά ότι εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος και ο μεγάλος βαθμός συντήρησης των *Ras* γονιδίων ανάμεσα στα είδη, από τη ζύμη μέχρι τον άνθρωπο (67), υποδηλώνει το σπουδαίο ρόλο τους στις διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις.

### 3.2 Δομή των γονιδίων *Ras*

Τα γονίδια *Ras* συναντώνται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και παρουσιάζουν σημαντική δομική ομολογία, λόγω της υψηλής συντηρητικότητας που υπάρχει μεταξύ των κωδικών περιοχών. Η χρωμοσωμική τους θέση στον άνθρωπο είναι για το *Kras*, το χρωμόσωμα 12 (12p12.1), για το *Hras*, το χρωμόσωμα 11 (11p15.5) και για το *Nras*, το χρωμόσωμα 1 (1p13.2). Το *Kras* αποτελείται από έξι εξώνια, ενώ το *Hras* από πέντε και το *Nras* από επτά. Και στα τρία *Ras*, το πρώτο 5' εξώνιο είναι μη μεταφραζόμενο, ακολουθούν τέσσερα μεταφραζόμενα εξώνια (τα οποία κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη p21) και μια περιοχή πολλαπλών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (variable tandem repeats, VTR) στο μη-μεταγραφόμενο 3' άκρο του (68). Το *Kras* έχει δύο εναλλακτικά εξώνια, το IVA και IVB, τα οποία κωδικοποιούν με εναλλακτικό μάτισμα, δύο διαφορετικές πρωτεΐνες. Οι υποκινητές των συγκεκριμένων γονιδίων βρίσκονται ακριβώς πριν από το μη κωδικό εξώνιο και δεν φέρουν τα χαρακτηριστικά TATA (με αποτέλεσμα την ύπαρξη πολλών θέσεων μεταγραφής) και CAT boxes που έχουν άλλα ευκαρυωτικά γονίδια, αλλά αντίθετα, είναι πλούσιοι σε GC βάσεις (65, 69).

Τα τρία γονίδια *Ras*, κωδικοποιούν τέσσερις ομόλογες πρωτεΐνες: *Kras4A*, *Kras4B*, *Hras* και *Nras*. Η παραγωγή της πρωτεΐνης *Kras-A* είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με τα παραγόμενα επίπεδα της πρωτεΐνης *Kras-B*, σε φυσιολογικά κύτταρα. Το *Kras* εκτείνεται περίπου σε μια γενωμική περιοχή 40kb, το *Hras* σε 4.5kb, ενώ το *Nras* σε 7kb (65, 68).

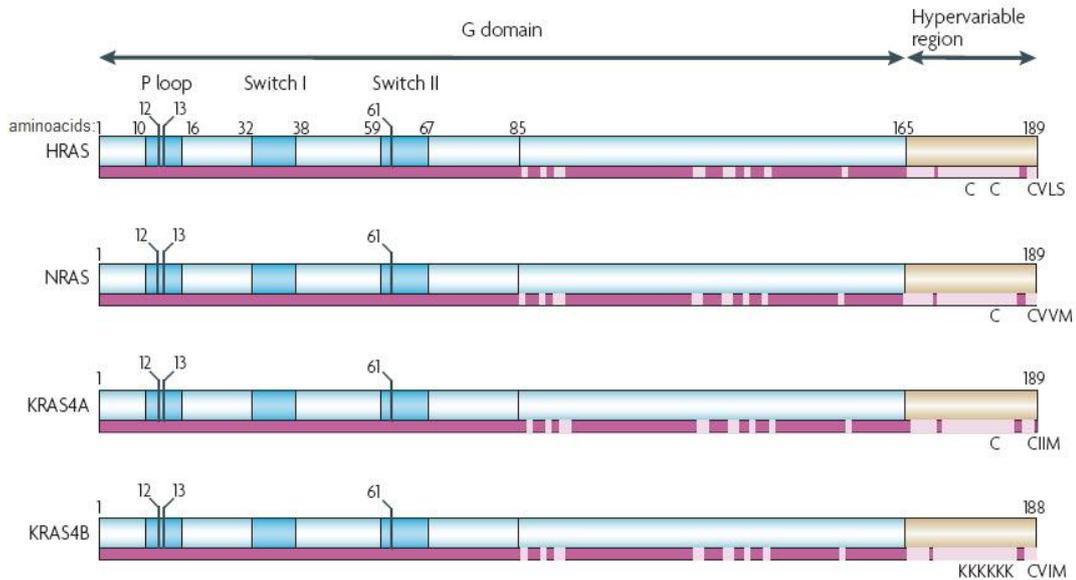
### 3.3 Η πρωτεΐνη RAS-p21

Η πρωτεΐνη *Ras-p21* είναι μικρή, ενδοκυττάρια σηματοδοτική πρωτεΐνη, η οποία ενεργοποιείται από ένα υποδοχέα με δράση κινάση της τυροσίνης και λειτουργεί σαν μοριακός διακόπτης. Έχει δράση GTPάσης, είναι μονομερής (αντίθετα με τις G-πρωτεΐνες οι οποίες είναι τριμερείς) και μοιάζει με την  $\alpha$ -υπομονάδα μιας G-πρωτεΐνης. Οι φυσιολογικές *Ras* πρωτεΐνες μεταφέρουν εξωκυττάρια μηνύματα σε διάφορα μονοπάτια, ρυθμίζοντας έτσι πολλές λειτουργίες του κυττάρου όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση, η απόπτωση και η οργάνωση του κυτταροσκελετού.

Η πρωτεΐνη *Ras-p21* και των τριών γονιδίων *Ras*, έχει μοριακό βάρος 21 kDa και αποτελείται από 189 αμινοξέα, εκτός από την *Kras-B*, η οποία αποτελείται από 188, λόγω του ότι το εξώνιο IVb έχει ένα λιγότερο κωδικόνιο. Αποτελείται από τις εξής τρεις

περιοχές: την καταλυτική περιοχή (G- domain, αα 1-165), την ετερογενή περιοχή (αα 165-186) και την περιοχή πρόσδεσης στη μεμβράνη (αα 187-189). Ανάμεσα στις ισομορφές της p21 πρωτεΐνης παρατηρείται υψηλή ομολογία στην καταλυτική περιοχή (τα 85 αμινοτελικά αμινοξέα είναι ακριβώς όμοια, ενώ τα υπόλοιπα 80 έχουν ~85-90% ομολογία), ενώ τα τελευταία 25 καρβοξυτελικά αμινοξέα διαφέρουν σημαντικά (εκτός από την κυστεΐνη στη θέση 186). Αυτό υποδηλώνει ότι η ετερογενής περιοχή των p21 πρωτεϊνών, πιθανόν να σχετίζεται με διακριτές λειτουργίες. Η καταλυτική περιοχή περιλαμβάνει την φωσφορική θηλιά (phosphate-loop, P-loop) στα αμινοξέα 10-16, στην οποία προσδένεται το GTP και GDP (65, 70, 71).

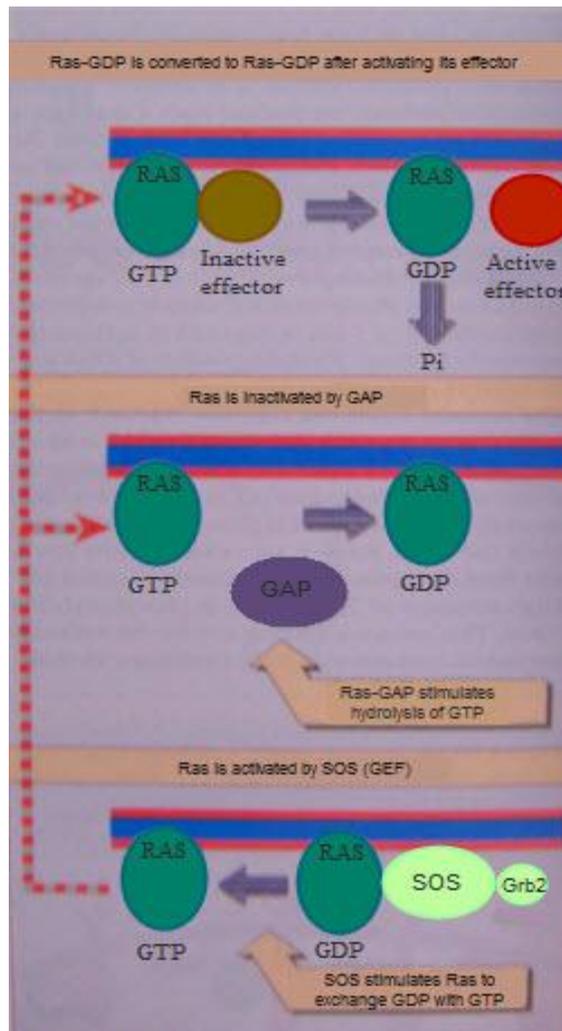
Η κυτταροπλασματική προ-p21 υπόκειται σε μια σειρά από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στο καρβοξυτελικό της άκρο, οι οποίες αυξάνουν τον υδρόφοβο χαρακτήρα της, με αποτέλεσμα την πρόσδεση της στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η συντηρημένη κυστεΐνη που αναφέρθηκε πιο πάνω (Cys186), είναι απαραίτητη για αυτές τις τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, όλες οι Ras πρωτεΐνες φαρνεσυλιώνονται στο CAAX μοτίβο που υπάρχει στο καρβοξυτελικό τους άκρο, στο οποίο το “C” είναι μια κυστεΐνη, το “A” συνήθως ένα αλειφατικό αμινοξύ και “X” ένα οποιοδήποτε αμινοξύ. Οι πρωτεΐνες Kras4A, Hras και Nras υπόκεινται σε μια επιπλέον τροποποίηση από ένα ή δύο παλμιτικά οξέα, ακριβώς πριν από το CAAX μοτίβο, ενώ στην περίπτωση της Kras4B πρωτεΐνης, η πρόσδεση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη πραγματοποιείται μέσω ιοντικών δεσμών που σχηματίζονται μεταξύ των ηλεκτροθετικών καταλοίπων λυσίνης και των ηλεκτραρνητικών λιπιδίων της μεμβράνης (70, 71). Οι δομές των τεσσάρων ισομορφών των Ras πρωτεϊνών φαίνονται στην εικόνα 3.1.



Εικόνα 3.1: Οι τέσσερις ισομορφές των Ras πρωτεϊνών. Η G-περιοχή (αμινοξέα 1-165) παρουσιάζει υψηλή ομολογία ανάμεσα στις ισομορφές και περιέχει: α) την φωσφορική θηλιά (P-loop), η οποία προσδένεται με την γ-φωσφορική ομάδα του GTP και β) τους διακόπτες I και II (αμινοξέα 32-38 και 59-67, αντίστοιχα), οι οποίοι ρυθμίζουν την πρόσδεση των Ras πρωτεϊνών σε διάφορα μόρια. Με σκούρο ροζ χρώμα παρουσιάζονται τα ομόλογα κατάλοιπα των ισομορφών, ενώ με ανοικτό ροζ οι μη-ομόλογες περιοχές. Τα θερμά σημεία για μεταλλάξεις φαίνονται στις θέσεις 12,13 και 61.

### 3.4 Μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης p21

Οι Ras πρωτεΐνες, υδρολύουν το GTP και παλινδρομούν ανάμεσα σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις. Είναι ενεργές όταν είναι συνδεδεμένες με το GTP (GTP-RAS) και αντίθετα ανενεργές, όταν συνδέονται με GDP (GDP-RAS). Τα επίπεδα της υδρόλυσης του GTP στην p21πρωτεΐνη, ρυθμίζονται από δύο κατηγορίες πρωτεϊνών: α) τις GAP (GTP-ase activating proteins) οι οποίες καταλύουν την υδρόλυση του GTP, καθιστώντας την Ras-p21 ανενεργή και β) τις GEF (guanine nucleotide exchange factors) (π.χ Son of sevenless, SOS) που αντικαθιστούν το GDP με GTP, ενεργοποιώντας την Ras-p21 (εικόνα 3.2) (72, 73).

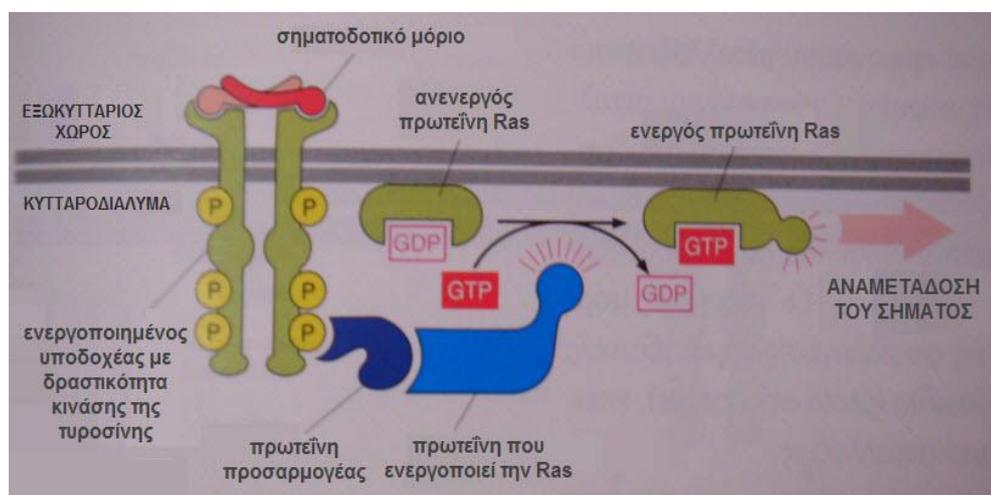


Εικόνα 3.2: Τα επίπεδα των Ras-GTP και Ras-GDP, ρυθμίζονται από δύο πρωτεΐνες. Οι Ras-GAP απενεργοποιούν την πρωτεΐνη Ras, μέσω της υδρόλυσης του GTP. Οι SOS (GEF) ενεργοποιούν τις Ras, μέσω της αντικατάστασης του GDP με GTP.

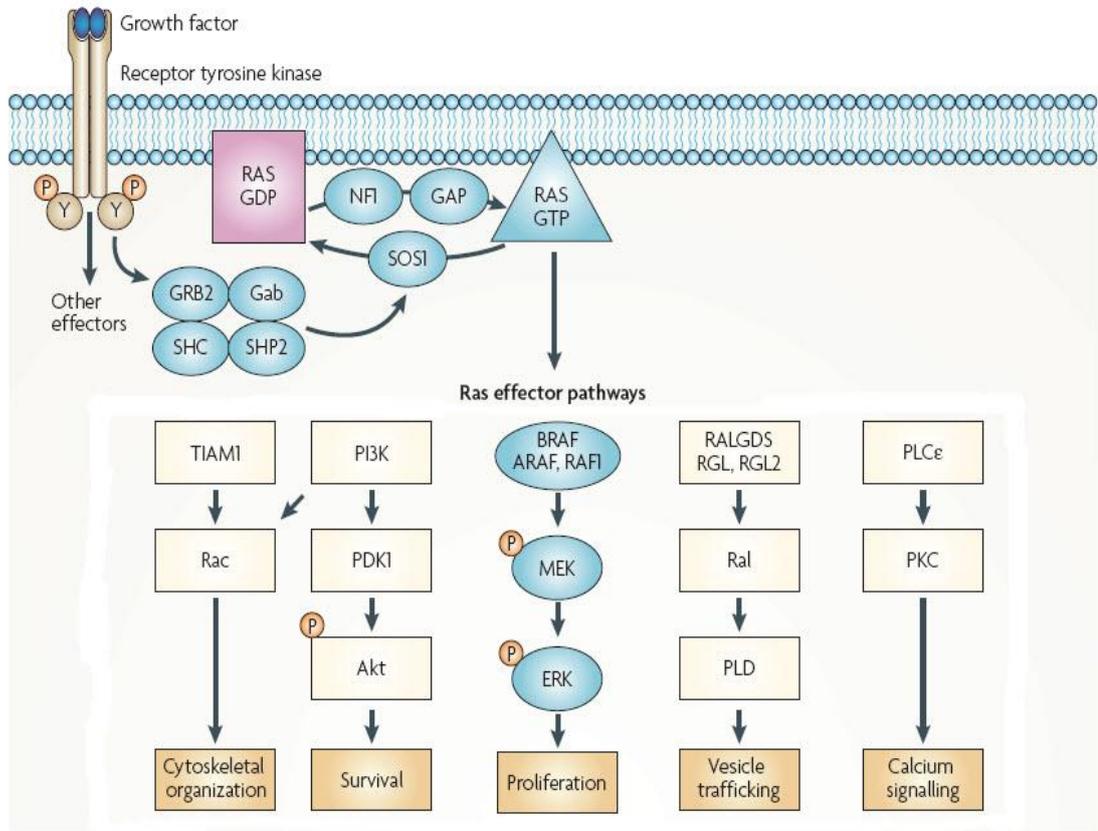
Το μονοπάτι διαβίβασης μηνυμάτων που συμμετέχει η Ras-p21 και είναι δυνατόν να προκαλέσει ογκογένεση, είναι το μονοπάτι MAPK του οποίου η ενισχυμένη ενεργοποίηση οδηγεί στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η έναρξη αυτού του μονοπατιού πραγματοποιείται όταν ένα εξωκυττάριο ερέθισμα, όπως ένας αυξητικός παράγοντας, έχει προσδεθεί στο εξωκυττάριο τμήμα του διαμεμβρανικού υποδοχέα με δράση κινάσης της τυροσίνης (receptor tyrosine kinase, RTK). Τότε, φωσφορυλιώνεται ο υποδοχέας (αφού έχει γίνει διμερής) και οι νεοφωσφορυλιωμένες τυροσίνες λειτουργούν γενικά ως θέσεις πρόσδεσης για πληθώρα ενδοκυττάρων σηματοδοτικών πρωτεϊνών (εικόνα 3.3). Στην περίπτωση μας, μια πρωτεΐνη-προσαρμογέας (adaptor) συνδέεται σε μια τέτοια θέση και ενεργοποιεί μια πρωτεΐνη (Ras-activating protein) η οποία ενεργοποιεί την

πρωτεΐνη Ras. Τότε, η Ras-p21 η οποία έχει προσδεμένο GDP, το ανταλλάξει με GTP και αλληλεπιδρά με την κινάση Raf-1 (ARAF, BRAF, RAF-1), ο οποία προσδένεται στην κυτταρική μεμβράνη μαζί με την Ras-p21. Οι Raf πρωτεΐνες ενεργοποιούν τις MEK1 ΚΑΙ MEK2 (Mitogen Extracellular Kinases), μέσω φωσφορυλίωσης και αυτές με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν τις ERK1 και ERK2 (extracellular signal-regulated kinase) οι οποίες μετατοπίζονται στον πυρήνα για να διεγείρουν διάφορους στόχους, που περιλαμβάνουν τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την μίτωση, την επιβίωση και τη μετανάστευση των κυττάρων (εικόνα 3.4) (74-76).

Αν η δράση της Ras-p21 πρωτεΐνης ανασταλεί και το κύτταρο εκτεθεί σε ένα αυξητικό παράγοντα στον οποίο απαντά υπό φυσιολογικές συνθήκες το κύτταρο, η φυσιολογική κυτταρική απάντηση δεν θα εκδηλωθεί. Αντίθετα, εάν αυτή η πρωτεΐνη παραμείνει μόνιμα ενεργοποιημένη, θα έχει επίδραση στη διαίρεση των κυττάρων ακόμα και όταν απουσιάζουν οι αυξητικοί παράγοντες, με αποτέλεσμα στη δημιουργία όγκων.



Εικόνα 3.3: Ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras. Μια πρωτεΐνη προσαρμογέας είναι προσαραγμένη πάνω σε μια συγκεκριμένη φωσφορυλιωμένη τυροσίνη του ενεργοποιημένου υποδοχέα με δράση κινάσης της τυροσίνης. Η πρωτεΐνη αυτή προσδένεται και ενεργοποιεί μια άλλη πρωτεΐνη που ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Ras (Ras-activating protein). Αυτή διεγείρει την Ras στο να ανταλλάξει το συνδεδεμένο GDP με GTP. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη Ras διεγείρει διάφορα μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού των Ras.



Εικόνα 3.4: Σηματοδοτικό μονοπάτι των Ras. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη Ras διεγείρει πολλά μονοπάτια που αφορούν την επιβίωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την οργάνωση του κυτταροσκελετού και διάφορες άλλες λειτουργίες. Το μονοπάτι MEK/ERK είναι υπεύθυνο για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μεταλλαγές μπορούν να οδηγήσουν στην απορύθμιση του, με αποτέλεσμα την δημιουργία όγκων.

### 3.5 Ενεργοποίηση των γονιδίων *Ras*

Η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *Ras*, μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους μηχανισμούς, οι οποίοι μπορούν να αλλάξουν την καταλυτική ενεργότητα της Ras-p21 πρωτεΐνης, οδηγώντας το σηματοδοτικό μονοπάτι, προς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την καρκινογένεση. Τα πρωτο-ογκογονίδια μπορούν να μετατραπούν σε ογκογονίδια, μέσω μεταλλαγών, υπερέκφρασης και πολλαπλασιασμού των γονιδίων (gene amplification), απώλεια ετεροζυγωτίας και μη-φυσιολογικής μεθυλίωσης, οδηγώντας σε παραγωγή της p21 σε μεγάλες ποσότητες ή σε δομικές αλλοιώσεις που σταθεροποιούν την p21-GTP μορφή. Έτσι, η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη δρα διαρκώς στον τελικό της στόχο, με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη δημιουργία όγκων. (77). Οι μεταλλαγές στα γονίδια *Ras* δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη διατήρηση των ογκογόνων ιδιοτήτων τους, αφού έχει δείχθει ότι η υπερέκφραση των φυσιολογικών *Ras*, μπορεί να οδηγήσει σε μετασχηματισμό των κυττάρων (78). Αρκετές μελέτες αναφέρουν την υπερέκφραση της Ras-p21 σε όγκους (79-81), ενώ άλλες διαπίστωσαν αυξημένα επίπεδα mRNA των *Ras* (82-84).

Η δυνατότητα των πρωτο-ογκογονιδίων *Ras* να μετατραπούν σε ογκογονίδια μετασχηματισμού δεν αναδεικνύεται μόνο μέσω των ποιοτικών μεταβολών της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (και κατ'επέκταση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας), αλλά και μέσω ποσοτικής μεταβολής, π.χ αν το πρωτο-ογκογονίδιο βρεθεί υπό τον έλεγχο ενός πιο ενεργού υποκινητή, υπερεκφράζεται και μπορεί να προκαλέσει μετασχηματισμό (68, 85).

Μελέτες σε ασθενείς με καρκίνο και μελέτες στόχευσης γονιδίων σε ποντίκια, έδειξαν ότι το κάθε γονίδιο *Ras*, έχει διαφορετικό ρόλο. Το *Kras* παίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυική ανάπτυξη και ποντίκια με απώλεια δράσης του *Kras* δεν επιβιώνουν, ενώ τα *Hras*- και *Nras*-deficient ποντίκια, αναπτύσσονται κανονικά (71). Επίσης, το επίπεδο της έκφρασης για το κάθε μέλος της οικογένειας των *Ras* γονιδίων ποικίλλει, αφού διαπιστώθηκε διαφορετική έκφραση τους, σε φυσιολογικούς ιστούς πονικιών. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη έκφραση του *Hras* στον εγκέφαλο, σε μυϊκό ιστό και στο δέρμα, του *Kras* στο ήπαρ, στους πνεύμονες και στο θύμο αδένα, ενώ το *Nras* κυρίως στο θύμο αδένα (86).

### 3.6 Μεταλλαγές των γονιδίων *Ras*

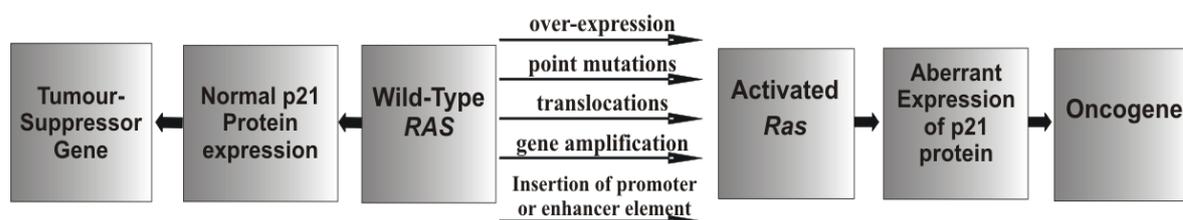
Οι μεταλλαγές των γονιδίων *ras*, απαντώνται συνήθως στα κωδικόνια 12, 13 και 61, τα οποία θεωρούνται ως “hot-spots” και συνήθως έχουν ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση των αμινοξέων στις θέσεις αυτές. Οι μεταλλαγές των *Ras* που οδηγούν σε ογκογένεση, δρουν είτε αναστέλλοντας την ενεργότητα της GTPάσης των *Ras* πρωτεϊνών, εμποδίζοντας έτσι την υδρόλυση του GTP είτε αυξάνοντας το ρυθμό αντικατάστασης του GDP από το GTP είτε επάγοντας μια στερεοδομική αλλαγή που οδηγεί σε ενεργή πρωτεΐνη, χωρίς πρόσδεση νουκλεοτιδίων (70, 77, 87).

Με τις μεταλλαγές στα γονίδια *Ras*, οι πρωτεΐνες GAP δεν μπορούν να ενισχύσουν την ενεργότητα των *Ras* πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα οι *Ras* πρωτεΐνες να παραμένουν διαρκώς στην ενεργοποιημένη τους μορφή και να δρουν μόνιμα στον τελικό τους στόχο. Οι GAP πρωτεΐνες έχουν ένα αρκετά συντηρημένο δακτύλιο αργινίνης (arginine finger), ο οποίος αλληλεπιδρά με τη φωσφορική-θηλιά (P-loop) των *Ras*-p21 πρωτεϊνών. Αυτή η αλληλεπίδραση ενεργοποιεί την υδρόλυση του RAS-GTP. Η γλουταμίνη στο κωδικόνιο 61 είναι απαραίτητη για την υδρόλυση του GTP, γιατί στο σύμπλοκο RAS-GAP, σχηματίζει δεσμό υδρογόνου μεταξύ της φωσφορικής ομάδας της προσδεδεμένης γουανίνης και της αργινίνης. Οποιοδήποτε άλλο αμινοξύ (εκτός του γλουταμινικού οξέος), μπλοκάρει τη υδρόλυση. Η αντικατάσταση της γλυκίνης στο κωδικόνιο 12 των *Ras* (εκτός της προλίνης), επίσης μπορεί να προκαλέσει ελάττωση του ρυθμού υδρόλυσης GTP και κατά συνέπεια συσσώρευση p21-GTP, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των *Ras* πρωτεϊνών (71).

Οι ενεργοποιημένες μεταλλαγές των *Ras*, λαμβάνουν χώρα στο 30% των όγκων (88). Μεταλλαγές στα *Ras* γονίδια έχουν βρεθεί σε πληθώρα όγκων και ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο του όγκου. Συγκεκριμένα, μεταλλαγές του *Kras* έχουν βρεθεί στο πάγκρεας, στον πνεύμονα, το *Nras* στο ήπαρ και σε μελανώματα, ενώ το *Hras* σε καρκίνους της ουροδόχου κύστης. Από τα τρία μέλη της οικογένειας, το *Kras* είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο, αφού έχουν βρεθεί μεταλλαγές του στο 85% των όγκων, ενώ μεταλλαγές στο *Nras* και *Hras* είναι πιο σπάνιες (~15% και ~1% αντίστοιχα) (89).

### 3.7 Ογκοκατασταλτική δράση των Ras και συνεισφορά στην απόπτωση

Τα *Ras* γονίδια όταν ενεργοποιούνται, οδηγούν προς τον πολλαπλασιασμό και τον κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων. Έχει βρεθεί όμως ότι αυτά τα γονίδια, όταν είναι στη φυσιολογική τους μορφή, εμπλέκονται στην κυτταρική γήρανση και απόπτωση, έχοντας έτσι ογκοκατασταλτική δράση (εικόνα 3.5). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα αγρίου-τύπου *Ras* γονίδια μπορούν να δράσουν και ως ογκοκατασταλτικά γονίδια, αφού διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του *Hras-1* καταστέλλει το φαινότυπο που επάγεται από το T24 μεταλλαγμένο *Hras* και *Nras*, σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (90).



Εικόνα 3.5: Διπλός ρόλος των *ras* γονιδίων. Τα αγρίου-τύπου *ras* δρουν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια, ενώ τα ενεργοποιημένα *ras*, δρουν ως ογκογονίδια.

Η ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού, οδηγεί σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό και συνεπώς σε καρκινογένεση. Μια πιθανή εξήγηση για το μηχανισμό δράσης του αγρίου-τύπου *Kras-2* προέρχεται από την παρατήρηση ότι υπάρχει μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του αγρίου τύπου *Kras-2* και της ενεργοποίησης του ERK.

Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση των *Ras*, μπορεί κάτω υπό ορισμένες συνθήκες να οδηγήσει σε **κυτταρική γήρανση** (senescence), αφού η έκφραση του ογκογόνου *Ras*, επάγει τον κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων, μόνο σε συνεργασία με άλλο ογκογονίδιο ή όταν ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο απενεργοποιηθεί (91).

Ακόμα, η εμπλοκή των *Ras* στην **απόπτωση** υποστηρίζεται από μελέτες οι οποίες αναφέρουν ότι το μονοπάτι MAPK/ERK επηρεάζεται από την υπερέκφραση των *Ras*. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Raf από το *Ras*, επάγει την απόπτωση, ενώ η ενεργοποίηση της PI3K από το *Ras* επάγει την κυτταρική επιβίωση (92). Ακόμα ένα στοιχείο που εμπλέκει το *Ras* στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, είναι ότι η επαγωγή της

απόπτωσης, φαίνεται να σχετίζεται με την p53 (93-95). Η υπόθεση ότι τα *Ras* επάγουν την απόπτωση, μπορεί να φαίνεται αντίθετη με την αρχική άποψη ότι προστατεύουν τα κύτταρα από αυτή, μπορεί όμως οι δύο αυτοί μηχανισμοί να συνυπάρχουν, εάν λάβουμε υπ' όψη την πληθώρα των ρυθμιστικών στοιχείων που λαμβάνουν μέρος σε κάθε μονοπάτι.

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα αγρίου τύπου *Ras* γονίδια δρουν ως ογκοκατασταλτικά, δεν έχει ακόμα πλήρως εξακριβωθεί. Το πιο πιθανό είναι ότι μπορεί να σχετίζεται με την ενεργοποίηση ορισμένων σηματοδοτικών μονοπατιών, που προωθούν είτε την κυτταρική γήρανση είτε την απόπτωση ή εναλλακτικά, να εμπλέκεται με τον ανταγωνισμό των ίδιων υποστρωμάτων.

### **3.8 *Ras* γονίδια και όγκοι εγκεφάλου**

Περιορισμένος αριθμός μελετών έχουν εξετάσει το μοριακό πρότυπο των *Ras* γονιδίων στους όγκους εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, δύο μελέτες έχουν αναφέρει μεταλλάξεις στο *Kras* (96, 97), ενώ στο *Nras*, μεταλλάξεις έχουν μελετηθεί μόνο σε νευροβλαστώματα και μυελοβλαστώματα (98, 99). Επίσης, μειωμένη έκφραση του mRNA του *Hras* και υπερέκφραση της Ras-p21 πρωτεΐνης, έχουν αναφερθεί σε ένα μικρό αριθμό γλοιωμάτων (100, 101). Στα μηνιγγιώματα, η βιβλιογραφία περιορίζεται σε ελάχιστες αναφορές που σχετίζονται με την ανίχνευση μεταλλαγών στα γονίδια *Ras* και οι οποίες κάνουν λόγο για απουσία *Ras* μεταλλαγών στα μηνιγγιώματα (102).

Το συνδυασμένο προφίλ της έκφρασης του mRNA και της p21 πρωτεΐνης, καθώς επίσης και η ανίχνευση μεταλλαγών στα *Ras* γονίδια, δεν έχει αξιολογηθεί σε ικανοποιητικό αριθμό δειγμάτων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΓΟΝΙΔΙΑ AKT

#### 4.1 Γενικά

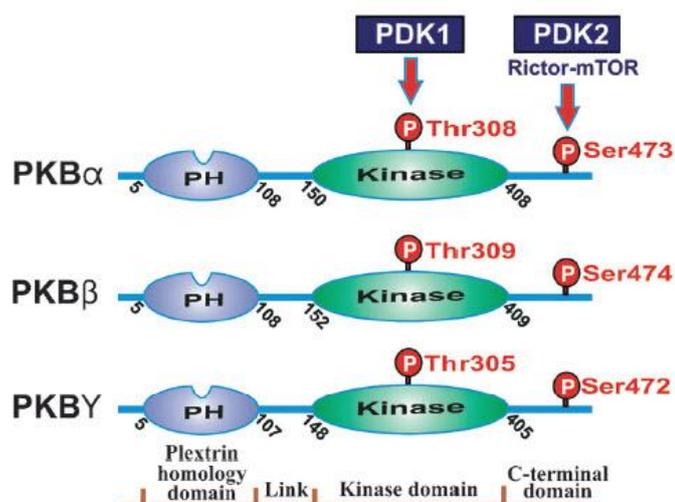
Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt έχει γίνει αντικείμενο μελέτης τα τελευταία χρόνια λόγω του ότι ρυθμίζει πληθώρα κυτταρικών αποκρίσεων, όπως η κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός, απόπτωση, μετανάστευση των κυττάρων και αγγειογένεση. Απορύθμιση αυτού του μονοπατιού, συχνά οδηγεί σε μια πληθώρα ασθενειών, όπως ο καρκίνος.

Η Akt κινάση ή αλλιώς πρωτεϊνική κινάση B (protein kinase B, PKB ) είναι μια σερίνη/θρεονίνη κινάση και ανήκει στην οικογένεια των AGC (cAMP-dependent, cGMP-dependent, protein kinase C) κινασών. Η υπο-οικογένεια των πρωτεϊνών PKB/Akt είναι συντηρημένη στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, αφού στο ποντίκι (*Mus musculus*) και στον άνθρωπο παρουσιάζουν 95% αμινοξική ομολογία (103).

Η υπο-οικογένεια των πρωτεϊνών PKB/Akt αποτελείται από τρία μέλη στα θηλαστικά: την πρωτεΐνη Akt-1 (PKB $\alpha$ ), Akt-2 (PKB $\beta$ ) και Akt-3 (PKB $\gamma$ ) οι οποίες κωδικοποιούνται από τρία διαφορετικά γονίδια, το *Akt-1*, *Akt-2* και *Akt-3* αντίστοιχα, ενώ αντίθετα στη ζύμη (*Saccharomyces cerevisiae*), στη *Drosophila melanogaster* και στον *Caenorhabditis elegans* υπάρχει μια μόνο ισομορφή της πρωτεΐνης (104). Η χρωμοσωμική θέση του Akt-1 είναι η 14q32, του Akt-2 είναι η 19q13.1-13.2, ενώ του Akt-3 είναι 1q44 (105). Τα γονίδια αυτά έχουν παρόμοιους μηχανισμούς ενεργοποίησης, αλλά τα επίπεδα έκφρασης τους διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του ιστού. Η Akt-1 φαίνεται να εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, η Akt-2 εκφράζεται κυρίως στα λιποκύτταρα, στο ήπαρ και στους σκελετικούς μύες, ενώ η Akt-3 εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο (106, 107).

## 4.2 Δομή PKB

Οι τρεις ισομορφές της πρωτεΐνης έχουν μοριακό βάρος 57kDa και είναι αρκετά συντηρημένες όσον αφορά τη δομή και την αμινοξική τους αλληλουχία. Η PKBβ και η PKBγ είναι κατά 81% και 83% ομόλογες με την PKBα, αντίστοιχα. Η PKB κινάση αποτελείται από τρεις περιοχές: α) την αμινοτελική περιοχή ομόλογη της της πλεκστρίνης (pleckstrin homology, PH domain), β) την κεντρική καταλυτική περιοχή κινάσης και γ) την καρβοξυτελική περιοχή (εικόνα 4.1) (108). Η PH περιοχή παρουσιάζει 80% ομολογία ανάμεσα στις ισομορφές και προσδένει 3,4,5-τριφωσφορικά φωσφοϊνοσιτίδια (PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub> ή PIP3) και 3,4 -διφωσφορικά φωσφοϊνοσιτίδια (PtdIns-3,4-P<sub>2</sub> ή PIP2). Η κεντρική περιοχή της κινάσης αποτελείται από περίπου 250 αμινοξέα και παρουσιάζει περίπου 90% ομολογία στις PKB ισομορφές (109). Αυτή η περιοχή περιλαμβάνει μια συντηρημένη θρεονίνη (Thr308 στην PKBα, Thr309 στην PKBβ, Thr305 στην PKBγ), της οποίας η φωσφορυλίωση είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των PKB πρωτεϊνών. Η καρβοξυτελική περιοχή, περίπου 40 αμινοξέων, έχει 70% ομολογία ανάμεσα στις τρεις ισομορφές και μοιάζει με την PKC οικογένεια πρωτεϊνών. Περιλαμβάνει το χαρακτηριστικό υδρόφοβο μοτίβο των AGC κινάσων, το οποίο είναι: F-X-X-F/Y-S/T-Y/F, όπου X είναι οποιοδήποτε αμινοξύ. Σε αυτή την περιοχή, περιλαμβάνεται επίσης και μια συντηρημένη σερίνη (Ser473 στην PKBα, Ser474 στην PKBβ και Ser472 στην PKBγ), της οποίας η φωσφορυλίωση είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των PKB πρωτεϊνών (108-110).



Εικόνα 4.1: Δομή των τριών ισομορφών της PKB: PKBα, PKBβ και PKBγ. Διακρίνονται οι τρεις περιοχές της πρωτεΐνης και οι θέσεις φωσφορυλίωσης της θρεονίνης και της σερίνης.

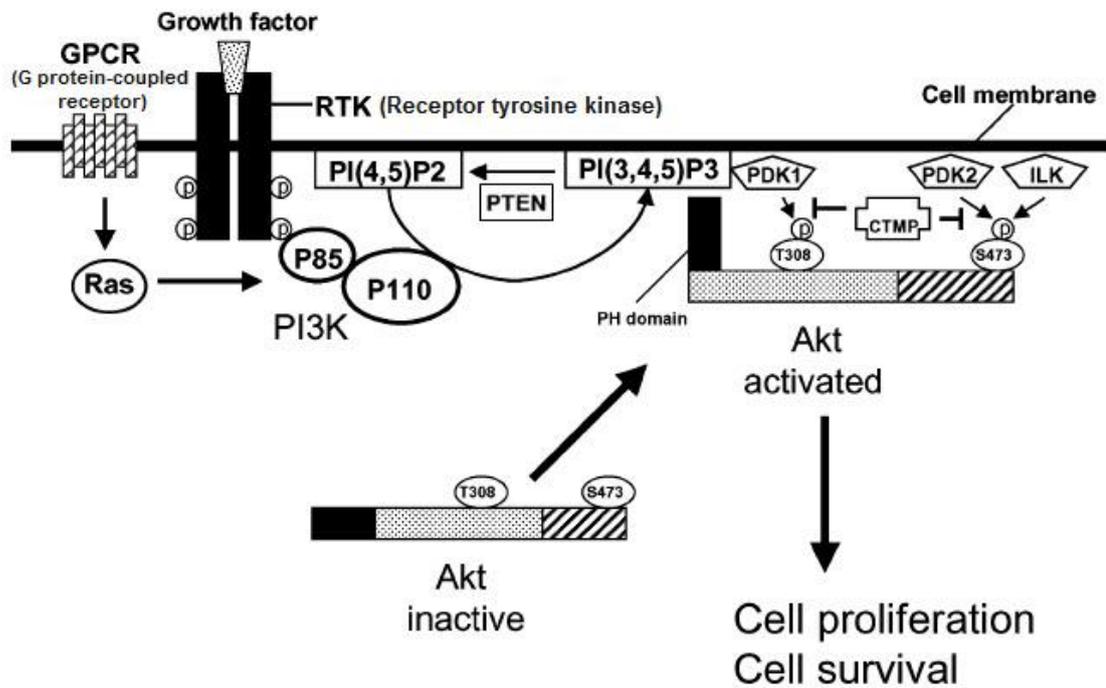
### 4.3 Ενεργοποίηση της PKB

Οι Akt πρωτεΐνες ρυθμίζουν τους μηχανισμούς της κυτταρικής ανάπτυξης και επιβίωσης με τη φωσφορυλίωση διαφόρων υποστρωμάτων. Οι κινάσες του φωσφοϊνοσιτιδίου 3 (PI3K), έχουν δραστηριότητα λιπιδικής κινάσης και ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες (π.χ PDGF, EGF, IGF-1) και μέσω υποδοχέων G-πρωτεϊνών.

Οι PI3K κινάσες καταλύουν τη σύνθεση του μεμβρανικού φωσφολιπιδίου PIP3, το οποίο εξυπηρετεί ως σημείο αγκυροβόλησης των πρωτεϊνών με PH περιοχές στην μεμβράνη, συμπεριλαμβανομένων των PKB πρωτεϊνών. Η αλληλεπίδραση της PKB με το PIP3 επάγει την αλλαγή στερεοδομής της PKB, η οποία διευκολύνει τη φωσφορυλίωση της θρεονίνης και της σερίνης από την κινάση PDK1 και PDK2 (εξαρτώμενη από το φωσφοϊνοσιτιδίο πρωτεϊνική κινάση 1 και 2, phosphoinositide-dependent protein kinase 1 and 2, αντίστοιχα) και έτσι επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση των PKB (108-111). Μόλις ενεργοποιηθεί η PKB, απομακρύνεται από την μεμβράνη και αρχίζει να φωσφορυλιώνει πολλά υποστρώματα στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, που εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως κυτταρική ανάπτυξη, μετανάστευση, κυτταρικός πολλαπλασιασμός και μεταβολισμός. Η ενεργοποίηση της PKB πρωτεΐνης φαίνεται αναλυτικά στην εικόνα 4.2.

Μεταλλαγές της PKB που οδηγούν σε αντικατάσταση της Thr308 και της Ser473 με το αμινοξύ αλανίνη, έχουν ως αποτέλεσμα τη χαμηλή ενεργότητα της πρωτεΐνης. Διπλές μεταλλαγές όπως T308D/S473D, δηλαδή αντικατάσταση και των δύο συντηρημένων αμινοξέων με ασπαρτικό οξύ, οδηγεί σε συνεχή ενεργοποίηση της κινάσης PKB (110).

Η ενεργοποίηση των PKB πρωτεϊνών αναστέλλεται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *PTEN* το οποίο έχει δράση φωσφατάσης, μέσω της αναστολής της δράσης του P3IK (110). Η απώλεια της λειτουργίας του *PTEN*, έχει δειχθεί ότι μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση των PKB (112).



Εικόνα 4.2: Ενεργοποίηση των πρωτεϊνών PKB. Η πρόσδεση ενός αυξητικού παράγοντα σε υποδοχείς με δράση κινάσης της τυροσίνης ή σε G protein-coupled receptors, διεγείρει τη φωσφορυλίωση του PI3K, το οποίο αποτελείται από τις P85 και P110 υπομονάδες. Το PI3K φωσφορυλιώνει το PIP2 σε PIP3, ενώ το PTEN δρα ως φωσφατάση και αναστρέφει αυτή την αντίδραση. Η PH περιοχή της πρωτεΐνης Akt, αλληλεπιδρά με το PIP3, οπότε η πρωτεΐνη μετατοπίζεται στη μεμβράνη και προκαλείται αλλαγή στη στερεοδομή της, με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της στα δύο συντηρημένα κατάλοιπα θρεονίνης και σερίνης, από τις PDK1 και PDK2 κινάσες. Η πρωτεΐνη CTMP (carboxyl terminal modulating protein), είναι ανασταλτικός παράγοντας της φωσφορυλίωσης. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη PKB, μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, όπου δρα φωσφορυλιώνοντας τα διάφορα υποστρώματα-στόχους της.

#### 4.4 Ρόλος PKB στον καρκίνο

Η ενεργοποίηση της PKB και η συνεχής δράση του σηματοδοτικού μονοπατιού, έχειδειχθεί ότι μπορεί να επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, συνεισφέροντας έτσι, στην εξέλιξη των όγκων. Οι μηχανισμοί ενεργοποίησης του μονοπατιού περιλαμβάνουν:

α) Πολλαπλασιασμός και την υπερέκφραση των γονιδίων *Akt*, καθώς και αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης.

β) Γενετικές αλλοιώσεις του PI3K. Αυτές περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό και την παρουσία μεταλλαγών στο γονίδιο *PIK3CA*, το οποίο κωδικοποιεί την p110 υπομονάδα του PI3K, καθώς και μεταλλαγές στο γονίδιο *PIK3RI* το οποίο κωδικοποιεί την p85α υπομονάδα του PI3K. Οι μεταλλαγές στο *PIK3RI* είναι σπάνιες σε σχέση με το *PIK3CA*, στους ανθρώπινους όγκους.

γ) Ενεργοποίηση και υπερέκφραση των υποδοχέων με δράση κινάσης της τυροσίνης και των G-protein coupled υποδοχέων.

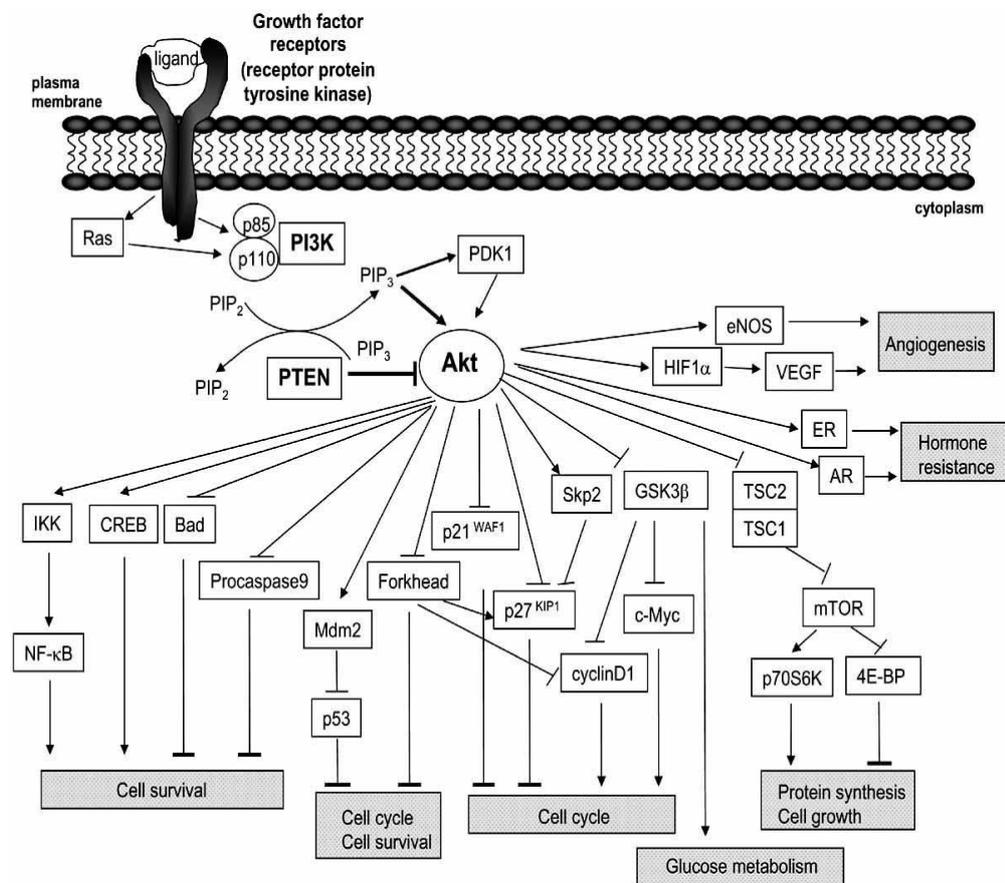
δ) Απώλεια λειτουργίας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *PTEN*, λόγω μεταλλαγών, απαλοιφής του γονιδίου, μεθυλίωσης του υποκινητή και απώλειας ετεροζυγωτίας.

Ο ρόλος της υπερέκφρασης της PKB και της ενεργοποιημένης PKB στον καρκίνο, φαίνεται να υποστηρίζεται από αρκετές μελέτες. Συγκεκριμένα, πειράματα απαλοιφής της PKB με τη χρήση antisense και si-RNA τεχνικών, σε κυτταρικές καρκινικές σειρές οι οποίες υπερεκφράζουν την PKB, έδειξαν την επαγωγή της απόπτωσης και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, καθώς επίσης και την αναστολή της ανάπτυξης και της διήθησης των όγκων (113-117). Από αυτά τα στοιχεία, φαίνεται ότι οι υπερεκφρασμένες και ενεργοποιημένες μορφές των PKB ισομορφών, ωθούν τα καρκινικά κύτταρα στην αποφυγή της απόπτωσης, μια κατάσταση που μπορεί να ανατραπεί με την παρεμπόδιση της δράσης της PKB, καθιστώντας την έτσι, μοριακό στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου.

Η PKB κινάση έχειδειχθεί ότι επάγει την κυτταρική επιβίωση, μέσω της φωσφορυλίωσης προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών και μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την έκφραση προ- και αντι-αποπτωτικών γονιδίων. Μερικά από τα υποστρώματα-στόχοι της PKB είναι η πρωτεΐνη Bad, GSK-3, pro-caspase9, IκB kinase (IKK), η Yes-associated protein (YAP), καθώς και πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες όπως οι FOXO1 (FKHR), FOXO2, FOXO3a (FKHRL1) και FOXO4 (AFX) (118-121).

Το μονοπάτι PI3K/PKB, μπορεί επίσης να ρυθμίσει τη δράση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53, η οποία ρυθμίζει την απόπτωση μέσω ρύθμισης προ-αποπτωτικών μορίων. Η p53 ρυθμίζεται αρνητικά από το Mdm2, το οποίο μπορεί να μεταφερθεί τον πυρήνα και να προκαλέσει την απενεργοποίηση της p53. Έχει επίσης βρεθεί, ότι η πρωτεΐνη PKB, μπορεί να φωσφορυλιώσει το Mdm2 και έτσι να απενεργοποιήσει την p53, αυξάνοντας έτσι, την επιβίωση των κυττάρων (122).

Μερικές από τις λειτουργίες στις οποίες εμπλέκεται το σηματοδοτικό μονοπάτι του PI3K/PKB, μετά από ενεργοποίηση της PKB πρωτεΐνης, φαίνονται στην εικόνα 4.3.



Εικόνα 4.3: Σηματοδοτικό μονοπάτι Akt και καρκίνος. Η ενεργοποίηση των PKB πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης υποδοχέων με δράση κινάσης της τυροσίνης και την απώλεια δράσης του PTEN. Όταν ενεργοποιηθούν ρυθμίζουν πληθώρα πρωτεϊνών-στόχων και παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές λειτουργίες του κυττάρου, όπως π.χ στην κυτταρική ανάπτυξη, στην επιβίωση, αγγειογένεση και στο μεταβολισμό. Η υπερενεργοποίηση των PKB μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία όγκων.

#### 4.5 Διαφορετικός ρόλος PKB ισομορφών

Οι τρεις ισομορφές φαίνεται να έχουν διαφορετικές λειτουργίες, αφού μελέτες σε isoform-specific knockout ποντίκια, παρουσίασαν διαφορετικούς φαινότυπους. Συγκεκριμένα, απαλοιφή του *Akt-1* γονιδίου, απεκάλυψε το ρόλο του στη ρύθμιση του σωματικού μεγέθους, ενώ απαλοιφή του *Akt-2* οδήγησε στη δημιουργία διαβήτη μαζί με απώλεια του υποδόριου λίπους, προτείνοντας έτσι, ότι το *Akt-2* παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης (123, 124). Απαλοιφή και των δύο γονιδίων μαζί οδήγησε σε περιγεννητική θνησιμότητα, λόγω σημαντικών αναπτυξιακών προβλημάτων (125). Η απαλοιφή του *Akt-3* γονιδίου είχε σχέση με μείωση κατά 20%, του μεγέθους του εγκεφάλου (126, 127). Σε αντίθεση με την μείωση του σωματικού μεγέθους που παρατηρείται στην περίπτωση της απαλοιφής του *Akt-1*, λόγω της μείωσης του αριθμού των κυττάρων, η μείωση του μεγέθους του εγκεφάλου που παρατηρείται στην απαλοιφή του *Akt-3*, οφείλεται στη μείωση του μεγέθους των νευρώνων και συνοδεύεται από μειωμένη σηματοδότηση του mTOR (127).

Επίσης, διάφορες μελέτες έδειξαν την εμπλοκή των *Akt* γονιδίων στη μετανάστευση και την διήθηση των κυττάρων. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των *Akt-1* και *Akt-2* μέσω διέγερσης με τον αυξητικό παράγοντα IFG-1 (insulin-like growth factor-1), έδειξε ότι το *Akt-1* μπορεί να μπλοκάρει τη σηματοδότηση του ERK μονοπατιού και έτσι να ανασταλεί η μετανάστευση των κυττάρων, ενώ το *Akt-2* μπορεί να λειτουργήσει αντίθετα, δηλαδή να ενεργοποιήσει το μονοπάτι ERK και αυτό να οδηγήσει στην επαγωγή της κυτταρικής μετανάστευσης και διήθησης (128). Παρόμοια μελέτη σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού έδειξε ότι η σίγαση του *Akt-1* είχε ως επακόλουθο την επαγωγή της μετανάστευσης, ενώ η σίγαση του *Akt-2* δεν είχε κανένα αποτέλεσμα (129). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν το ρόλο του *Akt-1* ως καταστολέα της μετανάστευσης και της διήθησης των κυττάρων, ενώ του *Akt-2* ως επαγωγέα αυτών των διαδικασιών. Ακόμα, έχει προταθεί ότι το *Akt-1* μπορεί να έχει διπλό ρόλο στην ογκογένεση, δρώντας όχι μόνο προ-ογκογενετικά καταστέλλοντας την απόπτωση, αλλά και αντι-ογκογενετικά, με την καταστολή της διήθησης και της μετάστασης. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι ρόλοι αυτοί, φαίνονται να μην είναι επικαλυπτόμενοι, άρα τα δύο αυτά γονίδια έχουν ξεχωριστούς ρόλους όσον αφορά τη μετανάστευση και την διήθηση των καρκινικών κυττάρων. Ο τρόπος με τον οποίο οι *Akt* ισομορφές λειτουργούν διαφορετικά στις συγκεκριμένες διαδικασίες, παραμένει ακόμα άγνωστος. Πιθανές εξηγήσεις

περιλαμβάνουν διαφορετικές αλληλεπιδράσεις με τα διάφορα υποστρώματα ή με τις πρωτεΐνες προσαρμογείς.

Ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα που αφορά τη λειτουργία των Akt, είναι ότι η διέγερση με τον IGF-1, είτε μπλοκάρει τη μετανάστευση και την διήθηση καρκινικών σειρών είτε δεν έχει επίπτωση στην κινητικότητα των κυττάρων, γεγονός αντίθετο με την επικρατούσα άποψη. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι ο φαινότυπος που θα επικρατήσει σε κάθε κύτταρο, εξαρτάται από την έκφραση των τριών ισομορφών Akt. Σε κύτταρα που επικρατεί η έκφραση της Akt-2 ισομορφής, η διέγερση του IGF-1 θα οδηγήσει σε αυξημένη μετανάστευση, ενώ κύτταρα με την επικρατή έκφραση της Akt-1, θα υπάρξει το αντίθετο αποτέλεσμα. Το ερώτημα εάν οι τρεις ισομορφές επάγουν εξίσου τη μετανάστευση των κυττάρων, δεν μπορεί ακόμα να απαντηθεί (128).

Ο ρόλος των Akt γονιδίων φαίνεται να είναι διαφορετικός σε κάθε ιστό. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το *Akt-1* δρα ως καταστολέας της μετανάστευσης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού, σε άλλους τύπους κυττάρων, επάγει αυτή τη διαδικασία (130-133).

#### **4.6 Γενετικές αλλοιώσεις του Akt μονοπατιού στον καρκίνο**

Παρόλο που η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt πραγματοποιείται σε πολλά είδη καρκίνων μέσω διάφορων μηχανισμών, υπάρχουν λίγες αναφορές που αφορούν την αλλαγή της έκφρασης των PKB/Akt. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ο πολλαπλασιασμός του *Akt-2* γονιδίου σε καρκίνο των ωοθηκών, του παγκρέατος και του μαστού (134-137), σε αντίθεση με το *Akt-1*, του οποίου ο πολλαπλασιασμός δεν είναι συχνό φαινόμενο στους όγκους (138). Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Akt-2 έχει παρατηρηθεί σε ένα ποσοστό καρκίνων των ωοθηκών, του παγκρέατος και του μαστού (115, 139), ενώ αυξημένη έκφραση και ενεργότητα της Akt-1 πρωτεΐνης, βρέθηκε σε καρκίνο του προστάτη, μαστού και ωοθηκών (140). Για το *Akt-3* υπάρχει μια μόνο αναφορά για υπερέκφραση του *Akt-3* mRNA σε κυτταρικές καρκινικές σειρές μαστού και προστάτη (141). Συνήθως η υπερέκφραση και η υπερενεργοποίηση της Akt πρωτεΐνης, σχετίζεται με κακή πρόγνωση (142).

Μεταλλαγές στην PKB πρωτεΐνη, δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί σε ανθρώπινους όγκους.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΑΞΟΝΑΣ SDF-1/CXCR4

#### 5.1 Γενικά

Ο SDF-1 ή CXCL12 (stromal cell-derived factor-1) ανήκει στην CXC οικογένεια χημοκινών (όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ). Η οικογένεια των χημοκινών αποτελείται από τέσσερις ομάδες: CXC, CC, CX<sub>3</sub>C και C. Η CXC ομάδα χωρίζεται σε δύο κατηγορίες: στις ELR<sup>+</sup> και στις ELR<sup>-</sup>, ανάλογα με την παρουσία ή απουσία του μοτίβου ELR (τριπεπτιδίο γλουταμικού οξέος, λευκίνης και αργινίνης). Οι ELR<sup>+</sup> CXC χημοκίνες είναι αγγειογενετικές, ενώ οι περισσότερες ELR<sup>-</sup> CXC χημοκίνες είναι αναστολείς της αγγειογένεσης (143). Ο SDF-1 αν και ανήκει στις ELR<sup>-</sup> CXC χημοκίνες, είναι αγγειογενετικός παράγοντας.

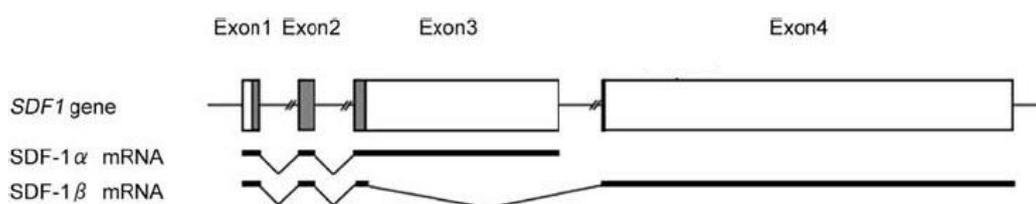
Ο SDF-1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς των σπονδυλωτών και λαμβάνει μέρος σε διάφορες διεργασίες του κυττάρου όπως στην καρδιακή και νευρωνική ανάπτυξη, στη μετανάστευση αρχέγονων κυττάρων, στη νεοαγγειογένεση και στην ογκογένεση. Προσδέεται στον υποδοχέα CXCR4 και στον πρόσφατα ταυτοποιημένο υποδοχέα CXCR7/RDC1 (144-147). Ο CXCR4 υποδοχέας είναι ένας G protein-coupled cell surface receptor (GPCR) και είναι ένας από τους πιο μελετημένους υποδοχείς χημοκινών, κυρίως λόγω του ρόλου του ως συνυποδοχέας στην είσοδο του ιού HIV στα κύτταρα (148) και της εμπλοκής του στη μετάσταση πληθώρας όγκων (149-153). Αποτελείται από 352 αμινοξέα.

#### 5.2 Ισομορφές SDF-1

Υπάρχουν έξι ισομορφές του ανθρώπινου SDF-1, οι οποίες είναι οι: SDF-1α, SDF-1β, SDF-1γ, SDF-1δ, SDF-1ε και SDF-1φ. Τα πρώτα τρία εξώνια είναι όμοια σε όλα τα γονίδια (αμινοξέα 1-68) και διαφέρουν στο τέταρτο εξώνιο (154). Η SDF-1α ισομορφή είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη, αφού συμμετέχει σε πολλές διεργασίες όπως την οργάνωση του πληθυσμού των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, την καθοδήγηση των αρχέγονων γαμετών κατά την ανάπτυξη και την νευροτροποποίηση στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Η SDF-1β ισομορφή εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα και φαίνεται να

εμπλέκεται σε διεργασίες που αφορούν το αγγειακό σύστημα και την αγγειογένεση. Αυτή η ισομορφή είναι κυρίως παρούσα σε όργανα πλούσιας αγγείωσης, όπως το ήπαρ, η σπλήνα, ο μυελός των οστών και οι νεφροί. Η SDF-1γ ισομορφή στους ανθρώπους και στα ποντίκια, βρίσκεται κυρίως στην καρδιά. Οι ισομορφές SDF-1δ, SDF-1ε και SDF-1φ έχουν μόλις πρόσφατα ταυτοποιηθεί σε ανθρώπινους ιστούς. Όλες εκφράζονται στο πάγκρεας, οι SDF-1φ και SDF-1ε βρέθηκαν στην καρδιά, στο ήπαρ και στους νεφρούς, ενώ η SDF-1δ βρέθηκε στη σπλήνα, στο ήπαρ σε εμβρυικό στάδιο και στους πνεύμονες (155). Από όλες τις ισομορφές μόνο οι SDF-1α και SDF-1β είναι καλά μελετημένες και κωδικοποιούνται από το ίδιο γονίδιο, μέσω εναλλακτικού ματίσματος.

Υπάρχουν δύο εναλλακτικά μετάγραφα του *SDF-1* γονιδίου (εικόνα 5.1) τα οποία κωδικοποιούν για τις SDF-1α και SDF-1β πρωτεΐνες που αποτελούνται από 89 και 93 αμινοξέα αντίστοιχα. Το *SDF-1* γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10, στη θέση 10q11.1.



Εικόνα 5.1: Δομή του γονιδίου *SDF-1*, το οποίο κωδικοποιεί τις ισομορφές *SDF-1α* και *SDF-1β*.

Οι SDF-1 πρωτεΐνες βρίσκονται στους ζωντανούς οργανισμούς ως μονομερή. Το γονίδιο *SDF-1α*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη SDF-1α αποτελείται από τρία εξώνια, ενώ το *SDF-1β*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη SDF-1β, από τέσσερα. Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (αμινοξέα 1-8) είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση της SDF-1 πρωτεΐνης με τον υποδοχέα της, τον CXCR4. Τα πρώτα δύο αμινοξέα (Lys-1 και Pro-2) παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση του υποδοχέα, ενώ τα υπόλοιπα έξι εμπλέκονται στην πρόσδεση της χημοκίνης με τον υποδοχέα (156). Η πρόσδεση με τον υποδοχέα σταθεροποιείται μέσω των αλληλεπιδράσεων με γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) στην επιφάνεια του κυττάρου. Οι SDF-1 πρωτεΐνες είναι θετικά φορτισμένες, λόγω των βασικών αμινοξέων (όπως η λυσίνη και η αργινίνη), που βρίσκονται στο καρβοξυτελικό άκρο των χημοκινών και με αυτό τον τρόπο, προσδένουν τις αρνητικά φορτισμένες γλυκοζαμινογλυκάνες (155). Έτσι, επιτυγχάνεται η πρόσδεση και η παραμονή των χημοκινών στην επιφάνεια των κυττάρων και κατά συνέπεια η συγκέντρωση των λευκών αιμοσφαιρίων.

### 5.3 Μηχανισμοί ρύθμισης της ενεργότητας της SDF-1 πρωτεΐνης

Οι SDF-1 πρωτεΐνες εκφράζονται συστατικά στους ιστούς των σπονδυλωτών, οπότε αυτά έχουν αναπτύξει τρόπους για τη διατήρηση της ισορροπίας των επιπέδων των εν λόγω πρωτεϊνών, μέσω της αποικοδόμησης και της πρόσδεσης του υποδοχέα.

#### 1) Μηχανισμός αποδόμησης:

Η SDF-1 πρωτεΐνη αποδομείται με πρωτεόλυση και στα δύο άκρα της. Το αμινοτελικό της άκρο, πρωτεολύεται αργά και πραγματοποιείται και στους ιστούς και στο αίμα, με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να μην έχει δράση χημοκίνης και να μειώνεται η ικανότητα πρόσδεσης της SDF-1 με τον υποδοχέα. Αντίθετα, η πρωτεόλυση του καρβοξυτελικού της άκρου είναι γρήγορη, λαμβάνει χώρα μόνο στο αίμα και πραγματοποιείται μόνο στην SDF-1α ισομορφή. Πιθανόν τα σπονδυλωτά να ανέπτυξαν ένα επιπρόσθετο μηχανισμό ρύθμισης στην επικρατέστερη ισομορφή, την SDF-1α. Σε αυτή την περίπτωση, η πρωτεΐνη SDF-1 δεν απενεργοποιείται, αλλά μειώνεται η ενεργότητα της περίπου στο μισό, μειώνοντας τη σταθεροποίηση μέσω γλυκοζαμινογλυκανών στην επιφάνεια του κυττάρου.

#### 2) Πρόσδεση στον υποδοχέα:

Η ικανότητα πρόσδεσης των γλυκοζαμινογλυκανών, η οποία διαφέρει ανάμεσα στις SDF-1 ισομορφές, αποτελεί ένα άλλο μηχανισμό ρύθμισης της ενεργότητας της πρωτεΐνης SDF-1. Για παράδειγμα, το τέταρτο εξώνιο της SDF-1γ ισομορφής είναι αρκετά βασικό, οπότε έλκει με μεγαλύτερη συγγένεια τις γλυκοζαμινογλυκάνες, με αποτέλεσμα αυτή η ισομορφή να προσδένεται κατ'ευθείαν στην επιφάνεια του κυττάρου, αμέσως μετά την έκκριση της (155).

### 5.4 SDF-1/CXCR4 και καρκίνος

Οι χημοκίνες παίζουν ρόλο στην επαγωγή μετανάστευσης των λευκών αιμοσφαιρίων σε περίπτωση φλεγμονής. Η σχέση τους με τη δημιουργία όγκων μπορεί να είναι έμμεση, για παράδειγμα με την επιρροή τους στην αγγειογένεση, αλλά και άμεση, επηρεάζοντας την κυτταρική επιβίωση, ανάπτυξη και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Ο ρόλος των χημοκινών στην ογκογένεση είναι περίπλοκος, αφού μερικές

χημοκίνες δρουν ογκογενετικά, ενώ άλλες έχουν ανασταλτικές ιδιότητες ως προς τον κακοήγη μετασχηματισμό. Οι χημοκίνες και οι υποδοχείς τους παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα στάδια της ογκογένεσης, γι αυτό θεωρούνται ως πιθανοί μοριακοί στόχοι για την θεραπεία του καρκίνου. Με αυτά τα ευρήματα, έχουμε τη δυνατότητα μέσω της έκφρασης των χημοκινών και των υποδοχέων τους, να παρέμβουμε στη διαδικασία της ανάπτυξης των όγκων και της μετάστασης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η παρεμπόδιση της δράσης των υποδοχέων όπως του CXCR2 και CXCR4 με μονοκλωνικά αντισώματα, είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης των όγκων και της μετάστασης. Συγκεκριμένα, η παρεμπόδιση της λειτουργίας του CXCR4 οδήγησε στη μείωση της ανάπτυξης και της μεταστατικής ικανότητας, όγκων κεφαλής-τραχήλου, καθώς και στη μείωση της ανάπτυξης ενδοκρανιακών πρωτογενών όγκων εγκεφάλου (157, 158). Ακόμα, αναστολείς του CXCR4 εμπόδισαν τη επαγόμενη από τον CXCL12-μετανάστευση καρκινικών κυττάρων μαστού και κυττάρων οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, in vitro (159, 160).

Ο άξονας SDF-1/CXCR4 έχει δείχθει ότι επάγει την αγγειογένεση και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων σε αρκετούς καρκίνους όπως στον καρκίνο του μαστού (161, 162), πνεύμονα (163), προστάτη (164) και νευροβλαστώματος (165).

### **5.5 SDF-1/CXCR4 και όγκοι εγκεφάλου**

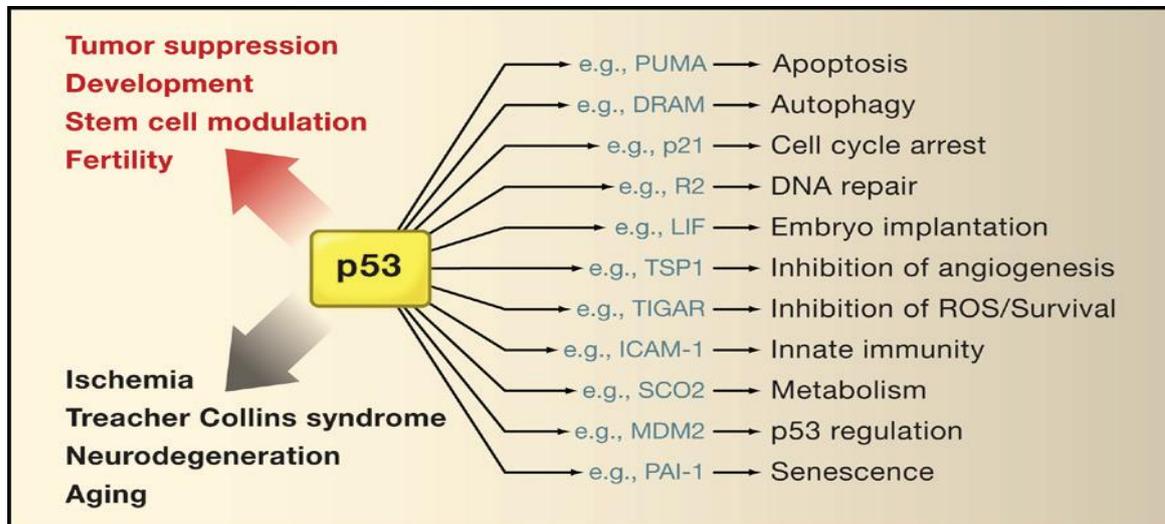
Μελέτες έχουν δείξει την εμπλοκή των SDF-1 και CXCR4 στην παθογένεση των όγκων. Συγκεκριμένα, ο CXCR4 έχει βρεθεί ότι εκφράζεται σε πληθώρα όγκων, όπως καρκίνο στον πνεύμονα, προστάτη και μαστό (166, 167). Το προφίλ έκφρασης του mRNA του *SDF-1a*, *SDF-1b* και του υποδοχέα του, *CXCR4*, δεν έχει μελετηθεί ικανοποιητικά σε όγκους εγκεφάλου. Υπάρχουν λίγες αναφορές στη βιβλιογραφία, οι οποίες περιλαμβάνουν την έκφραση των mRNA των *SDF-1* και *CXCR4* στα γλοιώματα (167-175). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η έκφραση των SDF-1 και CXCR4, είναι ανάλογη (αυξάνει) με το βαθμό διαφοροποίησης των γλοιωμάτων και είναι σε υψηλότερα επίπεδα σε αγγειογενετικές περιοχές (173, 176), αλλά υπάρχουν και αναφορές που έχουν αντιφατικά αποτελέσματα (169).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΟ P53

#### 6.1 Γενικά

Το *p53* γονίδιο είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο και κατέχει σημαντικό ρόλο γενικά στη γενωμική σταθερότητα και στην αποτροπή του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται είτε με την εμπλοκή του *p53* σε μηχανισμούς που διατηρούν την ακεραιότητα του DNA είτε μέσω απόπτωσης και κυτταρικής γήρανσης. Πέρα όμως από το σημαντικό του ρόλο ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο, πρόσφατα στοιχεία προσδίδουν στην πρωτεΐνη *p53* και άλλους ρόλους σε βιολογικά μονοπάτια, όπως ρύθμιση του μεταβολισμού, κυτταρικής διαφοροποίησης και ανάπτυξης (εικόνα 6.1) (177).



Εικόνα 6.1: Εμπλοκή της πρωτεΐνης *p53* σε διάφορα μονοπάτια, εκτός από το ρόλο της ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο, όπως ρύθμιση κυτταρικών (δεξιά) και αναπτυξιακών διαδικασιών (αριστερά). Το κόκκινο τόξο αντιπροσωπεύει διαδικασίες με θετικά αποτελέσματα, ενώ το γκρι με ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Με μπλε χρώμα φαίνονται μερικά αντιπροσωπευτικά παραδείγματα γονίδια-στόχων.

Το γονίδιο *p53* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53 (tumor protein 53, Trp53) η οποία είναι μια πρωτεΐνη ειδικής πρόσδεσης DNA (sequence-specific DNA-binding protein), με μοριακό βάρος 53kDa και 393 αμινοξικών καταλοίπων (178, 179).

Αρχικά, υπήρχε η άποψη ότι το φυσιολογικό *p53* είναι επικρατές γονίδιο όπως το *ras* και το *myc*. Η άποψη αυτή έπαψε να ισχύει όταν cDNA κλώνοι του γονιδίου *p53* από φυσιολογικό ιστό δεν οδήγησαν σε καρκινική εξαλλαγή φυσιολογικά κύτταρα, ενώ cDNA κλώνοι που απομονώθηκαν από κυτταρικές σειρές προερχόμενες από όγκους, οδήγησαν σε καρκινική εξαλλαγή τα φυσιολογικά κύτταρα, όταν χρησιμοποιήθηκαν μαζί με το γονίδιο *ras*. Επίσης, πολλοί όγκοι εκφράζουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του γονιδίου *p53*, χωρίς να έχουν χάσει το φυσιολογικό αλληλόμορφο (180).

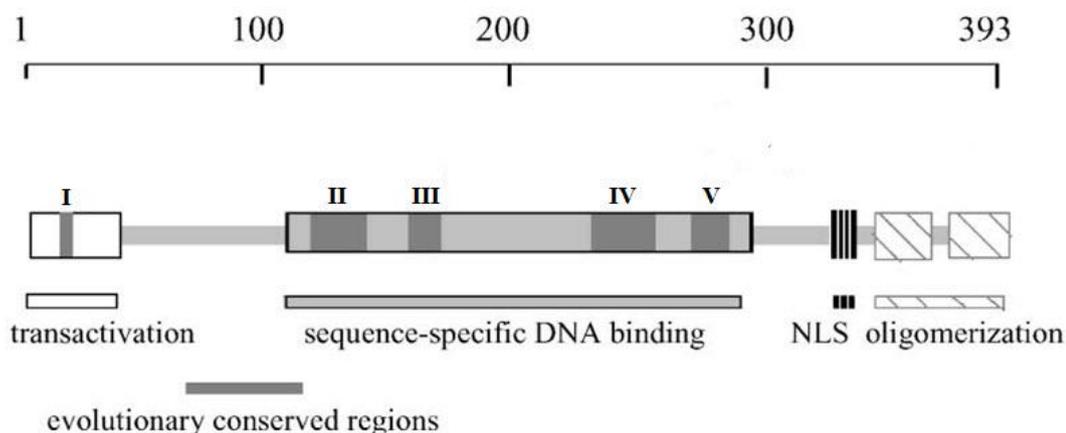
## 6.2 Δομή του γονιδίου *p53*

Το γονίδιο *p53* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 στη θέση 17p13.1 και αποτελείται από 11 εξώνια (181), από τα οποία το πρώτο είναι μη-μεταφραζόμενο. Το πρώτο και δεύτερο εξώνιο χωρίζονται από ένα ιντρόνιο, μήκους 10kb (182). Έχει βρεθεί ότι περιορίζεται μόνο στα σπονδυλωτά, αφού όλες οι προσπάθειες να βρεθεί στη *Drosophila*, στους ζυμομύκητες και στον αχινό, έχουν αποτύχει (183-187). Το γονίδιο έχει μήκος περίπου 20kb και η έκφραση του ελέγχεται από δύο υποκινητές, τους P1 και P2. Ο P1 βρίσκεται 100-250bp πριν από το πρώτο εξώνιο και δεν φέρει TATA box, CAAT box και περιοχές πλούσιες σε G/C βάσεις, όπως συνηθίζεται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ο P2 υποκινητής, βρίσκεται στο πρώτο ιντρόνιο (188).

## 6.3 Δομή της πρωτεΐνης p53

Η p53 πρωτεΐνη μπορεί να διακριθεί σε τρεις περιοχές: α) στην αμινοτελική περιοχή, η οποία περιέχει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (αα 1-42), β) στο κεντρικό μέρος της πρωτεΐνης όπου υπάρχουν αρκετά συντηρημένες αλληλουχίες και η περιοχή πρόσδεσης DNA (αα 102-292) και γ) στο καρβοξυτελικό άκρο, το οποίο περιέχει την περιοχή ολιγομερισμού που είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό τετραμερών p53 (αα 343-393), την περιοχή πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization sequence) και την περιοχή πρόσδεσης στο DNA με βλάβες, η οποία αναγνωρίζει μονόκλωνες περιοχές DNA

(αα 370-390) (εικόνα 6.2). Οι μεταλλαγές εμφανίζονται κυρίως στην κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης. Η οργάνωση του γονιδιώματος των γονιδίων *p53* διαφορετικών ειδών, δείχνει μια σημαντική ομοιότητα μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί πέντε συντηρημένες περιοχές στον *Xenopus* και στον άνθρωπο, στα εξώνια 4, 5, 7 και 8 (179, 189).



Εικόνα 6.2.: Δομή της πρωτεΐνης p53.

#### 6.4 Λειτουργίες του *p53*

Σε όλα τα φυσιολογικά κύτταρα, η *p53* βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Στην περίπτωση καταστροφής του DNA, τα επίπεδα της *p53* αυξάνονται, με αποτέλεσμα το κύτταρο να οδηγηθεί σε απόπτωση ή σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Αυτό εξαρτάται από ποιο σημείο του κυτταρικού κύκλου βρίσκεται εκείνη την περίοδο το κύτταρο. Συγκεκριμένα, εάν βρίσκεται στην αρχή της G1 φάσης, η *p53* διεγείρει ένα σημείο ελέγχου (checkpoint) το οποίο σταματά τον κυτταρικό κύκλο, για την επιδιόρθωση του DNA πριν το κύτταρο εισέλθει στην S φάση. Εάν όμως ο κυτταρικός κύκλος βρίσκεται στην G2 φάση, τότε το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση.

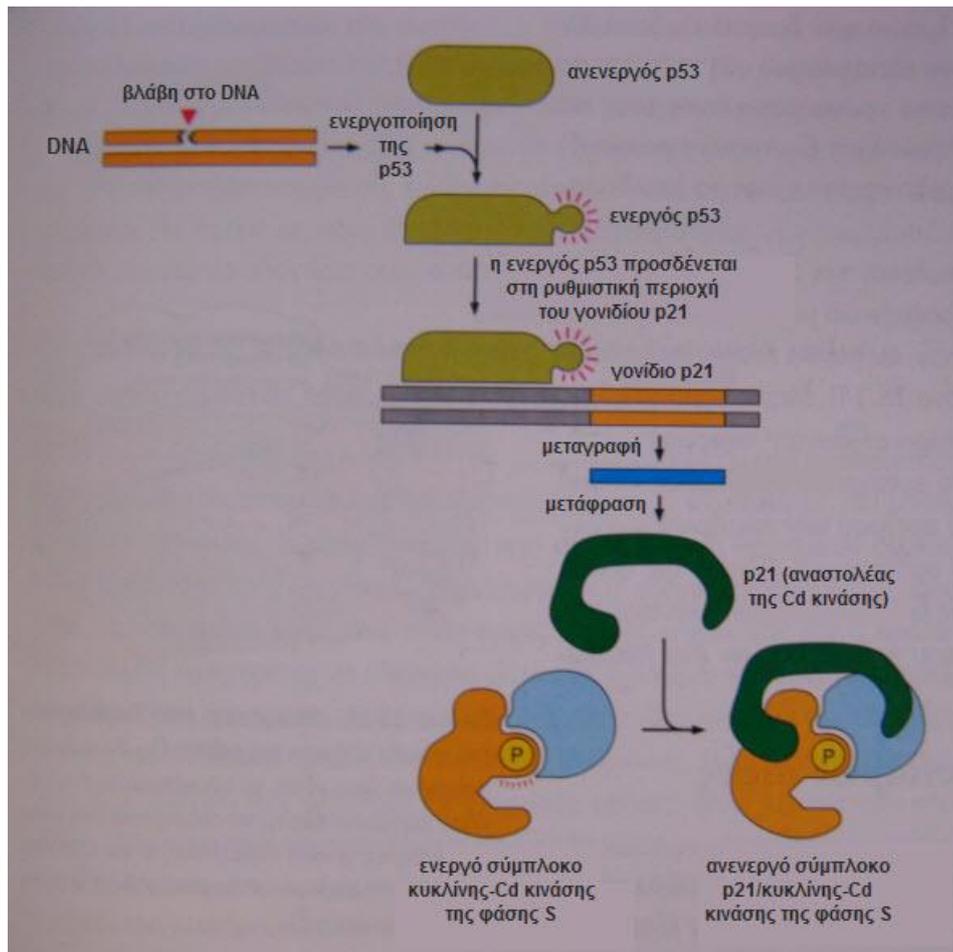
Οι ογκοκατασταλτικές λειτουργίες του *p53* γονιδίου, όπως η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και η απόπτωση, σχετίζονται και με τη ρύθμιση της φυσιολογικής ανάπτυξης, αφού υπάρχουν αρκετές αναφορές σε μοντέλα ποντικών και πτηνών που εμπλέκουν το *p53* στην εμβρυική ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, το *p53* φαίνεται ότι

έχει διαφορετικό πρότυπο έκφρασης κατά την εμβρυική ανάπτυξη, αφού στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης παρουσιάζει υψηλή έκφραση του mRNA, ενώ σε επόμενα στάδια, η έκφραση μειώνεται και περιορίζεται σε συγκεκριμένους ιστούς σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης (190-192).

Η πρωτεΐνη p53 δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση γονιδίων απαραίτητων για την απόπτωση, κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση, μέσω της πρόσδεσης της σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA. Συγκεκριμένα, η καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης p53 προσδέεται ως τετραμερές σε δίκλωνο DNA, με ειδικό τρόπο (193). Τα σημεία πρόσδεσης της πρωτεΐνης, αποτελούνται από δύο δεκαμερή μοτίβα της γενικής μορφής: 5'-PuPuPuC(AT)(AT)GPuPyPy-3' και είναι απαραίτητο να διαχωρίζονται από 0-13bp (194). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της περιοχής πρόσδεσης DNA και τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων της p53.

Η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιείται σε περιπτώσεις κυτταρικού stress που περιλαμβάνουν βλάβη του DNA, ενεργοποίηση κάποιου ογκογονιδίου, ριβοσωμικό στρες και συνθήκες υποξίας (195).

Σε περίπτωση βλάβης του DNA, η p53 πρωτεΐνη όπως αναφέρθηκε και πριν, ενεργοποιείται και διεγείρει τη μεταγραφή ενός γονιδίου (του cdkn1) που κωδικοποιεί μια ανασταλτική πρωτεΐνη των Cd κινασών (Cdk inhibitor proteins), την p21. Η p21 είναι μια φωσφοπρωτεΐνη, μοριακού βάρους 21kDa, που ονομάζεται και Cip1. Η p21 προσδέεται στα σύμπλοκα κυκλίνης-Cd κινάσης της φάσης S του κυτταρικού κύκλου και αναστέλει τη δράση τους. Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 δίνει την ευκαιρία για επιδιόρθωση του κατεστραμμένου DNA, πριν την αντιγραφή (εικόνα 6.3).



Εικόνα 6.3: Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 από την p53. Όταν το DNA υποστεί βλάβη, η πρωτεΐνη p53 αυξάνεται και ενεργοποιείται. Η ενεργός p53 διεγείρει τη μεταγραφή ενός γονιδίου που κωδικοποιεί ένα αναστολέα της Cd κινάσης, την πρωτεΐνη p21. Η p21 προσδένεται στα σύμπλοκα της κυκλίνης-Cd κινάσης της φάσης S και τα απενεργοποιεί. Έτσι, ο κυτταρικός κύκλος σταματά στη φάση G1.

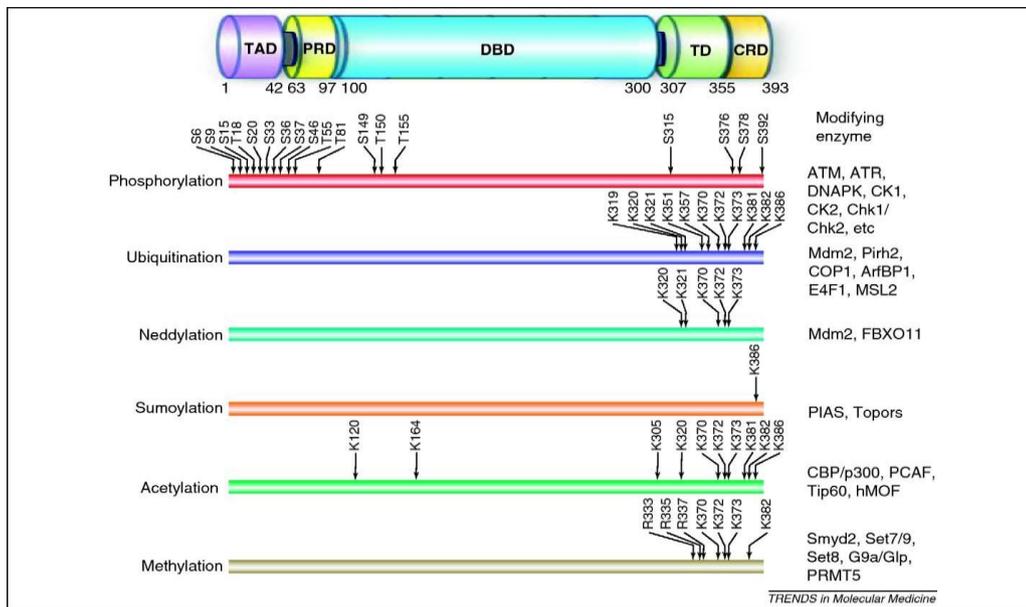
Για την επιδιόρθωση του DNA, η p53 ενεργοποιεί τη μεταγραφή ενός γονιδίου που κωδικοποιεί για μια επιδιορθωτική πρωτεΐνη του DNA, που ονομάζεται Gadd45 (growth arrest and DNA damage-inducible) (196). Εάν η επιδιόρθωση είναι επιτυχής, η p53 αυτο-αναστέλλεται, ενεργοποιώντας το γονίδιο *Mdm2* και η κυτταρική διαίρεση συνεχίζεται κανονικά. Εάν όμως, η επιδιόρθωση του DNA δεν είναι επιτυχής, η p53 ενεργοποιεί το προ-αποπτωτικό γονίδιο *BAX* και τον υποδοχέα Gd95 (ή Fas/Apo1), ενώ παράλληλα αναστέλει τη δράση της πρωτεΐνης Bcl2 (η οποία είναι αναστολέας της απόπτωσης), με αποτέλεσμα το κύτταρο να οδηγηθεί στην απόπτωση (197).

## 6.5 Μετα-μεταφραστικές και μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις

Σε περιπτώσεις βλάβης του DNA, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της p53 (εικόνα 6.4), Mdm2 και Mdmx είναι κυρίως η φωσφορυλίωση (198), ενώ απ'ευθείας ρύθμιση της p53 πραγματοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης, ακετυλίωσης και σουμοϋλίωσης (199). Η πρωτεΐνη p53 είναι υποφωσφορυλιωμένη στις G0/G1 φάσεις συγκριτικά με τη φάση S του κυτταρικού κύκλου, γι αυτό πιστεύεται ότι η υποφωσφορυλιωμένη μορφή της ελέγχει τον κυτταρικό κύκλο. Η φωσφορυλίωση της p53 πραγματοποιείται με διάφορες κινάσες όπως: η κινάση της καζεΐνης I και II, πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες (Cdks), JNK1, κινάση p38, πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από DNA (DNA-PK) σε διάφορα σημεία της πρωτεΐνης (200, 201). Συνήθως η φωσφορυλίωση λαμβάνει χώρα στην αμινοτελική περιοχή της p53 πρωτεΐνης στις σερίνες 6, 9, 15, 20, 33, 37, 46, και στις θρεονίνες 18 and 81 (202). Επίσης, μπορεί να φωσφορυλιωθεί και το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης στις σερίνες 315 και 392 (203, 204).

Η ακετυλίωση παίζει ρόλο στη σταθεροποίηση της p53 με το να εμποδίζει την ουβικουιτίνωση, αναστέλει το σχηματισμό του κατασταλτικού συμπλόκου HDM2/HDMX στους υποκινητές του γονιδίου-στόχου και στρατολογεί μόρια για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του p53 (205). Έχουν βρεθεί εννέα σημεία ακετυλίωσης για την p53 και οι ακετυλοτρανσφεράσες ιστωνών (histone acetyltransferases, HAT) οι οποίες είναι υπεύθυνες για αυτή την τροποποίηση, περιλαμβάνουν τις p300/CBP και pCAF (206).

Οι μετα-μεταφραστικοί μηχανισμοί της p53, οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές της διαμόρφωσης της τετραμερούς p53, σε ενεργοποίηση του σήματος πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και σε κάλυψη περιοχών με σημεία πρόσδεσης Mdm2 οι οποίες ρυθμίζουν αρνητικά την πρωτεΐνη (207). Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο εισέρχεται στον πυρήνα και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας (208).

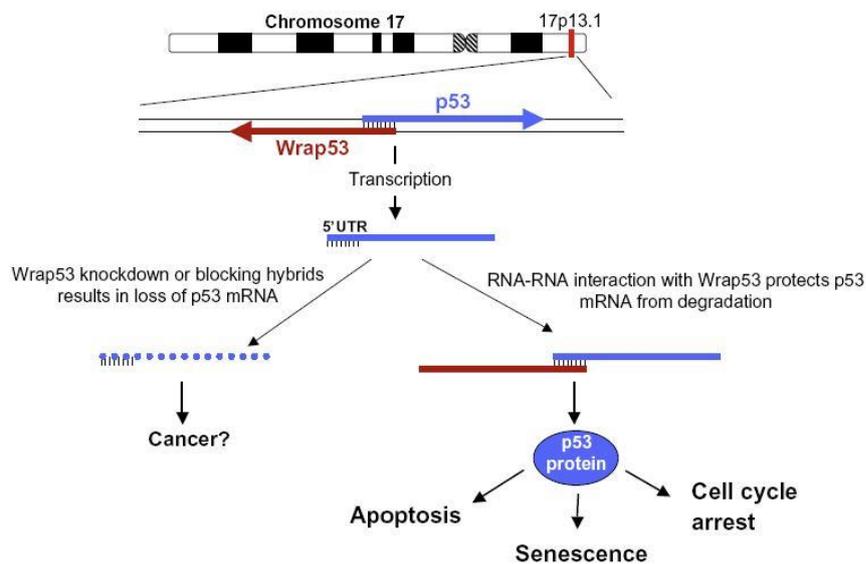


Εικόνα 6.4: Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της p53. Τα κύρια σημεία φωσφορυλίωσης, ουβικουιτινυλίωσης, σουμοϋλίωσης, νεδδυλίωσης, ακετυλίωσης και μεθυλίωσης φαίνονται στην εικόνα. Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την κάθε τροποποίηση φαίνονται στα δεξιά.

Σε επίπεδο mRNA, η μετα-μεταγραφική ρύθμιση της πρωτεΐνης, γίνεται μέσω κάποιων πρωτεϊνών όπως οι: HuR, L26, RPL26, nucleolin, και Wig-1, οι οποίες μπορούν να προσδεθούν στην 5' ή 3' μη-μεταφραζόμενη περιοχή (UTR) του mRNA του p53 γονιδίου, ρυθμίζοντας έτσι, την μετάφραση με διάφορους μηχανισμούς (209, 210). Επίσης, τα microRNAs miR-125a και miR-125b, ρυθμίζουν (downregulate) την έκφραση της p53, αναγνωρίζοντας response element στην 3' μη-μεταφραζόμενη περιοχή του mRNA του p53 (211, 212).

Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ένα φυσικό 'antisense' μετάγραφο του p53, το *Wrap53*, το οποίο φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση του p53. Αυτό το γονίδιο, αλληλεπικαλύπτεται σε κάποιες περιοχές με το p53 γονίδιο στο χρωμόσωμα 17, με αποτέλεσμα τα mRNAs τους να έχουν πλήρη συμπληρωματικότητα στα πρώτα εξώνια, υποδεικνύοντας έτσι ότι αλληλεπιδρούν και ότι το ένα επηρεάζει την έκφραση του άλλου. Αυτή η αλληλεπίδραση προστατεύει-καλύπτει κάποιες αλληλουχίες-

στόχους του mRNA της p53, με αποτέλεσμα να την προστατεύει από αποδόμηση. Επίσης, αυτή η αλληλεπίδραση είναι σημαντική και για την απόκριση της p53 σε περιπτώσεις καταστροφής του DNA (εικόνα 6.5). Η απαλοιφή του γονιδίου *Wrap53* ή η αναστολή της αλληλεπίδρασης των mRNAs των *Wrap53* και *p53*, εμποδίζουν την επαγωγή της p53 και την ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων της. Τα επίπεδα mRNA των *p53* και *Wrap53* αυξάνονται όταν υπάρχει βλάβη στο DNA και η υπερέκφραση του *Wrap53*, διεγείρει την p53 στο να οδηγήσει τα κύτταρα σε απόπτωση. Βάσει όλων αυτών, η δυσλειτουργία του *Wrap53*, μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα νέο μηχανισμό απενεργοποίησης της p53, σε όγκους που φέρουν φυσιολογικό *p53* (213, 214).



Εικόνα 6.5: Ρύθμιση της p53 από το *Wrap53*. Η αλληλεπίδραση των δύο μεταγράφων στην εκκαλυπτόμενη περιοχή τους, προστατεύει το mRNA της p53 από την αποδόμηση. Η απώλεια του *Wrap53* έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων mRNA της p53, ενώ αντίθετα η υπερέκφραση του *Wrap53*, αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του mRNA και της πρωτεΐνης p53 .

## 6.6 Ρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης p53

Οι Mdm2 και οι Mdm4 (Mdmx) είναι οι κύριες ογκοπρωτεΐνες που ρυθμίζουν αρνητικά την p53. Προσδένονται στο αμινοτελικό άκρο της p53 (αα 25-110), για να μπλοκάρουν την μεταγραφική της ενεργότητα. Η Mdm2 έχει πυρηνικές αλληλουχίες εντοπισμού και εξόδου, μεταξύ των αμινοξέων 175 και 195 (215) και λειτουργεί σαν E3 λιγάση ουβικουιτίνης (E3 ubiquitin ligase), για την αποικοδόμηση της p53 στο πρωτεάσωμα (216), ενώ η Mdm4 αναστέλλει τη μεταγραφή του p53 (217). Η πρωτεΐνη Mdm2 ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη p14Arf (p19Arf στα ποντίκια), η οποία θεωρείται θετικός ρυθμιστής της p53, αφού έχει την ικανότητα να αναστείλει την Mdm2, οδηγώντας έτσι σε υψηλές συγκεντρώσεις της p53 (218). Σε μελέτες σε *Mdm2*- και *Mdm4*-knockout ποντίκια, παρατηρήθηκε ο θάνατος αυτών των ποντικών σε αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης, λόγω του ότι η λειτουργία της p53 δεν μπορούσε να ανασταλεί, με αποτέλεσμα τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση. Η απαλοιφή του γονιδίου p53, σε αυτά τα ποντίκια όμως, συντέλεσε στην επιβίωση τους (219, 220). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ρύθμιση της ενεργότητας της p53 από τα *Mdm2* ή *Mdm4*, είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ανάπτυξη.

## 6.7 Μεταλλαγές της p53

Το p53 γονίδιο είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο στους ανθρώπινους όγκους. Η έκφραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης πραγματοποιείται όταν δεν υπάρχει κανένα φυσιολογικό αλληλόμορφο του γονιδίου (179). Οι μεταλλαγές στο p53 γονίδιο μπορεί να έχουν τις εξής συνέπειες: α) απώλεια της λειτουργίας, β) η μεταλλαγμένη p53 να είναι επικρατής ως προς τη φυσιολογική και γ) η απόκτηση δυναμικού μετασχηματισμού για την p53 (221).

Υπάρχουν διάφορα θερμά σημεία μεταλλαγών για το p53, τα οποία εξαρτώνται από τον τύπο του όγκου, π.χ μεταλλαγές στα κωδικόνια 248, 273 και 282 εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε καρκίνο του παχέως εντέρου, μεταλλαγές στο 273 σε όγκους εγκεφάλου, ενώ μεταλλαγές στο 242 και στο 273 είναι πιο συχνές στον καρκίνο του πνεύμονα (179).

Η περιοχή πρόσδεσης του DNA είναι η πιο συχνά μεταλλαγμένη περιοχή, ειδικά στα εξώνια 4, 5, 7 και 8. Αντικαταστάσεις στα αμινοξέα αυτής της περιοχής, οδηγούν σε

μεταλλαγμένη p53 πρωτεΐνη, η οποία δεν μπορεί να προσδέσει φυσιολογικά το DNA ή στερείται ικανότητας ενεργοποίησης της μεταγραφής (222).

Οι μεταλλαγές στο p53 έχουν διάφορες επιπτώσεις στην πρωτεΐνη όπως: αύξηση του χρόνου ημιζωής της από 20min σε μερικές ώρες (223, 224), με αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης της και την αλλαγή της θέσης της, από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα την ανικανότητα πρόσδεσης της με το DNA. Ακόμα, έχει βρεθεί ότι μεταλλαγμένες μορφές της p53, συνεργάζονται με τα ενεργοποιημένα γονίδια *Ras* στον κυτταρικό μετασχηματισμό (224).

## 6.8 p53 και όγκοι εγκεφάλου

Η εμπλοκή της p53 στον κακοήγη μετασχηματισμό των αστροκυττωμάτων, βρέθηκε όταν η έκφραση εξωγενούς φυσιολογικής p53 σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστωμάτων, κατέστειλε την ανάπτυξη τους (225). Η άποψη ότι οι μεταλλαγές παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των όγκων εγκεφάλου, υποστηρίχθηκε από το γεγονός ότι ασθενείς με σύνδρομο Li-Fraumeni, έχουν υψηλή πιθανότητα (~13%) δημιουργίας όγκων εγκεφάλου, σε μικρή ηλικία (226). Η πλειοψηφία των όγκων εγκεφάλου στους ασθενείς με σύνδρομο Li-Fraumeni είναι αστροκυττώματα, στα οποία το γονίδιο p53 είναι συχνά μεταλλαγμένο (227). Η απώλεια ενός αλληλομόρφου στο χρωμόσωμα 17 και οι μεταλλαγές στο p53, έχουν παρατηρηθεί περίπου στο 1/3 των αστροκυττωμάτων βαθμού κακοήθειας II, III και IV σε ενήλικες, υποδεικνύοντας έτσι ότι η απενεργοποίηση της p53, είναι πρώιμο γεγονός στη δημιουργία αστροκυττωμάτων βαθμού κακοήθειας II (228). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η ενεργότητα της p53 είναι ανάλογη με το βαθμό κακοήθειας. Συγκεκριμένα, στα αστροκυττώματα βαθμού κακοήθειας II: 18-46%, στα III: 29-57% και στα IV: 49-70% (229-231).

Θερμά σημεία (hot-spots) μεταλλαγών για το p53 στους όγκους εγκεφάλου είναι το 273, 248 και το 175 (232).

Ενώ οι μεταλλαγές του p53 συσχετίζονται με την πρόγνωση σε αρκετούς όγκους, όπως καρκίνος του μαστού, στομάχου και πνεύμονα (233, 234), στα αστροκυττώματα ο ρόλος του p53 σε σχέση με την πρόγνωση, δεν έχει ακόμα πλήρως ξεκαθαριστεί. Μελέτες δείχνουν ότι σε χαμηλής κακοήθειας αστροκυττώματα τα οποία εξελίσσονται σε γλοιοβλαστώματα, υπάρχει μεγάλη συχνότητα p53 μεταλλαγών, της τάξης του 58-83%. (230, 235). Επίσης, φαίνεται ότι ο χρόνος εξέλιξης ενός χαμηλής κακοήθειας

αστροκυττώματος σε γλοιοβλάστωμα, είναι μικρότερος σε ασθενείς με μεταλλάξεις στο *p53* σε σχέση με ασθενείς που δεν φέρουν μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο γονίδιο (230). Άλλες μελέτες όμως, αναφέρουν ότι οι μεταλλάξεις στο *p53* δεν επηρεάζουν την κλινική εικόνα του ασθενούς και το χρόνο επιβίωσης του (236-238). Σε αντίθεση με τα αστροκυττώματα, οι μεταλλάξεις στο *p53* φαίνεται να μην παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των επενδυωμάτων, πινεοκυτωμάτων, πινεοβλαστωμάτων και των μυελοβλαστωμάτων (239-241).

Όσον αφορά τα μηνιγγιώματα, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη βιβλιογραφία, είναι αμφιλεγόμενα ως προς το ρόλο της *p53*. Στοιχεία όπως η απουσία μεταλλαγών του *p53* στα μηνιγγιώματα (227, 242, 243), η έλλειψη μη-κανονικής έκφρασης της *p53* πρωτεΐνης ή της *Mdm2* σε μηνιγγιώματα και σε κυτταρικές σειρές μηνιγγιωμάτων (244) και τέλος η ομοιότητα της έκφρασης της *p53* πρωτεΐνης σε μηνιγγιώματα διαφορετικών βαθμών κακοήθειας (245), συνηγορούν στην υπόθεση ότι το μονοπάτι της *p53* δεν παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και ανάπτυξη των μηνιγγιωμάτων. Από την άλλη πλευρά, άλλες μελέτες υποστηρίζουν την εμπλοκή της *p53* στην ανάπτυξη των μηνιγγιωμάτων. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί η υπερέκφραση της πρωτεΐνης *p53* και η συσχέτιση της έκφρασης της με τον βαθμό κακοήθειας των όγκων και την υποτροπή των μηνιγγιωμάτων (246-248), καθώς και η απώλεια της πρωτεΐνης *Mdm2* στα μηνιγγιώματα υψηλής κακοήθειας (249).

## ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Οι διάφοροι τύποι κακοήθων όγκων εγκεφάλου έχουν μελετηθεί σχετικά λιγότερο από τους υπόλοιπους όγκους του ανθρωπίνου σώματος. Οι περισσότεροι συχνόι σε εμφάνιση τύποι είναι τα γλοιοβλαστώματα και τα μηνιγγιώματα. Αν και η αιτιολογία των κακοήθων όγκων του εγκεφάλου είναι άγνωστη, μοριακές μελέτες έχουν καταδείξει μοριακούς μηχανισμούς, εμπλεκόμενους στη γενικότερη παθοφυσιολογία της νόσου με συμμετοχή πολλών ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών, καθώς και διάφορα γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των όγκων.

Η μεγάλη πιθανότητα υποτροπής των γλοιωμάτων, καθώς και η πολύ κακή πρόγνωση που τα χαρακτηρίζει, οδήγησε στο μεγάλο ενδιαφέρον για τη διερεύνηση του βιολογικού υπόβαθρου της δημιουργίας και εξέλιξης των γλοιωμάτων.

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η εκτίμηση της μοριακής παθογένεσης των όγκων του εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η οικογένεια των ογκογονιδίων *Ras*, τα 3 γονίδια της οικογένειας *Akt*, ο άξονας *SDF-1/CXCR4* καθώς και το ογκοκαταστακτικό γονίδιο *p53*, ως πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες της δημιουργίας νεοπλασιών στον εγκέφαλο του ανθρώπου και για να διευκρινιστεί ο ρόλος τους στην κακοήθη εξαλλαγή και εξέλιξη των όγκων του εγκεφάλου.

Λεπτομερώς οι στόχοι της παρούσας διατριβής ήταν:

1. Η μελέτη της έκφρασης σε επίπεδο mRNA των ογκογονιδίων *Kras*, *Hras* και *Nras*, των γονιδίων της οικογένειας *Akt* (*Akt-1*, *Akt-2* και *Akt-3*), του άξονα *SDF-1/CXCR4* καθώς και του ογκοκαταστακτικού γονιδίου *p53*, σε δείγματα ιστών από γλοιώματα και μηνιγγιώματα, που εξαιρέθηκαν κατά τη χειρουργική επέμβαση ασθενών με όγκο στον εγκέφαλο, καθώς και σε παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς από τους ίδιους ασθενείς.
2. Ο προσδιορισμός πιθανών γενετικών αλλοιώσεων υπό μορφή μεταλλάξεων των γονιδίων της οικογένειας *Ras*, καθώς και του γονιδίου *p53*, στα δείγματα γλοιωμάτων και μηνιγγιωμάτων.
3. Η μελέτη των επιπέδων της πρωτεΐνης *p21*, που παράγεται από τους καρκινικούς και φυσιολογικούς ιστούς στα γλοιώματα. Στόχος αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθεί εάν οι μεταβολές της έκφρασης των ογκογονιδίων *Ras* που λαμβάνουν χώρα σε μεταγραφικό

επίπεδο στη δημιουργία όγκων εγκεφάλου, συνοδεύονται από αντίστοιχες μεταβολές στην έκφραση της παραγόμενης πρωτεΐνης ή εάν πραγματοποιείται μετα-μεταγραφική ρύθμιση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

4. Η ταυτοποίηση του προφίλ έκφρασης όλων των υπό μελέτη γονιδίων, στα δείγματα των γλοιωμάτων και των μηνιγγιωμάτων, για τον προσδιορισμό του αιτιολογικού παράγοντα της ενεργοποίησης των αντίστοιχων σηματοδοτικών μονοπατιών.

5. Η συσχέτιση του προφίλ έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων με τα κλινικά χαρακτηριστικά των όγκων, με στόχο τη διερεύνηση πιθανών γενετικών υποκατηγοριών των όγκων αυτών και την ενδεχόμενη διαφοροποίησή τους, όσον αφορά στην πρόγνωση.

6. Η συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων της οικογένειας *Akt* και των γονιδίων *SDF-1α*, *SDF-1β* και *CXCR4* στα γλοιώματα και στα μηνιγγιώματα, για να διευκρινιστεί εάν υπάρχει συνδυασμένη δράση του μονοπατιού του *Akt* με τον άξονα *SDF-1/CXCR4*, ως παράγοντα για την αιτιολογία της κακοήθους εξαλλαγής των κυττάρων του εγκεφάλου στον άνθρωπο.

Προέκταση της παραπάνω μελέτης θα αποτελέσει η πιθανή συμβολή αυτών των μοριακών δεικτών στην έγκαιρη και ακριβή διάγνωση των εν λόγω κακοηθειών σε πρώιμα στάδια. Μελλοντικός στόχος θα μπορούσε να είναι η θεραπευτική διαφοροποίηση ανάλογα με το γενετικό προφίλ του όγκου.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 7.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

##### 7.1.1 Συλλογή δειγμάτων όγκων εγκεφάλου

Για την παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν ιστοί από εγκέφαλο οι οποίοι συλλέχθηκαν σε χρονικό διάστημα 2 περίπου ετών (2005-2007), από την Νευροχειρουργική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΑ.Γ.Ν.Η). Τα δείγματα των ιστών που μελετήθηκαν προέρχονται από ασθενείς ανεξαρτήτου ηλικίας με απεικονιστικά κριτήρια κακοήθους νεοπλασίας εγκεφάλου και για τους οποίους είχε τεθεί ένδειξη χειρουργικής θεραπείας ή λήψης βιοψίας, χωρίς προηγουμένως να έχουν λάβει χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή οποιαδήποτε άλλη θεραπεία. Εάν για την αφαίρεση του όγκου απαιτήθηκε προσπέλαση διά μέσω φυσιολογικού εγκεφαλικού παρεγχύματος, τότε λήφθηκαν και δείγματα φυσιολογικού ιστού, τα οποία κρίθηκαν ως φυσιολογικά, μη-κακοήθη από παθολογοανατόμο. Οι ιστοί μετά τη λήψη τους, καταψύχθηκαν άμεσα στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , μέχρι και τη χρήση τους.

##### 7.1.2 Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων

Συνολικά για την ομάδα των γλοιωμάτων μελετήθηκαν 29 γλοιώματα και 14 φυσιολογικά δείγματα. Οι ασθενείς που αποτελέσαν την ομάδα των γλοιωμάτων ήταν ηλικίας 35-78 ετών, με μέσο όρο ηλικίας  $64,1 \pm 2$  έτη. Ο ιστολογικός τύπος της ομάδας των γλοιωμάτων αφορούσε πολύμορφα γλιοβλαστώματα (glioblastomas multiforme, GBM) σε ποσοστό 72% ( $n=21$ ) και αστροκυτώματα (astrocytomas) σε ποσοστό 28% ( $n=8$ ). Ανάλογα με τον ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης, τα γλοιώματα της παρούσας μελέτης αποτελούνταν από 4 δείγματα (14%) υψηλής διαφοροποίησης (Grade II), 4 δείγματα (14%) μέσης διαφοροποίησης (Grade III) και 21 (72%) δείγματα χαμηλής διαφοροποίησης (Grade IV). Τα ζεύγη παθολογικών-φυσιολογικών δειγμάτων ανέρχονταν στα 12. Στον πίνακα 7.1 παρουσιάζονται συνοπτικά τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

που αποτέλεσαν την ομάδα των γλοιωμάτων που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα διατριβή.

<b>Χαρακτηριστικά</b>	<b>Αριθμός ασθενών</b>
<b><i>Συνολικός αριθμός ασθενών</i></b>	29
<b><i>Ηλικία</i></b>	
Μέσος όρος±SEM (standard error of the mean)	64.1±2
Εύρος ηλικίας	35-78
<b><i>Ιστολογικός τύπος</i></b>	
Γλοιοβλαστώματα	21
Αστροκυττώματα	8
Φυσιολογικοί ιστοί	14
<b><i>Βαθμός διαφοροποίησης</i></b>	
Grade II (ινώδη αστροκυττώματα)	4
Grade III (αναπλαστικά αστροκυττώματα)	4
Grade IV (πολύμορφα γλοιοβλαστώματα)	21
<b><i>Ζεύγη</i></b>	
Grade IV (πολύμορφα γλοιοβλαστώματα)	12

**Πίνακας 7.1:** Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών της ομάδας των γλοιωμάτων

Η ομάδα των μηνιγγιωμάτων περιλάμβανε 23 παθολογικά δείγματα και 4 φυσιολογικούς ιστούς. Στον πίνακα 7.2 παρουσιάζονται συνοπτικά τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών που αποτέλεσαν την ομάδα των μηνιγγιωμάτων που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Η παρούσα μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Θεσμικής Δεοντολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

<b>Χαρακτηριστικά</b>	<b>Αριθμός ασθενών</b>
<b>Συνολικός αριθμός ασθενών</b>	23
<b>Ιστολογικός τύπος</b>	
Μηνιγγιώματα	23
Φυσιολογικοί ιστοί	4

**Πίνακας 7.2:** Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών της ομάδας των μηνιγγιωμάτων

## 7. 2. ΜΕΘΟΔΟΙ

### A. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

#### 7.2.1 Απομόνωση ολικού RNA από τους ιστούς

Η απομόνωση του ολικού RNA από τους ιστούς πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της τροποποιημένης μεθόδου των Chomczynsky and Sacchi (1987) και χρήση του αντιδραστηρίου Trizol (Invitrogen), 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. Συνοπτικά, το δείγμα ομογενοποιείται με τη βοήθεια ειδικού μηχανικού ομογενοποιητή με έμβολο από τεφλόν, μέσα σε διάλυμα Trizol. Στη συνέχεια εκχυλίζεται το RNA από το φαινολικό διάλυμα του Trizol με προσθήκη χλωροφορμίου. Ακολουθεί κατακρήμνιση του RNA με προσθήκη ισοπροπανόλης και το ίζημα του RNA εκπλένεται με 75% αιθανόλη και αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα. Η επαναιώρηση του RNA πραγματοποιείται με νερό ελεύθερο νουκλεασών (DEPC-H<sub>2</sub>O) και τα δείγματα RNA αποθηκεύονται στους -80 °C έως τη χρήση τους.

#### 7.2.2 Απομόνωση ολικού DNA από τους ιστούς

Το DNA απομονώθηκε με δύο τρόπους. Στην περίπτωση που ο όγκος των χειρουργικά εξαιρεθέντων ιστοτεμαχίων το επέτρεψε, χρησιμοποιήθηκαν γνωστά πρωτόκολλα απομόνωσης DNA από ιστό τα οποία περιλαμβάνουν ομογενοποίηση και

λύση κυτταρικών μεμβρανών με χρήση πρωτεΐνάσης K. Ακολούθως το DNA εκχυλίζεται με φαινόλη/χλωροφόρμιο και στη συνέχεια κατακρημνίζεται με προσθήκη 1/20 όγκου NaCl 5M και 2.5 όγκων απόλυτης αιθανόλης. Στη συνέχεια πραγματοποιείται έκπλυση του DNA με 70% αιθανόλη και επαναιώρηση σε ddH<sub>2</sub>O. Τα δείγματα DNA αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20 °C έως τη χρήση τους.

Στην περίπτωση που το εξαιρεθέν ιστοτεμάχιο ήταν πολύ μικρού όγκου, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση DNA από το ίδιο ιστοτεμάχιο από το οποίο είχε πραγματοποιηθεί προγενέστερα η εκχύλιση RNA. Συγκεκριμένα, μετά την εκχύλιση του RNA με προσθήκη χλωροφορμίου, προστέθηκε απόλυτη αιθανόλη στο υποκείμενο φαινολικό διάλυμα προς κατακρήμνιση του DNA. Ακολούθησε έκπλυση του DNA με 70% αιθανόλη και επαναιώρησή του σε ddH<sub>2</sub>O.

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

Η καθαρότητα και η συγκέντρωση του RNA και DNA προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση σε σπεκτροφωτόμετρο (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.

### **7.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση επιτυγχάνει τη γρήγορη και εκλεκτική ενίσχυση με εκθετικό τρόπο, συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών από οποιοδήποτε δείγμα DNA που τις περιέχει. Η ενίσχυση της αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει πραγματοποιείται με τη βοήθεια του θερμοανθεκτικού ενζύμου *Taq* DNA πολυμεράση, ειδικών εκκινητών (ολιγονουκλεοτίδια για την εκκίνηση της αντιγραφής, ειδικά για κάθε αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί) και μίγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων.

Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι εξής: αρχική θερμική αποδιάταξη του DNA στους 95 °C για 5min και ακολουθούν 35 κύκλοι αποδιάταξης στους 95 °C, υβριδοποίηση

των εκκινητών στην αντίστοιχη θερμοκρασία για καθε εκκινητή (πίνακας 7.3) και επιμήκυνση στους 72 °C, διάρκειας 30sec το κάθε βήμα. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει επώαση στους 72 °C για 5min για τον πολυμερισμό των ημιτελών PCR προϊόντων και ψύξη στους 4 °C.

<i>Γονίδιο</i>	<i>Αλληλουχία εκκινητών (5'-3')</i>	<i>Μέγεθος προϊόντος (bp)</i>
<i>Kras</i>	F:ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT R: TCAAAGAATGGTCCTGGACC	156
<i>Hras</i>	F: GAGACCCTGTAGGAGGACCC R: GGGTGCTGAGACGAGGGACT	312
<i>Nras</i>	F: AACTGGTGGTGGTTGGACCA R: ATATTCATCTACAAAGTGGTCCTGGA	83
<i>P53</i>	F: GGGAGTAGATGGAGCCTGGTTTTT R: CGCTTCTTGCCTGCTTGCTTA	249

**Πίνακας 7.3:** Αλληλουχίες εκκινητών και συνθήκες PCR αντιδράσεων

### 7.2.5 Αντίστροφη μεταγραφική-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)

Κατά τη μέθοδο αυτή το αρχικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται στην αντίδραση είναι το RNA, το οποίο μετατρέπεται σε συμπληρωματικό DNA (cDNA), με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase). Η αντίστροφη μεταγραφική πραγματοποιείται σε 3μg ολικού RNA σε όγκο 20μl (200Mm Tris HCl; Ph 8,4, 500Mm KCl, 25Mm MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M DTT, 10Mm dNTPs, 50ng random hexamers και 200 U Thermoscript II Rnase H – Reverse Transcriptase) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### 7.2.6 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, μπορούν να ποσοτικοποιηθούν τα προϊόντα 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 7.4. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να παρεμβάλλεται τουλάχιστον ένα ιντρόνιο ανάμεσα τους, για να αποφευχθεί η ενίσχυση πιθανού εναπομείναντος DNA.

Για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων, χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας, το γονίδιο της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης (GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

Για τη Real-time PCR χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο SYBR® Green II Master Mix (Stratagene) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και το μηχάνημα Mx3000P Real-time PCR system (Stratagene).

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε 1μl DNA από κάθε δείγμα, 2X Brilliant SYBR® Green QPCR Master Mix, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200-400 nM από κάθε εκκινητή και 30 mM χρωστική ROX σαν παθητική χρωστική, σε συνολικό όγκο αντίδρασης 20μl. Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε μίγμα των cDNA όλων των δειγμάτων και με διάφορες αραιώσεις του, δημιουργήθηκαν 5 πρότυπα διαλύματα (standards) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Τα πρότυπα διαλύματα έτρεξαν στην ίδια πλάκα με τα δείγματα, 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).

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητών (5'-3')	Θερμοκρασία υβριδοποίησης εκκινητών (°C)	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
<i>Kras</i>	F: GGGGAGGGCTTTCTTTGTGTA R: GTCCTGAGCCTGTTTTGTGTC	60	174
<i>Hras</i>	F: GGGGCAGTCGCGCCTGTGAA R: CCGGC GCCCACCACCACCAG	65	110
<i>Nras</i>	F: CTCCTCTGTGTATTTGCCATCA R: GCACCATAGGTACATCATCCGA	45	107
<i>Akt-1</i>	F: TCTATGGCGCTGAGATTGTG R: CTTAATGTGCCCGTCCTTGT	58	113
<i>Akt-2</i>	F: TGAAAACCTTCTGTGGGACC R: TGGTCCTGGTTGTAGAAGGG	60	145
<i>Akt-3</i>	F: GGCGAGCTGTTTTCCATTTG R: GGCCATCTTTGTCCAGCATTAG	58	160
<i>SDF-1α</i>	F: TGAGAGCTCGTCTTGAGTGA R: CACCAGGACCTTCTGTGGAT	55	233
<i>SDF-1β</i>	F: CTAGTCAAGTGC GTCCACGA R: GGACACACCACAGCACAAAC	55	221
<i>CXCR4</i>	F: GGTGGTCTATGTTGGCGTCT R: TGGAGTGTGACAGCTTGGAG	55	227
<i>P53</i>	F: GTGAGCGCTTCGAGATGTTC R: ATGGCGGGAGGTAGACTGAC	60	137
<i>GAPDH</i>	F: GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA R: GTCATTGATGGCAACAATATCCACT	60	101

**Πίνακας 7.4:** Αλληλουχίες εκκινητών και συνθήκες Real-time PCR αντιδράσεων

### 7.2.7 Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικού τμήματος (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

Οι πολυμορφισμοί μεγέθους περιοριστικού τμήματος είναι πολυμορφισμοί του DNA, οι οποίοι ανιχνεύονται μετά από πέψη με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Αυτές οι αλλαγές στην αλληλουχία του γονιδιακού DNA, οδηγούν στη δημιουργία διαφόρων μηκών τεμαχισμένου DNA μετά από την πέψη, τα οποία ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση.

Η μελέτη του κωδικόνιου 12 στα γονίδια *K-*, *H-* και *Nras* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του περιοριστικών ενζύμων BstNI (MvaI) για το *Kras* και *Nras* και το MspI (HpaII) για το *Hras*, τα οποία επιλέχθηκαν ειδικά ώστε να αναγνωρίζουν την ύπαρξη

συγκεκριμένων μεταλλαγών. Το BstNI (MvaI) αναγνωρίζει την αλληλουχία: CC(A/T)GG, ενώ το MspI (HpaII) την αλληλουχία: CCGG.

Τα προϊόντα των πέψεων για κάθε γονίδιο αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% και είναι τα εξής:

- Kras για το φυσιολογικό αλληλόμορφο: 15bp, 29bp και 113bp και για το μεταλλαγμένο: 15bp και 142bp

- Hras για το φυσιολογικό αλληλόμορφο: 21bp, 55bp και 236bp και για το μεταλλαγμένο: 21bp και 291bp

- Nras για το φυσιολογικό αλληλόμορφο: 19bp, 23bp και 41bp και για το μεταλλαγμένο: 23bp και 60bp

### 7.2.8 Αλληλούχιση (Sequencing)

Τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά στην ύπαρξη μεταλλαγών στα γονίδια *Ras*, επιβεβαιώθηκαν με ανάλυση της αλληλουχίας των PCR προϊόντων (sequencing). Τα προϊόντα της PCR που αφορούσαν το γονίδιο της p53, στάλθηκαν κατευθείαν για αλληλούχιση, για την ανίχνευση μεταλλαγών στο κωδικόνιο 273. Τα προϊόντα της PCR “καθαρίστηκαν” από τις προσμίξεις με τη βοήθεια του Wizard SV Gel και του PCR clean-up system (Promega, USA) και ενισχύθηκαν με το BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) σε συνολικό όγκο αντίδρασης 10μl. Η αλληλούχιση και η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν με το ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) χρησιμοποιώντας το Sequence Analysis 3.7 software (Applied Biosystems, USA).

### 7.2.9 Χρώση με Βρωμιούχο αιθίδιο

Η ανίχνευση των PCR προϊόντων πραγματοποιείται με χρώση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 10ng/μl. Οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

## **B. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

### **7.2.10 Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης από συμπαγείς ιστούς**

Η απομόνωση ολικής πρωτεΐνης από συμπαγείς ιστούς πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol (Invitrogen), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, από το ίδιο τμήμα του ιστού που έγινε η απομόνωση του DNA και RNA, έγινε και η απομόνωση της πρωτεΐνης. Συνοπτικά, μετά την εκχύλιση του RNA με προσθήκη χλωροφορμίου, προστέθηκε απόλυτη αιθανόλη στο υποκείμενο διάλυμα για να κατακρημνιστεί το DNA. Ακολούθως, με προσθήκη ισοπροπυλικής αλκοόλης και αφού προηγουμένως απομακρύνθηκε το ίζημα του DNA, κατακρυμνίστηκαν οι πρωτεΐνες. Ακολούθησε έκπλυση των πρωτεϊνών με αιθανόλη και στέγνωμα στον αέρα. Τέλος, οι πρωτεΐνες επαναιωρήθηκαν σε 1% SDS και επωάστηκαν στους 50 °C.

### **7.2.11 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford**

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος της πρωτεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X PBS στα 595nm με τη χρήση της χρωστικής Bradford. Αρχικά δημιουργείται μια πρότυπη καμπύλη με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm, πρότυπων διαλυμάτων βόειου αλβουμίνης (BSA), διαφόρων συγκεντρώσεων (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20μg/μl). Η πρότυπη καμπύλη απορρόφησης κατασκευάζεται ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης και από αυτή υπολογίζεται η εξίσωση που διέπει την πρότυπη καμπύλη, η οποία είναι της μορφής  $y=ax+b$ . Η φωτομέτρηση των δειγμάτων της πρωτεΐνης γίνεται εις διπλούν και υπολογίζεται η μέση τιμή απορρόφησης σε κάθε δείγμα. Με βάση την πρότυπη καμπύλη, υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα.

### **7.2.12 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των πρωτεϊνών**

Οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% SDS-PAGE (29:1 ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο). Το πήκτωμα αποτελείται από δύο μέρη: το πήκτωμα διαχωρισμού των πρωτεϊνών (separating or resolving gel) και το πήκτωμα επιστοίβαξης των πρωτεϊνών (stacking gel) για την ομοιόμορφη είσοδο των πρωτεϊνών στο πήκτωμα διαχωρισμού. Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 30μg πρωτεΐνης τα οποία αναμίχθηκαν με διάλυμα φόρτωσης-αποδιάταξης και ακολούθως αποδιάταχθηκαν με θέρμανση στους 95 °C για 5-10min και ψύξη σε πάγο.

### **7.2.13 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western Blot analysis)**

Τα δείγματα των πρωτεϊνών μετά την ηλεκτροφόρηση μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη βοήθεια ειδικής συσκευής, σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για τη μεταφορά πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα στη μεμβράνη λόγω του ότι είναι αρνητικά φορτισμένες και αυτό επιτυγχάνεται με τη διοχέτευση ηλεκτρικού ρεύματος από τη συσκευή. Ακολούθως, η μεμβράνη επώάζεται με διάλυμα blocking (5% αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη και ρυθμιστικό διάλυμα TBS 1X), έτσι ώστε να δεσμευτούν οι κενές θέσεις πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Αφού η μεμβράνη εκπλυθεί από την περίσσεια του διαλύματος blocking με διάλυμα TBS-T (Tris buffer saline, 1% Tween 20), προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα ( 1:1000 mouse anti-Ras, 1:10000 mouse anti-actin) σε διάλυμα TBS-T με 1% γάλα. Μετά τις εκπλύσεις του αντισώματος προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα (1:10000 anti-mouse το οποίο είναι προσδεδεμένο με το ένζυμο HRP, υπεροξειδάση του ραπανιού). Μετά από τις κατάλληλες εκπλύσεις, στη μεμβράνη προστίθεται το διάλυμα εμφάνισης ECL. Ακολουθεί η εμφάνιση σε φωτογραφικό φιλμ, όπου αποτυπώνεται η χημειοφωταύγεια από τις πρωτεΐνες.

## Γ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

### 7.2.14 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Οι τιμές έκφρασης του mRNA για κάθε δείγμα υπολογίστηκαν με βάση τις κανονικοποιημένες τιμές έκφρασης του γονιδίου στόχου 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, χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση: Κανονικοποιημένη τιμή δείγματος=

$$(1+E_{\text{Γονίδιο στόχος}})^{-\Delta Ct_{\text{Γονίδιο στόχος}}}/(1+E_{\text{GAPDH}})^{-\Delta Ct_{\text{GAPDH}}}$$

Προκειμένου να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης των εξεταζόμενων γονιδίων στα δείγματα, πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές ομαδοποιήσεις με δύο αντίστοιχα διαφορετικές στατιστικές αναλύσεις:

α) Η πρώτη ομαδοποίηση διαχώρησε τα δείγματα σε δύο ομάδες: 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. Ακολούθως, για τη μελέτη του προφίλ έκφρασης κάθε δείγματος (υπερέκφραση, υποέκφραση ή κανονική έκφραση), η κανονικοποιημένη τιμή έκφρασης κάθε παθολογικού δείγματος διαιρέθηκε με το μέσο όρο των κανονικοποιημένων τιμών των φυσιολογικών δειγμάτων. Εάν το πηλίκο αυτό είναι μεγαλύτερο από δύο, τότε το γονίδιο θεωρείται υπερέκφρασμένο στο συγκεκριμένο δείγμα, εάν το πηλίκο που προκύπτει είναι μικρότερο του 0,5 θεωρείται υποέκφρασμένο και εάν το πηλίκο είναι ανάμεσα στο 2 και 0,5 θεωρείται ότι έχει κανονική έκφραση.

β) Η δεύτερη ομαδοποίηση διαχώρησε τα δείγματα σε ζεύγη (παθολογικό-φυσιολογικό) και είχε ως στόχο τη μελέτη των ζευγών δειγμάτων από τον κάθε ασθενή. Σε αυτή την περίπτωση, η κανονικοποιημένη τιμή έκφρασης κάθε παθολογικού δείγματος, διαιρέθηκε με την αντίστοιχη κανονικοποιημένη τιμή του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού του ίδιου ασθενούς. Επειδή δεν είχαν όλα τα παθολογικά δείγματα αντίστοιχο φυσιολογικό, ο αριθμός των ζευγών στα γλοιώματα ανέρχεται στα 12, ενώ στα μηνιγγιώματα στα 4.

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-παθολογικά) και κλινικών δεδομένων (ηλικία, περιοχή ανεύρεσης του όγκου) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση παραμετρικών και μη παραμετρικών δοκιμασιών (Kruskal Wallis test, 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. Οι τιμές επιβίωσης του κάθε δείγματος θεωρήθηκαν οι τιμές από την ημερομηνία της χειρουργικής επέμβασης μέχρι την ημερομηνία απεβίωσης ή την ημερομηνία του τέλους της μελέτης (μέγιστο 23 μήνες), ανάλογα. Η δοκιμασία  $X^2$  (Chi-Square test,  $X^2$  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.

## 7.3 ΥΛΙΚΑ

### 7.3.1 Διαλύματα

#### **Διαλύματα απομόνωσης RNA, DNA και πρωτεϊνών**

- Φαινολικό διάλυμα απομόνωσης RNA, DNA και πρωτεϊνών Trizol (Invitrogen)
- Ισοπροπανόλη 100% (Merck)
- EtOH 70%, 75% και 100% (Merck)
- dH<sub>2</sub>O κατεργασμένο με DEPC
- 0.3M υδροχλωρική γουανιδίνη σε 95% αιθανόλη
- 1% SDS

## Ηλεκτροφορητικά διαλύματα

- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (0.5X TBE)
- Διάλυμα φόρτωσης-αποδιάταξης πρωτεϊνών 3X: 0.2M Tris.HCl, 6% SDS, 6% μερκαπτοαιθανόλη, 15% γλυκερόλη και 0.03% κυανού της βρωμοφαινόλης
- Ρυθμιστικό διάλυμα πήκτωματος διαχωρισμό πρωτεϊνών (separating or resolving gel buffer): 1.5M Tris.HCl, 4% SDS (w/v), pH 8.8
- Ρυθμιστικό διάλυμα πήκτωματος επιστοίβαξης πρωτεϊνών (stacking gel buffer): 1M Tris.HCl, 1.6% SDS (w/v), pH 6.8
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών 10X: 0.25mM Tris base, 1.92mM γλυκίνη, 1% SDS (w/v), pH 8.3
- Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη (transfer buffer) 1X: 0.025mM Tris base, 0.192mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη, pH 8.3
- Διάλυμα έκπλυσης μεμβρανών ανοσοοαποτύπωσης TBS:Tris buffer saline
- Διάλυμα ECL χημειοφωταύγειας ανίχνευσης πρωτεϊνών (ChemiLucent Western blot detection system, Chemicon Int, Cat No 2600)

### 7.3.2 Υλικά και εταιρείες προέλευσης

#### Υλικά

Αγαρόζη- Gibco BRL	Πρωτεϊνάση K- Gibco BRL
Αιθανόλη-Merck	SDS (Sodium dodecyl sulphate)- BDH
Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA)-BDH	TEMED-Sigma
Ακρυλαμίδιο-BDH	Tris base-BDH
Βορικό οξύ-BDH	Tween 20-Sigma
Γλυκερόλη-Gibco BRL	Υδροχλωρική γουανιδίνη-BDH
Ισοπροπανόλη-BDH	Φαινόλη-BDH
Κυανό βρωμοφαινόλης- Sigma	Χλωριούχο νάτριο-Sigma
Μεθανόλη- BDH	Χλωροφόρμιο-Fluka

### **Αντισώματα**

- Mouse anti-human Ras (R&D Systems, Inc) (mab3429)
- Mouse anti-human  $\beta$ -actin (Chemicon, International) (mab 2501)
- Anti-mouse IgG-HRP (Sigma) (Cat No 0168)

### **Ένζυμα**

- Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega, USA)
- ThermoScript αντίστροφη μεταγραφάση (Stratagene, USA)
- BstNI (MvaI) (New England, USA)
- MspI (HpaII) (New England, USA)
- Rnase free Dnase I

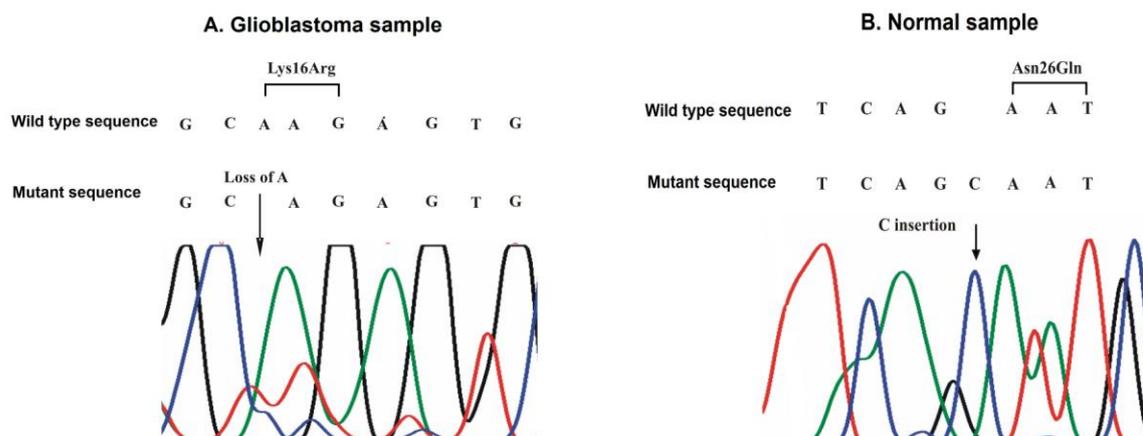
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΑ ΓΛΟΙΩΜΑΤΑ

#### 8.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ RAS

##### 8.1.1 Ανίχνευση μεταλλαγών στα γονίδια *Ras*

Η τεχνική «πολυμορφισμών μεγέθους περιοριστικών τμημάτων» (PCR-RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphisms), χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της GGT->GTT (Gly12Val) μεταλλαγής στο κωδικόνιο 12 των 3 γονιδίων *Ras*. Η μεταλλαγή αυτή δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα δείγματα μας. Η ανάλυση αλληλούχισης στα δείγματα μας, έδειξε την παρουσία δύο διαφορετικών μεταλλαγών στο *Kras*. Συγκεκριμένα, ανιχνεύτηκε μια απαλοιφή αδενίνης στο κωδικόνιο 16 σε ένα γλιοβλάστωμα, οδηγώντας σε αλλαγή του παραγόμενου αμινοξέος από λυσίνη (Lys) σε αργινίνη (Arg) και μια ένθεση κυτοσίνης στο κωδικόνιο 26 σε ένα φυσιολογικό δείγμα, με αποτέλεσμα την αλλαγή του αμινοξέος από ασπαραγίνη (Asn) σε γλουταμίνη (Gln) (εικόνα 8.1.1). Στα γονίδια *Hras* και *Nras* δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλαγές.



Εικόνα 8.1.1: Χρωματογραφήματα από την αλληλούχιση των δειγμάτων στο *Kras*. A: Έλλειψη αδενίνης στο κωδικόνιο 16 σε παθολογικό δείγμα (AAG->AGA;Lys16Arg). B: Ένθεση κυτοσίνης στο κωδικόνιο 26 σε φυσιολογικό δείγμα (AAT->CAA;Asn26Gln).

## 8.1.2 Ομαδοποίηση σε φυσιολογικά-παθολογικά δείγματα

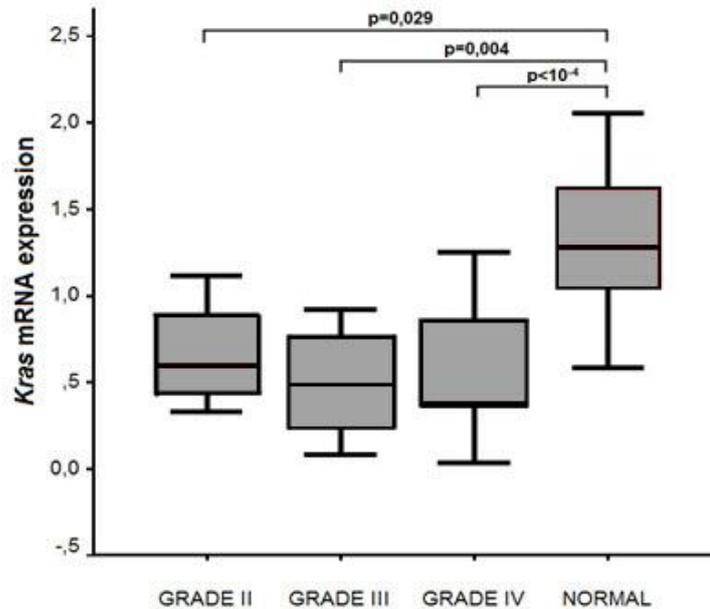
### 8.1.2.A Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων *Ras* σε δείγματα όγκων εγκεφάλου

Τα επίπεδα mRNA των γονιδίων *Kras* και *Hras* διαπιστώθηκε ότι είναι αυξημένα στους φυσιολογικούς ιστούς σε σχέση με την ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων ( $p < 10^{-4}$  και στις 2 περιπτώσεις, Mann-Whitney test). Επίσης, το *Kras* επέδειξε χαμηλότερα μεταγραφικά επίπεδα στα αναπλαστικά και στα ινώδη αστροκυττώματα, συγκριτικά με τα φυσιολογικά δείγματα ( $P=0.004$  and  $P=0.029$  αντίστοιχα, Mann-Whitney test). Η έκφραση του *Nras* δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες δειγμάτων. Στον πίνακα 8.1.1. παρουσιάζονται οι μέσες τιμές έκφρασης (Mean) και το σφάλμα της μέσης τιμής (Mean $\pm$ SEM) των γονιδίων *Ras* που μελετήθηκαν σε κάθε κατηγορία δειγμάτων.

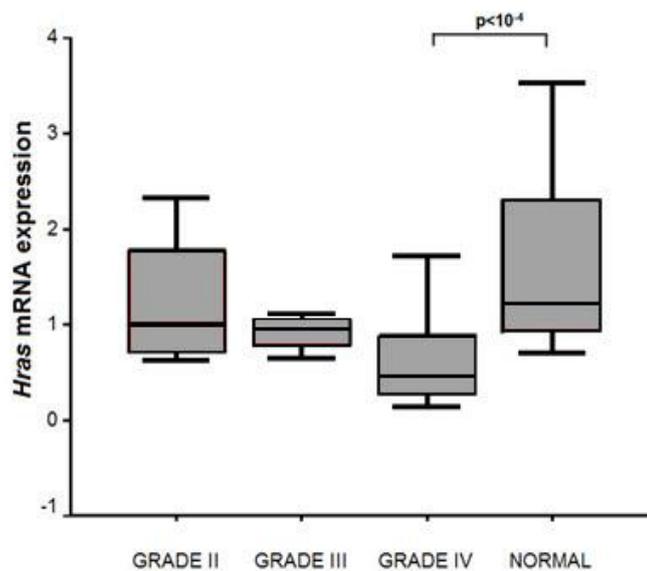
Γονίδιο	Γλοιοβλ. (Grade IV)	Αναπλαστικά Αστροκ. (Grade III)	Ινώδη Αστροκ. (Grade II)	Normal	Τιμή p
<i>Kras</i>	0.59 $\pm$ 0.09	0.49 $\pm$ 0.18	0.66 $\pm$ 0.16	1.34 $\pm$ 0.1	$p < 10^{-4}$ 1 (Grade IV - φυσιολ.) <b>0.004</b> (Grade III - φυσιολ.) <b>0.029</b> (Grade II - φυσιολ.)
<i>Hras</i>	0.77 $\pm$ 0.17	0.92 $\pm$ 0.10	1.24 $\pm$ 0.38	2.16 $\pm$ 0.5	$p < 10^{-4}$ 2 (Grade IV - Φυσιολ.)
<i>Nras</i>	333 $\pm$ 109.8	199.3 $\pm$ 198.8	307.5 $\pm$ 177.3	532 $\pm$ 179	NS

Πίνακας 8.1.1: Έκφραση σε επίπεδο mRNA των γονιδίων *Ras* στις ομάδες δειγμάτων. NS: non significant (μη στατιστικά σημαντικό).

Στις εικόνες 8.1.2 και 8.1.3 παριστάνονται γραφικά με τη βοήθεια box-plots οι διαφορές της έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων στις ομάδες δειγμάτων.



Εικόνα 8.1.2: Επίπεδα mRNA του *Kras* στις ομάδες δειγμάτων. Η ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων, αναπλαστικών και ινωδών αστροκυττωμάτων παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς ( $p < 10^{-4}$ ,  $p = 0.004$ ,  $p = 0.029$  αντίστοιχα, Mann-Whitney test).



Εικόνα 8.1.3: Επίπεδα mRNA του *Hras* στις ομάδες δειγμάτων. Τα γλοιοβλαστώματα παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης, σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα ( $p < 10^{-4}$ , Mann-Whitney test).

### **8.1.2.B Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) των γονιδίων *Ras*, σε δείγματα όγκων εγκεφάλου**

Για την ανάλυση του προφίλ έκφρασης κάθε γονιδίου σε κάθε δείγμα, η κανονικοποιημένη τιμή έκφρασης κάθε παθολογικού δείγματος διαιρέθηκε με το μέσο όρο των κανονικοποιημένων τιμών των φυσιολογικών δειγμάτων. Ανάλογα με το πηλίκο που προκύπτει, θεωρούμε το προς μελέτη γονίδιο υπερεκφρασμένο, υποεκφρασμένο ή φυσιολογικά εκφρασμένο στο συγκεκριμένο για κάθε φορά δείγμα (βλέπε κεφάλαιο 7.2.14).

Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης, αρχικά στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων, έδειξαν ότι η υποέκφραση είναι το πιο συχνό φαινόμενο και για τα 3 *Ras* γονίδια. Συγκεκριμένα, το *Kras* και *Hras* είναι υποεκφρασμένα σε ποσοστό 57% και 81% αντίστοιχα, κανονική έκφραση παρουσίασαν σε ποσοστό 43% και 19% αντίστοιχα, ενώ υπερέκφραση δεν παρουσίασε κανένα δείγμα σε αυτά τα γονίδια. Η υποέκφραση του *Nras* στην ίδια ομάδα δειγμάτων ήταν πιο συχνή (62%), σε σχέση με την υπερέκφραση (9.5%) και την κανονική έκφραση (28.5%).

Στην ομάδα των αναπλαστικών αστροκυττωμάτων (Grade III) και τα 3 *Ras* γονίδια εμφάνισαν το ίδιο προφίλ έκφρασης. Συγκεκριμένα, η μεταγραφική υποέκφραση όλων των *Ras* γονιδίων ήταν το πιο συνηθισμένο φαινόμενο, αφού εμφανίστηκε στο 75% των περιπτώσεων και στα 3 γονίδια. Κανονική έκφραση παρουσίασε το υπόλοιπο 25% των δειγμάτων, ενώ κανένα δεν βρέθηκε να υπερεκκράζεται.

Στα ινώδη αστροκυττώματα (Grade II), το *Kras* βρέθηκε να είναι υποεκφρασμένο σε ποσοστό 75%, ενώ το *H-* και *Nras* είτε υποεκφράστηκαν (50%) είτε παρουσίασαν κανονική έκφραση (50%). Τα συνολικά αποτελέσματα του προφίλ έκφρασης των 3 *Ras* γονιδίων στις 3 ομάδες δειγμάτων φαίνονται στους πίνακες 8.1.2, 8.1.3 και 8.1.4.

Το προφίλ έκφρασης (υπερ-έκφραση, υπο-έκφραση, κανονική έκφραση) του mRNA, αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία  $X^2$  (Chi-Square test,  $X^2$  test), όπου οι τιμές πιθανοτήτων μικρότερες από 0.05, θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Στις ομάδες δειγμάτων Grade II και Grade III, αυτή η δοκιμασία δεν μπόρεσε να πραγματοποιηθεί, λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων.

Γονίδιο	Υπερ- (%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)	Τιμή p
<i>Kras</i>	- (0/21)	43 (9/21)	57 (12/21)	<10 <sup>-4</sup> (υπερ-κανονική) <10 <sup>-4</sup> (υπερ-υπο) NS (κανονική-υπο)
<i>Hras</i>	- (0/21)	19 (4/21)	81 (17/21)	0.03 (υπερ-κανονική) <10 <sup>-4</sup> (υπερ-υπο) <10 <sup>-4</sup> (κανονική-υπο)
<i>Nras</i>	9.5 (2/21)	28.5 (6/21)	62 (13/21)	<10 <sup>-4</sup> (υπερ-υπο) 0.02 (κανονική-υπο) NS (υπερ-κανονική)

Πίνακας 8.1.2: Ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων. Υπερ:υπερέκφραση, υπο:υποέκφραση. NS: non significant (μη στατιστικά σημαντικό), X<sup>2</sup> Test.

Γονίδιο	Υπερ-(%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)
<i>Kras</i>	-	25 (1/4)	75 (3/4)
<i>Hras</i>	-	25 (1/4)	75 (3/4)
<i>Nras</i>	-	25 (1/4)	75 (3/4)

Πίνακας 8.1.3: Ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης στην ομάδα των αναπλαστικών αστροκυττωμάτων. Υπερ:υπερέκφραση, υπο:υποέκφραση.

Γονίδιο	Υπερ-(%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)
<i>Kras</i>	-	25 (1/4)	75 (3/4)
<i>Hras</i>	-	50 (2/4)	50 (2/4)
<i>Nras</i>	-	50 (2/4)	50 (2/4)

Πίνακας 8.1.4: Ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης στην ομάδα των ινωδών αστροκυττωμάτων. Υπερ:υπερέκφραση, υπο:υποέκφραση.

### 8.1.2.Γ Ανάλυση συνέκφρασης των επιπέδων mRNA των γονιδίων *Ras*

Για την αξιολόγηση του προτύπου συνέκφρασης ανά ζεύγος των υπό μελέτη γονιδίων, στις ομάδες των γλοιοβλαστωμάτων και των φυσιολογικών δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες συσχέτισης Pearson και Spearman, ανάλογα με το αν ακολουθούν κανονική ή μη κανονική κατανομή, αντίστοιχα.

Σύμφωνα με αυτές τις δοκιμασίες βρέθηκε ότι στην ομάδα των πολύμορφων γλοιοβλαστωμάτων το *Kras* συνεκφράζεται θετικά με το *Hras* ( $p=0.005$ , Spearman correlation), ενώ τα φυσιολογικά δείγματα δεν επέδειξαν συσχέτιση μεταξύ των 3 *Ras* γονιδίων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 8.1.5 και 8.1.6.

		<i>Kras</i>	<i>Hras</i>	<i>Nras</i>
<i>Kras</i>	Spearman's rho	1.000		
	Sig. 2-tailed			
<i>Hras</i>	Spearman's rho	0.191	1.000	
	Sig. 2-tailed	0.494		
<i>Nras</i>	Spearman's rho	0.166	0.131	1.000
	Sig. 2-tailed	0.553	0.643	

Πίνακας 8.1.5: Συντελεστής συσχέτισης *rho* του Spearman και στατιστική σημαντικότητα P της συνέκφρασης των γονιδίων ανά δύο, στην ομάδα των φυσιολογικών δειγμάτων. Δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

		<i>Kras</i>	<i>Hras</i>	<i>Nras</i>
<i>Kras</i>	Spearman's rho	1.000		
	Sig. 2-tailed			
<i>Hras</i>	Spearman's rho	0.587	1.000	
	Sig. 2-tailed	<b>0.005</b>		
<i>Nras</i>	Spearman's rho	0.174	0.326	1.000
	Sig. 2-tailed	0.451	0.149	

Πίνακας 8.1.6: Συντελεστής συσχέτισης *rho* του Spearman και στατιστική σημαντικότητα P της συνέκφρασης των γονιδίων ανά δύο, στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων.

### 8.1.3 Ομαδοποίηση ανά ζεύγη δειγμάτων (καρκινικός-φυσιολογικός ιστός από τον ίδιο ασθενή)

Επειδή δεν είχαν όλα τα παθολογικά δείγματα αντίστοιχο φυσιολογικό, ο αριθμός των ζευγών στα γλοιώματα ανέρχεται στα 12. Τα υπόλοιπα 2 φυσιολογικά δείγματα (ο συνολικός αριθμός φυσιολογικών ιστών ανέρχεται στα 14 δείγματα), αντιστοιχούν σε ασθενείς με ιώδες αστροκύτωμα. Αυτά τα δύο δείγματα-ζεύγη όμως, δεν μπορούσαν να αποτελέσουν ξεχωριστή ομάδα λόγω του μικρού αριθμού τους, οπότε δεν συμπεριλήφθηκαν στη στατιστική ανάλυση ανά ζεύγη. Συνεπώς, από τους 14 φυσιολογικούς ιστούς, στην ομαδοποίηση ανά ζεύγη περιλαμβάνονται μόνο οι 12, οι οποίοι προέρχονται από ασθενείς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα.

#### 8.1.3.A Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) των γονιδίων *Ras*, στα ζεύγη δειγμάτων

Το κύριο χαρακτηριστικό του προφίλ της έκφρασης των γονιδίων *Kras* και *Hras* στα ζεύγη, φάνηκε να είναι η υποέκφραση, αφού το *Kras* παρουσίασε υποέκφραση σε ποσοστό 75% των περιπτώσεων και κανονική έκφραση στο υπόλοιπο 25%, ενώ το *Hras* εμφάνισε υποέκφραση σε ποσοστό 92% και υπερέκφραση στο 8%. Το *Nras* αντιθέτως, παρουσίασε υπερέκφραση, κανονική έκφραση και υποέκφραση σε περίπου ίσο αριθμό δειγμάτων, σε ποσοστό 42%, 25% και 33% αντίστοιχα. Συνολικά, τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 8.1.7.

Γονίδιο	Υπερ- (%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)	Τιμή p
<i>Kras</i>	- (0/12)	25 (3/12)	75 (9/12)	<10 <sup>-4</sup> (υπερ-υπο) 0.01 (κανονική-υπο) NS (υπερ-κανονική)
<i>Hras</i>	8 (1/12)	-	92 (11/12)	<10 <sup>-4</sup> (υπερ-υπο) <10 <sup>-4</sup> (κανονική-υπο) NS (υπερ-κανονική)
<i>Nras</i>	42 (5/12)	25 (3/12)	33 (4/12)	NS (υπερ-υπο) NS (κανονική-υπο) NS (υπερ-κανονική)

Πίνακας 8.1.7: Προφίλ έκφρασης, ανά ζεύγη στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων. Υπερ.υπερέκφραση, υπο.υποέκφραση. NS: non significant (μη στατιστικά σημαντικό), X<sup>2</sup> Test.

### 8.1.3.B Ανάλυση συνέκφρασης των επιπέδων mRNA των γονιδίων *Ras* στα ζεύγη δειγμάτων

Η ανάλυση συνέκφρασης σε ζεύγη, δεν έδειξε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τριών γονιδίων *Ras*, σύμφωνα με τη δοκμασία Spearman. Στον πίνακα 8.1.8 φαίνονται τα αποτελέσματα συνέκφρασης των γονιδίων ανά δύο, στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων σε ζεύγη.

		<i>Kras</i>	<i>Hras</i>	<i>Nras</i>
<i>Kras</i>	Spearman's rho	1.000		
	Sig. 2-tailed			
<i>Hras</i>	Spearman's rho	0.093	1.000	
	Sig. 2-tailed	0.742		
<i>Nras</i>	Spearman's rho	-0.096	-0.1	1.000
	Sig. 2-tailed	0.732	0.723	

Πίνακας 8.1.8: Συντελεστής συσχέτισης *rho* του Spearman και στατιστική σημαντικότητα P της συνέκφρασης των γονιδίων ανά δύο, στα ζεύγη δειγμάτων.

### 8.1.4 Ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier (Kaplan-Meiers Survival Analysis)

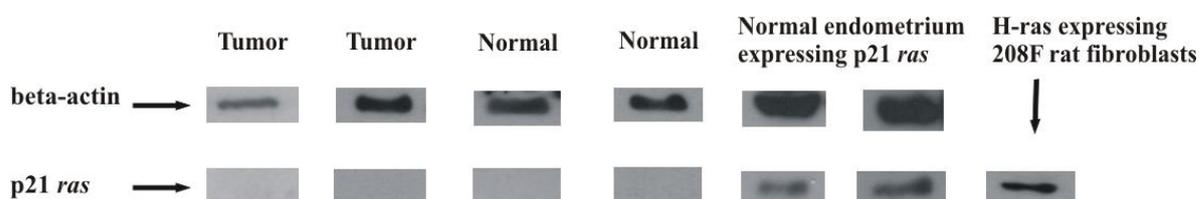
Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier πραγματοποιήθηκε για να εξακριβωθεί εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του προφίλ έκφρασης κάθε γονιδίου και του χρόνου επιβίωσης των ασθενών μετά την επέμβαση. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης για τα γονίδια *Ras* ήταν ότι τα μεταγραφικά επίπεδα αυτών των γονιδίων, δεν βρέθηκαν να συσχετίζονται με το χρόνο επιβίωσης των ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα. Συγκεκριμένα, η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan Meier δεν απεκάλυψε κάποιο προγνωστικό δείκτη που να σχετίζεται με το προφίλ έκφρασης των γονιδίων *Ras*. Η ανάλυση αυτή δεν μπόρεσε να πραγματοποιηθεί στις ομάδες των αναπλαστικών και ινωδών αστροκυττωμάτων, λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων σε αυτές τις κατηγορίες.

### 8.1.5 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα δείγματα όγκων εγκεφάλου, σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων

Τα επίπεδα έκφρασης mRNA των γονιδίων *Ras* δεν βρέθηκαν να συσχετίζονται με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων που εξετάστηκαν, όπως η ηλικία και η περιοχή ανεύρεσης του όγκου, στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων. Λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων στις ομάδες αναπλαστικών και ινωδών αστροκυττωμάτων, η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων, δεν μπόρεσε να αξιολογηθεί.

### 8.1.6 Μελέτη έκφρασης της πρωτεΐνης Ras-p21 στα γλοιώματα

Σύμφωνα με την ανασοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western, η πρωτεΐνη p21 δεν ανιχνεύτηκε στα δείγματα μας. Η πρωτεΐνη της β-ακτίνης που χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς, βρέθηκε να εκφράζεται σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς (εικόνα 8.1.9).



Εικόνα 8.1.9: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα έκφρασης της πρωτεΐνης p21 και β-ακτίνης σε γλοιώματα και φυσιολογικούς ιστούς. Η κυτταρική σειρά ινοβλαστών από αρουραίο G12V (G12V H-ras-transformed 208F rat fibroblasts) καθώς και εκχύλισμα πρωτεϊνών από φυσιολογικό ιστό ενδομητρίου χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες της έκφρασης της p21 πρωτεΐνης.

## 8.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ *AKT*, *SDF-1* ΚΑΙ *CXCR4*

### 8.2.1 Ομαδοποίηση σε φυσιολογικά-παθολογικά δείγματα

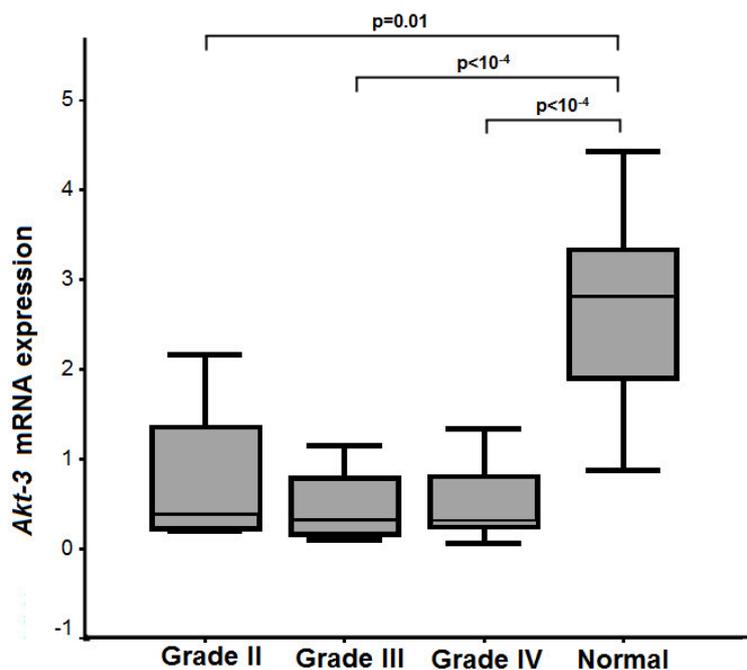
#### 8.2.1.A Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων *Akt-1*, *Akt-2*, *Akt-3*, *SDF-1α*, *SDF-1β* και *CXCR4* σε γλοιώματα

Όσον αφορά την οικογένεια των γονιδίων *Akt*, η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι τα μεταγραφικά επίπεδα του *Akt-3* είναι χαμηλότερα και στις 3 ομάδες καρκινικών δειγμάτων, σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα (T-test), ενώ το *Akt-1* και *Akt-2*, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεκριμένων ομάδων.

Η μελέτη της έκφρασης του άξονα *SDF-1/CXCR4*, έδειξε ότι τα γονίδια *SDF-1α*, *SDF-1β* και *CXCR4* δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων. Στον πίνακα 8.2.1 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές έκφρασης (Mean) και το σφάλμα της μέσης τιμής (Mean±SEM) των γονιδίων της οικογένειας *Akt*, του *SDF-1* και του *CXCR4*, που μελετήθηκαν σε κάθε κατηγορία δειγμάτων. Στην εικόνα 8.2.1 παριστάνονται γραφικά με τη βοήθεια box-plots, οι διαφορές της έκφρασης του *Akt-3* μεταξύ γλοιοβλαστωμάτων και φυσιολογικών δειγμάτων.

Γονίδιο	Γλοιοβλ. (Grade IV)	Αναπλαστικά αστροκ. (Grade III)	Ινώδη Αστροκ.	Φυσιολογ.	Τιμή p
<i>Akt-1</i>	1.66±0.16	1.53±0.35	1.17±0.37	2.25±0.3	NS
<i>Akt-2</i>	0.43±0.07	0.51±0.2	0.48±0.18	0.64±0.07	NS
<i>Akt-3</i>	0.64±0.16	0.47±0.23	0.78±0.46	2.84±0.42	<10 <sup>-4</sup> (Grade IV-Φυσιολ.) <10 <sup>-4</sup> (Grade III-Φυσιολ.) <b>0.01</b> (Grade II-Φυσιολ.)
<i>SDF-1α</i>	286.6±130.3	88.86±66.58	10.47±7.18	197.4±75.7	NS
<i>SDF-1β</i>	146.5±53.19	221.03±124.2	21.05±12.04	224.3±90.82	NS
<i>CXCR4</i>	480.7±133.5	550.6±423.8	314.2±313.9	274.2±135.4	NS

Πίνακας 8.2.1: Έκφραση σε επίπεδο mRNA των γονιδίων *Akt*, *SDF-1* και *CXCR4* στις ομάδες δειγμάτων. NS: non significant (μη στατιστικά σημαντικό).



Εικόνα 8.2.1: Επίπεδα mRNA του γονιδίου *Akt-3* στις διάφορες ομάδες δειγμάτων. Τα γλοιοβλαστώματα, τα αναπλαστικά και ινώδη αστροκυτώματα παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης, σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα ( $p < 10^{-4}$ , T-test).

### 8.2.1.B Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) των γονιδίων *Akt-1*, *Akt-2*, *Akt-3*, *SDF-1a*, *SDF-1b* και *CXCR4*, σε δείγματα όγκων εγκεφάλου

Στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων, τα γονίδια *Akt-3*, *SDF-1a* and *SDF-1b* εμφάνισαν υποέκφραση σε ένα στατιστικά σημαντικό ποσοστό σε σχέση με την υπερέκφραση και κανονική έκφραση ( $p < 10^{-4}$  σε όλες τις περιπτώσεις,  $X^2$  Test). Αντιθέτως, το *Akt-1*, φάνηκε να παρουσιάζει πιο συχνά φυσιολογική έκφραση από ότι υποέκφραση και υπερέκφραση ( $p < 10^{-4}$  και στις δύο περιπτώσεις,  $X^2$  Test). Το γονίδιο *Akt-2* εμφάνισε μόνο υποέκφραση και κανονική έκφραση σε παρόμοια ποσοστά, ενώ το *CXCR4* δεν είχε διαφορές στην εμφάνιση υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης ή υποέκφρασης. Τα αποτελέσματα φαίνονται λεπτομερώς στον πίνακα 8.2.2.

Γονίδιο	Υπερ- (%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)	Τιμή p
<i>Akt-1</i>	- (0/21)	76 (16/21)	24 (5/21)	<10 <sup>-4</sup> (κανονική-υπό) 0.01 (υπερ-υπό) <10 <sup>-4</sup> (υπερ-κανονική)
<i>Akt-2</i>	- (0/21)	57 (12/21)	43 (9/21)	NS (κανονική-υπό) <10 <sup>-4</sup> (υπερ-υπό) <10 <sup>-4</sup> (υπερ-κανονική)
<i>Akt-3</i>	- (0/21)	5 (1/21)	95 (20/21)	<10 <sup>-4</sup> (κανονική-υπό) <10 <sup>-4</sup> (υπερ-υπό) NS (υπερ-κανονική)
<i>SDF-1α</i>	19 (4/21)	5 (1/21)	76 (16/21)	<10 <sup>-4</sup> (κανονική-υπό) <10 <sup>-4</sup> (υπερ-υπό) NS (υπερ-κανονική)
<i>SDF-1β</i>	14 (3/21)	14 (3/21)	72 (15/21)	<10 <sup>-4</sup> (κανονική-υπό) <10 <sup>-4</sup> (υπερ-υπό) NS (υπερ-κανονική)
<i>CXCR4</i>	33 (7/21)	24 (5/21)	43 (9/21)	NS

Πίνακας 8.2.2: Ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων. Υπερ:υπερέκφραση, υπο:υποέκφραση. NS: non significant (μη στατιστικά σημαντικό), X<sup>2</sup> Test.

Γονίδιο	Υπερ- (%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)
<i>Akt-1</i>	-	75 (3/4)	25 (1/4)
<i>Akt-2</i>	-	75 (3/4)	25 (1/4)
<i>Akt-3</i>	-	-	100 (4/4)
<i>SDF-1α</i>	-	25 (1/4)	75 (3/4)
<i>SDF-1β</i>	25 (1/4)	50 (2/2)	25 (1/4)
<i>CXCR4</i>	25 (1/4)	25 (1/4)	50 (2/4)

Πίνακας 8.2.3: Ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης στην ομάδα των αναπλαστικών αστροκυττωμάτων. Υπερ:υπερέκφραση, υπο:υποέκφραση.

Το κύριο χαρακτηριστικό των γονιδίων *Akt-3*, *SDF1a* και *CXCR4* στην κατηγορία των αναπλαστικών αστροκυττωμάτων, είναι η υποέκφραση, αφού εμφανίστηκε σε ποσοστό 100%, 75% και 50% αντίστοιχα. Αντίθετα, τα υπόλοιπα τρία γονίδια (*Akt-1*, *Akt-2* και *SDF-1β*) εμφάνισαν κυρίως κανονική έκφραση (πίνακας 8.2.3).

Όσον αφορά την ομάδα των ινωδών αστροκυττωμάτων, σχεδόν όλα τα γονίδια εμφάνισαν υποέκφραση, με εξαίρεση το *Akt-1* που εμφάνισε σε ίσο ποσοστό υποέκφραση και κανονική έκφραση και το *Akt-2* το οποίο παρουσίασε κυρίως κανονική έκφραση (πίνακας 8.2.4).

Γονίδιο	Υπερ- (%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)
<i>Akt-1</i>	-	50 (2/4)	50 (2/4)
<i>Akt-2</i>	-	75 (3/4)	25 (1/4)
<i>Akt-3</i>	-	25 (1/4)	75 (3/4)
<i>SDF-1a</i>	-	-	100 (4/4)
<i>SDF-1β</i>	-	-	100 (4/4)
<i>CXCR4</i>	25 (1/4)	-	75 (3/4)

Πίνακας 8.2.4: Ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης στην ομάδα των ινωδών αστροκυττωμάτων. Υπερ:υπερέκφραση, υπο:υποέκφραση.

### 8.2.1.Γ Ανάλυση συνέκφρασης των επιπέδων mRNA των γονιδίων *Akt-1*, *Akt-2*, *Akt-3*, *SDF-1a*, *SDF-1β* και *CXCR4*

Για την αξιολόγηση του προτύπου συνέκφρασης ανά ζεύγος των υπό μελέτη γονιδίων, στις ομάδες των γλοιοβλαστωμάτων και των φυσιολογικών δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες συσχέτισης Pearson και Spearman, ανάλογα με το αν ακολουθούν κανονική ή μη κανονική κατανομή αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης στα φυσιολογικά δείγματα έδειξαν ότι τα γονίδια *SDF-1a*, *SDF-1β* και *CXCR4* συσχετίζονταν θετικά μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, το

*SDF-1α* παρουσιάζει θετική συσχέτιση έκφρασης με το *SDF-1β* και *CXCR4*, ενώ το *SDF-1β* συνεκφράζεται και με το *CXCR4* γονίδιο ( $p < 10^{-4}$ , Pearson correlation).

Στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων, το *Akt-2* βρέθηκε να συνεκφράζεται θετικά με το *Akt-3* ( $p = 0.016$ , Spearman's rank correlation).

Τα αποτελέσματα συνέκφρασης για όλα τα γονίδια στα φυσιολογικά και Grade IV δείγματα, φαίνονται στους πίνακες 8.2.5 και 8.2.6.

		<i>Akt-1</i>	<i>Akt-2</i>	<i>Akt-3</i>	<i>SDF-1α</i>	<i>SDF-1β</i>	<i>CXCR4</i>
<i>Akt-1</i>	Pearson correlation	1					
	Sig. 2-tailed	-					
<i>Akt-2</i>	Pearson correlation	-0.180	1				
	Sig. 2-tailed	0.537	-				
<i>Akt-3</i>	Pearson correlation	-0.011	-0.027	1			
	Sig. 2-tailed	0.970	0.927	-			
<i>SDF-1α</i>	Pearson correlation	0.191	-0.180	0.403	1		
	Sig. 2-tailed	0.514	0.538	0.153	-		
<i>SDF-1β</i>	Pearson correlation	0.391	-0.186	0.367	0.983	1	
	Sig. 2-tailed	0.186	0.544	0.217	<b>0.000</b>	-	
<i>CXCR4</i>	Pearson correlation	0.004	-0.148	0.313	0.858	0.908	1
	Sig. 2-tailed	0.989	0.614	0.277	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	-

Πίνακας 8.2.5: Συντελεστής συσχέτισης *rho* του Pearson και στατιστική σημαντικότητα P της συνέκφρασης των γονιδίων ανά δύο, στην ομάδα των φυσιολογικών δειγμάτων.

		<i>Akt-1</i>	<i>Akt-2</i>	<i>Akt-3</i>	<i>SDF-1α</i>	<i>SDF-1β</i>	<i>CXCR4</i>
<i>Akt-1</i>	Spearman's rho	1					
	Sig. 2-tailed	-					
<i>Akt-2</i>	Spearman's rho	0.122	1				
	Sig. 2-tailed	0.598	-				
<i>Akt-3</i>	Spearman's rho	0.377	0.518	1			
	Sig. 2-tailed	0.092	<b>0.016</b>	-			
<i>SDF-1α</i>	Spearman's rho	-0.051	-0.388	-0.014	1		
	Sig. 2-tailed	0.827	0.082	0.951	-		
<i>SDF-1β</i>	Spearman's rho	0.079	-0.309	0.177	0.273	1	
	Sig. 2-tailed	0.733	0.173	0.444	0.232	-	
<i>CXCR4</i>	Spearman's rho	0.364	-0.019	-0.003	-0.047	0.201	1
	Sig. 2-tailed	0.105	0.933	0.991	0.841	0.382	-

Πίνακας 8.2.6: Συντελεστής συσχέτισης *rho* του Spearman και στατιστική σημαντικότητα P της συνέκφρασης των γονιδίων ανά δύο, στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων

## 8.2.2 Ομαδοποίηση ανά ζεύγη δειγμάτων (καρκινικός-φυσιολογικός ιστός από τον ίδιο ασθενή)

Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 8.1.3 για τα γονίδια *Ras*.

### 8.2.2.A Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) των γονιδίων *Akt-1*, *Akt-2*, *Akt-3*, *SDF-1α*, *SDF-1β* και *CXCR4* στα ζεύγη δειγμάτων

Το κυριότερο χαρακτηριστικό της μελέτης του προφίλ έκφρασης στα ζεύγη των γλοιοβλαστωμάτων, ήταν η υποέκφραση στο *Akt-3*, η οποία εμφανίστηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό από ότι η κανονική έκφραση ( $p < 10^{-4}$ ,  $X^2$  Test). Τα υπόλοιπα γονίδια της οικογένειας *Akt*, εμφάνισαν σε παρόμοια ποσοστά κανονική έκφραση και υποέκφραση. Υπερέκφραση τα *Akt-2* και *Akt-3* δεν παρουσίασαν καθόλου, ενώ το *Akt-1* σε ένα πολύ μικρό ποσοστό. Ο άξονας *SDF-1/CXCR4*, εμφάνισε σε διαφορετικά αλλά παρόμοια ποσοστά υπερέκφραση, κανονική έκφραση και υποέκφραση, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές. Τα αποτελέσματα του προφίλ της έκφρασης αυτών των γονιδίων φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 8.2.7.

Γονίδιο	Υπερ- (%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)	Τιμή p
<i>Akt-1</i>	8 (1/12)	50 (6/12)	42 (5/12)	<b>0.02</b> (υπερ-κανονική) <b>0.05</b> (υπερ-υπο) NS (κανονική-υπο)
<i>Akt-2</i>	- (0/12)	42 (5/12)	58 (7/12)	<b>0.001</b> (υπερ-κανονική) <b>0.01</b> (υπερ-υπο) NS (κανονική-υπο)
<i>Akt-3</i>	- (0/12)	8 (1/12)	92 (11/12)	NS (υπερ-κανονική) <b>&lt;10<sup>-4</sup></b> (υπερ-υπο) <b>&lt;10<sup>-4</sup></b> (κανονική-υπο)
<i>SDF-1α</i>	42 (5/12)	25 (3/12)	33 (4/12)	NS
<i>SDF-1β</i>	25 (3/12)	33 (4/12)	42 (5/12)	NS
<i>CXCR4</i>	50 (6/12)	17 (2/12)	33 (4/12)	NS

Πίνακας 8.2.7: Ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης, ανά ζεύγη στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων. Υπερ:υπερέκφραση, υπο:υποέκφραση. NS: non significant (μη στατιστικά σημαντικό),  $X^2$  Test.

### 8.2.2.B Ανάλυση συνέκφρασης των επιπέδων mRNA των γονιδίων *Akt-1*, *Akt-2*, *Akt-3*, *SDF-1α*, *SDF-1β* και *CXCR4* στα ζεύγη δειγμάτων

Η ανάλυση συνέκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων ανά δύο, στα ζεύγη δειγμάτων, έδειξε μια θετική συσχέτιση μεταξύ του *Akt-2* και *Akt3* ( $p=0.003$ , Spearman's rank correlation) και μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ του *Akt2* και των ακόλουθων γονιδίων: *SDF-1α* ( $p=0.02$ , Spearman's rank correlation) και *SDF-1β* ( $p=0.018$ , Spearman's rank correlation). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 8.2.8.

		<i>Akt-1</i>	<i>Akt-2</i>	<i>Akt-3</i>	<i>SDF-1α</i>	<i>SDF-1β</i>	<i>CXCR4</i>
<i>Akt-1</i>	Spearman's rho	1					
	Sig. 2-tailed	-					
<i>Akt-2</i>	Spearman's rho	0.196	1				
	Sig. 2-tailed	0.542	-				
<i>Akt-3</i>	Spearman's rho	0.378	0.783	1			
	Sig. 2-tailed	0.226	<b>0.003</b>	-			
<i>SDF-1α</i>	Spearman's rho	0.399	-0.657	-0.266	1		
	Sig. 2-tailed	0.199	<b>0.020</b>	0.404	-		
<i>SDF-1β</i>	Spearman's rho	-0.224	-0.664	-0.371	0.538	1	
	Sig. 2-tailed	0.484	<b>0.018</b>	0.236	0.071	-	
<i>CXCR4</i>	Spearman's rho	0.217	-0.182	0.063	0.266	0.434	1
	Sig. 2-tailed	0.499	0.572	0.846	0.404	0.159	-

Πίνακας 8.2.8: Συντελεστής συσχέτισης *rho* του Spearman και στατιστική σημαντικότητα P της συνέκφρασης των γονιδίων ανά δύο, στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων

### **8.2.3 Ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier (Kaplan-Meiers Survival Analysis)**

Η προγνωστική αξία των μεταγραφικών επιπέδων των *Akt-1*, *Akt-2*, *Akt-3*, *SDF-1 $\alpha$* , *SDF-1 $\beta$*  και *CXCR4* εξετάστηκε με την ανάλυση κατά Kaplan-Meier στην ομάδα των πολύμορφων γλοιοβλαστωμάτων. Το παρατηρούμενο προφίλ έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση και υποέκφραση), δεν φάνηκε να συσχετίζεται με την επιβίωση των ασθενών. Η ανάλυση αυτή δεν πραγματοποιήθηκε στις ομάδες των αναπλαστικών και ινωδών αστροκυττωμάτων, λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων σε αυτές τις κατηγορίες.

### **8.2.4 Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα δείγματα όγκων εγκεφάλου, σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων**

Τα επίπεδα έκφρασης mRNA των γονιδίων *Akt-1*, *Akt-2*, *Akt-3*, *SDF-1 $\alpha$* , *SDF-1 $\beta$*  και *CXCR4* δεν βρέθηκαν να συσχετίζονται με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα που εξετάστηκαν, όπως η ηλικία και η περιοχή ανεύρεσης του όγκου. Λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων στις ομάδες αναπλαστικών και ινωδών αστροκυττωμάτων, η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων, δεν μπόρεσε να αξιολογηθεί.

## 8.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ p53

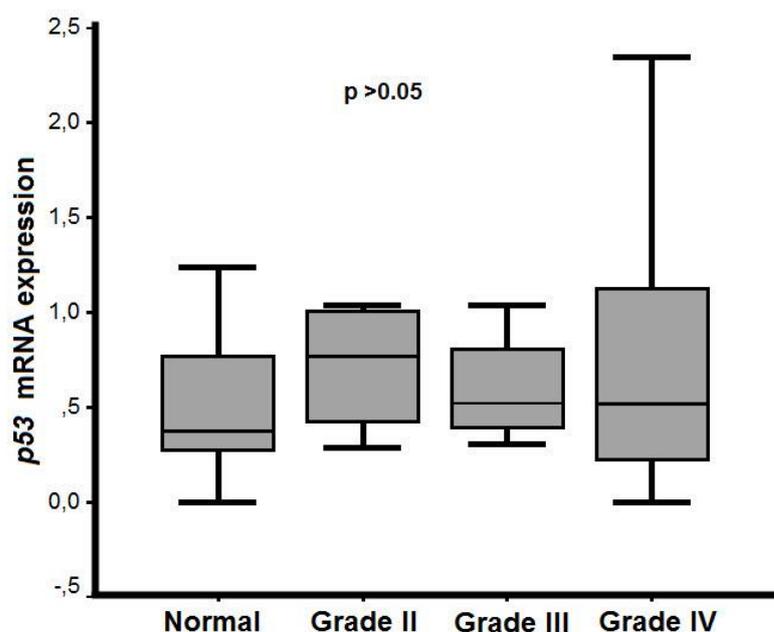
### 8.3.1 Ανίχνευση μεταλλαγών στο γονίδιο p53

Η μέθοδος της αλληλούχισης πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση της μεταλλαγής CGT→TGT (Arg273Cys) στο κωδικόνιο 273, το οποίο θεωρείται θερμό σημείο μεταλλαγών για το γονίδιο p53. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης έδειξαν την απουσία αυτής της μεταλλαγής στα δείγματα μας.

### 8.3.2 Ομαδοποίηση σε φυσιολογικά-παθολογικά δείγματα

#### 8.3.2.A Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA του γονιδίου p53 σε δείγματα όγκων εγκεφάλου

Το γονίδιο p53 δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα mRNA, ανάμεσα στις ομάδες των δειγμάτων.



Εικόνα 8.3.1: Τα επίπεδα mRNA του γονιδίου p53, δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές ανάμεσα στις ομάδες δειγμάτων (P>0.05, Mann-Whitney test)

### 8.3.2.B Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) του γονιδίου *p53* σε δείγματα όγκων εγκεφάλου

Στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων, τα δείγματα δεν παρουσίασαν ένα συγκεκριμένο προφίλ έκφρασης, αφού εμφάνισαν υπερέκφραση, κανονική έκφραση και υποέκφραση σε ποσοστά χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές (πίνακας 8.3.1)

Στις ομάδες των αναπλαστικών και ινωδών αστροκυττωμάτων, το προφίλ έκφρασης που επέδειξαν τα δείγματα ήταν το ίδιο, αφού εμφάνισαν κανονική έκφραση σε ποσοστό 75% και υποέκφραση σε 25% (πίνακες 8.3.2 και 8.3.3).

Γονίδιο	Υπερ- (%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)	Τιμή p
<i>p53</i>	24 (5/21)	43 (9/21)	33 (7/21)	NS

Πίνακας 8.3.1: Ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων. Υπερ:υπερέκφραση, υπο:υποέκφραση. NS: non significant (μη στατιστικά σημαντικό),  $\chi^2$  Test

Γονίδιο	Υπερ- (%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)
<i>p53</i>	- (0/4)	75 (3/4)	25 (1/4)

Πίνακας 8.3.2: Ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης στην ομάδα των αναπλαστικών αστροκυττωμάτων. Υπερ:υπερέκφραση, υπο:υποέκφραση

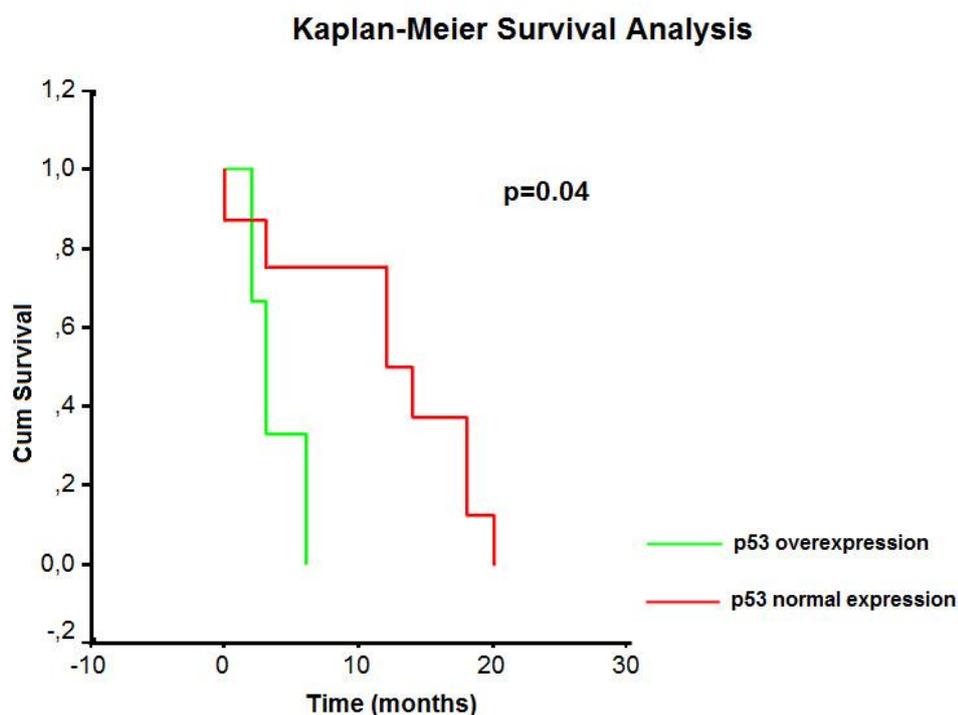
Γονίδιο	Υπερ- (%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)
<i>p53</i>	- (0/4)	75 (3/4)	25 (1/4)

Πίνακας 8.3.3: Ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης στην ομάδα των ινωδών αστροκυττωμάτων. Υπερ:υπερέκφραση, υπο:υποέκφραση

### 8.3.2.Γ Ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier (Kaplan-Meiers Survival Analysis)

Η προγνωστική αξία των μεταγραφικών επιπέδων του *p53* εξετάστηκε με την ανάλυση κατά Kaplan-Meier στην ομάδα των πολύμορφων γλοιοβλαστωμάτων. Παρατηρήθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά το χρόνο επιβίωσης των ασθενών, μεταξύ της υπερέκφρασης και της κανονικής έκφρασης του *p53*. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς που υπερέκφραζαν το εν λόγω γονίδιο, είχαν μικρότερη επιβίωση συγκριτικά με τους ασθενείς που το εξέφραζαν σε φυσιολογικά επίπεδα. Στην εικόνα 8.3.2 φαίνονται οι καμπύλες επιβίωσης των ασθενών με τα δύο διαφορετικά προφίλ έκφρασης σε σχέση με το χρόνο επιβίωσης.

Η ανάλυση αυτή δεν πραγματοποιήθηκε στις ομάδες των αναπλαστικών και ινωδών αστροκυττωμάτων, λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων σε αυτές τις κατηγορίες.



Εικόνα 8.3.2: Καμπύλη επιβίωσης στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων. Σύγκριση της επιβίωσης μεταξύ των δειγμάτων που επέδειξαν υπερέκφραση και κανονική έκφραση του γονιδίου *p53*.

### 8.3.3 Ομαδοποίηση ανά ζεύγη δειγμάτων (καρκινικός-φυσιολογικός ιστός από τον ίδιο ασθενή)

Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 8.1.3 για τα γονίδια *Ras*.

#### 8.3.3.A Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) του γονιδίου *p53* στα ζεύγη δειγμάτων

Η ανάλυση του προφίλ έκφρασης του γονιδίου *p53* στα ζεύγη δειγμάτων, έδειξε ότι τα μισά δείγματα παρουσίασαν κανονική έκφραση, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα εμφάνισαν υπερέκφραση και υποέκφραση σε ίσα ποσοστά, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά. Ο πίνακας 8.3.4 δείχνει τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης.

Γονίδιο	Υπερ- (%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)	Τιμή p
<i>p53</i>	25 (3/12)	50 (6/12)	25 (3/12)	NS

Πίνακας 8.3.4: Ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης, ανά ζεύγη στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων. Υπερ:υπερέκφραση, υπο:υποέκφραση. NS: non significant (μη στατιστικά σημαντικό),  $\chi^2$  Test

#### 8.3.3.B Ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier (Kaplan-Meiers Survival Analysis)

Η προγνωστική αξία των μεταγραφικών επιπέδων του *p53* εξετάστηκε με την ανάλυση κατά Kaplan-Meier στην ομάδα των πολύμορφων γλοιοβλαστωμάτων. Το παρατηρούμενο προφίλ έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση και υποέκφραση), δεν φάνηκε να συσχετίζεται με την επιβίωση των ασθενών. Η ανάλυση αυτή δεν πραγματοποιήθηκε στις ομάδες των αναπλαστικών και ινωδών αστροκυττωμάτων, λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων σε αυτές τις κατηγορίες.

### **8.3.3.Γ Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του *p53* στα δείγματα όγκων εγκεφάλου, σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων**

Τα επίπεδα έκφρασης mRNA του *p53* δεν βρέθηκαν να συσχετίζονται με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα που εξετάστηκαν, όπως η ηλικία και η περιοχή ανεύρεσης του όγκου. Λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων στις ομάδες αναπλαστικών και ινωδών αστροκυττωμάτων, η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων, δεν μπόρεσε να αξιολογηθεί.

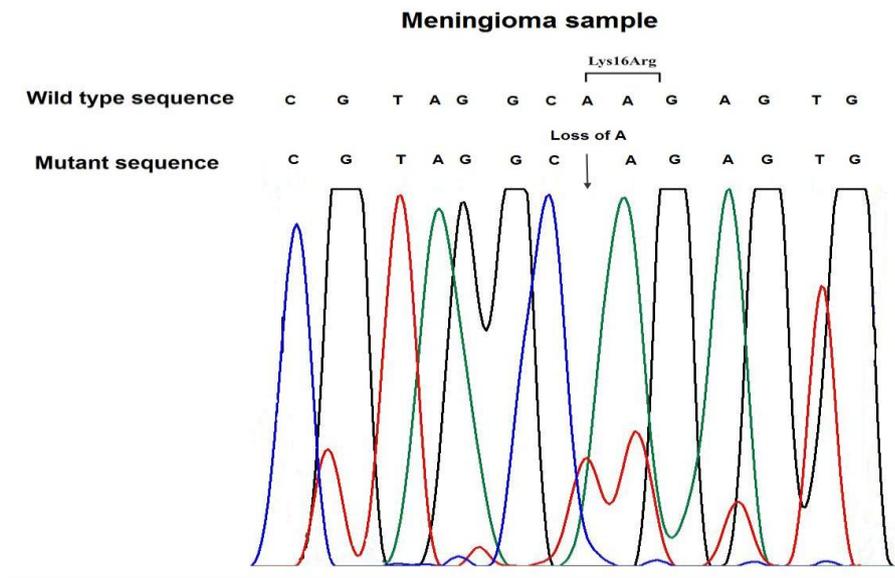
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΑ ΜΗΝΙΓΓΙΩΜΑΤΑ

#### 9.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ RAS

##### 9.1.1 Ανίχνευση μεταλλαγών στα γονίδια *Ras*

Η τεχνική «πολυμορφισμών μεγέθους περιοριστικών τμημάτων» (PCR-RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphisms), χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της GGT->GTT (Gly12Val) μεταλλαγής, στο κωδικόνιο 12 των 3 γονιδίων *Ras*. Όπως και στα γλοιώματα, η μεταλλαγή αυτή δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα δείγματα μας. Η ανάλυση αλληλούχισης στα δείγματα μας, έδειξε σε ένα μόνο μηνιγγίωμα την παρουσία της ίδιας μεταλλαγής που βρέθηκε σε ένα γλοιοβλάστωμα στο *Kras*. Η μεταλλαγή αυτή είναι μια απαλοιφή αδενίνης στο κωδικόνιο 16, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του παραγόμενου αμινοξέος από λυσίνη (Lys) σε αργινίνη (Arg). Στο χρωματογράφημα (εικόνα 9.1.1) φαίνεται η μεταλλαγμένη σε σχέση με τη φυσιολογική αλληλουχία του δείγματος. Στα γονίδια *Hras* και *Nras* δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλαγές.

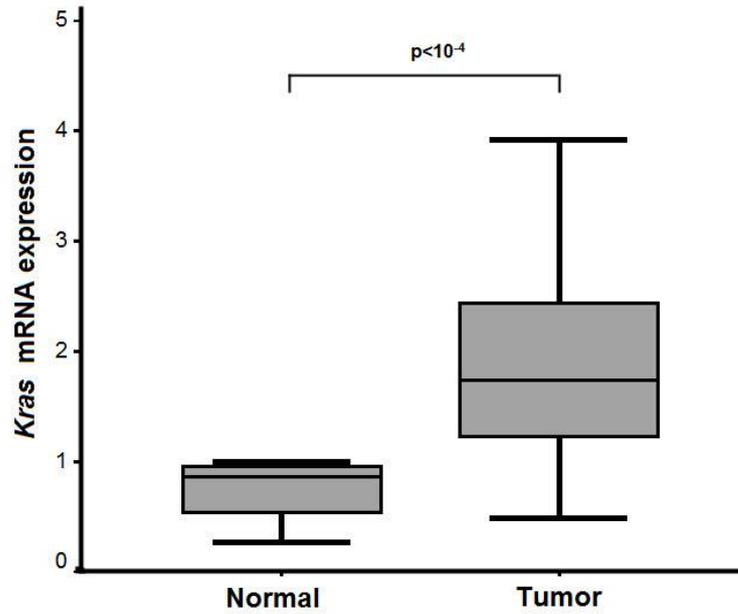


Εικόνα 9.1.1: Χρωματογράφημα από την αλληλούχιση των δειγμάτων στο *Kras*: Έλλειψη αδενίνης στο κωδικόνιο 16 σε ένα παθολογικό δείγμα (AAG->AGA;Lys16Arg).

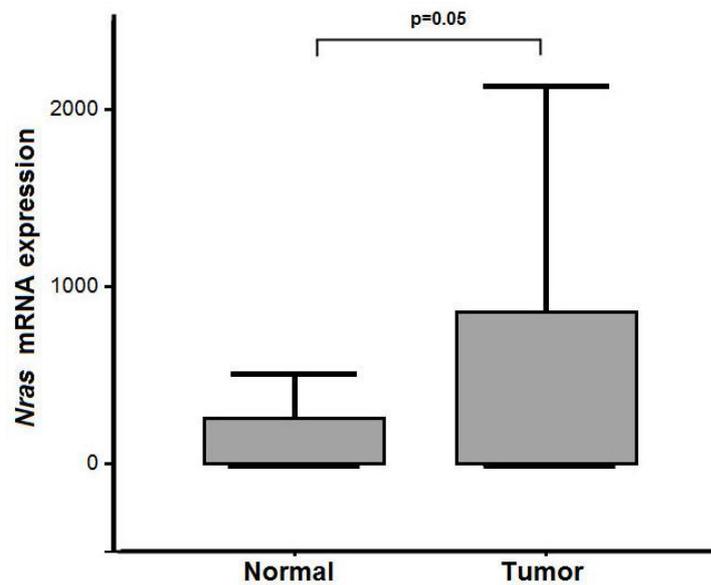
### 9.1.2 Ομαδοποίηση σε φυσιολογικά-παθολογικά δείγματα

#### 9.1.2.A Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων *Ras* σε δείγματα όγκων εγκεφάλου

Τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *Kras* και *Nras* διαπιστώθηκε ότι είναι αυξημένα στην ομάδα των μηνιγγιωμάτων σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς ( $p < 10^{-4}$ , T-Test και  $p = 0.05$ , Mann-Whitney test, αντίστοιχα). Η έκφραση του *Hras* δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις δύο ομάδες δειγμάτων. Στις εικόνες 9.1.2 και 9.1.3 παριστάνονται γραφικά με τη βοήθεια box-plots οι διαφορές της έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων στις ομάδες δειγμάτων.



Εικόνα 9.1.2: Επίπεδα mRNA του *Kras* στις ομάδες φυσιολογικών-παθολογικών δειγμάτων. Η ομάδα των μηνιγγιωμάτων παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς ( $p < 10^{-4}$ , T-test).



Εικόνα 9.1.3: Επίπεδα mRNA του *Nras* στις ομάδες φυσιολογικών-παθολογικών δειγμάτων. Η ομάδα των μηνιγγιωμάτων παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς ( $p = 0.05$ , Mann-Whitney test).

### 9.1.2.B Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) των γονιδίων *Ras*, στα μηνιγγιώματα

Η ανάλυση του προφίλ έκφρασης κάθε γονιδίου σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε όπως ακριβώς έγινε και στο κεφάλαιο 8.1.2.B στα γλοιώματα. Αυτή η ανάλυση στην ομάδα των μηνιγγιωμάτων, έδειξε ότι τα 3 *Ras* γονίδια έχουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, το *Kras* βρέθηκε να υπερεκφράζεται στο μεγαλύτερο ποσοστό δειγμάτων, να έχει κανονική έκφραση σε ένα μικρότερο ποσοστό, ενώ υποέκφραση δεν παρουσίασε σε κανένα δείγμα. Το *Hras* παρουσίασε κυρίως κανονική έκφραση και σε μικρότερο αριθμό δειγμάτων υποέκφραση, ενώ δεν εμφάνισε καθόλου υπερέκφραση. Τέλος, στο *Nras* τα δείγματα είτε υπερεκφράστηκαν είτε υποεκφράστηκαν, ενώ κανένα δείγμα δεν παρουσίασε κανονική έκφραση. Τα ποσοστά καθώς και οι τιμές πιθανοτήτων  $p$  σε κάθε περίπτωση φαίνονται στον πίνακα 9.1.1.

Γονίδιο	Υπερ- (%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)	Τιμή $p$
<i>Kras</i>	65 (15/23)	35 (8/23)	- (0/23)	<b>0.03</b> (υπερ-κανονική) <math>10^{-4}</math> (υπερ-υπο) <math>10^{-4}</math> (κανονική-υπο)
<i>Hras</i>	- (0/23)	65 (15/23)	35 (8/23)	<math>10^{-4}</math> (υπερ-κανονική) <b>0.001</b> (υπερ-υπο) <b>0.03</b> (κανονική-υπο)
<i>Nras</i>	43.5 (10/23)	- (0/23)	56.5 (13/23)	<math>10^{-4}</math> (υπερ-κανονική) NS (υπερ-υπο) <math>10^{-4}</math> (κανονική-υπο)

Πίνακας 9.1.1: Ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης στην ομάδα των μηνιγγιωμάτων. Υπερ.υπερέκφραση, υπο.υποέκφραση. NS: non significant (μη στατιστικά σημαντικό),  $\chi^2$  Test.

### 9.1.2.Γ Ανάλυση συνέκφρασης των επιπέδων mRNA των γονιδίων *Ras*

Σύμφωνα με τις δοκιμασίες συσχέτισης Spearman, στην οικογένεια των γονιδίων *Ras*, διαπιστώθηκε ότι το *Kras* συνεκφράζεται θετικά με το *Hras* ( $p=0.05$ , Spearman correlation), στα καρκινικά δείγματα. Η ανάλυση συνέκφρασης στην ομάδα των φυσιολογικών δειγμάτων, δεν μπόρεσε να πραγματοποιηθεί λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων ( $n=4$ ) σε αυτή την κατηγορία. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 9.1.2.

		<i>Kras</i>	<i>Hras</i>	<i>Nras</i>
<i>Kras</i>	Spearman's rho	1.000		
	Sig. 2-tailed			
<i>Hras</i>	Spearman's rho	0.405	1.000	
	Sig. 2-tailed	<b>0.05</b>		
<i>Nras</i>	Spearman's rho	-0.006	0.105	1.000
	Sig. 2-tailed	0.979	0.634	

Πίνακας 9.1.2: Συντελεστής συσχέτισης  $\rho$  του Spearman και στατιστική σημαντικότητα P της συνέκφρασης των γονιδίων ανά δύο, στην ομάδα των μηγιγιωμάτων.

### 9.1.3 Ομαδοποίηση ανά ζεύγη δειγμάτων (καρκινικός-φυσιολογικός ιστός από τον ίδιο ασθενή)

Σε αυτή την περίπτωση, επειδή ο αριθμός των φυσιολογικών δειγμάτων ήταν αρκετά μικρός (4 φυσιολογικά δείγματα), εξετάστηκε μόνο το προφίλ έκφρασης σε αυτά τα ζεύγη, χωρίς να πραγματοποιηθεί περαιτέρω στατιστική ανάλυση.

#### 9.1.3.A Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) των γονιδίων *Ras*, στα ζεύγη δειγμάτων

Τα αποτελέσματα της μελέτης του προφίλ έκφρασης στα ζεύγη μηνιγγιωμάτων, έδειξε τα ίδια αποτελέσματα με την ομαδοποίηση παθολογικών-φυσιολογικών δειγμάτων στο κεφάλαιο 9.1.2.B. Συγκεκριμένα, φάνηκε ότι το *Kras* κυρίως υπερεκφράζεται, σε αντίθεση με το *Hras* το οποίο έχει κανονική έκφραση σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων. Τέλος, στο *Nras* φάνηκε να υπερτερεί η υπερέκφραση, έναντι της υποέκφρασης και της κανονικής έκφρασης.

Γονίδιο	Υπερ-(%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)
<i>Kras</i>	75 (3/4)	25 (1/4)	- (0/4)
<i>Hras</i>	- (0/4)	75 (3/4)	25 (1/4)
<i>Nras</i>	50 (2/4)	25 (1/4)	25 (1/4)

Πίνακας 9.1.3: Ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης, ανά ζεύγη στα μηνιγγιώματα. Υπερ:υπερέκφραση, υπο:υποέκφραση.

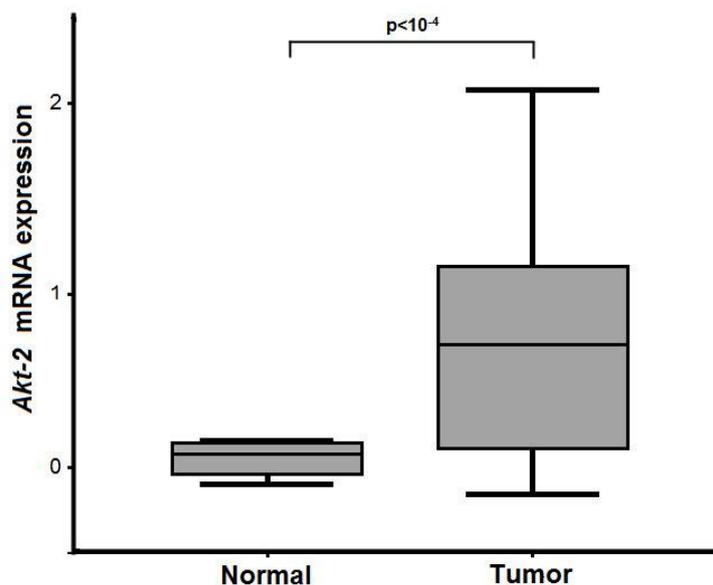
## 9.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ *AKT*, *SDF-1* ΚΑΙ *CXCR4*

### 9.2.1 Ομαδοποίηση σε φυσιολογικά-παθολογικά δείγματα

#### 9.2.1.A Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων *Akt-1*, *Akt-2*, *Akt-3*, *SDF-1α*, *SDF-1β* και *CXCR4* στα μηνιγγιώματα

Στη στατιστική ανάλυση της οικογένειας των γονιδίων *Akt*, διαπιστώθηκε ότι τα μεταγραφικά επίπεδα του *Akt-2* διαφέρουν σημαντικά στα καρκινικά και στα φυσιολογικά δείγματα ( $p < 10^{-4}$ , T-test) (εικόνα 9.2.1). Συγκεκριμένα, η ομάδα των μηνιγγιωμάτων παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα του mRNA, σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα. Το *Akt-1* και *Akt-3* δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο αυτών ομάδων.

Επίσης, η μελέτη της έκφρασης του άξονα *SDF-1/CXCR4*, έδειξε ότι τα γονίδια *SDF-1α*, *SDF-1β* και *CXCR4* δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων.



Εικόνα 9.2.1: Επίπεδα mRNA του *Akt-2* στις ομάδες δειγμάτων. Η ομάδα των μηνιγγιωμάτων παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς ( $p < 10^{-4}$ , T-test).

### 9.2.1.B Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) των γονιδίων *Akt-1*, *Akt-2*, *Akt-3*, *SDF-1α*, *SDF-1β* και *CXCR4*, στα μηνιγγιώματα

Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι τα *Akt-1* και *Akt-2* γονίδια, παρουσιάζουν παρόμοιο προφίλ έκφρασης. Συγκεκριμένα, εμφανίζουν κυρίως υπερέκφραση και κανονική έκφραση, ενώ υποέκφραση είτε σε μικρό ποσοστό είτε καθόλου. Το *Akt-3* αντιθέτως, δεν εμφάνισε καθόλου υπερέκφραση, ενώ κανονική έκφραση και υποέκφραση εμφάνισε σε παρόμοια ποσοστά.

Όσον αφορά τα γονίδια *SDF-1* και *CXCR4*, διαπιστώθηκε ότι έχουν παρόμοιο προφίλ έκφρασης. Και τα τρία γονίδια εμφανίζουν στο μεγαλύτερο ποσοστό των δειγμάτων υποέκφραση, ακολουθεί σε μικρότερο ποσοστό η υπερέκφραση και τέλος η κανονική έκφραση σε μικρό αριθμό δειγμάτων. Συνολικά τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 9.2.1.

Γονίδιο	Υπερ- (%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)	Τιμή p
<i>Akt-1</i>	43.5 (10/23)	48 (11/23)	8.5 (2/23)	NS (υπερ-κανονική) <b>0.007</b> (υπερ-υπο) <b>0.003</b> (κανονική-υπο)
<i>Akt-2</i>	56.5 (13/23)	43.5 (10/23)	- (0/23)	NS (υπερ-κανονική) <math>10^{-4}</math> (υπερ-υπο) <math>10^{-4}</math> (κανονική-υπο)
<i>Akt-3</i>	- (0/23)	56.5 (13/23)	43.5 (10/23)	<math>10^{-4}</math> (υπερ-κανονική) <math>10^{-4}</math> (υπερ-υπο) NS (κανονική-υπο)
<i>SDF-1α</i>	43.5 (10/23)	8.5 (2/23)	48 (11/23)	<math>10^{-4}</math> (υπερ-κανονική) NS (υπερ-υπο) <b>0.003</b> (κανονική-υπο)
<i>SDF-1β</i>	35 (8/23)	8.5 (2/23)	56.5 (13/23)	<b>0.03</b> (υπερ-κανονική) NS (υπερ-υπο) <math>10^{-4}</math> (κανονική-υπο)
<i>CXCR4</i>	35 (8/23)	4 (1/23)	61 (14/23)	<math>10^{-4}</math> (υπερ-κανονική) NS (υπερ-υπο) <math>10^{-4}</math> (κανονική-υπο)

Πίνακας 9.2.1: Ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης στα μηνιγγιώματα. Υπερ:υπερέκφραση, υπο:υποέκφραση. NS: non significant (μη στατιστικά σημαντικό),  $\chi^2$  Test.

### 9.2.1.Γ Ανάλυση συνέκφρασης των επιπέδων mRNA των γονιδίων *Akt-1*, *Akt-2*, *Akt-3*, *SDF-1α*, *SDF-1β* και *CXCR4*

Η αξιολόγηση του προτύπου συνέκφρασης ανά ζεύγος των υπό μελέτη γονιδίων, στην ομάδα των μηνιγγιωμάτων, έδειξε ότι στην οικογένεια των *Akt*, το *Akt-1* και *Akt-3* υπάρχει θετική συσχέτιση έκφρασης ( $p < 10^{-4}$ , Spearman correlation).

Επίσης, όσον αφορά τον άξονα *SDF-1/CXCR4*, παρατηρήθηκε ότι το γονίδιο *SDF-1β*, συνεκφράζεται με τα *SDF-1α* και *CXCR4* (πίνακας 9.2.2).

		<i>Akt-1</i>	<i>Akt-2</i>	<i>Akt-3</i>	<i>SDF-1α</i>	<i>SDF-1β</i>	<i>CXCR4</i>
<i>Akt-1</i>	Spearman's rho	1					
	Sig. 2-tailed	-					
<i>Akt-2</i>	Spearman's rho	0.313	1				
	Sig. 2-tailed	0.146	-				
<i>Akt-3</i>	Spearman's rho	0.672	0.153	1			
	Sig. 2-tailed	<b>0.000</b>	0.485	-			
<i>SDF-1α</i>	Spearman's rho	0.142	0.004	0.003	1		
	Sig. 2-tailed	0.517	0.986	0.989	-		
<i>SDF-1β</i>	Spearman's rho	0.367	-0.125	0.114	0.791	1	
	Sig. 2-tailed	0.085	0.568	0.606	<b>0.000</b>	-	
<i>CXCR4</i>	Spearman's rho	0.357	-0.431	0.073	0.229	0.509	1
	Sig. 2-tailed	0.095	0.04	0.740	0.293	<b>0.013</b>	-

Πίνακας 9.2.2: Συντελεστής συσχέτισης *rho* του Spearman και στατιστική σημαντικότητα P της συνέκφρασης των γονιδίων ανά δύο, στην ομάδα των μηνιγγιωμάτων.

### 9.2.2 Ομαδοποίηση ανά ζεύγη δειγμάτων (καρκινικός-φυσιολογικός ιστός από τον ίδιο ασθενή)

Σε αυτή την περίπτωση, όπως και στη μελέτη των γονιδίων *Ras*, ο αριθμός των φυσιολογικών δειγμάτων (άρα και των ζευγών) ήταν αρκετά μικρός (4 φυσιολογικά δείγματα), οπότε εξετάστηκε μόνο το προφίλ έκφρασης σε αυτά τα ζεύγη, χωρίς να πραγματοποιηθεί περαιτέρω στατιστική ανάλυση.

#### 9.2.2.A Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) των γονιδίων *Akt-1*, *Akt-2*, *Akt-3*, *SDF-1α*, *SDF-1β* και *CXCR4* στα στα ζεύγη μηγγιωμάτων

Στην ανάλυση του προφίλ έκφρασης ανά ζεύγη, παρατηρήθηκε ότι (όπως και στην προηγούμενη ανάλυση, κεφάλαιο 9.2.1.B) τα *Akt-1* και *Akt-2* γονίδια, παρουσιάζουν παρόμοιο προφίλ έκφρασης, αφού και στα δύο υπερτερεί η υπερέκφραση. Το *Akt-3* εμφάνισε κυρίως κανονική έκφραση.

Όσον αφορά τον άξονα *SDF-1/CXCR4*, διαπιστώθηκε ότι το *SDF-1β* και *CXCR4* γονίδιο, εμφάνισαν πιο συχνά υποέκφραση, ενώ το *SDF-1α* κανονική έκφραση. Συνολικά τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 9.2.3.

Γονίδιο	Υπερ- (%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)
<i>Akt-1</i>	75 (3/4)	- (0/4)	25 (1/4)
<i>Akt-2</i>	100 (4/4)	- (0/4)	- (0/4)
<i>Akt-3</i>	- (0/4)	75 (3/4)	25 (1/4)
<i>SDF-1α</i>	25 (1/4)	50 (2/4)	25 (1/4)
<i>SDF-1β</i>	50 (2/4)	- (0/4)	50 (2/4)
<i>CXCR4</i>	25 (1/4)	25 (1/4)	50 (2/4)

Πίνακας 9.2.3: Ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης, ανά ζεύγη στα μηγγιώματα. Υπερ:υπερέκφραση, υπο:υποέκφραση.

## 9.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ p53

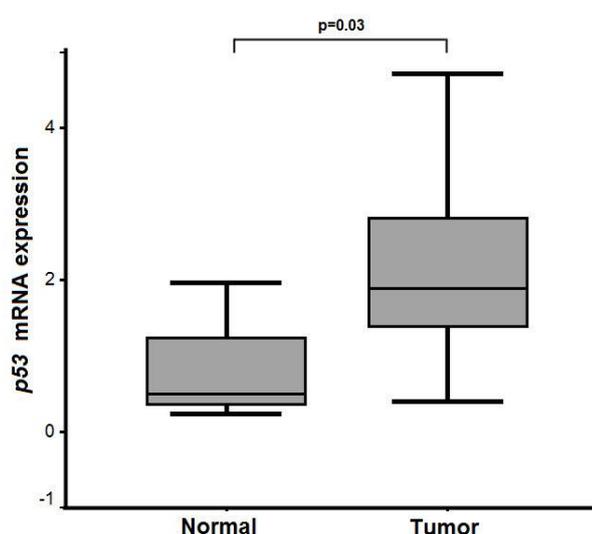
### 9.3.1 Ανίχνευση μεταλλαγών στο γονίδιο p53

Η μέθοδος της αλληλούχισης που εφαρμόστηκε στα δείγματα για την ανίχνευση της μεταλλαγής CGT→TGT (Arg273Cys) στο κωδικόνιο 273, έδειξε την απουσία αυτής της μεταλλαγής στα δείγματα μας.

### 9.3.2 Ομαδοποίηση σε φυσιολογικά-παθολογικά δείγματα

#### 9.3.2.A Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA του γονιδίου p53

Τα μεταγραφικά επίπεδα του p53 παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους καρκινικούς και στους φυσιολογικούς ιστούς. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα mRNA των παθολογικών δειγμάτων ήταν υψηλότερα από αυτά των φυσιολογικών ( $p=0.03$ , T-test). Στην εικόνα 9.3.1 παριστάνονται γραφικά με τη βοήθεια box-plot οι διαφορές της έκφρασης στις ομάδες δειγμάτων.



Εικόνα 9.3.1: Επίπεδα mRNA του p53 στις ομάδες δειγμάτων. Η ομάδα των μηγγιωμάτων παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς ( $p=0.03$ , T-test).

### 9.3.2.B Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) του γονιδίου *p53*, στα μνηγιγιώματα

Το γονίδιο *p53* εμφάνισε στο μεγαλύτερο ποσοστό των δειγμάτων υπερέκφραση, σε ένα μικρότερο ποσοστό κανονική έκφραση και σε ένα μόνο δείγμα υποέκφραση. Στον πίνακα 9.3.1 φαίνονται με λεπτομέρεια τα ποσοστά.

Γονίδιο	Υπερ- (%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)	Τιμή p
<i>p53</i>	61 (14/23)	35 (8/23)	4 (1/23)	NS (υπερ-κανονική) $p < 10^{-4}$ (υπερ-υπο) $p < 10^{-4}$ (κανονική-υπο)

Πίνακας 9.3.1: Ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης στην ομάδα των μνηγιγιωμάτων. Υπερ/υπερέκφραση, υπο/υποέκφραση. NS: non significant (μη στατιστικά σημαντικό),  $X^2$  Test.

### 9.3.3 Ομαδοποίηση ανά ζεύγη δειγμάτων (καρκινικός-φυσιολογικός ιστός από τον ίδιο ασθενή)

Σε αυτή την περίπτωση, όπως και στη μελέτη των γονιδίων *Ras*, ο αριθμός των φυσιολογικών δειγμάτων (άρα και των ζευγών) ήταν αρκετά μικρός (4 φυσιολογικά δείγματα), οπότε εξετάστηκε μόνο το προφίλ έκφρασης σε αυτά τα ζεύγη, χωρίς να πραγματοποιηθεί περαιτέρω στατιστική ανάλυση.

#### 9.3.3.A Μελέτη του προτύπου έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση, υποέκφραση) του γονιδίου *p53* στα ζεύγη μηγγιωμάτων

Η ανάλυση του προφίλ έκφρασης για το γονίδιο *p53* στα ζεύγη, έδειξε τα ίδια αποτελέσματα με την ανάλυση σε μη-ζεύγη (κεφάλαιο 9.3.2.B), αφού διαπιστώθηκε ότι υπερτερεί η υπερέκφραση, αφού εμφανίστηκε στο μεγαλύτερο ποσοστό δειγμάτων (πίνακας 9.3.2).

Γονίδιο	Υπερ- (%)	Κανονική (%)	Υπο- (%)
<i>p53</i>	75 (3/4)	- (0/4)	25 (1/4)

Πίνακας 9.3.2: Ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης, ανά ζεύγη στην ομάδα των μηγγιωμάτων. Υπερ:υπερέκφραση, υπο:υποέκφραση.

Στην ομάδα των μηγγιωμάτων, η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier και η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων, σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων, δεν μπόρεσαν να πραγματοποιηθούν, λόγω ελλειπών κλινικών στοιχείων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΑ ΓΛΟΙΩΜΑΤΑ

#### 10.1 Ογκογονίδια *Ras*

Τα ογκογονίδια *Ras* είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στον κακοήθη μετασχηματισμό των κυττάρων, μετά από την ενεργοποίηση τους και την υπερέκφραση της *Ras-p21* πρωτεΐνης. Ο διπλός ρόλος των *Ras* γονιδίων φαίνεται από το γεγονός ότι έχουν και ογκοκατασταλτική δράση, αφού έχει βρεθεί ότι αυτά τα γονίδια όταν είναι στη φυσιολογική τους μορφή, εμπλέκονται στην κυτταρική γήρανση και απόπτωση.

Τα *Ras* γονίδια έχουν βρεθεί ενεργοποιημένα σε πολλούς καρκίνους, αλλά η συχνότητα τους διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του όγκου. Αρκετές μελέτες, έχουν αναφέρει πολλές μεταλλαγές των *Ras* σε διάφορα είδη όγκων (250-252), συμπεριλαμβανομένων και των αστροκυττωμάτων (253, 254). Εντούτοις οι μεταλλαγές των *Ras* είναι σπάνιο γεγονός στην κακοήθη εξαλλαγή των όγκων εγκεφάλου (77).

Το συνδυασμένο προφίλ της έκφρασης της πρωτεΐνης *Ras-p21*, των μεταγραφικών επιπέδων και ο προσδιορισμός των γενετικών αλλοιώσεων υπό μορφή μεταλλάξεων των τριών *Ras* γονιδίων, δεν έχει μελετηθεί σε ικανοποιητικό αριθμό δειγμάτων όγκων εγκεφάλου. Έτσι, στην παρούσα μελέτη, προσπαθήσαμε να αξιολογήσουμε το πρότυπο έκφρασης των *Ras* γονιδίων σε δείγματα αστροκυττωμάτων βαθμού διαφοροποίησης II, III και IV και να το συγκρίνουμε με αυτό παρακείμενων φυσιολογικών ιστών.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρούσα μελέτη συνιστά την πρώτη προσπάθεια συνδυασμένης μελέτης του προφίλ έκφρασης των mRNA των εξεταζόμενων γονιδίων, σε δείγματα γλοιωμάτων και σχετικά μεγάλου αριθμού φυσιολογικών δειγμάτων που προέρχονται από τον ίδιο ασθενή. Έτσι, για την αξιολόγηση του μοριακού προφίλ κάθε δείγματος όγκου, στη μελέτη μας πραγματοποιήθηκε η σύγκριση της έκφρασης του κάθε παθολογικού δείγματος (της κανονικοποιημένης τιμής του δείγματος με *GAPDH*), με αυτή (κανονικοποιημένη τιμή του δείγματος με *GAPDH*) του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους (στατιστική ανάλυση ανά ζεύγη δειγμάτων και στατιστική ανάλυση μεταξύ φυσιολογικών-παθολογικών δειγμάτων).

### **10.1.1 Συζήτηση των αποτελεσμάτων της ομαδοποίησης σε φυσιολογικά-παθολογικά δείγματα**

#### **10.1.1.A Συζήτηση των αποτελεσμάτων για την ανίχνευση μεταλλαγών στα γονίδια *Ras***

Οι μεταλλαγές των γονιδίων *Ras*, απαντώνται συνήθως στα κωδικόνια 12, 13 και 61, τα οποία θεωρούνται ως “hot-spots”. Στη μελέτη αυτή έγινε προσπάθεια ανίχνευσης της μεταλλαγής Gly12Val (GGT->GTT) στα δείγματα μας. Τα αποτελέσματα έδειξαν την απουσία της συγκεκριμένης μεταλλαγής, αλλά και την ανίχνευση δύο διαφορετικών μεταλλαγών στο *Kras*, σε ένα δείγμα γλοιοβλαστώματος και σε ένα φυσιολογικό δείγμα, υποστηρίζοντας την επικρατούσα άποψη ότι οι μεταλλαγές των *Ras* είναι σπάνιο γεγονός (77) στην κακοήθη εξαλλαγή των όγκων εγκεφάλου. Η απουσία μεταλλαγών στα *Nras* και *Hras*, υποδεικνύει ότι οι μεταλλαγές σε αυτά τα γονίδια, δεν είναι γνώρισμα των γλοιωμάτων.

#### **10.1.1.B Συζήτηση των αποτελεσμάτων των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης, καθώς και της ανάλυσης συνέκφρασης στα γονίδια *Ras* στα γλοιώματα**

Η ανάλυση μεταξύ παθολογικών-φυσιολογικών δειγμάτων, η οποία έδειξε ότι τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *Kras* και *Hras* ήταν χαμηλότερα στα γλοιοβλαστώματα από ότι στους φυσιολογικούς ιστούς, είναι σύμφωνη με μια προηγούμενη μελέτη κατά την οποία παρατηρήθηκαν χαμηλά μεταγραφικά επίπεδα του *Hras* σε ένα μικρό αριθμό (n=4) γλοιοβλαστωμάτων, συγκριτικά με φυσιολογικά δείγματα (100). Η απουσία μεταλλαγών που να ενεργοποιούν την πρωτεΐνη Ras-p21, εξηγεί τα χαμηλά μεταγραφικά επίπεδα των *Kras* και *Hras* που βρέθηκαν στους όγκους, καθώς και το γεγονός της μη ανίχνευσης της Ras-p21 πρωτεΐνης στα δείγματα. Αυτά τα ευρήματα οδηγούν στην υπόθεση της έλλειψης ενεργοποίησης των *Ras*, στα γλοιώματα.

Το γεγονός ότι τα επίπεδα mRNA του *Nras* δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών δειγμάτων, μαζί με την απουσία μεταλλαγών στα εν λόγω δείγματα, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το *Nras* παίζει ένα λιγότερο σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση των γλοιωμάτων, σε σχέση με τα άλλα δύο *Ras* γονίδια. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι το *Kras* και *Hras*, συνεκφράζονται θετικά στα

γλοιοβλαστώματα και όχι στα φυσιολογικά δείγματα. Η θετική συσχέτιση των μεταγραφικών επιπέδων των δύο γονιδίων, υποδεικνύουν το συνεργιστικό ρόλο τους στον κακοήγη μετασχηματισμό των γλοιωμάτων.

#### **10.1.1.Γ Συζήτηση των αποτελεσμάτων του προτύπου έκφρασης των γονιδίων *Ras* στα γλοιώματα**

Το κύριο χαρακτηριστικό της ομάδας των γλοιοβλαστωμάτων και αναπλαστικών αστροκυττωμάτων είναι η υποέκφραση και των τριών γονιδίων *Ras*, ενώ η ομάδα των ινωδών αστροκυττωμάτων εμφάνισε σε ίσα ποσοστά κανονική έκφραση και υποέκφραση. Αν και ο αριθμός των δειγμάτων στις ομάδες των αναπλαστικών και ινωδών αστροκυττωμάτων είναι μικρός, αυτό το εύρημα εάν επαληθευτεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός δείκτης κακοήθειας σε όγκους εγκεφάλου.

#### **10.1.2 Συζήτηση των αποτελεσμάτων της ομαδοποίησης ανά ζεύγη δειγμάτων**

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ανά ζεύγη έδειξαν παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά τα γονίδια *Kras* και *Hras*, αφού το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η υποέκφραση. Το *Nras* όμως, σε αυτή την ανάλυση εμφάνισε στο μεγαλύτερο ποσοστό δειγμάτων υπερέκφραση, σε αντίθεση με την προηγούμενη ανάλυση στην οποία ήταν υποεκφρασμένο. Αυτό το εύρημα είναι σύμφωνο με μια μελέτη, στην οποία αναφέρεται η υπερέκφραση του *Nras* σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστωμάτων, σε σχέση με φυσιολογικά δείγματα (255).

Η απουσία συσχέτισης του *Kras* και *Hras* σε αυτή την ανάλυση, πιθανόν να οφείλεται στο μικρό αριθμό των δειγμάτων-ζευγών ( $n=12$ ) σε αυτή την ανάλυση.

Παρόλο που υπάρχουν μερικές διαφορές στα αποτελέσματα μεταξύ των δύο μεθόδων ανάλυσης, πιστεύουμε ότι η ανάλυση ανά ζεύγη είναι ο πιο κατάλληλος τρόπος για την αξιολόγηση του προφίλ έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων, επειδή το κάθε δείγμα όγκου συγκρίνεται με παρακείμενο φυσιολογικό δείγμα που προήλθε από τον ίδιο ασθενή, λαμβάνοντας υπ' όψη το μοναδικό μοριακό προφίλ του κάθε ασθενούς.

### 10.1.3 Συζήτηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης επιβίωσης κατά Kaplan-Meier και της σύγκρισης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα δείγματα όγκων εγκεφάλου, σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων, στις δύο μεθόδους ανάλυσης

Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier στην ομάδα των πολύμορφων γλοιοβλαστωμάτων, δεν έδειξε συσχέτιση του παρατηρούμενου προφίλ έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση και υποέκφραση), με την επιβίωση των ασθενών.

Τα επίπεδα έκφρασης mRNA των γονιδίων *Ras*, δεν βρέθηκαν να συσχετίζονται με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα που εξετάστηκαν, όπως η ηλικία και η περιοχή ανεύρεσης του όγκου, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτά τα στοιχεία δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και στην εξέλιξη των όγκων. Λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων στις ομάδες αναπλαστικών και ινωδών αστροκυττωμάτων, η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων, δεν μπόρεσε να αξιολογηθεί.

### Συμπέρασμα

Η μεταγραφική υποέκφραση των γονιδίων *Ras* στα γλοιώματα και η απουσία μεταλλαγών ικανών να ενεργοποιήσουν τα *Ras*, που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη, υποδεικνύουν την απώλεια της ογκοκατασταλτικής τους δράσης, οδηγώντας στο σχηματισμό όγκων. Τα *Ras* δρουν ως ογκογονίδια όταν ενεργοποιηθούν, ενώ τα φυσιολογικά *Ras*, έχουν ογκοκατασταλτική δράση (256-259). Τα αποτελέσματά μας, υποστηρίζουν προηγούμενες μελέτες, οι οποίες αναφέρουν το διπλό ρόλο των *Ras*. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι μηχανισμοί μέσω των οποίων δρουν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια, είναι η ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία οδηγούν στην απόπτωση και στη κυτταρική γήρανση.

## 10.2 Άξονας AKT/CXCR4

Η ενεργοποίηση της PKB και η συνεχής δράση του σηματοδοτικού μονοπατιού, έχειδειχθεί ότι μπορεί να επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, συνεισφέροντας έτσι, στην εξέλιξη των όγκων. Διάφορες μελέτες, έχουν δείξει την εμπλοκή της πρωτεΐνης PKB στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη διάφορων τύπων όγκων. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί η υπερέκφραση και η υπερενεργοποίηση της πρωτεΐνης σε πληθώρα όγκων, γεγονός που σχετίζεται συχνά με κακή πρόγνωση (139, 140, 260). Ακόμα μελέτες αναφέρουν τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων *Akt-1* και *Akt-2* σε διάφορους όγκους, όπως καρκίνο ωοθηκών, παγκρέατος, μαστού και προστάτη (134-139). Στους όγκους εγκεφάλου οι αναφορές που σχετίζονται με το προφίλ έκφρασης των γονιδίων και της πρωτεΐνης Akt, είναι περιορισμένες. Η υπερενεργοποίηση της πρωτεΐνης βρέθηκε σε πολύμορφα γλοιοβλαστώματα στα ποντίκια (261, 262), ενώ όσον αφορά τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *Akt*, οι αναφορές που υπάρχουν στη βιβλιογραφία περιορίζονται υπερέκφραση του *Akt-3* mRNA σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού και προστάτη (141) και στην υπερέκφραση του *Akt-1* σε ένα δείγμα από συνολικά 103 δείγματα γλοιοβλαστωμάτων (263).

Ο αγγειογενετικός παράγοντας CXCL12 και ο υποδοχέας του, ο CXCR4, φαίνεται από βιβλιογραφικά δεδομένα ότι εμπλέκονται στη παθογένεση των όγκων. Ο άξονας SDF-1/CXCR4 έχει βρεθεί ότι επάγει την αγγειογένεση και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων σε αρκετούς καρκίνους όπως στον καρκίνο του μαστού (161, 162), πνεύμονα (163), προστάτη (164) και νευροβλαστώματος (165).

Μια μελέτη έχει δείξει ότι ο πολλαπλασιασμός κυττάρων γλοιοβλαστώματος, ο οποίος διεγείρεται από τον SDF-1a, σχετίζεται με την ενεργοποίηση του μονοπατιού Akt/PKB, υποδεικνύοντας την συνδυασμένη δράση των *Akt* και του άξονα SDF-1/CXCR4 στην δημιουργία όγκων (175).

Δεδομένου ότι οι πληροφορίες που έχουμε σχετικά με την έκφραση σε επίπεδο mRNA των γονιδίων *Akt* σε ανθρώπινους όγκου εγκεφάλου είναι πολύ περιορισμένες, στην παρούσα μελέτη αξιολογήσαμε το πρότυπο έκφρασης των τριών γονιδίων *Akt*, *SDF-1* και *CXCR4* σε δείγματα γλοιομάτων και το συγκρίναμε με αυτό των φυσιολογικών, παρακείμενων ιστών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρούσα μελέτη συνιστά την πρώτη προσπάθεια συνδυασμένης μελέτης του προφίλ έκφρασης των mRNA των εξεταζόμενων γονιδίων, σε δείγματα γλοιομάτων και φυσιολογικών δειγμάτων που προέρχονται από τον

ίδιο ασθενή. Σε προηγούμενες μελέτες, τα μεταγραφικά επίπεδα των παθολογικών δειγμάτων συγκρίνονταν με το μέσο όρο των μεταγραφικών επιπέδων των φυσιολογικών δειγμάτων, τα οποία προέρχονταν από διαφορετικούς ασθενείς. Έτσι, για την αξιολόγηση του μοριακού προφίλ κάθε δείγματος όγκου, στη μελέτη μας πραγματοποιήθηκε η σύγκριση της έκφρασης του κάθε παθολογικού δείγματος (της κανονικοποιημένης τιμής του δείγματος με *GAPDH*), με αυτή (κανονικοποιημένη τιμή του δείγματος με *GAPDH*) του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους (στατιστική ανάλυση ανά ζεύγη δειγμάτων και στατιστική ανάλυση μεταξύ φυσιολογικών-παθολογικών δειγμάτων).

### **10.2.1 Συζήτηση των αποτελεσμάτων της ομαδοποίησης σε φυσιολογικά-παθολογικά δείγματα**

#### **10.2.1.A Συζήτηση των αποτελεσμάτων των μεταγραφικών επιπέδων και του προτύπου έκφρασης των γονιδίων *Akt-1*, *Akt-2*, *Akt-3*, *SDF-1α*, *SDF-1β* και *CXCR4* στα γλοιώματα**

Με βάση την ανάλυση μεταξύ παθολογικών-φυσιολογικών δειγμάτων, τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *Akt-1* και *Akt-2* δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων (γλοιοβλαστώματα, αναπλαστικά και ινώδη αστροκυτώματα) σε αντίθεση με το *Akt-3*, του οποίου τα επίπεδα mRNA βρέθηκαν να είναι χαμηλότερα στις τρεις ομάδες όγκων σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα. Τα αποτελέσματα μας στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων, έδειξαν μεγάλο ποσοστό υποέκφρασης του *Akt-3*, ενώ τα γονίδια *Akt-1* και *Akt-2* επέδειξαν κυρίως κανονική έκφραση. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στις ομάδες των αναπλαστικών και των ιωδών αστροκυττωμάτων. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι κανένα δείγμα δεν παρουσίασε υπερέκφραση σε καμία ομάδα. Τα ευρήματα αυτά είναι τα πρώτα που παρουσιάζονται στη διεθνή βιβλιογραφία και αφορούν γλοιοβλαστώματα. Οι μέχρι σήμερα βιβλιογραφικές αναφορές, αφορούν μελέτες σε καρκινικές κυτταρικές σειρές από καρκίνο του μαστού όπου είχε παρατηρηθεί υπερ-έκφραση των γονιδίων *Akt-1* και *Akt-3* (141).

Τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *SDF-1α*, *SDF-1β* και *CXCR4* δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες δειγμάτων. Ο *SDF-1α* και ο *SDF-1β* στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων εμφάνισαν σε ένα στατιστικά σημαντικό ποσοστό

υποέκφραση, ενώ το γονίδιο *CXCR4* εμφάνισε υπερέκφραση, κανονική έκφραση και υποέκφραση σε παρόμοια ποσοστά. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στις ομάδες των αναπλαστικών και ινωδών αστροκυττωμάτων, αφού το κύριο χαρακτηριστικό των τριών γονιδίων ήταν η υποέκφραση, με εξαίρεση το γονίδιο *SDF-1β*, το οποίο στην ομάδα των αναπλαστικών αστροκυττωμάτων, εμφάνισε σε μεγαλύτερο ποσοστό κανονική έκφραση. Βιβλιογραφικά δεδομένα που να αφορούν το προφίλ έκφρασης του άξονα *SDF-1/CXCR4*, δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής για τα γλοιώματα. Μια μελέτη, έδειξε ότι το mRNA του *SDF-1* και του *CXCR4* εκφράζεται σε ποσοστό 13/31 (42%) και 28/31 (90%) αντίστοιχα, στα γλοιώματα (169). Αυτή η μελέτη όμως, σε αντίθεση με τη δική μας, δεν πραγματοποιήθηκε σε φυσιολογικό ιστό και δεν έχει να κάνει με το προφίλ έκφρασης (δηλαδή υπερέκφραση, υποέκφραση, κανονική έκφραση) στα συγκεκριμένα δείγματα.

#### **10.2.1.B Συζήτηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης συνέκφρασης των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *Akt-1*, *Akt-2*, *Akt-3*, *SDF-1α*, *SDF-1β* και *CXCR4***

Στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων, το *Akt-2* βρέθηκε να συνεκφράζεται θετικά με το *Akt-3*, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή συνεργιστική δράση των πρωτεϊνών *Akt-2* και *Akt-3* στην εξέλιξη των όγκων.

Στην ομάδα των φυσιολογικών δειγμάτων, τα γονίδια *SDF-1α*, *SDF-1β* και *CXCR4* συσχετίζονταν θετικά μεταξύ τους, γεγονός αναμενόμενο, αφού ο *CXCR4* είναι υποδοχέας των δύο ισομορφών *SDF-1*. Στα γλοιοβλαστώματα όμως, αυτή η συσχέτιση παύει να υπάρχει, πράγμα που υποδεικνύει την απορύθμιση του μονοπατιού.

#### **10.2.1.Γ Συζήτηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης επιβίωσης κατά Kaplan-Meier**

Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier στην ομάδα των πολύμορφων γλοιοβλαστωμάτων, δεν έδειξε συσχέτιση του παρατηρούμενου προφίλ έκφρασης (υπερέκφραση, κανονική έκφραση και υποέκφραση), με την επιβίωση των ασθενών. Αυτό ίσως οφείλεται στο μικρό αριθμό δειγμάτων, γιατί η ενεργοποίηση του μονοπατιού PKB/Akt φαίνεται να εμπλέκεται περισσότερο στην εξέλιξη των όγκων, παρά στη δημιουργία τους. Αυτό υποστηρίζεται από ευρήματα που αναφέρουν ότι η ενεργοποίηση

της πρωτεΐνης σχετίζεται με τον ιστολογικό τύπο (264) και ότι μπορεί να οδηγήσει στη μετατροπή ανθρώπινων αναπλαστικών αστροκυττωμάτων σε γλοιοβλαστώματα (265). Πιθανόν, εάν ο αριθμός των δειγμάτων στις ομάδες των αναπλαστικών και ινωδών αστροκυττωμάτων ήταν ικανοποιητικός για τη διεξαγωγή αυτής της στατιστικής ανάλυσης, να μας έδινε χρήσιμα στοιχεία για την προγνωστική αξία των γονιδίων *Akt* και του άξονα SDF-1/CXCR4.

#### **10.2.1.Δ Συζήτηση των αποτελεσμάτων της σύγκρισης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα δείγματα όγκων εγκεφάλου, σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων**

Τα επίπεδα έκφρασης mRNA των γονιδίων *Akt-1*, *Akt-2*, *Akt-3*, *SDF-1α*, *SDF-1β* και *CXCR4* δεν βρέθηκαν να συσχετίζονται με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα που εξετάστηκαν, όπως η ηλικία και η περιοχή ανεύρεσης του όγκου, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτά τα στοιχεία δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και στην εξέλιξη των όγκων. Λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων στις ομάδες αναπλαστικών και ινωδών αστροκυττωμάτων, η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων, δεν μπόρεσε να αξιολογηθεί.

#### **10.2.2 Συζήτηση των αποτελεσμάτων της ομαδοποίησης ανά ζεύγη δειγμάτων**

Η ανάλυση ανά ζεύγη δειγμάτων στα γονίδια *Akt*, έδειξε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά της ανάλυσης μεταξύ παθολογικών-φυσιολογικών δειγμάτων. Συγκεκριμένα, το κύριο χαρακτηριστικό αυτής της ανάλυσης ήταν η υποέκφραση του γονιδίου *Akt-3* σε μεγάλο ποσοστό δειγμάτων, ενώ τα *Akt-1* και *Akt-2* γονίδια εμφάνισαν κανονική έκφραση και υποέκφραση σε παρόμοια ποσοστά.

Για τον άξονα SDF-1/CXCR4 όμως, η ανάλυση ανά ζεύγη δεν έδειξε τα ίδια αποτελέσματα με την ανάλυση παθολογικών-φυσιολογικών δειγμάτων. Συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκε υποέκφραση σε μεγάλο ποσοστό στα γονίδια *SDF-1α* και *SDF-1β*, όπως είχε παρατηρηθεί στην προηγούμενη ανάλυση, αλλά τα τρία γονίδια εμφάνισαν παρόμοια ποσοστά υπερέκφρασης, κανονικής έκφρασης και υποέκφρασης, χωρίς στατιστικά

σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Αυτή η διαφορά μεταξύ των δύο αναλύσεων, πιθανόν να οφείλεται στον μικρό αριθμό δειγμάτων της ανάλυσης ανά ζεύγη.

Η ανάλυση συνέκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων ανά δύο, στα ζεύγη δειγμάτων, έδειξε μια θετική συσχέτιση μεταξύ του *Akt-2* και *Akt3*, όπως ακριβώς αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ανάλυση, μεταξύ φυσιολογικών-παθολογικών δειγμάτων.

Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier και τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών στην ομάδα των πολύμορφων γλοιοβλαστωμάτων, δεν μπόρεσαν να παράξουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την εμπλοκή τους στην εξέλιξη των γλοιωμάτων.

Παρόλο που ο αριθμός των ζευγών είναι αρκετά μικρός, πιστεύουμε ότι η ανάλυση ανά ζεύγη είναι ο πιο κατάλληλος τρόπος για την αξιολόγηση του προφίλ έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων, επειδή το κάθε δείγμα όγκου συγκρίνεται με παρακείμενο φυσιολογικό δείγμα που προήλθε από τον ίδιο ασθενή.

Συμπερασματικά, το κύριο χαρακτηριστικό της μελέτης των γονιδίων *Akt*, είναι η υποέκφραση του *Akt-3*. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Akt/PKB, που έχει βρεθεί στους όγκους, πιθανόν να οφείλεται σε μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς και όχι στα επίπεδα mRNA των *Akt* γονιδίων.

Περαιτέρω μελέτη των μετα-μεταγραφικών μηχανισμών και των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης PKB καθώς και του άξονα SDF1/CXCR4, σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, θα δώσουν περισσότερες πληροφορίες για το ρόλο των εν λόγω γονιδίων στη εξέλιξη και στη παθογένεση των όγκων. Επίσης, η μελέτη της έκφρασης των εξεταζόμενων γονιδίων εκτός από το ότι μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της καρκινογένεσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς και προγνωστικούς σκοπούς.

### **10.3 Γονίδιο p53**

Σε όλα τα φυσιολογικά κύτταρα, η p53 βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Στην περίπτωση καταστροφής του DNA, τα επίπεδα της p53 αυξάνονται, με αποτέλεσμα το κύτταρο να οδηγηθεί σε απόπτωση ή σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Μεταλλάξεις στην p53 είναι συχνές σε διάφορους όγκους, ανάμεσα

τους και οι όγκοι εγκεφάλου (230, 233, 234). Υπάρχουν αμφιλεγόμενες απόψεις όσον αφορά τις μεταλλαγές στο εν λόγω γονίδιο, αφού άλλες κάνουν λόγο για συσχέτιση τους με την πρόγνωση (230, 235), ενώ άλλες υποστηρίζουν ότι δεν επηρεάζουν την κλινική εικόνα του ασθενούς και το χρόνο επιβίωσης του (236-238).

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια συνδυασμένης μελέτης του προφίλ έκφρασης των mRNA των εξεταζόμενων γονιδίων και ανίχνευσης μεταλλαγών, σε δείγματα γλοιομάτων και σχετικά μεγάλου αριθμού φυσιολογικών δειγμάτων που προέρχονται από τον ίδιο ασθενή. Έτσι, για την αξιολόγηση του μοριακού προφίλ κάθε δείγματος όγκου, στη μελέτη μας πραγματοποιήθηκε η σύγκριση της έκφρασης του κάθε παθολογικού δείγματος (της κανονικοποιημένης τιμής του δείγματος με *GAPDH*), με αυτή (κανονικοποιημένη τιμή του δείγματος με *GAPDH*) του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους (στατιστική ανάλυση ανά ζεύγη δειγμάτων και στατιστική ανάλυση μεταξύ φυσιολογικών-παθολογικών δειγμάτων).

### **10.3.1 Συζήτηση των αποτελεσμάτων των μεταγραφικών επιπέδων, του προτύπου έκφρασης και της ανάλυσης επιβίωσης κατά Kaplan-Meier**

Με βάση την ανάλυση μεταξύ παθολογικών-φυσιολογικών δειγμάτων, τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου της *p53*, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων (γλοιοβλαστώματα, αναπλαστικά και ινώδη αστροκυτώματα). Από την ανάλυση του προφίλ έκφρασης προέκυψαν παρόμοια αποτελέσματα στις δύο αναλύσεις. Στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων, τα δείγματα εμφάνισαν υπερέκφραση, κανονική έκφραση και υποέκφραση του γονιδίου *p53*, σε ποσοστά χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές, ενώ στις ομάδες των αναπλαστικών και ινωδών αστροκυττωμάτων, το προφίλ έκφρασης που επέδειξαν τα δείγματα ήταν το ίδιο, αφού εμφάνισαν κυρίως κανονική έκφραση. Τα αποτελέσματα αυτά, υποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση της *p53* πρωτεΐνης, πιθανόν να ρυθμίζεται μετα-μεταγραφικά.

Η προγνωστική αξία των μεταγραφικών επιπέδων του *p53* εξετάστηκε με την ανάλυση κατά Kaplan-Meier στην ομάδα των πολύμορφων γλοιοβλαστωμάτων. Παρατηρήθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά το χρόνο επιβίωσης των ασθενών, μεταξύ της υπερέκφρασης και της κανονικής έκφρασης του γονιδίου *p53*. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς που υπερέκφραζαν το εν λόγω γονίδιο, είχαν μικρότερη επιβίωση συγκριτικά με τους ασθενείς που το εξέφραζαν κανονικά. Με αυτό το

εύρημα, το γονίδιο της p53 μπορεί να θεωρηθεί προγνωστικός δείκτης στα γλοιώματα, εάν επαληθευτεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

Η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier και τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών στην ομάδα των πολύμορφων γλοιοβλαστωμάτων, δεν μπόρεσαν να παράξουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την εμπλοκή τους στην εξέλιξη των γλοιωμάτων, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτά τα στοιχεία δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και στην εξέλιξη των όγκων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΑ ΜΗΝΙΓΓΙΩΜΑΤΑ

#### 11.1 Ογκογονίδια *Ras*

Όπως αναφέρθηκε εκτενώς και σε προηγούμενο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής, τα ογκογονίδια *Ras* εμπλέκονται στη διαδικασία κακοήθους εξαλλαγής των φυσιολογικών κυττάρων τόσο στην κατεύθυνση της επαγωγής των όγκων αλλά και στην κατεύθυνση της καταστολής αυτών. Ο διπτός αυτός ρόλος των γονιδίων *Ras* έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών σε πολλά διαφορετικά είδη καρκίνου (90). Εντούτοις δεν έχει διερευνηθεί ικανοποιητικά μέχρι σήμερα ο ρόλος και ο μοριακός μηχανισμός δράσης των γονιδίων *Ras* στην δημιουργία των μηνιγγιωμάτων. Στο τμήμα αυτό της παρούσας διατριβής μελετήθηκε το συνδυασμένο προφίλ έκφρασης της πρωτεΐνης Ras-p21, των μεταγραφικών επιπέδων και ο προσδιορισμός των γενετικών αλλοιώσεων υπό μορφή μεταλλάξεων των τριών *Ras* γονιδίων σε έναν μεγάλο αριθμό μηνιγγιωμάτων. Το προφίλ αυτό των μηνιγγιωμάτων συγκρίθηκε με αυτό φυσιολογικών δειγμάτων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι και στην περίπτωση των μηνιγγιωμάτων η παρούσα μελέτη συνιστά την πρώτη προσπάθεια συνδυασμένης μελέτης του προφίλ έκφρασης των mRNA των εξεταζόμενων γονιδίων, σε δείγματα μηνιγγιωμάτων και σχετικά μεγάλου αριθμού φυσιολογικών δειγμάτων που προέρχονται από τον ίδιο ασθενή. Έτσι, για την αξιολόγηση του μοριακού προφίλ κάθε δείγματος όγκου, στη μελέτη μας πραγματοποιήθηκε η σύγκριση της έκφρασης του κάθε παθολογικού δείγματος (της κανονικοποιημένης τιμής του δείγματος με *GAPDH*), με αυτή (κανονικοποιημένη τιμή του δείγματος με *GAPDH*) του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους (στατιστική ανάλυση ανά ζεύγη δειγμάτων και στατιστική ανάλυση μεταξύ φυσιολογικών-παθολογικών δειγμάτων).

#### 11.1.1 Συζήτηση των αποτελεσμάτων για την ανίχνευση μεταλλαγών στα γονίδια *Ras*

Οι μεταλλαγές των γονιδίων *Ras*, απαντώνται συνήθως στα κωδικόνια 12, 13 και 61, τα οποία θεωρούνται ως “hot-spots”. Τα αποτελέσματά μας, όπως και στην περίπτωση

των γλοιωμάτων, έδειξαν την απουσία της Gly12Val (GGT->GTT) μεταλλαγής στα μηνιγγιώματα. Βρέθηκε όμως σε ένα μόνο μηνιγγίωμα η ίδια μεταλλαγή που βρέθηκε σε ένα γλοιοβλάστωμα στο *Kras*. Αυτό το εύρημα, όπως και η απουσία μεταλλαγών στα *Nras* και *Hras* γονίδια, υποδεικνύει ότι όπως και στα γλοιώματα, οι μεταλλαγές στους όγκους εγκεφάλου, είναι σπάνιο φαινόμενο.

### **11.1.2 Συζήτηση των αποτελεσμάτων των επιπέδων mRNA, του προτύπου έκφρασης καθώς και της ανάλυσης συνέκφρασης στα γονίδια *Ras* στα μηνιγγιώματα**

Από την ανάλυση μεταξύ παθολογικών-φυσιολογικών δειγμάτων, φαίνεται ότι τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *Kras* και *Nras*, είναι ψηλότερα στα παθολογικά δείγματα σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς, γεγονός που δεν εξηγείται από την απουσία μεταλλαγών στα μηνιγγιώματα. Πιθανολογούμε ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων *Ras* πραγματοποιείται μέσω άλλων μηχανισμών και όχι από την παρουσία μεταλλαγών, όπως συμβαίνει σε αρκετούς όγκους. Σημειώνουμε ότι στην περίπτωση των γλοιωμάτων η μελέτη μας η οποία παρουσιάστηκε αναλυτικά στο προηγούμενο κεφάλαιο ανέδειξε χαμηλότερα μεταγραφικά επίπεδα των *Kras* και *Hras* στα παθολογικά από ότι στα φυσιολογικά δείγματα. Αυτή η διαφορά μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η έκφραση των *Ras* γονιδίων έχει βρεθεί ότι διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του όγκου (266). Επιπροσθέτως το παραπάνω εύρημα συνηγορεί υπέρ της υπόθεσης ότι διαφορετικοί μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για την κακοήθη εξαλλαγή των κυττάρων του εγκεφάλου που οδηγούν στην ανάπτυξη των γλοιωμάτων και πιθανόν διαφορετικά μοριακά μονοπάτια να ευθύνονται για την ανάπτυξη των μηνιγγιωμάτων.

Από την ανάλυση συνέκφρασης διαπιστώθηκε ότι το *Kras* συνεκφράζεται θετικά με το *Hras* στην ομάδα των μηνιγγιωμάτων, όπως ακριβώς βρέθηκε και στην ανάλυση των γλοιωμάτων. Η θετική συσχέτιση των μεταγραφικών επιπέδων των δύο γονιδίων στις δύο μεγάλες ομάδες όγκων, υποδεικνύουν το συνεργιστικό ρόλο τους στον κακοήθη μετασχηματισμό των όγκων εγκεφάλου.

Τα αποτελέσματα της μελέτης του προφίλ έκφρασης στα ζεύγη μηνιγγιωμάτων, έδειξε τα ίδια αποτελέσματα με την ομαδοποίηση παθολογικών-φυσιολογικών δειγμάτων, επαληθεύοντας τα αποτελέσματα της προηγούμενης ανάλυσης.

## 11.2 Άξονας AKT/CXCR4

Διάφορες μελέτες, έχουν δείξει την εμπλοκή της πρωτεΐνης PKB στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη διάφορων όγκων. Στους όγκους εγκεφάλου οι αναφορές που σχετίζονται με το προφίλ έκφρασης των γονιδίων και της πρωτεΐνης Akt, είναι περιορισμένες. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού του PI3K/Akt συνεισφέρει στον επιθετικό φαινότυπο των κακοηθών μηνιγγιωμάτων (267). Όσον αφορά τα μεταγραφικά επίπεδα των CXCR4 και SDF-1 στα μηνιγγιώματα, έχουν βρεθεί στο 78% και στο 53% αντίστοιχα (268).

Δεδομένου ότι οι πληροφορίες που έχουμε σχετικά με την έκφραση σε επίπεδο mRNA των γονιδίων *Akt*, *SDF-1* και *CXCR4* σε ανθρώπινους όγκου εγκεφάλου είναι πολύ περιορισμένες, στην παρούσα μελέτη αξιολογήσαμε το πρότυπο έκφρασης των τριών γονιδίων *Akt*, *SDF-1* και *CXCR4* σε δείγματα μηνιγγιωμάτων και το συγκρίναμε με αυτό των φυσιολογικών, παρακείμενων ιστών.

### 11.2.1 Συζήτηση των αποτελεσμάτων των μεταγραφικών επιπέδων και του προτύπου έκφρασης των γονιδίων *Akt-1*, *Akt-2*, *Akt-3*, *SDF-1α*, *SDF-1β* και *CXCR4* στα μηνιγγιώματα

Με βάση την ανάλυση μεταξύ παθολογικών-φυσιολογικών δειγμάτων, η ομάδα των μηνιγγιωμάτων παρουσιάζει υψηλότερα μεταγραφικά επίπεδα του *Akt-2*, σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα, γεγονός που πιθανόν να εξηγεί την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης PKB και κατά συνέπεια την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του PI3K/PKB.

Το προφίλ της έκφρασης του *Akt-3* φαίνεται να είναι παρόμοιο ανάμεσα στα μηνιγγιώματα και στα γλοιώματα, αφού και στις δύο αυτές μεγάλες κατηγορίες όγκων δεν παρουσίασε υπερέκφραση. Στα γλοιώματα γενικά (γλοιοβλαστώματα, αναπλαστικά και ινώδη αστροκυττώματα) το κύριο χαρακτηριστικό ήταν η υποέκφραση του *Akt-3*, στα μηνιγγιώματα όμως, φαίνεται να αλλάζει αυτό το μοτίβο, αφού το μεγαλύτερο ποσοστό των δειγμάτων παρουσίασε κανονική έκφραση και μικρότερο ποσοστό υποέκφραση. Αυτή η διαφορά ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι οι ισομορφές των Akt, εκφράζονται διαφορετικά στους διάφορους τύπους όγκων.

Από τη μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων των *Akt* γονιδίων συμπεραίνουμε ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού της PKB στους όγκους εγκεφάλου (γενικά) μπορεί να

πραγματοποιείται μέσω μετα-μεταγραφικών μηχανισμών, οι οποίοι τελικά να οδηγούν στον κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων.

Στα μηνιγγιώματα προέκυψε ότι το *Akt-1* και *Akt-3* συνεκφράζονται θετικά, ενώ στην ομάδα των γλοιοβλαστωμάτων, το *Akt-2* βρέθηκε να συνεκφράζεται θετικά με το *Akt-3*, ευρήματα που υποδηλώνουν την πιθανή συνεργιστική δράση των ισομορφών των PKB πρωτεϊνών στην εξέλιξη των όγκων, ίσως με διαφορετικό τρόπο-μηχανισμό ανάμεσα στους διάφορους τύπους όγκων.

Η ανάλυση ανά ζεύγη στα μηνιγγιώματα, έδειξε παρόμοια αποτελέσματα σε σχέση με την ανάλυση μεταξύ παθολογικών-φυσιολογικών δειγμάτων, γεγονός που επαληθεύει τα αποτελέσματα της μεθόδου. Οι μικρές διαφορές στις τιμές των ποσοστών, μπορεί να οφείλονται στο μικρό αριθμό ( $n=4$ ) των δειγμάτων-ζευγών της ανάλυσης ανά ζεύγη.

Όπως και στα γλοιώματα, τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *SDF-1 $\alpha$* , *SDF-1 $\beta$*  και *CXCR4* δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες δειγμάτων. Επίσης, όσον αφορά τον άξονα *SDF-1/CXCR4*, παρατηρήθηκε ότι το γονίδιο *SDF-1 $\beta$* , συνεκφράζεται θετικά με τα *SDF-1 $\alpha$*  και *CXCR4*, υποδεικνύοντας ότι μπορεί να παίζουν συνεργιστικό ρόλο στη παθογένεση των μηνιγγιωμάτων.

### 11.3 Γονίδιο *p53*

Σε όλα τα φυσιολογικά κύτταρα, η *p53* βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Στην περίπτωση καταστροφής του DNA, τα επίπεδα της *p53* αυξάνονται, με αποτέλεσμα το κύτταρο να οδηγηθεί σε απόπτωση ή σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Μεταλλαγές στην *p53* είναι συχνές σε διάφορους όγκους, ανάμεσα τους και οι όγκοι εγκεφάλου (230, 233, 234). Στα μηνιγγιώματα τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη βιβλιογραφία, είναι αμφιλεγόμενα ως προς το ρόλο της *p53*.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια συνδυασμένης μελέτης του προφίλ έκφρασης των mRNA των εξεταζόμενων γονιδίων και ανίχνευσης μεταλλαγών, σε δείγματα γλοιωμάτων και σχετικά μεγάλου αριθμού φυσιολογικών δειγμάτων που προέρχονται από τον ίδιο ασθενή. Έτσι, για την αξιολόγηση του μοριακού προφίλ κάθε δείγματος όγκου, στη μελέτη μας πραγματοποιήθηκε η σύγκριση της έκφρασης του κάθε παθολογικού δείγματος (της κανονικοποιημένης τιμής του δείγματος με *GAPDH*), με αυτή (κανονικοποιημένη τιμή του δείγματος με *GAPDH*) του παρακείμενου φυσιολογικού

ιστού. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους (στατιστική ανάλυση ανά ζεύγη δειγμάτων και στατιστική ανάλυση μεταξύ φυσιολογικών-παθολογικών δειγμάτων).

### **11.3.1 Συζήτηση των αποτελεσμάτων των μεταγραφικών επιπέδων και του προτύπου έκφρασης του γονιδίου στα μηνιγγιώματα**

Με βάση την ανάλυση μεταξύ παθολογικών-φυσιολογικών δειγμάτων, τα επίπεδα mRNA του *p53*, στα παθολογικά δείγματα ήταν υψηλότερα από αυτά των φυσιολογικών ιστών, γεγονός αναμενόμενο, αφού σε περίπτωση καταστροφής του DNA, τα επίπεδα της *p53* αυξάνονται. Στην περίπτωση των μηνιγγιωμάτων, παρατηρήθηκε υπερέκφραση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου της *p53*, σε αντίθεση με τα γλοιώματα, όπου το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου περιλάμβανε υπερέκφραση, κανονική έκφραση και υποέκφραση. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε διαφορετικούς μηχανισμούς ενεργοποίησης της *p53* πρωτεΐνης ανάμεσα στα γλοιώματα και στα μηνιγγιώματα.

Η ανάλυση ανά ζεύγη έδειξε παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά το προφίλ έκφρασης του γονιδίου της *p53*, επαληθεύοντας, έτσι τα αποτελέσματα της προηγούμενης ανάλυσης.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Brandes A, Soesan M, Fiorentino MV. Medical treatment of high grade malignant gliomas in adults: an overview. *Anticancer Res.* (1991) 11:719-27
2. Johansson Swartling F. Identifying candidate genes involved in brain tumor formation. *Ups J Med Sci.* (2008)113:1-38
3. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* (2002) 61:215-25
4. Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF et al. Primary brain tumours in adults. *Lancet.* (2003) 361:323-31
5. Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW et al. Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer* (1997)79:1381-93
6. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* (2001) 15:1311-33
7. Merlo A. Genes and pathways driving glioblastomas in humans and murine disease models. *Neurosurg Rev.* (2003) 26:145-58
8. Louis DN, Gusella JF. A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *Trends Genet.* (1995) 11:412-5
9. Stupp R, Hegi ME, van den Bent MJ et al. Changing paradigms--an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. *Oncologist.* (2006) 11:165-80
10. Hermanson M, Funa K, Hartman M et al. Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res.* (1992) 52:3213-9
11. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst.* (1998) 90:1473-9
12. Fallon KB, Palmer CA, Roth KA et al. Prognostic value of 1p, 19q, 9p, 10q, and EGFR-FISH analyses in recurrent oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* (2004) 63:314-22
13. Schmidt MC, Antweiler S, Urban N et al. Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* (2002) 61:321-8
14. Jhavar BS, Fuchs CS, Colditz GA et al. Sex steroid hormone exposures and risk for meningioma. *J Neurosurg.* (2003) 99:848-53

15. Kalamarides M, Niwa-Kawakita M, Leblais H et al. Nf2 gene inactivation in arachnoidal cells is rate-limiting for meningioma development in the mouse. *Genes Dev.* (2002) 16:1060-5
16. Lee Y, Liu J, Patel S et al. Genomic landscape of meningiomas. *Brain Pathol.* (2010) 20:751-62
17. Amatya VJ, Takeshima Y, Inai K. Methylation of p14 (ARF) gene in meningiomas and its correlation to the p53 expression and mutation. *Mod Pathol.* (2004) 17:705-10
18. Boldrini L, Pistolesi S, Gisfredi S et al. Telomerase in intracranial meningiomas. *Int J Mol Med.* (2003) 12:943-7
19. Johnson MD, Okediji E, Woodard A. Transforming growth factor-beta effects on meningioma cell proliferation and signal transduction pathways. *J Neurooncol.* (2004) 66:9-16
20. Arena S, Barbieri F, Thellung S et al. Expression of somatostatin receptor mRNA in human meningiomas and their implication in in vitro antiproliferative activity. *J Neurooncol.* (2004) 66:155-66
21. Das A, Tan WL, Smith DR. Expression of extracellular matrix markers in benign meningiomas. *Neuropathology.* (2003) 23:275-81
22. Okada M, Miyake K, Matsumoto Y et al. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expressions correlate with the recurrence of intracranial meningiomas. *J Neurooncol.* (2004) 66:29-37
23. Spandidos DA. A unified theory for the development of cancer. *Biosci Rep.* (1986) 6:691-708
24. Spandidos DA, Anderson ML. A study of mechanisms of carcinogenesis by gene transfer of oncogenes into mammalian cells. *Mutat Res.* (1987) 185:271-91
25. Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell.* (2004) 116:235-46
26. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1971) 68:820-3
27. Fero ML, Randel E, Gurley KE et al. The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature.* (1998) 396:177-80
28. Wang TJ, Huang MS, Hong CY et al. Comparisons of tumor suppressor p53, p21, and p16 gene therapy effects on glioblastoma tumorigenicity in situ. *Biochem Biophys Res Commun.* (2001) 287:173-80
29. Levine AJ, Finlay CA, Hinds PW. P53 is a tumor suppressor gene. *Cell.* (2004) 116:67-9

30. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science*. (1996) 274:1672-7
31. Vandel L, Nicolas E, Vaute O et al. Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Mol Cell Biol*. (2001) 21:6484-94
32. Müller H, Helin K. The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta*. (2000) 1470:M1-12
33. Bertwistle D, Sugimoto M, Sherr CJ. Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol*. (2004) 24:985-96
34. Green RA, Wollman R, Kaplan KB. APC and EB1 function together in mitosis to regulate spindle dynamics and chromosome alignment. *Mol Biol Cell*. (2005) 16:4609-22
35. He L, Yu JX, Liu L et al. RIZ1, but not the alternative RIZ2 product of the same gene, is underexpressed in breast cancer, and forced RIZ1 expression causes G2-M cell cycle arrest and/or apoptosis. *Cancer Res*. (1998) 58:4238-44
36. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*. (1994) 371:257-61
37. Lukas J, Parry D, Aagaard L et al. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*. (1995) 375:503-6
38. Hirai H, Roussel MF, Kato JY et al. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol*. (1995) 15:2672-81
39. Harper JW, Adami GR, Wei N et al. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. (1993) 75:805-16
40. Tomoda K, Kubota Y, Kato J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature*. (1999) 398:160-5
41. Chim CS, Fung TK, Liang R. Disruption of INK4/CDK/Rb cell cycle pathway by gene hypermethylation in multiple myeloma and MGUS. *Leukemia*. (2003) 17:2533-5
42. Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev*. (2000) 10:94-9
43. Kim KC, Huang S. Histone methyltransferases in tumor suppression. *Cancer Biol Ther*. (2003) 2:491-9
44. Steigerwald K, Behbehani GK, Combs KA et al. The APC tumor suppressor promotes transcription-independent apoptosis in vitro. *Mol Cancer Res*. (2005) 3:78-89

45. Shen Y, White E. p53-dependent apoptosis pathways. *Adv Cancer Res.* (2001) 82:55-84
46. Müschen M, Warskulat U, Beckmann MW. Defining CD95 as a tumor suppressor gene. *J Mol Med.* (2000) 78:312-25
47. DuHadaway JB, Sakamuro D, Ewert DL et al. Bin1 mediates apoptosis by c-Myc in transformed primary cells. *Cancer Res.* (2001) 61:3151-6
48. Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res.* (2001) 264:29-41
49. Weller M, Kleihues P, Dichgans J et al. CD95 ligand: lethal weapon against malignant glioma? *Brain Pathol.* (1998) 8:285-93
50. Blagosklonny MV. Mitotic arrest and cell fate: why and how mitotic inhibition of transcription drives mutually exclusive events. *Cell Cycle.* (2007) 6:70-4
51. Prolla TA, Christie DM, Liskay RM. Dual requirement in yeast DNA mismatch repair for MLH1 and PMS1, two homologs of the bacterial mutL gene. *Mol Cell Biol.* (1994) 14:407-15
52. Seifert M, Reichrath J. The role of the human DNA mismatch repair gene hMSH2 in DNA repair, cell cycle control and apoptosis: implications for pathogenesis, progression and therapy of cancer. *J Mol Histol.* (2006) 37:301-7
53. Shiloh Y. ATM (ataxia telangiectasia mutated): expanding roles in the DNA damage response and cellular homeostasis. *Biochem Soc Trans.* (2001) 29:661-6
54. Hartman AR, Ford JM. BRCA1 and p53: compensatory roles in DNA repair. *J Mol Med.* (2003) 81:700-7
55. Nakanishi K, Taniguchi T, Ranganathan V et al. Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nat Cell Biol.* (2002) 4:913-20
56. Schmutte C, Baffa R, Veronese LM et al. Human thymine-DNA glycosylase maps at chromosome 12q22-q24.1: a region of high loss of heterozygosity in gastric cancer. *Cancer Res.* (1997) 57:3010-5
57. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature.* (2001) 411:613-7
58. Hori A, Honda S, Asada M et al. Metastin suppresses the motility and growth of CHO cells transfected with its receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* (2001) 286:958-63
59. Meehan WJ, Samant RS, Hopper JE et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) forms complexes with retinoblastoma-binding protein 1 (RBP1) and the

- mSin3 histone deacetylase complex and represses transcription. *J Biol Chem.* (2004) 279:1562-9
60. Gomis-Rüth FX, Maskos K, Betz M et al. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature.* (1997) 389:77-81
  61. Hojilla CV, Mohammed FF, Khokha R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *Br J Cancer.* (2003) 89:1817-21
  62. Mitchell DC, Stafford LJ, Li D et al. Transcriptional regulation of KiSS-1 gene expression in metastatic melanoma by specificity protein-1 and its coactivator DRIP-130. *Oncogene.* (2007) 26:1739-47
  63. Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW et al. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science.* (1995) 268:884-6
  64. Mashimo T, Watabe M, Hirota S et al. The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1998) 95:11307-11
  65. Barbacid M. ras genes. *Annu Rev Biochem.* (1987) 56:779-827
  66. Chardin P. The ras superfamily proteins. *Biochimie.* (1988)70:865-8
  67. Barbacid M. ras oncogenes: their role in neoplasia. *Eur J Clin Invest.* (1990) 20:225-35
  68. Spandidos DA, Lang JC. In vitro cell transformation by ras oncogenes. *Crit Rev Oncog.* (1989) 1:195-209
  69. Ryan J, Barkett P.E, Shimizu K et al. Chromosomal assignment of a family of human oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983) 80:4460-4463
  70. Grand R, Owen D. The biochemistry of ras p21. *Biochem. J.* (1991) 279: 609-631
  71. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer.* (2007) 7:295-308
  72. Santos E, Nebreda A. Structural and functional properties of *ras* proteins. *FASEB J.* (1989) 3: 2151-2163
  73. Downward J. Regulation of p21 ras by GTPase activating proteins and guanine nucleotide exchange proteins. *Curr Opin Genet Dev.* (1992) 2:13-18
  74. Abdellatif M, MacLellan S W, Schneider M. *J Biol Chem.* (1994) 269:15423-6
  75. Avruch J, Zhang XF, Kyriakis JM. Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway.. *Trends Biochem Sci.* (1994) 19:279-83

76. Macara IG, Lounsbury KM, Richards SA et al. The Ras superfamily of GTPases. *FASEB J.* (1996) 10:625-30
77. Kiaris H, Spandidos DA. Mutations of ras genes in human tumours. *Int J Oncol.* (1995) 7:413-21
78. Spandidos DA, Wilkie NM. Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. *Nature.* (1984)310:469-475
79. Spandidos DA, Karaiossifidi H, Malliri A et al. Expression of ras Rb1 and p53 proteins in human breast cancer. *Anticancer Res.* (1992) 12:81-9
80. Spandidos DA, Kerr IB. Elevated expression of the human ras oncogene family in premalignant and malignant tumours of the colorectum. *Br J Cancer.* (1984) 49:681-8
81. Field JK, Yiagnisis M, Spandidos DA et al. Low levels of ras p21 oncogene expression correlates with clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* (1992) 18:168-76
82. Kiaris H, Spandidos DA, Jones AS et al. Mutations, expression and genomic instability of the H-ras proto-oncogene in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer.* (1995) 72:123-8
83. Field JK, Lamothe A, Spandidos DA. Clinical relevance of oncogene expression in head and neck tumours. *Anticancer Res.* (1986) 6:595-600
84. Sheng ZM, Barrois M, Klijanienko J et al. Analysis of the c-Ha-ras-1 gene for deletion, mutation, amplification and expression in lymph node metastases of human head and neck carcinomas. *Br J Cancer.* (1990) 62:398-404
85. Spandidos DA. Mechanism of carcinogenesis: the role of oncogenes, transcriptional enhancers and growth factors. *Anticancer Res.* (1985) 5:485-98
86. Leon J, Guerrero I, Pellicer A. Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol Cell Biol.* (1987) 7:1535-40
87. Langen R, Schweins T, Warshel A. On the mechanism of guanosine triphosphate hydrolysis in ras p21 proteins. *Biochemistry.* (1992) 31:8691-6
88. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* (1989) 49:4682-9
89. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* (2003) 3:11-22
90. Spandidos DA, Sourvinos G, Tsatsanis C et al. Normal ras genes: their onco-suppressor and pro-apoptotic functions (review). *nt J Oncol.* 2002 Aug;21(2):237-41

91. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. (1997) 88:593-602
92. Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciana P, Ulrich E et al. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature*. (1997) 385:544-8
93. Nikiforov MA, Hagen K, Ossovskaya VS et al. p53 modulation of anchorage independent growth and experimental metastasis. *Oncogene*. (1996) 13:1709-19
94. Vater CA, Bartle LM, Dionne CA et al. Induction of apoptosis by tamoxifen-activation of a p53-estrogen receptor fusion protein expressed in E1A and T24 H-ras transformed p53<sup>-/-</sup> mouse embryo fibroblasts. *Oncogene*. (1996) 13:739-48
95. Fukasawa K, Vande Woude GF. Synergy between the Mos/mitogen-activated protein kinase pathway and loss of p53 function in transformation and chromosome instability. *Mol Cell Biol*. (1997) 17:506-18
96. Maltzman TH, Mueller BA, Schroeder J et al. Ras oncogene mutations in childhood brain tumours. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. (1997) 6:239-243
97. Sharma MK, Zehnbauser BA, Watson MA et al. RAS pathway activation and an oncogenic RAS mutation in sporadic pilocytic astrocytomas. *Neurology*. (2005) 65:1335-1336
98. Ireland CM. Activated N-ras oncogenes in human neuroblastomas. *Cancer Res*. (1989) 49:5530-5533
99. Iolascon A, Lania A, Badiali M et al. Analysis of N-ras gene mutations in medulloblastomas by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes in formalin-fixed, paraffin- embedded tissues. *Med Pediatr Oncol*. (1991) 19:240-245
100. Patt S, Thiel G, Zhou Q et al. Chromosomal changes and correspondingly altered proto-oncogene expression in human gliomas. Value of combined cytogenetic and molecular genetic analysis. *Anticancer Res*. (1993) 13:113-118
101. Salgaller M, Agius L, Yates A et al. Application of automated image analysis to demonstrate the correlation between ras p21 expression and severity of gliomas. *Biochem Biophys Res Commun*. (1990) 169:482-491
102. Joachim T, Ram Z, Rappaport ZH et al. Comparative analysis of the NF2, TP53, PTEN, KRAS, NRAS and HRAS genes in sporadic and radiation-induced human meningiomas. *Int J Cancer*. (2001) 94:218-21
103. Manning G, Whyte DB, Martinez R et al. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. (2002) 298:1912-34

104. Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *BiochemJ.* (1998 ) 335:1-13
105. Staal SP, Huebner K, Croce CM et al. The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32. *Genomics.* (1988) 2:96-8
106. Yang ZZ, Tschopp O, Hemmings-Mieszczak M et al. Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth. *J Biol Chem.* (2003) 278:32124-31
107. Hodgkinson CP, Sale EM, Sale GJ. Characterization of PDK2 activity against protein kinase B gamma. *Biochemistry.* (2002) 41:10351-9
108. Fayard E, Tintignac LA, Baudry A et al. Protein kinase B/Akt at a glance. *J Cell Sci.* (2005) 118:5675-8
109. Thomas CC, Deak M, Alessi DR et al. High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate. *Curr Biol.* (2002) 12:1256-62
110. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* (2007) 129:1261-74
111. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* (2005) 307:1098-101
112. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell.* (1998) 95:29-39
113. Asnaghi L, Calastretti A, Bevilacqua A et al. Bcl-2 phosphorylation and apoptosis activated by damaged microtubules require mTOR and are regulated by Akt. *Oncogene.* (2004) 23:5781-91
114. Chen WS, Xu PZ, Gottlob K et al. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev.* (2001) 15:2203-8
115. Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM et al. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1996) 93:3636-41
116. Remy I, Montmarquette A, Michnick SW. PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat Cell Biol.* (2004) 6:358-65
117. Tabellini G, Cappellini A, Tazzari PL et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt involvement in arsenic trioxide resistance of human leukemia cells. *J Cell Physiol.* (2005) 202:623-34
118. Biggs III, W. H., Meisenhelder, J., Hunter et al. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged phosphorylation promotes

- nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1999) 96:7421–26
119. Wolfrum C, Besser D, Luca E et al. Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2003) 100:11624-9
  120. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* (1999) 96:857-68
  121. Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM et al. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature.* (1999) 398:630-4
  122. Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2001) 98:11598-603
  123. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q et al. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem.* (2001) 276:38349-52
  124. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science.* (2001) 292:1728-31
  125. Peng XD, Xu PZ, Chen ML et al. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev.* (2003) 17:1352-65
  126. Tschopp O, Yang ZZ, Brodbeck D et al. Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development.* (2005) 132:2943-54
  127. Easton RM, Cho H, Roovers K et al. Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol Cell Biol.* (2005) 25:1869-78
  128. Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinovitz I et al. Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell.* (2005) 20(4):539-50
  129. Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D et al. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* (2005) 171:1023-34
  130. Kim D, Kim S, Koh H et al. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J.* (2001) 15:1953-62
  131. Enomoto A, Murakami H, Asai N et al. Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev Cell.* (2005) 9:389-402

132. Tanno S, Tanno S, Mitsuuchi Y et al. AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* (2001) 61:589-93
133. Suzuki A, Lu J, Kuskai G et al. ARK5 is a tumor invasion-associated factor downstream of Akt signaling. *Mol Cell Biol.* (2004) 24:3526-35
134. Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK et al. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer.* (1995) 64:280-5
135. Nakayama K, Nakayama N, Kurman RJ et al. Sequence mutations and amplification of PIK3CA and AKT2 genes in purified ovarian serous neoplasms. *Cancer Biol Ther.* (2006) 5:779-85
136. Ruggeri BA, Huang L, Wood M et al. Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Mol Carcinog.* (1998) 21:81-6
137. Miwa W, Yasuda J, Murakami Y et al. Isolation of DNA sequences amplified at chromosome 19q13.1-q13.2 including the AKT2 locus in human pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* (1996) 225:968-74
138. Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1987) 84:5034-7
139. Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A et al. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1992) 89:9267-71
140. Sun M, Wang G, Paciga JE et al. AKT1/PKB $\alpha$  kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol.* (2001) 159:431-7
141. Nakatani K, Thompson DA, Barthel A et al. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem.* (1999) 274:21528-32
142. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis.* (2004) 9:667-76
143. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem.* (1995) 270:27348-57
144. Balabanian K, Lagane B, Infantino S et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem.* (2005) 280:35760-6

145. Burns JM, Summers BC, Wang Y et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med.* (2006) 203:2201-13
146. Bleul CC, Farzan M, Choe H et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature.* (1996) 382:829-33
147. Nagasawa T, Nakajima T, Tachibana K et al. Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1996) 93:14726-9
148. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE et al. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *nce.* (1996) 272:872-7
149. Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in organ-specific metastasis. *Contrib Microbiol.* (2006) 13:191-9
150. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood.* (2006) 107:1761-7
151. Kucia M, Reza R, Miekus K et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells.* (2005) 23:879-94
152. Zlotnik A. Chemokines and cancer. *Int J Cancer.* (2006) 119:2026-9
153. Sun YX, Wang J, Shelburne CE et al. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem.* (2003) 89:462-73
154. Altenburg JD, Broxmeyer HE, Jin Q et al. A naturally occurring splice variant of CXCL12/stromal cell-derived factor 1 is a potent human immunodeficiency virus type 1 inhibitor with weak chemotaxis and cell survival activities. *J Virol.* (2007) 81:8140-8
155. Janowski M. *Cell Adh Migr.* Functional diversity of SDF-1 splicing variants. (2009) 3:243-9
156. Crump MP, Gong JH, Loetscher P et al. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J.* (1997) 16:6996-7007
157. Yoon Y, Liang Z, Zhang X, Choe M et al. CXC chemokine receptor-4 antagonist blocks both growth of primary tumor and metastasis of head and neck cancer in xenograft mouse models. *Cancer Res.* (2007) 67:7518-24

158. Rubin JB, Kung AL, Klein RS et al. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2003) 100:13513-8
159. Juarez J, Bradstock KF, Gottlieb DJ, Bendall LJ. Effects of inhibitors of the chemokine receptor CXCR4 on acute lymphoblastic leukemia cells in vitro. *Leukemia.* (2003) 17:1294-300
160. Tamamura H, Hori A, Kanzaki N et al. T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. *FEBS Lett.* (2003) 550:79-83
161. Müller A, Homey B, Soto H et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* (2001) 410:50-6
162. Smith MC, Luker KE, Garbow JR et al. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res.* (2004) 64:8604-12
163. Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M et al. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med.* (2003) 167:1676-86
164. Taichman RS, Cooper C, Keller ET et al. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res.* (2002) 62:1832-7
165. Geminder H, Sagi-Assif O, Goldberg L et al. A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. *J Immunol.* (2001) 167:4747-57
166. Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol.* (2004) 14:171-9
167. Tanaka T, Bai Z, Srinoulprasert Y et al. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Cancer Sci.* (2005) 96:317-22
168. Barbero S, Bajetto A, Bonavia R et al. Expression of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1 in human brain tumors and their involvement in glial proliferation in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* (2002) 973:60-69
169. Bajetto A, Barbieri F, Dorcaratto A et al. Expression of CXC chemokine receptors 1-5 and their ligands in human glioma tissues: role of CXCR4 and SDF1 in glioma cell proliferation and migration. *Neurochem Int.* (2006) 49:423-2
170. Rubin JB, Kung AL, Klein RS et al. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2003) 100:13513-8

171. Zhou Y, Larsen PH, Hao C et al. CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *J Biol Chem.* (2002) 277:49481-7
172. Woerner BM, Warrington NM, Kung AL et al. Widespread CXCR4 activation in astrocytomas revealed by phospho-CXCR4-specific antibodies. *Cancer Res.* (2005) 65:11392-9
173. Rempel SA, Dudas S, Ge S et al. Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXCR4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin Cancer Res.* (2000) 6:102-11
174. Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M et al. Prediction of central nervous system embryonal tumor outcome based on gene expression. *Nature.* (2002) 415:436-42
175. Barbero S, Bonavia R, Bajetto A. Stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer Res.* (2003) 63:1969-74
176. Bian XW, Yang SX, Chen JH et al. Preferential expression of chemokine receptor CXCR4 by highly malignant human gliomas and its association with poor patient survival. *Neurosurgery.* (2007) 61:570-8
177. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell.* (2009) 137:413-31
178. Sarkar C, Mukhopadhyay S, Sharma MC. p53 in Brain Tumors : Basic science illuminates clinical oncology. *IJHG.* (2009) 8:52-59
179. Prives C, Manfredi JJ. The p53 tumor suppressor protein: meeting review. *Genes Dev.* (1993) 7:529-34
180. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell.* (1989) 57:1083-93
181. Benchimol S, Lamb P, Crawford LV et al. Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet.* (1985) 11:505-10
182. Lamb P, Crawford L. Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol.* (1986) 6:1379-85
183. Soussi T, Caron de Fromentel C, Méchali M et al. Cloning and characterization of a cDNA from *Xenopus laevis* coding for a protein homologous to human and murine p53. *Oncogene.* (1987) 1:71-8
184. Pennica D, Goeddel DV, Hayflick JS et al. The amino acid sequence of murine p53 determined from a c-DNA clone. *Virology.* (1984) 134:477-82

185. Louis JM, McFarland VW, May P et al. The phosphoprotein p53 is down-regulated post-transcriptionally during embryogenesis in vertebrates. *Biochim Biophys Acta*. (1988) 950:395-402
186. Rigaudy P, Eckhart W. . Nucleotide sequence of a cDNA encoding the monkey cellular phosphoprotein p53. *Nucleic Acids Res* (1989) 17:8375
187. Matlashewski G, Lamb P, Pim D et al. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J*. (1984) 3:3257-62
188. Reisman D, Greenberg M, Rotter V. Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1988) 85:5146-50
189. Pavletich NP, Chambers KA, Pabo CO. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev*. (1993) 7:2556-64
190. Rogel A, Popliker M, Webb CG et al. p53 cellular tumor antigen: analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos, and tumors. *Mol Cell Biol*. (1985) 5:2851-5
191. Louis JM, McFarland VW, May P et al. The phosphoprotein p53 is down-regulated post-transcriptionally during embryogenesis in vertebrates. *Biochim Biophys Acta*. (1988) 950:395-402
192. Schmid P, Lorenz A, Hameister H et al. Expression of p53 during mouse embryogenesis. *Development*. (1991) 113:857-65
193. Weinberg RL, Veprintsev DB, Fersht AR. Cooperative binding of tetrameric p53 to DNA. *J Mol Biol*. (2004) 341:1145-59
194. Funk WD, Pak DT, Karas RH et al. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol*. (1992) 12:2866-71
195. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2007) 8:275-83
196. Sanchez Y, Elledge SJ. Stopped for repairs. *Bioessays*. (1995) 17:545-8
197. Basu A, Haldar S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod*. (1998) 4:1099-109
198. Hay TJ, Meek DW. Multiple sites of in vivo phosphorylation in the MDM2 oncoprotein cluster within two important functional domains. *FEBS Lett*. (2000) 478:183-6
199. Kruse JP, Gu W. Modes of p53 regulation. *Cell*. (2009) 137:609-22

200. Canman CE, Lim DS, Cimprich KA et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*. (1998) 281:1677-9
201. Fuchs SY, Adler V, Pincus MR et al. MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1998) 95:10541-6
202. Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. (2004) 4:793-805
203. Blydes JP, Luciani MG, Pospisilova S et al. Stoichiometric phosphorylation of human p53 at Ser315 stimulates p53-dependent transcription. *J Biol Chem*. (2001) 276:4699-708
204. Huang C, Ma WY, Maxiner A et al. p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem*. (1999) 274:12229-35
205. Dai C, Gu W. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med*. (2010) 16:528-36
206. Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S et al. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*. (1998) 12:2831-41
207. Sakaguchi K, Sakamoto H, Lewis MS et al. Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry*. (1997) 36:10117-24
208. Friedman PN, Chen X, Bargonetti J et al. The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1993) 90:3319-23
209. Zhang J, Chen X. Posttranscriptional regulation of p53 and its targets by RNA-binding proteins. *Curr Mol Med*. (2008) 8:845-9
210. Vilborg A, Glahder JA, Wilhelm MT et al. The p53 target Wig-1 regulates p53 mRNA stability through an AU-rich element. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2009) 106:15756-61
211. Le MT, Teh C, Shyh-Chang N et al. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev*. (2009) 23:862-76
212. Zhang Y, Gao JS, Tang X et al. MicroRNA 125a and its regulation of the p53 tumor suppressor gene. *FEBS Lett*. (2009) 583:3725-30
213. Mahmoudi S, Henriksson S, Corcoran M et al. Wrap53, a natural p53 antisense transcript required for p53 induction upon DNA damage. *Mol Cell*. (2009) 33:462-71
214. Farnebo M. Wrap53, a novel regulator of p53. *Cell Cycle*. (2009) 8:2343-6

215. Badciong JC, Haas AL. MdmX is a RING finger ubiquitin ligase capable of synergistically enhancing Mdm2 ubiquitination. *J Biol Chem.* (2002) 277:49668-75
216. Haupt Y, Maya R, Kazaz A et al. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* (1997) 387:296-9
217. Jackson MW, Berberich SJ. MdmX protects p53 from Mdm2-mediated degradation. *Mol Cell Biol.* (2000) 20:1001-7
218. Buschmann T, Minamoto T, Wagle N et al. Analysis of JNK, Mdm2 and p14(ARF) contribution to the regulation of mutant p53 stability. *J Mol Biol.* (2000) 295:1009-21
219. Montes de Oca Luna R, Wagner DS, Lozano G. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature.* (1995) 378:203-6
220. Jones SN, Roe AE, Donehower LA et al. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature.* (1995) 378:206-8
221. Böglér O, Huang HJ, Cavenee WK. Loss of wild-type p53 bestows a growth advantage on primary cortical astrocytes and facilitates their in vitro transformation. *Cancer Res.* (1995) 55:2746-51
222. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD et al. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science.* (1994) 265:346-55
223. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH et al. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol.* (1988) 8:531-9
224. Hinds PW, Finlay CA, Quartin RS et al. Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell Growth Differ.* (1990) 1:571-80
225. Van Meir EG, Roemer K, Diserens AC et al. Single cell monitoring of growth arrest and morphological changes induced by transfer of wild-type p53 alleles to glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1995) 92:1008-12
226. Malkin D, Li FP, Strong LC et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science.* (1990) 250:1233-8
227. Ohgaki H, Eibl RH, Schwab M et al. Mutations of the p53 tumor suppressor gene in neoplasms of the human nervous system. *Mol Carcinog.* (1993) 8:74-80
228. Chattopadhyay P, Rathore A, Mathur M et al. Loss of heterozygosity of a locus on 17p13.3, independent of p53, is associated with higher grades of astrocytic tumours. *Oncogene.* (1997) 15:871-4
229. Sarkar C, Ralte AM, Sharma MC et al. Recurrent astrocytic tumours--a study of p53 immunoreactivity and malignant progression. *Br J Neurosurg.* (2002) 16:335-42

230. Watanabe K, Sato K, Biernat W et al. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res.* (1997) 3:523-30
231. van Meyel DJ, Ramsay DA, Casson AG et al. p53 mutation, expression, and DNA ploidy in evolving gliomas: evidence for two pathways of progression. *J Natl Cancer Inst.* (1994) 86:1011-7
232. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS et al. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* (1994) 22:3551-5
233. Bergh J, Norberg T, Sjögren S et al. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med.* (1995) 1:1029-34
234. Goh HS, Yao J, Smith DR. *Cancer Res.* p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients. (1995) 55:5217-21
235. Reifenberger J, Ring GU, Gies U et al. Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol.* (1996) 55:822-31
236. Kraus JA, Bolln C, Wolf HK et al. TP53 alterations and clinical outcome in low grade astrocytomas. *Genes Chromosomes Cancer.* (1994) 10:143-9
237. Rainov NG, Dobberstein KU, Bahn H et al. Prognostic factors in malignant glioma: influence of the overexpression of oncogene and tumor-suppressor gene products on survival. *J Neurooncol.* (1997) 35:13-28
238. al-Sarraj S, Bridges LR. p53 immunoreactivity in astrocytomas and its relationship to survival. *Br J Neurosurg.* (1995) 9:143-9
239. Fink KL, Rushing EJ, Schold SC Jr et al. Infrequency of p53 gene mutations in ependymomas. *J Neurooncol.* (1996) 27:111-5
240. Tsumanuma I, Sato M, Okazaki H et al. The analysis of p53 tumor suppressor gene in pineal parenchymal tumors. *Noshuyo Byori.* (1995) 12:39-43
241. Adesina AM, Nalbantoglu J, Cavenee WK. p53 gene mutation and mdm2 gene amplification are uncommon in medulloblastoma. *Cancer Res.* (1994) 54:5649-51
242. Das A, Tan WL, Smith DR. p53 point mutation is rare in meningiomas from Singaporean patients. *Asian J Surg.* (2005) 28:7-10
243. Ellison DW, Lunec J, Gallagher PJ et al. Accumulation of wild-type p53 in meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* (1995) 21:136-42

244. Pykett MJ, Landers J, George DL. Expression patterns of the p53 tumor suppressor gene and the mdm2 proto-oncogene in human meningiomas. *J Neurooncol.* (1997) 32:39-44
245. Hei Y, Zhang XW, Wang Y et al. The features of pathology and immunohistochemistry in orbital meningiomas. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* (2006) 42:998-1001
246. Ohkoudo M, Sawa H, Hara M et al. Expression of p53, MDM2 protein and Ki-67 antigen in recurrent meningiomas. *J Neurooncol.* (1998) 38:41-9
247. Wang JL, Zhang ZJ, Hartman M et al. Detection of TP53 gene mutation in human meningiomas: a study using immunohistochemistry, polymerase chain reaction/single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing techniques on paraffin-embedded samples. *Int J Cancer.* (1995) 64:223-8
248. Nagashima G, Aoyagi M, Yamamoto M et al. P53 overexpression and proliferative potential in malignant meningiomas. *Acta Neurochir (Wien).* (1999) 141:53-61
249. Amatya VJ, Takeshima Y, Inai K. Methylation of p14 (ARF) gene in meningiomas and its correlation to the p53 expression and mutation. *Mod Pathol.* (2004) 17:705-10
250. Spandidos DA, Glarakis IS, Kotsinas A et al. Ras oncogene activation in benign and malignant colorectal tumours. *Tumouri.* (1995) 81:7-11
251. Spandidos DA, Liloglou T, Arvanitis D et al. Ras gene activation in human small intestinal tumours. *Int J Oncol.* (1993) 2:513-8
252. Rodenhuis S, Slebos RJ. Clinical significance of *ras* oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res.* (1992) 52:2665-9
253. Sharma MK, Zehnbauer BA, Watson MA et al. RAS pathway activation and an oncogenic RAS mutation in sporadic pilocytic astrocytoma. *Neurology.* (2005) 65:1335-6
254. Janzarik WG, Kratz CP, Loges NT et al. Further evidence for a somatic KRAS mutation in a pilocytic astrocytoma. *Neuropediatrics.* (2007) 38:61-63
255. Gerosa MA, Talarico D, Fognani C et al. Overexpression of N-ras oncogene and epidermal growth factor receptor gene in human glioblastomas. *J Natl Cancer Inst.* (1989) 81:63-67
256. Spandidos D, Wilkie NM. The normal human H-ras1 gene can act as an onco-suppressor. *Br J Cancer Suppl.* (1988) 9: 67-71
257. . Spandidos DA, Frame M and Wilkie NM. Expression of the normal H-ras1 gene can suppress the transformed and tumorigenic phenotypes induced by mutant ras genes. *Anticancer Res.* (1990) 10:1543-54

258. Zhang Z, Wang Y, Vikis HG et al. Wild-type Kras2 can inhibit lung carcinogenesis in mice. *Nat Genet.* (2001) 29:25-33
259. Wyllie AH, Rose KA, Morris RG, Steel CM, Foster E and Spandidos DA. Rodent fibroblast tumours expressing human myc and ras genes: growth, metastasis and endogenous oncogene expression. *Br J Cancer.* (1987) 56:251-9
260. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* (2004) 9:667-76
261. Holland EC, Celestino J, Dai C et al. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet* (2000) 25:55-7
262. Haas-Kogan D, Shalev N, Wong M, et al. Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMA. *Curr Biol* (1998) 8:1195-8
263. Knobbe CB, Reifenberger G. Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain Pathol* (2003) 13:507-18
264. Wang H, Wang H, Zhang W et al. Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas. *Lab Invest.* (2004) 84:941-51
265. Sonoda Y, Ozawa T, Aldape KD et al. Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. *Cancer Res.* (2001) 61:6674-8
266. Field JK, Spandidos DA. The role of ras and myc oncogenes in human solid tumours and their relevance in diagnosis and prognosis (review). *Anticancer Res.* (1990) 10:1-22
267. Mawrin C, Sasse T, Kirches E et al. Different activation of mitogen-activated protein kinase and Akt signaling is associated with aggressive phenotype of human meningiomas. *Clin Cancer Res.* (2005) 11:4074-82
268. Bajetto A, Barbieri F, Pattarozzi A et al. CXCR4 and SDF1 expression in human meningiomas: a proliferative role in tumoral meningotheial cells in vitro. *Neuro Oncol.* (2007) 9:3-11

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**