

Απορρυθμισμένη έκφραση του ογκογονιδίου *c-mos* στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα: Σχέση με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, τη γενωμική αστάθεια και την κινητική του όγκου

Γοργούλης Βασίλειος¹, Ζαχαράτος Παναγιώτης¹, Ευαγγέλου Κωνσταντίνος¹, Σεργεντιάνης Θεόδωρος¹, Μαριάτος Γεώργιος¹, Κοτσινας Αθανάσιος¹, Φούκας Περικλής¹, Οικονομοπούλου Χριστίνα¹, Λιόντος Μιχαήλ¹, Γιαννουκάκος Δρακούλης², Τριγγίδου Ροδούλα³, Καραμέρης Ανδρέας⁴, Καναβάρος Παναγιώτης⁵, Μπαρμπάτη Καλυψώ⁶ και Κίττας Χρήστος¹

Deregulated expression of c-mos oncogene in non-small cell lung carcinomas. Relationship with p53 protein status, genomic instability and tumor kinetics

Gorgoulis G.V¹, Zacharatos P¹, Evagelou K¹, Sergeantanis T¹, Mariatos G¹, Kotsinas A¹, Foukas P¹, Economopoulou C¹, Lontos M¹, Giannoukakos D², Trigidou R³, Karameris A⁴, Kanavaros P⁵, Barbatis K⁶, Kittas C¹

¹Department of Histology and Embryology, School of Medicine, University of Athens, ²Laboratory of Radioisotopes, NCSR "Demokritos", Athens, ³Department of Pathology, "Sotiria" Hospital, Athens, ⁴Department of Pathology, "NIMITS" Army Hospital, Athens, ⁵Department of Histology and Embryology, School of Medicine, University of Thessalia, ⁶Department of Pathology, "Red-Cross" Hospital, Athens

Aim. Little is known about the status of the mitogen-activating protein kinase (MAPK) pathways in lung cancer. The product of the *c-mos* proto-oncogene is one of the key molecules taking part in these pathways. *In vitro* investigations have shown that it is involved in oocyte maturation, whereas in somatic cells it has opposing effects on the cell cycle suggesting that this proto-oncogene may represent an important determinant of aberrant cell function (genomic instability and altered kinetics). A recent study suggests that these effects may be p53-dependent. In view of the proposed link between *c-mos* and p53, we examined in non-small

¹Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή Αθηνών, ²Εργαστήριο Ραδιοϊσοτόπων, Ε.ΚΕ.Φ.Ε. "Δημόκριτος", Αθήνα, ³Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, Γ.Ν. Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών "Σωτηρία", ⁴Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, Ν.Ι.Μ.Τ.Σ, Αθήνα, ⁵Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή Θεσσαλίας, ⁶Παθο-

λογοανατομικό Εργαστήριο, Νοσοκομείο "Ερυθρός Σταυρός", Αθήνα

Υποβλήθηκε: 14.3.2001
Εγκρίθηκε: 20.4.2001

cell lung carcinomas (NSCLCs): i) the status of *c-mos*, ii) its relationship to genomic instability (aneuploidy) and two kinetic parameters of the tumors, proliferation (PI) and apoptotic indexes (AI), and iii) its association with *p53* alterations and their concomitant relationship with the above parameters.

Material and Methods. The study was performed on 56 NSCLCs. The proliferation index (PI), the apoptotic index (AI) and ploidy status were evaluated by Ki-67 immunohistochemistry, TUNEL assay and Feulgen-DNA staining and image analysis, respectively. *C-mos* and *p53* in-situ protein levels were assessed by immunohistochemistry. Moreover, *c-mos* and *p53* status were examined by LOH, mutation analysis and RT-PCR. In addition, any possible correlation among the examined parameters was performed by statistical analysis.

Results and Conclusions. *C-mos* overexpression, as assessed by immunohistochemistry and mRNA analysis, was found in 27% of the tumors. Expression was higher in advanced stages (II&III vs I, $P=0.018$). Since *c-mos* gene amplification was not detected, its deregulated expression may be due to increased transcription. The majority of *c-mos* positive [*c-mos*(P)] cases was associated with aneuploidy. Sequencing showed two silent mutations and one missense (R→L) at codon 22, located in a region critical for *c-mos* stability. In contrast to the findings of some in vitro studies, *c-mos* overexpression was found to be accompanied with low AI score tumors, implying that induction of apoptosis may have been defective. Indeed, in these tumors *p53* alterations were found. The carcinomas with concomitant alterations of *c-mos* and *p53* [*c-mos*(P)/*p53*(P)] had significantly lower AI values ($P<0.001$) and were more frequently associated with aneuploidy ($P=0.015$) than the *c-mos*(N)/*p53*(N) tumors, but not the *c-mos*(N)/*p53*(P) tumors. The former suggests that *p53* status is the main determinant of ploidy status and apoptosis in our series. This finding reveals once again the pivotal role of wild-type (wt) *p53* in preventing oncogene-mediated activation.

Key words: *mos*, *p53*, proliferation, apoptosis, ploidy

Σκοπός: Οι οδοί των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase) έχουν ελάχιστα μελετηθεί στον καρκίνο του πνεύμονα. Ένα από τα μόρια-κλειδιά που συμμετέχει σε αυτές τις οδούς είναι το προϊόν του πρωτο-ογκογονιδίου *c-mos*, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των ωκυττάρων. In vitro μελέτες σε σωματικά κύτταρα έδειξαν ότι η έκφραση του *c-mos* έχει αντιφατικές δράσεις στον κυτταρικό κύκλο. Μια πρόσφατη μελέτη προτείνει ότι αυτές οι δράσεις ίσως να είναι εξαρτώμενες από την *p53*. Εν όψει της προφανούς σχέσης ανάμεσα στο *c-mos* και την *p53* διερευνήσαμε σε μη μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα: α) τις αλλοιώσεις του *c-mos*, β) τη σχέση του με τη χρωμοσωμική αστάθεια (ανευπλοειδία) και με τις κινητικές παραμέτρους των όγκων και γ) τη σχέση του με τις αλλοιώσεις της *p53* και τη συνακόλουθη σχέση τους με τις παραπάνω παραμέτρους.

Υλικό και Μέθοδοι: Η μελέτη έγινε σε 56 μη μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα. Ο δείκτης πολλαπλασιασμού (ΔΠ) εκτιμήθηκε με ανοσοϊστοχημεία του πεπτιδίου Ki-67, ο αποπτωτικός δείκτης (ΑΔ) με την τεχνική TUNEL και η ανευπλοειδία με χρώση Feulgen και ανάλυση εικόνας. Το *c-mos* και η *p53* μελετήθηκαν στο πρωτεϊνικό επίπεδο με ανοσοϊστοχημεία, ενώ σε επίπεδο DNA εξετάστηκαν για: α) απώλεια του ενός αλληλομόρφου και β) παρουσία μεταλλαγών με τη συνδυασμένη μέθοδο ανάλυσης στερεοδιαμόρφωσης μονόκλωνου DNA και ανάλυσης πρωτο-

διάταξης του DNA. Επιπλέον, τα μεταγραφικά επίπεδα του *c-mos* mRNA εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο ανάστροφης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Τέλος, οι στατιστικές μέθοδοι ανάλυσης μεταβλητότητας και λογιστικής εξάρτησης χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση πιθανών συσχετίσεων.

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα: Διαπιστώσαμε υπερέκφραση του *c-mos* στο 27% των όγκων. Η έκφραση ήταν υψηλότερη στα στάδια II και III (34%) από το στάδιο I (17%) ($P=0.018$). Απόλυτη σύμπτωση παρατηρήθηκε μεταξύ της υπερέκφρασης του *c-mos* και των αυξημένων επιπέδων του mRNA του *c-mos*. Εφόσον δεν ανιχνεύθηκε ενίσχυση του γονιδίου του *c-mos*, η απορρύθμιση της έκφρασής του μάλλον οφείλεται σε αυξημένη μεταγραφή. Από τις δετικές για το *c-mos* [*c-mos*(+)] περιπτώσεις, το 77% συσχετιζόταν με ανευπλοειδία. Η ανάλυση της πρωτοδιάταξης του DNA έδειξε δύο σιωπηλές και μία παρερμηνεύσιμη μεταλλαγή ($R>L$) στο κωδικόνιο 22, η οποία βρίσκεται σε μια κρίσιμη για τη σταθερότητα του μορίου περιοχή. Σε αντίθεση με τα ευρήματα ορισμένων *in vitro* μελετών, οι *c-mos*(+) όγκοι είχαν χαμηλότερο $\Delta\Delta$ από τους αρνητικούς για το *c-mos* [*c-mos*(-)] όγκους, εύρημα που υποστηρίζει ότι ίσως η επαγωγή της απόπτωσης να είναι ελαττωματική. Όντως, το 86% των όγκων που υπερεξέφραζε το *c-mos* παρουσίαζε αλλοιώσεις της *p53*. Τα καρκινώματα με ταυτόχρονες αλλοιώσεις του *c-mos* και της *p53* [*c-mos*(+)/*p53*(+)] εμφάνιζαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές του $\Delta\Delta$ ($P<0.001$) και παρουσίαζαν συχνότερα ανευπλοειδία ($P=0.015$) από ότι οι *c-mos*(-)/*p53*(-) όγκοι, αλλά όχι από ότι οι *c-mos*(-)/*p53*(+) όγκοι, εύρημα που υποδεικνύει ότι η φυσιολογική *p53* παίζει ρόλο "φύλακα" ελέγχοντας την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι όλες οι *c-mos*(+)/*p53*(-) περιπτώσεις συνδέονταν με ανευπλοειδία συνεπάγεται ότι η υπερέκφραση του *c-mos* ίσως επηρεάζει τη σταθερότητα του γονιδιώματος ανεξάρτητα της *p53*. Τέλος, η ανάλυση της γονιδιακής αστάθειας στην περιοχή του *c-mos* έδειξε απώλεια ετεροζυγωτίας στο 8.5% των όγκων. Αυτό το εύρημα δεν είναι σύμφωνο με το ρόλο του *c-mos* ως ογκογονιδίου και υπογραμμίζει την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα.

Λέξεις- κλειδιά: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, μοριακές τεχνικές

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η γενωμική αστάθεια είναι χαρακτηριστική των κακοηδών κυττάρων και διακρίνεται στη μικροδορυφορική αστάθεια (MA) και στη χρωμοσωμική αστάθεια (XA)¹. Η MA περιλαμβάνει αλλοιώσεις σε πολυμορφικές, μικρού μεγέθους, γειτονικές, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και συνδέεται σε μια μικρή ομάδα καρκινωμάτων του παχέος εντέρου με μεταλλάξεις (επιγενετικές ή κληρονομούμενες) στα γονίδια του μηχανισμού επιδιόρθωσης σφαλμάτων στο ζευγάρι των βάσεων του DNA (DNA mismatch repair genes)². Από την άλλη, η XA, η οποία δηλώνει διπλασιασμούς ή απώλειες τμημάτων ή ολόκληρων χρωμοσωμάτων και οδηγεί σε ανώμαλο αριθμό χρωμοσωμάτων (ανευπλοειδία), πιθανώς συμβαίνει στις περισσότερες κακοήθειες στον άνθρωπο¹. Η

μοριακή βάση της τελευταίας μόλις έχει αρχίσει να διερευνάται. Είναι λογικό να υποτεθεί ότι αλλοιώσεις στα γονίδια που συμμετέχουν στην αντιγραφή, τη συμπύκνωση και το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων, καθώς επίσης και η ενεργοποίηση γονιδίων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που ανιχνεύουν βλάβες στο DNA και το σωστό σχηματισμό της ατράκτου αποτελούν τα κύρια γεγονότα που οδηγούν σε XA³.

Από την ταχέως αυξανόμενη λίστα των μορίων που συμμετέχουν στις οδούς ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, η πρωτεΐνη *p53* είναι η ευρύτερα μελετημένη. Η *p53* είναι μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 σε απάντηση σε γενωτοξικό stress, συμμετέχοντας στο μηχανισμό της επιδιόρθωσης του DNA ή της απόπτωσης σε περίπτωση που η επιδιόρθωση δεν είναι δυνατή⁴. Ενεργοποιείται επί-

σης από ογκογόνα ερεθίσματα κινητοποιώντας μια αντι-ογκογόνο απόκριση⁵ και από φάρμακα-αναστολείς των μικροσωληνίσκων, προκαλώντας αναστολή στη φάση G2⁶. Συνεπώς, η p53 "ανιχνεύει" αλλοιώσεις και στα δύο σημεία ελέγχου, G1/S και G2/M. Αυτές οι διαφορές ιδιότητες "φύλακα" της p53 δικαιολογούν τη θέση της ως τον πιο κοινό γονιδιακό στόχο στις ανθρώπινες κακοήθειες⁷. Αν και οι δράσεις της p53 έχουν διερευνηθεί λεπτομερειακά⁴, οι γνώσεις μας για τα βιοχημικά σημεία που την ενεργοποιούν είναι ως τώρα πενιχρές. Ολοένα αυξάνονται τα στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η φωσφορυλίωση είναι μια μορφή σήματος που κινητοποιεί τις ρυθμιστικές λειτουργίες της p53. Η φωσφορυλίωση της p53 επιτελείται από αρκετές κινάσες του κυττάρου μεταξύ των οποίων η ATM (Ataxia-Telangiectasia-Mutated)⁸, η DNA-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (DNA-PK)⁹, η Jun-NH2 κινάση (JNK)¹⁰, οι κινάσες I και II της καζεΐνης, η κινάση που ενεργοποιεί τις εξαρτώμενες από τις κυκλίνες κινάσες (CAK) και άλλες⁹. Σε μια σύγχρονη αναφορά, οι Fukasawa και Vande Woude έδειξαν *in vitro* ότι τα επίπεδα της φυσιολογικής (wild type, wt) p53 αυξάνονταν ως απάντηση σε υψηλή έκφραση των *mos*/MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), οδηγώντας σε μείωση του πολλαπλασιασμού ή απόπτωση ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου. Παρατήρησαν επίσης ότι αδρανοποίηση της p53 ακολουδήθηκε από περιορισμό της αναστολής της αύξησης, μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα μετασχηματισμού από το *mos* σε ινοβλάστες εμβρύου ποντικού (MEFs) κατά δύο ή τρεις φορές και από χρωμοσωμική αστάθεια¹¹.

Το πρωτο-ογκογονίδιο *c-mos* είναι το κυτταρικό ανάλογο του *v-mos* ογκογονιδίου, προϊόντος του ιού MMSV (Moloney murine sarcoma virus) που ταυτοποιήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του '80. Εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 8q11-12 και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 39 kDa με δραστηριότητα κινάσης σερίνης-θρεονίνης^{12,13}. Το *c-mos* ενεργοποιεί την οδό των MAPK, φωσφορυλιώνοντας την κινάση των MAPK (MAPKK)¹⁴. Παίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των ωοκυττάρων, κατά την οποία, ως συστατικό του κυτταροστατικού παράγοντα (cytostatic factor, CSF), αναστέλλει την πρόοδο των ωοκυττάρων στη μετάφαση II σταθεροποιώντας τον παράγοντα προαγωγής της ωρίμανσης (Maturation Promoting Factor,

MPF)¹⁴. Επιπλέον, η δραστηριότητα του *c-mos* συνδέεται με τον κατάλληλο σχηματισμό και προσανατολισμό της μειωτικής ατράκτου και στην επακόλουθη ασύμμετρη διαίρεση του ωοκυττάρου και την παραγωγή του πρώτου πολικού σωματίου¹⁵. Παρόλο που ο ρόλος του *c-mos* στην ωρίμανση των ωοκυττάρων είναι γνωστός, πολύ λίγα είναι γνωστά για την έκφρασή του και τις λειτουργίες του στα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα¹⁶. Συνεχής (constitutive) έκφραση του *c-mos* σε σωματικά κύτταρα, όπως σε ινοβλάστες ποντικού, επάγει τον καρκινικό μετασχηματισμό¹⁷. Υπάρχουν ισχυρά στοιχεία ότι η μετασχηματιστική δράση του *c-mos*, όπως πολλών άλλων προϊόντων ογκογονιδίων, ασκείται όταν εκφράζεται στην G1 φάση. Το *c-mos* έχει προταθεί ότι συμμετέχει ως μιτογόνο ερέθισμα, ρυθμίζοντας, μέσω της οδού των MAPK, τη δράση πολλών ρυθμιστών της φάσης G1, όπως των *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, S6-κινάσης II και TCF/E1k-1^{14,18}. Έχει προταθεί ότι το *c-fos* είναι το κυρίως δραστικό μόριο της οδού *c-mos*/MAPK το οποίο οδηγεί στον κυτταρικό μετασχηματισμό^{14,19}. Επιπρόσθετα, δύο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι μετασχηματισμένα από το *v-mos* κύτταρα καλλιεργημένα απουσία ορού (serum-starved) εμφάνιζαν αυξημένα επίπεδα ορισμένων κυκλινών (D, E και A), κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs) (p33cdk2 και p43cdc2) και ειδικών για τη φάση S συμπλόκων E2F καταλήγοντας ότι η αδυναμία της αρνητικής ρύθμισης αυτών των κρίσιμων ρυθμιστικών για τον κυτταρικό κύκλο μορίων ίσως συνεισφέρει στο νεοπλασματικό μετασχηματισμό^{20,21}. Είναι ενδιαφέρον ότι ο ρόλος του *c-mos* στο μετασχηματισμό των σωματικών κυττάρων δε φαίνεται να περιορίζεται μόνο στη φάση G1, άλλα περιλαμβάνει και τη μίτωση. Οι δράσεις του *c-mos* στη φάση M χαρακτηρίζονται από τροποποιήσεις ανάλογες της μειωτικής διαδικασίας που οδηγούν στην παραγωγή διπύρηνων κυττάρων και ίσως είναι ενδεικτικές ενός νέου μηχανισμού ΧΑ²².

Εν όψει των διαφόρων δράσεων του *c-mos* σε αρκετές κυτταρικές σειρές και της προφανούς του σύνδεσης με την p53, διερευνήσαμε σε μια βάση 56 μη μικροκυτταρικών καρκινωμάτων του πνεύμονα, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενες αναλύσεις ενός πρωτεϊνικού δικτύου της G1 φάσης²², τα εξής: α) το *c-mos* σε επίπεδο πρωτεΐνης, mRNA και DNA, β) τη σχέση του με τη χρωμοσωμική αστάθεια (ανευπλοειδία) και τις κινητικές πα-

ραμέτρους των όγκων [δείκτης πολλαπλασιασμού (ΔΠ) και αποπτωτικός δείκτης (ΑΔ)] και γ) τη σχέση του με αλλοιώσεις της p53 και τη συνακόλουθη σχέση τους με τις άνωδι παραμέτρους.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Δείγματα ιστού

Συνολικά 56 μη μικροκυτταρικά καρκινώματα πνεύμονα με τον παρακείμενο φυσιολογικό πνευμονικό ιστό αναλύθηκαν. Αυτοί οι όγκοι ήταν μέρος μιας βάσης 68 μη μικροκυτταρικών καρκινωμάτων του πνεύμονα, ταξινομημένων σύμφωνα με τα κριτήρια του Π.Ο.Υ. και το σύστημα TNM²⁴, που έχουν προηγουμένως διερευνηθεί για ένα δίκτυο πρωτεϊνών της φάσης G1, μεταξύ των οποίων και για την p53²³ (Πίνακας 1).

2. Ανοσοϊστοχημεία

α) Αντισώματα: Για την ανοσοϊστοχημική ανάλυση τα ακόλουθα αντισώματα (Abs) χρησιμοποιήθηκαν: P-19 (Τάξη: IgG αιγός πολυκλωνικό, επίτοπος: C-τελικό άκρο της ανθρώπινης *c-mos*) (Santa Cruz, Bioanalytica, Ελλάδα), DO7 (Τάξη: IgG2b μονοκλωνικό μυός, επίτοπος: κατάλοιπα 1-45 της p53) (Dako, Καλλιφρονάς, Ελλάδα), MIB-1 (Τάξη: IgG1, μονοκλωνικό μυός, επίτοπος Ki-67 πυρηνικό αντιγόνο) (Oncogene Science, Βιοδυναμική, Ελλάδα).

β) Μέθοδος: Η ανοσοϊστοχημεία επιτελέστηκε με την έμμεση μέθοδο στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως²³.

γ) Μάρτυρες: Η ανθρώπινη κυτταρική σειρά ME180 από τράχηλο μήτρας χρησιμοποιήθηκε ως δετικός μάρτυρας για την ανίχνευση της *c-mos*¹⁶. Επιπρόσθετα, η ειδικότητα του P-19 αντι-*mos* αντισώματος ελέγχθηκε προ-επωάζοντας το με το κατάλληλο πεπτιδίο-μάρτυρα (Santa Cruz, Bioanalytica, Ελλάδα). Η απουσία ανοσοϊστοχημικής χρώσης επιβεβαίωσε την ειδικότητα για τη *c-mos*. Τα δείγματα από τα καρκινώματα του πνεύμονα της προηγούμενης μας μελέτης²³, με χαρακτηρισμένα επίπεδα της p53, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για την ανοσοδραστικότητα της πρωτεΐνης p53. Η αρνητική για τη *c-mos* κυτταρική σειρά λεμφώματος DB¹⁶ χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Επιπλέον, σε κάθε σειρά ανοσοα-

ντιδράσεων, αντίσωμα του σύστοιχου κλάσματος IgG, αλλά μη σχετιζόμενης ειδικότητας χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

δ) Αξιολόγηση: (i) *c-mos*: Κυτταροπλασματική και μεμβρανική χρώση θεωρήθηκε αποδεικτικό στοιχείο για την έκφραση του *c-mos*. Πυρηνική χρώση παρουσία κυτταροπλασματικού ή/και μεμβρανικού σήματος επίσης θεωρήθηκε ειδική, όπως έχει ήδη περιγραφεί²⁵. Αποκλειστικά πυρηνική χρώση αγνοήθηκε. Η ανοσοϊστοχημεία εκτιμήθηκε εξετάζοντας όλες τις διακριτές περιοχές κάθε δείγματος όγκου. Οι όγκοι θεωρήθηκαν δετικοί για το *c-mos* (+) όταν πάνω από το 30% των καρκινικών κυττάρων παρουσίαζαν δετική χρώση ειδήλως, καταμετρήθηκαν ως αρνητικοί (-). Σε μια πρόσφατη ανοσοϊστοχημική μελέτη διακρίναμε τους δετικούς όγκους σε 2 ομάδες: + <30% και ++ >30%²⁶. Όμως, για την παρούσα μελέτη τα κριτήρια επανεκτιμήθηκαν, επειδή μόνο τα καρκινώματα στα οποία >30% των κυττάρων εμφάνιζαν ανοσοδραστικότητα συνδέονταν με αυξημένα επίπεδα του mRNA του *c-mos*. (ii) p53: Οι όγκοι θεωρήθηκαν δετικοί (+) όταν περισσότερο από το 20% των καρκινικών κυττάρων εμφάνιζαν πυρηνική χρώση σε αντίθετη περίπτωση, καταμετρήθηκαν ως αρνητικοί (-). (iii) Ki-67: Τα κύτταρα των όγκων εκτιμήθηκαν ως δετικά όταν παρατηρείτο πυρηνική χρώση, χωρίς κυτταροπλασματικό υπόβαθρο. Ο δείκτης πολλαπλασιασμού (ΔΠ) υπολογίστηκε ως το ποσοστό των δετικών για το MIB-1 κυττάρων σε 5-7 οπτικά πεδία υψηλής μεγέθυνσης (τουλάχιστον 1000 κύτταρα εκτιμήθηκαν). Η εξέταση της τομής έγινε από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές (ΒΓ, ΠΦ). Η μεταβλητότητα μεταξύ των παρατηρητών ήταν στατιστικώς μη σημαντική ($P < 0,001$).

3. Μικροδιαχωρισμός της επιδυμητής ιστικής περιοχής και εξαγωγή των νουκλεϊκών οξέων

α) Μικροδιαχωρισμός: Για την εξαγωγή του DNA χρησιμοποιήθηκαν συνεχόμενες τομές 5μm και ο μικροδιαχωρισμός της επιδυμητής ιστικής περιοχής διεξήχθη όπως περιγράφεται προηγουμένως²³.

β) Εξαγωγή του DNA: Το DNA εξήχθη από 50μg νεοπλασματικού υλικού χρησιμοποιώντας τη μέθοδο φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης²⁷.

γ) Εξαγωγή του RNA: Καρκινικό υλικό με

Πίνακας 1. Σύνοψη των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών, της ανάλυσης των p53 και c-mos, Δείκτη Πολλαπλασιασμού, Αποπτωτικού Δείκτη και πλοειδίας.

Δείγμα	Φύλο	Ηλικία	Καπνιστής	Ανάλυση του c-mos				Ανάλυση p53					
				AIX	Έκφραση miRNA	Ανάλυση SSCP	Γονιδιακή μετάλλαξη		AIX	Ανάλυση SSCP	Ελαττωματικό εξόνιο	Γονιδιακή μετάλλαξη	
3	A	61	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		O	-	-			
19	A	70	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	-	-			
20	A	66	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		AE	-	+	9	δεν εξετάστηκε	
22	A	70	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	-	-			
23	A	79	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	-	-			
25	A	63	ΟΧΙ	-	ΦΕ	-		E	-	-			
27	A	70	ΟΧΙ	-	ΦΕ	-		AE	-	+	8	κωδικόνιο 282, CGG->_GG	
30	A	75	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	-	-			
31	A	64	ΝΑΙ	-	ΦΕ	+	κωδικόνιο 22, CGG->CTT	R->L	E	-	-		
39	A	56	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		-	-	-			
44	A	72	ΟΧΙ	-	ΦΕ	-		AE	-	+	6	κωδικόνιο 213, CGA->_GA	
45	A	57	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	-	-			
46	A	68	ΟΧΙ	-	ΦΕ	-		AE	-	-			
49	A	53	ΟΧΙ	-	ΦΕ	-		E	-	-			
50	A	62	ΟΧΙ	-	ΦΕ	-		E	-	-			
51	A	48	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	-	-			
54	A	65	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	-	-			
62	A	57	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	-	+	8	κωδικόνιο 270, TTT->ATT	
66	A	58	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	-	-			
13	A	64	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	+	+	7	κωδικόνιο 248 CGG->CTG	
15	A	69	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		AE	+	+	5	κωδικόνιο 163, TAC->TGC	
18	A	73	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	+	+	7	κωδικόνιο 230, ACC->AAC	
24	A	62	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		-	+	+	4	κωδικόνιο 74, GCC->ACC	
28	A	60	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	+	+	5	κωδικόνιο 157, GTC->TCC	
29	A	61	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	+	+	4	κωδικόνιο 69, GCT->GGT	
42	A	76	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	+	+	5	κωδικόνιο 157, GTC->TTC	
47	A	71	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		O	+	-			
52	A	72	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	+	+	8	κωδικόνιο 273, CGT->CAT	
53	A	60	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	+	+	9	κωδικόνιο 319, AAG->AAT	
55	A	52	ΟΧΙ	-	ΦΕ	-		E	+	+	8	κωδικόνιο 275, TGT->TTT	
57	A	58	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	+	+	5	κωδικόνιο 153, CCC->CAC	
59	A	65	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	+	+	5	κωδικόνιο 143, GTG->GCC	
60	A	64	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		-	+	-			
61	A	59	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	+	-			
63	Θ	60	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	+	-			
64	A	62	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	+	-			
65	A	56	ΝΑΙ	-	ΦΕ	-		E	+	-			
67	A	71	ΟΧΙ	-	ΦΕ	-		E	+	-			
37	A	71	ΟΧΙ	+	ΥΕ	-		MA	-	-			
43	A	60	ΟΧΙ	+	ΥΕ	+	κωδικόνιο 260, GCC->GCA	A>A	AE	-	+	4	κωδικόνιο 60, CCA->CCT
4	A	60	ΝΑΙ	+	ΥΕ	-		E	+	+	7	κωδικόνιο 249, AGG->AGT	
9	A	53	ΝΑΙ	+	ΥΕ	-		-	+	+	7	κωδικόνιο 238, TGT->TTT	
10	Θ	68	ΝΑΙ	+	ΥΕ	-		E	+	+	4	κωδικόνιο 93, CTG->ATG	
11	A	70	ΝΑΙ	+	ΥΕ	-		MA	+	+	8	κωδικόνιο 280, AGA->ATA	
14	A	74	ΝΑΙ	+	ΥΕ	-		E	+	+	7	κωδικόνιο 239, AAC->ACC	
16	A	63	ΝΑΙ	+	ΥΕ	-		E	+	-			
17	A	64	ΝΑΙ	+	ΥΕ	-		E	+	-			
26	A	63	ΝΑΙ	+	ΥΕ	-		E	+	+	6	κωδικόνιο 196, CGA->CCA	
48	A	73	ΝΑΙ	+	ΥΕ	+	κωδικόνιο 324, AGC->AGT	S>S	E	+	+	7	κωδικόνιο 237, ATG->ATA
56	A	58	ΝΑΙ	+	ΥΕ	-		E	+	-			
58	A	52	ΟΧΙ	+	ΥΕ	-		E	+	-			
68	A	61	ΝΑΙ	+	ΥΕ	-		E	+	-			
1	A	57	ΝΑΙ	MA	MA	-		E	+	-			
2	A	60	ΝΑΙ	MA	ΥΕ	-		E	MA	-			
7	A	64	ΝΑΙ	MA	MA	-		E	+	+	8	κωδικόνιο 273, CGT->CTT	
21	A	70	ΝΑΙ	MA	MA	-		-	-	-			

A: Άρρεν, Θ: Θήλυ

AIX: Ανοσοιστοχημεία, +: Θετικό, -: Αρνητικό, MA: Μη Αξιολογήσιμο

ΦΕ: Φυσιολογική Έκφραση, ΥΕ: Υπερέκφραση

SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism analysis, +(-): υποδεικνύει πιθανή μετάλλαξη (όχι μετάλλαξη), MI: Μετατόπιση Πιλαίσου

ΓΑ: Ανάλυση Γονιδιακής Αστάθειας, ΑΕ: Απόλυτα Ετεροζυγωτίας, Ο: Ομόζυγο, Ε: Ετερόζυγο

ΔΠ: Δείκτης Πολλαπλασιασμού, ΑΔ: Αποπτωτικός Δείκτης, Δ: Διπλοειδής, Αν: Ανευλοειδικός

Πλ: Καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων, Αδ: Αδενοκαρκίνωμα, ΑΜ: Αδιαφοροποίητο Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα

*δεδομένα από προηγούμενη μελέτη (23)

†σε μήνες μετά την εγχείρηση, +: υποδεικνύει ότι ο ασθενής βρίσκεται εν ζωή

περισσότερο από 90% καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του RNA, επειδή ο μικροδιαχωρισμός δεν είναι εφαρμόσιμος για μεθόδους χειρισμού του RNA. Το RNA εξήχθη με το αντιδραστήριο Trizol (Life Technologies, Αντι-Σελ, Ελλάδα) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ποιότητα και η ποσότητα του RNA εκτιμήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα αγαρόζης-φορμαλδεΐδης και φασματοφωτομετρία στα 260 και 280nm.

4. Πολλαπλή Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης σε συνδυασμό με ανάστροφη μεταγραφάση (Multiplex RT-PCR)

Προκειμένου να εξετάσουμε τα επίπεδα του mRNA του *c-mos* στον όγκο και τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, εκτελέσαμε την ημιποσοτική μέθοδο πολλαπλής PCR με ανάστροφη μεταγραφάση. Το τμήμα-στόχος του mRNA ενισχύεται ταυτόχρονα με μεγαλύτερο τμήμα mRNA αναφοράς ενός μορίου που εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα²⁸. Οι σχετικοί λόγοι των προϊόντων ενίσχυσης στα δείγματα του όγκου αντικατοπτρίζουν τη σχετική αναλογία των αρχικών mRNAs και συγκρίνονται με τους σχετικούς λόγους του σύστοιχου φυσιολογικού ιστού²⁸.

α) Σύνθεση του cDNA: cDNA συντέθηκε από 5μg ολικού RNA με τη χρήση oligo-dT και αντίστροφης μεταγραφάσης MMLV (Life Technologies, Αντι-Σελ, Ελλάδα) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

β) Εκκινητές: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση ήταν:

- cDNA-στόχος: Οι εκκινητές για το τμήμα του *c-mos* ήταν (Πίνακας 2):

5'- GCC TGC TCT TCC TCC ACT CG - 3'
(Θέση 803)

5'- AGT ATG TGC TGC CGC TCC CC - 3'
(Θέση 1100)

- cDNA αναφοράς: Ένα τμήμα 548bp της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά.

γ) Μέθοδος: Η αντίδραση της PCR επιτελέστηκε σε 30μl που περιείχαν 10μM Tris-HCl, pH 8,8, 50μM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 200μM από κάθε τρινοκλεοτίδιο (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 30μM εκκινητών του *c-mos*, 20μM εκκινητών β-ακτίνης, 5μl του ολικού cDNA και 1Unit Taq DNA πολυμεράσης (Promega, Bioanalytica, Ελλάδα). Το θερμικό πρότυπο του κύκλου ήταν αποδιάταξη στους 95°C για δύο λεπτά πριν την προσθήκη της Taq πολυμεράσης, που ακολουθήθηκε από 25 κύκλους 1min στους 95°C, 1min στους 60°C και 1min στους 72°C. Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα αγαρόζης 2% ύστερα από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

δ) Μάρτυρες: (i) Εφόσον το γονίδιο *c-mos* δεν διαθέτει ιντρόνια, ένα δετικό προϊόν της PCR θα μπορούσε θεωρητικά να προκύψει από προσμίξεις DNA στα διαλύματα του RNA. Για να αποκλεισθεί αυτή η πιθανότητα, επιτελέσαμε τις αντιδράσεις παρουσία ή απουσία αναστροφής μεταγραφάσης πριν την ενίσχυση του cDNA. Προσμεμειγμένα με DNA διαλύματα RNA υπέστησαν κατεργασία με DNAάση και/ή 4M LiCl₂ και επανελέγχθηκαν όπως περιγράφηκε άνωθεν. (ii) Για να αποκλεισθεί η πιθανότητα ψευδώς δετικών αποτελεσμάτων λόγω μόλυνσης κατά τη μεταφορά (carry-over effect), RNA απομονώθηκε από διάφορες κυτταρικές σειρές ποντικού και περιελήφθη στα πειράματα ως αρνητικός μάρτυρας. Αφού οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δεν εμφανίζουν ομολογία στην αλληλουχία τους με το *c-mos* του ποντικού^{12,29}, δεν αναμενόταν ειδικό προϊόν από την PCR στα κύτταρα του ποντι-

Πίνακας 2. Εκκινητές και αντίστοιχα θερμικά πρότυπα για κάθε τμήμα του *c-mos*

Τμήμα	Θέση αναφ. 12	Εκκινητές 5'→3'	Θερμικό πρότυπο					
			AA	A	Π	E	K	TE
1	194	GTC TCT TCA TTC ACT CCA GCG	95°C	94°C	60°C	72°C	30	72°C
	515	CTT GTT CAC TTG CTT TAT GGC	3min	30sec	30sec	15sec		4min
2	438	TGG GAG CTG GAG GGT TTG GC	95°C	94°C	66°C	72°C	30	72°C
	750	TCC AGT GCG GCA GTG AGG CT	3min	30sec	30sec	15sec		4min
3	803	GCC TGC TCT TCC TCC ACT CG	95°C	94°C	68°C	72°C	30	72°C
	1100	AGT ATG TGC TGC CGC TCC CC	3min	30sec	30sec	15sec		4min
4	1052	AAA TGA CTA CCA AGC AGG CG	95°C	94°C	60°C	72°C	30	72°C
	1284	ACC AAG TTT TCA GTC AGC CG	3min	30sec	30sec	15sec		4min

AA: Αρχική Αποδιάταξη, A: Αποδιάταξη, Π: Πρόσδεση των εκκινητών, E: Επέκταση, K: Αριθμός Κύκλων, TE: Τελική Επέκταση

κιού που εξετάστηκαν σε απουσία πρόσμιξης με την ανδρώπινη αλληλουχία του *c-mos*. (iii) Για να αποφευχθούν πιθανές ενδοπειραματικές αλλοιώσεις κατά την RT-PCR που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τον πραγματικό λόγο των μεταγράφων (στόχος προς αναφορά), διαλύματα RNA που αραιώθηκαν κατά δύο τάξεις μεγέθους χρησιμοποιήθηκαν στις ενισχύσεις των μαρτύρων. Από αυτές τις αντιδράσεις ένας μικρός αριθμός κύκλων PCR επελέγη για την εκτίμηση των λόγων των μεταγράφων του RNA.

ε) Αξιολόγηση: Ο σχετικός λόγος *c-mos*/β-ακτίνη εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας ένα σύστημα ανάλυσης εικόνας (Media Cybernetics, Maryland, ΗΠΑ). Επειδή η ενίσχυση του τμήματος β-ακτίνης δεν είναι απαραίτητα παρόμοια με εκείνη του *c-mos*, συγκρίθηκε ο σχετικός λόγος του *c-mos* και της β-ακτίνης ανάμεσα στα σύστοιχα δείγματα του όγκου και τα φυσιολογικά δείγματα [*c-mos*/β-ακτίνη (παθολογικό): *c-mos*/β-ακτίνη (φυσιολογικό)]. Επιτελώντας την ανωτέρω διαδικασία σε 100 ζεύγη φυσιολογικών-φυσιολογικών δειγμάτων για να εκτιμήσουμε τη φυσιολογική διακύμανση αυτού του λόγου, τη βρήκαμε να είναι $1,00 \pm 0,18$. Όταν ο σχετικός λόγος παθολογικό/φυσιολογικό ήταν μέσα σε αυτό το εύρος, τα επίπεδα του mRNA του *c-mos* θεωρήθηκαν φυσιολογικά. Τιμές μεγαλύτερες του 1,18 ερμηνεύθηκαν ως υπερέκφραση του *c-mos*.

5. Ανάλυση του πολυμορφισμού της στερεοδιαμόρφωσης της μονής αλύσου DNA (SSCP)

Η μέθοδος επιτελέστηκε σε ζεύγη DNA από φυσιολογικό και παθολογικό ιστό όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως²³.

α. Εκκινητές: Οι εκκινητές για το *c-mos*

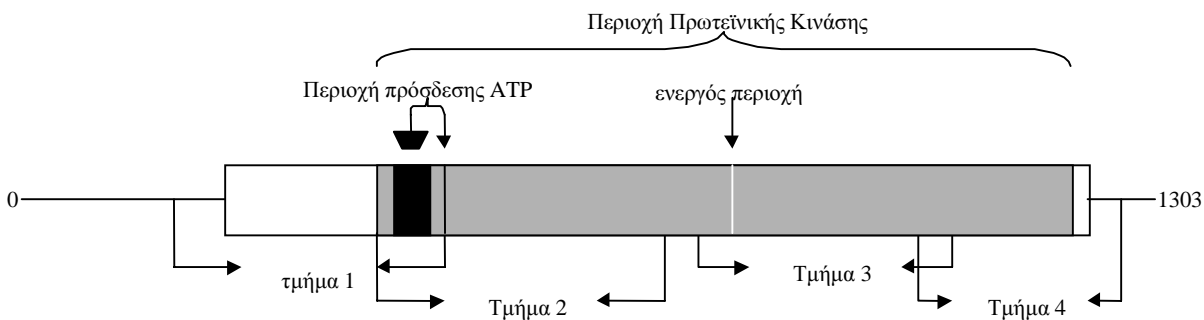
και την p53 και οι συνθήκες της PCR ήταν οι εξής:

- γονίδιο *c-mos*: Βάσει της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου του *c-mos*, όπως δημοσιεύτηκε από τους Watson et al.¹², οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη χρήση του λογισμικού Oligo (Version 4.01) (National Biosciences Inc., Plymouth, ΗΠΑ), ώστε να παραχθούν 4 μερικώς επικαλυπτόμενα τμήματα (Εικόνα 1, Πίνακας 2). Τα δερμικά προγράμματα της PCR παρουσιάζονται στον πίνακα 2.
 - γονίδιο p53: Για την ανάλυση του γονιδίου p53 ενισχύθηκε ένα τμήμα 2,9kb του γονιδίου της p53, το οποίο περιέχει τα εξόνια 4 έως 9, αφού προγενέστερες μελέτες έχουν δείξει ότι η πλειοψηφία των μεταλλάξεων της p53, στα καρκινώματα του πνεύμονα, εντοπίζεται στην περιοχή αυτή²³. Μεμονωμένα εξόνια (4-9) ενισχύθηκαν με την τεχνική φωλεασμένης PCR (nested-PCR).
- β. Αποδιάταξη και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR: Τα προϊόντα της PCR αποδιάταχθηκαν παρουσία 7M ουρίας και 50% φορμαμίδιου στους 95°C για 5min και ακολούθως διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 10% (37,5/1) για 3500Vh.

6. Αυτόματος προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης του DNA

Τα τμήματα του DNA που εμφάνισαν μεταβολές στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα καθαρίστηκαν και αναλύθηκαν περαιτέρω με τη μέθοδο αυτόματου προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης του DNA.

α. Καθαρισμός του προϊόντος της PCR: Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν με QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Bioanalytica,



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση του cDNA του *c-mos*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση των μεταλλάξεων υποδεικνύονται με βελόνες.

αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Genescan and Genotyper (PE-Applied Biosystems, Βαμβακάς, Αθήνα). (ii) γονίδιο της p53: Τα εξόνια της p53 που περιείχαν πιθανώς μεταλλάξεις ενισχύθηκαν με ζεύγος εκκινητών που έφεραν επέκταση για αλληλουχία του φάγου M13 και αναλύθηκαν όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως²³.

γ. Αξιολόγηση: Προς αποφυγή ψευδώς δεικτικών αποτελεσμάτων λόγω μεταλλάξεων που οφείλονταν στην Taq πολυμεράση, όλες οι αντιδράσεις της PCR και η ανάλυση της πρωτοδιατάξης επιτελέστηκαν και επιβεβαιώθηκαν δύο φορές από δύο ανεξάρτητα εργαστήρια.

7. Ανάλυση της γονιδιακής αστάθειας

Για να εξετάσουμε αλλοιώσεις των αλληλομόρφων του *c-mos* και της p53, διαλέξαμε δύο δείκτες: τον D8S285, που επελέγη από το Linkage Mapping Set v2.0 (PE-Applied Biosystems, Βαμβακάς, Αθήνα) και βρίσκεται σε γειτνίαση (τελομερικό άκρο) με το *c-mos*, και τον D17S179E, έναν πεντανουκλεοτιδικό δείκτη, ο οποίος εντοπίζεται μέσα στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου p53 και που σχεδιάστηκε με τη χρήση του λογισμικού Oligo (Version 4.01). Ο γονιδιακός τύπος D8S285 αναλύθηκε όπως περιγράφηκε προηγουμένως²³, ενώ ο D17S179E ως εξής:

α. Εκκινητές: Οι εκκινητές του D17S179E παράγουν ένα τμήμα 161bp και οι αλληλουχίες τους είναι:

5' - AGTAAGCGGAGATAGTGCCA - 3'

5' - GCACTGACAAAACATCCCCT - 3'

β. Μέθοδος: Οι δείκτες ενισχύθηκαν σε μια σειρά διπλών αντιδράσεων. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελούσαν: 1x GeneAmp buffer II, 250μM dNTPs, 2mM MgCl₂ και 2Units AmpiTaq Gold πολυμεράση. Οι παράμετροι ενίσχυσης της PCR ήταν: αρχική αποδιάταξη για 12min στους 95°C, 30 κύκλοι των 30sec στους 94°C, 30sec στους 55°C και 30sec στους 72°C που ακολουθήθηκαν από επέκταση για 20min στους 72°C. Τα προϊόντα αποδιατάχθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φορτώματος (size marker ROX-350/κυανού της δεξτράνης/φορμαμίδιο: 1/1/5) στους 95°C για 5min και αναλύθηκαν με ABI-PRISM 377 Automatic Sequencer (PE-Applied Biosystems, Βαμβακάς, Αθήνα). Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με τη χρήση λογισμικού Genescan and Genotyper (PE-Applied Biosystems, Βαμβακάς, Αθή-

να).

γ. Αξιολόγηση: Η μεταβλητότητα της αντίδρασης και ο καθορισμός των ορίων αξιολόγησης για τη μέτρηση της γονιδιακής αστάθειας έχουν περιγραφεί³¹. Όταν ο λόγος έντασης αλληλομόρφων είχε τιμές ?0,65 ή ?1,54, τα δείγματα καταμετρήθηκαν ως απώλεια ετεροζυγωτίας (AE)? ειδάλλως, όταν οι τιμές τους κυμαίνονταν μεταξύ 0,77-1,23, καταμετρήθηκαν ως αρνητικά. Δείγματα που εμφάνισαν τιμές 1,23-1,54 ή 0,65-0,77 υποβλήθηκαν σε δεύτερη δοκιμασία και καταμετρήθηκαν ως AE μόνο εάν λαμβανόταν και δεύτερη δετική τιμή.

8. Ανάλυση της πλοειδίας του πυρηνικού DNA

α. Μέθοδος: Η χρώση των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο Thionin-Feulgen³². Εν συντομία, 5μm τομών παραφίνης αποπαραφινώθηκαν, επανυδατώθηκαν σε διαλύματα ελαττούμενου αλκοολικού βαθμού και υπεβλήθηκαν σε όξινη υδρόλυση σε 5N HCl σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Ακολούθως, η χρώση των τομών έγινε με το αντιδραστήριο Thionin-Schiff (0,5% thionin, 0,5% διθειώδες νάτριο, 0,1N HCl) για 90min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, τα δείγματα εκπλύθηκαν τρεις φορές (30sec, 5min και 10min) σε πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα έκπλυσης δειωδών αλάτων (0,5% διθειώδες νάτριο, 0,05N HCl) και μία φορά σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 10min. Ένα επιπρόσθετο στάδιο έκπλυσης σε όξινη αλκοόλη (70% αλκοόλη, 0,1N HCl) χρησιμοποιήθηκε, ώστε να αυξηθεί η αντίθεση της χρώσης. Εν τέλει, οι τομές αφυδατώθηκαν σε αλκοόλη και εγκλειστήκαν σε μονιμοποιητικό υλικό με βάση την ξυλόλη.

β. Αξιολόγηση: Η διαδικασία μέτρησης επιτελέστηκε με τη χρήση του Optipath TV-based image analysis system (Meyer Instruments, Houston, Texas) εξοπλισμένου με μικροσκόπιο και ψηφιακή κάμερα. Ως εσωτερική αναφορά χρησιμοποιήθηκαν μάρτυρες λεμφοκύτταρα ή κοκκιοκύτταρα. Σε κάθε ανάλυση, περίπου 100 μάρτυρες και 350 κύτταρα όγκου μετρήθηκαν. Για να διακριθούν τα μη διπλοειδή κύτταρα από τα διπλοειδή, τέθηκε ως ανώτερο όριο για τις διπλοειδείς τιμές το 2,5c. Επειδή το κλάσμα πάνω από 2,5c μπορεί να περιλαμβάνει πολλαπλασιαζόμενα διπλοειδή κύτταρα, υπολογίσαμε επίσης το κλάσμα των κυττάρων του όγκου με τιμές DNA πάνω από

το επίπεδο 5c, που υπερβαίνει εκείνες των πολλαπλασιαζόμενων διπλοειδών κυττάρων. Περιπτώσεις στις οποίες πάνω από το 5% των κυττάρων εμφάνιζαν περιεχόμενο σε DNA πάνω από το επίπεδο 5c θεωρήθηκαν ανευπλοειδικές³³.

9. Προσδιορισμός αποπτωτικών σωματιών με τη χρήση Tdt τρανοφεράσης (TUNEL)

α. Μέθοδος: Θραύσεις και των δύο κλώνων του DNA ανιχνεύθηκαν με τη μέθοδο TUNEL σύμφωνα με τη μέθοδο των Gavrieli et al.³⁴. Εν συντομία, τομές παραφίνης 5μm εγκλείστηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες καλυμμένες από πολυ-L-λυσίνη, αποπαραφινώθηκαν, επανυδατώθηκαν και επώαστηκαν για 30min με 0,3% υπεροξειδίου του υδρογόνου, ώστε να εξουδετερωθεί η δραστηριότητα της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Η προεργασία περιλάμβανε επώαση των τομών με πρωτεΐνωση K (Sigma, Ελλάδα) (20μg/ml) για 15min στους 37°C. Το στάδιο σήμανσης επιτελέστηκε με την Tdt (15u ανά τομή) (New England Biolabs, Bioline, Ελλάδα) για 1h στους 37°C σε 25mM Tris-Cl, pH 7,2, 200mM κακοδυλικό κάλιο, 0,25mM CoCl₂ 250mg/ml BSA, 24μM biotin-dATP (Life Technologies, Αντι-Σελ, Ελλάδα). Η αντίδραση τερματίστηκε με έκπλυση των τομών σε 20mM EDTA. Το επόμενο στάδιο περιλάμβανε επώαση για 30 min σε διάλυμα στρεπταβιδίνης AB Complex (1:100 stock διάλυμα βιοτίνης, 1: 100 stock διάλυμα στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης) (Dako, Καλλιφρονάς, Ελλάδα). Χρησιμοποιήθηκε τετραϋδροχλωρική 3,3'-διαμινοβενζιδίνη (DAB) ως χρωμογόνο και αιματοξυλίνη ως βασική χρώση.

β. Μάρτυρες: Χρησιμοποιήσαμε ως δετικούς μάρτυρες τομές ιστών που επώαστηκαν με DNAάση I πριν από την κατεργασία με Tdt και ως αρνητικούς μάρτυρες τομές που επώαστηκαν σε ρυθμιστικό του Tdt χωρίς την παρουσία του ενζύμου.

γ. Αξιολόγηση: Τα κύτταρα θεωρήθηκαν ότι αποπίπτουν όταν παρατηρείτο πυρηνική χρώση χωρίς κυτταροπλασματικό υπόβαθρο. Ο αποπτωτικός δείκτης (ΑΔ) εκτιμήθηκε ως το ποσοστό των κυττάρων που αποπίπτουν σε 10 οπτικά πεδία υψηλής μεγέθυνσης (μετρηθέντα κύτταρα 900-10000). Η εξέταση των τομών έγινε από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές (ΠΦ, ΒΓ). Η μεταβλητότητα μεταξύ των παρατηρητών ήταν ελάχιστη (P<0,001).

10. Στατιστική ανάλυση

Οι πιθανές σχέσεις ανάμεσα στο *c-mos* και την p53 ανεξάρτητα, στα πρότυπα των *c-mos*/p53 με το ΔΠ, logΑΔ, την πλοειδία και τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους αξιολογήθηκαν με τη μη παραμετρική μέθοδο Kruskal-Wallis και το Χ² κατά Pearson (Πίνακας 3). Επιπλέον, η ανάλυση της μεταβλητότητας (ANOVA) χρησιμοποιήθηκε, ώστε να εκτιμηθεί ειδικότερα η πιθανή σχέση ανάμεσα στην p53, τα πρότυπα των *c-mos*/p53 και τα ΔΠ, logΑΔ (Πίνακας 5). Χρησιμοποιήθηκε ανάλυση με λογιστική εξάρτηση για την εκτίμηση πιθανών σχέσεων ανάμεσα στην p53, τα πρότυπα των *c-mos*/p53 και την πλοειδία (Πίνακας 5). Εν τέλει, καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meyer σχεδιάστηκαν για τις παραμέτρους που εξετάστηκαν στη παρούσα μελέτη. Διαφορές ανάμεσα στις καμπύλες επιβίωσης εξετάστηκαν με τη δοκιμασία log-rank. Ολόκληρη η ανάλυση επιτελέστηκε με το στατιστικό πακέτο SAS. Η στατιστική διαφορά θεωρήθηκε σημαντική όταν η τιμή του P ήταν <0,05.

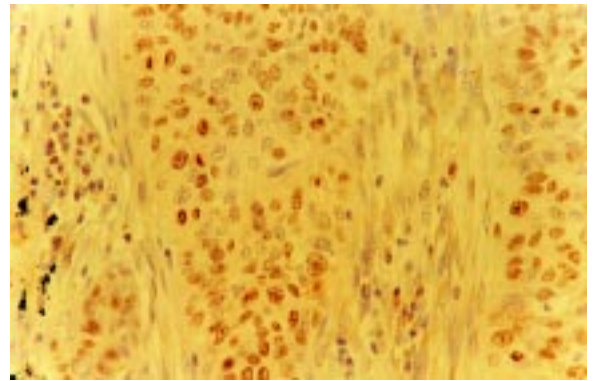
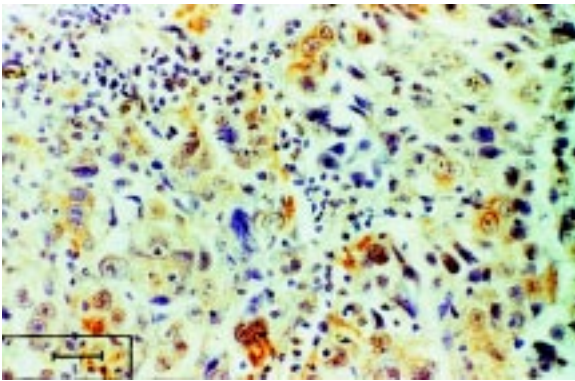
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ανάλυση των *c-mos* και p53

α. *c-mos*

i) Ανοσοϊστοχημεία και σχέση με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους: Έκφραση του *c-mos* παρατηρήθηκε σε 14 από 52 αξιολογήσιμες περιπτώσεις (27%). Η χρώση εντοπιζόταν κυρίως στο κυτταρόπλασμα και στην κυτταρική μεμβράνη, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις και πυρήνες αντιδρούσαν με το αντι-*mos* αντίσωμα. Η έκφραση περιοριζόταν στις καρκινικές περιοχές (Εικόνα 2α). Σημαντική ετερογένεια παρατηρήθηκε στη χρώση μέσα στους ίδιους τους όγκους. Η σχέση ανάμεσα στα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας για το *c-mos*, τις συνήθειες καπνίσματος, την ιστολογία, τη διήθηση των λεμφαδένων και το στάδιο παρουσιάζεται στον Πίνακα 3. Η στατιστική ανάλυση αποκάλυψε συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του *c-mos* και το στάδιο ομαδοποιημένο ως I και II/III [4/23 (17,4%) έναντι 10/29 (34%), P=0,018 με το Χ² κατά Pearson, Πίνακας 3].

ii) Ανάλυση με πολλαπλή RT-PCR της έκφρασης του *c-mos*: Τα επίπεδα του mRNA του *c-mos* εξετάστηκαν σε ζεύγη δειγμάτων από φυσιολογικό ιστό και όγκο με την ημιποσοτική



Εικόνα 2. Αντιπροσωπευτικά ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα (βλ. Μεθόδους). **α.** Καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα (περίπτωση 11) με υπερέκφραση του *c-mos*. Τεχνική στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης με "P19" αντί-*c-mos* αντίσωμα (βλ. Μεθόδους) και αιματοξυλίνη ως βασική χρώση (x400). **β.** Καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα (περίπτωση 21) με υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού (ΔΠ=35%). Τεχνική στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης με "MIB-1" αντί-Ki-67 αντίσωμα (DAB ως χρωμογόνο) και αιματοξυλίνη ως βασική χρώση (x400).

Πίνακας 3. Σχέση ανάμεσα στα *c-mos*, p53, *c-mos/p53* πρότυπα και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, ΔΠ, ΑΔ και πλοειδία

Έκφραση	Ιστορικό καπνίσματος			Ιστολογικός υπότυπος			Διήθηση λεμφαδένων			Στάδιο			Δείκτης Πολλαπλασιασμού			Αποτυπικός Δείκτης					
	Ναι	Όχι	P	Πλ.	Αδ	AM	P	+	-	P	I	II	III	P	MT(αίθρος)	SD	P	MT(αίθρος)	SD	P	
<i>c-mos</i> AIX	-	30	8	0.625	17	19	2	0.549	18	20	0.755	19	8	11	0.043	35.75(36)	12.01	0.874	1.965(34)	2.348	0.208
	+	11	3		6	6	2		8	6		4	8	2		34.99(13)	13.37		1.539(13)	1.224	
p53 AIX	-	14	8	0.013	7	14	1	0.549	11	11	0.788	12	7	3	0.140	29.33(20)	10.044	0.004	3.192(19)	2.58	<0.001
	+	30	3		18	12	3		18	15		11	10	12		38.64(32)	12.134		1.306(30)	1.119	
<i>c-mos/p53</i>	-/-	13	6	0.011	6	12	1	0.300	8	11	0.471	12	5	2	0.018	29.54(17)	10.668	0.022	3.170(17)	2.736	0.001
	+/-	0	2		0	2	0		2	0		0	2	0		25.21(2)	5.34		3.379(2)	0.229	
	-/+	17	2		11	7	1		10	9		7	3	9		40.77(19)	11.47		1.268(17)	1.069	
	+/+	11	1		6	4	2		6	6		4	6	2		36.62(11)	14.10		1.049(11)	0.689	

AIX: Ανοσοϊστοχημεία, +: Θετικό, -: Αρνητικό, Δ: Διπλοειδής, Αν: Ανευπλοειδικός, Πλ: Καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων, Αδ: Αδενοκαρκίνωμα, AM: Αδιαφοροποίητο Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα, MT: Μέση Τιμή, SD: Σταθερά Απόκλιση

μέθοδο πολλαπλής RT-PCR. Είναι ενδιαφέρον το εύρημα ότι το mRNA του *c-mos* ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα (φυσιολογικά και παθολογικά), όπως και στις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες στην ανοσοϊστοχημική ανάλυση. Η πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων αποκλείστηκε με τη χρήση κατάλληλων δεικτών (βλ. Υλικό και Μέθοδοι). Πάντως, η πολλαπλή RT-PCR απεκάλυψε σε 15 από τις 53 αξιολογήσιμες περιπτώσεις (28%) σημαντικά υψηλότερα επίπεδα του mRNA του *c-mos* στους όγκους συγκριτικά με τους σύστοιχους φυσιολογικούς ιστούς (Πίνακας 1, Εικόνα 3). Στα δείγματα αυτά, τα σχετικά επίπεδα του mRNA του *c-mos* κυμαίνονταν ανάμεσα στο 3 και 7,2. Είναι εξαιρετικά ενδιαφέροντα η εύρεση απόλυτης σύμπτωσης ανάμεσα στη θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για το *c-mos* και την υπερέκφραση του mRNA του *c-mos* (Πίνακας 1).

iii) Αλλοιώσεις του γονιδίου του *c-mos*: Τρία

από τα 56 δείγματα (5%) εμφάνισαν ειδικές για τον όγκο μεταβολές στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα (Πίνακας 1, Εικόνα 4). Η ανάλυση της πρωτοδιάταξης απεκάλυψε μια παρερμηνεύσιμη και δύο σιωπηλές μεταλλάξεις. Η παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη οδήγησε σε αντικατάσταση αργινίνης (R) από λευκίνη (L) (CGG>CTT) στο κωδικόνιο 22 (περίπτωση 31) (Εικόνα 5α), ενώ οι σιωπηλές μεταλλάξεις εντοπίστηκαν στο κωδικόνιο 260 (GCC>GCA) (περίπτωση 43) και στο κωδικόνιο 324 (AGC>AGT) (περίπτωση 48). β. p53

i) Ανοσοϊστοχημεία και σχέση με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους: Έκφραση της p53 παρατηρήθηκε σε 33 από τις 55 αξιολογήσιμες περιπτώσεις (60%). Η σχέση της p53 με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους των ασθενών συνοψίζεται στον Πίνακα 3. Σημαντική συσχέτιση σημειώθηκε μεταξύ της θετικής χρώσης για p53 και του καπνίσματος [30/44 (68%) έναντι 3/11 (27%), P=0,013 με το Χ2

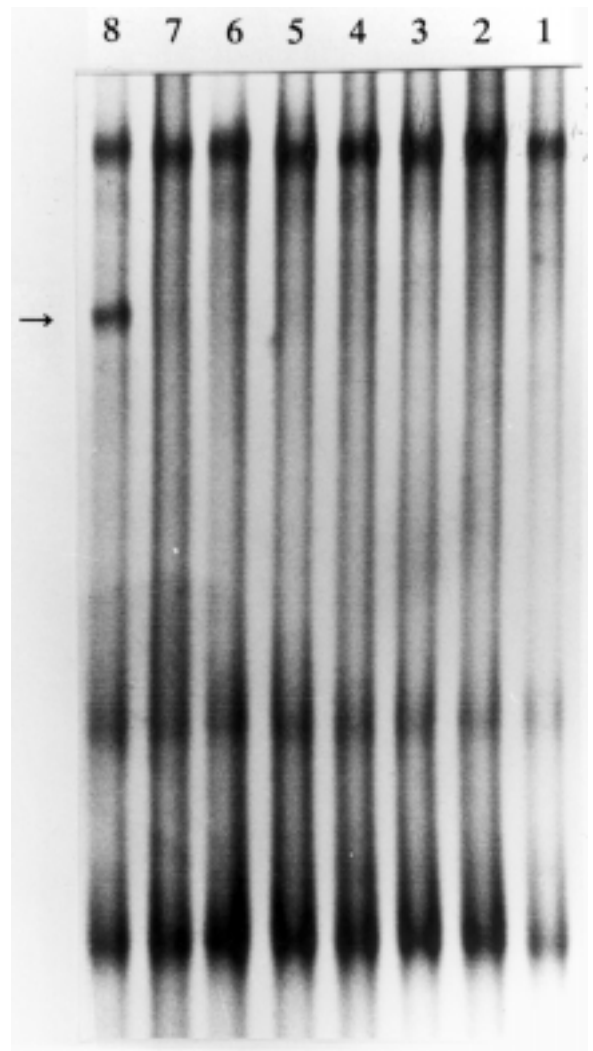
κατά Pearson, Πίνακας 3 και $P=0.020$, odds ratio=5,714 (1,313-24,871) με ανάλυση λογιστικής εξάρτησης].

ii) Αλλοιώσεις του γονιδίου της *p53*: Η ανάλυση της πρωτοδιάταξης αποκάλυψε μεταλλάξεις του γονιδίου *p53* σε 24 από τις 56 περιπτώσεις (43%). Είκοσι μεταλλάξεις ήταν παρερμηνεύσιμες, δύο ήταν σιωπηλές (περιπτώσεις 43 και 62) και δύο ήταν μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης (περιπτώσεις 27 και 44) (Πίνακας 1, Εικόνα 5b). Ένα ακόμη δείγμα (περίπτωση 20) εμφάνισε ειδική για τον όγκο μεταβολή της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας στη μέθοδο SSCP, αλλά περαιτέρω ανάλυση της πρωτοδιάταξης δεν πραγματοποιήθηκε επειδή δεν υπήρχε διαθέσιμο υλικό. Μια έντονα σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε ανάμεσα στις μεταλλάξεις του γονιδίου *p53* και τη δετική ανοσοϊστοχημική χρώση της *p53* [20/33 (61%) έναντι 4/22 (18%), $P=0,005$ με το χ^2 κατά Pearson]. Ανάλυση της γονιδιακής αστάθειας με το δείκτη D17S179E (Εικόνα 6) έδειξε απώλεια ετεροζυγωτίας σε 14 από τα 21 αξιολογήσιμα δείγματα (67%). Επτά από αυτές τις περιπτώσεις (50%) συνοδεύονταν από σημειακές μεταλλάξεις της *p53* στο εναπομείναν αλληλόμορφο (Πίνακας 1). Επειδή το αποτέλεσμα της ανοσοϊστοχημείας για τη *p53* συ-

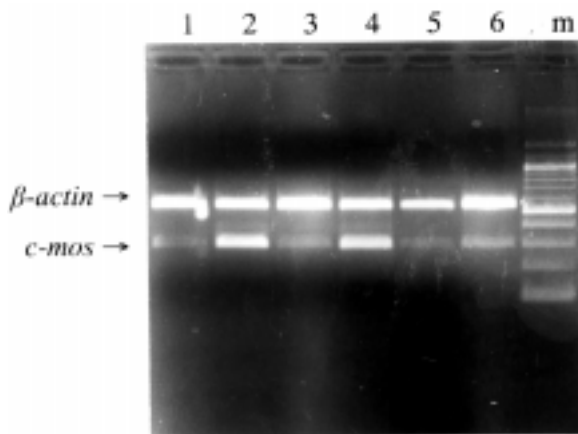
σχετίζεται έντονα με την ανάλυση της πρωτοδιάταξης και ο αριθμός των αξιολογήσιμων δειγμάτων στον γονιδιακό τόπο D17S179E ήταν μάλλον μικρός, αποφασίσαμε να θεωρήσουμε τη δετική ανοσοϊστοχημική χρώση για την *p53* ως ενδεικτική αλλοιώσεων του γονιδίου *p53* για τις ακόλουθες αναλύσεις.

2. Πλοειδία

α. Σχέση με τις κλινικοπαθολογικές παρα-



Εικόνα 4. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα της μεθόδου SSCP για το τμήμα 1 του γονιδίου του *c-mos* σε δείγματα σε ζεύγη φυσιολογικού-παθολογικού ιστού (1&2 δείγμα 28, 3&4 δείγμα 29, 5&6 δείγμα 30 και 7&8: δείγμα 31). Οι διαφορές στο ηλεκτροφορητικό προφίλ των δειγμάτων του όγκου σε σύγκριση με τα φυσιολογικά υποδεικνύονται με βέλη.



Εικόνα 3. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα της πολλαπλής RT-PCR για την εκτίμηση των επιπέδων του mRNA του *c-mos*. m: 100bp ηλεκτροφορητικός DNA μάρτυρας, 1&2 και 3&4: Δείγματα σε ζεύγη φυσιολογικού και παθολογικού ιστού (δείγμα 10 και 11 αντίστοιχα) με υπερέκφραση του mRNA του *c-mos*. 5&6: Δείγμα σε ζεύγη φυσιολογικού-παθολογικού ιστού (περίπτωση 13) με φυσιολογική έκφραση του mRNA του *c-mos*.

α. Mos

Γονίδιο : mos

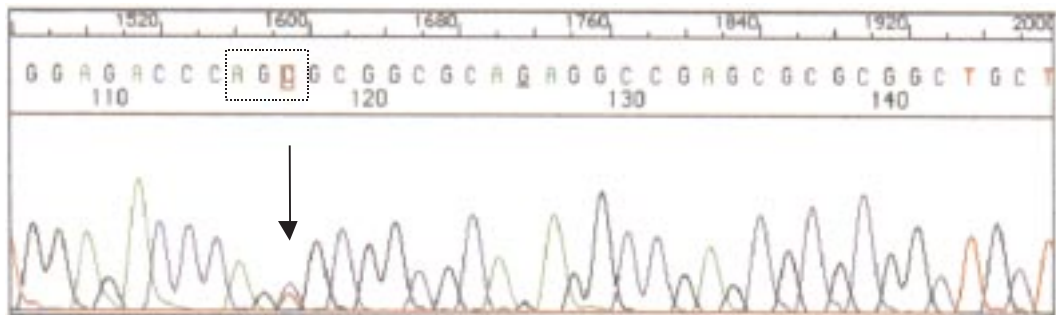
Τμήμα : 4

Δείγμα : 48

Κωδικόνιο : 324

Μεταλλαγή : AGC→AGT

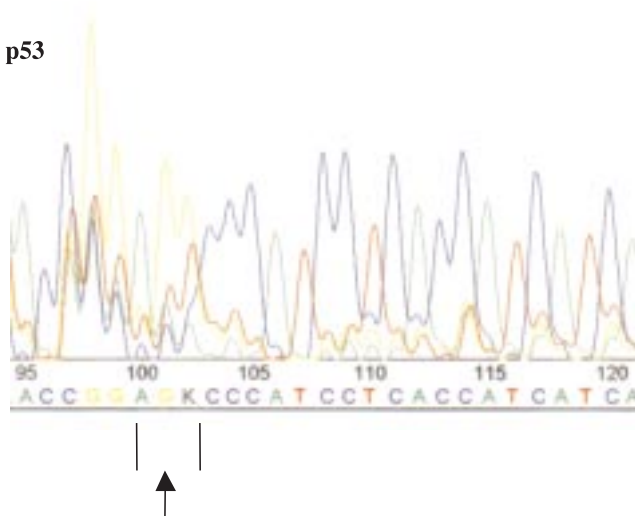
Αμινοξική Αντικατάσταση : S→S

**β. p53**

Γονίδιο : p53

Εξόνιο: 7

Δείγμα: 4



Μεταλλαγή: 249

Μεταλλαγή: AGG →

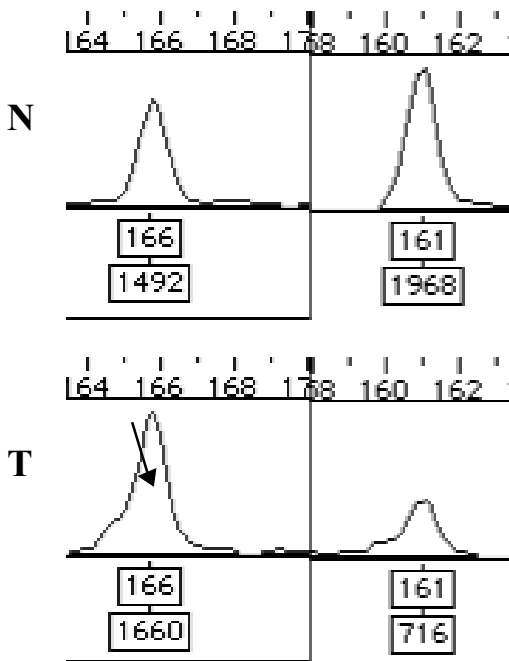
Αμινοξική Αντικατάσταση: R S

Εικόνα 5. Αντιπροσωπευτικός αυτόματος προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης του DNA: **α.** σε καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα (περίπτωση 48) με μεταβολή της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του τμήματος 4 του *c-mos* στη μέθοδο SSCP. Η θέση της μετάλλαξης του *c-mos* εντοπίζεται στο κωδικόνιο 324 και μεταβάλλει το AGC(S) σε AGT(S). **β.** σε αδιαφοροποίητο μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (περίπτωση 4) με μεταβολή της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας στο εξόνιο 7 του γονιδίου p53 στη μέθοδο SSCP. Η θέση της μετάλλαξης του γονιδίου p53 εντοπίζεται στο κωδικόνιο 249 και μεταβάλλει το AGG(R) σε AGT(S).

μέτρους: Είκοσι εννέα από τους 51 αξιολογησιμους όγκους (57%) καταμετρήθηκαν ως ανευπλοειδικοί (Εικόνα 7). Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην πλοειδία και τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των

όγκων.

β. Σχέση με τη *c-mos* ή την p53: Αν και οι περιπτώσεις στις οποίες το *c-mos* βρέθηκε υπερεκφρασμένο συνδέονταν συχνότερα με ανευπλοειδία, αυτή η σχέση δεν ήταν στατιστι-



Εικόνα 6. Αντιπροσωπευτικό αποτέλεσμα της ανάλυσης της γονιδιακής αστάθειας (βλ. Μεθόδους) με το χρωμοσωμικό δείκτη D17S179E (περίπτωση 54). Η απώλεια ετεροζυγωτίας υποδεικνύεται με βέλος. N: φυσιολογικό δείγμα, T: παθολογικό δείγμα

κά σημαντική (Πίνακας 3), ενώ η ανευπλοειδία συσχετιζόταν ισχυρά με την υπερέκφραση του *p53* (Πίνακες 3 και 4).

3. Αποπτωτικός δείκτης (ΑΔ)

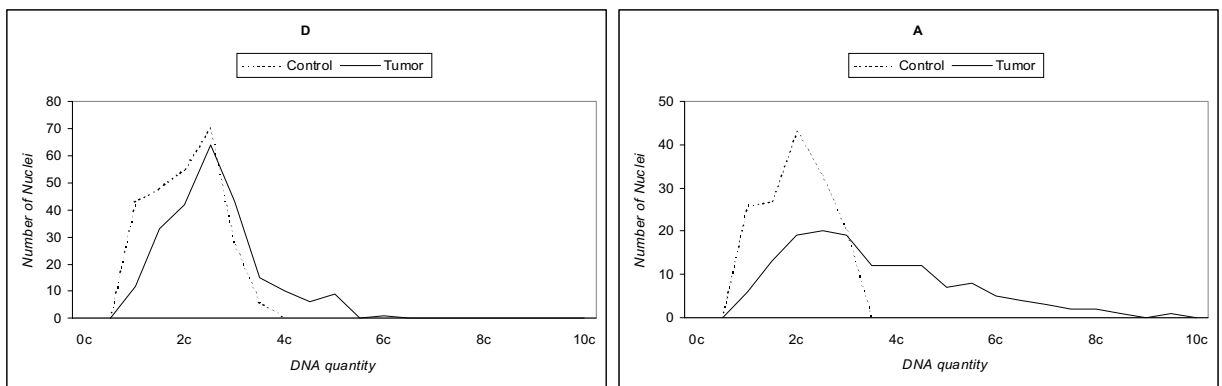
α. Σχέση με την πλοειδία και τις κλινικο-

παθολογικές παραμέτρους: Ο ΑΔ κυμαινόταν από 0,13% ως 10,67% με μέση τιμή $2,037 \pm 2,029\%$ (49 αξιολογήσιμες περιπτώσεις) (Εικόνα 8). Οι ανευπλοειδικοί όγκοι εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερο ΑΔ από τους διπλοειδείς όγκους [$P=0,031$ με τη δοκιμασία Kruskal-Wallis και $P=0,017$, Διαφορά στη Μέση Τιμή (ΔMT) του $\log AD$: $-0,628$ ($-1,139$, $-0,117$) με ANOVA]. Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στον ΑΔ, το κάπνισμα και τον ιστολογικό υπότυπο των καρκινωμάτων.

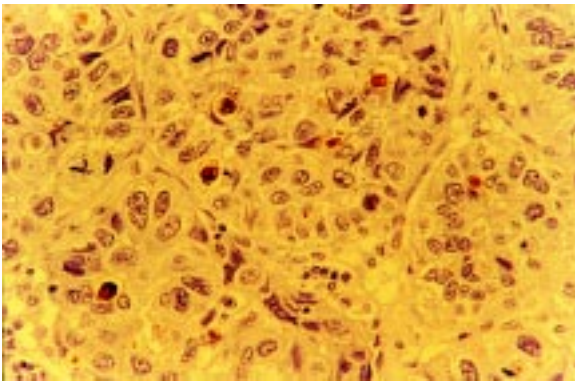
β. Σχέση με το *c-mos* ή την *p53*: Οι *c-mos(+)* όγκοι φάνηκαν να έχουν χαμηλότερο ΑΔ από τους *c-mos(-)* όγκους, αλλά αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακας 3). Εξάλλου, οι *p53(+)* περιπτώσεις συνδέονταν με σημαντικά χαμηλότερες τιμές ΑΔ από τις *p53(-)* (Πίνακες 3 και 4).

4. Ανάλυση του ρυθμού πολλαπλασιασμού

α. Σχέση με την πλοειδία, την απόπτωση και τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους: Στην παρούσα μελέτη, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού, που αντανακλάται από το δείκτη πολλαπλασιασμού ($\Delta \Pi$), εκτιμήθηκε με υπολογισμό του ποσοστού των κυττάρων που εξέφραζαν το MIB-1, το πιο αξιόπιστο αντίσωμα για την εκτίμηση του κλάσματος αύξησης με ανοσοϊστοχημεία³⁵. Τα ποσοστά των δετικών για το Ki-67 κυττάρων, στις καρκινικές περιοχές, κυμαίνονταν από 6,2% ως 70,4%, και ο μέσος $\Delta \Pi$ ήταν $35,06 \pm 12,16\%$ [52 αξιολογήσιμες περιπτώσεις] (Εικόνα 2β). Οι ανευπλοειδικοί όγκοι εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερες τιμές $\Delta \Pi$ από τους διπλοειδείς [$P=0,006$, $\Delta MT=9,57$ ($2,94$, $16,21$)



Εικόνα 7. Διαγράμματα που παριστούν το περιεχόμενο σε DNA των κυττάρων του όγκου (Ανάλυση πλοειδίας) (βλ. Μεθόδους). D: διπλοειδής όγκος (περίπτωση 9), A: ανευπλοειδικός όγκος (περίπτωση 10).



Εικόνα 8. Καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα (περίπτωση 20) με υψηλό αποπτωτικό δείκτη (3,5%) (TUNEL) (DAB ως χρωμογόνο) (βλ. Μεθόδους) και αιματοξυλίνη ως βασική χρώση (x400).

με ANOVA], ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο ΔΠ και τον ΑΔ. Ο ΔΠ ήταν σημαντικά υψηλότερος στα καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων από τα αδενοκαρκινώματα [$P=0,006$ στη δοκιμασία Kruskal-Wallis και $P=0,004$, $\Delta MT=-10,20$ (-16,93, -3,74) με ANOVA] και στους καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές ($P=0,019$ με τη δοκιμασία Kruskal-Wallis).

β. Σχέση με τη *c-mos* ή την *p53*: Οι *c-mos*(+) και οι *c-mos*(-) όγκοι είχαν παρόμοιες τιμές ΔΠ, ενώ οι *p53*(+) περιπτώσεις είχαν σημαντικά υψηλότερους ΔΠ από τις *p53*(-) (Πίνακες 3 και 4).

5. Πρότυπα έκφρασης των *c-mos* και *p53*

α. Σχέση των προτύπων με τις κλινικοπα-

θολογικές παραμέτρους: Όλα τα δεωρητικά αναμενόμενα πρότυπα των *c-mos/p53* παρατηρήθηκαν (Πίνακας 3). Συχνότερα εμφανίστηκαν τα πρότυπα *c-mos*(-)/*p53*(+) και *c-mos*(-)/*p53*(-) με 19 ασθενείς (37%) το καθένα, ακολουδούμενα από το φαινότυπο *c-mos*(+)/*p53*(+) που εμφανίστηκε σε 12 περιπτώσεις (23%). Η ανάλυση με Χ² κατά Pearson έδειξε συσχέτιση ανάμεσα στα πρότυπα έκφρασης των *c-mos/p53*, το κάπνισμα ($P=0,011$, Πίνακας 3) και το στάδιο της νόσου ($P=0,018$, Πίνακας 3). Όμως αυτές οι σχέσεις βρέθηκαν ανεξάρτητες όταν εφαρμόστηκε το μοντέλο λογιστικής εξάρτησης.

β. Σχέση με την πλοειδία, τον αποπτωτικό δείκτη και το ρυθμό πολλαπλασιασμού: Οι *c-mos*(+)/*p53*(+) και *c-mos*(-)/*p53*(+) φαινότυποι είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές ΑΔ και συνδέονταν συχνότερα με ανευπλοειδία από τους *c-mos*(-)/*p53*(-) όγκους (Πίνακας 4, Εικόνα 9), ενώ αναφορικά με τον πολλαπλασιασμό, μόνο οι όγκοι με προφίλ *c-mos*(-)/*p53*(+) εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερες τιμές ΔΠ από τους *c-mos*(-)/*p53*(-) όγκους (Πίνακας 4, Εικόνα 9).

6. Ανάλυση επιβίωσης

Η ανάλυση επιβίωσης (διάρκεια παρακολούθησης έως 37 μήνες) με τη χρήση της μεθόδου Kaplan-Meier δεν απεκάλυψε στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στην πορεία του ασθενούς, το *c-mos*, την υπερέκφραση της *p53* και τα πρότυπα των *c-mos/p53*.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η βιβλιογραφία πάνω στις αλλοιώσεις των

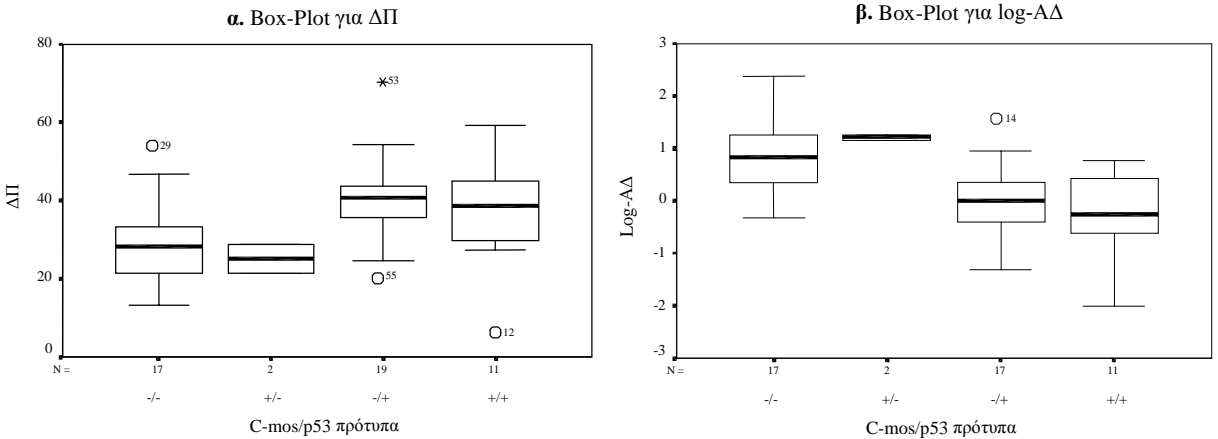
Πίνακας 4. Σχέση ανάμεσα στα ΔΠ, logΑΔ, πλοειδία και *p53*, πρότυπα *c-mos/p53* (το *c-mos* δε συσχετίζεται με καμία από τις εξετασθείσες παραμέτρους)

	Ανάλυση Μεταβλητότητας				Ανάλυση Λογιστικής Εξάρτησης	
	ΔΠ		logΑΔ		Πλοειδία	
	ΔMT(95%ΟΑ)	P	ΔMT(95%ΟΑ)	P	Odds ratio(95%ΟΑ)	P
Intercept	29.34(24.22, 34.45)	<0.001	0.921(0.579, 1.262)	<0.001	-	0.083
<i>p53</i> (+)	9.31(2.79-15.82)	0.006	-0.934(-1.371, -0.498)	<0.001	6.708(1.923- 23.409)	0.003
<i>p53</i> (-)	-	-	-	-	-	-
Intercept	29.53(23.83, 35.22)	<0.001	0.886(0.532, 1.240)	<0.001	-	0.039
<i>c-mos</i> (+)/ <i>p53</i> (+)	7.25(-1.83, 16.33)	0.115	-1.099(-1.663, -0.534)	<0.001	8.667(1.526- 49.220)	0.015
<i>c-mos</i> (-)/ <i>p53</i> (+)	11.20(3.36, 19.03)	0.006	-0.877(-1.378, -0.377)	0.001	8.450(1.843- 38.753)	0.006
<i>c-mos</i> (+)/ <i>p53</i> (-)	-4.38(-21.92, 13.17)	0.618	0.331(-0.760, 1.421)	0.544	4360(0.000-5.110E+25)	0.747
<i>c-mos</i> (-)/ <i>p53</i> (-)	-	-	-	-	-	-

ΔΠ: Δείκτης Πολλαπλασιασμού, ΑΔ: Αποπτωτικός Δείκτης

+: Θετικό, -: Αρνητικό

ΔMT: Διαφορά Μέσης Τιμής, ΟΑ: Όρια Αξιοπιστίας



Εικόνα 9. Στατιστικά διαγράμματα (box-plots) που παριστούν το δείκτη πολλαπλασιασμού (ΔΠ) (α) και τον αποπτωτικό δείκτη (ΑΔ) (β) των όγκων με ορισμένα πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών.

συστατικών της οδού των MAP κινασών στον καρκίνο του πνεύμονα είναι περιορισμένη³⁶. Εντοπίσαμε μόνο μία μελέτη που έδειξε ασθενή έκφραση του *c-mos* σε πνευμονικό ιστό ποπτικιού³⁷. Η μελέτη μας, η οποία ασχολείται με το *c-mos* και τη σχέση του με την πρωτεΐνη p53, τις παραμέτρους της αύξησης του όγκου και τη χρωμοσωμική αστάθεια σε μη μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα στον άνθρωπο, παρέχει ορισμένα νέα ευρήματα.

Υπερέκφραση του *c-mos* παρατηρήθηκε στο 27% των όγκων. Η παρατήρηση ότι η χρώση περιοριζόταν κυρίως στο κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη των κακοηδών κυττάρων συμφωνεί με το γεγονός ότι το *c-mos* είναι κυτταροπλασματική κινάση σερίνης-θρεονίνης¹⁴. Παρ' όλα αυτά, ανοσοϊστοχημική χρώση σημειώθηκε και στους πυρήνες ορισμένων καρκινικών κυττάρων. Το φαινόμενο της μεταφοράς στον πυρήνα έχει παρατηρηθεί σε MAPκινάσες και πιθανώς σχετίζεται με το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της μεταγραφής³⁸. Επιπρόσθετα, οι Min Wang και συν. έδειξαν ότι *c-mos* που εισήχθη με μικροέγχυση σε σωματικά κύτταρα θηλαστικών μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα και να συνδεθεί με τους κινητοχώρους διακόπτοντας τη φυσιολογική πρόοδο της μίτωσης³⁹. Η πυρηνική χρώση του *c-mos* μπορεί λοιπόν να συνδέεται με την ικανότητά του, όπως δείχθηκε *in vitro*, να υπερδέσει μια μειωτική διαδικασία στο μιτωτικό πρόγραμμα των σωματικών κυττάρων επηρεάζοντας αρνητικά τη χρωμοσωμική σταθερότητα²². Το παραπάνω μπορεί να σχετίζεται με το εύρημά μας ότι το 77% των δετικών για *c-*

mos περιπτώσεων στη βάση μας συνδέοταν με ανευπλοειδία. Ανοσοϊστοχημική ετερογένεια σημειώθηκε επίσης μέσα στους ίδιους τους όγκους, πιθανώς αντανakλώντας διακυμάνσεις του *c-mos* κατά τον κυτταρικό κύκλο^{16,40} ή κλωνική επέκταση των δετικών για *c-mos* κυττάρων, κατά την εξέλιξη του καρκίνου. Εντονότερη έκφραση της πρωτεΐνης *c-mos* στα καρκινώματα σταδίων II/III (34%) από τα σταδίου I (17,4%) (P=0,018) υποστηρίζει την ανωτέρω δεώρηση.

Η συμφωνία ανάμεσα στη δετική ανοσοϊστοχημική χρώση για το *c-mos* και τα υψηλά επίπεδα του mRNA του *c-mos* μαζί με την απουσία γονδιακής ενίσχυσης υποδεικνύει ότι η ανώμαλη έκφραση είναι κυρίως συνέπεια αυξημένης μεταγραφής. Αυτό είναι ενδιαφέρον εύρημα, επειδή φυσιολογικά το *c-mos* μεταγράφεται ειδικά στα γεννητικά κύτταρα και παίζει κρίσιμο ρόλο στη μείωση, ενώ στα σωματικά κύτταρα είναι μεταγραφικά σιωπηλό ή εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα¹⁶. Έχει δειχθεί ότι το *c-mos* στα σωματικά κύτταρα καταστέλλεται από ένα αρνητικό ρυθμιστικό στοιχείο (negative regulatory element, NRE), που εντοπίζεται μεταξύ 392 και 502bp πριν της δέσης έναρξης⁴¹. Ένας υποψήφιος αναστολέας του *c-mos* ανιχνεύτηκε σε πυρηνικά εκχυλίσματα από αρκετές σωματικές κυτταρικές σειρές αλλά όχι σε ανδρικά γεννητικά κύτταρα στα οποία το *c-mos* μεταγραφόταν⁴². Διατάραξη της αλληλεπίδρασης του αναστολέα με το NRE (π.χ. έλλειψη ή μεταλλάξεις του NRE, ελαττωματική λειτουργία ή έκφραση του αναστολέα) ίσως εξηγεί την ενεργοποίηση της μεταγραφής του

c-mos στις περιπτώσεις μας. Γνωρίζουμε ότι υπάρχει μόνο μία προηγούμενα δημοσιευμένη μελέτη στους πρωτοπαθείς ανδρώπινους όγκους, που περιγράφει την ανίχνευση του mRNA του *c-mos* σε καρκινώματα του θυρεοειδούς⁴³. Οι συγγραφείς επίσης παρατήρησαν ανώμαλα μετάγραφα σε ένα μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς⁴³. Εντούτοις, η έλλειψη υλικού εσωτερικής αναφοράς (παρακείμενου φυσιολογικού ιστού του θυρεοειδούς) στην εν λόγω μελέτη, καθιστά δύσκολη την κρίση για το ρόλο του *c-mos* στην καρκινογένεση στο θυρεοειδή. Αντίθετα, στη μελέτη μας επιδείξαμε εντονότερη έκφραση του *c-mos* σε καρκινικό πνευμονικό ιστό σε σχέση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Είναι αξιοσημείωτο ότι το γονίδιο του *c-mos* εμφανίζει ομολογία στην αλληλουχία του με το γονίδιο E2 του ιού του ανδρώπινου δηλώματος (HPV) και διασταυρούμενες αντιδράσεις ίσως οδηγούν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα⁴⁴. Έχουμε όμως πρόσφατα εξετάσει τη βάση των καρκινωμάτων για HPV αλλά δε βρέθηκε ένδειξη μόλυνσης από HPV⁴⁵.

Δομικές ανωμαλίες στο *c-mos* και τη γειτονική του περιοχή ανιχνεύθηκαν σε πλειομορφικά αδενώματα από τους Stenman και συν.⁴⁶. Ανάλυση με χρήση περιοριστικής ενδονουκλεάσης έδειξε ότι αυτές οι γενετικές ανωμαλίες ήταν το αποτέλεσμα πολλών σημειακών μεταλλάξεων παρά αναδιατάξεων⁴⁶. Η ανάλυση της πρωτοδιατάξης του *c-mos* στις περιπτώσεις μας έδειξε μια παρερμηνεύσιμη και δύο σιωπηλές σημειακές μεταλλάξεις. Δε βρήκαμε τον παλαιότερα αναφερθέντα πολυμορφισμό (μεταστροφή G σε T) στο κωδικόνιο 105^{47,48}. Η παρερμηνεύσιμη μεταλλαγή που παρατηρήθηκε στην περίπτωση 31, οδήγησε σε αντικατάσταση R>L στο κωδικόνιο 22. Η σημασία της είναι ασαφής, αφού η πρωτεΐνη *c-mos* σε αυτό τον ασθενή δεν ήταν ανιχνεύσιμη και τα επίπεδα του mRNA του *c-mos* ήταν φυσιολογικά. Το κωδικόνιο 22 βρίσκεται κοντά στη σερίνη (S) 3, της οποίας η φωσφορυλίωση είναι σημαντική για τη σταθερότητα του *c-mos*^{49,50} και την αλληλεπίδρασή του με την κινάση της MAPK (MKK)⁵¹. Επιπρόσθετα, η S3 φωσφορυλιώνεται *in vitro* από ρυθμιζόμενες από εξωκυττάρια σήματα κινάσες (extracellular signal-regulated kinases, ERKs) σχηματίζοντας κύκλωμα δετικής ανατροφοδότησης⁵². Έτσι, μια πιθανότητα είναι ότι η μετάλλαξη αυτή, στην N-τελική περιοχή, αποσταθεροποιεί το *c-mos*, και διακό-

πτει το κύκλωμα ανατροφοδότησης *mos*-ERK, επηρεάζοντας τη μεταγωγή του σήματος στην οδό των ERK.

Η οδός *mos*/MKK/ERK εμπλέκεται στις κυτταρικές διεργασίες της αύξησης [ανασκοπείται στα 14,38,40,53] και της διαφοροποίησης⁵⁴. *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι το εξαγόμενο αυτής της οδού μεταγωγής σημάτων (πολλαπλασιασμός [ανασκοπούνται στο 14,38,40,52], αναστολή του κυτταρικού κύκλου⁵⁵, απόπτωση⁵⁵ και διαφοροποίηση⁵⁴) εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους, όπως από τον κυτταρικό τύπο^{14,54}, τη φάση του κυτταρικού κύκλου⁵⁵ και τα επίπεδα της πρωτεΐνης *c-mos*⁴⁰. Αυτή η ποικιλία δράσεων δεν αποτελεί εκπληκτικό εύρημα για μια κινάση της MAPKK (MKKKs), όπως το *c-mos*, επειδή αντίθετα με τις MAPKs, που αναγνωρίζονται ειδικά από τις αντίστοιχες MKKs, οι MKKKs αλληλεπιδρούν με αριθμό MKKs, καθιστώντας δυνατή την ποικιλία των κυτταρικών απαντήσεων³⁸. Λαμβάνοντας υπόψη τις ανωτέρω εμφανώς αντίθετες δράσεις του *c-mos*, οδηγηθήκαμε στη διερεύνηση της σχέσης του με τις κινητικές παραμέτρους του όγκου, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Αν και δε βρέθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις *c-mos*(+) και *c-mos*(-) ομάδες ασθενών, ο μέσος ΑΔ των όγκων που υπερέεφραζαν το *c-mos* ήταν χαμηλότερος από ότι στους αρνητικούς για το *c-mos* (Πίνακας 3). Αυτό το εύρημα έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Fukasawa και συν., που ανέφεραν ότι αυξημένα επίπεδα του *c-mos* οδηγούν σε απόπτωση ή αναστολή του κυτταρικού κύκλου⁵⁵. Μια πιθανή εξήγηση για αυτή την προφανή ασυμφωνία είναι ότι σε πολλές από τις *c-mos*(+) περιπτώσεις, ένας επαγωγέας της απόπτωσης ίσως είναι ελαττωματικός. Με αφορμή την πρόσφατη μελέτη των Fukasawa και συν., οι οποίοι έδειξαν ότι η απόπτωση ή η αναστολή της αύξησης που επάγονται από την οδό *c-mos*/MKK/ERK είναι εξαρτώμενες από την p53¹¹, διερευνήσαμε τη σχέση ανάμεσα στην έκφραση του *c-mos* και την p53 και βρήκαμε ότι η υπερέκφραση του *c-mos* όντως συνοδεύεται συχνά από μεταλλάξεις του γονιδίου p53 (Πίνακες 1 και 3). Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι οι ανοσοϊστοχημικοί φαινότυποι *c-mos*(+)/p53(+) και *c-mos*(-)/p53(+) είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές ΑΔ και συνδέονταν συχνότερα με ανευπλοειδία σε σχέση με το *c-mos*(-)/p53(-) - το τελευταίο δεν παρουσιάζει διαφορά με το πρότυπο *c-mos*(+)/p53(-)

(Πίνακας 4) - ενισχύει την άποψη ότι η φυσιολογική p53 παίζει ρόλο "φύλακα" αναστέλλοντας τη διαμεσολαβούμενη από ογκογονίδια ενεργοποίηση της οδού *mos*/MKK/ERK¹¹. Παρόμοια λειτουργία "φύλακα" φαίνεται να επιτελεί η φυσιολογική p53 έναντι και άλλων ογκογονιδίων όπως το *ras*^{5,56} και η β-κατενίνη⁵⁷. Το εύρημα ότι οι όγκοι με αλλοιώσεις του γονιδίου p53 εμφάνισαν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού (P=0,004), ελαττωμένο αποπτωτικό δείκτη (P=0,001) και χρωμοσωμική αστάθεια (ανευπλοειδία) (P=0,005) σε σύγκριση με την ομάδα των περιπτώσεων με φυσιολογική p53 (Πίνακας 3) υποστηρίζει τον κεντρικό ρόλο της φυσιολογικής p53 ως κυτταρικού φύλακα της αύξησης και της διαίρεσης⁵⁸.

Αυτά τα δεδομένα μας οδηγούν σε σκέψεις αναφορικά με το ρόλο της υπερέκφρασης του *c-mos* σε ένα καρκινικό κύτταρο, αφού η σχέση της με την κινητική του όγκου και τη χρωμοσωμική αστάθεια φαίνεται να εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την ακεραιότητα της p53. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι το υπερεκφρασμένο *c-mos* ίσως παρακάμπτει ορισμένα στάδια στη φάση G0, τα οποία φυσιολογικά επάγονται από αυξητικούς παράγοντες καθιστώντας τα κύτταρα αναίσθητα σε και ανεξάρτητα από ρυθμιστικά σήματα για την αύξηση. Η υποστήριξη για αυτή την υπόθεση προέρχεται από μια πρόσφατη έρευνα σύμφωνα με την οποία μετασχηματισμένες από το *v-mos* ινοβλάστες ποντικού χαρακτηρίζονταν από ταχεία αύξηση και ελαττωμένες απαιτήσεις σε ορό, με ταυτόχρονη αναστολή της μεταγωγής σημάτων από τον προερχόμενο από τα αιμοπετάλια αυξητικό παράγοντα (PDGF)⁵⁹. Περαιτέρω στοιχεία παρέχουν οι μελέτες των Rhodes και συν. και Afshari και συν., οι οποίοι κατέδειξαν ότι μετασχηματισμένα από το *v-mos* κύτταρα NIH3T3 που καλλιεργήθηκαν απουσία ορού δεν ήταν ικανά να ελαττώσουν τη δραστηριότητα κρίσιμων για το κυτταρικό κύκλο ρυθμιστικών μορίων, μεταξύ των οποίων των κυκλινών D, E και A, των CDKs και των ειδικών για την S φάση συμπλόκων του E2F^{20,21}. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι το 14% των *c-mos*(+) όγκων δεν εμφάνισαν αλλοιώσεις του γονιδίου p53 και συνδέονταν με ανευπλοειδία υπαινίσσεται ότι ίσως η υπερέκφραση του *c-mos* επηρεάζει τη σταθερότητα του γονιδιώματος ανεξάρτητα της p53. Ένας πιθανός μηχανισμός είναι ότι η συνεχής διατήρηση του MPF κατά την όψιμη

φάση S θα μπορούσε να οδηγήσει σε πρόωρα γεγονότα συμπύκνωσης των χρωμοσωμάτων δημιουργώντας ελεύθερα άκρα DNA που έχουν υψηλό δυναμικό ανασυνδυασμού⁶⁰. Είναι αξιοσημείωτο ότι αυτές οι περιπτώσεις ήταν αδενοκαρκινώματα και, συγκριτικά με τα καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων και τα μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα, τα αδενοκαρκινώματα εμφανίζουν τη χαμηλότερη αναλογία μεταλλάξεων του γονιδίου p53³⁶. Τέλος, εφόσον η ευαισθησία σε ορισμένα φάρμακα-αναστολείς των μικροσωληνίσκων εξαρτάται από την επιτελούμενη από την p53 αναστολή της σχετιζόμενης με τους μικροσωληνίσκους πρωτεΐνης 4 (MAP4)⁶¹ και το *c-mos* ενεργοποιεί την οδό των κινασών των σχετιζομένων με τους μικροσωληνίσκους πρωτεϊνών^{62,63}, το πρότυπο των *c-mos* και p53 μπορεί να βοηθήσει σε ορισμένες περιπτώσεις στον καθορισμό της κατάλληλης χημειοθεραπευτικής στρατηγικής.

Άλλο ενδιαφέρον εύρημα ήταν ότι τέσσερις *c-mos*(-) περιπτώσεις (8,5%) εμφάνισαν απώλεια ετεροζυγωτίας στον τόπο D8S285 ο οποίος βρίσκεται στο τελομερικό άκρο του *c-mos* (Πίνακας 1). Δεδομένων των πειραματικών στοιχείων ότι το *c-mos* δρα ως ογκογονίδιο⁶⁴, η απώλεια του αλληλομόρφου δεν ήταν αναμενόμενη. Μια εξήγηση είναι ότι η απώλεια ετεροζυγωτίας στον τόπο D8S285 προκαλεί απώλεια της δραστηριότητας ενός καινούριου ογκοκατασταλτικού γονιδίου. Όμως, αν η απώλεια του αλληλομόρφου αναφέρεται στο *c-mos*, τότε ο ρόλος του στην καρκινογένεση είναι ακόμη πιο περίπλοκος. Δύο μελέτες που χρησιμοποίησαν *c-mos*/-knock-out ποντίκια έδειξαν ότι τα μεταλλαγμένα θήλα διέτρεχαν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης τερατωμάτων στην ωοθήκη, ενώ τα μεταλλαγμένα άρρενα ήταν φαινοτυπικά φυσιολογικά^{65,66}. Μια λογική ερμηνεία για το αποτέλεσμά μας είναι ότι αφού το *c-mos*, ως MKKK, βρίσκεται στο "σταυροδρόμι" της οδού των MAPK, η έλλειψή του, σε αυτή την ομάδα των καρκινωμάτων, ίσως παίζει συμπληρωματικό ρόλο στις δράσεις άλλου ελαττωματικού μορίου επιτρέποντας την επιβίωση του καρκινικού κυττάρου. Το εύρημα των Teng και συν., οι οποίοι ανίχνευσαν έλλειψεις του γονιδίου MKK4 σε διάφορες κυτταρικές σειρές συμφωνεί με τα αποτελέσματά μας⁶⁷.

Συνοπτικά, συγκεντρώθηκαν στοιχεία ότι η πρωτεΐνη *c-mos* υπερεκφράζεται σχετικά συχνά λόγω αυξημένης μεταγραφής στα μη μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα. Οι

επιδράσεις της στην κινητική του όγκου και τη χρωμοσωμική αστάθεια φαίνονται να εξαρτώνται κατά κύριο λόγο από την ακεραιότητα της p53. Η ανίχνευση απώλειας του αλληλομόρφου στην περιοχή του c-mos υπογραμμίζει την ανάγκη περαιτέρω διαλεύκανσης του ρόλου των MAPK στην καρκινογένεση στον πνεύμονα.

Η παρούσα εργασία τιμήθηκε με το βραβείο ΓΑΛΗΝΟΣ στο 7 Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής που έλαβε χώρα στην Αθήνα, 13-16 Απριλίου 2000.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-649, 1998.
- Arzimanoglou II, Gilbert F, Barber HR. Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer* 82:1808-1820, 1998.
- Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274:1664-1672, 1996.
- Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 187:112-126, 1999.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88:593-602, 1997.
- Wahl AF, Donaldson KL, Fairchild C, Lee FY, Foster SA, Demers GW, Galloway DA. Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nat Med* 2:72-79, 1996.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54:4855-4878, 1995.
- Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281:1674-1677, 1998.
- Milczarek GJ, Martinez J, Bowden GT. p53 Phosphorylation: biochemical and functional consequences. *Life Sci* 60:1-11, 1997.
- Fuchs SY, Adler V, Pincus MR, Ronai Z. MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10541-10546, 1998.
- Fusukawa K, Vande Woude GF. Synergy between the Mos/Mitogen-Activated Protein Kinase pathway and loss of p53 function in transformation and chromosome instability. *Mol Cell Biol* 17:506-518, 1997.
- Watson R, Oskarson M, Vande Woude GF. Human DNA sequence homologous to the transforming gene (mos) of Moloney murine sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:4078-4083, 1982.
- Caubert JF, Matthieu-Mahul D, Bernheim A, Larsen CJ, Berger R. Human proto-oncogene c-mos maps to 8q11. *EMBO J* 4:2245-2248, 1985.
- Sagata N. What does Mos do in oocytes and somatic cells? *BioEssays* 19:13-21, 1997.
- Choi T, Fukasawa K, Zhou R, Tessarollo L, Borror K, Resau J, Vande Woude GF. The mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7032-7035, 1996.
- Li C-CH, Chen E, O'Connell CD, Longo DL. Detection of c-mos proto-oncogene expression in human cells. *Oncogene* 8:1685-1691, 1993.
- Oskarsson M, McClements WL, Blair DG, Maizel JV, Vande Woude GF. Properties of a normal mouse cell DNA sequence (sarc) homologous to the src sequence of Moloney sarcoma Virus. *Science* 297:1222-1224, 1980.
- Davis R.J. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268:14553-14556, 1993.
- Okazaki K, Sagata N. The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *EMBO J* 14:5048-5059, 1995.
- Rhodes N, Innes CL, Propst F, Paules RS. Serum starved v-mos-transformed cells are unable to appropriately downregulate cyclins and CDKs. *Oncogene* 14:3017-3027, 1997.
- Afshari CA, Rhodes N, Paules RS, Mudryj M. Deregulation of specific E2F complexes by v-mos oncogene. *Oncogene* 14:3029-3038, 1997.
- Fukasawa K, Vande Woude GF. Mos overexpression in Swiss 3T3 cells induces meiotic-like alterations of the mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3430-3434, 1995.
- Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Kyroudi A, Veslemes M, Rassidakis A, Halazonetis TD, Field JK, Kittas C. Alterations of the p16-pRb pathway and the chromosome locus 9p21-22 in non-small-cell lung carcinomas: relationship with p53 and MDM2 protein expression. *Am J Pathol* 153:1749-1765, 1998.
- World Health Organization. The World Health Organization histologic typing of lung tumours. *Am. J Clin Pathol* 77:123-136, 1982.
- Fukasawa K, Zhou R, Matten WT, Armstrong AJ, Daar I, Oskarsson M, Sathyanarayana BK, Maclvor L, Wood TG, Vande Woude GF. Mutagenic analysis of functional domains of the

- mos proto-oncogene and identification of the sites important for MAPK activation and DNA binding. *Oncogene* 11:1447-1457, 1995.
26. Athanasiou A, Gorgoulis VG, Zacharatos P, Mariatos G, Kotsinas A, Liloglou T, Karameris A, Foukas P, Manolis EN, Field JK, Kittas C. C-mos immunoreactivity is an indicator of good prognosis in lung cancer. *Histopathology (Oxf.)* 37:45-54, 2000.
 27. Davis LG, Dibrner MD, Battey JF. *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing Co, Inc 1986.
 28. Bueso-Ramos CE, Yang Y, deLeon E, McCown P, Stass SA, Albitar M. The human MDM-2 oncogene is overexpressed in leukemias. *Blood* 82:2617-2623, 1993.
 29. Van Beveren C, Galleshaw JA, Jonas V, Berns AJ, Doolittle RF, Donoghue DJ, Verma IM. Nucleotide sequence and formation of the transforming gene of a mouse sarcoma virus. *Nature* 289:258-262, 1981.
 30. Gorgoulis V, Tsatsanis C, Ozanne B, Spandidos DA. Detection of epidermal growth factor receptor and *c-erbB-2* gene amplification in transitional cell bladder carcinoma using the differential PCR technique. *Int J Oncol* 4:1191-1197, 1994.
 31. Liloglou T, Maloney P, Xinarianos G, Fear S, Field JK. Sensitivity and limitations of high throughout fluorescent microsatellite analysis for the detection of allelic imbalance. Application in lung tumours. *Int J Oncol* 16:5-14, 2000.
 32. Auer GU, Falkmer UG, Zetterberg AD. Image cytometric nuclear DNA analysis in clinical tumor material. In: J.P.A. Baak (eds.) *Manual of quantitative pathology in cancer diagnosis and prognosis*. pp. 211-232. Heidelberg: Springer 1991.
 33. Hirano T, Franzen B, Kato H, Ebihara Y, Auer G. Genesis of squamous cell lung carcinoma. Sequential changes of proliferation, DNA ploidy, and p53 expression. *Am J Pathol* 144:296-302, 1994.
 34. Gavrieli Y, Serman Y, Ben Sasson S. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501, 1992.
 35. Kawai T, Suzuki M, Kono S, Shinomiya N, Rokutanda M, Takagi K, Ogata T, Tamai S. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in lung carcinoma: correlation with DNA flow cytometric analysis. *Cancer* 74:2468-2475, 1994.
 36. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 1378:F21-F59, 1998.
 37. Propst F, Rosenberg MP, Iyer A, Kaul K, Vande Woude GF. C-mos proto-oncogene RNA transcripts in mouse tissues: Structural features, developmental regulation and localization in specific cell types. *Mol Cell Biol* 7:1629-1637, 1987.
 38. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74:49-139, 1998.
 39. Min Wang X, Yew N, Peloquin JG, Vande Woude GF, Borisy GG. Mos oncogene product associates with kinetochores in mammalian somatic cells and disrupts mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8329-8333, 1994.
 40. Yew N, Strobel M, Vande Woude GF. Mos and the cell cycle: the molecular basis of the transformed phenotype. *Curr Opin Genet Dev* 3:19-25, 1993.
 41. Watson PH, Safneck JR, Le K, Dubik D, Shiu RP. Relationship of *c-myc* amplification to progression of breast cancer from in situ to invasive tumor and lymph node metastasis. *J Natl Cancer Inst* 85:902-907, 1993.
 42. Xu W, Cooper GM. Identification of a candidate *c-mos* repressor that restricts transcription of germ cell-specific genes. *Mol Cell Biol* 15:5369-5375, 1995.
 43. Parkar MH, Seid JM, Stringer BM, Ingemansson S, Woodhouse N, Goyns M.H. Abnormal expression of the MOS proto-oncogene in human thyroid medullary carcinoma. *Cancer Lett* 43:185-189, 1988.
 44. Danos O, Yavin M. *Cancer Cells: Oncogenes and Viral genes*. vol. 2. G.F. Vande Woude, A.J. Levine, W.C. Topp, J.D. Watson (eds.) pp. 291-294. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1984.
 45. Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, Kyroudi A, Rassidakis AN, Ikonomopoulos JA, Barbatis C, Herrington CS, Kittas C. Human papilloma virus (HPV) is possibly involved in laryngeal but not in lung carcinogenesis. *Hum Pathol* 30:274-283, 1999.
 46. Stenman G, Sahlin P, Mark J, Landys D. Structural alterations of the *c-mos* locus in benign pleomorphic adenomas with chromosome abnormalities of 8q12. *Oncogene* 6:1105-1108, 1991.
 47. Eng C, Foster KA, Healey CS, Houghton C, Gayther SA, Mulligan LM, Ponder BA. Mutation analysis of the *c-mos* proto-oncogene and the endothelin-B receptor gene in medullary thyroid carcinoma and pheochromocytoma. *Br J Cancer* 74:339-341, 1996.
 48. de Foy KA, Gayther SA, Colledge WH, Crockett S, Scott IV, Evans MJ, Ponder BA. Mutation analysis of the *c-mos* proto-oncogene in human ovarian teratomas. *Br J Cancer* 77:1642-4,

- 1998.
49. Nishizawa M, Okazaki K, Furuno N, Watanabe N, Sagata N. The 'second-codon rule' and autophosphorylation govern the stability and activity of Mos during the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 11:2433-2446, 1992.
50. Pham CD, Vuuyuru VB, Yang Y, Bai W, Singh B. Evidence for an important role of serine 16 and its phosphorylation in the stabilization of c-mos. *Oncogene* 18:4287-4294, 1999.
51. Chen M, Cooper JA. Ser-3 is important for regulating Mos interaction with and stimulation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Cell Biol* 15:4727-4734, 1995.
52. Matten WT, Copeland TD, Ahn NG, Vande Woude, G.F. Positive feedback between MAP kinase and Mos during *Xenopus* oocyte maturation. *Dev Biol* 179:485-492, 1996.
53. Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 265:966-970, 1994.
54. Benayoun B, Pelpel K, Solhonne B, Guillier M, Leibovitch S.A. Overexpression of Mos(rat) proto-oncogene product enhances the positive autoregulatory loop of MyoD. *FEBS Lett* 437:39-43, 1998.
55. Fukasawa K, Rulong S, Resau J, Pinto da Silva P, Vande Woude GF. Overexpression of mos oncogene product in Swiss 3T3 cells induces apoptosis preferentially during S-phase. *Oncogene* 10:1-8, 1995.
56. Hicks GG, Egan SE, Greenberg AH, Mowat M. Mutant p53 tumor suppressor alleles release ras-induced cell cycle growth arrest. *Mol Cell Biol* 11:1344-1352, 1991.
57. Damalas A, Ben-Ze'ev A, Simcha I, Shtutman M, Leal JF, Zhurinsky J, Geiger B, Oren M. Excess beta-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *EMBO J* 18:3054-3063, 1999.
58. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331, 1997.
59. Faller DV, Mundschau LJ, Forman LW, Quiñones MA. v-mos suppresses platelet-derived growth factor (PDGF) type-beta receptor autophosphorylation and inhibits PDGF-BB-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 269:5022-5029, 1994.
60. Vande Woude GF. Mos. In: G. Hardie and S. Hanks (eds.), *The Protein Kinase Factsbook* pp. 358-360, London: Academic Press 1995.
61. Zhang CC, Yang J-M, Bash-Babula J, White E, Murphy M, Levine AJ, Hait WN. DNA damage increases sensitivity to Vinca alkaloids and decreases sensitivity to Taxanes through p53-dependent repression of Microtubule-associated Protein 4. *Cancer Res* 59:3663-3670, 1999.
62. Yew N, Melini ML, Vande Woude GF. Meiotic initiation by the mos protein in *Xenopus*. *Nature* 355:649-652, 1992.
63. Hunt T. Cell cycle arrest and c-mos. *Nature* 355:587-588, 1992.
64. Schulz N, Propst F, Rosenberg MP, Linnoila RI, Paules RS, Kavzch R, Ogiso Y, Vande Woude GF. Pheochromocytomas and C-cell thyroid neoplasms in transgenic c-mos mice: a model for the human multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome. *Cancer Res* 52:450-452, 1992.
65. Colledge WH, Carlton MB, Udy GB, Evans MJ. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* 370:65-68, 1994.
66. Hashimoto N, Watanabe N, Furuta Y, Tamemoto H, Sagata N, Yokoyama M, Okazaki K, Nagayoshi M, Takeda N, Ikawa Y, et al. Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. *Nature* 370:68-71, 1994.
67. Teng DH, Perry WL 3rd, Hogan JK, Baumgard M, Bell R, Berry S, Davis T, Frank D, Frye C, Hattier T, et al. Human mitogen-activated protein kinase kinase 4 as a candidate tumor suppressor. *Cancer Res* 57:4177-4182, 1997.

Corresponding author

Gorgoulis Vassilis

Antaiou 53 Str.

Lamprini, Ano Patisia

Athens, GR-11146

GREECE

Tel/Fax: ++30-10-6535894

e-mail: histoclub@ath.forthnet.gr