

Μονάδα Ανοσολογίας Καρκίνου
Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας
Πνευμονολογική Κλινική, Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Θωρακοχειρουργική Κλινική,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΚΦΡΑΣΗ ΕΥΡΕΩΣ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ (ΤΑΑ) ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Στέφανος Τσόχας BSc, MSc

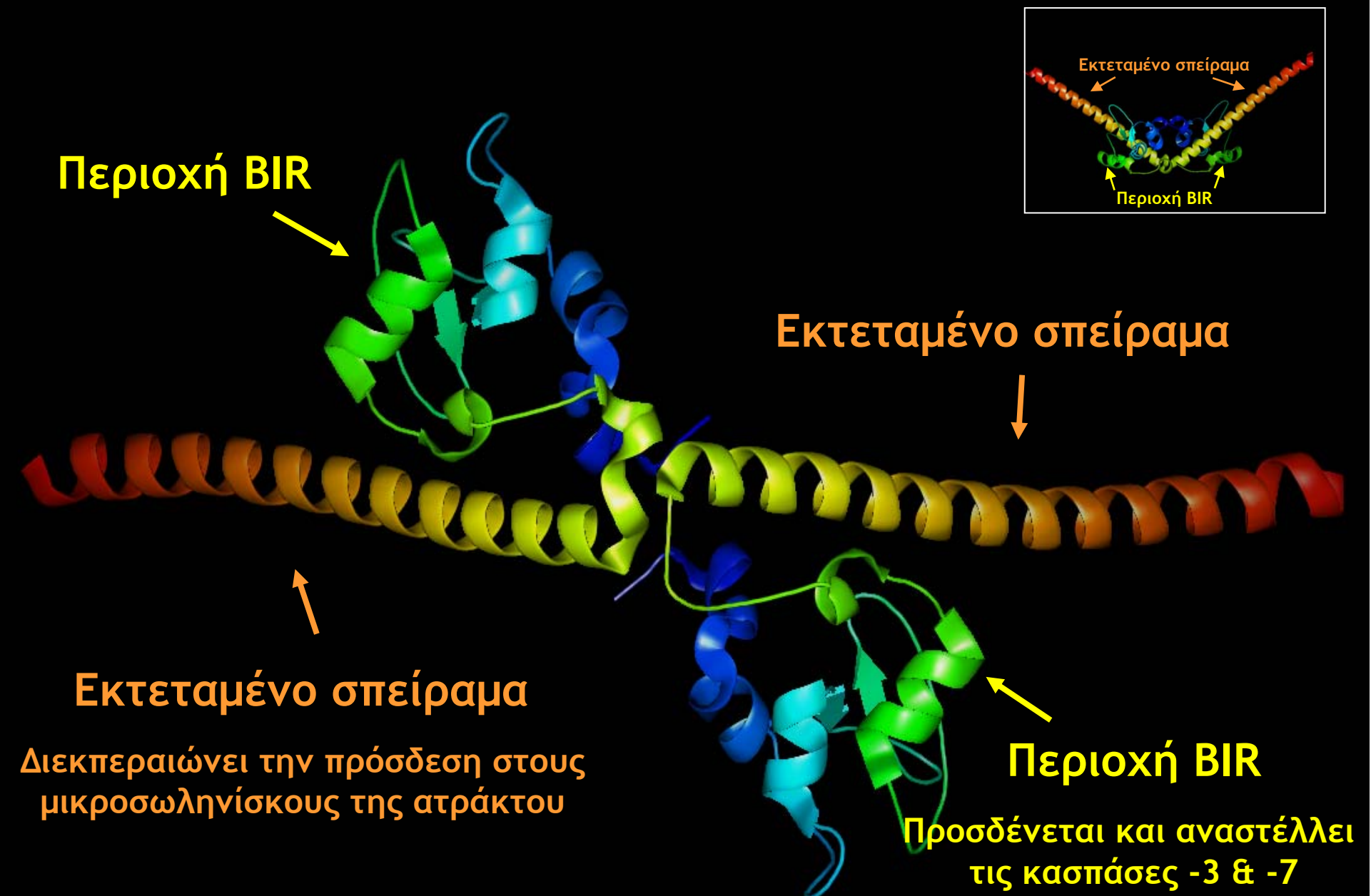
Κερενίδη Θ, Νάκου Μ, Χέβας Α, Δαλαβέρης Ε, Κουκούλης Γ, Γουργουλιάνης Κ,
Γερμενής ΑΕ, Καρανίκας Β

Η πρωτεΐνη Survivin



- Ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*)
- Δομικά χαρακτηριστικά:
 - i. Η περιοχή BIR (N-τελικό)
 - ii. Το εκτεταμένο σπείραμα (C-terminal)
- Εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε εμβρυικούς και βρεφικούς ιστούς, αλλά ΟΧΙ σε διαφοροποιημένους υγιείς ιστούς (με εξαίρεση ιστούς με έντονο κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως θύμος, εντερικό επιθήλιο κτλ.)
- Στον πυρήνα:
 - Προστασία του μιτωτικού μηχανισμού
 - Αποφυγή σημείων ελέγχου της κυτταρικής ανάπτυξης
 - Αντίσταση κατά φαρμάκων που στοχεύουν στη μιτωτική άτρακτο
- Στο κυτταρόπλασμα:
 - Εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια
 - Απελευθερώνεται ως απόκριση σε μηνύματα κυτταρικής απόπτωσης
 - Προκαλεί αναστολή απόπτωσης

Δομή του διμερούς συμπλόκου της Survivin



Ισομορφές της Survivin

➤ Survivin-2B:



- Προάγει την *απόπτωση*
- Υπερέκφρασή της έχει συσχετισθεί με γενικά *καλύτερη πρόγνωση*
- Αυξάνεται η έκφρασή της μέσω της p53 → ΑΠΟΠΤΩΣΗ

➤ Survivin-ΔEx3:



- Διατηρεί τον *αντι-αποπτωτικό* χαρακτήρα
- Υπερέκφρασή της σχετίζεται με *κακοήθεις νεοπλασίες*

➤ Survivin-3B:



- Πιθανή *αντι-αποπτωτική* δράση
- Απώλεια δυνατότητας πρόσδεσης με τους μικροσωληνίσκους

➤ Survivin-2α:



- Συνεντοπίζεται με την τυπική ισομορφή και προκαλεί *εξασθένιση* της αντι-αποπτωτικής δράσης της

Η οικογένεια πρωτεϊνών MAGE

(Melanoma associated antigens)

- Ειδική των όγκων οικογένεια γονιδίων
- Πολλές υπο-ομάδες (MAGE-A, -B, ..., -L) με έως και 17 μέλη
- Ελάχιστα γνωρίζουμε για τη λειτουργία τους
- Η MAGE-A1 ανιχνεύθηκε στα σπερματογόνια & τα πρώιμα σπερματοκύτταρα
- Η MAGE-A σε φυσιολογικούς ιστούς είναι μη ανιχνεύσιμη (με την εξαίρεση των όρχεων και των ωοθηκών)
- Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί τον κύριο μηχανισμό ρύθμισης έκφρασής τους

Η οικογένεια πρωτεϊνών MAGE

MAGE-A1:

- Η καλύτερα μελετημένη πρωτεΐνη MAGE
- Υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους νεοπλασίας

MAGE-A2:

- Ελάχιστα είναι γνωστά για αυτό το μέλος
- Έχει ανιχνευθεί σε ορισμένες νεοπλασίες

MAGE-A3:

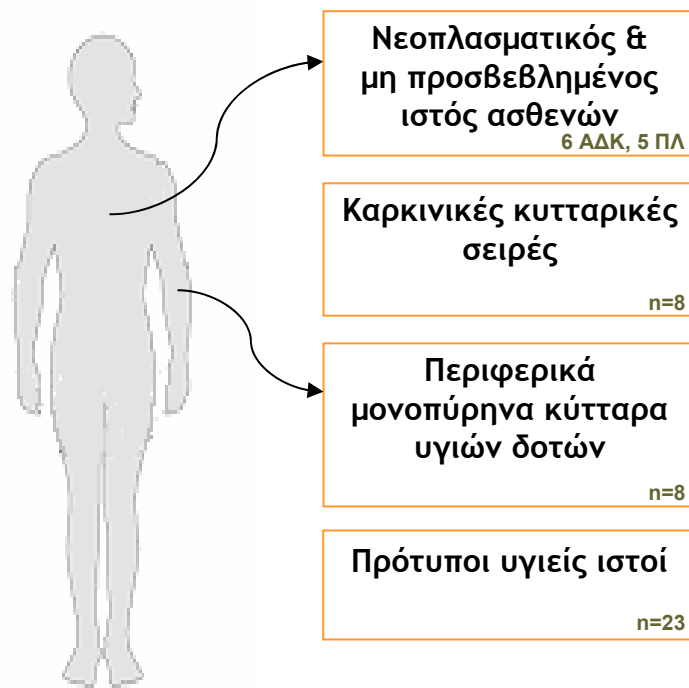
- Καλά μελετημένη
- Σχετίζεται με περιπτώσεις μεταστάσεων

Σκοπός της εργασίας

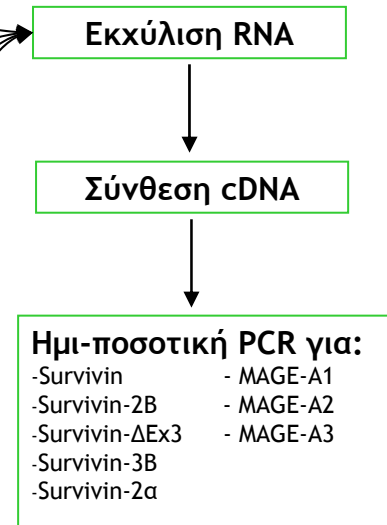
- ✓ Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των αντιγόνων *Survivin-STD*, *-2B*, *-ΔEx3*, *-3B*, *-2a* & *MAGE-A1*, *-A2*, *-A3* σε δείγματα νεοπλασματικού και αυτόλογου μη προσβεβλημένου ιστού ασθενών, καθώς και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και πρότυπα δείγματα υγιών ιστών
- ✓ Μελέτη των επιπέδων έκφρασης κάθε αντιγόνου στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου του πνεύμονα (αδενοκαρκίνωμα, πλακώδες καρκίνωμα)
- ✓ Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης με κλινικές παραμέτρους

Πειραματικός Σχεδιασμός

Δείγματα



Μέθοδοι



Εργαστηριακές Μέθοδοι

DNA $\xrightarrow{\text{ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ}}$ RNA $\xrightarrow{\text{ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ}}$ Πρωτεΐνες

Εκχύλιση RNA



Σύνθεση cDNA



Αντίδραση PCR



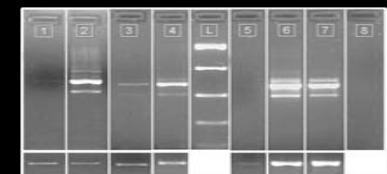
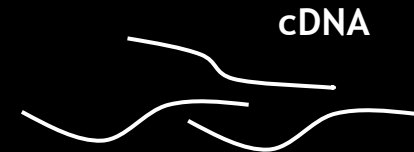
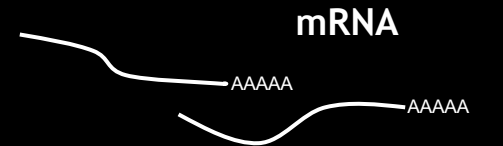
Υπολογισμός έκφρασης

- Λύση & ομογενοποίηση των κυττάρων
- Αφαίρεση πρωτεϊνών & DNA
- Απομόνωση ώριμων μορίων mRNA

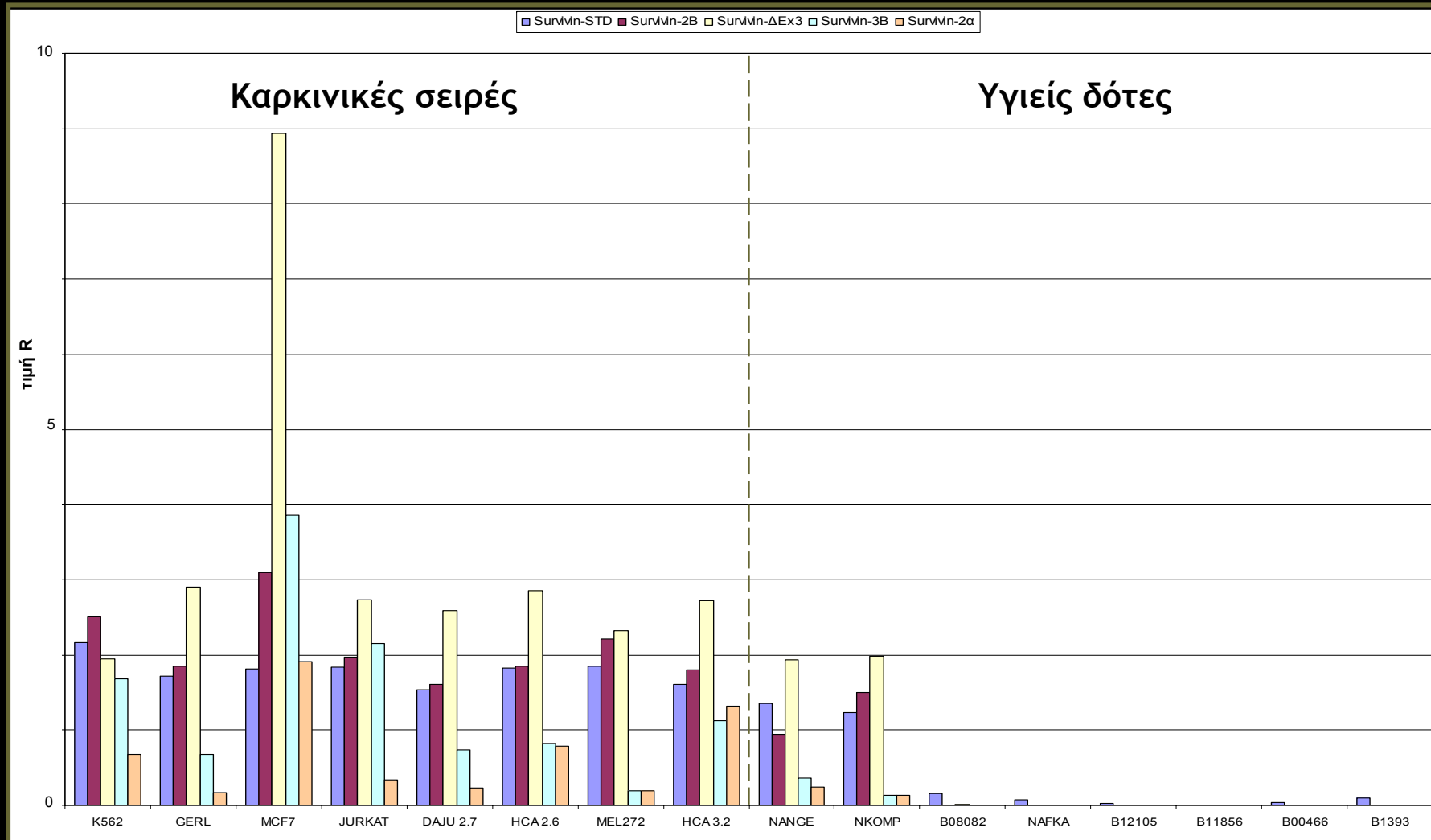
- Ανάστροφη μεταγραφάση (*reverse transcriptase*)
- Σύνθεση DNA συμπληρωματικών προς τα mRNA

- Για το γονίδιο αναφοράς (*b-actin*)
- Για κάθε καρκινικό αντιγόνο
- Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

- Μέτρηση φωτεινότητας των δεσμών στην πηκτή
- Σύγκριση της έκφρασης του κάθε αντιγόνου σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς



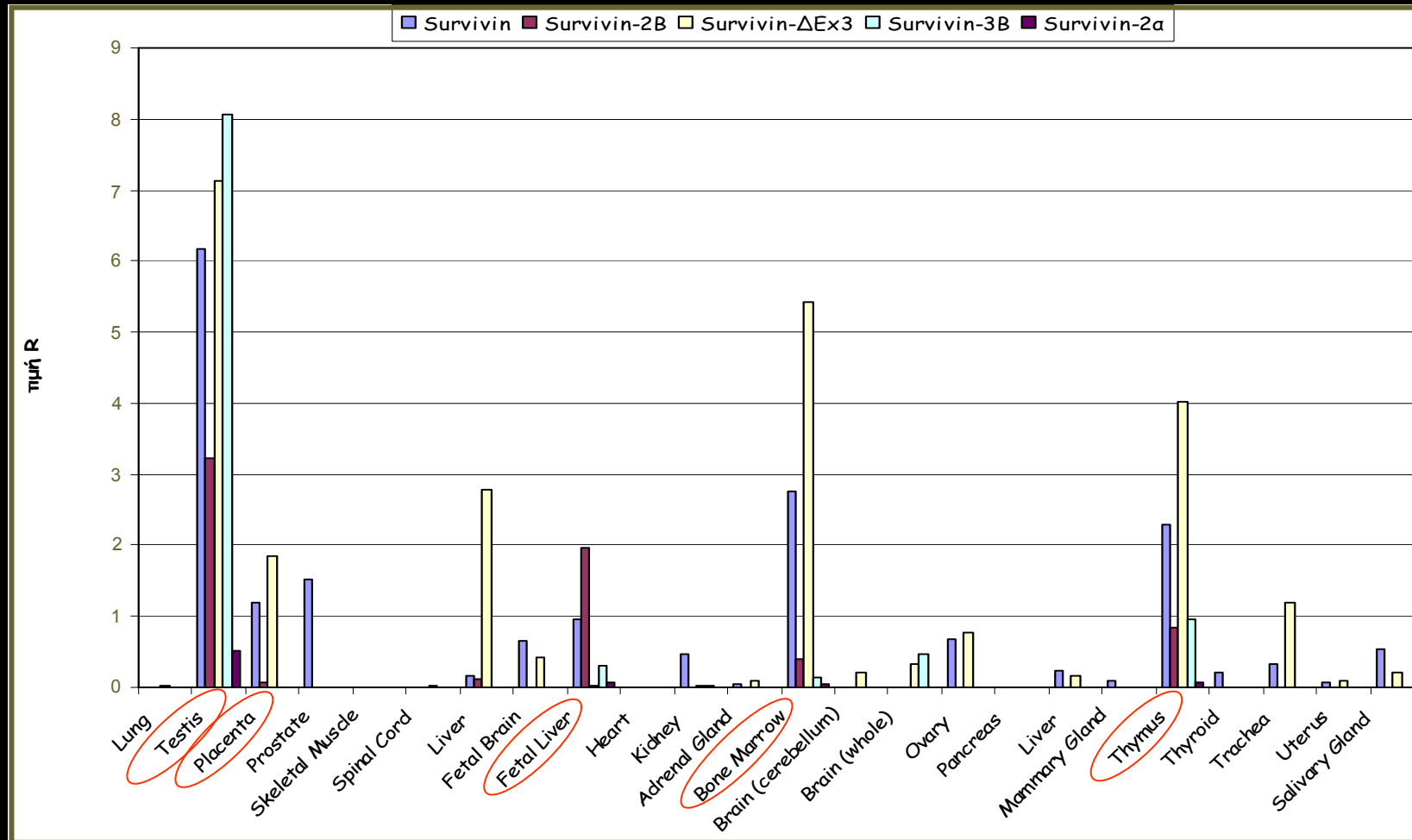
Αποτελέσματα - Καρκινικές κυτταρικές σειρές & υγιείς δότες



✓ Αρκετά υψηλή έκφραση όλων των ισομορφών

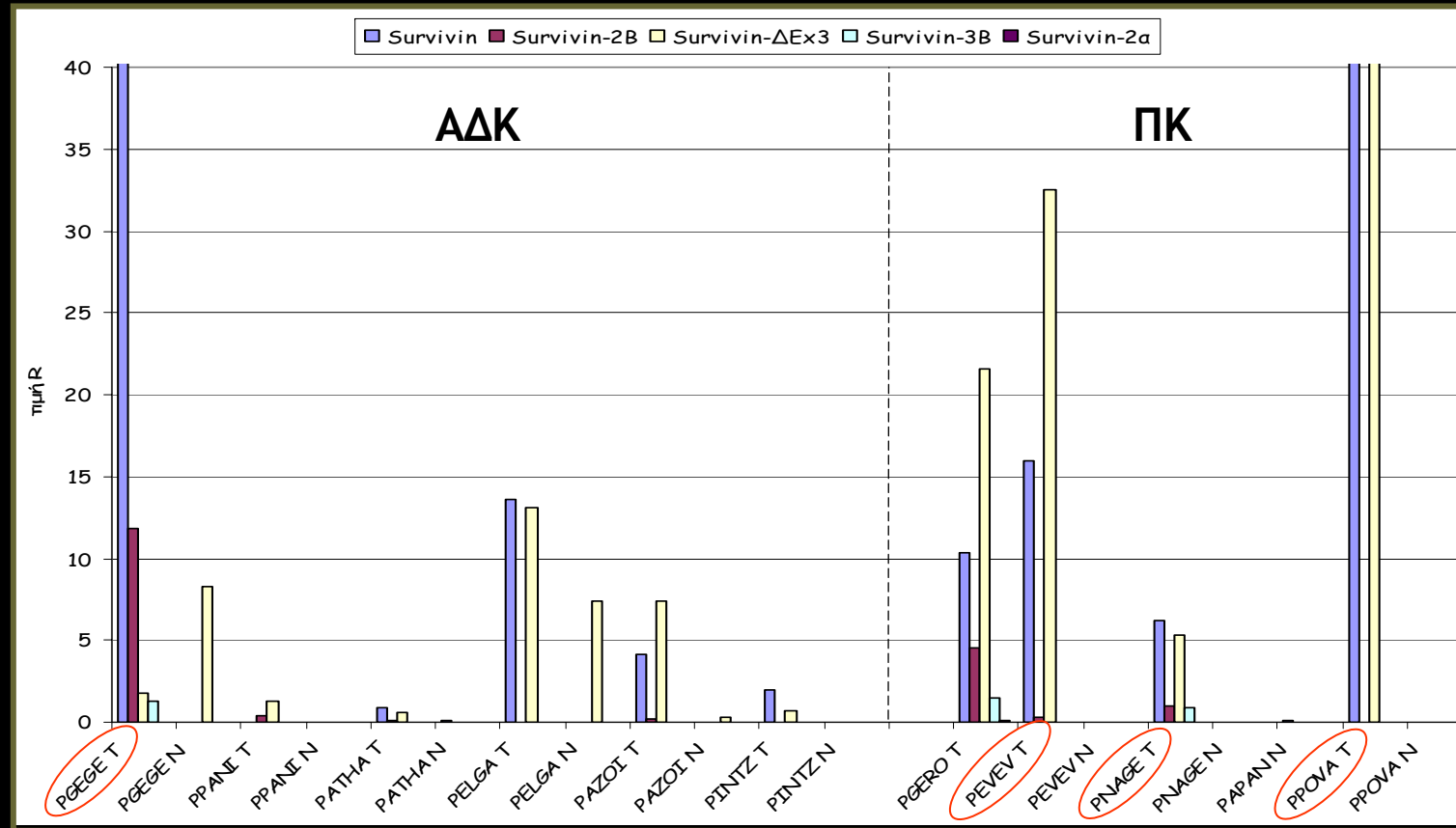
✓ Σημαντική διαφορά έκφρασης μεταξύ υγιών κυττάρων που έχουν διεγερθεί (NANGE, NKOMP) και αυτών χωρίς διέγερση

Αποτελέσματα - Υγιείς ιστοί



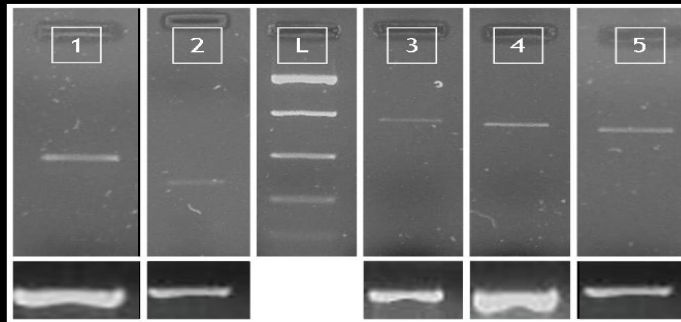
✓ Υψηλά επίπεδα έκφρασης σε συγκεκριμένους ιστούς (όρχεις, θύμος, εμβρυικοί ιστοί, μυελός των οστών κτλ.)

Αποτελέσματα - Ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα



✓ Σημαντική διαφορά επιπέδων έκφρασης μεταξύ καρκινικών και αυτόλογων φυσιολογικών δειγμάτων (PGEGE, PEVEV, PNAE, PPOVA)

Αποτελέσματα των αντιγόνων MAGE



1: PNAGE T (*MAGE-A1*, 421bp)
2: PPOVA T (*MAGE-A2*, 230bp)
3: PEVEV T (*MAGE-A3*, 725bp)
4: PGEGE T (*MAGE-A3*, 725bp)
5: PPOVA T (*MAGE-A3*, 725bp)
L: μάρτυρας

Ποσοστό δειγμάτων θετικά σε:

MAGE-A1 10% (1/10)

MAGE-A2 10% (1/10)

MAGE-A3 30% (3/10)

Συμπεράσματα

- ✓ Δημιουργία προτύπου έκφρασης αντιγόνων *Survivin-STD*, *-2B*, *-ΔEx3*, *-3B*, *-2a* και *MAGE-A1*, *-A2*, *-A3* σε 23 δείγματα πρότυπων μη προσβεβλημένων ιστών
- ✓ Διαφορά επιπέδων έκφρασης μεταξύ καρκινικού και αυτόλογου μη προσβεβλημένου πνευμονικού ιστού, αλλά και μεταξύ διαφορετικών ασθενών
- ✓ Δεν υπήρξε συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης με κλινικές παραμέτρους

Προοπτικές

- ✓ Επέκταση της μελέτης όλων των δειγμάτων για περισσότερα αντιγόνα (*p53*, *hTERT*, *MAGE-A4*, *-A6* και *-A12*)
 - ✓ Ανάλυση έκφρασης με *Real-Time PCR*

Department of Immunology and Histocompatibility

Prof Anastasios Germanis

Cancer Immunology Unit

Dr Vaios Karanikas

Kalala F

Tsohas S

Loules G

Argentou N

Vardakastani N

Gramoustianou E

Zamanakou M

Khalil S

Siska E

Soukou F

Boukas K

Collaborators

- **Respiratory Medicine Department, UTH:** Prof Gourgoulidis K, Kerenidi N
- **Thoracic Surgery Department, UTH:** Dr Hevas A
- **Department of Pathology, UTH:** Prof Koukoulis G, Nakou M
- **Genetic and Cellular Unit, Ludwig Institute for Cancer Research, Belgium:** Prof Coulie
- **Cancer Trials Laboratory, Austin Research Institute, Melbourne, Australia:** Prof. Loveland
- **2nd Department of Surgery, University of Kitakyushu, Japan:** M. Takenoyama

Funding

EU, GSRT, GSK, Pfizer