

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΛΟΓΟΘΕΤΗ ΣΤΕΛΛΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *p73*
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΟΝΑΔΑ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ένα ιδιαίτερα δημοφιλές απόφθεγμα από ένα best seller της προηγούμενης δεκαετίας έλεγε ότι αν θέλεις κάτι πολύ ολόκληρο το σύμπαν συνωμοτεί για να το αποκτήσεις. Ένα σύνθημα τύπου Πυθιακού χρησμού -γι' αυτό και τόσο επιτυχημένου- αφού αν δεν αποκτήσεις αυτό που θέλεις δεν το ήθελες πολύ, ενώ αν το αποκτήσεις φρόντισε γι' αυτό το σύμπαν. Παρά τις αισιόδοξες προθέσεις του, ένα τέτοιο σύνθημα μπορεί στα πρώτα βήματα μετά την απόκτηση του βασικού πτυχίου να γίνει σχεδόν μομφή, καθώς τότε είναι που πολλοί από εμάς διαπιστώνουμε ότι η θέληση μπορεί να μην επαρκεί για να επιτύχεις σε έναν χώρο εξαιρετικά ιδιόμορφο και απαιτητικό, όπως είναι η έρευνα. Είναι εξίσου σημαντικό να υπάρχει ένας συνδυασμός ευνοϊκών, ή τουλάχιστον μη δυσμενών συνθηκών, πρωτίστως οικονομικών και κοινωνικών. Ούτε η θέληση, ούτε τα αντικειμενικά ακαδημαϊκά προσόντα μπορούν να αντισταθμίσουν την έλλειψή τους και χωρίς αυτές οποιαδήποτε υπερπροσπάθεια, όσο φιλότιμη και αν είναι, τις περισσότερες φορές καταλήγει στο κενό. Σε μια εποχή που προσπαθούσα κακήν κακώς να συμβιβαστώ με αυτή την απογοητευτική διαπίστωση, έτυχε να περάσω από το Εργαστήριο Βιοϊατρικών Εφαρμογών του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και να γνωρίσω τον Δρ. Β. Ζουμπουρλή, ο οποίος με ενθάρρυνε να ξεκινήσω κάποια πειράματα στο εργαστήριό του. Δεν ξέρω ακόμα γιατί μου έδωσε αυτή την ευκαιρία, αφού παρ' όλη την εσωτερική παρόρμηση για έρευνα, οι εξωτερικές συνθήκες δεν ήταν υπέρ μου. Ίσως ήταν αυτό το έμφυτο πείσμα που έχει, σχεδόν χωρίς να το καταλαβαίνει, να θέλει να δίνει φτερά και να μην αφήνει κανένα όραμα, δικό του ή των άλλων, να πηγαίνει χαμένο. Και κάπως έτσι, ξεκίνησα.

Ύστερα ήταν ο Δρ. Ιωάννης Μιχαλόπουλος, που με την πολύτιμη εμπειρία του στη βιοπληροφορική ανάλυση συνέβαλε στο να διαμορφωθεί η ιδέα της παρούσας ερευνητικής μελέτης. Ο Καθηγητής Δρ. Δημήτριος Σπαντίδος, που έδειξε εμπιστοσύνη στην ιδέα αυτή και την έθεσε σε πλαίσιο διδακτορικής διατριβής. Ο Δρ. Τριαντάφυλλος Λιλόγλου, ο οποίος παρείχε ευχαρίστως δείγματα ασθενών και εκπαίδευση σε μοριακές τεχνολογίες αιχμής. Ο Διδάκτορας Αλέξανδρος Δάσκαλος, η συμβολή του οποίου στις αναλύσεις μεθυλίωσης ήταν καταλυτική. Ο Καθηγητής Δρ. Βασίλης Γοργούλης, ο οποίος συνεισέφερε με τις τεχνικές ανοσοκατακρήμνισης και, πολύ περισσότερο, με χρήσιμες συμβουλές στην κρίσιμη στιγμή της δημοσίευσης των αποτελεσμάτων. Και βέβαια, οι Καθηγητές Ο. Ζώρας και Γ. Σαμώνης και οι Αναπληρωτές καθηγητές Χ. Τσατσάνης, Γ. Σουρβίνος και Α. Ηλιόπουλος, οι οποίοι με προθυμία δέχτηκαν να συμμετέχουν στην αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αν τώρα, 4 χρόνια μετά, γράφω αυτές τις τελευταίες γραμμές και, πολύ περισσότερο, μπορώ στο εξής να κοιτάω πίσω χωρίς να μετανιώνω για όσα ήθελα αλλά δεν μπόρεσα να κάνω, δεν ευθύνεται ούτε η επιμονή μου ούτε, βέβαια, το σύμπαν, αλλά η στήριξη και η εμπιστοσύνη όλων των παραπάνω ανθρώπων και γι' αυτό τον λόγο τους ευχαριστώ όλους θερμά.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο : Λογοθέτη Στέλλα
Επάγγελμα : Βιολόγος
Ημερομηνία γεννήσεως: 21 Οκτωβρίου 1976
Διεύθυνση : Ορφέως 12, Ηλιούπολη
e-mail: stellalog2002@yahoo.com

ΣΠΟΥΔΕΣ

2005- 2011 | Διδακτορικό- **ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ**
εργαστήριο Βιοϊατρικών εφαρμογών

1996-2002 | Βασικό πτυχίο- **Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών**
Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Κατεύθυνση : Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας
Βαθμός αποφοίτησης : 8.0/10-Λίαν καλώς
Διπλωματική εργασία : *Μελέτη φυλοειδικών γονιδίων στο Δάκο και στη Μεσογειακή μύγα.*
Πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας το χρονικό διάστημα 9/2000-10/2001 υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας καθηγήτριας Κ. Κομητοπούλου και βαθμολογήθηκε με 10.

1988-1994 | **Ράλλειο Πρότυπο Γυμνάσιο-Λύκειο**
Βαθμός αποφοίτησης : 17.7/20

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

10/2007- | **Eurogreek Tranlations Ltd.**, εταιρεία μεταφράσεων
ΘΕΣΗ: Βιολόγος-Μεταφράσεις ιατρικών/βιολογικών κειμένων, κλινικών μελετών (για Astellas, Coronis, MEK, PPD), οδηγιών χρήσης φαρμακευτικών προϊόντων, εγχειριδίων και φυλλαδίων οδηγιών χρήσης αναλυτών (για Roche, Siemens), εγχειριδίων ιατροτεχνολογικού εξοπλισμού (για GE healthcare), πρωτότυπων επιστημονικών άρθρων και ανασκοπήσεων, φαρμακευτικών ευρεσιτεχνιών, κλινικών πρωτοκόλλων, ηλεκτρονικών εκπαιδευτικών ενοτήτων φαρμάκων (για Pfizer) (Αγγλικά σε Ελληνικά)

6/2004- 10/2007 | **BIOLINE SCIENTIFIC, ΑΦΟΙ ΝΤΟΥΡΟΥ-Ε.ΔΕΜΑΓΚΟΣ Ο.Ε.**, εταιρεία εμπορίας επιστημονικών οργάνων και χημικών αντιδραστηρίων.
ΘΕΣΗ: Βιολόγος-Υπεύθυνη Διαγωνισμών/Συμβάσεων Δημοσίου και ιδιωτικού τομέα (σύνταξη προσφορών και ετοιμασία φακέλων διαγωνισμών, παρακολούθηση εξέλιξης διαγωνισμών, διεκπεραίωση συμβάσεων), πωλήσεις, επιστημονική υποστήριξη εργαστηρίων

6/2002-5/2003 | **Ε.ΚΕ.Β.Ε. Αλέξανδρος Φλέμινγκ**,
εργαστήριο Νευροβιολογίας
ΘΕΣΗ: Βιολόγος- Συμμετοχή σε ερευνητικό πρόγραμμα

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

9/2005- | **ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ**
εργαστήριο Βιοϊατρικών εφαρμογών (εργ. Δρ Ζουμπουρλή Β.)

ΣΚΟΠΟΣ: μελέτη p73 πρωτεϊνών σε συστήματα καρκινογένεσης και συσχέτισή τους με τον καρκίνο.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ: Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-PAGE, ανάλυση πρωτεϊνών με μέθοδο Western, απομόνωση πρωτεϊνών (ολικών και πυρηνικών) από κυτταρικές καλλιέργειες και ιστούς (όγκους), ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών, δημιουργία κυττάρων δεκτικών για μετασχηματισμό (competent cells), κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς, απομόνωση DNA και RNA, κυτταρικές καλλιέργειες, επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακούς φορείς (transfection), EMSA assays, luciferase assays, PCR και RT-PCR, βιοπληροφορική ανάλυση, δημιουργία RNAi μορίων, ανοσοφθορισμός σε τομές παραφίνης, πρόκληση όγκων (με ενέσεις διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών) σε ποντίκια SCID για in vivo μελέτες.

7/2007-8/2007 | Πανεπιστήμιο Manchester,
Τομέας Επιστημών Υγείας (εργ. Dr A. Hurlstone)

ΣΚΟΠΟΣ: μελέτη p73 πρωτεϊνών με δημιουργία διαγονιδιακών ζώων zebra fish (visitor researcher, side project)

ΤΕΧΝΙΚΕΣ: Κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς, απομόνωση πλασμιδιακού DNA, επιλογή (screening) διαγονιδιακών ζώων zebra fish.

6/2002-5/2003 | Ε.ΚΕ.Β.Ε. Αλέξανδρος Φλέμινγκ,
εργαστήριο Νευροβιολογίας

ΣΚΟΠΟΣ: μελέτη πρωτεϊνών που παίζουν ρόλο στη μάθηση και τη μνήμη με μοντέλο τον οργανισμό *Drosophila melanogaster*, και συσχέτισή τους με καρκίνο και νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ: Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-PAGE, ανάλυση πρωτεϊνών με μέθοδο Western, ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών, ανοσοϊστοχημεία (τομές παραφίνης), in situ υβριδοποίηση (μη ραδιενεργή) με μόριο-ανιχνευτή RNA και DNA σε ολόκληρα έμβρυα *Drosophila*, RT-PCR, δημιουργία κυττάρων δεκτικών για μετασχηματισμό (competent cells), κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς, απομόνωση πλασμιδιακού DNA (με αλκαλική λύση και με κλίση PEG), δημιουργία RNAi μορίων

9/2002-10/2001 | Ε.Κ.Π.Α., Τμήμα Βιολογίας,
Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας

ΣΚΟΠΟΣ: εύρεση φυλοειδικού γονιδίου στο γονιδίωμα του Δάκου, καθώς και χαρτογράφηση φυλοειδικών γονιδίων στο γονιδίωμα της μεσογειακής μύγας, με σκοπό τη βιολογική καταπολέμηση εντόμων.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ: Καλλιέργεια βακτηριακών στελεχών, ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων, πέψη DNA με περιοριστικά ένζυμα, ηλεκτροφόρηση DNA και RNA, ανάλυση κατά Southern, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), επιλογή κλώνων από χρωμοσωμική και από cDNA βιβλιοθήκη βακτηριοφάγου λ (screening), απομόνωση DNA βακτηριοφάγου λ, δημιουργία κυττάρων δεκτικών για μετασχηματισμό (competent cells), κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς, απομόνωση πλασμιδιακού DNA, προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κατά Sanger, απομόνωση ολικού κυτταρικού DNA, ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης.

8/1999-1/2000 | Εθνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών,
Εργαστήριο Διατροφής

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΣΚΟΠΟΣ: έλεγχος ποιότητας ιχθυοτροφών, κυρίως για λογαριασμό της εταιρείας ΝΗΡΕΑΣ ΑΕ.(απασχόληση σε καθημερινή βάση και με πλήρες ωράριο)

ΤΕΧΝΙΚΕΣ: Ανάλυση ολικής σύστασης (πρωτεΐνες, λίπη, ανόργανα συστατικά, υγρασία), ποσοτικός προσδιορισμός βιταμινών C και E με HPLC, λυοφιλοποίηση τροφών και σωμάτων ψαριών, σήμανση τροφών με χρώμιο

ΓΝΩΣΕΙΣ Η/Υ

Προγράμματα: Ms Word, Ms Excel, Ms Powerpoint, Photoshop, MsAccess, PHP, SQL, HTML, Dreamweaver, MsFrontPage, MsOutlook

Μεταφραστικά προγράμματα: Trados, Tag Editor, Logoport, SDLX, IdiomServer

Προγράμματα μορφοποίησης κειμένων: Epic Editor

Internet: πολύ καλή χρήση και έρευνα μέσω διαδικτύου

ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά: Cambridge Proficiency

Άριστη γνώση βιολογικής και ιατρικής ορολογίας

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

23/06/08-28/06/08 | Επεξεργασία στατιστικών δεδομένων στις βιοϊατρικές επιστήμες, ΙΙΒΕΑΑ, 25 ώρες

2/2004-5/2004 | Σχεδιασμός και προγραμματισμός μεγάλων βάσεων δεδομένων μέσω διαδικτύου, ΙΕΚΕΠ, Περισσός 250 ώρες

7/2002-5/2003 | Γενετική της *Drosophila melanogaster*, Ε.ΚΕ.Β.Ε. Αλέξανδρος Φλέμινγκ

ΣΥΝΕΔΡΙΑ

17-19/9/2010 | 61^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (συμμετοχή με ηλεκτρονική αναρτημένη παρουσίαση)

20-22/11/09 | 60^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (συμμετοχή με αναρτημένη παρουσίαση)

15-17/08/09 | 14th World Congress on Advances in Oncology and 12th International Symposium on Molecular Medicine (συμμετοχή με αναρτημένη παρουσίαση)

27-29/11/08 | 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου και Στοχευμένης Θεραπείας (συμμετοχή με αναρτημένη παρουσίαση)

9-12/07/08 | International Lung Cancer Conference, University of Liverpool Cancer Research Center (συμμετοχή με αναρτημένη παρουσίαση)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Στέλλα Λογοθέτη, Σπύρος Βλαχόπουλος, Δημήτριος Μήκας και Βασίλειος Ζουμπουρλής. **Καρκινικά γονίδια και τα μονοπάτια που ελέγχουν. Ογκολογική Ενημέρωση: (7) 4 : 210-217, 2005**
2. Δημήτριος Μήκας, Στέλλα Λογοθέτη, Στέλλα Καραντανά, Νίκος Χουρί και Βασίλειος Ζουμπουρλής. **Πρωτεΐνες Rho και καρκίνος. Ογκολογική Ενημέρωση 8(2): 80-84, 2006**
3. Στέλλα Λογοθέτη, Δημήτριος Μήκας, Νίκος Χουρί και Βασίλειος Ζουμπουρλής. **Ογκογόνα μικρο-RNAs (oncomirs): microRNAs με ρόλο στον καρκίνο. Ογκολογική Ενημέρωση 8(4):220-226, 2006**

4. Στέλλα Καραντανά, Στέλλα Λογοθέτη, Αθηνά Γιαρίκα, Σπύρος Βλαχόπουλος και Βασίλειος Ζουμπουρλής. **Η γενετική και η γονιδιακή κατανόηση του καρκίνου. Ιατρική επικαιρότητα (Δεκ2006): 3532-3536, 2006**

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bakas P., Liapis A., Vlahopoulos S., Giner M., Logotheti S., Creatsas G., Meligova A., Alexis MN., Zoumpourlis V. **Estrogen receptors α and β in uterine fibroids: A basis for altered estrogen responsiveness.** Fertil. Steril. 2008. 90(5):1878-85.
2. Vlahopoulos S., Logotheti S., Mikas D., Giarika A., Gorgoulis V., Zoumpourlis V. **The role of ATF-2 in oncogenesis.** 2008. Bioessays. 2008. 30(4):314-27.
3. Volanis D, Kadiyska T, Galanis A, Delakas D, Logotheti S, Zoumpourlis V. **Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer.** 2010. Toxicol Lett. 193:131-7
4. Logotheti S, Michalopoulos I, Sideridou M, Daskalos A, Kossida S, Spandidos DA, Field JK, Vojtesek B, Liloglou T, Gorgoulis V, Zoumpourlis V. **Sp1 binds to the external promoter of the *p73* gene and induces the expression of TAp73 γ isoform in lung cancer.** 2010. FEBS J. 277:3014-27.
5. Daskalos A, Logotheti S, Markopoulou S, Xinarianos G, Gosney JR, Kastania AN, Zoumpourlis V, Field JK, Liloglou T. **Global DNA hypomethylation-induced Δ Np73 transcriptional activation in non-small cell lung cancer.** Cancer Let. 2011. 300(1): 79-86.

ΆΛΛΑ ΠΡΟΣΩΝΤΑ

Επικοινωνιακές ικανότητες, άνεση γραπτού λόγου, ικανότητες οργάνωσης και διαχείρισης χρόνου, ομαδικό πνεύμα

ΣΥΣΤΑΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΟΛΕΣ

Διαθέσιμες, εφόσον ζητηθούν

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γονίδιο *p73* διαθέτει έναν εξωτερικό υποκινητή (P1) και έναν εσωτερικό υποκινητή (P2), από τους οποίους συντίθενται οι ισομορφές TAp73 πλήρους μήκους και οι ισομορφές ΔNp73 με περικομμένο αμινοτελικό άκρο, αντίστοιχα. Το τελικό αποτέλεσμα του γονιδίου *p73* πιστεύεται ότι εξαρτάται από την αναλογία των αποπτωτικών ισομορφών TAp73 προς τις αντιαποπτωτικές ισομορφές ΔNp73. Η επιλεκτική ενεργοποίηση των υποκινητών του γονιδίου *p73* θα μπορούσε να επάγει την έκφραση είτε των αποπτωτικών είτε των αντιαποπτωτικών ισομορφών του *p73*, μετατοπίζοντας με αυτό τον τρόπο την αναλογία ΔN/TA προς μια ογκογόνο ή ογκοκατασταλτική κατεύθυνση. Κατά συνέπεια, οι επιγενετικοί και οι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι ενεργοποιούν με διαφορεικό τρόπο τους υποκινητές P1 και P2 αποτελούν σημαντικούς καθοριστικούς συντελεστές του ρόλου του γονιδίου *p73*, αφού μπορούν να μεταβάλλουν την αναλογία ΔN/TA. Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ταυτοποίηση νέων επιγενετικών και μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι επηρεάζουν τη σύνθεση των ισομορφών TAp73 και ΔNp73 στον καρκίνο του πνεύμονα, στον οποίο έχουν βρεθεί υπερέκφρασμένες και οι δύο τάξεις ισομορφών. Αρχικά, διερευνήθηκε η κατάσταση μεθυλίωσης του DNA και των δύο υποκινητών, προκειμένου να καθοριστεί η επιγενετική ρύθμιση της μεταγραφής των αντίστοιχων ισομορφών τους σε 102 πρωτοπαθείς όγκους ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC). Καταδείχτηκε ότι η μείωση των επιπέδων mRNA του TAp73 η οποία οφείλεται σε υπερμεθυλίωση του υποκινητή P1 είναι σπάνια, ενώ αντίθετα η υπερέκφραση του mRNA του ΔNp73 η οποία οφείλεται σε υπομεθυλίωση του υποκινητή P2 είναι ένα συχνό συμβάν, ιδιαίτερα μεταξύ ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα εκ πλακωδών κυττάρων. Ο υποκινητής P1 παρέμεινε ουσιαστικά μη μεθυλιωμένος στην πλειονότητα των καρκινωμάτων του πνεύμονα. Από την άλλη πλευρά, η υπομεθυλίωση του υποκινητή P2 συσχετίστηκε έντονα με την υπομεθυλίωση του μεταθετονίου LINE-1, το οποίο αποτελεί δείκτη συνολικής υπομεθυλίωσης του DNA. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η υπερέκφραση του ΔNp73 ενδέχεται να αποτελεί παθητική συνέπεια της συνολικής υπομεθυλίωσης του DNA. Καθώς η υπερέκφραση των ισομορφών TAp73 δεν ήταν δυνατό να αποδοθεί σε μεταβολή της κατάστασης μεθυλίωσης του υποκινητή P1, διατυπώθηκε η εύλογη υπόθεση ότι θα μπορούσε πιθανόν να οφείλεται σε απορρυθμισμένη ενεργότητα ειδικού ή ειδικών μεταγραφικών παραγόντων. Με βάση αυτή την υπόθεση, αναζητήθηκαν, στη συνέχεια, νέοι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι μπορούν να

ενεργοποιήσουν τον υποκινητή P1 και να προκαλέσουν υπερέκφραση των ισομορφών TAp73 στον καρκίνο του πνεύμονα. Χρησιμοποιώντας εργαλεία βιοπληροφορικής, προσδιορισμούς πρόσδεσης *in vitro* και ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης, χαρακτηρίστηκε μια περιοχή που εκτείνεται από -233 έως -204 bp (ζεύγη βάσεων) ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής του υποκινητή P1 του ανθρώπινου γονιδίου *p73* και οι οποία περιέχει συντηρημένες θέσεις δέσμευσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1. Η επεξεργασία των κυττάρων με RNAi Sp1 καθώς και με έναν αναστολέα της πρωτεΐνης Sp1 προκαλεί λειτουργική αναστολή της έκφρασης των ισομορφών TAp73, γεγονός το οποίο υποδεικνύει θετική ρύθμιση του P1 από την πρωτεΐνη Sp1. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η αναστολή ή η σίγηση της πρωτεΐνης Sp1 μπορεί να μειώσει, επίσης, και τα επίπεδα των ισομορφών ΔNp73. Συνεπώς, ο μεταγραφικός παράγοντας Sp1 ρυθμίζει άμεσα τη μεταγραφή των ισομορφών TAp73 και επηρεάζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης ΔNp73 στον καρκίνο του πνεύμονα. Επιπρόσθετα, καταδείχτηκε ότι η ισομορφή TAp73γ ήταν η μόνη ισομορφή TAp73 που υπερεκφράζεται σε πολλές κυτταρικές σειρές από καρκίνο του πνεύμονα και σε 26 όγκους από ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Το προφίλ υπερέκφρασης αυτής της ισομορφής ήταν σύμφωνο με το προφίλ υπερέκφρασης της πρωτεΐνης Sp1 σε αυτά τα κύτταρα. Η αποκλειστική υπερέκφραση της πρωτεΐνης TAp73γ θέτει ερωτήματα σχετικά με τον αποπτωτικό ρόλο αυτής της συγκεκριμένης ισομορφής *p73* στον καρκίνο του πνεύμονα.

ABSTRACT

The *p73* gene possesses an extrinsic P1 promoter and an intrinsic P2 promoter, resulting in synthesis of the full-length TAp73 and the N-terminal-truncated Δ Np73 isoforms, respectively. The ultimate effect of *p73* in oncogenesis is thought to depend on the apoptotic TAp73 to the antiapoptotic Δ Np73 isoforms' ratio. The selective activation of *p73* promoters could trigger the expression of either the apoptotic or the antiapoptotic *p73* isoforms, thus shifting the Δ N/TA ratio towards an oncogenic or an oncosuppression direction. Therefore, the epigenetic and transcription factors that differentially activate P1 and P2 promoters are crucial determinants of the role of *p73* in cancer, since they can alter the Δ N/TA ratio. This study was aimed at identifying novel epigenetic and transcription factors that affect both TAp73 and Δ Np73 isoform synthesis in the context of lung cancer, where both TAp73 and Δ Np73 isoforms have been previously found overexpressed. First, we investigated the DNA methylation status of both promoters as a means of epigenetic transcriptional control of their corresponding isoforms in 102 primary non-small cell lung carcinomas (NSCLCs). We demonstrated that while P1 hypermethylation-associated reduction of TAp73 mRNA levels is rare, the P2 hypomethylation-associated overexpression of Δ Np73 mRNA is a frequent event, particularly among squamous cell carcinomas. P1 promoter remained essentially unmethylated in the majority of lung cancer carcinomas. On the other hand, P2 hypomethylation strongly correlated with the hypomethylation of LINE-1 transposon, a marker of global DNA hypomethylation, indicating that Δ Np73 overexpression may be a passive consequence of global DNA hypomethylation. Since overexpression of TAp73 isoforms could not be attributed to change in the methylation status of P1 promoter, we plausibly hypothesized that it could potentially be caused by deregulated activity of specific transcription factor(s). In the light of this notion, we then searched for novel transcription factors that could activate P1 promoter and result to TAp73 overexpression in lung cancer. With the use of bioinformatics tools, in vitro binding assays, and chromatin immunoprecipitation analysis, a region extending -233 to -204 bps upstream of the transcription start site of the human *p73* P1 promoter, containing conserved Sp1 binding sites, was characterized. Treatment of cells with Sp1 RNAi and Sp1 inhibitor functionally suppresses TAp73 expression, indicating positive regulation of P1 by the Sp1 protein. Notably Sp1 inhibition or silencing also reduces Δ Np73 protein levels. Therefore, Sp1 directly regulates TAp73 transcription and affects Δ Np73 levels in lung cancer.

ABSTRACT

TAp73 γ was shown to be the only TA isoform overexpressed in several lung cancer cell lines and in 26 non-small cell lung cancers, consistent with Sp1 overexpression, thereby questioning the apoptotic role of this specific p73 isoform in lung cancer.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	I
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	III
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	VII
ABSTRACT	IX
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	XI
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	1
1.1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	1
1.1.2 ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	2
1.1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ.....	3
1.1.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	4
1.2. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ p53 ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	7
1.3 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ p53	11
1.3.1 ΟΜΟΛΟΓΙΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ.....	11
1.3.2 ΔΟΜΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ.....	13
1.3.3 ΡΟΛΟΣ ΣΤΗΝ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ: ΑΠΟΚΛΙΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ p63 ΚΑΙ p73 ΑΠΟ ΤΑ ΚΛΑΣΙΚΑ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΥΠΟΥ KNUDSON	20
1.3.4 ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ p53.....	23
1.4 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ p73 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	25
1.4.1 ΟΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ TAp73	25
1.4.1.1 ΠΡΟΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ TAp73.....	25
1.4.1.2 ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ TAp73	28
1.4.1.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ TAp73	29
1.4.1.4 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ TAp73 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	30
1.4.2 ΟΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ DNp73.....	32
1.4.2.1 ΘΕΜΑΤΑ ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ	32
1.4.2.2 Ο ΑΝΤΙΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ DNp73.....	33
1.4.2.3 Η ΟΓΚΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ DNp73.....	36
1.4.2.4 Η ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ DNp73 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	38
1.5 ΟΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ TAp73 ΚΑΙ DNp73 ΚΑΙ Η ΑΝΑΛΟΓΙΑ DN/TA ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	43
1.6 ΑΛΛΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ TAp73 ΚΑΙ ΜΕΛΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ p53 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ...	47
1.7 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ p73.....	48
1.7.1 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ: ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA.....	48
1.7.2 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ: ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	50
1.7.3 ΜΕΤΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ: ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ, ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ	52
1.7.3.1 ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ.....	52
1.7.3.2 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ	55
1.8 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	57
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	58
2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	58
2.1.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	58
2.1.1.1 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ: ΑΠΟΨΥΞΗ, ΑΡΑΙΩΣΗ ΚΑΙ ΚΡΥΟΦΥΛΑΞΗ	59
2.1.1.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΜΕ ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	60
2.1.2 ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΙ ΙΣΤΟΙ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ.....	60
2.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ DNA.....	61
2.2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	61
2.2.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ DNA	62
2.2.2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ DNA ΜΕ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΟ ΝΑΤΡΙΟ	62

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

2.2.2.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΜΕΣΩ ΠΥΡΟΦΩΣΦΟΡΙΚΟΥ (PYROSEQUENCING)	65
2.2.2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΚΙΝΗΤΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>p73</i>	68
2.2.2.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΘΕΤΟΝΙΟΥ LINE-1	70
2.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ RNA	71
2.3.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA	71
2.3.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ RNA ΜΕ ΤΟ ΚΙΤ Agilent RNA 6000 Nano kit	72
2.3.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ cDNA	73
2.3.4 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ.....	73
2.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	74
2.5 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	75
2.6 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	76
2.6.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	76
2.6.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	78
2.6.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΓΚΩΝ.....	80
2.6.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ <i>in vitro</i>	80
2.6.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	81
2.6.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΣΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN.....	81
2.6.6.1 Δημιουργία πηκτώματος ακρυλαμιδίου	82
2.6.6.2 Προετοιμασία και φόρτωση δειγμάτων.....	82
2.6.6.3 Εκτέλεση ηλεκτροφόρησης.....	83
2.6.6.4 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	83
2.6.6.5 Κάλυψη μη ειδικών θέσεων δέσμησης αντισώματος (blocking)	84
2.6.6.6 Επώαση με πρωτογενές αντίσωμα	84
2.6.6.7 Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα	85
2.6.6.8 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών.....	86
2.6.6.9 Αποδέσμευση αντισωμάτων από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (stripping)	87
2.6.6.10 Απαιτούμενα διαλύματα για την ανάλυση στυπώματος κατά Western	87
2.6.7 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (ELECTROMOBILITY SHIFT ASSAY).....	90
2.6.7.1 Υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων	91
2.6.7.2 Σήμανση ολιγονουκλεοτιδίων.....	92
2.6.7.3 Αντίδραση πρόσδεσης πρωτεϊνών στις συναινετικές αλληλουχίες DNA και αντίδραση μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλέγματος (supershift).....	92
2.6.7.4 Δημιουργία πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου και ηλεκτροφόρηση.....	93
2.6.7.5 Ξήρανση του πηκτώματος και αυτοραδιογραφία	93
2.6.7.6 Απαιτούμενα διαλύματα για τη μέθοδο κατακράτησης πρωτεϊνών	94
2.6.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΟΣΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ (CHIP).....	95
2.7 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	96
2.7.1 ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΜΟΡΙΑ siRNA.....	96
2.7.2 ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΑ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ (decoys).....	97
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	98
3.1 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>p73</i>	98
3.1.1. Κατάσταση μεθυλίωσης των υποκινητών <i>P1</i> και <i>P2</i> του γονιδίου <i>p73</i> σε NSCLC.....	98
3.1.2. Τα επίπεδα mRNA των <i>TAp73</i> και <i>ΔNp73</i> σχετίζονται με την κατάσταση μεθυλίωσης των αντίστοιχων υποκινητών τους	104
3.1.3. Η υπερέκφραση του <i>ΔNp73</i> που επάγεται από υπομεθυλίωση είναι περισσότερο υψηλή στα καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων σε σχέση με τα αδenoκαρκινώματα.....	106
3.2. ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>p73</i>	109
3.2.1. Ο υποκινητής <i>P1</i> του γονιδίου <i>p73</i> διαθέτει πολλές δυναμικές θέσεις δέσμησης <i>Sr1</i> ..	110
3.2.2. Οι περιοχές <i>A</i> , <i>B</i> και <i>C</i> του υποκινητή <i>P1</i> μπορούν να δεσμεύσουν <i>in vitro</i> πρωτεΐνη <i>Sr1</i>	113
3.2.3. Δέσμευση της ενδογενούς πρωτεΐνης <i>Sr1</i> από κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα στον υποκινητή <i>P1</i>	113
3.2.4. Η σύνδεση της πρωτεΐνης <i>TAp73</i> ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα <i>Sr1</i> μέσω της περιοχής <i>A</i> σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα	117
3.2.5. Οι πρωτεΐνες <i>TAp73</i> γ και <i>Sr1</i> είναι υπερεκφρασμένες σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα και σε όγκους από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.....	119

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

3.2.6. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης ΔNr73 επηρεάζονται από τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1 και είναι αυξημένα στα κύτταρα του καρκίνου του πνεύμονα	121
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	124
4.1 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ p73	124
4.2 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ p73	127
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	134
6. ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ	145

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

1.1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί μία από τις πλέον θανατηφόρες μορφές καρκίνου στις οικονομικά αναπτυγμένες χώρες. Περίπου 100 χρόνια πριν, οι κακοήθειες των πνευμόνων ήταν εξαιρετικά σπάνιες και αποτελούσαν μόνο το 1% όλων των καρκίνων που παρατηρούνταν κατά την αυτοψία. Ωστόσο, η συχνότητά τους αυξήθηκε δραματικά κατά τον εικοστό αιώνα, με αποτέλεσμα από το 1985 να αποτελεί τον πιο συχνό τύπο καρκίνου παγκοσμίως, ιδιαίτερα στους άνδρες. Τα νέα περιστατικά καρκίνου του πνεύμονα ανά έτος, παγκοσμίως, εκτιμάται ότι συνιστούν το 12,4% όλων των νέων περιστατικών καρκίνου. Ο ετήσιος αριθμός των νέων περιστατικών εκτιμάται ότι ήταν 1,04 εκατομμύρια το 1990, ενώ αυξήθηκε στα 1,35 εκατομμύρια το 2002. Παρά την τεράστια πρόοδο που σημειώθηκε στη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών καρκινογένεσης τα τελευταία 20 χρόνια, δεν έχουν σημειωθεί δραστικές βελτιώσεις στον τομέα της θεραπείας του καρκίνου του πνεύμονα. Έτσι, η πρόγνωση αυτού του τύπου καρκίνου είναι κακή. Μόνο το 15% των περιστατικών είναι ίασιμα, ενώ ο αριθμός των θανάτων που οφείλονται σε καρκίνο του πνεύμονα παραμένει υψηλός. Το υψηλότερο ποσοστό πενταετούς επιβίωσης είναι 15% και έχει αναφερθεί στις Η.Π.Α. [1] και αφορά συνήθως σε μη μεταστατικές περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα [2].

Τα γεωγραφικά πρότυπα επίπτωσης και θνησιμότητας του καρκίνου του πνεύμονα είναι επηρεασμένα από προηγούμενη έκθεση στον καπνό. Οι διακυμάνσεις της επίπτωσης του καρκίνου του πνεύμονα σε διάφορες περιοχές αντανακλούν άμεσα τον επιπολασμό του καπνίσματος. Για παράδειγμα, η χαμηλότερη επίπτωση καρκίνου του πνεύμονα σημειώθηκε στην Utah, ενώ η υψηλότερη στο Kentucky, περιοχές στις οποίες έχει σημειωθεί ο χαμηλότερος και ο υψηλότερος επιπολασμός καπνίσματος, αντίστοιχα. Λόγω της μείωσης του επιπολασμού του καπνίσματος, αναμένεται ο καρκίνος του πνεύμονα να καταστεί συχνότερος σε πρώην καπνιστές σε σχέση με τους νυν καπνιστές [3]. Στις Η.Π.Α., καθώς και στη Δυτική και Βόρεια Ευρώπη, η επίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα έχει ήδη φθάσει στο μέγιστο επίπεδό της και έχει αρχίσει να μειώνεται, σε αντιστοιχία με την κορύφωση και τη μείωση του καπνίσματος [1]. Ωστόσο, στην Ανατολική και τη Νότια Ευρώπη, η επίπτωση του

καρκίνου του πνεύμονα δεν έχει φθάσει ακόμα στα μέγιστο επίπεδο της. Παρόμοια, στην Κίνα, όπου τα 2/3 των ενηλίκων ανδρών είναι καπνιστές (αναλογία που αντιπροσωπεύει το 1/3 των καπνιστών παγκοσμίως), ο αριθμός των θανάτων που σχετίζονται με το κάπνισμα αναμένεται να κορυφωθεί τα επόμενα χρόνια [3]. Επιπρόσθετα, η επίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα και η θνησιμότητα από αυτόν εξακολουθεί να αυξάνεται στις γυναίκες [1].

1.1.2 ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Ο καρκίνος του πνεύμονα μπορεί να διακριθεί σε δύο τύπους, με βάση τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά του, τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC, Small Cell Lung Cancer) και τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC, Non-Small Cell Lung Cancer). Ο μικροκυτταρικός καρκίνος αποτελεί το 10-15% των περιστατικών καρκίνου του πνεύμονα, ενώ ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί το 85-90% των περιστατικών καρκίνου του πνεύμονα. Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα διακρίνεται περαιτέρω σε τρεις κύριους ιστολογικούς υποτύπους, το αδenoκαρκίνωμα, το καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων και το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα [4]. Το καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων και ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα δημιουργούνται στους κεντρικούς αεραγωγούς, ενώ τα αδenoκαρκινώματα (συμπεριλαμβανομένου του βρογχοκυψελιδικού καρκίνου) εντοπίζονται περιφερικά. Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα εμφανίζει νευροενδοκρινικά χαρακτηριστικά και προέρχεται από κύτταρα που είναι προγραμματισμένα να διαφοροποιούνται με νευροενδοκρινή τρόπο. Οι φυσιολογικοί ιστοί του πνεύμονα δεν περιλαμβάνουν πλακώδες επιθήλιο, οπότε οι όγκοι εκ πλακωδών κυττάρων προκύπτουν από μεταπλαστικές μεταβολές που προκαλούνται από το κάπνισμα. Το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα αντιπροσωπεύει τις λιγότερο διαφοροποιημένες μορφές του μη μικροκυτταρικού καρκίνου. Τα αδenoκαρκινώματα προκύπτουν από τα πρόδρομα κύτταρα των βρογχιολίων (κύτταρα Clara) ή των κυψελίδων (πνευμονοκύτταρα τύπου II) ή από κύτταρα που παράγουν βλέννη. Σήμερα, το αδenoκαρκίνωμα είναι ο πιο συχνός τύπος καρκίνου του πνεύμονα παγκοσμίως, ενώ η συχνότητά του αυξάνεται ραγδαίως. Αποτελεί τον πιο συχνό τύπο καρκίνου σε γυναίκες, μη καπνιστές και νεαρά άτομα [2].

Κλινικά, ο καρκίνος του πνεύμονα διακρίνεται σε νόσο «περιορισμένου» και «εκτεταμένου» σταδίου, όπου το «περιορισμένο» στάδιο περιλαμβάνει όγκους τοπικά

εντοπισμένους στον πνεύμονα και στους λεμφαδένες του θώρακα, ενώ το «εκτεταμένο» στάδιο περιλαμβάνει εξωθωρακικές μεταστάσεις. Ο προσδιορισμός του σταδίου του καρκίνου του πνεύμονα είναι σημαντικός για τον καθορισμό του θεραπευτικού σχήματος που θα χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπισή του [5].

1.1.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Αναμφίβολα, το κάπνισμα συνιστά τον σημαντικότερο αιτιολογικό παράγοντα δημιουργίας καρκίνου του πνεύμονα, καθώς το 75-85% των περιπτώσεων αποδίδεται σε αυτό [4]. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα είναι παρόμοιος είτε χρησιμοποιούνται «ελαφριά» τσιγάρα είτε χρησιμοποιούνται πούρα και πίπα. Το παθητικό κάπνισμα έχει, επίσης, συσχετισθεί με τις αιτίες του καρκίνου του πνεύμονα και έχει ενοχοποιηθεί για το 1,6% των περιστατικών. Αποτελέσματα μιας μετα-ανάλυσης και μιας ολοκληρωμένης ανασκόπησης κατέδειξαν ότι ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα σε άτομα που δεν είναι καπνιστές, αλλά ζουν μαζί με έναν καπνιστή, είναι κατά 1,14 έως 5,20 φορές αυξημένη σε σχέση με μη καπνιστές που ζουν με μη καπνιστές. Επιπρόσθετα, πρόσφατα καταδείχτηκε ότι το παθητικό κάπνισμα κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα κατά 3,6 φορές [3].

Η επαγγελματική έκθεση αποτελεί ακόμα έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου. Συγκεκριμένα, σε πολλούς χώρους εργασίας, οι εργάτες εκτίθενται σε καρκινογόνες ουσίες, όπως κρυσταλλικό πυρίτιο, χρυσότιλος (λευκός αμίαντος), ουράνιο και ραδιενεργή σωματιδιακή ύλη, που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα, καθώς και άλλων τύπων καρκίνου. Επιπρόσθετα, η μόλυνση του αέρα έχει ενοχοποιηθεί για το 11% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα στα αστικά κέντρα της Ευρώπης. Πιστεύεται ότι η συσσωρευτική έκθεση σε περιβάλλοντα με υψηλές εκπομπές μολυσματικών ουσιών, όπως ενώσεις πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων μπορεί μακροχρόνια να οδηγήσει στην εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα, πιθανόν μέσω οξειδωτικού στρες, φλεγμονής και δυσλειτουργίας του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Η κατανάλωση αλκοόλ έχει, επίσης, συσχετισθεί με ελαφρώς υψηλότερα ποσοστά καρκίνου του πνεύμονα. Τον αντίποδα των παραπάνω παραγόντων κινδύνου αποτελούν οι αντιοξειδωτικές διατροφικές ουσίες, όπως τα καροτενοειδή, η β-κρυπτοξανθίνη, οι βιταμίνες C και E, που έχουν καταδείξει προστατευτικό ρόλο έναντι του καρκίνου του πνεύμονα, καθώς

και η φυσική άσκηση, η οποία φέρεται να μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα κατά 13-30% [3].

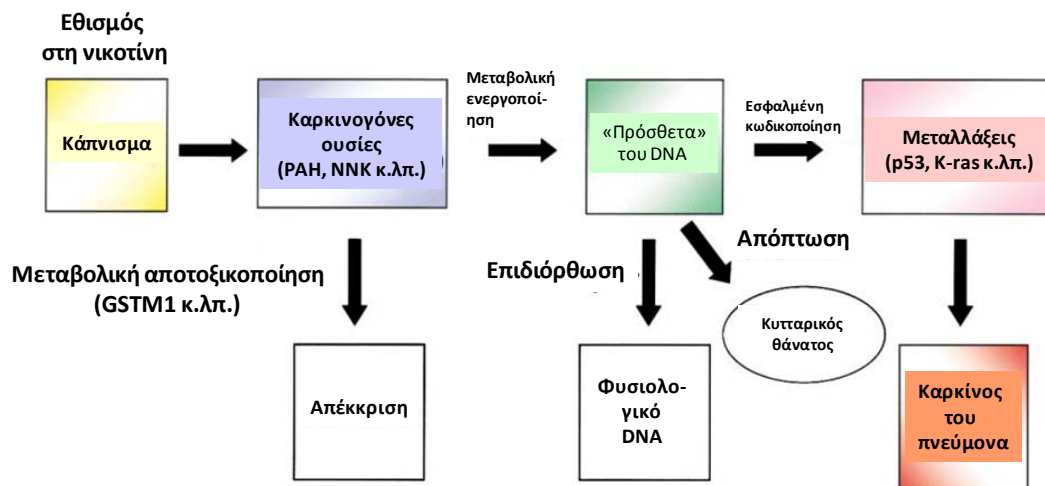
1.1.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Πολλές μοριακές επιδημιολογικές μελέτες υποδηλώνουν ότι η ευαισθησία στον καρκίνο του πνεύμονα ενδέχεται να είναι κληρονομική. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η προδιάθεση είναι οικογενής, καθώς η εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα ακολουθεί τους νόμους της Μεντελικής κληρονομικότητας για τα σπάνια αυτοσωμικά γονίδια [6]. Αυτή η οικογενής συσχέτιση είναι περισσότερο έκδηλη σε περιπτώσεις εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα σε μη καπνιστές. Ωστόσο, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, οι διακυμάνσεις του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα που παρατηρούνται από άτομο σε άτομο, ακόμα και όταν εκτίθενται στους ίδιους παράγοντες κινδύνου, οφείλονται σε γενετικές διαφορές που είναι συχνές στον πληθυσμό. Ειδικότερα, ο καπνός του τσιγάρου περιέχει πάνω από 20 γνωστές καρκινογόνες ουσίες που επάγουν ειδικά καρκίνο του πνεύμονα. Σε αυτές ανήκουν οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, καθώς και η ένωση 4-(μεθυλονιτροζαμινο)-1-(3-πυριδυλο)-1-βουτανόνη (NNK). Η τρανσφεράση της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο που απενεργοποιεί τις καρκινογόνες ουσίες, ενώ το κυτόχρωμα P450 είναι ένα ένζυμο που τις ενεργοποιεί. Οι πολυμορφισμοί που μειώνουν τη δραστηριότητα της οικογένειας της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης S ή αυξάνουν τη δραστηριότητα της οικογένειας του κυτοχρώματος P450 ενδέχεται να προκαλούν αύξηση της ευαισθησίας σε καρκίνο. Οι ενεργοποιημένες καρκινογόνες ουσίες προσδένονται στο DNA και προκαλούν μεταλλάξεις, ιδιαίτερα αντικαταστάσεις G→T, οι οποίες είτε επιδιορθώνονται, είτε οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση, είτε συσσωρεύονται στο γονιδίωμα. Οι διαφορές στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα μεταξύ των ατόμων καθορίζονται από τους γενετικούς πολυμορφισμούς αυτών των ενζύμων, καθώς και από την ικανότητα του κυττάρου να εντοπίζει και να επιδιορθώνει τις βλάβες στο DNA που προκαλούνται από τις καρκινογόνες ουσίες του τσιγάρου [2].

Οι καρκινογόνες ουσίες του τσιγάρου επιδρούν στο DNA και προκαλούν βλάβες σε βασικά γονίδια τα οποία εμπλέκονται στη γένεση του καρκίνου του πνεύμονα. Εάν το κύτταρο αποτύχει να επιδιορθώσει αυτές τις βλάβες ή να επάγει

απόπτωση, μετατρέπεται σε καρκινικό. Οι βλάβες αυτές είναι τόσο γενετικές (απώλεια ετεροζυγωτίας, χρωμοσωμική αστάθεια, μεταλλάξεις ογκογονιδίων, ογκοκατασταλτικών γονιδίων και γονιδίων επιδιόρθωσης του DNA) όσο και επιγενετικές (μεταβολές της μεθυλίωσης). Τα βασικά γονίδια που συμβάλλουν στην παθογένεση του καρκίνου του πνεύμονα περιλαμβάνουν τα ογκογονίδια *c-myc* και *K-ras*. Το τελευταίο έχει βρεθεί μεταλλαγμένο στο 15%–20% των περιπτώσεων του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, κυρίως σε αδenoκαρκινώματα, αλλά ποτέ σε μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Τα γονίδια *EGFR*, κυκλίνη D1 και *BCL2* υπερεκφράζονται σε καρκίνο του πνεύμονα. Επιπρόσθετα, η τελομεράση RNA (hTR) και η καταλυτική υπομονάδα της, αντίστροφη μεταγραφάση, εκφράζονται σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα, παρέχοντας την αντίστροφη μεταγραφάση της ανθρώπινης τελομεράσης του RNA (hTERT), έναν μηχανισμό αθανατοποίησης των κυττάρων [2]. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, επίσης, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γένεση του καρκίνου του πνεύμονα. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53* έχει βρεθεί μεταλλαγμένο στο 90% των περιπτώσεων μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και στο 70% των περιπτώσεων μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα [4]. Τα αντίστοιχα ποσοστά για το γονίδιο *Rb* είναι 90% και 20% και για το γονίδιο *p16* >50% και <1%. Άλλα ογκογονίδια τα οποία εμπλέκονται λιγότερο συχνά στον καρκίνο του πνεύμονα, αλλά των οποίων η απενεργοποίηση υποδεικνύει συσχέτιση των αντίστοιχων οδών τους με τη γένεση του καρκίνου του πνεύμονα είναι τα *PTEN*, *hOGG1* (επιδιόρθωση του DNA) και *BAP1* (ουβικουϊτίνωση). Επιπρόσθετα, η υπερμεθυλίωση συνιστά ακόμα έναν τρόπο απενεργοποίησης της έκφρασης γονιδίων, όπως τα *APC*, *CDH13*, *RARβ*, *FHIT*, *RASSF1A*, *TIMP3*, *p16*, *MGMT*, *SEMA3B* και *DAPK* στον καρκίνο του πνεύμονα. Άλλες μεταλλάξεις που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα αφορούν στο μιτοχονδριακό DNA. Ωστόσο, η λειτουργική σημασία αυτών των μεταλλάξεων παραμένει ακόμα άγνωστη. Τέλος, οι κύριες κυτταρικές ρυθμιστικές οδοί που έχουν βρεθεί απορυθμισμένες στον καρκίνο του πνεύμονα περιλαμβάνουν τις οδούς Rb/p16/cyclin D1, p53/MDM2/p19ARF, wnt/APC, EGFR/Ras, PP2a, καθώς και την οδό της τελομεράσης [2]. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου ο εθισμός στη νικοτίνη οδηγεί τελικά στη γένεση του καρκίνου του πνεύμονα παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.1.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Εικόνα 1.1: Εθισμός στη νικοτίνη, καρκινογόνες ουσίες του καπνού και η γένεση του καρκίνου του πνεύμονα. Ο εθισμός στη νικοτίνη αποτρέπει τους καπνιστές να διακόψουν το κάπνισμα. Οι καρκινογόνες ουσίες που επάγουν ειδικά καρκίνο του πνεύμονα είτε μεταβολίζονται, είτε προσδέονται στο DNA («πρόσθετα» του DNA, DNA adducts) προκαλώντας βλάβες. Αυτές οι βλάβες είτε επιδιορθώνονται, είτε οδηγούν σε απόπτωση. Όμως, εάν παραμείνουν, προκαλούν σημαντικές μεταλλάξεις σε γονίδια, όπως το p53 ή το Ras, οδηγώντας σε γενετική αστάθεια, πρόσθετες μεταλλάξεις και, τελικά, καρκίνο [2].

1.2. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *p53* ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Το γονίδιο *p53* έχει προσελκύσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία 20 χρόνια, καθώς έχει βρεθεί μεταλλαγμένο σε ποσοστό >50% όλων των καρκίνων και σε ποσοστό 70-90% των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα, ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο. Πρόκειται για ένα τυπικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο και η απώλεια του ενός αλληλομόρφου του δημιουργεί προδιάθεση σε καρκίνο (σύνδρομο Li-Fraumeni) [7]. Υπέρ του βασικού ογκοκατασταλτικού ρόλου του γονιδίου *p53* συνηγορούν δεδομένα που προκύπτουν από ποντίκια στα οποία έχει αδρανοποιηθεί το γονίδιο *p53* (knockout). Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά, τα ποντίκια *p53*^{-/-} δεν παρουσιάζουν καμία αναπτυξιακή ανωμαλία, αλλά αναπτύσσουν αυθόρμητα όγκους σε διάφορα όργανα έως τον έκτο μήνα της ηλικίας τους [8].

Το ανθρώπινο γονίδιο *p53* εδράζεται στο χρωμόσωμα 17p13.1 και κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα μήκους 393 αμινοξέων. Η πρωτεΐνη *p53* περιλαμβάνει τις εξής 5 κύριες λειτουργικές περιοχές:

- α) την όξινη αμινοτελική περιοχή (αμινοξέα 1 ± 50) που απαιτείται για τη μεταγραφική ενεργοποίηση,
- β) μια περιοχή πλούσια σε προλίνες (αμινοξέα 61 ± 94), με πέντε επαναλήψεις της αλληλουχίας PXXP (P=προλίνη και X=οποιοδήποτε αμινοξύ). Η περιοχή αυτή αλληλεπιδρά με μόρια που περιέχουν την περιοχή δέσμευσης SH3 και είναι σημαντική για την αποτελεσματική αναστολή της αύξησης και την απόπτωση που διαμεσολαβείται από την *p53*,
- γ) την κεντρική περιοχή (αμινοξέα 97 ± 300), που είναι η περιοχή δέσμευσης της πρωτεΐνης *p53* σε ειδικές αλληλουχίες του DNA, με τη μορφή ομοτετραμερούς,
- δ) την περιοχή τετραμερισμού (αμινοξέα 324 ± 352), μέσω της οποίας η πρωτεΐνη *p53* σχηματίζει ομοτετραμερή, ώστε να μπορέσει να δεσμευτεί στο DNA και
- ε) τη βασική καρβοξυτελική περιοχή (αμινοξέα 363 ± 393) η οποία διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο και αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA, τον ανασυνδυασμό του DNA και την απόπτωση [7].

Τα επίπεδα της ώριμης πρωτεΐνης *p53* στο φυσιολογικό κύτταρο είναι χαμηλά. Σε συνθήκες που επάγουν το κυτταρικό στρες (όπως βλάβες στο DNA από υπερϊώδη ή ιονίζουσα ακτινοβολία, ενεργοποίηση ογκογονιδίων, υποξία, υπερπλοειδία, έλλειψη ριβονουκλεοτιδίων και απώλεια της κυτταρικής πρόσφυσης),

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

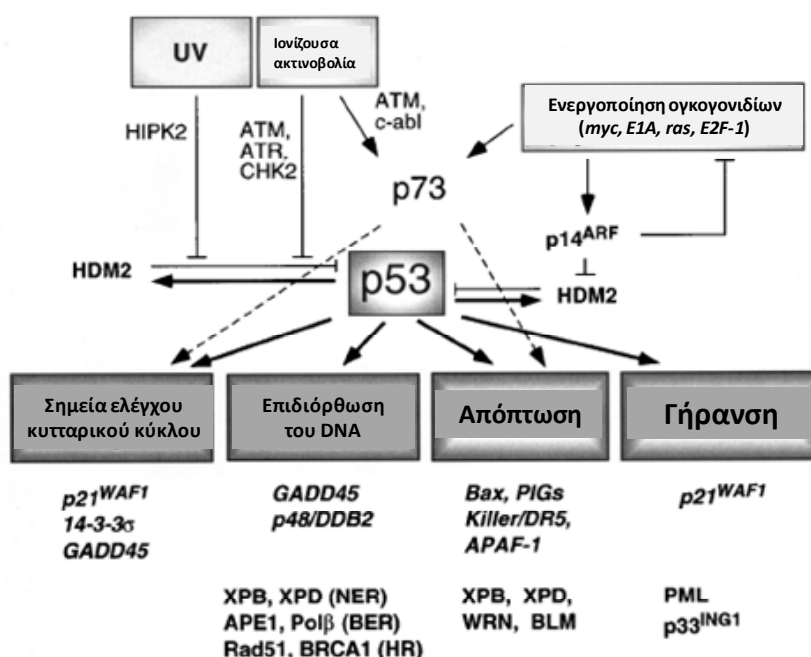
η πρωτεΐνη p53 υφίσταται μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις (φωσφορυλιώσεις) και εκδηλώνει ογκοπροστατευτικές δράσεις. Συγκεκριμένα, η ενεργοποιημένη p53 τετραμερίζεται, προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες στο DNA και ενεργοποιεί γονίδια-στόχους (π.χ. *p21^{CIP1/WAF1}* και *14-3-3σ*) που επάγουν την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 ή G2. Η αναστολή αυτή παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου υπό ακατάλληλες συνθήκες, ώστε να μη συσσωρεύονται γενετικά σφάλματα και να επιτραπεί η επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Επιπλέον, η πρωτεΐνη p53 εμπλέκεται σε οδούς επιδιόρθωσης του DNA, όπως η επιδιόρθωση με αφαίρεση βάσης (BER, base-excision repair), η επιδιόρθωση με αφαίρεση νουκλεοτιδίων (NER, nucleotide excision repair) και η επιδιόρθωση με ομόλογο ανασυνδυασμό (HRR, homologous recombination repair). Εάν οι βλάβες στο DNA είναι εκτεταμένες, η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιεί γονίδια που επάγουν γήρανση (*p21^{CIP1/WAF1}*) ή/και απόπτωση (π.χ. *Bax*, *PIG3* και *APAF-1*) ή αλληλεπιδρά με ελικάσες, επάγοντας απόπτωση. Με αυτό τον τρόπο, τα δυνητικά μεταλλαγμένα κύτταρα απομονώνονται από τον υπόλοιπο κυτταρικό πληθυσμό και αναστέλλεται η ογκογένεση. Λόγω των παραπάνω ογκοπροστατευτικών δράσεών της, η πρωτεΐνη p53 έχει χαρακτηριστεί ως «φύλακας» του γονιδιώματος. Η δομή και η λειτουργία της πρωτεΐνης p53 συνοψίζονται στην Εικόνα 1.2.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.



B.



Εικόνα 1.2: Δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης p53. A) Λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης p53. TA: περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης, PP: περιοχή πλούσια σε προλίνες, DBD: περιοχή δέσμευσης στο DNA, TET: περιοχή τετραμερισμού., BD: βασική καρβοξυτελική περιοχή. B) Το δίκτυο p53. Βασικοί οδοί σταθεροποίησης της πρωτεΐνης p53 που επάγεται από στρες, καθώς και επιδράσεις της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης p53. NER: nucleotide excision repair, BER: base excision repair. HR: homologous recombination [7].

Η μετάλλαξη του γονιδίου *p53* είναι το κύριο συμβάν το οποίο οδηγεί σε απενεργοποίηση της οδού απόκρισης στο στρες που διαμεσολαβείται από *p53* στον καρκίνο του πνεύμονα. Τέτοιου είδους μεταλλάξεις δημιουργούν προκαρκινικά κύτταρα τα οποία διαθέτουν επιλεκτικό πλεονέκτημα για ανεξέλεγκτη ανάπτυξη, καθώς και για γενετική αστάθεια. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *p53* στους καρκίνους δεν είναι τυχαίες, αλλά εντοπίζονται κυρίως στη σχετικά μικρή περιοχή δέσμευσης στο DNA. Ποσοστό περίπου 75% αυτών των μεταλλάξεων είναι αντικαταστάσεις ενός μόνο νουκλεοτιδίου (παρανοηματικές μεταλλάξεις), σε αντίθεση με άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια, στα οποία οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας, μη νοηματικές μεταλλάξεις ή μεταλλάξεις αναγνωστικού πλαισίου. Αυτές οι μεταλλάξεις οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας και καταστέλλουν πλήρως τη δέσμευση στο DNA και τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων. Η απώλεια της λειτουργίας του *p53* θεωρείται πρώιμο συμβάν στη γένεση του καρκίνου του πνεύμονα. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις του γονιδίου *p53* έχουν βρεθεί σε προνεοπλασματικές βλάβες, όπως η δυσπλασία του βρογχικού επιθηλίου, καθώς και σε μη καρκινικό περιφερικό πνευμονικό ιστό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, γεγονός το οποίο υποστηρίζει ότι οι μεταλλάξεις αυτές αποτελούν περισσότερο αίτιο, παρά αποτέλεσμα της ογκογένεσης στον πνευμονικό ιστό. Υποστηρίζεται ότι οι καρκινογόνες χημικές ουσίες που περιέχονται στον καπνό μπορούν να προκαλέσουν μεταλλάξεις του γονιδίου *p53* σε θερμά σημεία (hotspot) στον καρκίνο του πνεύμονα στον άνθρωπο. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι οι αντικαταστάσεις $G \rightarrow T$ στο γονίδιο *p53* σχετίζονται με το κάπνισμα τσιγάρων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η αντικατάσταση $G \rightarrow T$ στο κωδικόνιο 157 του γονιδίου *p53* (GTC σε TTC) είναι συχνή σε καπνιστές ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (33%), αλλά όχι σε μη καπνιστές ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (15%) ή σε ασθενείς με κάποιον άλλο τύπο καρκίνου (15%). Επιπρόσθετα, η αντικατάσταση $G \rightarrow T$ στο κωδικόνιο 249 του γονιδίου *p53* είναι η πιο συχνή παρανοηματική μετάλλαξη του *p53* σε αυτό το κωδικόνιο στον καρκίνο του πνεύμονα και παρατηρείται σπάνια σε άλλους τύπους καρκίνου [7].

1.3 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ p53

Τα περισσότερα ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια αποτελούν μέλη ευρύτερων οικογενειών συγγενικών γονιδίων. Επί αρκετά χρόνια, το γονίδιο *p53* θεωρείτο η εξαίρεση αυτού του κανόνα, καθώς δεν είχε βρεθεί κανένα άλλο γονίδιο ομόλογο του *p53*. Ωστόσο, το 1997 οι Kaghad M *et al* ταυτοποίησαν ένα γονίδιο στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 1p36.3 με μεγάλη ομολογία με το *p53*, το οποίο ονόμασαν *p73* [9]. Λίγο αργότερα, απομονώθηκε και το τρίτο μέλος της οικογένειας, που ονομάστηκε *p63* (γνωστό, επίσης, ως *p51*, *p43*, *p73L* και *KET*) και το οποίο εδράζεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 3q27-29. Αρχικά, αναμενόταν ότι τα γονίδια *p63* και *p73* θα αποτελούσαν τυπικά ογκοκατασταλτικά γονίδια, λόγω της μεγάλης ομολογίας τους με το γονίδιο *p53*, ιδιαίτερα στην περιοχή δέσμευσης στο DNA, και της ακόμα μεγαλύτερης ομολογίας μεταξύ τους, ωστόσο γρήγορα αποδείχτηκε ότι η υπόθεση αυτή συνιστούσε μια υπεραπλούστευση. Επόμενες μελέτες κατέδειξαν ότι ο ρόλος των γονιδίων αυτών στην ογκογένεση είναι αρκετά διαφοροποιημένος από εκείνον του *p53*, ενώ παράλληλα διαδραματίζουν σημαντικούς και εντελώς διακριτούς ρόλους κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, το μεν *p63* στην επιδερμική ανάπτυξη, το δε *p73* στη νευρική ανάπτυξη [10]. Όπως αναπτύσσεται διεξοδικά παρακάτω, τα γονίδια *p63* και *p73* παρουσιάζουν αξιοσημείωτες ομοιότητες, αλλά και ριζικές διαφορές σε σύγκριση με το πρότυπο γονίδιο *p53* της οικογένειας, αλλά και μεταξύ τους, τόσο ως προς τη δομή του γονιδίου και τα προϊόντα της μετάφρασης, όσο και ως προς το ρόλο τους στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και τον καρκίνο.

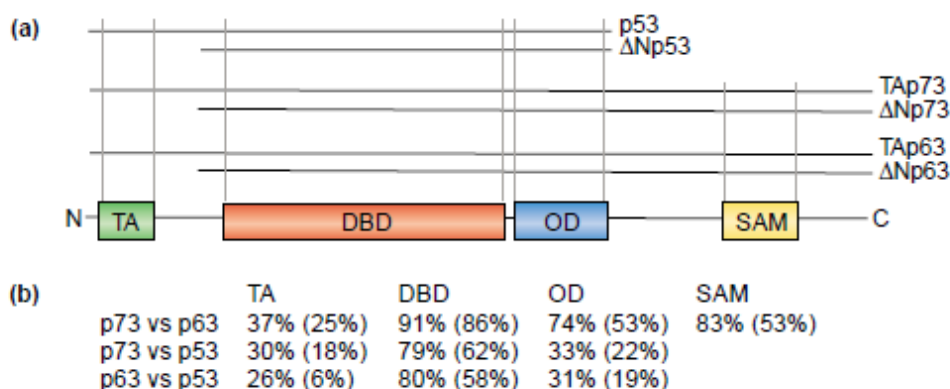
1.3.1 ΟΜΟΛΟΓΙΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ

Τα μέλη της οικογένειας *p53* εμφανίζουν σημαντική ομοιότητα στην αλληλουχία, καθώς και υψηλή συντηρητικότητα των κύριων λειτουργικών περιοχών τους. Η δομή του γονιδίου είναι συντηρημένη από τα μαλάκια μέχρι τον άνθρωπο. Τα γονίδια *p63* και *p73* κωδικοποιούν τις 3 κύριες λειτουργικές περιοχές που υπάρχουν στην πρωτεΐνη *p53* σε όλα τα είδη, δηλαδή μια όξινη αμινοτελική περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (TA, transactivation domain), μια περιοχή δέσμευσης στο DNA (DBD, DNA-Binding Domain) και μια βασική καρβοξυτελική περιοχή ολιγομερισμού (OD, Oligomerization Domain). Τα γονίδια *p63* και *p73* εμφανίζουν υψηλό ποσοστό ομολογίας και ταυτότητας αλληλουχίας με το γονίδιο *p53* σε αυτές τις περιοχές. Συγκεκριμένα, στην περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης το ποσοστό ομολογίας αμινοξικών καταλοίπων είναι 30% μεταξύ *p73* και *p53* και 26% μεταξύ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

p63 και p53. Στην περιοχή δέσμευσης στο DNA, το ποσοστό ομολογίας είναι 79% μεταξύ p73 και p53 και 80% μεταξύ p63 και p53, ενώ στην περιοχή ολιγομερισμού, το ποσοστό ομολογίας είναι 33% μεταξύ p73 και p53 και 31% μεταξύ p63 και p53 (Εικόνα 1.3). Το υψηλό ποσοστό ομολογίας στην περιοχή δέσμευσης στο DNA υποδηλώνει ότι τα μέλη της οικογένειας δεσμεύονται σε κοινά γονίδια-στόχους. Πράγματι, τόσο η πρωτεΐνη p63, όσο και η πρωτεΐνη p73 μπορούν να προσδεθούν σε κανονικές θέσεις δέσμευσης p53 στο DNA. Το ποσοστό ομολογίας στις 3 κύριες λειτουργικές περιοχές είναι ακόμα υψηλότερο μεταξύ των γονιδίων *p63* και *p73*, γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι τα γονίδια αυτά βρίσκονται εξελικτικά πλησιέστερα μεταξύ τους απ' ό,τι με το γονίδιο *p53*. Από την άλλη μεριά, τα γονίδια *p63* και *p73* κωδικοποιούν μια επιπλέον περιοχή, την περιοχή SAM (Sterile Alpha Motif) στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, η οποία δεν παρουσιάζει καμία ομοιότητα ή ομολογία με το γονίδιο *p53*, αλλά είναι πολύ συντηρημένη μεταξύ των γονιδίων *p63* και *p73* (83% ομολογία στην αλληλουχία) [11]. Η περιοχή αυτή διαμεσολαβεί αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, πολλές από τις οποίες είναι σημαντικές για τη ρύθμιση αναπτυξιακών διαδικασιών. Επιπρόσθετα, τα γονίδια *p63* και *p73* κωδικοποιούν μοτίβα PXXP (όπου P: προλίνη και X: οποιοδήποτε αμινοξύ), όπως ακριβώς και το γονίδιο *p53*. Μάλιστα, έχει καταδειχτεί ότι η πρωτεΐνη p73 αλληλεπιδρά, μέσω μιας αλληλουχίας PXXP που εντοπίζεται μετά την περιοχή δέσμευσης στο DNA, με την περιοχή SH3 της ογκοπρωτεΐνης c-abl, δηλαδή με μια περιοχή πρωτεΐνης με την οποία αλληλεπιδρά και η πρωτεΐνη p53 μέσω των μοτίβων PXXP. Ωστόσο, τα μοτίβα αυτά εκτείνονται σε όλο το μήκος του γονιδίου, σε αντίθεση με το γονίδιο *p53*, στο οποίο τα μοτίβα PXXP είναι συγκεντρωμένα στην αμινοτελική περιοχή (αμινοξικά κατάλοιπα 61-94) [10].

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Εικόνα 1.3: Η οικογένεια p53. (A) Η οικογένεια p53 περιλαμβάνει τρία γονίδια, τα p53, p63 και p73, τα οποία εκφράζονται, όλα, ως δύο κύριες πρωτεΐνες: η TA πρωτεΐνη, που είναι ενεργή ως μεταγραφικός παράγοντας και η ΔN, που είναι ανενεργή ως μεταγραφικός παράγοντας. (B) Ποσοστό ομολογίας και ταυτότητας (εντός παρενθέσεων) μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων των πρωτεϊνών p53, p63 και p73. Οι τιμές υποδεικνύονται για κάθε ξεχωριστή λειτουργική περιοχή. Συντομογραφίες: DBD, περιοχή δέσμευσης στο DNA. OD, περιοχή ολιγομερισμού. SAM, μοτίβο SAM. TA, περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης.

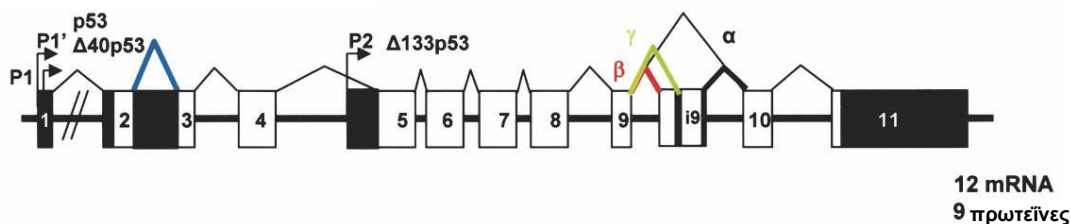
1.3.2 ΔΟΜΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ

Το ανθρώπινο γονίδιο p53 αποτελείται από 11 εξώνια και έχει μέγεθος 19,2 kbp. Μέχρι πρόσφατα θεωρείτο ότι διέθετε έναν υποκινητή που κωδικοποιεί μόνο μία πρωτεΐνη p53. Ωστόσο, το 2005 οι Bourdon JC *et al* κατέδειξαν ότι στην πραγματικότητα το ανθρώπινο γονίδιο p53 μπορεί θεωρητικά να συνθέσει 12 μετάγραφα mRNA, από τα οποία μπορούν να προκύψουν 9 πρωτεϊνικές ισομορφές. Αυτός ο μεγάλος αριθμός ισομορφών είναι αποτέλεσμα α) της ύπαρξης ενός εσωτερικού υποκινητή στο εσώνιο 4, από τον οποίο προκύπτουν οι Δ133 ισομορφές, που δεν περιέχουν την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης, καθώς η σύνθεσή τους ξεκινά από το αμινοξύ 133, β) του εναλλακτικού ματίσματος στο εσώνιο 9, με αποτέλεσμα να συντίθενται οι ισομορφές p53β και p53γ που δεν περιέχουν την περιοχή ολιγομερισμού και γ) του εναλλακτικού ματίσματος στο εσώνιο 2 ή της εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης, που οδηγούν στη δημιουργία των ισομορφών Δ40p53, οι οποίες δεν διαθέτουν ένα τμήμα της περιοχής μεταγραφικής ενεργοποίησης (τα πρώτα 40 αμινοξέα της πρωτεΐνης p53). Οι διάφοροι συνδυασμοί αμινοτελικής «κεφαλής» και καρβοξυτελικής «ουράς» οδηγούν στη δημιουργία συνολικά 9 πρωτεϊνικών ισομορφών p53. Από τις παραπάνω ισομορφές, μόνο η

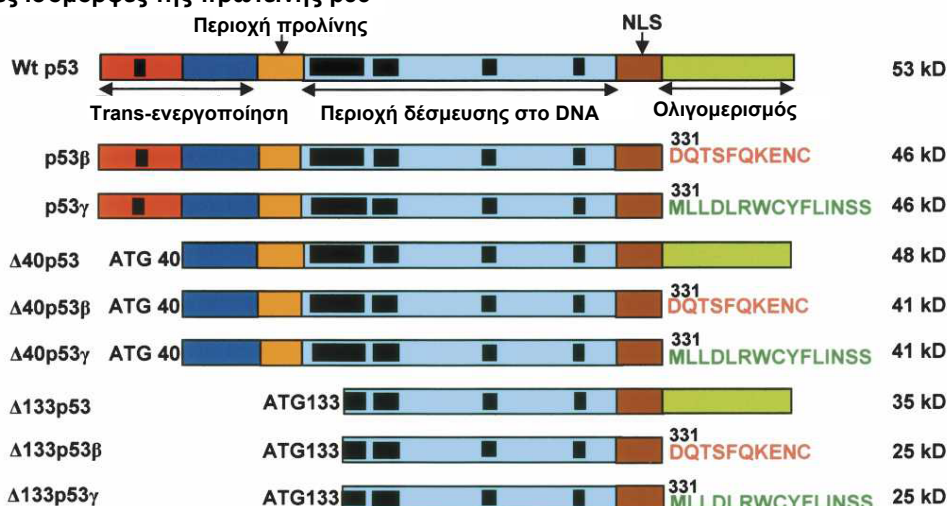
πρωτεΐνη p53 πλήρους μήκους διαθέτει μεταγραφικές και αποπτωτικές ιδιότητες, καθώς και την ικανότητα να ανταποκρίνεται σε συνθήκες κυτταρικού στρες. Η πρωτεΐνη Δ40p53 δρα ως επικρατής αρνητική μεταλλαγμένη μορφή της ισομορφής p53 πλήρους μήκους και παρεμποδίζει τις μεταγραφικές και αποπτωτικές λειτουργίες της. Παρόμοια, η ισομορφή Δ133p53 αυτή καθαυτή δεν μπορεί να επάγει απόπτωση ενώ, όταν συνεκφράζεται με την ισομορφή p53 πλήρους μήκους, μειώνει την αποπτωτική ικανότητα της, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι δρα επίσης ως επικρατής αρνητική μεταλλαγμένη μορφή της. Η ισομορφή p53β δεν μπορεί να προσδεθεί στο DNA και να ενεργοποιήσει αποπτωτικά γονίδια-στόχους, όπως το γονίδιο *p21* και το γονίδιο *bax*, αλλά πιστεύεται ότι μπορεί να σχηματίσει σύμπλεγμα με την ισομορφή p53 πλήρους μήκους και να ενισχύσει τη μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου *bax*, όχι όμως και του γονιδίου *p21*. Επιπρόσθετα, καμία από τις ισομορφές Δ40p53, Δ133p53 και p53β δεν μπορεί να ανταποκριθεί σε συνθήκες κυτταρικού στρες (Εικόνα 1.4) [12].

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A Δομή ανθρώπινου γονιδίου p53



B Πιθανές ισομορφές της πρωτεΐνης p53

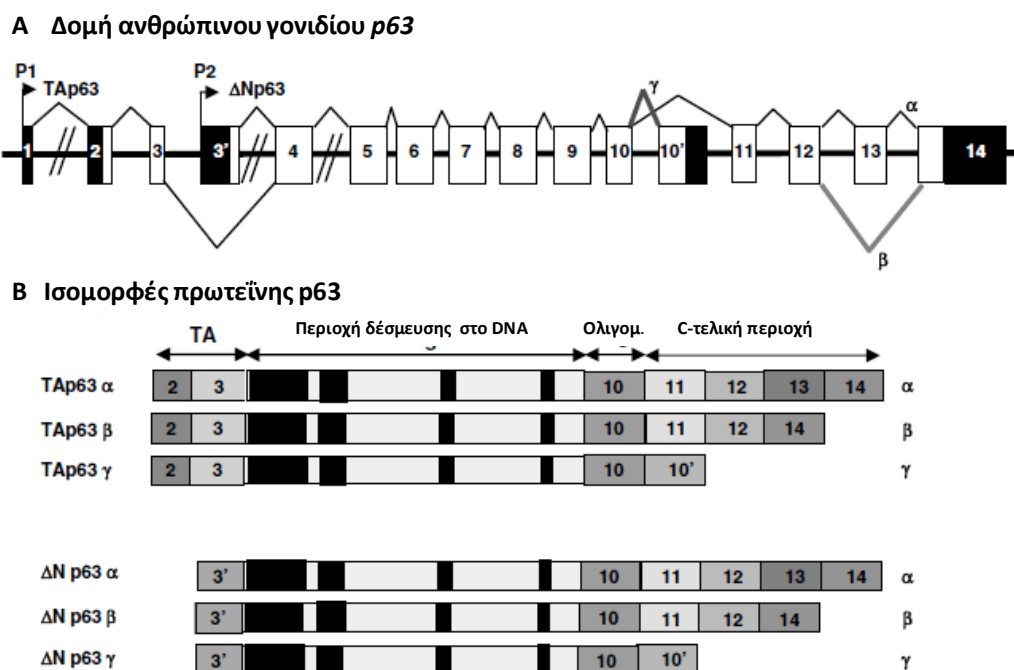


Εικόνα 1.4: Το ανθρώπινο γονίδιο p53 και οι ισομορφές του. A) Δομή του γονιδίου p53. Υποδεικνύονται οι δύο υποκινητές (P1 και P2), καθώς και οι θέσεις εναλλακτικού ματίσματος (μετάγραφα α, β, γ). B) Πρωτεϊνικές ισομορφές p53. Οι ισομορφές p53, p53β και p53γ κωδικοποιούνται από τον υποκινητή P1 και περιέχουν ολόκληρη την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης. Οι ισομορφές Δ133p53 κωδικοποιούνται από τον υποκινητή P2 και έχουν χάσει ολόκληρη την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης και ένα τμήμα της περιοχής δέσμευσης στο DNA. Οι ισομορφές Δ40p53 συντίθενται από τον υποκινητή P1, μετά από εναλλακτικό μάτισμα του εξωνίου, το οποίο οδηγεί σε απώλεια ενός τμήματος της περιοχής μεταγραφικής ενεργοποίησης [12].

Η δομή των γονιδίων p63 και p73 παρουσιάζει ομοιότητες με τη δομή του γονιδίου p53 τόσο ως προς την ύπαρξη εσωτερικού υποκινητή, όσο και ως προς το εναλλακτικό μάτισμα των μεταγράφων μετά το εξόνιο 10. Αναλυτικότερα, το ανθρώπινο γονίδιο p63 αποτελείται από 16 εξόνια και έχει μέγεθος περίπου 270 kbp. Παρόμοια με το γονίδιο p53, διαθέτει δύο υποκινητές, έναν εξωτερικό (P1), που κωδικοποιεί την τάξη των TA ισομορφών, οι οποίες περιλαμβάνουν την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης, και έναν εσωτερικό (P2), στο εσόνιο 3', που κωδικοποιεί την τάξη των ΔN ισομορφών, από τις οποίες απουσιάζει η περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης. Όπως συμβαίνει και στην περίπτωση του γονιδίου p53,

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

τα μετάγραφα *p63* μπορούν να υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα μετά το εσώνιο 10, το οποίο οδηγεί στη δημιουργία παραλλαγών με διαφορετικά καρβοξυτελικά άκρα. Έτσι, ανάλογα με το μάτισμα στο 3' άκρο, το γονίδιο *p63* εκφράζει τουλάχιστον 3 ισομορφές με διαφορετικό καρβοξυτελικό άκρο, τις *p63α*, *p63β* και *p63γ*. Έως σήμερα, δεν έχει παρατηρηθεί εναλλακτικό μάτισμα στην 5' περιοχή των μεταγράφων *p63*. Συνολικά, το γονίδιο *p63* μπορεί να συνθέσει τουλάχιστον 6 μετάγραφα, από τα οποία μπορούν να προκύψουν 6 διαφορετικές ισομορφές πρωτεϊνών *p63* (Εικόνα 1.5) [13].



Εικόνα 1.5: Το ανθρώπινο γονίδιο *p63* και οι ισομορφές του. A) Δομή του ανθρώπινου γονιδίου. Υποδεικνύονται οι δύο υποκινητές (P1 και P2), καθώς και οι θέσεις εναλλακτικού ματίσματος (μετάγραφα α, β, γ). B) Πρωτεϊνικές ισομορφές *p63*. Οι ισομορφές TAp63 που κωδικοποιούνται από τον υποκινητή P1 περιέχουν την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (TA) στο αμινοτελικό άκρο τους. Οι πρωτεΐνες ΔNp63, που κωδικοποιούνται από τον υποκινητή P2 είναι οι περικομμένες μορφές της πρωτεΐνης *p63* και περιέχουν μια αμινοτελική περιοχή διαφορετική από τις TAp63 ισομορφές [13].

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ανθρώπινο γονίδιο *p73* αποτελείται από 15 εξόνια και έχει μέγεθος μεγαλύτερο από 80 kbp. Όπως και τα γονίδια *p53* και *p63*, διαθέτει έναν εξωτερικό υποκινητή (P1), που κωδικοποιεί την τάξη των ΓΑ ισομορφών και έναν εσωτερικό υποκινητή (P2), στο εσώνιο 3', που κωδικοποιεί την τάξη των ΔΝ ισομορφών. Επίσης, τα μετάγραφα *p73* μπορούν να υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα μετά το εσώνιο 10, δίνοντας, φυσιολογικά, τουλάχιστον επτά ισομορφές με διαφορετικό καρβοξυτελικό άκρο, τις α, β, γ, δ, ε, ζ και η. Επιπρόσθετα, τα μετάγραφα *p73* που συντίθενται από τον εξωτερικό υποκινητή P1 μπορούν να υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα στο 5' άκρο, όπως συμβαίνει με το γονίδιο *p53*, γεγονός το οποίο οδηγεί στη σύνθεση ισομορφών που δεν περιέχουν την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης ή περιέχουν μόνο ένα τμήμα της περιοχής αυτής. Πιο αναλυτικά, από το εναλλακτικό μάτισμα στο 5' άκρο προκύπτουν τρεις επιπλέον τάξεις μεταγράφων:

α) τα *p73Δex2*, τα οποία δεν διαθέτουν το εξόνιο 2 και μεταφράζονται σε πρωτεΐνες που περιέχουν μόνο ένα τμήμα της περιοχής μεταγραφικής ενεργοποίησης,
β) τα *p73Δex2/3*, τα οποία δεν διαθέτουν τα εξόνια 2 και 3 και μεταφράζονται σε πρωτεΐνες που δεν περιέχουν την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης και
γ) το ΔΝ'p73, το οποίο περιλαμβάνει το εξόνιο 3'. Το πρωτεϊνικό προϊόν του μεταγράφου ΔΝ'p73 δεν έχει περιγραφεί ακόμα. Το μετάγραφο ΔΝ'p73 περιέχει το κωδικόνιο έναρξης μεταγραφής στο εξόνιο 2, ένα δεύτερο κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής στο εξόνιο 3' και ένα κωδικόνιο λήξης στο εξόνιο 3'. Επομένως, θεωρητικά, μπορεί να κωδικοποιεί είτε μια πρωτεΐνη μικρού μήκους που περιέχει μόνο την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (εφόσον χρησιμοποιείται το κωδικόνιο λήξης στο εξόνιο 3') είτε μια πρωτεΐνη ΔΝ'p73 ταυτόσημη με την πρωτεΐνη ΔΝp73 (εφόσον η μετάφραση αρχίζει από το κωδικόνιο έναρξης στο εξόνιο 3').

Όπως συμβαίνει και στην περίπτωση του γονιδίου *p53*, διάφοροι συνδυασμοί αμινοτελικής «κεφαλής» και «καρβοξυτελικής» ουράς, μπορούν να δώσουν μια ποικιλία ισομορφών *p73*. Έτσι, το γονίδιο *p73* εκφράζει τουλάχιστον 35 παραλλαγές mRNA, οι οποίες μπορούν να κωδικοποιήσουν θεωρητικά 29 διαφορετικές πρωτεϊνικές ισομορφές. Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί 14 διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης *p73* (Εικόνα 1.6) [13].

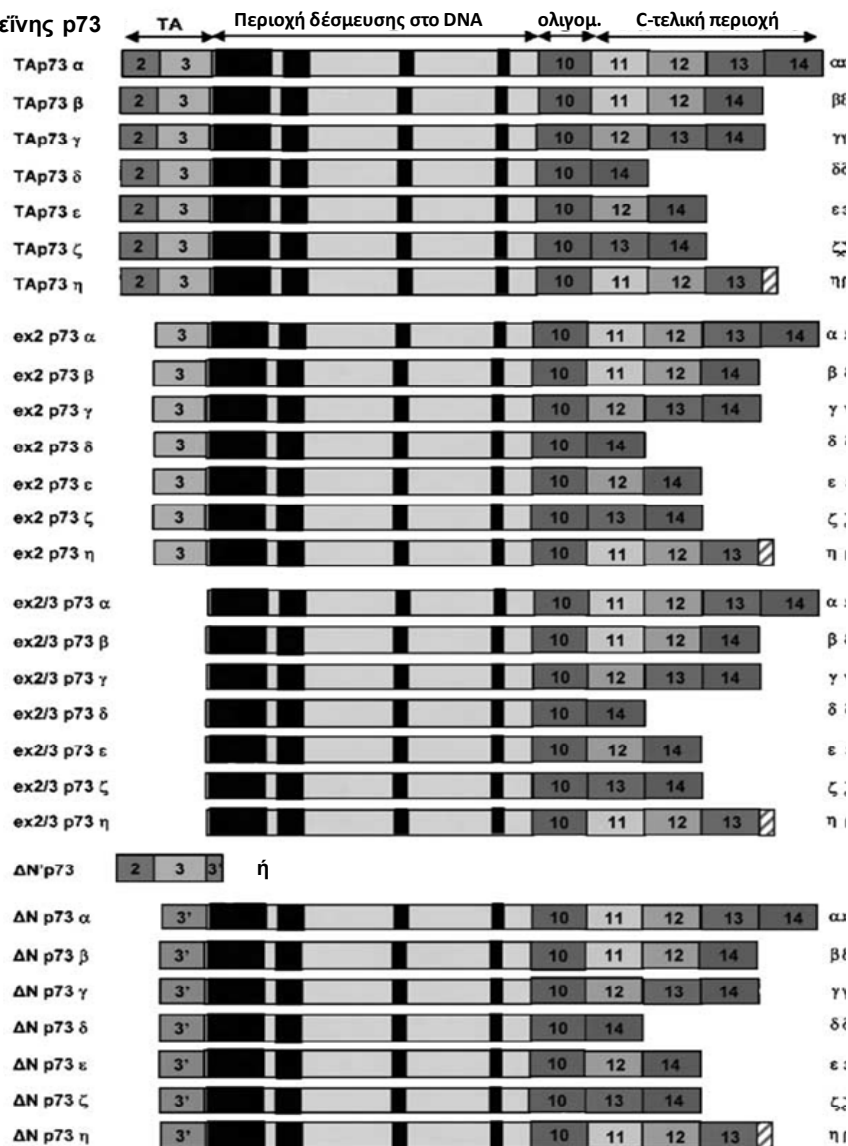
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

α Ανθρώπινο γονίδιο p73



β

Ισομορφές πρωτεΐνης p73



Εικόνα 1.6: Το ανθρώπινο γονίδιο p73 και οι ισομορφές του. Α) Δομή του γονιδίου p73. Υποδεικνύονται οι δύο υποκινητές (P1 και P2), καθώς και οι θέσεις εναλλακτικού ματίσματος (μετάγραφα α, β, γ, δ, ε, ζ, η). Β) Πρωτεϊνικές ισομορφές p73. Οι ισομορφές TAp73 που κωδικοποιούνται από τον υποκινητή P1 περιέχουν την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (TA) στο αμινοτελικό άκρο τους. Οι ισομορφές p73Δex2 προκύπτουν από τον υποκινητή P1 με εναλλακτικό μάτισμα του εξωνίου 2 και περιέχουν μόνο ένα τμήμα της περιοχής TA. Οι ισομορφές p73Δex2/3 προέρχονται από

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

τον υποκινητή P2 με εναλλακτικό μάτισμα των εξωνίων 2 και 3 και έχουν χάσει ολόκληρη την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το μετάγραφο ΔN'p73, το οποίο προέρχεται με εναλλακτικό μάτισμα του εξωνίου 3' δεν έχει περιγραφεί ακόμα, αλλά το μετάγραφο ΔN'p73 έχει βρεθεί συχνά υπερεκφρασμένο σε όγκους. Θεωρητικά η πρωτεΐνη ΔN'p73 είτε περιλαμβάνει μόνο την περιοχή TA είτε είναι ταυτόσημη με την πρωτεΐνη ΔNp73. Οι ισομορφές ΔNp73, που κωδικοποιούνται από τον υποκινητή P2 είναι οι περικομμένες μορφές της p73 πρωτεΐνης και περιέχουν μια αμινοτελική περιοχή διαφορετική από τις TAp73 ισομορφές [13].

1.3.3 ΡΟΛΟΣ ΣΤΗΝ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ: ΑΠΟΚΛΙΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *p63* ΚΑΙ *p73* ΑΠΟ ΤΑ ΚΛΑΣΙΚΑ ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΥΠΟΥ KNUDSON

Οι πρώτες ενδείξεις ότι ο ρόλος των γονιδίων *p63* και *p73* αποκλίνει από εκείνον του τυπικού ογκοκατασταλτικού γονιδίου *p53* προήλθαν από τα διαγονιδιακά ποντίκια *p63^{-/-}* και *p73^{-/-}*. Αντίθετα με τα ποντίκια *p53^{-/-}*, τα οποία εμφανίζουν αυθόρμητους όγκους, αλλά δεν έχουν καμία αναπτυξιακή ανωμαλία, τα ποντίκια *p63^{-/-}* και *p73^{-/-}* δεν αναπτύσσουν αυθόρμητους όγκους, αλλά εμφανίζουν αναπτυξιακές ανωμαλίες βαριάς μορφής στην επιδερμική και τη νευρική ανάπτυξη, αντίστοιχα. Αναλυτικότερα, τα ποντίκια στα οποία έχει αδρανοποιηθεί το γονίδιο *p63* γεννιούνται ζωντανά, αλλά εμφανίζουν σοβαρές αναπτυξιακές ανωμαλίες. Δεν διαθέτουν θωρακικές πλευρές ή διαθέτουν περικομμένες θωρακικές πλευρές λόγω της αποτυχίας διαφοροποίησης [14] ή διατήρησης [15] του κορυφαίου εκτοδερμικού επάρματος. Το δέρμα των ποντικίων *p63^{-/-}* δεν αναπτύσσεται πέρα από ένα πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο. Δεν παρουσιάζει διαστρωμάτωση και δεν εκφράζει δείκτες διαφοροποίησης. Επιπλέον, τα ποντίκια δεν διαθέτουν δομές που εξαρτώνται από αλληλεπιδράσεις της επιδερμίδας με το μεσέγχυμα, όπως οι θύλακοι των τριχών, τα δόντια, καθώς και παράγωγα πλακωδών επιθηλίων, όπως οι γαλακτοφόροι αδένες, οι δακρυϊκοί αδένες και οι σιελογόνοι αδένες. Τα ποντίκια αυτά είναι βιώσιμα κατά τη γέννηση, αλλά πεθαίνουν αρκετές ώρες μετά, πιθανόν λόγω αυξημένης διαπερατότητας του δέρματος και επακόλουθης αυξημένης απώλειας υγρών, η οποία οδηγεί σε αφυδάτωση [14, 15]. Ο αναπτυξιακός ρόλος του γονιδίου *p63* υποστηρίζεται, επίσης, από το γεγονός ότι στον άνθρωπο έχουν βρεθεί έξι σπάνιες αυτοσωμικές επικρατείς γενετικές μεταλλάξεις του γονιδίου *p63*, οι οποίες προκαλούν ανωμαλίες στην ανάπτυξη διαφόρων οργάνων εκτοδερμικής προέλευσης. Συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν στα σύνδρομα Hay-Wells ή AEC (Ancyloblepharon Ectodermal dysplasia Clefting), LMS (Limb-Mammary Syndrome), Rapp-Hodgkin, EEC (Ectrodactyly Ectodermal dysplasia Clefting), SHFM (Split-Hand/Foot Malformations) και ADULT (Acro-Dermato-Ungual-Lacrymal-Tooth) [10].

Από την άλλη πλευρά, τα ποντίκια στα οποία έχει αδρανοποιηθεί το γονίδιο *p73* εμφανίζουν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, τα οποία οφείλονται κυρίως σε

γαστρεντερικές αιμορραγίες, αλλά και ενδοκρανιακές αιμορραγίες. Τα ζώα που κατορθώνουν να επιβιώσουν παρουσιάζουν χρόνιες λοιμώξεις και φλεγμονές, νευροαναπτυξιακές ανωμαλίες, καθώς επίσης και ανωμαλίες στη συμπεριφορά και την αναπαραγωγή. Συγκεκριμένα, στις λοιμώξεις και τις φλεγμονές των ποντικών $p73^{-/-}$ συγκαταλέγονται η ρινίτιδα βαριάς μορφής, η πυώδης μέση ωτίτιδα, το περικογχικό οίδημα και η επιπεφυκίτιδα. Πιστεύεται ότι οι λοιμώξεις αυτές είναι αποτέλεσμα ακατάλληλων αποκρίσεων ή αποκρίσεων υπερδραστηριοποίησης του επιθηλίου, οι οποίες καθιστούν αυτούς τους παραρρίνιους κόλπους επιρρεπείς σε εποικισμό από παθογόνους μικροοργανισμούς. Αυτό σημαίνει ότι οι λοιμώξεις των ποντικών $p73^{-/-}$ είναι δευτεροπαθείς των ιδιοσυστασιακών φλεγμονωδών σημάτων τα οποία επάγονται από την απώλεια του γονιδίου $p73$, ενώ οι γαστρεντερικές βλάβες αποδίδονται σε επακόλουθη γενικευμένη βλεννογονίτιδα. Στις νευροαναπτυξιακές ανωμαλίες περιλαμβάνονται η ήπια, συγγενής υδροκεφαλία και η ιπποκαμπική δυσγενεσία. Η υδροκεφαλία, σε ορισμένα άτομα, εξελίσσεται σε ιδιαίτερα νοσηρή κατάσταση, που χαρακτηρίζεται από μαζική επέκταση των πλευρικών κοιλιών του εγκεφάλου, συμπίεση του φλοιού και ενδοκοιλιακή αιμορραγία. Πιστεύεται ότι η υδροκεφαλία οφείλεται, ενδεχομένως, σε βλάβη στην παραγωγή ή την επαναπορρόφηση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Από την άλλη πλευρά, η ιπποκαμπική δυσγενεσία είναι αποτέλεσμα ελλείμματος στην οργάνωση, παρά ανεπάρκειας των νευρώνων της κοκκιώδους στιβάδας. Οι συμπεριφορικές και αναπαραγωγικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν την απώλεια σεξουαλικού ενδιαφέροντος των αρσενικών ποντικών $p73^{-/-}$ για τα θηλυκά, καθώς και της επιθετικότητας έναντι σε άλλα αρσενικά. Πιστεύεται ότι αυτό το χαρακτηριστικό οφείλεται σε βλάβη στο όργανο του Jacobson, δηλαδή στην οσφρητική δομή που εμπλέκεται στην ανίχνευση φερομονών και στην οποία, φυσιολογικά, εκφράζονται υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης $p73$ [16].

Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η αδυναμία να καταδειχτεί η ογκοκατασταλτική δράση του γονιδίου $p73$ σε διαγονιδιακά ποντίκια $p73^{-/-}$ *in vivo* ενδέχεται να οφείλεται στη μικρή διάρκεια ζωής των ποντικών $p73^{-/-}$ και ότι, εάν τα ποντίκια αυτά μπορούσαν να ζήσουν περισσότερο, θα εμφάνιζαν όγκους. Μία βασική αιτία θανάτου των ποντικών $p73^{-/-}$ ήταν ο υποσιτισμός, λόγω της αδυναμίας των νεογνών $p73^{-/-}$ να ανταγωνιστούν με τα άτομα $p73^{+/+}$ και τα άτομα φυσικού τύπου της ίδιας γενιάς ως προς το θηλασμό. Πρόσφατα, οι Nemaierova A *et al* κατόρθωσαν να εντοπίσουν τα ποντίκια $p73^{-/-}$ και να αυξήσουν το χρόνο ζωής τους, δίνοντάς τα σε θετές θηλάζουσες

μητέρες. Ωστόσο, κανένα από τα ποντίκια $p73^{-/-}$ τα οποία επιβίωσαν για μεγάλο χρονικό διάστημα, δεν εμφάνισε κλινικά σημεία κακοήθειας [17].

Ο ρόλος των γονιδίων $p63$ και $p73$ στον καρκίνο είναι αμφίσημος. Οι πρώτες μελέτες των γονιδίων $p63$ και $p73$ σε διάφορους ανθρώπινους όγκους καταδεικνύουν ότι, εκ πρώτης όψεως, τα γονίδια αυτά δεν είναι τυπικά ογκοκατασταλτικά γονίδια, αφού δεν υφίστανται απώλεια της έκφρασης ή της λειτουργίας κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης. Είναι αξιοσημείωτο ότι, αντίθετα με το γονίδιο $p53$, τα γονίδια $p63$ και $p73$ σπανίως έχουν βρεθεί μεταλλαγμένα σε καρκίνους [13]. Για παράδειγμα, το γονίδιο $p73$ έχει βρεθεί μεταλλαγμένο σε <0,5% των περιπτώσεων καρκίνου που έχουν εξεταστεί [18]. Επιπρόσθετα, η περιοχή 3q27, στην οποία εδράζεται το γονίδιο $p63$ βρίσκεται συχνά ενισχυμένη σε καρκίνους του πνεύμονα και του τραχήλου της μήτρας, ενώ οι ισομορφές TAp63 υπερεκφράζονται σε κακοήθη λεμφώματα, γεγονός τα οποία παραπέμπουν περισσότερο σε ογκογονίδιο, παρά σε ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Από την άλλη πλευρά, η περιοχή 1p36, στην οποία εδράζεται το γονίδιο $p73$ παρουσιάζει απώλεια ετεροζυγωτίας σε ανθρώπινους καρκίνους [13], ενώ τα προϊόντα του γονιδίου $p73$ έχουν βρεθεί υπερεκφρασμένα σε πολλούς τύπους καρκίνου [10]. Άλλες μελέτες παρουσιάζουν σημαντικές *in vivo* ενδείξεις που συνηγορούν υπέρ του ογκοκατασταλτικού ρόλου των γονιδίων αυτών. Συγκεκριμένα, οι Flores ER *et al* κατέδειξαν ότι ποντίκια ετερόζυγα για το γονίδιο $p63$ ($p63^{+/-}$) ή το $p73$ ($p73^{+/-}$) παρουσιάζουν προδιάθεση για δημιουργία όγκων, όπως καρκινώματα από πλακώδες επιθήλιο, ιστιοκυτταρικά σαρκώματα, λεμφώματα θύμου, αιμαγγειοσαρκώματα και αδenoκαρκινώματα του πνεύμονα. Περαιτέρω ανάλυση των όγκων που προήλθαν από αυτά τα ετερόζυγα ποντίκια κατέδειξε ότι στους όγκους αυτούς είχε συμβεί απώλεια του εναπομείναντος αλληλομόρφου φυσικού τύπου. Διπλά ετερόζυγα ποντίκια $p63^{+/-}$, $p73^{+/-}$ εμφάνισαν όγκους νωρίτερα σε σχέση με τα ετερόζυγα ποντίκια $p63^{+/-}$ ή $p73^{+/-}$. Επίσης, τα διπλά ετερόζυγα ποντίκια $p63^{+/-}$, $p73^{+/-}$ ή $p63^{+/-}$, $p73^{+/-}$ παρουσίασαν αυξημένη επιβάρυνση λόγω όγκων και σημαντικά υψηλότερη συχνότητα μεταστάσεων σε σχέση με τα ποντίκια $p53^{+/-}$ [19].

Συμπερασματικά, τα γονίδια $p63$ και $p73$ αφενός μεν διαδραματίζουν εμφανή και ουσιώδη ρόλο στην ανάπτυξη, αφετέρου δε φέρονται να εμπλέκονται σε οδούς καρκινογένεσης, αν και όχι ως τυπικά ογκοκατασταλτικά γονίδια. Έχει προταθεί ότι η λειτουργική πολυπλοκότητα που εμφανίζουν αυτά τα γονίδια σε σχέση με το πρωτότυπο μέλος της οικογένειας, $p53$, οφείλεται εν μέρει στον μεγάλο αριθμό

ισομορφών τις οποίες μπορούν να συνθέσουν [19]. Επομένως, η διερεύνηση των βιολογικών δράσεων κάθε ισομορφής ξεχωριστά είναι απαραίτητη προκειμένου να καθοριστεί ο τελικός ρόλος των γονιδίων *p63* και *p73* στην ογκογένεση.

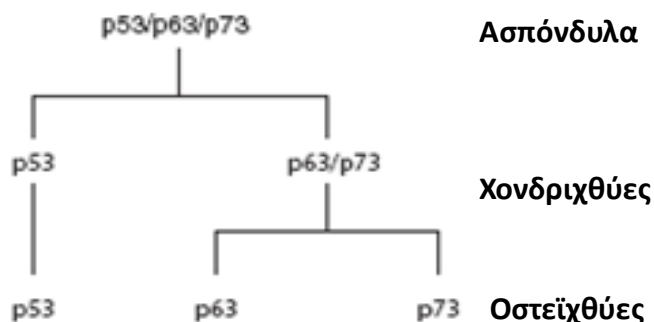
1.3.4 ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ *p53*

Τα πρώτα παράλογα γονίδια της οικογένειας *p53/p63/p73* συναντώνται στα χοανομαστιγωτά (δύο παράλογα γονίδια) και στη θαλάσσια ανεμόνα (τρία παράλογα γονίδια). Η θαλάσσια ανεμόνα *Nematostella vectensis* έχει ένα γονίδιο που μοιάζει με υβρίδιο *p63/p73* (τον πρόδρομο των γονιδίων *p63* και *p73*) και το οποίο ονομάζεται *pnpr-63*. Αυτό είναι το αρχαιότερο σαφές παράδειγμα προγονικού μέλους της οικογένειας *p53*. Ένα ομόλογο των γονιδίων της οικογένειας *p53* εντοπίζεται για πρώτη φορά στο νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans*, στις μέλισσες και στη *Drosophila melanogaster*. Όλοι αυτοί οι οργανισμοί διαθέτουν ένα μόνο αντίγραφο ομολόγου γονιδίου το οποίο σχετίζεται στενότερα με ένα υβριδικό γονίδιο *p63/p73* παρά με το ίδιο το γονίδιο *p53*. Αυτό το γονίδιο διατηρείται έως τα πρώτα Χορδωτά. Στους Χονδριχθούς παρατηρείται για πρώτη φορά διπλασιασμός αυτού του υβριδικού γονιδίου, από τον οποίο προκύπτει ένα πρόδρομο γονίδιο *p53* και ένα υβριδικό γονίδιο *p63/p73*. Αυτός ο διαχωρισμός του *p53* από το υβριδικό γονίδιο *p63/p73* υποδεικνύει ότι το γονίδιο *p53* είναι μεταγενέστερο των *p63* και *p73* και τεκμηριώνει το γεγονός ότι τα γονίδια *p63* και *p73* παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια μεταξύ τους από ότι με το γονίδιο *p53*. Στους Οστεϊχθούς παρατηρείται ένας σαφής, δεύτερος διαχωρισμός μεταξύ των γονιδίων *p63* και *p73*, τα οποία διατηρούνται σε όλους τους μεταγενέστερους ανώτερους οργανισμούς (Εικόνα 1.7). Αυτή η γενετική επέκταση συνοδεύτηκε από αντίστοιχη λειτουργική διαφοροποίηση των τριών μελών της οικογένειας, ώστε να αποκτήσουν τις λειτουργίες που τους αποδίδονται σήμερα.

Τα δεδομένα αυτά, που προέρχονται από ζωικούς οργανισμούς των οποίων το γονιδίωμα έχει πλήρως αλληλουχιστεί, παρέχουν ένα εύλογο πρότυπο σχετικά με την εξέλιξη των λειτουργιών των μελών της οικογένειας *p53*. Σύμφωνα με αυτό, το γονίδιο *p53*, στη μορφή που είναι γνωστό σήμερα, είναι μεταγενέστερο των *p63* και *p73*. Ωστόσο, η λειτουργία της απόκρισης σε βλάβες του DNA με επακόλουθη επαγωγή της απόπτωσης είναι αρχέγονη. Αναλυτικότερα, το πλέον πρωτόγονο μέλος της οικογένειας *p53*, δηλαδή το γονίδιο *pnpr63* στη θαλάσσια ανεμόνα, επάγει

απόπτωση των κυττάρων της γαμετικής σειράς ως απόκριση σε βλάβες στο DNA, ώστε να διαφυλάσσει την πιστότητα της γαμετικής σειράς. Παρόμοια, το υβριδικό γονίδιο *p63/p73* στα ενήλικα άτομα *Drosophila melanogaster*, το οποίο ονομάζεται *Dmp53*, κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα που προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες γονιδίων-στόχων (*reaper* και *sickle*) και πυροδοτεί απόπτωση σε κύτταρα της γαμετικής σειράς των ενήλικων ατόμων ως απόκριση σε βλάβες του DNA. Επίσης, στον σκώληκα *Caenorhabditis elegans*, το γονίδιο *p63/p73* (εδώ ονομάζεται *CEP-1*) ανταποκρίνεται σε συνθήκες στρες, όπως βλάβες στο DNA, υποξία και στέρση τροφής (starvation) και προκαλεί απόπτωση των κυττάρων της γαμετικής σειράς. Επομένως, οι πρώτες λειτουργίες των μελών της οικογένειας p53 είναι η διασφάλιση της ακεραιότητας του γονιδιώματος της γαμετικής σειράς, ώστε να αποτρέπεται η δημιουργία εμβρύων με γενετικές ανωμαλίες.

Στα Χορδωτά, το γονίδιο *p53*, που εμφανίζεται για πρώτη φορά στους Χονδριχθύες, ειδικεύεται στη διατήρηση της πιστότητας του διπλασιασμού των σωματικών βλαστικών κυττάρων ή των προγονικών κυττάρων, ώστε να αποτρέπεται η συσσώρευση γενετικών βλαβών στα κύτταρα και ο επακόλουθος μετασχηματισμός τους σε καρκινικά κύτταρα. Στους Οστεϊχθύες, το ανώτερο επίπεδο πολυπλοκότητας των ιστών επιβάλλει τον διαχωρισμό του υβριδικού γονιδίου *p63/p73* σε δύο ξεχωριστά, πλέον, γονίδια, τα οποία επιφορτίζονται με διαφορετικές λειτουργίες: το μεν *p63* με την παραγωγή επιθηλιακών κυττάρων και σχετικών εξαρτημάτων, το δε *p73* με τον έλεγχο ανοσολογικών και νευρικών κυττάρων. Η διαφοροποίηση των γονιδίων *p63* και *p73* συνεχίζεται σύντομα μετά το διαχωρισμό τους, λόγω της εισαγωγής εσωνίων στο γονίδιο *p63*, η οποία αυξάνει δραματικά το μέγεθός του (από 25 kbp σε οστεϊχθύες σε 265 kbp στον άνθρωπο) και, συνακόλουθα, τη συχνότητα των ανασυνδυασμών του (Εικόνα 1.7) [20].



Εικόνα 1.7: Σενάριο της εξέλιξης των γονιδίων της οικογένειας p53. Ένας διπλασιασμός του πρωτόγονου υβριδικού γονιδίου οδήγησε σε διαχωρισμό του γονιδίου p53 στους Χονδριχθύες. Ένας δεύτερος διπλασιασμός διαχώρισε το γονίδιο p53 από το γονίδιο p63 στους Οστεϊχθύες [20].

1.4 ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ p73 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

1.4.1 ΟΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ TAp73

1.4.1.1 ΠΡΟΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ TAp73

Οι ισομορφές TAp73 διαθέτουν την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης TA και παρουσιάζουν μεταγραφική ενεργότητα. Μπορούν να ενεργοποιήσουν διάφορα γονίδια-στόχους της πρωτεΐνης p53, όπως τα *p21^{Waf1/Cip1}*, *bax*, *mdm2*, κυκλίνη G, *gadd45*, *IGFBP3* (*Insulin like growth factor-binding protein 3*), τη ριβοσωμική ομάδα γονιδίων (*Ribosomal Gene Cluster, RBC*), το *PUMA* και το *14-3-3σ*, αν και όχι στον ίδιο βαθμό με το p53. Όμως, δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν όλα τα γονίδια-στόχους του p53. Από την άλλη πλευρά, έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν γονίδια, κυρίως νευροαναπτυξιακά, τα οποία δεν μπορούν να ενεργοποιηθούν από την πρωτεΐνη p53. Κατά συνέπεια, οι πρωτεΐνες TAp73 παρουσιάζουν ειδικότητα ως προς τους μεταγραφικούς στόχους τους. Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι σημαντικά γονίδια-στόχοι του p53, τα οποία εμπλέκονται σε τυπικές διαδικασίες απόπτωσης και κυτταρικού θανάτου, ενεργοποιούνται επίσης από τις πρωτεΐνες TAp73 υποδεικνύει προαποπτωτικό ρόλο για τις ισομορφές TAp73 [21].

Έχει καταδειχτεί ότι οι μεταγραφικά ενεργές ισομορφές του *p73* επάγουν απόπτωση μέσω πολλών διαφορετικών μοριακών μηχανισμών. Καταρχήν, η ισομορφή TAp73α μπορεί να επάγει στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω του γονιδίου *scotin*, με τρόπο ανάλογο με εκείνον της πρωτεΐνης *p53*. Αναλυτικότερα, η *scotin* είναι μια πιθανή διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και της οποίας η υπερέκφραση πυροδοτεί στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Το ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο αποτελεί σημαντικό ενδοκυτταρικό αισθητήρα των μεταβολών των κυτταροπλασματικών σημάτων (π.χ. ανεπάρκεια ασβεστίου, αναστολή γλυκοζυλίωσης, συσσώρευση ικών πρωτεϊνών κ.α.) επάγει, συνακόλουθα, απόπτωση και κυτταρικό θάνατο. Έχει βρεθεί ότι το *p53* πυροδοτεί την υπερέκφραση *scotin*, ως απόκριση σε βλάβες στο DNA. Παρόμοια, η ισομορφή TAp73α, αλλά όχι η ισομορφή ΔNp73α, επάγει υπερέκφραση της *scotin* και στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Επιπρόσθετα, η ισομορφή TAp73α μπορεί να επάγει τον μεταγραφικό παράγοντα Gadd 153/CHOP, ο οποίος επάγεται υπό συνθήκες στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, καθώς επίσης και να προάγει μεταβολές στη μορφολογία του ενδοπλασματικού δικτύου [21].

Ένας δεύτερος αποπτωτικός μηχανισμός στον οποίον εμπλέκονται οι μεταγραφικά ενεργές ισομορφές του *p73* είναι η μιτοχονδριακή οδός απόπτωσης. Συγκεκριμένα, το *p73* ενεργοποιεί τη σύνθεση της πρωτεΐνης PUMA, μιας πρωτεΐνης με περιοχή BH3, η οποία με τη σειρά της μετατοπίζει την πρωτεΐνη Bax στα μιτοχόνδρια και διευκολύνει την ταχεία μετατροπή από την ανενεργή στην ενεργή της μορφή. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη Bax πυροδοτεί απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια και, τελικά, απόπτωση. Οι ισομορφές TAp73 μπορούν να ενεργοποιήσουν απευθείας το γονίδιο *bax*, ωστόσο ο βαθμός αυτής της ενεργοποίησης δεν επαρκεί για να επαχθεί απόπτωση, σε αντίθεση με την οδό PUMA/Bax. Αυτός ο μηχανισμός απόπτωσης είναι ειδικός για τις ισομορφές TAp73, ενώ οι ισομορφές ΔNp73 αναστέλλουν τόσο την άμεση ενεργοποίηση του γονιδίου *bax* όσο και την έμμεση (μέσω PUMA) ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Bax, παρεμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τον κυτταρικό θάνατο [21].

Ωστόσο, ο παραπάνω δεν φαίνεται να είναι ο μοναδικός τρόπος με τον οποίο οι ισομορφές TAp73 συμμετέχουν στη μιτοχονδριακή οδό απόπτωσης. Έχει καταδειχτεί ότι ο αδενοϊός E1A μπορεί να επάγει τη σύνθεση των ισομορφών TAp73, αλλά όχι των ισομορφών ΔNp73, καθώς επίσης και να οδηγήσει σε αύξηση της έκφρασης της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Noxa και, συνακόλουθα, σε απόπτωση

μέσω μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, σε κύτταρα που δεν εκφράζουν p53. Είναι πιθανό η αύξηση των επιπέδων Noxa και η απόπτωση σε κύτταρα που δεν εκφράζουν p53 να οφείλεται στην ενεργοποίηση του γονιδίου *Noxa* από τις πρωτεΐνες TAp73. Επομένως, οι ισομορφές TAp73 ενδέχεται να συμμετέχουν στη μιτοχονδριακή οδό απόπτωσης μέσω του *Noxa* [22, 23].

Ένας τρίτος μηχανισμός απόπτωσης που διαμεσολαβείται από τις ισομορφές TAp73 περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του διαμεμβρανικού υποδοχέα του κυτταρικού θανάτου CD95 με τρόπο παρόμοιο με εκείνον του p53. Πιο αναλυτικά, έχει βρεθεί ότι στην κυτταρική σειρά ηπατοκαρκινώματος στον άνθρωπο, HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma), η ενεργοποίηση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου από τον υποδοχέα CD95 και τον αντίστοιχο συνδέτη του, CD95L, απαιτεί p53. Η πρωτεΐνη p53 επάγει την μεταγραφή του γονιδίου *CD95*, αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα CD95. Η ισομορφή TAp73α δρα με τον ίδιο τρόπο, ενώ οι ισομορφές ΔNp73 αναστέλλουν τη μεταγραφή του γονιδίου *CD95* [22]. Επιπρόσθετα, σε περίπτωση πρόκλησης βλαβών στο DNA, οι ισομορφές ΔNp73, οι οποίες αναστέλλουν την αποπτωτική δράση των TAp73, αποικοδομούνται εκλεκτικά και ταχέως, ενώ τα επίπεδα των ισομορφών TAp73 και p53 αυξάνονται και παραμένουν υψηλά, ώστε να εκδηλώσουν την αποπτωτική δράση τους [21].

Πρόσφατα καταδείχτηκε ότι απουσία του p53, ενεργοποιείται το p73 και αναλαμβάνει αποπτωτικό ρόλο ως απόκριση σε βλάβες του DNA που επάγονται π.χ. από γενοτοξικό στρες. Συγκεκριμένα, η παρατεταμένη αναστολή της έκφρασης του γονιδίου p53 σε κυτταρικές σειρές οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας έχει ως αποτέλεσμα το κύτταρο, υπό συνθήκες γενοτοξικού στρες, να προσαρμοστεί κατά τέτοιο τρόπο ώστε να ευνοηθεί η ενεργοποίηση του γονιδίου p73. Οι ισομορφές TAp73 που προκύπτουν ενεργοποιούν την κυτταρική απόπτωση που διαμεσολαβείται από Bax. Ωστόσο, η αποκατάσταση της έκφρασης του γονιδίου p53 έχει ως αποτέλεσμα η λειτουργική πρωτεΐνη p53 να αναλαμβάνει πλέον τον ρόλο του επαγωγέα της απόπτωσης που διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη Bax, ενώ η πρωτεΐνη TAp73 παύει να δρα αποπτωτικά. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει ότι σε συνθήκες απουσίας της πρωτεΐνης p53, το κυτταρικό μικροπεριβάλλον μεταβάλλεται έτσι ώστε τον αποπτωτικό ρόλο να αναλάβουν και να αναπληρώσουν οι συγγενικές της πρωτεΐνες, TAp73 [24].

Επιπλέον, η αποπτωτική δράση των ισομορφών TAp73 μπορεί να ενισχυθεί από την αλληλεπίδραση τους με άλλες πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, πρόσφατα

καταδείχτηκε ότι οι πρωτεΐνες TAp73 μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την πρωτεΐνη BCA3 (Breast Cancer-Associated gene 3) μέσω της περιοχής ολιγομερισμού τους και να αυξήσουν την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας σε απόπτωση που επάγεται από ακτινοβολία, μέσω ενεργοποίησης γονιδίων όπως η κασπάση 7, η κασπάση 9 και το *bax* [25].

1.4.1.2 ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ TAp73

Πληθώρα *in vitro* πειραμάτων κατέδειξε εμφανώς αποπτωτικό ρόλο για τις ισομορφές TAp73, σε αντίθεση με τις ισομορφές ΔNp73, οι οποίες διαπιστώθηκε ότι δρουν ως επικρατείς αρνητικές μορφές των TAp73. Η διαπίστωση αυτής της λειτουργικής διάκρισης των ισομορφών TAp73 από τις ΔNp73 οδήγησε σε αναθεώρηση και επανασχεδιασμό των *in vivo* πειραμάτων ογκογένεσης σε ποντίκια, αφού στις αρχικές μελέτες με ποντίκια $p73^{-/-}$, στοχευόταν η σύνθεση όλων, ανεξαιρέτως, των προϊόντων του γονιδίου $p73$ και όχι εκλεκτικά των αποπτωτικών.

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος των ισομορφών TAp73 *in vivo*, κατασκευάστηκαν ποντίκια $TAp73^{-/-}$, στα οποία οι ισομορφές ΔNp73 εκφράζονται σε κανονικά επίπεδα, αλλά η έκφραση των ισομορφών TAp73 έχει ανασταλεί. Τα ποντίκια αυτά ανέπτυξαν έναν ενδιάμεσο φαινότυπο μεταξύ των φαινοτύπων $p53^{-/-}$ και $p73^{-/-}$ αναφορικά με την επίπτωση των αυθόρμητων όγκων και των όγκων που επάγονται από καρκινογόνες ουσίες, τη στειρότητα, τη γήρανση και την υποκαμπική δυσγενεσία. Πέρα από τις νευροαναπτυξιακές ανωμαλίες, οι οποίες παρουσίαζαν ομοιότητα, αλλά όχι ταυτότητα, με εκείνες των ποντικίων $p73^{-/-}$, τα ποντίκια $TAp73^{-/-}$ εμφάνιζαν τάση για ανάπτυξη όγκων και ήταν ευαίσθητα σε καρκινογόνες ουσίες. Συγκεκριμένα, ο χρόνος ζωής των ποντικίων $TAp73^{-/-}$ ήταν αυξημένος σε σχέση με τα ποντίκια $p73^{-/-}$, αλλά μειωμένος σε σχέση με τα ποντίκια φυσικού τύπου. Το 30% των ποντικίων $TAp73^{+/-}$ και το 73% των ποντικίων $TAp73^{-/-}$ ανέπτυξαν αυθόρμητα κακοήθειες. Ο συχνότερος τύπος καρκίνου που ανέπτυξαν ήταν αδenoκαρκίνωμα των πνευμόνων, καθώς παρατηρήθηκε στο 32% όλων των ποντικίων $TAp73^{-/-}$ που αναλύθηκαν, ενώ αντιπροσώπευαν το 44% όλων των όγκων που λήφθηκαν από τα ποντίκια $TAp73^{-/-}$.

Στη συνέχεια, επάχθηκε καρκινογένεση σε ποντίκια $TAp73^{-/-}$ και $TAp73^{+/-}$ με ενδοπεριτοναϊκή ένεση της καρκινογόνου ουσίας DMBA. Το χρονικό διάστημα έως την ανάπτυξη όγκων στα ποντίκια $TAp73^{-/-}$ ήταν σημαντικά μικρότερο σε σύγκριση

με τον αντίστοιχο χρόνο για τα ποντίκια $TAp73^{+/-}$, αν και τα σημεία ανάπτυξης όγκων (κόλον, λεπτό έντερο, ήπαρ και στόμαχος) ήταν τα ίδια και για τις δύο ομάδες ζώων. Επιπλέον, παρουσία του αντιμιτωτικού παράγοντα νοκοδαζόλη, οι εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού (MEF, mouse embryonic fibroblasts) από ποντίκια $TAp73^{-/-}$ εμφάνισαν μη φυσιολογικές κυτταρικές διαιρέσεις σε σύγκριση με αντίστοιχους ινοβλάστες από ποντίκια φυσικού τύπου. Μετά από πολύωρη επεξεργασία των κυττάρων με νοκοδαζόλη, περισσότερα κύτταρα ινοβλαστών από ποντίκια $TAp73^{-/-}$ είχαν εισέλθει λανθασμένα στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και είχαν εμφανίσει πολυπλοειδίες και ανευπλοειδίες. Παρόμοια, ειδικά οι ινοβλάστες πνεύμονα από ποντίκια $TAp73^{-/-}$ παρουσίασαν γενωμική αστάθεια και απώλεια της ευπλοειδίας, γεγονός το οποίο πιθανόν ερμηνεύει την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα στα ποντίκια $TAp73^{-/-}$ σε σχέση με τα ποντίκια φυσικού τύπου. Τα παραπάνω πειράματα υποδηλώνουν ότι οι ισομορφές TAp73 παίζουν ρόλο στη διατήρηση της γενωμικής σταθερότητας, η απώλεια της οποίας οδηγεί σε μη φυσιολογικές διαιρέσεις και μετατροπή των κυττάρων σε καρκινικά [26].

1.4.1.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ TAp73

Όλες οι ισομορφές TAp73 είναι δυνητικά μεταγραφικά ενεργές, λόγω της παρουσίας της περιοχής TA. Ωστόσο, παρουσιάζουν διαφορεική μεταγραφική ενεργότητα ως προς την ενεργοποίηση τυπικών στόχων του γονιδίου p53. Πράγματι, οι De Laurenzi V *et al* κατέδειξαν ότι η μεταγραφική ενεργότητα της ισομορφής TAp73β ως προς την ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου $p21^{Waf1/Cip1}$, ενός τυπικού αποπτωτικού στόχου του p53, είναι παρόμοια με εκείνη της πρωτεΐνης p53. Από την άλλη πλευρά, οι ισομορφές TAp73α και TAp73δ παρουσίασαν χαμηλότερη μεταγραφική ενεργότητα σε σχέση με την TAp73β, ενώ η ισομορφή TAp73γ παρουσίασε τη χαμηλότερη μεταγραφική ενεργότητα από όλες τις προαναφερθείσες ισομορφές [27]. Παρόμοια, οι Ueda Y *et al* κατέδειξαν ότι η ισομορφή TAp73β παρουσιάζει υψηλή μεταγραφική ενεργότητα ως προς την ενεργοποίηση ενός υποκινητή που περιέχει τη συναινετική αλληλουχία δέσμευσης p53 (p53BCS, p53-binding consensus sequence), ενεργότητα η οποία ήταν συγκρίσιμη με εκείνη της πρωτεΐνης p53, σε κύτταρα χωρίς ενδογενή p53. Αντίθετα, οι ενεργότητες των ισομορφών TAp73α, TAp73γ και TAp73ε ήταν σημαντικά χαμηλότερες. Αξίζει να

σημειωθεί ότι οι παραπάνω ισομορφές παρουσίασαν επίσης διαφορεική ικανότητα αναστολής της ενεργοποίησης του υποκινητή p53BCS από την ενδογενή πρωτεΐνη p53 κατά τη διαμόλυνση κυττάρων που διαθέτουν λειτουργικό γονίδιο p53 φυσικού τύπου. Σε αυτή την περίπτωση, η ισομορφή με τη χαμηλότερη μεταγραφική ενεργότητα, δηλαδή η TAp73ε είχε την εντονότερη ανασταλτική επίδραση στη δραστηριότητα της ενδογενούς πρωτεΐνης p53, ενώ η ισομορφή με την υψηλότερη μεταγραφική ενεργότητα, δηλαδή η TAp73β, είχε την πιο ήπια επίδραση [28].

Εξάλλου, σε δοκιμές λουσιφεράσης που περιλάμβαναν συνδιαμόλυνση κυττάρων H1299 με το πλασμίδιο έκφρασης TAp73 και με κατασκευάσμα (construct) γονιδίου αναφοράς λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *hTERT* καταδείχτηκε ότι η υπερέκφραση των ισομορφών TAp73 προκάλεσε σαφή αρνητική ρύθμιση την ενεργότητα του υποκινητή του *hTERT*. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι διαφορετικές ισομορφές TAp73 εμφάνισαν διαφορετική ανασταλτική επίδραση. Οι ισομορφές TAp73β και TAp73δ παρουσίασαν την ισχυρότερη ανασταλτική επίδραση, ενώ οι ισομορφές TAp73γ και TAp73ε την ασθενέστερη [29, 30]. Έχει προταθεί ότι οι ισομορφές TAp73 επηρεάζουν έμμεσα την έκφραση του γονιδίου *hTERT*, σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα με τον ιδιοσυστασιακό μεταγραφικό παράγοντα Sp1, με αποτέλεσμα να αποτρέπουν την πρόσδεσή του σε ειδικές θέσεις δέσμευσης στον υποκινητή του γονιδίου *hTERT* και, κατά συνέπεια, την μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου *hTERT* που διαμεσολαβείται από Sp1 [29]. Επομένως, η διαφορετική ανασταλτική επίδραση της κάθε ισομορφής TAp73 στην ενεργοποίηση του γονιδίου αντανακλά πιθανόν τη διαφορετική συγγένεια πρόσδεσης για τον παράγοντα Sp1.

1.4.1.4 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ TAp73 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Παρότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου *p73* στους όγκους είναι σπάνιες, η υπερέκφραση των πρωτεϊνικών ισομορφών του είναι πολύ συχνή. Οι ισομορφές TAp73 έχουν βρεθεί υπερεκφρασμένες σε ένα ευρύ φάσμα καρκινικών τύπων, όπως το μυελοβλάστωμα [31], το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [32], το μελάνωμα [33], η οξεία και χρόνια μυελοειδής λευχαιμία [34], ο καρκίνος των ωοθηκών [35] και ο καρκίνος του πνεύμονα [36, 37]. Μάλιστα, σε αρκετούς από αυτούς τους καρκινικούς τύπους έχουν βρεθεί υπερεκφρασμένες τόσο οι ισομορφές TAp73 όσο και οι ισομορφές ΔNp73 [38].

Έχει βρεθεί ότι στους περισσότερους όγκους οι διάφορες καρβοξυτελικές παραλλαγές των ισομορφών TAp73 που υπερεκφράζονται δεν ακολουθούν κάποιο συγκεκριμένο, ομοιογενές πρότυπο. Για παράδειγμα, το πρότυπο της έκφρασης των ισομορφών TAp73 στο νευροβλάστωμα είναι πολύ σύνθετο, καθώς διαφορετικοί όγκοι εκφράζουν διαφορετικές καρβοξυτελικές παραλλαγές και δεν υπάρχει καμία προφανής συσχέτιση των παραλλαγών αυτών με τα συνήθη κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά. Το ετερογενές πρότυπο της έκφρασης των TAp73 ισομορφών στο νευροβλάστωμα ενισχύεται από το γεγονός ότι σε ιστολογικά διακριτά σημεία του ίδιου όγκου οι καρβοξυτελικές παραλλαγές ματίσματος εκφράζονται με ποικίλους τρόπους, π.χ. στην περιοχή του όγκου που αντιστοιχεί σε διαφοροποιούμενο νευροβλάστωμα εκφράζονται μόνο οι παραλλαγές p73α και p73β, ενώ στην περιοχή του ίδιου όγκου που αντιστοιχεί σε διαφοροποιημένο νευροβλάστωμα εκφράζονται οι παραλλαγές p73α, p73β, p73γ και p73δ [39, 40]. Στη μυελοειδή λευχαιμία, το πρότυπο υπερέκφρασης των καρβοξυτελικών παραλλαγών είναι, επίσης, σύνθετο, αν και παρατηρείται μια τάση των λευχαιμικών βλαστών να υπερεκφράζουν τις ισομορφές TAp73 «μικρότερου μήκους», δηλαδή τις γ, δ, ε και ζ. Μάλιστα, η ισομορφή TAp73ε εκφράζεται μόνο σε λευχαιμικά κύτταρα, ενώ απουσιάζει εντελώς από τα φυσιολογικά μυελοειδή κύτταρα (κοκκιοκύτταρα και λεμφοκύτταρα) [41]. Εξίσου ετερογενές παρουσιάζεται το πρότυπο υπερέκφρασης των διαφόρων ισομορφών TAp73 και στους όγκους των ωοθηκών. Συγκεκριμένα, καταδείχτηκε ότι η ισομορφή TAp73α εκφράζεται σε όλα τα αδενοκαρκινώματα ωοθηκών που εξετάστηκαν και, σε μικρότερο ποσοστό, στους καλοήθεις όγκους των ωοθηκών (αδενώματα). Ωστόσο, ενώ στους κακοήθεις όγκους εκφράζονταν συχνά τουλάχιστον τρεις ισομορφές TAp73, στους καλοήθεις όγκους των ωοθηκών σπάνια εκφράζονταν περισσότερες από δύο ισομορφές TAp73 [34]. Επίσης, σε φυσιολογικό ιστό του τραχήλου της μήτρας η ισομορφή TAp73α εκφράζεται σε μη πολλαπλασιαζόμενο επιθήλιο, ενώ μικρότερου μήκους ισομορφές TAp73 εκφράζονται σε πολλαπλασιαζόμενο επιθήλιο. Αντίθετα, σε καρκινικό ιστό του τραχήλου της μήτρας, η ισομορφή TAp73α παύει να εκφράζεται, ενώ οι μικρότερου μήκους ισομορφές TAp73 εξακολουθούν να εκφράζονται σε επίπεδα παρόμοια ή και αυξημένα σε σχέση με εκείνα του φυσιολογικού επιθηλίου [42].

Συμπερασματικά, παρότι δεν μπορεί να προκύψει ακόμα κάποιο σαφές πρότυπο σχετικά με την έκφραση της κάθε καρβοξυτελικής ισομορφής TAp73, φαίνεται ότι οι ισομορφές TAp73 μικρότερου μήκους έχουν την τάση να

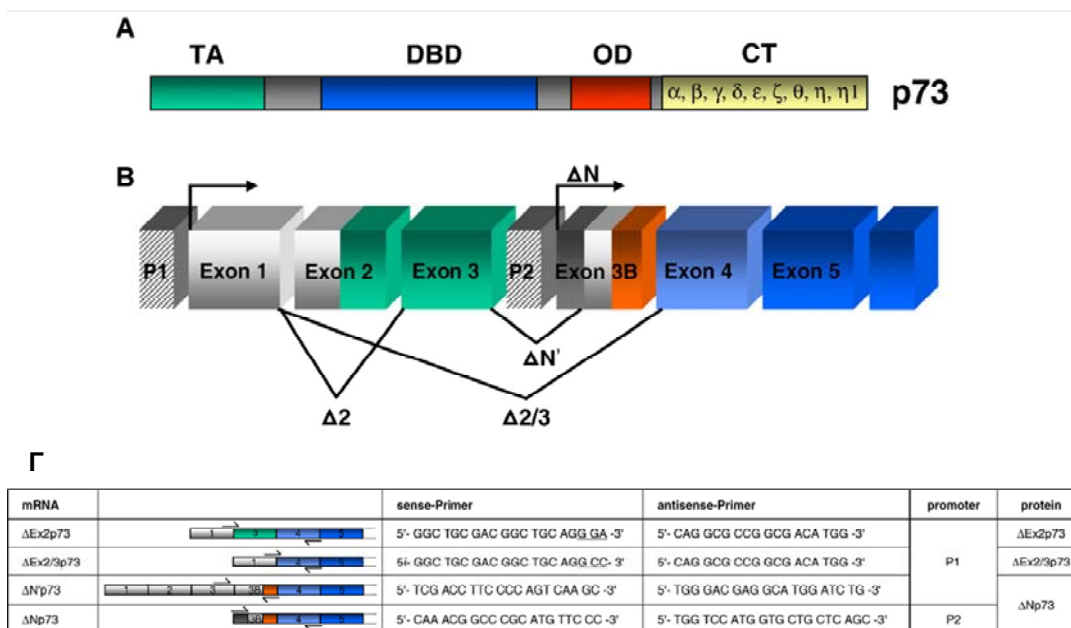
υπερεκφράζονται σε ορισμένους τύπους καρκίνου, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι η αποπτωτική δράση της πρωτεΐνης TAp73 ενδέχεται, εκτός από την περιοχή TA, να σχετίζεται με συγκεκριμένες λειτουργικές περιοχές του καρβοξυτελικού άκρου της, οι οποίες πιθανόν να μην περιλαμβάνονται σε όλες τις παραλλαγές ματίσματος.

1.4.2 ΟΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ DNp73

1.4.2.1 ΘΕΜΑΤΑ ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ

Η δεύτερη μεγάλη τάξη των ισομορφών του γονιδίου *p73* περιλαμβάνει ισομορφές στις οποίες έχει περικοπεί το μεγαλύτερο τμήμα της περιοχής TA ή ολόκληρη η περιοχή TA και, επομένως, τυπικά δεν έχουν δυνατότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης γονιδίων. Οι ισομορφές αυτές προκύπτουν με δύο τρόπους: είτε με απευθείας σύνθεση από τον εσωτερικό υποκινητή P2, είτε με εναλλακτικό μάτισμα του μορίου mRNA που συντίθεται από τον εξωτερικό υποκινητή P1. Οι ισομορφές που συντίθενται από τον υποκινητή P2 ονομάζονται ΔNp73, ενώ οι ισομορφές που προκύπτουν από τον υποκινητή P1 με εναλλακτικό μάτισμα (δηλαδή οι ισομορφές p73Dex2, p73Dex2/3 και ΔN'p73) σε πολλές δημοσιεύσεις ονομάζονται, στο σύνολό τους ΔTAp73, λόγω της απουσίας της περιοχής TA (Εικόνα 1.8). Το σύνολο των ισομορφών ΔTAp73 και ΔNp73 πρόσφατα ορίστηκαν από τους Buhlmann S *et al* ως ΔNp73, λόγω της κοινής δράσης τους ως επικρατείς αρνητικοί αναστολείς (DN: Dominant Negative) των p53 και TAp73 [43]. Ωστόσο, σε άλλες ερευνητικές εργασίες έχει χρησιμοποιηθεί ο όρος ΔTAp73 για να χαρακτηριστούν όλες οι ισομορφές που στερούνται τμήματος ή ολόκληρης της περιοχής TA, είτε αυτές προέρχονται από τον υποκινητή P1, είτε από τον υποκινητή P2 [44]. Επίσης, άλλες ερευνητικές ομάδες χρησιμοποιούν τον όρο ΔNp73 για να χαρακτηρίσουν το σύνολο των ισομορφών χωρίς λειτουργική περιοχή TA, ανεξάρτητα από τον υποκινητή από τον οποίο προέρχονται [45]. Επειδή οι ισομορφές που προκύπτουν από τον υποκινητή P2 εμφανίζουν σαφείς διαφοροποιήσεις στο προφίλ έκφρασης και σε ορισμένες ειδικές λειτουργίες σε σύγκριση με εκείνες που προκύπτουν από τον υποκινητή P1, στην παρούσα διατριβή ακολουθείται η ονοματολογία που έχουν χρησιμοποιήσει οι Buhlmann S *et al* για τις ισομορφές αυτές.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Εικόνα 1.8. Οργάνωση του γονιδίου TP73 και οι ισομορφές DNp73. (A) Δομή περιοχών του γονιδίου p73. TA: περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (πράσινη), DBD: περιοχή δέσμευσης στο DNA (μπλε) OD: περιοχή ολιγομερισμού (κόκκινη), CT: καρβοξυτελική περιοχή (κίτρινη). (B) Πρότυπο των ισομορφών με περικομμένο αμινοτελικό άκρο. Τα εξώνια παρουσιάζονται ως πλαίσια και είναι χρωματισμένα ανάλογα με την περιοχή που κωδικοποιούν. Οι θέσεις έναρξης της μεταγραφής υποδεικνύονται με βέλη. Οι περιοχές των δύο υποκινητών υποδεικνύονται από τα πλαίσια με τις γραμμές. Οι παραλλαγές που ρυθμίζονται από τον υποκινητή P1 επισημαίνονται ως Δ2 (ΔEx2p73), Δ2/3 (ΔEx2/3p73) και ΔN' (ΔN'p73). Η μοναδική 5' μη μεταφρασμένη περιοχή του μεταγράφου ΔNp73, η οποία δημιουργείται με εναλλακτική χρήση του υποκινητή P2, παρουσιάζεται με σκούρο γκρι χρώμα, ενώ η κωδική αλληλουχία που προκύπτει από το εξώνιο 3B (ή 3') παρουσιάζεται με πορτοκαλί χρώμα. (Γ) Μετάγραφα αμινοτελικών παραλλαγών. Παρουσιάζεται η δομή των εξωνίων του mRNA για κάθε ισομορφή DNp73 (με τη χρωματική κωδικοποίηση που περιγράφεται στην Εικόνα 1.8B). Οι θέσεις των εκκινητών που χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση της κάθε ισομορφής παρουσιάζονται με βέλη. Στην τρίτη και την τέταρτη στήλη του πίνακα φαίνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών. Στην πέμπτη στήλη του πίνακα παρουσιάζεται ο υποκινητής από τον οποίο μεταγράφεται η κάθε ισομορφή DNp73, ενώ στην έκτη στήλη αναφέρονται οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται [43]. Συνομογραφίες: TA: περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης, DBD: περιοχή δέσμευσης στο DNA, OD: περιοχή ολιγομερισμού, CT: καρβοξυτελική περιοχή

1.4.2.2 Ο ΑΝΤΙΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ DNp73

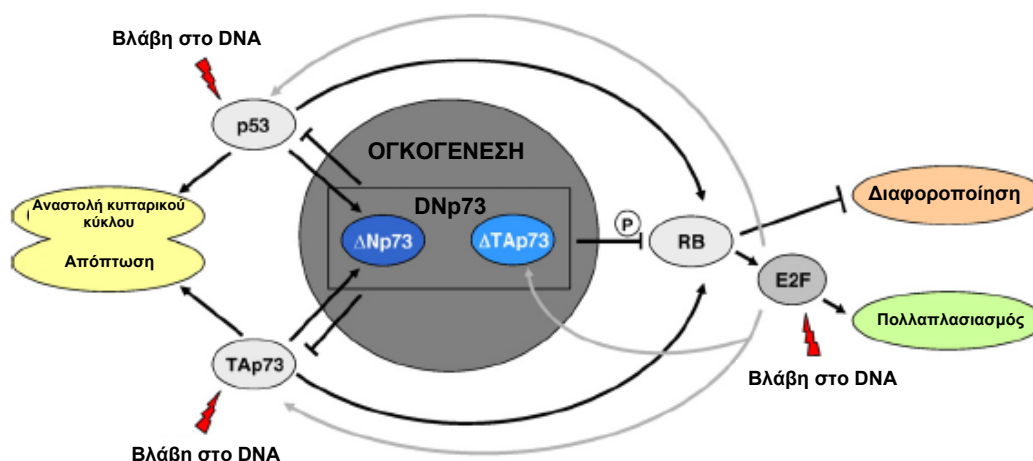
Λόγω της έλλειψης της αμινοτελικής περιοχής μεταγραφικής ενεργοποίησης, οι ισομορφές DNp73 δεσμεύονται στο DNA, χωρίς να μπορούν να ενεργοποιήσουν τα γονίδια-στόχους, με αποτέλεσμα να δρουν ως επικρατείς αρνητικοί αναστολείς των μεταγραφικών παραγόντων p53 και TAp73. Όπως περιγράφεται αναλυτικά στην

ενότητα «Αλληλεπιδράσεις μεταξύ TAp73 και DNp73 και η αναλογία DN/TA στον καρκίνο», οι ισομορφές DNp73 προκαλούν παρεμπόδιση στην ογκοκατασταλτική δράση των παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων μέσω ανταγωνισμού για τις ειδικές θέσεις δέσμευσης p53/TAp73 στο DNA ή/και μέσω σχηματισμού μεταγραφικά μη λειτουργικών ετεροδιμερών DNp73/TAp73. Κατά συνέπεια, επειδή ανταγωνίζονται τις ογκοκατασταλτικές δράσεις των p53 ή/και TAp73, οι ισομορφές DNp73 διαδραματίζουν ρόλο αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών. Έχει καταδειχτεί ότι η εκτοπική έκφραση αυτών των παραλλαγών σε ποντίκια προκαλεί αποκλεισμό της απόπτωσης που διαμεσολαβείται από τον παράγοντα p53 και προστατεύει τους συμπαθητικούς νευρώνες και τους νευρώνες του φλοιού του εγκεφάλου από κυτταρικό θάνατο που επάγεται από την έλλειψη νευρικού αυξητικού παράγοντα (NGF, nerve growth factor). Συγκεκριμένα, η ισομορφή ΔNp73 διαμεσολάβησε αυτή την αποπτωτική επίδραση μέσω παρεμπόδισης της θετικής ρύθμισης των μεταγραφικών στόχων του γονιδίου *p53*, *p21^{WAF1}* και *Araf-1*. Με παρόμοιο τρόπο, οι περικομμένες ισομορφές DNp73 αναστέλλουν, επίσης, την απόπτωση που διαμεσολαβείται από p53 και TAp73 σε καρκινικά κύτταρα. Αντιστρόφως, η ειδική αρνητική ρύθμιση του mRNA του ΔNp73, αλλά όχι του TAp73, από αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια προκάλεσε αύξηση της πρωτεΐνης PUMA, η οποία αποτελεί άμεσο μεταγραφικό στόχο των p53 και TAp73, καθώς και αλλοστερική ενεργοποίηση της πρωτεΐνης BAX, με αποτέλεσμα να επάγεται απόπτωση. Επομένως, η ανταγωνιστική δράση των μορφών p73 με περικομμένο αμινοτελικό άκρο έναντι των παραγόντων p53 ή TAp73 μπορεί να παρεμποδιστεί μέσω μείωσης της δεξαμενής του ενδογενούς DNp73, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αποκατάσταση της προαποπτωτικής λειτουργίας αυτών των πρωτεϊνών. Πρόσφατα καταδείχτηκε ότι η ισομορφή ΔNp73 ανταγωνίζεται την κατασταλτική επίδραση των προαποπτωτικών ισομορφών TAp73 στην έκφραση της ανθρώπινης αντίστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης (hTERT, human telomerase reverse transcriptase). [46]. Συγκεκριμένα, οι ισομορφές TAp73 παρεμποδίζουν τη δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 στις αντίστοιχες θέσεις δέσμευσης του υποκινητή του γονιδίου *hTERT*, πιθανόν μέσω δημιουργίας συμπλέγματος Sp1-TAp73, και τη συνακόλουθη ενεργοποίηση του γονιδίου [29]. Ωστόσο οι ισομορφές ΔNp73 αναστέλλουν αυτή την αλληλεπίδραση, αποκαθιστώντας την έκφραση του γονιδίου *hTERT*.

Εκτός από αυτή την αντιαποπτωτική επίδραση που εξαρτάται από τον παράγοντα p53, έχει αναφερθεί ότι η ισομορφή ΔNp73α επηρεάζει επίσης την

έκφραση διαφόρων γονιδίων με τρόπο μη εξαρτώμενο από τον παράγοντα p53, υποδηλώνοντας ότι διαδραματίζει έναν ακόμα ρόλο, ξεχωριστό από εκείνον ως επικρατούς αρνητικού αναστολέα του p53. Πράγματι, βρέθηκε ότι η ισομορφή ΔNp73α, αλλά όχι η ισομορφή ΔNp73β, δρα ως αντιαποπτωτικός μεταγραφικός παράγοντας λόγω της ικανότητάς του να επάγει γονίδια που ανταποκρίνονται στον παράγοντα θερμικού σοκ (HSF1, heat shock factor 1), όπως η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 (Hsp70, heat shock protein 70) σε διάφορες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ή ακόμα μέσω ενεργοποίησης της έκφρασης των γονιδίων που ανταποκρίνονται σε στον πυρηνικό παράγοντα κB (NFκB, nuclear factor κB). Επιπρόσθετα, η ισομορφή ΔNp73 επάγει την επιβίωση των νευρώνων ανεξάρτητα από την αναστολή των προαποπτωτικών δράσεων του παράγοντα p53, μέσω άμεσης δέσμευσης στην κινάση του αμινοτελικού άκρου του c-Jun (JNK, c-Jun N-terminal kinase), με αποτέλεσμα να προκαλεί μειωμένη έκφραση του Bim EL, ενός επαγωγέα της απόπτωσης που διαμεσολαβείται από τα μιτοχόνδρια [43].

Ένας άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου οι παραλλαγές ΔNp73 εκδηλώνουν αντιαποπτωτική δράση, ανεξάρτητα από τη δράση τους ως επικρατείς αρνητικοί αναστολείς, είναι μέσω παρεμπόδισης της κατασταλτικής δράσης της πρωτεΐνης RB. Συγκεκριμένα, έχει καταδειχτεί ότι σε ανθρώπινους διπλοειδείς ινοβλάστες υπό συνθήκες στέρησης ορού, οι ισομορφές ΔNp73 αυξάνουν τη φωσφορυλίωση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης RB, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίησή της και, συνακόλουθα, την αύξηση της δραστηριότητας του μεταγραφικού παράγοντα E2F1, που επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο μηχανισμός αυτός δεν εξαρτάται από την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης RB με τον παράγοντα p53 [47]. Παρόμοια, οι Beitzinger *et al* βρήκαν ότι η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *hTERT* από την ισομορφή ΔNp73 πραγματοποιείται μέσω παρεμπόδισης της καταστολής του υποκινητή του γονιδίου αυτού που διαμεσολαβείται από τον άξονα E2F-RB. Κατά συνέπεια, απενεργοποιώντας τις δύο κύριες ογκοκατασταλτικές οδούς, δηλαδή εκείνη του p53 και εκείνη του RB, οι ισομορφές ΔNp73 δρουν ως λειτουργικά ανάλογα άλλων ογκοπρωτεϊνών [43]. Η συσχέτιση των πρωτεϊνών ΔNp73 με τις ογκοκατασταλτικές οδούς του p53 και του RB απεικονίζεται στην Εικόνα 1.9.



Εικόνα 1.9 Πιθανός μηχανισμός ογκογένεσης που διαμεσολαβείται από DNp73. Στα πλαίσια μιας σύνθετης αλληλεπίδρασης με άλλα μέλη της οικογένειας p53, οι ισομορφές DNp73 προκαλεί παρεμπόδιση στις οδούς κυτταρικού θανάτου p53/TAp73 και στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης RB, η οποία επάγει αποκρίσεις σε αντικαρκινικούς παράγοντες και ελέγχει την ανάπτυξη του όγκο. Η ισομορφή ΔNp73 ενεργοποιείται απευθείας από τις πρωτεΐνες p53 και TAp73, ενώ οι ισομορφές TAp73 και ΔTAp73 ρυθμίζονται θετικά από τον μεταγραφικό παράγοντα E2F (βλ. παρακάτω) (τροποποίηση από Buhlmann S 2008 [43]).

1.4.2.3 Η ΟΓΚΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ DNp73

Η υπόθεση ότι οι ισομορφές DNp73 παρουσιάζουν δυνητική ογκογόνο δράση σε κύτταρα καταδείχτηκε σαφώς από *in vitro* και *in vivo* αναλύσεις μετασχηματισμού. Η εκτοπική έκφραση της ισομορφής ΔNp73 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της κατασταλτικής δράσης των πρωτεϊνών p53 και TAp73 στο σχηματισμό αποικιών, γεγονός το οποίο υποδηλώνει την πιθανή εμπλοκή της ισομορφής ΔNp73 στην ογκογένεση μέσω αναστολής της ογκοκατασταλτικής δράσης τους. Ακόμα, έχει καταδειχτεί ότι η ισομορφή ΔEx2/3p73 προκαλεί κακοήγη μετασχηματισμό των ινοβλαστών NIH3T3. Η ένεση κυττάρων σταθερά διαμολυσμένων με ΔEx2/3p73 σε αθυμικά ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ταχέως αυξανόμενων όγκων σαρκωματώδους μορφολογίας, η οποία ήταν συγκρίσιμη με εκείνη που προκλήθηκε από κύτταρα διαμολυσμένα με το ογκογονίδιο *H-Ras*. Στη μελέτη των Petrenko *et al*, η ισομορφή ΔNp73 υποβοήθησε την αθανατοποίηση των πρωτογενών εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικού (MEF, mouse embryo fibroblasts), προκάλεσε τη διάσωσή τους από τη γήρανση η οποία

επάγεται από το *Ras* και λειτούργησε συνεργιστικά με τις ογκοπρωτεΐνες cMyc και E1A στην επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και το σχηματισμό αποικιών. Επίσης, σε πειράματα συν-διαμόλυνσης των κυττάρων MEF με ΔNr73 και Ras, τα οποία στη συνέχεια ενέθηκαν σε αθυμικά ποντίκια, το ΔNr73 αλληλεπίδρασε με την ογκογόνο πρωτεΐνη Ras, επάγοντας τον κακοήγη μετασχηματισμό των MEF και την επακόλουθη δημιουργία κακοήθων ινοσαρκωμάτων. Εξάλλου, οι ισομορφές ΔNr73 διευκολύνουν διάφορα ογκογονίδια με τα οποία συνεργάζονται να μετασχηματίζουν τους μυοβλάστες σε κακοήγη κύτταρα σε αθυμικά ποντίκια. Επίσης, έχει καταδειχτεί ότι τα διαγονιδιακά ποντίκια ΔEx2/3p73, στα οποία ο διαγονιδιακός φαινότυπος έχει περιοριστεί στο ήπαρ, εμφανίζουν αυξημένο πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων με πολυεστιακές προνεοπλασματικές βλάβες (αδενώματα από ηπατικά κύτταρα) και ηπατικό καρκίνωμα. Ο μετασχηματισμός των ηπατοκυττάρων και η επιδείνωση των όγκων του ήπατος η οποία ανιχνεύτηκε στα διαγονιδιακά ποντίκια οφειλόταν κυρίως στη συσσώρευση υπερφωσφορυλιωμένης, ανενεργής πρωτεΐνης RB και, συνακόλουθα, στην αυξημένη δραστηριότητα του παράγοντα E2F. Άλλες μελέτες καταδεικνύουν επίσης αντιαποπτωτικό ρόλο της ισομορφής ΔEx2/3p73 με μηχανισμούς που δεν έχουν διερευνηθεί ακόμα [43, 48].

Η ογκογόνος δράση των ισομορφών ΔNr73 καταδεικνύεται, επίσης, σε μια πρόσφατη *in vivo* μελέτη σε ποντίκια στα οποία είχε ανασταλεί γενετικά η παραγωγή των ισομορφών ΔNr73 (ποντίκια ΔNr73^{-/-}), ενώ τα επίπεδα σύνθεσης των ισομορφών TAp73 ήταν φυσιολογικά. Συγκεκριμένα, στη μελέτη αυτή δείχτηκε ότι τα κύτταρα MEF ΔNr73^{-/-} παρουσίασαν αυξημένη έκφραση των γονιδίων-στόχων της πρωτεΐνης p53, όπως τα *p21*, *Mdm2* και *Puma*, ενώ εμφάνισαν αυξημένη ευαισθησία σε ένα ευρύ φάσμα παραγόντων που επάγουν απόπτωση, συμπεριλαμβανομένης της σισπλατίνης, της δοξορουβικίνης, της ετοποσίδης και της ακτινοβολίας γάμμα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η έλλειψη των ισομορφών ΔNr73 ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στις επιδράσεις των βλαβών του DNA. Επιπρόσθετα, κύτταρα MEF με γονότυπο ΔNr73^{-/-} τα οποία μετασχηματίστηκαν με E1A/Ras^{V12} και, κατόπιν, ενέθηκαν σε αθυμικά ποντίκια σχημάτισαν όγκους σημαντικά μικρότερους και με μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με τα μετασχηματισμένα με E1A/Ras^{V12} κύτταρα MEF φυσικού τύπου ως προς τις ισομορφές ΔNr73. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η απώλεια των ισομορφών ΔNr73 μειώνει την ικανότητα των μετασχηματισμένων κυττάρων να δώσουν γένεση σε νέους όγκους. Όταν αναλύθηκε η απόκριση σε βλάβες στο DNA (DDR, DNA

damage response) στα κύτταρα ΔNp73^{-/-}, διαπιστώθηκε ένας εντελώς καινούργιος ρόλος για τις ισομορφές ΔNp73 στην αναστολή του μοριακού σήματος που προέρχεται από μια θραύση του DNA και ενεργοποιεί την οδό DDR. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι οι ισομορφές ΔNp73 μετατοπίζονται αμέσως στο σημείο της βλάβης στο DNA, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την πρωτεΐνη-αισθητήρα βλαβών στο DNA, την 53BP1, και να αναστείλουν την ενεργοποίηση της κινάσης ATM και της επακόλουθης φωσφορυλίωσης του παράγοντα p53, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο παρεμπόδιση στην οδό του p53. Αυτό το εύρημα αποτελεί μια πιθανή ερμηνεία γιατί οι ανθρώπινοι όγκοι με αυξημένη έκφραση ΔNp73 εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες που στοχεύουν στην ενεργοποίηση της οδού του p53 [49].

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθεί ότι η ισομορφή ΔNp73β, ανεξάρτητα από τη βασική προαποπτωτική επίδραση που περιγράφηκε για όλες τις ισομορφές ΔNp73, μπορεί, υπό ορισμένες συνθήκες *in vitro*, να επάγει αναστολή του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση [50, 51]. Επίσης, η ισομορφή ΔNp73β μπορεί να ενεργοποιήσει ορισμένα αποπτωτικά γονίδια (π.χ. *p21*, *14-3-3σ*, *GADD45* και *MDM2*), αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με την ισομορφή TAp73β [50]. Η ικανότητα της ισομορφής ΔNp73β να ενεργοποιεί γονίδια αποδίδεται σε μια δεύτερη περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης στο αμινοτελικό άκρο των ΔN ισομορφών, η οποία περιλαμβάνει 13 μοναδικά αμινοξικά κατάλοιπα και τα αμινοτελικά μοτίβα RxxP. Ωστόσο, επειδή η ισομορφή ΔNp73α δεν καταστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη, ο αποπτωτικός φαινότυπος ενδέχεται να οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην καρβοξυτελική περιοχή [50]. Τέλος, η ισομορφή ΔNp73β (όπως και η ισομορφή TAp73β) μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφική έκφραση της κασπάσης-2s, μιας πρωτεΐνης η οποία αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο, μέσω πρόσδεσης σε μια αλληλουχία 18 bp, πλούσια σε GC, στον υποκινητή του γονιδίου της κασπάσης-2s [52].

1.4.2.4 Η ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΔNp73 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Στις πιο πρόσφατες μελέτες έκφρασης των ισομορφών του γονιδίου *p73* σε καρκίνους του ανθρώπου, χρησιμοποιούνται τεχνικές PCR πραγματικού χρόνου με εκκινητές ειδικούς για την κάθε ισομορφή, προκειμένου να γίνει διάκριση μεταξύ των

διαφόρων ισομορφών ΔNp73 και των ισομορφών TAp73. Αυτό οφείλεται κυρίως στην έλλειψη αντισωμάτων υψηλής συγγένειας που είναι ειδικά για κάθε ισομορφή ΔNp73. Στην καλύτερη περίπτωση, στο εμπόριο διατίθενται αντισώματα μόνο έναντι της ισομορφής ΔNp73. Αυτές οι μελέτες παρέχουν ολοένα αυξανόμενες ενδείξεις ότι οι ισομορφές p73 με περικομμένο αμινοτελικό άκρο υπερεκφράζονται στον καρκίνο, διαδραματίζοντας πιθανό ρόλο ογκογονιδίου στους πρωτοπαθείς καρκίνους του ανθρώπου. Συχνά υφίστανται θετική ρύθμιση σε πολλούς καρκίνους του ανθρώπου, αλλά όχι σε φυσιολογικούς ιστούς. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι όγκοι του παχέος εντέρου (κόλον), των πνευμόνων, του θυρεοειδούς, του μαστού, των ωοθηκών, του ενδομητρίου, του τραχήλου της μήτρας, του αιδοίου, του κόλπου, του προστάτη, καθώς και το μελάνωμα, το νευροβλάστωμα, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία εκ B-κυττάρων και ένα υψηλό ποσοστό ραβδομυοσαρκωμάτων. Για παράδειγμα, σε μια ημιποσοτική μελέτη RT-PCR σε πρωτοπαθείς όγκους, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του μαστού και της γυναικείας γεννητικής οδού, το 73% των όγκων κατέδειξε θετική ρύθμιση των ισομορφών ΔNp73 σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Σε καρκίνους του μαστού παρατηρήθηκε υπερέκφραση της ισομορφής ΔNp73 σε ποσοστό 31% από 52 περιπτώσεις που αναλύθηκαν. Σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, η επίπτωση της θετικής έκφρασης των ισομορφών ΔNp73 σε όγκους ήταν 58%. Η μονοπαραγοντική και η πολυπαραγοντική ανάλυση κατέδειξαν την έκφραση των ισομορφών ΔNp73 ως σημαντικό ανεξάρτητο παράγοντα για την πρόβλεψη κακής πρόγνωσης καρκίνου του πνεύμονα. Παρόμοια, οι Casciano *et al* ανέφεραν ότι η έκφραση των ισομορφών ΔNp73 σε ασθενείς με νευροβλάστωμα σχετίζεται έντονα με μειωμένη επιβίωση και διαδραματίζει ρόλο στην πρόβλεψη κακής έκβασης ανεξάρτητα από την ηλικία, τη θέση του πρωτοπαθούς όγκου, το στάδιο και την ενίσχυση του γονιδίου *MYCN*. Μια πρόσφατη μελέτη σε δείγματα προστάτη κατέδειξε ότι η έκφραση των ισομορφών ΔNp73 σχετιζόταν έντονα με τη βαθμολογία Gleason, υποδηλώνοντας έναν πιθανό ρόλο των μεταγράφων ΔNp73 στην εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη. Επίσης, σε μια κοόρτη (cohort) 117 ασθενών με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, η υπερέκφραση της ισομορφής ΔNp73 αποτέλεσε πιθανό προγνωστικό δείκτη του κινδύνου υποτροπής της νόσου, καθώς τα επίπεδα της ισομορφής ΔNp73 ήταν σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με υποτροπή της νόσου (70,8%). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η θετική ρύθμιση των ισομορφών σε καρκίνους του τραχήλου της μήτρας ανιχνεύτηκε κυρίως σε περιπτώσεις με ανθεκτικότητα στην ακτινοθεραπεία,

ενώ στην πλειονότητα των περιπτώσεων με ευαισθησία στην ακτινοβολία ανιχνεύθηκε αυξημένη έκφραση των ισομορφών TAp73 [43].

Σε πολλές περιπτώσεις καρκίνων παρατηρείται ταυτόχρονη υπερέκφραση τόσο των ισομορφών ΔNp73 όσο και των ισομορφών TAp73, όπως π.χ. στο 85% (σε σύνολο 51 περιστατικών) των ασθενών με λεμφοκυτταρική λευχαιμία εκ B-κυττάρων. Επιπρόσθετα, ισομορφές TAp73a καθώς και ΔNp73a ανιχνεύθηκαν σε επίπεδο RNA και πρωτεΐνης στην πλειονότητα των κυτταρικών σειρών από καρκίνο του θυρεοειδούς, διαφορετικών ιστοτύπων, καθώς και σε καρκινώματα θυρεοειδούς του ανθρώπου, αλλά όχι σε φυσιολογικούς ιστούς του θυρεοειδούς αδένα. Εξάλλου, η ποσοτικοποίηση των ισομορφών TAp73 και ΔNp73 με RT-PCR σε 113 ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου (κόλον) και σε 60 ασθενείς με καρκίνο του μαστού υπέδειξε συνυπερέκφραση των ισομορφών αυτών στους καρκινικούς ιστούς. Παρόμοια, σε 25 περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου (κόλον) και σε 14 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού που αναλύθηκαν με ανοσοϊστοχημεία παρατηρήθηκε έκφραση πρωτεϊνών TAp73 και ΔNp73 στο 19% και 33% των περιπτώσεων του παχέος εντέρου και στο 21% και 30% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού αντίστοιχα [43].

Φαίνεται ότι οι ισομορφές ΔNp73 συνδέονται με πιο προχωρημένα στάδια του καρκίνου, καθώς έχουν παρατηρηθεί στατιστικές συσχετίσεις μεταξύ της θετικής ρύθμισης των ισομορφών ΔNp73 και των χαρακτηριστικών κακής πρόγνωσης, όπως μετάσταση στους λεμφαδένες και διείσδυση στα αγγεία σε καρκίνους του ανθρώπου. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση των ισομορφών ΔEx2/3p73 και ΔNp73 έχει συσχετισθεί με τα προχωρημένα παθολογικά στάδια των όγκων. Σε ορισμένους τύπους καρκίνου, μάλιστα, η υπερέκφραση των ισομορφών ΔNp73 από τον υποκινητή P2 παρατηρείται σε καλοήθεις καταστάσεις, ενώ η υπερέκφραση των ισομορφών που συντίθενται από τον υποκινητή P1 συνδέεται με κακοήθεις καταστάσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το μελάνωμα, όπου μια πλήρης ανάλυση του προφίλ έκφρασης όλων των ισομορφών με περικομμένο αμινοτελικό άκρο με RT-PCR πραγματικού χρόνου, σε καλοήθη δείγματα σπύλων και δείγματα μελανώματος κατέδειξε ότι οι ισομορφές TAp73, ΔEx2p73 και ΔEx2/3p73 υπερεκφράζονται σε μεταστατικούς όγκους, ενώ οι ισομορφές ΔNp73 που συντίθενται από τον υποκινητή P2 είναι άφθονες σε καλοήθεις σπύλους. Επίσης, έχει καταδειχτεί ότι τα μετάγραφα ΔNp73 που συντίθενται από τον υποκινητή P2 είναι περισσότερο άφθονα στην καλοήθη υπερπλασία του προστάτη σε σχέση με τον

καρκίνο του προστάτη [43]. Άλλες μελέτες υποδεικνύουν διαφοροποιήσεις μεταξύ της έκφρασης των ισομορφών ΔTAp73 και ΔNp73 στους καρκινικούς ιστούς. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί αύξηση των επιπέδων έκφρασης των ισομορφών ΔTAp73 έναντι των ισομορφών ΔNp73 σε μια κοόρτη ασθενών με γλοίωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας. Μια ανάλυση επιβίωσης σε ασθενείς με γλοίωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας κατέδειξε ότι ειδικά η έκφραση της ισομορφής ΔEx2/3p73 σχετίζεται με μικρότερους χρόνους επιβίωσης [53]. Παρόμοια, σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα έχει βρεθεί ότι οι ισομορφές ΔTAp73 είναι σημαντικά αυξημένες στους καρκινικούς ιστούς σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς, ενώ οι ισομορφές ΔNp73 δεν παρουσιάζουν σημαντική αύξηση [32].

Συμπερασματικά, η συσχέτιση μεταξύ της θετικής ρύθμισης των ισομορφών ΔNp73 στους όγκους, ειδικά σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο καρκίνου και κακή πρόγνωση, υποδηλώνει ότι εμπλέκονται στην ογκογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου και υπογραμμίζει τη δυνητική χρησιμότητά τους ως προγνωστικούς καρκινικούς δείκτες. Η έκφραση των ισομορφών ΔNp73 σε διάφορους καρκίνους του ανθρώπου συνοψίζεται στον Πίνακα 1.1 [43].

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πίνακας 1.1: Έκφραση των ισομορφών DNp73 σε διάφορους καρκίνους του ανθρώπου (από Buhlmann S 2008 [43])

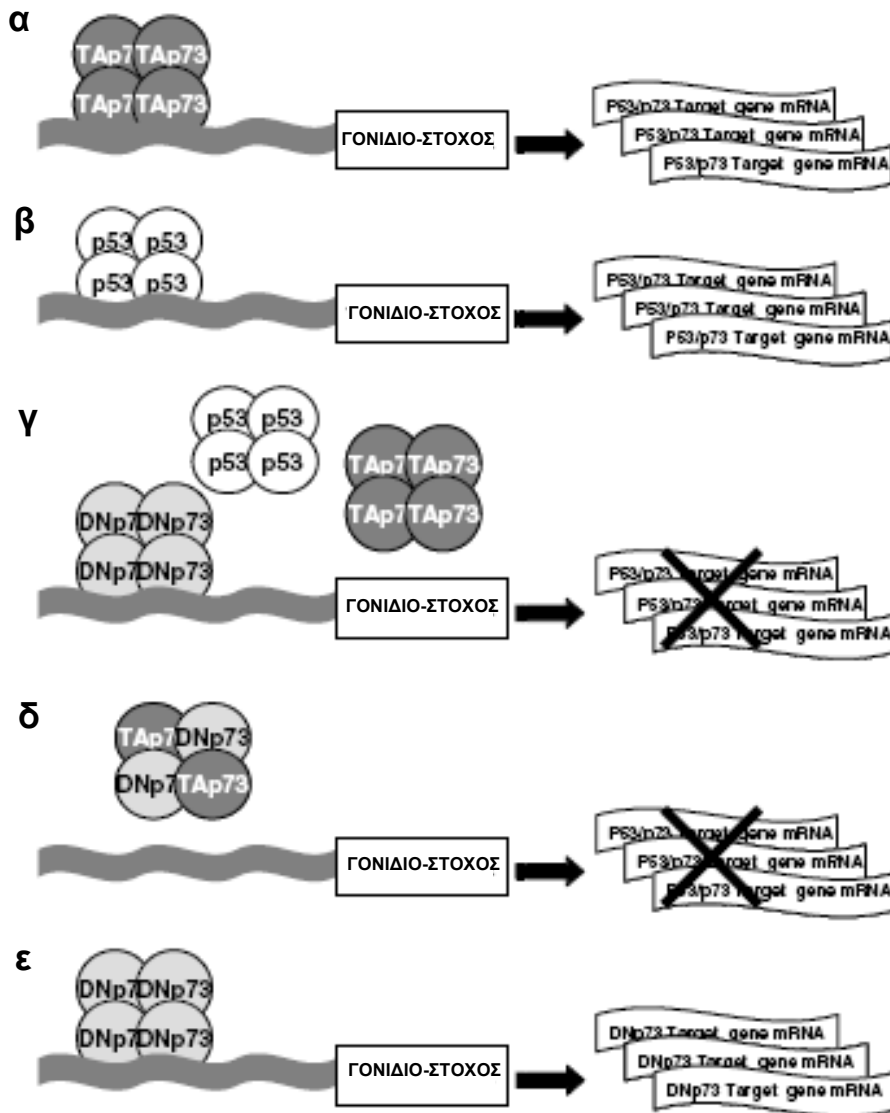
Τύπος καρκίνου	Μέθοδος ανάλυσης	Έκφραση DNp73 (T>N)
Καρκίνος του πνεύμονα	IHC	ΔNp73
Ραβδομυοσάρκωμα	RT-PCR	ΔEx2p73 και ΔNp73
Καρκίνος του προστάτη	RT-PCR	ΔNp73
Non-Hodgkin λεμφώματα	qRT-PCR	ΔNp73
Καρκίνος του θυρεοειδούς	RT-PCR, Western blot, IHC	ΔNp73
	qRT-PCR	ΔNp73 N>T
Καρκίνος των ωοθηκών	qRT-PCR	ΔN'p73, ΔNp73 μόνο σε μικρό αριθμό όγκων
Γυναικολογικός καρκίνος	qRT-PCR	ΔN'p73 και ΔNp73
	RT-PCR	ΔNp73 και ΔEx2p73
	RT-PCR	ΔEx2p73
Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας	IHC	ΔNp73
Καρκίνος του παχέος εντέρου (κόλον)	qRT-PCR	ΔEx2p73, ΔEx2/3p73 και ΔNp73
	IHC	ΔNp73
Μυελοβλάστωμα	qRT-PCR	ΔEx2p73, ΔEx2/3p73, ΔN'p73 και ΔNp73
	Western blot	ΔNp73
Νευροβλάστωμα	RT-PCR	ΔNp73
	RT-PCR	ΔNp73, ΔEx2p73
	Western blot	ΔNp73
Αδαμαντινοβλάστωμα	RT-PCR, IHC	ΔNp73
Καρκίνος του μαστού	qRT-PCR	ΔEx2p73, ΔEx2/3p73 και ΔNp73
	IHC	ΔNp73
	ICC	ΔNp73
Μελάνωμα	qRT-PCR	ΔEx2p73, ΔEx2/3p73 σε μεταστάσεις, ΔNp73 N>T
Οξεία μυελοειδής λευχαιμία	RT-PCR, Western blot	ΔNp73
Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία εκ Β-λεμφοκυττάρων	qRT-PCR, Western blot	ΔNp73
Γλοίωμα	qRT-PCR	ΔEx2p73, ΔEx2/3p73
	RT-PCR	ΔNp73 (χαμηλά επίπεδα έκφρασης)
Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	qRT-PCR	ΔEx2p73, ΔEx2/3p73 και ΔN'p73
	Western blot, IHC	ΔNp73

***Συντομογραφίες**

RT-PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση, qRT-PCR: ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση, Western blot: στίπωμα κατά Western, IHC: ανοσοϊστοχημεία, ICC: ανοσοκυτταροχημεία, N: φυσιολογικός ιστός, T: καρκινικός ιστός.

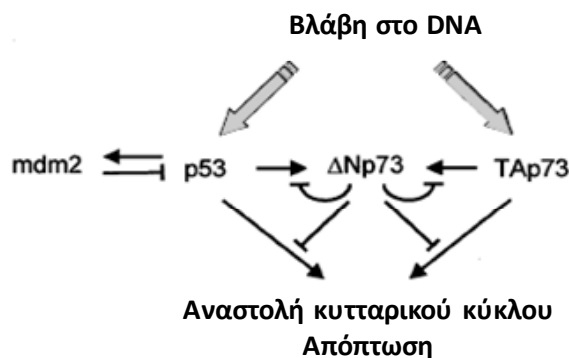
1.5 ΟΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ TAp73 ΚΑΙ DNp73 ΚΑΙ Η ΑΝΑΛΟΓΙΑ DN/TA ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Οι αποπτωτικές ισομορφές TAp73 και οι αντιαποπτωτικές ισομορφές DNp73 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με σύνθετους τρόπους. Καταρχήν, οι ισομορφές DNp73 διαδραματίζουν έναν πολύ σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο, επειδή εκδηλώνουν την επικρατή αρνητική δράση τους παρεμποδίζοντας τη μεταγραφική δράση των παραγόντων p53 και TAp73 και, κατά συνέπεια, την ικανότητά τους να επάγουν απόπτωση. Αυτή η ανασταλτική επίδραση επιτυγχάνεται α) μέσω σχηματισμού μη λειτουργικών ετεροτετραμερών DNp73/TAp73 ή DNp73/p53 ή β) μέσω ανταγωνισμού μεταξύ των λειτουργικών ομοτετραμερών p53 ή TAp73 με τα μη λειτουργικά ομοτετραμερή DNp73 ως προς τη δέσμευση σε γονίδια-στόχους (Εικόνα 1.10). Κατά συνέπεια, οι ισομορφές DNp73 μπορούν να ελέγξουν τη δραστηριότητα τόσο των ισομορφών TAp73, όσο και του παράγοντα p53 [18].



Εικόνα 1.10: Ρόλος των ισομορφών *DNp73* σε κύτταρα που παράγουν λειτουργικές πρωτεΐνες *TAp73* και *p53*. Απουσία *DNp73*, οι παράγοντες *TAp73* και *p53* μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων των *TAp73/p53* (α και β). Οι ισομορφές *DNp73* μπορούν να αναστείλουν την ενεργότητα των μεταγραφικών παραγόντων *TAp73* και *p53* καταλαμβάνοντας τις ειδικές θέσεις δέσμησης στο DNA (γ) ή σχηματίζοντας αδρανή ετεροτετραμερή με τις πρωτεΐνες *TAp73* (δ). Επίσης, υπάρχουν δεδομένα ότι οι ισομορφές *DNp73* έχουν ενεργότητα ως μεταγραφικοί παράγοντες (ε) [18].

Επιπρόσθετα, ο υποκινητής P2 περιέχει ένα λειτουργικό ρυθμιστικό στοιχείο που αποκρίνεται σε p53 ή/και TAp73. Μέσω αυτού του ρυθμιστικού στοιχείου οι παράγοντες p53 and TAp73 μπορούν να επάγουν την έκφραση των ισομορφών ΔNp73. Οι παραγόμενες ισομορφές ΔNp73, με τη σειρά τους, έχουν επικρατή αρνητική επίδραση στη λειτουργία των παραγόντων p53 και TAp73, με αποτέλεσμα να δημιουργείται τελικά μια επικρατής αρνητική καμπύλη ανάδρασης που ρυθμίζει τη λειτουργία τόσο της πρωτεΐνης p53, όσο και της πρωτεΐνης TAp73. Η καμπύλη αυτή μπορεί να παρέχει υψηλή λειτουργική εξειδίκευση-αποτελεσματικότητα (fine-tuning) στο γονίδιο *p53* με έναν τρόπο ανάλογο με εκείνον της καμπύλης p53/MDM2, κατά την οποία η πρωτεΐνη MDM2 επάγεται από τον μεταγραφικό παράγοντα p53 και, στη συνέχεια, δεσμεύεται σε αυτόν και επάγει την αποικοδόμησή του μέσω ουβικουιτίνωσης. Τόσο η πρωτεΐνη MDM2, όσο και η πρωτεΐνη ΔNp73 είναι άμεσοι μεταγραφικοί στόχοι του παράγοντα p53 και αναστέλλουν τη λειτουργία του, είτε επάγοντας την αποικοδόμησή του (στην περίπτωση της πρωτεΐνης MDM2 είτε μέσω ανταγωνισμού για τις θέσεις δέσμευσης σε γονίδια-στόχους του παράγοντα p53 (στην περίπτωση των ισομορφών ΔNp73). Η διατάραξη αυτών των ρυθμιστικών αγκυλών σε καρκινικά κύτταρα ή σε κύτταρα που έχουν προσβληθεί από ογκογόνους ιούς, η οποία προκαλεί περίσσεια ή σε συνεχή έκφραση των πρωτεϊνών MDM2 ή ΔNp73 είναι δυνατό να οδηγήσει σε αδρανοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων p53 ή TAp73. Συνεπώς, η απώλεια αυτών των δύο ρυθμιστικών οδών ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα ακατάλληλη δραστηριότητα των παραγόντων p53 ή TAp73 και αναστολή της κυτταρικής αύξησης, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη του καρκίνου (Εικόνα 1.11) [18, 54, 55].

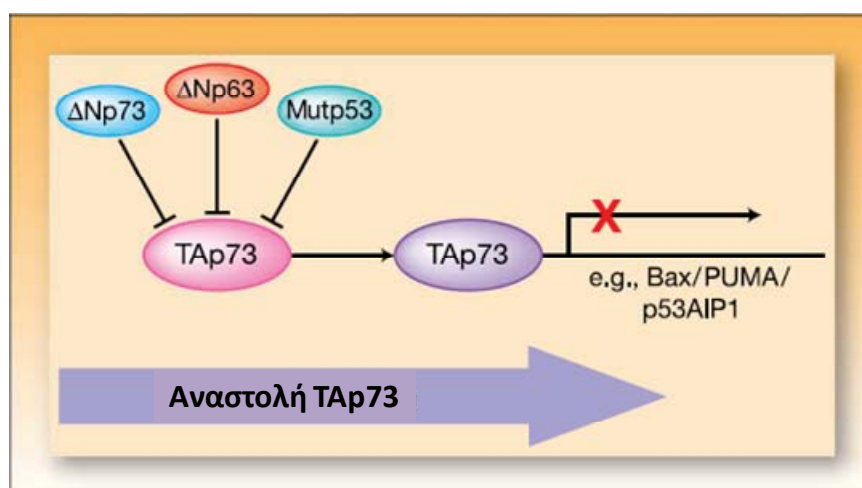


Εικόνα 1.11: Σχηματική αναπαράσταση της καμπύλης p53. Οι παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA επάγουν τα γονίδια p53 και p73 μέσω διακριτών οδών. Τα επίπεδα έκφρασης και η δράση των γονιδίων p53 και p73 ρυθμίζονται από διαφορετικές οδούς. Η πρωτεΐνη MDM2, της οποίας η έκφραση επάγεται από τον παράγοντα p53 ελέγχει την αποικοδόμηση του παράγοντα p53. Η πρωτεΐνη ΔNp73 επάγεται τόσο από τον παράγοντα p53, όσο και από τον παράγοντα TAp73 και ανταγωνίζεται τη δράση τους. Επίσης, η πρωτεΐνη ΔNp73 ελέγχει την ίδια την επαγωγή της μέσω της αρνητικής καμπύλης ανάδρασης που δημιουργείται [54].

Επομένως, λόγω αφενός της συνυπερέκφρασης των ισομορφών TAp73 και DNp73 σε καρκινικούς ιστούς και αφετέρου των αλληλεπιδράσεων μεταξύ TAp73 και DNp73, το τελικό αποτέλεσμα των ισομορφών p73 στην ογκογένεση εξαρτάται από την αναλογία DN/TA και όχι από την υπερέκφραση μιας συγκεκριμένης ισομορφής p73 ή μιας συγκεκριμένης τάξης ισομορφών p73 αυτή καθαυτή. Η αναλογία των δύο ανταγωνιστικών τάξεων πρωτεϊνών p73 οι παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασής τους και, συνεπώς, τη στοιχειομετρία τους είναι σημαντικά στοιχεία από τα οποία θα μπορούσε να καθοριστεί εάν το γονίδιο p73 θα έχει ογκοκατασταλτική ή ογκογόνο δράση. Λογικά, για την ογκογόνο δράση η ισορροπία DN/TA μετατοπίζεται προς την πλευρά της σύνθεσης ισομορφών DNp73. Ωστόσο, ακόμα και στην περίπτωση που τα επίπεδα μεταγραφής αυξάνονται σε ίσες ποσότητες, η ισορροπία αυτή εξακολουθεί να ευνοεί τις ισομορφές DNp73, επειδή οι πρωτεΐνες αυτές είναι πιο σταθερές σε σχέση με τις ισομορφές TAp73. Επί του παρόντος, δεν είναι γνωστή πόση ακριβώς δραστηριότητα DNp73 απαιτείται για να αντισταθμίσει την ογκοκατασταλτική λειτουργία των ισομορφών TAp73. Θεωρητικά, μια ελαφρά αύξηση της αναλογίας DN/TA θα μπορούσε να είναι επαρκής για τη μετατροπή του γονιδίου p73 από ογκοκατασταλτικό γονίδιο σε ογκογονίδιο [32].

1.6 ΑΛΛΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ TAp73 ΚΑΙ ΜΕΛΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ p53 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθεί ότι η αναστολή της αποπτωτικής δράσης των πρωτεϊνών TAp73, μέσω σχηματισμού μη λειτουργικών ετεροτετραμερών ή/και μέσω ανταγωνισμού μεταξύ λειτουργικών και μη λειτουργικών ομοτετραμερών, ως προς τις θέσεις δέσμευσης στο DNA δεν επιτυγχάνεται μόνο από τις ισομορφές ΔNp73. Αντίθετα, είναι ένας γενικευμένος μηχανισμός αλληλεπίδρασης των ογκογόνων μορφών πρωτεϊνών της οικογένειας p53 με τις αποπτωτικές ισομορφές TAp73. Ο μηχανισμός αυτός στηρίζεται α) στην ομολογία των περιοχών ολιγομερισμού μεταξύ των μελών της οικογένειας p53, που δίνει τη δυνατότητα σχηματισμού ετεροδιμερών και β) στην ομολογία της περιοχής δέσμευσης στο DNA μεταξύ των μελών της οικογένειας p53, η οποία τα καθιστά ικανά να δεσμεύονται σε κοινά ρυθμιστικά στοιχεία των υποκινητών και να ελέγχουν την έκφραση γονιδίων-στόχων. Έτσι, εκτός από τις ισομορφές ΔNp73, η αποπτωτική δράση της πρωτεΐνης TAp73 μπορεί επίσης να αναστέλλεται από την ογκογόνο ισομορφή ΔNp63α, καθώς επίσης και από μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης p53 (Εικόνα 1.12) [56].



Εικόνα 1.12: Απενεργοποίηση της πρωτεΐνης TAp73 από τις πρωτεΐνες ΔNp73, ΔNp63α και τις μεταλλαγμένες μορφές του παράγοντα p53 (Mutp53). Η απενεργοποιημένη TAp73 χάνει την ικανότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης προαποπτωτικών γονιδίων-στόχων, όπως τα Bax, PUMA και p53AIP1 [56].

1.7 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ p73

Με βάση τα παραπάνω, η ρύθμιση της σύνθεσης των ισομορφών p73 είναι πολύ σημαντική, επειδή καθορίζει τη σχετική έκφραση των ισομορφών TAp73 και DNp73 σε ένα κύτταρο και, κατά συνέπεια, το εάν η τελική επίδραση των προϊόντων του γονιδίου *p73* θα είναι ογκοκατασταλτική ή ογκογόνος. Η σύνθεση των ισομορφών p73 ρυθμίζεται σε τρία επίπεδα, στο επιγενετικό, το μεταγραφικό και το μεταμεταφραστικό, τα οποία αναλύονται παρακάτω. Στην Εικόνα 1.13 συνοψίζονται οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγραφική και τη μεταμεταφραστική ρύθμιση των πρωτεϊνών p73.

1.7.1 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ: ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA

Η μεθυλίωση του DNA είναι ένας δυναμικός, αντιστρεπτός τρόπος επιγενετικής, ο οποίος μπορεί να τροποποιήσει τη λειτουργικότητα διαφόρων γονιδίων στο κύτταρο. Οι μεταβολές του προτύπου μεθυλίωσης του DNA είναι συχνές στα καρκινικά κύτταρα. Από τη μια πλευρά, η υπερμεθυλίωση νησίδων CpG σε περιοχές υποκινητών συγκεκριμένων γονιδίων αναστέλλει τη μεταγραφή, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στη σίγηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως τα *p16INK4a*, *Rb*, E-καντχερίνη και *BRCAl* [57]. Από την άλλη πλευρά, η υπομεθυλίωση ειδικών γενετικών τόπων ενεργοποιεί εκ νέου την έκφραση γονιδίων με ογκογόνο δυναμικό. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ενεργοποίηση ογκογονιδίων, όπως τα *H-Ras*, *c-myc* [57] και *PAX2* [58] μέσω υπομεθυλίωσης των υποκινητών τους. Η απομεθυλίωση του DNA συμβαίνει μέσω δύο διακριτών διαδικασιών: α) της παθητικής απομεθυλίωσης, η οποία προκαλείται από λανθασμένη διατήρηση των σημείων μεθυλίωσης (methylation marks) κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA, λόγω έλλειψης των ενεργητικών διατήρησης της μεθυλίωσης και β) της ενεργής απομεθυλίωσης, η οποία σχετίζεται με μια απομεθυλάση που διαγράφει τα σημεία μεθυλίωσης από το DNA με τρόπο μη εξαρτώμενο από την αντιγραφή [59]. Στα καρκινικά κύτταρα, η συνολική υπομεθυλίωση του γονιδιώματος συμβαίνει ταυτόχρονα με την υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG και αφορά σε γονίδια τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την επιδιόρθωση του DNA και την απόπτωση [57]. Αυτές οι μεταβολές είναι, συνήθως, ειδικές για κάποιον τύπο όγκου [60].

Έχει αναφερθεί μεθυλίωση του γονιδίου *p73* σε ορισμένους τύπους καρκίνου, όπως οι λευχαιμίες/τα λεμφώματα και τα νευροβλαστώματα. Συγκεκριμένα, η υπερμεθυλίωση του *p73* αποτελεί συχνό συμβάν στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και ευθύνεται για την αναστολή της μεταγραφής του αντίστοιχου γονιδιακού προϊόντος [61], ενώ είναι σπάνια και δεν έχει καμία επίδραση στην παθογένεση της οξείας μυελοβλαστικής λευχαιμίας [34]. Σε λεμφώματα non-Hodgkin, ο υποκινητής P1 του γονιδίου *p73* έχει βρεθεί μεθυλιωμένος σε λεμφώματα εκ B-λεμφοκυττάρων και η μεθυλίωση αυτή συνοδεύεται από απουσία ή χαμηλά επίπεδα έκφρασης TAp73. Αντίθετα, έχει βρεθεί μη μεθυλιωμένος σε λεμφώματα εκ T-λεμφοκυττάρων [62]. Η υψηλότερη συχνότητα μεθυλίωσης του γονιδίου *p73*, έως και 94%, έχει αναφερθεί στα λεμφώματα από φυσικά κύτταρα-φονείς, ενώ δεν υπάρχουν ανιχνεύσιμα μετάγραφα του γονιδίου *p73* σε αυτές τις κακοήθειες [63]. Άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι ο εξωτερικός και ο εσωτερικός υποκινητής του γονιδίου *p73* επηρεάζονται με διαφορετικό τρόπο από τη μεθυλίωση. Αναλυτικότερα, στο νευροβλάστωμα, ο υποκινητής P1 δεν είναι μεθυλιωμένος, ενώ τα επίπεδα μεταγραφής των ισομορφών TAp73 δεν εξαρτώνται από την κατάσταση μεθυλίωσης [64]. Αντίθετα, ο υποκινητής P2 είναι μερικώς μεθυλιωμένος σε πρωτοπαθή νευροβλαστώματα που εκφράζουν ΔNp73 και πλήρως μεθυλιωμένος σε πρωτοπαθή νευροβλαστώματα που δεν εκφράζουν ΔNp73, υποδηλώνοντας ότι η έκφραση των ισομορφών ΔNp73, αλλά όχι των ισομορφών TAp73 ελέγχεται, τουλάχιστον εν μέρει, από επιγενετικά συμβάντα [65]. Εξάλλου, πρόσφατα η μεθυλίωση των υποκινητών του γονιδίου *p73* διερευνήθηκε σε καρκίνους του πνεύμονα. Χρησιμοποιώντας μεθόδους ποιοτικού προσδιορισμού, οι Di Vinci *et al* έδειξαν ότι τόσο οι ισομορφές ΔNp73, όσο και οι TAp73 υπερεκφράζονται σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και ότι ο υποκινητής P1 ήταν μη μεθυλιωμένος στην πλειονότητα των περιστατικών που εξετάστηκαν (39/41), ενώ ο υποκινητής P2 ήταν μερικώς μη μεθυλιωμένος σε 24/41 περιστατικά που εξετάστηκαν. Η έκφραση των πρωτεϊνών TAp73 και ΔNp73 στους καρκινικούς ιστούς ήταν αυξημένη σε σχέση με τους φυσιολογικούς παρακείμενους ιστούς, αλλά οι ερευνητές δεν μπόρεσαν να καταδείξουν κάποια συσχέτιση μεταξύ της κατάστασης μεθυλίωσης των υποκινητών P1 και P2 και την έκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνικών προϊόντων τους [37]. Ωστόσο στη μελέτη αυτή, η κατάσταση μεθυλίωσης δεν συσχετίστηκε με τα άμεσα προϊόντα της μεταγραφής των υποκινητών P1 και P2, δηλαδή με το mRNA των μορίων TAp73 και ΔNp73, αλλά με

τις πρωτεΐνες TAp73 και ΔNp73 που συνιστούν αποτέλεσμα σύνθετων μετα-μεταγραφικών και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (π.χ. εκτεταμένο μάτισμα στην καρβοξυτελική και αμινοτελική περιοχή, σταθεροποίηση ή αποικοδόμηση πρωτεϊνικών προϊόντων κ.λπ.).

1.7.2 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ: ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Μια αρχική μελέτη για τον προσδιορισμό της βασικής ενεργότητας του εξωτερικού υποκινητή του γονιδίου *p73* κατέδειξε ότι μια έλλειψη των νουκλεοτιδίων -119 έως +19 bp σε σχέση με το εξώνιο 1 οδήγησε σε μείωση την ενεργότητας του υποκινητή αυτού κατά 13 έως 20 φορές σε σχέση με τον ακέραιο υποκινητή. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι σε αυτή την περιοχή περιέχονται ρυθμιστικά στοιχεία απαραίτητα για τη βασική ενεργότητα του υποκινητή P1. Πράγματι, στη συγκεκριμένη μελέτη καταδείχτηκαν, επίσης, πιθανές ρυθμιστικές θέσεις για τους παράγοντες E2F1, Sp1, AP-2 και Egr-1, 2, 3 σε αυτή την περιοχή, με τη βοήθεια εργαλείων βιοπληροφορικής [66].

Το 2000, δημοσιεύτηκαν ανεξάρτητα τρία άρθρα τα οποία καταδείκνυαν ότι ο παράγοντας E2F1 ενεργοποιεί άμεσα τη μεταγραφή της πρωτεΐνης *p73* πλήρους μήκους η οποία, με τη σειρά της, οδηγεί στην ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων του *p53* και, τελικά, σε απόπτωση. Επομένως, η ενεργοποίηση του εξωτερικού υποκινητή του γονιδίου *p73* από την απορρυθμισμένη ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 ενδέχεται να αποτελεί έναν προστατευτικό μηχανισμό έναντι της ογκογένεσης, ο οποίος είναι ανεξάρτητος από το *p53*. Η περιοχή που προσφέρει την υψηλότερη ενεργότητα του υποκινητή βρίσκεται μεταξύ των θέσεων -113 και -217 bp (σε σχέση με τη θέση έναρξης της μεταγραφής) του γονιδίου *p73*. Ο εξωτερικός υποκινητής περιέχει τρεις λειτουργικές θέσεις δέσμευσης του παράγοντα E2F1, στις θέσεις -284, -155 και -132 bp σε σχέση με τη θέση έναρξης της μεταγραφής. Αυτό σημαίνει ότι τα δύο από τα τρία λειτουργικά ρυθμιστικά στοιχεία του E2F1 βρίσκονται στην περιοχή του υποκινητή με την υψηλότερη μεταγραφική ενεργότητα.

Εκτός από τον παράγοντα E2F1, ο υποκινητής P1 μπορεί να ρυθμιστεί από την πρωτεΐνη *p53* μέσω μιας πιθανής θέσης δέσμευσης *p53*. Ωστόσο, βρέθηκε ότι αυτό το πιθανό ρυθμιστικό στοιχείο *p53* δεν είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του γονιδίου *p73* η οποία εξαρτάται από βλάβες στο DNA. Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι η ενεργοποίηση του υποκινητή P1 οδηγεί στη θετική ρύθμιση όχι μόνο

των ισομορφών TAp73, αλλά και των ισομορφών ΔTAp73. Από την άλλη πλευρά, η ενεργοποίηση του υποκινητή P2 έχει βρεθεί ότι ελέγχεται άμεσα τόσο από τις ισομορφές TAp73, όσο και από την πρωτεΐνη p53 μέσω ενός καλά χαρακτηρισμένου ρυθμιστικού στοιχείου p53. Όπως περιγράφηκε λεπτομερώς παραπάνω, οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες ΔNp73 αναστέλλουν τη λειτουργία των παραγόντων TAp73 και p53 μέσω μιας αρνητικής καμπύλης ανάδρασης (βλ. ενότητα «Αλληλεπιδράσεις μεταξύ TAp73 και DNp73 και η αναλογία DN/TA στον καρκίνο»). Με αυτό τον τρόπο, οι ισομορφές ΔNp73 ελέγχουν, κατ' επέκταση, και την ίδια την έκφρασή τους.

Εκτός από τους παραπάνω μεταγραφικούς παράγοντες, έχουν χαρακτηριστεί και ορισμένοι άλλοι μεταγραφικοί συμπαράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν με έμμεσο τρόπο τη μεταγραφική ενεργοποίηση των υποκινητών του γονιδίου *p73*. Από αυτούς, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο παράγοντας C-EBPα, ο οποίος φαίνεται να δρα ως καταστολέας του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 στον υποκινητή P1. Σε φυσιολογικές συνθήκες, στον υποκινητή P1 υπάρχει ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που περιέχει τον καταστολέα C-EBPα, τον παράγοντα E2F1 και, πιθανόν, και άλλες πρωτεΐνες. Μετά από επεξεργασία των κυττάρων με παράγοντες πρόκλησης βλαβών στο DNA (π.χ. δοξορουβικίνη), η πρωτεΐνη C-EBPα μεταφέρεται από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα να καταργείται η κατασταλτική δράση που ασκεί στον παράγοντα E2F1. Με αυτό τον τρόπο, ο παράγοντας E2F1 μπορεί πλέον να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή των ισομορφών *p73* από τον υποκινητή P1 [18]. Ένας άλλος μεταγραφικός συμπαράγοντας του γονιδίου *p73*, ο οποίος έχει ταυτοποιηθεί πρόσφατα είναι η πρωτεΐνη Ying-Yang 1 (YY1). Αναλυτικότερα, έχει αναφερθεί ότι οι παράγοντες YY1 και E2F1 έχουν συνεργιστική δράση στην ενεργοποίηση του υποκινητή P1. Η πρωτεΐνη YY1 αλληλεπιδρά φυσικά με τον παράγοντα E2F1 στον πυρήνα και δρα ως συνενεργοποιητής της μεταγραφικής ενεργοποίησης του P1 [67].

Ρυθμιστικές περιοχές έχουν ταυτοποιηθεί και καθοδικά του υποκινητή P1. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι υπάρχει μια ρυθμιστική περιοχή μήκους 1 kb εντός του πρώτου εσωνίου του γονιδίου *p73*, αμέσως πριν το κωδικόνιο ATG του δεύτερου εξωνίου. Αυτή η περιοχή περιέχει έξι θέσεις δέσμευσης του μεταγραφικού καταστολέα ZEB1 (δEF1). Η αναστολή του ZEB1 έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης *p73* [68]. Μια γενετική έλλειψη 73 bp σε αυτή την περιοχή (πολυμορφισμός γαμετικής σειράς) έχει συσχετισθεί με χαμηλά επίπεδα

έκφρασης της TAp73 και, επομένως, με αλλαγή της ισορροπίας DN/TA στον ορθοκολικό καρκίνο [69].

1.7.3 ΜΕΤΑΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ: ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ, ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

1.7.3.1 ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ

Εκτός από τις πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή, υπάρχει και μια πληθώρα πρωτεϊνών που μπορούν να σταθεροποιήσουν, να ενεργοποιήσουν και να αποικοδομήσουν την πρωτεΐνη p73, παίζοντας με αυτό τον τρόπο ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα έκφρασης του γονιδίου *p73* στον καρκίνο. Οι πρώτες ενδείξεις μεταμεταφραστικής ρύθμισης έχουν προκύψει από μελέτες που καταδεικνύουν τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης p73 από την κινάση τυροσίνης c-Abl μετά από βλάβες στο DNA. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι πολύ σημαντική για την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα p73, καθώς η αναστολή της δραστηριότητας της πρωτεΐνης c-Abl οδηγεί σε μείωση της μεταγραφής και της απόπτωσης που επάγεται από την p73. Η πρωτεΐνη c-Abl δεσμεύεται στην p73 μέσω αλληλεπίδρασης της περιοχής SH3 (Src homology 3) της c-Abl και του μοτίβου PxxP της p73. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη p73 φωσφορυλιώνεται στα κατάλοιπα τυροσίνης στις θέσεις 99, 121 και 240. Έχει προταθεί ότι η φωσφορυλίωση σε πολλαπλές θέσεις δημιουργεί ένα πρόσθετο μοτίβο δέσμευσης που απαιτείται για την αλληλεπίδραση με την περιοχή SH2 της πρωτεΐνης c-Abl και τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης p73. Έχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη c-Abl μπορεί να σταθεροποιήσει τις ισομορφές TAp73α, TAp73β, ΔNp73α και ΔNp73β, αλλά είναι πιθανό να μπορεί να σταθεροποιήσει και άλλες ισομορφές p73, εάν και εφόσον αυτές περιέχουν το μοτίβο αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη c-Abl. Η λειτουργική σημασία της σταθεροποίησης των ισομορφών ΔNp73 παραμένει ακόμα ασαφής. Είναι αξιοσημείωτο ότι η πρωτεΐνη p73 μπορεί επίσης να σταθεροποιηθεί από την ογκοπρωτεΐνη BCR-Abl (χιμαιρική πρωτεΐνη c-Abl με απορρυθμισμένη δραστηριότητα) που παράγεται με χρωμοσωμική μετατόπιση t(9;22) στις λευχαιμίες [70].

Για την ενεργοποίηση της κινάσης c-Abl από ιονίζουσα ακτινοβολία (IR, ionizing radiation) απαιτείται μια λειτουργική πρωτεϊνική κινάση σερίνης ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated). Σε κύτταρα στα οποία δεν υπάρχει ATM, η

φωσφορυλίωση του παράγοντα p73 είναι μειωμένη. Οι κινάσες σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoint) Chk2 και Chk1, οι οποίες αποτελούν καθοδικούς τελεστές της οδού ATM/ATR, εμπλέκονται επίσης στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p73 μετά από επεξεργασία γενοτοξικών φαρμάκων. Οι πρωτεΐνες αυτές σταθεροποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα E2F1, ο οποίος ενεργοποιεί το γονίδιο p73. Επιπρόσθετα, η κινάση Chk1, αλλά όχι η κινάση Chk2, φωσφορυλιώνει άμεσα την πρωτεΐνη p73 στη σερίνη 47 (Ser47), ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο τη μεταγραφική και την αποπτωτική δράση της. Πρόσφατα, προτάθηκε ένας επιπρόσθετος μηχανισμός, σύμφωνα με τον οποίο η κινάση ATM διαμεσολαβεί τη συσσώρευση της πρωτεΐνης IKK-α, το οποίο αποτελεί συστατικό του συμπλέγματος NFκB. Η πρωτεΐνη IKK-α, με τη σειρά της, ενεργοποιεί την προαποπτωτική δράση της p73, πιθανόν μέσω άμεσης φωσφορυλίωσης της αμινοτελικής περιοχής της p73 [70].

Άλλες οδοί που ενεργοποιούνται από στρες, όπως για παράδειγμα οι οδοί JNK/SAPK και p38 MAPK, εμπλέκονται στη ρύθμιση της πρωτεΐνης p73 μετά από βλάβες στο DNA. Η ενεργοποίηση της οδού JNK οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα c-Jun, ο οποίος αναστέλλει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης p73 και συμβάλλει στη σταθεροποίησή της. Έχει προταθεί ότι ο παράγοντας c-Jun ρυθμίζει θετικά την πρωτεΐνη YAP (βλ. παρακάτω) η οποία, με τη σειρά της, σταθεροποιεί την πρωτεΐνη p73. Επίσης, η κινάση JNK φωσφορυλιώνει άμεσα την πρωτεΐνη TAp73 σε διάφορα κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης τα οποία βρίσκονται τόσο στο αμινοτελικό, όσο και στο καρβοξυτελικό άκρο, μετά από επεξεργασία με σισπλατίνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης TAp73, την αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας που διαμεσολαβείται από p73 και την απόπτωση. Είναι ενδιαφέρον ότι η πρωτεΐνη ΔNp73 δεσμεύεται στην κινάση JNK και αναστέλλει τη δραστηριότητά της, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι η κινάση JNK ενδέχεται να διαμεσολαβεί τη ρύθμιση των ισομορφών TAp73 από τις ισομορφές ΔNp73. Από την άλλη πλευρά, η κινάση p38 απαιτείται για την ενεργοποίηση και τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης p73 από τον παράγοντα c-Abl και σχετίζεται με την άμεση φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης p73 σε κατάλοιπα σερίνης. Η φωσφορυλίωση αυτή είναι προαπαιτούμενο για τη δέσμευση της p73 στην πρωτεΐνη PML (promyelocytic leukemia protein, πρωτεΐνη προμυελωτικής λευχαιμίας). Η PML αναστέλλει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης p73 και ενισχύει τη μεταγραφική ενεργότητά της [70].

Η ενίσχυση της δραστηριότητας του παράγοντα c-Abl από την κινάση p38 διεγείρει τη δέσμευση της ισομεράσης Pin1, η οποία καταλύει την cis-trans ισομερείωση των φωσφορυλιωμένων πεπτιδίων Ser/Thr-Pro. Η Pin1 επάγει μια αλλοστερική αλλαγή στην πρωτεΐνη p73, η οποία ενισχύει την ακετυλίωσή της, που διαμεσολαβείται από τις ακετυλοτρανσφεράσες p300/CBP. Στην ισομορφή TAp73α, έχουν ταυτοποιηθεί θέσεις ακετυλίωσης σε τρία κατάλοιπα λυσίνης, στις θέσεις 321, 327 και 331. Μεταλλάξεις αντικατάστασης αυτών των τριών λυσινών από αργινίνες έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ακετυλίωσης της πρωτεΐνης p73 και συνακόλουθη αδυναμία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης να προκαλέσει καταστολή της ανάπτυξης του όγκου και απόπτωση. Όσον αφορά στην απόκριση σε βλάβες στο DNA, η ακετυλίωση της p73 που διαμεσολαβείται από την p300/CBP, αυξάνει την πρωτεϊνική σταθερότητα και ενισχύει τη μεταγραφική ενεργότητα τόσο της πρωτεΐνης p53, όσο και της πρωτεΐνης p73. Άλλη μια ακετυλοτρανσφεράση, η PCAF, μπορεί να συμβάλλει επίσης στην ακετυλίωση και την αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας της πρωτεΐνης p73 [70].

Εκτός από τις πρωτεΐνες p38, PML και Pin1, η ακετυλίωση της πρωτεΐνης p73 που διαμεσολαβείται από την ακετυλάση p300 ενισχύεται από την πρωτεΐνη YAP (YAP1, YAP65). Συγκεκριμένα, η περιοχή WW της πρωτεΐνης YAP1 (Yes-associated protein 1) αλληλεπιδρά με το μοτίβο PPPPY της πρωτεΐνης TAp73, το οποίο βρίσκεται αμέσως πριν από την περιοχή SAM. Η YAP λειτουργεί ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής της p73, ενώ ταυτόχρονα επηρεάζει τη συσσώρευση της πρωτεΐνης p73 ως απόκριση στις βλάβες στο DNA. Η σίγηση της YAP οδηγεί σε μείωση της σταθερότητας της πρωτεΐνης p73 σε κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε σισπλατίνη [70]. Πρόσφατα προτάθηκε ο εξής μηχανισμός σταθεροποίησης της p73 από τη YAP: η πρωτεΐνη YAP1 ανταγωνίζεται με την πρωτεΐνη Itch ως προς την πρόσδεση στο μοτίβο PPPY της πρωτεΐνης p73 [71]. Επειδή η πρωτεΐνη Itch δρα ως λιγάση της ουβικουιτίνης E3 που εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της p73, η YAP αποτρέπει την ουβικουιτίνωση και τη συνακόλουθη αποικοδόμηση της πρωτεΐνης p73. Η πρωτεΐνη YAP δεσμεύεται ειδικά στις ισομορφές p73α και p73β, αλλά όχι στην p73γ [70]. Γενικά, υπάρχει μια σύνθετη σχέση μεταξύ p73 και YAP, κατά την οποία η πρωτεΐνη YAP δεσμεύεται στην p73 και ενεργοποιεί τη μεταγραφή της πρωτεΐνης PML, η οποία με τη σειρά της, διαμεσολαβεί τη σαμουλίωση και τη σταθεροποίηση της YAP, αυξάνει τη δραστηριότητα της p73 και, επομένως, σχηματίζει μια προαποπτωτική, αυτορρυθμιζόμενη καμπύλη ανάδρασης [72].

Η πρωτεΐνη p73 αλληλεπιδρά επίσης με τα μέλη της οικογένειας ASPP, τα ASPP1 και ASPP2 (p53BP2) και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των προαποπτωτικών γονιδίων *Bax*, *PIG3* και *PUMA*, αλλά όχι των γονιδίων *MDM2* ή *p21*. Το τρίτο μέλος της οικογένειας ASPP, η πρωτεΐνη iASPP, αλληλεπιδρά επίσης με την πρωτεΐνη TAp73 και η διατάραξη αυτής της αλληλεπίδρασης επάγει μεταγραφή και απόπτωση που εξαρτώνται από την πρωτεΐνη p73 στα καρκινικά κύτταρα [70].

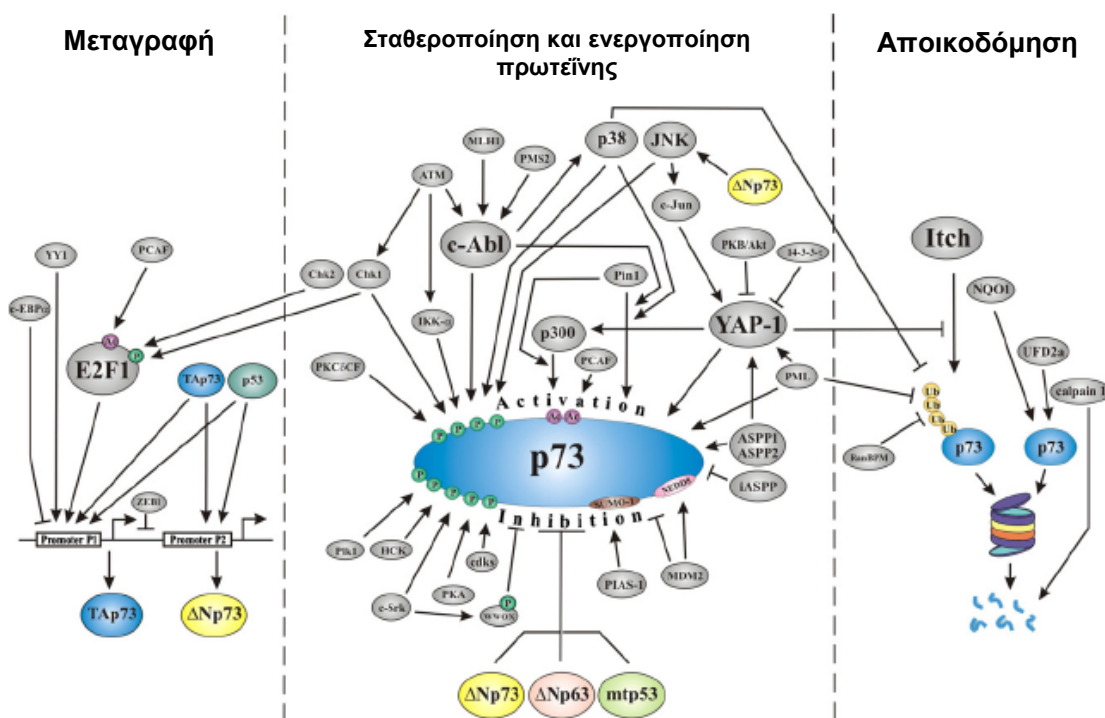
Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη p73 ελέγχεται μεταμεταφραστικά από την πρωτεϊνική κινάση C. Καταρχήν, έχει βρεθεί ότι η κινάση σερίνης/θρεονίνης PKCδ και το καταλυτικό της κλάσμα PKCδCF μπορούν να φωσφορυλιώσουν την ισομορφή TAp73β στη θέση Ser289. Με αυτό τον τρόπο σταθεροποιείται η πρωτεΐνη TAp73β και επάγεται μεταγραφή που εξαρτάται από την πρωτεΐνη p73 [70]. Δεύτερον, πρόσφατα βρέθηκε μια δεύτερη περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 381 έως 399, υπεύθυνη για τη ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο και της οποίας η ενεργότητα τροποποιείται από PKC-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο 388 [73]. Τέλος, εκτός από τις κινάσες που ενεργοποιούν την p73, υπάρχουν και κινάσες οι οποίες φωσφορυλιώνουν άμεσα την p73 και αναστέλλουν την ενεργοποίησή της, όπως είναι οι HCK, c-Src, PKA, Plk1 (polo-like kinase 1) και οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες. [70].

1.7.3.2 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ

Οι οδοί που οδηγούν στην αποικοδόμηση της πρωτεΐνης p73 φαίνεται ότι είναι διαφορετικές από τις αντίστοιχες της p53. Για παράδειγμα, παρότι η πρωτεΐνη p73 μπορεί να αλληλεπιδράσει φυσικά με την πρωτεΐνη MDM2, η αλληλεπίδραση αυτή δεν προκαλεί την ουβικουίτινωση ή την αποικοδόμησή της. Αντίθετα, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης MDM2 αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα της πρωτεΐνης p73 και ενισχύει τη σταθερότητά της. Έχει καταδειχτεί ότι η E3 λιγάση Itch στοχεύει τις ισομορφές TAp73 και ΔNp73. Επίσης, η σταθερότητα της πρωτεΐνης p73 ρυθμίζεται από μηχανισμούς που δεν εξαρτώνται από την ουβικουίτινη. Αναλυτικότερα, η πρωτεοσωμική αποικοδόμηση των ισομορφών TAp73 ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση των ισομορφών TAp73 με τις πρωτεΐνες NQO1 (NADH quinone oxidoreductase 1) ή UFD2a (U-box type E3/E4 ligase) με τρόπο μη εξαρτώμενο από την ουβικουίτινη. Και τα δύο ένζυμα επηρεάζουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης p73 σε περιπτώσεις πρόκλησης βλαβών στο DNA. Ακόμα,

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

έχει αναφερθεί πρωτεολυτική αποικοδόμηση της πρωτεΐνης p73 από την ασβεστιο-εξαρτώμενη πρωτεάση καλπαΐνη I [70]. Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών p73 εξαρτάται από την ισομορφή. Για παράδειγμα, η ρύθμιση της σταθερότητας της πρωτεΐνης p73 που διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη Itch είναι εκλεκτική για τις ισομορφές που περιέχουν το καρβοξυτελικό μοτίβο PPxY, όπως οι ισομορφές α και β, ενώ οι γ και δ δεν επηρεάζονται. Σε συνθήκες πρόκλησης βλαβών στο DNA (π.χ. επεξεργασία με δοξορουβικίνη), η πρωτεΐνη Itch ρυθμίζεται αρνητικά και, συνακόλουθα, οι πρωτεΐνες p73 σταθεροποιούνται [74]. Γενικά, οι βλάβες στο DNA σταθεροποιούν τις ισομορφές TAp73 [70]. Οι πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στη μεταγραφή, τη σταθεροποίηση, την ενεργοποίηση και την αποικοδόμηση της των ισομορφών p73 συνοψίζονται στην Εικόνα 1.13.



Εικόνα 1.13: Επισκόπηση της ρύθμισης των πρωτεϊνών p73 (μεταγραφικό και μεταμεταφραστικό επίπεδο ρύθμισης).

mtp53: μεταλλαγμένη μορφή p53, Promoter P1: υποκινητής P1, Promoter P2: υποκινητής P2, Activation: Ενεργοποίηση, Inhibition: Αναστολή [70].

1.8 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το γονίδιο *p73* μπορεί να δράσει είτε ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο είτε ως ογκογονίδιο, ανάλογα με το ποια τάξη ισομορφών (TA ή DN) βρίσκεται σε αφθονία σε ένα κύτταρο σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά επίπεδα. Η επιλεκτική ενεργοποίηση των υποκινητών (σε επιγενετικό ή σε μεταγραφικό επίπεδο), θα μπορούσε να προκαλέσει τη σύνθεση είτε ογκογόνων είτε ογκοκατασταλτικών ισομορφών *p73*, μετατοπίζοντας με αυτό τον τρόπο την ισορροπία DN/TA προς μια ογκογόνο ή ογκοκατασταλτική κατεύθυνση και, επομένως, να καθορίσει το τελικό αποτέλεσμα του γονιδίου *p73* στον καρκίνο. Έτσι, η ταυτοποίηση νέων παραγόντων που έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν τη σχετική έκφραση των ισομορφών *p73* είναι ζωτικής σημασίας, ιδιαίτερα στον καρκίνο του πνεύμονα, στον οποίο τα δεδομένα τόσο για τον ρόλο των πρωτεϊνών *p73*, όσο και για τη ρύθμιση των υποκινητών P1 και P2 παρέμεναν, έως τώρα, πτωχά. Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι υπάρχει διαφοροποίηση του ρόλου των ισομορφών *p73*, ανάλογα με το καρβοξυτελικό άκρο τους, οπότε ο προσδιορισμός της καρβοξυτελικής παραλλαγής ματίσματος, όπου είναι δυνατός, μπορεί να παρέχει ενδεικτικά στοιχεία σχετικά με τον ρόλο της κάθε καρβοξυτελικής παραλλαγής στον καρκίνο.

Αυτή η διατριβή επικεντρώνεται στην ταυτοποίηση μεταγραφικών και επιγενετικών παραγόντων οι οποίοι ρυθμίζουν διαφορετικά τη χρήση των υποκινητών P1 και P2 του γονιδίου στον καρκίνο του πνεύμονα. Αρχικά καθορίστηκε η κατάσταση μεθυλίωσης των δύο υποκινητών και συσχετίστηκε με τα επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων μεταγράφων τους, TAp73 και ΔNp73. Στη συνέχεια, αναζητήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση των πρωτεϊνών TAp73 και ΔNp73 στον καρκίνο του πνεύμονα. Τέλος, προσδιορίστηκε το προφίλ έκφρασης των ισομορφών TAp73 και ΔNp73 σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από πρότυπες, ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα και σε πρωτοπαθείς όγκους ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

2.1.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τυπικές κυτταρικές σειρές από καρκίνο του ανθρώπου, οι οποίες λήφθηκαν από την American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Αυτές οι κυτταρικές σειρές αντιπροσωπεύουν διακριτούς ιστολογικούς τύπους καρκίνου του πνεύμονα (Πίνακας 2.1). Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM που είχε συμπληρωθεί με 10% v/v ορού εμβρύου βοός (FBS, Foetal Bovine Serum) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Όλα τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 37 °C, σε 5% CO₂.

Πίνακας 2.1: Κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη και ο ιστολογικός τύπος τους

Κυτταρικές σειρές	Ιστολογικός τύπος
HNBE	Φυσιολογικός ινοβλάστης
CCL-171	Εμβρυϊκός ινοβλάστης πνεύμονα
IMR-90	Εμβρυϊκός ινοβλάστης πνεύμονα
CALU-6	Αναπλαστικό καρκίνωμα πνευμονικού επιθηλίου
DMS-53	Μικροκυτταρικό καρκίνωμα
CRL-5802	Πνευμονικό καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων
HTB-182	Πνευμονικό καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων
HTB-58	Πνευμονικό καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων
HTB-59	Πνευμονικό καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων
SKMES-1	Πνευμονικό καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων
A549	Αδενοκαρκίνωμα
CALU-3	Αδενοκαρκίνωμα
CRL-5935	Αδενοκαρκίνωμα
SKLU-1	Αδενοκαρκίνωμα
CORL-23	Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα

2.1.1.1 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ: ΑΠΟΨΥΞΗ, ΑΡΑΙΩΣΗ ΚΑΙ ΚΡΥΟΦΥΛΑΞΗ

A) Απόψυξη αποθεμάτων (stock) κυττάρων που φυλάσσονται σε υγρό άζωτο

Τα κύτταρα αποψύχονται αφού μεταφερθούν από τους $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (υγρό άζωτο) στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (υδατόλουτρο). Στη συνέχεια με φυγοκέντρηση στις 2500 rpm σε θερμοκρασία δωματίου, αφαιρείται το υγρό κατάψυξης το οποίο περιέχει την τοξική ουσία διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύεται σε 1 ml DMEM και προστίθεται σε φλάσκα των 75 cm^2 μαζί με 20 ml θρεπτικού υλικού, συμπληρωμένο με 10% FBS και μεταφέρεται σε επωαστικό θάλαμο ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 95% υγρασία). Για την εξασφάλιση σωστών συνθηκών ανάπτυξης, το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται κάθε 2-3 ημέρες.

B) Αραίωση κυττάρων της κυτταροκαλλιέργειας

Όταν τα κύτταρα πολλαπλασιαστούν και καλύψουν την επιφάνεια της φλάσκας σταματούν να αναπτύσσονται και απαιτείται αραίωση για τη συνέχιση της ανάπτυξής τους. Αναλυτικότερα, αφού αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό από την φλάσκα, τα κύτταρα εκπλένονται με διάλυμα 1xPBS, προστίθενται 5 ml διαλύματος θρυψίνης 0,01% κ.ό και μεταφέρεται ξανά στον επωαστικό θάλαμο 10-15 λεπτά, ώστε να ολοκληρωθεί η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας. Στη συνέχεια, προστίθενται περίπου 5 ml θρεπτικού υλικού με ορό, ώστε να ανασταλεί η δράση της θρυψίνης και το περιεχόμενο της φλάσκας μεταφέρεται σε σωληνάριο των 30 ml τύπου Universal και φυγοκεντρείται σε 2500 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, ενώ το ίζημα αναδιαλύεται σε 1 ml DMEM και διανέμεται σε 2-4 φλάσκες που περιέχουν DMEM συμπληρωμένο με 10% v/v FBS. Όλες οι φλάσκες τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο και το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται κάθε 2-3 ημέρες.

Γ) Κρυοφύλαξη κυτταρικών σειρών

Για την κρυοφύλαξη των κυττάρων ακολουθείται η ίδια διαδικασία, όπως για την αραίωση με τη διαφορά ότι μετά την φυγοκέντρηση και την αφαίρεση του υπερκείμενου, το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύεται σχολαστικά σε 1 ml υγρό κατάψυξης και τοποθετείται σε κρυοσωληνάρια. Τα κρυοσωληνάρια καταψύχονται σταδιακά (20 min στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24-48 ώρες στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ και στη συνέχεια φυλάσσονται σε υγρό άζωτο, $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.1.1.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΜΕ ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση διαφόρων παραγόντων στην έκφραση των ισομορφών του γονιδίου *p73*, κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν παρουσία των παραγόντων αυτών σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας. Συγκεκριμένα, οι κυτταρικές σειρές CRL5802 και A549 αναπτύχθηκαν σε τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας διαμέτρου 60 mm που περιείχε θρεπτικό υλικό DMEM: F12 με L-γλουταμίνη και 10% FBS. Όταν τα κύτταρα κάλυψαν το 60-70% της επιφάνειας του τρυβλίου, στο θρεπτικό υλικό προστέθηκε ο απομεθυλιωτικός παράγοντας 5-αζα-2-δεοξυκυτιδίνη (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με τον αναστολέα αποακετυλάσης ιστονών τριχοστατίνη A (TSA) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO), σε συγκέντρωση 100 nM και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες ακόμα. Στη συνέχεια, απομονώθηκε mRNA από τα επεξεργασμένα κύτταρα.

Επιπρόσθετα, προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση της μιθραμυκίνης A (αναστολέας του μεταγραφικού παράγοντα Sp1) στην έκφραση των ισομορφών του γονιδίου *p73*, τα κύτταρα της κυτταρικής σειράς A549 αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό και όταν τα κύτταρα κάλυψαν το 60-70% της επιφάνειας του τρυβλίου, προστέθηκαν 50-400 nM μιθραμυκίνης A. Μετά από 48 ώρες, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολούθησε εκχύλιση ολικών πρωτεϊνών.

2.1.2 ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΙ ΙΣΤΟΙ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Για αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο ξεχωριστές ομάδες πρωτοπαθών όγκων που είχαν αφαιρεθεί από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Η πρώτη ομάδα αποτελούνταν από όγκους από 102 ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, οι οποίοι λήφθηκαν στο Νοσοκομείο Liverpool Heart and Chest Hospital, στο Λίβερπουλ του Ηνωμένου Βασιλείου. Μπόρεσαν να ληφθούν οι αντίστοιχοι φυσιολογικοί ιστοί πνεύμονα για 38 από αυτούς τους ασθενείς. Οι 56 από τους ασθενείς ήταν άνδρες, ενώ οι 46 ήταν γυναίκες και το εύρος ηλικίας τους κυμαινόταν μεταξύ 49 και 81 ετών (μέση τιμή 64 έτη). Πενήντα τρεις από τους όγκους αυτούς ήταν αδenoκαρκινώματα, ενώ οι υπόλοιποι 49 ήταν καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων. Η δεύτερη ομάδα αποτελούνταν από δείγματα πρωτοπαθών όγκων και των αντίστοιχων φυσιολογικών ιστών τους, τα οποία προέρχονταν από 26 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, 18 άνδρες και 8 γυναίκες. Από τους 26 ασθενείς, οι 19 είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο εκ πλακωδών κυττάρων, ενώ οι υπόλοιποι 7 με

αδενοκαρκίνωμα. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 68,6 έτη. Όλοι οι παραπάνω ασθενείς υποβλήθηκαν σε χειρουργική εκτομή όγκου στο κέντρο Cardiothoracic Centre of Broadgreen, στο Λίβεπουλ του Ηνωμένου Βασιλείου. Πραγματοποιήθηκε ανατομή όλων των ιστών από παθολογοανατόμο εντός 30 min από τη χειρουργική εκτομή και οι ιστοί φυλάχθηκαν αμέσως σε καταψύκτη των -80 °C. Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Liverpool Ethics και όλοι οι ασθενείς είχαν δώσει έγγραφη συγκατάθεση κατόπιν ενημέρωσης σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Helsinki (Declaration of Helsinki).

2.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ DNA

2.2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Το DNA εκχυλίστηκε από πρωτοπαθείς όγκους, χρησιμοποιώντας τομές 20×40 μm, οι οποίες είχαν προετοιμαστεί από κατεψυγμένο ιστό. Η πρώτη και η τελευταία τομή ελέγχθηκαν από παθολογοανατόμο, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι το περιεχόμενο του δείγματος σε κύτταρα όγκου ήταν τουλάχιστον 80%. Η εκχύλιση του DNA από τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με το κιτ DNeasy kit (πρωτόκολλο για 96 πηγάδια) (Qiagen, Hilden, Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή. Αναλυτικά, ο ιστός υποβλήθηκε σε λύση με 360 μl αντιδραστηρίου ATL και 40 μl διαλύματος πρωτεϊνάσης K και επώαστηκε σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο στους 55 °C κατά τη διάρκεια της νύχτας, υπό ανάδευση σε 200 rpm. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 820 μl ρυθμιστικού διαλύματος AL το οποίο είχε αναμειχθεί προηγουμένως με αιθανόλη. Τα προϊόντα της λύσης μεταφέρθηκαν σε πλάκες 96 πηγαδιών που περιείχαν μεμβράνες με βάση οξείδιο του πυριτίου, οι οποίες μπορούν να δεσμεύουν DNA, και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 4000 × g για 10 min. Στη συνέχεια, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε πλύση με 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης AW1 και φυγοκεντρήθηκαν σε 4000 × g για 10 min. Ακολούθησε δεύτερη πλύση των δειγμάτων με προσθήκη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης AW2 και φυγοκέντρωση σε 4000 × g για 10 min. Τέλος, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 55 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης AE, το οποίο είχε προθερμανθεί στους 60 °C και το DNA κάθε δείγματος ανακτήθηκε από τη μεμβράνη με φυγοκέντρωση σε 4000 × g για 5 min.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την εκχύλιση DNA από κυτταρικές σειρές, χρησιμοποιήθηκε το κιτ DNeasy kit (πρωτόκολλο φυγοκέντρησης στηλών) (Qiagen, Hilden, Germany). Συνοπτικά, περίπου 5×10^6 κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν σε $300 \times g$ για 5 λεπτά και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 200 μl PBS. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 20 μl πρωτεΐνάσης K και 4 μl RNάσης A (100 mg/ml) και το προϊόν της λύσης αναμειχθηκε σε ανακινήτηρα τύπου vortex και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Κατόπιν, προστέθηκαν 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος AL και το προϊόν της λύσης αναμειχθηκε σε ανακινήτηρα τύπου vortex και επώαστηκε σε θερμοκρασία 56 °C για 10 λεπτά. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 200 μl αιθανόλης (καθαρότητας 96–100%) και ακολούθησε ανάμειξη σε ανακινήτηρα τύπου vortex. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε στήλη φυγοκέντρησης DNeasy Mini spin column (η οποία φέρει μια μεμβράνη με βάση το οξείδιο του πυριτίου). Η στήλη τοποθετήθηκε σε ένα σωληνάριο συλλογής των 2 ml και φυγοκεντρήθηκε σε $6000 \times g$ για 1 min. Κατόπιν, προστέθηκαν 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης AW1 και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε $6000 \times g$ για 1 min. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος AW2 και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε $20.000 \times g$ για 3 min, ώστε να στεγνώσει η μεμβράνη DNeasy. Η στήλη φυγοκέντρησης DNeasy mini spin column τοποθετήθηκε σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρου του 1,5 ml και το DNA ανακτήθηκε με προσθήκη 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος AE και φυγοκέντρηση σε $6000 \times g$ για 1 min. Η ποιότητα και η ποσότητα του DNA εκτιμήθηκαν με φασματοφωτομετρία σε μήκος κύματος 260/280 nm.

2.2.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ DNA

2.2.2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ DNA ΜΕ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΟ ΝΑΤΡΙΟ

Προκειμένου να προσδιοριστεί η κατάσταση μεθυλίωσης των διαφορετικών υποκινητών, καθώς και των μεταθετονίων που εξετάστηκαν σε αυτή τη μελέτη, τα δείγματα DNA υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με δισουλφιδικό νάτριο. Συγκεκριμένα, 1 μg DNA από δείγματα ιστών υποβλήθηκε σε επεξεργασία με δισουλφιδικό νάτριο, χρησιμοποιώντας το κιτ EZ-96 DNA Methylation-Gold™ Kit, (μορφή ρηχών πηγαδιών) (ZymoResearch, CA, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Πριν από τη χρήση του κιτ, παρασκευάστηκε το αντιδραστήριο μετατροπής CT Conversion Reagent, με ανάμειξη 7,88 ml νερού, 440 μl ρυθμιστικού διαλύματος M-Dissolving Buffer και 2,63 ml ρυθμιστικού διαλύματος M-Dilution buffer. Κατόπιν,

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

το αντιδραστήριο αυτό αναμείχθηκε σε ανακινητήρα, σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης M-Wash Buffer παρασκευάστηκε με προσθήκη 144 ml αιθανόλης 100% σε 36 ml συμπυκνωμένου διαλύματος πλύσης M-Wash Buffer. Ποσότητα 130 μ l του αντιδραστηρίου μετατροπής CT Conversion Reagent προστέθηκε σε 20 μ l (1 μ g) κάθε δείγματος DNA σε μια πλάκα μετατροπής (Conversion Plate) και τα δείγματα αναμείχθηκαν με αναρρόφηση με την πιπέτα και έκχυση ξανά στο σωληνάριο του δείγματος. Η πλάκα σφραγίστηκε, μεταφέρθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή και πραγματοποιήθηκαν τα ακόλουθα βήματα: 98 °C για 10 λεπτά, 64 °C για 2,5 ώρες. Στη συνέχεια, τα δείγματα από την πλάκα μετατροπής (Conversion Plate) μεταφέρθηκαν στα πηγάδια της πλάκας δέσμησης Silicon-A™ Binding Plate η οποία στερεώθηκε σε μια πλάκα συλλογής (Collection Plate) και προστέθηκαν 400 μ l διαλύματος δέσμησης M-Binding Buffer. Η πλάκα φυγοκεντρήθηκε σε 3000 \times g για 5 min και το υγρό απορρίφθηκε. Κατόπιν, σε κάθε πηγάδι της πλάκας προστέθηκαν 400 μ l ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης M-Wash Buffer και η πλάκα φυγοκεντρήθηκε σε 3000 \times g για 5 min. Σε κάθε πηγάδι προστέθηκαν 200 μ l ρυθμιστικού διαλύματος M-Desulphonation Buffer και η πλάκα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min. Μετά την επώαση, φυγοκεντρήθηκε σε 3000 \times g για 5 min και το υγρό απορρίφθηκε. Σε κάθε πηγάδι της πλάκας προστέθηκαν 400 μ l ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης M-Wash Buffer, η πλάκα φυγοκεντρήθηκε σε 3000 \times g για 5 min και το υγρό απορρίφθηκε. Προστέθηκαν ξανά 400 μ l ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης M-Wash Buffer στην πλάκα και η πλάκα φυγοκεντρήθηκε σε 3,000 \times g για 10 min. Στη συνέχεια, η πλάκα δέσμησης Silicon-A™ Binding Plate τοποθετήθηκε πάνω σε μια πλάκα έκλουσης (Elution Plate) και προστέθηκαν 35 μ l ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης M-Elution Buffer σε κάθε πηγάδι. Μετά από 5 min, η πλάκα έκλουσης, στην οποία είχε τοποθετηθεί η πλάκα δέσμησης φυγοκεντρήθηκε σε 3000 \times g για 3 min, ώστε να εκλουσθεί το DNA. Για κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 3 μ l DNA επεξεργασμένου με δισουλφιδικό νάτριο.

Για τις κυτταρικές σειρές, 1 μ g DNA υποβλήθηκε σε επεξεργασία με δισουλφιδικό νάτριο με χρήση του kit EZ DNA Methylation-Gold Kit™ (Zymo Research) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Συγκεκριμένα, το αντιδραστήριο μετατροπής CT Conversion Reagent παρασκευάστηκε πριν από τη χρήση του kit με προσθήκη 900 μ l ddH₂O (απιονισμένο και απεσταγμένο νερό), 50 μ l ρυθμιστικού διαλύματος M-Dissolving Buffer και 300 μ l ρυθμιστικού διαλύματος M-

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Dilution Buffer σε ένα σωληνάριο του αντιδραστηρίου μετατροπής CT Conversion Reagent. Το μείγμα διαλυτοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου με σύντομες αναδεύσεις, ανά διαστήματα, σε ανακινήτηρα τύπου vortex για χρονικό διάστημα 10 min. Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης M-Wash Buffer παρασκευάστηκε με προσθήκη 24 ml αιθανόλης 100% σε συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης M-Wash Buffer. Σε ένα σωληνάριο PCR, προστέθηκαν 130 μ l από το διάλυμα αντιδραστηρίου μετατροπής CT Conversion Reagent προστέθηκαν και 20 μ l δείγματος DNA (1 μ g) από την κάθε κυτταρική σειρά και το δείγμα αναμείχθηκε με αναρρόφηση με την πιπέτα και έκχυση ξανά στο σωληνάριο. Το σωληνάριο δείγματος τοποθετήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή και πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω βήματα: 98 °C για 10 min, 64 °C για 2,5 ώρες. Μετά την επώαση, το δείγμα φορτώθηκε σε στήλη Zymo-Spin IC™ η οποία περιείχε 600 μ l ρυθμιστικού διαλύματος δέσμευσης M-Binding Buffer και η στήλη τοποθετήθηκε σε σωληνάριο συλλογής το οποίο περιλαμβάνεται στο κιτ. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε σε $>10.000 \times g$ για 30 δευτερόλεπτα και το υγρό απορρίφθηκε. Στη στήλη προστέθηκαν 100 μ l ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης M-Wash Buffer και η στήλη φυγοκεντρήθηκε σε $>10.000 \times g$ για 30 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200 μ l ρυθμιστικού διαλύματος M-Desulphonation και η στήλη επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15-20 min. Μετά την επώαση, η στήλη φυγοκεντρήθηκε σε $>10.000 \times g$ για 30 δευτερόλεπτα και το υγρό απορρίφθηκε. Στη στήλη προστέθηκαν 200 μ l ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης M-Wash Buffer και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε $>10.000 \times g$ για 30 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν ξανά στη στήλη 200 μ l ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης M-Wash και η στήλη φυγοκεντρήθηκε σε $>10.000 \times g$ για 2 min, ώστε να διασφαλιστεί η πλήρης αφαίρεση ιχνών αλκοόλης. Στο τέλος, προστέθηκαν 10 μ l ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης M-Elution Buffer απευθείας στη μήτρα της στήλης και η στήλη τοποθετήθηκε σε σωληνάριο τύπου eppendorf του 1,5 ml και υποβλήθηκε σε σύντομη φυγοκέντρηση σε $>10.000 \times g$, ώστε να εκλουσθεί το DNA. Για κάθε αντίδραση PCR, χρησιμοποιήθηκαν 3 μ l DNA επεξεργασμένου με δισουλφιδικό νάτριο.

2.2.2.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΜΕΣΩ ΠΥΡΟΦΩΣΦΟΡΙΚΟΥ (PYROSEQUENCING)

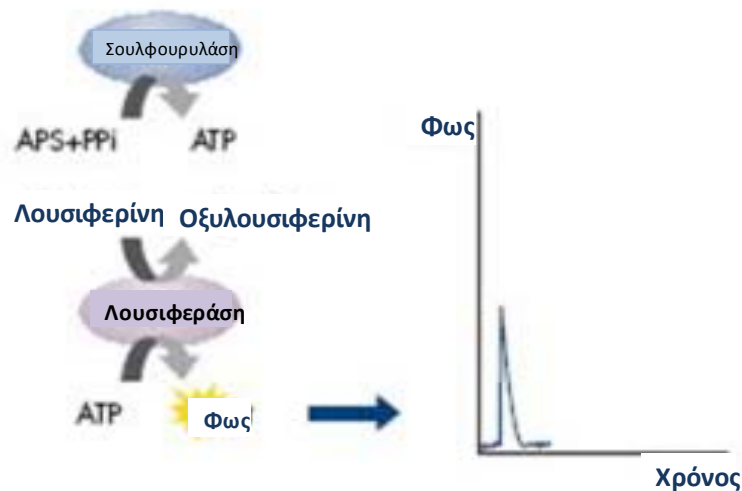
Η μέθοδος Pyrosequencing (PSQ) είναι μια μέθοδος προσδιορισμού αλληλουχίας για την ταυτοποίηση αλληλουχιών DNA μικρού μήκους με υψηλή απόδοση και πιστότητα. Η διαδικασία διακρίνεται σε δύο μέρη: την παρασκευή των δειγμάτων των οποίων η αλληλουχία πρόκειται να προσδιοριστεί και την ανάλυση σε σύστημα Pyrosequencer.

Στο πρώτο μέρος της διαδικασίας, η αλληλουχία-στόχος του DNA ενισχύεται με αντίδραση PCR, χρησιμοποιώντας κατάλληλους υποκινητές που δημιουργούνται στο λογισμικό pyrosequencing. Ένας από τους δύο υποκινητές είναι βιοτινυλιωμένος. Μετά τον έλεγχο της ποιότητας του προϊόντος της αντίδρασης PCR σε πήκτωμα αγαρόζης, στα προϊόντα της αντίδρασης PCR προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης που περιέχει σφαιρίδια σεφαρόζης-στρεπταβιδίνης και, στη συνέχεια, τα δείγματα αναμειγνύονται και μεταφέρονται σε μια πλάκα PSQ 966 πηγαδιών. Με τη βοήθεια ενός εργαλείου που δημιουργεί κενό, τα σφαιρίδια, στα οποία έχει δεσμευτεί το προϊόν της αντίδρασης PCR συγκρατούνται σε ένα φίλτρο. Τα σφαιρίδια υποβάλλονται σε σχολαστική πλύση με αιθανόλη, NaOH και ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. Το διάλυμα NaOH αποδιατάσσει και διαχωρίζει τους κλώνους DNA, ενώ το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης εξουδετερώνει το φορτίο του ακινητοποιημένου κλώνου. Κατά συνέπεια, στο τέλος της παραπάνω διαδικασίας, μέσα στο εργαλείο απομένουν μόνο τα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης με τον βιοτινυλιωμένο κλώνο του προϊόντος της αντίδρασης PCR. Στη συνέχεια, το DNA αποδεσμεύεται από τα σφαιρίδια σε μία νέα πλάκα PSQ 96 πηγαδιών με τη βοήθεια του ρυθμιστικού διαλύματος υβριδοποίησης, το οποίο περιέχει τους εκκινητές αλληλούχισης.

Το δεύτερο μέρος της τεχνικής πραγματοποιείται στο όργανο 96MA Pyrosequencer (Qiagen, Hilden, Germany). Στο μείγμα που περιέχει τη μήτρα του DNA και τον εκκινητή αλληλούχισης, προστίθενται τα ένζυμα DNA πολυμεράση, ATP σουλφουρυλάση, λουσιφεράση και απυράση, καθώς και τα υποστρώματα 5' φωσφοσουλφική αδενοσίνη (APS, adenosine phosphosulfate) και λουσιφερίνη. Το πρώτο από τα τέσσερα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTP) εισάγεται στο μείγμα αντίδρασης. Η DNA πολυμεράση καταλύει την ενσωμάτωση του πρώτου νουκλεοτιδίου dNTP στον κλώνο DNA, εάν αυτό είναι συμπληρωματικό με τη βάση του κλώνου της μήτρας. Κάθε συμβάν ενσωμάτωσης συνοδεύεται από την

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

απελευθέρωση πυροφωσφορικού (PPi), η ποσότητα του οποίου είναι ισομοριακή με την ποσότητα του νουκλεοτιδίου που ενσωματώνεται. Η ATP σουλφουράση μετατρέπει το Ppi σε ATP παρουσία APS. Αυτό το μόριο ATP χρησιμοποιείται από το ένζυμο λουσιφεράση για τη μετατροπή της λουσιφερίνης σε οξυλουσιφερίνη. Η οξυλουσιφερίνη παράγει ορατό φως, η ποσότητα του οποίου είναι ανάλογη της ποσότητας του ATP. Το φως που παράγεται στην αντίδραση που καταλύεται από τη λουσιφεράση ανιχνεύεται με μία κάμερα συζευγμένου φορτίου (CCD, charge coupled device) και παρουσιάζεται ως μία κορυφή σε ένα χαρακτηριστικό γράφημα (pyrogram). Το ύψος κάθε κορυφής (φωτεινό σήμα) είναι ανάλογο του αριθμού των νουκλεοτιδίων που ενσωματώνονται (Εικόνα 2.1).



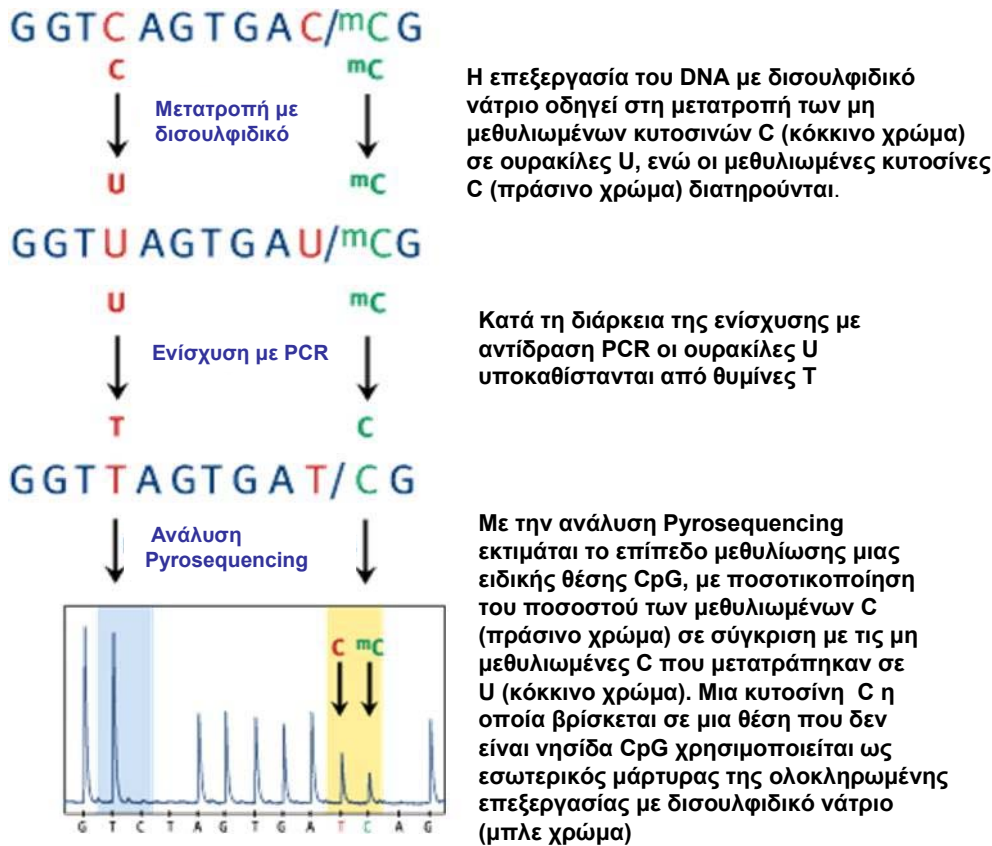
Εικόνα 2.1: Αρχή μεθόδου *pyrosequencing*. Η ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων δημιουργεί φωτεινό σήμα το οποίο παρουσιάζεται ως κορυφή στο πρόγραμμα του *Pyrosequencer* (προσαρμογή από τη διαδικτυακή τοποθεσία www.qiagen.com)

Η απυράση, ένα ένζυμο αποικοδόμησης νουκλεοτιδίων, αποικοδομεί συνεχώς τα μόρια ATP και τα μη ενσωματωμένα μόρια dNTP. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της παραγωγής φωτεινού σήματος και την αναγέννηση του διαλύματος της αντίδρασης. Στη συνέχεια, προστίθεται το επόμενο μόριο dNTP. Προστίθεται ένα μόριο dNTP κάθε φορά. Καθώς η διαδικασία συνεχίζεται, συντίθεται ο συμπληρωματικός κλώνος DNA και η νουκλεοτιδική αλληλουχία προσδιορίζεται από τις κορυφές που εμφανίζονται στο διάγραμμα (pyrogram).

Η τεχνική *Pyrosequencing* βρίσκει εφαρμογές στον προσδιορισμό γενετικών παραλλαγών (SNPs, απλότυπους), σε ανίχνευση μεταλλάξεων (σημειακές

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

μεταλλάξεις, προσθήκες/αφαιρέσεις βάσεων), σε ποσοτικοποιήσεις (ποσοτικοποίηση συχνότητας αλληλομόρφων, απώλεια ετεροζυγωτίας, μεθυλίωση νησίδων CpG) και σε προσδιορισμούς αλληλουχίας (καθορισμός ιικού/βακτηριακού τύπου, έλεγχος κλώνων, ταυτοποίηση αλληλουχίας). Σε αυτή τη διατριβή, η τεχνική pyrosequencing χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση μεθυλίωσης. Συγκεκριμένα, το γενωμικό DNA υποβάλλεται σε χημική επεξεργασία με δισουλφιδικό νάτριο, κατά την οποία η μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη (C) να μετατρέπεται σε ουρακίλη (U), ενώ η μεθυλιωμένη κυτοσίνη (^mC) παραμένει αμετάβλητη. Με χρήση αντίδρασης ενίσχυσης PCR, η ουρακίλη (U) γίνεται θυμίνη (T), ενώ η μεθυλιωμένη κυτοσίνη (^mC) γίνεται κυτοσίνη (C) στο προϊόν ενίσχυσης. Με αυτό τον τρόπο, επιτυγχάνεται η διάκριση μεταξύ ^mC και C (Εικόνα 2.2). Ο δείκτης μεθυλίωσης (MI) υπολογίζεται ως ο μέσος όρος του ποσοστού (%) μεθυλιωμένων κυτοσινών [^mC/(^mC+C)] σε όλες τις νησίδες CpG που εξετάστηκαν στις περιοχές-στόχους των υποκινητών.



Εικόνα 2.2: Παράδειγμα ποσοτικού προσδιορισμού της μεθυλίωσης μιας αλληλουχίας DNA. Η αλληλουχία υποβάλλεται σε χημική μετατροπή με επεξεργασία με δισουλφιδικό και σε ενίσχυση με αντίδραση PCR. Στη συνέχεια, με pyrosequencing, η μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη (C) μετράται ως ποσοστό T στη νησίδα CpG και η μεθυλιωμένη κυτοσίνη (^mC) μετράται ως ποσοστό C στη νησίδα CpG (προσαρμογή από τη διαδικτυακή τοποθεσία www.qiagen.com).

2.2.2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΚΙΝΗΤΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ p73

Σε αυτή τη μελέτη εξετάστηκε η κατάσταση μεθυλίωσης των υποκινητών P1 και P2 του γονιδίου p73. Αρχικά, προσδιορίστηκαν οι περιοχές που είναι πλούσιες σε CpG και στους δύο υποκινητές P1, P2 του γονιδίου p73 με το πρόγραμμα αναζήτησης CpG island searcher (<http://cpgislands.usc.edu/>). Για τον υποκινητή P1, επιλέχθηκε μια περιοχή-στόχος ανοδικά του εξωνίου 1, η οποία περιέχει 8 νησίδες CpG, ενώ για τον υποκινητή P2 επιλέχθηκε μια περιοχή-στόχος η οποία περιέχει 6 νησίδες CpG ανοδικά του εναλλακτικού εξωνίου 3'. Για την ανάλυση μεθυλίωσης με

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

pyrosequencing, σχεδιάστηκαν οι παρακάτω υποκινητές με τη βοήθεια του λογισμικού Assay Design Software (Biotage, Uppsala, Sweden) (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2: Εκκινητές που σχεδιάστηκαν με το λογισμικό Assay Design Software για την ανάλυση του ποσοστού μεθυλίωσης των υποκινητών P1 και P2 με pyrosequencing. BIO: βιοτινυλιωμένο άκρο.

Υποκινη- τής	Εκκινητής Forward (5'→3')	Εκκινητής Reverse (5'→3')	Εκκινητής αλληλούχισης (5'→3')
P1	GGTTATATTTTTTGTTTTTTGGGA	BIO-ACCCATCTTTCCTAACACC	GTTTTTTGGATTTTAAG
P2	AGGAGTTTTGGTGGGTTTAATTAT	BIO- CCCACCCCTTTATTCCTC	GGTGGGTTTAATTATGG

Για την ενίσχυση με αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 50 ng γενωμικού DNA επεξεργασμένου με δισουλφιδικό νάτριο, 5 μM από κάθε εκκινητή και μείγμα GoTaq mix (Promega, Madison, WI) σε όγκο αντίδρασης 25 μl. Το θερμικό προφίλ για κάθε υποκινητή παρουσιάζεται στον παρακάτω Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3: Θερμικό προφίλ ενίσχυσης υποκινητών P1 και P2 του γονιδίου p73 με αντίδραση PCR

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αρ. κύκλων
Ενεργοποίηση Taq	95 °C	5 min	
Αποδιάταξη	94 °C	30 sec	
Υβριδοποίηση	51 °C	45 sec	40
Επιμήκυνση	72 °C	45 sec	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	

Η ποιότητα και η ποσότητα του προϊόντος PCR αξιολογήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (2%) πριν από την ανάλυση Pyrosequencing.

2.2.2.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΘΕΤΟΝΙΟΥ LINE-1

Προκειμένου να προσδιοριστεί η κατάσταση μεθυλίωσης του μεταθετονίου LINE-1 στους πρωτοπαθείς όγκους NSCLC χρησιμοποιήθηκε ως στόχος η αλληλουχία LINE-1.2 (Genebank accession no M80343). Αυτή η αλληλουχία επιλέχθηκε ειδικά επειδή ανήκει σε οικογένεια ενεργών ρετρομεταθετών στοιχείων και υπάρχουν δημοσιευμένα δεδομένα σχετικά με την ικανότητά τους να πραγματοποιούν ρετρομετάθεση [75]. Για την ανάλυση μεθυλίωσης του στοιχείου LINE-1.2, αρχικά προσδιορίστηκαν περιοχές που είναι πλούσιες σε CpG με τη βοήθεια του προγράμματος αναζήτησης νησίδων CpG, CpG island searcher (<http://cpgislands.usc.edu/>). Επιλέχθηκε μια περιοχή-στόχος στο 5' άκρο του εσωτερικού υποκινητή η οποία περιλάμβανε 6 νησίδες CpG. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Assay Design Software (Biotage, Uppsala, Sweden) και συντέθηκαν από την Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Πίνακας 2.4).

Πίνακας 2.4: Εκκινητές που σχεδιάστηκαν με το λογισμικό Assay Design Software για την ανάλυση του ποσοστού μεθυλίωσης του μεταθετονίου LINE-1 με pyrosequencing. BIO: βιοτινυλιωμένο άκρο.

Υποκινη- τής	Εκκινητής Forward (5'→3')	Εκκινητής Reverse (5'→3')	Εκκινητής αλληλούχισης (5'→3')
LINE-1	BIO-TAGGGAGTGTTAGATAGTGG	AACTCCCTAACCCCTTAC	CAAATAAAACAATACCTC

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του στόχου με αντίδραση PCR, χρησιμοποιώντας το κιτ Qiagen HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Hilden, Germany), 5 μM βιοτινυλιωμένου εκκινητή, 10 μM μη βιοτινυλιωμένου εκκινητή και 3 μl (περίπου 60 ng) DNA επεξεργασμένου με δισουλφιδικό νάτριο. Προκειμένου να αποφευχθεί η παρουσία τυχόν υπολειμμάτων βιοτινυλιωμένου εκκινητή, η οποία θα μπορούσε πιθανόν να προκαλέσει προβλήματα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης pyrosequencing, χρησιμοποιήθηκε περίσσεια μη βιοτινυλιωμένου εκκινητή. Για τον ίδιο λόγο, χρησιμοποιήθηκαν πολλοί κύκλοι αντίδρασης PCR (40 κύκλοι). Το θερμικό προφίλ της ενίσχυσης του LINE-1 παρουσιάζεται στον παρακάτω Πίνακα 2.5.

Πίνακας 2.5: Θερμικό προφίλ ενίσχυσης LINE-1 με αντίδραση PCR

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αρ. κύκλων
Ενεργοποίηση Taq	95 °C	5 min	
Αποδιάταξη	94 °C	30 sec	
Υβριδοποίηση	58 °C	45 sec	40
Επιμήκυνση	72 °C	45 sec	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	

2.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ RNA

2.3.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA

Η εκχύλιση RNA από ιστούς και κυτταρικές σειρές πραγματοποιήθηκε με χρήση του κιτ RNeasy kit (πρωτόκολλο πέψης με DNάση) (Qiagen, Hilden, Germany). Περίπου $<5 \times 10^6$ κύτταρα κατακρημνίστηκαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν με προσθήκη 350 μ l ρυθμιστικού διαλύματος λύσης RLT και ανάδευση σε ανακινήτρια τύπου vortex. Το προϊόν της λύσης μεταφέρθηκε σε στήλη φυγοκέντρησης QIAshredder, η οποία τοποθετήθηκε σε σωληνάριο συλλογής των 2 ml και φυγοκεντρήθηκε σε $8000 \times g$ για 2 min. Κατόπιν, προστέθηκαν 350 μ l διαλύματος αιθανόλης 70% v/v και το μείγμα αναμείχθηκε καλά με πιπέτα, ωσότου γίνει ομογενές. Κατόπιν, 700 μ l από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν σε στήλη φυγοκέντρησης Rneasy, η οποία τοποθετήθηκε σε σωληνάριο συλλογής των 2 ml και φυγοκεντρήθηκε σε $8000 \times g$ (10,000 rpm) για 15 sec. Στη στήλη φυγοκέντρησης RNeasy προστέθηκαν 350 μ l ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης RW1 και η στήλη φυγοκεντρήθηκε σε $8000 \times g$ (10,000 rpm) για 15 sec. Κατόπιν, προστέθηκε μείγμα επώασης με DNάση I (10 μ l αποθεματικού διαλύματος DNάσης I και 70 μ l ρυθμιστικού διαλύματος RDD) απευθείας στη στήλη φυγοκέντρησης RNeasy και ακολούθησε επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Ποσότητα 350 μ l ρυθμιστικού διαλύματος RW1 προστέθηκαν στη στήλη φυγοκέντρησης RNeasy και η στήλη φυγοκεντρήθηκε σε $8000 \times g$ (10,000 rpm) για 15 sec. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 500 μ l ρυθμιστικού διαλύματος RPE στη στήλη φυγοκέντρησης RNeasy η οποία φυγοκεντρήθηκε σε $8000 \times g$ (10,000 rpm) 15 sec. Ύστερα, προστέθηκαν 500 μ l ρυθμιστικού διαλύματος RPE στη στήλη φυγοκέντρησης RNeasy και η στήλη φυγοκεντρήθηκε σε $8000 \times g$ (10,000 rpm) για 2 min. Η στήλη τοποθετήθηκε σε καθαρό σωληνάριο τύπου eppendorf χωρίς

DNάσες/RNάσες, προστέθηκαν 50 μl νερού χωρίς DNάσες/RNάσες και η κάθε στήλη φυγοκεντρήθηκε σε $8000 \times g$ (10,000 rpm) για 1 min, προκειμένου να εκλουσθεί το RNA. Το προϊόν της έκλουσης διαχωρίστηκε σε κλάσματα και ένα από τα κλάσματα χρησιμοποιήθηκε για έλεγχο της ποιότητας και της ποσότητάς του σε αναλυτή Agilent (Agilent Technologies, CA, USA), ενώ τα υπόλοιπα κλάσματα RNA φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία -80°C για μελλοντική χρήση.

2.3.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ RNA ΜΕ ΤΟ KIT Agilent RNA 6000 Nano kit

Η ποιότητα και η ποσότητα του RNA αξιολογήθηκε με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση σε βιολογικό αναλυτή Agilent 2100 (Agilent Technologies, CA, USA). Συνοπτικά, 550 μl μήτρας πηκτώματος Agilent RNA 6000 Nanogel matrix τοποθετήθηκαν στο επάνω μέρος της υποδοχής ενός φίλτρου φυγοκέντρωσης. Το φίλτρο φυγοκέντρωσης φυγοκεντρήθηκε σε $1500 \times g \pm 20\%$ για 10 min και χρησιμοποιήθηκαν 65 μl φιλτραρισμένου πηκτώματος για κάθε chip. Στη συνέχεια, το συμπυκνωμένο διάλυμα χρώσης RNA 6000 Nano dye αναδεύτηκε σε ανακινήτηρα τύπου vortex, ώστε να γίνει ομογενές και 1 μl από αυτό το διάλυμα προστέθηκε σε ένα κλάσμα 65 μl φιλτραρισμένου πηκτώματος. Το μείγμα πηκτώματος και χρωστικής αναδεύτηκε σχολαστικά σε ανακινήτηρα τύπου vortex και φυγοκεντρήθηκε σε $13.000 \times g$, σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Κατόπιν, 9 μl μείγματος πηκτώματος-χρωστικής μεταφέρθηκαν με την πιπέτα στον πυθμένα ενός επισημασμένου πηγαδιού που βρισκόταν σε ένα RNA Nano chip. Το πήκτωμα και η χρωστική διαχύθηκαν σε ολόκληρο το chip υπό την πίεση αέρα, χρησιμοποιώντας σύριγγα για 30 δευτερόλεπτα. Μετά από 5 δευτερόλεπτα, το έμβολο της σύριγγας επέστρεψε αργά προς τα πίσω, ο σταθμός αρχικής πλήρωσης του chip ήταν ανοικτός και 9 μl του μείγματος πηκτώματος-χρωστικής μεταφέρθηκαν με την πιπέτα σε καθένα από τα επισημασμένα πηγάδια. Στη συνέχεια, 5 μl του δείκτη RNA 6000 Nano marker μεταφέρθηκαν με την πιπέτα στο πηγάδι που ήταν επισημασμένο με το σύμβολο του μοριακού δείκτη RNA, καθώς και σε καθένα από τα 12 πηγάδια δειγμάτων. Προκειμένου να αποδιαταχθούν τυχόν δευτεροταγείς δομές του RNA, ο μοριακός δείκτης RNA και τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία 70°C για 2 min προτού φορτωθούν στο chip. Στο πηγάδι με το σύμβολο του μοριακού δείκτη φορτώθηκε 1 μl μοριακού δείκτη RNA, ενώ σε καθένα από τα 12 πηγάδια δειγμάτων

φορτώθηκε 1 μl δείγματος. Το chip τοποθετήθηκε σε οριζόντια θέση στον κατάλληλο προσαρμογέα του ανακινητήρα τύπου vortex και αναδεύτηκε έντονα σε $100 \times g$ για 60 sec. Τελικά, το chip εισήχθη σε έναν βιολογικό αναλυτή Agilent 2100 και η ανάλυση ξεκίνησε εντός 5 min από την τοποθέτηση του chip.

2.3.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ cDNA

Για την παρασκευή cDNA από τα δείγματα όγκων ασθενών και τις κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκε το κιτ αντίστροφης μεταγραφής Quantitect (Qiagen, Hilden, Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή. Αυτό το κιτ επιλέχθηκε επειδή περιλαμβάνει ένα αρχικό βήμα αφαίρεσης του γενωμικού DNA (gDNA), ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα επιμόλυνσης του παραγόμενου cDNA από μεταφορά gDNA. Αναλυτικά, 1 μg RNA αναμείχθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα gDNA wipe-out buffer και νερό χωρίς RNάσες και επώαστηκε σε θερμοκρασία 42 °C για 2 min. Στη συνέχεια, στο δείγμα προστέθηκε αντίστροφη μεταγραφάση Quantiscrypt, ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης Quantiscrypt RT buffer και μείγμα εκκινητών αντίστροφης μεταγραφής RT primer mix. Το δείγμα αναμείχθηκε και επώαστηκε στους 42 °C για 30 min και, κατόπιν, ακολούθησε επώαση στους 95 °C για 3 min, ώστε να απενεργοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφάση Quantiscrypt.

2.3.4 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

Προκειμένου να διερευνηθεί το προφίλ έκφρασης των μεταγράφων TAp73 και ΔNp73 στις κυτταρικές σειρές και τους ιστούς ασθενών, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου που έχει τυποποιηθεί από την εταιρεία Applied Biosystems. Πιο αναλυτικά, σχεδιάστηκαν δοκιμές ποσοτικού PCR (qPCR) πραγματικού χρόνου Taqman χρησιμοποιώντας το λογισμικό Primer Express v 2.0 (Applied Biosystems, CA, USA) προκειμένου να μειωθεί ο χρόνος βελτιστοποίησης της αντίδρασης PCR. Η σύνθεση των εκκινητών πραγματοποιήθηκε από την Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Το 5' άκρο του ανιχνευτή σημάνθηκε με χρωστική FAM, ενώ το 3' άκρο σημάνθηκε με χρωστική TAMRA. Το μόριο ACTB-VIC (Applied Biosystems) χρησιμοποιήθηκε ως ενδογενής μάρτυρας. Επειδή ο ανιχνευτής του μορίου αυτού είναι σημασμένος με διαφορετική χρωστική (VIC) από τους ανιχνευτές των μορίων TAp73 και ΔNp73, χρησιμοποιήθηκε στο ίδιο

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

σωληνάριο αντίδρασης με τους προσδιορισμούς-στόχους. Κάθε αντίδραση ενίσχυσης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 10 µl κύριου μείγματος 2x TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), 900 nM από κάθε εκκινητή, 250 nM ανιχνευτή, 1 µl (250 nM) του ανιχνευτή του ενδογενούς μάρτυρα ACTB-VIC (Applied Biosystems, CA, USA) και 1 µl της αντίδρασης παραγωγής cDNA (περίπου 50 ng cDNA) σε γενικές συνθήκες (50 °C για 2 min, 95 °C για 10 min, 50 κύκλοι με [94 °C για 30 sec και 60 °C για 45 sec]) σε έναν αναλυτή PCR πραγματικού χρόνου, μοντέλο 7500 της Applied Biosystems. Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό 7500 Software v2.0.1 (Applied Biosystems, CA, USA). Τα επίπεδα RNA εκφράστηκαν ως σχετικές τιμές ποσοτικοποίησης (RQ, relative quantification) οι οποίες υπολογίστηκαν από τον τύπο $RQ=2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, όπου Ct: ο κύκλος στον οποίο το δείγμα υπερβαίνει το κατώφλι του σήματος (cycle threshold). Ως βαθμονομητής χρησιμοποιήθηκε η έκφραση των TAp73 και ΔNp73 στην κυτταρική σειρά A549. Όλα τα πειράματα qPCR πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν από ένα μεμονωμένο παρασκεύασμα από κάθε δείγμα ιστού ασθενούς ή κυτταρικής σειράς. Για τα μετάγραφα ΔNp73, επιλέχθηκαν εκκινητές που ενισχύουν ειδικά το προϊόν μεταγραφής του υποκινητή P2 και όχι τα μετάγραφα DTAp73 που προέρχονται από τον υποκινητή P1. Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των μεταγράφων TAp73 και ΔNp73 φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 2.6:

Πίνακας 2.6: Εκκινητές και ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των προϊόντων TAp73 και ΔN p73

Προϊόν ενίσχυσης	Εκκινητής Forward (5'→3')	Εκκινητής Reverse (5'→3')	Ανιχνευτής
TAp73	GGCTGCGACGGCTGCAGAGC	GCTCAGCAGATTGAACTGGGCCATG	
ΔNp73	GCCCCGATGTTCCCCAG	TTGAACTGGGCCGTGGC	FAM-TCACCGACGTACAGCATGGTAGGCG-TAMRA

2.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των δειγμάτων των ασθενών, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc.). Επιλέχθηκαν μη παραμετρικές δοκιμές, επειδή η δοκιμή Kolmogorov Smirnov κατέδειξε ότι η κατανομή κάθε παραμέτρου της μελέτης δεν ήταν κανονική, τόσο για τους ασθενείς

με καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων, όσο και για τους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα. Η δοκιμή Mann–Whitney χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση των διαφορών των επιπέδων έκφρασης του mRNA των τιμών TAp73 RQ και ΔNp73 RQ μεταξύ των δειγμάτων ασθενών με υπερμεθυλιωμένους και υπομεθυλιωμένους υποκινητές, καθώς επίσης και μεταξύ ομάδων δειγμάτων διαφορετικών ιστολογικών τύπων. Η τιμή P2 Mtl συσχετίσθηκε με την τιμή Mtl του υποκινητή του LINE-1 με τη χρήση της δοκιμής Spearman. Ως στατιστικά σημαντικά ορίστηκαν τα αποτελέσματα με $p < 0,05$.

2.5 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την ανάλυση του υποκινητή P1 του γονιδίου *tp73* χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό εργαλείο ConTra [76], ως εξής: Καθορίστηκε η κατεύθυνση του γονιδίου *tp73*. Συγκρίθηκαν όλα τα μετάγραφα *tp73* που έχουν καταχωριστεί στη βάση δεδομένων του Ensembl και επιλέχθηκε το μετάγραφο με το πλέον ανοδικό σημείο έναρξης της μεταγραφής (TSS, Transcription Start Site) [77]. Για την αρχική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν τμήματα 1kbp της στοίχισης UCSC multiz 28way 5000 των γενωμικών αλληλουχιών που είναι ομόλογες με τον υποκινητή P1 του γονιδίου *tp73*. Οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν με τη μήτρα V\$SP1_Q2_01 TRANSFAC Position Weight Matrix των μοτίβων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 με όριο αποκοπής (cut-off) πυρήνα 0,90 και όριο αποκοπής (cut-off) ομοιότητας μήτρας 0,75. Η στοίχιση των αλληλουχιών, καθώς και οι σχετικές πληροφορίες τους αναφορικά με τις πιθανές θέσεις δέσμευσης του παράγοντα Sp1 λήφθηκαν και προβλήθηκαν με το πρόγραμμα Jalview [78]. Στη συνέχεια, με το πρόγραμμα BioEdit [79], οι στοίχισεις εισήχθησαν σε πρόγραμμα Microsoft Word 2003 (<http://www.microsoft.com/>) για περαιτέρω επεξεργασία.

2.6 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

2.6.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Για την παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κυτταρικές σειρές, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας διαμέτρου 90 mm ωσότου καλύψουν ολόκληρη την επιφάνεια του τρυβλίου. Κατόπιν, τα κύτταρα συλλέγονται σε θερμοκρασία 0-4 °C ως εξής: τα κύτταρα εκπλένονται τρεις φορές με παγωμένο διάλυμα 1xPBS, προστίθενται 2-3 ml παγωμένου διαλύματος 1xPBS στο τρυβλίο, τα κύτταρα αποκολλώνται με τη βοήθεια ξύστρου και το εναιώρημα διαλύματος-κυττάρων μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου Universal. Το σωληνάριο φυγοκεντρείται σε 2500 rpm στους 4 °C, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αναδιαλύεται σε 300 µl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (lysis buffer) και μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου Eppendorf. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης είναι 20 mmol/L Tris (pH 7,6), 0,5% v/v Triton X-100TM, 250 mmol/L NaCl, 3 mmol/L EDTA, 3 mmol/L EGTA, 2 mmol/L ορθοβαναδικό νάτριο, 10 g/ml απροτινίνη, 10 g/ml λευπεπτίνη, 1 mmol/L διθειοθρεϊτόλη (DTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) και 10 g/ml PEFABLOC® (Roche Applied Science, Hague Road, IN, USA). Το προϊόν της αναδιάλυσης επωάζεται σε πάγο για 30 min. Στη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος τα σωληνάρια υποβάλλονται σε συχνές σύντομες αναδεύσεις σε ανακινητήρα τύπου vortex, ώστε να υποβοηθηθεί η λύση των κυττάρων. Κατόπιν, το προϊόν της λύσης φυγοκεντρείται σε 10.000 rpm, σε θερμοκρασία 4 °C για 10 min. Το υπερκείμενο διαχωρίζεται σε κλάσματα σε ειδική ψυχόμενη βάση στήριξης και φυλάσσεται σε καταψύκτη των -70 °C.

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (lysis buffer) χρησιμοποιούνται τα παρακάτω υλικά στις ποσότητες που υποδεικνύονται:

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Lysis buffer):

<i>Διάλυμα</i>	<i>Αρχική Συγκέντρωση</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>	<i>Για 50 ml</i>
Tris pH 7,5	1 M	20 mM	1 ml
Triton X-100 TM	100%	0,5 %	250 µl
NaCl	5 M	250 mM	2,5 ml
EGTA	0,5 M	3 mM	300 µl
EDTA	0,2 M	3 mM	750 µl
dH ₂ O		πλήρωση έως 50 ml	

Το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης φυλάσσεται στο ψυγείο και κάθε φορά προστίθενται οι αναστολείς στις παρακάτω συγκεντρώσεις:

<i>Αναστολέας</i>	<i>Αρχική Συγκέντρωση</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>	<i>Για 1 ml</i>
Pefablock TM	10 mg/ml	10 µg/µl	1 µl
Ορθοβαναδικό Na	500 mM	2 mM	20 µl
Απρωτινίνη	10 mg/ml	10 µg/µl	1 µl
Λευπεπτίνη	10 mg/ml	10 µg/µl	1 µl
DTT	1 M	1 mM	1 µl

Επίσης, στο διάλυμα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets) της Roche (Roche Applied Science, Hague Road, IN, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Συνήθως 1 δισκίο αναδιαλύεται σε 1 ml dH₂O (απιονισμένο νερό) και 20 µl από αυτό το αποθεματικό διάλυμα προστίθενται σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης.

2.6.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Για την παρασκευή πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κυτταρικές σειρές, τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας διαμέτρου 90 mm ωσότου καλύψουν ολόκληρη την επιφάνεια του τρυβλίου. Κατόπιν, τα κύτταρα συλλέγονται σε θερμοκρασία 0-4 °C ως εξής: τα κύτταρα εκπλένονται τρεις φορές με παγωμένο διάλυμα 1xPBS, προστίθενται 2-3 ml παγωμένου διαλύματος 1xPBS στο τρυβλίο, τα κύτταρα αποκολλώνται με τη βοήθεια ξύστρου και το εναιώρημα διαλύματος-κυττάρων μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου Universal. Το σωληνάριο φυγοκεντρείται σε 2500 rpm στους 4 °C και αφαιρείται το υπερκείμενο. Το ίζημα των κυττάρων ομογενοποιείται με τη βοήθεια ομογενοποιητή από γυαλί/Teflon σε υποτονικό ρυθμιστικό διάλυμα (25 mM Tris pH 7,5, 5 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT και 0,5 mM PMSF), συμπληρωμένο με αναστολείς πρωτεασών. Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 2500 rpm στους 4 °C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα, στο οποίο περιέχονται οι πυρήνες των κυττάρων, υποβάλλεται σε πλύση ως εξής: 4 ml ισοτονικού ρυθμιστικού διαλύματος (25 mM Tris pH 7,5, 5 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 1 mM PMSF και 0,2 mM σουκρόζη) προστίθενται στο ίζημα, το ίζημα αναδιαλύεται και φυγοκεντρείται σε 2500 rpm στους 4 °C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμα 2 φορές. Τελικά, το ίζημα αναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης πυρηνικών πρωτεϊνών (25 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,2% v/v Triton X-100 TM, 0,5 mM DTT και 0,5 mM PMSF). Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 25.000 rpm (55.000 × g) στους 4 °C για 1 ώρα και το υπερκείμενο (πυρηνικό εκχύλισμα) συλλέγεται, διαχωρίζεται σε κλάσματα και φυλάσσεται σε καταψύκτη των -70 °C.

Για την παρασκευή του υποτονικού ρυθμιστικού διαλύματος, του ισοτονικού ρυθμιστικού διαλύματος και του ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης πυρηνικών πρωτεϊνών, χρησιμοποιούνται τα παρακάτω υλικά στις ποσότητες που υποδεικνύονται:

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υποτονικό ρυθμιστικό διάλυμα (Hypotonic buffer):

<u>Διάλυμα</u>	<u>Αρχική Συγκέντρωση</u>	<u>Τελική συγκέντρωση</u>	<u>Για 20 ml</u>
Tris pH 7,5	1 M	25 mM	500 μ l
KCl	1 M	5 mM	100 μ l
MgCl ₂	1 M	0,5 mM	10 μ l
DTT	1 M	0,5 mM	10 μ l
PMSF	0,1 M	0,5 mM	10 μ l
dH ₂ O		πλήρωση έως 20 ml	

Ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα (Isotonic buffer):

<u>Διάλυμα</u>	<u>Αρχική Συγκέντρωση</u>	<u>Τελική συγκέντρωση</u>	<u>Για 20 ml</u>
Tris pH 7,5	1 M	25 mM	500 μ l
KCl	1 M	5 mM	100 μ l
MgCl ₂	1 M	0,5 mM	10 μ l
Σουκρόζη		0,2 M	1,36 g
DTT	1 M	0,5 mM	10 μ l
PMSF	0,1 M	1 mM	200 μ l
dH ₂ O		πλήρωση έως 20 ml	

Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear extraction buffer):

<u>Διάλυμα</u>	<u>Αρχική Συγκέντρωση</u>	<u>Τελική συγκέντρωση</u>	<u>Για 5 ml</u>
Tris pH 7,5	1 M	25 mM	125 μ l
KCl	1 M	0,6 M	3 ml
EDTA	0,2 M	1 mM	25 μ l
Γλυκερόλη	100%	20%	1 ml
Triton X-100	100%	0,2%	10 μ l
DTT	1 M	0,5 mM	2,5 μ l
PMSF	0,1 M	0,5 mM	25 μ l
dH ₂ O		πλήρωση έως 5 ml	

Πρέπει να σημειωθεί ότι τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται λίγο πριν από τη χρήση τους. Σε περίπτωση που δεν είναι δυνατή η παρασκευή φρέσκων διαλυμάτων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαλύματα που έχουν παρασκευαστεί έως και μία εβδομάδα πριν από τη χρήση τους και έχουν φυλαχθεί στο ψυγείο. Οι

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

πρωτεϊνικοί αναστολείς προστίθενται σε όλα τα παραπάνω διαλύματα αμέσως πριν από τη χρήση τους στις παρακάτω ποσότητες:

<i>Αναστολέας</i>	<i>Αρχική Συγκέντρωση</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>	<i>Για 1 ml</i>
Pefablock TM	10 mg/ml	10 µg/µl	1 µl
Ορθοβαναδικό Na	500 mM	2 mM	20 µl
Απροτινίνη	10 mg/ml	10 µg/µl	1 µl
Λευπεπτίνη	10 mg/ml	10 µg/µl	1 µl
DTT	1 M	1 mM	1 µl

Επίσης, στο διάλυμα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets) της Roche (Roche Applied Science, Hague Road, IN, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Συνήθως 1 δισκίο αναδιαλύεται σε 1 ml dH₂O (απιονισμένο νερό) και 20 µl από αυτό το αποθεματικό διάλυμα προστίθενται σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης.

2.6.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΓΚΩΝ

Κατεψυγμένα δείγματα όγκων αναμειγνύονται με παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα RIPA (1xPBS, 1% v/v Nonidet P-40, 0,5% κ.β. δεοξυχολικό νάτριο και 0,1% κ.ό. SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς πρωτεασών (Roche Applied Science, Hague Road, IN, USA) σε αναλογία ιστού προς ρυθμιστικό διάλυμα 1:1. Το μείγμα επωάζεται στον πάγο για 1 ώρα και ομογενοποιείται με συχνές αναδεύσεις σε ανακινητήρα τύπου vortex. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται σε 13.000 × g για 15 min στους 4 °C και το υπερκείμενο συλλέγεται σε ένα καθαρό, αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf.

2.6.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ *in vitro*

Οι πρωτεΐνες TAp73α, TAp73β και TAp73γ συντέθηκαν από τα αντίστοιχα πλασμίδια έκφρασης με χρήση του κιτ TnT[®] *in vitro* translation system (κωδικός L1170, Promega, Madison, WI, USA). Πρόκειται για ένα σύστημα το οποίο

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

συνδυάζει RNA πολυμεράση, νουκλεοτίδια, άλατα και ανασυνδυασμένο αναστολέα ριβονουκλεάσης με το προϊόν λύσης δικτυοερυθροκυττάρων κουνελιού σε ένα κύριο μείγμα TnT[®] Quick Master Mix. Οι πρωτεΐνες συντίθενται απευθείας με προσθήκη των αντιστοιχών πλασμιδίων έκφρασης, τα οποία διαθέτουν υποκινητή T7, σε αυτό το κύριο μείγμα. Αναλυτικότερα, αναμειγνύονται 40 μl TnT[®] Quick Master Mix, 1 μl μεθειονίνης 1mM και 2 μl πλασμιδίου έκφρασης συγκέντρωσης 0,5 μg/μl και το διάλυμα αναμειγνύεται και επωάζεται σε θερμοκρασία 30 °C για 60-90 min. Τα πλασμίδια έκφρασης ήταν μια ευγενική προσφορά του Δρ. G. Melino και έχουν περιγραφεί παλαιότερα. Συνοπτικά, πρόκειται για πλασμίδια έκφρασης pcDNA-HA (με επίτοπο αιμοσυγκολλητίνης, HA), στα οποία το προϊόν ενίσχυσης των μεταγράφων TAp73α, TAp73β ή TAp73γ έχει συνδεθεί μεταξύ των μοναδικών περιοριστικών θέσεων *NheI* και *NotI*. Τα πλασμίδια αυτά διαθέτουν υποκινητή T7 [27].

Η πρωτεΐνη *in vitro* Sp1 αγοράστηκε από την εταιρεία Promega (Promega, Madison, WI, USA).

2.6.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων γίνεται με τη φωτομετρική μέθοδο Bradford [80]. Συγκεκριμένα, σε ένα σωληνάριο τύπου eppendorf προστίθενται 200 μl αντιδραστηρίου Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 800 μl απιονισμένο νερό και 1 μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιείται αλβουμίνη ορού βοός (BSA) σε συγκεντρώσεις 0, 1, 2,5, 5 και 10 μg/μl. Η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων μετράται σε μήκος κύματος 595 nm στο φωτόμετρο. Η συγκέντρωση του δείγματος υπολογίζεται αυτόματα από το φωτόμετρο με βάση την πρότυπη καμπύλη οπτικής πυκνότητας-συγκέντρωσης.

2.6.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΣΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN

Η μέθοδος αυτή αποτελεί κλασικό τρόπο διαχωρισμού και ταυτοποίησης πρωτεϊνών με βάση το μοριακό βάρος τους. Βασική αρχή της μεθόδου αποτελεί η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών με τη χρήση πηκτώματος ακρυλαμιδίου και, στη συνέχεια, η ταυτοποίηση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης-στόχου με τη βοήθεια ειδικού αντισώματος έναντι αυτής. Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε η μονάδα

ηλεκτροφόρησης και στυπώματος Western της Biorad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

2.6.6.1 Δημιουργία πηκτώματος ακρυλαμιδίου

Το πήκτωμα ακρυλαμιδίου αποτελείται από ένα κατώτερο στρώμα ανάλυσης (resolving gel) και ένα ανώτερο στρώμα στοίβαξης (stacking gel). Το resolving gel έχει συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 8-12%, ανάλογα με το εύρος του MB των πρωτεϊνών-στόχων, αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του πηκτώματος (τα 2/3 του συνολικού) και σε αυτό στο οποίο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Στη συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 8% για το resolving gel. Το stacking gel έχει μικρότερη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου (5%) και βοηθάει την είσοδο των πρωτεϊνών στο resolving gel. Αρχικά ο χώρος μεταξύ των γυάλινων πλακών της συσκευής ηλεκτροφόρησης πληρώνεται με μια ποσότητα resolving gel σε υγρή μορφή και προστίθεται μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης (για να αποφευχθεί η δημιουργία τυχόν φυσαλίδων). Το υγρό ακρυλαμίδιο πολυμερίζεται και σταθεροποιείται εντός 10-20 λεπτών. Στη συνέχεια, η ισοπροπανόλη αφαιρείται και η επιφάνεια του πηκτώματος εκπλένεται με απιονισμένο νερό. Κατόπιν, πάνω από το στρώμα του resolving gel προστίθεται stacking gel σε υγρή μορφή και τοποθετείται το κατάλληλο χτένι για τον σχηματισμό των πηγαδιών του πηκτώματος. Το υγρό stacking gel πολυμερίζεται και στερεοποιείται εντός 10-20 λεπτών. Μετά τη στερεοποίηση, το χτένι αφαιρείται προσεκτικά και τα πηγάδια εκπλένονται με απιονισμένο νερό για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ακρυλαμιδίου από τα πηγάδια. Η διάταξη των γυάλινων πλακών τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1X running buffer).

2.6.6.2 Προετοιμασία και φόρτωση δειγμάτων

Για την προετοιμασία των δειγμάτων, η κατάλληλη ποσότητα δείγματος (20 µg ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων ή 5-10 µg πυρηνικών εκχυλισμάτων) εισάγεται σε σωληνάριο δείγματος με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (loading buffer 3x) της New England Biolabs (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Στο διάλυμα αυτό έχει ήδη προστεθεί ο αναγωγικός παράγοντας DTT 1 M (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) σε αναλογία 1/10. Το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία

100 °C, ώστε οι πρωτεΐνες να υποστούν μετουσίωση. Στη συνέχεια, τα σωληνάρια φυγοκεντρώνονται σύντομα, προκειμένου τα σταγονίδια του δείγματος να συγκεντρωθούν στον πυθμένα του σωληναρίου και να μην υπάρχουν απώλειες δείγματος λόγω εξάτμισης και τα δείγματα φορτώνονται στα πηγάδια του πηκτώματος.

2.6.6.3 Εκτέλεση ηλεκτροφόρησης

Μετά τη φόρτωση των δειγμάτων, η εκτέλεση της ηλεκτροφόρησης διενεργείται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, με εφαρμογή σταθερής τάσης 150 Volt για περίπου 1-2 ώρες, ώστε να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες με βάση το μοριακό βάρος τους. Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με τη βοήθεια κατάλληλου πρωτεϊνικού δείκτη, ο οποίος φορτώνεται ταυτόχρονα με τα δείγματα και περιέχει πρωτεΐνες συγκεκριμένου μοριακού βάρους που παρουσιάζονται σαν έγχρωμες ζώνες στο πήκτωμα. Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης-στόχου προσδιορίζεται μέσω σύγκρισης με το ηλεκτροφορητικό πρότυπο του πρωτεϊνικού δείκτη. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε ο πρωτεϊνικός δείκτης Amersham™ Rainbow™ Full Range (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), για εύρος μοριακού βάρους πρωτεϊνών 12-225 kDa. Το μοριακό βάρος των ισομορφών TAp73 κυμαινόταν μεταξύ 55-75 kDa, ενώ το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης Sp1 ήταν 95-105 kDa.

2.6.6.4 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα ακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (στύπωμα). Η διαδικασία προϋποθέτει τη χρήση ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος 1X Towbin buffer. Οι πλάκες της διάταξης ηλεκτροφόρησης αποχωρίζονται, ώστε η μια πλευρά του πηκτώματος να παραμείνει προσκολλημένη σε μία από αυτές, ενώ η άλλη να είναι ελεύθερη. Επάνω στην ελεύθερη πλευρά του πηκτώματος τοποθετούνται 2 φύλλα από χαρτί τύπου Whatmann, τα οποία έχουν διαβραχεί με διάλυμα 1X Towbin buffer, έτσι ώστε το πήκτωμα να αποκολληθεί από την πλάκα, χωρίς να υποστεί ζημιά. Τα φύλλα Whatmann που φέρουν το πήκτωμα τοποθετούνται επάνω στη μαύρη πλευρά της ειδικής κασέτας στυπώματος, η οποία διαβρέχεται συνεχώς με 1X Towbin buffer.

Στην άλλη πλευρά του πηκτώματος τοποθετείται μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, οι διαστάσεις της οποίας επαρκούν για την κάλυψη ολόκληρης της επιφάνειας του πηκτώματος. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να διασφαλιστεί ότι δεν παραμένουν φυσαλίδες μεταξύ του πηκτώματος και της μεμβράνης, οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε κακή ποιότητα εικόνας του στυπώματος και αποτυχία της ανάλυσης. Πάνω από την μεμβράνη τοποθετούνται 2 φύλλα από χαρτί τύπου Whatmann. Η κασέτα κλείνει με την ειδική ασφάλεια και τοποθετείται στη συσκευή στυπώματος. Κατά την εισαγωγή της κασέτας στη μονάδα, πρέπει να διασφαλιστεί ότι ο θετικός πόλος της συσκευής (μαύρος) αντιστοιχεί στην πλευρά της κασέτας στην οποία βρίσκεται η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης (μαύρη), επειδή οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο. Η συσκευή πληρώνεται με διάλυμα 1X Towbin buffer και συνδέεται με τροφοδοτικό και η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη πραγματοποιείται σε πεδίο σταθερής έντασης 330 mA για 90 min.

2.6.6.5 Κάλυψη μη ειδικών θέσεων δέσμευσης αντισώματος (blocking)

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας μεταφοράς πρωτεϊνών, η μεμβράνη αφαιρείται από την κασέτα. Η επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών επιβεβαιώνεται από το στύπωμα του ηλεκτροφορητικού προτύπου του πρωτεϊνικού δείκτη στη μεμβράνη. Στη συνέχεια, η μεμβράνη τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει διάλυμα 1X TBS με 0,1% v/v Tween-20 και 5% κ.β. άπαχο γάλα. Το δοχείο τοποθετείται σε αναδευτήρα (rocker) τύπου see-saw, μοντέλο SM4 της Bibby Stuart (Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, UK) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτή η επώαση διασφαλίζει την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων του αντισώματος.

2.6.6.6 Επώαση με πρωτογενές αντίσωμα

Στην συνέχεια το παραπάνω διάλυμα απορρίπτεται και προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα στην κατάλληλη συγκέντρωση κάθε φορά. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται για την επώαση του πρωτογενούς αντισώματος είναι: 1X TBS με 0,1% v/v Tween-20 και 3% κ.β. άπαχο γάλα. Πραγματοποιείται ολονύκτια επώαση πραγματοποιείται για 12-15 ώρες στους 4 °C, υπό ανάδευση. Τα πρωτογενή αντισώματα και οι αντίστοιχες αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- α) πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της Sp1 ανθρώπου (κλώνος PEP2) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), σε αραιώση 1:600
- β) μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της β-ακτίνης ανθρώπου (Abcam, Cambridge, UK), σε αραιώση 1:1000
- γ) μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι πρωτεϊνών TAp73 ανθρώπου (το οποίο έχει καταδειχτεί ότι αναγνωρίζει τις ισομορφές TAp73 α, β και γ [81]). Το αντίσωμα αυτό ήταν μια ευγενική προσφορά του Δρ. Borek Vojtesek, Masaryk Memorial Cancer Institute, Τσεχία. Η αραιώση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:4000.
- δ) πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της VEGF ανθρώπου (κωδικός sc-507) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), σε αραιώση 1:500
- ε) μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι των ισομορφών ΔNp73 (Abcam, Cambridge, UK), σε αραιώση 1:500.

2.6.6.7 Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα

Μετά την επώαση με το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα, ακολουθεί πλύση της μεμβράνης σε διάλυμα 1X TBS με 0,1% v/v Tween-20, υπό ανάδευση για 10 λεπτά. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές. Στη συνέχεια, προστίθεται το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση χρένου. Το είδος του δευτερογενούς αντισώματος που προστίθεται εξαρτάται από το ζώο από το οποίο προέρχεται το πρωτογενές αντίσωμα (ποντικός, κουνέλι κ.λπ.). Το δευτερογενές αντίσωμα προστίθεται σε διάλυμα 1X TBS με 0,1% v/v Tween-20 και 1% κ.β. άπαχο γάλα. Η επώαση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες, υπό ανάδευση. Τα δευτερογενή αντισώματα και οι αντίστοιχες αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία ήταν τα εξής:

- α) για την ανίχνευση της πρωτεΐνης Sp1, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της ανοσοσφαιρίνης κουνελιού, συζευγμένο με υπεροξειδάση χρένου, σε αραιώση 1:8000.
- β) για την ανίχνευση της πρωτεΐνης β-ακτίνη, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της ανοσοσφαιρίνης ποντικού, συζευγμένο με υπεροξειδάση χρένου, σε αραιώση 1:5000.
- γ) για την ανίχνευση της πρωτεΐνης TAp73, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της ανοσοσφαιρίνης ποντικού, συζευγμένο με υπεροξειδάση χρένου, σε αραιώση 1:10.000.

δ) για την ανίχνευση της πρωτεΐνης VEGF, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της ανοσοσφαιρίνης κουνελιού, συζευγμένο με υπεροξειδάση χρένου, σε αραιώση 1:3000.

ε) για την ανίχνευση της πρωτεΐνης ΔNp73, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της ανοσοσφαιρίνης ποντικού, συζευγμένο με υπεροξειδάση χρένου, σε αραιώση 1:10.000.

Στη συνέχεια, η μεμβράνη υποβάλλεται τρεις φορές σε πλύση σε διάλυμα 1X TBS με 0,1% v/v Tween-20, υπό ανάδευση για 10 λεπτά.

2.6.6.8 Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών-στόχων στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πραγματοποιείται με χρήση ειδικών συστημάτων χημειοφωταύγειας. Τα συστήματα αυτά παρέχουν το κατάλληλο ενζυμικό υπόστρωμα στο ενζυμικό τμήμα του δευτερογενούς αντισώματος (υπεροξειδάση χρένου), ώστε αυτό να αντιδράσει και να παράγει φθορίζον μόριο στις περιοχές που έχει συνδεθεί. Στη συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιήθηκε το ενισχυμένο σύστημα χημειοφωταύγειας (ECL) Supersignal West pico της Pierce (Pierce, Rockford, IL, USA). Αποτελείται από δύο διαλύματα, δηλαδή ένα σταθερό ρυθμιστικό διάλυμα υπεροξειδίου και ένα μείγμα φθορίζοντος υποστρώματος (luminol) και ενισχυτή, τα οποία παράγουν φθορισμό αμέσως μετά την ανάμειξή τους. Για την παραγωγή φθορίζοντος σήματος, αναμειγνύονται ίσες ποσότητες από τα δύο διαλύματα και το μείγμα εγχέεται με πιπέτα στην επιφάνεια της νιτροκυτταρίνης, στην πλευρά στην οποία έχουν προσδεθεί οι πρωτεΐνες. Το υγρό παραμένει στη μεμβράνη για 2 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση χημειοφωταύγειας και, κατόπιν, η περίσσεια του υγρού αφαιρείται με απορροφητικό χαρτί. Η μεμβράνη εισάγεται σε κασέτα εμφάνισης, μεταξύ δύο φύλλων λεπτής ζελατίνης. Στη συνέχεια, η κασέτα μεταφέρεται σε σκοτεινό θάλαμο και η μεμβράνη εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ. Για την εμφάνιση του σήματος χημειοφωταύγειας που αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες-στόχους, το φιλμ εμβαπτίζεται σε διάλυμα εμφάνισης (developer), εκπλένεται σε νερό βρύσης και τελικά εμβαπτίζεται σε διάλυμα μονιμοποίησης (fixer). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών, το μέγεθος του σήματος που αντιπροσωπεύει την ποσότητα της πρωτεΐνης-στόχου κανονικοποιείται ως προς το αντίστοιχο σήμα της β-ακτίνης και μετράται με το λογισμικό ImageQuant (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

2.6.6.9 Αποδέσμευση αντισωμάτων από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (stripping)

Η ίδια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επώαση της ίδιας μεμβράνης με περισσότερα από ένα πρωτογενή αντισώματα, ώστε να μπορέσουν να ανιχνευθούν π.χ. πρωτεΐνες με παραπλήσιο μοριακό βάρος στο ίδιο δείγμα. Σε αυτή την περίπτωση αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της εμφάνισης, η μεμβράνη υποβάλλεται σε πλύση 3 φορές με διάλυμα 1X TBS με 0,1% v/v Tween-20, υπό ανάδευση για 10 min. Κατόπιν, εμβαπτίζεται ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα stripping buffer στους 60 °C για 30-45 λεπτά, προκειμένου να αποδεσμευτούν από αυτήν τα συμπλέγματα πρωτογενούς-δευτερογενούς αντισώματος. Μετά από 3 πλύσεις με διάλυμα 1X TBS με 0,1% v/v Tween-20, υπό ανάδευση για 10 min, επαναλαμβάνονται τα παραπάνω βήματα από το στάδιο της κάλυψης των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης των αντισωμάτων, με χρήση διαφορετικού πρωτογενούς αντισώματος.

2.6.6.10 Απαιτούμενα διαλύματα για την ανάλυση στυπώματος κατά Western

Για την ανάλυση που περιγράφηκε παραπάνω, απαιτείται η παρασκευή των εξής διαλυμάτων:

Διάλυμα 4X Tris-HCl SDS pH 8,8:

<u>Υλικά</u>	<u>Τελική συγκέντρωση</u>	<u>Για 500 ml</u>
Tris base	1,5 M	91 gr
SDS	0,4%	2 gr
dH ₂ O		περίπου 300 ml

Τα παραπάνω υλικά διαλυτοποιούνται στην αναγραφόμενη ποσότητα νερού και, κατόπιν, το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή 8,8 με τη βοήθεια pHμέτρου. Μετά τη ρύθμιση του pH, συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο του διαλύματος.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Διάλυμα 4X Tris-HCl SDS pH 6,8:

<i>Υλικά</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>	<i>Για 100 ml</i>
Tris base	1,5 M	6,05 gr
SDS	0,4%	0,4 gr
dH ₂ O		περίπου 60 ml

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται με τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε παραπάνω στην τιμή 6,8 και συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο του διαλύματος.

Διάλυμα πηκτώματος ανάλυσης (Resolving gel) 8% κ.β.:

<i>Υλικά</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>	<i>Για 10 ml</i>
Ακρυλαμίδιο 30% κ.β.	8%	2,66 ml
4X Tris-HCl SDS pH 8,8	1X	2,5 ml
dH ₂ O		4,84 ml
Υπερθειικό αμμώνιο (APS)	0,01%	100 μl
TEMED		15 μl

Διάλυμα πηκτώματος στοιβαξης (Stacking gel) 5%:

<i>Υλικά</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>	<i>Για 5ml</i>
Ακρυλαμίδιο 30% κ.β.	5%	0,83 ml
4X Tris-HCl SDS pH 6,8	1X	1,25 ml
dH ₂ O		2,92 ml
Υπερθειικό αμμώνιο (APS)	0,01%	50 μl
10% κ.β.		
TEMED		7 μl

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (10X Running Buffer):

<u>Υλικά</u>	<u>Για 1 L</u>
Tris base	30,2 gr
Γλυκίνη	144 gr
SDS	10 gr
dH ₂ O	πλήρωση έως 1 L

Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1X για την ηλεκτροφόρηση. Έτσι γίνεται 10 φορές αραιώση πριν την χρήση του. Για τον σκοπό αυτό προστίθενται 100 ml 10X Running Buffer σε 900 ml απιονισμένου νερού (τελικός όγκος 1 L) και αναμειγνύεται καλά πριν την χρήση.

10X Towbin:

<u>Υλικά</u>	<u>Για 1 L</u>
Tris base	30,2 gr
Γλυκίνη	144 gr
dH ₂ O	πλήρωση έως 1 L

Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1X για την διαδικασία της μεταφοράς των πρωτεϊνών στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Για την παρασκευή διαλύματος 1X Towbin προστίθενται 100 ml 10X Towbin, 200 ml αιθανόλης και 700 ml απιονισμένου νερού.

30% κ.β. ακρυλαμίδιο:

<u>Υλικά</u>	<u>Τελική συγκέντρωση</u>	<u>Για 1 L</u>
Ακρυλαμίδιο	29%	290 gr
N,N'-μεθυλενο- δις-ακρυλαμίδιο	1%	10 gr
dH ₂ O		πλήρωση έως 1 L

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

10X TBS:

<i>Υλικά</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>	<i>Για 1 L</i>
Tris base	0,1 M	12,114 gr
NaCl	1,5 M	87,66 gr
dH ₂ O	πλήρωση έως 1 L	

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή 7,6 με HCl και συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό έως τον τελικό όγκο. Το διάλυμα 10X TBS αποστειρώνεται και στην συνέχεια φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Για να χρησιμοποιηθεί, αραιώνεται σε 1X TBS (100 ml διαλύματος 10X TBS με 900 ml απιονισμένο νερό) και προστίθεται ανάλογη ποσότητα Tween-20 σε τελική συγκέντρωση 0,1% v/v. Το διάλυμα TBS-Tween χρησιμοποιείται για τις πλύσεις των μεμβρανών και την επώαση με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα στο στύπωμα κατά Western.

Διάλυμα Stripping Buffer:

100 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη

2% κ.β. SDS

62,5 mM Tris-HCl pH 6,7

2.6.7 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (ELECTROMOBILITY SHIFT ASSAY)

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην πρόσδεση των πρωτεϊνών σε συναινετικές αλληλουχίες DNA. Η ειδική πρόσδεση των πρωτεϊνών στο DNA καθώς και η διαφορετική κινητικότητα των συμπλεγμάτων DNA/πρωτεϊνών σε σχέση με το μη προσδεδεμένο DNA δίνει τη δυνατότητα της ποιοτικής και ποσοτικής μελέτης της πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA (θέσεις δέσμευσης). Βασικά στοιχεία του μείγματος της αντίδρασης αποτελούν οι πρωτεΐνες και τα ολιγονουκλεοτιδία του DNA, τα οποία και σημαίνονται με ραδιενεργό ³²P.

2.6.7.1 Υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων

Τα μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια που αντιπροσώπευαν τις περιοχές A, B, C και D του υποκινητή P1 του γονιδίου *p73* του ανθρώπου συντέθηκαν από την Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Οι κλώνοι 5'→3' και 3'→5' κάθε περιοχής υβριδοποιήθηκαν σε ένα δίκλωνο μόριο ως εξής: σε ένα σωληνάριο τύπου eppendorf αναμείχθηκαν ισομοριακές ποσότητες των κλώνων 5'→3' και 3'→5' και το σωληνάριο τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 100 °C για 10 min. Στη συνέχεια, το υδατόλουτρο απενεργοποιήθηκε, ώστε η θερμοκρασία να μειωθεί σταδιακά έως τη θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτό το χρονικό διάστημα πραγματοποιείται η αναδιάταξη του δίκλωνου DNA. Στη συνέχεια, τα σωληνάρια αφέθηκαν για μικρό χρονικό διάστημα στον πάγο, προτού φυλαχθούν σε θερμοκρασία -20 °C. Η συναινετική αλληλουχία Sp1, καθώς και μια μεταλλαγμένη θέση δέσμευσης Sp1 χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός και αρνητικός μάρτυρας της κατακράτησης της πρωτεΐνης Sp1, αντίστοιχα (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Οι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες συνοψίζονται στον Πίνακα 2.7. Ανάμειξη ίσων όγκων 5 pmol/μl του κλώνου 5'→3' και 5 pmol/μl του κλώνου 3'→5' οδήγησε σε διάλυμα δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου συγκέντρωσης 2,5 pmol/μl.

Πίνακας 2.7: Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα κατακράτησης πρωτεϊνών (EMSA)

Όνομασία	θέση (σε σχέση με την TSS)	Κατεύθυνση	5'–αλληλουχία–3'
Περιοχή A	-233 έως -204 bps	FWD	5'–aaagggcggcggggaaggagggcggggcagagc–3'
		REV	5'–gctctgccccgectccttcccggcgccttt–3'
Περιοχή B	-61 έως -33 bps	FWD	5'–cccgcgggcgctccccctcccgcgcccc–3'
		REV	5'–tgggcgcggggaggggagggcggcgcggg–3'
Περιοχή C	-20 έως -1 bps	FWD	5'–aggggcccggcagccccgcct–3'
		REV	5'–agggcgggctgccccggccccct–3'
Περιοχή D	-4 έως +20 bps	FWD	5'–ccctgcctccccgcggcgccacc–3'
		REV	5'–gggtgcgcgggcggggagggcaggg–3'
CON	Καμία	FWD	5'–attcgatcgggcggggagcag–3'
		REV	5'–ctcgccccgccccgatcgaat–3'
mSp1	Καμία	FWD	5'–attcgatcggttcggggcag–3'
		REV	5'–ctcgccccgaaccgatcgaat–3'

Συντομογραφίες: TSS: θέση έναρξης της μεταγραφής, FWD: κατεύθυνση 5'→3', REV: κατεύθυνση 3'→5', CON: θετικός μάρτυρας, mSp1: αρνητικός μάρτυρας.

2.6.7.2 Σήμανση ολιγονουκλεοτιδίων

Τα υβριδοποιημένα νουκλεοτίδια σημάνθηκαν στο 3' άκρο με ^{32}P με χρήση της T4 πολυνουκλεοτιδικής κινάσης (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Αναλυτικά, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: σε ένα σωληνάριο τύπου erpendorf προστέθηκαν 1 μl 0,5 M DTT, 1 μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα T4 πολυνουκλεοτιδικής κινάσης, 2 μl δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου (5 pmol), 2 μl T4 πολυνουκλεοτιδικής κινάσης, 2 μl $\gamma^{32}\text{ATP}$ και 2 μl αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Ακολούθησε διαδοχική επώαση του μείγματος στους 37 °C για 30 λεπτά, στους 70 °C για 5 λεπτά, στους 37 °C για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και στους 0 °C (πάγος) για 5 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης υποβλήθηκε σε κάθαρση από τα άλατα, το ένζυμο και τα μη ενσωματωμένα ραδιενεργά νουκλεοτίδια με τη βοήθεια των στηλών Microspin G-25 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ενσωμάτωση των ραδιενεργών νουκλεοτιδίων στο δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο, το μείγμα ελέγχεται με μετρητή Geiger μετά την κάθαρση.

2.6.7.3 Αντίδραση πρόσδεσης πρωτεϊνών στις συναινετικές αλληλουχίες DNA και αντίδραση μεταβολής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλέγματος (supershift)

Το μείγμα αντίδρασης προετοιμάστηκε με ανάμειξη 2000 cpm $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ραδιοσημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου με 10 μg πρωτεϊνικών πυρηνικών εκχυλισμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης (binding buffer: 50 mM HEPES pH 8,0, 500 mM NaCl, 0,5 M PMSF, 0,5 mg/ml BSA, 20% γλυκερόλη και 1 mM EDTA) στο οποίο είχαν προστεθεί 1 mM DTT και 150 $\mu\text{g/ml}$ poly(dI-dC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20 μl . Το μείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min και, κατόπιν, αναμείχθηκε με χρωστική και φορτώθηκε σε πήκτωμα ηλεκτροφόρησης.

Για την αντίδραση ποιοτικού προσδιορισμού του συμπλέγματος πρωτεΐνης-συναινετικής αλληλουχίας DNA, το μείγμα της αντίδρασης επωάζεται παρουσία του κατάλληλου αντισώματος (αντίδραση supershift). Στη συγκεκριμένη εργασία,

προκειμένου να προσδιοριστεί η πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 στις εξεταζόμενες δυνητικές θέσεις δέσμευσης Sp1, προστέθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-Sp1 (κλώνος PEP2) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) και ακολούθησε επώαση στους 4 °C για 30 min. Η πρωτεΐνη ταυτοποιήθηκε από τη διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα (μικρότερη) που παρουσιάζει το σύμπλεγμα αντισώματος-πρωτεΐνης-συναινετικής αλληλουχίας DNA σε σχέση με το σύμπλεγμα πρωτεΐνης-συναινετικής αλληλουχίας DNA.

2.6.7.4 Δημιουργία πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου και ηλεκτροφόρηση

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, 6% σε περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου. Για τη δημιουργία του πηκτώματος, αναμειγνύονται 6 ml διαλύματος 5xTBE, 12 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου 30% κ.β., 44 ml απιονισμένου νερού, 800 μl 10% APS και 180 μl TEMED και το μείγμα εγχέεται μεταξύ των πλακών μιας συσκευής ηλεκτροφόρησης ώστε να πολυμεριστεί και να στερεοποιηθεί. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 150 V για 90 min.

2.6.7.5 Ξήρανση του πηκτώματος και αυτοραδιογραφία

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αποκολλάται προσεκτικά από τις πλάκες της συσκευής ηλεκτροφόρησης, τοποθετείται επάνω σε ένα κομμάτι χαρτιού Whatmann και καλύπτεται από κομμάτι διαφανούς μεμβράνης. Η διάταξη τοποθετείται σε ξηραντήρα, υπό κενό σε θερμοκρασία 80 °C για 90 λεπτά τουλάχιστον, ωστόσο επιτευχθεί πλήρης ξήρανση του πηκτώματος. Κατόπιν, η συσκευή απενεργοποιείται και η διάταξη μεταφέρεται σε σκοτεινό θάλαμο και τοποθετείται σε κατάλληλη κασέτα αυτοραδιογραφίας. Επάνω από τη διάταξη τοποθετείται φιλμ αυτοραδιογραφίας και η κασέτα μεταφέρεται στους -80 °C για 24 ώρες τουλάχιστον. Μετά την περίοδο επώασης, η κασέτα μεταφέρεται ξανά στον σκοτεινό θάλαμο για την εμφάνιση του φιλμ αυτοραδιογραφίας. Για την εμφάνιση του σήματος ραδιενέργειας που αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες-στόχους, το φιλμ αφαιρείται από την κασέτα και εμβαπτίζεται σε διάλυμα εμφάνισης (developer), εκπλένεται σε νερό βρύσης και τελικά εμβαπτίζεται σε διάλυμα μονιμοποίησης (fixer).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.6.7.6 Απαιτούμενα διαλύματα για τη μέθοδο κατακράτησης πρωτεϊνών

Για την ανάλυση που περιγράφηκε παραπάνω, απαιτείται η παρασκευή των εξής διαλυμάτων:

Διάλυμα πρόσδεσης 5X Binding Buffer:

<u>Διάλυμα</u>	<u>Αρχική Συγκέντρωση</u>	<u>Τελική Συγκέντρωση</u>	<u>Για 10 ml</u>
Hepes pH 8,0	1 M	50 mM	0,5ml
NaCl	5 M	500 mM	1,0ml
EDTA pH 8,0	0.2 M	1 mM	50 μ l
BSA	0,25 gr/ml	0,5 mg/ml	200 μ l
PMSF	0,1 M	0,5 mM	50 μ l
Γλυκερόλη	100%	20%	2,0 ml
dH ₂ O		πλήρωση έως 10 ml	

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 5X TBE:

<u>Υλικά</u>	<u>Για 1 L</u>
Tris base	54 gr
Βορικό οξύ	27,5 gr
EDTA 1 M pH 8,0	10 ml

Για την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται διάλυμα 0,5X TBE, το οποίο δημιουργείται με αραίωση του αποθεματικού διαλύματος 5X TBE σε απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:9 (Για 1 L αναμειγνύονται 100 ml διαλύματος 5X TBE σε 900 ml απιονισμένου νερού).

Πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου:

<u>Υλικά</u>	<u>Τελική Συγκέντρωση</u>	<u>Για 60ml</u>
Ακρυλαμίδιο 30% κ.β	6% κ.β.	12 ml
5X TBE	0,5X	6,0 ml
dH ₂ O		41 ml
Υπερθεϊκό αμμώνιο (APS) 10% κ.β	0.01%	800 μ l
TEMED		180 μ l

2.6.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ (ChIP)

Η ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Chromatin immunoprecipitation, ChIP) είναι μια μέθοδος για την *in vivo* ταυτοποίηση της πρόσδεσης των πρωτεϊνών σε ειδικές θέσεις δέσμευσης στο DNA. Στη συγκεκριμένη εργασία, κύτταρα A549 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας διαμέτρου 90 mm σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό ωσότου καλύψουν το 80% της επιφάνειας του τρυβλίου. Αφού εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα PBS, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με διάλυμα 1% v/v φορμαλδεΐδης σε θερμοκρασία 37 °C για 10 min. Με αυτό τον τρόπο διασφαλίζεται η δημιουργία διασταυρούμενων δεσμών μεταξύ του DNA και των πρωτεϊνών που είναι προσδεμένες πάνω σε αυτό εκείνη τη στιγμή. Τα επεξεργασμένα κύτταρα, στη συνέχεια, υποβλήθηκαν σε πλύση με παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS δύο φορές και συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση σε 2000 rpm για 5 min. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 600 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCL (50mM Tris-HCl pH 8,0, 85 mM KCl and 0,5% v/v NP40) και το διάλυμα επώαστηκε για 10 min στον πάγο. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε σε 5000 rpm για 5 min στους 4 °C και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 600 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (50 mM HEPES-KOH pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0, 1% v/v Triton-X, 0,1% κ.β. δεοξυχολικό νάτριο και 0,1% κ.ό. SDS) το οποίο περιείχε αναστολείς πρωτεασών. Το προϊόν λύσης επώαστηκε σε συσκευή παραγωγής υπερήχων, ώστε το DNA να διασπαστεί σε τμήματα μέσου μεγέθους 500-1000 bp και φυγοκεντρήθηκε σε 13.000 rpm, για 5 min σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης, το οποίο περιέχει τη χρωματίνη, υποβλήθηκε σε ολονύκτια επώαση με αντίσωμα έναντι του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 (κωδικός sc-59x) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), ώστε να σχηματιστούν ανοσοσυμπλέγματα DNA-πρωτεΐνης Sp1-αντισώματος έναντι του Sp1. Στη συνέχεια, τα ανοσοσυμπλέγματα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με 60 μl μείγμα DNA σπέρματος σολωμού/σφαιριδίων αγαρόζης συζευγμένων με πρωτεΐνη A (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) για 2 ώρες σε θερμοκρασία 4 °C. Η επώαση με το DNA σπέρματος σολωμού διασφαλίζει την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης του DNA, ενώ τα σφαιρίδια αγαρόζης-πρωτεΐνης A δεσμεύουν το κλάσμα Fc της ανοσοσφαιρίνης IgG. Κατόπιν, τα σφαιρίδια υποβλήθηκαν σε διαδοχικές πλύσεις για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου με 1ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης χωρίς SDS,

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης συν 500 mM NaCl, με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0, 250 mM LiCl, 1% v/v NP40 και 1% κ.ό. δεοξυχολικό νάτριο) και, τελικά, δύο φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα TE (10 mM Tris pH 8,0 και 1 mM EDTA). Η έκλουση των ανοσοσυμπλεγμάτων πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (1% κ.β. SDS, 50 mM Tris-HCl pH 7,5 και 10 mM EDTA) και επώαση στους 65 °C για 5min. Κατόπιν, τα προϊόντα έκλουσης επώαστηκαν με RNAση για 1 ώρα και με πρωτεΐνάση K για 4 ώρες σε θερμοκρασία 65 °C, ώστε να διασπαστούν οι διασταυρούμενοι δεσμοί. Το DNA εκχυλίστηκε με προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φαινόλης-χλωροφορμίου 1:1 και φυγοκέντρωση σε 12000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 4 °C. Στη συνέχεια, προστέθηκε αιθανόλη 100%, η οποία περιείχε 10 μg γλυκογόνου και το μείγμα επώαστηκε κατά τη διάρκεια της νύχτας σε θερμοκρασία -20 °C και φυγοκεντρήθηκε σε 12000 rpm για 15 min σε θερμοκρασία 4 °C, ώστε να κατακρημνιστεί το DNA. Το ίζημα υποβλήθηκε σε πλύση με προσθήκη 1 ml 70% v/v αιθανόλης και φυγοκέντρωση σε 12000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 4 °C. Το ίζημα DNA επαναιωρήθηκε σε 10 μl TE και υποβλήθηκε σε αντίδραση ενίσχυσης PCR. Οι εκκινητές PCR που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: fwd 5' TCG CCG GGC TCT GCA GGA G 3' και rev 5' GTT TCG CTG CGT CCC CTT CGC 3'. Οι εκκινητές αυτοί στοχεύουν ειδικά το τμήμα του υποκινητή P1 που εκτείνεται από την περιοχή A έως την περιοχή C.

2.7 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

2.7.1 ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΜΟΡΙΑ *siRNA*

Για την αδρανοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Sp1, ώστε να μελετηθεί η επίδρασή του στα γονίδια *p73* και *VEGF*, χρησιμοποιήθηκε το kit Sp1 Validated Stealth RNAi DuoPak (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Συγκεκριμένα, κύτταρα A549 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 6 πηγαδιών και διαμολύνθηκαν με Sp1 siRNA με χρήση του αντιδραστηρίου διαμόλυνσης Lipofectamine RNAiMAX, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Το θρεπτικό υλικό που περιείχε Lipofectamine αντικαταστάθηκαν με θρεπτικό υλικό μετά από 6 ώρες. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν για 48 ώρες στους 37 °C σε επωαστικό θάλαμο CO₂, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και οι πρωτεΐνες εκχυλίστηκαν για ανάλυση κατά

Western, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε το υλικό medium-GCcontent siRNA control (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

2.7.2 ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΑ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ (decoys)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην εισαγωγή στο κύτταρο περίσσειας σταθερών δίκλωνων ολογονουκλεοτιδίων, τα οποία μπορούν να ανταγωνιστούν περιοχές του υποκινητή διαφόρων γονιδίων ως προς τη δέσμευση μεταγραφικών παραγόντων. Στην παρούσα εργασία, προκειμένου να προσδιοριστεί εάν οι περιοχές A, B και C περιέχουν λειτουργικές θέσεις δέσμευσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1, κύτταρα A549 διαμολύνθηκαν με δίκλινα φωσφοροθευικά ολιγονουκλεοτίδια για τις περιοχές A, B ή C (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Σε περίπτωση στην οποία κάποια από αυτές τις περιοχές περιέχει τελικά λειτουργική θέση δέσμευσης, το αντίστοιχο δίκλινο ολιγονουκλεοτίδιο (decoys) μπορεί να ανταγωνιστεί την περιοχή αυτή ως προς τη δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα Sp1. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της πρόσδεσης της πρωτεΐνης Sp1 στην περιοχή αυτή. Η μείωση αυτή ανιχνεύεται από τη μείωση του επιπέδου έκφρασης των μεταγραφικών προϊόντων που συντίθενται από τον υποκινητή P1, δηλαδή των ισομορφών TAp73. Η μέθοδος αυτή έχει περιγραφεί παλαιότερα [82]. Συγκεκριμένα, κύτταρα A549 καλλιεργήθηκαν σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 6 πηγαδιών και διαμολύνθηκαν με 150 nM ανταγωνιστικών ολιγονουκλεοτιδίων Sp1 (περιοχή A, B ή C), χρησιμοποιώντας αντιδραστήριο διαμόλυνσης Fugene (Roche Applied Science, Hague Road, IN, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Μετά από 4 ώρες, το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε από νέο θρεπτικό υλικό, χωρίς αντιδραστήριο Fugene και ολιγονουκλεοτίδια. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν 4, 12 και 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση και οι ολικές πρωτεΐνες που εκχυλίστηκαν από αυτά τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε στύπωμα κατά Western.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *p73*

Η μελέτη της επιγενετικής ρύθμισης του γονιδίου *p73* πραγματοποιήθηκε σε μια ομάδα δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων από 102 ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, καθώς και στους αντίστοιχους φυσιολογικούς πνευμονικούς ιστούς για 38 από αυτούς τους ασθενείς. Χρησιμοποιήθηκαν ευαίσθητοι ποσοτικοί προσδιορισμοί, προκειμένου να καθοριστούν τα επίπεδα μεθυλίωσης των υποκινητών P1 και P2 και να διερευνηθεί περαιτέρω η σχέση τους με τα επίπεδα mRNA των TAp73 και ΔNp73. Επίσης, εξετάστηκε η συσχέτιση της μεθυλίωσης των υποκινητών P1 και P2 με τη μεθυλίωση του υποκινητή του μεταθετονίου LINE-1, το οποίο αποτελεί αναπληρωματικό δείκτη της συνολικής υπομεθυλίωσης [83, 84] στον καρκίνο του πνεύμονα. Τέλος, αξιολογήθηκε η συσχέτιση της μεθυλίωσης των υποκινητών P1 και P2 με τα αντίστοιχα προϊόντα τους σε διαφορετικούς ιστολογικούς τύπους μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC), κυρίως σε αδenoκαρκίνωμα και καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων.

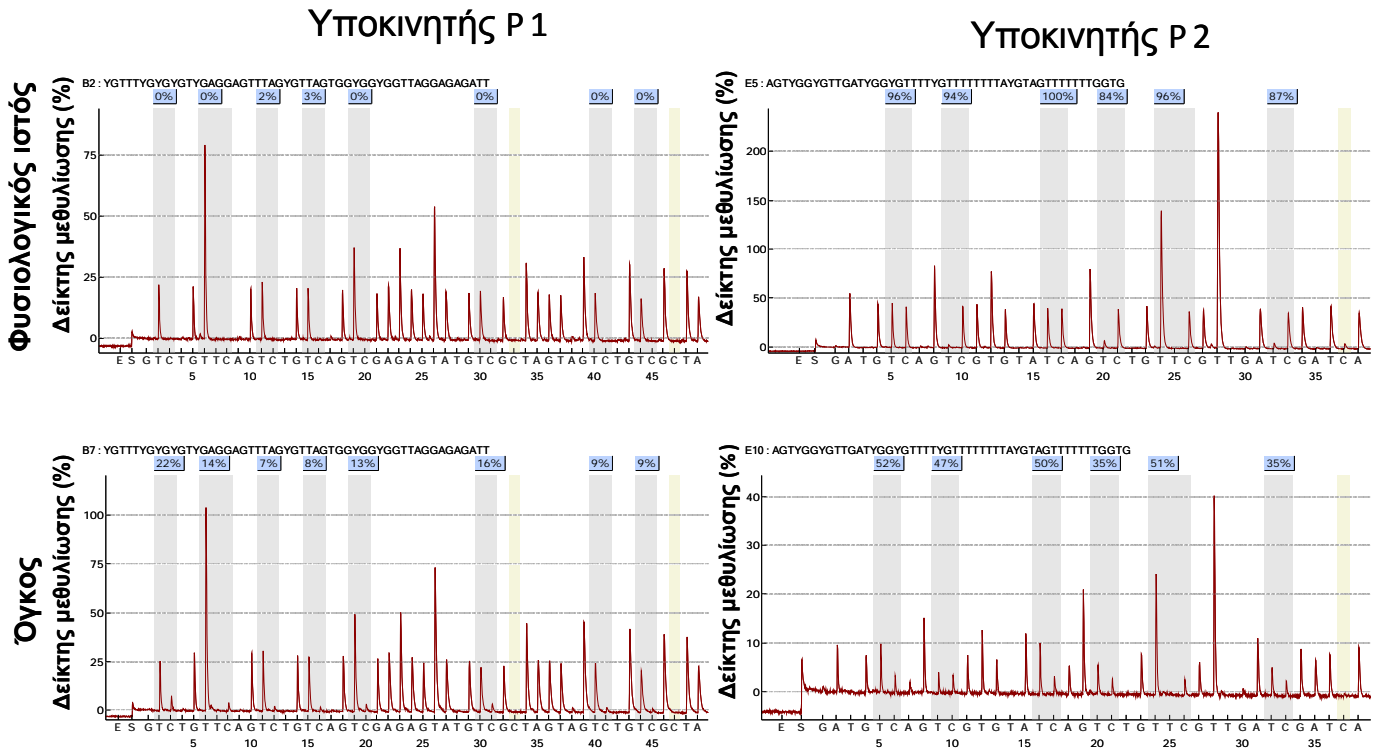
3.1.1. Κατάσταση μεθυλίωσης των υποκινητών P1 και P2 του γονιδίου *p73* σε NSCLC

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων μεθυλίωσης των υποκινητών P1 και P2 του γονιδίου *p73* σε ιστούς NSCLC, καθώς επίσης και στους διαθέσιμους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μεθυλίωσης με την τεχνική pyrosequencing. Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά διαγράμματα (pyrogram) των προσδιορισμών pyrosequencing και για τους δύο υποκινητές, ενώ στον Πίνακα 3.1 παρέχονται οι τιμές του δείκτη μεθυλίωσης (MtI) για όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν. Οι όγκοι με τιμές MtI ίσες ή μεγαλύτερες από 10% ορίστηκαν ως υπερμεθυλιωμένοι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες [85]. Στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, παρατηρήθηκαν πολύ χαμηλά επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή P1. Μόνον επτά δείγματα όγκων (ποσοστό 6,8% των δειγμάτων) υπερέβαιναν το κατώφλι υπερμεθυλίωσης 10% (Πίνακας 3.1). Ο βαθμός μεθυλίωσης του υποκινητή P2 ήταν πολύ υψηλός στους φυσιολογικούς ιστούς (μέση τιμή MtI = $91 \pm 0,2\%$), ενώ στους καρκινικούς ιστούς παρατηρήθηκαν διάφοροι βαθμοί απομεθυλίωσης. Πενήντα επτά (55,9%) από τα δείγματα που εξετάστηκαν παρουσίασαν υπομεθυλίωση του υποκινητή P2 (Πίνακας 3.1). Σε 5/102 (4,91%) δείγματα όγκων παρατηρήθηκε ταυτόχρονη υπερμεθυλίωση του υποκινητή P1 και υπομεθυλίωση του υποκινητή P2, ενώ σε 2/102 (0,02%) δείγματα όγκων παρατηρήθηκε μόνο υπερμεθυλίωση του υποκινητή P1 και σε 50/102 (49,1%) δείγματα παρατηρήθηκε μόνο υπομεθυλίωση του υποκινητή P2. Επίσης, εκτιμήθηκε η συνολική μεθυλίωση του DNA μέσω του προσδιορισμού των επιπέδων μεθυλίωσης του μεταθετονίου LINE-1. Στους ιστούς όγκων παρατηρήθηκαν διάφοροι βαθμοί υπομεθυλίωσης του υποκινητή του μεταθετονίου LINE-1

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

(μέση τιμή MtI = 58,5% ± 0,9) σε σύγκριση με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς του πνεύμονα (μέση τιμή MtI = 69,5% ± 0,1, δοκιμή Mann–Whitney $p < 0,05$). Πρέπει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων μεθυλίωσης DNA του υποκινητή P2 και του υποκινητή του μεταθετονίου LINE-1 (Spearman's $R = 0,340$, $p = 0,001$). Δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική συσχέτιση της κατάστασης μεθυλίωσης των υποκινητών P1, P2 και του LINE-1 με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, όπως η ηλικία, το φύλο, η κατάσταση T, η μετάσταση στους λεμφαδένες και η διαφοροποίηση.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 3.1. Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα (pyrogram) της ανάλυσης μεθυλίωσης του DNA των υποκινητών P1 και P2. Στον άξονα x παρουσιάζεται η σειρά κατανομής των βάσεων και στον άξονα y το επίπεδο φθορισμού. Το ποσοστό της μεθυλίωσης υπολογίζεται ως η αναλογία κορυφών C/(C+T) ανά νησίδα CpG. Ο παρακείμενος φυσιολογικός ιστός (επάνω) καταδεικνύει υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης του DNA του υποκινητή P2, ενώ ο ιστός καρκίνου του πνεύμονα (κάτω) εμφανίζει χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή P2.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 3.1: Έκφραση mRNA των ισομορφών p73 και επίπεδα μεθυλίωσης του DNA των υποκινητών του γονιδίου p73 σε δείγματα NSCLC, αναφορικά με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους τους.

Δείγμα	Κλινικοπαθολογικές παράμετροι					Δείκτης μεθυλίωσης (%)				Έκφραση mRNA (Τιμή RQ)	
	Φύλο	Ιστολογικός τύπος	Διαφοροποίηση	Κατάσταση T	Κατάσταση N	P1 σε όγκους	P2 σε όγκους	P2 σε φυσιολογικούς ιστούς	LINE-1 σε όγκους	TAp73 RQ σε όγκους	ΔNp73 RQ σε όγκους
1	A	Πλακ	μέτρια	2	0	4,23	58,43	91,2	45,5	1,12	0,46
2	A	Πλακ	υψηλή	2	1	5,00	93,79	Δ/Κ	70,5	0,18	0,00
3	A	Πλακ	μέτρια	2	1	2,85	63,83	90,7	64,8	0,42	0,45
4	A	Πλακ	μέτρια	2	0	7,34	88,04	91,3	66,5	0,22	0,28
5	A	Πλακ	χαμηλή	2	1	4,24	47,13	Δ/Κ	53,0	0,62	0,04
6	A	Πλακ	μέτρια	3	1	6,04	68,41	89,7	51,2	0,46	0,07
7	A	Αδεν	χαμηλή	2	0	3,29	92,06	92,8	58,3	1,08	0,16
8	Γ	Αδεν	μέτρια	2	1	2,72	90,74	Δ/Κ	64,1	0,15	0,00
9	Γ	Αδεν	μέτρια	2	0	46,89	56,02	Δ/Κ	58,4	0,06	0,00
10	A	Αδεν	χαμηλή	2	1	15,85	48,24	Δ/Κ	40,6	0,03	0,00
11	A	Πλακ	μέτρια	2	1	0,47	69,51	92,6	60,0	0,07	0,19
12	A	Αδεν	χαμηλή	2	2	5,18	93,30	92,1	67,7	0,98	0,07
13	A	Πλακ	μέτρια	2	1	6,82	92,93	91,4	43,1	Δ/Κ	Δ/Κ
14	A	Πλακ	χαμηλή	2	1	3,39	47,39	Δ/Κ	50,1	0,41	2,30
15	Γ	Αδεν	χαμηλή	2	2	5,65	60,56	92,7	49,8	0,41	0,08
16	Γ	Πλακ	χαμηλή	2	1	10,12	60,78	92,3	58,8	0,12	0,04
17	Γ	Αδεν	μέτρια	2	0	6,15	60,19	92,4	Δ/Κ	0,30	0,99
18	Γ	Αδεν	μέτρια	2	0	3,83	94,12	91,9	64,2	0,33	0,03
19	A	Πλακ	μέτρια	2	0	4,07	80,68	90,1	50,2	0,26	0,00
20	A	Πλακ	μέτρια	2	0	3,41	59,79	91	55,0	3,18	15,89
21	A	Πλακ	μέτρια	2	1	2,66	54,28	92,5	45,9	0,75	0,22
22	A	Αδεν	μέτρια	3	0	6,11	75,18	Δ/Κ	69,2	0,24	0,06
23	A	Πλακ	χαμηλή	3	1	3,98	90,91	Δ/Κ	58,2	0,10	0,00
24	Γ	Αδεν	μέτρια	2	0	1,83	84,06	Δ/Κ	66,9	0,77	0,26
25	Γ	Αδεν	μέτρια	2	0	4,03	91,88	Δ/Κ	41,5	Δ/Κ	Δ/Κ
26	A	Αδεν	χαμηλή	2	0	2,46	45,98	Δ/Κ	64,3	0,12	0,47
27	A	Πλακ	χαμηλή	2	1	3,48	86,93	91	58,9	0,91	0,39
28	A	Πλακ	υψηλή	3	1	3,03	62,32	Δ/Κ	53,7	0,55	0,13
29	Γ	Αδεν	μέτρια	1	0	3,18	61,49	Δ/Κ	69,1	0,26	0,29
30	A	Πλακ	μέτρια	2	1	5,95	94,37	Δ/Κ	22,9	0,28	0,04
31	Γ	Πλακ	μέτρια	2	1	0,30	12,77	Δ/Κ	63,9	0,42	9,99
32	Γ	Αδεν	μέτρια	2	0	2,68	54,50	92,2	52,7	0,48	0,07
33	A	Αδεν	χαμηλή	2	1	2,66	93,08	Δ/Κ	62,0	0,11	0,00

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

34	A	Πλακ	μέτρια	2	0	0,59	72,05	Δ/Κ	50,4	1,44	0,23
35	Γ	Αδεν	χαμηλή	2	2	7,65	54,47	90,2	57,4	0,25	0,10
36	A	Πλακ	μέτρια	2	2	3,32	94,75	90,9	44,1	1,67	0,00
37	A	Αδεν	χαμηλή	2	0	4,78	52,23	Δ/Κ	50,5	0,29	0,08
38	Γ	Αδεν	χαμηλή	3	0	5,05	61,82	Δ/Κ	33,1	0,93	0,88
39	Γ	Αδεν	χαμηλή	2	2	4,14	36,43	91,3	67,0	0,06	0,00
40	A	Αδεν	χαμηλή	2	1	3,43	94,46	93,3	60,8	0,11	0,00
41	A	Πλακ	μέτρια	4	2	5,13	92,77	Δ/Κ	43,1	0,15	0,00
42	A	Πλακ	μέτρια	2	1	2,83	50,72	Δ/Κ	43,4	1,00	0,65
43	A	Αδεν	χαμηλή	2	0	2,50	52,29	90,3	68,0	0,32	0,32
44	Γ	Αδεν	χαμηλή	2	2	2,45	93,00	93,3	64,6	0,25	0,07
45	Γ	Αδεν	χαμηλή	2	0	2,56	92,48	91,4	63,1	0,42	0,00
46	A	Πλακ	μέτρια	2	1	6,53	71,60	Δ/Κ	44,6	0,23	Δ/Κ
47	Γ	Πλακ	μέτρια	2	1	7,19	29,01	Δ/Κ	Δ/Κ	0,18	0,00
48	A	Πλακ	μέτρια	2	0	3,05	62,68	91	51,2	0,28	0,41
49	Γ	Αδεν	μέτρια	2	1	3,29	62,20	85,8	64,2	3,03	9,71
50	A	Πλακ	χαμηλή	3	1	2,81	90,59	92,2	68,9	1,00	0,02
51	Γ	Πλακ	χαμηλή	2	0	3,86	75,91	Δ/Κ	58,9	2,97	0,77
52	A	Αδεν	χαμηλή	2	1	3,04	65,23	93,5	56,8	1,35	1,04
53	Γ	Πλακ	Δ/Κ	2	0	4,73	72,00	Δ/Κ	67,0	0,02	0,00
54	Γ	Αδεν	χαμηλή	2	2	4,86	93,75	Δ/Κ	66,1	0,09	0,00
55	A	Αδεν	μέτρια	2	2	3,24	71,38	90,6	64,0	0,90	0,45
56	A	Αδεν	χαμηλή	1	0	28,04	67,58	Δ/Κ	47,1	0,09	0,00
57	A	Πλακ	μέτρια	2	0	6,59	89,25	92,2	60,3	0,13	0,02
58	Γ	Πλακ	μέτρια	2	0	3,05	49,05	91,6	52,3	0,42	0,29
59	Γ	Πλακ	μέτρια	1	0	3,99	71,49	Δ/Κ	58,5	0,31	0,04
60	Γ	Αδεν	χαμηλή	2	1	3,96	75,82	90,3	Δ/Κ	0,08	0,54
61	A	Αδεν	χαμηλή	1	0	3,25	52,69	90	47,4	1,16	2,10
62	A	Αδεν	υψηλή	2	0	5,49	92,53	91,2	Δ/Κ	0,19	0,00
63	A	Αδεν	χαμηλή	2	0	4,69	80,36	Δ/Κ	67,9	0,33	0,44
64	Γ	Αδεν	χαμηλή	1	0	5,10	91,42	Δ/Κ	55,9	0,47	0,00
65	Γ	Αδεν	μέτρια	2	2	4,18	88,41	Δ/Κ	66,3	0,55	0,30
66	Γ	Πλακ	μέτρια	2	0	3,42	59,23	90,9	64,1	0,96	0,01
67	A	Αδεν	μέτρια	2	0	2,97	94,42	91,3	69,1	0,29	0,00
68	A	Αδεν	μέτρια	2	1	4,77	93,29	Δ/Κ	Δ/Κ	0,07	0,00
69	A	Αδεν	μέτρια	2	1	5,13	91,35	Δ/Κ	63,8	0,31	0,39
70	Γ	Πλακ	μέτρια	2	0	3,36	81,21	92,5	60,1	2,48	1,10
71	Γ	Πλακ	μέτρια	2	2	3,45	88,46	91,7	64,6	0,10	0,00
72	A	Πλακ	χαμηλή	2	0	5,53	93,60	Δ/Κ	63,0	0,10	0,00
73	Γ	Αδεν	χαμηλή	2	1	4,98	91,71	Δ/Κ	64,9	0,38	0,58
74	A	Αδεν	μέτρια	2	0	5,51	93,93	Δ/Κ	68,0	0,15	0,00
75	A	Πλακ	μέτρια	3	0	4,22	92,25	Δ/Κ	64,7	0,15	0,13
76	A	Αδεν	χαμηλή	2	0	32,06	84,48	Δ/Κ	45,2	0,05	0,00
77	Γ	Αδεν	υψηλή	1	0	5,81	94,16	Δ/Κ	61,1	0,02	0,00

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

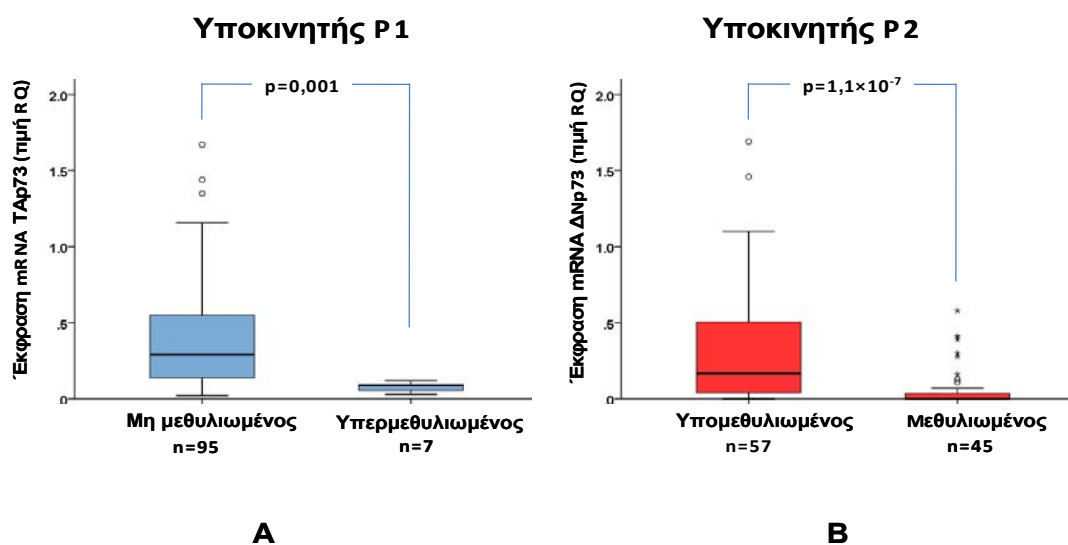
78	Γ	Πλακ	μέτρια	2	0	4,93	94,14	Δ/Κ	71,0	0,07	0,00
79	Γ	Πλακ	μέτρια	2	0	4,64	79,34	Δ/Κ	65,8	0,88	1,46
80	Α	Αδεν	μέτρια	2	1	7,81	91,28	Δ/Κ	67,3	0,04	0,00
81	Γ	Πλακ	μέτρια	2	1	3,74	72,74	Δ/Κ	67,0	0,14	0,04
82	Γ	Πλακ	χαμηλή	1	2	5,71	93,93	Δ/Κ	66,4	0,28	0,01
83	Α	Πλακ	χαμηλή	2	0	6,89	47,57	Δ/Κ	60,2	0,48	0,05
84	Α	Αδεν	χαμηλή	4	1	6,99	91,45	Δ/Κ	66,1	0,04	0,00
85	Α	Αδεν	μέτρια	4	0	3,79	91,49	Δ/Κ	67,7	0,06	0,11
86	Γ	Αδεν	μέτρια	1	1	4,38	89,66	Δ/Κ	68,6	0,55	0,41
87	Α	Πλακ	μέτρια	2	0	5,31	75,11	Δ/Κ	58,8	0,24	0,06
88	Α	Πλακ	μέτρια	2	2	3,37	66,26	Δ/Κ	45,5	0,22	0,13
89	Α	Αδεν	μέτρια	4	0	4,66	92,56	Δ/Κ	65,4	0,07	0,00
90	Γ	Αδεν	μέτρια	1	0	14,12	91,57	Δ/Κ	67,4	0,09	0,00
91	Γ	Αδεν	χαμηλή	1	0	2,72	53,84	Δ/Κ	51,9	0,73	1,69
92	Α	Πλακ	χαμηλή	2	1	3,46	92,96	Δ/Κ	68,4	0,06	0,00
93	Γ	Αδεν	μέτρια	2	0	2,97	72,49	Δ/Κ	65,9	0,43	0,14
94	Γ	Αδεν	μέτρια	3	2	3,95	92,46	Δ/Κ	60,9	0,02	0,02
95	Α	Πλακ	χαμηλή	2	2	10,77	89,74	Δ/Κ	59,2	0,10	0,00
96	Γ	Αδεν	μέτρια	2	0	5,29	92,22	Δ/Κ	66,7	0,09	0,00
97	Γ	Πλακ	μέτρια	3	2	3,17	65,56	Δ/Κ	50,0	0,41	0,10
98	Α	Αδεν	χαμηλή	2	0	5,05	81,15	Δ/Κ	67,9	1,06	0,04
99	Γ	Πλακ	χαμηλή	2	1	7,76	92,51	Δ/Κ	61,9	0,18	0,00
100	Γ	Αδεν	μέτρια	2	2	8,73	93,31	Δ/Κ	57,9	0,05	0,01
101	Γ	Πλακ	μέτρια	2	0	3,34	60,62	Δ/Κ	44,4	0,27	0,08
102	Α	Πλακ	χαμηλή	3	1	4,09	64,67	Δ/Κ	55,6	0,25	0,04

Συντομογραφίες: Α = άνδρας, Γ = γυναίκα, Πλακ = καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων, Αδεν = αδenoκαρκίνωμα, Δ/Κ = δεν καθορίστηκε.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1.2. Τα επίπεδα mRNA των TAp73 και ΔNp73 σχετίζονται με την κατάσταση μεθυλίωσης των αντίστοιχων υποκινητών τους

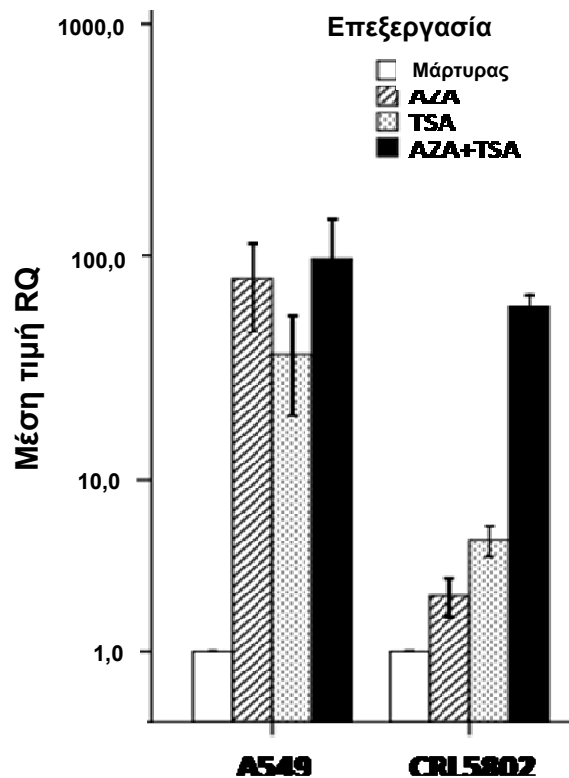
Τα επίπεδα των mRNA TAp73 και ΔNp73 μετρήθηκαν σε πρωτοπαθείς όγκους μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα με ποσοτική μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου. Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στο σχεδιασμό των εκκινητών, ώστε να διασφαλιστεί η χρήση εκκινητών που ενισχύουν μόνον τα μετάγραφα ΔNp73 και όχι τα μετάγραφα p73Δex2, p73Δex2/3 και ΔN'p73, τα οποία προκύπτουν από τον υποκινητή P1. Στη συνέχεια, αναλύθηκε η έκφραση των μεταγράφων TAp73 σε σύγκριση με τα επίπεδα μεθυλίωσης DNA του υποκινητή P1 στην ομάδα των δειγμάτων όγκου. Η έκφραση mRNA των επτά δειγμάτων που είχαν υπερμεθυλιωμένο υποκινητή P1 ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με εκείνη της υποομάδας δειγμάτων που είχαν μη μεθυλιωμένο υποκινητή P1 (Εικόνα. 3.2). Ωστόσο, η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων mRNA του ΔNp73 και των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή P2 ήταν περισσότερο ισχυρή (δοκιμή Mann–Whitney, $p = 1,1 \times 10^{-7}$), ενώ τα επίπεδα mRNA του ΔNp73 ήταν σημαντικά υψηλότερα στους όγκους που είχαν υπομεθυλιωμένο υποκινητή P2 (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2. A) Θηκόγραμμα (box plot) της κατανομής των τιμών RQ TAp73 σε δείγματα ιστών καρκίνου του πνεύμονα τα οποία διαθέτουν μη μεθυλιωμένο υποκινητή P1 έναντι των δειγμάτων ιστών καρκίνου του πνεύμονα τα οποία διαθέτουν υπερμεθυλιωμένο υποκινητή P1. B) Θηκόγραμμα της κατανομής των τιμών RQ ΔNp73 RQ σε δείγματα ιστών καρκίνου του πνεύμονα τα οποία διαθέτουν μεθυλιωμένο υποκινητή P2 έναντι των δειγμάτων ιστών καρκίνου του πνεύμονα τα οποία διαθέτουν υπομεθυλιωμένο υποκινητή P1. Οι αστερίσκοι και οι κύκλοι στο διάγραμμα αντιπροσωπεύουν τις έκτροπες τιμές.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δεν παρατηρήθηκε καμία άλλη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης mRNA TAp73 ή ΔNp73 και οποιασδήποτε από τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους των δειγμάτων που εξετάστηκαν. Προκειμένου να επαληθευτεί περαιτέρω η επίδραση της υπομεθυλίωσης του υποκινητή P2 στην έκφραση των μεταγράφων ΔNp73, μελετήθηκε η επίδραση επιγενετικών τροποποιητικών μορίων στα επίπεδα mRNA ΔNp73 *in vitro*. Συγκεκριμένα, μία κυτταρική σειρά καρκίνου του πνεύμονα που αντιστοιχεί σε αδενοκαρκίνωμα (A549) και μία κυτταρική σειρά καρκίνου του πνεύμονα που αντιστοιχεί σε καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων (CRL5802) υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τον αναστολέα της DNA μεθυλοτρανσφεράσης 5-αζα-2-δεοξυκυτιδίνη (AZA) και τον αναστολέα αποακετυλάσης ιστονών τριχοστατίνη A (TSA). Και οι δύο κυτταρικές σειρές βρέθηκε ότι διαθέτουν μεθυλιωμένο υποκινητή P2 (MtI>80%), ενώ τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή P1 είναι πολύ χαμηλά (MtI<10%). Η έκφραση mRNA ΔNp73 αυξήθηκε κατά την επεξεργασία, ενώ παρατηρήθηκε αθροιστική επίδραση των δύο ενώσεων και στις δύο κυτταρικές σειρές. Είναι αξιοσημείωτο ότι η επεξεργασία με 5-αζα-2-δεοξυκυτιδίνη μόνο αύξησε τα επίπεδα ΔNp73 περισσότερο από 100 φορές στην κυτταρική σειρά A549 (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: Ανάλυση της έκφρασης $\Delta Nr73$ σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα που έχουν υποβληθεί σε επεξεργασία με 5'-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη (AZA) και τριχοστατίνη (TSA). Η προσθήκη των ουσιών μεμονωμένα πυροδοτεί την υπερέκφραση των ισομορφών $\Delta Nr73$ και στις δύο κυτταρικές σειρές, ενώ στα κύτταρα CRL5802 παρουσιάζεται έντονη αθροιστική επίδραση. Η έκφραση mRNA $\Delta Nr73$ (άξονας y) παρουσιάζεται ως τιμή σχετικής ποσοτικοποίησης (RQ, relative quantification) σε λογαριθμική κλίμακα. Για κάθε κυτταρική σειρά, χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας (μη επεξεργασμένα κύτταρα) ως βαθμονομητής, επομένως η έκφραση του μάρτυρα έχει οριστεί ως 1.

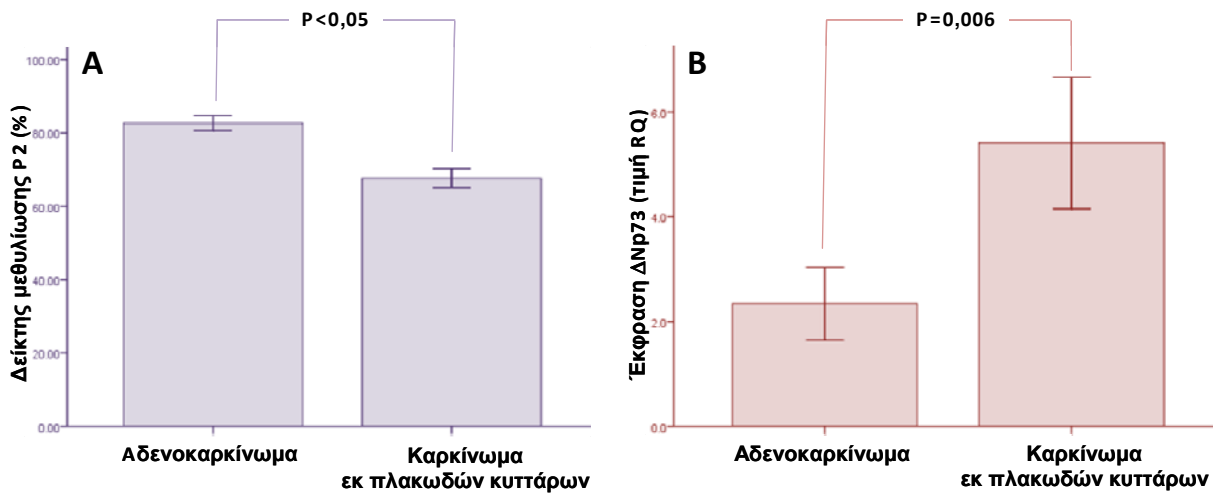
3.1.3. Η υπερέκφραση του $\Delta Nr73$ που επάγεται από υπομεθυλίωση είναι περισσότερο υψηλή στα καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων σε σχέση με τα αδενοκαρκινώματα

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.4, τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή P2 ήταν σημαντικά χαμηλότερα στα καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων (μέση τιμή MtI = 68% ± 2,5) σε σύγκριση με τα αδενοκαρκινώματα (μέση τιμή MtI = 83% ± 3,0, δοκιμή Mann–Whitney U = 655,50, $p < 0,05$). Παρόμοια, η έκφραση mRNA του $\Delta Nr73$ ήταν υψηλότερη σε καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων (μέση τιμή RQ = 0,98 ± 0,41) σε σύγκριση με τα αδενοκαρκινώματα (μέση τιμή RQ = 0,19 ± 0,05, δοκιμή Mann–Whitney $p = 0,006$). Τα επίπεδα μεθυλίωσης εμφάνισαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα επίπεδα mRNA του $\Delta Nr73$ τόσο σε αδενοκαρκινώματα (Spearman's R = -0,373, $p = 0,008$), όσο και σε καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων (Spearman's R = -0,425,

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

$p = 0,002$). Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η συσχέτιση ήταν περισσότερο ισχυρή σε καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων σε σύγκριση με τα αδενοκαρκινώματα. Κατά συνέπεια, τα υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή P2 σε αδενοκαρκινώματα προκαλούν χαμηλότερα επίπεδα mRNA του ΔNp73, ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή P2 σε καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων αντιστοιχούν σε υψηλότερα επίπεδα mRNA του ΔNp73 (Εικόνα 3.4). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή P1 μεταξύ των καρκινωμάτων εκ πλακωδών κυττάρων και των αδενοκαρκινωμάτων (δοκιμή Mann–Whitney $U = 1112,00$, $p = 0,212$), παρότι παρατηρήθηκε μια οριακή διαφορά στα επίπεδα mRNA του TAp73 μεταξύ καρκινωμάτων εκ πλακωδών κυττάρων (μέση τιμή $RQ = 0,57 \pm 0,1$) και αδενοκαρκινωμάτων (μέση τιμή $RQ = 0,4 \pm 0,07$) (δοκιμή Mann–Whitney $U = 957,50$, $p = 0,044$). Επομένως, μεταξύ των δύο ιστολογικών τύπων παρουσιάζονται διαφορές τόσο στα επίπεδα mRNA του ΔNp73, όσο και στα επίπεδα mRNA του TAp73. Ωστόσο, μόνο τα επίπεδα mRNA του ΔNp73 είναι συμβατά με αντίστοιχες διαφορές στα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή P2 σε αυτούς τους ιστολογικούς τύπους.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 3.4. Η υπομεθυλίωση του υποκινητή P2 είναι μεγαλύτερη σε καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων σε σύγκριση με τα αδενοκαρκινώματα (A). Αυτό αντανακλάται άμεσα στα επίπεδα των μεταγράφων ΔNr73, τα οποία είναι υψηλότερα σε καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων σε σύγκριση με τα αδενοκαρκινώματα (B). Τα ιστογράμματα αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές και οι γραμμές σφάλματος παρουσιάζουν το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής.

3.2. ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ p73

Η παρούσα μελέτη, καθώς και μια άλλη πρόσφατη μελέτη [37] κατέδειξαν ότι ο υποκινητής P1 στην πλειονότητα των δειγμάτων όγκων NSCLC που εξετάστηκαν είναι μη μεθυλιωμένος. Από την άλλη πλευρά, έχει αναφερθεί η συχνή υπερέκφραση των ισομορφών TAp73 στον καρκίνο του πνεύμονα [36, 37]. Αυτό σημαίνει ότι ο υποκινητής P1 είναι απορρυθμισμένος στον καρκίνο του πνεύμονα, αλλά η απορρύθμιση αυτή στις περισσότερες περιπτώσεις δεν σχετίζεται με μεταβολή της μεθυλίωσης. Κατά συνέπεια, η υπερέκφραση των ισομορφών TAp73 θα μπορούσε να αποδοθεί σε απορρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν τη δραστηριότητα του υποκινητή P1. Πράγματι, έχει καταδειχτεί ότι στον υποκινητή P1 υπάρχουν λειτουργικές θέσεις δέσμησης του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 [86], μέσω των οποίων η πρωτεΐνη E2F1 επάγει υπερέκφραση των ισομορφών TAp73 και, συνακόλουθα, απόπτωση [87, 88]. Έχει αναφερθεί ότι ο υποκινητής P1 δεν απενεργοποιείται πλήρως από κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση των λειτουργικών θέσεων δέσμησης E2F1 [87], γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι κάποιος ή κάποιοι πρόσθετοι μεταγραφικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του υποκινητή P1. Με βάση τα παραπάνω, το δεύτερο μέρος της παρούσας διατριβής επικεντρώθηκε στην ταυτοποίηση νέων μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι ελέγχουν τη χρήση του υποκινητή P1 και, κατά συνέπεια τη σχετική έκφραση των ισομορφών p73 στον καρκίνο του πνεύμονα. Επίσης, ταυτοποιήθηκαν οι ισομορφές TAp73 που υπερεκφράζονται στον καρκίνο του πνεύμονα. Τέλος, διερευνήθηκε η επίδραση των μεταγραφικών παραγόντων που ταυτοποιήθηκαν στην έκφραση των ισομορφών ΔNp73. Για την επίτευξη αυτών των ερευνητικών στόχων χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα, καθώς και μια ομάδα 26 δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων ασθενών με NSCLC μαζί με τους αντίστοιχους, παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς του πνεύμονα.

3.2.1. Ο υποκινητής P1 του γονιδίου *p73* διαθέτει πολλές δυνητικές θέσεις δέσμευσης Sp1

Προκειμένου να ταυτοποιηθούν νέοι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι ελέγχουν τη χρήση του υποκινητή P1, αναζητήθηκαν συντηρημένες θέσεις δέσμευσης σε περιοχές της αλληλουχίας του υποκινητή P1 οι οποίες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία μεταξύ διαφόρων ζωικών ειδών, συμπεριλαμβανομένων των *Bos Taurus*, *Equus caballus*, *Erinaceus europaeus*, *Loxodonta Africana*, *Macaca mulatta*, *Mus musculus*, *Ornithorhynchus anatinus*, *Otolemur garnettii*, *Pan troglodytes*, *Rattus norvegicus* and *Tupaia belangeri*. Καταρχήν, επιλέχθηκε η θέση έναρξης μεταγραφής (TSS) των μεταγράφων ENST00000346387, ENST00000354437, ENST00000357733, ENST00000378290 και ENST00000378295 του ανθρώπου, η οποία βρίσκεται στη θέση chr1:3558989 (Ensembl v54 – May 2009). Η ανάλυση εστιάστηκε στα πρώτα 250 bp (ζεύγη βάσεων) ανοδικά της TSS (θέσης έναρξης μεταγραφής), που παρουσίαζαν το υψηλότερο ποσοστό ομολογίας μεταξύ των θηλαστικών. Ταυτοποιήθηκαν τέσσερις συντηρημένες περιοχές στον υποκινητή P1 του ανθρώπινου γονιδίου *p73* (A έως D), οι οποίες περιλάμβαναν δυνητικές θέσεις δέσμευσης του Sp1 (Εικόνα 3.5). Η περιοχή A εκτείνεται από -233 έως -204 bp ανοδικά της TSS του υποκινητή P1 του ανθρώπινου γονιδίου *p73* και περιλαμβάνει 2 δυνητικά στοιχεία δέσμευσης Sp1. Οι περιοχές B, C και D οι οποίες εκτείνονται από -61 έως -33 bp, από -20 έως -1 bp και από -4 έως +20 bp ανοδικά της TSS, αντίστοιχα, περιέχουν, όλες, από ένα πιθανό στοιχείο δέσμευσης Sp1. Αυτή η *in silico* πρόβλεψη των υποψήφιων μοτίβων Sp1 στις περιοχές A, C και D συμφωνεί με μια προηγούμενη μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MatInspector V2.2 στη διαδικτυακή τοποθεσία TRANSFAC WWW [66]. Επιπρόσθετα, η ανάλυση ConTra προσδιόρισε ακόμα ένα υποψήφιο μοτίβο Sp1 στην περιοχή B. Η μελέτη κατέδειξε, επίσης, μια κανονική, συντηρημένη αλληλουχία TATA Box στη θέση -32, με βάση τη χαρτογράφηση της TSS από το πρόγραμμα Ensembl, η οποία είναι ταυτόσημη με την αλληλουχία TATA Box που έχει περιγραφεί παλαιότερα για τον υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου *p73* [86].

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

		Περιοχή A			
<i>Homo sapiens</i>	-242	cgcgcgccaaaagggcgg-----cgggaaggaggcggggca-----gagcgcgcg-cccgg	-196		
<i>Bos taurus</i>		cgcgcgccaaaagacgg-----cgggaaggaggcggggca-----gagtgcgccccgg			
<i>Equus caballus</i>		cgcgcgccaaaagacgg-----cgggaaggaggcggggca-----gagcgcgcg-cccgg			
<i>Erinaceus europaeus</i>		cgcgcgccaaaagggcgg-----cgggaaggaggcggggca-----gagagcg-cccgg			
<i>Loxodonta africana</i>		tgcgcgccagacacggg-----cgggaaggaggcgcccct-----gagggcg-----			
<i>Mus musculus</i>		cgcgcgccaaagcggg-----cgggaaggaggcgggag-----gagcggg-gccca			
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>		caagtggcaggcggcagtgccgtcaggggagtgcggagggtgaatgcgctg-ccccg			
<i>Otolemur garnettii</i>		cgcgcgccaaaagcggg-----cgggaaggaggcggggca-----gagagcg-cccgg			
<i>Pan troglodytes</i>		cgcgcgccaaaagggcgg-----cgggaaggaggcggggca-----gagcgcg-cccgg			
<i>Macaca mulatta</i>		cgcgcgccaaaagcggg-----cgggaaggaggcggggca-----gagcgcg-cccgg			
<i>Rattus norvegicus</i>		cgcgcgccaaagc-----agaggcggga-----gagcaga-gcccg			
<i>Tupaia belangeri</i>		cgcgcgccaaa-gcgg-----cgggaaggaggcggggca-----gagcgcgcgccag			
<i>Homo sapiens</i>	-195	gaccccgcac-ttggacgcggccagctggagag-gcgggagcgccggaggagaccttggcc	-139		
<i>Bos taurus</i>		gaccccgcac-tcggacgcggccagctggggggg-gcgggagcgccgatggcgaaccttggcc			
<i>Equus caballus</i>		gaccccgcacttcggacgcgctccagctgcggga-gcggagcgccggctgcaaccttggct			
<i>Erinaceus europaeus</i>		gaccccgcac-tcggacgcggccagctggggggg-gcgggagcgccgcgggcaaccgggtc			
<i>Loxodonta africana</i>		gatccccg-c-tctgcaaaagccagctgcgagg-gcgggagcgcgaggagacagctcggcc			
<i>Mus musculus</i>		gaccccgcac-tcggcagagcagctgggggag-gcggggcgcgctgggagccaggggc			
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>		gcccccgcc-tccgggagggcggccatggttgg-gcgagacg-----agatgggagccgggac			
<i>Otolemur garnettii</i>		a--cccgcac-tcggagcggccagctggggggg-gcgggagcgcc--gaggagaccttggcc			
<i>Pan troglodytes</i>		gaccccgcac-ttggacgcggcccccttggacagtgcggagcgccgggaggagatcttgtcc			
<i>Macaca mulatta</i>		gaccccgcac-tcggacgcggccatctgggggag-gcgggagcgccgggaggagaccttggcc			
<i>Rattus norvegicus</i>		gaccccgcac-tcggcagagccagctgggggag-gcggggcgcgctgggagccgggggc			
<i>Tupaia belangeri</i>		gacccctgac-ac-gacgcggccagctgggggg-gcgggagcgccgggaggagaccttggcc			
<i>Homo sapiens</i>	-138	-----ccgcc-gcgactcgggtggcccgc-	-116		
<i>Bos taurus</i>		ctagcct-gg-----cgctgttgcctctgctctcctcgcacaacggctgagcgcccgc-c			
<i>Equus caballus</i>		ccggcctggg-----ccccgccggcgcctctcccgcac-gcctgagcgcccgc-c			
<i>Erinaceus europaeus</i>		ccggcct-aa-----ccgcggccg-ccagcccttctccagcg-cgggctgagcgcccgc-c			
<i>Loxodonta africana</i>		-----ggggaccgcgcgcgcctgtcccgctcccgc-gcggctga--gcccg-c			
<i>Mus musculus</i>		-----cggttgg-ccggcccctcctcccgc-c-acgctgagt-gcccgc-c			
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>		-----tttg-gcaataaagaaagctg-t			
<i>Otolemur garnettii</i>		-----aggcc-----cgccccgc			
<i>Pan troglodytes</i>		-----ccgcc-gcgactcgggtggcccgc			
<i>Macaca mulatta</i>		-----ccgcc-gcgactcgggtggcccgc			
<i>Rattus norvegicus</i>		-----ccggcg-gcggcccctcctcccgc-c-acgctgagt-gcccgc-c			
<i>Tupaia belangeri</i>		tcggccc-gg-----cccggcag-cctggcccctcctcgcg-gcggctgagtagcccgc-c			
<i>Homo sapiens</i>	-115	gctgcct-----tcccgcgcggcgctaa-aaaaggcgtaacgcccgggcccg-cct	-65		
<i>Bos taurus</i>		gctgcct-----tcccgc-cggcgctgcgggaaggcgctaacgctggcgggta-ccc			
<i>Equus caballus</i>		gctgcct-----tcccgcggcagcgggctgcgggaaggcgctaacgcccgcggcgg-ccc			
<i>Erinaceus europaeus</i>		gctacct-----tcccgcgcggcggtgcgggaaggcgctaaccc-gcggcca-ccc			
<i>Loxodonta africana</i>		gccccct-----tcccgcggc-caggtc-gaacagcgctaa-----gcccgtg			
<i>Mus musculus</i>		gctgcct-----tcccgcgggtccgcca-gaaaggcgctaa-gcctgcggcag-tcc			
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>		gcttgcctgctaaatgcgacctcccctcgtca-gagggaccat-----ctg-tct			
<i>Otolemur garnettii</i>		gctccct-----			
<i>Pan troglodytes</i>		gctgcct-----tcccgcgcggcctggctaa-aaaaggcgtaacgcccgggcccg-cct			
<i>Macaca mulatta</i>		gctgcct-----tcccgcgcggcgggctaa-aaaaggcgtaacgcccgggcccg-cct			
<i>Rattus norvegicus</i>		gctgcct-----tcccgcgggtccgcca-gaaaggcgctaa-gcctgcggcag-ccc			
<i>Tupaia belangeri</i>		gctgcct-----tcccgcctgcgggctgcaaaaggcgtaacgcccgggcgcccc			
		Περιοχή B		TATA Box	
<i>Homo sapiens</i>	-64	ac---tcccgcggcgctcccctcccgcgcccatat---aacccgctt---gg	-18		
<i>Bos taurus</i>		c---tcccgcggcgctcccctcccgcgcccatat---aacccgctt---gg			
<i>Equus caballus</i>		cc---tcccgcggcgctcccctcccgcggccatata---aacccgctc---ga			
<i>Erinaceus europaeus</i>		c---tcccgcggcagcgcctcccctcccgcgcccatata---aactgcctc---gg			
<i>Loxodonta africana</i>		c---gccccgc-cgcgccccctcacgcgcggatata---aacccgc---g			
<i>Mus musculus</i>		cc---tcggcgc-cgcctcccctgctcgcacacctata---aacccgc-----			
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>		ccgagcgcctcacccccacccccatctctacgcatgatggggaggccacttccagagga			
<i>Otolemur garnettii</i>		-----			
<i>Pan troglodytes</i>		ac---tcccgcggcgctcccctcccgcgcccatat---aacccgctata---gg			
<i>Macaca mulatta</i>		ac---tcccgcggcgctcccctcccgcgcccatat---aacccgctata---gg			
<i>Rattus norvegicus</i>		cc---tcggcgc-cgcctcccctgccccacgccatata---aacccgc-----			
<i>Tupaia belangeri</i>		cc---tctccacagagcctcccctcccgcggccataa---aatccgctc-----tg			
		Περιοχή C		TSS	
<i>Homo sapiens</i>	-17	ggccgggagccccgcctgctcccgcggg-----cgaccggccccggag-g	29		
<i>Bos taurus</i>		-cgccgggagccccgcctgctcccgcgggccccgggagccccgggagccccggag-g			
<i>Equus caballus</i>		-gccccgggagccccgcctgctcccgcgggccccgggagccccgggagccccggag-g			
<i>Erinaceus europaeus</i>		cgccgggagccccgcctgctcccgcgggagccccgggagccccgggagccccggag-g			
<i>Loxodonta africana</i>		gccccgggagccccgcctgctcccgcgggagccccgggagccccgggagccccggag-g			
<i>Mus musculus</i>		cgtccccgcatccag-----			
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>		aaccttgccctctcccgcacac-----			
<i>Otolemur garnettii</i>		-----			
<i>Pan troglodytes</i>		ggccgggagccccgcctgctcccgcggg-----cgccgggagccccggag-g			
<i>Macaca mulatta</i>		ggccgggagccccgcctgctcccgcggg-----cgccgggagccccggag-g			
<i>Rattus norvegicus</i>		cgtccccgagccccgcctcccgcggg-----ctcagccca-----			
<i>Tupaia belangeri</i>		cgccgggagccccgcctgctcccgcgggagccccgggagccccgggagccccggag-g			

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εικόνα 3.5: Ο υποκινητής P1 του γονιδίου p73 διαθέτει πολλές δυνητικές θέσεις δέσμευσης Sp1, οι οποίες είναι συντηρημένες μεταξύ 12 ειδών θηλαστικών. Η στοίχιση με τη χρήση της ανάλυσης ConTra κατέδειξε τέσσερις συντηρημένες περιοχές που περιέχουν δυνητικά στοιχεία δέσμευσης Sp1. Οι περιοχές αυτές εκτείνονται από -233 έως -204 bp (Περιοχή A), -61 έως -33 bp (Περιοχή B), -20 έως -1 bp (Περιοχή C) και -4 έως +20 bp (Περιοχή D) σε σχέση με την TSS του υποκινητή P1 του ανθρώπινου γονιδίου p73. Οι τέσσερις περιοχές επισημαίνονται με πλαίσια, ενώ οι θέσεις δέσμευσης του Sp1 επισημαίνονται με κίτρινο χρώμα. Η αλληλουχία TATA box περικλείεται, επίσης, σε πλαίσιο.

3.2.2. Οι περιοχές A, B και C του υποκινητή P1 μπορούν να δεσμεύσουν *in vitro* πρωτεΐνη Sp1

Αξιολογήθηκε η συγγένεια πρόσδεσης της πρωτεΐνης Sp1 που είχε συντεθεί *in vitro* στις περιοχές A, B, C και D με τη βοήθεια πειραμάτων EMSA. Η *in vitro* πρωτεΐνη Sp1 μπορεί να δεσμευτεί σε ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στις περιοχές A, B και C (Εικόνα 3.6α, διαδρομή 6 και 11, Εικόνα 3.6β, διαδρομή 6, αντίστοιχα). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανταγωνισμού μεταξύ του ίδιου σημασμένου και μη σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου A (Self-competition), κατά τα οποία το μη σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο A βρισκόταν σε περίσσεια. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανταγωνισμού μεταξύ του μη σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου A και του ολιγονουκλεοτιδίου-θετικού μάρτυρα (CON), το οποίο περιέχει μία λειτουργική θέση δέσμευσης Sp1-binding site). Τα παραπάνω πειράματα είχαν ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση του συμπλέγματος Sp1 πρωτεΐνης-ραδιοσημασμένου νουκλεοτιδίου A λόγω της προσθήκης περίσσειας είτε μη σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου A (self competition), είτε μη σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου-μάρτυρα (Εικόνα 3.6α, διαδρομές 7 και 8, αντίστοιχα). Η προσθήκη περίσσειας μη σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου-αρνητικού μάρτυρα (mSp1), το οποίο περιέχει μια μεταλλαγμένη λειτουργική θέση δέσμευσης Sp1, δεν επηρέασε την πρόσδεση του ραδιοσημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου A στην πρωτεΐνη Sp1 (Εικόνα 3.6α, διαδρομή 9). Επιπρόσθετα, η προσθήκη αντισώματος αντι-Sp1 είχε ως αποτέλεσμα ισχυρή αντίδραση supershift του συμπλέγματος ραδιοσημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου A-πρωτεΐνης Sp1 (Εικόνα 3.6α, διαδρομή 10). Παρόμοια πειράματα για τις περιοχές B (Εικόνα 3.6α) και C (Εικόνα 3.6β) επιβεβαίωσαν την ειδική δέσμευση *in vitro* Sp1-DNA. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ενεργότητα δέσμευσης του ολιγονουκλεοτιδίου που αντιστοιχεί στην περιοχή A είναι σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τα υπόλοιπα ολιγονουκλεοτίδια που εξετάστηκαν, γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι και οι δύο πιθανές θέσεις δέσμευσης Sp1 στην περιοχή A είναι, ενδεχομένως, ενεργές A. Κατά συνέπεια, η περιοχή A φαίνεται ότι αποτελεί καλύτερη θέση δέσμευσης για τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1. Αντίθετα, η περιοχή D δεν μπόρεσε να δεσμεύσει *in vitro* Sp1 (Εικόνα 3.6β, διαδρομές 11-15), πιθανόν επειδή βρίσκεται καθοδικά σε σχέση με τη θέση έναρξης της μεταγραφής και δεν συμπεριλήφθηκε στα επόμενα στάδια της ανάλυσης.

3.2.3. Δέσμευση της ενδογενούς πρωτεΐνης Sp1 από κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα στον υποκινητή P1

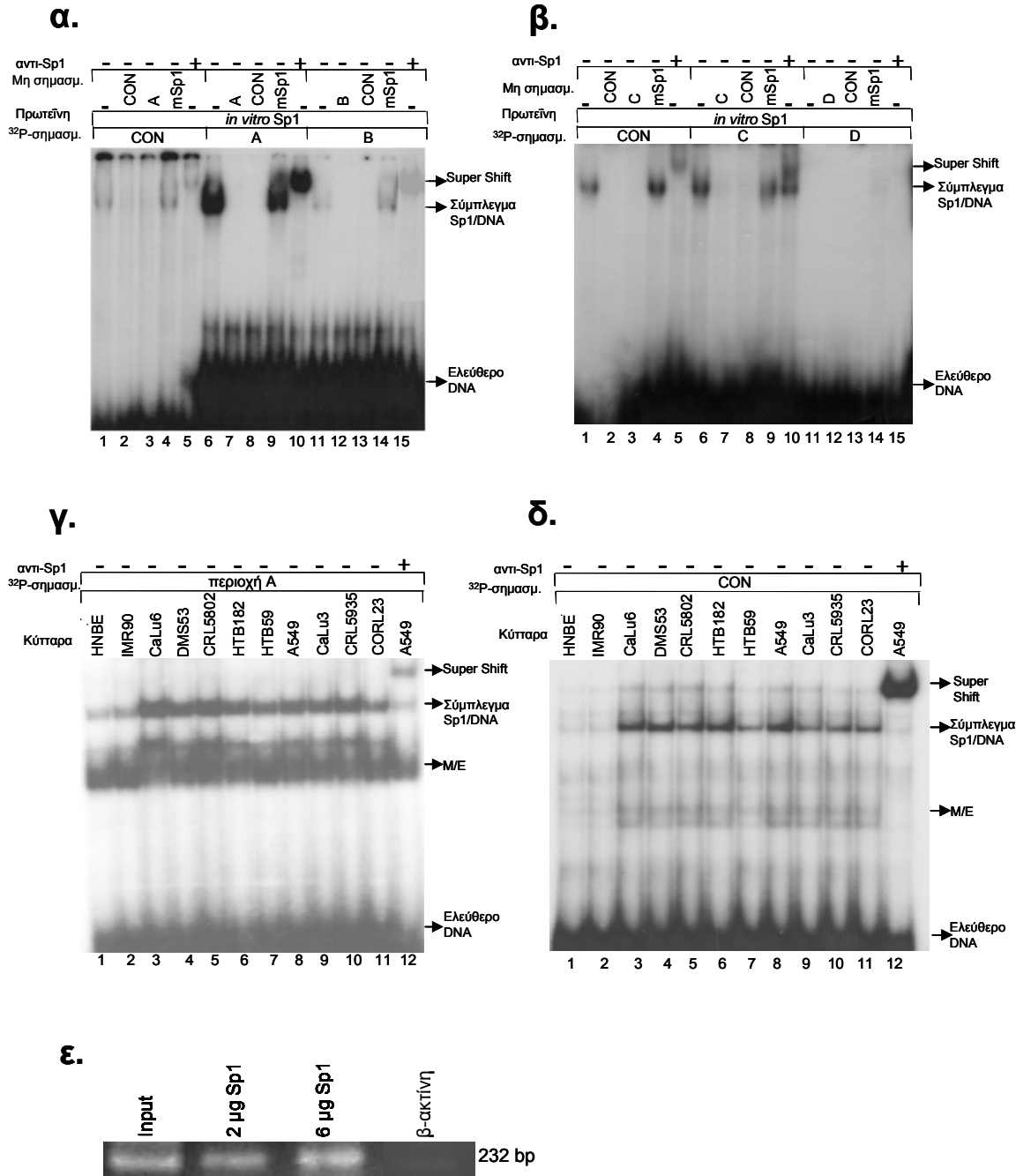
Προκειμένου να επαληθευτεί η ικανότητα της ενδογενούς πρωτεΐνης Sp1 να δεσμεύεται στον υποκινητή P1 στο εσωτερικό του κυττάρου, διεξάχθηκαν πρόσθετα πειράματα EMSA χρησιμοποιώντας πυρηνικά εκχυλίσματα από 11 αντιπροσωπευτικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα. Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε μόνο το ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο A,

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

επειδή βρέθηκε ότι μπορούσε να δεσμεύει την *in vitro* πρωτεΐνη Sp1 περισσότερο δραστικά σε σύγκριση με τα υπόλοιπα εξεταζόμενα ολιγονουκλεοτίδια. Παρατηρήθηκε ότι η δέσμευση της ενδογενούς πρωτεΐνης Sp1 στην περιοχή A στην κυτταρική σειρά εμβρυϊκού ινοβλάστη IMR-90 ήταν περίπου ισοδύναμη με εκείνη στα φυσιολογικά κύτταρα HNBE (Εικόνα 3.6γ, διαδρομές 1 και 2). Στην κυτταρική σειρά αναπλαστικού καρκινώματος CALU6 σημειώθηκε μια σημαντική αύξηση των συμπλεγμάτων ολιγονουκλεοτιδίου A-ενδογενούς πρωτεΐνης Sp1 (διαδρομή 3). Τα επίπεδα των συμπλεγμάτων παραμένουν εξίσου υψηλά στην κυτταρική σειρά μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα DMS53 (διαδρομή 4), στις κυτταρικές σειρές καρκινωμάτων εκ πλακωδών κυττάρων CRL5802, HTB182 και HTB59 (διαδρομές 5-7, αντίστοιχα), στις κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος A549, CALU 3 και CRL5935 (διαδρομές 8-10, αντίστοιχα), καθώς επίσης και στην κυτταρική σειρά CORL23 (διαδρομή 11). Το σύμπλεγμα ολιγονουκλεοτιδίου A-πρωτεΐνης Sp1 έδωσε θετική αντίδραση supershift στην αντιπροσωπευτική κυτταρική σειρά A549 (διαδρομή 12), γεγονός το οποίο καταδεικνύει την ειδικότητα της περιοχής A για την πρωτεΐνη Sp1 που περιέχεται στα πυρηνικά κυτταρικά εκχυλίσματα. Το πρότυπο δέσμευσης Sp1-DNA για το ολιγονουκλεοτίδιο της περιοχής A συμφωνεί με εκείνο για το ολιγονουκλεοτίδιο-θετικό μάρτυρα (Εικόνα 3.6δ).

Η δέσμευση της ενδογενούς πρωτεΐνης Sp1 στον υποκινητή P1 *in vivo* υποστηρίζεται από πρόσθετα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP). Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι στοχεύουν ειδικά ένα τμήμα του υποκινητή P1 μήκους 232 bp που περιλαμβάνει την περιοχή A. Η προσθήκη του αντισώματος αντι-Sp1 είχε ως αποτέλεσμα την ανοσοκατακρήμνιση του υποκινητή P1 στα κύτταρα A549 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 3.6ε). Αντίθετα, δεν προέκυψε σήμα PCR όταν χρησιμοποιήθηκε το μη σχετικό αντίσωμα έναντι της β-ακτίνης (αρνητικός μάρτυρας) για την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης. Ως θετικός μάρτυρας για τη μήτρα της αντίδρασης PCR χρησιμοποιήθηκε το διασπασμένο DNA των κυττάρων A549 που παράχθηκε πριν από το στάδιο της ανοσοκατακρήμνισης (αρχικό δείγμα, input).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 3.6: Η πρωτεΐνη Sp1 δεσμεύεται στον υποκινητή PI *in vitro* και *in vivo* (α) Το σημασμένο με ³²P ολιγονουκλεοτίδιο της περιοχής A επώαστηκε με *in vitro* πρωτεΐνη Sp1 είτε μόνο του (διαδρομή 6) είτε παρουσία μη σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου περιοχής A (αντίδραση self-competition) (διαδρομή 7), μη σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου-θετικού μάρτυρα (CON) (αντίδραση ανταγωνισμού με θετικό μάρτυρα) (διαδρομή 8) ή μη σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου-αρνητικού μάρτυρα (mSp1) (αντίδραση ανταγωνισμού με αρνητικό μάρτυρα) (διαδρομή 9). Στη διαδρομή 10, τα συμπλέγματα πρωτεΐνης-DNA αντιδρούν με αντίσωμα αντι-Sp1 (αντίδραση supershift). Οι διαδρομές 11-15 αντιστοιχούν σε παρόμοιο σετ αντιδράσεων για το ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο της περιοχής B. Οι διαδρομές 1-5 αντιπροσωπεύουν τις αντίστοιχες αντιδράσεις για το ολιγονουκλεοτίδιο-θετικό μάρτυρα (CON), το οποίο περιέχει λειτουργική θέση δέσμευσης Sp1. (β) Οι διαδρομές 6-10 αντιστοιχούν σε παρόμοιο σετ αντιδράσεων για το ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο της περιοχής C, ενώ οι διαδρομές 11-15

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

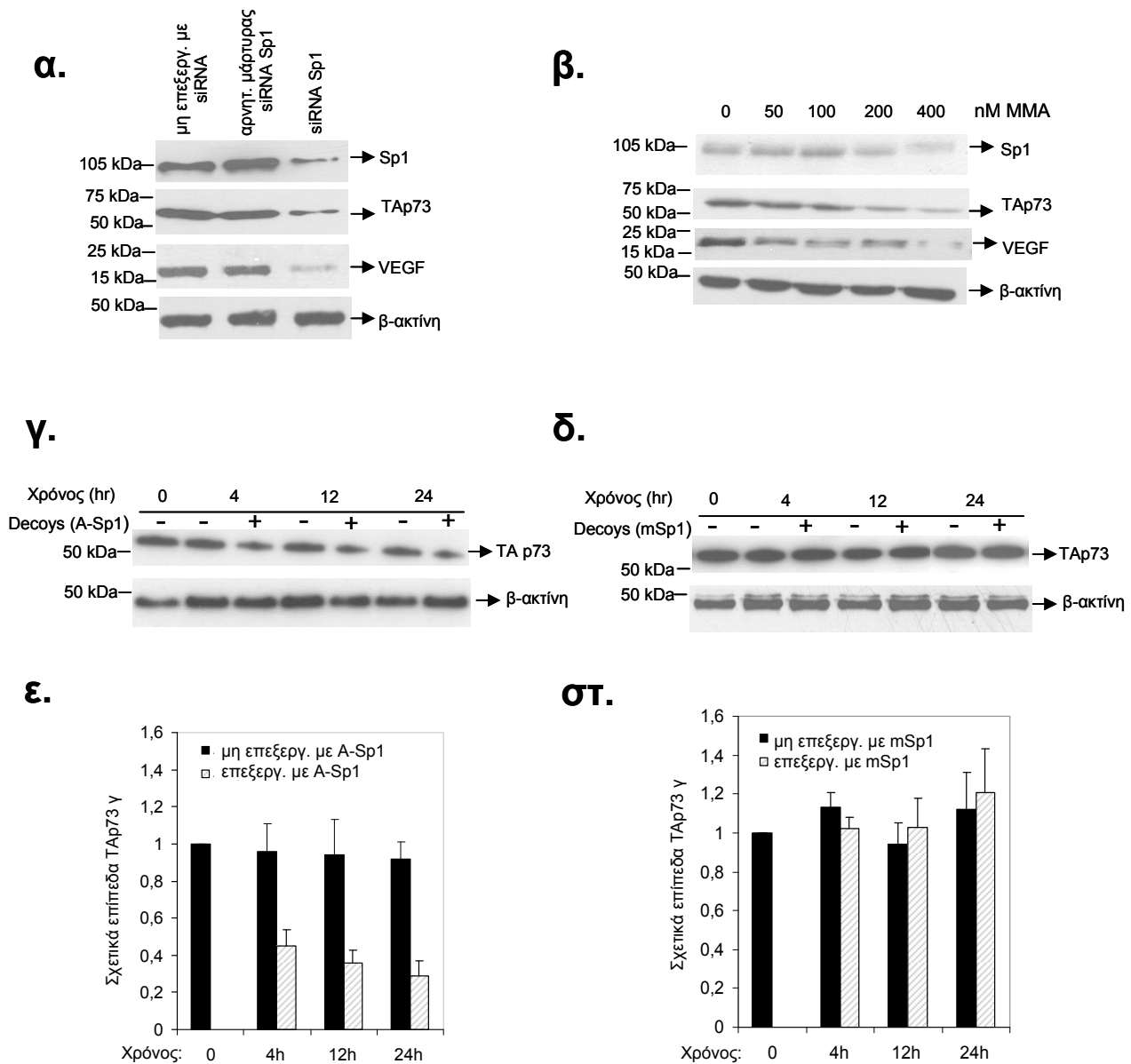
αντιστοιχούν σε παρόμοιο σετ αντιδράσεων για το ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο της περιοχής D. Στις διαδρομές 1-5 απεικονίζονται οι αντίστοιχες αντιδράσεις για το ολιγονουκλεοτίδιο-θετικό μάρτυρα (CON), το οποίο περιέχει λειτουργική θέση δέσμευσης Sp1. Τα πειράματα EMSA στα οποία χρησιμοποιήθηκαν *in vitro* Sp1 και ολιγονουκλεοτίδια της περιοχής A, B, C ή D κατέδειξαν ότι οι περιοχές A, B και C μπορούν να δεσμεύσουν Sp1. (γ) Οι διαδρομές 1-11 παρουσιάζουν το ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο A το οποίο έχει επωαστεί με πυρηνικά εκχυλίσματα από 11 κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα. Η ειδικότητα του συμπλέγματος ολιγονουκλεοτιδίου της περιοχής A-πρωτεΐνης Sp1 επιβεβαιώνεται με αντίδραση supershift με το αντίσωμα αντι-Sp1 στην αντιπροσωπευτική κυτταρική σειρά A549 (διαδρομή 12). (δ) Στις διαδρομές 1-11 απεικονίζονται τα αντίστοιχα πειράματα με τον θετικό μάρτυρα, τα οποία παρουσιάζουν την ειδική δέσμευση της ενδογενούς πρωτεΐνης Sp1 των ίδιων κυτταρικών σειρών με το ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο CON. Το σύμπλεγμα CON-Sp1 αντέδρασε με το αντίσωμα αντι-Sp1 στην κυτταρική σειρά A549 (διαδρομή 12). Συντομεύσεις: Μη σημασμ.: μη σημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο, ³²P-σημασμ.: ραδιοσημασμένο με ³²P ολιγονουκλεοτίδιο, M/E: συμπλέγματα DNA με μη ειδικές πρωτεΐνες. (ε) Ανάλυση ChIP με DNA από κύτταρα A549. Πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση με 2 μg και 6 μg αντι-Sp1. Ως αρνητικός μάρτυρας ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκε χρωματίνη που είχε επωαστεί με αντίσωμα έναντι της β-ακτίνης, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το αρχικό δείγμα (input).

3.2.4. Η σύνθεση της πρωτεΐνης TAp73 ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1 μέσω της περιοχής A σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η ικανότητα του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 να ρυθμίζει την έκφραση της πρωτεΐνης TAp73 *in vivo*. Αυτό επιτεύχθηκε με επεξεργασία της κυτταρικής σειράς A549, η οποία είναι γνωστό ότι εκφράζει TAp73, είτε με siRNA Sp1 είτε με αναστολέα του Sp1. Οι μεταβολές της έκφρασης της πρωτεΐνης TAp73 που προκλήθηκαν παρακολούθηθηκαν με ανάλυση στυπώματος κατά Western. Η έκφραση της πρωτεΐνης VEGF, που αποτελεί γνωστό μεταγραφικό στόχο του Sp1 [89] χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Συνοπτικά, κύτταρα A549 διαμολύνθηκαν παροδικά με siRNA Sp1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μείγμα μορίων siRNA που είναι διαθέσιμο στο εμπόριο, το οποίο δεν προκαλεί σίγηση του Sp1. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.7α, η επεξεργασία με siRNA Sp1 οδήγησε στην αρνητική ρύθμιση των πρωτεϊνών TAp73 και VEGF σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα των κυττάρων που δεν είχαν υποβληθεί σε επεξεργασία με siRNA Sp1, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι ο υποκινητής P1 ρυθμίζεται από τον παράγοντα Sp1. Αντίθετα, τόσο τα επίπεδα της πρωτεΐνης TAp73, όσο και τα επίπεδα της πρωτεΐνης VEGF δεν επηρεάστηκαν από την επεξεργασία με τον αρνητικό μάρτυρα siRNA. Παρόμοια, τα επίπεδα της πρωτεΐνης TAp73 μειώθηκαν σταδιακά μετά από 48ωρη επεξεργασία των κυττάρων A549 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα του Sp1, μιθραμυκίνη A (Εικόνα 3.7β). Η μιθραμυκίνη A αναστέλλει τον παράγοντα Sp1 όχι μόνο παρεμποδίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων με περιοχές υποκινητή πλούσιες σε GC, αλλά επίσης μειώνοντας, σε υψηλές συγκεντρώσεις, τη δέσμευσή του στον ίδιο τον υποκινητή του και, επομένως, αναστέλλοντας τη θετική αυτορρύθμισή του [90].

Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων A549 με δίκλινα φωσφοροθευικά ολιγονουκλεοτίδια της περιοχής A, τα οποία μπορούν να ανταγωνιστούν την περιοχή A ως προς τη δέσμευση του παράγοντα Sp1 (decoy). Με αυτό τον τρόπο, εξετάστηκε εάν ειδικά η περιοχή A του υποκινητή P1 είναι υπεύθυνη για την έκφραση της πρωτεΐνης TAp73 η οποία διαμεσολαβείται από Sp1 σε κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα. Τα δίκλινα φωσφοροθευικά ολιγονουκλεοτίδια mSp1 (αλληλουχίες με μεταλλαγμένες θέσεις δέσμευσης της Sp1, βλ. υλικά και μέθοδοι) χρησιμοποιήθηκαν ως αντίστοιχος αρνητικός μάρτυρας. Η 24ωρη επεξεργασία των κυττάρων με φωσφοροθευικά ολιγονουκλεοτίδια της περιοχής A προκάλεσε τη μείωση των επιπέδων TAp73 (Εικόνα 3.7γ, ε), αντίθετα από τα φωσφοροθευικά ολιγονουκλεοτίδια mSp1 (Εικόνα 3.7δ, στ). Από την άλλη πλευρά, τα φωσφοροθευικά ολιγονουκλεοτίδια B και C είχαν ασήμαντη επίδραση στην έκφραση της πρωτεΐνης TAp73.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 3.7: Η πρωτεΐνη Sp1 διεμεσολαβεί την υπερέκφραση της TAp73 μέσω ενεργοποίησης του υποκινητή P1. (α) Η παροδική διαμόλυνση με siRNA Sp1 προκαλεί αρνητική ρύθμιση των πρωτεϊνών Sp1 και TAp73 σε κύτταρα A549. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης VEGF χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός μάρτυρας της παρεμπόδισης του siRNA Sp1. Τα επίπεδα β ακτίνης χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας φόρτωσης. Το μη ειδικό siRNA Sp1 χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. (β) 48ωρη επεξεργασία των κυττάρων A549 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αναστολέα του Sp1, μιθραμυκίνη A (MMA) οδηγεί σε αρνητική ρύθμιση των Sp1 και TAp73. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης VEGF χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός μάρτυρας. (γ) Κύτταρα A549 διαμολύνθηκαν παροδικά με decoy της περιοχής A (A-Sp1), και τα επίπεδα της πρωτεΐνης TAp73 μετά από 4, 12 και 24 ώρες εκτιμήθηκαν με στόψωμα κατά Western. (δ) Πραγματοποιήθηκαν παρόμοια πειράματα παροδικής διαμόλυνσης με decoy μεταλλαγμένων θέσεων της Sp1 (mSp1) ως αρνητικός μάρτυρας της παρεμπόδισης. (ε) Η ποσοτικοποίηση με το πρόγραμμα ImageQuant κατέδειξε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης TAp73 στα επεξεργασμένα με A-Sp1 κύτταρα μειώθηκαν σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα των μη επεξεργασμένων με A-Sp1 κυττάρων. (στ) Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων TAp73 δεν κατέδειξε καμία μεταβολή των επιπέδων της TAp73 σε κύτταρα που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με decoy mSp1 (γκρι γραμμές) σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα κύτταρα (μαύρες γραμμές). Σε όλα τα πειράματα, οι ποσότητες των πρωτεϊνών κανονικοποιήθηκαν ως προς τη β ακτίνη.

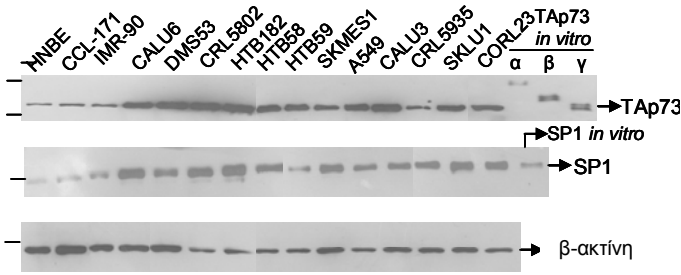
3.2.5. Οι πρωτεΐνες TAp73 γ και Sp1 είναι υπερεκφρασμένες σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα και σε όγκους από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα

Η ανάλυση στυπώματος κατά Western για τις ισομορφές TAp73 με χρήση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από 15 κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα κατέδειξε ότι η ισομορφή TAp73 γ υπερεκφράζεται, ενώ οι ισομορφές TAp73 α και β δεν ανιχνεύονται. Τα επίπεδα της ισομορφής TAp73 γ είναι χαμηλά στα κύτταρα HNBE, ελαφρώς αυξημένα σε κυτταρικές σειρές εμβρυϊκού ινοβλάστη πνεύμονα (CCL-171, IMR-90) και πολύ αυξημένα στα κύτταρα αναπλαστικού καρκινώματος πνευμονικού επιθηλίου (CALU-6), στα κύτταρα μικροκυτταρικού καρκινώματος (DMS-53), στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα εκ πλακωδών κυττάρων (CRL-5802, HTB-182, HTB-58, HTB-59 και SKMES-1), σε κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος (A549, CALU-3, CRL-5935 και SKLU-1), καθώς και σε κύτταρα μεγαλοκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (CORL-23). Το αντίστοιχο πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης Sp1 ήταν συμβατό με εκείνο της TAp73 γ (Εικόνα 3.8α), καθώς και με το πρότυπο δέσμευσης Sp1-DNA που εμφανίζεται στα πειράματα EMSA. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών TAp73 γ και Sp1 παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.8β.

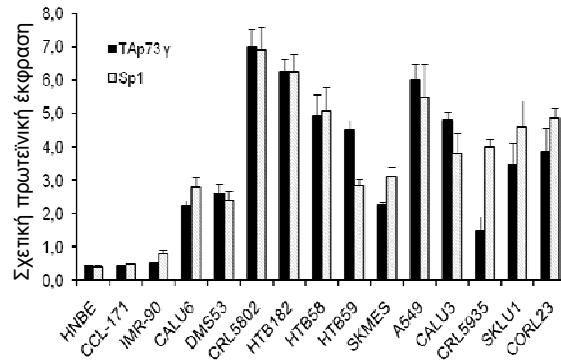
Προκειμένου να επαληθευτούν τα ευρήματα *in situ*, αναλύθηκε η πρωτεϊνική έκφραση των ισομορφών TAp73 σε μια ομάδα δειγμάτων από 26 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Η ισομορφή TAp73γ υπερεκφραζόταν αποκλειστικά στο 68,42% (13/19) των δειγμάτων καρκίνου του πνεύμονα εκ πλακωδών κυττάρων και στο 57,14% (4/7) των δειγμάτων αδενοκαρκινώματος, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς. Οι ισομορφές TAp73α και β δεν ανιχνεύτηκαν στα δείγματα όγκων των ασθενών. Εξετάστηκαν, επίσης, τα επίπεδα της πρωτεΐνης Sp1 και βρέθηκε ότι υπερεκφράζονταν στο 57,89% (11/19) των δειγμάτων καρκίνου του πνεύμονα εκ πλακωδών κυττάρων και στο 42,86% (3/7) των δειγμάτων αδενοκαρκινώματος. Οι πρωτεΐνες Sp1 και TAp73γ συνυπερεκφράζονταν στο 42,86% (3/7) των δειγμάτων αδενοκαρκινώματος, στο 52,63% (10/19) των δειγμάτων καρκίνου του πνεύμονα εκ πλακωδών κυττάρων και στο 50% (13/26) όλων των καρκινικών δειγμάτων. Στην Εικόνα. 3.8γ εμφανίζονται τα επίπεδα TAp73 και Sp1 σε αντιπροσωπευτικά δείγματα καρκινώματος εκ πλακωδών κυττάρων και αδενοκαρκινώματος. Τα μέσα επίπεδα της πρωτεΐνης TAp73γ στους καρκινικούς ιστούς ήταν αυξημένα κατά 12 φορές περίπου σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα στους φυσιολογικούς ιστούς. Παρόμοια, παρατηρήθηκε αύξηση των μέσων επιπέδων Sp1 κατά 8 φορές στα εξεταζόμενα δείγματα όγκων σε σύγκριση με τα μέσα φυσιολογικά επίπεδα (Εικόνα 3.8δ). Τα επίπεδα TAp73 και Sp1 στο σύνολο των 26 ζευγών φυσιολογικών-καρκινικών δειγμάτων παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.9.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

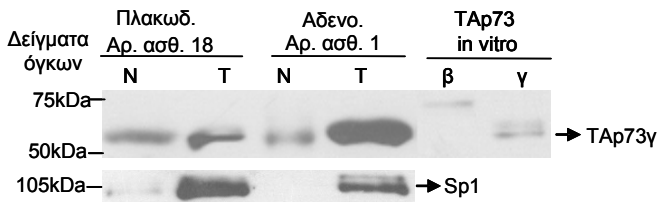
α.



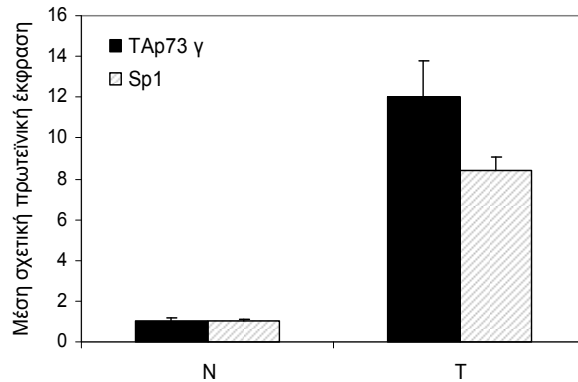
β.



γ.



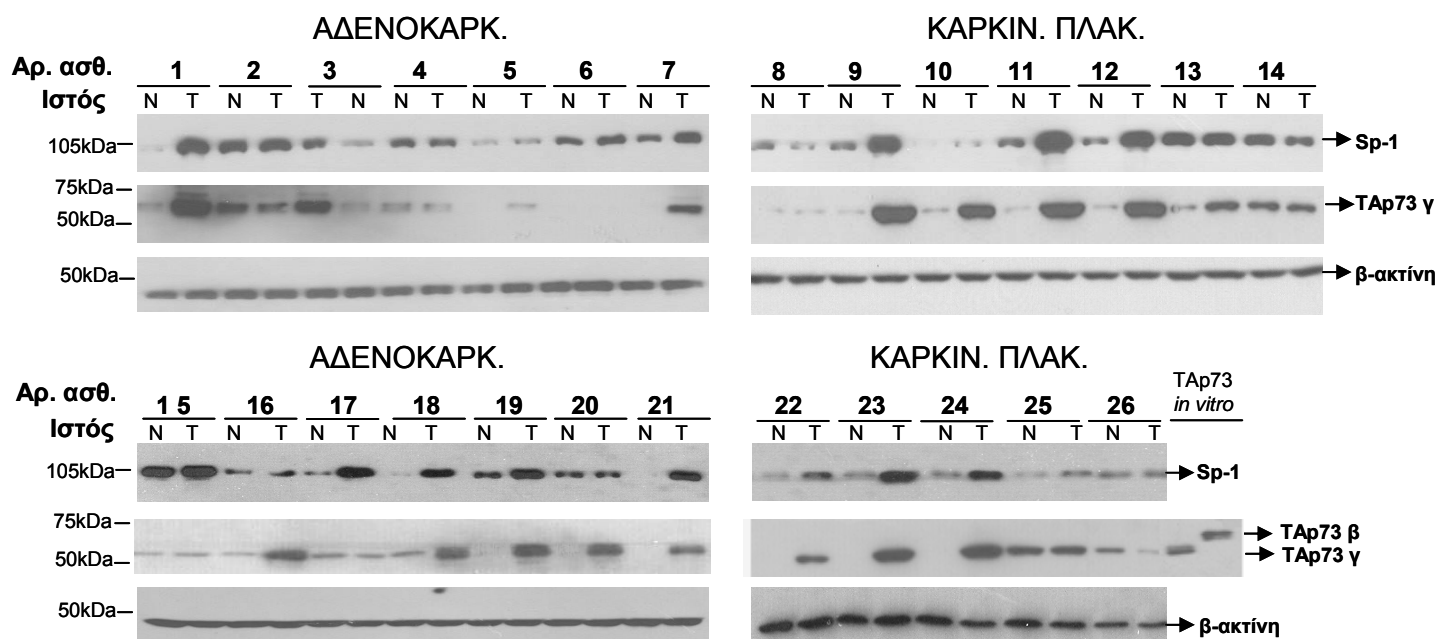
δ.



Εικόνα 3.8: Οι πρωτεΐνες TAp73γ και Sp1 συνυπερεκφράζονται σε κυτταρικές σειρές από καρκίνο του πνεύμονα και δείγματα όγκων από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. (α) Η ανάλυση με στύπωμα κατά Western των ολικών εκχυλισμάτων από 15 κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα κατέδειξε ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων Sp1 και TAp73γ. Οι ισομορφές TAp73α, β και γ που είχαν συντεθεί *in vitro* χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για την ταυτοποίηση των ισομορφών TAp73, η *in vitro* Sp1 χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας της έκφρασης της πρωτεΐνης Sp1, ενώ τα επίπεδα β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας φόρτωσης. (β) Τα επίπεδα έκφρασης των Sp1 και TAp73γ ποσοτικοποιήθηκαν με το πρόγραμμα ImageQuant και εκφράστηκαν ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα των κύτταρων HNBE. (γ) Η ανάλυση με στύπωμα κατά Western κατέδειξε σημαντική συνυπερέκφραση των επιπέδων TAp73γ και Sp1 σε αντιπροσωπευτικά δείγματα καρκινώματος εκ πλακωδών κυττάρων (αρ. ασθενούς 1) και αδενοκαρκίνωμα (αρ. ασθενούς 18) σε σύγκριση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς. Οι ισομορφές TAp73β και γ που είχαν συντεθεί *in vitro* χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για την ταυτοποίηση των ισομορφών TAp73. (δ) Τα μέσα επίπεδα πρωτεϊνών TAp73γ και Sp1 σε 26 δείγματα NSCLC και στους αντίστοιχους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς ήταν κατά 12 (γκρι στήλες) και 8 (μαύρες στήλες) αυξημένα, αντίστοιχα.

Συνομογραφίες: Πλακώδ.: καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων, αδενο.: αδενοκαρκίνωμα, N: φυσιολογικός ιστός, T: καρκινικός ιστός.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 3.9. Προφίλ έκφρασης των πρωτεϊνών TAp73 και Sp1 σε 26 ζεύγη φυσιολογικών-καρκινικών δειγμάτων. Συντομογραφίες: Αδενοκαρκ.: αδενοκαρκίνωμα, Καρκίν. πλακ.: καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων, N: φυσιολογικός ιστός, T: καρκινικός ιστός.

3.2.6. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης ΔNp73 επηρεάζονται από τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1 και είναι αυξημένα στα κύτταρα του καρκίνου του πνεύμονα

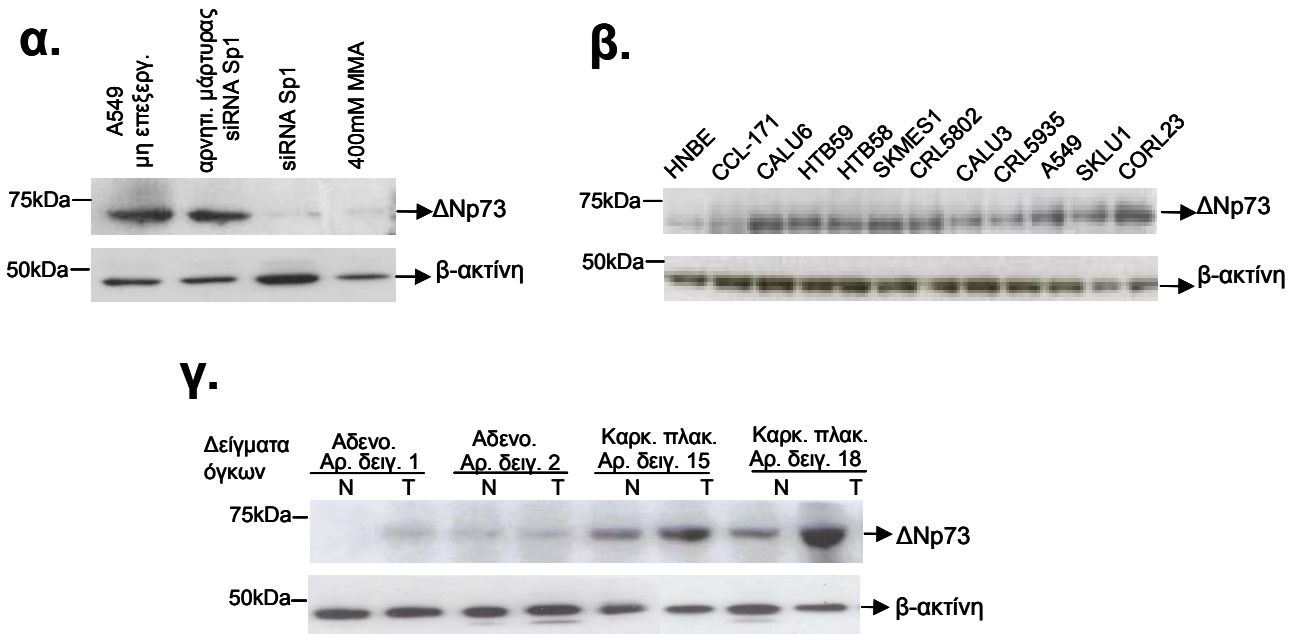
Επειδή το τελικό αποτέλεσμα της δράσης των ισομορφών TAp73 εξαρτάται από την παρουσία της επικρατούς αρνητικής πρωτεΐνης ΔNp73 [54], είναι ιδιαίτερα σημαντικό να εξεταστεί εάν ο μεταγραφικός παράγοντας Sp1 μπορεί να επηρεάσει, επίσης, και τα επίπεδα ΔNp73 στον καρκίνο του πνεύμονα. Επιπρόσθετα, θα πρέπει να διερευνηθεί εάν, μαζί με την ισομορφή TAp73γ, υπερεκφράζονται επίσης και οι ισομορφές ΔNp73 στον καρκίνο του πνεύμονα. Για τον σκοπό αυτό, αρχικά εκτιμήθηκε η επίδραση των μορίων siRNA Sp1 στα επίπεδα της πρωτεΐνης ΔNp73 σε κύτταρα A549. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.10α, τα επίπεδα ΔNp73 είναι σημαντικά μειωμένα στα κύτταρα A549 που έχουν υποβληθεί σε επεξεργασία με siRNA Sp1 σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα κύτταρα. Αντίθετα, τα επίπεδα ΔNp73 στα κύτταρα A549 που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τον αρνητικό μάρτυρα siRNA που δεν προκαλεί σίγηση του παράγοντα Sp1 παρέμειναν αμετάβλητα. Παρόμοια, τα επίπεδα ΔNp73 παρουσίασαν σημαντική μείωση μετά από

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

επεξεργασία των κυττάρων A549 με τον αναστολέα Sp1, μιθραμυκίνη A, σε συγκέντρωση 400 nM (Εικόνα 3.10α). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση με το πρόγραμμα ConTra προκειμένου να εξεταστεί εάν ο μεταγραφικός παράγοντας Sp1 θα μπορούσε, δυνητικά, να αλληλεπιδράσει άμεσα με τον υποκινητή P2. Η ανάλυση αυτή κατέδειξε μια συντηρημένη περιοχή 124 bp ανοδικά της TSS του μεταγράφου ΔNr73. Στην περιοχή αυτή βρέθηκε μια πολύ συντηρημένη δυνητική θέση δέσμησης Sp1 στη θέση -17 έως -26 bp, καθώς και δύο πιθανές αλληλουχίες TATA box στις θέσεις -3 έως -9 και -26 έως +32 bp. Επίσης, ταυτοποιήθηκε άλλη μια πιθανή θέση δέσμησης Sp1 στο 5' άκρο της συντηρημένης αλληλουχίας του υποκινητή (-115 έως -124 bp ανοδικά της TSS). Η TSS εντοπίστηκε στο chr1:3597096 (Ensemble v54 – Μάιος 2009) του υποκινητή P2 (μετάγραφα ENST00000378280 και ENST00000378285)].

Στη συνέχεια, παρακολούθησαν τα επίπεδα ΔNr73 σε 12 κυτταρικές σειρές από καρκίνο του πνεύμονα, καθώς επίσης και σε τέσσερα αντιπροσωπευτικά ζεύγη δειγμάτων φυσιολογικού-καρκινικού ιστού από μια ομάδα 26 ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Στην Εικόνα 3.10β παρουσιάζεται ότι η έκφραση της πρωτεΐνης ΔNr73 ήταν χαμηλή στις κυτταρικές σειρές HNBE και CCL-171, ενώ ήταν σημαντικά αυξημένη στα κύτταρα αναπλαστικού καρκινώματος πνευμονικού επιθηλίου (CALU-6), στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα εκ πλακωδών κυττάρων (HTB-58, HTB-59 και SKMES-1), στις κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος (CALU-3, CRL-5935, A549 και SKLU-1), καθώς και στα κύτταρα μεγαλοκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (CORL-23). Οι ισομορφές ΔNr73 υπερεκφράζονταν στα αντιπροσωπευτικά δείγματα όγκων σε σύγκριση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς (Εικόνα 3.10γ), γεγονός το οποίο συμφωνεί με τα δεδομένα από τις κυτταρικές σειρές, καθώς επίσης και με προηγούμενα δεδομένα από κλινικά δείγματα [91, 37]. Κατά συνέπεια, τα επίπεδα των ισομορφών ΔNr73, όπως και τα επίπεδα TAp73γ, είναι αυξημένα στα κύτταρα του καρκίνου του πνεύμονα και επηρεάζονται από τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 3.10. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης ΔNr73 επηρεάζονται από την πρωτεΐνη Sp1 και υπερεκφράζονται στα κύτταρα του καρκίνου του πνεύμονα. (α) Η παροδική διαμόλυνση με siRNA Sp1 προκάλεσε τη μείωση της πρωτεΐνης ΔNr73 στα κύτταρα A549. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε siRNA που δεν είναι ειδικό για Sp1, ενώ τα επίπεδα β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας φόρτωσης. Ο αναστολέας του Sp1, μιθραμυκίνη A (MMA) σε συγκέντρωση 400 nM προκάλεσε, επίσης, μείωση στα επίπεδα ΔNr73. (β) Η ανάλυση με στόπωμα κατά Western σε ολικά εκχυλίσματα από 12 κυτταρικές σειρές κατέδειξε αυξημένα επίπεδα ΔNr73 σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα HNBE. (γ) Η ανάλυση με στόπωμα κατά Western κατέδειξε αύξηση της πρωτεΐνης ΔNr73 σε αντιπροσωπευτικά δείγματα καρκινώματος εκ πλακωδών κυττάρων και αδενοκαρκινώματος σε σχέση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ p73

Στο πρώτο μέρος της διατριβής μελετήθηκε η επίδραση της μεθυλίωσης στον εξωτερικό και τον εσωτερικό υποκινητή του γονιδίου p73 στον καρκίνο του πνεύμονα. Καταδείχτηκε ότι ο υποκινητής P1 είναι σπάνια υπερμεθυλιωμένος (6,8% των περιπτώσεων), ενώ ο υποκινητής P2 είναι συχνά υπομεθυλιωμένος (55,9% των περιπτώσεων) σε δείγματα όγκων από ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Αυτή η επιγενετική απορρύθμιση συσχετίζεται με μειωμένα επίπεδα mRNA TAp73 και αυξημένα επίπεδα mRNA ΔNp73, αντίστοιχα. Η επεξεργασία αντιπροσωπευτικών κυτταρικών σειρών καρκίνου του πνεύμονα με επιγενετικά τροποποιητικά μόρια επιβεβαίωσε την επαγωγή της μεταγραφής των ισομορφών ΔNp73 από επιγενετικούς παράγοντες *in vitro*. Πρέπει να σημειωθεί ότι η υπομεθυλίωση του υποκινητή συσχετίστηκε με την υπομεθυλίωση του μεταθετονίου LINE-1, το οποίο αποτελεί δείκτη συνολικής μεθυλίωσης. Επίσης, καταδείχτηκε ότι υπάρχει μια ιστοειδική διαφορά στη σχετιζόμενη με την υπομεθυλίωση αύξηση των επιπέδων mRNA ΔNp73. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα mRNA TAp73 είναι περισσότερο αυξημένα στα καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων σε σύγκριση με τα αδενοκαρκινώματα, αλλά αυτή η αύξηση φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από τις αντίστοιχες διαφορές των ιστών αυτών ως προς τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή P1.

Το εύρημα ότι ο υποκινητής P1 είναι ουσιαστικά μη μεθυλιωμένος σε φυσιολογικούς ιστούς, καθώς και ότι τα επίπεδα μεθυλίωσής του παραμένουν σταθερά χαμηλά στην πλειονότητα των δειγμάτων όγκων μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα είναι σύμφωνο με ανάλογα προηγούμενα ευρήματα που έχουν δημοσιευτεί από τους Di Vinci *et al.* Μόνο ελάχιστα από τα εξετασθέντα δείγματα όγκων βρέθηκε ότι εμφανίζουν υπερμεθυλιωμένο υποκινητή P1 σε συνδυασμό με τη χαμηλότερη έκφραση της πρωτεΐνης TAp73, σε σύγκριση με την έκφραση της πρωτεΐνης TAp73 των δειγμάτων με μη μεθυλιωμένο υποκινητή P1 [37 και αυτή η μελέτη]. Επομένως, και οι δύο μελέτες συμφωνούν ότι η μεθυλίωση του υποκινητή P1 συμβαίνει σπάνια και, κατά συνέπεια, δεν αποτελεί κύριο καθοριστικό παράγοντα της απορρύθμισης της έκφρασης των ισομορφών TAp73 στον καρκίνο του πνεύμονα.

Από την άλλη πλευρά ο υποκινητής P2, ο οποίος ήταν γενικά υπερμεθυλιωμένος σε φυσιολογικούς ιστούς του πνεύμονα, βρέθηκε μερικώς απομεθυλιωμένος στα δείγματα όγκων. Το ποσοστό των μερικώς απομεθυλιωμένων δειγμάτων όγκων ήταν ελαφρώς χαμηλότερο από εκείνο που έχει καθοριστεί στην προηγούμενη μελέτη των Di Vinci *et al* στην οποία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική PCR που είναι ειδική για μεθυλίωση (methylation-specific PCR, MSP) [37]. Ωστόσο, στην προαναφερθείσα μελέτη δεν καταδείχτηκε μια σαφής συσχέτιση μεταξύ της κατάστασης μεθυλίωσης του υποκινητή P2 και των επιπέδων της πρωτεΐνης ΔNp73 στους καρκινικούς ιστούς [37]. Αντίθετα, στη παρούσα διατριβή υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης με τα επίπεδα έκφρασης mRNA ΔNp73. Αυτή η ασυμφωνία θα μπορούσε ενδεχομένως να οφείλεται στο γεγονός ότι τα αντισώματα έναντι των ισομορφών ΔNp73 τα οποία διατίθενται στο εμπόριο ανιχνεύουν αναπόφευκτα όχι μόνο το προϊόν της μετάφρασης του μεταγράφου ΔNp73 το οποίο προκύπτει από τον υποκινητή P2, αλλά επίσης και το προϊόν της μετάφρασης του μεταγράφου ΔN'p73 το οποίο προκύπτει από τον υποκινητή P1. Αυτό συμβαίνει επειδή το προϊόν του μεταγράφου ΔN'p73 είναι πανομοιότυπο με την πρωτεΐνη ΔNp73 [32]. Η εκδοχή αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι στη μελέτη των Di Vinci *et al* αναφέρθηκε έκφραση του μεταγράφου ΔN'p73 το οποίο προκύπτει από τον υποκινητή P1 στους εξετασθέντες καρκινικούς ιστούς [37]. Εν αντιθέσει, οι ποσοτικοί προσδιορισμοί με PCR πραγματικού χρόνου ανιχνεύουν προϊόντα τα οποία συντίθενται αποκλειστικά από τον υποκινητή P2. Επομένως, αποτελούν μια ακριβέστερη μέθοδο εκτίμησης της αμιγούς μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή P2, η οποία δεν παρουσιάζει συστηματικό σφάλμα εξαιτίας της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή P1. Άλλος ένας λόγος για τη μερική ασυμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ αυτής της μελέτης και της μελέτης των Di Vinci *et al* είναι ότι αυτή η μελέτη βασίστηκε σε ποσοτικές μεθόδους προσδιορισμού της μεθυλίωσης (pyrosequencing) και όχι σε ποιοτικές (MSP). Πράγματι, έχει αποδειχτεί ότι όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος MSP μπορεί να συμβεί εσφαλμένη υβριδοποίηση των εκκινητών της αντίδρασης PCR με μη ειδικές περιοχές του DNA, γεγονός το οποίο οδηγεί στη δημιουργία ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι η συχνότητα δημιουργίας ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων στη μέθοδο MSP ανέρχεται σε ποσοστό έως και 10% σε προσδιορισμούς στους οποίους συνδυάζονται μικρές ποσότητες αρχικού δείγματος (input) DNA και μεγάλου αριθμού κύκλων της αντίδρασης PCR. Η τεχνική της ανάλυσης μεθυλίωσης με

pyrosequencing η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή υπερνικά αυτούς τους τεχνικούς περιορισμούς και παρέχει υψηλότερο βαθμό ευαισθησίας στην εκτίμηση της κατάστασης μεθυλίωσης, ειδικά σε περιπτώσεις στις οποίες χρησιμοποιούνται κλινικά δείγματα με χαμηλές συγκεντρώσεις DNA [92].

Τόσο τα επίπεδα mRNA του TAp73, όσο και τα επίπεδα mRNA του ΔNp73 παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφορετικών ιστολογικών τύπων καρκίνου του πνεύμονα, αλλά μόνο τα επίπεδα mRNA του ΔNp73 εξαρτιώνταν από τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή P2. Είναι σημαντικό ότι η έκφραση των πρωτεϊνών ΔNp73 έχει καταδειχτεί ότι αποτελεί δείκτη κακής πρόγνωσης στον καρκίνο του πνεύμονα. Μάλιστα, οι ασθενείς με καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων παρουσίαζαν χαμηλότερο ποσοστό πενταετούς επιβίωσης σε σύγκριση με του ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα [91, 93]. Επομένως, τα αυξημένα επίπεδα mRNA του ΔNp73, τα οποία ήταν συμβατά με χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή P2 στους ασθενείς με καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων ενδέχεται να συμβάλλουν, μαζί με άλλες σημαντικές μοριακές μεταβολές, στη χειρότερη πρόγνωση αυτής της ιστολογικής ομάδας ασθενών σε σύγκριση με τους ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα. Εξάλλου, η συσχέτιση του υποκινητή P2 με την υπομεθυλίωση του μεταθετονίου LINE-1, το οποίο αποτελεί ένα αποδεκτό μέτρο της κατάστασης της συνολικής μεθυλίωσης του DNA [84, 85], υποδηλώνει ότι αυτή η μείωση των επιπέδων μεθυλίωσης είναι μια άμεση συνέπεια της συνολικής υπομεθυλίωσης. Εφόσον, η συνολική υπομεθυλίωση είναι πιο συχνή στα καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων σε σύγκριση με τα αδenoκαρκινώματα [85, 94], η διαφορά αυτή μπορεί να συνεπάγεται και την ιστοειδική διαφορά των επιπέδων mRNA του ΔNp73 που εξαρτώνται από τη μεθυλίωση του υποκινητή P2. Αντίθετα, οι διαφορές στα επίπεδα mRNA του TAp73 μεταξύ αυτών των ιστολογικών τύπων είναι ανεξάρτητα από την κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή P1 και οφείλονται πιθανόν σε άλλους παράγοντες, όπως για παράδειγμα σε ιστοειδικές διαφορές των επιπέδων συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων που ενεργοποιούν τον υποκινητή P1.

Ένα άλλο αξιοσημείωτο εύρημα της παρούσας διατριβής είναι ότι η υπομεθυλίωση του υποκινητή P2 συμβαίνει πολύ συχνότερα από την υπερμεθυλίωση του υποκινητή P1 σε δείγματα μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η υπερέκφραση των αντιαποπτωτικών ισομορφών ΔNp73 ενδέχεται να συμβάλλει σε μεγαλύτερο βαθμό στην ογκογένεση απ' ό,τι η υποέκφραση των αποπτωτικών ισομορφών TAp73. Σε αυτό το σημείο δημιουργείται

εύλογα το ερώτημα εάν η τελική επίδραση του γονιδίου p73 στη γένεση του καρκίνου του πνεύμονα οφείλεται περισσότερο στην αύξηση των επιπέδων ΔNp73 παρά στη μείωση των επιπέδων TAp73, αφού η έκφραση των ισομορφών ΔNp73 υπόκειται σε αυστηρή επιγενετική αναστολή στους φυσιολογικούς πνευμονικούς ιστούς. Το ερώτημα αυτό θα απαντηθεί σε μελλοντικές ερευνητικές μελέτες.

Εξάλλου, δεδομένου ότι οι απομεθυλιωτικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο στις κλινικές δοκιμές που αφορούν στον καρκίνο του πνεύμονα, θα πρέπει να διερευνηθεί εκτενέστερα η πιθανή εκ νέου ενεργοποίηση της σύνθεσης των ογκογόνων ισομορφών ΔNp73 προκειμένου να αξιολογηθεί ο κίνδυνος της χρήσης αυτών των παραγόντων στην αντικαρκινική θεραπεία. Αυτό θα αποτελέσει ένα σημαντικό βήμα για την αξιοποίηση των δεδομένων που προκύπτουν από τη μελέτη των επιγενετικών φαινομένων στο πλαίσιο της κλινικής θεραπείας του καρκίνου του πνεύμονα.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα του πρώτου μέρους της μελέτης υποδηλώνουν ότι τα επιγενετικά συμβάντα επηρεάζουν την έκφραση των ισομορφών ΔNp73 από τον υποκινητή P2, ενώ η απορρύθμιση των ισομορφών TAp73 δεν οφείλεται σε επιγενετικούς παράγοντες, αφού η μεθυλίωση του υποκινητή P1 συμβαίνει σπάνια στον καρκίνο του πνεύμονα. Ο υποκινητής P1 παραμένει μη μεθυλιωμένος στην πλειονότητα των πνευμονικών καρκινικών ιστών και, κατά συνέπεια, η έκφραση των ισομορφών TAp73 δεν μπορεί να αποτραπεί, εάν στον πυρήνα του καρκινικού κυττάρου ανευρίσκονται μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι μπορούν να ενεργοποιήσουν τον υποκινητή P1. Η υπόθεση αυτή οδήγησε στην αναζήτηση νέων μεταγραφικών παραγόντων που ενεργοποιούν τον υποκινητή P1, η οποία αποτέλεσε το αντικείμενο του δεύτερου μέρους της παρούσας διδακτορικής διατριβής

4.2 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ p73

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης, αναζητήθηκαν νέοι μεταγραφικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη χρήση του υποκινητή P1 στον καρκίνο του πνεύμονα. Στο πλαίσιο αυτό, ταυτοποιήθηκε μια περιοχή από -233 έως -204 bp ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής (TSS) του υποκινητή P1 του ανθρώπου η οποία περιείχε συντηρημένες, λειτουργικές θέσεις δέσμησης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1. Η μείωση των ενδογενών επιπέδων της πρωτεΐνης Sp1 ή η αναστολή της δέσμησης της πρωτεΐνης Sp1 σε αυτή την περιοχή ρυθμίζει αρνητικά τα πρωτεϊνικά επίπεδα TAp73

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

στον καρκίνο του πνεύμονα. Επίσης, ο παράγοντας Sp1 επηρέασε τα επίπεδα των ισομορφών ΔNp73 στα κύτταρα του καρκίνου του πνεύμονα.

Η πρωτεΐνη Sp1 θεωρείται παραδοσιακά ένας μεταγραφικός παράγοντας που περιέχεται σε όλα τα κύτταρα και ευθύνεται για τη βασική/ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση ενός ευρέος φάσματος γονιδίων ιών και θηλαστικών. Εντούτοις, νέα δεδομένα συσχετίζουν την απορρυθμισμένη έκφραση του παράγοντα Sp1 με την ανάπτυξη όγκων και τη μετάσταση. Αναλυτικότερα, ο παράγοντας Sp1 έχει βρεθεί υπερεκφρασμένος σε όγκους του παγκρέατος, του μαστού, του θυρεοειδούς αδένου και του παχέος εντέρου (κόλον), ενώ ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων τα οποία διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και τις αντιαποπτωτικές διαδικασίες [95]. Η παρούσα διδακτορική διατριβή αναδεικνύει την πρωτεΐνη Sp1 ως τον δεύτερο σε χρονολογική σειρά μεταγραφικό παράγοντα, μετά τον παράγοντα E2F1, ο οποίος ελέγχει άμεσα τον υποκινητή P1 του γονιδίου p73. Επίσης, αποδεικνύει ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της υπερέκφρασης του παράγοντα Sp1 και της υπερέκφρασης των πρωτεϊνικών ισομορφών TAp73 στον καρκίνο του πνεύμονα.

Οι οικογένειες των μεταγραφικών παραγόντων Sp μπορούν να σχηματίσουν συμπλέγματα με τις ισομορφές TAp73 [96]. Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι οι ισομορφές TAp73 προκαλούν παρεμπόδιση της μεταγραφικής ενεργότητας του παράγοντα Sp1, με αποτέλεσμα να δρουν ως καταστολείς της ενεργοποίησης γονιδίων η οποία διαμεσολαβείται από Sp1. Συγκεκριμένα, το φαινόμενο αυτό έχει δείχτει για το γονίδιο του ενισχυτή II της πρωτεΐνης του πυρήνα (core) του ιού της ηπατίτιδας B [46], της υπομονάδας αντίστροφη μεταγραφάση της ανθρώπινης τελομεράσης του RNA (hTERT) [29, 30], του ισχυρού αγγειογενετικού παράγοντα VEGF [97] και το μορίου ελέγχου του σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου G2/M, κυκλίνη B [98]. Έχει προταθεί ότι αυτή η καταστολή είναι δυνατό να επιτυγχάνεται μέσω σχηματισμού συμπλεγμάτων πρωτεϊνών Sp1-TAp73, γεγονός το οποίο προκαλεί την κατάργηση της δέσμευσης του παράγοντα Sp1 στις ειδικές θέσεις δέσμευσης Sp1 που βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων [46, 29]. Αυτός ο ογκοκατασταλτικός μηχανισμός μέσω παρεμπόδισης της μεταγραφικής δράσης της πρωτεΐνης Sp1 είναι παρόμοιος με εκείνον του παράγοντα p53 [99, 100]. Η προαναφερόμενη αρνητική επίδραση της πρωτεΐνης p73 στη μεταγραφή που διαμεσολαβείται από τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1 είναι ειδική μόνο για τις ισομορφές TAp73 και όχι για τις ισομορφές ΔNp73 [30] ή ΔTAp73 [46, 29].

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Εξάλλου, η αποτελεσματικότητα αυτής της επίδρασης παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάλογα με την ισομορφή TAp73, αφού η ισομορφή TAp73β αποτελεί τον πλέον αποτελεσματικό καταστολέα, ενώ η ισομορφή TAp73γ είναι ο λιγότερο αποτελεσματικός καταστολέας [29]. Είναι σημαντικό να διαλευκανθεί μελλοντικά εάν η παρεμπόδιση των ισομορφών TAp73 στη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων που διαμεσολαβείται από Sp1 είναι ένα φαινόμενο που παρουσιάζεται στον καρκίνο του πνεύμονα. Ένα τέτοιο εύρημα θα υποδήλωνε ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πρωτεΐνης Sp1 και των ισομορφών TAp73 εκτείνονται πέρα από το επίπεδο του μεταγραφικού ελέγχου του υποκινητή P1. Υποθετικά, σε υψηλά επίπεδα έκφρασης Sp1, ο υποκινητής P1 θα μπορούσε να ενεργοποιείται από τον μεταγραφικό παράγοντα P1, έτσι ώστε να μπορέσουν να συντεθούν ισομορφές TAp73. Οι ισομορφές αυτές, με τη σειρά τους, θα μπορούσαν να σχηματίσουν συμπλέγματα με την πρωτεΐνη Sp1 προκαλώντας παρεμπόδιση στη διαμεσολαβούμενη από Sp1 μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση. Η πιθανή ύπαρξη μιας τέτοιας αρνητικής καμπύλης ανάδρασης μεταξύ Sp1 και TAp73 αξίζει να διερευνηθεί μελλοντικά.

Στην παρούσα διατριβή καταδείχτηκε επίσης ότι η ισομορφή p73 πλήρους μήκους η οποία υπερεκφράζεται στα πνευμονικά καρκινικά κύτταρα τόσο *in vitro*, όσο και *in situ* είναι η TAp73γ. Τα επίπεδα των ισομορφών TAp73 έχουν βρεθεί αυξημένα σε όγκους από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα στο παρελθόν, αλλά χωρίς να καθορίζεται η ακριβής ισομορφή ή οι ακριβείς ισομορφές TAp73 που υπερεκφράζονται σε κάθε περίπτωση [36, 37]. Απ' όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη φορά που καταδεικνύεται ότι η ισομορφή TAp73γ υπερεκφράζεται ειδικά και αποκλειστικά σε καρκινικούς ιστούς. Τυπικά, οι ισομορφές TAp73 ενεργοποιούν γονίδια τα οποία διαμεσολαβούν είτε την αναστολή του κυτταρικού κύκλου είτε την απόπτωση, όπως τα γονίδια *p21*, *bax*, *mdm2*, *gadd45*, κυκλίνη G, *IGFBP3*, *14-3-3* και πυροδοτούν τον κυτταρικό θάνατο [101]. Ευρήματα *in vivo* υποστηρίζουν τον προτεινόμενο ογκοκατασταλτικό ρόλο των ισομορφών TAp73, καθώς τα ποντίκια TAp73^{-/-} είναι επιρρεπή στο σχηματισμό όγκων και αναπτύσσουν όγκους μετά από έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες. Μάλιστα, το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα αποτελεί τον πιο συχνό τύπο καρκίνου που παρουσιάζουν αυτά τα διαγονιδιακά ζώα [26]. Επομένως, τα ευρήματά μας δημιουργούν ερωτήματα σχετικά με τον υποτιθέμενο ρόλο της ισομορφής TAp73γ στον καρκίνο, αφού υποδηλώνουν ότι η λειτουργία της μπορεί να αποκλίνει από την τυπική αποπτωτική λειτουργία που έχει

προταθεί για τις ισομορφές TAp73. Πράγματι, η ισομορφή TAp73γ δεν παρουσίασε καμία αποτελεσματικότητα στην ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου *p21^{Waf1/Cip1}* και την αναστολή του σχηματισμού αποικιών κυττάρων της καρκινικής κυτταρικής σειράς Saos, σε αντίθεση με τις πιο αποτελεσματικές ισομορφές TAp73α και TAp73β [27]. Παρόμοια, η ισομορφή TAp73γ προκαλεί πολύ μειωμένη μεταγραφική ενεργοποίηση ενός υποκινητή που περιέχει μια συναινετική αλληλουχία δέσμησης του μεταγραφικού παράγοντα p53 σε κυτταρικές σειρές που δεν εκφράζουν p53 [28].

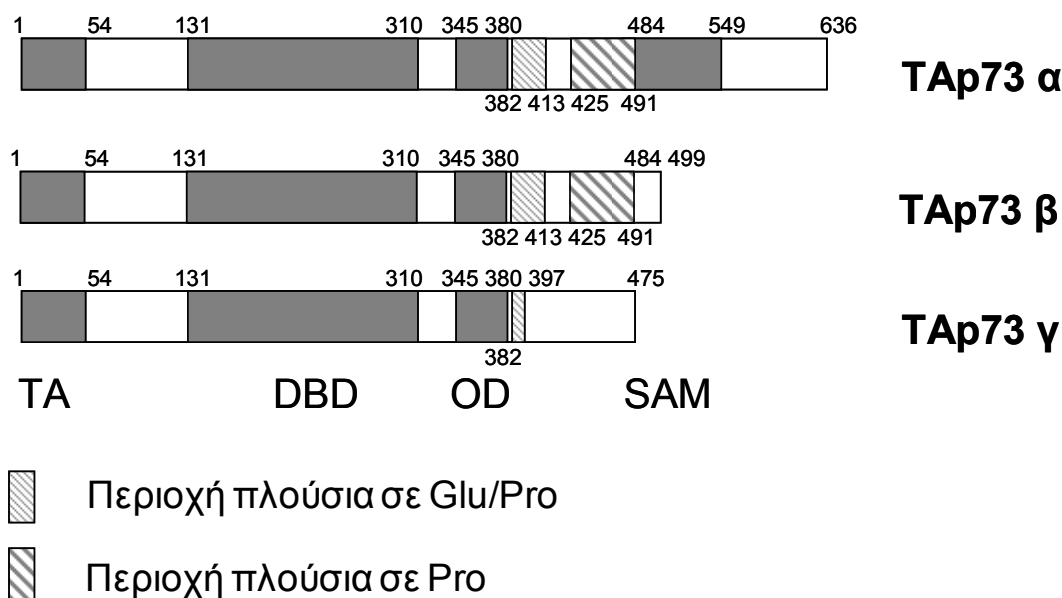
Η αποτυχία της ισομορφής TAp73γ να επάγει μεταγραφική ενεργοποίηση στον ίδιο βαθμό με τις περισσότερο μελετημένες ισομορφές TAp73α και TAp73β είναι δυνατό να σχετίζεται με τις διαφορές στην καρβοξυτελική περιοχή τους (Εικόνα 4.1). Πιο αναλυτικά, μια νέα διαφορά της ισομορφής TAp73γ η οποία έχει επισημανθεί πρόσφατα είναι ότι η καρβοξυτελική περιοχή της είναι βασική, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται ασθενή συμπλέγματα μεταξύ της πρωτεΐνης αυτής και ειδικών αλληλουχιών DNA. Αντίθετα, οι αντίστοιχες περιοχές των ισομορφών TAp73α και TAp73β είναι ουδέτερες και σχηματίζουν ισχυρά συμπλέγματα DNA-πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζει διαφορετική δέσμηση σε υποκινητές και, κατά συνέπεια, διαφορετική μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων [102]. Μια άλλη διαφορά της καρβοξυτελικής περιοχής της ισομορφής TAp73γ είναι ότι κατά τη διαδικασία του εναλλακτικού ματίσματος αφαιρείται το εξώνιο 11. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην περιέχει πλέον το μεγαλύτερο τμήμα της περιοχής που είναι πλούσια σε Glu/Pro, καθώς και την περιοχή που είναι πλούσια σε Pro. Οι περιοχές αυτές περιέχονται σε μια περιοχή η οποία εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 382 έως και 491 και πιστεύεται ότι ενισχύουν τη μεταγραφική ενεργότητα των ισομορφών TAp73α και TAp73β [103, 104]. Επιπρόσθετα, η έλλειψη του εξωνίου 11 από την ισομορφή TAp73γ έχει ως αποτέλεσμα να είναι περικομμένη μια δεύτερη περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης η οποία βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 381 έως 399. Πρόσφατα καταδείχτηκε ότι η περιοχή αυτή μπορεί να ρυθμίζει γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου [73]. Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν ότι η ισομορφή TAp73γ παρουσιάζει ένα έλλειμμα μεταγραφικής ενεργοποίησης συγκριτικά με άλλες ισομορφές TAp73, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να επηρεάσει αρνητικά τη δράση του ως αποπτωτική πρωτεΐνη.

Εξάλλου, σε συμφωνία με προηγούμενες κλινικές μελέτες [37], καταδείχτηκε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης ΔNp73 είναι επίσης αυξημένα σε κυτταρικές σειρές

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

καρκίνου του πνεύμονα και σε ενδεικτικά δείγματα όγκων. Επιπρόσθετα και για πρώτη φορά καταδείχτηκε ότι τα επίπεδα ΔNp73 υφίστανται αρνητική ρύθμιση in vitro κατά την αναστολή ή την αδρανοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Sp1. Η επίδραση του παράγοντα Sp1 στην έκφραση της πρωτεΐνης ΔNp73 ενδέχεται να είναι άμεση, αφού με τη βοήθεια βιοπληροφορικής ανάλυσης ταυτοποιήθηκαν πολύ συντηρημένες, πιθανές θέσεις δέσμησης Sp1 στον υποκινητή P2. Αυτό είναι πιθανό να σημαίνει ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Sp1 ελέγχει τόσο την έκφραση των πρωτεϊνών TAp73, όσο και την έκφραση των πρωτεϊνών ΔNp73 διαμέσου της άμεσης ρύθμισης των αντίστοιχων υποκινητών τους. Εναλλακτικά, είναι πιθανό η επίδραση αυτή να είναι έμμεση, καθώς η υπερέκφραση των ισομορφών ΔN που προκύπτουν από τον υποκινητή P2 θα μπορούσε να οφείλεται στην υπερέκφραση της πρωτεΐνης TAp73, η οποία είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί τον υποκινητή P2 [18]. Σε αυτή την περίπτωση, η αρνητική ρύθμιση της πρωτεΐνης ΔNp73 κατά την αναστολή της δράσης ή τη μείωση των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 θα μπορούσε ενδεχομένως να οφείλεται στην αρνητική ρύθμιση της πρωτεΐνης TAp73 από τον παράγοντα Sp1. Επιπλέον, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ένα κλάσμα των πρωτεϊνών ΔNp73 να παράγεται από τον υποκινητή P1 στον καρκίνο του πνεύμονα. Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι τα μετάγραφα ΔN'p73 που συντίθενται από τον υποκινητή P1 και τα οποία έχει αναφερθεί ότι εκφράζονται σε όγκους καρκίνου του πνεύμονα [37] μεταφράζονται επίσης σε ένα πρωτεϊνικό προϊόν ταυτόσημο με την πρωτεΐνη ΔNp73 που συντίθεται από τον υποκινητή P2 [32]. Με άλλα λόγια, δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες ΔNp73 αποτελούν τα προϊόντα της μετάφρασης τόσο των μεταγράφων ΔN' που προκύπτουν από τον υποκινητή P1, όσο και των μεταγράφων ΔN που προκύπτουν από τον υποκινητή P2, η μείωση των επιπέδων ΔNp73 που παρατηρήθηκε σε αυτή τη μελέτη ενδέχεται να οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στη μείωση της ενεργότητας του υποκινητή P1. Τέλος, είναι επίσης δυνατό η επίδραση του παράγοντα Sp1 στα επίπεδα της πρωτεΐνης ΔNp73 να αποτελεί το συνδυαστικό ή/και το συνεργιστικό αποτέλεσμα όλων των προαναφερθέντων διαδικασιών. Όλα τα παραπάνω ζητήματα χρειάζεται να διερευνηθούν εκτενώς σε μελλοντικές ερευνητικές εργασίες.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Εικόνα 4.1: Σύγκριση μεταξύ της πρωτοταγούς δομής των ισομορφών TAp73α, TAp73β και TAp73γ. Το εναλλακτικό μάτισμα έχει ως αποτέλεσμα τη απώλεια της περιοχής που είναι πλούσια σε προλίνες και την περικοπή της περιοχής που είναι πλούσια σε Glu/Pro, η οποία περιέχει μια αμινοτελική περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης που ταυτοποιήθηκε πρόσφατα.

Συντομογραφίες: TA: περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης, DBD: περιοχή δέσμευσης στο DNA, OD: περιοχή ολιγομερισμού, SAM: μοτίβο SAM (sterile alpha motif) (τροποποίηση από Ozaki T et al [104]).

Συμπερασματικά, είναι προφανές ότι υπάρχει σύνδεση μεταξύ της δράσης της πρωτεΐνης Sp1 και της έκφρασης των ισομορφών p73 στον καρκίνο του πνεύμονα. Ο μεταγραφικός παράγοντας Sp1 όχι μόνο έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει τα επίπεδα των ισομορφών TAp73 και ΔNr73, αλλά επίσης η απορρυθμισμένη έκφρασή του σχετίζεται με τον καρκίνο του πνεύμονα. Από την άλλη πλευρά, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης TAp73 στον καρκίνο του πνεύμονα θα μπορούσε να σχετίζεται με βλάβες στο DNA που επάγονται από ογκογονίδια, αφού έχει αποδειχτεί ότι η επαγωγή της πρωτεΐνης p73 εξαρτάται από την απόκριση σε βλάβες στο DNA [105, 106]. Οι μηχανισμοί στους οποίους στηρίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 και των ισομορφών p73 πλήρους μήκους ή των ισομορφών p73 με περικομμένο αμινοτελικό άκρο θα πρέπει να διερευνηθούν εκτενέστερα.

Τέλος, τα επιγενετικά συμβάντα ενδέχεται να έχουν ζωτική σημασία για την απορρύθμιση της ενεργότητας του υποκινητή P2, ενώ τα μεταγραφικά συμβάντα

φαίνεται ότι εμπλέκονται κυρίως στην απορρύθμιση της ενεργότητας του υποκινητή P1 στον καρκίνο του πνεύμονα. Η έκφραση mRNA του ΔNr73 φαίνεται ότι βρίσκεται υπό αυστηρό επιγενετικό έλεγχο του υποκινητή P2 σε φυσιολογικά καρκινικά κύτταρα. Όταν ο υποκινητής P2 απορρυθμιστεί λόγω απομεθυλίωσης, συγκεκριμένος ή συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες έχουν την ευκαιρία να πλησιάσουν τον υποκινητή P2 και, συνακόλουθα, να ενισχύσουν τη μεταγραφή των αντιαποπτωτικών ισομορφών ΔNr73 ευνοώντας, πιθανόν, τις ογκογόνες δράσεις στο εσωτερικό του κυττάρου. Αντίθετα, ο επιγενετικός έλεγχος είναι πιο χαλαρός στην περίπτωση του υποκινητή P1 και η σύνθεση των αντίστοιχων προϊόντων της φαίνεται ότι απορρυθμίζεται μόνο παρουσία υψηλών επιπέδων μεταγραφικών παραγόντων που είναι ειδικοί για τον υποκινητή P1.

Εξάλλου, η παρούσα μελέτη παρέχει ενδείξεις για ύπαρξη διαφορικού παρά αντίθετου τρόπου ρύθμισης των υποκινητών του γονιδίου p73 σε ιστούς καρκίνου του πνεύμονα. Στην περίπτωση στην οποία οι τρόποι ρύθμισης των υποκινητών P1 και P2 παρουσιάζουν πράγματι μια σχέση που δεν είναι τύπου yin-yang, θα μπορούσαν θεωρητικά να προσφέρουν κάποιο βαθμό ελευθερίας στη σύνθεση των αντίστοιχων προϊόντων τους σε συγκεκριμένους ιστούς, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο τη συμμετοχή τους σε ξεχωριστές λειτουργίες. Η ιδέα αυτή υποστηρίζεται περαιτέρω από το γεγονός ότι οι ισομορφές TAp73 και ΔNr73 παρουσιάζουν όχι μόνο αυστηρά ανταγωνιστικές λειτουργίες (π.χ. αποπτωτική δράση της TAp73 έναντι της αντιαποπτωτικής δράσης της ΔNr73 [54]), αλλά επίσης και μοναδικές, ανεξάρτητες μεταξύ τους λειτουργίες, ειδικά σε αναπτυξιακές διαδικασίες, στις οποίες το γονίδιο p73 διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο. Για παράδειγμα η πρωτεΐνη ΔNr73 είναι αναγκαία για το φυσιολογικό μέγεθος των κοιλιών και πάχος του φλοιού του εγκεφάλου κατά τη διάρκεια της νευρογένεσης σε διαγονιδιακά ποντίκια ΔNr73^{-/-}, ενώ η απουσία της πρωτεΐνης TAp73 δεν επηρεάζει αυτές τις παραμέτρους στα διαγονιδιακά ποντίκια TAp73^{-/-} [49]. Η διερεύνηση αυτής της υπόθεσης στο μέλλον θα μπορούσε να διαλευκάνει το φάσμα των λειτουργιών καθώς και την αλληλεπίδραση μεταξύ των ισομορφών p73.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pirozynski M. (2006) 100 years of lung cancer. *Respir Med* **100**, 2073-2084.
2. Minna JD, Roth JA, Gazdar AF. (2002) Focus on lung cancer. *Cancer Cell* **1**, 49-52.
3. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. (2008) Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment and survivorship. *Mayo Clin Proc.* **83**, 584-594.
4. Takahashi T. (2002) Lung cancer: An ever increasing store of in depth basic knowledge and the beginning of its clinical application. *Oncogene* **21**, 6868-6869.
5. Minna JD, Kurie JM, Jacks T. (2003) A big step in the study of small cell lung cancer. *Cancer Cell* **4**, 163-166.
6. Schwartz AG.(2004) Genetic predisposition to lung cancer. *Chest* **125**, 86S-9S.
7. Robles AI, Linke SP, Harris CC. (2002) The p53 network in lung carcinogenesis. *Oncogene* **21**, 6898-6907.
8. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215-221.
9. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* **90**, 809-819.
10. Moll UM, Slade N. (2004) p63 and p73: Roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res.* **2**, 371-386.
11. Melino G, Lu X, Gasgo M, Crook T, Knigh RA. (2003) Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Bioch Sci.* **28**, 663-670.
12. Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville MK, Lane DP. (2005) p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* **19**, 2122-2137.
13. Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. (2006) p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.* **13**, 962-972.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

14. Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. (1999) p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* **398**, 708-713.
15. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F. (1999) p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* **398**, 714-718.
16. Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, McKeon F, Caput D. (2000) p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* **404**, 99-103.
17. Nemajerova A, Palacios G, Nowak NJ, Matsui S, Petrenko O. (2009) Targeted deletion of p73 in mice reveals its role in T cell development and lymphomagenesis. *Plos One* **4**, e7784.
18. Marabese M, Vikhanskaya F, Broggin M. (2007) p73: a chiaroscuro gene in cancer. *Eur J Cancer* **43**, 1361-1372.
19. Flores ER, Sengupta S, Miller JB, Newman JJ, Bronson R, Crowley D, Yang A, McKeon F, Jacks T. (2005) Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell* **7**, 363-373.
20. Belyi VA, Ak P, Markert E, Wang H, Hu W, Puzio-Kuter A, Levine AJ. (2010) The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2**, a001198.
21. Ramadan S, Terrinoni A, Catani MV, Sayan AE, Knight RA, Mueller M, Krammer PH, Melino G, Candi E. (2005) p73 induces apoptosis by different mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.* **331**, 713-717.
22. Flinterman M, Guelen L, Ezzati-Nik S, Killick R, Melino G, Tominaga K, Mymryk JS, Gäken J, Tavassoli M. (2005) E1A activates transcription of p73 and Noxa to induce apoptosis. *J Biol Chem.* **280**, 5945-5959.
23. Zawacka-Pankau J, KostECKA A, Sznarkowska A, Hedström E, Kawiak A. (2010) p73 tumor suppressor protein: a close relative of p53 not only in structure but also in anti-cancer approach? *Cell Cycle* **9**, 720-728.
24. Chakraborty J, Banerjee S, Ray P, Hossain DM, Bhattacharyya S, Adhikary A, Chattopadhyay S, Das T, Sa G. (2010) Gain of cellular adaptation due to

- prolonged p53 impairment leads to functional switchover from p53 to p73 during DNA damage in acute myeloid leukemia cells. *J Biol Chem.* **285**, 33104-33112.
25. Leung TH, Ngan HY. (2010) Interaction of TAp73 and breast cancer-associated gene 3 enhances the sensitivity of cervical cancer cells in response to irradiation-induced apoptosis. *Cancer Res.* **70**, 6486-6496.
26. Tomasini R, Tsuchihara K, Wilhelm M, Fujitani M, Rufini A, Cheung CC, Khan F, Itie-Youten A, Wakeham A, Tsao MS, Iovanna JL, Squire J, Jurisica I, Kaplan D, Melino G, Jurisicova A & Mak TW (2008) TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev.* **22**, 2677-2691.
27. De Laurenzi V, Costanzo A, Barcaroli D, Terrinoni A, Falco M, Annicchiarico-Petruzzelli M, Levrero M, Melino G (1998) Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J Exp Med.* **188**, 1763-1768.
28. Ueda Y, Hijikata M, Takagi S, Chiba T & Shimotohno K (1999) New p73 variants with altered C-terminal structures have varied transcriptional activities. *Oncogene* **18**, 4993-4998.
29. Racek T, Mise N, Li Z, Stoll A & Pützer BM (2005) C-terminal p73 isoforms repress transcriptional activity of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter. *J Biol Chem.* **280**, 40402-40405.
30. Beitzinger M, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R & Stiewe T (2006) Regulation of telomerase activity by the p53 family member p73. *Oncogene* **25**, 813-826.
31. Castellino RC, De Bortoli M, Lin LL, Skapura DG, Rajan JA, Adesina AM, Perlaky L, Irwin MS, Kim JY (2007) Overexpressed TP73 induces apoptosis in medulloblastoma. *BMC Cancer* **7**, 127.
32. Stiewe T, Tuve S, Peter M, Tannapfel A, Elmaagacli AH & Putzer BM (2004) Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res.* **10**, 626-633.
33. Tuve S, Wagner SN, Schitteck B & Putzer BM (2004) Alterations of DeltaTA-p73 splice transcripts during melanoma development and progression. *Int J Cancer* **108**, 162-166.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

34. Pluta A, Nyman U, Joseph B, Robak T, Zhivotovsky B, Smolewski P (2006) The role of p73 in hematological malignancies. *Leukemia* **20**, 757-766.
35. Zwahlen D, Tschan MP, Grob TJ, Peters UR, Fink D, Haenggi W, Altermatt HJ, Cajot JF, Tobler A, Fey MF, Aebi S. (2000) Differential expression of p73 splice variants and protein in benign and malignant ovarian tumours. *Int J Cancer* **88**, 66-70.
36. Mai M, Yokomizo A, Qian C, Yang P, Tindall DJ, Smith DI & Liu W (1998) Activation of p73 silent allele in lung cancer. *Cancer Res.* **58**, 2347-2349.
37. Di Vinci A, Sessa F, Casciano I, Banelli B, Franzi F, Brigati C, Allemanni G, Russo P, Dominioni L, Romani M (2009) Different intracellular compartmentalization of TA and ΔNp73 in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol.* **34**, 449-456.
38. Coates PJ. (2006) Regulating p73 isoforms in human tumours. *J Pathol.* **210**, 385-389.
39. Romani M, Tonini GP, Banelli B, Allemanni G, Mazzocco K, Scaruffi P, Boni L, Ponzoni M, Pagnan G, Raffaghello L, Ferrini S, Croce M, Casciano I. (2003) Biological and clinical role of p73 in neuroblastoma. *Cancer Lett.* **197**, 111-117.
40. Casciano I, Ponzoni M, Lo Cunsolo C, Tonini GP, Romani M. (1999) Different p73 splicing variants are expressed in distinct tumour areas of a multifocal neuroblastoma. *Cell Death Differ.* **6**, 391-393.
41. Tschan MP, Grob TJ, Peters UR, Laurenzi VD, Huegli B, Kreuzer KA, Schmidt CA, Melino G, Fey MF, Tobler A, Cajot JF. (2000) Enhanced p73 expression during differentiation and complex p73 isoforms in myeloid leukemia. *Biochem Biophys Res Commun.* **277**, 62-65.
42. Nenutil R, Ceskova P, Coates PJ, Nylander K, Vojtesek B. (2003) Differential expression of p73alpha in normal ectocervical epithelium, cervical intraepithelial neoplasia, and invasive squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* **22**, 386-392.
43. Buhlmann S, Pützer BM. (2008) DNp73 a matter of cancer: mechanisms and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* **1785**, 207-216.
44. Stiewe T, Theseling CC, Pützer BM. (2002) Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *J Biol Chem.* **277**, 14177-14185.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

45. Irwin MS. (2006) DeltaNp73: Misunderstood protein? *Cancer Biol Ther.* **5**, 804-807.
46. Buhlmann S, Racek T, Schwarz A, Schaefer S, Pützer BM. (2008) Molecular Mechanism of p73-Mediated Regulation of Hepatitis B Virus Core Promoter/Enhancer II: Implications for Hepatocarcinogenesis. *J Mol Biol.* **378**, 20-30.
47. Stiewe T, Stanelle J, Theseling CC, Pollmeier B, Beitzinger M, Pützer BM. (2003) Inactivation of retinoblastoma (RB) tumor suppressor by oncogenic isoforms of the p53 family member p73. *J Biol Chem.* **278**, 14230-14236.
48. Petrenko O, Zaika A, Moll UM. (2003) Δ Np73 facilitates cell immortalization and cooperated with oncogenic Ras in cellular transformation in vivo. *Mol Cell Biol.* **23**, 5540-5555.
49. Wilhelm MT, Rufini A, Wetzel MK, Tsuchihara K, Inoue S, Tomasini R, Itie-Youten A, Wakeham A, Arsenian-Henriksson M, Melino G, Kaplan DR, Miller FD, Mak TW. (2010) Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for Δ Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev.* **24**, 549-560.
50. Liu G, Nozell S, Xiao H, Chen X. (2004) DeltaNp73beta is active in transactivation and growth suppression. *Mol Cell Biol.* **24**, 487-501.
51. Marrazzo E, Marchini S, Tavecchio M, Alberio T, Previdi S, Erba E, Rotter V, Broggin M. (2009) The expression of the Δ Np73 β isoform leads to tetraploidy. *Eur J Cancer* **45**, 443-453.
52. Toh WH, Logette E, Corcos L, Sabapathy K. (2008) TAp73beta and DNp73beta activate the expression of the pro-survival caspase-2S. *Nucleic Acids Res.* **36**, 4498-509.
53. Wager M, Guilhot J, Blanc JL, Ferrand S, Milin S, Bataille B, Lapierre F, Denis S, Chantereau T, Larsen CJ, Karayan-Tapon L. (2006) Prognostic value of increase in transcript levels of Tp73 DeltaEx2-3 isoforms in low-grade glioma patients. *Br J Cancer* **95**, 1062-1069.
54. Grob TJ, Novak U, Maise C, Barcaroli D, Lüthi AU, Pirnia F, Hügli B, Graber HU, De Laurenzi V, Fey MF, Melino G & Tobler A. (2001) Human Δ Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ.* **8**, 1213-1223.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

55. Kartasheva NN, Contente A, Lenz-Stöppler C, Roth J, Dobbelstein M. (2002) p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene* **21**, 4715-4727.
56. Lunghi P, Costanzo A, Mazzerà L, Rizzoli V, Levrero M, Bonati A. (2009) The p53 family protein p73 provides new insights into cancer chemosensitivity and targeting. *Clin Cancer Res.* 15:6495-502.
57. Esteller M, Herman JG. (2002) Cancer as an epigenetic disease-DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol.* **196**, 1-7.
58. Wu H, Chen Y, Liang J, Shi B, Wu G, Zhang Y, Wang D, Li R, Yi X, Zhang H, Sun L, Shang Y. (2005) Hypomethylation-linked activation of PAX2 mediates tamoxifen-stimulated endometrial carcinogenesis. *Nature* **438**, 981-987.
59. De Smet C, Loriot A. (2010) DNA hypomethylation in cancer: Epigenetic scars of a neoplastic journey. *Epigenetics* **5**, 206-213.
60. Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomäki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su Huang H, Petrelli NJ, Zhang Y, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C. (2000) Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet.* **24**, 132-138.
61. Corn PG, Kuerbitz SJ, van Noesel MM, Esteller M, Compitello N, Baylin SB, Herman JG. (10999) Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res.* **59**, 3352-3356.
62. Martinez-Delgado B, Melendez B, Cuadros M, Garcia MJ, Nomdedeu J, Rivas C. (2002) Frequent inactivation of the p73 gene by abnormal methylation or LOH in non-Hodgkin's lymphomas. *Int J Cancer* **102**, 15-19.
63. Siu LL, Chan JK, Wong KF, Kwong YL. (2002) Specific patterns of gene methylation in natural killer lymphomas: p73 is consistently involved. *Am J Pathol.* **160**, 59-66.
64. Banelli B, Casciano I, Romani M (2000). Methylation-independent silencing of the p73 gene in neuroblastoma. *Oncogene* **19**, 4553-4556.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

65. Casciano I, Banelli B, Croce M, Allemanni G, Ferrini S, Tonini GP, Ponzoni M, Romani M. (2002) Role of methylation in the control of Δ Np73 expression in neuroblastoma. *Cell Death Differ.* **9**, 343-345.
66. Ding Y, Inoue T, Kamiyama J, Tamura Y, Ohtani-Fujita N, Igata E, Sakai T. (1999) Molecular cloning and functional characterization of the upstream promoter region of the human p73 gene. *DNA Res.* **6**, 347-351.
67. Wu S, Murai S, Kataoka K, Miyagishi M. (2008) Yin Yang 1 induces transcriptional activity of p73 through cooperation with E2F1. *Biochem Biophys Res Commun.* **365**,75-81.
68. Fontemaggi G, Gurtner A, Strano S, Higashi Y, Sacchi A, Piaggio G, Blandino G. (2001) The transcriptional repressor ZEB regulates p73 expression at the crossroad between proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol.* **21**, 8461-8670.
69. Domínguez G, Peña C, Silva J, García JM, García V, Rodríguez R, Cantos B, Citores MJ, España P, Bonilla F. (2006) The presence of an intronic deletion in p73 and high levels of ZEB1 alter the TAp73/DeltaTAp73 ratio in colorectal carcinomas. *J Pathol.* **210**, 390-397.
70. Vilgelm A, El-Rifai W, Zaika A. (2008) Therapeutic prospects for p73 and p63: rising from the shadow of p53. *Drug Resist Updat.* **11**, 152-163.
71. Levy D, Adamovich Y, Reuven N, Shaul Y. (2007) The Yes-associated protein 1 stabilizes p73 by preventing Itch-mediated ubiquitination of p73. *Cell Death Differ.* **14**, 743-751.
72. Lapi E, Di Agostino S, Donzelli S, Gal H, Domany E, Rechavi G, Pandolfi PP, Givol D, Strano S, Lu X, Blandino G. (2008) PML, YAP, and p73 are components of a proapoptotic autoregulatory feedback loop. *Mol Cell.* **32**, 803-814.
73. Nyman U, Vlachos P, Cascante A, Hermanson O, Zhivotovsky B, Joseph B. (2009) Protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell cycle-inhibitory function of the p73 carboxy terminus transactivation domain. *Mol Cell Biol.* **29**, 1814-1825.
74. Rossi M, De Laurenzi V, Munarriz E, Green DR, Liu YC, Vousden KH, Cesareni G, Melino G. (2005) The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *EMBO J.* **24**, 836-848.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

75. Sassaman DM, Dombroski BA, Moran JV, Kimberland ML, Naas TP, DeBerardinis RJ, Gabriel A, Swergold GD, Kazazian HH Jr. (1997) Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat Genet.* **16**, 37-43.
76. Hooghe B, Hulpiou P, van Roy F, De Bleser P. (2008) ConTra: a promoter alignment analysis tool for identification of transcription factor binding sites across species. *Nucleic Acids Res.* **36**, W128-132.
77. Hubbard TJ, Aken BL, Ayling S, Ballester B, Beal K, Bragin E, Brent S, Chen Y, Clapham P, Clarke L, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Fernandez-Banet J, Gordon L, Graf S, Haider S, Hammond M, Holland R, Howe K, Jenkinson A, Johnson N, Kahari A, Keefe D, Keenan S, Kinsella R, Kokocinski F, Kulesha E, Lawson D, Longden I, Megy K, Meidl P, Overduin B, Parker A, Pritchard B, Rios D, Schuster M, Slater G, Smedley D, Spooner W, Spudich G, Trevanion S, Vilella A, Vogel J, White S, Wilder S, Zadissa A, Birney E, Cunningham F, Curwen V, Durbin R, Fernandez-Suarez XM, Herrero J, Kasprzyk A, Proctor G, Smith J, Searle S, Flicek P. (2009) Ensembl 2009. *Nucleic Acids Res.* **37**, D690-697.
78. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. (2009) Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189-1191.
79. Hall TA. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* **41**, 95-98.
80. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248-254.
81. Sayan AE, Paradisi A, Vojtesek B, Knight RA, Melino G, Candi E. (2005) New antibodies recognizing p73: comparison with commercial antibodies. *Biochem Biophys Res Commun.* **330**, 186-193.
82. Park YG, Nesterova M, Agrawal S, Cho-Chung YS. (1999) Dual blockade of cyclic AMP response element-(CRE) and AP-1-directed transcription by CRE-transcription factor decoy oligonucleotide. *J Biol Chem.* **274**, 1573-1580.
83. Chalitchagorn K, Shuangshoti S, Hourpai N, Kongruttanachok N, Tangkijvanich P, Thong-ngam D, Voravud N, Sriuranpong V, Mutirangura A.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (2004) Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene* **23**, 8841-8846.
84. Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E, Ehrlich M, Laird PW. (2005) Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res.* **33**, 6823-6836.
85. Daskalos A, Nikolaidis G, Xinarianos G, Savvari P, Cassidy A, Zakopoulou R, Kotsinas A, Gorgoulis V, Field JK, Liloglou T. (2009) Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* **124**, 81-87.
86. Seelan RS, Irwin M, van der Stoop P, Qian C, Kaelin WG, Liu W. (2002) The human p73 promoter: characterization and identification of functional E2F binding sites. *Neoplasia* **4**, 195-203.
87. Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, Smith DI, Liu W, Flores ER, Tsai KY, Jacks T, Vousden KH, Kaelin WG. (2000) Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* **407**, 645-648.
88. Stiewe T, Pützer BM (2001) Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nature Genet.* **26**, 464-469.
89. Shi Q, Le X, Abbruzzese JL, Peng Z, Qian CN, Tang H, Xiong Q, Wang B, Li XC, Xie K. (2001) Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* **61**, 4143-4154.
90. Jia Z, Zhang J, Wei D, Wang L, Yuan P, Le X, Li Q, Yao J, Xie K. (2007) Molecular basis of the synergistic antioncogenic activity of bevacizumab and mithramycin A. *Cancer Res.* **67**, 4878-4885.
91. Uramoto H, Sugio K, Oyama T, Nakata S, Ono K, Morita M, Funa K, Yasumoto K. (2004) Expression of deltaNp73 predicts poor prognosis in lung cancer. *Clin Cancer Res.* **10**, 6905-6911.
92. Shaw RJ, Akufo-Tetteh EK, Risk JM, Field JK, Liloglou T. (2006) Methylation enrichment pyrosequencing: combining the specificity of MSP with validation by pyrosequencing. *Nucleic Acids Res.* **34**, e78.
93. Uramoto H, Sugio K, Oyama T, Nakata S, Ono K, Nozoe T, Yasumoto K. (2006) Expression of the p53 family in lung cancer. *Anticancer Res.* **26**, 1785-1790.

94. Saito K, Kawakami K, Matsumoto I, Oda M, Watanabe G, Minamoto T. (2010) Long interspersed nuclear element 1 hypomethylation is a marker of poor prognosis in stage IA non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* **16**, 2418-2426.
95. Safe S, Abdelrahim M. (2005) Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer* **41**, 2438-2448.
96. Koutsodontis G, Vasilaki E, Chou WC, Papakosta P, Kardassis D. (2005) Physical and functional interactions between members of the tumour suppressor p53 and the Sp families of transcription factors: importance for the regulation of genes involved in cell-cycle arrest and apoptosis. *Biochem J.* **389**, 443-455.
97. Salimath B, Marmé D, Finkenzeller G. (2000) Expression of the vascular endothelial growth factor gene is inhibited by p73. *Oncogene* **19**, 3470-3476.
98. Innocente SA, Lee JM. (2005) p73 is a p53-independent, Sp1-dependent repressor of cyclin B1 transcription. *Biochem Biophys Res Commun.* **329**, 713-718.
99. Kanaya T, Kyo S, Hamada K, Takakura M, Kitagawa Y, Harada H, Inoue M. (2000) Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res.* **6**, 1239-1247.
100. Xu D, Wang Q, Gruber A, Björkholm M, Chen Z, Zaid A, Selivanova G, Peterson C, Wiman KG, Pisa P. (2000) Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene* **19**, 5123-5133.
101. Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, Knight RA, Green DR, Thompson C, Vousden KH. (2004) p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem.* **279**, 8076-8083.
102. Sauer M, Bretz AC, Beinoraviciute-Kellner R, Beitzinger M, Burek C, Rosenwald A, Harms GS, Stiewe T. (2008) C-terminal diversity within the p53 family members account for differences in DNA binding and transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.* **36**, 1900-1912.
103. Takada N, Ozaki T, Ichimiya S, Todo S, Nakagawara A. (1999) Identification of a transactivation activity in the COOH-terminal region of p73 which is

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- impaired in the naturally occurring mutants found in human neuroblastomas. *Cancer Res.* **59**, 2810-2814.
104. Ozaki T, Naka M, Takada N, Tada M, Sakiyama S, Nakagawara A (1999) Deletion of the COOH-terminal region of p73 α enhances both its transactivation function and DNA-binding activity but inhibits induction of apoptosis in mammalian cells. *Cancer Res.* **59**, 5902-5907.
105. Lontos M, Niforou K, Velimezi G, Vougas K, Evangelou K, Apostolopoulou K, Vrtel R, Damalas A, Kontovazenitis P, Kotsinas A, Zoumpourlis V, Tsangaris GT, Kittas C, Ginsberg D, Halazonetis TD, Bartek J, Gorgoulis VG. (2009) Modulation of the E2F1-Driven Cancer Cell Fate by the DNA Damage Response Machinery and Potential Novel E2F1 Targets in Osteosarcomas *Am J Pathol.* **175**, 376-391.
106. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. (2008) An oncogene-induced DNA damage model for cancer development *Science* **319**, 1352-1355.

6. ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

Sp1 binds to the external promoter of the *p73* gene and induces the expression of TAp73 γ in lung cancer

Stella Logotheti¹, Ioannis Michalopoulos², Maria Sideridou³, Alexandros Daskalos⁴, Sophia Kossida², Demetrios A. Spandidos⁵, John K. Field⁴, Borek Vojtesek⁶, Triantafyllos Liloglou⁴, Vassilis Gorgoulis³ and Vassilis Zoumpourlis¹

1 Biomedical Applications Unit, Institute of Biological Research and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece

2 Bioinformatics & Medical Informatics, Foundation for Biomedical Research of the Academy of Athens, Greece

3 Molecular Carcinogenesis Group, Department of Histology and Embryology, Medical School of Athens, Greece

4 Roy Castle Lung Cancer Research Programme, Division of Surgery and Oncology, University of Liverpool Cancer Research Centre, University of Liverpool, UK

5 Laboratory of Clinical Virology, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece

6 Department of Oncological and Experimental Pathology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

Keywords

lung cancer; P1 promoter; *p73* isoforms; Sp1; TAp73 γ ; Δ Np73

Correspondence

V. Zoumpourlis, Biomedical Application Unit, Institute of Biological Research and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, 48 Vas. Constantinou Ave, 116 35 Athens, Greece
Fax: +210 7273677
Tel: +210 7273730
E-mail: vzub@eie.gr

(Received 16 February 2010, revised 1 May 2010, accepted 12 May 2010)

doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07710.x

The *p73* gene possesses an extrinsic P1 promoter and an intrinsic P2 promoter, resulting in TAp73 and Δ Np73 isoforms, respectively. The ultimate effect of *p73* in oncogenesis is thought to depend on the apoptotic TA to antiapoptotic Δ N isoforms' ratio. This study was aimed at identifying novel transcription factors that affect TA isoform synthesis. With the use of bioinformatics tools, *in vitro* binding assays, and chromatin immunoprecipitation analysis, a region extending -233 to -204 bp upstream of the transcription start site of the human *p73* P1 promoter, containing conserved Sp1-binding sites, was characterized. Treatment of cells with Sp1 RNAi and Sp1 inhibitor functionally suppress TAp73 expression, indicating positive regulation of P1 by the Sp1 protein. Notably Sp1 inhibition or knockdown also reduces Δ Np73 protein levels. Therefore, Sp1 directly regulates TAp73 transcription and affects Δ Np73 levels in lung cancer. TAp73 γ was shown to be the only TA isoform overexpressed in several lung cancer cell lines and in 26 non-small cell lung cancers, consistent with Sp1 overexpression, thereby questioning the apoptotic role of this specific *p73* isoform in lung cancer.

Introduction

Lung cancer is one of the most common and fatal types of cancer in developed countries. Despite scientific advances, the overall number of associated deaths has only slightly decreased during the last 20 years [1]. The well-known tumour suppressor gene *p53* has been found to be mutated in 70–90% of lung cancer cases and in less than 50% of all cancer cases [1]. However, the involvement of *p73*, its structural and functional

homologue, in this type of cancer is not clearly understood [2].

The *p73* gene is a member of the *p53* family that encodes an N-terminal transactivation domain (TA), a highly conserved DNA-binding domain (DBD), and a C-terminal oligomerization domain [3]. Despite its high degree of sequence similarity with *p53*, especially in the DBD, and its ability to activate various *p53*

Abbreviations

ChIP, chromatin immunoprecipitation; DBD, DNA-binding domain; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; NSCLC, non-small cell lung cancer; siRNA, small interfering RNA; TA, transactivation domain; TSS, transcription start site; VEGF, vascular endothelial growth factor.

targets [4] as well as to induce apoptosis in cancer cells [5], *p73* has unique characteristics that differentiate it from a classical Knudson-type gene. Unlike *p53*, *p73* rarely mutates in cancer [6], and *p73*^{-/-} mice do not develop spontaneous tumours, but show severe abnormalities in neuronal development [7]. The gene produces numerous isoforms as a result of: (a) alternative splicing in the 3'-end (leading to the formation of α , β , γ , δ , ϵ , ζ and η isoforms) [8–12]; (b) the use of an extrinsic promoter (P1) and an alternative, intrinsic promoter (P2) in the 5'-end (leading to the formation of TA and Δ N classes of isoforms, respectively) [13]; and (c) alternative splicing in the 5'-end (resulting in truncated transcripts *p73* Δ ex2, *p73* Δ ex2/3, and Δ N'-*p73*, which partially or entirely lack the TA, collectively called Δ TA) [14]. The numerous isoforms derive from several combinations between differential N-terminal domain and C-terminal domain [15].

Despite the rarity of *p73* mutations, overexpression of *p73* isoforms is common in several types of cancer [14,16], including lung cancer [2]. Elevated levels of expression of *p73* isoforms have also been correlated with lung cancer, as Δ N*p73* overexpression predicts a poorer prognosis in patients with squamous cell carcinoma and adenocarcinoma [17]. In addition, TAp*73* is overexpressed in lung cancer tumour tissues [18,19].

The 'two genes in one' idea has been suggested for *p73*, whereby the same gene is thought to generate products with opposing roles, mainly the apoptotic TA isoform(s) and the antiapoptotic Δ N isoforms. In general, TAp*73* isoforms regulate the transcription of Δ N*p73* isoforms, which, in turn, act as dominant negative regulators of both TAp*73* and *p53*, thus giving a dominant negative feedback loop [13]. Consequently, the ultimate effect of *p73* isoforms in cancer progression is attributed to the TA/ Δ N ratio, rather than the overexpression of a specific *p73* isoform or a specific class of *p73* isoforms *per se* [20,21].

In line with this concept, the selective promoter activation could result in the activation of either oncogenic or tumour suppressor isoform(s) of this gene, thereby shifting the TA/ Δ N equilibrium towards an oncogenic or a tumour suppressor direction. For example, the *p73* P1 promoter contains functional E2F1-binding sites [22], through which the E2F1 transcription factor induces TAp*73* overexpression and consequent apoptosis [23,24]. It has been reported that the *p73* P1 promoter is not completely inactivated by site-directed mutagenesis of its functional E2F1 sites [23], implying that additional transcription factor(s) play a significant role in its regulation. This study focused on the identification of novel transcriptional

factors that control the use of the *p73* P1 promoter and, subsequently, the relative expression of *p73* isoforms in lung cancer by using lung cancer cell lines and tumour samples. Sp1 was found to activate the transcription of TAp*73* γ in lung cancer via highly conserved Sp1-binding sites on the *p73* P1 promoter. In addition, TAp*73* γ and Sp1 are co-overexpressed both *in vitro* and *in situ* in lung cancer. Sp1 also affected the Δ N*p73* levels in lung cancer.

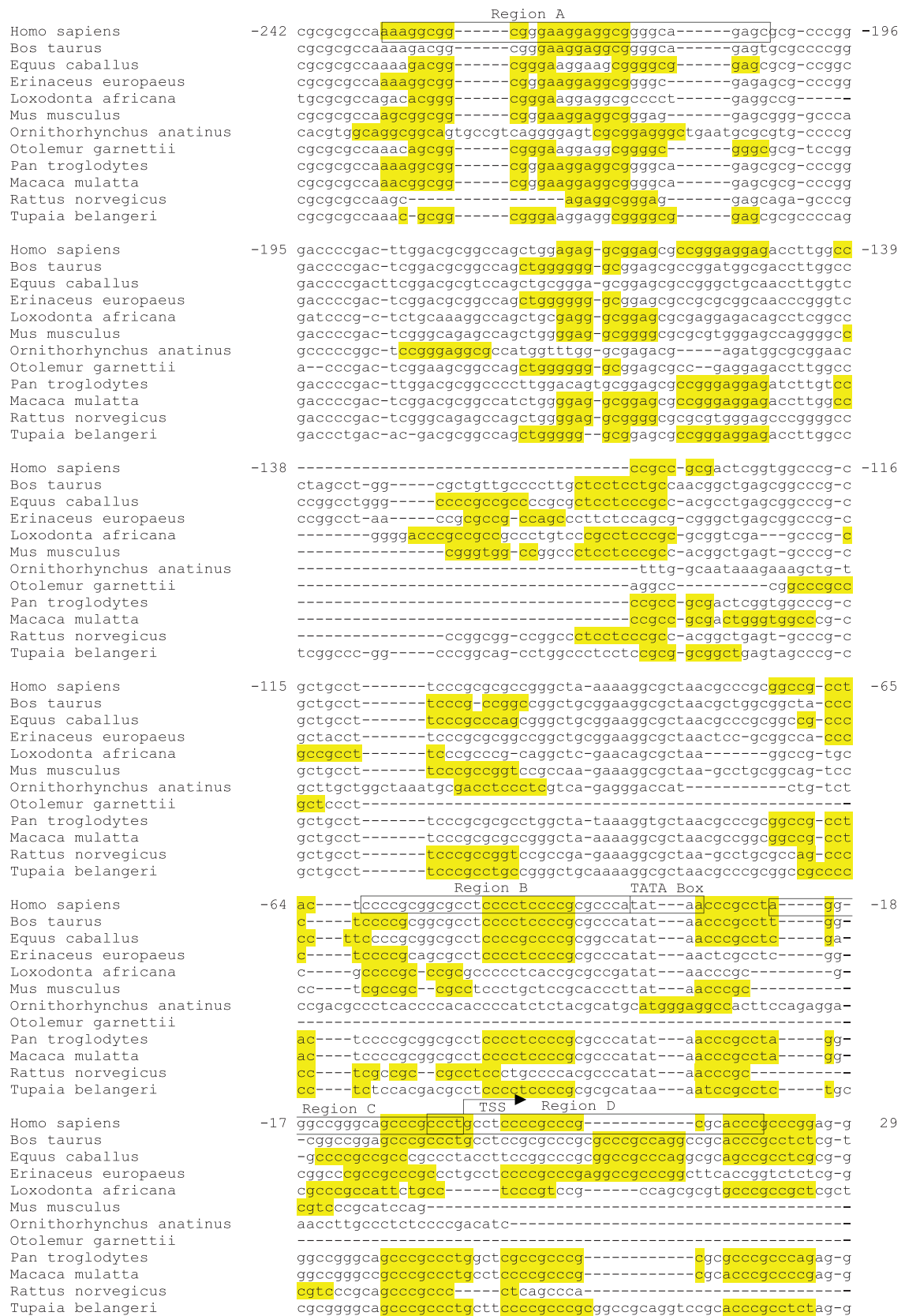
Results

The *p73* P1 promoter has multiple putative Sp1-binding sites

In order to identify transcription factors that control the use of the *p73* P1 promoter, we searched for conserved binding sites located in regions of its sequence that show high homology among various species, including *Bos taurus*, *Equus caballus*, *Erinaceus europaeus*, *Loxodonta africana*, *Macaca mulatta*, *Mus musculus*, *Ornithorhynchus anatinus*, *Otolemur garnettii*, *Pan troglodytes*, *Rattus norvegicus* and *Tupaia belangeri*. The transcription start site (TSS) of the human transcripts ENST00000346387, ENST00000354437, ENST00000357733, ENST00000378290, and ENST00000378295, which is located at chr1:3558989 (Ensembl v54, May 2009), was selected. The analysis focused on the first 250 bp upstream of the TSS, which shows most conservation among mammals. Four conserved human *p73* P1 promoter regions (A–D), containing potential Sp1-binding sites, were identified (Fig. 1). Region A is located –233 to –204 bp upstream of the human *p73* P1 TSS, and contains two putative Sp1-binding elements. Regions B, C, and D, which are located –61 to –33, –20 to –1, and –4 to +20 bp upstream of the TSS, respectively, all contain one putative Sp1-binding element. Our *in silico* prediction of candidate Sp1 motifs in regions A, C and D is in accordance with a previous study, in which MATINSPECTOR V2.2 at the TRANSFAC website was used [25]. Furthermore, CONTRA analysis also suggested another candidate Sp1 motif in region B. Our study demonstrated a canonical, conserved TATA box at position –32, based on the mapping of the TSS by Ensembl, which is identical to the TATA box previously described for the human *p73* P1 promoter [22].

Regions A, B and C on the *p73* P1 promoter can bind Sp1 *in vitro*

We evaluated the affinity of the *in silico*-identified region A, B, C and D oligonucleotides for *in vitro*



synthesized Sp1 protein using electrophoretic mobility shift assay (EMSA) experiments. *In vitro*, Sp1 can bind to region A, B and C oligonucleotides (Fig. 2A, lanes 6 and 11, and Fig. 2B, lane 6, respectively). Self-competition experiments, as well as competition experiments using an excess of unlabelled control oligonucleotide (containing a control Sp1 binding site) for region A radiolabelled oligonucleotide, abolished the formation of the Sp1–radiolabelled region A oligonucleotide complex (Fig. 2A, lanes 7 and 8, respectively). The addition of the mSp1 oligonucleotide (containing a mutated Sp1 binding site) did not affect protein–DNA binding (Fig. 2A, lane 9), whereas the addition of antibody against Sp1 strongly supershifted the Sp1–DNA complex (Fig. 2A, lane 10). Similar experiments for regions B (Fig. 2A) and C (Fig. 2B) confirmed specific *in vitro* Sp1–DNA binding. Notably, the binding activity of the region A oligonucleotide was markedly higher than those of all other oligonucleotides that were tested, possibly indicating that both putative Sp1 binding elements in region A are active. Therefore, region A appears to be a better binding site for Sp1. In contrast, region D failed to bind *in vitro* synthesized Sp1 protein (Fig. 2B, lanes 11–15), and it was excluded from further analysis.

Binding of endogenous Sp1 from lung cancer cell lines to the *p73* P1 promoter

In order to validate the ability of endogenous Sp1 to bind to the *p73* P1 promoter within the cellular environment, we performed additional EMSA experiments using nuclear extracts from 11 representative lung cancer cell lines. We used only region A radiolabelled oligonucleotide, as it was found to bind *in vitro* to Sp1 more effectively. We observed that the binding of endogenous Sp1 to region A in the fibroblast cell line IMR90 was almost equal to that in the normal HNBE cells (Fig. 2C, lanes 1 and 2). A marked increase in the level of region A oligonucleotide–Sp1 complexes was noted in the anaplastic carcinoma cell line (Fig. 2C, lane 3), and the levels of the complexes appeared to remain equivalently high in the small cell lung cancer cell line (Fig. 2C, lane 4), the squamous cell carcinoma cell lines (Fig. 2C, lanes 5–7), the adenocarcinoma cell lines (Fig. 2C, lanes 8–10), and the large cell lung carcinoma cell line (Fig. 2C, lane 11). The region A oligonucleotide–Sp1 complex

was supershifted in the representative cell line A549 (Fig. 2C, lane 12), demonstrating the specificity of region A for Sp1 of the nuclear cell lysates. The Sp1–DNA binding pattern for the region A oligonucleotide is consistent with that of the control oligonucleotide (Fig. 2D).

Binding of Sp1 to the *p73* P1 promoter within the cellular environment is further supported by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays. Sp1 antibody immunoprecipitated the *p73* P1 promoter in A549 cells in a dose-dependent manner (Fig. 2E). In contrast, no PCR signal was observed when the irrelevant β -actin antibody was used for ChIP. The sheared and cross-linked DNA that was produced prior to the immunoprecipitation step (input) was used as a positive control PCR template.

TAp73 synthesis is regulated by Sp1 through region A in lung cancer cell lines

Next, we tested the ability of Sp1 to regulate TAp73 expression *in vivo* by treating the standard TAp73-expressing cell line A549 with either Sp1 small interfering RNA (siRNA) or an Sp1 protein inhibitor. The resulting changes in TAp73 expression were monitored by western blot analysis. The known Sp1 target vascular endothelial growth factor (VEGF) [26] was used as a positive control. A549 cells were transiently transfected with Sp1 siRNA, and the nonsilencing control siRNA was the negative control for Sp1 siRNA interference. As shown in Fig. 3A, treatment with Sp1 siRNA resulted in the downregulation of TAp73 and VEGF levels as compared with the corresponding levels in the siRNA-untreated cells, revealing positive regulation of the *p73* P1 promoter by Sp1. In contrast, TAp73 and VEGF levels were not affected by treatment with negative control Sp1 siRNA. Similarly, TAp73 levels gradually decreased after a 48 h treatment of A549 cells with increasing concentrations of the Sp1 inhibitor mithramycin A (Fig. 3B), which not only interferes with the transcription of genes containing GC-rich regions in their promoters, but also, at high concentrations, reduces recruitment of Sp1 to its own promoter [27].

We then performed transient transfection of A549 cells with region A double-stranded phosphorothioate oligonucleotides, which are able to antagonize region A for Sp1 binding, in order to examine whether

Fig. 1. The P1 *p73* promoter has multiple putative Sp1-binding sites, conserved among 12 mammalian species. Alignment using CONTRA analysis revealed four conserved, putative Sp1 element-containing regions, spanning from –233 to –204 bp (region A), –61 to –33 bp (region B), –20 to –1 bp (region C) and –4 to +20 bp (region D) relative to the TSS of the human *p73* P1 promoter. The four regions are box-highlighted, and the human Sp1-binding sites are yellow-shaded. The TATA box is also box-highlighted.

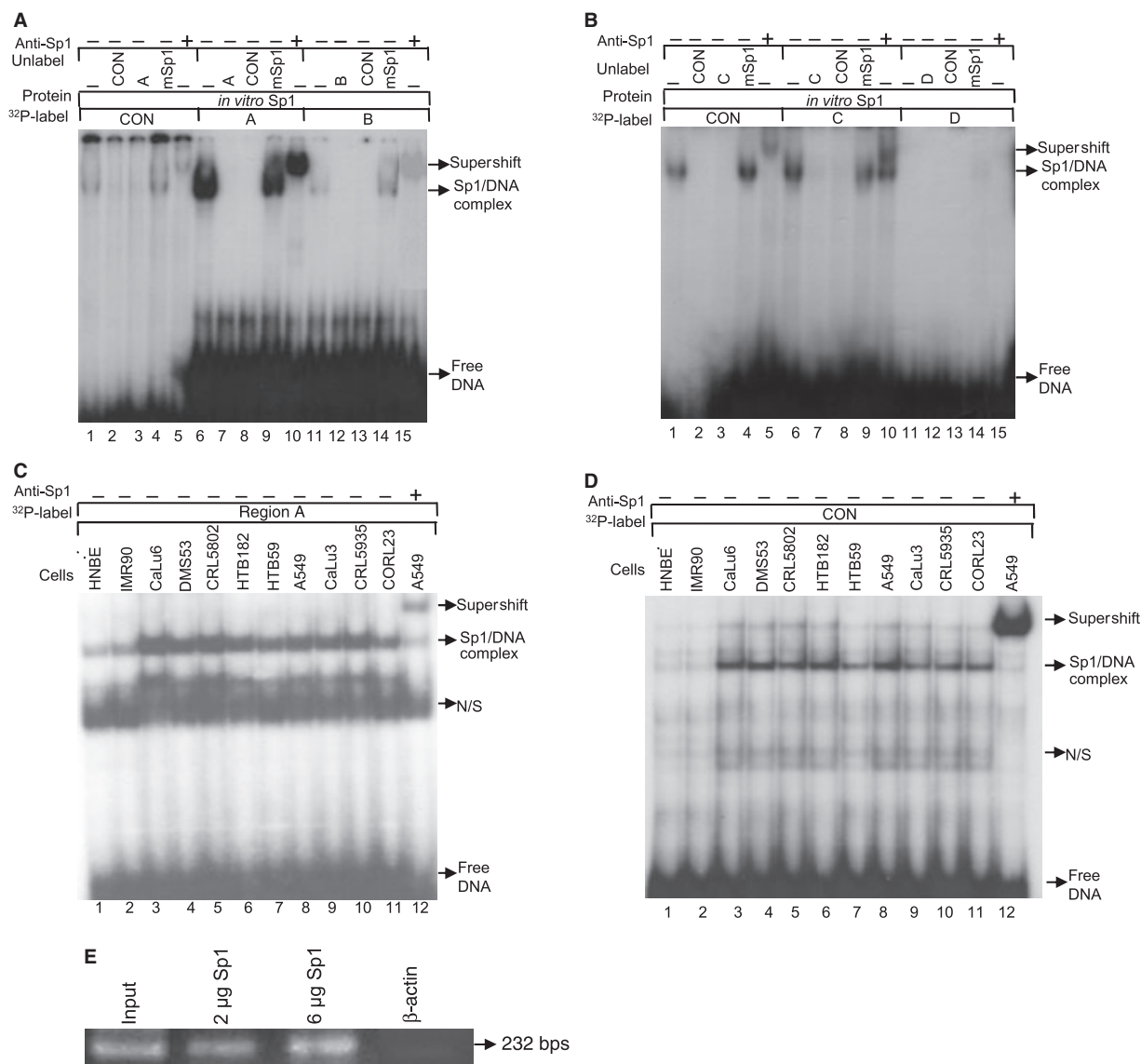


Fig. 2. Sp1 binds to the *p73* P1 promoter both *in vitro* and *in vivo*. (A) The ³²P-labelled region A target was incubated with the *in vitro* Sp1 protein either alone (lane 6) or in the presence of cold region A oligonucleotide (self-competition reaction) (lane 7), cold control oligonucleotide (CON) (competition reaction with positive control) (lane 8), or cold mutant Sp1 oligonucleotide (mSp1) (competition reaction with negative control) (lane 9). In lane 10, the protein–DNA complexes are supershifted with polyclonal antibody against Sp1 (supershift reaction). Lanes 11–15 correspond to a similar set of reactions for the ³²P-labelled region B target. Lanes 1–5 correspond to the positive control reactions for the Sp1-containing oligonucleotide (CON). (B) Lanes 6–10 correspond to a similar set of reactions for the ³²P-labelled region C target, and lanes 11–15 correspond to a similar set of reactions for the ³²P-labelled region D target. Lanes 1–5 correspond to the positive control reactions for the Sp1-containing oligonucleotide (CON). EMSAs using *in vitro* Sp1 and region A, B, C or D oligonucleotides revealed that regions A, B and C can bind to Sp1. (C) Lanes 1–11 contain radiolabelled region A oligonucleotide incubated with nuclear extracts from 11 lung cancer cell lines and electrophoresed on polyacrylamide gel. The specificity of the region A oligonucleotide–Sp1 protein complex is confirmed by a supershift reaction with polyclonal antibody against Sp1 in the representative A549 cell line (lane 12). (D) Lanes 1–11 show the corresponding positive control EMSA experiments demonstrating specific binding of endogenous Sp1 of the same cell lines to radiolabelled control Sp1 oligonucleotide (CON). The CON–Sp1 protein complex was supershifted in the representative cell line, A549 (lane 12). Unlabel., unlabelled oligonucleotides; ³²P-label, ³²P-labelled oligonucleotides; N/S, nonspecific DNA–protein complexes. (E) ChIP assay with DNA from A549 cells. Immunoprecipitation was performed with 2 μg and 6 μg of antibody against Sp1. PCR primer pairs were specific for the –265 to +61 bp region of the *p73* P1 promoter. Chromatin incubated with antibody against β-actin was used as a negative immunoprecipitation control, whereas input was used as a positive PCR control.

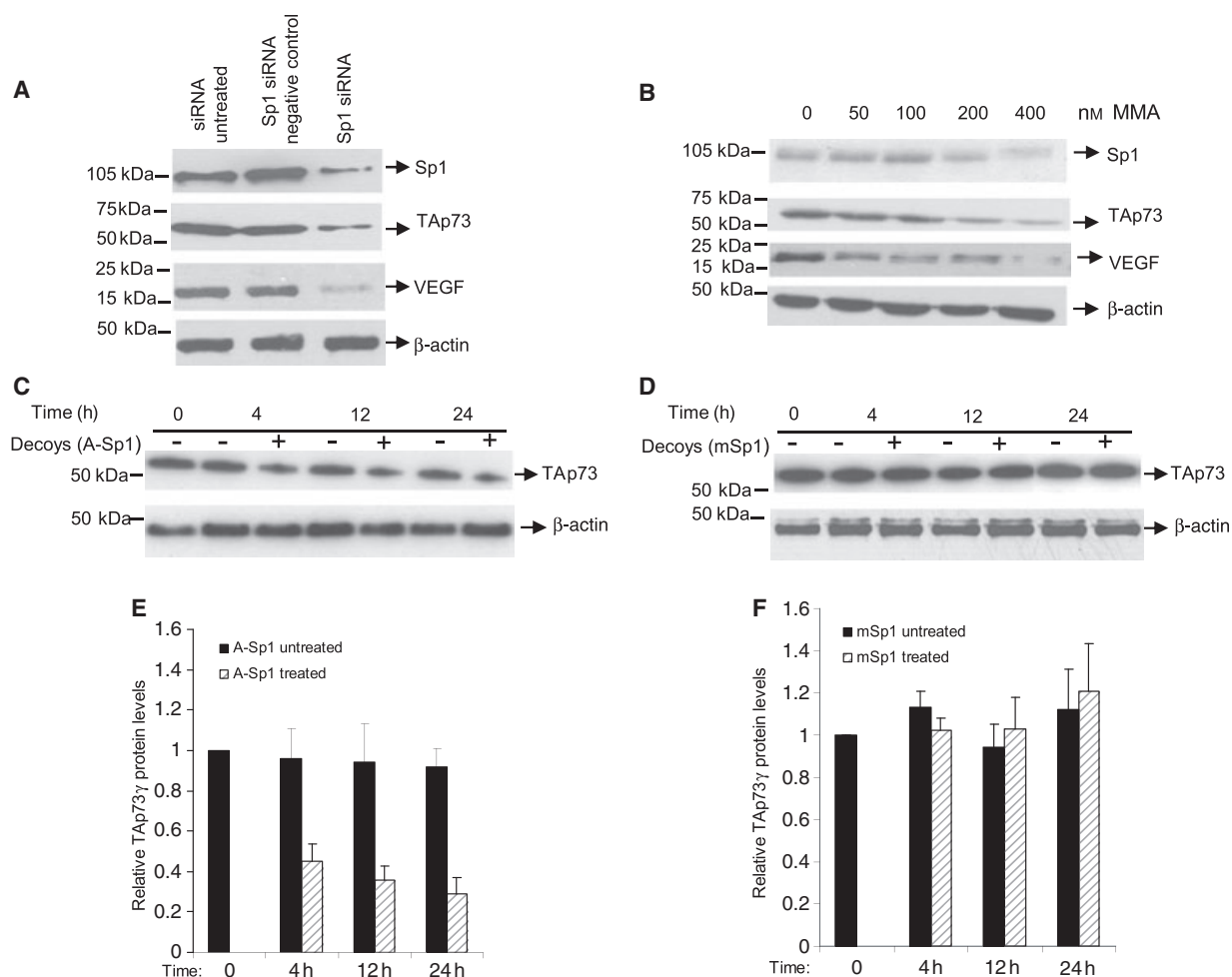


Fig. 3. Sp1 mediates TAp73 overexpression through P1 activation. (A) Transient transfection with Sp1 siRNA results in the reduction of Sp1 and TAp73 levels in A549 cells. VEGF levels were used as a positive control for Sp1 siRNA interference. β -actin levels were used as a loading control. Nonspecific Sp1 siRNA was used as a negative control. (B) A 48-h treatment of A549 cells with increasing concentrations of the Sp1 inhibitor mithramycin A results in reductions in Sp1 and TAp73 levels. VEGF levels were used as a positive control (C) A549 cells were transiently transfected with region A decoy, total protein extracts were prepared from these cells after 4, 12 and 24 h of decoy treatment, and the TAp73 levels were estimated by western blot analysis. (D) Similar transient transfection experiments with mutant Sp1 (mSp1) decoys were performed as a negative control of interference. The experiment was performed in triplicate. (E) TAp73 levels were quantified by IMAGEQUANT and compared with the corresponding levels of the untreated cells. As shown in the graph, TAp73 levels decreased with time upon region A decoy treatment. (F) Quantification of the TAp73 levels and comparison with the corresponding levels of decoy-untreated cells (black bars) demonstrated no change in TAp73 levels of mSp1-treated cells over time (grey bars). The protein amounts in all experiments were normalized to β -actin.

region A of the *p73* P1 promoter is specifically responsible for Sp1-mediated TAp73 expression in lung cancer cells. Mutant (mSp1) double-stranded phosphorothioate oligonucleotides were used as the corresponding negative control. Region A phosphorothioate oligonucleotides were able to reduce TAp73 expression over a 24 h treatment period (Fig. 3C,E), whereas mSp1 phosphorothioate oligonucleotides failed to affect TAp73 expression (Fig. 3D,F). In contrast, region B and C phosphorothioate oligonucleotides had

a negligible effect on TAp73 expression, even after 48 h of treatment (data not shown).

TAp73 γ and Sp1 are co-overexpressed in lung cancer cell lines and non-small cell lung cancers (NSCLCs)

Western blot analysis for TAp73 isoforms using total protein extracts from 15 lung cancer cell lines revealed that the abundantly expressed TAp73 isoform in all

tested cell lines was TAp73 γ , whereas TAp73 α and TAp73 β were not detected. The level of TAp73 γ was low in the normal HNBE cells, slightly increased in the fetal lung fibroblast cell lines (CCL171 and IMR90), and substantially increased in the lung epithelial anaplastic carcinoma cell line (CALU6), the small cell carcinoma cell line (DMS53), the squamous lung cancer cell lines (CRL5802, HTB182, HTB58, HTB59, and SKMES1), the adenocarcinoma cell lines (A549, CALU3, CRL5935, and SKLU1), and the large cell lung cancer cell line (CORL23). The corresponding Sp1 expression pattern was consistent with that of TAp73 γ (Fig. 4A), as well as with the Sp1–DNA binding pattern revealed by the EMSA experiments. Quantification of TAp73 γ and Sp1 levels is shown in Fig. 4B.

To verify our findings *in situ*, we analysed the expression of TAp73 isoforms in a group of 26 lung cancer patients. TAp73 γ was exclusively overexpressed in 68.42% (13/19) of squamous cell lung cancer

samples and in 57.14% (4/7) of adenocarcinoma samples as compared with their corresponding adjacent normal tissues. TAp73 α and TAp73 β were undetectable in the tumour tissues of all patients. Sp1 levels were also examined, and Sp1 was found to be overexpressed in 57.89% (11/19) of squamous cell lung cancer samples and in 42.86% (3/7) of adenocarcinoma samples. Sp1 and TAp73 γ were co-overexpressed in 42.86% (3/7) of adenocarcinoma samples, in 52.63% (10/19) of squamous cell lung cancer samples, and in 50% (13/26) of total lung cancer samples. Figure 4C shows TAp73 and Sp1 levels in representative squamous cell carcinoma and adenocarcinoma samples (Fig. S1). The mean TAp73 γ levels showed an approximately 12-fold increase in tumour tissues with respect to the corresponding normal levels. Similarly, an approximately eight-fold increase in the mean Sp1 levels was observed in the examined tumour samples (Fig. 4D).

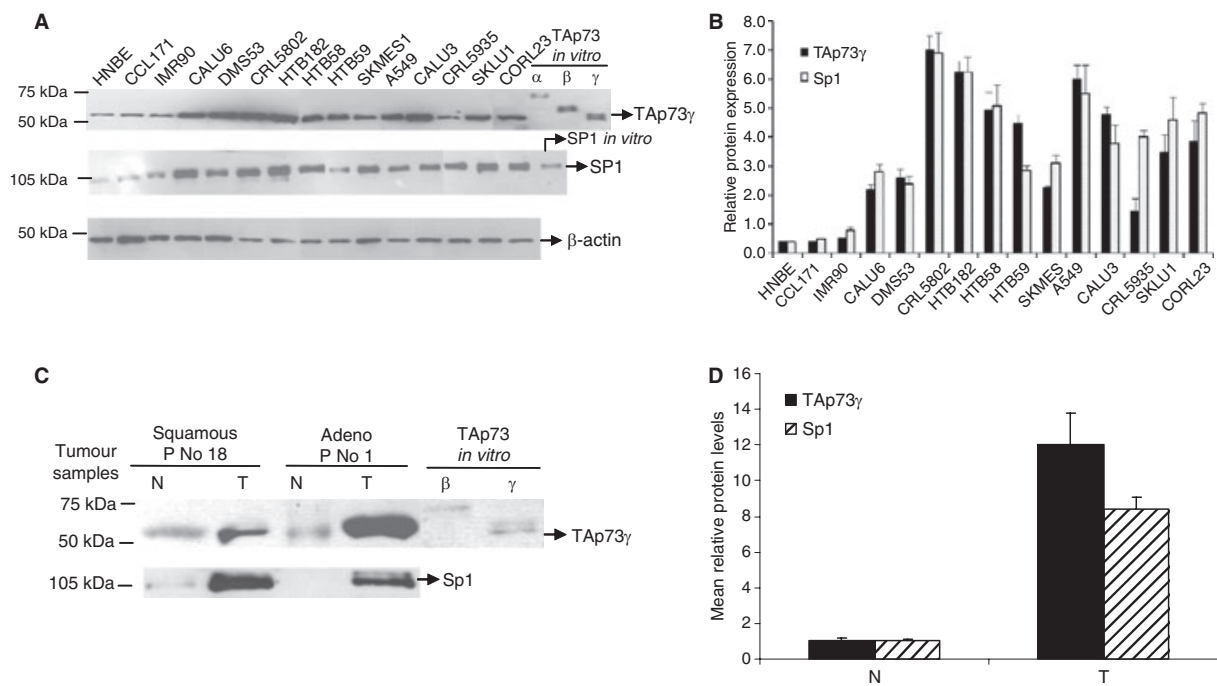


Fig. 4. TAp73 γ and Sp1 are co-overexpressed in lung cancer cell lines and tumour samples. (A) Western blot analysis of total extracts from 15 lung cancer cell lines revealed coelevation of Sp1 and TAp73 γ protein levels in these cells. *In vitro*-translated TAp73 α , TAp73 β and TAp73 γ were used as controls for the identification of TAp73 isoforms, *in vitro* Sp1 was used as a control for the expression of Sp1, and β -actin was used as a loading control. (B) Sp1 and TAp73 γ levels were quantified by IMAGEQUANT and expressed relative to the normal HNBE cell line. (C) Western blot analysis demonstrated a significant increase in both TAp73 γ and Sp1 levels in the representative squamous cell carcinoma (patient No. 1) and adenocarcinoma (patient No. 18) samples as compared with the corresponding normal tissues. *In vitro*-synthesized TAp73 β and TAp73 γ were used as controls, for the identification of the exact TAp73 isoform expressed in these samples. (D) The mean levels of TAp73 γ and Sp1 in 26 NSCLCs samples were compared with the corresponding mean levels in the normal samples. Relative mean TAp73 γ levels showed an almost 12-fold increase (grey bars), and relative mean Sp1 levels showed a greater than eight-fold increase (black bars). The experiment was performed in triplicate.

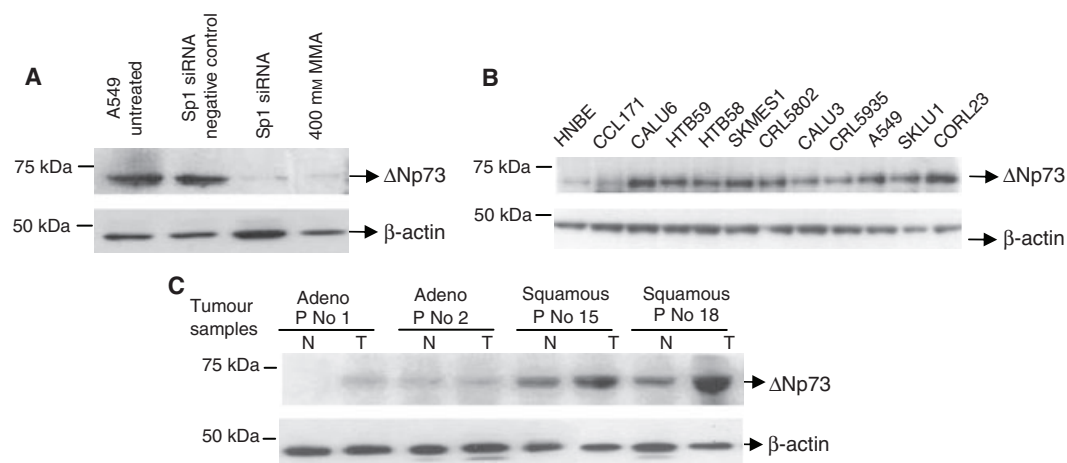


Fig. 5. Δ Np73 levels are affected by Sp1, and Δ Np73 is overexpressed in lung cancer cells. (A) Transient transfection with Sp1 siRNA resulted in the downregulation of both Δ Np73 proteins in A549 cells. Nonspecific Sp1 siRNA was used as a negative control, and β -actin levels were used as a loading control. The Sp1 inhibitor mithramycin A at 400 nM also caused a marked decrease in Δ Np73 levels. (B) Western blot analysis of total extracts from 12 lung cancer cell lines revealed elevated Δ Np73 levels in these cells. (C) Western blot analysis demonstrated an increase in Δ Np73 in representative squamous cell carcinoma and adenocarcinoma samples relative to the adjacent normal tissues.

Δ Np73 levels are affected by Sp1 and enhanced in lung cancer cells

As the outcome of the action of TAp73 is dependent on the presence of the dominant negative Δ Np73 [13], an important issue to be considered is whether Sp1 also affects Δ Np73 levels in the context of lung cancer. It is also important to investigate whether Δ Np73 is co-overexpressed, along with TAp73 γ , in lung cancer. In this respect, we first assessed the effect of Sp1 siRNA treatment of A549 cells on Δ Np73 levels. As shown in Fig. 5A, Δ Np73 levels were markedly reduced in the Sp1 siRNA-treated A549 cells as compared with the untreated cells, in contrast to the Δ Np73 levels of nonsilencing control-treated A549 cells, which remained unchanged. Similarly, Δ Np73 levels showed a marked decrease upon treatment of the A549 cell line with 400 nM mithramycin A (Fig. 5A). A CONTRA analysis was performed in order to examine whether a direct interaction of Sp1 with the *p73* P2 promoter is possible. Interestingly, our analysis showed a conserved region of 124 bp upstream of the Δ N-TP73 TSS. A highly conserved Sp1 candidate site was found at position -17 to -26 . This sequence was flanked by two candidate TATA boxes at positions -3 to -9 and -26 to $+32$. Another Sp1 site was identified at the 5'-end of the conserved promoter region (-115 to -124). The TSS was located at chr1:3597096 (Ensemble v54, May 2009) of the Δ N-TP73 promoter (transcripts ENST00000378280 and ENST00000378285) (data not shown).

Next, Δ Np73 levels were monitored in 12 lung cancer cell lines, as well as in four representative paired samples of the 26-membered panel of lung cancer patients. Figure 5B shows that Δ Np73 protein expression was low in the normal HNBE and fetal lung fibroblast CCL171 cell lines, whereas it was significantly increased in the lung epithelial anaplastic carcinoma cell line (CALU6), in the squamous lung cancer cell lines (HTB59, HTB58, and SKMES1), in the adenocarcinoma cell lines (CALU3, CRL5935, A549, and SKLU1), and in the large cell lung cancer cell line (CORL23). In agreement with the data concerning cell lines, as well as previous data on clinical samples [17,19], Δ Np73 was also overexpressed in the representative tumour samples as compared with their corresponding normal tissues (Fig. 5C). Thus, Δ Np73 levels are not only enhanced in lung cancer cells, along with those of TAp73 γ , but are also affected by Sp1.

Discussion

In the search for transcription factors that affect the use of the *p73* P1 promoter, we identified a region -233 to -204 bp upstream of the TSS of the human *p73* P1 promoter containing conserved, functional Sp1-binding sites. Reduction of the endogenous Sp1 levels or inhibition of Sp1 binding to this region downregulates TAp73 expression in lung cancer cells. Importantly, Sp1 also affected the expression of Δ Np73 in lung cancer cells.

Sp1 has traditionally been considered to be a ubiquitous transcription factor, responsible for the basal/

constitutive activation of a wide range of viral and mammalian genes. However, novel data strongly correlate deregulated Sp1 expression with tumour development, growth and metastasis, as it is significantly overexpressed in pancreatic, breast, thyroid and colon tumours, and it transactivates genes with a substantial role in cancer progression, cell cycle regulation, and antiapoptotic procedures [28]. Our study makes Sp1 the second transcription factor identified, so far, after E2F1 as directly controlling the *p73* P1 promoter. In addition, it indicates an association between Sp1 overexpression and TAp73 overexpression in lung cancer.

Sp families of transcription factors can form complexes with TAp73 isoforms [29]. Recently, it was shown that TAp73 isoforms interfere with Sp1 transcriptional activity, thus acting as repressors of Sp1-mediated activation of genes, such as those encoding enhancer II of the core protein of hepatitis B virus [30], human telomerase reverse transcriptase [31,32], the potent angiogenic factor VEGF [33] and the cell cycle G₂/M checkpoint controller cyclin B [34]. It is proposed that this repression may be achieved via formation of Sp1–TAp73 complexes, resulting in the abrogation of Sp1 binding to corresponding elements on target gene promoters [30,32]. This tumour suppression mechanism parallels that of p53 [35,36]. The above-mentioned negative effect of p73 on Sp1-mediated transcription is specific only to the TAp73 isoforms, and not the ΔNp73 [31] or ΔTAp73 isoforms [30,32], and its efficiency fluctuates depending on the type of TAp73 isoform, with TAp73β being the most effective suppressor and TAp73γ being the least effective [32]. It remains to be elucidated whether TAp73 interference in the Sp1-mediated transactivation of oncogenes also applies to lung cancer, suggesting that the interactions between Sp1 and TAp73 isoforms extend beyond the level of transcriptional control of the *p73* P1 promoter.

In this study, we also demonstrated that the full-length p73 isoform overexpressed in cancer cells both *in vitro* and *in situ* is TAp73γ. TA isoforms were found to be elevated in lung cancer samples in the past, but the exact TAp73 isoform(s) overexpressed were not determined [2,19]. To the best of our knowledge, this is the first time that this particular isoform has been found to be specifically and exclusively overexpressed in cancer cells. Typically, TAp73 isoforms activate genes that mediate either cell cycle arrest or apoptosis, such as *p21*, *bax*, *mdm2*, *gadd45*, *cyclin G*, *IGFBP3*, and *14-3-3*, and trigger cell death [5]. *In vivo* evidence supports the proposed role of TA isoforms as tumour suppressors, as *TAp73*^{-/-} mice are tumour-prone and develop tumours upon treatment with carcinogens,

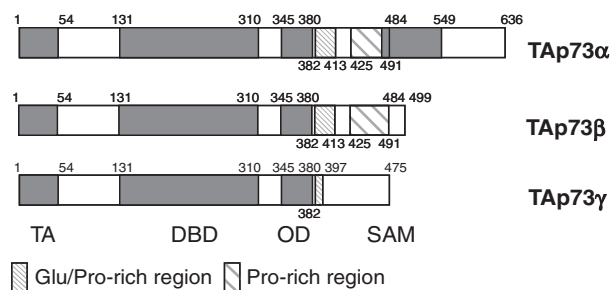


Fig. 6. Comparison between the primary structure of TAp73α, TAp73β, and TAp73γ. Alternative splicing results in the loss of the Pro-rich domain and in the truncation of the Glu/Pro-rich domain, which contains a newly identified N-terminal transactivation domain, OD, oligodimerization domain; SAM, sterile α-motif (based on [40]).

with lung adenocarcinoma being the most frequent cancer diagnosed in these knockout animals [37]. Therefore, our finding raises questions about the presumed role of TAp73γ in cancer, suggesting that its function may diverge from the traditionally proposed apoptotic function of TAp73 isoforms. Indeed, TAp73γ has been almost ineffective in activating the *p21Waf1/Cip1* promoter and inhibiting colony formation of Saos cells, in contrast to the more efficient TAp73α and TAp73β [9]. Similarly, it only poorly transactivates a p53-binding consensus sequence-containing promoter in *p53*-null cell lines [11].

The failure of TAp73γ to exert the same drastic transactivation activities as the more extensively studied TAp73α and TAp73β might be associated with differences in its C-terminal domain (Fig. 6). In this respect, a newly highlighted difference in TAp73γ is that its C-terminal domain is basic and forms weak sequence-specific DNA–protein complexes, whereas the corresponding domains of TAp73α and TAp73β are neutral and form strong DNA–protein complexes, reflecting differential promoter binding and target gene transactivation [38]. Another difference in the C-terminal domain of TAp73γ is that, owing to the excision of exon 11 during alternative splicing, it lacks most of the Glu/Pro-rich domain and the Pro-rich domain, which are located in a region extending from 382 to 491 amino acids and are thought to enhance the transactivation activities of TAp73α and TAp73β [39,40]. In addition, lack of exon 11 in TAp73γ results in the truncation of a second transactivation domain, located within amino acids 381–399, which was recently shown to regulate genes involved in cell cycle progression [41]. The above data imply a transactivational deficit for TAp73γ as compared with other TAp73 isoforms, which could influence its apoptotic function.

In agreement with previous clinical studies [19], we demonstrated that ΔNp73 levels are also elevated in

lung cancer cell lines and in exemplary tumour samples. Furthermore, and for the first time, we showed that $\Delta Np73$ levels are reduced *in vitro* upon inhibition or knockdown of the Sp1 transcription factor. The effect of Sp1 on $\Delta Np73$ expression may be direct, as highly conserved, putative Sp1-binding sites on the *p73* P2 promoter were identified by bioinformatic analysis. This possibly means that Sp1 controls both TAp73 and $\Delta Np73$ expression via regulation of their respective promoters. Alternatively, it is possible that this effect may be indirect, as the overexpression of P2-derived ΔN isoforms could be attributed to the overexpression of TAp73, which is known to activate the P2 promoter [13]. In this case, downregulation of $\Delta Np73$ expression upon Sp1 inhibition or reduction could be caused by subsequent downregulation of TAp73 expression. Furthermore, the possibility that the *p73* P1 promoter is able to produce a fraction of $\Delta Np73$ molecules in lung cancer cannot be excluded, as the P1-derived $\Delta N'$ transcripts, which have been reported to be expressed in lung cancer tumours [19], are also translated to $\Delta Np73$ [14]. In other words, as $\Delta Np73$ proteins are the translational products of both P1-derived $\Delta N'$ and P2-derived ΔN transcripts, the decreased $\Delta Np73$ levels may be attributed, at least in part, to the reduced activity of the *p73* P1 promoter. Finally, it is also possible that the influence of Sp1 on $\Delta Np73$ levels might be the combinational and/or synergistic result of all the above-mentioned processes. Therefore, all of these issues should be addressed in the future.

Taken together, our findings make it clear that there is a link between the expression of Sp1 and *p73* isoforms in lung cancer. Not only does Sp1 have the potential to affect the TA and ΔN protein isoform levels, but its deregulated expression is also implicated in lung cancer. On the other hand, TAp73 overexpression in lung cancer could be linked to oncogene-induced DNA damage, as induction of *p73* is DNA damage response-dependent [42,43]. The mechanisms that underlie the interplay between Sp1 and full-length or N-terminal-truncated *p73* isoform(s) should be further investigated.

Experimental procedures

Bioinformatics

The CONTRA [44] web tool was used for *tp73* P1 promoter analysis, as follows. The direction of transcription of *tp73* was identified, and the most upstream TSS of all *tp73* Ensembl [45] transcripts was selected. One thousand base pairs of the UCSC multiz 28-way 5000 upstream alignment,

homologous to the human *tp73* P1 promoter genomic sequences, were used for the initial analysis. The sequences were compared against the VSSP1_Q2_01 TRANSFAC position weight matrix of Sp1 target motifs with a core cut-off of 0.90 and a similarity matrix cut-off of 0.75. The sequence alignment and its accompanying information regarding potential Sp1 sites were downloaded and viewed by JALVIEW [46]. Through BIOEDIT [47], the alignments were imported to Microsoft Word 2003 (<http://www.microsoft.com/>) for further manipulation.

Cell lines and culture conditions

The following human lung carcinoma cell lines used in this study were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA): HNBE, CCL171, IMR90, CALU6, DMS53, CRL5802, HTB182, HTB58, HTB59, SKMES1, A549, CALU3, CRL5935, SKLU1 and CORL23. All cell lines were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). To evaluate the effects of mithramycin A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 60–70% confluent cells were incubated with 50–400 nM mithramycin A in 60-mm cell culture dishes for 48 h.

Patient characteristics and tumour specimens

Tumour specimens and their corresponding normal tissues were derived from 26 lung cancer patients, 18 males and eight females. Of the 26 patients, 19 were diagnosed with squamous cell carcinoma and seven with adenocarcinoma. The patients' mean age was 68.6 years. All of the above-mentioned patients underwent surgical tumour excision at the Cardiothoracic Centre of Broadgreen, Liverpool, UK. The study protocol was approved by the Liverpool Ethics Committee and all of the patients provided written, informed consent.

Preparation of total cell lysates and nuclear extracts

For the preparation of total cell lysates, cells were lysed in lysis buffer (20 mmol·L⁻¹ Tris, pH 7.6, 0.5% Triton X-100, 250 mmol·L⁻¹ NaCl, 3 mmol·L⁻¹ EDTA, 3 mmol·L⁻¹ EGTA, 10 g·mL⁻¹ Pefabloc, 2 mmol·L⁻¹ sodium orthovanadate, 10 g·mL⁻¹ aprotinin, 10 g·mL⁻¹ leupeptin, and 1 mmol·L⁻¹ dithiothreitol). Lysates were incubated on ice for 30 min and then centrifuged at 8000 × *g* at 4 °C for 10 min. The supernatant was aliquoted and stored at -70 °C.

For the preparation of nuclear extracts, cells were pelleted and homogenized in ice-cold hypotonic buffer (25 mM Tris, pH 7.5, 5 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride) with a Teflon-

glass homogenizer. The nuclear fraction was pelleted, washed with isotonic buffer (25 mM Tris, pH 7.5, 5 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 0.2 mM sucrose) and lysed with extraction buffer (25 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.5 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride). Nuclear debris was removed by centrifugation at 55 000 *g* for 1 h at 4 °C. Estimations of the protein concentrations for both total cell lysates and nuclear extracts were performed using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Protein extraction from tumour samples

Frozen tissue samples mixed with ice-cold RIPA buffer [1 × NaCl/P_i, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (v/v) SDS] (Sigma-Aldrich) containing protease inhibitors (Roche Applied Science, Hague Road, IN, USA) at a tissue/buffer volume ratio of 1 : 1. The mixture was incubated on ice for 1 h and homogenized with frequent vortexing. The homogenate was centrifuged at 13 000 *g* for 15 min at 4 °C, and the resulting supernatant was collected in a clean Eppendorf tube.

In vitro proteins

In vitro Sp1 was purchased from Promega (Madison, WI, USA). TAp73 α , TAp73 β and TAp73 γ were synthesized from the corresponding expression plasmids [9], using the TnT *in vitro* translation system (Promega).

EMSAs

Annealed oligonucleotides representing regions A, B, C and D of the human *p73* P1 promoter were used (Invitrogen). A consensus Sp1-binding site and a mutant Sp1-binding site were used as positive and negative control, respectively (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Oligonucleotide sequences are summarized in Table 1. Annealed

oligonucleotides were end-labelled with [³²P]ATP[γ P], using T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), following the manufacturer's instructions. Radiolabelled products were purified on Microspin G-25 columns (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), according to the manufacturer's instructions. The reaction mixture was prepared by mixing 2000 c.p.m. of γ -³²P-labelled oligonucleotide with 20 μ g of nuclear cell protein in binding buffer (50 mM Hepes, pH 8.0, 500 mM NaCl, 0.5 M phenylmethanesulfonyl fluoride, 0.5 mg·mL⁻¹ BSA, 20% glycerol, 1 mM EDTA) plus 1 mM dithiothreitol and 150 μ g·mL⁻¹ poly(dI-dC) (Sigma-Aldrich), and left at room temperature for 30 min. The reaction mixtures were subsequently electrophoresed on a 6% polyacrylamide gel at 150 V for 90 min, and the gel was dried and visualized by autoradiography. For the supershift assay, the reaction mixture was incubated with antibody against human Sp1 (PEP2) (Santa Cruz Biotechnology) for 30 min at 4 °C.

ChIP assay

Cells were crosslinked at a final concentration of 1% formaldehyde for 10 min at 37 °C. Crosslinked cells were washed twice in ice-cold NaCl/P_i and collected by centrifugation for 5 min at 300 × *g*. The pellet was resuspended in 600 μ L of buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 85 mM KCl, 0.5% NP40) and incubated for 10 min on ice. The solution was centrifuged for 5 min at 1700 × *g*, and the pellet was resuspended in 600 μ L of lysis buffer (50 mM Hepes/KOH, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing protease inhibitors. Lysate was sonicated to shear DNA to an average fragment size of 500–1000 bp, and the debris was pelleted by centrifugation for 5 min at 11 000 × *g* and 4 °C. The soluble chromatin material was further treated with salmon sperm DNA/protein A agarose 50% slurry (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA). After overnight incubation with antibody against Sp1 (sc-59x) (Santa Cruz Biotechnology), the immune complexes were

Table 1. Oligonucleotides used in EMSA experiments. F, forward; R, reverse.

Name	Position (relative to the TSS)	Direction	Oligonucleotides (5' to 3')
Region A	-233 to -204 bp	F	aaaggcggcggaaggaggcgggagcagac
		R	gctctgccccgctccttcccgcgccttt
Region B	-61 to -33 bp	F	cccgcggcgctcccctcccgcgcca
		R	tggcgcggggagggagggcgcggg
Region C	-20 to -1 bp	F	aggggcgggcagcccgcct
		R	agggcgggctgcccggcccct
Region D	-4 to +20 bp	F	ccctgctcccgcgcgcgaacc
		R	gggtgcgcgggcggggagggcaggg
Cold control oligonucleotide	None	F	attcgatcggggcgggcgag
		R	ctcgccccccccgatcgaat
mSp1	None	F	attcgatcgggttcggggcgag
		R	ctcgccccgaaccgatcgaat

treated with 60 μ L of salmon sperm DNA/protein A agarose 50% slurry (Upstate Biotechnology) for 2 h at 4 °C. The beads were then washed sequentially for 5 min at room temperature in 1 mL of lysis buffer without SDS, in 1 mL of lysis buffer plus 500 mM NaCl, in 1 mL of buffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0, 250 mM LiCl, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate), and finally twice in Tris/EDTA. Immune complexes were eluted with 200 μ L of elution buffer (1% SDS, 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA) and incubated for 5 min at 65 °C. The pooled elutes were incubated with RNase for 1 h and with proteinase K for 4 h at 65 °C to reverse crosslinks. DNA was extracted by phenol/chloroform treatment and precipitated with 10 μ g of glycogen and ethanol overnight at – 20 °C. The pelleted DNA was resuspended in 10 μ L of nuclease free water and amplified by PCR. The PCR primers used were as follows: forward, 5'-TCG CCG GGC TCT GCA GGA G-3'; and reverse, 5'-GTT TCG CTG CGT CCC CTT CGC-3'.

siRNA transient transfection

Sp1 Validated Stealth RNAi DuoPak and its medium-GC content siRNA control (Invitrogen) were used for knock-down of p73 and VEGF. A549 cells were harvested in six-well plates and transfected with Lipofectamine RNAiMAX according to the manufacturer's instructions. Lipofectamine-containing medium was replaced after 6 h. Cells were collected following a 48-h incubation at 37 °C, and total proteins were isolated for western blot analysis.

Double-stranded oligonucleotide functional analysis

We used phosphorothioate oligonucleotides for regions A, B and C (Invitrogen) to transiently transfect the A549 cell line, as previously described [48]. Cells were harvested in six-well plates and transfected with 150 nM Sp1-decoy oligonucleotides, using Fugene transfection reagent (Roche Applied Science), according to the manufacturer's instructions. After 4 h, the medium was replaced with fresh medium, without Fugene and oligonucleotides. The cells were collected 4, 12 and 24 h after transfection, and total proteins extracted from these cells were subjected to western blot analysis.

Western blot analysis

Protein extracts (10 μ g) were electrophoresed on an 8% SDS/polyacrylamide gel under reducing conditions, transferred to nitrocellulose membranes, and blocked for 2 h at room temperature. The blots were subsequently incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: rabbit immunoglobulin against human Sp1 (PEP2) (Santa Cruz Biotechnology), mouse immunoglobulin against human β -actin (Abcam, Cambridge, UK), mouse immunoglobulin

against human full length p73 (which has been shown to recognize TAp73 α , TAp73 β , and TAp73 γ [49]), rabbit immunoglobulin against human VEGF (sc-507) (Santa Cruz Biotechnology), and mouse immunoglobulin against human Δ Np73 (Abcam), in 1 : 600, 1 : 1000, 1 : 4000, 1 : 500 and 1 : 500 dilutions, respectively. The blots were incubated with the appropriate secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) in corresponding dilutions of 1 : 8000, 1 : 5000, 1 : 10 000, 1 : 3000 and 1 : 10 000 for 2 h at room temperature. Detection of protein levels was carried out using an enhanced chemiluminescence system (Pierce, Rockford, IL, USA). The protein amounts were normalized to β -actin and quantified using IMAGEQUANT software (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

Acknowledgements

We thank G. Melino for kindly providing us with the TAp73 constructs. S. Logotheti and V. Zoumpourlis were supported by 05NON-EU-3. A. Daskalos, T. Liloglou and J. K. Field were supported by the Roy Castle Lung Cancer Foundation, UK. B. Vojtesek was supported by grants IGA MZ CR NS/9812-4 and MZOMOU2005. V Gorgoulis is financially supported by European commition grants FP-7 GENICA and FP-7 INLACARE.

References

- 1 Minna JD, Roth JA & Gazdar AF (2002) Focus on lung cancer. *Cancer Cell* **1**, 49–52.
- 2 Tokuchi Y, Hashimoto T, Kobayashi Y, Hayashi M, Nishida K, Hayashi S, Imai K, Nakachi K, Ishikawa Y, Nakagawa K *et al.* (1999) The expression of p73 is increased in lung cancer, independent of p53 alteration. *Br J Cancer* **80**, 1623–1629.
- 3 Melino G, Lu X, Gasco M, Crook T & Knight RA (2003) Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem Sci* **28**, 663–670.
- 4 De Laurenzi V & Melino G (2000) Evolution of functions within the p53/p63/p73 family. *Ann NY Acad Sci* **926**, 90–100.
- 5 Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, Knight RA, Green DR, Thompson C & Vousden KH (2004) p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* **279**, 8076–8083.
- 6 Nomoto S, Haruki N, Kondo M, Konishi H, Takahashi T, Takahashi T & Takahashi T (1998) Search for mutations and examination of allelic expression imbalance of the p73 gene at 1p36.33 in human lung cancers. *Cancer Res* **58**, 1380–1383.

- 7 Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A *et al.* (2000) p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* **404**, 99–103.
- 8 Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalou P, Lelias JM, Dumont X *et al.* (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* **90**, 809–819.
- 9 De Laurenzi V, Costanzo A, Barcaroli D, Terrinoni A, Falco M, Annicchiarico-Petruzzelli M, Levrero M & Melino G (1998) Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J Exp Med* **188**, 1763–1768.
- 10 De Laurenzi VD, Catani MV, Terrinoni A, Corazzari M, Melino G, Costanzo A, Levrero M & Knight RA (1999) Additional complexity in p73: induction by mitogens in lymphoid cells and identification of two new splicing variants epsilon and zeta. *Cell Death Differ* **6**, 389–390.
- 11 Ueda Y, Hijikata M, Takagi S, Chiba T & Shimotohno K (1999) New p73 variants with altered C-terminal structures have varied transcriptional activities. *Oncogene* **18**, 4993–4998.
- 12 Ishimoto O, Kawahara C, Enjo K, Obinata M, Nukiwa T & Ikawa S (2002) Possible oncogenic potential of DeltaNp73: a newly identified isoform of human p73. *Cancer Res* **62**, 636–641.
- 13 Grob TJ, Novak U, Maisse C, Barcaroli D, Lüthi AU, Pirnia F, Hügli B, Graber HU, De Laurenzi V, Fey MF *et al.* (2001) Human ΔNp73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ* **8**, 1213–1223.
- 14 Stiewe T, Tuve S, Peter M, Tannapfel A, Elmaagacli AH & Putzer BM (2004) Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res* **10**, 626–633.
- 15 Marabese M, Vikhanskaya F & Broggin M (2007) p73: a chiaroscuro gene in cancer. *Eur J Cancer* **43**, 1361–1372.
- 16 Tuve S, Wagner SN, Schitteck B & Putzer BM (2004) Alterations of DeltaTA-p73 splice transcripts during melanoma development and progression. *Int J Cancer* **108**, 162–166.
- 17 Uramoto H, Sugio K, Oyama T, Nakata S, Ono K, Morita M, Funa K & Yasumoto K (2004) Expression of deltaNp73 predicts poor prognosis in lung cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 6905–6911.
- 18 Mai M, Yokomizo A, Qian C, Yang P, Tindall DJ, Smith DI & Liu W (1998) Activation of p73 silent allele in lung cancer. *Cancer Res* **58**, 2347–2349.
- 19 Di Vinci A, Sessa F, Casciano I, Banelli B, Franzi F, Brigati C, Allemanni G, Russo P, Dominioni L & Romani M (2009) Different intracellular compartmentalization of TA and ΔNp73 in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* **34**, 449–456.
- 20 Nyman U, Sobczak-Pluta A, Vlachos P, Perlmann T, Zhivotovsky B & Joseph B (2005) Full-length p73alpha represses drug-induced apoptosis in small cell lung carcinoma cells. *J Biol Chem* **280**, 34159–34169.
- 21 Muller M, Schilling T, Sayan AE, Kairat A, Lorenz K, Schulze-Bergkamen H, Oren M, Koch A, Tannapfel A, Stremmel W *et al.* (2005) TAp73/DNp73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ* **12**, 1564–1577.
- 22 Seelan RS, Irwin M, van der Stoop P, Qian C, Kaelin WG & Liu W (2002) The human p73 promoter: characterization and identification of functional E2F binding sites. *Neoplasia* **4**, 195–203.
- 23 Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, Smith DI, Liu W, Flores ER, Tsai KY, Jacks T, Vousden KH *et al.* (2000) Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* **407**, 645–648.
- 24 Stiewe T & Pützer BM (2001) Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat Genet* **26**, 464–469.
- 25 Ding Y, Inoue T, Kamiyama J, Tamura Y, Ohtani-Fujita N, Igata E & Sakai T (1999) Molecular cloning and functional characterization of the upstream promoter region of the human p73 gene. *DNA Res* **6**, 347–351.
- 26 Shi Q, Le X, Abbruzzese JL, Peng Z, Qian CN, Tang H, Xiong Q, Wang B, Li XC & Xie K (2001) Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* **61**, 4143–4154.
- 27 Jia Z, Zhang J, Wei D, Wang L, Yuan P, Le X, Li Q, Yao J & Xie K (2007) Molecular basis of the synergistic antioncogenic activity of bevacizumab and mithramycin A. *Cancer Res* **67**, 4878–4885.
- 28 Safe S & Abdelrahim M (2005) Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer* **41**, 2438–2448.
- 29 Koutsodontis G, Vasilaki E, Chou WC, Papakosta P & Kardassis D (2005) Physical and functional interactions between members of the tumour suppressor p53 and the Sp families of transcription factors: importance for the regulation of genes involved in cell-cycle arrest and apoptosis. *Biochem J* **389**, 443–455.
- 30 Buhlmann S, Racek T, Schwarz A, Schaefer S & Pützer BM (2008) Molecular mechanism of p73-mediated regulation of hepatitis B virus core promoter/enhancer II: implications for hepatocarcinogenesis. *J Mol Biol* **378**, 20–30.
- 31 Beitzinger M, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R & Stiewe T (2006) Regulation of telomerase activity by

- the p53 family member p73. *Oncogene* **25**, 813–826.
- 32 Racek T, Mise N, Li Z, Stoll A & Pützer BM (2005) C-terminal p73 isoforms repress transcriptional activity of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter. *J Biol Chem* **280**, 40402–40405.
 - 33 Salimath B, Marmé D & Finkenzeller G (2000) Expression of the vascular endothelial growth factor gene is inhibited by p73. *Oncogene* **19**, 3470–3476.
 - 34 Innocente SA & Lee JM (2005) p73 is a p53-independent, Sp1-dependent repressor of cyclin B1 transcription. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 713–718.
 - 35 Kanaya T, Kyo S, Hamada K, Takakura M, Kitagawa Y, Harada H & Inoue M (2000) Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res* **6**, 1239–1247.
 - 36 Xu D, Wang Q, Gruber A, Björkholm M, Chen Z, Zaid A, Selivanova G, Peterson C, Wiman KG & PISA P (2000) Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene* **19**, 5123–5133.
 - 37 Tomasini R, Tsuchihara K, Wilhelm M, Fujitani M, Rufini A, Cheung CC, Khan F, Itie-Youten A, Wakeham A, Tsao MS *et al.* (2008) TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev* **22**, 2677–2691.
 - 38 Sauer M, Bretz AC, Beinoraviciute-Kellner R, Beitzinger M, Burek C, Rosenwald A, Harms GS & Stiewe T (2008) C-terminal diversity within the p53 family members account for differences in DNA binding and transcriptional activity. *Nucleic Acids Res* **36**, 1900–1912.
 - 39 Takada N, Ozaki T, Ichimiya S, Todo S & Nakagawara A (1999) Identification of a transactivation activity in the COOH-terminal region of p73 which is impaired in the naturally occurring mutants found in human neuroblastomas. *Cancer Res* **59**, 2810–2814.
 - 40 Ozaki T, Naka M, Takada N, Tada M, Sakiyama S & Nakagawara A (1999) Deletion of the COOH-terminal region of p73 α enhances both its transactivation function and DNA-binding activity but inhibits induction of apoptosis in mammalian cells. *Cancer Res* **59**, 5902–5907.
 - 41 Nyman U, Vlachos P, Cascante A, Hermanson O, Zhivotovsky B & Joseph B (2009) Protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell cycle-inhibitory function of the p73 carboxy terminus transactivation domain. *Mol Cell Biol* **29**, 1814–1825.
 - 42 Lontos M, Niforou K, Velimezi G, Vougas K, Evangelou K, Apostolopoulou K, Vrtel R, Damalas A, Kontovazenitis P, Kotsinas A *et al.* (2009) Modulation of the E2F1-driven cancer cell fate by the DNA damage response machinery and potential novel E2F1 targets in osteosarcomas. *Am J Pathol* **175**, 376–391.
 - 43 Halazonetis TD, Gorgoulis VG & Bartek J (2008) An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* **319**, 1352–1355.
 - 44 Hooghe B, Hulpiau P, van Roy F & De Bleser P (2008) ConTra: a promoter alignment analysis tool for identification of transcription factor binding sites across species. *Nucleic Acids Res* **36**, W128–W132.
 - 45 Hubbard TJ, Aken BL, Ayling S, Ballester B, Beal K, Bragin E, Brent S, Chen Y, Clapham P, Clarke L *et al.* (2009) Ensembl 2009. *Nucleic Acids Res* **37**, D690–D697.
 - 46 Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M & Barton GJ (2009) Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189–1191.
 - 47 Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95–98.
 - 48 Park YG, Nesterova M, Agrawal S & Cho-Chung YS (1999) Dual blockade of cyclic AMP response element-(CRE) and AP-1-directed transcription by CRE-transcription factor decoy oligonucleotide. *J Biol Chem* **274**, 1573–1580.
 - 49 Sayan AE, Paradisi A, Vojtesek B, Knight RA, Melino G & Candi E (2005) New antibodies recognizing p73: comparison with commercial antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* **330**, 186–193.

Supporting information

The following supplementary material is available:

Fig. S1. (A) TAp73 and Sp1 protein expression in 26 lung cancer patients. N, normal tissue; T, tumour tissue; PNo, patient number. (B) TAp73 γ /Sp1 ratio in lung cancer patient samples.

This supplementary material can be found in the online version of this article.

Please note: As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Cancer Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/canlet

Global DNA hypomethylation-induced Δ Np73 transcriptional activation in non-small cell lung cancer

Alexandros Daskalos^a, Stella Logotheti^b, Soultana Markopoulou^a, George Xinarianos^a, John R. Gosney^c, Anastasia N. Kastania^d, Vassilis Zoumpourlis^b, John K. Field^a, Triantafillos Liloglou^{a,*}

^a Roy Castle Lung Cancer Research Programme, The University of Liverpool, Department of Clinical and Molecular Cancer Medicine, 200 London Road, Liverpool L3 9TA, United Kingdom

^b National Hellenic Research Foundation, 48 Vassileos Constantinou Ave., 11635 Athens, Greece

^c The University of Liverpool, School of Cancer Studies, Division of Pathology, Duncan Building, Liverpool, United Kingdom

^d Bioinformatics and Medical Informatics Team, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, 4 Soranou Ephessiou, 115 27 Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 July 2010

Received in revised form 2 September 2010

Accepted 6 September 2010

Available online xxx

Keywords:

Lung cancer

p73

DNA methylation

Δ Np73

TAp73

ABSTRACT

p73 possesses an extrinsic P1 promoter and an intrinsic P2 promoter controlling the expression of the pro-apoptotic TAp73 isoforms and the anti-apoptotic Δ Np73 isoforms respectively. In this study, we investigated the DNA methylation status of both promoters as a means of epigenetic transcriptional control of their corresponding isoforms in 102 primary non-small cell lung carcinomas (NSCLCs). We demonstrated that while P1 hypermethylation-associated reduction of TAp73 mRNA levels is relatively infrequent, the P2 hypomethylation-associated over-expression of Δ Np73 mRNA is a frequent event, particularly among squamous cell carcinomas. P2 hypomethylation strongly correlated with LINE-1 element hypomethylation, indicating that Δ Np73 over-expression may be a passive consequence of global DNA hypomethylation.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

p73 is a p53-family member which, despite its high homology with p53, is not a typical Knudson-type gene. It encodes a number of protein isoforms with a suggested dual role in cancer. In detail, the full-length TAp73 isoforms induce cell cycle arrest and apoptosis by transactivating a number of p53 target genes, whereas the N-terminal truncated Δ Np73 isoforms hamper apoptosis either by directly inhibiting TAp73 and p53 or through indirect inhibition of p53-mediated transcription, therefore exerting oncogenic activities in the cells [1–4]. The synthesis of isoforms with opposing properties by only one gene is mainly achieved by the alternative usage of two different promoters in p73 gene, the extrinsic promoter (P1) located upstream to exon 1, which gives rise to the transactivation domain

(TA)-containing (TAp73) isoforms and the intrinsic promoter (P2) located in intron 3, which controls the transcription of TA-deprived (Δ Np73) isoforms. Isoforms lacking the TA domain (p73 Δ ex2, p73 Δ ex2/3 and Δ N'-p73) can also be produced through alternative splicing of transcripts driven by the extrinsic promoter [5,6].

DNA methylation is a dynamic, reversible mode of epigenetic regulation which can modify functionality of numerous genes within the cell. Alterations of the pattern of DNA methylation are common in cancer cells. On the one hand, hypermethylation of CpG islands within certain gene promoter regions inhibits transcription, thus contributing in the silencing of crucial tumour suppressor genes, such as p16^{INK4a}, Rb, E-cadherin and BRCA1 [7]. On the other hand, hypomethylation of specific loci reactivates expression of genes with an oncogenic potential. For example, hypomethylation-linked activation has been reported in some cancers for genes such as H-Ras, c-myc [7], PAX2 [8], Cros [9] and NGALR [10]. DNA demethylation occurs through

* Corresponding author. Tel.: +44 0151 7948958.

E-mail address: liloglout@roycastle.liv.ac.uk (T. Liloglou).

two distinct processes, referred as passive demethylation, which results from improper preservation of methylation marks during DNA replication due to the lack of methylation maintenance activities; and active demethylation, which involves a demethylase that erases methylation marks from DNA in a replication-independent manner [11]. Global hypomethylation of the genome occurs simultaneously with hypermethylation of CpG islands in cancer cells, involving genes implicated in cell cycle regulation, DNA repair and apoptosis [7]. These changes are usually tumour-type specific [12].

Methylation of *p73* has been reported in certain types of cancer, such as leukemias/lymphomas and neuroblastomas. Specifically, *p73* hypermethylation poses as a common event in acute lymphoblastic leukemia, responsible for inhibition of transcription of the corresponding gene product [13], whereas it is very rare and has no effect on pathogenesis in acute myeloblastic leukemia [14]. In non-Hodgkins lymphomas, P1 *p73* promoter has been found methylated in B-cell lymphomas, accompanied by absence or low levels of TAp73, but unmethylated in T-cell lymphomas [15]. The highest *p73* methylation frequency up to 94% has been reported in natural killer cell lymphomas, while *p73* transcript was not detectable in these malignancies [16]. Other studies indicate that extrinsic and intrinsic *p73* promoters are differentially affected by methylation. In detail, P1 promoter is unmethylated independently from TAp73 transcription in neuroblastomas [17]. In contrast, P2 promoter is partially methylated in Δ Np73-expressing primary neuroblastomas and fully methylated in Δ Np73-non-expressing primary neuroblastomas, suggesting that expression of Δ Np73, but not TAp73, is at least in part, controlled by epigenetic events [18].

Recently, *p73* promoter methylation was investigated in the context of lung cancer. Using qualitative methods, Di Vinci et al. showed that both Δ Np73 and TAp73 proteins are overexpressed in NSCLCs and that P1 promoter was unmethylated in most cases examined (39/41), whereas P2 was partially unmethylated in 24/41 cases examined. Both TAp73 and Δ Np73 protein levels were variably elevated in these tumours in comparison with normal adjacent tissues, however no correlation was established between P1 and P2 methylation status and the expression of the corresponding protein products in tumours [19]. Following this work and expanding the analysis to a larger number of patients, we used sensitive quantitative assays to thoroughly determine the methylation levels of P1 and P2 promoters and to further investigate their correlation with TAp73 and Δ Np73 mRNA levels, as well as with LINE-1 promoter methylation, the surrogate marker of global hypomethylation [20,21], in lung cancer. We also evaluated the association of P1 and P2 promoter methylation with their corresponding products in the context of distinct histological NSCLC types, mainly adenocarcinomas and squamous cell carcinomas.

2. Materials and methods

2.1. Patients and tissues

Frozen tumour samples for 102 NSCLC patients were obtained from Liverpool Heart and Chest Hospital. Corre-

sponding normal lung tissues were available for 38 of these patients. The patients comprised 56 males and 46 females and ranged in age between 49 and 81 years (mean, 64 years). Fifty-three of the NSCLCs were adenocarcinomas, whereas the remaining 49 were squamous cell carcinomas. Tissues were dissected by the pathologist within 30 min from surgical resection and were immediately stored to a -80°C freezer. The study protocol was approved by the Liverpool Ethics Committee and all patients provided written, informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

2.2. DNA extraction and methylation analysis

For the DNA extraction 20 μm -thick sections were cut from frozen tissue. Tumour sections were stained with H&E and microscopically reviewed to ensure a $>80\%$ tumour cell content. Genomic DNA was extracted from the samples using the DNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Quality and quantity of the DNA was assessed by spectrophotometry at 260/280 nm. For the methylation analysis, CpG rich regions of both *p73* gene promoters were identified by CpG island searcher (<http://cpgislands.usc.edu/>). For P1 a target region upstream to exon 1 containing eight CpGs was chosen, whereas for P2 a target region containing six CpGs upstream to the alternative 3' exon was chosen. The following primers were designed for pyrosequencing methylation analysis of P1 using the Assay Design Software (Biotage, Uppsala, Sweden): FWD: 5'-GGTATATTTTTGTTTTTGGA-3', REV (biotinylated): 5'-ACCCATCTTCTAACACC-3', SEQ: 5'-GTTTTTGGATTTAAG-3'. For the P2 promoter, the primers were: FWD: 5'-AGGAGTTTTGGTGGTTAAT-TAT-3', REV (biotinylated): 5'-CCCACCCCTTATCTCTC-3', SEQ: 5'-GGTGGTTAATTATGG-3'. One μg of genomic DNA was treated with sodium bisulfite, using the EZ DNA methylation Kit™ (ZymoResearch, CA, USA). Fifty nanograms of bisulfite-treated genomic DNA, 5 μM of each primer and GoTaq mix (Promega, Madison, WI) were used in a 25 μl -PCR reaction. The thermal profile was: 95 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min, [-94°C for 30 s, 51 $^{\circ}\text{C}$ for 45 s at, 72 $^{\circ}\text{C}$ for 45 s] 40 cycles, 72 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min. Pyrosequencing was performed as previously described [22]. The methylation index (Mti) for each promoter was calculated as the average methylation% of the examined CpGs.

2.3. RNA extraction, cDNA synthesis and mRNA expression analysis by qPCR

RNA extraction was performed using the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol and the quality and the quantity of the RNA was assessed by capillary electrophoresis on an Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, CA, USA). For cDNA synthesis, the Quantitect kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used. Primers/probe designed to specifically amplify the TAp73 transcript were: FWD: 5' GGTTATATTTTTGTTTTTGGGA 3', REV: 5' Biotin-ACCCATCTTCTAACACC 3', sequencing: 5' GTTTTTGGATTTAAG 3'. Primers/probe for Δ Np73 transcript were: FWD: 5'-GCCCGCATGTCC-CAG-3', REV: 5'-TTGAAGTGGCCGTGGC-3' and Probe:

5'-FAM-TCACCGACGTACAGCATGGTAGGCG-TAMRA-3'. Each amplification reaction was performed using 1 μ l of the reverse transcription reaction, 900 nM of each primer, 250 nM probe, 1 μ l of the endogenous control ACTB-VIC (Applied Biosystems, CA, USA) and Taqman expression master mix (Applied Biosystems, CA, USA) under universal conditions (50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, [94 °C for 30 s, 60 °C for 45 s] 50 cycles, on a 7500 real time PCR system (Applied Biosystems, CA, USA). Relative quantification (RQ) values were calculated using the expression of A549 cells as a calibrator. All qPCR experiments were performed in triplicate from a single RNA preparation from each tumour specimen.

2.4. Cell lines and in vitro experiments

CR15802 and A549 lung cancer cell lines, obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA), were grown in DMEM: F12 with L-glutamine and 10% FBS. Cell lines were treated with 100 nM 5-aza-2'-deoxycytidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) alone or combined with 100 nM Trichostatin-A (TSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 24 h as previously described [22] and Δ Np73 mRNA expression was measured by qPCR. All qPCR experiments were performed in triplicate from two biological replicates for each condition (overall six measurements taken).

2.5. Statistical analysis

The SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc.) was used for statistical analysis. Non-parametric tests were selected, since Kolmogorov Smirnov test revealed that the distribution of each study parameter was not normal both in squamous cell cancer patients and in adenocarcinoma patients. The Mann-Whitney test was employed to examine the differences in

mRNA expression levels of Tap73 RQ and the Δ Np73 RQ between the sample groups with hypermethylated and hypomethylated promoters, as well as between sample groups with different histologies. The P2 Mtl was correlated with LINE-1 promoter Mtl also using the Spearman correlation test. The statistical significance was defined by $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Methylation status of P1 and P2 p73 promoters in NSCLCs

We used pyrosequencing to quantitatively determine the methylation levels of P1 and P2 p73 promoters in NSCLC tissues, as well as in the available adjacent normal tissues. Representative pyrograms of the pyrosequencing assays for both promoters are given in Fig. 1 while detailed methylation index values for all examined specimens are provided in Table 1. Hypermethylation in tumours was designated at the 10% level as has been previously used [22]. Similarly, we set a threshold of 10% reduction to classify tumours as hypomethylated [22]. Very low methylation levels of P1 promoter were observed in normal adjacent tissues. Only seven tumour samples (6.8%) exceeded the 10% hypermethylation threshold (Table 1). The P2 promoter was heavily methylated in normal tissues (mean Mtl: $91 \pm 0.2\%$) while a variable degree of demethylation was observed in the tumour tissues. Fifty-seven (55.9%) of the examined tumours demonstrated P2 hypomethylation (Table 1). Simultaneous P1 hypermethylation and P2 hypomethylation was observed in 5/102 (4.91%) tumour samples, whereas 2/102 (0.02%) tumour samples presented only P1 hypermethylation and 50/102 (49.1%) tumour samples presented only P2 hypomethylation.

We have also assessed global DNA methylation by examining the methylation levels of the LINE-1 retrotransposable element. A variable degree of LINE-1 hypomethylation was observed in tumour tissue (mean Mtl $58.5\% \pm 0.9$) as compared to the normal adjacent lung tissue (mean Mtl $69.5\% \pm 0.1$, Mann-Whitney test $p < 0.05$). Notably, a significant association was observed between the DNA methylation levels of P2 and LINE-1 promoters (Spearman's $R = 0.340$, $p = 0.001$).

No significant associations were observed between the methylation status of any of the p73 promoters or LINE-1 element and clinicopathological parameters, such as age, gender, T status, nodal metastasis and differentiation.

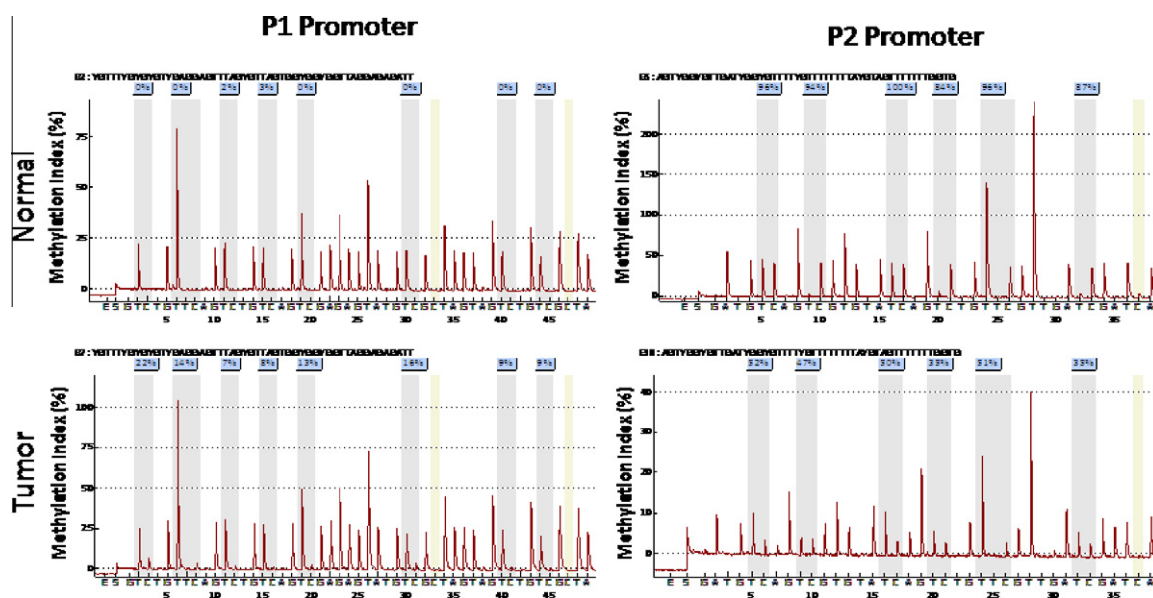


Fig. 1. Representative pyrograms from the DNA methylation analysis of the P1 and P2 promoters. X-axis shows the dispensation order and Y-axis the fluorescence level. The percentage of methylation is calculated as the C/(C + T) peak ratio per CpG. The C dispensation at position 35 controls for the full bisulfite conversion of DNA. Normal adjacent tissue (top) demonstrates high levels of DNA methylation while lung cancer tissue (bottom) has lower levels of methylation.

Table 1

mRNA expression of p73 isoforms and DNA methylation levels of their promoters in NSCLC specimens, in comparison to their clinicopathological parameters. M = male, F = female, Sq = squamous carcinoma, Ad = adenocarcinoma, ND = not determined.

Sample	Clinicopathological parameters					Methylation index (%)				mRNA expression (RQ value)	
	Gender	Histology	Differentiation	T status	N status	P1 tumour	P2 tumour	P2 normal	LINE-1 tumour	TAp73 RQ tumour	Δ Np73 RQ tumour
1	M	Sq	Moderate	2	0	4.23	58.43	91.2	45.5	1.12	0.46
2	M	Sq	Good	2	1	5.00	93.79	ND	70.5	0.18	0.00
3	M	Sq	Moderate	2	1	2.85	63.83	90.7	64.8	0.42	0.45
4	M	Sq	Moderate	2	0	7.34	88.04	91.3	66.5	0.22	0.28
5	M	Sq	Poor	2	1	4.24	47.13	ND	53.0	0.62	0.04
6	M	Sq	Moderate	3	1	6.04	68.41	89.7	51.2	0.46	0.07
7	M	Ad	Poor	2	0	3.29	92.06	92.8	58.3	1.08	0.16
8	F	Ad	Moderate	2	1	2.72	90.74	ND	64.1	0.15	0.00
9	F	Ad	Moderate	2	0	46.89	56.02	ND	58.4	0.06	0.00
10	M	Ad	Poor	2	1	15.85	48.24	ND	40.6	0.03	0.00
11	M	Sq	Moderate	2	1	0.47	69.51	92.6	60.0	0.07	0.19
12	M	Ad	Poor	2	2	5.18	93.30	92.1	67.7	0.98	0.07
13	M	Sq	Moderate	2	1	6.82	92.93	91.4	43.1	ND	ND
14	M	Sq	Poor	2	1	3.39	47.39	ND	50.1	0.41	2.30
15	F	Ad	Poor	2	2	5.65	60.56	92.7	49.8	0.41	0.08
16	F	Sq	Poor	2	1	10.12	60.78	92.3	58.8	0.12	0.04
17	F	Ad	Moderate	2	0	6.15	60.19	92.4	ND	0.30	0.99
18	F	Ad	Moderate	2	0	3.83	94.12	91.9	64.2	0.33	0.03
19	M	Sq	Moderate	2	0	4.07	80.68	90.1	50.2	0.26	0.00
20	M	Sq	Moderate	2	0	3.41	59.79	91	55.0	3.18	15.89
21	M	Sq	Moderate	2	1	2.66	54.28	92.5	45.9	0.75	0.22
22	M	Ad	Moderate	3	0	6.11	75.18	ND	69.2	0.24	0.06
23	M	Sq	Poor	3	1	3.98	90.91	ND	58.2	0.10	0.00
24	F	Ad	Moderate	2	0	1.83	84.06	ND	66.9	0.77	0.26
25	F	Ad	Moderate	2	0	4.03	91.88	ND	41.5	ND	ND
26	M	Ad	Poor	2	0	2.46	45.98	ND	64.3	0.12	0.47
27	M	Sq	Poor	2	1	3.48	86.93	91	58.9	0.91	0.39
28	M	Sq	Good	3	1	3.03	62.32	ND	53.7	0.55	0.13
29	F	Ad	Moderate	1	0	3.18	61.49	ND	69.1	0.26	0.29
30	M	Sq	Moderate	2	1	5.95	94.37	ND	22.9	0.28	0.04
31	F	Sq	Moderate	2	1	0.30	12.77	ND	63.9	0.42	9.99
32	F	Ad	Moderate	2	0	2.68	54.50	92.2	52.7	0.48	0.07
33	M	Ad	Poor	2	1	2.66	93.08	ND	62.0	0.11	0.00
34	M	Sq	Moderate	2	0	0.59	72.05	ND	50.4	1.44	0.23
35	F	Ad	Poor	2	2	7.65	54.47	90.2	57.4	0.25	0.10
36	M	Sq	Moderate	2	2	3.32	94.75	90.9	44.1	1.67	0.00
37	M	Ad	Poor	2	0	4.78	52.23	ND	50.5	0.29	0.08
38	F	Ad	Poor	3	0	5.05	61.82	ND	33.1	0.93	0.88
39	F	Ad	Poor	2	2	4.14	36.43	91.3	67.0	0.06	0.00
40	M	Ad	Poor	2	1	3.43	94.46	93.3	60.8	0.11	0.00
41	M	Sq	Moderate	4	2	5.13	92.77	ND	43.1	0.15	0.00
42	M	Sq	Moderate	2	1	2.83	50.72	ND	43.4	1.00	0.65
43	M	Ad	Poor	2	0	2.50	52.29	90.3	68.0	0.32	0.32
44	F	Ad	Poor	2	2	2.45	93.00	93.3	64.6	0.25	0.07
45	F	Ad	Poor	2	0	2.56	92.48	91.4	63.1	0.42	0.00
46	M	Sq	Moderate	2	1	6.53	71.60	ND	44.6	0.23	ND
47	F	Sq	Moderate	2	1	7.19	29.01	ND	ND	0.18	0.00
48	M	Sq	Moderate	2	0	3.05	62.68	91	51.2	0.28	0.41
49	F	Ad	Moderate	2	1	3.29	62.20	85.8	64.2	3.03	9.71
50	M	Sq	Poor	3	1	2.81	90.59	92.2	68.9	1.00	0.02
51	F	Sq	Poor	2	0	3.86	75.91	ND	58.9	2.97	0.77
52	M	Ad	Poor	2	1	3.04	65.23	93.5	56.8	1.35	1.04
53	F	Sq	Nd	2	0	4.73	72.00	ND	67.0	0.02	0.00
54	F	Ad	Poor	2	2	4.86	93.75	ND	66.1	0.09	0.00
55	M	Ad	Moderate	2	2	3.24	71.38	90.6	64.0	0.90	0.45
56	M	Ad	Poor	1	0	28.04	67.58	ND	47.1	0.09	0.00
57	M	Sq	Moderate	2	0	6.59	89.25	92.2	60.3	0.13	0.02
58	F	Sq	Moderate	2	0	3.05	49.05	91.6	52.3	0.42	0.29
59	F	Sq	Moderate	1	0	3.99	71.49	ND	58.5	0.31	0.04
60	F	Ad	Poor	2	1	3.96	75.82	90.3	ND	0.08	0.54
61	M	Ad	Poor	1	0	3.25	52.69	90	47.4	1.16	2.10
62	M	Ad	Good	2	0	5.49	92.53	91.2	ND	0.19	0.00
63	M	Ad	Poor	2	0	4.69	80.36	ND	67.9	0.33	0.44
64	F	Ad	Poor	1	0	5.10	91.42	ND	55.9	0.47	0.00
65	F	Ad	Moderate	2	2	4.18	88.41	ND	66.3	0.55	0.30
66	F	Sq	Moderate	2	0	3.42	59.23	90.9	64.1	0.96	0.01

Table 1 (continued)

Sample	Clinicopathological parameters					Methylation index (%)				mRNA expression (RQ value)	
	Gender	Histology	Differentiation	T status	N status	P1 tumour	P2 tumour	P2 normal	LINE-1 tumour	TAp73 RQ tumour	Δ Np73 RQ tumour
67	M	Ad	Moderate	2	0	2.97	94.42	91.3	69.1	0.29	0.00
68	M	Ad	Moderate	2	1	4.77	93.29	ND	ND	0.07	0.00
69	M	Ad	Moderate	2	1	5.13	91.35	ND	63.8	0.31	0.39
70	F	Sq	Moderate	2	0	3.36	81.21	92.5	60.1	2.48	1.10
71	F	Sq	Moderate	2	2	3.45	88.46	91.7	64.6	0.10	0.00
72	M	Sq	Poor	2	0	5.53	93.60	ND	63.0	0.10	0.00
73	F	Ad	Poor	2	1	4.98	91.71	ND	64.9	0.38	0.58
74	M	Ad	Moderate	2	0	5.51	93.93	ND	68.0	0.15	0.00
75	M	Sq	Moderate	3	0	4.22	92.25	ND	64.7	0.15	0.13
76	M	Ad	Poor	2	0	32.06	84.48	ND	45.2	0.05	0.00
77	F	Ad	Good	1	0	5.81	94.16	ND	61.1	0.02	0.00
78	F	Sq	Moderate	2	0	4.93	94.14	ND	71.0	0.07	0.00
79	F	Sq	Moderate	2	0	4.64	79.34	ND	65.8	0.88	1.46
80	M	Ad	Moderate	2	1	7.81	91.28	ND	67.3	0.04	0.00
81	F	Sq	Moderate	2	1	3.74	72.74	ND	67.0	0.14	0.04
82	F	Sq	Poor	1	2	5.71	93.93	ND	66.4	0.28	0.01
83	M	Sq	Poor	2	0	6.89	47.57	ND	60.2	0.48	0.05
84	M	Ad	Poor	4	1	6.99	91.45	ND	66.1	0.04	0.00
85	M	Ad	Moderate	4	0	3.79	91.49	ND	67.7	0.06	0.11
86	F	Ad	Moderate	1	1	4.38	89.66	ND	68.6	0.55	0.41
87	M	Sq	Moderate	2	0	5.31	75.11	ND	58.8	0.24	0.06
88	M	Sq	Moderate	2	2	3.37	66.26	ND	45.5	0.22	0.13
89	M	Ad	Moderate	4	0	4.66	92.56	ND	65.4	0.07	0.00
90	F	Ad	Moderate	1	0	14.12	91.57	ND	67.4	0.09	0.00
91	F	Ad	Poor	1	0	2.72	53.84	ND	51.9	0.73	1.69
92	M	Sq	Poor	2	1	3.46	92.96	ND	68.4	0.06	0.00
93	F	Ad	Moderate	2	0	2.97	72.49	ND	65.9	0.43	0.14
94	F	Ad	Moderate	3	2	3.95	92.46	ND	60.9	0.02	0.02
95	M	Sq	Poor	2	2	10.77	89.74	ND	59.2	0.10	0.00
96	F	Ad	Moderate	2	0	5.29	92.22	ND	66.7	0.09	0.00
97	F	Sq	Moderate	3	2	3.17	65.56	ND	50.0	0.41	0.10
98	M	Ad	Poor	2	0	5.05	81.15	ND	67.9	1.06	0.04
99	F	Sq	Poor	2	1	7.76	92.51	ND	61.9	0.18	0.00
100	F	Ad	Moderate	2	2	8.73	93.31	ND	57.9	0.05	0.01
101	F	Sq	Moderate	2	0	3.34	60.62	ND	44.4	0.27	0.08
102	M	Sq	Poor	3	1	4.09	64.67	ND	55.6	0.25	0.04

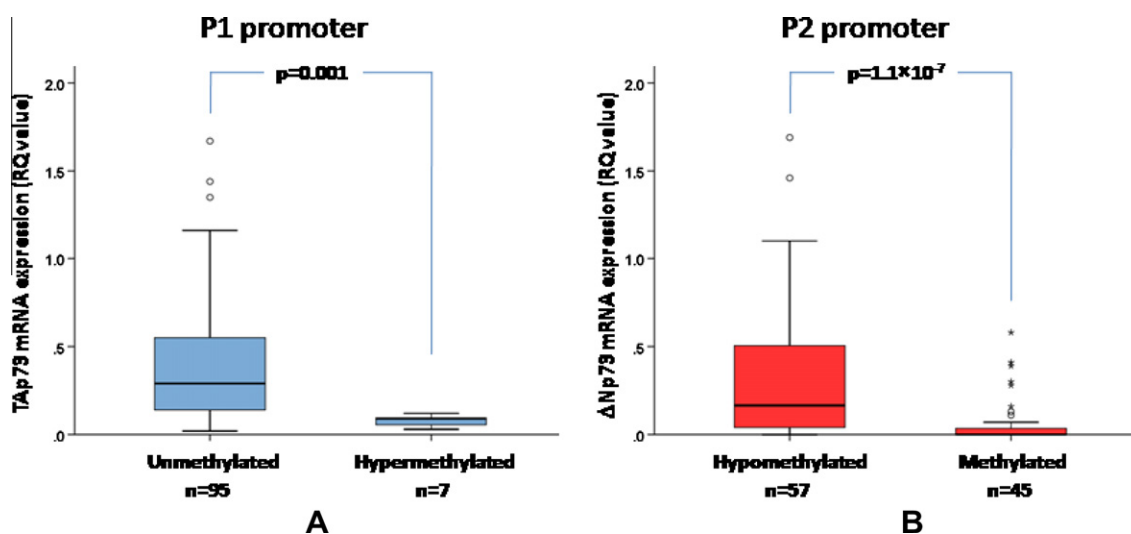


Fig. 2. (A) Box plot representation of the distribution of TAp73 RQ values in lung cancer tissues bearing an unmethylated P1 promoter versus lung cancer tissues bearing a hypermethylated P1 promoter. (B) Box plot representation of the distribution of Δ Np73 RQ values in lung cancer tissues bearing a methylated P2 promoter versus lung cancer tissues bearing a hypomethylated P2 promoter. Stars and circles in the plot indicate outliers.

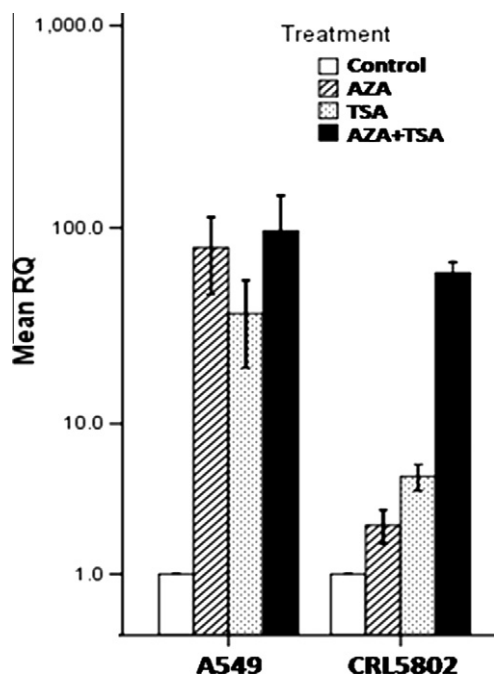


Fig. 3. Δ Np73 expression analysis in lung cancer cell lines treated with 5'-aza-2'-deoxycytidine (AZA) and trichostatin (TSA). The addition of compounds separately triggers the over-expression of Δ Np73 in both cell lines while an additive effect is profound in CRL5802 cells. Δ Np73 mRNA expression (Y-axis) is given as relative quantification (RQ) values in logarithmic scale. For each cell line, the untreated control was used as calibrator, thus the control expression is set to 1.

3.2. Tap73 and Δ Np73 mRNA levels correlated to the methylation status of their corresponding promoters

The Tap73 and Δ Np73 mRNA levels were measured in primary NSCLCs by qPCR. Particular attention was given experimentally to ensure the use of primers that amplify only the Δ Np73 transcripts and none of P1-derived p73 Δ ex2, p73 Δ ex2/3 and Δ N'-p73 transcripts. We subsequently analyzed the Tap73 expression comparatively to the DNA methylation levels of P1 promoter in the panel of tumour samples. The mRNA expression in the seven samples bearing a hypermethylated P1 promoter was significantly lower to that of the sample group with an unmethylated P1 promoter (Fig. 2). However, the correlation between the Δ Np73 mRNA expression and the methylation levels of the P2 promoter was more profound (Mann–Whitney test, $p = 1.1 \times 10^{-7}$), with Δ Np73 mRNA levels being significantly higher in the tumours with a hypomethylated P2 promoter (Fig. 2). No other association was observed between Tap73 or Δ Np73 mRNA expression and any of the clinicopathological parameters of the examined specimens.

In order to further validate the impact of P2 hypomethylation on Δ Np73 expression, we monitored the effect of epigenetic modifiers on Δ Np73 mRNA levels *in vitro* by treating one adenocarcinoma lung cancer cell line (A549) and one squamous cell carcinoma lung cancer cell line (CRL5802) with the DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (AZA) and the histone deacetylase inhibitor trichostatin-A (TSA). Both cell lines bear a methylated P2 promoter, whereas methylation levels of P1 promoter are very low (data not shown). Δ Np73 mRNA expression was increased upon treatment, while an additive effect of the two compounds was observed in both cell lines. Strikingly, treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine alone increased Δ Np73 levels as much as 100-fold in A549 cell line (Fig. 3).

3.3. Hypomethylation-induced Δ Np73 over-expression is more profound in squamous cell carcinomas than in adenocarcinomas

As shown in Fig. 4, P2 methylation levels were markedly lower in squamous cell carcinomas (mean Mtl: $68\% \pm 2.5$) in comparison with adenocarcinomas (mean Mtl: $83\% \pm 3.0$, Mann–Whitney test $U = 655.50$,

$p < 0.05$). Consistently, Δ Np73 mRNA expression was higher in squamous carcinomas (mean RQ = 0.98 ± 0.41) than in adenocarcinomas (mean RQ = 0.19 ± 0.05 , Mann–Whitney test, $p = 0.006$). The methylation levels were significantly correlated to Δ Np73 mRNA levels both in adenocarcinomas (Spearman's $R = -0.373$, $p = 0.008$) and in squamous cell carcinomas (Spearman's $R = -0.425$, $p = 0.002$). Importantly, this correlation was more intense in squamous cell carcinomas compared to adenocarcinomas. Thus, higher P2 methylation levels in adenocarcinomas result to lower Δ Np73 mRNA levels whereas lower P2 methylation levels in squamous cell carcinomas correspond to higher Δ Np73 mRNA levels (Fig. 4). In contrast, no differences were observed in P1 methylation levels between squamous cell carcinomas and adenocarcinomas (Mann–Whitney test $U = 1112.00$, $p = 0.212$) although a borderline difference of Tap73 mRNA levels was observed between squamous cell carcinomas (mean RQ = 0.57 ± 0.1) and adenocarcinomas (mean RQ = 0.4 ± 0.07) (Mann–Whitney test $U = 957.50$, $p = 0.044$). Therefore, inter-histological differences exist for both Δ Np73 and Tap73 mRNA levels, but only Δ Np73 mRNA levels are consistent with corresponding differences in the P2 methylation levels.

4. Discussion

In this study we demonstrated that P1 promoter of the p73 gene is rarely hypermethylated (6.8%) in NSCLCs whereas the P2 promoter is often hypomethylated (55.9%). This epigenetic deregulation is, linked with decreased Tap73 mRNA levels and increased Δ Np73 mRNA levels, respectively. Treatment of lung cancer cell lines with epigenetic modifiers confirmed the epigenetic induction of Δ Np73 transcription *in vitro*. Notably, P2 hypomethylation was associated with LINE-1 hypomethylation, an indicator of global methylation. We also demonstrated a tissue type specific difference in the hypomethylation-linked induction of Δ Np73 mRNA levels. Tap73 mRNA levels are also more increased in squamous cell carcinomas, however independently from inter-histological differences in the P1 methylation levels.

In agreement with Di Vinci et al., P1 promoter is essentially unmethylated in normal tissues and its methylation levels remain invariably low in the majority of the tumour samples. Only a few tumour samples bear a hypermethylated P1 promoter in conjunction with lower Tap73 expression when compared to the Tap73 expression of the unmethylated tumour samples ([19] and this study). Since P1 promoter remains unmethylated in the majority of tumour tissues, Tap73 expression cannot be prevented, provided that specific transcription factors are present within the nucleus. Indeed, recently it has been shown that Tap73 isoforms are overexpressed in response to over-expression of Sp1 transcription factor, which directly activates P1 promoter in lung cancer [23]. Therefore, changes in the levels of transcription factors seem to mainly deregulate P1 promoter control, whereas the infrequent methylation of P1 promoter does not pose as a major determinant of Tap73 deregulation in lung cancer.

The P2 promoter which was generally heavily methylated in normal lung tissues was found partially demethylated in the tumour samples in a percentage slightly lower than the one previously determined by methylation-specific PCR [19]. It is of note that although methylation levels were significantly correlated to the Δ Np73 mRNA expression, a clear association between the methylation status of P2 promoter and the Δ Np73 protein levels could not be established in NSCLC tissues examined previously

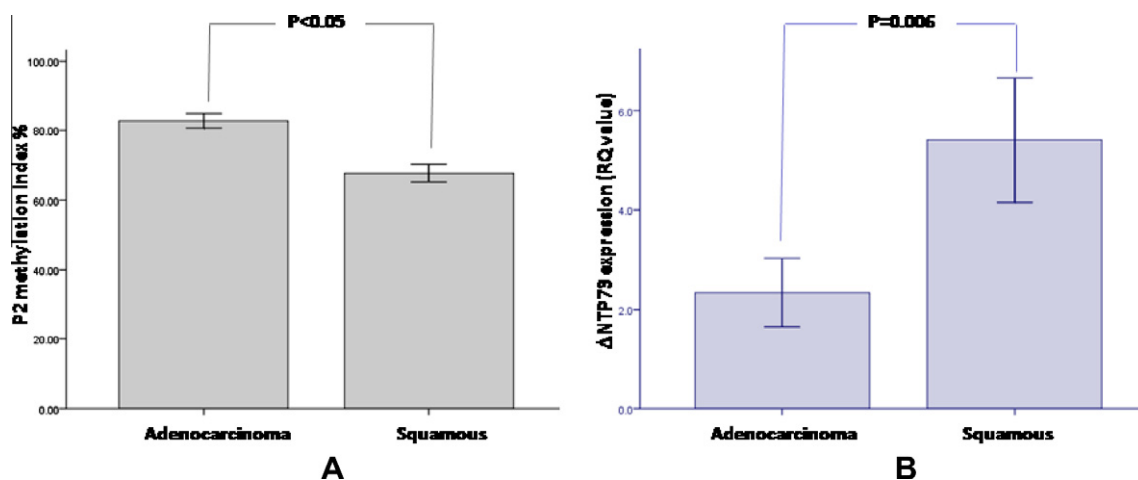


Fig. 4. Hypomethylation of P2 promoter is more profound in squamous cell carcinomas than adenocarcinomas (A). This is directly reflected in the $\Delta Np73$ transcript levels which are higher in squamous carcinomas than adenocarcinomas (B). Histograms represent mean values and error bars are indicative of the standard error of the mean.

[19]. This discrepancy could possibly be attributed to the fact that commercially available $\Delta Np73$ -specific antibodies inevitably detect not only the translational product of the P2-derived ΔN transcript, but also the translational product of the P1-derived $\Delta N'$ transcript, which is identical to the $\Delta Np73$ protein [6]. Indeed, P1-derived $\Delta N'$ transcripts have been reported to be expressed in lung cancer tumours used in the abovementioned study [19]. In contrast, quantitative RT-PCR assays detect products arising exclusively from P2 promoter and, therefore, they provide a more accurate means of estimating sheer P2 transcriptional activity, unbiased by P1 transcriptional activity. Another reason of inconsistent results between studies based on qualitative (methylation-specific PCR) versus quantitative methylation methods (pyrosequencing) could be mis-priming of methylation-specific PCR, which subsequently yields false positive results in up to 10% frequency, in assays combining small amounts of DNA input and high numbers of PCR cycles. Methylation enrichment pyrosequencing used herein overcomes these technical limitations and provides a higher degree of sensitivity in estimating methylation status, whenever clinical samples with low DNA concentrations are used [24].

Both TAp73 and $\Delta Np73$ mRNA levels demonstrated significant inter-histological differences, but only $\Delta Np73$ mRNA levels were dependent on the methylation levels of the corresponding promoter. Importantly, $\Delta Np73$ expression has been previously shown to predict poor prognosis in lung cancer, with squamous cell carcinoma patients presenting lower 5-year survival rates in comparison with adenocarcinoma patients [25,26]. Thus, elevated $\Delta Np73$ mRNA levels, consistent with lower P2 methylation levels in squamous cell lung cancer patients, may contribute, among other discrete molecular changes, to the poorer prognosis of this histological group in comparison to lung adenocarcinoma patients. In addition, the correlation of P2 promoter hypomethylation with LINE-1 hypomethylation, an accepted measure of global DNA methylation status [21,22], suggests that this reduction of P2 methylation levels is a passive consequence of global

hypomethylation, which is more frequent in squamous cell carcinomas comparatively to adenocarcinomas [22,27]. In contrast, differences in TAp73 mRNA expression between distinct histological lung cancer types might be attributed to tissue type-related differences in the levels of specific transcription factors that activate P1 promoter.

Collectively, the above data suggest that epigenetic events might be crucial for the deregulation of P2 activity, whereas transcriptional events seem to be mainly implicated to deregulation of P1 activity in lung cancer [23]. $\Delta Np73$ mRNA expression appears to be restrained by strict epigenetic control of P2 promoter in the normal lung cell. Once deregulated, specific transcription factor(s) have the opportunity to approach P2 promoter, therefore enhancing transcription of the anti-apoptotic $\Delta Np73$ isoforms and possibly favoring oncogenic activities within the cell. In contrast, epigenetic control is looser in the case of P1 promoter and the synthesis of its corresponding products seems to be deregulated only upon presence of excess amounts of specific transcription factors.

In addition, the fact that P2 hypomethylation is markedly more frequent than P1 hypermethylation in lung cancer samples suggests that the resulting over-expression of the anti-apoptotic $\Delta Np73$ contributes in a much greater extent to oncogenesis as compared to the under-expression of the apoptotic TAp73. Considering the strict epigenetic inhibition of $\Delta Np73$ transcription in the normal lung cell, the question if increase of $\Delta Np73$ rather than alterations of TAp73 may determine the ultimate effect of $p73$ in lung carcinogenesis should be addressed in future studies. As demethylating agents are now entering lung cancer trials, it is imperative to gain a greater insight into the potential reactivation of oncogenic $\Delta Np73$ in order to evaluate the risk of the usage of these agents in anti-cancer treatment and to advance for the clinical utilization of epigenetics in cancer therapy.

Our study also provides hints of a differential rather than opposing mode of regulation of $p73$ promoters in lung tissues. In case that the modes of regulation of P1 and P2 promoters do present a non-yin-yang relationship, they

could offer a certain degree of freedom in the synthesis of their corresponding products in specific tissues, thus allowing their participation in distinct functions. This notion is further supported by the fact that TAp73 and Δ Np73 isoforms present not only strictly counteracting functions, i.e. TAp73 apoptotic activities versus Δ Np73 anti-apoptotic activities [3], but also unique, independent functions especially in developmental processes, in which p73 gene is primarily implicated. For instance, Δ Np73 is essential for normal ventricular size and cortical thickness during neurogenesis in Δ Np73^{-/-} mice, whereas lack of TAp73 does not influence these parameters in TAp73^{-/-} mice [28]. The investigation of this hypothesis in the future would set more light on the range of functions and the interplay of the p73 isoforms.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest related to this work.

Acknowledgements

This research project was funded by the Roy Castle Lung Cancer Foundation, UK and the TOK Marie Curie program SUPRAGENE, Cont. No. MTKD-CT-2005-029508. We are grateful to the clinical resources group for providing the tissue.

References

- [1] C.D. Pozniak, S. Radinovic, A. Yang, F. McKeon, D.R. Kaplan, F.D. Miller, An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death, *Science* 289 (2000) 304–306.
- [2] T. Stiewe, C.C. Theseling, B.M. Putzer, Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 14177–14185.
- [3] T.J. Grob, U. Novak, C. Maisse, D. Barcaroli, A.U. Luthi, F. Pirnia, B. Hugli, H.U. Graber, V. De Laurenzi, M.F. Fey, G. Melino, A. Tobler, Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53, *Cell Death Differ.* 8 (2001) 1213–1223.
- [4] T. Stiewe, S. Zimmermann, A. Frilling, H. Esche, B.M. Putzer, Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene, *Cancer Res.* 62 (2002) 3598–3602.
- [5] U.M. Moll, N. Slade, p63 and p73: roles in development and tumor formation, *Mol. Cancer Res.* 2 (2004) 371–386.
- [6] T. Stiewe, S. Tuve, M. Peter, A. Tannapfel, A.H. Elmaagacli, B.M. Putzer, Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 626–633.
- [7] M. Esteller, J.G. Herman, Cancer as an epigenetic disease-DNA methylation and chromatin alterations in human tumours, *J. Pathol.* 196 (2002) 1–7.
- [8] H. Wu, Y. Chen, J. Liang, B. Shi, G. Wu, Y. Zhang, D. Wang, R. Li, X. Yi, H. Zhang, L. Sun, Y. Shang, Hypomethylation-linked activation of PAX2 mediates tamoxifen-stimulated endometrial carcinogenesis, *Nature* 438 (2005) 981–987.
- [9] H.J. Jun, S. Woolfenden, S. Coven, K. Lane, R. Bronson, D. Housman, A. Charest, Epigenetic regulation of c-ROS receptor tyrosine kinase expression in malignant gliomas, *Cancer Res.* 69 (2009) 2180–2184.
- [10] L. Cui, L.Y. Xu, Z.Y. Shen, Q. Tao, S.Y. Gao, Z. Lv, Z.P. Du, W.K. Fang, E.M. Li, NGALR is overexpressed and regulated by hypomethylation in esophageal squamous cell carcinoma, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 7674–7681.
- [11] C. De Smet, A. Loriot, DNA hypomethylation in cancer: epigenetic scars of a neoplastic journey, *Epigenetics* 5 (2010) 206–213.
- [12] J.F. Costello, M.C. Frühwald, D.J. Smiraglia, L.J. Rush, G.P. Robertson, X. Gao, F.A. Wright, J.D. Feramisco, P. Peltomäki, J.C. Lang, D.E. Schuller, L. Yu, C.D. Bloomfield, M.A. Caligiuri, A. Yates, R. Nishikawa, H. Su Huang, N.J. Petrelli, X. Zhang, M.S. O'Dorisio, W.A. Held, W.K. Cavenee, C. Plass, Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns, *Nat. Genet.* 24 (2000) 132–138.
- [13] P.G. Corn, S.J. Kuerbitz, M.M. van Noesel, M. Esteller, N. Compitello, S.B. Baylin, J.G. Herman, Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation, *Cancer Res.* 59 (1999) 3352–3356.
- [14] A. Pluta, U. Nyman, B. Joseph, T. Robak, B. Zhivotovsky, P. Smolewski, The role of p73 in hematological malignancies, *Leukemia* 20 (2006) 757–766.
- [15] B. Martinez-Delgado, B. Melendez, M. Cuadros, M.J. Garcia, J. Nomdedeu, C. Rivas, Frequent inactivation of the p73 gene by abnormal methylation or LOH in non-Hodgkin's lymphomas, *Int. J. Cancer* 102 (2002) 15–19.
- [16] L.L. Siu, J.K. Chan, K.F. Wong, Y.L. Kwong, Specific patterns of gene methylation in natural killer lymphomas: p73 is consistently involved, *Am. J. Pathol.* 160 (2002) 59–66.
- [17] B. Banelli, I. Casciano, M. Romani, Methylation-independent silencing of the p73 gene in neuroblastoma, *Oncogene* 19 (2000) 4553–4556.
- [18] I. Casciano, B. Banelli, M. Croce, G. Allemanni, S. Ferrini, G.P. Tonini, M. Ponzoni, M. Romani, Role of methylation in the control of Δ Np73 expression in neuroblastoma, *Cell Death Differ.* 9 (2002) 343–345.
- [19] A. Di Vinci, F. Sessa, I. Casciano, B. Banelli, F. Franzini, C. Brigati, G. Allemanni, P. Russo, L. Dominioni, M. Romani, Different intracellular compartmentalization of TA and DeltaNp73 in non-small cell lung cancer, *Int. J. Oncol.* 34 (2009) 449–456.
- [20] K. Chalitchagorn, S. Shuangshoti, N. Hourpai, N. Kongruttanachok, P. Tangkijvanich, D. Thong-ngam, N. Voravud, V. Sriuranpong, A. Mutirangura, Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis, *Oncogene* 23 (2004) 8841–8846.
- [21] D.J. Weisenberger, M. Campan, T.I. Long, M. Kim, C. Woods, E. Fiala, M. Ehrlich, P.W. Laird, Analysis of repetitive element DNA methylation by MethylLight, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 6823–6836.
- [22] A. Daskalos, G. Nikolaidis, G. Xinarianos, P. Savvari, A. Cassidy, R. Zakopoulou, A. Kotsinas, V. Gorgoulis, J.K. Field, T. Liloglou, Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer, *Int. J. Cancer* 124 (2009) 81–87.
- [23] S. Logotheti, I. Michalopoulos, M. Sideridou, A. Daskalos, S. Kossida, D.A. Spandidos, J.K. Field, B. Vojtesek, T. Liloglou, V. Gorgoulis, V. Zoumpourlis, Sp1 binds to the external promoter of the p73 gene and induces the expression of TAp73gamma in lung cancer, *FEBS J.* 277 (2010) 3014–3027.
- [24] R.J. Shaw, E.K. Akufo-Tetteh, J.M. Risk, J.K. Field, T. Liloglou, Methylation enrichment pyrosequencing: combining the specificity of MSP with validation by pyrosequencing, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) e78.
- [25] H. Uramoto, K. Sugio, T. Oyama, S. Nakata, K. Ono, M. Morita, K. Funa, K. Yasumoto, Expression of deltaNp73 predicts poor prognosis in lung cancer, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 6905–6911.
- [26] H. Uramoto, K. Sugio, T. Oyama, S. Nakata, K. Ono, T. Nozoe, K. Yasumoto, Expression of the p53 family in lung cancer, *Anticancer Res.* 26 (2006) 1785–1790.
- [27] K. Saito, K. Kawakami, I. Matsumoto, M. Oda, G. Watanabe, T. Minamoto, Long interspersed nuclear element 1 hypomethylation is a marker of poor prognosis in stage IA non-small cell lung cancer, *Clin. Cancer Res.* 16 (2010) 2418–2426.
- [28] M.T. Wilhelm, A. Rufini, M.K. Wetzel, K. Tsuchihara, S. Inoue, R. Tomasini, A. Itie-Youten, A. Wakeham, M. Arsenian-Henriksson, G. Melino, D.R. Kaplan, F.D. Miller, T.W. Mak, Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for {Delta}Np73 in the DNA damage response pathway, *Genes Dev.* 24 (2010) 549–560.