ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΟΛΥΟΜΑ ΙΟΙ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ: ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ

ΙΣΜΗΝΗ ΛΑΣΗΘΙΩΤΑΚΗ

ΙΑΤΡΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΣΟΥΡΒΙΝΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2016

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ονοματεπώνυμο: Λασηθιωτάκη Ισμήνη
Ημερομηνία γέννησης: 10/11/1982
Τόπος γέννησης: Αθήνα
Διεύθυνση οικίας: Όρμος Μαραθοκάμπου, Σάμος
Κινητό τηλέφωνο: +306973385855
email: ismini.lasithiotaki@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

Μέση Εκπαίδευση:
18° Γυμνάσιο και Λύκειο Αθηνών 1994-2000
Βραβεία Αριστείας από το Δήμο Αθηναίων (1995-2000)

Ανώτατη Εκπαίδευση:
Πτυχιούχος Εθνικού και Καποδιστριακού |Πανεπιστημίου Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας 2000-2005, Λίαν Καλώς
Πτυχιούχος Πανεπιστημίου Κρήτης, Σχολή Ιατρικής, Τμήμα Ιατρικής 2005-2011, Λίαν Καλώς

Ξένες Γλώσσες:
First Certificate in English, Univ of Cambridge UK, Grade A- 1995
Certificate of Proficiency in English, Univ of Michigan USA, Grade A -1996
Certificate of Proficiency in English, Univ of Cambridge UK, Grade A – 1996
D.E.L.F. 1er et 2eme degré (Diplôme élémentaire de langue française), Tres Bien 1995
Diplôme d'Etudes Françaises (Sorbonne 2eme Degré)
Université Paris Sorbonne, Tres Bien – 1996

Γνώσεις Η/Υ:

MICROSOFT WORD, MICROSOFT EXCEL, GRAPH PAD, COREL DRAW, PHOTOSHOP, SPSS

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ - ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

Στα πλαίσια της εκπαίδευσης στο Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ:

Τεχνητά συστήματα ανασυνδυασμού, κλωνοποίηση-έκφραση γονιδίων, δημιουργία γονιδιακών τραπεζών/βιβλιοθηκών, ανάλυση καρυοτύπων, χρωματογραφία σφαιρινών σε στήλη ιοντοανταλλάκτη, ανάλυση απτοσφαιρινών.
Απομόνωση ολικού DNA & RNA ιστού, μετασχηματισμός κυττάρων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, χαρτογράφηση DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, απομόνωση χρωματίνης.
Ψυχοτεμαχισμός και ψυκτοεξάχνωση μεμβρανικών πρωτεϊνών, ανοσοϊστοχημική εντόπιση αντιγονικών θέσεων. Χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου για παρατήρηση και εξαγωγή αποτελεσμάτων.
Βιοχημικός έλεγχος καρδιακής, νεφρικής λειτουργίας, βιοχημικός έλεγχος ορμονών.
Ανοσοκατακρήμνιση, ανοσοδιάχυση, ανοσοενζυμικά μέθοδος ELISA.

Διπλωματική εργασία στον τομέα φυσιολογίας 2004-2005:

Επίδραση περιβαλλοντικού και οξειδωτικού στρες στα μονοπάτια σηματοδότησης των map-κινασών, συσχετισμός με τον καταρράκτη των κασπασών και με τις heat shock proteins σε ασπόνδυλα (*Mytilus galloprovinciallis*).

Μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν: παρασκευή πούδρας από ιστούς, ομογενοποίηση ιστού, απομόνωση DNA, RNA και πρωτεϊνών. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο bradford. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, ημίστεγνη μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Αποκόλληση ανοσοσυμπλόκων από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. PCR, Northern blot, Southern blot, Western blot.

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ-ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Εθνικό ίδρυμα ερευνών

Παρακολούθηση κύκλος «Κοινωνία και υγεία» iii, iv, v (2003-2004-2005)

- Πανελληνιά ένωση βιολόγων

Συμμέτοχη στα πανελληνιά συνέδρια 2004, 2005, 2006

- European respiratory society congress

Συμμέτοχη στα ετήσια συνέδρια 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015

- American thoracic society

Συμμέτοχη στα ετήσια συνέδρια 2009, 2010, 2011, 2012, 2014, 2015

- World congress on advances in oncology and international symposium on molecular medicine

Συμμέτοχη στα ετήσιο συνέδρια 2009, 2010, 2012, 2013, 2014, 2015

- Lung science conference – european respiratory society

Συμμέτοχη στα ετήσιο συνέδρια (estoril 2009, 2010, 2011, 2012)

- 27ο Βορειοελλαδικό Συνέδριο Ιατρικής.

Συμμετοχή και παρακολούθηση 2012.

- 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας 2012
- Πανελλήνιο πνευμονολογικό συνέδριο

Συμμέτοχη στα ετήσιο συνέδρια 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016

- Πανελλήνιο Συνέδριο Αναισθησιολογίας

Συμμέτοχη στα ετήσιο συνέδρια 2013, 2015

- Πανελλήνιο Συνέδριο Αλγολογίας

Συμμέτοχη στα ετήσιο συνέδρια 2014, 2016

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

1. Upregulation of stromal cell derived factor-1alpha in collagen vascular diseases-associated interstitial pneumonias (CVDs-IPs). Margaritopoulos GA, Antoniou KM, Soufla G, Karagiannis K, Proklou A, Lasithiotaki I, Tzanakis N, Spandidos DA, Siafakas NM. Pulm *Pharmacol Ther. 2010 Apr;23(2):115-20. Epub 2009 Oct 28.*
2. Expression analysis of angiogenic growth factors and biological axis CXCL12/CXCR4 axis in idiopathic pulmonary fibrosis. Antoniou KM, Soufla

G, Lymbouridou R, Economidou F, Lasithiotaki I, Manousakis M, Drositis I, Spandidos DA, Siafakas NM. *Connect Tissue Res. 2010;51(1):71-80.*

3. Role of VEGF-stromal cell-derived factor-1alpha/CXCL12 axis in pleural effusion of lung cancer. Economidou F, Antoniou KM, Soufla G, Lasithiotaki I, Karagiannis K, Lymbouridou R, Proklou A, Spandidos DA, Siafakas NM. *J Recept Signal Transduct Res. 2010 Jun;30(3):154-60.*
4. Investigation of Toll-like receptors in the pathogenesis of fibrotic and granulomatous disorders: a bronchoalveolar lavage study. Margaritopoulos GA, Antoniou KM, Karagiannis K, Samara KD, Lasithiotaki I, Vassalou E, Lymbouridou R, Koutala H, Siafakas NM. *Fibrogenesis Tissue Repair. 2010 Oct 11;3:20.*
5. Investigation of angiogenetic axis Angiopoietin-1 and -2/Tie-2 in fibrotic lung diseases: a bronchoalveolar lavage study. Margaritopoulos GA, Antoniou KM, Karagiannis K, Vassalou E, Lasithiotaki I, Lambiri I, Siafakas NM. *Int J Mol Med. 2010 Dec;26(6):919-23.*
6. Detection of herpes simplex virus type-1 in patients with fibrotic lung diseases..Lasithiotaki I, Antoniou KM, Vlahava VM, Karagiannis K, Spandidos DA, Siafakas NM, Sourvinos G. *PLoS One. 2011;6(12):e27800. Epub 2011 Dec 20.*
7. Expression profiles of Toll-like receptors in non-small cell lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis. Samara KD, Antoniou KM, Karagiannis K, Margaritopoulos G,Lasithiotaki I, Koutala E, Siafakas NM. *Int J Oncol. 2012 May;40(5):1397-404.*
8. Investigation of Telomerase/Telomeres system in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells derived from IPF and RA-UIP. Antoniou KM, Margaritopoulos GA, Proklou A, Karagiannis K,Lasithiotaki I, Soufla G, Kastrinaki MC, Spandidos DA, Papadaki HA, Siafakas NM. *J Inflamm (Lond). 2012 Jul 2;9(1):27.*
9. Association of human herpes, papilloma and polyoma virus families with bladder cancer. Panagiotakis GI, Papadogianni D, Chatziioannou MN, Lasithiotaki I, Delakas D, Spandidos DA. *Tumour Biol. 2012 Sep 13.*
10. The presence of Merkel cell polyomavirus is associated with deregulated expression of BRAF and Bcl-2 genes in non-small cell lung cancer. Lasithiotaki I, Antoniou KM, Derdas SP, Sarchianaki E, Symvoulakis EK, Psaraki A, Spandidos DA, Stathopoulos EN, Siafakas NM, Sourvinos G. Int J Cancer. 2013 Aug 1;133(3):604-11. doi: 10.1002/ijc.28062. Epub 2013 Feb 27.
11. Expression of SDF-1/CXCR4 axis in bone marrow mesenchymal stem cells derived from rheumatoid arthritis-usual interstitial pneumonia. Margaritopoulos GA, Antoniou KM, Lasithiotaki I, Proklou A, Soufla G, Siafakas NM. Clin Exp Rheumatol. 2013 Jul-Aug;31(4):610-1. Epub 2013 May 27.
12. Molecular pathological findings of Merkel cell polyomavirus in lung cancer: a possible etiopathogenetic link? Antoniou KM, Lasithiotaki I, Symvoulakis E, Derdas SP, Psaraki A, Spandidos DA, Stathopoulos EN, Siafakas NM, Sourvinos G. Int J Cancer. 2013 Dec 15;133(12):3016-7. doi: 10.1002/ijc.28308. Epub 2013 Jun 29.
13. Differential telomerase expression in idiopathic pulmonary fibrosis and non-small cell lung cancer. Antoniou KM, Samara KD, Lasithiotaki I, Margaritopoulos GA, Soufla G, Lambiri I, Giannarakis I, Drositis I, Spandidos DA, Siafakas NM. Oncol Rep. 2013 Dec;30(6):2617-24. doi: 10.3892/or.2013.2753.

14. Detection and genotype analysis of human papillomavirus in non-small cell lung cancer patients. Sarchianaki E, Derdas SP, Ntaoukakis M, Vakonaki E, Lagoudaki ED, Lasithiotaki I, Sarchianaki A, Koutsopoulos A, Symvoulakis EK, Spandidos DA, Antoniou KM, Sourvinos G. Tumour Biol. 2014 Apr;35(4):3203-9. doi: 10.1007/s13277-013-1419-2.
15. NLRP3 inflammasome expression in idiopathic pulmonary fibrosis and rheumatoid lung. Lasithiotaki I, Giannarakis I, Tsitoura E, Samara KD, Margaritopoulos GA, Choulaki C, Vasarmidi E, Tzanakis N, Voloudaki A, Sidiropoulos P, Siafakas NM, Antoniou KM.Eur Respir J. 2016 Mar;47(3):910-8. doi: 10.1183/13993003.00564-2015.
16. Aberrant expression of miR-21, miR-376c and miR-145 and their target host genes in Merkel cell polyomavirus-positive non-small cell lung cancer. Lasithiotaki I, Tsitoura E, Koutsopoulos A, Lagoudaki E, Koutoulaki C, Pitsidianakis G, Spandidos DA, Siafakas NM, Sourvinos G, Antoniou KM. Oncotarget. 2016 Aug 11. doi: 10.18632/oncotarget.11222.
17. Toll-like receptors and autophagy in interstitial lung diseases.. Margaritopoulos GA, Lasithiotaki I, Antoniou KM. Eur J Pharmacol. 2016 Sep 27. pii: S0014-2999(16)30619-7
18. MiR-185/AKT and miR-29a/Collagen 1a pathways are activated in IPF BAL cells. Tsitoura E, Wells AU, Karagiannis K, Lasithiotaki I, Vasarmidi E, Bibaki E, Koutoulaki C, Sato H, Spandidos DA, Siafakas NM, Sourvinos G, Antoniou KM. Oncotarget. 2016 Oct 18.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

« Καθώς όμως κατέβαινε το λόφο, κάποια θλίψη άγγιξε την ψυχή του και μια σκέψη γεννήθηκε στην καρδιά του: Πως θα μπορέσω να φύγω ήρεμα και χωρίς πόνο; Όχι, δε θα μπορέσω να φύγω από την πόλη αυτή χωρίς μια πληγή στην καρδιά μου.
Πάρα πολλά κομμάτια του πνεύματός μου διασκόρπισα σ'αυτούς τους δρόμους, και πάρα πολλά είναι τα παιδιά της λαχτάρας μου που βαδίζουν γυμνά ανάμεσα σε αυτούς τους λόφους, και δεν μπορώ να φύγω μακριά τους χωρίς κάποιο βάρος και κάποιον πόνο.
Κι ωστόσο, δε μπορώ ν'αργοπορήσω άλλο εδώ. Η θάλασσα που καλεί όλα τα πράγματα κοντά της, καλεί κι εμένα, και πρέπει να ταξιδέψω.
Μ'ευχαρίστηση θα έπαιρνα μαζί μου όλα όσα είναι εδώ. Αλλά πως μπορώ;»

Το κείμενο του Χαλίλ Γκιμπάν, απόσπασμα από τον Κήπο του Προφήτη, μιλάει για το τέλος μιας εποχής, το αναπόφευκτο τέλος ενός ταξιδιού που σου έμαθε πολλά. Κάπως έτσι αισθάνομαι για την παρούσα διδακτορική διατριβή: αποτέλεσε απαρχή μιας νέας θεώρησης των πραγμάτων για μένα. Έμαθα να πειραματίζομαι κυριολεκτικά αλλά και με τα όρια του εαυτού μου, να μαθαίνω από τα λάθη μου και να εξερευνώ με πάθος την επιστήμη που διάλεξα. Μέσα από αυτό το ταξίδι είδα και γνώρισα πολλά πράγματα που με απαρτίζουν πλέον σαν άνθρωπο. Δεν μπορώ παρά να είμαι ευγνώμων για την εμπειρία.

Για όλα τα παραπάνω, και για πολλά ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Γεώργιο Σουρβίνο, την Επίκουρη Καθηγήτρια Αικατερίνη Αντωνίου, που με την πείρα και την διάθεση που τους χαρακτηρίζουν, με βοήθησαν σε όλο το πέρας του έργου αυτού. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, όλους τους συναδέλφους του εργαστηρίου για την καθημερινή συμβολή και συνδρομή τους, την Ελίζα Τσιτούρα, την Ειρήνη Λυμπουρίδου, τον Κωνσταντίνο Καραγιάννη, την Ειρήνη Βασαρμίδη, το Σταύρο Δέρδα καθώς και όλους τους συναδέλφους από τα εργαστήρια Ιολογίας, Αιματολογίας και Ρευματολογίας για την πολύτιμη συμβουλή και υποστήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Δημήτριο Σπαντίδο, Νικόλαο Σιαφάκα, Νικόλαο Τζανάκη καθώς και την πνευμονολόγο Αικατερίνη Σαμαρά και την υπεύθυνη του σπιρομετρικού εργαστηρίου του ΠΑΓΝΗ Δέσποινα Μωραϊτάκη.

Χωρίς τη συντροφιά και τη συμβολή όλων τους δε θα βρισκόμουν εδώ.

Ευχαριστώ από καρδιάς.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α. Γενικό Μέρος
1. Καρκίνος του Πνεύμονα
Επιδημιολογικά Δεδομένα
2. Παράγοντες σχετιζόμενοι με την ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα
Κάπνισμα
Ηλικία
Περιβάλλον
Κληρονομικότητα
Γενετικές Μεταβολές
Ογκογονίδια
3. Κλινική Συμπτωματολογία καρκίνου πνεύμονα
4. Πολυόμα ιοί και Καρκίνος
Δομή
Ιστορία και Ξενιστές
Πολυόμα ιοί και Άνθρωπος
Πολυόμα ιοί και χαρακτηριστικά του καρκίνου
5. Επιγενετική στον Καρκίνο του Πνεύμονα
Β. Ειδικό Μέρος
I. Σκοπός της μελέτης
II. Ασθενείς και Μέθοδοι
III. Αποτελέσματα
IV. Συζήτηση
V. Συμπεράσματα
Βιβλιογραφία
Δημοσιευμένες εργασίες

Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Καρκίνος του Πνεύμονα

Με τον όρο καρκίνο ορίζεται το κακόηθες νεόπλασμα που αναπτύσσεται από επιθηλιακό ιστό. Ως νεόπλασμα ορίζεται κάθε «ανώμαλη μάζα ιστού, η ανάπτυξη της οποίας ξεπερνά τα όρια αυτής των φυσιολογικών ιστών, δεν υπόκειται στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς των τελευταίων και επιμένει στον ρυθμό ανάπτυξης όταν ανασταλούν τα ερεθίσματα που προκάλεσαν αυτήν τη μεταβολή» (1). Η καρκινογένεση προκύπτει από πολυσύνθετες γενετικές και επιγενετικές αλλαγές με αποτέλεσμα τη σταδιακή κακοήθη εξαλλαγή των κυττάρων. Πρόκειται για μια πολυπαραγοντική και πολυσταδιακή διαδικασία (2). Ο καρκίνος του πνεύμονα (ΚΠ) αναπτύσσεται από το αναπνευστικό επιθήλιο των βρόγχων (3).

Ο καρκίνος του πνεύμονα θεωρούταν σπάνια μορφή νεοπλασματικής νόσου μέχρι το 1930, έπειτα όμως εμφάνισε δραματική αύξηση της παρουσίας και της θνησιμότητας του σε άντρες και γυναίκες. Ο Hoover πριν από περίπου 60 έτη περιέγραψε για πρώτη φορά τη σχέση του καρκίνου του πνεύμονα με το κάπνισμα (4, 5). Στα έτη που ακολούθησαν, η παρατήρηση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την καρκινογένεση, έχει βοηθήσει στην κατανόηση της νόσου σε κυτταρικό επίπεδο (6). Οι παρατηρήσεις αυτές ίσως μπορούν να οδηγήσουν σε βελτιωμένες μεθόδους διάγνωσης, σταδιοποίησης των καρκίνων, θεραπείας και πρόληψη της νόσου.

Τύποι καρκίνου του πνεύμονα

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι καρκίνου του πνεύμονα:

-Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC)

-Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC)

Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα: Περίπου 10% έως 15% όλων των καρκίνων του πνεύμονα είναι ο καρκίνος του πνεύμονα μικρών κυττάρων (SCLC), που ονομάζεται έτσι για το μέγεθος των καρκινικών κυττάρων, όταν παρατηρείται στο μικροσκόπιο. Είναι πολύ σπάνιο για κάποιον που δεν έχει καπνίσει να έχει μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Ο SCLC ξεκινά συχνά στους βρόγχους κοντά στο κέντρο του θώρακα, και τείνει να εξαπλωθεί ευρέως μέσα στο σώμα νωρίς στην πορεία της νόσου. Για το λόγο αυτό θεωρείται σε γενικές γραμμές ανεγχείρητη νόσος. Υπάρχει μεγάλη πιθανότητα μικρομεταστατικής νόσου την ώρα της διάγνωσης

ακόμα και αν ο εργαστηριακός έλεγχος είναι αρνητικός. Ο μικροκυτταρικός καρκίνος έχει υψηλά ποσοστά ανταποκρίσεων στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία.

Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα: Περίπου το 85% έως 90% των καρκίνων του πνεύμονα είναι μη-μικροκυτταρικός (NSCLC). Υπάρχουν τρεις κύριοι υπότυποι NSCLC. Τα κύτταρα σε αυτούς τους υποτύπους διαφέρουν σε μέγεθος, σχήμα, και ιστοχημικά χαρακτηριστικά. Αλλά είναι ομαδοποιημένοι ως μη μικροκυτταρικοί, γιατί η προσέγγιση στη θεραπεία και την πρόγνωση είναι παρόμοια.

-Πλακώδες καρκίνωμα: Περίπου 35% έως 40% όλων των καρκίνων του πνεύμονα είναι καρκινώματα πλακωδών κυττάρων. Τα πλακώδη κύτταρα είναι επίπεδα κύτταρα που βρίσκονται στο εσωτερικό των αεραγωγών στους πνεύμονες. Συχνά συνδέεται με ιστορικό καπνίσματος και τείνουν να βρίσκονται κεντρικά στους πνεύμονες, κοντά σε ένα βρόγχο.

-Αδενοκαρκίνωμα: Περίπου το 40% των καρκίνων του πνεύμονα είναι αδενοκαρκινώματα. Αυτοί οι καρκίνοι ξεκινήσει από κύτταρα που εκκρίνουν βλέννη. Αυτό το είδος του καρκίνου του πνεύμονα εμφανίζεται κυρίως σε νυν ή πρώην καπνιστές, αλλά είναι επίσης ο πιο κοινός τύπος καρκίνου του πνεύμονα σε μη καπνιστές. Είναι πιο συχνός στις γυναίκες παρά στους άνδρες, και είναι πιο πιθανό να συμβεί σε νεότερα άτομα από άλλους τύπους καρκίνου του πνεύμονα.Τα αδενοκαρκίνωμα συνήθως βρίσκονται στα περιφερικά τμήματα του πνεύμονα. Τείνουν να αναπτύσσονται πιο αργά από ό, τι άλλοι τύποι καρκίνου του πνεύμονα, και είναι πιο πιθανό να διαγνωστούν προτού εξαπλωθούν εκτός του πνεύμονα.Τα άτομα με τον τύπο του αδενοκαρκινώματος που ονομάζεται αδενοκαρκίνωμα in situ τείνουν να έχουν καλύτερη πρόγνωση.

Το βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα είναι μια κακοήθης μορφή μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα που αναπτύσσεται και πολλαπλασιάζεται εντός των κυψελίδων των πνευμόνων . Είναι μία από τις λίγες μορφές καρκίνου που δεν έχει καλοήθη τύπο: Κάθε εμφάνιση του καρκινώματος βρογχοκυψελιδικού τύπου θεωρείται κακοήθης. Αυτή η μορφή καρκίνου του πνεύμονα είναι η πιο κοινή σε μη καπνίστριες γυναίκες.

-Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα: 5% έως 10% των καρκίνων του πνεύμονα. Ονομάζεται έτσι επειδή τα καρκινικά κύτταρα είναι μεγάλα. Μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε περιοχή του πνεύμονα. Τείνει να αναπτυχθεί και να εξαπλωθεί γρήγορα, πράγμα που μπορεί να κάνει δυσκολότερη τη θεραπεία. Ένας υποτύπος καρκινώματος μεγάλων κυττάρων, γνωστός ως καρκίνωμα νευροενδοκρινικά

μεγάλων κυττάρων, είναι μια ταχέως αναπτυσσόμενη μορφή καρκίνου που είναι παρόμοια με τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

Άλλοι τύποι καρκίνου του πνεύμονα

Μαζί με τους 2 κύριους τύπους καρκίνου του πνεύμονα, άλλοι όγκοι μπορούν, λιγότερο συχνά, να αναπτυχθούν στους πνεύμονες:

Καρκινοειδείς όγκοι: Αφορούν λιγότερο από 5% των όγκων του πνεύμονα. Οι περισσότεροι έχουν αργή ανάπτυξη. Μερικοί τύποι καρκινοειδούς μπορεί να εξαπλωθούν, αλλά έχουν συνήθως καλύτερη πρόγνωση από του μικροκυτταρικού ή μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Λιγότερο συχνά είναι τα άτυπα καρκινοειδή. Η πρόγνωση για αυτούς τους όγκους είναι κάπου μεταξύ των τυπικών καρκινοειδών και του μικροκυτταριού καρκίνου του πνεύμονα.

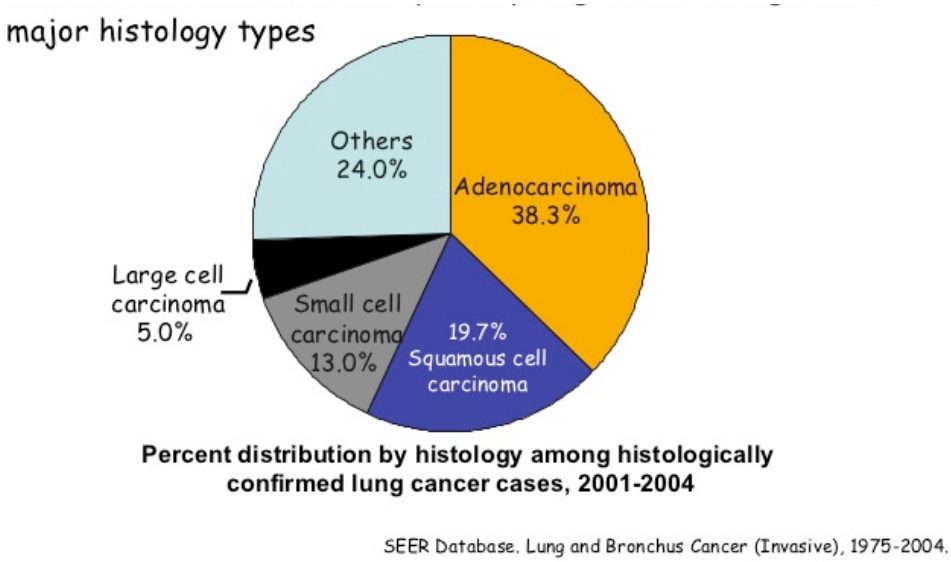
Άλλοι όγκοι του πνεύμονα

Άλλοι τύποι καρκίνου του πνεύμονα όπως αδενοκυστικά καρκινώματα, λεμφώματα, σαρκώματα και, καθώς καλοήθεις όγκοι των πνευμόνων όπως αμαρτώματα είναι σπάνιοι. Έχουν διαφορετικούς παράγοντες κινδύνου από τους πιο κοινούς καρκίνους των πνευμόνων.

Μεταστατικοί καρκίνοι των πνευμόνων

Καρκίνοι που ξεκινούν σε άλλα όργανα (όπως του μαστού, του παγκρέατος, των νεφρών, ή του δέρματος) μπορεί μερικές φορές να εξαπλωθούν (μετάσταση) στους πνεύμονες, αλλά δεν είναι καρκίνος του πνεύμονα. Για παράδειγμα, ο καρκίνος που ξεκινά στο μαστό και εξαπλώνεται στους πνεύμονες είναι ακόμα ο καρκίνος του μαστού. Η θεραπεία εξαρτάται από την προέλευση, δηλαδή το όργανο όπου εδρεύει η πρωτοπαθής εστία.

Οι υπότυποι του ΚΠ απεικονίζονται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Υπότυποι ΜΜΚΠ.

<u>Επιδημιολογικά δεδομένα</u>

Σε παγκόσμια κλίμακα, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου όσον αφορά στην επίπτωση αλλά και τη θνητότητα. Η πλειοψηφία σχετίζεται με το κάπνισμα, αν και έχουν ενοχοποιηθεί και άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ο καρκίνος του πνεύμονα παραμένει η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες και η δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες, με κατ' εκτίμηση να ευθύνεται για το ένα πέμπτο της θνητότητας παγκοσμίως (1,59 εκατομύρια θάνατοι, 19,4% των συνολικών θανάτων από καρκίνο. Εκτιμάται ότι αποτελεί περί το 13% (1,8 εκκατομύρια περιστατικά) όλων των πρωτοδιαγνώσεων καρκίνου για το 2012, φτάνοντας το 58% σε λιγότερο ανεπτυγμένες περιοχές. Για την Ελλάδα, ο πιο συχνός καρκίνος είναι ο καρκίνος του πνεύμονα (6.884 νέα κρούσματα και 6.434 θάνατοι το 2012) και ακολουθούν ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, ο καρκίνος του προστάτη και ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης.

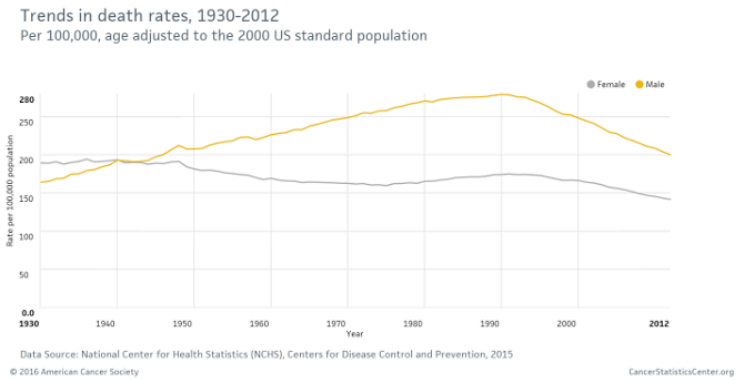
Στους άνδρες, τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης ΚΠ ήταν στη Βόρεια Αμερική, την Ευρώπη, την Ανατολική Ασία, την Αργεντινή και την Ουρουγουάη και τα χαμηλότερα ποσοστά ήταν στην υποσαχάρια Αφρική. Στις γυναίκες, τα υψηλότερα ποσοστά ΚΠ ήταν στη Βόρεια Αμερική, τη Βόρεια Ευρώπη, την Αυστραλία, τη Νέα Ζηλανδία και την Κίνα. Παρά τον χαμηλό επιπολασμό του καπνίσματος, τα ποσοστά

ΚΠ σε γυναίκες στην Κίνα (21,3 περιπτώσεις ανά 100.000 γυναίκες) ήταν υψηλότερα από τα αντίστοιχα ποσοστά σε γυναίκες κάποιας ευρωπαϊκής χώρας. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη ρύπανση του αέρα εσωτερικών χώρων από αναθυμιάσεις άνθρακα, που συνηθίζεται να χρησιμοποιείται ως καύσιμο για σόμπες και για το μαγείρεμα στην Κίνα (7). Παρά τις κάποιες βελτιώσεις στις χειρουργικές τεχνικές και στις συνδυασμένες θεραπείες κατά τις τελευταίες αρκετές δεκαετίες, ο καρκίνος του πνεύμονα παραμένει μία από τις πιο θανατηφόρες μορφές καρκίνου (8). Το σχετικό ποσοστό πενταετούς επιβίωσης για όλα τα στάδια συνολικά είναι περίπου 17% στις Ηνωμένες Πολιτείες για τα έτη 2002-2008 από 12% που ήταν τα έτη 1975-19776 . Το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης αγγίζει το 53% για τις περιπτώσεις που ανιχνεύονται όταν η νόσος παραμένει εντοπισμένη, αλλά μόνο το 15% των ΚΠ διαγιγνώσκονται σε αυτό το πρώιμο στάδιο.

2. Παράγοντες σχετιζόμενοι με την ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα

Κάπνισμα

Ο καρκίνος του πνεύμονος κατέχει το μεγαλύτερο ποσοστό θνητότητας και θνησιμότητας και στα δύο φύλα στις Η.Π.Α.. Σε σύγκριση με τα ποσοστά θνητότητας και θνησιμότητας του ΚΠ στην παρούσα εποχή (Εικόνα 2), το 1920 θεωρούταν σπάνια νόσος, αφού αναφέρονται μόνο 956 περιπτώσεις ΚΠ. Από το 1950 και μετά αναγνωρίστηκε ως σοβαρό πρόβλημα της δημόσιας υγείας (9). Η εντόπιση νέων περιστατικών σε άνδρες κορυφώθηκε τη δεκαετία του 1980 (με περίπου 87 ασθενείς άνα 100.000 άτομα), ενώ η επίπτωση της νόσου συνέχισε να αυξάνεται και στις γυναίκες, φτάνοντας τα 42 περιστατικά /100.000 το 1991. Μετά το 1982 η επίπτωση στους άντρες ισσορόπησε, ενώ για τις γυναίκες συνέχισε η αυξανόμενη πορεία αλλά με μικρότερο ρυθμό. Από το 1987 και μετά, η επίπωση της θνητότητας από ΚΠ στις γυναίκες υπερέβη αυτήν του καρκίνο μαστού, που αποτελούσε τη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο για τις γυναίκες για πάνω από 40 έτη.



Εικόνα 2. Τάσεις θνητότητας Κ.Π. (cancer.org)

Η αύξηση του ΚΠ είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αύξηση στην κατανάλωση καπνού και τσιγάρου. Στις Η.Π.Α. ο ΚΠ πήρε διαστάσεις τη δεκαετία του 1930 και του Πρώτου Παγκοσμίου Πολέμου, ιδιαίτερα στον αντρικό πληθυσμό, λόγω καπνίσματος. Παρόμοια αύξηση παρατηρήθηκε και στις γυναίκες κατά τον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο, έως και τη δεκαετία του 1960. Με βάση τα δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, έξι εκατομύρια άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο εξαιτίας του καπνίσματος παγκοσμίως. Οι πιθανότητες θανάτου από ΚΠ είναι εικοσιδύο φορές περισσότερες σε άνδρες καπνιστές και δώδεκα φορές σε γυναίκες σε σχέση με μη καπνιστές (10, 11).

Ηλικία

Η πιθανότητα εμφάνισης ΚΠ αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας, ανεξαρτήτως φύλου και φυλής. Με την αύξηση της ηλικίας δυσκολεύει η θεραπεία και μειώνεται η πιθανότητα αναστολής της θνησιμότητας μετά από θεραπευτικές παρεμβάσεις (12). Έχει παρατηρηθεί ότι η πιθανότητα εμφανίσεως αδενοκαρκινώματος, που αποτελεί το 50% του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (non-small cell lung cancer – NSCLC), είναι υψηλότερη σε νέους παρά σε ηλικιωμένους ασθενείς (13). Έχει επίσης προταθεί ότι ο ΚΠ παραμένει πιο επιθετικός σε νέους ασθενείς, δεν υπάρχουν όμως ακόμα αποδείξεις. Σοβαρό σημείο κλειδί για την πορεία της νόσου παραμένει η σταδιοποίηση του καρκίνου και την ιστολογία του (14).

Ο καρκίνος του πνεύμονα ξεκινά πιο συχνά στα επιθηλιακά κύτταρα των μεγαλύτερων σε διάμετρο βρόγχων ή μικρότερων δομών, όπως τα βρογχιόλια ή οι κυψελίδες.Οι καρκίνοι του πνεύμονα πιστεύεται ότι άρχονται ως προ-καρκινικές

εστίες. Αλλαγές στα γονίδια (DNA) των πνευμονικών κυττάρων μπορεί να προκαλέσουν τον ταχύτερο πολλαπλασιασμό τους. Τα κύτταρα αυτά μπορεί να φαίνονται λίγο ανώμαλα, αν τα δούμε κάτω από ένα μικροσκόπιο, αλλά σε αυτό το σημείο δεν σχηματίζουν ακόμη μια μάζα ή όγκο. Οι αλλαγές αυτές δεν φαίνονται στην ακτινογραφία και δεν προκαλούν συμπτώματα.Με την πάροδο του χρόνου, τα ανώμαλα κύτταρα αποκτούν επιπλέον γονιδιακές αλλαγές (καρκινική εξαλλαγή). Ως ένας καρκίνος που αναπτύσσεται, τα καρκινικά κύτταρα παράγουν χημικές ουσίες που προκαλούν το σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων σε κοντινή απόσταση. Αυτά τα αιμοφόρα αγγεία τρέφουν τα καρκινικά κύτταρα, τα οποία μπορούν να συνεχίσουν να αναπτύσσονται και να σχηματίσουν έναν όγκο αρκετά μεγάλο ώστε να είναι ορατός σε απεικονιστικές εξετάσεις όπως ακτινογραφίες.Σε κάποιο σημείο, κύτταρα από τον κυρίως καρκινικό όγκο μπορεί να ξεφύγουν και να εξαπλωθούν σε άλλα μέρη του σώματος (μετάσταση). Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι μια απειλητική για τη ζωή ασθένεια, επειδή τείνει να εξαπλωθεί με αυτόν τον τρόπο, ακόμη και πριν να μπορεί να ανιχνευθεί απεικονιστικά όπως μια ακτινογραφία θώρακος ή με την αξονική τομογραφία.

Περιβάλλον

Ο ΚΠ σχετίζεται με το επαγγελματικό περιβάλλον και με την έκθεση σε άλλους καρκινογόνους παράγοντες εκτός από το κάπνισμα (15). Τέτοιοι παράγοντες είναι το αρσενικό, ο αμίαντος, τύποι αιθέρα, η χρωμυκίνη, οι υδρογονάνθρακες, το αέριο μουστάρδας, το νίκελ και η ακτινοβολία. Σε βιομηχανίες και σύγχρονα ναυπηγεία η έκθεση σε αμίαντο αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα εμφανίσεως ΚΠ. Η έκθεση σε ουράνιο σε εργάτες ορυχείων έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση μικροκυτταρικού τύπου καρκίνου (small cell lung cancer- SCLC) και χαρακτηριστικό είναι πως τον 19ο αιώνα ο τύπος αυτός της νόσου ονομαζόταν «φθίσης ορυχείων». Ο Saccomanno και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν ηψηλά ποσοστά ΚΠ σε εργάτες ορυχείων του Κολοράντο οι οποίοι εκτίθονταν σε ουράνιο. Τα ποσοστά αυτά εκτοξεύονταν όταν συνυπήρχε και καπνιστική συνήθεια (16, 17).

Κληρονομικότητα

Είναι γνωστό ότι ένας μεγάλος αριθμός καπνιστών, συμπεριλαμβανομένων και βαρέων καπνιστών, δεν αναπτύσσουν καρκίνο του πνεύμονα. Πιθανώς, λοιπόν, η νόσος εξαρτάται και από τη γενετική προδιάθεση και ίσως και έτερα καρκινογόνα. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι πιθανότητες εμφάνισης ΚΠ δεν εξαρτώνται από το το

οικογενειακό ιστορικό. Γενετική ποικιλομορφία που αφορά σην απάντηση του σώματος σε ανοσολογικού τύπου συμβάντα ίσως να καθορίζει περισσότερο την άμυνα προς τα διάφορα καρκινογόνα και εν τέλει τις πιθανότητες εμφανίσεως ΚΠ. Άλλες μελέτες δείνουν ότι η ανάπτυξη του ΚΠ σε ενήλικες κάτω των 50 ετών συσχετιζόταν με ένα επικρατές σπάνιο αυτοσωμικό γονίδιο. Αυτό το γονίδιο δεν εντοπίστηκε σε πιο ηλικιωμένους ασθενείς με τη νόσο. Συνεπώς στους μεγαλύτερους, η βασική αιτία της νόσου παρέμενε η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου (17).

Γενετικές μεταβολές

Η αλματώδης ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας οδηγησε στην αναγνώριση γενετικών αλλαγών στον ανθρώπινο ΚΠ. Όμως, η ποικιλία γενετικών ανωμαλιών που έχουν εντοπιστεί έχει προκαλέσει σύγχυση ως προς την αξία τους στη δημιουργία αλλά και στην εξέλιξη του ΚΠ(6).

Ογκογονίδια

Πρόκειται για οικογένειες γονιδίων που η έκφραση τους επάγει την καρκινογένεση (Πίνακας 1).

Πίνακας 1.

Καρκίνος Πνεύμονα: Ογκογονίδια και Ογκοκατασταλτικά Γονίδια		
	SCLC	**NSCLC**
Ογκογονίδια	c-myc L-myc N-myc c-raf c-myb c-erbB1 (EGFR) c-fms c-rlf Telomerase GRP/BN	N-ras, K-ras, H-ras c-mycc c-raf c-fes c-fur c-erbB1 (EGFR) c-sis c-erbB2 (HER2/neu) Bcl1 MEK1 Braf Ros1
Ογκοκατασταλτικά γονίδια	p53, Rb, Pten	p53, Rb, Pten

Την τελευταία δεκαετία έχει καταστεί προφανές ότι οι υπότυποι του NSCLC μπορούν να ταξινομηθούν με βάση το μοριακό επίπεδο, με ορισμένες «οδηγές» μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε διάφορα ογκογονίδια. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα Akt1, Alk, Braf, Egfr, Her2, Kras, Mek1, Met, Nras, Pik3ca, Ret και Ros1 (18). Οι «οδηγές» μεταλλάξεις καταλήγουν σε ενεργοποίηση μεταλλαγμένων πρωτεϊνών σηματοδότησης που επάγουν και διατηρούν την καρκινογένεση. Αυτές οι μεταλλάξεις σπάνια βρίσκονται ταυτόχρονα στον ίδιο όγκο. Μεταλλάξεις ανευβρίσκονται σε όλους τους υπότυπους του NSCLC (αδενοκαρκίνωμα, πλακώδες και μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα) καθώς και σε όλους τους ενεργούς, πρώην και μη καπνιστές. Οι μη καπνιστές με αδενοκαρκίνωμα έχουν τη μεγαλύτερη επίπτωση σε μεταλλάξεις Egfr, Her2, Alk, Ret και Ros1.

Το μονοπάτι του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor, EGFR) είναι ένα από τα πιο συχνά απορυθμισμένα μονοπάτια στον ΜΜΚΠ. Η οικογένεια των EGFR υποδοχέων αποτελείται από διαμεμβρανικούς υποδοχείς τύπου τυροσινικής κινάσης (ΤΚ) και περιλαμβάνει τον EGFR (ή ERBB1 ή HER1), τον HER2 (ή ERBB2), τονHER3 (ή ERBB3), και τον HER4 (ή ERBB4). Ο καλύτερα μελετημένος ΤΚ υποδοχέας στον NSCLC είναι ο EGFR και οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του αποτελούν σήμερα τον κύριο μοριακό στόχο της νόσου. Οι μεταλλάξεις του EGFR είναι πιο συχνές σε ποτέ καπνίστριες με αδενοκαρκίνωμα από την Ανατολική Ασία. Εκτός από τις μεταλλάξεις του EGFR, η ευαισθησία στην αντι-EGFR θεραπεία επηρεάζεται και από άλλα μέλη της οικογένειας του EGFR, όπως τον HER2. Ο HER2 υπερεκφράζεται περίπου στο 20% των NSCLC και η υπερέκφραση αυτή στα πρώιμα στάδια του αδενοκαρκινώματος πνεύμονα έχει συνδεθεί με κακή πρόγνωση. Παρόλα αυτά, η ενεργοποίηση του HER2 από μόνη της σπάνια αποτελεί κλινικό πρόβλημα, αφού συνήθως σχετίζεται με ενεργοποίηση του EGFR και καλή ανταπόκριση στην αντι-EGFR θεραπεία. Εντούτοις, ένας σοβαρός περιορισμός της θεραπευτικής αυτής προσέγγισης ενάντια στον NSCLC είναι η επίκτητη αντοχή στη θεραπεία που αναπτύσσουν οι ασθενείς κατά τη διάρκεια ή μετά την ολοκλήρωσή της. Η εμφάνιση της EGFR T790M σημειακής μετάλλαξης αποτελεί πολύ καλά μελετημένο μηχανισμό δευτερογενούς αντοχής σε πάνω από το 68% των ασθενών με όγκους αρχικά ευαίσθητους στην αντι-EGFR θεραπεία. Σε άλλες περιπτώσεις, ενεργοποίηση του HER2 μπορεί να ευθύνεται για επίκτητη αντοχή στους EGFR αναστολείς (18).

Το μονοπάτι σηματοδοσίας της κινάσης της 3-φωσφοινοσιτίδης (PI3K) είναι επίσης πολύ συχνά ενεργοποιημένο στον NSCLC, μέσω μεταλλάξεων στα γονίδια

PIK3CA, AKT1 ή PTEN. Είναι αξιοσημείωτο ότι το γονίδιο PIK3CA είναι πιο συχνά ενεργοποιημένο στο ΚΠ από πλακώδη κύτταρα παρά στο αδενοκαρκίνωμα, ενώ μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN, αρνητικού ρυθμιστή του γονιδίου PIK3CA, εμφανίζονται σε ποσοστό 10% των ΚΠ (19). Τα γονίδια αυτά αποτελούν δυνητικούς στόχους ενάντια στο ΚΠ από πλακώδη κύτταρα, ενώ προκλινικές μελέτες ανέδειξαν πολλά υποσχόμενη αντικαρκινική δράση των αναστολέων του συγκεκριμένου μονοπατιού. Εκτός από σημειακές μεταλλάξεις, ενισχύσεις και απώλειες γονιδίων, στον NSCLC απαντώνται και μεταθέσεις. Το γονίδιο ELM4/ALK έχει καταδειχθεί ως αναπνευστικό ογκογονίδιο και οι ασθενείς που εκφράζουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη σε δείγματα όγκων τους παρουσιάζουν καλή ανταπόκριση στον αναστολέα της ALK κριζοτινίμπη. Επομένως, το γονίδιο ELM4/ALK αποτελεί σημαντικό μοριακό στόχο για το θεραπευτικό χειρισμό του NSCLC (20).

Μια από τις πρώτες γονιδιακές αλλαγές που σχετίστηκαν με τον ΚΠ ήταν η ενίσχυση του ογκογονιδίου c-myc, όπως παρατηρήθηκε κυρίως σε μικροκυτταρικούς καρκίνους πνεύμονα (SCLC). Τα κύτταρα που χαρακτηρίζονταν από αυτή την γονιδιακή ενίσχυση παρουσίαζαν πολύ γρήγορο διπλασιασμό, υψηλότερες κλωνικές σταθερές και μεγαλύτερη αντοχή στην ακτινοβολία από άλλους τύπους SCLC (19, 20). Η συνολική αξία της υπερέκφρασης της οικογένειας γονιδίων myc δεν έχει πλήρως ξεκαθαριστεί. Γενικά οι κυτταρικές σειρές με την τροποποιημένη μορφολογία ήταν πιο ανθεκτικές στη χημειοθεραπεία και στην ακτινοθεραπεία και στους δύο βασικές κατηγορίες καρκίνου (SCLC, NSCLC) (16). Όμως, μάλλον δεν αποτελεί πρωτογενές φαινόμενο αφού εμφανίζεται σε μειονότητα καρκίνων (21, 22).

Η οικογένεια ras (ομόλογη με τον ιό του σαρκώματος των ποντικιών) έχει τρία κύρια μέλη γονιδίων, τα H-ras, τα K-ras και τα N-ras τα οποία είναι τα περισσότερο ενεργοποιημένα ογκογονίδια εντοπιζόμενα σε ανθρώπινο καρκίνο. Κωδικοποιούν μια πρωτεϊνη cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21) η οποία βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματοκυτταρικής μεμβράνης, έχουν δραστηριότητα GTPάσης και μπορούν να συμμετέχουν στη μεταφορά σημάτων. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων EGFR και KRAS είναι αμοιβαία αποκλειόμενες και η μη φυσιολογική ενεργοποίηση του μονοπατιού του KRAS έχει σχετιστεί με πρωτοπαθή αντοχή στους αναστολείς EGFR. Οι μεταλλάξεις του KRAS έχουν ως αποτέλεσμα τη συστατική ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού RAF–MEK–ERK.

Μελέτες σε ποντίκια με καρκίνο πνεύμονος ενοχοποιούν γονίδια ras για την εξέλιξη της καρκινογένεσης. Οι μεταλλάξεις αφορούσαν κυρίως GC με AT αλλαγές

υποδεικνύοντας ότι η μεθυλίωση του DNA αποτελεί πιθανότατα τον κύριο λόγο αυξήσεως της νεοπλασίας από αυτά τα καρκινογόνα. Οι μελέτες υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση των ras συμβάλλει στην ανάπτυξη ΚΠ. Η ενεργοποίηση ras αφορά το ένα τρίτο περίπου των αδενοκαρκινωμάτων του ΚΠ ασθενών με βαρύ ιστορικό καπνίσματος (23, 24).

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια σχετίζονται με ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και κυτταρική ανάπτυξη και είναι συνεπώς υπεύθυνα για καρκινογένεση. Ο ρόλος τους στην καρκινογένεση σχετίζεται με την απενεργοποίηση άλλων γονιδίων, η οποία μπορεί να συντελέσει στην ανάπτυξη κάποιου όγκου (25). Η συχνή εμφάνιση χρωμοσωμιακών διαγραφών στα SCLC και στα NSCLC υποδηλώνει ότι η απώλεια ειδικής γονιδιακής λειτουργίας μπορεί να είναι ένα κρίσιμο βήμα για την ανάπτυξη καρκίνου πνεύμονα. Δύο πολύ σημαντικά ογκοκατασταλτικά γονίδια στον καρκίνο του πνεύμονα είναι οι πυρηνικές φωσφοπρωτεϊνες p53 και Rb (26-28). Το γονίδιο p53 κωδικοποιεί μια πρωτεϊνη 375 αμινοξέων η οποία μπορεί και σχηματίζει σύμπλοκα με άλλες μεγάλες πρωτεϊνες όπως το αντιγόνο T και η end-binding protein 1 (E1B). Οι μεταλλάξεις του γονιδίου είναι συχνές σε πληθώρα καρκίνων. Ο ακριβής ρόλος αυτών των μεταλλάξεων αποτελεί και σήμερα θέμα προς διερεύνηση (29). Αρκετά ακόμα γονίδια έχουν θεωρηθεί υποψήφια ως ογκοκατασταλτικά. Το γονίδιο p16 είναι συχνά απενεργοποιημένο σε αρκετούς καρκίνους, όπως και στον καρκίνο του πνεύμονα. Άλλα γονίδια λιγότερο συχνά αναφερόμενα είναι τα Phosphatase και tensin homolog (PTEN), Candida albicans HOG1 και η BRCA associated protein (BAP1).

3. Κλινική συμπτωματολογία καρκίνου πνεύμονα

Τα συστηματικά - μη ειδικά σημεία και συμπτώματα είναι κοινά τόσο στα SCLC όσο και στα NSCLC, ενώ διαφέρουν ανάλογα με την εντόπιση και το μέγεθος του όγκου. Οι κεντρικοί ως προς τη θέση όγκοι προκαλούν βήχα, εντοπισμένο συριγμό, αιμόπτυση αλλά και συμπτώματα απόφραξης του αεραγωγού. Τα συμπτώματα και σημεία προκαλούνται από τον πρωτοπαθή όγκο, τις μεταστάσεις και τα παρανεοπλασματικά σύνδρομα.

Τα κυριότερα συμπτώματα από τον καρκίνο του πνεύμονα είναι τα εξής:

- Βήχας
- Δύσπνοια
- Αιμόπτυση

- Θωρακικό άλγος
- Βράγχος φωνής
- Υποτροπιάζουσες λοιμώξεις
- Γενικά συμπτώματα ανορεξία, κακουχία, απώλεια βάρους
- οστικά άλγη
- Νευρολογικές εκδηλώσεις
- Δυσφαγία
- Σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας
- Σύνδρομο Horner

Τα παρανεοπλασματικά σύνδρομα είναι πιο συχνά στο SCLC και σχετίζονται με την παραγωγή πολυπεπτιδικών ορμονών. Περιγράφονται στα πλαίσια αυτά το Σύνδρομο απρόσφορης έκκρισης αντιδιουριτικής ορμόνης, η παραγωγή Έκτοπου αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης, υπερασβεστιαιμία, νευρομυοπάθειες και Σύνδρομο Lambert –Eaton και τέλος υπερτροφική πνευμονική οστεοαρθροπάθεια.

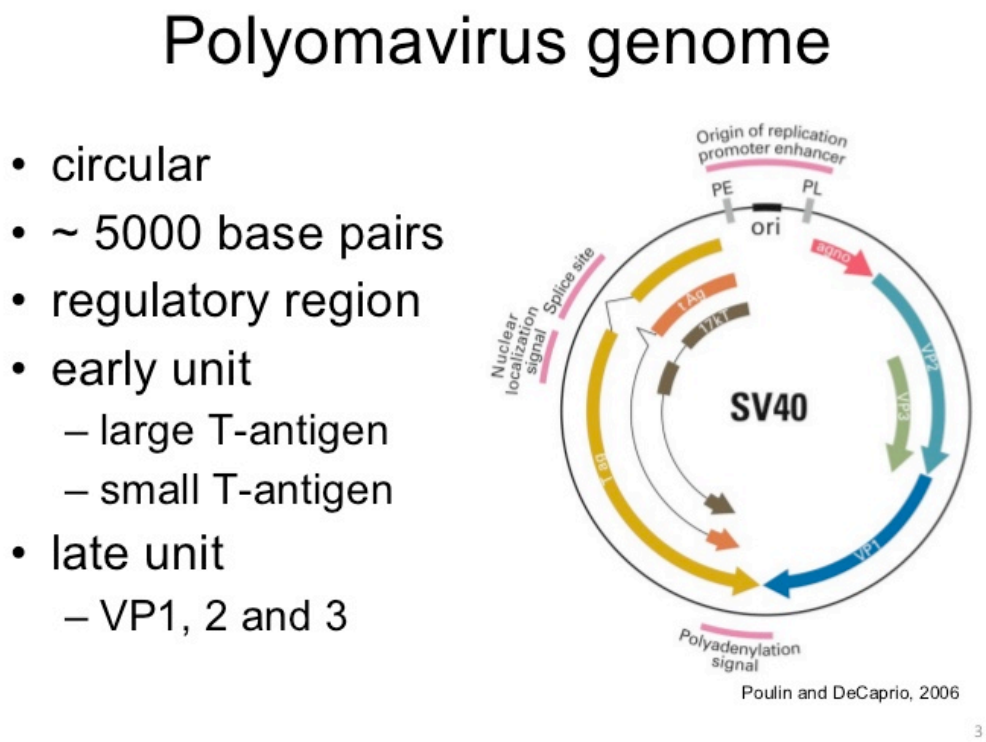
Συνήθως η διάγνωση γίνεται στα πλαίσια της διερεύνησης κάποιων από τα παραπάνω συμπτώματα. Η πρώτη εξέταση που γίνεται είναι συνήθως μια ακτινογραφία θώρακος, στην οποία μπορεί να φαίνεται ο καρκίνος του πνεύμονα. Ακολούθως, πραγματοποιείται αξονική τομογραφία θώρακος (CT) για τον ακριβή καθορισμό της θέσης του όγκου και την εκτίμηση των λεμφαδένων του μεσοθωρακίου. Στη συνέχεια, είναι απαραίτητη η λήψη βιοψίας από τον καρκίνο ή και από τυχόν ύποπτους λεμφαδένες, αφού ο ιστολογικός τύπος του όγκου σε συνδυασμό με την έκταση της νόσου θα καθορίσουν το είδος της θεραπείας. Η βιοψία γίνεται συνήθως με βρογχοσκόπηση και ορισμένες φορές, όταν αυτό δεν είναι εφικτό, μπορεί να γίνει με διαδερμική παρακέντηση της μάζας υπό απεικονιστική καθοδήγηση με CT. Τέλος, σε κάποιες περιπτώσεις η ταυτοποίηση του όγκου μπορεί να γίνει με κυτταρολογική εξέταση των πτυέλων του ασθενούς. Άλλες διαγνωστικές εξετάσεις που μπορεί να γίνουν είναι: CT κοιλίας και εγκεφάλου, σπινθηρογράφημα οστών, PET–CT, και ενδοσκοπικό υπερηχογράφημα (EUS).

4. Πολυόμα ιοί και Καρκίνος

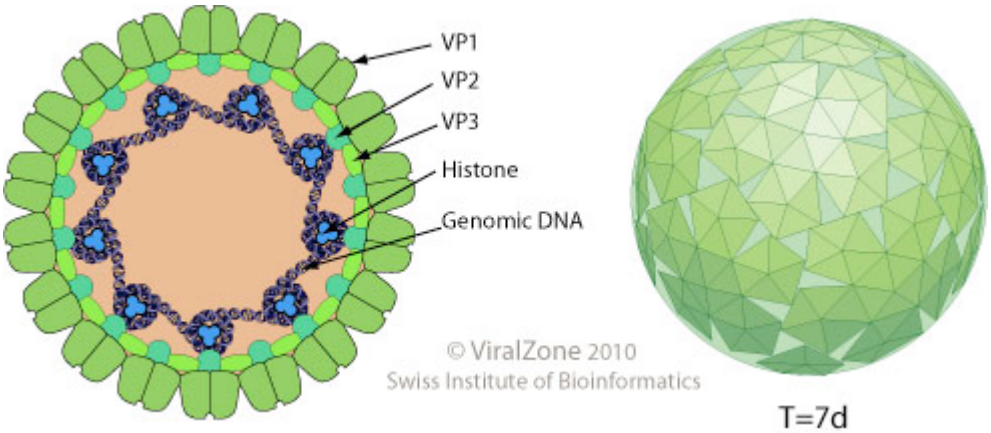
Δομή

Οι πολυόμα ιοί είναι DNA ιοί (δίκλωνο DNA, ~5.000 ζεύγη βάσεων, κυκλικό γονιδίωμα), μικροί (40-50 nm σε διάμετρο), έχουν εικοσαεδρική δομή και δεν περιβάλλονται από λιποπρωτεϊνικό φάκελο. Οι κύριες ρυθμιστικές πρωτεΐνες τους

είναι οι large tumor antigen (LT-ag) και small tumor antigen (st-ag) (Εικόνα 3), ενώ τουλάχιστον δυο δομικές πρωτεΐνες (VP1 and VP2) δημιουργούν το καψίδιο (Εικόνα 4). Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες εκφράζονται πρώιμα κατά τη μόλυνση και συμμετέχουν στην ιική μεταγραφή και τον ιικό πολλαπλασιασμό, ενώ οι δομικές πρωτεΐνες εκφράζονται όψιμα στον ιικό κύκλο μόλυνσης (30). Πολλοί πολυόμα ιοί κωδικοποιούν επιπλέον ρυθμιστικές και δομικές πρωτεΐνες (για παράδειγμα ALTO, VP3, VP4, agnoprotein) (31, 32). Είναι δυνητικά ογκογόνοι (προκαλούν δηλαδή τη δημιουργία όγκων) και συχνά επιμένουν προκαλώντας λανθάνουσες μολύνσεις στον ξενιστή χωρίς να προκαλούν έκδηλη νόσο, αλλά μπορεί να προκαλέσουν την εμφάνιση όγκων σε ένα ξενιστή διαφορετικού είδους ή σε έναν ξενιστή με ένα αναποτελεσματικό ανοσοποιητικό σύστημα.



Εικόνα 3. Γονιδίωμα Πολυόμα ιών.



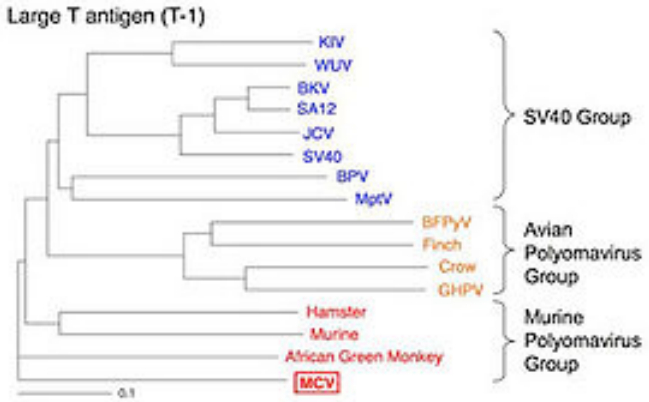
Εικόνα 4. Καψίδιο και δομικές πρωτεΐνες.

Ιστορία και ξενιστές

Ο πρώτος πολυόμα ιός ανακαλύφθηκε σε ποντίκια με λευχαιμία τη δεκαετία του 1950 από τους Ludwik Gross, Sarah Stewart και Bernice Eddy (33). Έδειξαν ότι το διήθημα από τα πειραματόζωα μπορούσε να προκαλέσει ογκογένεση σε νεογέννητα ποντίκια και αργότερα αποδείχθηκε ότι αυτοί οι όγκοι ήταν στην πραγματικότητα ιοί. Από εκεί και πήραν το όνομά τους, Πολυόμα (Polyoma) το οποίο αναφέρεται στην ικανότητα των ιών να δημιουργούν πολλαπλούς (poly-) όγκους (-oma). Ο πρώτος πολυόμα ιός σε πρωτεύον απομονώθηκε το 1960 (34). Ο ιός αυτός, Simian virus 40 (SV40), είχε την ικανότητα να μετασχηματίζει κύτταρα, περιλαμβανομένων και των ανθρώπινων, ώστε να παράγουν όγκους σε μοντέλα ζώων καθώς και να είναι παρόν σε ανθρώπινους καρκίνους. Η ογκογενετική δυνατότητα του SV40 βασίζεται στο LT-ag, το οποίο μπορεί να συνδεθεί με τα ογκοκατασταλτικά γονίδια p53 και pRb, να παρέμβει στην επιδιόρθωση του DNA, την απόπτωση, την κυτταρική μεταγραφή, την πρωτεινική αποδόμηση, τη λειτουργία τελομεράσης, ανοσολογικές και φλεγμονώδεις απαντήσεις, να επάγει την αγγειογένεση και την κυτταρική μετανάστευση. Το SV40 st-ag μπορεί να συνδράμει το μετασχηματισμό μέσω της απενεργοποίησης της πρωτεινικής φωσφατάσης 2A (35, 36). Εκτός του SV40 και του θαλάσσιου πολυόμα ιού, άλλοι μη ανθρώπινοι πολυόμα ιοί, όπως ο πολυόμα ιός των χάμστερ, ο λεμφοτρόπος πολυόμα ιός και ο simian agent 12 έχουν φανεί να κατέχουν ογκογενιτικές ιδιότητες σε κυτταρικές καλλιέργειες ή μοντέλα ζώων (37-39). Όμως, ο ογκογενετικός ρόλος των ιών αυτών στο φυσικό τους ξενιστή παραμένει ασαφής. Στην πραγματικότητα, μόνο ένας πολυόμα ιός θηλαστικών φαίνεται να είναι σαφώς συσχετισμένος με καρκίνο στο φυσικό ξενιστή του. Ο πολύόμα ιός των προκύων [Raccoon polyomavirus (RacPyV)] πρωτοαναγνωρίστηκε σε όγκους μετωπιαίων λοβών και οσφρητικών οδών από προκύωνες (40). Μια

περίπτωση λεμφώματος από πολυόμα ιό σε χάμστερ εκτός εργαστηρίου έχει περιγραφεί (41), ενώ δυο νέοι πολυόμα ιοί θηλαστικών έχουν απομονωθέι από καλοήθεις όγκους: ένας πολυόμα ιός από ινοθήλωμα γλώσσας θαλάσσιου ελέφαντα και ολόκληρο το γένωμα ενός άλλου πολυόμα ιού κλωνοποιήθηκε από βιοψία ινώματος προβοσκίδας Αφρικανικού ελέφαντα (42, 43). Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να διερευνηθεί η πιθανότητα αυτά τα θηλαστικά να είναι ο αληθινός ξενιστής καθώς και εάν αυτοί οι πολυόμα ιοί είναι οι αιτιολογικοί λοιμωξιογόνοι παράγοντες αυτών των υπερπλαστικών ινωτικών ιστών στους φυσικούς ξενιστές τους. Σε αντίθεση, πο πολυόμα ιοί των πουλιών δεν φαίνεται να προκαλούν καρκίνους. Παρόλη την παρόμοια γενετική οργάνωση με τους πολυόμα ιούς των θηλαστικών, τα LT-ag τους δεν περιλαμβάνουν ομόλογες περιοχές με τις αλληλουχίες που προσδένουν το p53 και δεν προσδένονται όλα τα LT-ag των πολυόμα ιών των πτηνών την περιοχή LXCXE που χρειάζεται για την πρόσδεση στην pRB1 (44).

Μέχρι πρόσφατα, η οικογένεια των ιών Polyomaviridae περιείχε μόνο ένα γένος (Polyomavirus). Πολύ πρόσφατα (45) έγινε αναταξινόμηση της οικογένειας και περιλαμβάνει πλέον 3 γένη: Orthopolyomavirus, Wukipolyomavirus και Avipolyomavirus (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Οικογενειακό δένδρο της οικογένειας των Πολυόμα ιών με βάση το Large T antigen.

<u>Πολυόμα ιοί και Άνθρωπος</u>

Οι πρώτοι δύο Polyoma ιοί απομονώθηκαν από ανθρώπους το 1971 και ονομάστηκαν από τα αρχικά των ασθενών από τους οποίους ανιχνεύθηκαν: ο BK Polyoma ιός (BKPyV) και ο JC ιός (JCPyV) (46, 47). Και οι δυο ιοί παρουσιάζουν γενομική οργάνωση που μοιάζει πιο πολύ με του SV40 παρά με του θαλάσσιου πολυόμα-ιού. Στους τρεις πρώτους απουσιάζει το μεσαίο Τ-αντιγόνο που

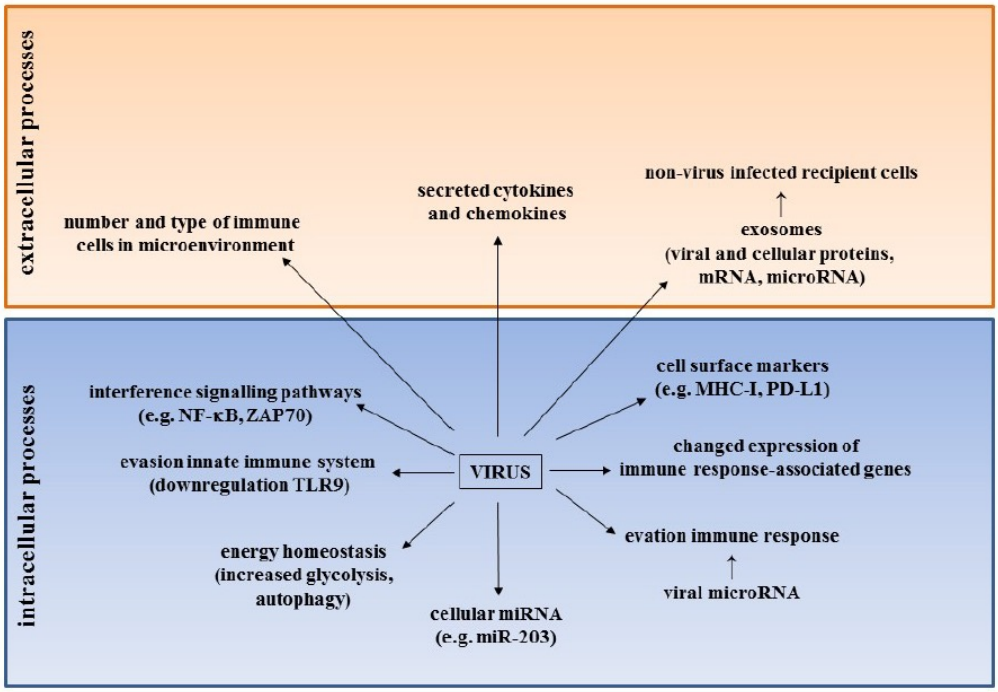
κωδικοποιείται από το θαλάσσιο πουόμα-ιό, ενώ έχουν ένα επιπλέον όψιμο γονίδιο που αναφέρεται ως agnogene (30). Ο ιός JC, ο οποίος μπορεί να μολύνει το αναπνευστικό σύστημα, τους νεφρούς, τον εγκέφαλο (μερικές φορές μπορεί να προκαλέσει την θανατηφόρα προοδευτική πολυεστιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια) και ο ιός BK ο οποίος προκαλεί μια ήπια λοίμωξη του αναπνευστικού και μπορεί να επηρεάσει τους νεφρούς ανοσοκατασταλμένων ασθενών με μεταμόσχευση. Και οι δύο ιοί είναι πολύ διαδεδομένοι: περίπου το 80% του ενήλικου πληθυσμού στις ΗΠΑ έχουν αντισώματα για τους ιούς JC και BK. Δύο μετέπειτα ανακαλυφθέντες ιοί Polyoma, ο ιός KI (Karolinska Institute) και ο ιός WU (Washington University), στενά συγγενικοί μεταξύ τους, έχουν απομονωθεί από εκκρίσεις του αναπνευστικού συστήματος. Τον Ιανουάριο του 2008, περιγράφηκε ένα νέο είδος Polyoma ιού των κυττάρων Merkel και χαρακτηρίστηκε ως ο πιο πιθανός αιτιολογικός παράγοντας του καρκίνου των κυττάρων Merkel (καρκίνωμα δέρματος). Από το 2007, συνολικά έντεκα νέοι πολυόμα ιοί έχουν βρεθεί στον άνθρωπο: KIPyV, WUPyV, Merkel cell PyV (MCPyV), HPyV6, HPyV7, *Trichodysplasia spinulosa*-associated PyV (TSPyV), HPyV9, HPyV10 (και οι MW και MX), STLPyV, HPyV12, και NJPyV-2013 (48-60). Ο επιπολασμός στον ορό των διάφορων πολυόμα ιών στον άνθρωπο κυμαίνεται από ~25% έως ~100%, ανάλογα με τον ιό. Ο υψηλός ορο-επιπολασμός δείχνει ότι αυτοί οι ιοί είναι αρκετά συχνοί στους ενήλικες (61-63). Όλοι οι ιοί Πολυόμα είναι ιδιαίτερα συχνοί στην παιδική ηλικία και στους νέους ενήλικες (64-66). Οι περισσότερες από αυτές τις μολύνσεις φαίνεται να προκαλούν λίγα ή και καθόλου συμπτώματα. Είναι πιθανόν αυτοί οι ιοί να παραμένουν δια βίου σχεδόν σε όλους τους ενήλικες. Τα νοσήματα που προκαλούνται στους ανθρώπους από τους ιούς Polyoma είναι πιο συχνά μεταξύ ανοσοκατεσταλμένων ατόμων είτε λόγω AIDS ή γήρατος ή μετά από μεταμόσχευση (67).

Ενώ οι ογκογενετικές ιδιότητες των BKPyV, JCPyV και MCPyV σε κυτταρικές καλλιέργειες και μοντέλα ζώων έχουν περιγραφεί καλά (68-71), μόνο ο MCPyV φαίνεται να σχετίζεται με καρκίνο στο φυσικό ξενιστή του. Περίπου το 80% του Καρκινώματος από κύτταρα δέρματος Μέρκελ (Merkel cell carcinoma - MCC) είναι θετικό για γένωμα MCPyV, το οποίο τυπικά ενσωματώνεται και κωδικοποιεί ένα κολόβωμα του LT-ag (72). DNA, RNA καθώς και πρωτεΐνες των BKPyV και JCPyV έχουν ανιχνευθεί σε αρκετούς ιστούς από όγκους, αλλά συχνά ανευρίσκονται και σε μάρτυρες ιστούς χωρίς νεοπλασίες (73-75). Συνεπώς, μια αιτιολογική σχέση μεταξύ των ιών αυτών και του ανθρώπινου καρκίνου παραμένει αμφιλεγόμενη, αν και η παρουσία του BKPyV ίσως να αυξάνει τον κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου

νεφρού και προστάτη, ενώ ο JCPyV ίσως να σχετίζεται με καρκίνο του ορθού και του κεντρικού νευρικού συστήματος (76-79). Ο σχετιζόμενος με τους πολυόμα ιούς καρκίνος του ορθού μπορεί να οφείλεται σε άλλους πολυόμα ιούς που υπάρχουν στο κρέας, όπως πρότεινε ο Harald zur Hausen (80). Πρόσφατες αναλύσεις δειγμάτων βόειου κρέατος ανέδειξαν αρκετούς πολυόμα ιούς βοειδών συγγενικούς μς τους ανθρώπινους πολυόμα ιούς MCPyV, HPyV 6, HPyV7 ή άλλους ζωικούς πολυόμα ιούς, συμπεριλαμβανομένων και των πολυόμα ιών της φρουτονυχτερίδας, των προκυώνων και των χιμπατζήδων (81, 82). Δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί εάν οι ιοί αυτοί μπορούν να ανιχνευθούν σε βιοψίες ανθρώπινου καρκίνου του ορθού. Με βάση την παρούσα γνώση, πειστική απόδειξη του ρόλου τους σε αυτές τις νεοπλασίες εκλείπει.

Πολυόμα ιοί και Χαρακτηριστικά του Καρκίνου

Άτομα με δυσλειτουργικό ανοσοποιητικό σύστημα είναι πιο επιρρεπή σε νόσο, λοιμώξεις και (επαγώμενο από ιούς) καρκίνο (83) (Εικόνα 6). Επιπρόσθετα, οι ογκοϊοί μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονή, η οποία προδιαθέτει τα κύτταρα του ξενιστή στην απόκτηση καρκινογόνων μεταλλάξεων (84). Σύμφωνα με την υπόθεση της καρκινικής ανοσοτροποποίησης, τα καρκινικά κύτταρα έχουν ανάγκη να ξεπεράσουν διαδοχικά και με επάρκεια διακριτές φάσεις για να αποκτήσουν καρκινική εκδήλωση και ανάπτυξη. Αυτές οι φάσεις αφορούν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ανοσοποιητικού και του καρκινικού κυττάρου και περιλαμβάνουν την εξάλειψη των πρόσφατα μετασχηματισμένων κύτταρων, μία ισορροπία στην οποία το ανοσοποιητικό σύστημα περιορίζει την έκφυση των όγκων, και μια απόδραση στην οποία τα κύτταρα του όγκου είναι σε θέση να παρακάμψουν τις φάσεις ανοσοαπόκρισης του ξενιστή (85-87). Για να προκαλέσει ένας ιός όγκους, χρειάζονται να παρακάμψουν την αποβολή από το ανοσοποιητικό σύστημα και να επάγουν εναλλαγές στο μικροπεριβάλλον του όγκου, συμπεριλαμβανομένου του μολυσμένου κύτταρου επιτρέποντας το μετασχηματισμένο από ιό κύτταρο να προοδεύσει (88, 89).



Εικόνα 6. Νέοι μηχανισμοί που οι Πολυόμα ιοί προκαλούν καρκίνο.

(Creative Commons Attribution license from *The Role of Merkel Cell Polyomavirus and Other Human Polyomaviruses in Emerging Hallmarks of Cancer* Review)

Επιδημιολογικά στοιχεία δείχνουν ότι οι ασθενείς με δυσλειτουργία των Τ κυττάρων βρίσκονται σε 5- έως 50-φορές αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης MCC, υποδεικνύοντας έτσι τη σημασία του ανοσοποιητικού συστήματος. Ωστόσο, ανοσοεπαρκή άτομα μπορούν επίσης να αναπτύξουν MCPyV-θετικά MCC, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο ιός και μολυσμένα με ιό κύτταρα μπορεί να αποφύγουν την αποβολή από το ανοσοποιητικό σύστημα. Ένας μηχανισμός με τον οποίο ο MCPyV παρακάμπτει το ανοσοποιητικό σύστημα είναι να μειώσει τον μηχανισμό της έμφυτης άμυνας. Τα MCPyV LT-ag και st-ag μειώνουν την έκφραση του Toll-like Receptor 9 (TLR9), ένα σημαντικό υποδοχέα της έμφυτης άμυνας του ξενιστή που αναγνωρίζει ιογενή dsDNA σε επιθηλιακά κύτταρα και MCC κύτταρα (90).

Για να διερευνηθούν οι φλεγμονώδεις ρυθμιστές στο MCC που απαιτούνται για τη διαφυγή του όγκου από το ανοσοποιητικό, και να συμπεράνουμε μια πιθανή συμβολή του MCPyV στην ογκογένεση, αρκετές ομάδες έχουν εξετάσει ανοσοκύτταρα και φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές ιού-θετικών και ιού-αρνητικών MCC. Σε σύγκριση με τους όγκους του ιού-αρνητικό, ένας μεγαλύτερος αριθμός διηθητικών CD8 + Τ-κύτταρα σε MCPyV-θετικά MCC έχει παρατηρηθεί (91-93), ενώ άλλοι ερευνητές δεν έχουν ανιχνεύσει μια σχέση με την κατάσταση του ιού και τον αριθμό των εντός του όγκου CD8 + Τ-κυττάρων (94, 95). Άλλες διαφορές στο

μικροπεριβάλλον του ιού-θετικών και ιού-αρνητικών MCC περιλαμβάνουν μεγαλύτερο αριθμό των CD3 + Τ-κυττάρων, CD20 + Β κύτταρα, φυσικά κύτταρα φονείς CD16 +, και CD68 +, CD69 +, CD163 + μακροφάγα (91, 92, 95-98).

Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο μπορεί να επηρεάσουν οι HPyV τη γονιδιακή έκφραση είναι μέσω των microRNA. Τα microRNAs (miRNAs) είναι μικρά RNAs που μπορούν να μειώνουν την παραγωγή πρωτεΐνης είτε με αποδόμηση των μεταγράφων ή την αναστολή της μετάφρασης του mRNA. Το SV40 miRNA, το πρώτη PYV miRNA που περιγράφηκε, έδειξε ότι μειώνει τη λύση των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων και την απελευθέρωση IFN-γ (99), ενώ φαίνεται οι HPyV να εφαρμόζουν διαφορετικές στρατηγικές για να ξεφύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα BKPyV, JCPyV και MCPyV miRNA δεν ήταν σε θέση να αναστέλλουν την επαγόμενη από IFN-μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης (100), αλλά τα BKPyV και JCPyV miRNAs ανέστειλαν την μετάφραση του mRNA της UL16-binding protein 3 (ULBP3) (101). Το ULBP3 αναγνωρίζεται και συνδέεται με τον υποδοχέα D της φυσικής ομάδας δολοφόνος 2 (NKG2D). Ο NKG2D εκφράζεται από NK και CD8 + Τ-κύτταρα και συνδεόμενος με το ULBP3 πυροδοτεί θανάτωση του κυττάρου-στόχου (102). Κατά συνέπεια, τα BKPyV- και JCPyV μολυσμένα κύτταρα μπορούν να ξεφύγουν από την δειμέσου NKG2D θανάτωση και παρακάμπτουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Οι πρωτεΐνες PSME3 και PIK3CD/p110δ, οι οποίες εμπλέκονται στην ανοσολογική λειτουργία, είχαν προβλεφθεί να είναι υποθετικοί στόχοι για τα MCPyV miRNA (103). Το PSME3 είναι μια υπομονάδα ενός πρωτεοσώματος υπεύθυνο για την παραγωγή των πεπτιδίων που φορτώνονται σε MHC I, και το PI3KCD παίζει ένα μοναδικό ρόλο στη σηματοδότηση υποδοχέα αντιγόνου με ενεργοποίηση Τ-κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό των Β-κυττάρων (104-106). Η έλλειψη αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να αποτρέψει την εκκαθάριση από το ανοσοποιητικό της λοίμωξης από MCPyV, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο η ιογενής λοίμωξη να διατηρηθεί.

Ορισμένοι ιοί πολυόμα δείχνουν να εκφράζουν ιικά miRNA, ενώ άλλοι μπορεί να κωδικοποιούν ένα υποθετικό miRNA (107-109). Παρά το γεγονός ότι αρκετά ιικά miRNAs έχουν προταθεί να παίζουν ένα ρόλο στον καρκίνο (110), μια άμεση συνέπεια των HPyV miRNA στον καρκίνο δεν έχει ταυτοποιηθεί. Επειδή οι RacPyV και MCPyV είναι οι μόνοι PYV που σχετίζονται με τον καρκίνο στο φυσικό τους ξενιστή, εξετάστηκε η έκφραση του miRNAs τους σε όγκους. Τα RacPyV miRNA ήταν από τα πιο άφθονα miRNAs ανιχνεύσιμα σε RacPyV που σχετίζεται με όγκους, αλλά δεν παρατηρήθηκε σε RacPyV αρνητικούς υγιείς ιστούς προκύωνα

(109). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με MCPyV-θετικό MCC, όπου το ιικό miRNA είναι ανιχνεύσιμο μόνο σε λιγότερο από το μισό των όγκων που ερευνήθηκαν, και όταν υπάρχουν, τα επίπεδα MCPyV miRNA ήταν <0,025% του συνόλου των miRNAs στην MCPyV -θετικό MCC (111). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι τα MCPyV miRNA δεν εμπλέκονται στο MCC. Τα PYV miRNA μπορούν να διαμορφώσουν βιολογικές δραστηριότητες που μπορούν να συμβάλλουν στην κακοήθεια, όπως να αποφύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα, την απόπτωση και διαταραχή έκφρασης κυτταρικών γονιδίων(112, 113). Τα MCPyV miRNA στοχεύουν την πρωτεΐνη AMBRA1 στο κύτταρο ξενιστή, η οποία εμπλέκεται στην αυτοφαγία και απόπτωση (114). Παρεκκλίνουσα έκφραση κυτταρικών γονιδίων μπορεί να προωθήσει νεοπλασματική εξέλιξη, και τα PYV miRNAs μπορούν να διαταράξουν την έκφραση κυτταρικών γονιδίων παρεμβαίνοντας με συρραφή, έτσι στοχεύοντας παράγοντες μεταγραφής ή πρωτεΐνες που ελέγχουν τη δραστηριότητα των παραγόντων μεταγραφής, ή με την επαγωγή έκφρασης της κυτταρικών miRNAs. Ιογενής λοίμωξη μπορεί να προκαλέσει μια μοναδική υπογραφή των miRNAs του κύτταρου ξενιστή, το οποίο μπορεί να συμβάλει στην ιογενή παθογόνα διεργασία (115).

Ωστόσο, ένα κοινό χαρακτηριστικό που μοιράζονται όλοι οι γνωστοί PYV miRNA είναι η αποσιώπηση του LT-ag, έτσι ώστε να μην αναμένεται καμία επίδραση στην έκφραση κυτταρικών miRNA (99, 100). Από την άλλη μεριά, παρεμβολή με την έκφραση κυτταρικών miRNA είναι εύλογη σε MCPyV-θετικούς όγκους επειδή οι MCC εκφράζουν LT-AG (116). Η επίδραση του LT-ag στην έκφραση κυτταρικών miRNA δεν έχει διερευνηθεί, αλλά οι πρωτεΐνες των ογκοϊών HBV, EBV, KSHV και HCV συμβάλλουν στη ρύθμιση των επιπέδων των κυτταρικών miRNAs, συμπεριλαμβανομένων των ογκογόνων miRNAs (117-122). Η σύγκριση του miRNA προφίλ σε MCPyV-θετικά και αρνητικά MCC ανέδειξε ότι το miR-203 ήταν σημαντικά χαμηλότερο σε MCPyV-θετικά MCC σε σύγκριση με MCPyV-αρνητικά MCC. Η υπερέκφραση του miR-203 σε MCPyV-αρνητικά MCC ανέστειλε την ανάπτυξη των κυττάρων και προκάλεσε διακοπή του κυτταρικού κύκλου (123). Ο MCPyV μπορεί να προκαλέσει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων καταστέλλοντας την έκφραση του miR-203, αλλά ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο μπορεί να ρυθμίζει MCPyV αυτό miRNA μένει να διευκρινιστεί.

Ο McPyV έχει συσχετισθεί με υπερμεθυλίωση του RASSF1A στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα [ΜΚΠ: small cell lung cancer (SCLC)] (124) (Εικόνα 7), ενώ στον ΜΜΚΠ ο McPyV έχει σχετισθεί με τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων [Human Papilloma Virus (HPV)] στο 33% ασθενών (125). Αν και η

έρευνα δεν έχει καταλήξει σε συναίνεση σχετικά με την επικράτηση του MCPyV στο NSCLC, είναι σαφές ότι η παρουσία αυτού του ιού εμπλέκεται με καρκινογόνο φαινόμενα όχι μόνο στο δέρμα αλλά και σε κακοήθειες του πνεύμονα.

Virus	Viral protein	Epigenetic mechanism or regulator affected	Outcome or expected outcome
Family:			
Polyomaviridae			
MCPyV	T antigen (?)	?	*RASSF1A* hypermethylation (silencing)

Εικόνα 7. Επιγενετικές τροποποιήσεις προκαλούμενες από MCPyV σε ανθρώπινα κύτταρα. (Epigenetic Dysregulation in Virus-Associated Neoplasms, (124))

5. Επιγενετική στον Καρκίνο του Πνεύμονα

Επιγενετική ορίζεται ως η μελέτη των αναστρέψιμων κληρονομήσιμων αλλαγών στη λειτουργία των γονιδίων, που εμφανίζονται χωρίς κάποια αλλαγή την αλληλουχία του DNA. Οι επιγενετικές επιδράσεις επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση και προέρχονται από χημικές τροποποιήσεις του DNA, των ιστονών ή της έκφρασης των ncRNAs. Οι επιγενετικές αλλαγές έχουν πλέον συσχετισθεί αιτιολογικά με ασθένειες, όπως αυτοάνοσες θυρεοειδοπάθειες ή το άσθμα, επιδεικνύοντας ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις μεταβιβάζουν δυναμικές πληροφορίες, σημαντικά επηρεασμένες από περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Υπάρχουν στοιχεία ότι το κάπνισμα τσιγάρου, ο κύριος παράγοντας κινδύνου των πνευμονοπαθειών, της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (ΧΑΠ) και του καρκίνου του πνεύμονα σχετίζεται με επιγενετικές αλλαγές του βρογχικού επιθηλίου και ότι τα επιγενετικά μονοπάτια ρυθμίζουν τη φλεγμονή στους αεραγωγούς.

Οι κύριοι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα περιλαμβάνουν τον καπνό του τσιγάρου, την περιβαλλοντική ρύπανση, την ακτινοβολία και την έκθεση στον αμίαντο, όμως πολλαπλές περιπτώσεις καρκίνου πνεύμονα απέτυχαν να αποδοθούν σε κάποιον από αυτούς τους παράγοντες. Παρόλο που τα μοριακά μονοπάτια δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμη, οι επιγενετικές αλλαγές που σχετίζονται με τα microRNA (miRNAs) θα μπορούσαν να παίζουν σημαντικό ρόλο στη γένεση καρκίνων που περιέχουν μεταλλάξεις. Τα microRNA, μικρά, μη κωδικοποιούμενα μόρια RNA περιορίζουν την παραγωγή πρωτεινών μέσω αναστολής μετάφρασης των αγγελιοφόρων RNA [messenger RNAs (mRNAs)], ή

μέσω της αποδόμησης τους. Το miR-21 έχει βρεθεί υπερκφρασμένο σε έξι ανθρώπινους καρκίνους, ενώ η υπερέκφραση miR-21 αποτελεί ξεχωριστό αρνητικό προγνωστικό παράγοντα για τη συνολική επιβίωση του ΜΜΚΠ.

Δεδομένου ότι η συσσώρευση των γενετικών και επιγενετικών γεγονότων στο αναπνευστικό επιθήλιο είναι απαραίτητη για την πνευμονική καρκινογένεση, η καταστολή ογκοκατασταλτικών γονιδίων μέσω μεθυλίωσης υποκινητή, καθώς και τροποποίηση των ουρών των ιστονών έχουν εμπλακεί στην έρευνα της αιτιολογίας του καρκίνου του πνεύμονα (126). Επιπλέον, microRNAs (miRNAs ή Mirs) έχουν δειχθεί να απορυθμίζονται συχνά στον καρκίνο του πνεύμονα (127). Τα μοριακά μονοπάτια που εμπλέκονται απομένει να διευκρινιστούν, αν και τα microRNA που σχετίζονται με επιγενετικές αλλοιώσεις μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη γένεση των μεταλλάξεων που υποθάλπουν τον όγκο. Ορισμένα microRNAs (epi-microRNAs) εξουδετερώνουν τη CpG μεθυλίωση και ρυθμίζουν τα συστατικά των επιγενετικών μηχανισμών, δημιουργώντας έτσι ένα αυστηρά ελεγχόμενο μηχανισμό ανάδρασης (128). Επιπλέον, οι miRNA μεταβολές μετά από έκθεση σε καπνό τσιγάρων σε in-vitro μοντέλο ανθρώπινων βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων αποδείχθηκε ότι μοιάζουν πολύ με εκείνα στο βρογχικό επιθήλιο των καπνιστών (129), παρέχοντας ένα νέο παράδειγμα της μεσολάβησης του καπνίσματος στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς του καρκίνου.

Τα καρκινώματα του πνεύμονα υποκρύπτουν πολλαπλές μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη, πολλαπλασιασμό ή απόπτωση. Τέτοιες μεταλλάξεις μπορεί να περιλαμβάνουν το μονοπάτι Ras/Raf του οποίου η βλάβη έχει ως αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των κυττάρων μέσω της ρύθμισης MAPK / ERK, ενώ το μονοπάτι του p53 βρίσκεται στο σταυροδρόμι ενός δικτύου καταρρακτών σηματοδότησης, που είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση της ανάπτυξης των κυττάρων και την απόπτωση που προκαλείται από γονιδιοτοξικές και μη - γονιδιοτοξικές καταπονήσεις. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων ras, συμπεριλαμβανομένου του ογκογονίδιο K-ras, στον καρκίνο του πνεύμονα περιορίζεται αποκλειστικά στην NSCLC (κυρίως αδενοκαρκίνωμα) (130), ενώ σε μια πρόσφατη μελέτη (131) έχει προταθεί ότι το μεταλλαγμένο γονίδιο BRAF είναι «γεγονός» που οδηγεί σε αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα . Ανεπάρκεια του RKIP αναστολέα συσχετίζεται θετικά με την καρκινογένεση, καθώς και την προσβολή και μετάσταση καρκινώματος πνεύμονα πλακώδους κυττάρου (132), ενώ το συνολικό επίπεδο RKIP δεν έχει προγνωστική αξία για την έκβαση του ασθενούς με καρκίνο του πνεύμονα (133). Γονιδιοτοξικό στρες καταλήγει στην ενεργοποίηση του

«κηδεμόνα του γονιδιώματος», το γονίδιο *p53*. Με τη σειρά του, το *p53* μειώνει τη φωσφορυλίωση του RB1 και επάγει μια στάση κυτταρικού κύκλου επισκευή-ή-απόπτωση μέσω Bax / Bcl-2 και άλλων διαδικασιών που προκαλούνται από το *p53 (134)*. Το *Bax* είναι ένα γονίδιο που επάγει την απόπτωση, ενώ το *Bcl-2* είναι ένα αντι- αποπτωτικό γονιδίο και το ετερο-διμερές *Bax/Bcl-2* επάγει μία εξουδετέρωση του *Bax* και απώλεια της απόπτωσης (135). Μετάλλαξη του *p53* είναι πολύ συχνή σε καρκίνο του πνεύμονα και εμφανίζεται στο 50% των ΜΜΚΠ και το 75% των ΜΚΠ καρκίνο του πνεύμονα (136).

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ι. Σκοπός της μελέτης

Μια αιτιολόγηση ιικής απαρχής στον καρκίνο του πνεύμονα είναι δελεαστική, αφού ο ιός μπορεί να θεωρηθεί ως το κύριο γεγονός ή ως ένας σημαντικός συμπαράγοντας, όπως για παράδειγμα στο μεσοθηλίωμα (Simian Virus 40 των πολυόμα ιών και αμιάντωση (137)). Συνυπολογίζοντας ότι η οικογένεια των πολυόμα ιών έχει ήδη συσχετισθεί με ανθρώπινες κακοήθειες, αρχικός στόχος ήταν η διερεύνηση της επίπτωσης των MCPyV, BKV και JCV σε δείγματα ΜΜΚΠ. Ταυτόχρονα μελετήθηκε η γονιδιακή έκφραση των *K-ras, BRAF, RKIP, Bax, Bcl-2, p53* και *RB1* στον ίδιο πληθυσμό ΜΜΚΠ, σε σχέση με την ύπαρξη των πολυόμα ιών.

Μετέπειτα σκοπός ήταν η διερεύνηση των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ ρύθμισης microRNA και λοίμωξης με MCPyV σε πνεύμονες με κακοήθεια, μέσω της μελέτης έκφρασης ενδογενών microRNA παρουσία MCPyV. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα απίπεδα έκφρασης των microRNAs miR-21, miR-367, miR-155, miR-146a, miR-302c, miR-145 και miR-376c καθώς και των αντίστοιχων γονιδίων στόχων και συσχετιζόμενων μονοπατιών (*Bcl-2, Braf, Akt-1, Akt-2, Bax, Hif-1a, p53, Pten, Daxx, Pkr, Timp3*, *Grb2, Alk7*, *Mmp9*, *Oct-4, Sox2*, *Fascin1*) σε δείγματα ΜΜΚΠ, παρουσία αλλά και απουσία MCPyV.

ΙΙ. Ασθενείς και Μέθοδοι

Ο πληθυσμός ασθενών της μελέτης περιλάμβανε 110 διαδοχικούς ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ), από την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης (ΠΑΓΝΗ). Οι ασθενείς που περιλήφθηκαν στη μελέτη ταξινομήθηκαν με βάση τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ, WHO) του 1997. Η ομάδα ελέγχου περιλάμβανε 14 δείγματα ιστού από μακροσκοπικά υγιή σημεία πνεύμονα, προήλθε από τους ασθενείς του βασικού πληθυσμού της μελέτης οι οποίοι υπεβλήθησαν σε λοβεκτομή και ταυτοποιήθηκαν ιστολογικά. Δημογραφικά στοιχεία αναγράφονται στον πίνακα 2 και οι ιστολογικοί υπότυποι στον πίνακα 3.

Πίνακας 2. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών.

Characteristics	**Control group**	**NSCLC patients**	**p value**
Number	14	110	
Age*	56.33±5.47	62.92±1.12	NS
Sex (male/female)**	12/2	101/9	NS
Non-smokers**	9	12	0.0011
Smokers**	2	96	0.0007
Ex-smokers**	3	2	NS
FEV1*	86.78±8.71	84.12±3.53	NS
FVC*	93.22±7.50	89.89±4.11	0.0274
FEV1/FVC*	73.33±4.29	74.46±1.80	NS
DLCO*	74.43±11.37	83.77±9.15	0.00386
KCO*	83.15±10.89	91.36±14.19	NS

Τιμές εκφράζονται ως mean ± SD (standard deviation- τυπική απόκλιση).

**t*-test; $P < 0.05$ θεωρείται στατιστικά σημαντικό.

**χ^2 test; $P < 0.05$ θεωρείται στατιστικά σημαντικό.

NS; μη στατιστικά σημαντικό.

Πίνακας 3. Ιστολογικοί υπότυποι.

Υπότυπος ΜΜΚΠ	Όλα	Άνδρες	Γυναίκες
Αριθμός δειγμάτων	110	101	9
Αδενοκαρκίνωμα	58	52	6
Πλακώδες	39	38	1
Αδενοπλακώδες	4	4	-
Γιγαντοκυτταρικό			
Αδιαφοροποίητο	3	2	1
Βρογχοκυψελιδικό	3	2	1
Αδιαφοροποίητο	2	2	-
Γιγαντοκυτταρικό	1	1	-

Συγκατάθεση

Η Επιτροπή Ηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης ενέκρινε το πρωτόκολλο της μελέτης και όλοι οι ασθενείς έδωσαν έγγραφη συγκατάθεση για τη συμμετοχή στη μελέτη (Reg. No 140/4-2-2015).

Βιολογικά δείγματα και επεξεργασία

Εκατόν δέκα δείγματα καρκίνου πνεύμονα από μπλοκ παραφίνης του Εργαστηρίου Παθολογοανατομίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Όλα τα δείγματα προήλθαν από χειρουργικά παρασκευάσματα. Μεταξύ των 110 ασθενών, δεκαέξι υπεβλήθησαν σε περαιτέρω χειρουργική εκτομή της βλάβης, από τους οποίους προήλθε φρέσκο δείγμα ιστού, το οποίο αποθηκεύτηκε στους -80 ^{o}C μέχρι περαιτέρω επεξεργασία.

DNA εξαγωγή και πρωτόκολλο PCR

Για εξαγωγή DNA, τα δείγματα από μπλοκ παραφίνης επεξεργάστηκαν με τη χρήση του QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Έγινε εξαγωγή γενωμικού DNA από τα δείγματα μαρτύρων και των δειγμάτων φρέσκου ιστού έπειτα από ομογενοποίηση και μετέπειτα επεξεργασία με πρωτεϊνάση Κ, ακολουθούμενη από εξαγωγή φαινόλης και κατακρήμνιση αιθανόλης σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες. Όλα τα δείγματα DNA ποσοτικοποιήθηκαν σπεκτροφωτομετρικά και ομαλοποιημένα δείγματα παρήχθησαν για κάθε ασθενή.

Real-Time quantitave PCR αντιδράσεις για τα πειράματα των ιών BKPyV και JCPyV πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας εμπορικά κιτ: για τον BKPyV το BKV Real Time Q-PCR Alert AmpliMIX kit (Cat. No. RTS175 BKV), σύμφωνα με τις

οδηγίες του παρασκευαστή (Nanogen Advanced Diagnostics S.p.A., Italy), ενώ για τον JCPyV DNA το JCV/BKV oligomix Alert nested PCR kit (Cat. No. BAN075) χρησιμοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή (Nanogen Advanced Diagnostics S.p.A., Italy). Η παρουσία MCPyV DNA ερευνήθηκε χρησιμοποιώντας πρωτόκολλα Real Time quantitave PCR, με τη χρήση του MCV138 ζευγαριού εκκινητών, που στοχεύουν την περιοχή του LT-ag, όπως έχει περιγραφεί παλαιότερα (138). Η ποιότητα και ακεραιότητα του εξηγμένου DNa επιβεβαιώθηκε μετά από επιτυχημένη ενίσχυση του γονιδίου της *beta2-microglobulin* σε όλα τα δείγματα.

Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στους χειρισμούς μέσα στην PCR-hood, προς αποφυγή επιμόλυνσης. Κάθε αντίδραση PCR περιείχε δυο αρνητικούς μάρτυρες. Οι θετικοί μάρτυρες για τους BKPyV και JCPyV προήλθαν από την εταιρεία Nanogen Advanced Diagnostics S.p.A. (Cat. No. CTR075), ενώ DNA από ασθενή με MCC χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας για MCPyV. Όλες οι Real Time PCRs διεξήχθηκαν σε σύστημα Mx3000P Real Time PCR system, ενώ όλα τα PCR προϊόντα αναλύθηκαν σε 2% γέλη αγαρόζης, βάφτηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο και αναγνώστηκαν κάτω από τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (260 nm). Αυτά τα άμεσα ιικά προϊόντα υπεβλήθησαν σε ανάλυση άμεσης αλληλούχισης γι επιβεβαίωση των αρχικών αποτελεσμάτων ενίσχυσης.

Γονιδιακή Έκφραση

Δεκαέξι δείγματα φρέσκου ιστού από ασθενείς με ΜΜΚΠ και δεκατέσσερα δείγματα μαρτύρων επεξεργάστηκαν με το πρωτόκολλο TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) για ολική απομόνωση RNA, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το απομονωμένο RNA μετέπειτα επεξεργάστηκε με DNase για αποφυγή επιμόλυνσης με DNA. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του RNA μετρήθηκε με σπεκτροφωτόμετρο. Αραιωμένα δείγματα RNA αποθηκεύτηκαν στους -80 ºC μέχρι τη χρήση. cDNA από κάθε δείγμα παρήχθη με αντίστροφη μεταγραφή 1 μg ολικού RNA, χρησιμοποιώντας το SuperScript® First-Strand Synthesis System (Invitrogen) και ποικίλα εξαμερή. Για την αφαίρεση του αρχικού RNA προτύπου το cDNA επωάστηκε με *E. coli* RNaseH (Invitrogen) και αποθηκέυτηκε στους -20˚C μέχρι τη χρήση.

Τα επίπεδα των μεταγράφων των *K-ras, BRAF, RKIP, Bax*, *Bcl-2, p53* και *RB1* προσδιορίστηκαν με το σύστημα Mx3000P Real-Time PCR system (Stratagene) και SYBR-Green I Master Mix (Stratagene, La Jolla, CA, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως έχει περιγραφεί στο παρελθόν (139). Οι εκκινητές είχαν

σχεδιαστεί με μήκος τουλάχιστον ένα ιντρόνιο, προς αποφυγή ενίσχυσης επιμολυσμένου γενωμικού DNA. Το γονίδιο *GAPDH* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων. Για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων τα PCR προιόντα αναλύθηκαν σε 2% γέλη αγαρόζης, βάφτηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο και αναγνώστηκαν κάτω από τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (260 nm). Οι αλληλουχίες των εκκινητών αναφέρονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Αλληλουχίες εκκινητών γονιδίων.

Γονίδιο	**Primer pair αλληλουχία (5'-3')**	**Θερμοκρασία ανάπτησης**
GAPDH	FOR: GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA REV :GTCATTGATGGCAACAATATCCACT	60 ºC
BRAF	FOR: AGAAAGCACTGATGATGAGAGG REV: GGAAATATCAGTGTCCCAACCA	58 ºC
RKIP	FOR: AGACCCACCAGCATTTCGTG REV: GCTGATGTCATTGCCCTTCA-3	58 ºC
p53	FOR: GTGAGCGCTTCGAGATGTTC REV: ATGGCGGGAGGTAGACTGAC	60 ºC
K-ras	FOR:ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT REV: TCAAAGAATGGTCCTGGACC	60 ºC
Bcl-2	FOR: GAAACCCCTAGTGCCATCAA REV: GGGACGTCAGGTCACTGAAT	55 ºC
Bax	FOR: TTCTGACGGCAACTTCAACTGG REV: TTGGTGCACAGGGCCTGTAATC	61 ºC
RB1	FOR: CTTGCATGGCTCTCAGATTCAC REV: AGAGGACAAGCAGATTCAAGGTG	60ºC

Για την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των microRNA, ολικό RNA αραιώθηκε σε τελική συγκέντρωση 3ng/μl και 10ng χρησιμοποιήθηκαν για αντίστροφη μεταγραφή και αντιδράσεις Real-Time qPCR με τις δοκιμασίες TaqMan^{TM} microRNA assays (Life Technologies) και το σύστημα 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems. Αλληλουχίες ανιχνευτών και εκκινητών αναγράφονται στον πίνακα 5. Τα επίπεδα έκφρασης του miR-191 χρησιμοποιήθηκαν για την ομαλοποίηση των επιπέδων έκφρασης των microRNA σε όλα τα δείγματα, όπως έχει περιγραφεί παλαιότερα (140).

Πίνακας 5. Ανιχνευτές και εκκινητές των microRNAs.

microRNA	**microRNA Assay ID**	**Annealing Temperature**
Has-miR--191	002299	60 ºC
Has-miR--21	000397	60 ºC
Has-miR--145	000467	60 ºC
Has-miR--146a	000468	60 ºC
Has-miR--155	002623	60 ºC
hsa-miR--302c-3p	000533	60 ºC
Has-miR--367	000555	60 ºC
Has-miR--376c	002122	60 ºC

Για την ανάλυση γονιδίων στόχων των microRNAs χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA, μετάγραφα επιβεβαιωμένων από τη βάση δεδομένων MiR-tarbase γονίδια στόχοι του miR-21 (*Pten*, *Bcl-2*, *Daxx*, *Pkr*, *Timp3*), του miR-376c (*Grb2*, *Alk7*, *Mmp9*) και του miR-145 (*Oct4*, *Sox2*, *Fascin1*) αναλύθηκαν. Επίσης, αναλύθηκαν γονίδια συσχετιζόμενα με τα γονίδια στόχους και αποπτωτικά μονοπάτια του miR-21 (*p53(141), Braf(142), Akt-1, Akt-2(143), Baxx(144), Hif1a(143)).* Επίπεδα *Gapdh* χρησιμοποιήθηκαν για ομαλοποίηση των επιπέδων έκφρασης mRNA σε όλα τα δείγματα. Αλληλουχίες ανιχνευτών και εκκινητών αναγράφονται στον πίνακα 6. Για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων τα PCR προιόντα αναλύθηκαν σε 2% γέλη αγαρόζης, βάφτηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο και αναγνώστηκαν κάτω από τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (260 nm).

Πίνακας 6. Ανιχνευτές και εκκινητές γονιδίων στόχων και σχετιζόμενω μονοπατιών των μελετούμενων microRNAs.

Gene	Primer pair sequence (5'-3')	Annealing Temperature
GAPDH	FOR: AGCCACATCGCTCAGACAC REV : GCCCAATACGACCAAATCC	54 ºC
Braf	FOR: AGAAAGCACTGATGATGAGAGG REV: GGAAATATCAGTGTCCCAACCA	58 ºC
Bcl-2	FOR: GAAACCCCTAGTGCCATCAA REV: GGGACGTCAGGTCACTGAAT	55 ºC
p53	FOR: GTGAGCGCTTCGAGATGTTC REV: ATGGCGGGAGGTAGACTGAC	60 ºC
Akt-1	FOR: GCAGCACGTGTACGAGAAGA REV: GGTGTCAGTCTCCGACGTG	54 ºC
Akt-2	FOR: CTCACACAGTCACCGAGAGC REV: TGGGTCTGGAAGGCATACTT	56 ºC
Bax	FOR: TTCTGACGGCAACTTCAACTGG REV: TTGGTGCACAGGGCCTGTAATC	61 ºC
Daxx	FOR: CATGCGAGGTTCTGAGAATTG REV:GAGGAAGTGGTGGGGATTTC	54 ºC
Pten	FOR:CGGCAGCATCAAATGTTTCAG REV:CGGCAGCATCAAATGTTTCAG	55ºC
Pkr	FOR: CCATGGGGAATTACATAGGC REV: CTTTCTGTCCCATTTTGCATT	52 ºC
Hif1a	FOR: CTTGCATGGCTCTCAGATTCAC REV: AGAGGACAAGCAGATTCAAGGTG	60ºC
Timp3	FOR: GGCGGCAGCAGCGGCAATGAC REV: TACCAGCTTCTTCCCCACCACCTT	60ºC
Grb2	FOR: CCATCGCCAAATATGACTTCAAA REV: CTTCGTTCAAAACCTTGAGGATGT	62 ºC
Alk7	FOR: ATGACCCGGGCGCTCTGCTCA REV: ATACTGTCAGCATCGCAGCTA	58 ºC
Mmp9	FOR: ACTTTGACAGCGACAAGAGGTGG REV: CCGGCACTGAGGAATGATCTAA	64 ºC
Oct4	FOR:AGGGAAGGAGATTATGGAGGAGGG REV:AGCTTTGGGCTCTGGAAGGC	60 ºC
Sox2	FOR:AGGATAAGTACACGCTGCCC REV:TAACTGTCCATGCGCTGGTT	57 ºC
Fascin1	FOR:CGCTCCAGCTATGACGTCTTCC REV:CAGGAGAACCTGCCTTTGATGTT	60 ºC

Εξαγωγή πρωτεϊνών και Ανοσοστύπωση κατά Western

Δείγματα από φρέσκο ιστό ομογενοποιήθηκαν με RIPA lysis buffer (Tris buffered saline pH 7.4, NP-40Na-deoxycholate, NaCl, EDTA, PMSF, Protease Inhibitor Cocktail, Phosphatase inhibitors, Na-Vanadat, NaF) προς εξαγωγή ολικής πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες ποσοτικοποιήθηκαν με το πρωτόκολλο Bradford Protein Quantitation. Σε γέλη 12% SDS–PAGE 40 mg ολικής πρωτεΐνης φορτώθηκαν σε κάθε πηγάδι και διεξήχθη η ηλεκτροφόρηση διαχωρισμού. Οι πρωτείνες από τη γέλη μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF με ημίστεγνη μεταφορά. Η μεμβράνη PVDF επεξεργάστηκε με TBST (10 mM Tris–HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween-20) διάλυμα που περιείχε 5% σαποβουτυρωμένο γάλα σε θερμοκρασία δωματίου για

μία ώρα, προς δέσμευση μη ειδικών θέσεων. Ειδικά αντισώματα στις κατάλληλες αραιώσεις (phosphor-BRAF (Ser445), BRAF and Bcl-2 1/1,000; beta-actin 1/2,000) προστέθηκαν και διεξήχθη ολονύκτια επώαση στους 4°C. Όλα τα ειδικά αντισώματα προήλθαν από τη Cell Signaling Technology, MA, USA. Μετέπειτα, προστέθηκε HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG πολυκλωνικό αντίσωμα (αραίωση 1:2,000) και επωάστηκαν οι μεμβράνες σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Μετά από ξέπλυμα με TBST, με τη χρήση της ενιχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL) πραγματοποιήθηκαν ακτινογραφικό φιλμ αιχμαλωτίζει την αντίδραση. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό QuantityOne.

Στατιστική Ανάλυση

Για την ανάλυση της ύπαρξης κανινικής κατανομής χρησιμοποιήθηκε το Kolmogorov-Smirnov test. Η έκφραση των mRNA όλων των γονιδίων συνεκρίθη μεταξύ των ομάδων παθολογικών και υγιών δειγμάτων, καθώς και μεταξύ διαφόρων ιστολογικών υποτύπων, χρησιμοποιώντας παραμετρικές δοκιμασίες (Student's t-test και One way Anova). Γραμμική συσχέτιση μεταξύ microRNAs και γονιδίων στόχων αναλύθηκε με το Linear (Pearson) correlation test.

Τιμές πιθανότητας (P-values) <0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Όλες οι στατιστικές δοκιμασίες έγιναν με λογισμικό SPSS 11.5 (SPSS, Chicago, IL, USA).

ΙΙΙ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανίχνευση Πολυόμα Ιών

Η ομάδα ασθενών με ΜΜΚΠ περιλάμβανε 101 άνδρες και 9 γυναίκες. Δημογραφικά και λειτουργικές δοκιμασίες πνευμόνων φαίνονται στον Πίνακα 2. Αποτελέσματα βιοψιών και ιστολογικοί υπότυποι φαίνονται στον Πίνακα 3. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 62.92±1.12 έτη, και πλειοψηφικά ενεργοί καπνιστές (87.3%).

Οι ιστικές βιοψίες από τους ασθενείς με ΜΜΚΠ αλλά και από την ομάδα ελέγχου απεδείχθη αρνητική για την ύπαρξη DNA BKPyV και JCPyV.

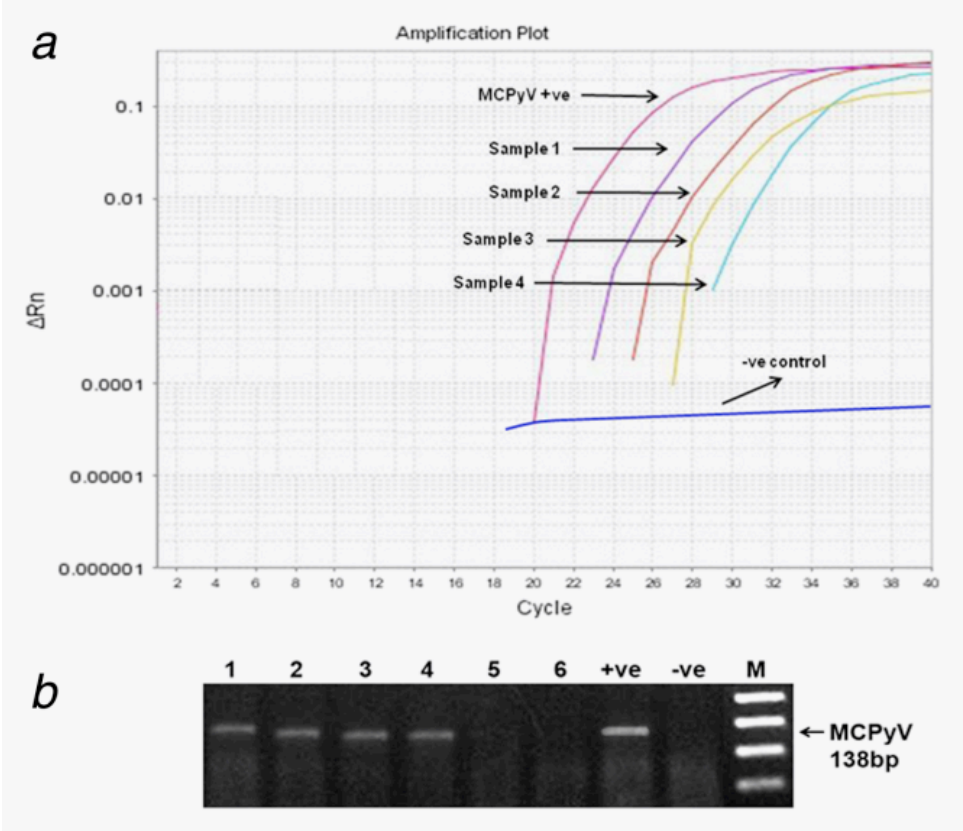
MCPyV DNA ανιχνεύθηκε σε 10 από τα 110 (9.1%) δείγματα καρκινικού ιστού, ενώ γένωμα MCPyV δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα δείγματα μαρτύρων (Εικόνα 8). Η μεγάλη πλειοψηφία των MCPyV-θετικών δειγμάτων προήλθαν από άνδρες (9/10), ενώ η μέση ηλικία ήταν 63.78±11.25 years (Πίνακας 7). Οι ιστολογικοί τύποι ήταν κυρίως αδενοκαρκινώματα και πλακώδη καρκινώματα. Οι δυο κυρίαρχοι ιστολογικοί υπότυποι σε MCPyV-θετικά δείγματα είχαν παρόμοιες ηλικίες ασθενών.

Πίνακας 7. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά Merkel Cell Polyomavirus-θετικών ασθενών με ΜΜΚΠ.

Lung cancer tissue group							
Αρ.	**Φύλο**	**Ηλικία (έτη)**	**Ιστολογικός υπότυπος**	**Καπνιστική συνήθεια N/O (pack years)**	**FEV1 (%)**	**FVC (%)**	**FEV1/FVC**
27	M	47	Undifferentiated large cell lung carcinoma	N (65)	91.8	113.2	64.77
44	M	66	Adenocarcinoma	N (40)	100.8	121	65.9
57	M	73	Adenocarcinoma	Πρώην (10)	92.1	95.5	63.97
62	M	67	Squamous cell carcinoma	O	87.2	83.8	76.61
63	M	73	Adenocarcinoma	N (80)	88.5	80	85.25
67	M	65	Bronchoalveolar carcinoma	N (55)	68.9	89.3	61.14
71	M	74	Adenocarcinoma	N (43)	101.6	83.7	96.03
78	M	85	Squamous cell carcinoma	N (85)	63.6	89.3	51.83
80	M	54	Squamous cell carcinoma	N (30)	90.3	91.8	73.56
88	F	55	Adenocarcinoma	N (25)	79.1	91.9	72.67
Μέση Τιμή		63.78±11.25		51±29	86.39±12.47	93.95±13.16	71.17±12.69

Τιμές εκφράζονται ως mean ± SD (standard deviation- τυπική απόκλιση).

FEV1: forced expiratory volume in one second, FVC: forced vital capacity



Εικόνα 8. Αντιπροσωπευτικά δείγματα MCPyV όπως ανιχνεύθηκε με Real Time PCR και σε γέλη αγαρόζης. +ve θετικός μάρτυρας, -ve αρνητικός μάρτυρας, M 50bp DNA ladder.

Μεταξύ των MCPyV-θετικών δειγμάτων, μόνο ένας ασθενής δεν είχε καπνιστική συνήθεια και, ενώ ένας ασθενής ήταν πρώην καπνιστής, η μέση καπνιστική συνήθεια σε πακέτα-έτη (pack year -p.y.) ήταν 51 έτη. Στην MCPyV θετική ομάδα, οι ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και με πλακώδες είχαν περίπου 39py καπνιστική συνήθεια, αν και στην ομάδα του πλακώδους ένας ασθενής δεν είχε καθόλου ιστορικό καπνιστικής συνήθειας. Καμία διαφορά δεν ανιχνεύθηκε στις κλινικές παραμέτρους μεταξύ MCPyV-θετικών και MCPyV-αρνητικών ασθενών στις υποομάδες των αδενοκαρκινωμάτων και των πλακώδων καρκινωμάτων.

Γονιδιακή έκφραση

Μετάγραφα των *K-ras, BRAF, RKIP*, αλλά και των *p53* και *RB1* δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ δειγμάτων ΜΜΚΠ και ομάδας μαρτύρων (Πίνακας 8). Αντίθετα, η έκφραση του *Bcl-2* ήταν σημαντικά υποεκφρασμένη στα δείγματα ΜΜΚΠ συγκριτικά με τους μάρτυρες (mean±SD 1.19±1.39 and 1.23±1.49, αντίστοιχα, λόγος μέσων τιμών 0.97, p=0.047). Επίσης, σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα *Bax*

ανιχνεύθηκαν στα δείγματα ΜΜΚΠ συγκριτικά με τους μάρτυρες (mean±SD 1.15±0.23 and 9.91±0.16, αντίστοιχα, λόγος μέσων τιμών 0.12, p=0.038). Ο λόγος *Bax/Bcl2* ήταν 0.97 για την ομάδα ΜΜΚΠ και 8.06 για τους μάρτυρες.

Πίνακας 8. Πρότυπο έκφρασης κυτταρικών γονιδίων σε δείγματα καρκίνου του πνεύμονα και μάρτυρες σε σχέση με την παρουσία ή απουσία MCPyV.

MEAN±SD	ΜΜΚΠ	Υγιής ιστός	Λόγος* των μέσων τιμών	*p1* value	McPyV-θετικά δείγματα	McPyV-αρνητικά δείγματα	Λόγος# των μέσων τιμών	*p2* value
K-ras	1.21±0.20	1.08±0.16	1.12	NS	1.24±0.39	1.21±0.21	1.03	NS
BRAF	1.16±0.20	1.08±0.23	1.07	NS	1.29±0.10	1.12±0.21	1.15	**p=0.0411**
RKIP	1.11±0.19	1.04±0.19	1.07	NS	1.17±0.18	1.09±0.19	1.07	NS
p53	1.21±0.22	1.13±0.15	1.07	NS	1.29±0.23	1.21±0.23	1.07	NS
RB1	1.37±0.31	1.34±0.12	1.02	NS	1.29±0.54	1.42±0.32	0.91	NS
Bcl-2	1.19±1.39	1.23±1.49	0.97	**p=0.047**	1.12±0.14	1.26±0.12	0.89	**p=0.050**
Bax	1.15±0.23	9.91±0.16	0.12	**p=0.038**	1.24±0.25	1.11±0.21	1.12	NS

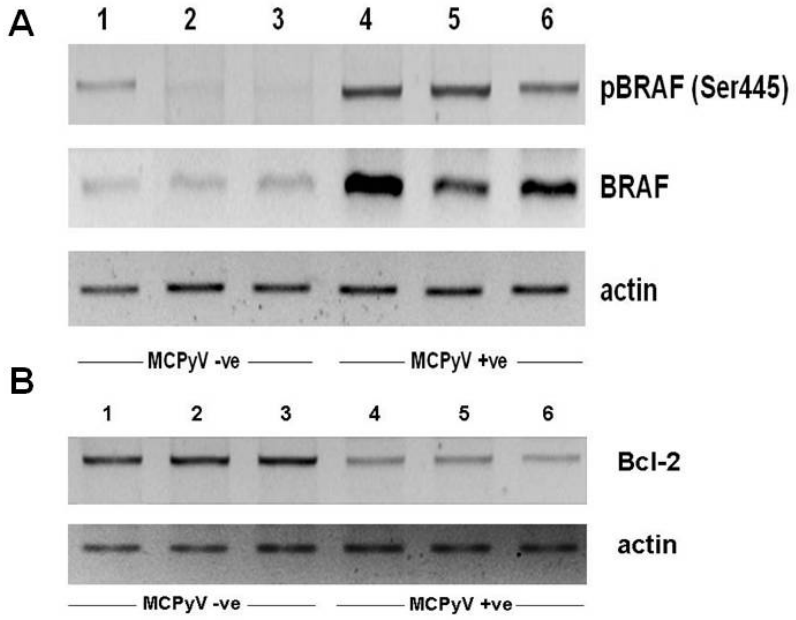
*λόγος μέσων τιμών καρκίνου/υγιούς ιστού
λόγος μέσων τιμών καρκίνου MCPyV-θετικών δειγμάτων/MCPyV-αρνητικών δειγμάτων
p1 : p value ΜΜΚΠ συγκριτικά με υγιή ιστό,
p2: p value MCPyV- θετικών δειγμάτων συγκριτικά με MCPyV-αρνητικών δειγμάτων

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε εάν η λοίμωξη με MCPyV επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων. Έξι MCPyV θετικα και 10 MCPyV αρνητικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για τη γονιδιακή ανάλυση. Μεταξύ των δειγμάτων ΜΜΚΠ, το *Braf* υπερεκφράστηκε στα MCPyV-θετικά δείγματα ιστού σε σχέση με τα MCPyV αρνητικά (mean±SD 1.29±0.10 και 1.12±0.21 αντίστοιχα, λόγος μέσων τιμών 0.97, p=0.0411) (Πίνακας 5). Αντίθετα με το *Braf*, το *Bcl-2* γονίδιο ήταν σημαντικά υποεκφρασμένο στα MCPyV θετικά δείγματα (mean±SD 1.12±0.14 και 1.26±0.12, αντίστοιχα, λόγος των μέσων τιμών 0.89, p=0.050).

Οι προαναφερθείσες διαφορές που παρατηρήθηκαν στη γονιδιακή έκφραση αναφορικά με την κατάσταση του MCPyV εξετάστηκαν και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Ανοσοστύπωση κατά Western επιβεβαίωσε την αυξημένη έκφραση του *Braf* στα MCPyV μολυσμένα δείγματα καθώς και υποέκφραση του *Bcl-2* στα μη μολυσμένα δείγματα (Εικόνα 9). Επιπροσθέτως, ανιχνεύθηκε η κατάσταση ενεργοποίησης του Braf σε ένα ποσοστό των δειγμάτων. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ένα

συγκεκριμένο φωσφο-Braf αντίσωμα (Ser445) που ανιχνεύει ενδογενή επίπεδα Braf όταν είναι φωσφορυλιωμένη η serine 445. Σημειώνεται ότι η φωσφορυλίωση του Braf στο συγκεκριμένο αμινοξικό κατάλοιπο ήταν ιδιατέρως αυξημένη στα MCPyV-μολυσμένα δείγματα σε σχέση με τις τιμές αναφοράς της φωσφορυλίωσης των MCPyV μη μολυσμένων δειγμάτων (Εικόνα 9[A]).

Καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ κλινικών παραμέτρων και προτύπων έκφρασης δεν παρατηρήθηκε.



Εικόνα 9. Ανοσοστύπωση Western της φωσφο-Braf (Ser445), Braf και Bcl-2 σε MCPyV μολυσμένα και μη μολυσμένα δείγματα ΜΜΚΠ.

Έκφραση microRNA

Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση της έκφρασης των microRNAs miR-21, miR-145, miR-146a, miR-155, miR-302c, miR-367 και miR-376c σε MCPyV θετικά και αρνητικά δείγματα ΜΜΚΠ. Το miR-367, μέλος μιας ομάδας γονιδίων που επαναπρογραματίζει ινοβλαστες σε πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (145), και το miR-145, ένα υποτιθέμενο ογκοκατασταλτικό γονίδιο (146), έχουν βρεθεί συσχετιζόμενα με κακή πρόγνωση σε αφαιρεμένο ΜΜΚΠ (147), ενώ το miR-145 και το miR-146a, ένας διαμεσολαβητής φλεγμονής (148), έχουν προταθεί ως διαγνωστικοί βιοδείκτες

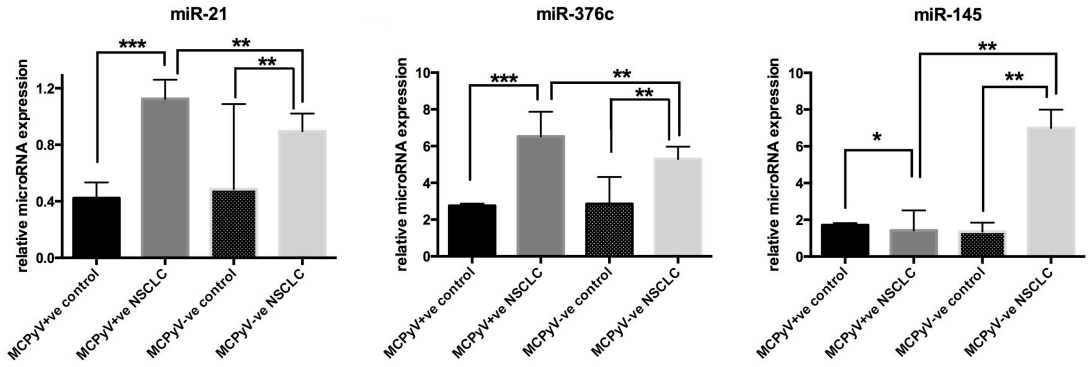
ορού στον ΜΜΚΠ (149). Το miR-155, ένα πολυλειτουργικό microRNA εμπλεκόμενο με τη διαφοροποίηση αιμοποιητικών σειρών, ανοσία και ιικές λοιμώξεις, φλεγμονή, καρκίνο και καρδιαγγειακές παθήσεις (150), έχει υποτεθεί ότι επάγει την ανάπτυξη του ΜΜΚΠ σε ασθενείς από Ασία και Αμερική (151). Το mir-376c προωθεί την επιβίωση του καρκίνου ωοθηκών με την αναστολή του ALK-7 activin receptor-like kinase 7 και ενοχοποιείται για χημειοαντίσταση (152). Το miR-302c έχει προταθεί ότι αποτρέπει τον επαγόμενο από το Ras γηρασμό, μέσω της αναστολής του p21(153), ενώ το miR-21, το πλέον υπερεκφρασμένο microRNA σε συμπαγείς όγκους, έχει βρεθεί σχετιζόμενο με κακή πρόγνωση στο ΜΜΚΠ (154), προβλέπει την επάνοδο και αυξημένη θνητότητα στο ΜΜΚΠ (155) και την ευαισθησία σε ακτινοθεραπεία (156). Η ομαλοποίηση έγινε με το miR-191 επειδή ήταν το πλέον σταθερά εκφραζόμενο microRNA στα δείγματα από μπλοκ παραφίνης, όπως έχει προταθεί στο παρελθόν (147).

Τα miR-21 και miR-376c ήταν σημαντικά υπερεκφρασμένα στα δείγματα ΜΜΚΠ σε σχέση με τους μάρτυρες Επίσης, και τα δύο ήταν σημαντικά υπερεκφρασμένα στα MCPyV θετικά δείγματα ΜΜΚΠ σε σχέση με τα MCPyV αρνητικά (Πίνακας 9, Εικόνα 10). Αντιθέτως, το miR-145ήταν σημαντικά υποεκφρασμένο στα MCPyV θετικά δείγματα ΜΜΚΠ σε σχέση με τα MCPyV αρνητικά και τους μάρτυρες (Εικόνα 10).

Πίνακας 9. Πρότυπα έκφρασης των microRNAs σε δείγματα πνεύμονα από ΜΜΚΠ και μάρτυρες, σε σχέση με παρουσία ή απουσία MCPyV.

MEAN±SD	**MCPyV +ve μάρτυρες**	**MCPyV +ve ΜΜΚΠ**	**MCPyV -ve μάρτυρες**	**MCPyV -ve ΜΜΚΠ**	***P*-value**
miR-21	0.43±0.24	1.13±0.08	0.49±0.60	0.88±0.05	0.013
miR-376c	2.75±0.26	6.53±0.38	2.85±1.47	5.29±2.51	0.048
miR-145	1.71±0.23	1.35±0.21	1.28±0.43	6.99±3.99	0.0002

Τιμές εκφράζονται ως mean ± SD (standard deviation- τυπική απόκλιση). NS; μη στατιστικά σημαντικό. $P < 0.05$ θεωρείται στατιστικά σημαντικό.



Εικόνα 10. Πρότυπο έκφρασης των microRNAs σε δείγματα ΜΜΚΠ (MCPyV+ve N=8, MCPyV-ve N=16) και μάρτυρες (MCPyV+ve N=5, MCPyV-ve N=5) σε σχέση με την ύπαρξη MCPyV DNA. One-way Anova και confirmatory student's t test.
* $p<0.05$, ** $p<0.005$, *** $p<0.0005$

Καμία συσχέτιση δεν ανιχνεύθηκε μεταξύ ηλικίας, φύλου, καπνιστικής συνήθειας ή ιστολογικού υποτύπου. Η επιβίωση και στις δύο ομάδες δε διέφερε σημαντικά.

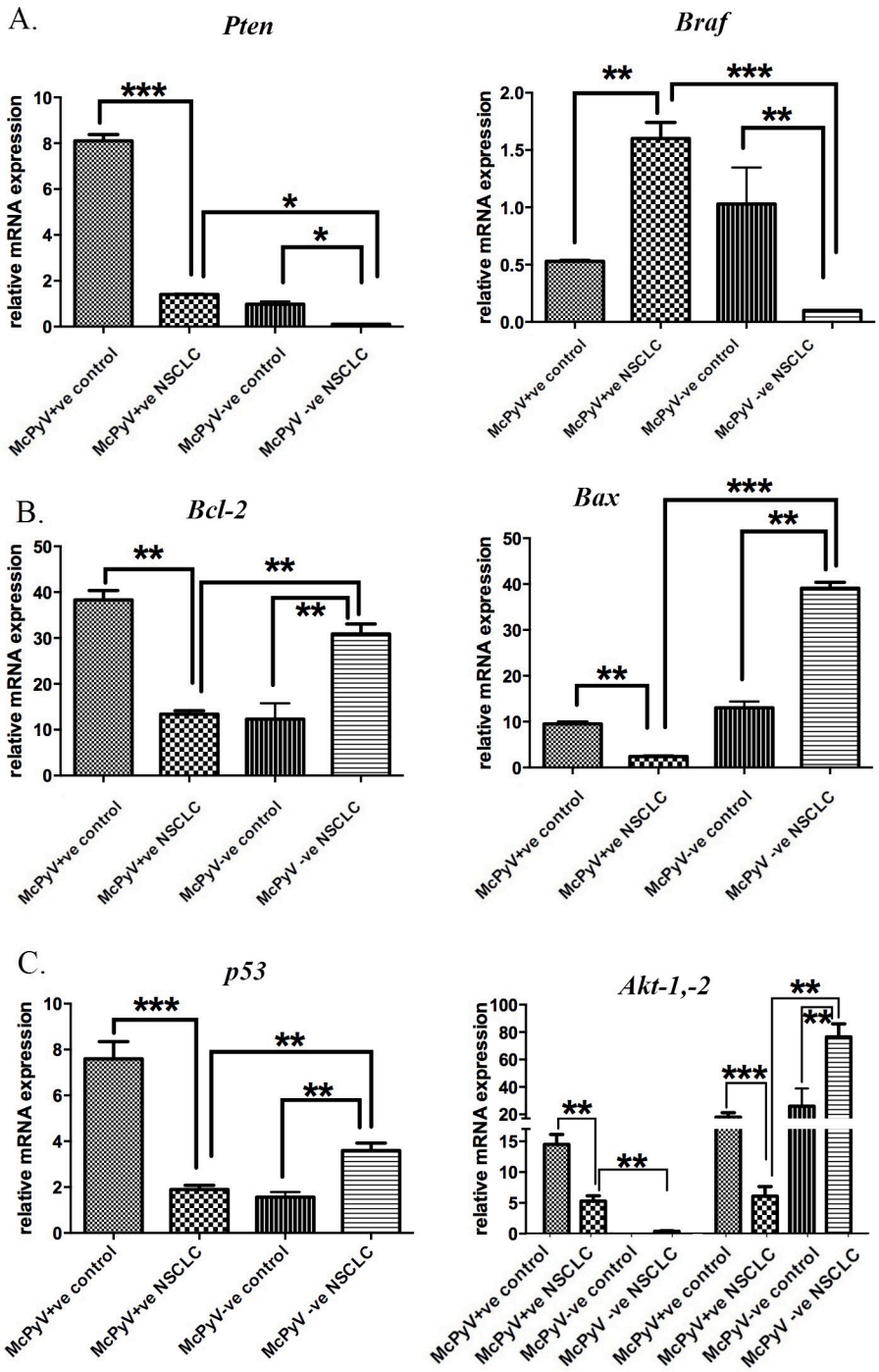
Έκφραση γονιδίων στόχων

Τα γονίδια στόχοι του miR-21 κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τα χαρακτηριστικά του καρκίνου (86), μια ρόδα πιθανών γονιδίων που στοχεύονται από το MiR-21 σε ένα ογκογόνο περιβάλλον, καθώς και πιθανά μονοπάτια σηματοδότησης που επηρεάζονται από το miR-21. Τα γονίδια *Pten* και *Braf*, σχετιζόμενα με τη διατήρηση της σηματοδότησης πολλαπλασιασμού, ήταν σημαντικά υποεκφρασμένα και υπερεκφρασμένα, αντίστοιχα για τα MCPyV θετικά και αρνητικά δείγματα ΜΜΚΠ σε σύγκριση με τους αντίστοιχους μάρτυρες (Πίνακας 10, Εικόνα 11). Τα *Bcl-2* και *Bax,* άντι- και προ-αποπτωτικά γονίδια αντίστοιχα, σχετίζονται με την αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο και βρέθηκαν υποεκφρασμένα στα MCPyV θετικά συγκριτικά με τα αρνητικά δείγματα ΜΜΚΠ αλλά και συγκριτικά με τους μάρτυρες. Γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση της γενομικής σταθερότητας, *p53* και *Akt2,* ήταν υποεκφρασμένα στα MCPyV θετικά συγκριτικά με μάρτυρες και αρνητικά δείγματα ΜΜΚΠ, ενώ το *Akt1* ήταν υποεκφρασμένο στα MCPyV θετικά συγκριτικά με τους μάρτυρες αλλά υπερεκφρασμένο συγκριτικά με τα MCPyV αρνητικά δείγματα ΜΜΚΠ.

Πίνακας 10. Πρότυπα έκφρασης των γονιδίων στόχων των microRNAs σε δείγματα πνεύμονα από ΜΜΚΠ και μάρτυρες σε σχέση με την παρουσία και απουσία του MCPyV.

	Πρότυπα έκφρασης των γονιδίων			
MEAN±SD	**MCPyV +ve μάρτυρες**	**MCPyV +ve ΜΜΚΠ**	**MCPyV -ve μάρτυρες**	**MCPyV -ve ΜΜΚΠ**
		miR--21 στόχοι		
		Άμεσοι στόχοι		
Pten	8.10±0.8	1.4±0.02	0.98±0.32	0.10±0.00
Bcl-2	38.30±5.8	13.40±2.10	12.32±9.87	40.90±6.10
Daxx	10.08±1.23	16.79±8.10	8.69±3.63	7.10±0.81
Pkr	357.1±56.04	64.71±11.37	41.97±6.54	46.71±23.71
Timp3	6.10±1.31	1.4±0.02	0.03±0.00	0.30±0.00
		Σχετιζόμενα μονοπάτια		
Braf	0.53±0.02	1.60±0.40	1.03±0.94	0.10±0.00
Bax	9.50±1.20	2.4±0.31	13.69±4.12	39.1±3.72
p53	7.60±2.10	1.90±0.51	1.56±0.65	3.6±0.89
Akt-1	14.50±1.63	5.30±0.85	0.03±0.00	0.4±0.09
Akt-2	18.10±3.12	3.10±1.56	26.45±13.58	76.5±9.54
Hif1a	11.71±0.98	78.80±6.57	6.91±2.23	3.90±0.09
		miR--376c στόχοι		
Alk7	1.13±0.76	0.22±0.32	0.58±1.21	0.62±0.06
Mmp9	357.1±56.04	64.71±11.37	123.89±55.63	166.71±15.71
Grb2	12.31±0.32	1.98±0.02	5.32±1.29	6.32±0.34
		miR--145 στόχοι		
Oct4	0.87±0.02	1.10±0.41	0.49±0.02	0.54±0.26
Sox2	0.92±0.38	5.21±2.78	2.65±0.03	1.21±0.72
Fascin1	-	53.16±12.28	-	28.04±6.89

Τιμές εκφράζονται ως mean ± SD (standard deviation- τυπική απόκλιση). NS; μη στατιστικά σημαντικό. $P < 0.05$ θεωρείται στατιστικά σημαντικό.



Εικόνα 11. Πρότυπο έκφρασης των γονιδίων στόχων του microRNA 21: *Pten, Braf, Bcl-2, Bax, p53, Akt-1, Akt-2* σε δείγματα ΜΜΚΠ (MCPyV+ve N=8, MCPyV-ve N=16) και μάρτυρες (MCPyV+ve N=5, MCPyV-ve N=5) σε σχέση με την ύπαρξη MCPyV DNA. One-way Anova και confirmatory student's t test.
$p<0.05$, ** $p<0.005$, *** $p<0.0005$

Υπερέκφραση παρατηρήθηκε για τον επαγόμενο από την υποξία και την έμφυτη ανοσία μεταγραφικό παράγοντα *Hif1a* στα MCPyV θετικά δείγματα ΜΜΚΠ συγκριτικά με τους μάρτυρες και τα MCPyV αρνητικά (Εικόνα 12), ενώ το φλεγμονώδες γονίδιο που επάγει όγκους *Daxx* ήταν υπερεκφρασμένο στα MCPyV θετικά δείγματα ΜΜΚΠ συγκριτικά με τους μάρτυρες και τα MCPyV αρνητικά. Ο απορυθμιστής της αγγειογένεσης *Timp3* ήταν υπερεκφρασμένος στα MCPyV θετικά δείγματα ΜΜΚΠ συγκριτικά με τους μάρτυρες αλλά υποεκφρασμένος συγκριτικά με τα MCPyV αρνητικά. Τέλος, ο *Pkr* ένας αντιιικός διαμεσολαβητής της έμφυτης ανοσίας που προωθεί νεοπλασικούς φλεγμονώδεις μηχανισμούς βρέθηκε σημαντικά υπερεκφρασμένος στα MCPyV θετικά δείγματα ΜΜΚΠ συγκριτικά με τα MCPyV αρνητικά. Σημειώνεται ότι ο *Pkr* ήταν σημαντικά υποεκφρασμένο στους κακοήθεις ιστούς της μελέτης.

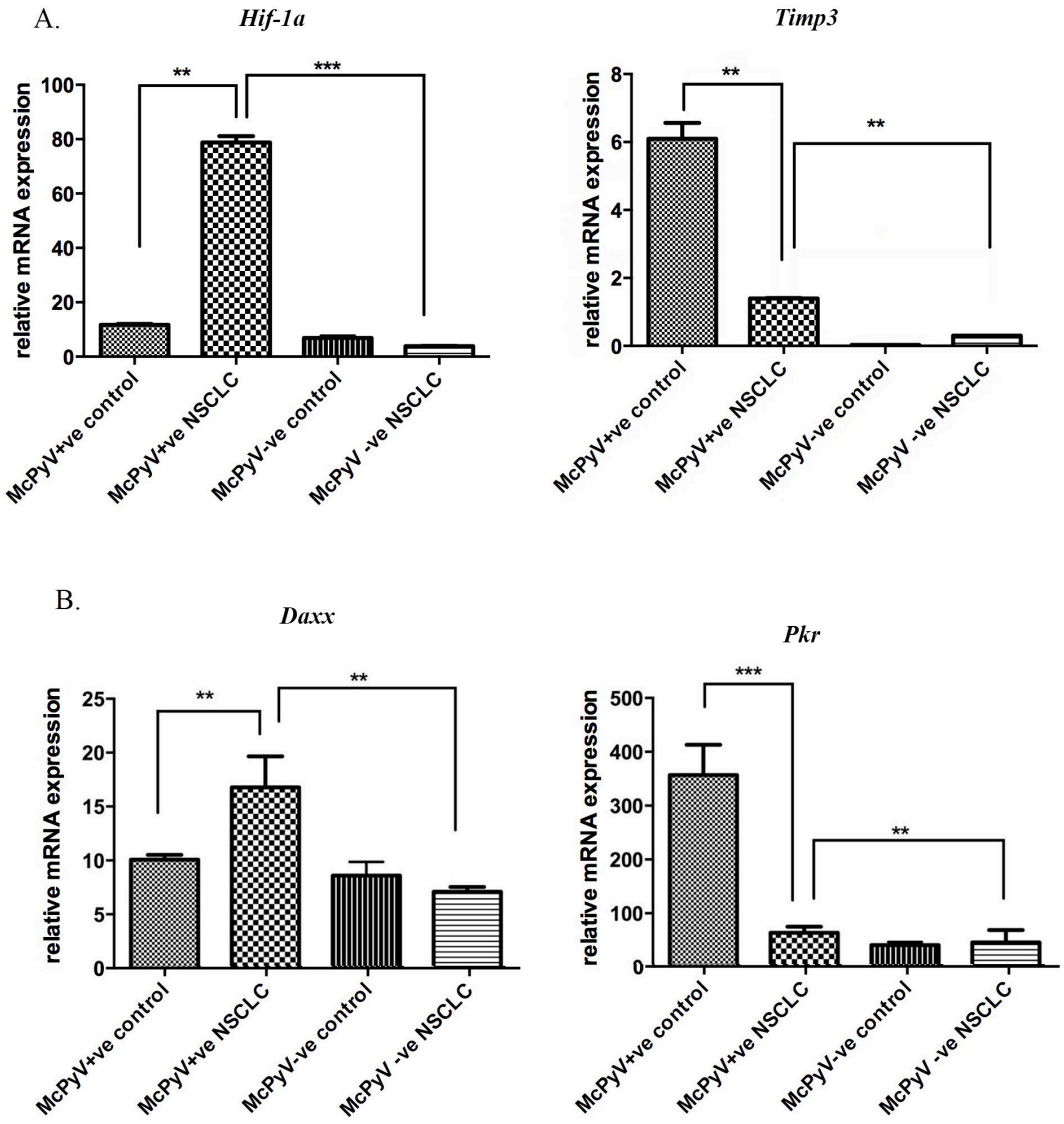
Όλοι οι άμεσοι στόχοι του miR-21 παρουσίασαν σημαντική αρνητική συσχέτιση με την έκφραση του miR-21 στα MCPyV θετικά δείγματα ΜΜΚΠ, εκτός από το *Daxx* που έδειξε θετική συσχέτιση (Πίνακας 11). Τα *Pten, Bcl-2* και *Pkr* γονίδια έδειξαν μέτρια αρνητική συσχέτιση με την έκφραση του miR-21 στα MCPyV θετικά δείγματα ΜΜΚΠ, ενώ το *Daxx* και ο *Timp3* παρουσίασαν μια πτωχότερη συσχέτιση με την έκφραση του miR-21 στον MCPyV θετικό ΜΜΚΠ.

Πίνακας 11. Συσχετίσεις μεταξύ microRNAs και γονιδίων στόχων σε δείγματα ΜΜΚΠ, σε σχέση με την ύπαρξη MCPyV DNA.

Correlations

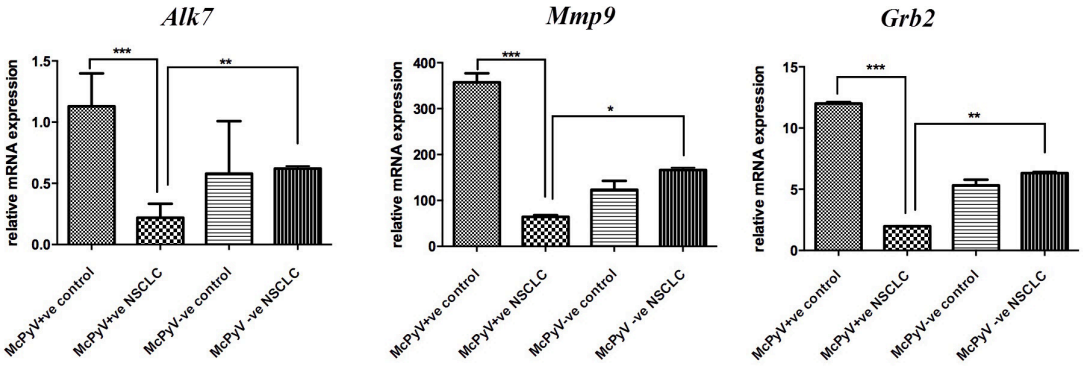
r/r^2/p value	MCPyV +ve controls	MCPyV +ve samples	MCPyV -ve controls	MCPyV -ve samples
Correlation of target genes with miR--21				
Pten	NS	r= -0.6205, r^2=0.3850, p=0.0009	NS	r= -0.4027, r^2=0.1621, p=0.0460
Bcl-2	r= +0.5603, r^2=0.3139, p=0.0036	r= -0.5044, r^2=0.2544, p=0.0101	NS	NS
Daxx	NS	r=+0.4309, r^2=0.1857, p=0.0315	NS	r= -0.2398, r^2=0.2598, p=0.0047
Timp3	NS	r= -0.4293, r^2=0.1843, p=0.0322	r= -0.8293, r^2=0.5845, p=0.0432	r= -0.1493, r^2=0.3649, p=0.0212
Pkr	NS	r= -0.4946, r^2=0.2446, p=0.0266	NS	r= -0.9746, r^2=0.6597, p=0.0023
Correlation of target genes with miR--376c				
Alk7	NS	r= -0.6951, r^2=0.5912, p=0.0251	NS	NS
Mmp9	r=+0.4351, r^2=0.1964, p=0.0387	r= -0.3416, r^2=0.4108, p=0.0023	NS	r=+0.6941, r^2=0.4679, p=0.0039
Grb2	r=+0.6398, r^2=0.2415, p=0.0289	r= -0.7589, r^2=0.6341, p=0.0049	NS	NS
Correlation of target genes with miR--145				
Oct4	NS	r=+0.2341, r^2=0.3019, p=0.0056	r=+0.1956, r^2=0.2098, p=0.0042	r= -0.6832, r^2=0.5912, p=0.0183
Sox2	NS	r=+0.3965, r^2=0.4170, p=0.0038	NS	r= -0.9230, r^2=0.7154, p=0.0058
Fascin1	-	r=+0.6231, r^2=0.5439, p=0.0008	-	r= -0.2206, r^2=0.1905, p=0.0029

NS: non significant, r=Pearson's r coefficient, r^2=coefficient of determination.



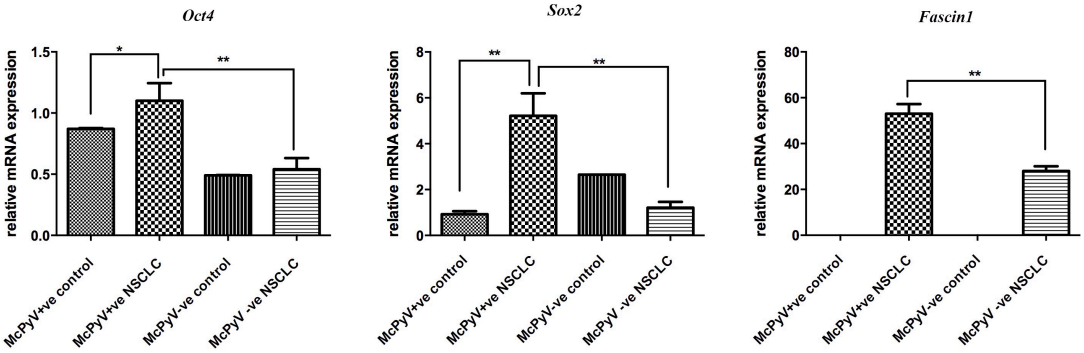
Εικόνα 12. Πρότυπο έκφρασης των γονιδίων στόχων του microRNA 21: *Hif1a, Timp3, Daxx, Pkr* σε δείγματα ΜΜΚΠ (MCPyV+ve N=8, MCPyV-ve N=16) και μάρτυρες (MCPyV+ve N=5, MCPyV-ve N=5) σε σχέση με την ύπαρξη MCPyV DNA. One-way Anova και confirmatory student's t test.
$p<0.05$, ** $p<0.005$, *** $p<0.0005$

Τα μετάγραφα των γονιδίων στόχων του miR-376c, τα *Alk-7, Mmp9* και G*rb2* ήταν σημαντικά λιγότερα στα MCPyV θετικά δείγματα ΜΜΚΠ συγκριτικά με τους μάρτυρες και τα MCPyV αρνητικά (Εικόνα 13). Τα *Alk7* και *Grb2* συσχετίστηκαν αρνητικά σε σημαντικό βαθμό με το miR-367c στα MCPyV θετικά δείγματα ΜΜΚΠ, ενώ το *Mmp9* ανέδειξε μια μικρότερη αρνητική συσχέτιση με την έκφραση του miR-376c στα MCPyV θετικά δείγματα ΜΜΚΠ.



Εικόνα 13. Πρότυπο έκφρασης των γονιδίων στόχων του microRNA 376c: *Alk7, Mmp9, Grb2* σε δείγματα ΜΜΚΠ (MCPyV+ve N=8, MCPyV-ve N=16) και μάρτυρες (MCPyV+ve N=5, MCPyV-ve N=5) σε σχέση με την ύπαρξη MCPyV DNA. One-way Anova και confirmatory student's t test.
$p<0.05$, ** $p<0.005$, *** $p<0.0005$

Το miR-145, το οποίο στοχεύει τα γονίδια *Oct4, Sox2* και *Fascin1* βρέθηκε υπερεκφρασμένο στα MCPyV θετικά δείγματα ΜΜΚΠ συγκριτικά με τους μάρτυρες και τα MCPyV αρνητικά (Εικόνα 14). Τα *Oct4, Sox2* και *Fascin1* συσχετίστηκαν αρνητικά με το miR-145 στα MCPyV θετικά δείγματα ΜΜΚΠ, τα *Oct4* και *Sox2* ανέδειξαν ένα πτωχό αποτέλεσμα συσχέτισης, ενώ το *Fascin1* ανέδειξε ένα μέτριο έως δυνατό συντελεστή συσχέτισης.



Εικόνα 14. Πρότυπο έκφρασης των γονιδίων στόχων του microRNA 376c: *Oct4, Sox2, Fascin1* σε δείγματα ΜΜΚΠ (MCPyV+ve N=8, MCPyV-ve N=16) και μάρτυρες (MCPyV+ve N=5, MCPyV-ve N=5) σε σχέση με την ύπαρξη MCPyV DNA. One-way Anova και confirmatory student's t test.
$p<0.05$, ** $p<0.005$, *** $p<0.0005$

Τα επίπεδα μεταγράφων του *Akt-1* συσχετίστηκαν σημαντικά με την καπνιστική συνήθεια μόνο στα MCPyV αρνητικά δείγματα ΜΜΚΠ. Καμία άλλη σημαντική συσχέτιση μεταξύ γονίδια στόχους των microRNA και κλινικών παραμέτρων δε βρέθηκε.

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η κύρια αιτία θνησιμότητας που σχετίζεται με τον καρκίνο στις Ηνωμένες Πολιτείες, με κατ 'εκτίμηση 224.390 νέες περιπτώσεις και 158.080 θάνατοι αναμένονται το 2016 (ACS 2016). Κλασικά, αποφάσεις θεραπείας ήταν εμπειρικές και με βάση την ιστολογική εξέταση του όγκου. Χημειοθεραπεία βασισμένη στο λευκόχρυσο παραμένει ο ακρογωνιαίος λίθος της θεραπείας. Ωστόσο, τα ποσοστά επιβίωσης παραμένουν χαμηλά. Νέες θεραπείες και στρατηγικές θεραπείας είναι απαραίτητες.

Υπολογίζεται ότι μία στις πέντε περιπτώσεις καρκίνου παγκοσμίως προκαλείται από μόλυνση, με την πλειοψηφία να προκαλείται από τους ογκο-ιούς (157, 158). Οι περισσότεροι από τους ιούς είναι ικανοί να εκφράζουν ιικά γονίδια, προκαλώντας μεταβολές στην κυτταρική ανάπτυξη, πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των μολυσμένων κυττάρων. Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο να δημιουργήσει μια σχέση μεταξύ της ανθρώπινης λοίμωξης polyomavirus και ΜΜΚΠ. Επιπλέον, μελετήθηκε η έκφραση των ογκογονιδίων, ογκοκατασταλτικών γονιδίων, γονιδίων απόπτωσης αλλά και επιγενετικών μηχανισμών που σχετίζονται με MCPyV σε μολυσμένα δείγματα ΜΜΚΠ, σε μια προσπάθεια να αξιολογηθούν οι πιθανοί μηχανισμοί ογκογένεσης σε αυτή την ομάδα ασθενών.

Σημαντικό εύρημα είναι η επίπτωση 9,1% του MCPyV στην ομάδα ΜΜΚΠ. Επιπλέον, ανιχνεύθηκε μια αυξημένη έκφραση του mRNA του *Braf* και μειωμένο επίπεδο μεταγραφής *Bcl-2* στα MCPyV-θετικά δείγματα ΜΜΚΠ. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν την εμπλοκή του Merkel Cell Polyoma Virus σε αυτόν τον τύπο καρκίνου του πνεύμονα μέσω απορρύθμισηw των παραπάνω γονιδίων.

Τα MCPyV-θετικά δείγματα κυρίως ελήφθησαν από άνδρες καπνιστές, και περιελάμβαναν κυρίως αδενοκαρκινώματα (50%) που ακολουθούνται από καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων (30%). Τα ευρήματα αυτά είναι αξιοσημείωτα δεδομένου ότι μια σημαντική αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα έχει παρατηρηθεί, ξεπερνώντας αυτή του πλακώδους καρκινώματος. Η αλληλεπίδραση "γονίδιο-περιβάλλον" που υποτίθεται ότι ευθλυνεται για την προώθηση αυτής της αλλαγής (159) μπορεί να είναι ένας ευρέως διαδεδομένος μολυσματικός παράγοντας, ικανός να αλληλεπιδρά με τις περιβαλλοντικές προσβολές προκαλώντας επιδεκτικότητα σε γενετική μετάλλαξη και τελικά ογκογένεση.

Η ανιχνευόμενη συχνότητα των MCPyV-θετικών δείγματων (9,1%) σε ΜΜΚΠ είναι μέσα στα πλαίσια επίπτωσης των προσδιορισμένων ποσοστών επικράτησης δύο προηγούμενων μελετών: μία MCPyV και HPV συν-μελέτη (160) και μια πρόσφατη μελέτη της παρουσίας MCPyV DNA σε ΜΜΚΠ από τη Χιλή (161). Η HPV και MCPyV συν-μελέτη προτείνει την παρουσία MCPyV στο 16,7% των 30 ασθενών με ΜΜΚΠ, κυρίως πλακώδους καρκινώματος καπνιστών. Είναι ενδιαφέρον ότι, τα ευρήματα αυτά προέρχονταν τόσο από κακοήθεις περιοχές όσο και απο παρακείμενο καλοήθη ιστό. Ερευνητές ανίχνευσαν επίσης δύο καλοήθη MCPyV θετικά δείγματα αλλά δεν τους αντιστοιχούν κακοήθη. Η παρούσα μελέτη εξέτασε 110 ασθενείς με ΜΜΚΠ, συμπεριλαμβανομένης μιας ομάδας ελέγχου που αποδείχθηκε ότι είναι αρνητική για MCPyV DNA. Η ασυμφωνία μεταξύ των τριών αυτών μελετών μπορεί να είναι αποτέλεσμα των διαφορών στον πληθυσμό των ασθενών που μελετήθηκε, καθώς και η διαφορά στην ομάδα ελέγχου που δοκιμάζεται. Αξίζει να σημειωθεί ότι, έχουμε επίσης δείξει μια θετική τάση στο κάπνισμα, δεδομένου ότι η πλειοψηφία των MCPyV-θετικών δειγμάτων ελήφθησαν από καπνιστές. Οι διαφορές μεταξύ των τριών αυτών μελετών μπορεί επίσης να αποδοθεί σε διακυμάνσεις δειγματοληπτικές. Η μελέτη από τη Χιλή περιείχε μόνο αδενοκαρκινώματα και πλακώδη καρκινώματα σε αναλογία 1: 1, ενώ η παρούσα μελέτη συμπεριέλαβε όλα τα είδη ιστολογικών τύπων ΜΜΚΠ και η αναλογία μεταξύ τους απεικονίζει την τάση τους σε μια διαφορετική γεωγραφική περιοχή. Επιπλέον, οι συγγραφείς από την Χιλή δήλωσαν ότι το πτωχό ποσοστό τους πιθανώς οφείλεται στη χαμηλή ποιότητα του δείγματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μια ποσοτική μελέτη (162), έχει αποδειχθεί ότι η συχνότητα εμφάνισης των MCPyV DNA στον ιστό του καρκίνου του πνεύμονα είναι δύο φορές πιο συχνή από τον υγιή πνευμονικό ιστό, αν και στην παρούσα μελέτη στο φυσιολογικό ιστό δε βρέθηκε παρουσία MCPyV. Σημειώνεται ότι η απουσία MCPyV στην ομάδα ελέγχου της παρούσας μελέτης μπορεί να είναι αποτέλεσμα του μικρού μεγέθους του δείγματος ελέγχου.

Είναι γνωστό ότι η παρουσία DNA ιού δεν είναι μια επαρκής συνθήκη για την υποστήριξη της συμμετοχής του στην ογκογένεση. Αρκετοί DNA ιοί μπορεί να μην είναι ισχυροί προαγωγοί του νεοπλαστικού μετασχηματισμού. Αντ 'αυτού η μακροπρόθεσμη παρουσία αυτών των ιών και οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με αυτούς στο κύτταρο μπορεί να συμβάλουν σε ένα περιβάλλον που είναι ευεργετικό για τον ιό, και το γεγονός αυτό μπορεί να παίζει κρίσιμο ρόλο στη μετάβαση από πρόδρομο νεοπλασματική βλάβη προς κακοήθεια. Έτσι, η παρούσα μελέτη διερεύνησε περαιτέρω τη γονιδιωματική έκφραση μιας ποικιλίας γονιδίων που εμπλέκονται σε

βασικές κυτταρικές λειτουργίες, προκειμένου να διερευνηθεί η ενδεχόμενη σύνδεση μεταξύ του ιού και της ογκογένεσης. Το κύριο εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν η καταστολή του γονιδίου *Bcl-2* σε ΜΜΚΠ. Επιπλέον, η αυξημένη έκφραση του γονιδίου *Braf* παρατηρήθηκε στα MCPyV-θετικά δείγματα ΜΜΚΠ. Έρευνες έχουν δείξει ότι η κατάλυση του *Braf* δεν είχε σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη του ΜΜΚΠ (163). Επιπλέον, μεταλλάξεις *Braf* υποβάλλονται σε προσεκτική παρατήρηση, καθώς πιστεύεται ότι είναι εξαιρετικοί θεραπευτικοί στόχοί, με τη μετάλλαξη του *Braf* εξόνιου 15 σε ασθενείς με NSCLC χωρίς άλλες μεταλλάξεις του γονιδίου να είναι αρκετή για να εντοπίσει υποψήφιους για θεραπεία, σε άνδρες ασθενείς με ΜΜΚΠ και σε ασθενείς οι οποίοι είναι βαρείς καπνιστές (164). Μια συχνότητα του 3% των *Braf* μεταλλάξεων σε αδενοκαρκινώματα πνεύμονα ανιχνεύθηκε, υποδεικνύοντας ότι όλοι οι ασθενείς με μετάλλαξη BRAF ήταν νυν ή πρώην καπνιστές (131). Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες του HPyV παρεμβαίνουν στην κανονική δράση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου, όπως p53, pRb, cyclins, cyclin-dependent kinases (CDK) και CDK αναστολείς, επάγωντας τη δράση της τελομεράσης, αστάθεια DNA, διαταραχή αποδόμησης πρωτεϊνών και πρόληψη της απόπτωσης (165). Δύο από τις κύριες οδούς σηματοδότησης που διεγείρονται από το Middle T antigen (MT) των polyoma ιών είναι οι mitogen-activated protein kinase (MAPK) μέσω του Ras/ raf μονοπατιού (166) και οι φωσφατιδυλινοσιτόλη 3-κινάση (PI3K) καταρράκτες. *Braf* αυξορρύθμιση που οδηγεί σε κατάντη υπερέκφραση του μονοπατιού MAPK / ERK και, τελικά, σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, μπορεί να είναι ένα άμεσο αποτέλεσμα πολυόμα πρωτεΐνης πολυώματος που μετασχηματίζει το κύτταρο, συμβάλλοντας έτσι στην καρκινογένεση.

Τρίτη σημαντική παρατήρηση, η υποέκφραση του γονιδίου *Bcl-2* στα MCPyV θετικά δείγματα καρκίνου του πνεύμονα, η οποία έχει συσχετισθεί σε προηγούμενες μελέτες με μια πιο επιθετική συμπεριφορά του NSCLC (167). Το δεύτερο κύριο μονοπάτι σηματοδότησης που διεγείρεται από το Middle T antigen (MT) είναι ο καταρράκτης της φωσφατιδυλινοσιτόλη 3-κινάσης (PI3K), η οποία οδηγεί, μέσω Akt, στη φωσφορυλίωση του Bcl-2-associated death agonist (*BAD*), που με τη σειρά του επαναφέρει τα αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα της *BAD*-binding protein $BCL\text{-}X_L$ (166). Παρά το γεγονός ότι ο κύριος στόχος της παρούσας μελέτης δεν ήταν να διερευνήσει το μονοπάτι PI3K / Akt, ερευνήσαμε την απορρύθμιση της απόπτωσης από την έκφραση των δύο γονιδίων που βρίσκονται κατάντη του καταρράκτη PI3K: Bax και Bcl-2. Μία αναλογία <1 του Bax / Bcl-2 δείχνει

υπερέκφραση του Bcl-2 και την απώλεια της Bax, σε σύγκριση με το κανονικό βρογχικό επιθήλιο και έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τη σοβαρότητα των προνεοπλαστικών βλαβών, από χαμηλού βαθμού σε υψηλής ποιότητας. Στην παρούσα μελέτη, μία στατιστικά σημαντική υποέκφραση του Bax σε δείγματα καρκίνου του πνεύμονα, του οποίου ο ρόλος συνίσταται στην επιτάχυνση προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου με σύνδεση προς, και ανταγωνισμό, την καταστολέα απόπτωσης Bcl-2. Το σύνολο των δειγμάτων ιστού καρκίνου του πνεύμονα είχε αναλογία Bax / Bcl-2 <1, σύμφωνα με τις μελέτες που εμπλέκουν τέτοιες αναλογίες με νεοπλασίες (135). Είναι ενδιαφέρον ότι τα MCPyV-θετικά δείγματα είχαν πτωχότερα Bcl 2 επίπεδα σε σύγκριση με MCPyV-αρνητικά δείγματα, που οδηγεί προς μια απώλεια της δραστικότητας καταστολέα απόπτωσης, η οποία μπορεί να συμβάλει στον ανώμαλο πολλαπλασιασμό. Υποθέτουμε ότι η ευαισθησία της Bcl-2 απορρύθμισης μπορεί να είναι ένας παράγοντας που συμβάλλει στη μόλυνση από MCPyV. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η Bcl-2 σχετιζόμενο αθανατοποιητικό γονίδιο, Bag3 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με το Large T antigen του JCPyV και να καταστέλλει την έκφραση LTA σε πρωτόγονους νευροεκτοδερμικούς όγκους, υποδηλώνοντας ότι Bag3 επηρεάζει την έκφραση του LTA στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο, πιθανότατα από την αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης (168). Ευρήματα μιας πρόσφατης μελέτης υποδηλώνουν ότι Bcl-2 θετικότητα δείχνει καλύτερο κλινικό στάδιο κατά το χρόνο της διάγνωσης με λιγότερες μετάστασεις και μακρύτερη ποσοστό επιβίωσης σε ασθενείς με MCC (169). Στην παρούσα μελέτη, όλα τα MCPyV-θετικά δείγματα βρέθηκαν θετικά για την έκφραση Bcl-2, και ενώ τα δεδομένα από τα ποσοστά επιβίωσης δεν μπορούν να συσχετιστούν αυτή τη στιγμή με την έκφραση Bcl-2, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η μόλυνση MCPyV σε καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα μπορεί να τροποποιήσει το πρότυπο έκφρασης αλλά δεν καταστέλλει την έκφραση της Bcl-2. Περαιτέρω μελέτες μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τα ποσοστά επιβίωσης του καρκίνου του πνεύμονα σε σχέση με την έκφραση Bcl-2.

Το LT-ag του MCPyV περιέχει ένα υποτιθέμενο χώρο δέσμευσης του p53 που μπορεί να χαθεί όταν ο ιός υφίσταται μετάλλαξη περικοπής στον ιστό (170). Πρόσφατα, δείχθηκε οτι ασθενείς με MCC με υψηλότερο ιικό απόθεμα έτειναν να συνδέονται με χαμηλότερη έκφραση p53 και μακρύτερη επιβίωση (171), ενώ σε μία άλλη μελέτη η έκφραση p53 στον MCC όγκο συνδέθηκε με δυσμενή επιβίωση (172). Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη με στόχο τη βελτίωση της ευαισθησίας ανίχνευσης του MCPyV στο MCC, αποκάλυψε ότι ενώ όλα τα MCC μπορεί να περιέχει MCPyV

DNA, οι όγκοι μπορούν να επιλεγούν για την παρουσία μεταλλάξεων απενεργοποιήσεως p53 όταν δεν εκφράζονται τα ιικά αντιγόνα T. Επιπλέον, στην περίπτωση που οι MCPyV θετικοί MCC όγκοι διαταράξουν τη p53 σηματοδότηση, τότε η παραπάνω επιλογή επιτυγχάνεται με έναν διαφορετικό μηχανισμό που δεν εμπλέκει το C τέρμα LT-ag (173). Στην παρούσα μελέτη, αν και παρατηρήθηκε μια τάση για p53 αυξορρύθμιση στα MCPyV-θετικά δείγματα, το p53 δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την παρουσία MCPyV στα δείγματα ΜΜΚΠ που υποδηλώνει ότι μεταξύ των διαφόρων ανθρώπινων όγκων, ο MCPyV μπορεί να προκαλέσει διαφορετικές ογκογενετικές οδούς.

Όσον αφορά την έκφραση του *RB1*, βρήκαμε ότι η παρουσία MCPyV δεν συσχετίζεται με αφθονία των μεταγράφων *RB1*σε δείγματα ΜΜΚΠ. Αυτό το εύρημα είναι σε συμφωνία με την αντίστοιχη έκφραση και φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Retinoblastoma σε MCPyV-θετικά και -αρνητικά Merkel Cell Cacrinoma cells (174).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι αν και ο MCPyV είναι πιθανώς ένας ογκογόνος πολυόμα ιός σε ανθρώπους και δυνητικά σχετίζεται αιτιολογικά με την ανάπτυξη του MCC, δεν είναι προς το μορφολογικό παρόμοιο SCLC(175). Μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία του MCPyV DNA είναι υψηλότερη σε αναπνευστικά δείγματα από ασυμπτωματικούς ασθενείς μετά από μεταμόσχευση πνεύμονα σε σύγκριση με τους KIPyV και WUPyV (176), ενώ σε μια μελέτη για την οξεία λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος περισσότεροι ενήλικες από παιδιά ήταν θετικοί για το αναπνευστικό MCPyV σε αντίθεση με τους KIPyV και WUPyV(177). Φαίνεται πιθανό ότι η παρουσία του MCPyV στο πνευμονικό παρέγχυμα παίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην εξέλιξη της πνευμονικών νόσων σε ενήλικες, και δεδομένου ότι η φλεγμονή έχει υποτεθεί ότι είναι σημαντική στην πνευμονική καρκινογένεση (178), οι ιογενείς λοιμώξεις μπορεί να αποτελούν ένα βασικό κομμάτι της διαδικασίας. Δεν υπήρξε καμία ανίχνευση του ιού JCPyV ή BKPyV DNA σε οποιοδήποτε από τα δείγματα ΜΜΚΠ, σύμφωνα με την έλλειψη αποδεικτικών στοιχείων προς έναν αιτιοπαθολογικό ρόλο αυτών των πολυόμα ιών και των καρκινωμάτα του πνεύμονα. Παρά το γεγονός ότι οι ανθρώπινοι πολυόμα ιοί έχουν παγκόσμια παρουσία και υψηλή οροθετικότητα σε όλο τον κόσμο, κανένα από τα δείγματα του πληθυσμού μαρτύρων από τον έλεγχό μας δεν απεδείχθει θετικό για DNA MCPyV, BKPyV ή JCPyV.

Οι περισσότεροι από τους ιούς είναι ικανοί να εκφράζουν ιικά γονίδια ή ακόμα και microRNAs, προκαλώντας μεταβολές στην κυτταρική ανάπτυξη, πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των μολυσμένων κυττάρων. Η παρούσα μελέτη,

λοιπόν, στόχευσε στη συνέχεια στη δημιουργία σύνδεσης μεταξύ της μόλυνσης του ανθρώπου με πολυόμα ιό McPyV στον και επιγενετικές μεταβολές στην έκφραση τόσο των microRNA όσο και των γονιδίων στόχων τους. Μεταξύ άλλων microRNAs που αξιολογήθηκαν, τα miR-21, miR-376c και miR-145 έδειξαν μια σοβαρή απορύθμιση της έκφρασης παρουσία MCPyV DNA σε δείγματα ΜΜΚΠ. Το miR-21 έχει ερευνηθεί εκτενώς, και θεωρείται ένα τυπικό «ογκο-miR», δρώντας ανασταλτικά στην έκφραση φωσφατασών, οι οποίες περιορίζουν τη λειτουργία μονοπατιών όπως των AKT και MAPK(179). Ερευνητές έχουν επίσης διατυπώσει η άποψη ότι το miR-21 μπορεί να προβλέψει επανεμφάνιση και δυσμενή πρόγνωση σε ΜΜΚΠ (155).

Επιθετικότητα κακοήθειας

Η παρούσα μελέτη συμπεριέλαβε γονίδια στόχους του miR-21 και των συναφών μονοπατιών, που εμπλέκονται στην πλειοψηφία των χαρακτηριστικών του καρκίνου (86). Τα *Pten* και *Braf* - γονίδια που εμπλέκονται στη διατήρηση σηματοδότησης πολλαπλασιασμού - βρέθηκαν απορυθμισμένα στα MCPyV-θετικά δείγματα ΜΜΚΠ. Υψηλά miR-21 / χαμηλά *Pten* επίπεδα έκφρασης, όπως και στα παρόντα αποτελέσματα, υποδεικνύουν μια φτωχή αναστολή Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) με κακή κλινική ανταπόκριση και βραχύτερη επιβίωση(180), ενώ η καταστολή του miR-21 μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη του όγκου μέσω της *Pten* υπερέκφρασης (181). Επιπλέον, το *Braf* έχει μελετηθεί εκτενώς για σημαντικές μεταλλάξεις σε ασθενείς με ΜΜΚΠ (182). Όσον αφορά τα γονίδια που εμπλέκονται στην αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο, ερευνήσαμε την ισορροπία Bax / Bcl-2. Το *Bax*, ευρέως γνωστός προ-αποπτωτικός παράγοντας, και Bcl-2, εκπρόσωπος των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, βρέθηκαν να υποεκφράζονται σε MCPyV-θετικό ΜΜΚΠ, αρνητικά συσχετιζόμενα με το miR-21. Σε μια πρόσφατη μελέτη (183) πρότειναν ότι η υπερέκφραση του miR-21 θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση των επιπέδων mRNA αλλά και πρωτεΐνης του *Bcl-2* σε πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα. Από τα αποτελέσματα μας δείχνουν μια σημαντική επιρροή του miR-21 στην έκφραση του *Bcl-2* μόνο σε MCPyV-θετικά δείγματα, και φαίνεται εύλογο ότι ο MCPyV επηρεάζει το miR-21, προωθώντας ένα πιο επιθετικό νεοπλασματικό φαινότυπο, δεδομένου ότι ποσοστό <1 του Bax / Bcl- 2, όπως παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, υποδεικνύει την υπερέκφραση του Bcl-2 και την απώλεια της Bax, σε σύγκριση με κανονικό βρογχικό επιθήλιο και έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει με τη σοβαρότητα των προνεοπλαστικών βλαβών, από χαμηλού βαθμού έως υψηλού βαθμός (184). Είναι ενδιαφέρον ότι τα MCPyV-θετικά δείγματα είχαν σημαντικά

χαμηλότερο *Bcl-2*, καθώς και τα επίπεδα *Bax,* σε σύγκριση με τα MCPyV-αρνητικά δείγματα, τονίζοντας την πιθανή απώλεια ρύθμισης του καταστολέα απόπτωσης. Δεδομένου ότι το ογκοκατασταλτικό *Bax* δεν είναι άμεσος στόχος του miR-21, μπορεί να προταθεί ότι η ισορροπία Bcl-2 / Bax επηρεάζεται από την παρουσία του DNA MCPyV μέσω διαφόρων οδών, αν και το miR-21 είναι ένα ουσιαστικό μέρος αυτής της απορρύθμισης . Η γενομική σταθερότητα σχετίζεται με τα γονίδια p53, Akt-1 και Akt-2, που ήταν όλα υποεκφρασμένα σε MCPyV-θετικά δείγματα ΜΜΚΠ σε σύγκριση με MCPyV θετικούς υγιείς πνεύμονες. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η αναστολή του miR-21 θα είναι επωφελής σε επαγωγή απόπτωσης σε καρκινικές θεραπείες που κατευθύνονται έναντι p53-ανεπαρκών όγκων (185), εκτός από τα δεδομένα που υποδηλώνουν ότι η υποέκφραση του miRNA-21 θα μπορούσε να ευαισθητοποιεί ραδιοανθεκτικά κύτταρα ΜΜΚΠ, με αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και ενίσχυση της απόπτωσης μέσω της αναστολής του PI3K / Akt μονοπατιού (121) σηματοδότησης. Τα αποτελέσματά μας προσθέτουν μία νέα προοπτική σε αυτές τις υποθέσεις: η λοίμωξη από πολυόμα ιό φαίνεται να συμβάλλει αρνητικά στην απορύθμιση αυτών των γονιδίων μέσω του miR-21. Επίσης, έχει προταθεί ότι η απώλεια του αγγειογόνου απορυθμιστή, *Timp3*, προωθεί την κακοήθεια και την επακόλουθη υποτροπή με κακή πρόγνση σε ασθενείς με HPV-μολυσμένο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (186). Στην παρούσα μελέτη, τα MCPyV-μολυσμένα κύτταρα ΜΜΚΠ έδειξαν σημαντική υποέκφραση Timp3 σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Ερευνώμενα μαζί, αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να υπαινίσσονται μια φτωχότερη έκβαση παρουσία MCPyV DNA σε ΜΜΚΠ ασθενείς.

Το miR-376c, σημαντικά υπερεκφράστηκε σε MCPyV-θετικά δείγματα ΜΜΚΠ, και συσχετίζεται αρνητικά με όλα τα γονίδια-στόχους του, *Alk7*, *Mmp9* και *Grb2*, με καθένα από αυτά να υποεκφράζεται σε MCPyV-θετικά δείγματα ΜΜΚΠ. Το miR-376c έχει προταθεί να αναστέλλει την έκφραση του *Alk7* και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς και την απόπτωση σε κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών (152), και να οδηγή σε κακή απόκριση στη χημειοθεραπεία(187). Επιπλέον, πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι το Grb2-associated binder 2 (Gab2) υπερεκφράζεται σε κακοήθεις ιστούς του πνεύμονα και μπορεί να διεγείρει την ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα (188). Σε συνδυασμό, αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η υπερέκφραση του miR-376c σε MCPyV θετικούς ασθενείς με ΜΜΚΠ, οδηγεί στην απορύθμιση των γονιδίων στόχων του, και θα μπορούσε να συνεπάγεται μια χειρότερη πρόγνωση όσον αφορά την μετανάστευση και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα.

Τέλος, το miR-145 αποτελεί προτεινόμενο ογκοκατασταλτικό (189). Η ενεργοποίηση EGFR έχει προταθεί ότι εμπλέκεται στην αρνητική ρύθμιση του miR-145 σε κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα (146). Στη μελέτη μας, το miR-145 μέτρια υποεκφράστηκε σε MCPyV-θετικές περιπτώσεις ΜΜΚΠ σε σύγκριση με αντίστοιχους μάρτυρες, ενώ προέκυψε μια πενταπλάσια υποέκφραση στα MCPyV-θετικά δείγματα σε σχέση με MCPyV-αρνητικά. Το miR-145 γονίδια στόχοι, *Oct4 / Sox2 / Fascin1* όλα συσχετίστηκαν σημαντικά με το miR-145. Θα μπορούσε να υποτεθεί ότι το miR-145 στο MCPyV-θετικό ΜΜΚΠ είναι σε θέση να επηρεάσει τα γονίδια-στόχους του, όπως φαίνεται από τη θετική συσχέτιση μεταξύ miR-145 και Oct4 / Sox2 / Fascin1in αυτή η ομάδα. Είναι ενδιαφέρον ότι, υπάρχει μια διακριτή δυσρύθμιση του miR-145 παρουσία MCPyV, η οποία δεν φαίνεται να επηρεάζει τα γονίδια-στόχους. Από την άλλη πλευρά, οι δυνατότητες ογκοκαταστολής του miR-145 φαίνεται να είναι άθικτη στα MCPyV-αρνητικά δείγματα ΜΜΚΠ, όπου η αρνητική συσχέτιση μεταξύ miR-145 και γονιδίων-στόχων του απεικονίζεται με σαφήνεια. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι στους MCPyV θετικούς ασθενείς με ΜΜΚΠ, η miR-145 υποέκφραση μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια των προστατευτικών λειτουργιών του miR-145 σε αυτούς τους ασθενείς μέσω διαφορετικών γονιδίων στόχων.

Φυσική Ανοσία και ιογενής παρουσία

Στην παρούσα μελέτη,τα γονίδια στόχοι του miR-21 και τα συναφή μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται στην ιική απόκριση, επαγώγιμα από την τύπου I ιντερφερόνη γονίδια *Daxx, Pkr*, καθώς και *Hif1a*, ήταν απορυθμισμένα σε MCPyV-θετικά δείγματα ΜΜΚΠ. Η συμμετοχή της *Daxx* σε υπερμεθυλίωση του DNA και απόπτωση (190) εμφανίστηκε πρόσφατα, ενώ η *Hif1a* υπερέκφραση, όπως στα MCPyV-θετικά δείγματα ΜΜΚΠ, έχει σχετιστεί (191) με τον σχηματισμό του βλαστοκυττάρων που μοιάζουν με καρκινικά, που υφίστανται μια διαδικασία ενδοθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης, τα οποία αναστέλλονται από το miR-21. Στην παρούσα μελέτη, η έκφραση *Daxx* και *Hif1a* συσχετίζεται θετικά με τη miR-21 έκφρασης σε MCPyV-θετικό NSCLC, γεγονός που υποδηλώνει μια miR-21-ανεξάρτητη έκφραση των γονιδίων αυτών σε MCPyV-θετικό ΜΜΚΠ. Η *Pkr*, η οποία συσχετίζεται αρνητικά με miR-21 υπερέκφραση σε MCPyV θετικά δείγματα ΜΜΚΠ, έχει προταθεί να είναι εμπλέκεται σοβαρά στην ανάπτυξη του ΜΜΚΠ και μπορεί να χρησιμεύσει ως πιθανός προγνωστικός δείκτης για ασθενείς με αυτήν την θανάσιμη ασθένεια (192). Η *Pkr* υπερεκφράζεται μόνο σε MCPyV-θετικούς μη-κακοήθεις

ιστούς και όχι σε MCPyV-θετικούς ιστούς ΜΜΚΠ. Αυτό μπορεί να υποδεικνύει μια πιθανή αναστολή της *Pkr* σε καρκινικά κύτταρα που θα αναστέλλει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, και στη συνέχεια θα οδηγήσει και ιό και καρκινικό κύτταρο σε ανθεκτικότητα έναντι ενός ισχυρού ενδογενούς μηχανισμού κυτταρικής άμυνας.

Είναι ενδιαφέρον ότι το δεύτερο δυσρυθμισμένο microRNA στα MCPyV-θετικά ΜΜΚΠ, το miR-376c, έχει βρεθεί ότι είναι σημαντικά αυξημένο στον ορό ασθενών με ιό γρίπης Ασιατικής προέλευσης Α (H7N9) (193), υποδεικνύοντας έτσι μία πιθανή ιική απόκριση microRNA. Η παρουσία του DNA του ιού δεν αποτελεί ικανή συνθήκη για να υποστηρίξει τη συμμετοχή της στην ογκογένεση. Αντιθέτως, η μακροπρόθεσμη παρουσία αυτών των ιών αλλά και οι πρωτεΐνες που σχετίζονται μαζί τους στο κύτταρο μπορεί να συμβάλει σε ένα περιβάλλον που είναι ευεργετικό για τον ιό, με αποτέλεσμα την μετάβαση από νεοπλασματική πρόδρομο προς κακοήθεια. Από πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ιικά αντιγόνα σε μολυσμένους πνεύμονες επάγουν ταχέως μία εξάντληση στα Τα-λεμφοκύτταρα, που χαρακτηρίζεται από προοδευτική λειτουργική βλάβη και αυξορρύθμιση των πολυάριθμων ανασταλτικών υποδοχέων (194) και ότι HBsAg-θετική κατάσταση είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για τη συνολική επιβίωση σε ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ (195), παραμένει πιθανό ότι ιική ευαισθητοποίηση του ανθρώπινου πνεύμονα μπορεί να επηρεάσει την απόπτωση και πνευμονική ογκογένεση.

V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η σύνδεση μεταξύ του καρκίνου του πνεύμονα και μολυσματικών παραγόντων όπως οι ιοί μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερη κατανόηση της επίπτωσης της νόσου σε μη-καπνιστές. Παρά το γεγονός ότι το κάπνισμα εμπλέκεται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα, το γεγονός ότι μόνο μια μειοψηφία των καπνιστών αναπτύσσουν καρκίνο του πνεύμονα στη διάρκεια της ζωής τους κάνει αυτή την ασθένεια σημαντικό μοντέλο για την αξιολόγηση των αλληλεπιδράσεων γονιδίων-περιβάλλοντος. Η παρούσα μελέτη συμβάλλει στο πεδίο της παθογένεσης της καρκινογένεσης του πνεύμονα με την παροχή στοιχείων που εμπλέκουν μόλυνση MCPyV σε ένα αξιοσημείωτο 10% των ασθενών με ΜΜΚΠ, ενώ παρέχει στοιχεία ότι η απορρύθμιση των *Braf* και *Bcl-2* σε MCPyV μολυσμένα κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα μπορεί να είναι ένα από τα κρίσιμα βήματα που εμπλέκονται στη συμβολή του ιού στην καρκινογένεση, μέσω μετασχηματισμού των κυττάρων MCPyV.

Μια πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι παρόλο MCPyV είναι πιθανώς ένας ογκογόνος ιός πολυώματος σε ανθρώπους και δυνητικά αιτιολογικά σχετίζεται με την ανάπτυξη του MCC, δεν έχει σχέση με την μορφολογικά παρόμοιο SCLC (196), ενώ μια άλλη μελέτη προτείνει ότι το DNAτου LT-ag του MCPyV είναι παρούσα σε μια υποομάδα ασθενών με ΜΜΚΠ, η οποία συσχετίστηκε σημαντικά με μεταλλάξεις του EGFR (197). Η παρούσα μελέτη διερεύνησε τις επιγενετικές μεταβολές στα καρκινικά κύτταρα των πνευμόνων που προκαλείται από παρουσία MCPyV DNA σε ασθενείς με ΜΜΚΠ. Τα προφίλ έκφρασης των microRNAs και γονιδίων-στόχων τους σε αυτή τη μελέτη οδηγεί στην υπόθεση ότι η παρουσία του πολυόμα ιού Merkel μπορεί να οδηγήσει σε ένα πιο επιθετικό ΜΜΚΠ, καθώς και πτωχότερη πρόγνωση. Ένα και μόνο miRNA μπορεί να αναστέλλει έως και αρκετές εκατοντάδες mRNAs, άρα η παρεκκλίνουσα έκφραση miRNA μπορεί να καταστείλει μια πληθώρα μετεγράφων και να επηρεάσει βαθιά τα μονοπάτια σηματοδότησης που σχετίζονται με τον καρκίνο. Με αυτό το σκεπτικό, αυτά τα αποτελέσματα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή. Περαιτέρω έρευνα, ιδιαίτερα για θεραπευτικές παρεμβάσεις είναι απαραίτητη για τη σκιαγράφηση επιγενετικών μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτήν την θανάσιμη ασθένεια.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Willis R. Pathology of Tumors. 3rd ed. London: Butterworth & Co; 1960.
2. Okada F. Inflammation-related carcinogenesis: current findings in epidemiological trends, causes and mechanisms. Yonago Acta Med. 2014 Jun;57(2):65-72.
3. Wistuba, II, Berry J, Behrens C, Maitra A, Shivapurkar N, Milchgrub S, et al. Molecular changes in the bronchial epithelium of patients with small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2000 Jul;6(7):2604-10.
4. Hoover R. Epidemiology: tobacco and geographic pathology. Harris CC e, editor. New York: Marcel Dekker; 1978.
5. Hoffmann D, Hecht SS, Ornaf RM, Wynder EL. N'-nitrosonornicotine in tobacco. Science. 1974 Oct 18;186(4160):265-7.
6. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. Cell. 1991 Jan 25;64(2):235-48.
7. http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveilance/documents/document/acspc-027766.pdf. 2008; Available from: http://www.cancer.org/.
8. Langevin SM, Kratzke RA, Kelsey KT. Epigenetics of lung cancer. Transl Res. 2015 Jan;165(1):74-90.
9. A. Ochsner MDB. Carcinoma of the lung. Arch Surg. 1941;42:209-58.
10. ACS. Cancer facts and figures. Washington DC: ACS; 1995.
11. LD Johnston JB, PM O'Malley. Twentieth national survey of American high school seniors and the fourth national survey of eighth and tenth grade students. University of Michigan. 1995.
12. M.A. O'Rourke JRF, P. Feigl , J. Laszlo. Age trends of lung cancer stage at diagnosis: implications for lung cancer in the elderly. . JAMA. 1987;7(258):921-6.
13. Read RC, Yoder G, Schaeffer RC. Survival after conservative resection for T1 N0 M0 non-small cell lung cancer. Ann Thorac Surg. 1990 Mar;49(3):391-8; discussion 9-400.
14. SS Devessa WB, JF Jr Fraumeni Declining lung cancer rates among young men and women in the United States: a cohort analysis. J Natl Cancer Inst. 1987(81):1568-71.
15. Saccomanno G AV, Saunders RP, Auerbach O, Klein MG. Early indices of cancer risk among uranium miners with reference to modifying factors. Ann NY Acad Sci 1976(271):377-83.
16. Pershagen G, Akerblom G, Axelson O, Clavensjo B, Damber L, Desai G, et al. Residential radon exposure and lung cancer in Sweden. N Engl J Med. 1994 Jan 20;330(3):159-64.
17. Ooi WL, Elston RC, Chen VW, Bailey-Wilson JE, Rothschild H. Increased familial risk for lung cancer. J Natl Cancer Inst. 1986 Feb;76(2):217-22.
18. Lovly C, L. Horn, W. Pao. Molecular Profiling of Lung Cancer. 2016; Available from: https://www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/.
19. Little CD, Nau MM, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD. Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. Nature. 1983 Nov 10-16;306(5939):194-6.
20. Funa K, Steinholtz L, Nou E, Bergh J. Increased expression of N-myc in human small cell lung cancer biopsies predicts lack of response to chemotherapy and poor prognosis. Am J Clin Pathol. 1987 Aug;88(2):216-20.
21. Yokota J, Wada M, Yoshida T, Noguchi M, Terasaki T, Shimosato Y, et al. Heterogeneity of lung cancer cells with respect to the amplification and rearrangement of myc family oncogenes. Oncogene. 1988 Jun;2(6):607-11.

22. Aisner SC, Finkelstein DM, Ettinger DS, Abeloff MD, Ruckdeschel JC, Eggleston JC. The clinical significance of variant-morphology small-cell carcinoma of the lung. J Clin Oncol. 1990 Mar;8(3):402-8.
23. Mukhopadhyay T, Tainsky M, Cavender AC, Roth JA. Specific inhibition of K-ras expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA. Cancer Res. 1991 Mar 15;51(6):1744-8.
24. Georges RN, Mukhopadhyay T, Zhang Y, Yen N, Roth JA. Prevention of orthotopic human lung cancer growth by intratracheal instillation of a retroviral antisense K-ras construct. Cancer Res. 1993 Apr 15;53(8):1743-6.
25. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. Science. 1991 Nov 22;254(5035):1138-46.
26. Sozzi G, Pastorino U, Moiraghi L, Tagliabue E, Pezzella F, Ghirelli C, et al. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. Cancer Res. 1998 Nov 15;58(22):5032-7.
27. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Cotticelli MG, Inoue H, et al. The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. Cell. 1996 Apr 5;85(1):17-26.
28. Ji L, Fang B, Yen N, Fong K, Minna JD, Roth JA. Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. Cancer Res. 1999 Jul 15;59(14):3333-9.
29. Quinlan DC, Davidson AG, Summers CL, Warden HE, Doshi HM. Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. Cancer Res. 1992 Sep 1;52(17):4828-31.
30. J. A. DeCaprio MJI, E.O. Major. Polyomaviruses. Knipe DM, Howley, P.M.,, editor. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, and Wolters Kluwer; 2013.
31. Carter JJ, Daugherty MD, Qi X, Bheda-Malge A, Wipf GC, Robinson K, et al. Identification of an overprinting gene in Merkel cell polyomavirus provides evolutionary insight into the birth of viral genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jul 30;110(31):12744-9.
32. Schowalter RM, Buck CB. The Merkel cell polyomavirus minor capsid protein. PLoS Pathog. 2013;9(8):e1003558.
33. Fulghieri C, Bloom S. SarahElizabeth Stewart. Emerg Infect Dis. 2014 May;20(5):893-5.
34. Sweet BHH, M.R. The vacuolating virus, SV40. Proc Soc Exp Biol Med. 1960(105):420-7.
35. Cheng JD, J.A.; Fluck, M.M.; Schaffhausen, B.S. . Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyomavirus T antigens. Semin Cancer Biol. 2009(19):218-28.
36. An P, Saenz Robles MT, Pipas JM. Large T antigens of polyomaviruses: amazing molecular machines. Annu Rev Microbiol. 2012;66:213-36.
37. Valis JD, Strandberg JD, Shah KV. Transformation of hamster kidney cells by simian papovavirus SA12. Proc Soc Exp Biol Med. 1979 Feb;160(2):208-12.
38. Bastien C, Feunteun J. The hamster polyomavirus transforming properties. Oncogene. 1988 Feb;2(2):129-35.
39. Chen JD, Neilson K, Van Dyke T. Lymphotropic papovavirus early region is specifically regulated transgenic mice and efficiently induces neoplasia. J Virol. 1989 May;63(5):2204-14.
40. Dela Cruz FN, Jr., Giannitti F, Li L, Woods LW, Del Valle L, Delwart E, et al. Novel polyomavirus associated with brain tumors in free-ranging raccoons, western United States. Emerg Infect Dis. 2013 Jan;19(1):77-84.
41. Simmons JH, Riley LK, Franklin CL, Besch-Williford CL. Hamster polyomavirus infection in a pet Syrian hamster (Mesocricetus auratus). Vet Pathol. 2001 Jul;38(4):441-6.

42. Colegrove KM, Wellehan JF, Jr., Rivera R, Moore PF, Gulland FM, Lowenstine LJ, et al. Polyomavirus infection in a free-ranging California sea lion (Zalophus californianus) with intestinal T-cell lymphoma. J Vet Diagn Invest. 2010 Jul;22(4):628-32.
43. Stevens H, Bertelsen MF, Sijmons S, Van Ranst M, Maes P. Characterization of a novel polyomavirus isolated from a fibroma on the trunk of an African elephant (Loxodonta africana). PLoS One. 2013;8(10):e77884.
44. Johne R, Muller H. Polyomaviruses of birds: etiologic agents of inflammatory diseases in a tumor virus family. J Virol. 2007 Nov;81(21):11554-9.
45. Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ, et al. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. Arch Virol. 2011 Sep;156(9):1627-34.
46. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. Lancet. 1971 Jun 19;1(7712):1253-7.
47. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. Lancet. 1971 Jun 19;1(7712):1257-60.
48. Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, et al. Identification of a third human polyomavirus. J Virol. 2007 Apr;81(8):4130-6.
49. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. PLoS Pathog. 2007 May 4;3(5):e64.
50. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. Science. 2008 Feb 22;319(5866):1096-100.
51. Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. Cell Host Microbe. 2010 Jun 25;7(6):509-15.
52. van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. PLoS Pathog. 2010 Jul 29;6(7):e1001024.
53. Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kuhn J, et al. A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. J Virol. 2011 May;85(9):4586-90.
54. Sauvage V, Foulongne V, Cheval J, Ar Gouilh M, Pariente K, Dereure O, et al. Human polyomavirus related to African green monkey lymphotropic polyomavirus. Emerg Infect Dis. 2011 Aug;17(8):1364-70.
55. Buck CB, Phan GQ, Raiji MT, Murphy PM, McDermott DH, McBride AA. Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus. J Virol. 2012 Oct;86(19):10887.
56. Siebrasse EA, Reyes A, Lim ES, Zhao G, Mkakosya RS, Manary MJ, et al. Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. J Virol. 2012 Oct;86(19):10321-6.
57. Yu G, Greninger AL, Isa P, Phan TG, Martinez MA, de la Luz Sanchez M, et al. Discovery of a novel polyomavirus in acute diarrheal samples from children. PLoS One. 2012;7(11):e49449.
58. Lim ES, Reyes A, Antonio M, Saha D, Ikumapayi UN, Adeyemi M, et al. Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. Virology. 2013 Feb 20;436(2):295-303.

59. Korup S, Rietscher J, Calvignac-Spencer S, Trusch F, Hofmann J, Moens U, et al. Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. PLoS One. 2013;8(3):e58021.
60. Mishra N, Pereira M, Rhodes RH, An P, Pipas JM, Jain K, et al. Identification of a novel polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and vasculitic myopathy. J Infect Dis. 2014 Nov 15;210(10):1595-9.
61. Moens U, Van Ghelue M, Song X, Ehlers B. Serological cross-reactivity between human polyomaviruses. Rev Med Virol. 2013 Jul;23(4):250-64.
62. Nicol JT, Leblond V, Arnold F, Guerra G, Mazzoni E, Tognon M, et al. Seroprevalence of human Malawi polyomavirus. J Clin Microbiol. 2014 Jan;52(1):321-3.
63. Lim ES, Meinerz NM, Primi B, Wang D, Garcea RL. Common exposure to STL polyomavirus during childhood. Emerg Infect Dis. 2014 Sep;20(9):1559-61.
64. Rockett RJ, Bialasiewicz S, Mhango L, Gaydon J, Holding R, Whiley DM, et al. Acquisition of human polyomaviruses in the first 18 months of life. Emerg Infect Dis. 2015 Feb;21(2):365-7.
65. Nunes MC, Kuschner Z, Rabede Z, Cutland CL, Madimabe R, Kuwanda L, et al. Polyomaviruses-associated respiratory infections in HIV-infected and HIV-uninfected children. J Clin Virol. 2014 Dec;61(4):571-8.
66. Sourvinos G, Mammas IN, Spandidos DA. Merkel cell polyomavirus infection in childhood: current advances and perspectives. Arch Virol. 2015 Apr;160(4):887-92.
67. Gossai A, Waterboer T, Nelson HH, Michel A, Willhauck-Fleckenstein M, Farzan SF, et al. Seroepidemiology of Human Polyomaviruses in a US Population. Am J Epidemiol. 2016 Jan 1;183(1):61-9.
68. Moens U, Van Ghelue M, Johannessen M. Oncogenic potentials of the human polyomavirus regulatory proteins. Cell Mol Life Sci. 2007 Jul;64(13):1656-78.
69. Borchert S, Czech-Sioli M, Neumann F, Schmidt C, Wimmer P, Dobner T, et al. High-affinity Rb binding, p53 inhibition, subcellular localization, and transformation by wild-type or tumor-derived shortened Merkel cell polyomavirus large T antigens. J Virol. 2014 Mar;88(6):3144-60.
70. Verhaegen ME, Mangelberger D, Harms PW, Vozheiko TD, Weick JW, Wilbert DM, et al. Merkel cell polyomavirus small T antigen is oncogenic in transgenic mice. J Invest Dermatol. 2015 May;135(5):1415-24.
71. Spurgeon ME, Cheng J, Bronson RT, Lambert PF, DeCaprio JA. Tumorigenic activity of merkel cell polyomavirus T antigens expressed in the stratified epithelium of mice. Cancer Res. 2015 Mar 15;75(6):1068-79.
72. Chang Y, Moore PS. Merkel cell carcinoma: a virus-induced human cancer. Annu Rev Pathol. 2012;7:123-44.
73. Moens U, Johannessen M. Human polyomaviruses and cancer: expanding repertoire. J Dtsch Dermatol Ges. 2008 Sep;6(9):704-8.
74. Abend JR, Jiang M, Imperiale MJ. BK virus and human cancer: innocent until proven guilty. Semin Cancer Biol. 2009 Aug;19(4):252-60.
75. Maginnis MS, Atwood WJ. JC virus: an oncogenic virus in animals and humans? Semin Cancer Biol. 2009 Aug;19(4):261-9.
76. Enam S, Del Valle L, Lara C, Gan DD, Ortiz-Hidalgo C, Palazzo JP, et al. Association of human polyomavirus JCV with colon cancer: evidence for interaction of viral T-antigen and beta-catenin. Cancer Res. 2002 Dec 1;62(23):7093-101.
77. Bulut Y, Ozdemir E, Ozercan HI, Etem EO, Aker F, Toraman ZA, et al. Potential relationship between BK virus and renal cell carcinoma. J Med Virol. 2013 Jun;85(6):1085-9.
78. Delbue S, Ferrante P, Provenzano M. Polyomavirus BK and prostate cancer: an unworthy scientific effort? Oncoscience. 2014;1(4):296-303.

79. Carluccio SS, L.; Elia, F.; Villani, S.; Delbue, S.; Ferrante, P. . A potential linkage between the JC and BK polyomaviruses and brain and urinary tract tumors: A review of the literature. Adv Tumor Virol 2014(4):17-24.
80. zur Hausen H. Red meat consumption and cancer: reasons to suspect involvement of bovine infectious factors in colorectal cancer. Int J Cancer. 2012 Jun 1;130(11):2475-83.
81. Zhang W, Li L, Deng X, Kapusinszky B, Delwart E. What is for dinner? Viral metagenomics of US store bought beef, pork, and chicken. Virology. 2014 Nov;468-470:303-10.
82. Peretti A, FitzGerald PC, Bliskovsky V, Buck CB, Pastrana DV. Hamburger polyomaviruses. J Gen Virol. 2015 Apr;96(Pt 4):833-9.
83. Moens U, Rasheed K, Abdulsalam I, Sveinbjornsson B. The role of Merkel cell polyomavirus and other human polyomaviruses in emerging hallmarks of cancer. Viruses. 2015 Apr 10;7(4):1871-901.
84. Moore PS, Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. Nat Rev Cancer. 2010 Dec;10(12):878-89.
85. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol. 2002 Nov;3(11):991-8.
86. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
87. Banerjee A, Vasanthakumar A, Grigoriadis G. Modulating T regulatory cells in cancer: how close are we? Immunol Cell Biol. 2013 May;91(5):340-9.
88. Vossen MT, Westerhout EM, Soderberg-Naucler C, Wiertz EJ. Viral immune evasion: a masterpiece of evolution. Immunogenetics. 2002 Nov;54(8):527-42.
89. Bhatia S, Afanasiev O, Nghiem P. Immunobiology of Merkel cell carcinoma: implications for immunotherapy of a polyomavirus-associated cancer. Curr Oncol Rep. 2011 Dec;13(6):488-97.
90. Shahzad N, Shuda M, Gheit T, Kwun HJ, Cornet I, Saidj D, et al. The T antigen locus of Merkel cell polyomavirus downregulates human Toll-like receptor 9 expression. J Virol. 2013 Dec;87(23):13009-19.
91. Harms PW, Patel RM, Verhaegen ME, Giordano TJ, Nash KT, Johnson CN, et al. Distinct gene expression profiles of viral- and nonviral-associated merkel cell carcinoma revealed by transcriptome analysis. J Invest Dermatol. 2013 Apr;133(4):936-45.
92. Lauttia S, Sihto H, Kavola H, Koljonen V, Bohling T, Joensuu H. Prokineticins and Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. Br J Cancer. 2014 Mar 18;110(6):1446-55.
93. Andea AA, Coit DG, Amin B, Busam KJ. Merkel cell carcinoma: histologic features and prognosis. Cancer. 2008 Nov 1;113(9):2549-58.
94. Paulson KG, Iyer JG, Tegeder AR, Thibodeau R, Schelter J, Koba S, et al. Transcriptome-wide studies of merkel cell carcinoma and validation of intratumoral CD8+ lymphocyte invasion as an independent predictor of survival. J Clin Oncol. 2011 Apr 20;29(12):1539-46.
95. Wheat R, Roberts C, Waterboer T, Steele J, Marsden J, Steven NM, et al. Inflammatory cell distribution in primary merkel cell carcinoma. Cancers (Basel). 2014 May 06;6(2):1047-64.
96. Sihto H, Joensuu H. Tumor-infiltrating lymphocytes and outcome in Merkel cell carcinoma, a virus-associated cancer. Oncoimmunology. 2012 Nov 1;1(8):1420-1.
97. Sihto H, Bohling T, Kavola H, Koljonen V, Salmi M, Jalkanen S, et al. Tumor infiltrating immune cells and outcome of Merkel cell carcinoma: a population-based study. Clin Cancer Res. 2012 May 15;18(10):2872-81.

98. Triozzi PL, Fernandez AP. The role of the immune response in merkel cell carcinoma. Cancers (Basel). 2013 Feb 28;5(1):234-54.
99. Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM, Ganem D. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. Nature. 2005 Jun 2;435(7042):682-6.
100. Cox JE, McClure LV, Goga A, Sullivan CS. Pan-viral-microRNA screening identifies interferon inhibition as a common function of diverse viruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Feb 10;112(6):1856-61.
101. Bauman Y, Mandelboim O. MicroRNA based immunoevasion mechanism of human polyomaviruses. RNA Biol. 2011 Jul-Aug;8(4):591-4.
102. Bauman Y, Nachmani D, Vitenshtein A, Tsukerman P, Drayman N, Stern-Ginossar N, et al. An identical miRNA of the human JC and BK polyoma viruses targets the stress-induced ligand ULBP3 to escape immune elimination. Cell Host Microbe. 2011 Feb 17;9(2):93-102.
103. Lee S, Paulson KG, Murchison EP, Afanasiev OK, Alkan C, Leonard JH, et al. Identification and validation of a novel mature microRNA encoded by the Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas. J Clin Virol. 2011 Nov;52(3):272-5.
104. Groettrup M, Soza A, Eggers M, Kuehn L, Dick TP, Schild H, et al. A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. Nature. 1996 May 9;381(6578):166-8.
105. Okkenhaug K, Bilancio A, Farjot G, Priddle H, Sancho S, Peskett E, et al. Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. Science. 2002 Aug 9;297(5583):1031-4.
106. Yan Q, Sharma-Kuinkel BK, Deshmukh H, Tsalik EL, Cyr DD, Lucas J, et al. Dusp3 and Psme3 are associated with murine susceptibility to Staphylococcus aureus infection and human sepsis. PLoS Pathog. 2014 Jun;10(6):e1004149.
107. Kincaid RP, Sullivan CS. Virus-encoded microRNAs: an overview and a look to the future. PLoS Pathog. 2012 Dec;8(12):e1003018.
108. Lagatie O, Tritsmans L, Stuyver LJ. The miRNA world of polyomaviruses. Virol J. 2013 Aug 28;10:268.
109. Chen CJ, Cox JE, Azarm KD, Wylie KN, Woolard KD, Pesavento PA, et al. Identification of a polyomavirus microRNA highly expressed in tumors. Virology. 2015 Feb;476:43-53.
110. Zhu Y, Haecker I, Yang Y, Gao SJ, Renne R. gamma-Herpesvirus-encoded miRNAs and their roles in viral biology and pathogenesis. Curr Opin Virol. 2013 Jun;3(3):266-75.
111. Renwick N, Cekan P, Masry PA, McGeary SE, Miller JB, Hafner M, et al. Multicolor microRNA FISH effectively differentiates tumor types. J Clin Invest. 2013 Jun;123(6):2694-702.
112. Grundhoff A, Sullivan CS. Virus-encoded microRNAs. Virology. 2011 Mar 15;411(2):325-43.
113. Cullen BR. MicroRNAs as mediators of viral evasion of the immune system. Nat Immunol. 2013 Mar;14(3):205-10.
114. Fimia GM, Corazzari M, Antonioli M, Piacentini M. Ambra1 at the crossroad between autophagy and cell death. Oncogene. 2013 Jul 11;32(28):3311-8.
115. Skalsky RL, Cullen BR. Viruses, microRNAs, and host interactions. Annu Rev Microbiol. 2010;64:123-41.
116. Shuda M, Arora R, Kwun HJ, Feng H, Sarid R, Fernandez-Figueras MT, et al. Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. Int J Cancer. 2009 Sep 15;125(6):1243-9.

117. Braconi C, Valeri N, Gasparini P, Huang N, Taccioli C, Nuovo G, et al. Hepatitis C virus proteins modulate microRNA expression and chemosensitivity in malignant hepatocytes. Clin Cancer Res. 2010 Feb 1;16(3):957-66.
118. Wu YH, Hu TF, Chen YC, Tsai YN, Tsai YH, Cheng CC, et al. The manipulation of miRNA-gene regulatory networks by KSHV induces endothelial cell motility. Blood. 2011 Sep 8;118(10):2896-905.
119. Bala S, Tilahun Y, Taha O, Alao H, Kodys K, Catalano D, et al. Increased microRNA-155 expression in the serum and peripheral monocytes in chronic HCV infection. J Transl Med. 2012 Jul 30;10:151.
120. Lin L, Yin X, Hu X, Wang Q, Zheng L. The impact of hepatitis B virus x protein and microRNAs in hepatocellular carcinoma: a comprehensive analysis. Tumour Biol. 2014 Dec;35(12):11695-700.
121. Ma L, Deng X, Wu M, Zhang G, Huang J. Down-regulation of miRNA-204 by LMP-1 enhances CDC42 activity and facilitates invasion of EBV-associated nasopharyngeal carcinoma cells. FEBS Lett. 2014 May 2;588(9):1562-70.
122. Mansouri S, Pan Q, Blencowe BJ, Claycomb JM, Frappier L. Epstein-Barr virus EBNA1 protein regulates viral latency through effects on let-7 microRNA and dicer. J Virol. 2014 Oct;88(19):11166-77.
123. Xie H, Lee L, Caramuta S, Hoog A, Browaldh N, Bjornhagen V, et al. MicroRNA expression patterns related to merkel cell polyomavirus infection in human merkel cell carcinoma. J Invest Dermatol. 2014 Feb;134(2):507-17.
124. Minarovits J, Demcsak A, Banati F, Niller HH. Epigenetic Dysregulation in Virus-Associated Neoplasms. Adv Exp Med Biol. 2016;879:71-90.
125. Helmbold P, Lahtz C, Herpel E, Schnabel PA, Dammann RH. Frequent hypermethylation of RASSF1A tumour suppressor gene promoter and presence of Merkel cell polyomavirus in small cell lung cancer. Eur J Cancer. 2009 Aug;45(12):2207-11.
126. Yang IV, Schwartz DA. Epigenetic control of gene expression in the lung. Am J Respir Crit Care Med. 2011 May 15;183(10):1295-301.
127. Joshi P, Middleton J, Jeon YJ, Garofalo M. MicroRNAs in lung cancer. World J Methodol. 2014 Jun 26;4(2):59-72.
128. Momi N, Kaur S, Rachagani S, Ganti AK, Batra SK. Smoking and microRNA dysregulation: a cancerous combination. Trends Mol Med. 2014 Jan;20(1):36-47.
129. Mathis C, Poussin C, Weisensee D, Gebel S, Hengstermann A, Sewer A, et al. Human bronchial epithelial cells exposed in vitro to cigarette smoke at the air-liquid interface resemble bronchial epithelium from human smokers. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology. 2013 Apr 1;304(7):L489-503.
130. Herbst RS HJ, Lippman SM. Lung cancer. N Engl J Med. 2008 Sep 25;359(13):1367-80.
131. Paik PK AM, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. J Clin Oncol. 2011 May 20;29(15):2046-51.
132. Xu H WX, Shen W, et al. [The expression and significance of RKIP in lung squamous cell carcinoma tissues]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi. 2011 Mar;14(3):194-8.
133. Huerta-Yepez S YN, Hernandez-Cueto A, et al. Expression of phosphorylated raf kinase inhibitor protein (pRKIP) is a predictor of lung cancer survival. BMC Cancer. 2011;11:259.
134. Amundson SA MT, Fornace AJ Jr. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. Oncogene. 1998 Dec 24;17(25):3287-99.
135. Brambilla E NA, Gazzeri S, et al. Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. Am J Pathol. 1996 Dec;149(6):1941-52.

136. Fong KM SY, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. J Thorac Cardiovasc Surg. 1999 Dec;118(6):1136-52.
137. Cleaver AL, Bhamidipaty K, Wylie B, Connor T, Robinson C, Robinson BW, et al. Long-term exposure of mesothelial cells to SV40 and asbestos leads to malignant transformation and chemotherapy resistance. Carcinogenesis. 2014 Feb;35(2):407-14.
138. Andres C BB, Puchta U, et al. Prevalence of MCPyV in Merkel cell carcinoma and non-MCC tumors. J Cutan Pathol. 2010 Jan;37(1):28-34.
139. Antoniou KM SG, Lymbouridou R, et al. Expression analysis of angiogenic growth factors and biological axis CXCL12/CXCR4 axis in idiopathic pulmonary fibrosis. Connect Tissue Res. 2010;51(1):71-80.
140. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. RNA. 2008 May;14(5):844-52.
141. Yan B, Li H, Yang X, Shao J, Jang M, Guan D, et al. Unraveling regulatory programs for NF-kappaB, p53 and microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma. PLoS One. 2013;8(9):e73656.
142. Mima K, Nishihara R, Nowak JA, Kim SA, Song M, Inamura K, et al. MicroRNA MIR21 and T Cells in Colorectal Cancer. Cancer Immunol Res. 2015 Sep 29.
143. Liu LZ, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, et al. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1alpha expression. PLoS One. 2011;6(4):e19139.
144. Ruan Q, Wang T, Kameswaran V, Wei Q, Johnson DS, Matschinsky F, et al. The microRNA-21-PDCD4 axis prevents type 1 diabetes by blocking pancreatic beta cell death. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jul 19;108(29):12030-5.
145. Kaid C, Silva PB, Cortez BA, Rodini CO, Semedo-Kuriki P, Okamoto OK. miR-367 promotes proliferation and stem-like traits in medulloblastoma cells. Cancer Sci. 2015 Sep;106(9):1188-95.
146. Guo YH, Zhang C, Shi J, Xu MH, Liu F, Yuan HH, et al. Abnormal activation of the EGFR signaling pathway mediates the downregulation of miR145 through the ERK1/2 in non-small cell lung cancer. Oncol Rep. 2014 Apr;31(4):1940-6.
147. Campayo M, Navarro A, Vinolas N, Diaz T, Tejero R, Gimferrer JM, et al. Low miR-145 and high miR-367 are associated with unfavourable prognosis in resected nonsmall cell lung cancer. Eur Respir J. 2013 May;41(5):1172-8.
148. Hou ZH, Han QJ, Zhang C, Tian ZG, Zhang J. miR146a impairs the IFN-induced anti-HBV immune response by downregulating STAT1 in hepatocytes. Liver Int. 2014 Jan;34(1):58-68.
149. Wang RJ, Zheng YH, Wang P, Zhang JZ. Serum miR-125a-5p, miR-145 and miR-146a as diagnostic biomarkers in non-small cell lung cancer. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(1):765-71.
150. Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. Biochim Biophys Acta. 2009 Jun;1792(6):497-505.
151. Wang F, Zhou J, Zhang Y, Wang Y, Cheng L, Bai Y, et al. The Value of MicroRNA-155 as a Prognostic Factor for Survival in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. PLoS One. 2015;10(8):e0136889.
152. Ye G, Fu G, Cui S, Zhao S, Bernaudo S, Bai Y, et al. MicroRNA 376c enhances ovarian cancer cell survival by targeting activin receptor-like kinase 7: implications for chemoresistance. J Cell Sci. 2011 Feb 1;124(Pt 3):359-68.
153. Borgdorff V, Lleonart ME, Bishop CL, Fessart D, Bergin AH, Overhoff MG, et al. Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21(Waf1/Cip1). Oncogene. 2010 Apr 15;29(15):2262-71.

154. Ma XL, Liu L, Liu XX, Li Y, Deng L, Xiao ZL, et al. Prognostic role of microRNA-21 in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(5):2329-34.
155. Yang M, Shen H, Qiu C, Ni Y, Wang L, Dong W, et al. High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence and unfavourable survival in non-small cell lung cancer. Eur J Cancer. 2013 Feb;49(3):604-15.
156. Ma Y, Xia H, Liu Y, Li M. Silencing miR-21 sensitizes non-small cell lung cancer A549 cells to ionizing radiation through inhibition of PI3K/Akt. Biomed Res Int. 2014;2014:617868.
157. DM. P. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. Int J Cancer. 2006 Jun 15;118(12):3030-44.
158. Bouvard V BR, Straif K, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. Lancet Oncol. 2009 Apr;10(4):321-2.
159. Brentnall TA CR, Lee JG, et al. Microsatellite instability and K-ras mutations associated with pancreatic adenocarcinoma and pancreatitis. Cancer Res. 1995 Oct 1;55(19):4264-7.
160. Joh J JA, Moore GD, et al. Human papillomavirus (HPV) and Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in non small cell lung cancer. Exp Mol Pathol. 2010 Dec;89(3):222-6.
161. Gheit T MJ, Levican J, et al. Merkel cell polyomavirus in non-small cell lung carcinomas from Chile. Exp Mol Pathol. 2012 Aug;93(1):162-6.
162. Loyo M G-PR, Brait M, et al. Quantitative detection of Merkel cell virus in human tissues and possible mode of transmission. Int J Cancer. 2010 Jun 15;126(12):2991-6.
163. Blasco RB FS, Santamaria D, et al. c-Raf, but not B-Raf, is essential for development of K-Ras oncogene-driven non-small cell lung carcinoma. Cancer Cell. 2011 May 17;19(5):652-63.
164. Kobayashi M SM, Takahashi T, et al. Clinical significance of BRAF gene mutations in patients with non-small cell lung cancer. Anticancer Res. 2011 Dec;31(12):4619-23.
165. Moens U JM. Human polyomaviruses and cancer: expanding repertoire. J Dtsch Dermatol Ges. 2008 Sep;6(9):704-8.
166. SM. D. Polyoma virus middle T antigen and its role in identifying cancer-related molecules. Nat Rev Cancer. 2002 Dec;2(12):951-6.
167. Porebska I WE, Kosacka M, et al. Apoptotic markers p53, Bcl-2 and Bax in primary lung cancer. In Vivo. 2006 Sep-Oct;20(5):599-604.
168. Sariyer IK MN, Patel PK, et al. Bag3-induced autophagy is associated with degradation of JCV oncoprotein, T-Ag. PLoS One. 2012;7(9):e45000.
169. Sahi H KV, Kavola H, et al. Bcl-2 expression indicates better prognosis of Merkel cell carcinoma regardless of the presence of Merkel cell polyomavirus. Virchows Arch. 2012 Sep 14.
170. Houben R SD, Becker JC. Molecular pathogenesis of Merkel cell carcinoma. Experimental dermatology. 2009 Mar;18(3):193-8.
171. Bhatia K GJ, Modali R, et al. Merkel cell carcinoma subgroups by Merkel cell polyomavirus DNA relative abundance and oncogene expression. Int J Cancer. 2010 May 1;126(9):2240-6.
172. Waltari M SH, Kukko H, et al. Association of Merkel cell polyomavirus infection with tumor p53, KIT, stem cell factor, PDGFR-alpha and survival in Merkel cell carcinoma. Int J Cancer. 2011 Aug 1;129(3):619-28.
173. Rodig SJ CJ, Wardzala J, et al. Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. J Clin Invest. 2012 Dec 3;122(12):4645-53.

174. Houben R SD, Alb M, et al. Comparable expression and phosphorylation of the retinoblastoma protein in Merkel cell polyoma virus-positive and negative Merkel cell carcinoma. Int J Cancer. 2010 Feb 1;126(3):796-8.
175. Wetzels CT HJ, Bakkers JM, et al. Ultrastructural proof of polyomavirus in Merkel cell carcinoma tumour cells and its absence in small cell carcinoma of the lung. PLoS One. 2009;4(3):e4958.
176. Bergallo M CC, Terlizzi ME, et al. Quantitative detection of the new polyomaviruses KI, WU and Merkel cell virus in transbronchial biopsies from lung transplant recipients. J Clin Pathol. 2010 Aug;63(8):722-5.
177. Goh S LC, Tiveljung-Lindell A, et al. Merkel cell polyomavirus in respiratory tract secretions. Emerg Infect Dis. 2009 Mar;15(3):489-91.
178. Smith CJ PT, King JA. Perspectives on pulmonary inflammation and lung cancer risk in cigarette smokers. Inhal Toxicol. 2006 Aug;18(9):667-77.
179. Musilova K, Mraz M. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. Leukemia. 2015 May;29(5):1004-17.
180. Shen H, Zhu F, Liu J, Xu T, Pei D, Wang R, et al. Alteration in Mir-21/PTEN expression modulates gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. PLoS One. 2014;9(7):e103305.
181. Zhang J, Zhang C, Hu L, He Y, Shi Z, Tang S, et al. Abnormal Expression of miR-21 and miR-95 in Cancer Stem-Like Cells is Associated with Radioresistance of Lung Cancer. Cancer Invest. 2015 May;33(5):165-71.
182. Kobayashi M, Sonobe M, Takahashi T, Yoshizawa A, Ishikawa M, Kikuchi R, et al. Clinical significance of BRAF gene mutations in patients with non-small cell lung cancer. Anticancer Res. 2011 Dec;31(12):4619-23.
183. Xu LF, Wu ZP, Chen Y, Zhu QS, Hamidi S, Navab R. MicroRNA-21 (miR-21) regulates cellular proliferation, invasion, migration, and apoptosis by targeting PTEN, RECK and Bcl-2 in lung squamous carcinoma, Gejiu City, China. PLoS One. 2014;9(8):e103698.
184. Brambilla E, Negoescu, A., Gazzeri, S., Lantuejoul, S., Moro, D., Brambilla, C., Coll, J. L. Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. Am J Pathol. 1996 Dec;149(6):1941-52.
185. Ma X, Choudhury SN, Hua X, Dai Z, Li Y. Interaction of the oncogenic miR-21 microRNA and the p53 tumor suppressor pathway. Carcinogenesis. 2013 Jun;34(6):1216-23.
186. Wu DW, Tsai LH, Chen PM, Lee MC, Wang L, Chen CY, et al. Loss of TIMP-3 promotes tumor invasion via elevated IL-6 production and predicts poor survival and relapse in HPV-infected non-small cell lung cancer. Am J Pathol. 2012 Nov;181(5):1796-806.
187. Li J, Wang H, Ke H, Ni S. MiR-129 regulates MMP9 to control metastasis of non-small cell lung cancer. Tumour Biol. 2015 Aug;36(8):5785-90.
188. Xu XL, Wang X, Chen ZL, Jin M, Yang W, Zhao GF, et al. Overexpression of Grb2-associated binder 2 in human lung cancer. Int J Biol Sci. 2011;7(5):496-504.
189. Sachdeva M, Zhu S, Wu F, Wu H, Walia V, Kumar S, et al. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Mar 3;106(9):3207-12.
190. Hervouet E, Cheray M, Vallette FM, Cartron PF. DNA methylation and apoptosis resistance in cancer cells. Cells. 2013;2(3):545-73.
191. Vosa U, Vooder T, Kolde R, Vilo J, Metspalu A, Annilo T. Meta-analysis of microRNA expression in lung cancer. Int J Cancer. 2013 Jun 15;132(12):2884-93.
192. Guo C, Shao R, Correa AM, Behrens C, Johnson FM, Raso MG, et al. Prognostic significance of combinations of RNA-dependent protein kinase and EphA2 biomarkers for NSCLC. J Thorac Oncol. 2013 Mar;8(3):301-8.

193. Guan P, Yin Z, Li X, Wu W, Zhou B. Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues. J Exp Clin Cancer Res. 2012;31:54.
194. Erickson JJ, Lu P, Wen S, Hastings AK, Gilchuk P, Joyce S, et al. Acute Viral Respiratory Infection Rapidly Induces a CD8+ T Cell Exhaustion-like Phenotype. J Immunol. 2015 Sep 23.
195. Peng JW, Liu DY, Lin GN, Xiao JJ, Xia ZJ. Hepatitis B Virus Infection Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Advanced Non Small Cell Lung Cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(13):5285-8.
196. Wetzels CT, Hoefnagel, J. G., Bakkers, J. M., Dijkman, H. B., Blokx, W. A., Melchers, W. J. Ultrastructural proof of polyomavirus in Merkel cell carcinoma tumour cells and its absence in small cell carcinoma of the lung. PLoS One. 2009;4(3):e4958.
197. Liang Y. An expression meta-analysis of predicted microRNA targets identifies a diagnostic signature for lung cancer. BMC Med Genomics. 2008;1:61.

IJC
International Journal of Cancer

The presence of Merkel cell polyomavirus is associated with deregulated expression of *BRAF* and *Bcl-2* genes in non-small cell lung cancer

I. Lasithiotaki[1], K.M. Antoniou[1], S.P. Derdas[2], E. Sarchianaki[2], E.K. Symvoulakis[2], A. Psaraki[1], D.A. Spandidos[2], E.N. Stathopoulos[3], N.M. Siafakas[1] and G. Sourvinos[2]

[1]Department of Thoracic Medicine, University Hospital, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece
[2]Laboratory of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece
[3]Laboratory of Pathology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

Polyomaviruses such as BK virus (BKV), JC virus (JCV) and Merkel cell polyomavirus (MCPyV) are typically nononcogenic, although they have been detected in a variety of human neoplasms. The aim of our study was to determine the frequency of the most common polyomaviruses MCPyV, BKV and JCV as well as the gene expression profile of genes involved in oncogenesis including *K-ras, BRAF, RKIP, Bax, Bcl-2, p53* and *RB1* in a cohort of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. Real-time and nested polymerase chain reaction (PCR) were used to assess the presence of polyomaviruses DNA in tissue biopsies from 110 patients with primary NSCLC and 14 tissue specimens from macroscopically healthy sites of their lung. Real-time PCR was also used to determine the mRNA expression of *K-ras, BRAF, RKIP, Bax, Bcl-2, p53* and *RB1* in selected samples. Results showed that ten NSCLC specimens were positive for the presence of MCPyV DNA (10/110, 9.1%), whereas no control sample was tested positive for the virus. The MCPyV-positive samples were predominantly obtained from male smokers (9/10). BKV and JCV DNA were not detected either in lung tissues biopsies or the control specimens. Interestingly, gene expression analysis revealed increased mRNA and protein expression of *BRAF* gene in association with *BRAF* phosphorylation in the MCPyV-positive samples, whereas *Bcl-2* gene expression was downregulated in the same type of samples. The detected MCPyV prevalence in NSCLC in combination with the deregulated expression of *BRAF* and *Bcl-2* genes suggests that these events are likely to contribute to the pathogenesis of NSCLC.

Infectious Causes of Cancer

In 2011, lung cancer worldwide constituted 13% of all malignant tumors and accounted for 18% of cancer deaths.[1] The main risk factors that have been implicated thus far include cigarette smoking, environmental pollution, radiation and exposure to asbestos,[2] although numerous lung cancer cases have failed to be attributed to these factors. It has been postulated that the gene–environment interaction is also involved in carcinogenesis, where environmental factors cause genomic instability either directly or *via* an inflammatory process.[3]

Human polyomaviruses (HPyVs) are double-stranded DNA viruses encapsulated in an icosahedral capsid, with no lipoprotein envelope. JC (JCV), BK (BKV), Karolinska Institute (KIV), Washington University (WUV), Merkel cell (MCPyV) viruses and the newly discovered skin-infecting HPyV6, HPyV7 and trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus have been detected in humans.[4] Similar studies with the newly discovered HPyV are lacking. A number of cases in which HPyV exhibited a higher prevalence compared to the corresponding normal tissue have recently been identified.[5] However, a direct causative role of HPyV in cancer remains controversial.

Merkel cell polyomavirus (MCPyV) was first discovered in Merkel cell carcinoma (MCC) of the skin, a highly aggressive tumor from neuroendocrine cells.[6] Since the discovery of MCPyV as a major etiopathological factor of MCC, additional associations have been sought between MCPyV and other human neoplasia, including lung carcinomas. In small cell lung cancer (SCLC), this virus has been correlated with hypermethylation of the tumor suppressor gene RASSF1A,[7] whereas in non-small cell lung cancer (NSCLC) MCPyV has been detected either alone[8] or in association with human papillomavirus (HPV) in 33% of the patients.[9]

MCPyV expresses the large T antigen (LTA) that may be truncated in cancer cells, resulting in elimination of the viral helicase function and replication, while the ability of the

Key words: Merkel cell polyomavirus, non-small cell lung cancer, *BRAF, Bcl-2*
DOI: 10.1002/ijc.28062
History: Received 10 Oct 2012; Accepted 9 Jan 2013; Online 25 Jan 2013
Correspondence to: George Sourvinos, Laboratory of Virology, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, 71003 Crete, Greece, Tel./Fax: +30-2810-394-835, E-mail: sourvino@med.uoc.gr or Katerina M. Antoniou, Department of Thoracic Medicine, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion, 71003 Crete, Greece, Tel.: +30-2810-392-433, E-mail: kantoniou@med.uoc.gr

What's new?

An estimated one in five cancer cases worldwide are caused by infection, with the majority being caused by tumor viruses. The present study aimed to establish an association between human polyomavirus infection and non-small cell lung cancer (NSCLC). The data implicate Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in 9.1% of the cases in a cohort of 110 NSCLC patients. The expression profile of genes involved in oncogenesis also point to the deregulation of *BRAF* and *Bcl-2* in MCPyV-positive NSCLC cells. These findings suggest the involvement of MCPyV in non-small cell lung cancer through deregulation of *BRAF* and *Bcl-2*.

truncated LTA to bind critical cell cycle-regulating proteins may be preserved leading to cell proliferation and enhanced transformation potential.[10] LTA expression by MCPyV is crucial for inhibiting important responses to UVR-induced DNA damage, suggesting that progressive MCV-mediated abrogation of genomic stability may be involved in Merkel cell carcinogenesis.[11] Furthermore, the LTA may target and interact with cellular proteins such as the retinoblastoma protein, as an intact retinoblastoma protein-binding site in MCPyV LTA is required for promoting growth of MCC cells.[12]

Lung carcinomas harbor multiple mutations in genes involved in cell growth, proliferation or apoptosis. Such mutations may include the Ras/raf pathway whose defect results in uncontrolled cell growth *via* MAPK/ERK regulation, while the *p53* pathway is situated at the crossroads of a network of signaling cascades, essential for cell growth regulation and apoptosis induced by genotoxic and nongenotoxic stresses. Mutations of the *ras* genes, including the *K-ras* oncogene, in lung cancer are entirely limited to NSCLC (predominantly adenocarcinoma),[13] whereas in a recent study[14] it has been suggested that the mutant *BRAF* is a driving "event" in lung adenocarcinoma. Deficiency of the inhibitor *RKIP* is positively correlated with carcinogenesis as well as invasion and metastasis of lung squamous cell carcinoma,[15] while the total level of *RKIP* has no predictive value for lung cancer patient outcome.[16] Genotoxic stress results in the activation of the "guardian of the genome" gene *p53*. In turn, *p53* reduces RB1 phosphorylation and induces a repair-or-apoptosis cell cycle stop through *Bax/Bcl-2* and other *p53*-induced gene regulation processes.[17] *Bax* is an apoptosis-inducing gene, whereas *Bcl-2* is an antiapoptotic gene and the heterodimer *Bax/Bcl-2* induces a neutralization of *Bax* and a loss of apoptosis.[18] Mutation of *p53* is very frequent in lung cancer and occurs in 50% of NSCLCs and 75% of SCLCs.[19]

A viral etiology of lung tumors is attractive because the virus can be regarded as a main oncogenic event or as an important cofactor as in human mesotheliomas (Simian Virus 40 of the polyoma family plus asbestosis). In this view and considering the fact that the polyoma family has already been linked with human malignancies, we aimed to examine the MCPyV, BKV and JCV frequency as well as the expression patterns of *K-ras*, *BRAF*, *RKIP*, *Bax*, *Bcl-2*, *p53* and *RB1* genes in the same series of NSCLC specimens.

Material and Methods

Patients

The lung tissue group of patients comprised of 110 consecutive patients with NSCLC from the Department of Thoracic Medicine, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece. The patients included in our study were classified according to the criteria of WHO (1997). The tissue control group consisted of 14 samples from macroscopically healthy sites of the lung derived from NSCLC patients ongoing lobectomy and were verified histologically.

Ethics statement

The Ethics Committee of the University Hospital of Heraklion, Crete approved the protocol and all patients and control subjects provided informed consent in written form.

Biological samples and processing

One hundred and ten lung cancer tissue specimens were obtained from paraffin-embedded blocks from the Laboratories of Pathology, University Hospital of Heraklion, Crete. All the samples were obtained from surgical resections. Among the 110 patients, 16 underwent further surgical resection of the lesion, from which fresh lung tissue specimens were obtained and stored at −80°C until further processing.

DNA extraction and PCR amplification

To extract DNA, lung cancer tissue biopsy samples from paraffin-embedded blocks were processed using the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Germany), according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA from the lung cancer tissue samples from controls and fresh lung cancer tissue biopsies was extracted after homogenization and subsequent treatment using proteinase K, followed by phenol extraction and ethanol precipitation according to the standard procedures. All the DNA samples were quantified spectrophotometrically and normalized aliquots were produced for each sample.

Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) reactions for the BKV and JCV assays were performed using commercial kits. For the detection of BKV DNA, the BKV real-time Q-PCR Alert AmpliMIX kit (Cat. No. RTS175 BKV) was applied according to the manufacturer's instructions (Nanogen Advanced Diagnostics S.p.A., Italy), whereas for the detection of JCV DNA the JCV/BKV oligomix Alert

nested PCR kit (Cat. No. BAN075) was used, according to the manufacturer's instructions (Nanogen Advanced Diagnostics S.p.A.). The presence of MCPyV DNA was tested using real-time quantitative PCR protocols, using the MCV138 set of primers that targets the LTA region, as previously described.[20] The integrity and quality of the extracted DNA were confirmed after the successful amplification of the beta2-microglobulin gene in all samples.

Particular care was taken and all manipulations were performed inside a PCR hood to avoid potential contamination. Each PCR reaction contained two negative controls. The positive controls for the BKV and JCV reactions were obtained from Nanogen Advanced Diagnostics S.p.A. (Cat. No. CTR075), while DNA from a MCC patient served as the positive control. All real-time PCRs were carried out in an Mx3000P real-time PCR system while additionally, PCR end products were analyzed on 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and the bands were visualized under a UV transilluminator (260 nm). These viral PCR products were then subjected to direct sequencing analysis to verify the initial amplification results.

Gene expression

Sixteen fresh tissue specimens from NSCLC patients and 14 controls were processed using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) protocol for total RNA extraction according to the manufacturer's instructions. The extracted RNA was subsequently treated with DNase to avoid DNA contamination. RNA concentration and purity were evaluated by a spectrophotometer. Aliquots of RNA were stored at −80°C until use. cDNA from each sample was derived by reverse transcription of 1 μg of total RNA using the the SuperScript® First-Strand Synthesis System (Invitrogen) and random hexamers. To remove the RNA template, cDNA was incubated with *Escherichia coli* RNaseH (Invitrogen) and stored at −20°C until use.

Transcript levels of *K-ras, BRAF, RKIP, Bax, Bcl-2, p53* and *RB1* were determined using the Mx3000P real-time PCR system (Stratagene, La Jolla, CA) and SYBR-Green I Master Mix (Stratagene) according to the manufacturer's instructions, as previously described.[21] The primers were designed to span at least one intron in order to avoid amplification of contaminating genomic DNA. GAPDH was used as an internal control to normalize mRNA expression levels. To verify the results of the melt-curve analysis, PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized under a UV light transilluminator. Primer sequences and annealing temperatures for all the genes analyzed as well as for GAPDH are shown in Table 1.

Protein extraction and Western blotting

Fresh tissue samples were homogenized in RIPA lysis buffer (Tris-buffered saline pH 7.4, NP-40Na-deoxycholate, NaCl, EDTA, PMSF, Protease Inhibitor Cocktail, Phosphatase inhibitors, Na-Vanadat and NaF) to extract the total protein.

Table 1. Primer sequences used for quantitative real-time RT-PCR

Gene	Primer pair sequence (5′-3′)	Annealing temperature (°C)
GAPDH	FOR: GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA	60
	REV: GTCATTGATGGCAACAATATCCACT	
BRAF	FOR: AGAAAGCACTGATGATGAGAGG	58
	REV: GGAAATATCAGTGTCCCAACCA	
RKIP	FOR: AGACCCACCAGCATTTCGTG	58
	REV: GCTGATGTCATTGCCCTTCA-3	
p53	FOR: GTGAGCGCTTCGAGATGTTC	60
	REV: ATGGCGGGAGGTAGACTGAC	
K-ras	FOR: ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT	60
	REV: TCAAAGAATGGTCCTGGACC	
Bcl-2	FOR: GAAACCCCTAGTGCCATCAA	55
	REV: GGGACGTCAGGTCACTGAAT	
Bax	FOR: TTCTGACGGCAACTTCAACTGG	61
	REV: TTGGTGCACAGGGCCTGTAATC	
RB1	FOR: CTTGCATGGCTCTCAGATTCAC	60
	REV: AGAGGACAAGCAGATTCAAGGTG	

Proteins were quantified using the Bradford Protein Quantitation protocol. After a 12% SDS–PAGE gel was cast, 40 mg of total protein was loaded into each lane, and the electrophoresis separation was performed. Proteins in the gel were then transferred to a PVDF membrane in a semidry blotting system. The PVDF membrane was blocked with TBST (10 mM Tris–HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.1% Tween-20) solution containing 5% skimmed milk at room temperature for 1 hr. Primary antibodies were then added at the appropriate dilution [phosphor-BRAF (Ser445), BRAF and Bcl-2 1/1,000; beta-actin 1/2,000) with overnight incubation at 4°C. All primary antibodies were purchased from Cell Signaling Technology, MA. Subsequently, the HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG polyclonal antibodies (1:2,000 dilution) were added, with incubation at room temperature for 1 hr. After TBST washing, autoradiography was conducted with enhanced chemiluminescence reagents. The results were analyzed with the QuantityOne software.

Statistical analysis

The Kolmogorov–Smirnov test was used to determine whether the expression data obtained followed a normal distribution pattern. The mRNA expression of all the genes was compared between the groups of normal and pathological samples, as well as between groups with different histological features, using parametric procedures (Student's *t*-test and one-way ANOVA).

Probability values (p-values) <0.05 were considered statistically significant. Statistical calculations were performed using SPSS 11.5 software (SPSS, Chicago, IL).

Table 2. The clinicopathological characteristics of the subjects

Characteristics	Control group	NSCLC patients	*p* value
Number	14	110	
Age[1]	56.33 ± 5.47	62.92 ± 1.12	NS
Sex (male/female)[2]	12/2	101/9	NS
Nonsmokers[2]	9	12	0.0011
Smokers[2]	2	96	0.0007
Ex-smokers[2]	3	2	NS
FEV1[1]	86.78 ± 8.71	84.12 ± 3.53	NS
FVC[1]	93.22 ± 7.50	89.89 ± 4.11	0.0274
FEV1/FVC[1]	73.33 ± 4.29	74.46±1.80	NS
DLCO[1]	74.43 ± 11.37	83.77 ± 9.15	0.00386
KCO[1]	83.15 ± 10.89	91.36 ± 14.19	NS

Values are expressed as means ± SEM (standard error of the mean).
[1]*t*-test; $P < 0.05$ is considered statistically significant.
[2]χ^2 test; $P < 0.05$ is considered statistically significant.
Abbreviations: DL_{CO}: diffusing capacity for carbon monoxide; FEV1: forced expiratory volume in 1 sec; FVC: forced vital capacity; KCO: DLCO per unit lung volume; NS: not significant.

Table 3. Histological types of biopsies of NSCLC patients

NSLC subtype	All	Male	Female
Number	110	101	9
Adenocarcinoma	58	52	6
Squamous	39	38	1
Adenosquamous	4	4	–
Large cell undifferentiated	3	2	1
Bronchioalveolar	3	2	1
Undifferentiated	2	2	–
Giant cell	1	1	–

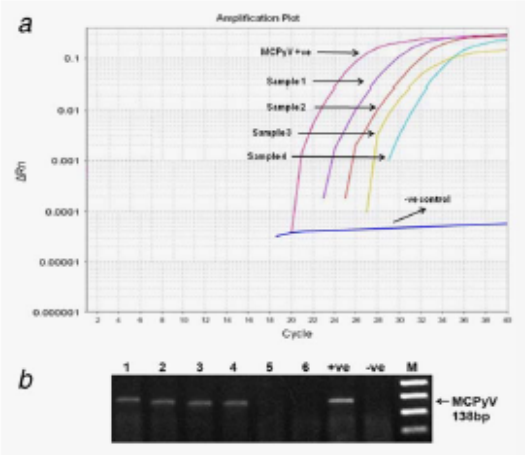


Figure 1. Representative examples of MCPyV as detected by (*a*) real-time PCR and (*b*) on agarose gel. +ve: positive control; −ve: negative control; M: 50-bp DNA ladder. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Results

Polyomavirus detection

The NSCLC tissue study sample included 101 male and nine female patients with NSCLC. Demographics and pulmonary function tests of patients are shown in Table 2. Biopsy results and malignant subtypes of NSCLC of all patients are shown in Table 3. Briefly, the mean age of patients was 62.92 ± 1.12 years, while the majority of the NSCLC group consisted of active smokers (87.3%).

The lung tissue biopsies from the NSCLC patients and the control population tested negative for the presence of BKV and JCV DNA.

MCPyV DNA was detected in ten of 110 (9.1%) specimens from the lung cancer group, whereas MCPyV genomes were not detected in any of the control samples (Fig. 1). The vast majority of the MCPyV-positive samples were obtained from male patients (9/10), while the mean age was 63.78 ± 11.25 years (Table 4). The histological types consisted mainly of adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. The two predominant histological MCPyV-positive types showed similarities in mean age of the patients.

Among the MCPyV-positive samples only one had a no smoking history, and although one patient was an ex-smoker, the mean pack year (p.y.) smoking history was 51 p.y. In both the adenocarcinoma and squamous cell carcinoma MCPyV-positive group, we observed a smoking history of ~39 pack years, although in the squamous cell carcinoma MCPyV-positive group one patient had no smoking history. No difference was identified in clinical parameters between virus-positive and virus-negative patients in adenocarcinoma or squamous cell carcinoma histological NSCLC subtypes.

Gene expression

Transcript levels of *K-ras*, *BRAF*, *RKIP*, as well as of *p53* and *RB1* were not statistically significantly altered between NSCLC specimens and the control population (Table 5). In contrast, *Bcl-2* expression was significantly downregulated in the lung cancer samples compared to the controls (mean ± SD: 1.19 ± 1.39 and 1.23 ± 1.49, respectively, ratio of the means 0.97, $p = 0.047$). Of note, considerably lower levels of *Bax* expression were also found in the NSCLC specimens compared to the controls (mean ± SD: 1.15 ± 0.23 and 9.91 ± 0.16, respectively, ratio of the means 0.12, $p = 0.038$). The *Bax/Bcl2* ratio was 0.97 for the lung cancer group and 8.06 for the controls.

We subsequently determined whether the MCPyV infection affected the expression levels of the abovementioned cellular genes. Six MCPyV-positive samples and ten MCPyV-negative specimens were used in the gene expression analysis. Among NSCLC specimens, *BRAF* was upregulated in MCPyV-positive tissue samples compared to MCPyV-negative samples

Table 4. Clinicopathological characteristics of Merkel cell polyomavirus-positive NSCLC patients

Lung cancer tissue group							
Patient no.	Sex	Age (years)	Histological type	Smoking status Y/N (pack-years)	FEV1 (%)	FVC (%)	FEV1 /FVC
27	M	47	Undifferentiated large cell lung carcinoma	Y (65)	91.8	113.2	64.77
44	M	66	Adenocarcinoma	Y (40)	100.8	121	65.9
57	M	73	Adenocarcinoma	Ex-smoker (10)	92.1	95.5	63.97
62	M	67	Squamous cell carcinoma	N	87.2	83.8	76.61
63	M	73	Adenocarcinoma	Y (80)	88.5	80	85.25
67	M	65	Bronchoalveolar carcinoma	Y (55)	68.9	89.3	61.14
71	M	74	Adenocarcinoma	Y (43)	101.6	83.7	96.03
78	M	85	Squamous cell carcinoma	Y (85)	63.6	89.3	51.83
80	M	54	Squamous cell carcinoma	Y (30)	90.3	91.8	73.56
88	F	55	Adenocarcinoma	Y (25)	79.1	91.9	72.67
Mean		63.78 ± 11.25		51 ± 29	86.39 ± 12.47	93.95 ± 13.16	71.17 ± 12.69

Values are expressed as means ± SEM (standard error of the mean).
Abbreviations: FEV1: forced expiratory volume in 1 sec; FVC: forced vital capacity; NSCLC: non-small cell lung cancer; SCLC: small cell lung cancer.

Table 5. Expression profile of cellular genes in lung tissue samples of NSCLC patients and controls in relation to the presence or absence of MCPyV

Mean ± SD	Lung cancer tissue	Healthy lung tissue	Ratio[1] of means	*p*1 value	McPyV-positive samples	McPyV-negative samples	Ratio[2] of means	*p*2 value
K-ras	1.21 ± 0.20	1.08 ± 0.16	1.12	NS	1.24 ± 0.39	1.21 ± 0.21	1.03	NS
BRAF	1.16 ± 0.20	1.08 ± 0.23	1.07	NS	1.29 ± 0.10	1.12 ± 0.21	1.15	$p = 0.0411$
RKIP	1.11 ± 0.19	1.04 ± 0.19	1.07	NS	1.17 ± 0.18	1.09 ± 0.19	1.07	NS
p53	1.21 ± 0.22	1.13 ± 0.15	1.07	NS	1.29 ± 0.23	1.21 ± 0.23	1.07	NS
RB1	1.37 ± 0.31	1.34 ± 0.12	1.02	NS	1.29 ± 0.54	1.42 ± 0.32	0.91	NS
Bcl-2	1.19 ± 1.39	1.23 ± 1.49	0.97	$p = 0.047$	1.12 ± 0.14	1.26 ± 0.12	0.89	$p = 0.050$
Bax	1.15 ± 0.23	9.91 ± 0.16	0.12	$p = 0.038$	1.24 ± 0.25	1.11 ± 0.21	1.12	NS

*p*1: *p* value lung cancer tissue *vs.* healthy lung tissue; *p*2: *p* value MCPyV-positive samples *vs.* MCPyV-negative samples.
[1]Ratio of the means lung cancer tissue/healthy lung tissue.
[2]Ratio of the means MCPyV-positive samples/MCPyV-negative samples.

(mean ± SD: 1.29 ± 0.10 and 1.12 ± 0.21, respectively, ratio of the means 0.97, $p = 0.0411$) (Table 5). Unlike *BRAF*, *Bcl-2* gene was markedly downregulated in the MCPyV-positive specimens (mean ± SD: 1.12 ± 0.14 and 1.26 ± 0.12, respectively, ratio of the means 0.89, $p = 0.050$).

The aforementioned differences observed in the gene expression depending on the MCPyV status were additionally examined at the protein level. Western blot analysis confirmed the increased expression of *BRAF* in the MCPyV-infected samples as well as the downregulation of *Bcl-2* in the uninfected specimens (Fig. 2). Moreover, we investigated the activation status of BRAF in a proportion of the samples. For that purpose, a specific phospho-BRAF (Ser445) antibody that detects endogenous levels of B-RAF when phosphorylated at serine 445 was used. Of note, the phosphorylation of BRAF at this particular residue was significantly increased in the MCPyV-infected samples compared to the basal levels of phosphorylation in the MCPyV noninfected specimens (Fig. 2*a*).

No statistically significant association was observed between the expression patterns and any of the clinical parameters.

Discussion

An estimated one in five cancer cases worldwide are caused by infection, with the majority being caused by tumor viruses.[22,23] Most of the viruses are capable of expressing viral

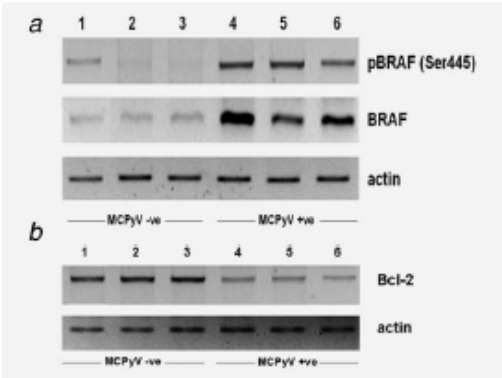


Figure 2. Western blot analysis of phospho-BRAF (Ser445), BRAF and Bcl-2 in MCPyV-infected and noninfected NSCLC specimens. (*a*) Compared to MCPyV noninfected cells (lanes 1–3), both activation of BRAF at Ser445 and overexpression of BRAF protein were evident in MCPyV-infected tissues (lanes 4–6). (*b*) Bcl-2 protein levels were significantly decreased in MCPyV-positive samples (lanes 4–6) compared to noninfected tissue specimens. Actin was used as a stable endogenous control. −ve: negative samples; +ve: positive samples.

genes, inducing alterations in cell growth, proliferation and apoptosis of the infected cells. Our study aimed to establish an association between HPyV infection and NSCLC. Moreover, we investigated the expression of oncogenes, tumor suppressor genes and apoptosis-related genes in MCPyV-infected NSCLC samples, in an effort to evaluate possible mechanisms of oncogenesis in this group of patients. Our major finding is the 9.1% prevalence of MCPyV in the NSCLC group. Moreover, we found an increased mRNA expression of *BRAF* and decreased *Bcl-2* transcription level in the MCPyV-positive NSCLC samples. These findings suggest the involvement of MCPyV in this type of lung cancer through deregulation of the above genes.

The MCPyV-positive samples were predominantly obtained from male smokers, and included mainly adenocarcinomas (50%) followed by squamous cell carcinomas (30%). These findings are noteworthy because a marked increase in the incidence of lung adenocarcinoma has been observed surpassing that of squamous cell carcinoma. The "gene–environment" interaction that is hypothesized to promote this change[24] may be a widely spread infectious agent, capable of interacting with environmental insults causing a susceptibility to genetic mutation and ultimately oncogenesis.

The detected frequency of MCPyV-positive samples (9.1%) in NSCLC is identified in the prevalence rates of two previous studies' identified prevalence rates; a MCPyV and HPV costudy[9] and a recent study of MCPyV DNA presence in NSCLC from Chile.[8] The HPV and MCPyV costudy suggested the presence of MCPyV in 16.7% of 30 NSCLC patients, mainly from squamous cell carcinomas of smoker patients. Interestingly, these findings came from both malignant and adjacent benign tissue. Researchers also detected two benign MCPyV-positive samples but not their corresponding malignant ones. Our study screened 110 NSCLC patients, including a control group that proved to be negative for MCPyV DNA. The discordance among these three studies may be a result of differences in the population of patients studied as well as the difference in the control group tested. Notably, we have also shown a positive trend in smoking status, because the majority of MCPyV-positive samples were obtained from smokers. The differences among these three studies may also be attributed to sample composition variations. The study from Chile used only adenocarcinomas and squamous cell carcinomas at a 1:1 ratio, whereas our study included all NSCLC histological types and the ratio between them reflects their trend in a different geographical area. Moreover, the authors from Chile have stated that their poor percentage is potentially attributed to low sample quality. It is of note that a quantitative study[25] has proven that the incidence of MCPyV DNA in lung cancer tissue is twice as common as in normal lung tissue, although in our study no normal tissue was found to be MCPyV-positive. It is noted that the absence of MCPyV in the control group of our study may be a result of the small control sample size.

It is known that the presence of DNA in this virus is not a sufficient condition to support its involvement in tumorigenesis. Several DNA viruses may not be strong promoters of neoplastic transformation. Instead, the long-term presence of these viruses and their associated proteins in the cell may contribute to an environment that is beneficial to the virus, playing a critical role in the transition from neoplastic precursor toward malignancy. Thus, our study further explored the gene expression of a variety of genes involved in fundamental cellular processes to investigate a possible association between the virus and oncogenesis. The major finding in our study was the downregulation of the *Bcl-2* gene in NSCLC. Moreover, an increased expression of the *BRAF* gene was observed in the MCPyV-positive cases. Research has shown that ablation of *BRAF* had no significant impact on NSCLC tumor development.[26] Moreover, *BRAF* mutations undergo careful observation as they are thought to be excellent therapeutic targets, with *BRAF* exon 15 mutation in NSCLC patients without other gene mutations being sufficient to identify candidates for treatment, in NSCLC male and patients who are heavy smokers.[27] An incidence of 3% of *BRAF* mutations in lung adenocarcinomas was detected, indicating that all patients with a *BRAF* mutation were current or former smokers.[14] The regulatory proteins of HPyV interfere with the normal activity of cell cycle regulatory proteins such as p53, pRb, cyclins, cyclin-dependent kinases (CDK) and CDK inhibitors, inducing telomerase activity, DNA instability, perturbed protein degradation and preventing apoptosis.[28] Two of the principal signaling pathways that are stimulated by the polyoma middle T antigen (MT) are the mitogen-activated protein kinase (MAPK) *via* the Ras/raf pathway[29] and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)

cascades. *BRAF* upregulation that leads to a downstream upregulation of the MAPK/ERK pathway and ultimately to uncontrolled cell proliferation may be a direct result of polyoma protein transformation of the cell, thus contributing to carcinogenesis.

Our third major finding, the downregulation of the *Bcl-2* gene in the MCPyV-positive lung cancer specimens, has been correlated in previous studies with a more aggressive behavior of NSCLC.[30] The second principal signaling pathway that is stimulated by the polyoma MT is the phosphatidylinositol 3-kinase (*PI3K*) cascade, which results, *via Akt*, in the phosphorylation of the *Bcl-2*-associated death agonist (*BAD*), which in turn restores the antiapoptotic effects of the *BAD*-binding protein $BCL\text{-}X_L$.[29] Although the main aim of our study was not to explore the *PI3K/Akt* pathway, we investigated the deregulation of apoptosis by the expression of two genes situated downstream the *PI3K* cascade: *Bax* and *Bcl-2*. A ratio <1 of *Bax/Bcl-2* indicates hyperexpression of *Bcl-2* and loss of *Bax* when compared to normal bronchial epithelium and has been shown to increase with the severity of the preneoplastic lesions, from low grade to high grade.[18] In our study, we have shown a statistically significant downregulation of *Bax* expression in lung cancer samples, whose role consists of accelerating programmed cell death by binding to, and antagonizing, the apoptosis repressor *Bcl-2*. The total of the lung cancer tissue samples had a *Bax/Bcl-2* ratio <1, in accordance with the studies implicating such ratios with neoplasias.[18] Interestingly, the MCPyV-positive samples had lower *Bcl-2* levels compared to MCPyV-negative samples, leading toward a loss of apoptosis-repressor activity, which may contribute to aberrant proliferation. We hypothesize that the susceptibility of Bcl-2 deregulation may be a contributing factor to MCPyV infection. A recent study has shown that the Bcl-2-associated athanogene, *Bag3*, has the ability to interact with the JCV LTA and downregulate the level of LTA expression in primitive neuroectodermal tumor cells, suggesting that *Bag3* affects the expression of LTA at the post-transcriptional level, most likely by destabilizing the protein.[31] The findings of a recent study suggest that *Bcl-2* positivity indicates a better clinical stage at the time of diagnosis with less metastasis and a longer survival rate in MCC.[32] In our study, all the MCPyV-positive samples tested positive for *Bcl-2* expression, and while data from survival rates cannot be correlated at this time with *Bcl-2* expression, we may hypothesize that MCPyV infection in lung cancer cells may alter the expression pattern but not repress the *Bcl-2* expression. Further studies may provide information on lung cancer survival rates in correlation with *Bcl-2* expression.

LTA of MCPyV contains a supposed *p53*-binding site that may be lost when the virus undergoes a truncating mutation in tissue.[10] Recently, it was shown in MCCs that higher viral abundance tended to be associated with lower *p53* expression and longer survival,[33] whereas in another study *p53* expression in tumor was associated with unfavorable MCC-specific survival.[34] In addition, a recent study aiming to improve the sensitivity of detection of MCPyV in MCC revealed that although all MCC may contain MCPyV viral DNA, tumors may be selected for the presence of inactivating p53 mutations when the viral T antigens are not expressed. Furthermore, in the case that MCPyVpositive MCC tumors disrupt p53 signaling, then the above selection is accomplished by a different mechanism that does not involve the C terminus of the LTA.[35] In our study, although a trend for *p53* upregulation in the MCPyV-positive sample was observed, *p53* was not significantly affected by the MCPyV in the NSCLC samples, suggesting that among different human tumors, MCPyV may induce different oncogenic pathways.

Regarding the *RB1* expression, we found that the presence of MCPyV did not correlate with the abundance in the *RB1* transcripts in NSCLC samples. This finding is in agreement with the comparable expression and phosphorylation of the retinoblastoma protein in MCPyV-positive and -negative MCC cells.[36]

Recent studies have shown that although MCPyV is possibly an oncogenic polyomavirus in humans and is potentially causally related to the development of MCC, it is not to the morphological similar to SCLC.[37]

Studies have shown that presence of MCPyV DNA is higher in respiratory specimens from asymptomatic patients following lung transplantation compared to KIV and WUV,[38] whereas in a study on acute respiratory tract infection more adults than children were positive for respiratory MCPyV in contrast to KIV and WUV.[39] It seems likely that presence of MCPyV in the lung parenchyma may play a critical role in the progression of pulmonary diseases in adults, and because inflammation has been postulated to be important in lung carcinogenesis,[40] viral infections may be a key component of the process.

There was no detection of BKV or JCV DNA in any of the NSCLC samples, in accordance with the lack of evidence toward an etiopathological role of these polyomaviruses and lung carcinomas. Although HPyVs have a global presence and high seropositivity worldwide, none of our control population samples was tested positive for MCPyV, BKV or JCV DNA.

The connection between lung cancer and infectious agents such as viruses may lead to a better understanding of the incidence of the disease in nonsmokers. Although smoking accounts for the majority of lung cancer cases, the fact that only a minority of smokers develop lung cancer in their lifetimes makes this disease an important model for assessing gene–environment interactions. Our study contributes to the field of the pathogenesis of lung carcinogenesis by providing data implicating MCPyV infection in a notable 10% of NSCLC patients, while suggesting that the deregulation of BRAF and Bcl-2 in MCPyV-infected lung cancer cells may be one of the critical steps involved in the contribution to carcinogenesis *via* MCPyV cell transformation.

References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2010.
2. Alberg AJ, Ford FG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132:29S–55S.
3. Lee JM, Yanagawa J, Peebles KA, et al. Inflammation in lung carcinogenesis: new targets for lung cancer chemoprevention and treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:208–17.
4. zur Hausen H. Novel human polyomaviruses—re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens. *Int J Cancer* 2008;123:247–50.
5. Gjoerup O, Chang Y. Update on human polyomaviruses and cancer. *Adv Cancer Res* 2010;106:1–51.
6. Feng H, Shuda M, Chang Y, et al. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 2008;319:1096–100.
7. Helmbold P, Lahtz C, Herpel E, et al. Frequent hypermethylation of RASSF1A tumour suppressor gene promoter and presence of Merkel cell polyomavirus in small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2009;45:2207–11.
8. Gheit T, Munoz JP, Levican J, et al. Merkel cell polyomavirus in non-small cell lung carcinomas from Chile. *Exp Mol Pathol* 2012;93:162–6.
9. Joh J, Jenson AB, Moore GD, et al. Human papillomavirus (HPV) and Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in non small cell lung cancer. *Exp Mol Pathol* 2010;89:222–6.
10. Houben R, Schrama D, Becker JC. Molecular pathogenesis of Merkel cell carcinoma. *Exp Dermatol* 2009;18:193–8.
11. Demetriou SK, Ona-Vu K, Sullivan EM, et al. Defective DNA repair and cell cycle arrest in cells expressing Merkel cell polyomavirus T antigen. *Int J Cancer* 2012;131:1818–27.
12. Houben R, Adam C, Baeurle A, et al. An intact retinoblastoma protein-binding site in Merkel cell polyomavirus large T antigen is required for promoting growth of Merkel cell carcinoma cells. *Int J Cancer* 2012;130:847–56.
13. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1367–80.
14. Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 2011;29:2046–51.
15. Xu H, Wang X, Shen W, et al. [The expression and significance of RKIP in lung squamous cell carcinoma tissues]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2011;14:194–8.
16. Huerta-Yepez S, Yoon NK, Hernandez-Cueto A, et al. Expression of phosphorylated raf kinase inhibitor protein (pRKIP) is a predictor of lung cancer survival. *BMC Cancer* 2011;11:259.
17. Amundson SA, Myers TG, Fornace AJ, Jr. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* 1998;17:3287–99.
18. Brambilla E, Negoescu A, Gazzeri S, et al. Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. *Am J Pathol* 1996;149:1941–52.
19. Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;118:1136–52.
20. Andres C, Belloni B, Puchta U, et al. Prevalence of MCPyV in Merkel cell carcinoma and non-MCC tumors. *J Cutan Pathol* 2010;37:28–34.
21. Antoniou KM, Soufla G, Lymbouridou R, et al. Expression analysis of angiogenic growth factors and biological axis CXCL12/CXCR4 axis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Connect Tissue Res* 2010;51:71–80.
22. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006;118:3030–44.
23. Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 2009;10:321–2.
24. Brentnall TA, Chen R, Lee JG, et al. Microsatellite instability and K-ras mutations associated with pancreatic adenocarcinoma and pancreatitis. *Cancer Res* 1995;55:4264–7.
25. Loyo M, Guerrero-Preston R, Brait M, et al. Quantitative detection of Merkel cell virus in human tissues and possible mode of transmission. *Int J Cancer* 2010;126:2991–6.
26. Blasco RB, Francoz S, Santamaria D, et al. c-Raf, but not B-Raf, is essential for development of K-Ras oncogene-driven non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* 2011;19:652–63.
27. Kobayashi M, Sonobe M, Takahashi T, et al. Clinical significance of BRAF gene mutations in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2011;31:4619–23.
28. Moens U, Johannessen M. Human polyomaviruses and cancer: expanding repertoire. *J Dtsch Dermatol Ges* 2008;6:704–8.
29. Dilworth SM. Polyoma virus middle T antigen and its role in identifying cancer-related molecules. *Nat Rev Cancer* 2002;2:951–6.
30. Porebska I, Wynodek E, Kosacka M, et al. Apoptotic markers p53, Bcl-2 and Bax in primary lung cancer. *In Vivo* 2006;20:599–604.
31. Sariyer IK, Menabova N, Patel PK, et al. Bag3-induced autophagy is associated with degradation of JCV oncoprotein, T-Ag. *PLoS One* 2012;7:e45000.
32. Sahi H, Koljonen V, Kavela H, et al. Bcl-2 expression indicates better prognosis of Merkel cell carcinoma regardless of the presence of Merkel cell polyomavirus. *Virchows Arch* 2012;461:553–9.
33. Bhatia K, Goedert JJ, Modali R, et al. Merkel cell carcinoma subgroups by Merkel cell polyomavirus DNA relative abundance and oncogene expression. *Int J Cancer* 2010;126:2340–6.
34. Waltari M, Sihto H, Kukko H, et al. Association of Merkel cell polyomavirus infection with tumor p53, KIT, stem cell factor, PDGFR-alpha and survival in Merkel cell carcinoma. *Int J Cancer* 2011;129:619–28.
35. Rodig SJ, Cheng J, Wardzala J, et al. Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. *J Clin Invest* 2012;122:4645–53.
36. Houben R, Schrama D, Alb M, et al. Comparable expression and phosphorylation of the retinoblastoma protein in Merkel cell polyoma virus-positive and negative Merkel cell carcinoma. *Int J Cancer* 2010;126:796–8.
37. Wetzels CT, Hoefnagel JG, Bakkers JM, et al. Ultrastructural proof of polyomavirus in Merkel cell carcinoma tumour cells and its absence in small cell carcinoma of the lung. *PLoS One* 2009;4:e4958.
38. Bergallo M, Costa C, Terlizzi ME, et al. Quantitative detection of the new polyomaviruses KI, WU and Merkel cell virus in transbronchial biopsies from lung transplant recipients. *J Clin Pathol* 2010;63:722–5.
39. Goh S, Lindau C, Tiveljung-Lindell A, et al. Merkel cell polyomavirus in respiratory tract secretions. *Emerg Infect Dis* 2009;15:489–91.
40. Smith CJ, Perfetti T, King JA. Perspectives on pulmonary inflammation and lung cancer risk in cigarette smokers. *Inhal Toxicol* 2006;18:667–77.

Aberrant expression of miR-21, miR-376c and miR-145 and their target host genes in Merkel cell polyomavirus-positive non-small cell lung cancer

Ismini Lasithiotaki[1,2], Eliza Tsitoura[2,3], Anastasios Koutsopoulos[4], Eleni Lagoudaki[4], Chara Koutoulaki[2], George Pitsidianakis[1], Demetrios A. Spandidos[3], Nikolaos M. Siafakas[1], George Sourvinos[3,*], Katerina M. Antoniou[1,2,*]

[1]Department of Thoracic Medicine, University Hospital, Medical School, University of Crete, Heraklion 71110, Greece

[2]Laboratory of Cellular and Molecular Pneumonology, Medical School, University of Crete, Heraklion Crete 71110, Greece

[3]Laboratory of Clinical Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion Crete 71110, Greece

[4]Department of Pathology, Medical School, University of Crete, Heraklion Crete 71110, Greece

[*]These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: *George Sourvinos,* ***email:*** *sourvino@med.uoc.gr*

Keywords: *merkel cell polyomavirus, non-small cell lung cancer, microRNAs, signalling pathways*

Received: *April 23, 2016* ***Accepted:*** *July 19, 2016* ***Published:*** *August 11, 2016*

ABSTRACT

Merkel Cell Polyoma Virus (MCPyV) infection has been associated with non-small cell lung cancer (NSCLC). Viruses can manipulate cellular miRNAs or have a profound impact on cellular miRNA expression to control host regulatory pathways. In this study, we evaluated the expression profiles of cancer-associated and virally affected host microRNAs miR-21, miR-145, miR-146a, miR-155, miR-302c, miR-367 and miR-376c in a series of NSCLC tissue samples as well as in samples from "healthy" sites, distant from the tumour region that were either positive or negative for MCPyV DNA. miR-21 and miR-376c were significantly upregulated whereas miR-145 was significantly downregulated in the MCPyV+ve samples compared to the MCPyV-ve tumour samples. Overall, miR-21 and miR-376c expression was higher in tumour compared to healthy tissue samples. No association was observed between the miR-155, miR-146a, miR-302c and miR-367 levels and the presence of MCPyV. The expression of miR-21 target genes (*Pten, Bcl-2, Daxx, Pkr, Timp3*), miR-376c (*Grb2, Alk7, Mmp9*) and miR-145 (*Oct-4, Sox2, Fascin1*) and their associated pathways (*Braf, Akt-1, Akt-2, Bax, Hif1a, p53*) was altered between MCPyV+ve tumor samples and their corresponding controls. These results show a novel association between miR-21, miR-376c and miR-145 and their host target genes with the presence of MCPyV, suggesting a mechanism of virus-specific microRNA signature in NSCLC.

INTRODUCTION

Lung cancer remains the leading cause in cancer-related mortality in both males and females. Approximately 85% of lung tumors are non-small cell lung cancer (NSCLC), including adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell carcinoma [1]. Although the majority of lung cancer patients are smokers, only a minority among smokers will develop this disease, strongly suggesting that additional environmental determinants including virus infections, in a background of genetic susceptibility, drive disease initiation and progression [2].

The accumulation of genetic and epigenetic events in the respiratory epithelium is essential for lung carcinogenesis [3]. In particular, microRNAs (miRNAs) have been shown to be commonly dysregulated in lung cancer [4]. MicroRNAs, short, non-coding RNA molecules, are key regulators of transcription regulation and it is currently appreciated that they participate in tumorigenesis by regulating the expression of oncogenes and tumor suppressors or by acting as oncogenes and

tumor suppressors themselves [5]. Furthermore, certain miR-NAs (epi-miR-NAs) counteract CpG methylation and regulate the components of epigenetic machinery, thus creating a tightly controlled feedback mechanism [5]. MiRNA signatures have been identified in NSCLC, not only demonstrating their biological role but also suggesting them as potential non-invasive diagnostic and therapeutic biomarkers in this type of lung malignancy [6].

Merkel cell polyoma virus (MCPyV) is a double stranded DNA virus that belongs to the family of human polyoma viruses. Several members of the human polyoma viruses have demonstrated oncogenic properties in cell culture and animal models however to date MCPyV is the only member associated with cancer in humans [7]. The prevalence of MCPyV in Merkel cell carcinomas (MCC) of the skin reaches 80%[7] while we and others have previously demonstrated the presence of MCPyV in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) [8]. We have shown that the deregulation of *Braf* and *Bcl-2* is associated with the presence of MCPyV DNA in NSCLC patients, implicating apoptotic pathways with polyoma virus infection in human lung cancer [9]. Although additional studies are needed for the accurate determination of the prevalence of MCPyV in NSCLC, it appears that the presence of this virus may be implicated with carcinogenic phenomena not only in the skin but also in malignancies of the lung [10].

Viruses are known to alter the expression of several host miRNAs in order to highjack cellular machinery for their propagation or to evade antiviral responses while several miRNAs associated with cancer, are also affected by viruses that cause tumours in humans [11]. Information regarding the effect of MCPyV infection on host miRNA expression is extremely limited [12]. Interestingly, MCPyV appears to suppress the expression of miR-203 though yet unknown mechanisms in MCPyV-positive MCC and this was directly linked to increased cell proliferation and evasion of cell cycle arrest [12].

Considering the emerging interactions between microRNA regulation and MCPyV infection in MCC, we hypothesised that the expression of NSCLC-associated microRNAs may be influenced by the presence of MCPyV in cancerous lung tissues. Thus, in this study, we investigated the expression profiles of the microRNAs previously associated with NSCLC such as miR-21, miR-367, miR-155, miR-146a, miR-302c, miR-145 and miR-376c and their corresponding target genes and associated pathways in samples from primary NSCLC that were positive or negative for MCPyV DNA. Our results demonstrated aberrant expression patterns of a miR-21, miR-376c and miR-145 which correlated with the deregulated expression of several target genes, providing novel evidence of a MCPyV induced epigenetic mechanism in NSCLC.

RESULTS

Polyomavirus detection

Initially we tested the NSCLC tissue samples for the presence of MCPyV DNA. Eight (N=8) NSCLC samples and five of the non-malignant corresponding controls (N=5) tested positive for MCPyV DNA. Sixteen (N=16) NSCLC samples and five of the non-malignant corresponding controls (N=5) tested negative for MCPyV genomes. From our original cohort [8] we were able to obtain non-malignant appropriate control tissues from 5 NSCLC patients positive for MCPyV and from 5 NSCLC patients negative for MCPyV. Demographics, biopsy results and malignant subtypes of NSCLC of patients are

Table 1: The clinicopathological characteristics and histological NSCLC types of all patients

Characteristics	MCPyV-positive	MCPyV-negative	P-value
Number	8	16	
Age*	68.00±8.21	62.82±11.63	NS
Sex (male/female)**	7/1	14/2	NS
Non-smokers**	1	1	NS
Smokers**	6	8	NS
Ex-smokers**	1	7	NS
Adenocarcinoma	5	10	
Squamous	2	5	
Large Cell Undifferentiated	1	1	

Values are expressed as means ± SD (standard deviation).
**t*-test; $P < 0.05$ is considered statistically significant.
**χ^2test; $P < 0.05$ is considered statistically significant.
NS; not significant.

shown in Table 1. The two groups of MCPyV-positive and –negative NSCLC samples were matched for age, gender, smoking history and NSCLC subtypes since no significant differences were observed between the two groups.

The histological types consisted mainly of adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. The two predominant histological MCPyV-positive types showed similarities in mean age of the patients.

microRNA expression

Next, we compared the expression of the microRNAs miR-21, miR-145, miR-146a, miR-155, miR-302c, miR-367 and miR-376c in the MCPyV+ve and MCPyV-ve NSCLC samples and their corresponding control samples. MiR-367, member of a cluster that reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells [13], and miR-145, a hypothesized tumor suppressor [14], have been shown to be associated with an unfavourable prognosis in resected NSCLC [15], while miR-145 and miR-146a, a mediator of inflammation [16], have been proposed as serum diagnostic biomarkers in NSCLC [17]. MiR-155, a multifunctional microRNA involved in haematopoietic lineage differentiation, immunity and viral infections, inflammation, cancer, and cardiovascular diseases [18], has been hypothesized to induce the development of NSCLC in patients from Asia and America [19]. Mir-376c suppresses non-small-cell lung cancer cell growth and invasion by targeting LRH-1-mediated Wnt signaling pathway [20]. MiR-302c has been proposed to prevent Ras-induced senescence by inhibiting p21 [21], while miR-21, the most upregulated microRNA in solid tumours, has been shown to be associated with NSCLC prognosis [22], predict recurrence and unfavourable survival in NSCLC [23] and sensitivity to ionizing radiation [24]. Normalisation was performed using miR-191 as it was found to be the most stably expressed microRNA in FFPE lung samples, as previously suggested [15].

MiR-21 and miR-376c were significantly overexpressed in the NSCLC samples compared to the controls (Table 2, Figure 1). MiR-21 and miR-376c were also significantly higher in MCPyV-positive NSCLC samples as compared to MCPyV-negative samples (Table 2, Figure 1). Alternatively, miR-145 was significantly overexpressed in MCPyV-negative NSCLC samples compared to MCPyV-positive NSCLC samples and the control non-malignant tissue samples (Figure 1). The expression of miR-367, miR-155, miR-146a and miR-302c showed no difference either between the MCPyV-positive and the MCPyV-negative NSCLC samples or NSCLC and control samples.

No significant associations were found between gene expression and age, gender, smoking history or NSCLC subtype. The survival curve of both groups did not differ significantly.

Gene expression

We further sought to investigate the expression profiles of genes targeted by the dysregulated microRNAs in this cohort.

MiR-21 target genes were categorised, mainly based on the hallmarks of cancer [25], a wheel of potential genes targeted by miR-21 in a tumorous environment as well as the potential pathways influenced by miR-21. The *Pten* and *Braf* genes, involved in the sustenance of proliferative signalling, were significantly underexpressed and overexpressed, respectively in the MCPyV-positive NSCLC samples compared to their corresponding controls (Table 3, Figure 2A). *Bcl-2* and *Bax*, anti- and pro-apoptotic genes, respectively, implicated in resistance to cell death, were underexpressed in the MCPyV-positive NSCLC samples compared to the MCPyV-negative NSCLC samples as well as to the controls (Figure 2B). Genes implicated in the deregulation of genomic stability, *p53* and *Akt2*, were underexpressed in the MCPyV-positive NSCLC samples compared to controls and the MCPyV-negative NSCLC samples (Figure 2C), while *Akt1* was underexpressed in the MCPyV-positive NSCLC samples compared to the controls but overexpressed compared to the MCPyV-negative NSCLC samples.

Overexpression was detected for the hypoxia-associated and innate immune response-inducible transcription factor *Hif1a* in the MCPyV-positive NSCLC samples compared to the controls and the MCPyV-

Table 2: Expression profiles of microRNAs in lung tissue samples of NSCLC patients and controls in relation to the presence or absence of MCPyV

MEAN±SD	MCPyV +ve controls	MCPyV +ve samples	MCPyV -ve controls	MCPyV -ve samples	*P*-value
miR-21	0.43±0.24	1.13±0.08	0.49±0.60	0.88±0.05	0.013
miR-376c	2.75±0.26	6.53±0.38	2.85±1.47	5.29±2.51	0.048
miR-145	1.71±0.23	1.35±0.21	1.28±0.43	6.99±3.99	0.0002

Values are expressed as means ± SD (standard deviation).
$P < 0.05$ is considered statistically significant.
NS; not significant.

negative NSCLC samples (Figure 3A), while the tumor-promoting inflammatory gene *Daxx* was overexpressed in the MCPyV-positive NSCLC samples compared to the controls as well as the MCPyV-negative NSCLC samples (Figure 3B). Angiogenic deregulator *Timp3* was underexpressed in the MCPyV-positive NSCLC samples compared to the controls but overexpressed compared to the MCPyV-negative NSCLC samples (Table 3, Figure 3A). Lastly, *Pkr*, an antiviral innate immune response-inducible gene also involved in tumor-promoting inflammatory pathways, was expressed at significantly higher levels in the MCPyV-positive tissue samples compared to the MCPyV-negative tissues (Table 3, Figure 3B). Interestingly, the expression of *Pkr* was significantly suppressed in the malignant tissues.

All miR-21 direct target genes showed a significant negative correlation with miR-21 expression in the MCPyV-positive NSCLC group, apart from *Daxx* which showed a positive correlation (Table 4). *Pten, Bcl-2* and *Pkr* showed moderate negative correlation with miR-21 expression in MCPyV-positive NSCLC, while *Daxx* and *Timp3* showed a weaker correlation with miR-21 expression in MCPyV positive NSCLC.

The transcript levels of genes targeted by miR-376c, *Alk-7, Mmp9* and *Grb2* were significantly decreased in the MCPyV-positive NSCLC samples compared to the controls and MCPyV-negative samples (Table 3, Figure 4). *Alk7* and *Grb2* strongly negatively correlated with miR-367c in the MCPyV-positive NSCLC group (Table 4), while *Mmp9* showed a weak negative correlation with miR-376c expression in MCPyV-positive NSCLC.

MiR-145 targets genes *Oct4, Sox2* and *Fascin1* were overexpressed in the MCPyV-positive NSCLC samples compared to the controls and the MCPyV-negative samples (Table 3, Figure 5). *Oct4, Sox2* and *Fascin1* negatively correlated with miR-145 in the MCPyV-positive NSCLC group (Table 4), *Oct4* and *Sox2* had a weak correlation result, while *Fascin1* showed a moderate to strong correlation coefficient.

The *Akt-1* transcript levels correlated significantly with the smoking status only in the MCPyV-negative group. No other significant correlation between microRNA target gene expression and clinical parameters arose.

DISCUSSION

The present study aimed to investigate the potential association between human polyomavirus infection and epigenetic alterations involving the expression of microRNAs in NSCLC. Among the evaluated microRNAs, miR-21 and miR-376c showed a modest but significant increased expression in MCPyV-positive NSCLC samples relative to the MCPyV-negative tumour samples. Conversely, miR-145 was strongly downregulated in the MCPyV-positive NSCLC samples relative to the MCPyV-negative tumour samples.

Tumour aggressiveness

Several miR-21 target genes and associated pathways are implicated in the majority of the hallmarks of cancer [25]. In both MCPyV-positive and MCPyV-negative NSCLC samples, we found high miR-21 levels that were correlated with low *PTEN* mRNA levels. This inverse association was stronger in the MCPyV-positive tumour samples and may indicate a poor Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) resistance clinical response and a shorter survival [26]. This should be taken into consideration, in combination with data suggesting that the downregulation

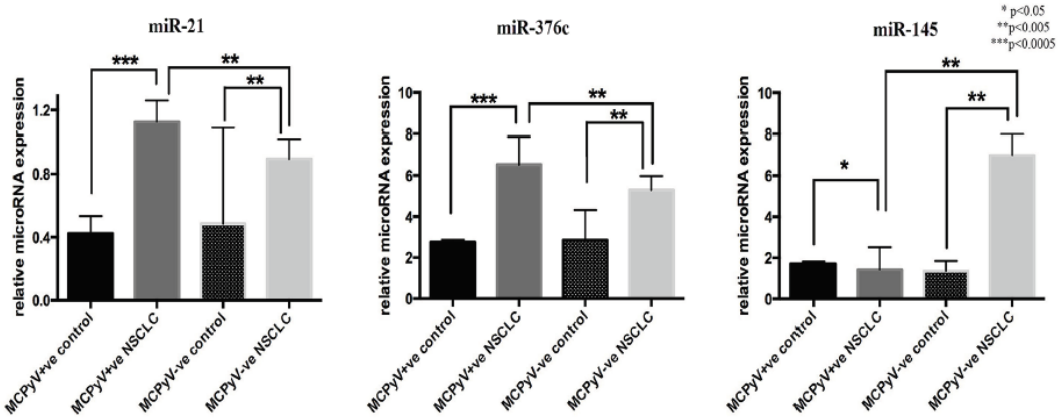


Figure 1: Expression profile of microRNAs in lung tissue samples of NSCLC patients (MCPyV+ve N=8, MCPyV-ve N=16) and controls (MCPyV+ve N=5, MCPyV-ve N=5) in relation to the presence or absence of MCPyV. Samples showed normal distribution, One-way Anova and confirmatory student's t test were used for the analysis. * p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005.

Table 3: Expression profiles of microRNAs' target genes in lung tissue samples of NSCLC patients and controls in relation to the presence or absence of MCPyV

	Gene expression profiles			
MEAN±SD	**MCPyV +ve controls**	**MCPyV +ve NSCLC samples**	**MCPyV –ve controls**	**MCPyV -ve NSCLC samples**
miR--21 targets				
Direct target genes				
Pten	8.10±0.8	1.4±0.02	0.98±0.32	0.10±0.00
Bcl-2	38.30±5.8	13.40±2.10	12.32±9.87	40.90±6.10
Daxx	10.08±1.23	16.79±8.10	8.69±3.63	7.10±0.81
Pkr	357.1±56.04	64.71±11.37	41.97±6.54	46.71±23.71
Timp3	6.10±1.31	1.4±0.02	0.03±0.00	0.30±0.00
Associated pathways' genes				
Braf	0.53±0.02	1.60±0.40	1.03±0.94	0.10±0.00
Bax	9.50±1.20	2.4±0.31	13.69±4.12	39.1±3.72
p53	7.60±2.10	1.90±0.51	1.56±0.65	3.6±0.89
Akt-1	14.50±1.63	5.30±0.85	0.03±0.00	0.4±0.09
Akt-2	18.10±3.12	3.10±1.56	26.45±13.58	76.5±9.54
Hif1a	11.71±0.98	78.80±6.57	6.91±2.23	3.90±0.09
miR--376c targets				
Alk7	1.13±0.76	0.22±0.32	0.58±1.21	0.62±0.06
Mmp9	357.1±56.04	64.71±11.37	123.89±55.63	166.71±15.71
Grb2	12.31±0.32	1.98±0.02	5.32±1.29	6.32±0.34
miR--145 targets				
Oct4	0.87±0.02	1.10±0.41	0.49±0.02	0.54±0.26
Sox2	0.92±0.38	5.21±2.78	2.65±0.03	1.21±0.72
Fascin1	-	53.16±12.28	-	28.04±6.89

Values are expressed as means ± SD (standard deviation).
NS: non significant.

of miRNA-21 could sensitize radioresistant NSCLC cells by inhibiting cell proliferation and enhancing apoptosis through the inhibition of the PI3K/Akt signalling pathway [24]. *Braf* gene involved in sustaining pro-proliferative signalling was found strongly upregulated in the MCPyV-positive NSCLC samples relative to the MCPyV-negative tumour samples as previously shown [8]. The combination of low *Pten* levels with high *Braf* expression provides evidence for increased tumour aggressiveness associated with MCPyV in NSCLC.

We also investigated the *Bax/Bcl-2* equilibrium, which is related to apoptosis resistance in association with miR-21 expression, following up on our previous study [8]. *Bax*, widely described as a pro-apoptotic factor, and *Bcl-2*, representative of anti-apoptotic proteins, were found underexpressed in MCPyV-positive NSCLC cases, both negatively correlating with miR-21. A ratio of *Bax/Bcl-2* lower than 1, as was observed in the MCPyV-positive samples, indicates hyperexpression of *Bcl-2* and loss of *Bax* and has been shown to positively correlate with the severity of the preneoplastic lesions, from low-grade to high-grade [27].

Importantly MCPyV-positive NSCLC samples showed decreased *p53* expression relative to the MCPyV-negative tumour samples. Inhibition of *p53* activity is a characteristic of polyoma viruses including MCPyV [28]. Recent data suggest that the inhibition of miR-21 would be beneficial in apoptosis-inducing cancer therapies directed against p53-deficient tumours [29].

It has been suggested that loss of angiogenic deregulator, promotes tumor malignancy and subsequent relapse and poor survival in patients with HPV-infected

non-small cell lung cancer [30]. In the present study, MCPyV-infected NSCLC cells showed a significant underexpression of *Timp3* compared to the controls. Taken together, these results may hint at a poorer outcome in the presence of MCPyV DNA in NSCLC patients.

MiR-376c, was significantly overexpressed in MCPyV-positive NSCLC samples, and negatively correlated with its target genes, *Alk7, Mmp9* and *Grb2*, in MCPyV-positive NSCLC samples. MiR-376c has been suggested to inhibit *Alk7* expression, cell proliferation and apoptosis only in ovarian cancer cell lines [31], and lead to poor chemotherapy response. *Mmp9*, known to promote lung tumour metastasis [32], has been suggested to be inhibited by miR-129 [33] and has been proposed as

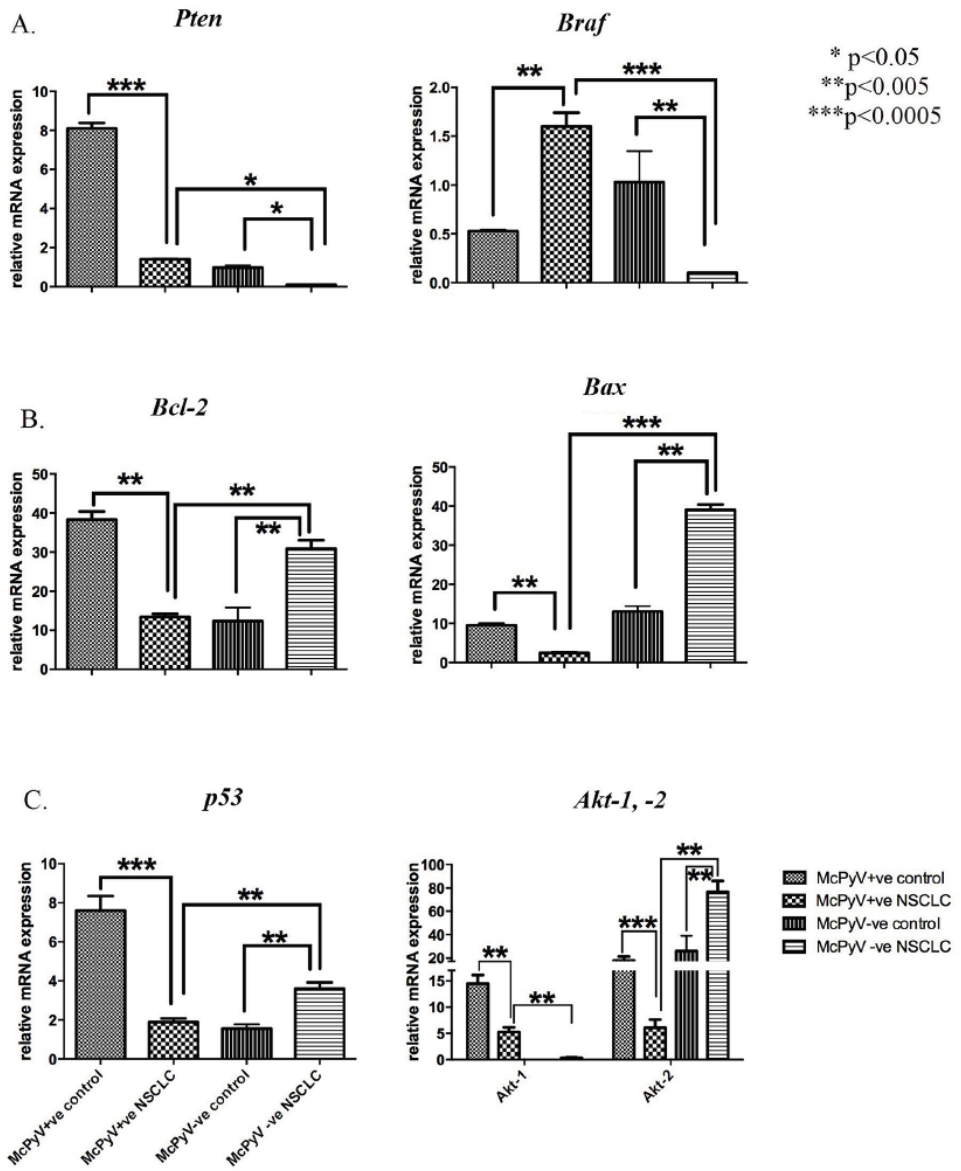


Figure 2: Expression profile of miR-21 target genes and associated pathways' genes *Pten, Braf, Bcl-2, Bax, p53, Akt-1, Akt-2* in lung tissue samples of NSCLC patients (MCPyV+ve N=8, MCPyV-ve N=16) and controls (MCPyV+ve N=5, MCPyV-ve N=5) in relation to the presence or absence of MCPyV. Samples showed normal distribution, One-way Anova and confirmatory student's t test were used for the analysis. * p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005.

a possible therapeutic target [33]. In addition, cytosolic adaptor protein GRB2, a critical mediator of oncogenic EGFR signaling through activation of RAS [34], is required for survival of cells with mutant EGFR [35]. To the best of our knowledge, this is the first report of *Mmp9* miR-376c mediated inhibition in human NSCLC, as well as miR-376c mediated *Grb2* downregulation in MCPyV-positive tumour samples.

Importantly, miR-145, a suggested tumor-suppressor [36] was strongly downregulated in MCPyV-positive NSCLC compared to MCPyV-negative NSCLC, while it was significantly higher in MCPyV-negative NSCLC relative to the non-malignant controls. This striking difference was also reflected in the miR-145 target genes, *Oct4/Sox2/Fascin1* which were all upregulated in the MCPyV-positive tumour samples. It has been shown that miR-145 expression is negatively correlated with the levels of Oct4/Sox2/Fascin1 in lung adenocarcinoma and an Oct4(high)/Sox2(high)/Fascin1(high)/miR145(low) phenotype, as in the present study, predicted poor

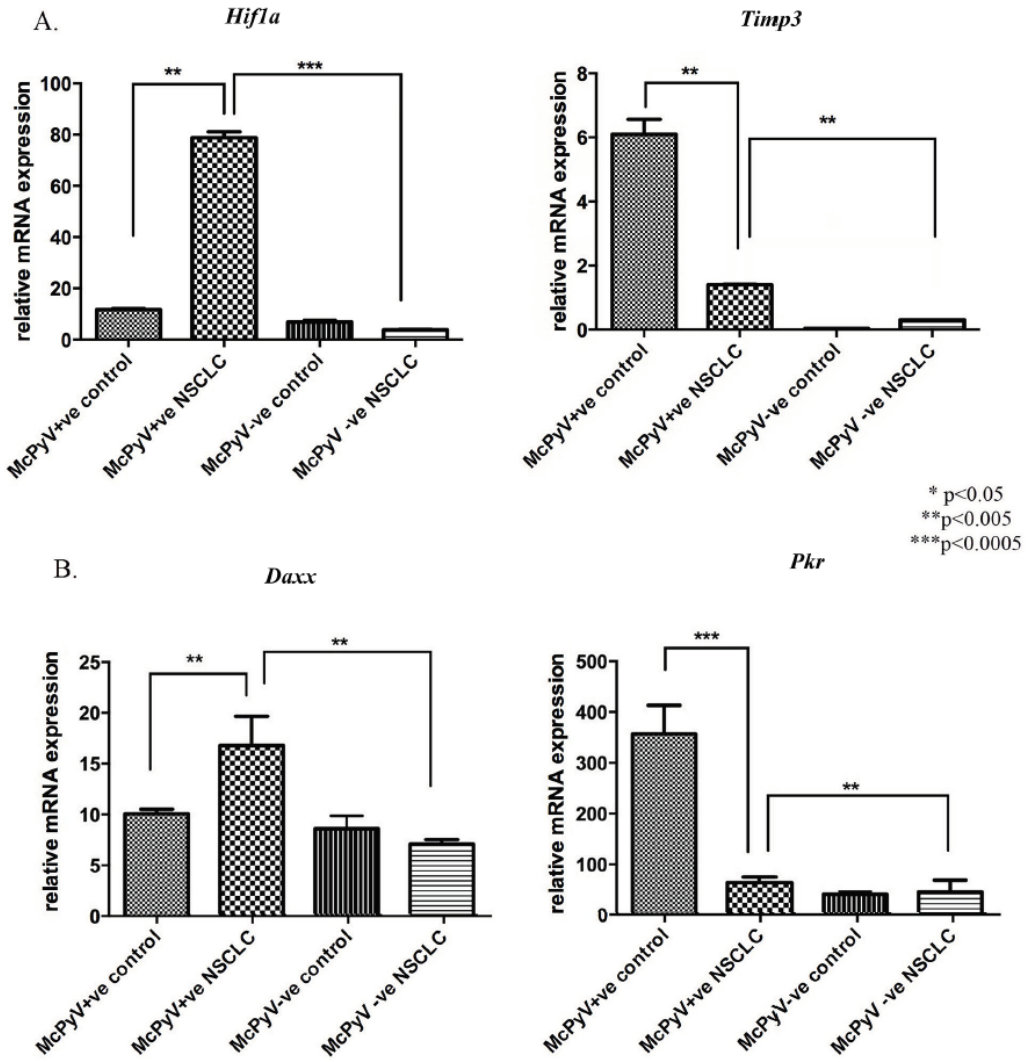


Figure 3: Expression profile of miR-21 target genes and associated pathways' genes *Hif1a, Timp3, Daxx, Pkr* in lung tissue samples of NSCLC patients (MCPyV+ve N=8, MCPyV-ve N=16) and controls (MCPyV+ve N=5, MCPyV-ve N=5) in relation to the presence or absence of MCPyV. Samples showed normal distribution, One-way Anova and confirmatory student's t test were used for the analysis. * p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005.

Table 4: Correlations between microRNAs and their target genes in lung tissue samples of NSCLC patients and controls in relation to the presence or absence of MCPyV

	Correlations			
r/r²/p value	**MCPyV +ve controls**	**MCPyV +ve NSCLC samples**	**MCPyV -ve controls**	**MCPyV -ve NSCLC samples**
Correlation of target genes with miR--21				
Pten	NS	r= -0.6205, r^2=0.3850, p= 0.0009	NS	r= -0.4027, r^2= 0.1621, p= 0.0460
Bcl-2	r= +0.5603, r^2=0.3139, p=0.0036	r= -0.5044, r^2=0.2544, p= 0.0101	NS	NS
Daxx	NS	r= +0.4309, r^2=0.1857, p= 0.0315	NS	r= -0.2398, r^2= 0.2598, p= 0.0047
Timp3	NS	r= -0.4293, r^2=0.1843, p= 0.0322	r= -0.8293, r^2=0.5845, p=0.0432	r= -0.1493, r^2= 0.3649, p= 0.0212
Pkr	NS	r= -0.4946, r^2=0.2446, p= 0.0266	NS	r= -0.9746, r^2= 0.6597, p= 0.0023
Correlation of target genes with miR--376c				
Alk7	NS	r= -0.6951, r^2=0.5912, p= 0.0251	NS	NS
Mmp9	r= +0.4351, r^2=0.1964, p=0.0387	r= -0.3416, r^2=0.4108, p= 0.0023	NS	r= +0.6941, r^2= 0.4679, p= 0.0039
Grb2	r= +0.6398, r^2=0.2415, p=0.0289	r= -0.7589, r^2=0.6341, p= 0.0049	NS	NS
Correlation of target genes with miR--145				
Oct4	NS	r= +0.2341, r^2= 0.3019, p= 0.0056	r=+0.1956, r^2=0.2098, p=0.0042	r= -0.6832, r^2= 0.5912, p= 0.0183
Sox2	NS	r= +0.3965, r^2= 0.4170, p= 0.0038	NS	r= -0.9230, r^2= 0.7154, p= 0.0058
Fascin1	-	r= +0.6231, r^2= 0.5439, p= 0.0008	-	r= -0.2206, r^2= 0.1905, p= 0.0029

NS: non significant, r=Pearson's r coefficient, r^2=coefficient of determination.

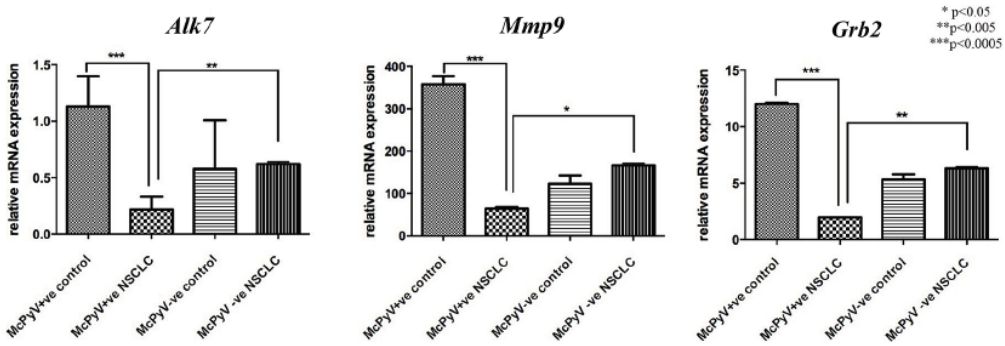


Figure 4: Expression profile of miR-376c target genes *Alk7, Mmp9, Grb2* in lung tissue samples of NSCLC patients (MCPyV+ve N=8, MCPyV-ve N=16) and controls (MCPyV+ve N=5, MCPyV-ve N=5) in relation to the presence or absence of MCPyV. Samples showed normal distribution, One-way Anova and confirmatory student's t test were used for the analysis. * p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005.

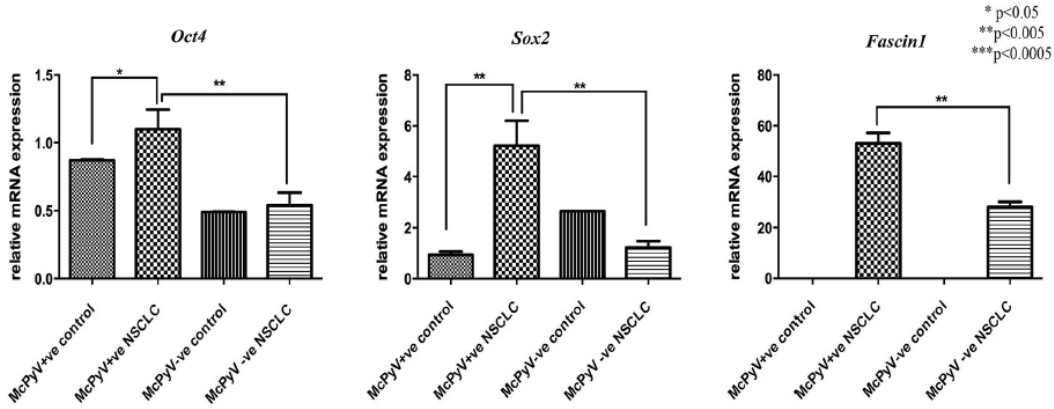


Figure 5: Expression profile of miR-145 target genes *Oct4, Sox2, Fascin1* in lung tissue samples of NSCLC patients (MCPyV+ve N=8, MCPyV-ve N=16) and controls (MCPyV+ve N=5, MCPyV-ve N=5) in relation to the presence or absence of MCPyV. Samples showed normal distribution, One-way Anova and confirmatory student's t test were used for the analysis. * p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005.

prognosis [37]. Moreover, it was also revealed that the repressive effect of miR-145 on tumour metastasis was mediated by inhibiting the epithelial-mesenchymal transdifferentiation (EMT) and metastastic ability, partially by regulating Oct4/Sox2/Fascin1 [37].

Innate anti-virus response

In the present study, miR-21 target genes and associated pathways involved in anti-viral response, type I interferon-inducible genes *Daxx*, *Pkr*, as well as *Hif1a*, were analysed in NSCLC cases. *Daxx* and *Hif1a* expression increased in MCPyV positive NSCLC while it correlated positively with miR-21 expression, suggesting that *Daxx* expression was not directly regulated by miR-21 in MCPyV positive NSCLC. *Pkr* was upregulated in MCPyV positive non-malignant tissues and not in MCPyV positive NSCLC tissues where it negatively correlated with miR-21 expression. Implication of *Daxx* and *Hif1a* in DNA hypermethylation and apoptosis [38] has recently emerged, while *Hif1a* overexpression, as in MCPyV-positive NSCLC samples, has been associated [39] with the formation of cancer-stem-like-like cells undergoing a process of endothelial-mesenchymal transition, both of which are inhibited by miR-21. In the present study, *Daxx* and *Hif1a* expression correlated positively with miR-21 expression in NSCLC, suggesting a miR-21-independent expression in NSCLC. *Pkr*, which negatively correlated with miR-21 overexpression in MCPyV-positive NSCLC specimens, has been suggested to be markedly involved in the development of NSCLC and may serve as a potential prognostic marker for patients with this deadly disease [40]. *Pkr* was upregulated only in non-malignant tissues and not in NSCLC tissues. This may suggest a possible *Pkr* inhibition in tumour cells which would inhibit the arrest in cellular translation processes and subsequently result in both virus and tumour cell resistance to a potent intrinsic cellular defence mechanism.

In conclusion, the present study explored the epigenetic alterations in lung tumor cells caused by the presence of MCPyV DNA in NSCLC patients. The expression profiles of microRNAs and their target genes in this study leads to the hypothesis that the presence of Merkel Cell Polyoma virus may lead to a more aggressive NSCLC as well as poorer outcomes in NSCLC prognosis. As a single miRNA may inhibit up to several hundred mRNAs, aberrant miRNA expression may suppress a multitude of transcripts and profoundly influence cancer-related signalling pathways; thus, these results must be interpreted with caution. Further research, particularly on therapeutic interventions is essential in delineating epigenetic mechanisms implicated in this deadly disease.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The lung tissue patient group comprised of 24 consecutive patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) from the Department of Thoracic Medicine, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece. The patients included in this study were classified according to the criteria of WHO (1997). The tissue control group consisted of 10 samples from macroscopically healthy sites of the lung derived from NSCLC patients included in this cohort and were histologically verified. Demographics and lung carcinoma subtypes of all patients are summarized in Table 1.

Ethics statement

The Ethics Committee of the University Hospital of Heraklion, Crete approved the protocol (Reg. No 140/4-2-2015) and all patients and control subjects provided informed consent in written form.

Biological samples and processing

Twenty-four lung cancer tissue specimens and 10 non-malignant specimens from corresponding patients were obtained from paraffin-embedded blocks from the Laboratory of Pathology, University Hospital of Heraklion, Crete. All the samples were obtained from surgical resections.

MCPyV detection, MicroRNA and mRNA expression

Twenty four paraffin-embedded tissue specimens from NSCLC patients and ten corresponding controls (from macroscopically and histologically verified healthy sites of respective appropriate controls from 5 NSCLC patients positive for MCPyV and from 5 NSCLC patients negative for MCPyV in this cohort) were processed using RecoverAll™ Total nucleic acid isolation from Ambion, for the isolation of total RNA as recommended by the manufacturer. RNA concentration and purity were evaluated by a spectrophotometer (Nanodrop).

The presence of MCPyV DNA was tested using Real-Time quantitative PCR protocols, using the MCV138 set of primers, which targets the Large T antigen (LTA) region, as previously described [8]. The integrity and quality of the extracted DNA were confirmed after the successful amplification of the *beta2-microglobulin* gene in all samples.

Particular care was taken and all manipulations were performed inside a PCR-hood to avoid potential contamination. Each PCR reaction contained two negative controls. DNA from a Merkel cell carcinoma patient served as the positive control. All Real-Time PCR reactions were carried out in an Mx3000P Real Time PCR system while additionally, PCR end-products were analyzed on a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and the bands were visualized under a UV transilluminator (260 nm). These viral PCR products were then subjected to direct sequencing analysis to verify the specific amplification of the MCPyV LTA region.

For the analysis of microRNA expression levels, 10ng total RNA were used in reverse transcriptase and Real-Time qPCR reactions using the TaqMan™ microRNA assays (Life Technologies) and 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Reverse transcription was performed at 16°C for 15 min, 42°C for 30 min, 85°C for 5 min and 2fold diluted cDNA samples were analysed by Real-Time PCR (95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec, 60°C for 1 min). Probe and primer sequences are summarized in Table 5. miR-191 was used as endogenous control for the normalization of microRNA expression levels in all samples, due to its high stability and consistency, as previously described [14, 41].

For gene expression analyses, 500ng of total RNA were first treated with DNAfree (Ambion) in order to remove genomic DNA contamination, followed by 1st strand cDNA synthesis using Maxima RT ™ (Fermentas)

Table 5: Primer sequences used for quantitative Real-Time RT-PCR

Gene	Primer pair sequence (5'-3')	Annealing temperature
GAPDH	FOR: AGCCACATCGCTCAGACAC REV : GCCCAATACGACCAAATCC	54 °C
Braf	FOR: AGAAAGCACTGATGATGAGAGG REV: GGAAATATCAGTGTCCCAACCA	58 °C
Bcl-2	FOR: GAAACCCCTAGTGCCATCAA REV: GGGACGTCAGGTCACTGAAT	55 °C
p53	FOR: GTGAGCGCTTCGAGATGTTC REV: ATGGCGGGAGGTAGACTGAC	60 °C
Akt-1	FOR: GCAGCACGTGTACGAGAAGA REV: GGTGTCAGTCTCCGACGTG	54 °C
Akt-2	FOR: CTCACACAGTCACCGAGAGC REV: TGGGTCTGGAAGGCATACTT	56 °C
Bax	FOR: TTCTGACGGCAACTTCAACTG REV: TTGGTGCACAGGGCCTGTAATC	61 °C
Daxx	FOR: CATGCGAGGTTCTGAGAATTG REV:GAGGAAGTGGTGGGGATTTC	54 °C
Pten	FOR:CGGCAGCATCAAATGTTTCAG REV:CGGCAGCATCAAATGTTTCAG	55 °C

Table 5: Primer sequences used for quantitative Real-Time RT-PCR		
Gene	**Primer pair sequence (5'-3')**	**Annealing temperature**
Pkr	FOR: CCATGGGGAATTACATAGGC REV: CTTTCTGTCCCATTTTGCATT	52 °C
Hif1a	FOR: CTTGCATGGCTCTCAGATTCAC REV: AGAGGACAAGCAGATTCAAGGTG	60 °C
Timp3	FOR: GGCGGCAGCAGCGGCAATGAC REV: TACCAGCTTCTTCCCCACCACCTT	60 °C
Grb2	FOR: CCATCGCCAAATATGACTTCAAA REV: CTTCGTTCAAAACCTTGAGGATGT	62 °C
Alk7	FOR: ATGACCCGGGCGCTCTGCTCA REV: ATACTGTCAGCATCGCAGCTA	58 °C
Mmp9	FOR: ACTTTGACAGCGACAAGAGGTG REV: CCGGCACTGAGGAATGATCTAA	64 °C
Oct4	FOR: AGGGAAGGAGATTATGGAGGAGG REV: AGCTTTGGGCTCTGGAAGGC	60 °C
Sox2	FOR: AGGATAAGTACACGCTGCCC REV: TAACTGTCCATGCGCTGGTT	57 °C
Fascin1	FOR: CGCTCCAGCTATGACGTCTTCC REV: CAGGAGAACCTGCCTTTGATGTT	60 °C
microRNA	**microRNA Assay ID**	
Has-miR--191	002299	60 °C
Has-miR--21	000397	60 °C
Has-miR--145	000467	60 °C
Has-miR--146a	000468	60 °C
Has-miR--155	002623	60 °C
hsa-miR--302c-3p	000533	60 °C
Has-miR--367	000555	60 °C
Has-miR--376c	002122	60 °C

and Real-Time qPCR analysis using Maxima SYBR-Green qPCRmix (Fermentas) on a Mx3005P qPCR system (Agilent Technologies). RT reaction was performed at 25°C for 10 min, 50°C for 20 min, 65°C for 10 min and 85°C for 5 min. 6fold diluted cDNA samples were analysed by Real-Time PCR (95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec, primer pair specific annealing temperature (Table 5)°C for 30sec, 72°C for 30sec, followed by 72°C for 10min). Transcript levels of validated miR-21 target genes (*Pten, Bcl-2, Daxx*, *Pkr*, *Timp3*, validated miR-376c target genes (*Grb2*, *Alk7*, *Mmp9*) and validated miR-145 target genes (*Oct4*, *Sox2*, *Fascin1*) obtained from TarBase.v7 were evaluated. We also evaluated the following genes associated with target genes and apoptotic pathways of miR-21 *p53* [42], *Braf* [43], *Akt-1, Akt-2* [44], *BaxX* [45], *Hif1a* [46]. *GAPDH* levels were used as endogenous control for the normalization of mRNA expression levels in all samples. Primers sequences and annealing temperatures are shown in Table 5.

Statistical analysis

The Kolmogorov-SmiRnov test was used to determine whether the expression data obtained followed a normal distribution pattern. The mRNA expression of all the genes was compared between the groups of normal and pathological samples, as well as between groups with different histological features, using parametric procedures (Student's t-test and One way Anova), as all sample groups followed Gaussian (normal) distribution. Linear regression between microRNAs and their target genes were analysed with the Linear (Pearson) correlation test. Probability values (P-values) <0.05 were considered statistically significant. Statistical

calculations were performed using SPSS 11.5 software (SPSS, Chicago, IL, USA).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly funded by the European Commission FP7 program "Translational Potential" (TransPOT; EC contract number 285948) and the Special Account for Research, University of Crete (KA 2852). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Jemal A, Siegel R, Xu J and Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin. 2010; 60:277-300.
2. Forde PM, Brahmer JR and Kelly RJ. New strategies in lung cancer: epigenetic therapy for non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2014; 20:2244-2248.
3. Yang IV and Schwartz DA. Epigenetic control of gene expression in the lung. Am J Respir Crit Care Med. 2011; 183:1295-1301.
4. Joshi P, Middleton J, Jeon YJ and Garofalo M. MicroRNAs in lung cancer. World J Methodol. 2014; 4:59-72.
5. Momi N, Kaur S, Rachagani S, Ganti AK and Batra SK. Smoking and microRNA dysregulation: a cancerous combination. Trends Mol Med. 2014; 20:36-47.
6. Wang H, Wu S, Zhao L, Zhao J, Liu J and Wang Z. Clinical use of microRNAs as potential non-invasive biomarkers for detecting non-small cell lung cancer: a meta-analysis. Respirology. 2015; 20:56-65.
7. Moens U, Rasheed K, Abdulsalam I and Sveinbjornsson B. The role of Merkel cell polyomavirus and other human polyomaviruses in emerging hallmarks of cancer. Viruses. 2015; 7:1871-1901.
8. Lasithiotaki I, Antoniou KM, Derdas SP, Sarchianaki E, Symvoulakis EK, Psaraki A, Spandidos DA, Stathopoulos EN, Siafakas NM and Sourvinos G. The presence of Merkel cell polyomavirus is associated with deregulated expression of BRAF and Bcl-2 genes in non-small cell lung cancer. Int J Cancer. 2013; 133:604-611.
9. Joh J, Jenson AB, Moore GD, Rezazedeh A, Slone SP, Ghim SJ and Kloecker GH. Human papillomavirus (HPV) and Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in non small cell lung cancer. Exp Mol Pathol. 2010; 89:222-226.
10. Hashida Y, Imajoh M, Nemoto Y, Kamioka M, Taniguchi A, Taguchi T, Kume M, Orihashi K and Daibata M. Detection of Merkel cell polyomavirus with a tumour-specific signature in non-small cell lung cancer. Br J Cancer. 2013; 108:629-637.
11. Guo YE and Steitz JA. Virus meets host microRNA: the destroyer, the booster, the hijacker. Mol Cell Biol. 2014; 34:3780-3787.
12. Xie H, Lee L, Caramuta S, Hoog A, Browaldh N, Bjornhagen V, Larsson C and Lui WO. MicroRNA expression patterns related to merkel cell polyomavirus infection in human merkel cell carcinoma. J Invest Dermatol. 2014; 134:507-517.
13. Kaid C, Silva PB, Cortez BA, Rodini CO, Semedo-Kuriki P and Okamoto OK. miR-367 promotes proliferation and stem-like traits in medulloblastoma cells. Cancer Sci. 2015; 106:1188-1195.
14. Guo YH, Zhang C, Shi J, Xu MH, Liu F, Yuan HH, Wang JY, Jiang B and Gao FH. Abnormal activation of the EGFR signaling pathway mediates the downregulation of miR145 through the ERK1/2 in non-small cell lung cancer. Oncol Rep. 2014; 31:1940-1946.
15. Campayo M, Navarro A, Vinolas N, Diaz T, Tejero R, Gimferrer JM, Molins L, Cabanas ML, Ramirez J, Monzo M and Marrades R. Low miR-145 and high miR-367 are associated with unfavourable prognosis in resected nonsmall cell lung cancer. Eur Respir J. 2013; 41:1172-1178.
16. Hou ZH, Han QJ, Zhang C, Tian ZG and Zhang J. miR146a impairs the IFN-induced anti-HBV immune response by downregulating STAT1 in hepatocytes. Liver Int. 2014; 34:58-68.
17. Wang RJ, Zheng YH, Wang P and Zhang JZ. Serum miR-125a-5p, miR-145 and miR-146a as diagnostic biomarkers in non-small cell lung cancer. Int J Clin Exp Pathol. 2015; 8:765-771.
18. Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J and Bonmassar E. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. Biochim Biophys Acta. 2009; 1792:497-505.
19. Wang F, Zhou J, Zhang Y, Wang Y, Cheng L, Bai Y and Ma H. The Value of MicroRNA-155 as a Prognostic Factor for Survival in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. PLoS One. 2015; 10:e0136889.
20. Jiang W, Tian Y, Jiang S, Liu S, Zhao X and Tian D. MicroRNA-376c suppresses non-small-cell lung cancer cell growth and invasion by targeting LRH-1-mediated Wnt signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2016; 473:980-986.
21. Borgdorff V, Lleonart ME, Bishop CL, Fessart D, Bergin AH, Overhoff MG and Beach DH. Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21(Waf1/Cip1). Oncogene. 2010; 29:2262-2271.
22. Ma XL, Liu L, Liu XX, Li Y, Deng L, Xiao ZL, Liu YT, Shi HS and Wei YQ. Prognostic role of microRNA-21 in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. Asian Pac J Cancer Prev. 2012; 13:2329-2334.
23. Yang M, Shen H, Qiu C, Ni Y, Wang L, Dong W, Liao Y and Du J. High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence and unfavourable survival in non-small cell lung cancer. Eur J Cancer. 2013; 49:604-615.

24. Ma Y, Xia H, Liu Y and Li M. Silencing miR-21 sensitizes non-small cell lung cancer A549 cells to ionizing radiation through inhibition of PI3K/Akt. Biomed Res Int. 2014; 2014:617868.
25. Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011; 144:646-674.
26. Shen H, Zhu F, Liu J, Xu T, Pei D, Wang R, Qian Y, Li Q, Wang L, Shi Z, Zheng J, Chen Q, Jiang B and Shu Y. Alteration in Mir-21/PTEN expression modulates gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. PLoS One. 2014; 9:e103305.
27. Brambilla E, Negoescu A, Gazzeri S, Lantuejoul S, Moro D, Brambilla C and Coll JL. Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. Am J Pathol. 1996; 149:1941-1952.
28. Borchert S, Czech-Sioli M, Neumann F, Schmidt C, Wimmer P, Dobner T, Grundhoff A and Fischer N. High-affinity Rb binding, p53 inhibition, subcellular localization, and transformation by wild-type or tumor-derived shortened Merkel cell polyomavirus large T antigens. J Virol. 2014; 88:3144-3160.
29. Ma X, Choudhury SN, Hua X, Dai Z and Li Y. Interaction of the oncogenic miR-21 microRNA and the p53 tumor suppressor pathway. Carcinogenesis. 2013; 34:1216-1223.
30. Wu DW, Tsai LH, Chen PM, Lee MC, Wang L, Chen CY, Cheng YW and Lee H. Loss of TIMP-3 promotes tumor invasion via elevated IL-6 production and predicts poor survival and relapse in HPV-infected non-small cell lung cancer. Am J Pathol. 2012; 181:1796-1806.
31. Ye G, Fu G, Cui S, Zhao S, Bernaudo S, Bai Y, Ding Y, Zhang Y, Yang BB and Peng C. MicroRNA 376c enhances ovarian cancer cell survival by targeting activin receptor-like kinase 7: implications for chemoresistance. J Cell Sci. 2011; 124:359-368.
32. El-Badrawy MK, Yousef AM, Shaalan D and Elsamanoudy AZ. Matrix metalloproteinase-9 expression in lung cancer patients and its relation to serum mmp-9 activity, pathologic type, and prognosis. J Bronchology Interv Pulmonol. 2014; 21:327-334.
33. Li J, Wang H, Ke H and Ni S. MiR-129 regulates MMP9 to control metastasis of non-small cell lung cancer. Tumour Biol. 2015; 36:5785-5790.
34. Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D and Schlessinger J. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. Cell. 1992; 70:431-442.
35. Li J, Bennett K, Stukalov A, Fang B, Zhang G, Yoshida T, Okamoto I, Kim JY, Song L, Bai Y, Qian X, Rawal B, Schell M, Grebien F, Winter G, Rix U, et al. Perturbation of the mutated EGFR interactome identifies vulnerabilities and resistance mechanisms. Mol Syst Biol. 2013; 9:705.
36. Sachdeva M, Zhu S, Wu F, Wu H, Walia V, Kumar S, Elble R, Watabe K and Mo YY. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106:3207-3212.
37. Chiou GY, Cherng JY, Hsu HS, Wang ML, Tsai CM, Lu KH, Chien Y, Hung SC, Chen YW, Wong CI, Tseng LM, Huang PI, Yu CC, Hsu WH and Chiou SH. Cationic polyurethanes-short branch PEI-mediated delivery of Mir145 inhibited epithelial-mesenchymal transdifferentiation and cancer stem-like properties and in lung adenocarcinoma. J Control Release. 2012; 159:240-250.
38. Hervouet E, Cheray M, Vallette FM and Cartron PF. DNA methylation and apoptosis resistance in cancer cells. Cells. 2013; 2:545-573.
39. Vosa U, Vooder T, Kolde R, Vilo J, Metspalu A and Annilo T. Meta-analysis of microRNA expression in lung cancer. Int J Cancer. 2013; 132:2884-2893.
40. Guo C, Shao R, Correa AM, Behrens C, Johnson FM, Raso MG, Prudkin L, Solis LM, Nunez MI, Fang B, Roth JA, Wistuba, II, Swisher SG, Lin T and Pataer A. Prognostic significance of combinations of RNA-dependent protein kinase and EphA2 biomarkers for NSCLC. J Thorac Oncol. 2013; 8:301-308.
41. Andres C, Belloni B, Puchta U, Sander CA and Flaig MJ. Prevalence of MCPyV in Merkel cell carcinoma and non-MCC tumors. J Cutan Pathol. 2010; 37:28-34.
42. Peltier HJ and Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. RNA. 2008; 14:844-852.
43. Yan B, Li H, Yang X, Shao J, Jang M, Guan D, Zou S, Van Waes C, Chen Z and Zhan M. Unraveling regulatory programs for NF-kappaB, p53 and microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma. PLoS One. 2013; 8:e73656.
44. Mima K, Nishihara R, Nowak JA, Kim SA, Song M, Inamura K, Sukawa Y, Masuda A, Yang J, Dou R, Nosho K, Baba H, Giovannucci EL, Bowden M, Loda M, Giannakis M, et al. MicroRNA MIR21 and T Cells in Colorectal Cancer. Cancer Immunol Res. 2015.
45. Liu LZ, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, Kung HF, Lai L and Jiang BH. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1alpha expression. PLoS One. 2011; 6:e19139.
46. Ruan Q, Wang T, Kameswaran V, Wei Q, Johnson DS, Matschinsky F, Shi W and Chen YH. The microRNA-21-PDCD4 axis prevents type 1 diabetes by blocking pancreatic beta cell death. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108:12030-12035.