

Μονάδα Ανοσολογίας Καρκίνου
Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας
Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Μελέτη έκφρασης των αντιγόνων των οικογενειών
Survivin και MAGE-A στον καρκίνο του πνεύμονα
(*IRTALUNG*)**

Στέφανος Τσόχας

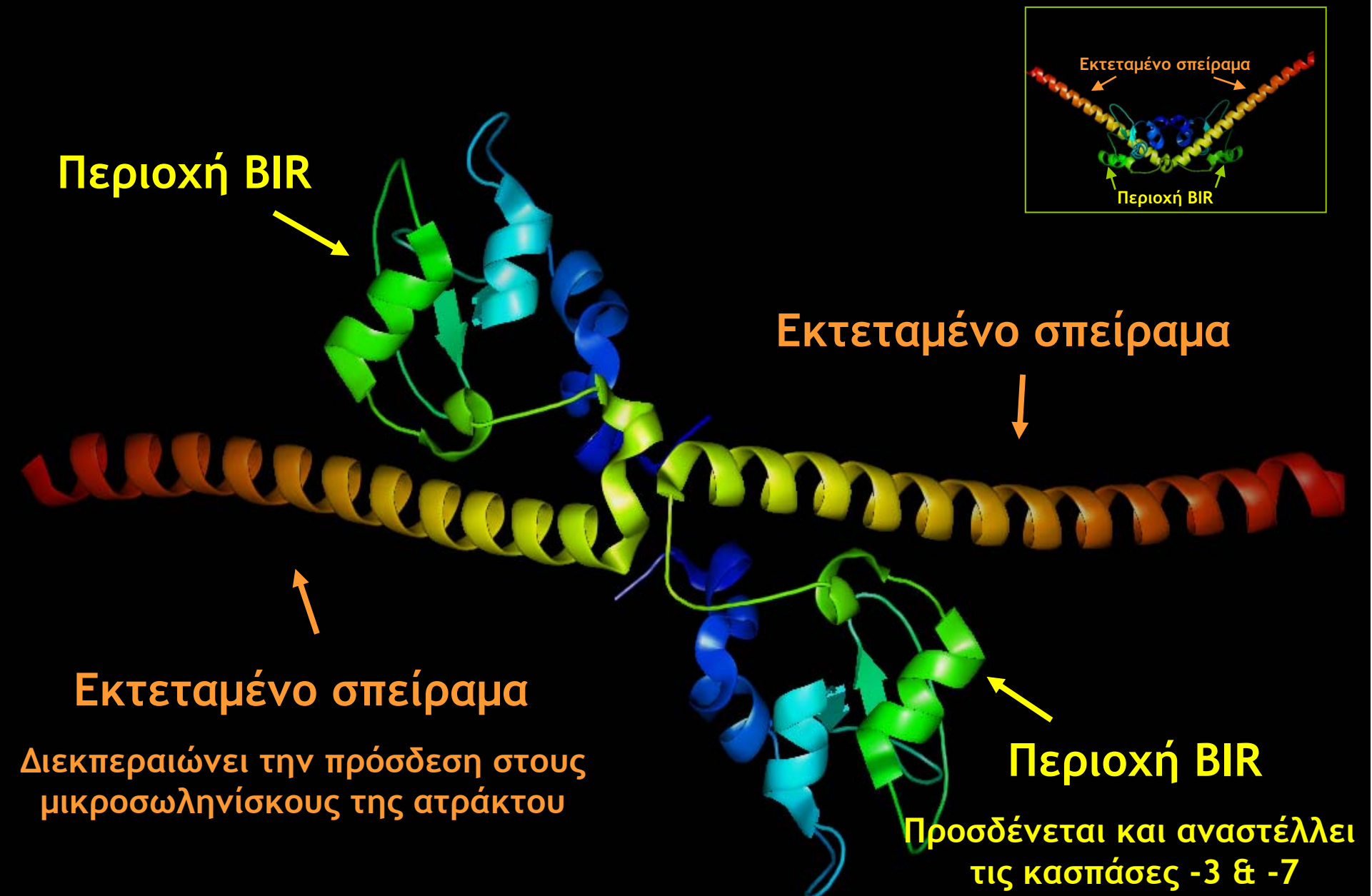
Διπλωματική εργασία στα πλαίσια του Π.Μ.Σ.
«Κλινικές εφαρμογές της Μοριακής Ιατρικής»
Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Η πρωτεΐνη Survivin

Exon 1 Exon 2 Exon 3 Exon 4

- 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:



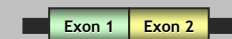
- Διατηρεί τον *αντι-αποπτωτικό* χαρακτήρα
- Υπερέκφρασή της σχετίζεται με *κακοήθεις νεοπλασίες*

➤ 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

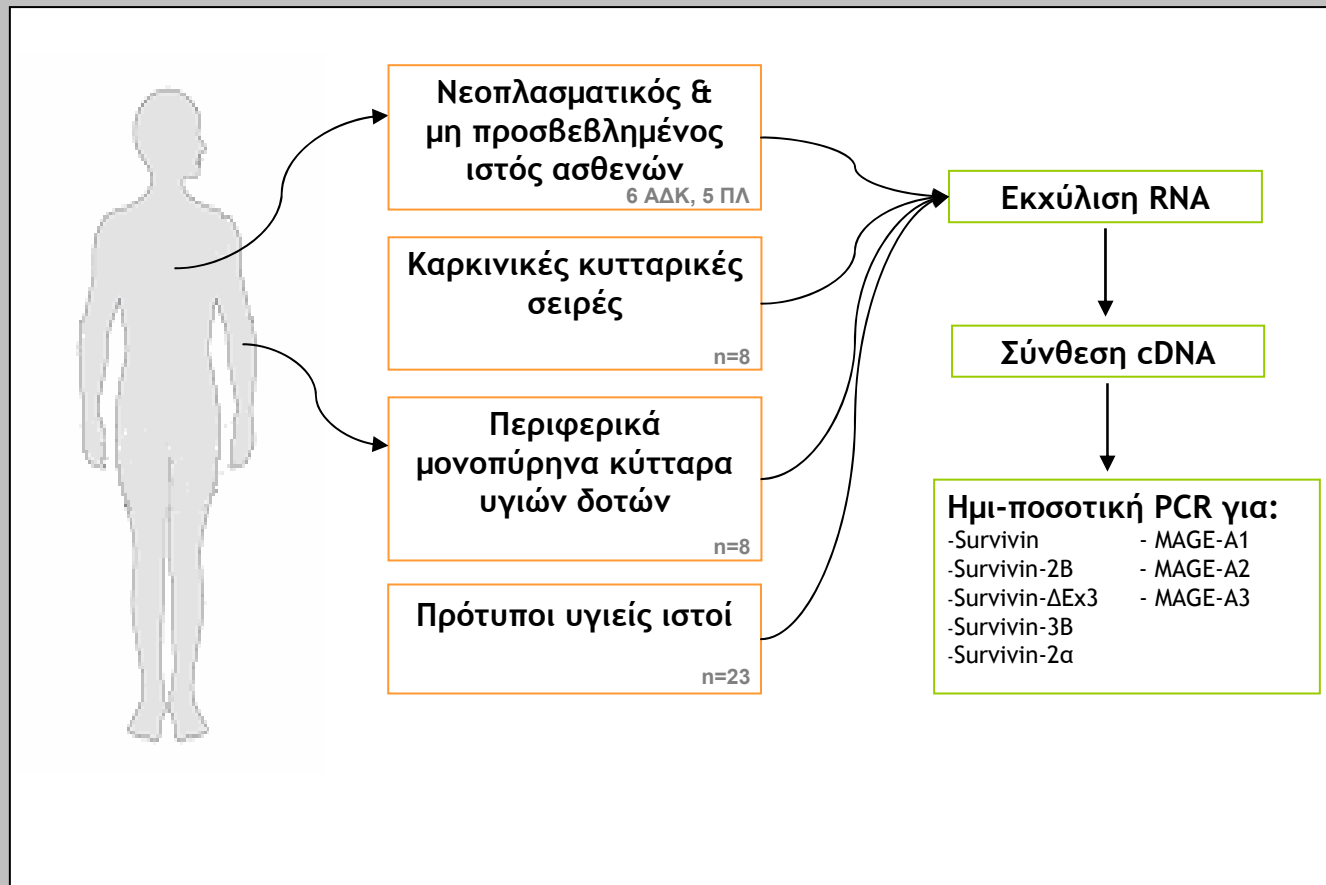
Σκοπός της εργασίας

- ✓ 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



Εκχύλιση RNA



Σύνθεση cDNA



Αντίδραση PCR



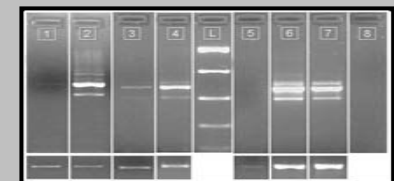
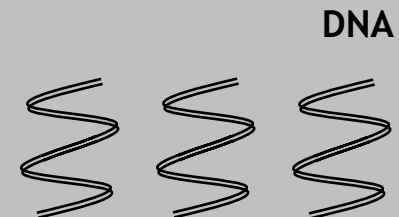
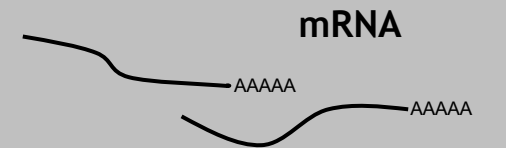
Υπολογισμός έκφρασης

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

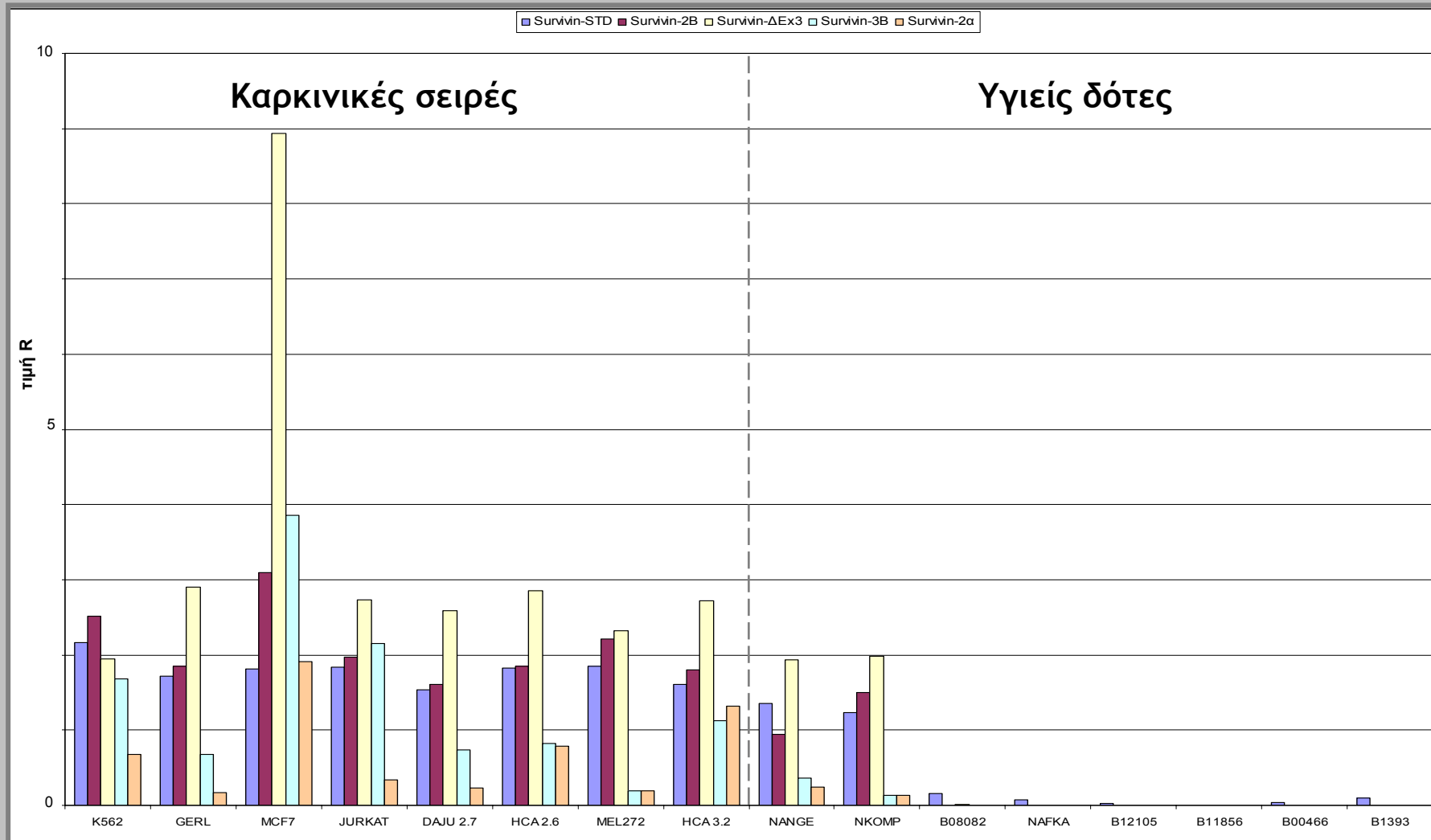
- Ανάστροφη μεταγραφάση (*reverse transcriptase*)
- Σύνθεση DNA συμπληρωματικών προς τα mRNA

- 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



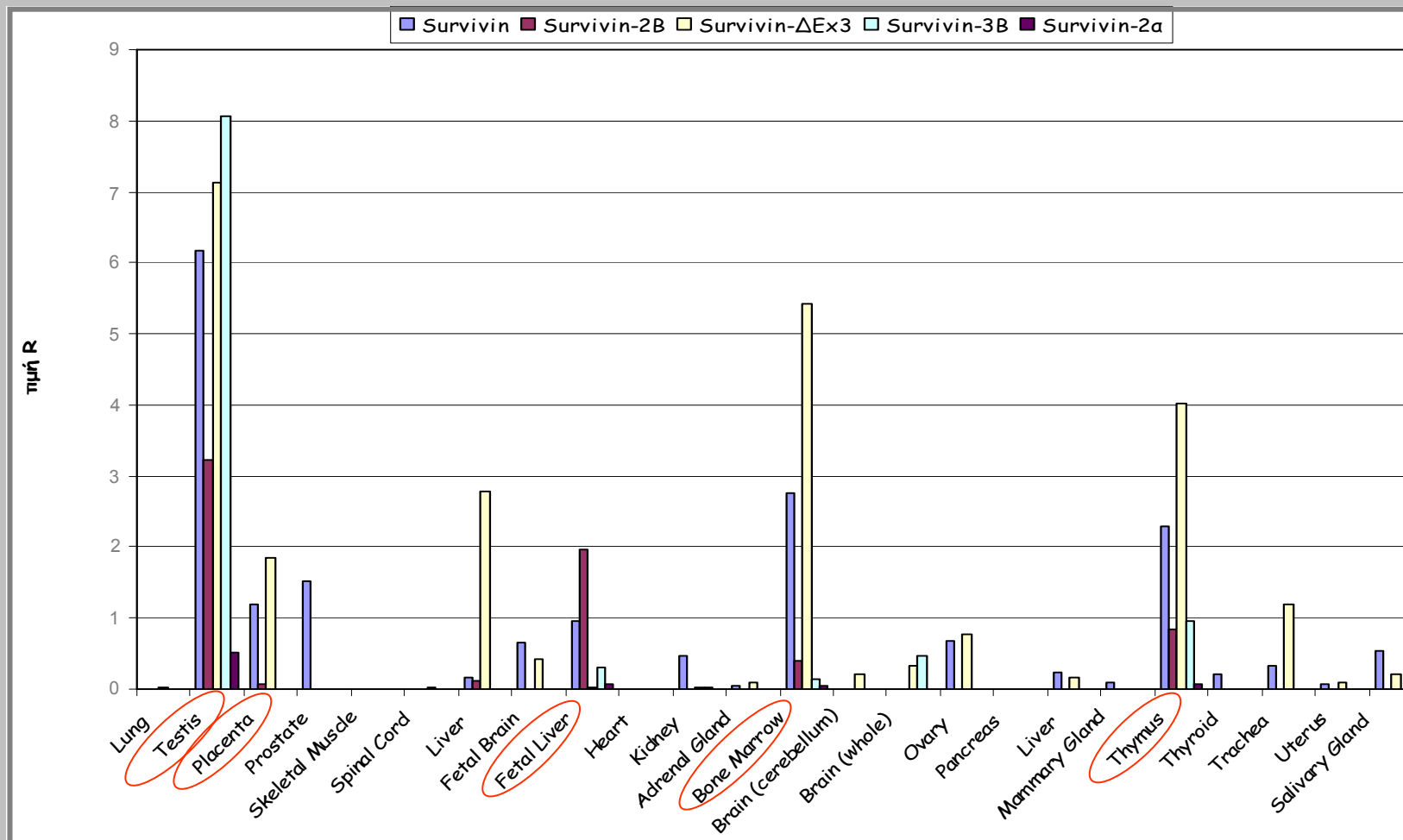
Αποτελέσματα - Καρκινικές κυτταρικές σειρές & υγιείς δότες



✓ Αρκετά υψηλή έκφραση όλων των ισομορφών

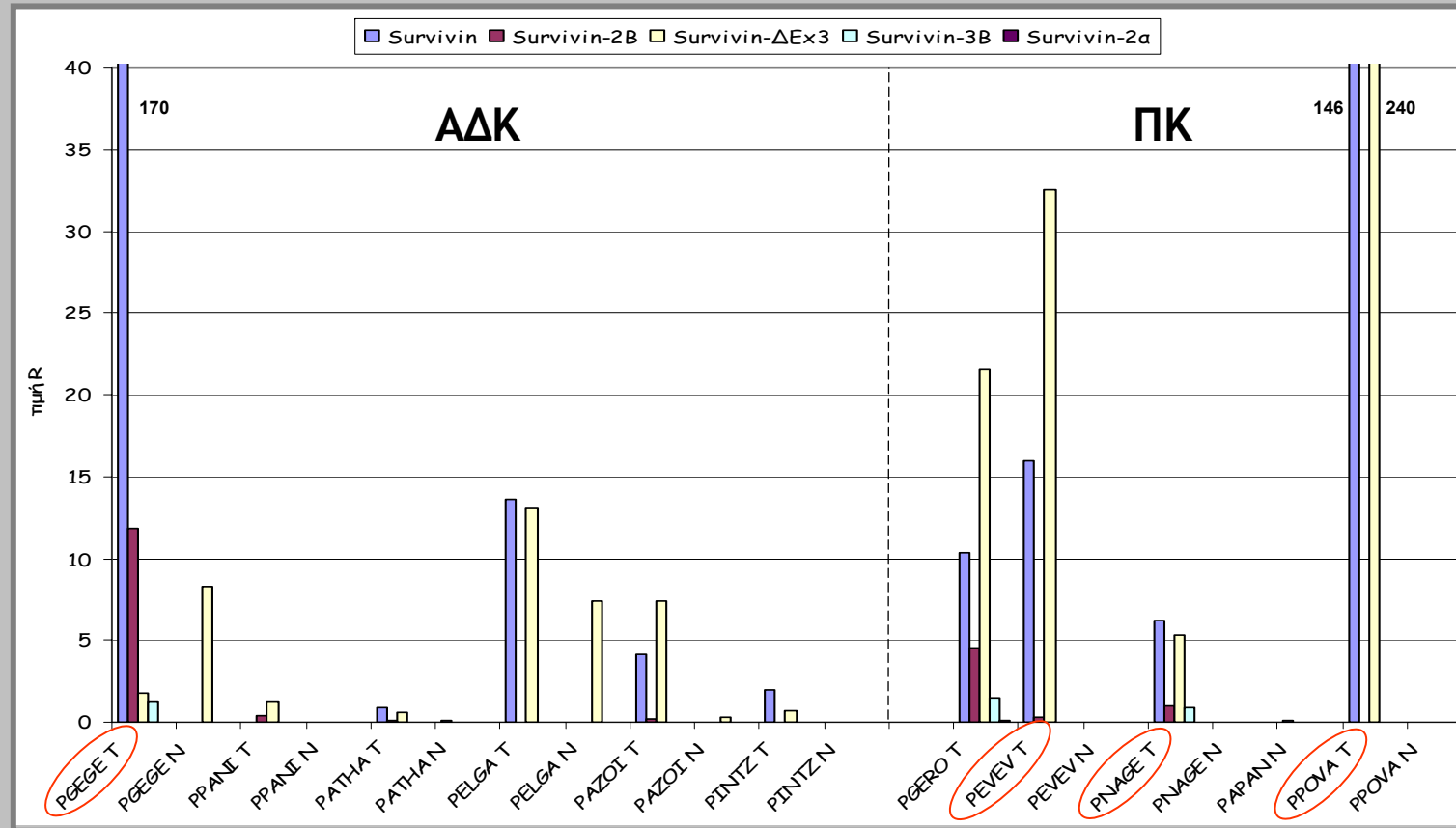
✓ Σημαντική διαφορά έκφρασης μεταξύ υγιών κυττάρων που έχουν διεγερθεί (NANGE, NKOMP) και αυτών χωρίς διέγερση

Αποτελέσματα - Υγιείς ιστοί



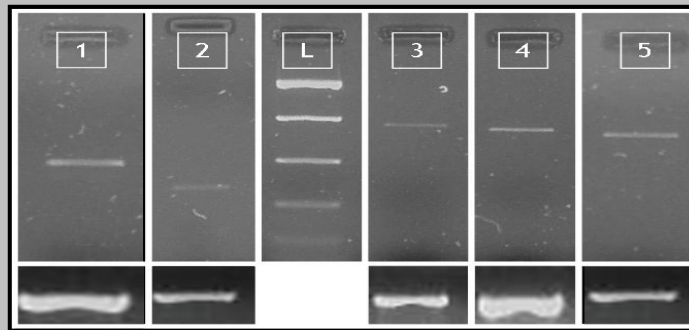
✓ Υψηλά επίπεδα έκφρασης σε συγκεκριμένους ιστούς (όρχεις, θύμος, εμβρυικοί ιστοί, μυελός των οστών κτλ.)

Αποτελέσματα - Ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα



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

Συνέχεια της μελέτης

- ✓ Μελέτη όλων των δειγμάτων για όλα τα αντιγόνα με ποσοτική *Real-time PCR*
- ✓ Ανάλυση έκφρασης για τα γονίδια *p53* και *hTERT*