



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΥΛΙΚΩΝ

**Πρωτεύουσα ανάπτυξη μεθοδολογιών για την έγκαιρη διάγνωση του
καρκίνου.**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Κολεβέντης Διαμαντής

Επιβλέπων: Δημήτριος-Διονύσιος Κουτσούρης
Καθηγητής Ε.Μ.Π

Αθήνα



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΥΛΙΚΩΝ

Πρωτεύουσα ανάπτυξη μεθοδολογιών για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου.

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Κολεβέντης Διαμαντής

Επιβλέπων: Δημήτριος-Διονύσιος Κουτσούρης
Καθηγητής ΕΜΠ

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

.....
Κουτσούρης Δημήτριος

Καθηγητής ΕΜΠ

.....
Ματσόπουλος Γιώργος

Καθηγητής ΕΜΠ

.....
Πρέντζα Ανδριάννα

Καθηγήτρια
Πανεπιστημίου Πειραιά

Αθήνα, Ιούλιος 2019

.....
Κολεβέντης Διαμαντής
Διπλωματούχος Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών Ε.Μ.Π

Copyright © Κολεβέντης Διαμαντής, Οκτώβριος

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ' ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τη συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τη συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου

Περίληψη

Η ασθένεια του καρκίνου ταλαιπωρεί ένα πολύ μεγάλο ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού και συνάμα ευθύνεται για εκατομμύρια θανάτους κάθε χρόνο. Η πολυπαραγοντική του φύση κάνει δύσκολη την κατανόησή του και η πολυπλοκότητα και διαφοροποίηση που τον χαρακτηρίζει για κάθε τύπο δυσχεραίνει την έγκαιρη διάγνωση, αυξάνοντας τα ποσοστά θνησιμότητας. Το εγχείρημα της ανάλυσης του καρκίνου και όλων των αλλοιώσεων που επιφέρει στον κυτταρικό κύκλο χρειάζεται τη συνδρομή των επιστημών της βιολογίας, της πληροφορικής και των μαθηματικών. Η πρωτεωμική, μαζί με τα εργαλεία και τις τεχνολογίες που χρησιμοποιεί στοχεύει στον εντοπισμό αυτών των αλλοιώσεων και στην ανακάλυψη ευαίσθητων και εξειδικευμένων καρκινικών δεικτών με υψηλή διαγνωστική αξία ειδικά στα πρώτα στάδια της ασθένειας. Η ανάγκη για ανεύρεση τέτοιων βιοδεικτών είναι επιτακτικότερη ειδικά για καρκινικούς τύπους με υψηλή παγκόσμια συχνότητα όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, ο καρκίνος του μαστού, ο ορθοκολικός και ο δερματικός.

Λέξεις κλειδιά: Καρκίνος, πρωτεωμική, μικροσυστοιχίες, βιοπληροφορική, μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης, βιοδείκτες, έγκαιρη διάγνωση.

Abstract

Cancer afflicts a very large proportion of world's population, causing millions of deaths annually. Its multifactorial nature makes it difficult to understand it and the complexity it beholds for each type makes early diagnosis difficult, with the result of higher mortality rates. The task of the analysis of the disruption of cell cycle needs the collaboration of Biology, Computer Science and Mathematics. The tools and technologies included in Proteomics aim to the identification of those changes and the discovery of sensitive, specialized cancer markers of high diagnostic value, especially at early disease stages. The need of finding such biomarkers is imperative especially for cancerous types with a high global incidence, such as lung, breast, colorectal and skin cancer.

Key words: Cancer, Proteomics, microarrays, bioinformatics, molecular signaling pathways, biomarkers, early diagnosis.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά κατ αρχάς τον καθηγητή κ. Κουτσούρη για το προνόμιο της ανάθεσης μιας εργασίας με ένα τόσο σύγχρονο και ενδιαφέρον αντικείμενο. Έπειτα θα ήθελα ευχαριστήσω να μεταδιδακτορικό κ Ιωάννη Μακρή για την βοήθεια, την υπομονή και την καθοδήγηση στην εκπόνηση της διπλωματικής. Τέλος ευχαριστώ όλους τους καθηγητές του τμήματος ΗΜΜΥ και συγκεκριμένα αυτούς της ροής της Βιοϊατρικής για τη γνώση, την κατεύθυνση και την αμεσότητα που μου προσέφεραν.

Σε δύσκολες συγκύριες χρειαζόμαστε τους φίλους και τους συγγενείς. Θα ήθελα να ευχαριστήσω για τον καιρό διαμονής μου στην Αθήνα τους καλούς μου φίλους Αλέξανδρο Καλαϊτζίδη και Ανδρέα Βρυζάλα για τη φιλοξενία. Στους Γιώργο Καρούζο, Πέτρο Καραλή, Κωνσταντίνο Καρατζούλη, Νίκο Παπαηλίου, Κατερίνα Καραγιάννη και Δημήτρη Δημάκη για την μόνιμη παρακίνηση, τις συζητήσεις και το ενδιαφέρον τους, θα ήθελα να κοινοποιήσω μέσω της παρούσας ενότητας της διπλωματικής την αγάπη μου και να τους ευχαριστήσω που ήταν πάντα δίπλα μου.

Επίσης χωρίς την οικογένειά μου δε θα ήταν δυνατή η διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής. Ευχαριστώ τον θείο μου, Φώτη Κολεβέντη για τη συμπαράσταση που μου έδειξε διαχρονικά. Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στη μητέρα μου Βασιλική και στα αδέρφια μου Κατερίνα, Ορέστη και Μαρία. Δίχως αυτούς δεν θα είχα τη δυνατότητα της συγγραφής της παρούσας διπλωματικής.

Το συγκεκριμένο σύγγραμμα θα ήθελα να το αφιερώσω στα δύο μικρότερα αδέρφια μου Μαρία Κολεβέντη και Ορέστη Κολεβέντη.

Περιεχόμενα

Περίληψη	4
Abstract	4
Ευχαριστίες.....	5

Πίνακας περιεχομένων

1.1 Το κύτταρο.....	13
1.2 Το Γενετικό υλικό	14
1.3 RNA.....	17
1.4 Γονίδια.....	19
1.5 Πρωτεΐνες.....	19
1.6 Κεντρικό Δόγμα της Βιολογίας.....	22
Βιβλιογραφία 1 ^{ου} κεφαλαίου.....	23
2.1 Καρκίνος.....	24
2.2 Γενετική του καρκίνου.....	24
2.3 Μεταλλάξεις.....	25
2.4 Μηχανική καρκίνου.....	27
2.4.1 Ογκογονίδια	28
2.4.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια	30
2.5 Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων.....	31
2.5.1 Αυτο-επάρκεια σε μηνύματα κυτταρικής αύξησης (growth signals).....	31
2.5.2 Απώλεια απόκρισης σε ανασταλτικά (αντιμιτογόνα) σήματα.....	32
2.5.3 Αντίσταση στην απόπτωση	32
2.5.4 Απόκτηση της ικανότητας ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού.....	33
2.5.5 Απόκτηση της ικανότητας επαγωγής της αγγειογένεσης.....	33
2.5.6 Απόκτηση της ικανότητας διείσδυσης σε παρακείμενους ιστούς και μετάστασης ..	34
2.6 Περιβαντολογικοί και χημικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην καρκινογένεση	35
Βιβλιογραφία 2 ^{ου} κεφαλαίου.....	41
3.1 Υπολογιστική Βιολογία.....	44
3.2 Το πρωτέωμα	45
3.3 Από την κλασική βιολογία στη Βιολογία των Συστημάτων	47
3.4 Εξελίξεις που οδήγησαν στη Πρωτεωμική και τη Βιολογία των Συστημάτων.....	48
3.4.1 Βιοπληροφορική	49
3.3.1.1 Ιστορική αναδρομή	49

3.3.1.2 Πρόγραμμα Αποκωδικοποίησης του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (The Human Genome Project, HGP).....	50
3.4 Ακολουθιακές Μέθοδοι βιοπληροφορικής	51
3.4.1 Στόχος των αλγόριθμων σύγκρισης ακολουθιών	52
3.4.2 Διαδικασία στοίχισης και σύγκρισης ακολουθιών-Αλγόριθμοι Ευθυγράμμισης.....	52
3.4.2.1 Στοίχιση κατά ζεύγη και μέθοδος dot-plot.	53
3.4.2.2 Αλγόριθμοι δυναμικού προγραμματισμού.....	54
3.4.2.3 Εργαλεία στοίχισης ακολουθιών με στοιχεία βάσεων δεδομένων.....	56
3.4.3 Ο Αλγόριθμος FASTA	56
3.4.4 Ευρετική μέθοδος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).....	56
3.5 Πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών (Multiple Sequence Alignment – MSA).....	58
3.6 Φυλογενετική Ανάλυση.....	58
3.7 Βάσεις δεδομένων Βιοπληροφορικής.....	59
3.8 Παραγωγή και ανάλυση βιολογικών δεδομένων – η cDNA βιβλιοθήκη.....	60
3.9 Η Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	60
3.10 Μικροσυστοιχίες	62
3.10.1 Μικροσυστοιχίες DNA	62
3.10.1.1 Αρχή λειτουργίας των μικροσυστοιχιών.....	63
3.10.2 Μικροσυστοιχίες cDNA	63
3.10.3 Ολιγονουκλεοτιδικές Μικροσυστοιχίες (Oligonucleotide arrays)	66
3.10.3.1 Διαδικασία κατασκευής 25μερών ολιγονουκλεοτιδίων.....	67
3.10.4 Μικροσυστοιχίες μικροσφαιριδίων	70
3.10.5 Μικροσυστοιχίες Agilent.....	71
3.10.6 Παραγωγή δεδομένων από πρωτεΐνες.....	73
3.10.7 Κλασική μεθοδολογία της Πρωτεωμικής.....	74
3.10.8 Μικροσυστοιχίες Πρωτεϊνών	76
3.10.9 Εφαρμογές των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών	78
3.10.10 Πρωτεωμική και καρκίνος.....	79
3.10.10.1 Καρκινικοί δείκτες (tumor markers).....	80
3.10.10.2 Ιδανικά χαρακτηριστικά καρκινικού δείκτη.....	81
3.10.10.3 Συμβολή της πρωτεωμικής στην εύρεση νέων καρκινικών δεικτών.....	83
3.10.10.4 Μελλοντικές προκλήσεις για την πρωτεωμική στο πεδίο των καρκινικών δεικτών.....	89
Βιβλιογραφία 3 ^{ου} κεφαλαίου	90

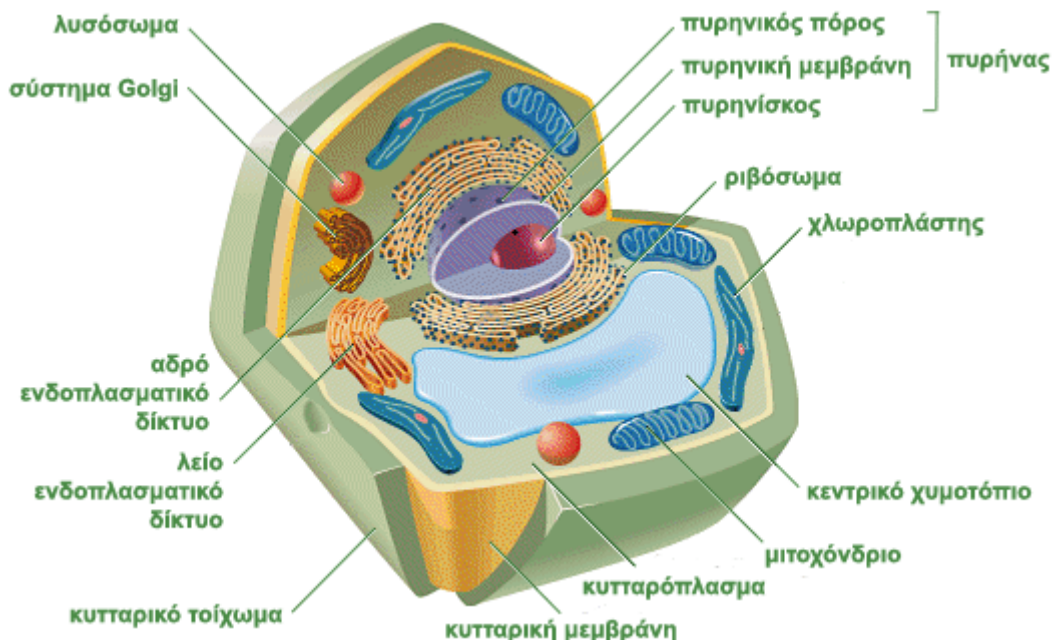
4.1	Μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης (ΜΚΣ) και καρκίνος	94
4.1.1	Το μονοπάτι (RTK)/Ras/ERK.	96
4.1.2	Το μονοπάτι PI3K-PKB/Akt	97
4.1.3	Το μονοπάτι Wnt	98
4.1.4	Το μονοπάτι του κυτταρικού κύκλου (cell cycle) και του p53.	100
4.1.5	Μοτίβα αλλοιώσεων μεταξύ ΜΚΣ.....	102
4.2	Τύποι καρκίνου και έγκαιρη διάγνωσή τους, εξερεύνηση νέων καρκινικών δεικτών μέσω πρωτεωμικής.....	105
4.2.1	Καρκίνος του πνεύμονα	105
4.2.1.1	Βιολογία του Καρκίνου του Πνεύμονα	106
4.2.1.2	Βιοδείκτες καρκίνου του πνεύμονα	107
4.2.1.3	Καρκινικοί δείκτες Πρωτεωμικής.....	109
4.2.1.4	Καρκινικά αυτοαντισώματα στην υπηρεσία της διάγνωσης του καρκίνου του πνεύμονα.....	110
4.2.1.5	Βιοπληροφορική ανάλυση των πρωτεϊνών που σχετίζονται άμεσα με τον καρκίνο του πνεύμονα.	112
4.2.1.6	Ανάλυση πρωτεϊνών στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC).	113
4.2.1.7	Ανάλυση πρωτεϊνών στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC).	115
4.2.2	Καρκίνος του μαστού	116
4.2.2.1	Βιολογία του Καρκίνου του Μαστού	118
4.2.2.2	Τεχνικές διάγνωσης του καρκίνου του Μαστού.....	119
4.2.2.3	Βιοδείκτες του καρκίνου του Μαστού.....	120
4.2.2.4	Καρκινικά αυτοαντισώματα στην υπηρεσία της διάγνωσης του καρκίνου του Μαστού.....	122
4.2.2.5	Βιοπληροφορική ανάλυση των πρωτεϊνών που σχετίζονται άμεσα με τον καρκίνο του Μαστού.....	123
4.2.3	Καρκίνος του παχέος εντέρου.....	124
4.2.3.1	Βιολογία του Καρκίνου του Παχέος Εντέρου.....	127
4.2.3.2	Διάγνωση και βιοδείκτες του Καρκίνου του παχέος Εντέρου.....	128
4.2.3.3	Καρκινικά αυτοαντισώματα και πρωτεΐνες ως βιοδείκτες του Καρκίνου του Παχέος Εντέρου.....	130
4.2.3.4	Βιοπληροφορική ανάλυση των πρωτεϊνών που σχετίζονται άμεσα με τον καρκίνο του Παχέος Εντέρου.....	132
4.2.4	Καρκίνος του δέρματος.....	136

4.2.4.1 Βιολογία του Δερματικού Καρκίνου.	138
4.2.4.2 Διάγνωση και βιοδείκτες του Καρκίνου του δέρματος.	139
4.2.4.3 Βιοπληροφορική ανάλυση των πρωτεϊνών που σχετίζονται άμεσα με τον καρκίνο δέρματος.	143
Βιβλιογραφία 4 ^{ου} κεφαλαίου	149
5.1 Συμπεράσματα για τη συμβολή της πρωτεωμικής στην έγκαιρη διάγνωση.	160

1 Στοιχεία Μοριακής Βιολογίας

1.1 Το κύτταρο

Κάθε οργανισμός αποτελείται από ένα ή περισσότερα κύτταρα. Το κύτταρο θεωρείται στον κόσμο της μοριακής βιολογίας η στοιχειώδης δομική μονάδα της έμβιας ύλης. Πράγματι, είναι η απλούστερη ύπαρξη ικανή να επιτελέσει εκείνες τις διεργασίες που χαρακτηρίζουν την έννοια της ζωής. Διεργασίες όπως η ενδοκυττάρια κίνηση και η επιλεκτική είσοδος ή έξοδος ουσιών προς και από το κύτταρο καθώς και η προσαρμοστικότητά του στις συνθήκες του περιβάλλοντος επιτυγχάνονται μέσω της μεταβολικής μηχανής που διαθέτει το κύτταρο [1]. Στους πολυκύτταρους οργανισμούς όπως ο άνθρωπος η μορφολογία των κυττάρων διαφέρει σε δομή, σχήμα και μέγεθος εξυπηρετώντας την ειδική λειτουργία στον οργανισμό την οποία επιτελεί το εκάστοτε κύτταρο [2]. Ανεξάρτητα από τη μορφολογική τους διαφοροποίηση όμως όλα τα κύτταρα μοιράζονται βασικά κοινά χαρακτηριστικά όπως η ικανότητά τους να αναπτύσσονται, να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα, να επεξεργάζονται πληροφορίες μέσω επικοινωνίας με το περιβάλλον, να πραγματοποιούν στο εσωτερικό τους σειρά χημικών αντιδράσεων και φυσικά, να αναπαράγονται.[3] Τα κύτταρα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες βάσει πολυπλοκότητας: τα ευκαρυωτικά και τα προκαρυωτικά. Τα βασικά μέρη ενός ευκαρυωτικού κυττάρου είναι η πλασματική μεμβράνη, ο πυρήνας και το κυτταρόπλασμα.



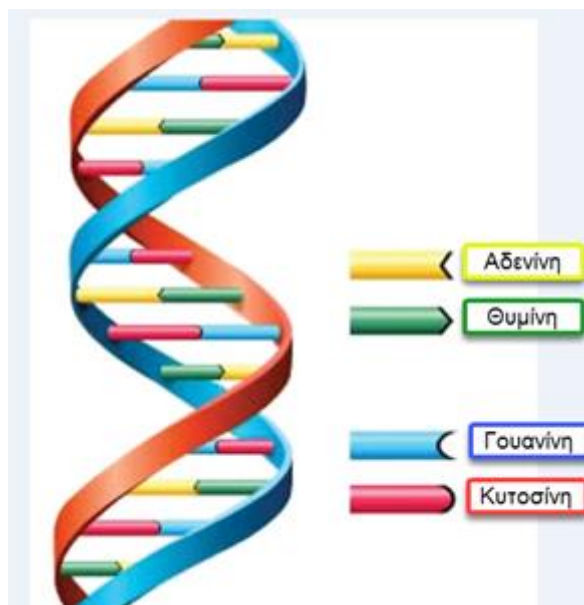
Εικόνα 1.1: Το ευκαρυωτικό κύτταρο

Τα ευκαρυωτικά περιβάλλονται από μια πολύ λεπτή (6-8nm) μεμβράνη, η οποία ονομάζεται πλασματική μεμβράνη. Ανάλογες μεμβράνες χρησιμοποιούνται στο εσωτερικό του κυττάρου για τη διαμερισματοποίηση του ενδότερου χώρου του, απομονώνοντας τα διάφορα οργανίδια του έτσι ώστε απερίσπαστα να πραγματοποιούν τις προβλεπόμενες βιοχημικές διεργασίες τους. Το κυτταρόπλασμα αποτελείται από το κυτταροδιάλυμα και διάφορα οργανίδια τα οποία επιτελούν διεργασίες στο εσωτερικό του κυττάρου. Τέλος, ο πυρήνας είναι το κέντρο ελέγχου του κυττάρου. Διαχωρίζεται από το κυτταρόπλασμα μέσω μιας μεμβράνης, η οποία ονομάζεται πυρηνική μεμβράνη, ενώ επικοινωνεί με αυτό μέσω πόρων που διαπερνούν τη πυρηνική μεμβράνη, τους πυρηνικούς πόρους. Στα ανθρώπινα κύτταρα ο πυρήνας αποτελείται από πρωτεΐνες, DNA και RNA σε ποσοστά 80%, 18% και 2% αντίστοιχα. Το μεγαλύτερο μέρος των πυρήνων καταλαμβάνουν τα χρωμοσώματα τα οποία είναι υπεύθυνα για την αναπαραγωγή και τη κληρονομικότητα των κυττάρων.[2].

1.2 Το Γενετικό υλικό

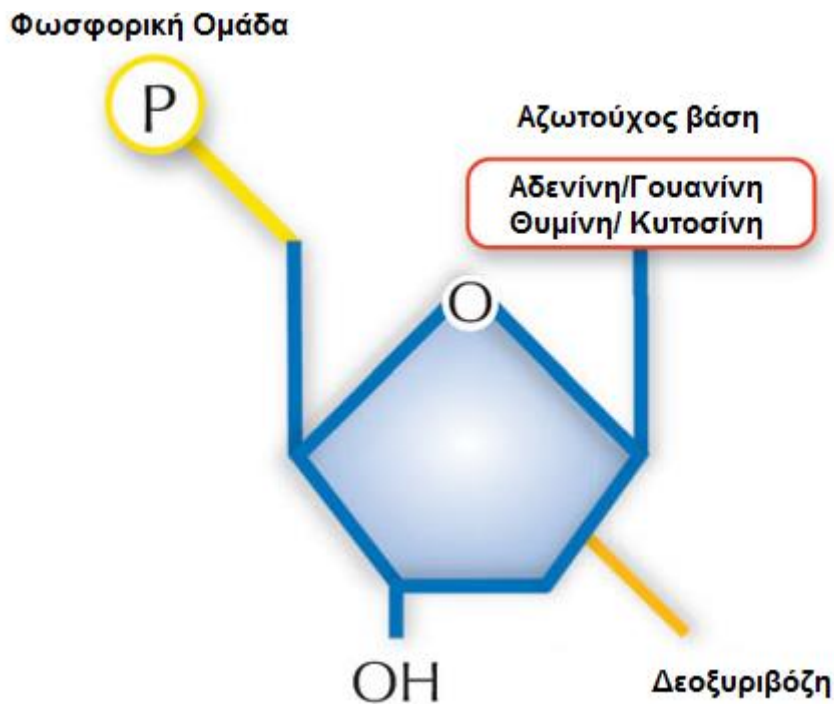
Το γενετικό υλικό είναι υπεύθυνο για την αποθήκευση της γενετικής πληροφορίας, για την κληροδότησή της στην επόμενη γενιά ή στο επόμενο κύτταρο και την σύνθεση πρωτεϊνών. Όλα τα χαρακτηριστικά ενός οργανισμού είναι καθορισμένα από το DNA, το οποίο οργανώνεται σε χρωμοσώματα και στο σύνολό του αποτελεί το γονιδίωμα του οργανισμού[4]. Κάθε χρωμόσωμα διαθέτει γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή σπανιότερα RNA και είναι οι φορείς της

κληρονομικότητας. Το DNA αποτελείται από δύο αλυσίδες (κλώνοι) , σε μορφή έλικας.



Εικόνα 1.2: Η διπλή έλικα του DNA

Ο κάθε κλώνος είναι ένα μακρύ πολυμερές το οποίο αποτελείται από δεοξυριβονουκλεοτίδια και μαζί με τον αντιπαράλληλο κλώνο σχηματίζει τη διπλή ελικοειδή αλυσίδα που ανακάλυψαν οι Watson και Crick το 1953,(Nobel 1962). Καθένα από τα δεοξυριβονουκλεοτίδια αποτελείται από ένα σάκχαρο με πέντε άτομα άνθρακα, την δεοξυριβόζη, μία φωσφορική μονάδα και μία αζωτούχο βάση.

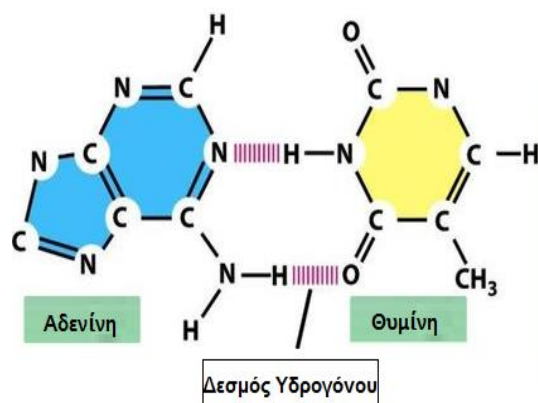


Εικόνα 1.3: Δομή των αζωτούχων βάσεων

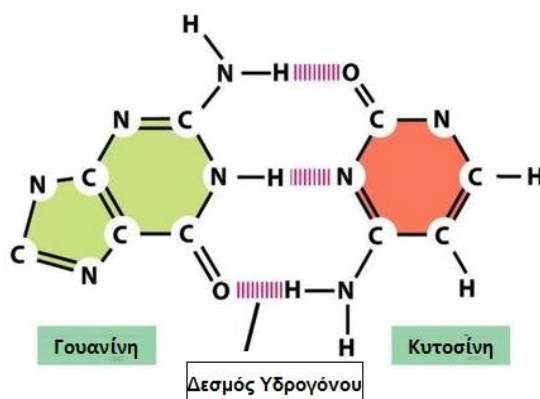
Η βάση είναι αυτή που μεταφέρει τη γενετική πληροφορία, ενώ το σάκχαρο και η φωσφορική ομάδα είναι υπεύθυνα για τη δομή του νουκλεοτιδίου. Όλα τα νουκλεοτίδια παρουσιάζουν απόλυτη ομοιότητα στη δομή τους και το μόνο στοιχείο διαφοροποίησής τους είναι η βάση, καθώς οι βάσεις είναι τέσσερις, χωριζόμενες σε δύο κατηγορίες [4]:

- Τις πουρίνες (Αδενίνη και γουανίνη, με συμβολισμό A, G)
- Τις πυριμιδίνες (θυμίνη και κυτοσίνη, με συμβολισμό T, C)

Οι βάσεις αναγκάζουν τα νουκλεοτίδια διαφορετικών αλυσίδων DNA να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, καθώς μεταξύ αδενίνης και θυμίνης όπως και γουανίνης και κυτοσίνης αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου. Αυτή η αλληλεπίδραση ονομάζεται συμπληρωματικότητα των βάσεων και έχει τεράστια σημασία για την αντιγραφή του DNA [6].



Εικόνα 1.4: Διπλοί δεσμοί υδρογόνου μεταξύ A-T



Εικόνα 1.5: Οι αντίστοιχοι μεταξύ G-C

Η γενετική πληροφορία είναι αποθηκευμένη στο DNA το οποίο λειτουργεί ως βιβλιοθήκη, με τις διαδικασίες της αντιγραφής και της κυτταρικής διαίρεσης να εγγυώνται την διαίωσή της. Η προσφορά για τον οργανισμό ξεκινά και τελειώνει σε αυτή τη σημαντικότερη λειτουργία του.

1.3 RNA

Εκτός όμως από τον DNA υπάρχει ακόμα ένα βιολογικό μακρομόριο αποτελούμενο κι αυτό από νουκλεοτίδια, το RNA, το οποίο διαδραματίζει βασικότατο ρόλο στην έκφραση της αποθηκευμένης γενετικής πληροφορίας. Οι διαφορές του από το DNA είναι δομικές, οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν σε διαφορές και στη διάταξη στο χώρο. Πιο συγκεκριμένα, τα νουκλεοτίδια του RNA χρησιμοποιούν το σάκχαρο ριβόζη αντί της δεοξυριβόζης και τη βάση ουρακίλη (U) αντί της θυμίνης (T). Λόγω των διαφορών αυτών το RNA εμφανίζεται ως μονόκλωνο μόριο αν και σε τμήματά του μπορεί να εμφανίζει τοπικά διπλή έλικα, φαινόμενο που συμβαίνει λόγω της συμπληρωματικότητας των βάσεων του (αδενίνη-ουρακίλη, γουανίνη-κυτοσίνη). Σε αντίθεση με το DNA, το οποίο εκτελεί έναν και μοναδικό σκοπό, υπάρχουν διάφορα RNA με διαφορές τόσο στο μήκος των νουκλεοτιδικών αλυσίδων τους όσο

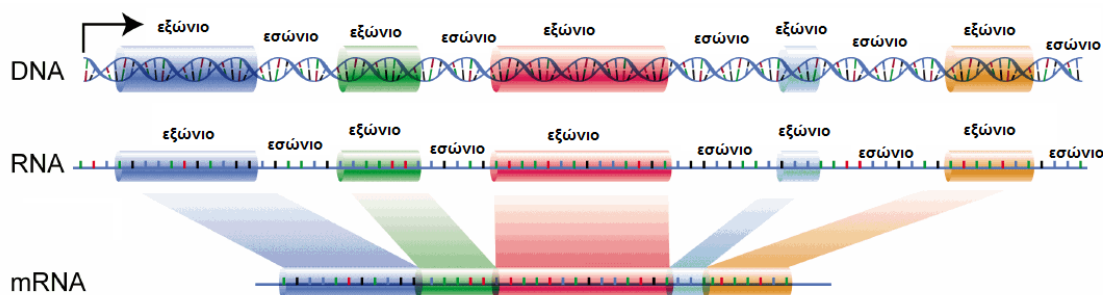
και στη λειτουργία που επωμίζονται [6]. Ένα συγκεκριμένο RNA από αυτά λαμβάνει μέρος στη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης καθώς χρησιμοποιείται ως καλούπι για να περάσει η πληροφορία με ακρίβεια από το DNA στην παραγωγή πρωτεϊνών [5]. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως μετάφραση, συμβαίνει στο χώρο του κυτταροπλάσματος και το RNA που παίρνει μέρος σε αυτήν, με ρόλο «αγγελιοφόρου», ονομάζεται messenger RNA (mRNA). Όλα τα άλλα είδη RNA δεν καταλήγουν στο να κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αλλά μιμούνται τη λειτουργία τους ή αλληλεπιδρούν με αυτές καθώς δρουν ως ενζυματικά, δομικά, και ρυθμιστικά συστατικά για μια ευρεία γκάμα διεργασιών στο κύτταρο. Στην περίπτωση του ανθρώπινου οργανισμού, τα μη κωδικοποιητικά RNA είναι της τάξης των δεκάδων χιλιάδων [1], με το εκάστοτε είδος να διαφέρει στο μήκος, στη λειτουργία και στο πεδίο δράσης. Για παράδειγμα, σε αντιδιαστολή με τα μόρια tRNA και rRNA, που ασκούν τη λειτουργία τους στο κυτταρόπλασμα, πολλά μικρά μόρια RNA (snRNA και snoRNA) λειτουργούν μέσα στον πυρήνα ως συστατικά του μηχανισμού επεξεργασίας RNA. Όλα τα είδη RNA παράγονται στον πυρήνα των κυττάρων με τη διαδικασία της μεταγραφής.

Πίνακας 1.1: Είδη και ρόλος των διαφόρων RNA [8,9,10,11,12]

ΕΙΔΟΣ RNA	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
mRNA (Messenger RNA)	Αγγελιοφόρο RNA, κωδικοποίηση πρωτεϊνών.
rRNA (Ribosomal RNA)	Ριβοσωμικό RNA, «χτίσιμο» της σκελετικής δομής του ριβοσώματος, καταλύουν τη σύνθεση πρωτεϊνών.
tRNA (transfer RNA)	Μεταφορικό RNA, κεντρικής σημασίας για την πρωτεϊνική σύνθεση, λειτουργία υποδοχέα μεταξύ mRNA και αμινοξέων
snRNA (Small nuclear RNA)	Μικρό πυρηνικό RNA, ρόλος σε εύρος διεργασιών στον πυρήνα συμπεριλαμβανομένου του ματίσματος του pre-mRNA και την επεξεργασία του pre-rRNA
snoRNA (Small nucleolar RNA)	Μικρό πυρηνισκικό RNA, υπεύθυνο για τις τομές του pre-rRNA, συμμετοχή στη σύνθεση, επεξεργασία και χημική τροποποίηση του rRNA
miRNA (microRNA)	Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, αναστολή της μετάφρασης συγκεκριμένων mRNA και πρόκληση της αποδόμησής τους
siRNA (Small interfering RNA)	Τερματίζουν τη γονιδιακή έκφραση κατευθύνοντας την αναστολή συγκεκριμένων mRNA μετά τη μεταγραφή αποτρέποντας τη πρωτεϊνοσύνθεση και δημιουργία συμπαγών δομών χρωματίνης.
piRNA (Piwi- interacting RNA)	Προστατεύουν το γονιδίωμα του οργανισμού του από μεταθετά στοιχεία, καταστολή μετα-μεταγραφικά ή / και μεταγραφικά
LncRNA (Long non-coding RNA)	Γονιδιωματική αποτύπωση, κυτταρική διαφοροποίηση και οργανογένεση

1.4 Γονίδια

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως τα γονίδια είναι υποακολουθίες του γονιδιώματος ενός οργανισμού. Συγκεκριμένα στον άνθρωπο το ποσοστό τους επί του γονιδιώματος είναι 3-5% με το υπόλοιπο ποσοστό να έχει χαρακτηριστεί «σαβούρα» από τους βιολόγους καθώς δε φαίνεται να έχει κάποιο λειτουργικό ρόλο. Από αυτό το μικρό ποσοστό, ένα ακόμα μικρότερο συμμετέχει στην πρωτεϊνοσύνθεση (< 2%), το οποίο αντιστοιχεί σε κωδικοποιούσες περιοχές, τα εξώνια, ενώ ενδιάμεσες αλληλουχίες που δεν κωδικοποιούν αμινοξέα ονομάζονται εσώνια.



Εικόνα 1.6: Κωδικοποιούσες περιοχές στο γονίδιο (εξώνια) και ενδιάμεσες μη κωδικοποιούσες (εσώνια)

Στις μη κωδικοποιούσες περιοχές ανήκουν και τα ψευδογονίδια, τα οποία ενώ μεταγράφονται σε RNA δεν καταλήγουν σε πρωτεϊνικό προϊόν, καθώς και οι διαγονιδιακές περιοχές οι οποίες είναι τμήματα μεταξύ γονιδίων και δε μεταγράφονται [3].

1.5 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι ένα ακόμα μακρομόριο, με πολυδιάστατη μορφή και λειτουργία. Είναι τα τελικά προϊόντα της γονιδιακής έκφρασης και μέσω αυτών αποδίδεται το σύνολο των χαρακτηριστικών ενός οργανισμού, ο φαινότυπος. Οι πρωτεΐνες αποτελούν την εργαλειοθήκη του κυττάρου καθώς:

- Είναι δομικά συστατικά των κυττάρων και των ιστών.
- Λειτουργούν ως αποθήκες και μεταφορείς ουσιών.
- Συντελούν στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων.
- Βοηθούν στην κίνηση των κυττάρων.
- Συντελούν στην άμυνα των κυττάρων κατά ξένων ουσιών.

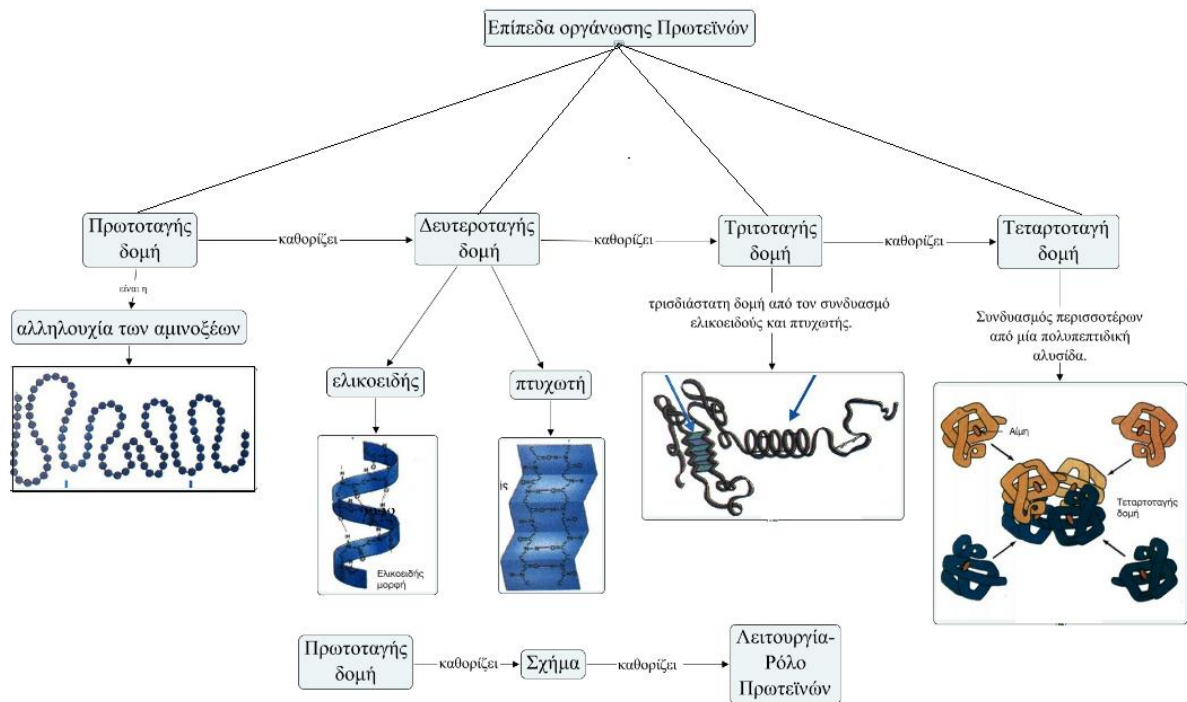
Επίσης αποτελούν περίπου το 80% του ξηρού βάρους του μυός, το 70% του ξηρού βάρους του δέρματος και το 90% του ξηρού βάρους του αίματος. Παρά τις λειτουργικές διαφορές τους οι πρωτεΐνες έχουν τα ίδια δομικά υλικά. Είναι πολυπεπτίδια, δηλαδή αλυσιδωτά γραμμικά βιομόρια που αποτελούνται από αμινοξέα. Το εκάστοτε γονίδιο κωδικοποιεί την αντίστοιχη ακολουθία των αμινοξέων χρησιμοποιώντας το μεταγραφόμενο mRNA. Αυτό για κάθε τριπλέτα βάσεων που διαθέτει, κωδικοποιεί με τη σειρά του ένα αμινοξύ. Όταν η διαδικασία (μετάφραση) έχει τελειώσει, τότε έχουμε την εκφρασμένη πληροφορία από το γονίδιο σε πρωτεΐνη. Καθένας από τους δυνατούς συνδυασμούς τριπλέτας βάσεων mRNA αντιστοιχεί σε ένα ξεχωριστό από πλήθος 20 αμινοξύ.

Πίνακας 1.2: Σύνθεση και ονομασία των αμινοξέων

Γενετικός κώδικας							
		Δεύτερο γράμμα					
		U	C	A	G		
Πρώτο γράμμα	U	UUU } φαινυλαλανίνη UUC } UUA } λευκίνη UUG }	UCU } UCC } σερίνη UCA } UCG }	UAU } τυροσίνη UAC } UAA } λήξη UAG } λήξη	UGU } κυστεΐνη UGC } UGA } λήξη UGG } τρυπτοφάνη	U C A G	
	C	CUU } λευκίνη CUC } CUA } CUG }	CCU } CCC } προλίνη CCA } CCG }	CAU } ιστιδίνη CAC } CAA } γλουταμίνη CAG }	CGU } CGC } αργινίνη CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } ισολευκίνη AUC } AUA } AUG } μεθειονίνη έναρξη	ACU } ACC } θρεονίνη ACA } ACG }	AAU } ασπαραγγίνη AAC } AAA } λυσίνη AAG }	AGU } σερίνη AGC } AGA } αργινίνη AGG }	U C A G	
	G	GUU } βαλίνη GUC } GUA } GUG }	GCU } GCC } αλανίνη GCA } GCG }	GAU } ασπαρτικό οξύ GAC } GAA } γλουταμινικό οξύ GAG }	GGU } GGC } γλυκίνη GGA } GGG }	U C A G	

Τα πολυπεπτίδια συνήθως δε μπορούν να εκδηλώσουν το βιολογικό τους ρόλο αμέσως μετά τη μετάφραση ως απλά μονοδιάστατες αμινοξικές ακολουθίες. Για αυτό τα πρωτεϊνικά μόρια περνούν από τέσσερα επίπεδα οργάνωσης. Το πρώτο επίπεδο είναι η πρωτοταγής δομή, δηλαδή το πολυπεπτίδιο που αποτελείται από την αμινοξική αλληλουχία. Σε αυτή την αλληλουχία υπάρχει η πληροφορία για τον τρόπο οργάνωσης της πρωτεΐνης. Στο δεύτερο επίπεδο οργάνωσης, τη δευτεροταγή δομή το πολυπεπτίδιο αναδιπλώνεται και αποκτά είτε ελικοειδή είτε πτυχωτή μορφή. Στην τριτοταγή δομή, αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινοξέων (ηλεκτροστατικές, Van der Waals, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, υδρογονικοί δεσμοί) προκαλούν τοπικές αναδιπλώσεις στο πολυπεπτίδιο. Έτσι, είτε πτυχωτή είτε ελικοειδής, η αλυσίδα

αναδιπλώνεται στο χώρο και αποκτά καθορισμένη μορφή. Σε περίπτωση που η πρωτεΐνη αποτελείται από μια μοναδική αλυσίδα, η τριτοταγής είναι και η τελευταία του δομή. Η λειτουργία της πρωτεΐνης έχει άμεση σχέση με την τριτοταγή δομή. Εάν όμως αποτελείται από περισσότερες από μία αλυσίδες, τότε η τελική της δομή είναι η τεταρτοταγής στην οποία συνδυάζονται σε ένα πρωτεϊνικό μόριο οι επιμέρους αλυσίδες [14].



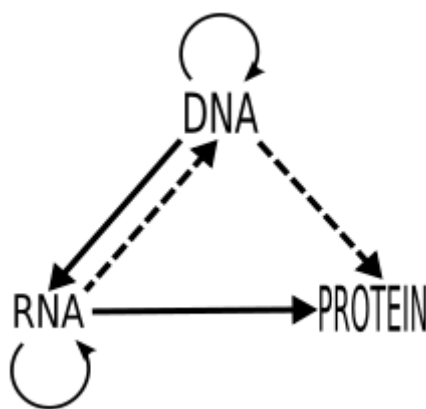
Εικόνα 1.7: Επίπεδα οργάνωσης των πρωτεϊνών.

Χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών είναι να αλληλεπιδρούν διαδοχικά μεταξύ τους και με άλλα βιομόρια, όπως το RNA. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές ονομάζονται πρωτεϊνικά μονοπάτια και μέσω αυτών οι πρωτεΐνες κατηγοριοποιούνται σε ευρείες κατηγορίες, έχοντας στόχο την εύρυθμη κυτταρική λειτουργία από τη δημιουργία του κυττάρου ως και το θάνατό του. Η σημασία των πρωτεϊνικών μονοπατιών είναι εξαιρετική για το κύτταρο και κατ' επέκταση για τον οργανισμό καθώς μέσω αυτών συγκροτούνται οι μηχανισμοί μεταγωγής σημάτων που ελέγχουν, ξεκινούν και σταματάνε τα κυριότερα στάδια της ζωής ενός κυττάρου:

- Την απόπτωση
- Τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό
- Την κυτταρική διαφοροποίηση
- Τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου

1.6 Κεντρικό Δόγμα της Βιολογίας

Συνοψίζοντας τη διαδρομή της γενετικής πληροφορίας ως την πρωτεϊνοσύνθεση, πρώτος σταθμός είναι το DNA, το οποίο έχει δυο λειτουργίες. Η πρώτη είναι η αντιγραφή του που μαζί με την κυτταρική διαίρεσή του εξασφαλίζει τη διαιώνισή του από κύτταρο σε κύτταρο και από οργανισμό σε οργανισμό. Η δεύτερη είναι η διαδικασία της μεταγραφής, κατά την οποία η πληροφορία του εκάστοτε γονιδίου μεταγράφεται σε αγγελιοφόρο RNA (mRNA) και είναι υπεύθυνη για το ποια γονίδια θα εκφραστούν, πότε και σε ποιους ιστούς. Ύστερα η μετάφραση του mRNA, διαδικασία που καταλήγει με βάση το γενετικό κώδικα να εκφράζεται η γενετική πληροφορία σε πρωτεΐνες. Σε περίπτωση που ο οργανισμός που μελετάται είναι ιός και ως γενετικό υλικό διαθέτει RNA αντί DNA υπάρχουν άλλες δύο επιπρόσθετες λειτουργίες. Πρώτη η αντίστροφη μεταγραφή, κατά την οποία ακολουθείται αντίστροφη πορεία από τη γνωστή (το RNA συνθέτει DNA) και δεύτερη είναι ο αυτοδιπλασιασμός, διαδικασία ανάλογη της αντιγραφής, κατά τον οποίο το RNA αντιγράφεται ώστε να μεταφέρει στα θυγατρικά ιικά κύτταρα αναλλοίωτη τη γενετική του πληροφορία [13]. Αυτές οι διαδικασίες αποτελούν το Κεντρικό Δόγμα της Μοριακής Βιολογίας, όπως ονομάστηκε από τον F.Crick (1958).



Εικόνα 1.8: Σχηματικό διάγραμμα του κεντρικού δόγματος της Βιολογίας.

Βιβλιογραφία 1^{ου} κεφαλαίου.

1. Berk, Matsudaira Lodish (2004), **Molecular Cell Biology Fifth Edition**
2. Ολυμπία Γκίμπα-Τζιαμπίρη, **Η φυσιολογία του ανθρώπου Τόμος 1^{ος} Β Έκδοση**
3. Κ. Σπ. Νικήτα (2011), **Προσομοίωση Φυσιολογικών Συστημάτων**
4. Δ. Γιόβα (2011), **Εισαγωγή Στη Νανοβιοφυσική Και Οπτική Απεικόνιση**
5. J.M. Berg, Tymoczko (2002), **Biochemistry Fifth Edition**
6. Alberts, Johnson, Lewis (2014), **Molecular Biology Of The Cell Sixth Edition**
7. Kung T.Y, Colognori D, Lee, J.T (2013), **Long Noncoding RNAs: Past, Present and Future**, Genetics, Mar; 193(3): 651-669.
8. Kittler, R., et al. (2004). **An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division**. Nature, 432, 1036-40.
9. Gorbunova V, Levy A.A (1997), **Circularized Ac/Ds Transposons: Formation**, Structure and Fate, January 7, Genetics Society of America.
10. Fatica A, Bozzoni I (2014), **long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development**, REVIEWS GENETICS. Nature Reviews Genetics **15**, 7–21.
11. Iwasaki Y.W, Siomi M.C, Siomi H (2015), **PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions**. Annual Review of Biochemistry, Mar 5; 84:405-33.
12. Hirotsugu I, Siomi M.C, Siomi H. (2012). **Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines**. Genes and Development 26:2361-2373.
13. David L. Nelson D.L, Michael M. Cox M.M (2013), **Lehninger Principles of Biochemistry 6th ed** , W. H. Freeman and Company

2

Η Καρκινική νόσος

2.1 Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι νόσος γνωστή από την αρχαιότητα με πληροφορίες περί της φύσης του από την εποχή που έχουμε ανακαλύψει ιατρικά κείμενα. Οι Ιπποκράτης και Γαληνός απέδωσαν στη νόσο το όνομά της, παρομοιάζοντας την εμφάνιση του όγκου με την όψη του κάβουρα (καρκίνου) [1,2]. Σήμερα αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, έχοντας ευθύνη για το 20% περίπου των θανάτων, προσβάλλοντας περισσότερο από το 1/3 του πληθυσμού. Επίσης η αντιμετώπισή του είναι εξαιρετικά ακριβή, με το 10% περίπου της συνολικής δαπάνης της ιατρικής περίθαλψης να δεσμεύεται για αυτήν την ασθένεια. Για τα αίτια της νόσου καθώς και για το κατά πόσο είναι ιάσιμη υπήρχαν στα παλαιότερα χρόνια αρκετές θεωρίες, αλλά στη σημερινή εποχή, με την πρόοδο της έρευνας και της τεχνολογίας η επιστήμη τις έχει απομυθοποιήσει, ρίχνοντας φώς στους παράγοντες που συντελούν στη δημιουργία του καρκίνου και δίνοντας ελπίδα για την καταπολέμησή του.

2.2 Γενετική του καρκίνου

Αν και θεωρείται μία ασθένεια, ο καρκίνος στην πραγματικότητα είναι μία ονομασία η οποία περιγράφει ένα ευρύ σύνολο ενός μεγάλου αριθμού ασθενειών. Οι ασθένειες αυτές διαφέρουν, αλλά στις παρυφές τους συγκλίνουν γύρω από έναν κοινό παράγοντα, τον κοινό λόγο εμφάνισής τους που μπορεί να αναλυθεί σε δύο συνιστώσες: Τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διήθηση των παρακείμενων ιστών. Σε υγιή άτομα η ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ φθοράς και παραγωγής κυττάρων εγγυάται τη σωστή λειτουργία του οργανισμού, ενώ σε περίπτωση απώλειας της ικανότητας αυτής έχουμε σιγά σιγά στην αρχή και προοδευτικά όλο και σε μεγαλύτερο ρυθμό την ανεξέλεγκτη κυτταρική παραγωγή, με αποτέλεσμα την εμφάνιση όγκων [3]. Άρα όταν ένας όγκος εμφανίζεται δεν είναι παρά το αποτέλεσμα μίας εξίσωσης ιδιαίτερα σύνθετης με πολλές μεταβλητές η οποία δίνει συνεχώς λάθος αποτελέσματα σε πολλά στάδια. Η διαδικασία αυτή μπορεί να διαρκέσει έως και αρκετά χρόνια και το άθροισμα αυτών των αποτελεσμάτων να οδηγήσει σε ογκογένεση.

2.3 Μεταλλάξεις

Αν θέλουμε να εντοπίσουμε την απαρχή, τον κοινό αυτό παράγοντα που απορυθμίζει τα κύτταρα ενός οργανισμού θα πρέπει να εστιάσουμε στο πρώτο στάδιο της γονιδιακής έκφρασης. Στο πρώτο σκαλοπάτι βρίσκουμε το DNA. Πράγματι, ο καρκίνος είναι μια γονιδιακή νόσος και οφείλεται σε μετάλλαξη του γενετικού υλικού. Στην πραγματικότητα μία και μοναδική μετάλλαξη δε δύναται να εξελιχθεί σε νεοπλασία αλλά μια σειρά πολλαπλών γενετικών χτυπημάτων, δηλαδή μια συσσώρευση αρκετών τυχαίων μεταλλάξεων μπορεί. Ως μετάλλαξη (ή αλλιώς μεταλλαγή) χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε μεταβολή που μπορεί να συμβεί στο γενετικό υλικό. Είναι η δομική μεταβολή που υφίσταται το DNA από την επίδραση βιολογικών, χημικών και φυσικών παραγόντων και μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε σωματικό ή γεννητικό κύτταρο. Ωστόσο μόνο οι μεταλλάξεις των γεννητικών κυττάρων μπορεί να μεταβιβαστούν από τη μία γενιά στην επόμενη και είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία κληρονομικών ασθενειών [7]. Οι λόγοι που συμβαίνουν είναι:

1. Λάθη κατά την αντιγραφή του DNA.

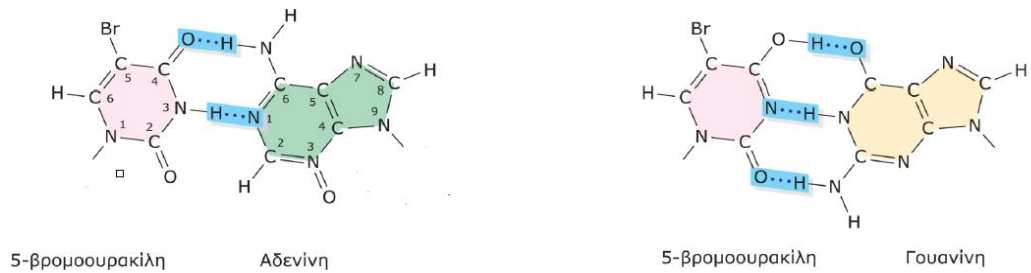
Παραβίαση του κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων κατά την κατασκευή του θυγατρικού DNA από το μητρικό «καλούπι».

2. Λάθη οφειλόμενα σε φαινόμενα ανασυνδιασμού του DNA.

Σφάλματα στην επαναδιάταξη ή στην αναδιάταξη του DNA, ωστόσο συνήθως λάθη στο επίπεδο αυτό συνήθως επισκευάζονται.

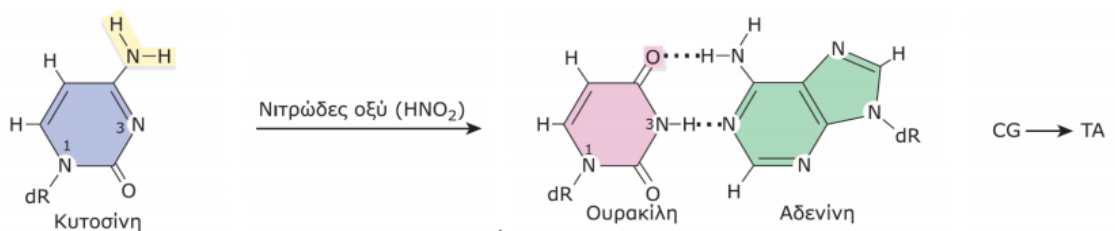
3. Χημικά μεταλλαξογόνα. [4]

- Χημικά ανάλογα βάσεων τα οποία ενσωματώνονται στο DNA. Κάποια αναστέλλουν την αντιγραφή ενώ άλλα προάγουν λάθος ζεύξη βάσεων, όπως η βρομοουρακίλη (5BU) η οποία στη φυσιολογική της κατάσταση συμπεριφέρεται ως θυμίνη και ζευγαρώνει με την αδενίνη, ενώ σπανιότερα ζευγαρώνει με τη γουανίνη (συμπεριφορά κυτοσίνης).

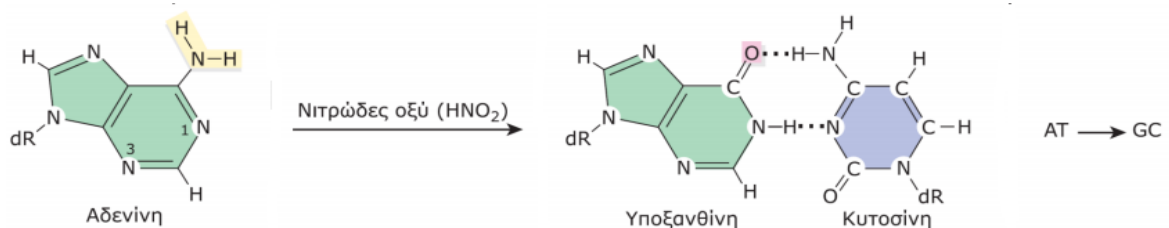


Εικόνα 2.1: Ζευγάρισμα βρομοουρακίλης με αδερίνη και γουανίνη

- Απαμινωτικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα το νιτρώδες οξύ, (HNO_2), το οποίο προκαλεί οξειδωτική απαμίνωση. Συγκεκριμένα, απαμινώνει την κυτοσίνη και την αδερίνη μετατρέποντάς τες σε ουρακίλη και την υποξανθίνη (απαμινομένη αδερίνη). Οι αλλαγές αυτές καταλήγουν σε μεταπτώσεις στα ταιριάσματα των βάσεων. Στην πρώτη περίπτωση προκύπτει ζεύγος T-A αντί C-G, ενώ στη δεύτερη G-C αντί A-T.

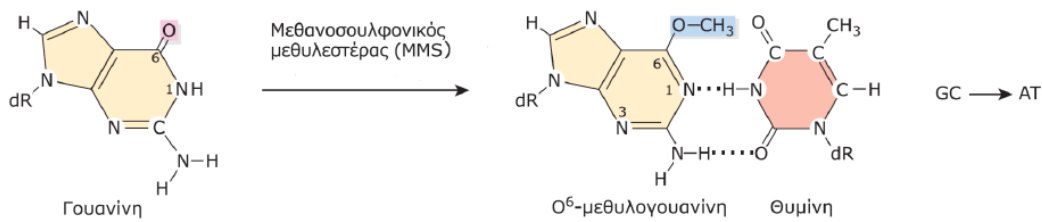


Εικόνα 2.2: Οξειδωτική απαμίνωση της κυτοσίνης από HNO_2



Εικόνα 2.3: Οξειδωτική απαμίνωση της αδερίνης από HNO_2

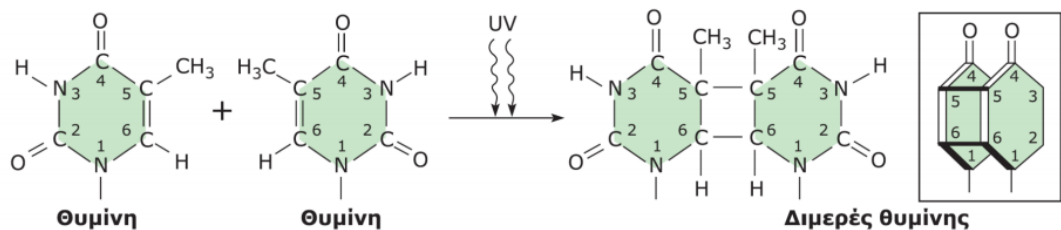
- Αλκυλιωτικοί παράγοντες που είτε αλκυλιώνουν το DNA (του περνάνε μια αλκυλομάδα) ή «προσκολλώνται» στο DNA με τέτοιο τρόπο που του προκαλούν προβλήματα στην αντιγραφή του ή στην επιδιόρθωσή του.



Εικόνα 2.4: Ο μεθανοσουλφονικός μεθυλεστέρας (MMS) αλκυλώνει τη γουανίνη

4. Ακτινοβολία (Ιονίζουσα – υπεριώδης – μικροκύματα κλπ).[5,6]

- Ιονίζουσα ακτινοβολία: Ακτίνες τύπου γ και Χ, οι οποίες στην περίπτωση συνεχούς έκθεσης προκαλούν καταστροφή των φωσφοδιεστερικών δεσμών στο DNA.
- Υπεριώδης ακτινοβολία: επάγει το διμερισμό γειτονικών πυριμιδινών (T-T), προκαλώντας τοπική παραμόρφωση της διπλής έλικας στη θέση που βρίσκονται



Εικόνα 2.5: Δημιουργία διμερών θυμίνης λόγω UV ακτινοβολίας

5. Τυχαίες χημικές αλλαγές του DNA, με πιθανότερο σενάριο την επιβάρυνση του κυττάρου (ελέω αθροιστικών παραγόντων), είναι οι αλλαγές που συμβαίνουν τυχαία, χωρίς να μπορούμε να εντοπίσουμε την απαρχή τους.

2.4 Μηχανική καρκίνου

Ο καρκίνος είναι γενετική ασθένεια, προκαλούμενη από μεταλλαγές στο κυτταρικό γονιδίωμα. Αυτές οι αλλαγές διεγείρουν το κύτταρο, το οποίο είναι φαινομενικά φυσιολογικό, σε πολλαπλασιασμό, με τα θυγατρικά του να σχηματίζουν με γεωμετρική πρόοδο κυτταρική μάζα (υπερπλασία). Σε ήδη απορυθμισμένα κύτταρα, υπάρχει πιθανότητα να συμβεί εκ νέου μεταλλαγή, με απογόνους ύστερα από τις διαδοχικές διαιρέσεις να παρουσιάζουν μορφολογικές ανωμαλίες (δυσπλασία). Η εμφάνιση όγκου προέρχεται από μια τρίτη μεταλλαγή (in situ καρκίνωμα), ενώ η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων του όγκου να αποσπώνται

και να διεισδύουν σε ιστούς και όργανα (μετάσταση) αποκτάται από διαδοχικές περειαίρω μεταλλαγές τους.

Στα φυσιολογικά κύτταρα υπάρχουν δύο τύποι γονιδίων που ελέγχουν την αρχή και σηματοδοτούν το τέλος της κυτταρικής διαίρεσης. Το πρώτο είδος, τα πρωτο-ογκογονίδια, παράγουν πρωτεΐνες που προάγουν τον πολλαπλασιασμό, ενώ για την αναστολή του υπάρχουν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Αλλαγές στις δύο αυτές κλάσεις γονιδίων οδηγούν στην καρκινογένεση [12]. Πιο συγκεκριμένα, ο μετασχηματισμός των πρωτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια με αυξημένη ενεργότητα (gain of function) , καθώς και η απώλεια ενεργότητας (loss of function) των ογκοκατασταλτικών γονιδίων οδηγούν στην ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση που χαρακτηρίζει την καρκινική νόσο.[8]

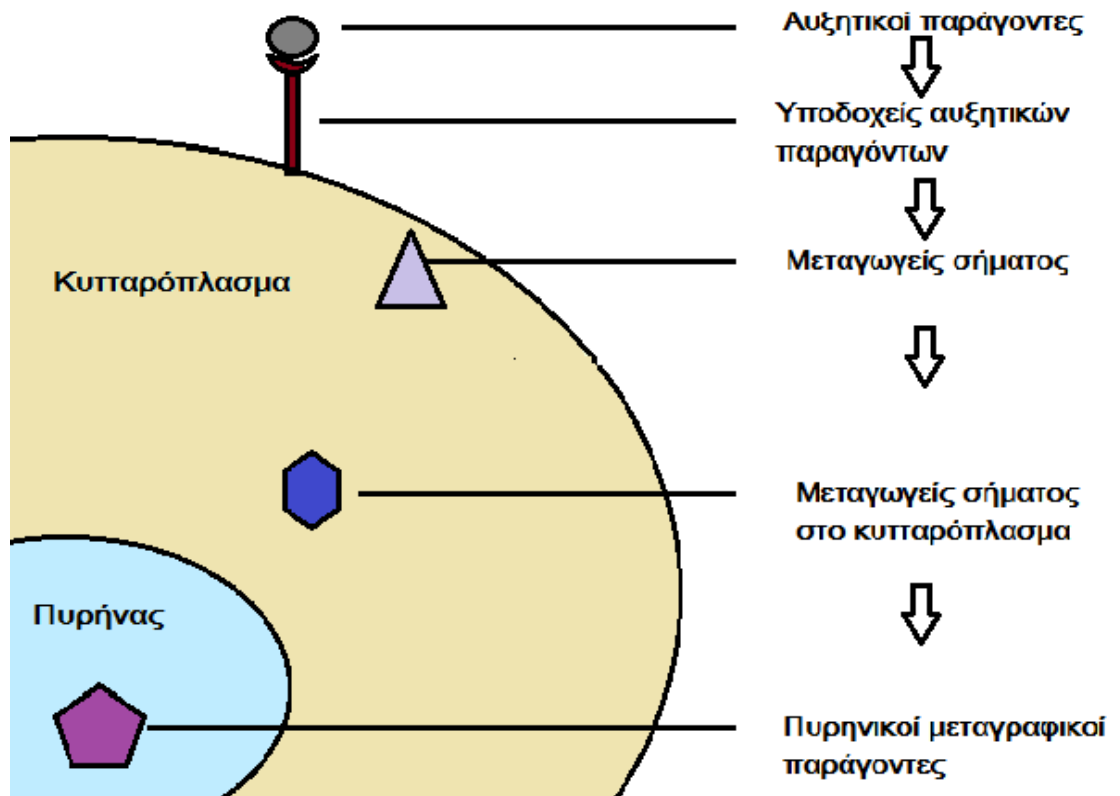
2.4.1 Ογκογονίδια

Τα ογκογονίδια είναι οι υπερενεργές μορφές των πρωτο-ογκογονιδίων, τα οποία ενεργοποιούνται κάτω από γονιδιακές μεταλλαγές. Αρχικά ταυτοποιήθηκαν σε ρετροϊούς (v-onc) ως τα γονίδια εκείνα που προκαλούν μετασχηματισμό στα κύτταρα-ξενιστές, (M. Bishop, H. Varmus, Nobel 1989). Σήμερα είναι γνωστά πάνω από 100 ογκογονίδια, για την ενεργοποίηση των οποίων αρκεί να απενεργοποιηθεί ένα από τα δύο αλληλόμορφα (επικρατή γονίδια).

Οι ογκοπρωτεΐνες που κωδικοποιούν τα αντίστοιχά τους φυσιολογικά γονίδια είναι σημαντικές για τον πολλαπλασιασμό καθώς δρουν ως κρίκοι σε μία αλυσίδα υπεύθυνη για την κυτταρική αύξηση [10]:

- Αυξητικοί παράγοντες (πχ: EGF, PDGF)
- Υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (πχ: Her 2/neu)
- Μεταγωγείς σήματος (πχ: Ras)
- Μεταγωγείς σήματος στο κυτταρόπλασμα (πχ:abl)

- Πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες (πχ: Myc)



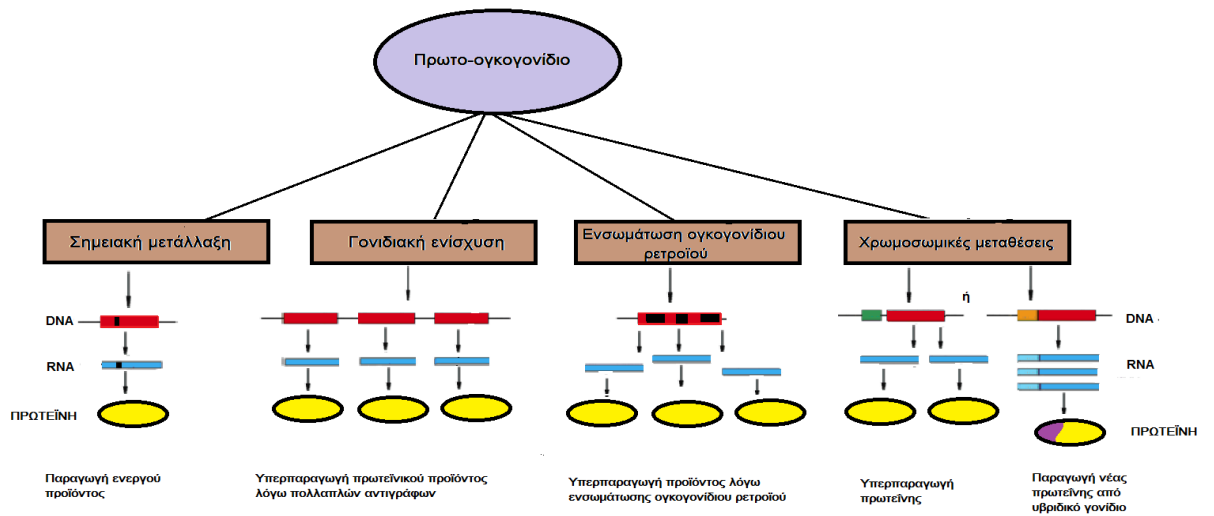
Εικόνα 2.6: Ρόλος ογκοπρωτεϊνών στην κυτταρική διαίρεση

Μεταλλαγές στα υγιή αυτά γονίδια οδηγούν στην απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου καθώς διασάλευση οποιουδήποτε κρίκου αυτής της αλυσίδας μπορεί να προκαλέσει μετασχηματισμό του κυτταρικού φαινοτύπου είτε επιδρώντας στον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης, είτε μεταβάλλοντας την ίδια τη γονιδιακή έκφραση.

Ανάλογα με τον τύπο ή το εύρος της μετάλλαξης των αντίστοιχων πρωτο-ογκογονιδίων τους διαφέρουν στη λειτουργία τους:

- Σημειακή μετάλλαξη: Αλλαγή σε ένα ζεύγος βάσεων έχει ως γονιδιακό αποτέλεσμα μια καινούρια αλληλουχία που δίνει ένα νέο προϊόν (εάν γίνει σε κωδικοποιούσα περιοχή) ή υπερπαραγωγή του προϊόντος (εάν γίνει σε ρυθμιστική περιοχή).
- Γονιδιακή ενίσχυση: Ενίσχυση (amplification) μιας γονιδιακής περιοχής η οποία ενέχει πρωτο-ογκογονίδιο, με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή πολλαπλών αντιγράφων που με τη σειρά τους παράγουν ακατάσχετα πρωτεΐνες [9].
- Χρωμοσωμικές μεταθέσεις : Συγχώνευση γονιδίων και παραγωγή προϊόντος με διαφορετικές ιδιότητες από το καινούριο υβριδικό γονίδιο ή υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης.

- Ενσωμάτωση ρετροϊών: Ενσωμάτωση ιικών ογκογονιδίων (v-onc) από το γονιδίωμα ρετροϊών, με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή του προϊόντος.



Εικόνα 2.7: Μηχανισμοί μετατροπής πρωτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια.

2.4.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Το δεύτερο είδος γονιδίων που εμπλέκεται στην καρκινογένεση είναι τα ογκοκατασταλτικά γονίδια . Ο ρόλος τους είναι να δρουν ως γονίδια- φρουροί (gatekeepers), δηλαδή ως μοριακά φρένα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Antiproliferation Genes), παρεμποδίζοντάς τον όταν χρειάζεται ή ως γονίδια-φροντιστές (caretakers), που έχουν ως σκοπό τη γονιδιωματική σταθερότητα (Genomic stability Genes), με τα παράγωγά τους να επεμβαίνουν σε βλάβες του DNA και να τις επιδιορθώνουν [13]. Μερικά σημαντικά ογκοκατασταλτικά:

Πίνακας 2.1: Υποκατηγορίες ογκοκατασταλτικών γονιδίων

Γονίδια- Φρουροί	Γονίδια κυτταρικής φροντίδας
pRb, p53 p21, p16 APC	BRCA1, BRCA2 MSH2, MSH1 XP

Στα καρκινικά κύτταρα τα ογκοκατασταλτικά εμφανίζονται αδρανοποιημένα, κατάσταση που συμβαίνει όταν και τα δύο αλληλόμορφα απενεργοποιηθούν (υπολειπόμενα γονίδια) . Αξίζει να σημειωθεί πως στο 50% των καρκίνων έχει εντοπιστεί μεταλλαγμένο το ογκοκατασταλτικό p53.

2.5 Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων

Κάθε όργανο μπορεί να αναπτύξει διαφορετικές μορφές καρκίνου, πράγμα που δείχνει την πολυπλοκότητα της ασθένειας. Ωστόσο υπάρχει η παραδοχή πως καθεμία από τις μορφές αυτές χαρακτηρίζεται από έξι βασικές αλλαγές στη λειτουργία του κυττάρου που συνεπικουρούν στο να γίνει καρκινικό και εν τέλει να αναπτυχθεί η καρκινική νόσος:

1. Αυτο-επάρκεια σε μηνύματα κυτταρικής αύξησης (growth signals)
2. Απώλεια απόκρισης σε ανασταλτικά (αντιμιτογόνα) σήματα
3. Αντίσταση στην απόπτωση
4. Απόκτηση της ικανότητας ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού (αναστολή κυτταρικής γήρανσης)
5. Απόκτηση της ικανότητας επαγωγής της αγγειογένεσης
6. Απόκτηση της ικανότητας διείσδυσης σε παρακείμενους ιστούς και μετάστασης



Εικόνα 2.8: Τα 6 κύρια χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων

2.5.1 Αυτο-επάρκεια σε μηνύματα κυτταρικής αύξησης (growth signals)

Η κυτταρική αύξηση σαν διαδικασία άρχεται από μόρια που φέρουν την πληροφορία από το περιβάλλον του κυττάρου και τη μεταφέρουν ως τον πυρήνα του κυττάρου. Αυξητικοί παράγοντες, μόρια διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων καθώς και μόρια εξωκυττάριας ύλης είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό. Τα καρκινικά

κύτταρα από την άλλη, παράγουν τα ίδια τα απαραίτητα αυτά μηνύματα κυτταρικής αύξησης διακόπτοντας την επικοινωνία με το περιβάλλον τους, διαταράσσοντας έτσι την ομοιόσταση του ιστού. Η αυτό-επάρκεια των καρκινικών κυττάρων μπορεί να προκύψει με την ενεργοποίηση ογκογονιδίων που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες, ή με αλλαγές σε υποδοχείς αυξητικών παραγόντων που οδηγούν στην υπερέκφρασή τους κάνοντάς τους να αποκρίνονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις αυξητικών παραγόντων. Ακόμα μπορεί να εμφανίζονται δομικά αλλαγμένοι, κατάσταση που μπορεί να τους επιτρέπει να ενεργοποιούνται απουσία προσδέματος. Τέλος, η αυτό-επάρκεια μπορεί να επιτευχθεί και από αλλαγές σε μόρια μεταγωγής σήματος που μεταφέρουν πληροφορία από τους υποδοχείς στο εσωτερικό του κυττάρου. Για παράδειγμα η ογκοπρωτεΐνη Ras εμφανίζεται μεταλλαγμένη στο 25% του συνόλου των καρκίνων.

2.5.2 Απώλεια απόκρισης σε ανασταλτικά (αντιμιτογόνα) σήματα

Τα καρκινικά κύτταρα δεν αποκρίνονται σε αντιμιτογόνα μηνύματα τα οποία βρίσκονται στο περιβάλλον τους ή προσδεμένα στην επιφάνειά τους. Σε αυτήν την κατηγορία εμπλέκονται το ογκοκατασταλτικό p53 και το Rb που θεωρείται βασικό φρένο του πολλαπλασιασμού, καθώς τα περισσότερα αντιμιτογόνα μηνύματα δρουν μέσω αυτού.

2.5.3 Αντίσταση στην απόπτωση

Η απόπτωση είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που μαζί με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό δρουν ως εργαλεία της ομοιόστασης του ιστού. Η αντίσταση στη διαδικασία της απόπτωσης είναι βασικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων και συμβάλει στη δημιουργία και την αύξηση των καρκινικών όγκων καθώς μειώνει το ρυθμό απομάκρυνσης των κυττάρων που πρέπει να απομακρυνθούν κάθε δεδομένη στιγμή. Τα αποπτωτικά μονοπάτια είναι δύο, το εξωγενές και το ενδογενές, ωστόσο και τα δύο καταλήγουν στον κατακερματισμό του κυττάρου. Η εξωγενής οδός επάγεται από μόρια θανάτου όπως η λεμφοτοξίνη που προσδέεται στη κυτταρική μεμβράνη από διακυτταρικούς υποδοχείς, ενώ η ενδογενής οδός, ξεκινώντας από το εσωτερικό του κυττάρου και συγκεκριμένα τα μιτοχόνδρια, επάγεται από στρεσογόνα σήματα. Τα σήματα αυτά προκαλούν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-C, μια μικρής πρωτεΐνης μεταφοράς ηλεκτρονίων στον ενδομεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Η καταστολή των αντι-αποπτωτικών μελών ή η ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών μελών της οικογένειας ογκοπρωτεϊνών Bcl-2 οδηγεί σε μεταβολή της διαπερατότητας των πόρων των

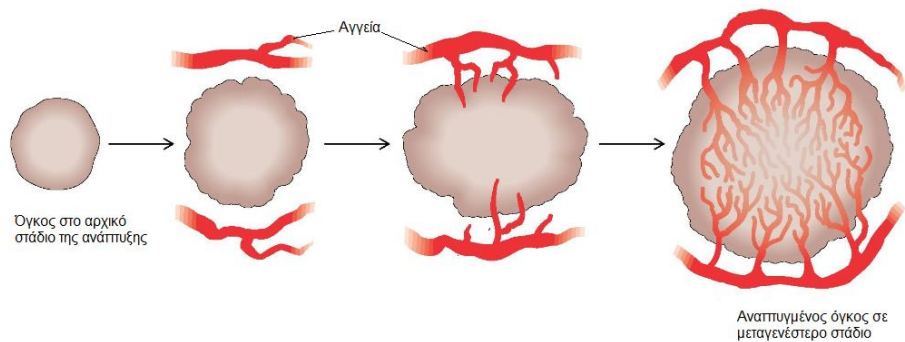
μιτοχονδριακών μεμβρανών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα [14,15]. Το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι επάγεται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53.

2.5.4 Απόκτηση της ικανότητας ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού

Τα φυσιολογικά κύτταρα υπόκεινται στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης, δηλαδή δεν πολλαπλασιάζονται επ' αόριστον. Στον μηχανισμό της κυρίαρχο ρόλο παίζουν αλληλουχίες στα άκρα των χρωμοσωμάτων, τα τελομερή. Σε κάθε κυτταρικό κύκλο στο τέλος της διαδικασίας της αντιγραφής ένα ακραίο τμήμα του συνοδού κλώνου δεν αντιγράφεται, οπότε ένας κλώνος προκύπτει να είναι μικρότερος από τον άλλο. Η αποκατάσταση των τμημάτων που λείπουν γίνεται μέσω ενός ενζύμου, της τελομεράσης, η οποία μετά από τις διαδοχικές αντιγραφές και την πάροδο του χρόνου χάνει την ενεργότητά της, με αποτέλεσμα την συνεχή βράχυνση των τελομερών μετά από κάθε κύκλο, έως και την οριστική τους απώλεια. Τότε τα άκρα των χρωμοσωμάτων συντήκονται με γειτονικά χρωμοσώματα και εντέλει αποπίπτουν [11]. Τα καρκινικά κύτταρα σε πολύ μεγάλο ποσοστό (~ 90%) παρουσιάζουν αυξημένη ενεργότητα της τελομεράσης, εμφανίζοντας έτσι αντίσταση στην κυτταρική γήρανση. Σε συνδυασμό με την αυτο-επάρκεια, την μη απόκριση σε αντιμιτογόνα σήματα και την αντίσταση στην απόπτωση το χαρακτηριστικό αυτό δίνει την ικανότητα στους καρκινικούς όγκους να αυξάνονται σε μέγεθος.

2.5.5 Απόκτηση της ικανότητας επαγωγής της αγγειογένεσης

Ως αγγειογένεση ορίζεται η δημιουργία αγγείων από ήδη υπάρχοντα[16]. Η διαδικασία αυτή ελέγχεται από τη δράση διαφόρων αγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών μορίων. Ο καρκίνος διαταράσσει την ισορροπία των δύο τύπων μορίων επάγοντας την αγγειογένεση. Οι καρκινικοί όγκοι κατασκευάζουν ένα δικό τους δίκτυο όταν έχουν αυξήσει το μέγεθός τους το οποίο όντας προέκταση του αγγειακού συστήματος μεταφέρει θρεπτικά συστατικά στα κύτταρα του εσωτερικού τους.



Εικόνα 2.9: Αγγειογένεση από καρκινικά κύτταρα κατά την ανάπτυξή τους

Αυξητικοί παράγοντες, με προεξέχοντες τους VEGF, FGF, προάγουν την αγγειογένεση και εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα στον καρκίνο, ενώ η ενδοστατίνη, η αγγειοστατίνη και η θρομβοσπονδίνη-1, η οποία ρυθμίζεται από το ογκοκατασταλτικό p53, αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές της αγγειογένεσης. Η ενδεχόμενη μειωμένη ενεργότητα του p53 στην καρκινική νόσο μειώνει την έκφραση της θρομβοσπονδίνης-1 με αποτέλεσμα την επαγωγή της αγγειογένεσης.

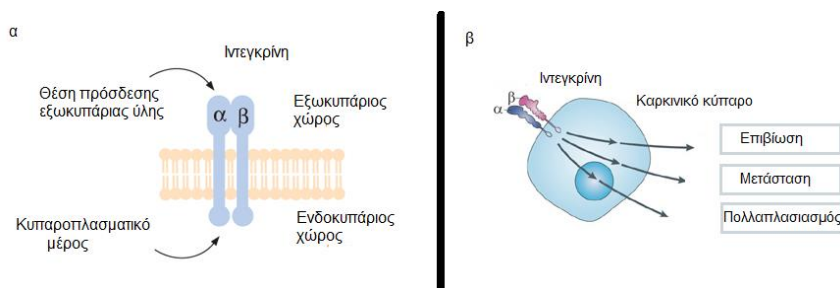
2.5.6 Απόκτηση της ικανότητας διείσδυσης σε παρακείμενους ιστούς και μετάστασης

Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποσπώνται από την περιοχή που βρίσκονται, να αποκτήσουν κινητικότητα και διεισδυτικότητα και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και της λέμφου να προσκολλώνται σε καινούριους ιστούς όπου και δημιουργούν καινούριους όγκους. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται μετάσταση [17] και είναι ο βασικότερος λόγος θανάτου στις περισσότερες μορφές καρκίνου. Αλλαγές στα μόρια διακυτταρικής σύνδεσης όπως η E-καντερίνη (E-cadherin)¹, της οποίας το αντίστοιχο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που την κωδικοποιεί εμφανίζει μειωμένη έκφραση στον καρκίνο, όπως και σε αυτά της κυτταρικής προσκόλλησης πυροδοτούν την διαδικασία της μετάστασης. Ένα ακόμα μόριο που η αλλαγή του επάγει τη μετάσταση είναι οι ιντεγκρίνες. Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερείς διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες² αποτελούμενες από συνδυασμό α και β αλυσίδων. Το ένα μέρος τους, το εξωκυττάριο, έχει αλληλεπίδραση με τα μόρια του περιβάλλοντος εκτός του κυττάρου, ενώ το ενώ το τμήμα που βρίσκεται στα ενδότερα του κυτταρικού χώρου αλληλεπιδρά με μόρια μεταγωγής σήματος [19]. Στα καρκινικά

¹ Διαμεμβρανική πρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας, σημαντική για το σχηματισμό και τη διατήρηση της τοπικής σύνδεσης μεταξύ των κυττάρων[18].

² Σύμπλεγμα που αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό τμήμα, που περιέχει ως προσθετική ομάδα υδατάνθρακες.

κύτταρα οι ιντεγκρίνες αλλάζουν ώστε να εξασφαλίσουν την επιβίωσή του και τη συνέχιση των λειτουργιών του.



Εικόνα 2.10: Δομή ιντεγκρινών (α), ιντεγκρίνες καρκινικού κυττάρου (β)

2.6 Περιβαντολλογικοί και χημικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην καρκινογένεση

Η γνώση μας για τη δημιουργία του καρκίνου ως προς τους παράγοντες που συμβάλλουν σε αυτήν είναι πως το περιβάλλον και η έκθεση σε χημικά συμμετέχει στο 90% ως το 95% των σποραδικών νεοπλασιών, αφήνοντας ένα πενιχρό 5%-10% στις περιπτώσεις οικογενών μορφών. Μελέτες περί της συμβολής περιβαντολλογικών παραγόντων, συνυπολογίζοντας δεδομένα γεωγραφικών διαφοροποιήσεων, του στυλ ζωής και των συνηθειών ανά πληθυσμό δείχνουν αυτήν την άρρηκτη σύνδεση της ασθένειας με το περιβάλλον και τη συμπεριφορά των ατόμων σε αυτό [20, 21]. Είναι γεγονός πως η πλειονότητα των περιστατικών εμφανίζεται σε ηλικίες άνω των 55 ετών. Βιολογικοί, βιοχημικοί, περιβαντολλογικοί και βιοφυσικοί παράγοντες όμως συντείνουν σε εμφανίσεις καρκίνου σε πιο πρώιμες ηλικίες. Ακολουθούν οι σημαντικότεροι συντελεστές στην καρκινογένεση.

❖ Γήρας

Όπως είδαμε και λίγο πιο πάνω στο κεφάλαιο η καρκινογένεση είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης βλαβών σε βάθος συνήθως δεκαετιών. Κάθε κυτταρικός κύκλος έχει «απώλειες», η βράχυνση του μήκους των τελομερών που σε συνδυασμό με τη μείωση της ενεργότητας της τελομεράσης λόγω ηλικίας μπορεί να οδηγήσει μεταλλαγές των σωματικών κυττάρων.

❖ Οικογενειακό ιστορικό – Κληρονομικότητα

Ορισμένες μορφές καρκίνου εμφανίζονται συχνότερα σε άτομα του ίδιου γενεαλογικού δέντρου και θεωρούνται κληρονομικές. Για παράδειγμα το ρετινοβλάστωμα (οφθαλμολογικός όγκος που προέρχεται από μεταλλαγή στο

ογκοκατασταλτικό Rb) είναι κατά 45% οικογενές και ανήκει στην ομάδα των οικογενών μορφών καρκίνου (familial Ca). Σε αυτό το σύνολο βρίσκουμε τους οικογενείς καρκίνους του παχέως εντέρου (Αδενωματώδης πολυποδίαση παχέως εντέρου (FAP)), του μαστού, του προστάτη και του παγκρέατος [22]. Η προδιάθεση μπορεί να αντιμετωπιστεί με τακτικούς ελέγχους και συνέπεια από τα άτομα που τη φέρουν.

❖ **Κάπνισμα και αλκοόλ**

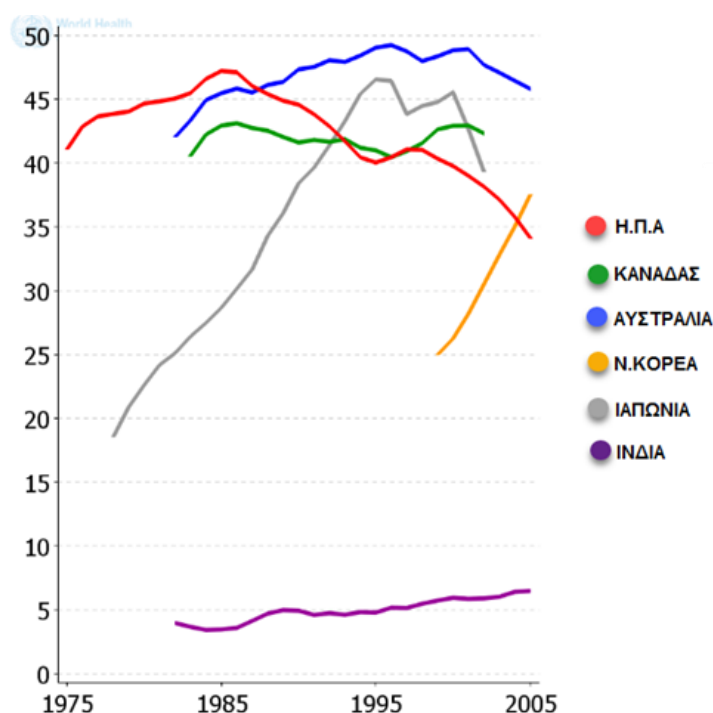
Από τη δεκαετία του '70 και ύστερα οι ενδείξεις για την επίδραση του καπνίσματος στην ασθένεια του καρκίνου ξεκίνησαν να επιβεβαιώνονται με δεδομένα ερευνών. Σήμερα γνωρίζουμε πως το κάπνισμα ευθύνεται για πάνω από το 85% των καρκίνων του πνεύμονα και για το 30% των θανάτων γενικά των καρκινοπαθών. Το παθητικό κάπνισμα δε αυξάνει κατά 5% την πιθανότητα ανάπτυξης της ασθένειας. Με πάνω από 4000 χημικές ουσίες, εκ των οποίων το 10% βλαβερές για την υγεία και γύρω στις 40 να είναι εξακριβωμένα καρκινογενή χημικά (αρσενικό, φορμαλδεΐδη, χρώμιο, κ.ά.), αυτή η κακή συνήθεια συντελεί καταλυτικά στα κρούσματα καρκίνου όπως αυτοί της στοματικής κοιλότητας, του φάρυγγα, του λάρυγγα, των πνευμόνων, του παγκρέατος, των νεφρών και του στομάχου [23].

Όσο για την έτερη κακή συνήθεια, η βλαβερότητα της αθρόας κατανάλωσης αλκοόλ είναι ευρέως γνωστή. Η σύνδεσή της με την καρκινογένεση ξεκίνησε με μελέτες από την πρώτη κιόλας δεκαετία του 1900 (επίδραση αλκοόλ στον καρκίνο του οισοφάγου) οι οποίες συνεχίζονται και για άλλους τύπους καρκίνου. Η χρόνια κατανάλωση αλκοόλ σήμερα γνωρίζουμε πως αποτελεί έναν επιβαρυντικό παράγοντα που αυξάνει την εμφάνιση της ασθένειας στα όργανα του ανωτέρου αναπνευστικού συστήματος, όπως και του πεπτικού, καθώς και στο συκώτι, το στήθος και το πάγκρεας [24]. Ακόμα υπάρχουν ενδείξεις για τη συνεργεία της συνεχούς κατάποσης αλκοόλ και των ιών HBV και HCV (ηπατίτιδες Β και C) η οποία προωθεί την κύρωση του ήπατος και ενδεχομένως αυξάνει το ρίσκο εμφάνισης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος .

❖ **Διατροφή**

Η γνωστή ρήση «είμαστε ό,τι τρώμε» έχει βάση και στην ασθένεια του καρκίνου. Καρκινογόνες ουσίες όπως οι διοξίνες, οι νιτροζαμίνες και τα παρασιτοκτόνα καταλήγουν στο πιάτο των καταναλωτών είτε από τον τρόπο καλλιέργειας, είτε από τον τρόπο συντήρησης είτε από τον τρόπο προετοιμασίας του φαγητού. Έρευνες γύρω από την κατανάλωση κόκκινου κρέατος και τη σχέση της με την εμφάνιση καρκίνου (ειδικά του παχέως εντέρου) έχουν θορυβήσει την παγκόσμια κοινότητα, με πρόσφατα ευρήματα να «ενοχοποιούν» τη συχνή κατανάλωση βοδινού, χοιρινού,

μοσαρίσιου και αρνίσιου κρέατος. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η στατιστική που αφορά τη συσχέτιση του καρκίνου του παχέος εντέρου και της κατανάλωσης κόκκινου κρέατος με αντικείμενο Ιάπωνες μετανάστες σε περιοχές δυτικών προτύπων ζωής και ρυθμού όπως η Ευρώπη ή η Αμερική στην οποία καταδεικνύεται η σύνδεση εμφάνισης καρκίνου με τις περιβαλλοντικές και κυρίως διατροφικές αλλαγές που βίωσαν[25]. Η συσχέτισή του δε με την κατανάλωση συγκεκριμένα βοδινού είναι ακόμα πιο ανησυχητική, με τις σύγχρονες δυτικές χώρες να έχουν τα πρωτεία σε ποσοστά κρουσμάτων και τις πρόσφατα δυτικοποιημένες οικονομίες να ακολουθούν με ραγδαίους ρυθμούς αύξησης.



Εικόνα 2.11: Στατιστική πρόοδος περιστατικών καρκίνου παχέος εντέρου σε βάθος 30ετίας ανά χώρα.

Στην πιο πάνω εικόνα φαίνεται η ραγδαία αύξηση των περιστατικών καρκίνου του παχέος εντέρου στις δύο ασιατικές χώρες που βίωσαν έντονη μεταβολή στον τρόπο ζωής και οικονομίας, υιοθετώντας ένα αστικοποιημένο μοντέλο δυτικού τύπου. Η απότομη κλίση της καμπύλης αφορά δύο συνιστώσες. Αφενός τα λιμάνια των συγκεκριμένων χωρών «άνοιξαν» για τις εισαγωγές βοδινού κρέατος από τους μεγάλους εξαγωγείς (Η.Π.Α. , Αυστραλία), αφετέρου η προετοιμασία του με παραδοσιακές τεχνικές μαγειρέματος που επέτασσαν λεπτές φέτες να περνούν λίγα λεπτά ή δευτερόλεπτα σε βραστό νερό (με αποτέλεσμα το εσωτερικό να παραμένει ωμό), έφεραν τη ραγδαία αυτή αύξηση εμφάνισης καρκίνου. Η δεύτερη αυτή συνιστώσα είναι και ο παράγοντας που «ανεβάζει» στα υψηλότερα σκαλιά τις χώρες αυτές, έναντι άλλων χωρών που γνώρισαν παρόμοιους κοινωνικούς και οικονομικούς

μετασχηματισμούς τις τελευταίες δεκαετίες, αλλά παραδοσιακά ως διατροφική συνήθεια είχαν το κρέας να είναι κανονικά μαγειρεμένο [26]. Στον αντίποδα βρίσκεται η Ινδία, χώρα με πολύ μικρούς πληθυσμούς να έχουν στη διατροφή τους το βοδινό κρέας καταλαμβάνοντας την τελευταία θέση σε εμφανίσεις καρκίνου του παχέος εντέρου.

❖ Παχυσαρκία

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η παχυσαρκία συνδέεται με την αύξηση του κινδύνου για διάφορες μορφές καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων του παχέος εντέρου, του ενδομητρίου, των νεφρών, του οισοφάγου, του παγκρέατος, της χοληδόχου κύστης και του ήπατος. Παγκόσμιοι οργανισμοί (WCRF) και το Αμερικανικό Ινστιτούτο Έρευνας για τον καρκίνο (AICR) μετά από χρόνιες μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η παχυσαρκία είναι ένας καθιερωμένος παράγοντας κινδύνου για αρκετά περιστατικά καρκίνου. Επιπλέον, η παχυσαρκία μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη απόκριση στη θεραπεία, την παρεμπόδιση της έγκαιρης πρόγνωσης και συνεπώς την αύξηση της θνησιμότητας από την ασθένεια [27]. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση έχει υπολογιστεί ότι μια υποθετική, ιδανική συνθήκη εξάλειψης του υπερβολικού βάρους θα μπορούσε να μειώσει μέχρι έως 21.000 τα ετήσια περιστατικά καρκίνου του παχέος εντέρου και κατά 13.000 τα αντίστοιχα του καρκίνου του μαστού [28]. Όσο για την πρόοδο της ασθένειας, η παχυσαρκία είναι παράγοντας επιτάχυνσής της. Για παράδειγμα, στον καρκίνο του μαστού ένας μεγάλος αριθμός BMI (Δείκτης Μάζας Σώματος) έχει παρατηρηθεί πως ευνοεί την ανάπτυξη όγκων υψηλότερου βαθμού καθώς και την ταχύτητα σχηματισμού τους [29].

❖ Παθογόνα

Σε παγκόσμιο επίπεδο οι λοιμώξεις σχετίζονται με περίπου το 18% των νεοπλασμάτων, με το ποσοστό αυτό να κυμαίνεται από περίπου 10% στις χώρες υψηλού εισοδήματος έως και 25% σε χώρες του τρίτου κόσμου, με τα πρωτεία να ανήκουν στις χώρες της νοτιοανατολικής Αφρικής [30]. Στις αναπτυγμένες δυτικές οικονομίες οι πιο συχνά απαντώμενοι ιοί (συγκεκριμένα DNA ιοί) είναι αυτοί του ανθρώπινου θηλώματος (HPV) και της ηπατίτιδας Β (HBV). Οι HPV είναι μέλη μιας ευρείας οικογένειας ιών, γνωστοί ως ιοί Papovna και θεωρούνται άμεσα μεταλλαξιγόνοι εισάγοντας τα ιικά γονίδια E7 και E6, με αποτέλεσμα την αναστολή του pRB (απορρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού) και του p53, βάζοντας «φρένο» στη διαδικασία της απόπτωσης. Ο HPV είναι από τους πιο διαδεδομένους ιούς (ποσοστό αρκετά άνω του 75%), έχει συμμετοχή στην ανάπτυξη του καρκίνου

της μήτρας και ευθύνεται για το 12% περίπου του συνόλου των καρκίνων του γυναικείου πληθυσμού παγκοσμίως [31]. Οι ιοί της ηπατίτιδας και ο HIV (ο ιός που προκαλεί το AIDS) σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου και είναι ίσως οι πιο γνωστοί ευρέως, ανήκουν όμως σε μια ομάδα παθογόνων (DNA-ιών και βακτηρίων) που έχουν μετέχουν στη διαδικασία της καρκινογένεσης.

Πίνακας 2.2: Παθογόνοι μικροοργανισμοί και είδη καρκίνων που εν δυνάμει προωθούν [21].

Είδος παθογόνου μικροοργανισμού	Είδος καρκίνου που προκαλεί
Ανθρώπινου θηλώματος (HPV)	Συνδέεται με εμφάνιση καρκίνου της μήτρας.
Ηπατίτιδας Β (HBV) και C (HCV)	Κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του ήπατος.
Ιός της ανθρώπινης ανοσοεπάρκειας (HIV)	Κίνδυνος εμφάνισης σαρκώματος Kaposi.
Ιός Epstein-Barr (EBV)	Σύνδεση με το λέμφωμα του Burkitt.
Ανθρώπινος ερπητοϊός-8 (HHV8)	Κύριος παράγοντας κινδύνου για το σάρκωμα Kaposi.
Ελικοβακτηρίδιο του Πυλωρού (Helicobacter pylori)	Μπορεί να προκαλέσει έλκος στομάχου που μπορεί να οδηγήσει MALT γαστρικό λέμφωμα και καρκίνο του οισοφάγου.
Σαλμονέλα του τύπου (<i>Salmonella typhi</i>)	Μπορεί να προκαλέσει καρκίνο της χοληδόχου κύστης.
Στρεπτόκοκκοι ομάδας D (bovis)	Αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου.
Ανθρώπινος Τ-Λεμφοτρόπος ιός 1 (HTLV-1)	Αύξηση του κινδύνου λευχαιμίας.

❖ Ατμοσφαιρική ρύπανση, υπεριώδης ακτινοβολία

Η ρύπανση του αέρα και των υδάτων είναι το αποτέλεσμα βιολογικών, βιοχημικών αντιδράσεων σε ατμόσφαιρα, στρατόσφαιρα και νερό και μπορεί να θεωρηθεί απότοκος της βιομηχανικής ανάπτυξης, της ραγδαίας αύξησης του πληθυσμού και της εντατικοποίησης της παραγωγής. Η ατμοσφαιρική ρύπανση οφείλεται σε αιωρούμενα σωματίδια, κυρίως πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες

(PAH) και οξειδία του άνθρακα, ενώ σε ένα πιο άμεσο κλειστό περιβάλλον εσωτερικών χώρων συναντάμε ουσίες όπως οι πτητικές οργανικές ενώσεις, το βενζόλιο και το 1,3-βουταδιένιο. Πολλές από αυτές τις ενώσεις είναι ιδιαίτερα επιβλαβείς για τον άνθρωπο, με τους PAH να αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα καθώς παρεισφρέουν στο αναπνευστικό μέσω της αναπνοής. Στα υπερπληθή αστικά κέντρα η συνεχής έκθεση σε έναν ακόμα συνήθη ρύπο, το οξείδιο του αζώτου έχει αποδειχθεί πως αυξάνει τον κίνδυνο της συγκεκριμένης ασθένειας ακόμα και σε πληθυσμούς μη καπνιστών. Διοξείδιο και μονοξείδιο του άνθρακα, μεθάνιο και καυσαέρια, όπως και υδροφθοράνθρακες (HFCs) ευθύνονται για σχεδόν 3,5 εκατομμύρια θανάτους κάθε χρόνο παγκοσμίως [32]. Στα ανώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας υπάρχει το στρώμα του όζοντος, το οποίο απορροφά ένα σημαντικό μέρος της UV ακτινοβολίας. Η αραίωσή του γνωστή και ως «τρύπα» του όζοντος είναι αποτέλεσμα της χρήσης χλωροφθορανθράκων (CFCs) που εμπεριέχονται προωθητικά αέρια και σε ψυκτικές συσκευές. Το αποτέλεσμα ήταν για πολλά χρόνια να καλπάζουν οι τα ποσοστά των δερματικών καρκίνων. Το φαινόμενο που ήταν φλέγον περιβαντολλογικό θέμα για την επιστημονική κοινότητα από περίπου το 1970, όταν και παρατηρήθηκε αρχικά πάνω από την Ανταρκτική, έλαβε μια αποφασιστική για την παγκόσμια κοινότητα δράση όταν το 1987 υπεγράφη το πρωτόκολλο του Μόντρεαλ το οποίο έχει οδηγήσει στη σταδιακή κατάργηση του 98% της παραγωγής και κατανάλωσης των ουσιών που καταστρέφουν το όζον (ΟΚΟ). Στόχος είναι η επαναφορά της στοιβάδας του όζοντος έως τα μέσα του αιώνα σε συνθήκες προ του 1980, στόχος που χρόνο με το χρόνο επιτυγχάνεται [33].

Συνοψίζοντας, η πολυπαραγοντική φύση της εμφάνισης του καρκίνου είναι ο λόγος της αδυναμίας έως σήμερα της πρόβλεψης, της εκτίμησης της προόδου και της αντιμετώπισής της. Λόγω της πολυπλοκότητας των μηχανισμών που εμπλέκονται στην κυτταρική απορύθμιση η Μοριακή Βιολογία χρειάστηκε την αρωγή επιπλέον επιστημών με τα μαθηματικά και την εξέλιξη των υπολογιστικών συστημάτων να γίνονται τις τελευταίες δεκαετίες αναπόσπαστο κομμάτι της έρευνας.

Βιβλιογραφία 2^{ου} κεφαλαίου

1. W. K. C. Guthrie (1971), **The Sophists**, London: Cambridge University Press
2. Stephen J. McPhee, Χαράλαμπος Μ. Μουτσόπουλος (2000), **Παθολογική φυσιολογία**, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.
3. Πατελάρου Α , Σηφάκη-Πιστόλλα Δ, Ξυλούρη Α, Πρινάρη Α, **Πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα για την εξάπλωση του καρκίνου στην Ελλάδα και την οργάνωση φορέων πρόληψης σε παγκόσμιο επίπεδο: Μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας**, Ελληνικό Περιοδικό της Νοσηλευτικής Επιστήμης.
4. Ribble D., Goldstein N., Norris A. D. (2005), **A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates**, BMC Biotechnology, 5:12.
5. Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A., (2005), **Mutations induced by ultraviolet light**, **Mutation Research**, 1:571(1-2):19-31
6. Upton C. (2012). **Cancer Growth and Progression, Mechanisms of Oncogenesis**, Vol. 12, 43-61
7. Berk, Matsudaira Lodish (2004), **Molecular Cell Biology Fifth Edition**
8. **introduction to oncogenes and molecular cancer medicine**, Dennis W. Ross (1998)
9. Lockwood W. W., Chari R., Coe B.P, Girard L., MacAulay C., Lam S., Gazdar A.F., Minna J.D., Lam W.L, (2008), **DNA amplification is a ubiquitous mechanism of oncogene activation in lung and other cancers**, Nature, 27, 4615–4624;
10. Gray M. J., Gallick G. E. , (2010), **Mechanisms of Oncogenesis**, SpringerLink
11. Jerry W. Shay, Ying Zou, Hiyama E. (2001), **Telomerase and cancer**, Human Molecular Genetics, Vol. 10, No. 7, 677-685, Oxford University Press
12. Alberts, Johnson, Lewis (2014), **Molecular Biology Of The Cell Sixth Edition**, Book News Inc., Portland, OR
13. Robert A. Weinberg (2007)- **The Biology Of Cancer**, Garland Science
14. Green D. R., Zhenyue H. & Tak W. Mak, Yong-Ling P. Ow,(2008) **Cytochrome c: functions beyond respiration**, Nature Reviews Molecular Cell Biology 9, 532-542

15. Vladimir P Skulachev, (1998). **Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades**, Febs Letters, Vol.423, pp.275–280
16. Norrby K (1997), **Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control**, 105(6):417-37
17. Seyfried TN, Huysentruyt LC (2013), **on the origin of cancer metastasis, Critical Reviews in Oncogenesis**, vol. 18(1-2):43-73.
18. Desgrosellier JS, Cheresh DA (2010), **Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities**. Nature reviews cancer, vol; 10(1):9-22.
19. Moschos J.S., Kirkwood J.M. (2007), **Integrins and Cancer**, Oncology (Williston Park) , 21(9 Suppl 3):13-20
20. Hanahan D, Weinberg RA (2000), **The hallmarks of cancer**. Cell. ; 100(1):57–70.
21. Parsa N., **Environmental Factors Inducing Human Cancers, 2012**, Iranian Journal of Public Health, 41(11): 1-9
22. Sci C., Hruban RH., Klein AP., **Familial pancreatic cancer, 2009**, M Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 133(3):365-74
23. Centers for Disease Control and Prevention (US), **National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion**, Office on Smoking and Health (US), 2010.
24. Tuyns AJ. (1979), **Epidemiology of alcohol and cancer**, Cancer Res. Jul; 39(7 Pt 2):2840-3.
25. Haenszel W, Kurihara M (1968). **Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States**. Journal of the National Cancer Institute. Jan; 40(1):43-68.
26. Hausen H. (2012), **Red meat consumption and cancer: Reasons to suspect involvement of bovine infectious factors in colorectal cancer**, International journal of cancer, Jun 1;130(11):2475-83
27. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. **Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective**. Washington, DC: AICR; 2007
28. Giovanni De Pergola, Silvestris F. (2013), **Obesity as a Major Risk Factor for Cancer**, Journal of Obesity, vol: 2013;291546.
29. Daling JR, Malone KE et. al. (2001) **Relation of body mass index to tumor markers and survival among young women with invasive ductal breast carcinoma**. Cancer. Aug 15; 92(4):720-9.

30. Parkin DM. (2006). **The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002.** International journal of cancer, Jun 15; 118(12):3030-44.
31. World Health Organization: <http://www.who.int/immunization/diseases/hpv/en/>
32. Mateen FJ, Brook RD (2011). **Air pollution as an emerging global risk factor for stroke,** JAMA, Mar 23; 305(12):1240-1.
33. Ευρωπαϊκή επιτροπή, https://ec.europa.eu/environment/efe/themes/montreal-protocol-25-years-protecting-ozone-layer_el

3

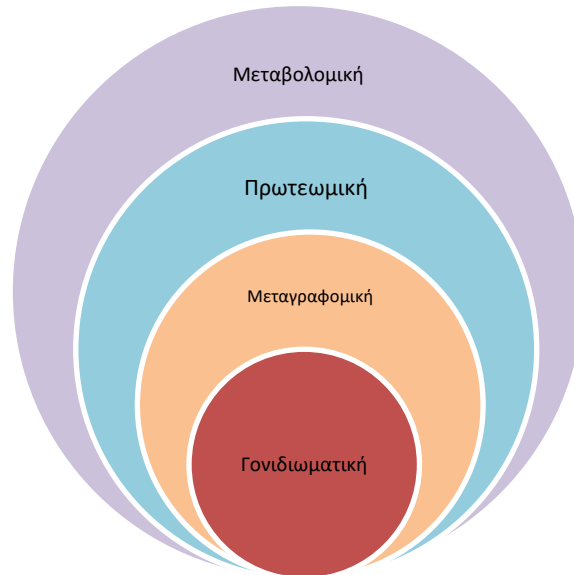
Τεχνικές Πρωτεωμικής

3.1 Υπολογιστική Βιολογία

Τα τελευταία χρόνια για τη βιολογική έρευνα αποτελούν την απαρχή μιας χρυσής εποχής, με την εισαγωγή νέων τεχνολογιών και τη συμβολή άλλων πεδίων επιστημών. Η σύμπλευση της βιολογίας με τομείς όπως τα μαθηματικά, η στατιστική και η πληροφορική γιγάντωσε την παραγωγή βιολογικών δεδομένων, ενώ ταυτόχρονα κατέστησε δυνατή τη διαχείριση, την επεξεργασία και ερμηνεία τους [1], [2]. Έτσι σήμερα βιώνουμε την εποχή της υπολογιστικής βιολογίας (computational biology), μιας επιστήμης-μίγματος η οποία παρέχει τη δυνατότητα της μοντελοποίησης, της πρόβλεψης και της εξόρυξης επιθυμητών δεδομένων από ακολουθίες. Τα υψηλότερα επίπεδα οργάνωσης της βιολογικής πληροφορίας άνοιξαν το δρόμο για την ανάπτυξη νέων πεδίων της υπολογιστικής βιολογίας. Οι νέες αυτές κατευθύνσεις με τη δημοφιλή κατάληξη «-omics» έχουν ως στόχο τη συνολική μελέτη των βιολογικών μορίων, σε όλο τους το εύρος. Τα βασικότερα πεδία είναι τα εξής:

- Γονιδιωματική (genomics): Η μελέτη του γονιδιώματος, δηλαδή του συνόλου των γονιδίων ενός οργανισμού, εμπειρικλείοντας ολόκληρο το σύνολο των γενετικών οδηγιών που τον καθορίζουν.
- Πρωτεωμική (proteomics): Το αντικείμενό της είναι το πρωτέωμα, το οποίο είναι το σύνολο των πρωτεϊνών ενός οργανισμού, με βασικό άξονα την κατανόηση της δομής και της λειτουργίας τους.
- Μεταγραφομική (transcriptomics): Στόχος της η διεξοδική μελέτη του μεταγραφώματος, δηλαδή του συνόλου των RNA μορίων: mRNA, rRNA, tRNA, μη-κωδικών (non-coding) RNA τα οποία μεταγράφονται σε ένα κύτταρο ή σε έναν πληθυσμό κυττάρων

- Μεταβολομική (metabolomics): Η κατεύθυνσή της προσανατολίζεται στη μελέτη των βιοχημικών διαδικασιών και των μεταβολιτών τους σε εύρος δείγματος από ένα κύτταρο ως και το σύνολο ενός οργανισμού[1].

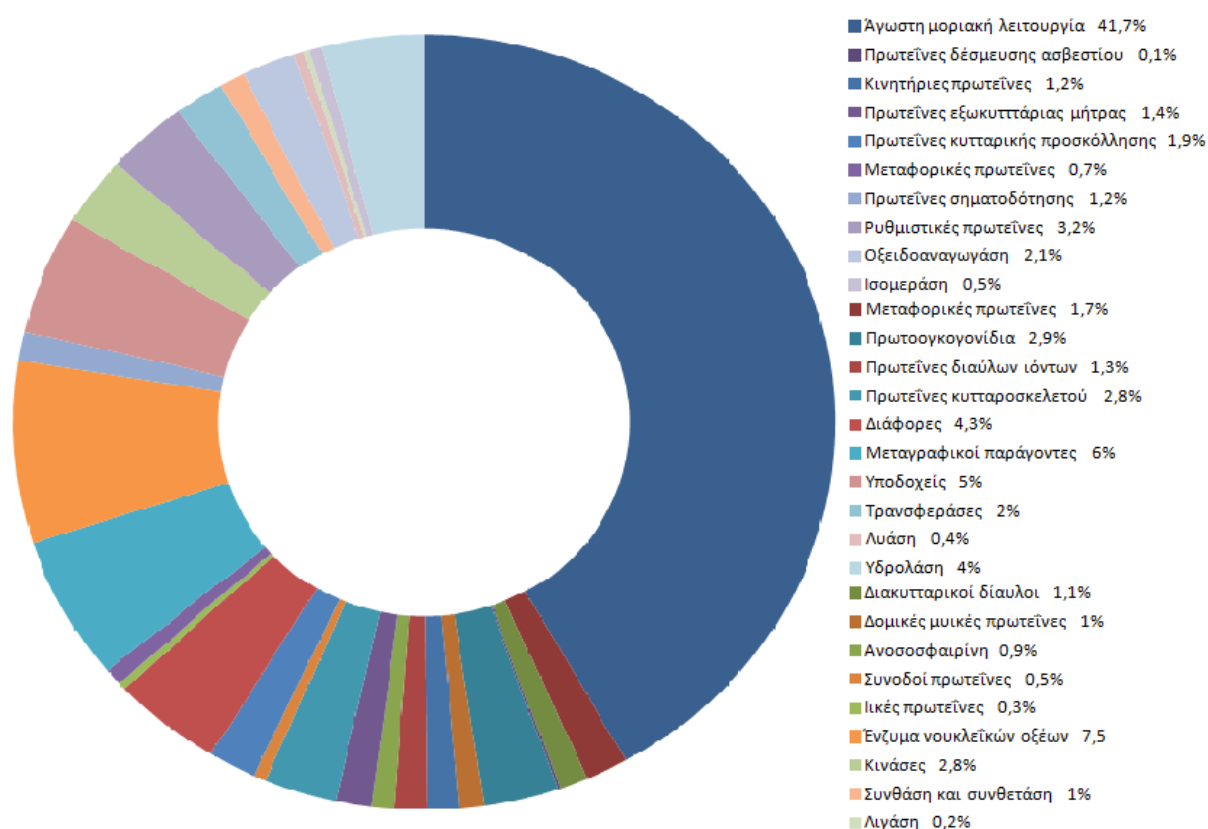


Εικόνα 3.1: Πεδία της υπολογιστικής βιολογίας για υψηλότερα επίπεδα βιολογικής πληροφορίας.

3.2 Το πρωτέωμα

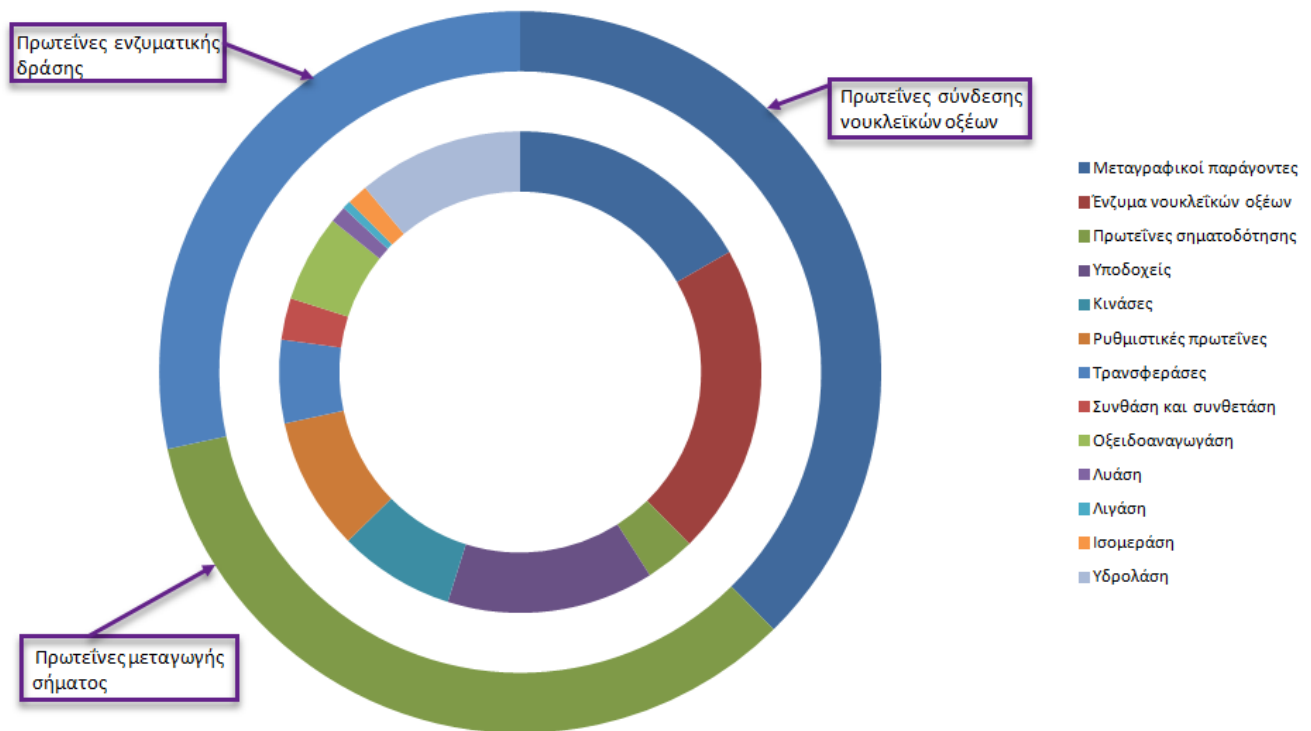
Όπως είδαμε στο πρώτο κεφάλαιο κάθε κύτταρο περιέχει όλες τις απαραίτητες γονιδιακές πληροφορίες για τη δημιουργία ενός οργανισμού. Ωστόσο, η έκφραση των γονιδίων διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο. Τα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα απαραίτητα για τις βασικές κυτταρικές λειτουργίες εκφράζονται σχεδόν καθολικά σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, ενώ εκείνα που είναι υπεύθυνα για εξειδικευμένες λειτουργίες εκφράζονται σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων. Άρα, μπορούμε να πούμε πως κάθε οργανισμός έχει ένα γονιδίωμα αλλά πολλά πρωτεώματα αλλά και πως κάθε πρωτέωμα αποτελεί ένα υποσύνολο του συνόλου των γονιδιακών προϊόντων που μπορούν να παραχθούν. Αν και ένα και μοναδικό, το γονιδίωμα είναι πιο σύνθετο, εμπεριέχοντας όλες τις πιθανές εκφράσεις της γονιδιακής πληροφορίας. Αντίθετα το πρωτέωμα του κάθε κυττάρου αποτελεί ένα σύνολο μεταξύ του 30% και 80% των πιθανών αυτών εκφράσεων. Το σύνολο του πρωτεώματος από προϊόν μετάφρασης στα ριβοσώματα ως και το «θάνατό» του επιδέχεται πολλών τροποποιήσεων. Ένα από τα αντικείμενα της πρωτεωμικής είναι η μελέτη αυτού του «κύκλου ζωής» των πρωτεϊνών, όπως και η ταξινόμησή τους βάσει αλληλουχίας και δομής. Μία ακόμα κατεύθυνση του κλάδου της πρωτεωμικής είναι η καταχώρηση των γνωστών πρωτεϊνών σε οικογένειες,

δηλαδή πρωτεΐνες οι οποίες έχουν κοινή προέλευση, παρεμφερή αλληλουχία και λειτουργική συνάφεια [3].



Εικόνα 3.2: Ομάδες πρωτεϊνών συναφούς λειτουργίας .

Οι καταχωρημένες πρωτεΐνες που ανήκουν στις διάφορες ομάδες μπορούν να ομαδοποιηθούν περαιτέρω καθώς κάποιες έχουν ενζυματική δράση, ενώ άλλες έχουν να κάνουν με την πρόσδεση σε νουκλεϊκά οξέα ελέγχοντας τη γονιδιακή έκφραση. Ακόμα ένα ποσοστό συμμετέχει σε πρωτεϊνικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος [3].



Εικόνα 3.3: Υπερομάδες πρωτεϊνών με κοινές ευρύτερες λειτουργίες

3.3 Από την κλασική βιολογία στη Βιολογία των Συστημάτων

Η μελέτη του πρωτεώματος ανέβασε το επίπεδο της βιολογικής έρευνας. Αν και φαινομενικά πρωτεωμική και κλασική βιολογία σε πρωτεϊνικό επίπεδο ασχολούνται με κοινό αντικείμενο, την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών, υπάρχουν ειδοποιείς διαφορές στον τρόπο μελέτης και στη στόχευσή τους. Η προσέγγιση της βιολογίας στον τομέα των πρωτεϊνών είναι κυρίως η μελέτη της δομής και της λειτουργίας τους. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει να υπάρχει πλήρης ακολουθιακή ανάλυση, να προσδιοριστεί επαρκώς η δομή και να γίνει μοντελοποίηση για περαιτέρω διερεύνηση της πρωτεϊνικής λειτουργίας. Αυτή η αλυσίδα εργασιών παράγει αποτελέσματα και ευρήματα σημαντικά για τις επιστήμες όπως η βιοχημεία και η ενζυμολογία. Στον αντίποδα η πρωτεωμική έχει ως αντικείμενο πολυπρωτεϊνικά συστήματα, εστιάζοντας στην αλληλεπίδραση μεταξύ των διάφορων πρωτεϊνών και το ρόλο που αυτές διαδραματίζουν ως μέρος ενός συστήματος. Ακόμα, το αντικείμενο της ανάλυσης του πρωτεώματος, σε αντίθεση με την χημική βιολογία που εστιάζει στην πλήρη αλληλούχιση μιας πρωτεΐνης, είναι συνήθως πολύπλοκα πρωτεϊνικά μίγματα και η αλληλούχιση είναι μερική. Βάσεις δεδομένων και υπολογιστικά εργαλεία εξασφαλίζουν την ταχύτητα της ανάλυσης (high - throughput analysis). Άρα, είναι εύκολα κατανοητό πως το αντικείμενο της πρωτεωμικής δεν

είναι η δομική βιολογία των πρωτεϊνών με το στενό όρο, αλλά η δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ τους και ο χαρακτηρισμός της συμπεριφοράς του συστήματος στο οποίο συμμετέχουν.

Μαζί με τα υπόλοιπα πεδία που αφορούν τα υψηλότερα επίπεδα οργάνωσης της βιολογικής πληροφορίας η πρωτεωμική δημιούργησε το χώρο και τις συνθήκες για μια νέα επιστημονική περιοχή, τη **Βιολογία των Συστημάτων**. Σε αυτό το πεδίο αντί να εξετάζονται υποσύνολα και συνιστώσες μιας αρχικής υπόθεσης, επιχειρείται ο συσχετισμός των συνιστωσών και ο προσδιορισμός των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους ώστε να οδηγηθούμε σε νέες υποθέσεις από τα ίδια τα δεδομένα. Λόγω της μη συγκεκριμένης στόχευσης, ο όγκος δεδομένων που επεξεργάζεται είναι πολύ μεγάλος. Εκεί υπεισέρχεται η έννοια των συνεργών επιστημών, με μαθηματικές μεθόδους, στατιστικά εργαλεία και πληροφορική να πρωτοστατούν στην υποβοήθηση της βιολογίας και της χημείας. Με τα προηγμένα αυτά εργαλεία τα ογκώδη δεδομένα μπορούν να προσπελάζονται γρήγορα, να επεξεργάζονται και η πληροφορία να στοχεύεται και να εξορύπεται, ενώ τα μοντέλα πρόβλεψης γίνονται ακριβέστερα και πιο αξιόπιστα. Για την κατανόηση των βιολογικών συστημάτων ερευνάται η δομή τους σε βάθος, ξεκινώντας από γονιδιακό επίπεδο, φτάνοντας ως και την κατασκευή τους, όπως και η δυναμική τους, δηλαδή η απόκρισή τους σε εξωτερικά ερεθίσματα. Ακόμα μελετώνται οι μέθοδοι ελέγχου και τροποποίησης, όροι που αφορούν την αντίδραση σε διαταραχές και την απόκτηση των ιδιοτήτων των συστημάτων[1],[7].

3.4 Εξελίξεις που οδήγησαν στη Πρωτεωμική και τη Βιολογία των Συστημάτων

Οι όροι «πρωτέωμα» και «πρωτεωμική» εισήχθησαν στις αρχές της δεκαετίας του '90 (1994, Marc Wilkins) για να αποτελέσουν συμπλήρωμα της γονιδιωματικής. Αυτά τα δύο πεδία αποτέλεσαν την απαρχή της επόμενης εποχής στη βιολογία. Η εξέλιξη δύο τομέων, της πληροφορικής και των τεχνικών ανάλυσης βιολογικών δεδομένων, άλλαξαν το τοπίο στο χώρο της μοριακής βιολογίας, θεμελιώνοντας τις βάσεις για την περεταίρω ανάπτυξη των πεδίων που συγκροτούν τη βιολογία των συστημάτων.

3.4.1 Βιοπληροφορική

Οι γονιδιακές, ESTs (expressed sequence tag)³ και πρωτεϊνικές βάσεις δεδομένων που είχαν κάνει την εμφάνισή τους στη δεκαετία του '90 έβρισκαν όλο και περισσότερο χρήση ως κατάλογοι εκφρασμένων γονιδίων. Η ραγδαία ανάπτυξη της πληροφορικής τις τελευταίες δεκαετίες έδωσε ευκολία στο χειρισμό τους, δίνοντας τη δυνατότητα αποθήκευσης, ανάκτησης και διανομής των δεδομένων. Η σύμπραξη της στον τομέα της μοριακής βιολογίας γιγάντωσε τον όγκο των βάσεων βιολογικών δεδομένων, με αυτές να διπλασιάζουν το περιεχόμενό τους ανά περίπου 15 μήνες [8],[9]. Εργαλεία πληροφορικής σήμερα, χρησιμοποιώντας τον παγκόσμιο ιστό (internet), μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναζήτηση μιας αλληλουχίας νουκλεϊκών οξέων ή μιας πρωτεΐνης σε μια βάση δεδομένων η οποία πλέον διαρκεί δευτερόλεπτα. Ακόμα, η αναζήτηση όλων των δεδομένων (αλληλουχίας, δομής, λειτουργίας) στις μέρες μας είναι δωρεάν και εύκολα προσβάσιμη για τον καθένα από το σπίτι του μέσω των συμβατικών ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με την αύξηση των βιολογικών δεδομένων υπήρξε η ανάγκη ανάπτυξης αλγορίθμων οι οποίοι θα μπορούσαν να στοιχίσουν ακολουθίες, να τις αναλύσουν για να εξάγουν συμπεράσματα και να προβλέψουν τη δομή και τη λειτουργία τους. Οπότε η πληροφορική κλήθηκε να ανταποκριθεί και σε αυτόν τον τομέα, προσθέτοντας στην οργάνωση των βάσεων δεδομένων εργαλεία για την επεξεργασία και μελέτη των δειγμάτων. Αυτό το πάντρεμα της επιστήμης των υπολογιστών και της βιολογίας ονομάστηκε βιοπληροφορική [13].

3.3.1.1 Ιστορική αναδρομή

Η ανάπτυξη του τομέα της βιοπληροφορικής είναι αποτέλεσμα της προόδου τόσο στη μοριακή βιολογία, όσο και στην επιστήμη των υπολογιστών. Το πρώτο μεγάλο εγχείρημα στον τομέα των bioinformatics (αν και η ονοματοδοσία του πεδίου συνέβη αργότερα) έγινε τη δεκαετία του '60 (Margaret Dayhoff 1965) και είχε ως αντικείμενο την ανάπτυξη μιας βάσης δεδομένων πρωτεϊνικής αλληλουχίας (*Atlas of Protein Sequence and Structure*) [10]. Στη συνέχεια στις αρχές του '70 το Εθνικό Εργαστήριο Brookhaven ίδρυσε την τράπεζα πρωτεϊνικών δεδομένων (Protein Data Bank) με σκοπό την αρχειοθέτηση τρισδιάστατων πρωτεϊνικών δομών. Στο ξεκίνημά της οι εγγεγραμμένες πρωτεΐνες δεν ξεπερνούσαν τις δώδεκα, ενώ σήμερα υπάρχουν πάνω από 30.000 [11]. Το πρώτο βήμα για την μετάβαση από την

³ Τα ESTs είναι μικρές αλληλουχίες, κομμάτια αλληλουχιών cDNA. Χρησιμοποιούνται ως ετικέτες για την ταυτοποίηση προϊόντων μεταγραφής, και είναι πολύ σημαντικά για τον προσδιορισμό των γονιδιακών αλληλουχιών [5]. Ως σήμερα πάνω από 70 εκατομμύρια ESTs είναι διαθέσιμα σε βάσεις δεδομένων.

καταχώρηση δεδομένων στην αντιπαραβολή και ανάλυσή τους επετεύχθη το 1970 από τους Needleman και Wunsch με την ανακάλυψη του πρώτου αλγόριθμου ευθυγράμμισης ακολουθιών. Λίγα χρόνια μετά τέθηκαν τα θεμέλια για την πρόβλεψη της δομής των πρωτεϊνών, με τον πρώτο αλγόριθμο πρόβλεψης (Chou , Fasman 1974) [12]. Στην αρχή της επόμενης δεκαετίας ιδρύθηκε η Gene Bank (1980) και με την εισαγωγή γρήγορων αλγόριθμων όπως οι FASTA (William Pearson) και BLAST (Stephen- Altschul) η βιολογική έρευνα γιγαντώθηκε, φτάνοντας στον κορυφώνα της τον Απρίλη 2003 με την ανακοίνωση της ολοκλήρωσης, ύστερα από 13 χρόνια, της αποκωδικοποίησης του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project) [13].

3.3.1.2 Πρόγραμμα Αποκωδικοποίησης του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (The Human Genome Project, HGP)

Ξεκινώντας το 1990 το διεπιστημονικό Πρόγραμμα της Αποκωδικοποίησης του Ανθρώπινου Γονιδιώματος είχε ως πρωταρχικό σκοπό τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων που αποτελούν το DNA, ενώ παράλληλα προγράμματα έτρεξαν και για άλλους οργανισμούς ώστε να υπάρχει καλύτερη κατανόηση του δικού μας γενετικού κώδικα (συγκριτική γονιδιωματική). Οι γνώσεις μας για το ανθρώπινο DNA περί του αριθμού και μήκους των γονιδίων και όπως και της έκφρασής τους επιτεύχθηκαν μέσω του HGP, ενώ σήμερα έχουν εντοπιστεί συγκεκριμένες ακολουθίες σε συγκεκριμένα γονίδια που σχετίζονται με ασθένειες όπως ο καρκίνος. Οι βασικοί στόχοι του αρχικού προγραμματισμού του HGP ήταν οι εξής:

- Ο καθορισμός του γενετικού και φυσικού χάρτη.
- Η ανάλυση της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος, όπως και η ανάπτυξη τεχνολογιών και εργαλείων πληροφορικής για αυτόματο sequencing.
- Εντοπισμός γονιδίων και μελέτη της έκφρασής τους.
- Μελέτη των πολυμορφισμών (SNPs) του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Μετά το πέρας του προγράμματος γνωρίζουμε πως το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από 3×10^{12} βάσεις και είναι σχεδόν απόλυτα (99,9%) κοινό σε όλους τους ανθρώπους. Οι επαναλαμβανόμενες ακολουθίες που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες αποτελούν περίπου το 50% του συνόλου του, ενώ οι κωδικοποιούσες περιοχές αντιπροσωπεύουν το 2% [2].

3.3.1.2.1 Συνεισφορά του HGP στη Βιολογία των Συστημάτων

Το HGP απέδειξε πως η χαρτογράφηση και κατανόηση του γονιδιώματος ήταν αναγκαία για τη μελέτη ενός σύνθετου βιολογικού συστήματος καθώς κάθε χαρακτηριστικό του οργανισμού, όπως και κάθε λειτουργία του προϋποθέτουν συνεργία γονιδίων και των προϊόντων τους. Έτσι, μέσω του προγράμματος ξεπήδησαν τα καινούρια ολιστικά πεδία βιολογίας των «-omics», όπως και καινούριες τεχνολογίες στην παραγωγή βιολογικών δεδομένων. Πρώτα εμφανίστηκε το πεδίο της πρωτεωμικής που μαζί με τη γονιδιωματική χρησιμοποιήθηκαν για μια πρώτη ανάγνωση των βιολογικών μονοπατιών και μαζί με αναλυτικές συσκευές που χάρισε η τεχνολογική πρόοδος όπως οι μικροσυστοιχίες και η φασματοσκοπία μάζας μείωσαν το χρόνο των πειραμάτων και αύξησαν την ποιότητα των δεδομένων επιταχύνοντας την παραγωγή αποτελεσμάτων. Τέλος, το HGP οδήγησε στην ανάπτυξη εξελιγμένων υπολογιστικών και μαθηματικών μοντέλων αλλάζοντας μια για πάντα την κουλτούρα της βιολογικής έρευνας προωθώντας μια πιο διεπιστημονική προσέγγιση μέσω της συμπόρευσης των πεδίων των μαθηματικών, της πληροφορικής και της Βιολογίας υπό τη σκεπή της βιοπληροφορικής[59]. Όλες οι ακολουθίες που εντοπίζονται στο ανθρώπινο γονιδίωμα και οι αλληλουχίες του πρωτεώματος αποθηκεύονται σε βάσεις δεδομένων που μαζί με την εισαγωγή αλγορίθμων σύγκρισης και ευθυγράμμισης δίνουν τη δυνατότητα καθημερινά να εισάγονται νέα δεδομένα που χρησιμοποιούνται σε πειράματα με αντικείμενο το μοριακό προφίλ για διάφορες ασθένειες όπως ο καρκίνος σε δημόσια προσβάσιμες σελίδες στο διαδίκτυο.

3.4 Ακολουθιακές Μέθοδοι βιοπληροφορικής

Η συγκριτική ανάλυση είναι μια από τις παραδοσιακές τεχνικές της βιολογίας. Από τη θεωρία της φυσικής επιλογής των ειδών του Δαρβίνου, μέσω της παρατήρησης και σύγκρισης των μορφολογικών χαρακτηριστικών των οργανισμών χρησιμοποιήθηκε ως εργαλείο για την πραγματοποίηση αυτού του σπουδαίου έργου. Σήμερα, μέσω των αλγορίθμων σύγκρισης ακολουθιών ως κομμάτι της βιοπληροφορικής η συγκριτική ανάλυση φτάνει σε μακρομοριακό επίπεδο και στοχεύει στην κατανόηση των δομικών, λειτουργικών και εξελικτικών σχέσεων ανάμεσα σε δύο αντιπαραβαλλόμενες ακολουθίες. Έτσι, μέσω των ακολουθιακών μεθόδων γεννήθηκε ένα ιδιαίτερο μονοπάτι της Βιολογίας των Συστημάτων, τα συγκριτικά «-omics».

3.4.1 Στόχος των αλγόριθμων σύγκρισης ακολουθιών

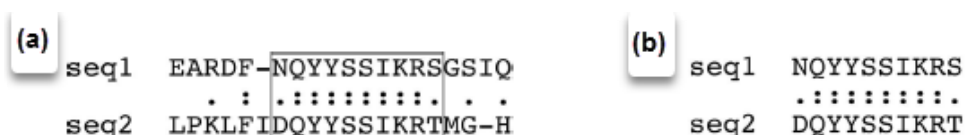
Το DNA και οι πρωτεΐνες είναι προϊόντα εξέλιξης. Στα εκατομμύρια έτη της ιστορίας των ειδών οι μοριακές ακολουθίες υπόκεινται σε συνεχείς διαφοροποιήσεις μέσω μεταλλάξεων, όπως οι αντικαταστάσεις (substitutions), οι ενθέσεις (insertions) και οι διαγραφές (deletions), ώστε οι οργανισμοί να προσαρμόζονται στις εκάστοτε συνθήκες. Ειδικά στην περίπτωση των πρωτεϊνών οι αντικαταστάσεις έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας νέας τριπλέτας οπότε και ένα νέο αμινοξύ. Η βασική στόχευση της στοίχισης ακολουθιών είναι η διερεύνηση ομοιοτήτων μεταξύ ακολουθιών, αντιπαραβάλλοντας μια (ως προς εξέταση) με κάποια γνωστή ή ένα σύνολο άλλων καθορισμένων. Με αυτόν τον τρόπο αναζητείται η συγγένεια ενός γονιδίου ή μιας πρωτεΐνης με τα αντίστοιχα αντιπαραβαλλόμενα μόρια που σε περίπτωση που αναγνωριστεί υποδηλώνει μια κοινή προέλευση, έναν κοινό πρόγονο. Η κοινή προέλευση ονομάζεται *ομολογία* και μέσω αυτής μπορούμε να αποφανθούμε για τη δομή και τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης, να ταυτοποιήσουμε γονίδια και να κατασκευάσουμε φυλογενετικά δένδρα, δενδρογράμματα αναπαράστασης των εξελικτικών σχέσεων ανάμεσα σε μακρομόρια ή και είδη οργανισμών [1,60].

3.4.2 Διαδικασία στοίχισης και σύγκρισης ακολουθιών- Αλγόριθμοι Ευθυγράμμισης.

Ένα πείραμα σύγκρισης ξεκινά με τη στοίχιση δύο ή και περισσότερων ακολουθιών (alignment), όπου αντιπαραβάλλονται σε τέτοια διάταξη ώστε να έχουν βέλτιστη αντιστοίχιση οι βάσεις ή τα κατάλοιπα. Όσες βάσεις ή κατάλοιπα δεν ταυτίζονται με τα κατακόρυφα στοιχεία τους θεωρούνται προϊόντα αντικαταστάσεων, ενώ φαινόμενα αντιστοίχισης περιοχών σε κενά (gaps) καταδεικνύουν ένθεση ή διαγραφή. Η διαδικασία της σύγκρισης στηρίζεται σε συσχετισμούς μεταξύ ομοιοτήτων (match) και διαφορών (mismatch). Για τη βέλτιστη στοίχιση έχουν κατασκευαστεί πίνακες αντικατάστασης (substitution matrices) που υπολογίζουν αυτές τις αξίες μεταξύ διαδοχικών στοιχείων και βαθμολογούν (score) συνεπώς την ομοιότητα μεταξύ των ακολουθιών⁴. Τέτοιοι είναι οι τύπου PAM(PERCENT Accepted Mutation) και BLOSUM (Block Amino Acid Substitution Matrix).

⁴ Οι αντικαταστάσεις στις πρωτεϊνικές αλληλουχίες όπως είδαμε πιο πάνω οδηγούν σε αλλαγή του αμινοξέος. Το πιο ευνοϊκό σενάριο είναι η μεταλλαγή να οδηγήσει σε αμινοξύ με παραπλήσιες ιδιότητες παρά σε ένα με διαφορετικές. Αυτού του τύπου οι αντικαταστάσεις ονομάζονται συντηρητικές. Σε έναν πίνακα τέτοιες αντικαταστάσεις συμβάλλουν θετικά στο τελικό σκορ [1].

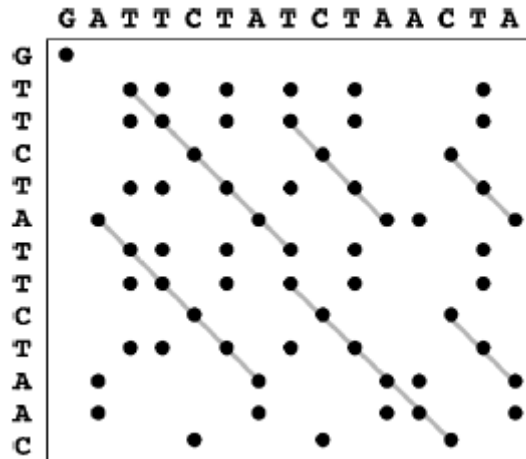
Η στοίχιση μπορεί να είναι είτε ολική (global alignment) είτε τοπική (local alignment). Η διαφορά τους έγκειται στο μήκος των αλληλουχιών που στοιχίζονται, καθώς στην πρώτη χρησιμοποιείται το σύνολο του μήκους συμπεριλαμβάνοντας όσο το δυνατό περισσότερους χαρακτήρες, ενώ στη δεύτερη γίνεται μια επιμέρους ευθυγράμμιση των τμημάτων που εμφανίζεται μεγαλύτερη πύκνωση ταυτόσημων στοιχείων. Είναι εύκολα αντιληπτό πως για άνισες ακολουθίες σε μήκος προτιμάται η τοπική στοίχιση.



Εικόνα 3.4: Ολική στοίχιση, με την περιοχή μέγιστης ομοιότητας στο περίγραμμα (a), τοπική στοίχιση μόνο των τμημάτων με τοπική ομοιότητα (b). Με ":" χαρακτηρίζεται η ταύτιση, ενώ με "." η ταύτιση κατάλοιπων [60].

3.4.2.1 Στοίχιση κατά ζεύγη και μέθοδος dot-plot.

Η στοίχιση κατά ζεύγη (pairwise alignment) χρησιμοποιείται για την αντιπαραβολή δύο ακολουθιών με στόχο την αναζήτηση ομοιοτήτων μεταξύ μιας αλληλουχίας (π.χ. πρωτεϊνικής) με κάποια γνωστή από κάποια βάση δεδομένων. Από τις βασικότερες μεθόδους είναι η dot-plot κατά την οποία σχηματίζεται μια μήτρα στους άξονες της οποίας διατάσσονται οι δύο αλληλουχίες. Η σύγκριση γίνεται μέσω σάρωσης των κατάλοιπων του κάθετου και του οριζόντιου άξονα. Εάν υπάρχει ταύτιση μεταξύ κατάλοιπων τοποθετείται μια κουκίδα (dot) στη μήτρα, διαφορετικά παραμένει κενή η θέση τομής. Όταν οι δύο αλληλουχίες εμφανίζουν μεγάλες περιοχές ομοιότητας τότε οι κουκίδες σχηματίζουν διαδοχικές διαγώνιες γραμμές, υποδεικνύοντας την ταύτιση των ακολουθιών, ενώ σε περίπτωση ενθέσεων ή διαγραφής οι γραμμές παρουσιάζουν κενά.



Εικόνα 3.5: Παράδειγμα σύγκρισης μέσω dot-plot

Σε περιπτώσεις που οι ακολουθίες που στοιχίζονται έχουν μεγάλο μήκος, εμφανίζεται το πρόβλημα του θορύβου, το οποίο αντιμετωπίζεται με τεχνικές φιλτραρίσματος.

3.4.2.2 Αλγόριθμοι δυναμικού προγραμματισμού

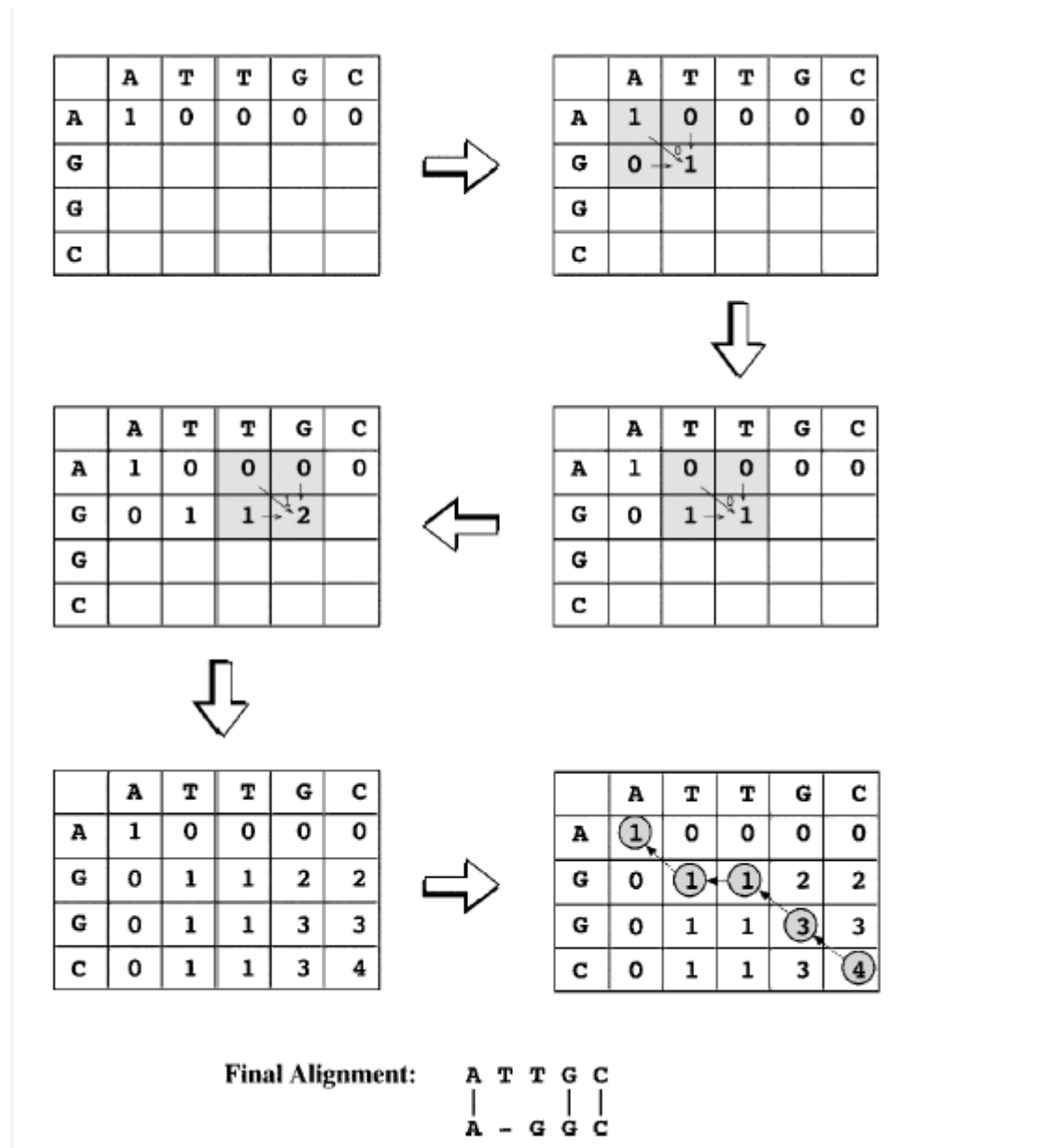
Οι αλγόριθμοι δυναμικού προγραμματισμού εξασφαλίζουν τη βέλτιστη ευθυγράμμιση για όλα τα πιθανά ζεύγη μεταξύ δύο ακολουθιών. Στη βάση τους είναι παρόμοιοι με τη μέθοδο dot-plot καθώς δημιουργούν δισδιάστατες μήτρες, με τη διαφορά πως προσεγγίζουν με έναν πιο ποσοτικό τρόπο τη στοίχιση, μετατρέποντας την τυπική μήτρα dot σε πίνακα βαθμολόγησης συσχετισμών (misses/matches), καταλήγοντας στο υψηλότερο σκορ, δηλαδή την βέλτιστη στοίχιση. Από τους πιο γνωστούς αλγόριθμους σύγκρισης, ο Needleman-Wunsch (1970) χρησιμοποιείται κατά κόρον στην στοίχιση. Μέσω του εν λόγω αλγόριθμου η στοίχιση δύο αλληλουχιών χωρίζεται σε επιμέρους τοπικές στοίχισεις (υποπροβλήματα). Για καθεμιά από τις δυο ακολουθίες του εκάστοτε υποπροβλήματος οι πιθανές επιλογές είναι η στοίχιση δύο βάσεων ή καταλοιπών ή εισαγωγή ενός κενού. Η βαθμολόγηση των πιθανών λύσεων προκύπτει μέσω των τιμών ενός πίνακα αντικατάστασης S ενώ αξίες για την εισαγωγή κενών και αισίως η βέλτιστη λύση επιλέγονται βάσει τελικού σκορ. Για δύο αλληλουχίες με μήκος α και β, σχηματίζεται πίνακας M (α+1)×(β+1), του οποίου πρώτες στήλες και γραμμές αντιστοιχούν σε κενά των ακολουθιών. Κάθε στοιχείο του πίνακα παίρνει μια τιμή βάσει της σχέσης: :

$$M(i, j) = \max [M(i-1, j-1) + S(i, j),$$

$$M(i, j-1) - g.p \text{ (ποινή εισαγωγής κενού στην } 1^{\text{η}} \text{ ακολουθία),}$$

$$M(i-1, j) - g.p \text{ (ποινή εισαγωγής κενού στην } 2^{\text{η}} \text{ ακολουθία)].$$

Μια τροποποιημένη μορφή του συγκεκριμένου αλγόριθμου, ο Smith-Waterman (1981), διαθέτει την ικανότητα να αλιεύει το βέλτιστο μονοπάτι στοίχισης δίχως την ανάγκη της σάρωσης όλης της μήτρας από άκρη σε άκρη, αλλά δύναται να ξεκινήσει και να τελειώσει την αναζήτηση στο εσωτερικό του πίνακα. Βελτιώσεις στον αλγόριθμο αυτό ήρθαν τα επόμενα χρόνια (Altschul - Erickson, 1986, Sellers, 1984, Waterman-Eggert, 1987)[10,62].



Εικόνα 3.6: Βήματα κατασκευής και περαίωση πίνακα δυναμικού προγραμματισμού [13].

3.4.2.3 Εργαλεία στοίχισης ακολουθιών με στοιχεία βάσεων δεδομένων.

Η κύρια εφαρμογή της ανά ζεύγη στοίχισης ακολουθιών είναι η σύγκριση μεταξύ μιας αλληλουχίας με μια άλλη, από πληθώρα αποθηκευμένων σε μια βάση δεδομένων. Αυτή η μεγάλης κλίμακας αντιπαραβολή μεταξύ διαδοχικών ακολουθιών δε θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσω αλγόριθμων δυναμικού προγραμματισμού, καθώς τέτοιες τεχνικές κρίνονται ως αργές και μη πρακτικές. Με βασικό κριτήριο την ταχύτητα, την ευαισθησία και την ειδικότητα κατασκευάστηκαν νέοι αλγόριθμοι και μέθοδοι έτσι ώστε η σύγκριση των ακολουθιών να γίνεται εύκολα και γρήγορα [13]. Οι δύο πιο γνωστοί από αυτούς είναι ο FASTA και ο BLAST.

3.4.3 Ο Αλγόριθμος FASTA

Ο ευριστικός αλγόριθμος FASTA (Lipman D, Pearson W) [63]⁵ χρησιμοποιείται για την προσέγγιση ταυτίσεων μεταξύ δύο ακολουθιών αντιπαραβάλλοντας την πρώτη ως ακολουθία αναφοράς με κάθε ακολουθία που βρίσκεται στη βάση δεδομένων [64]. Η βασική ιδέα του στηρίζεται στη διαλογή μικρών τμημάτων που εμφανίζουν έναν βαθμό ομοιότητας και ύστερα στον υπολογισμό των τοπικών στοίχισεων μέσω δυναμικού προγραμματισμού στις περιοχές που βρίσκονται. Τα βήματα ως την ολοκλήρωση του αλγορίθμου είναι τα εξής:

1. Αναγνώριση των επιμέρους τμημάτων με υψηλό βαθμό ομοιότητας («λέξεις», words) μεταξύ των αλληλουχιών και προσδιορισμός των 10 τμημάτων με τη μέγιστη βαθμολογία.
2. Συνυπολογισμός των συντηρητικών καταστάσεων και εκ νέου βαθμολόγηση των 10 περιοχών με χρήση μητρών τύπου BLOSSUM ή PAM.
3. Ένωση των τμημάτων υψηλής βαθμολογίας.
4. Εκτέλεση δυναμικού προγραμματισμού και εύρεση των αντιστοιχίσεων.

3.4.4 Ευρετική μέθοδος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

⁵ Ο αλγόριθμος FASTA βρίσκεται στο EBI (European Bioinformatics Institute) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>).

Το πρόγραμμα BLAST (Altschul Stephen, 1990) έχει καταλήξει το πλέον δημοφιλές εργαλείο τοπικής στοίχισης ακολουθίας (query) με αντίστοιχες σε βάση δεδομένων. Μέσω αυτού μπορεί να αναζητηθεί η συγγένεια μεταξύ γονιδίων ή πρωτεϊνών γρήγορα και αξιόπιστα. Μια από τις καινοτομίες που εμφάνισε η λογική του αλγόριθμου είναι η λογική των λέξεων- γειτόνων (neighborhood words), μέσω της οποίας αντί να αναζητείται η ταύτιση των λέξεων, αρκούμαστε στην υψηλή ομοιότητα η οποία εκδηλώνεται μέσω μιας βαθμολόγησης. Η βαθμολόγηση με τη σειρά της είναι μεγαλύτερη ή ίση με ένα κατώφλι «T» και επιτυγχάνεται με χρήση πίνακα αντικατάστασης. Αυτή η στρατηγική «αναγκάζει» το μέγεθος του συνόλου των λέξεων (W) να παραμένει σταθερό (π.χ. W=3 για πρωτεΐνες) αυξάνοντας την ταχύτητα, μη θυσιάζοντας το κομμάτι της ευαισθησίας, αφήνοντας και τα δύο αυτά χαρακτηριστικά να ρυθμίζονται από την κρίσιμη παράμετρο T. Αυξάνοντας το κατώφλι τα hits των λέξεων μειώνονται και συνεπώς η ταχύτητα αυξάνει, ενώ μειώνοντάς το έχουμε μεγαλύτερο αριθμό συγγενειών, οπότε και μεγαλύτερο χρόνο στη στοίχιση [10, 13].

Σήμερα υπάρχουν αρκετές παραλλαγές του BLAST ανάλογα την ακολουθία εισόδου (query) και τον τύπο βάσης δεδομένων που αντιπαραβάλλεται όπως φαίνεται στον κάτωθι πίνακα.

Πίνακας 3.1: Παραλλαγές αλγόριθμου BLAST[13].

Παραλλαγές BLAST	Είδος ακολουθίας (query)	Είδος βάσης δεδομένων
BLASTP	πρωτεϊνική	πρωτεϊνική
BLASTN	νουκλεοτιδική	νουκλεοτιδική
BLASTX	Μεταφρασμένη νουκλεοτιδική	πρωτεϊνική
TBLASTN	πρωτεϊνική	Μεταφρασμένη νουκλεοτιδική
TBLASTPX	Μεταφρασμένη νουκλεοτιδική	Μεταφρασμένη νουκλεοτιδική

3.5 Πολλαπλή στοίχιση ακολουθιών (Multiple Sequence Alignment - MSA)

Η πολλαπλή στοίχιση αναφέρεται σε πειράματα με στοιχίσεις άνω του ενός ζεύγους ακολουθιών. Η πιο συνήθης χρήση της είναι στην αναγνώριση κοινών χαρακτηριστικών μεταξύ συνόλων γονιδίων ή πρωτεϊνών που δεν θεωρούνται μακριά εξελικτικά με στόχο την στοιχειοθέτησή τους σε οικογένειες ή υπεροικογένειες. Η διαδικασία περιλαμβάνει όλη τη διεργασία που συναντήσαμε και στις τεχνικές στοίχισης ακολουθιών κατά ζεύγη, ενώ μαζί με τη χρήση δυναμικού προγραμματισμού χρησιμοποιούνται επαναληπτικές μέθοδοι, μέθοδοι εύρεσης κοινών προτύπων, όπως και αντίστοιχες στοχαστικές και πιθανοτικές (Hidden Markov Models, Simulated Annealing και Γενετικοί αλγόριθμοι) μέθοδοι. Πέραν της κατάταξης σε οικογένειες και υπεροικογένειες των πρωτεϊνών η πολλαπλή στοίχιση έχει τεράστια προσφορά στην κατανόηση της κληρονομικότητας και της εξέλιξης και αισίως στην εξέλιξη της φυλογενετικής ανάλυσης μέσω της δυνατότητας κατασκευής φυλογενετικών δέντρων [1]. Ο πιο διάσημος αλγόριθμος πολλαπλής στοίχισης είναι ο ClustalW⁶.

3.6 Φυλογενετική Ανάλυση

Η φυλογενετική ανάλυση είναι ένα ξεχωριστό πεδίο της Βιολογίας το οποίο μελετά την εξελικτική απόσταση των ειδών μέσω ανάλυσης και σύγκρισης των γονιδίων και των πρωτεϊνών. Η κατάταξη γραφικά απεικονίζεται μέσω δενδρογραμμάτων στα οποία διατάσσονται οι μονάδες ανάλογα με το πόσο απομακρύνονται από τον κοινό τους πρόγονο. Στα δένδρα με ρίζα υπονοείται ένας κοινός πρόγονος ενώ σε περίπτωση μη ύπαρξης ρίζας θεωρείται μια απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ των μονάδων ανεξαιρέτως της κοινής προέλευσης. Ένα φυλογενετικό δένδρο περιλαμβάνει τα κλαδογράμματα, μέσω των οποίων ελέγχονται οι διασταυρώσεις με το δένδρο (χωρίς να ενδιαφέρει το μήκος τους). Στον αντίποδα τα φυλλογράμματα σχηματίζονται με μήκη που χαρακτηρίζουν ανάλογα την εξελικτική διαφοροποίηση των ειδών από τα προγονικά.

Η φυλογενετική ανάλυση πέραν της συμβολής της στη μελέτη της εξέλιξης συνεπικουρεί στη φαρμακολογία, την επιδημιολογία, όπως και στη μελέτη ασθενειών προερχόμενες από μεταλλάξεις, όπως ο καρκίνος.

⁶ Ο αλγόριθμος ClustalW μπορεί να βρεθεί στο European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

3.7 Βάσεις δεδομένων Βιοπληροφορικής

Όπως είδαμε και πιο πάνω οι πρώτες βάσεις δεδομένων έπαιξαν βασικό ρόλο στην άνθιση της βιοπληροφορικής επιστήμης. Μαζί με τις διάφορες τεχνολογίες παραγωγής δεδομένων που αναπτύσσονται στη συνέχεια της διπλωματικής προκάλεσαν μια έκρηξη δεδομένων-παραγόμενων και αποθηκευμένων. Οι μεγαλύτερες και πιο ευρέως γνωστές νουκλεοτιδικές βάσεις δεδομένων είναι οι εξής:

- GenBank – National Center for Biotechnology Information (NCBI) του U.S. National Institutes of Health (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).
- DDBJ – DNA Databank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>).
- EMBL – European Molecular Biology Laboratory, UK, (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>).

Μεταξύ τους υπάρχει συνεργεία έτσι ώστε να υπάρχει συνεχής ανταλλαγή δεδομένων μεταξύ τους σε κοινές παραμέτρους μορφοποίησης (format). Σήμερα υπάρχουν αρκετές μικρότερες βάσεις οι οποίες αντλούν συνήθως τα δεδομένα τους από αυτές τις τρεις δημόσια προσβάσιμες βάσεις δεδομένων.

Σε πρωτεϊνικό επίπεδο συναντάμε βάσεις δεδομένων ακολουθιών και βάσεις ταξινόμησης πρωτεϊνών σε οικογένειες ή υπεροικογένειες. Ως κομμάτια των βάσεων αυτών συναντάμε βάσεις απεικόνισης τρισδιάστατων δομών, προσδιορισμένων από πειραματικές διαδικασίες. Κάτω από τη στέγη της UniProt (<https://www.uniprot.org/>, Universal Protein Resource) ενώνονται οι SwissProt, tr-EMBL και PIR-PSD. Ακόμα βάσεις όπως η RefSeq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>, Reference Sequence project collection) του ncbi, που περιέχει πληροφορίες από τα γονίδια ως τα προϊόντα της μεταγραφής τους, η PDB (Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org/>) που περιέχει πληροφορίες για τη δομή των πρωτεϊνών και των συμπλόκων τους με μακρομόρια σχετίζονται με τη ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης και τη μελέτη του τελικού προϊόντος της. Για τη δομική ιεράρχηση των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο οι CATH (<http://www.cathdb.info/>) και η SCOP (Structural Classification of Proteins, <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>). Τέλος, μια βάση αποκλειστικά για τις ανθρώπινες γενετικές ασθένειες έχει δημιουργηθεί, η OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, <https://www.omim.org/>) [1].

3.8 Παραγωγή και ανάλυση βιολογικών δεδομένων – η cDNA βιβλιοθήκη

Ένα από τα πρώτα βήματα για την αναβάθμιση του τρόπου που διεξάγεται η έρευνα ήταν η ανακάλυψη νέων τεχνικών στην παραγωγή βιολογικών δεδομένων. Μία από τις πιο σημαντικές, η κατασκευή των cDNA βιβλιοθηκών έδωσε την ικανότητα της απομόνωσης των εξωνίων και συνεπώς της παραγωγής πρωτεϊνών. Για την κατασκευή τέτοιων βιβλιοθηκών εξάγεται το ολικό «ώριμο» mRNA και χρησιμοποιείται ως καλούπι για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (complementary DNA) μέσω του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης. Ύστερα τα υβρίδια mRNA-cDNA διασπώνται μέσω χημικών ή υπερθέρμανσης και ακολούθως οι μονόκλωνες αλυσίδες cDNA με τη σειρά τους δρουν ως αποτύπωμα για τη δημιουργία μιας συμπληρωματικής DNA αλυσίδας. Τα δίκλινα μόρια εισάγονται σε πλασμίδια ή βακτηριοφάγους και κλωνοποιούνται. Έτσι η παραγωγή πρωτεϊνών μπορεί να καλύψει τη ζήτηση για το εκάστοτε πείραμα, δίνοντας γρήγορα μια πληθώρα δεδομένων για κάθε χρήση.

3.9 Η Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Για την ανάπτυξη και τη ραγδαία παραγωγή αποτελεσμάτων του σήμερα, ο τομέας παραγωγής βιολογικών δεδομένων για δεκαετίες έκανε άλματα τόσο στον αριθμό των δειγμάτων υπό μελέτη σε κάθε δείγμα, όσο και στη βελτιστοποίηση του χρόνου που απαιτείται για τη διεξαγωγή του. Η ανακάλυψη – σταθμός για το πεδίο αυτό ήταν αυτή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού (Polymerase Chain Reaction, PCR). Χάρη στην όντως πολύ σημαντική αυτή τεχνική (K.Mullis 1983, Nobel 1993), από επιλεγμένα μεταγραφόμενα τμήματα DNA μπορούν να παραχθούν εκατομμύρια σε λίγες ώρες χωρίς να χρειάζονται τη «στέγη» ζωντανών κυττάρων [4], καθώς ο πολλαπλασιασμός γίνεται *in vitro*. Για την πραγματοποίησή της είναι απαραίτητοι εκτός του τμήματος DNA που είναι ο προς πολλαπλασιασμό στόχος οι **ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές** (primers), δηλαδή μικρές αλληλουχίες από τις οποίες θα ξεκινήσουν να αναπτύσσονται οι νέες αλληλουχίες DNA βάσει του κανόνα της συμπληρωματικότητας (υβριδισμός των εκκινητών). Ακόμα, για την διεξαγωγή της PCR χρειάζεται η **DNA πολυμεράση**⁷, του υπεύθυνου ενζύμου για την

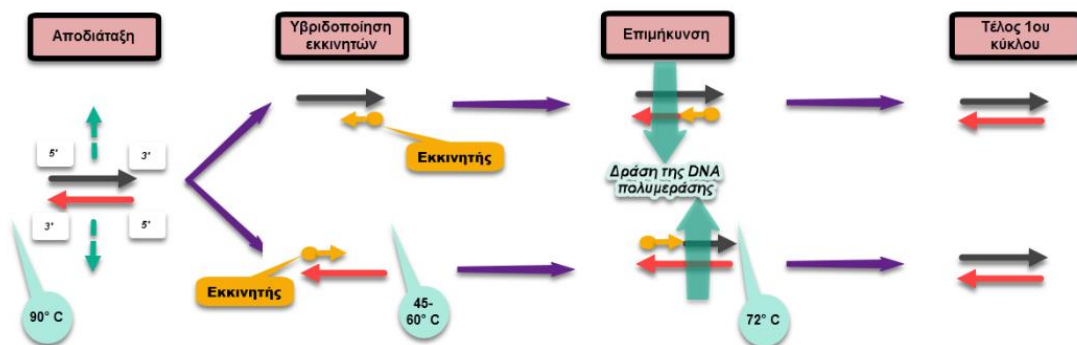
⁷ Η DNA πολυμεράση συναντάται καθολικά σε όλους τους οργανισμούς. Αν και δε μπορεί να συνθέσει καινούρια μόρια, μπορεί να αντιγράψει μονόκλινα DNA από αρχικά «καλούπια». Στην PCR χρησιμοποιείται η Taq πολυμεράση, η οποία προέρχεται από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq), με φυσικό περιβάλλον τις θερμές πηγές. Ο λόγος της χρήσης της είναι η δραστητικότητά και η ανθεκτικότητά της σε υψηλές θερμοκρασίες (βέλτιστη δράση στους 72° C, αντοχή έως και τους 95° C) [14].

κατασκευή των αλληλουχιών βάσει συμπληρωματικότητας, όπως και: ιόντα μαγνησίου (Mg^{++}) που αποτελούν συνένζυμο της πολυμεράσης [2], τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs) και το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης.

Τα βασικά στάδια της εκτέλεσης της PCR είναι τρία:

- **Αποδιάταξη** (DNA Denaturation). Η αποδιάταξη γίνεται θερμαίνοντας το δείγμα στη θερμοκρασία των $90^{\circ} C$ για 30 sec. Αυτό εξασφαλίζει τον διαχωρισμό της διπλής έλικας (τήξη). Τα πρώτα ζευγάρια που διαχωρίζονται είναι τα A – T (μικρότερη δύναμη σύνδεσης, διπλός δεσμός υδρογόνου), άρα τα τμήματα που κυριαρχούν τα ζευγάρια αυτά «σπάνε» πρώτα, και ύστερα αυτά που έχουν μεγαλύτερο πληθυσμό G-C (ισχυρότερος δεσμός, τρεις δεσμοί υδρογόνου).
- **Υβριδισμός εκκινητών** (DNA Annealing). Σε αυτό το στάδιο υπάρχουν μονόκλινα τμήματα και εκκινητές (17-30 ζεύγη βάσεων) στα άκρα τους. Με μείωση της θερμοκρασίας ($45-60^{\circ} C$ για 30 sec - 1 min) προσδιορίζεται το τμήμα προς αντιγραφή από την αντιπαράλληλη θέση των εκκινητών στα αντίστοιχα αντικριστά άκρα των μονόκλωνων πλέον αλυσίδων.
- **Επιμήκυνση** (DNA Extension). Μέσω της πολυμεράσης, ενώ η θερμοκρασία ανεβαίνει σε αυτή της μέγιστης απόδοσής της ($72^{\circ} C$), οι εκκινητές επιμηκύνονται και από το εκμαγείο της κάθε μονόκλωνης αλληλουχίας κατασκευάζεται μια καινούρια συμπληρωματική. Η ταχύτητα κατασκευής της νέας αλυσίδας κυμαίνεται από 500 ως 1000 ζεύγη βάσεων το λεπτό.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται από 20 ως 40 φορές, οπότε όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό ο ρυθμός παραγωγής των αντιγράφων είναι εκθετικής μορφής[15].



Εικόνα 3.7: Σχηματική περιγραφή των τριών σταδίων της PCR, με τελικό προϊόν την παραγωγή μιας πανομοιότυπης δίκλωνης αλληλουχίας DNA με την αρχική μετά την αντιγραφή της.

3.10 Μικροσυστοιχίες

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (microarrays) είναι εργαλείο ταχείας ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Η ανακάλυψή τους ήταν παρακαταθήκη του εγχειρήματος του Προγράμματος Ανθρώπινου Γονιδιώματος (HGP) και από τότε συνεχώς εξελίσσονται και διευρύνουν το φάσμα τους ως προς το είδος των δειγμάτων που αναλύουν. Έτσι σήμερα οι μικροσυστοιχίες έχουν μεγάλο ρόλο σε όλα τα «-omics» πεδία της βιολογίας, με την ονομασία τους να ποικίλει ανάλογα με το είδος του μακρομορίου που εξετάζεται [16].

Η προσέγγιση της βιολογικής έρευνας πλέον γίνεται με τρόπο ολιστικό. Η κάθε κυτταρική διεργασία ενός οργανισμού είναι αποτέλεσμα μιας δυναμικής αλληλεπίδρασης όλων των μακρομορίων του. Η κατανόηση της σύμπραξης αυτής απαιτεί εργαλεία με δυνατότητα προσπέλασης μεγάλου όγκου δεδομένων καθώς και με ικανότητα διεξαγωγής πειραμάτων σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, μιας και η γονιδιακή έκφραση εξαρτάται από το περιβάλλον του οργανισμού. Η πλειοψηφία των mRNAs, πρωτεϊνών, μεταβολιτών, αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-πρωτεϊνών, γονιδιωματικών μεταλλάξεων, πολυμορφισμών και επιγενετικών αλλοιώσεων προσδιορίζεται σε ένα και μόνο πείραμα, μιας και το εύρος της ανάλυσης που προσφέρεται από τις μικροσυστοιχίες είναι τεράστιο [18]. Η απόκριση στις περιβαντολλογικές αλλαγές είναι χαρακτηριστικό της προσαρμοστικότητας ενός κυττάρου και κατ' επέκταση των οργανισμών. Η εξακρίβωση όλων εκείνων των μηχανισμών που συμβάλλουν και οδηγούν στην προσαρμογή στην εναλλαγή των εξωτερικών συνθηκών γίνεται δυνατή την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών, καθώς μπορούμε να εξάγουμε δεδομένα για το ίδιο μακρομόριο διεξάγοντας ξεχωριστά πειράματα σε διαφορετικές συνθήκες. Η ευελιξία που προσφέρεται από τα συγκεκριμένα εργαλεία στον τομέα αυτόν έδωσε τη δυνατότητα της ανίχνευσης αλλαγών στη γονιδιακή απόκριση σε καταστάσεις εναλλαγής της θερμοκρασίας ή υποξίας [21]. Η αναλυτική ικανότητα των μικροσυστοιχιών προσέδωσε στον τομέα της παραγωγής δεδομένων τις παραπάνω αρετές και γι' αυτό αποτελούν αναπόσπαστο εργαλείο της Βιολογίας των Συστημάτων.

3.10.1 Μικροσυστοιχίες DNA

Οι DNA μικροσυστοιχίες (DNA microarrays) σχεδιάστηκαν αρχικά για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση μεταγραφόμενων RNA από δείγμα χιλιάδων γονιδίων εντός του γονιδιώματος σε ένα πείραμα. Η χρήση τους επέτρεψε την εξαγωγή αποτελεσμάτων από την συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης με την κατάσταση του κυττάρου. Σήμερα, η τεχνολογία αυτή δίνει τη δυνατότητα για συνεπή

παρακολούθηση της προόδου των ασθενειών όπως και της κυτταρικής απόκρισης σε ερεθίσματα. Ακόμα, έκανε εύκολη και γρήγορη την ταυτοποίηση των φαρμακευτικών στόχων, ενώ συμβάλλει καθοριστικά στον εντοπισμό και τη μελέτη καρκινικών όγκων [18,28].

3.10.1.1 Αρχή λειτουργίας των μικροσυστοιχιών

Η λειτουργία των μικροσυστοιχιών βασίζεται στον υβριδισμό, δηλαδή στην ιδιότητα των αζωτούχων βάσεων να σχηματίζουν δεσμούς με τις συμπληρωματικές τους. Ως αποτέλεσμα αλληλουχίες σε μονόκλωνη κατάσταση ενώνονται σε δίκλινα μόρια με τις συμπληρωματικές τους. Τόσο στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, που είδαμε πιο πάνω, όσο και σε τεχνικές ανάλυσης όπως η Northern⁸ και Southern blot⁹ [19,20] η ιδιότητα του υβριδισμού αποτελεί τη βάση της εκάστοτε τεχνικής.

Κάθε DNA μικροσυστοιχία είναι ένα γυάλινο πλακίδιο παρόμοιας όψης και διαστάσεων με τη διαφάνεια ενός μικροσκοπίου, με διατεταγμένες, ισαπέχουσες μεταξύ τους κουκίδες (spots) σε προκαθορισμένες θέσεις. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 5 ως 150μm. Η θέσεις αυτές «δεσμεύονται» από μονόκλωνες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που προσκολλώνται, με μήκος από 20 ως 1000 bp (ζευγάρια βάσεων). Οι αλληλουχίες είναι συμπληρωματικές ως προς συγκεκριμένες αντίστοιχες DNA - στόχους και ονομάζονται ανιχνευτές (probes). Υπάρχουν δύο κυρίαρχοι τύποι μικροσυστοιχιών, με ειδοποιό διαφορά τον τύπο των επιλεγμένων ανιχνευτών. Ο πρώτος χρησιμοποιεί mRNA ή cDNA κατασκευασμένα από ESTs ενώ στον δεύτερο χρησιμοποιούνται ολιγονουκλεοτίδια.

3.10.2 Μικροσυστοιχίες cDNA

Οι συσκευές αυτές σήμερα είναι αρκετά διαδεδομένες και είναι βασικό εργαλείο στις περιπτώσεις που ζητούμενο του πειράματος είναι η παράλληλη ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε ευρεία κλίμακα, καθώς οι cDNA μικροσυστοιχίες επιτρέπουν την επί τόπου, ταυτόχρονη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης χιλιάδων γονιδίων σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Με τις όλο και

⁸ Η ανάλυση Northern blot (C.J. Alwine, 1977) είναι μέθοδος ανάλυσης του μεγέθους RNA σε μεγάλα δείγματα. Η τεχνική αυτή είναι φθηνή και απλή σε εκτέλεση. Χρησιμοποιεί την τεχνική της ηλεκτροφόρησης για το διαχωρισμό των RNA-στόχων με βάση το μέγεθός τους και ύστερα με την εισαγωγή ανιχνευτών (ακολουθίες συμπληρωματικές στις στοχευόμενες) απομονώνεται το επιθυμητό RNA.

⁹ Η μέθοδος Southern blot (Edwin Southern, 1975) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συγκεκριμένων ακολουθιών μέσα σε δείγματα DNA. Και σε αυτήν την τεχνική χρησιμοποιούνται οι τεχνικές της ηλεκτροφόρησης και του υβριδισμού των ανιχνευτών. Τα DNA-θραύσματα που προκύπτουν από το διαχωρισμό μεταφέρονται σε μια μεμβράνη που τα φιλτράρει, μέσω των ανιχνευτών.

μεγαλύτερες βάσεις δεδομένων cDNA μπορούμε να προσδιορίσουμε πλέον τα πρότυπα της έκφρασης αυτής σε επίπεδα ολόκληρου γονιδιώματος [22]. Για τη διεξαγωγή ενός πειράματος με αυτήν την τεχνολογία πρώτα από το υπό μελέτη δείγμα απομονώνεται το mRNA και μέσω της αντίστροφης μεταγραφάσης συντίθενται τα cDNA. Το cDNA προκρίνεται έναντι του mRNA για τους κάτωθι λόγους:

- Το cDNA είναι εν γένει σταθερότερο του mRNA. Κάθε διάλυμα που περιέχει mRNAs εμφανίζει και ένα μεγάλο αριθμό ριβονουκλεασών (RNAses), οι οποίες είναι μια υπεροικογένεια ενζύμων με ρόλο καταλύτη στην υδρόλυση των ριβονουκλεϊκών οξέων. Αυτό το χαρακτηριστικό σε συνδυασμό με την αφθονία τους στο περιβάλλον του διαλύματος (είναι εξαιρετικά δύσκολο να διατηρηθεί δείγμα RNA απαλλαγμένο από RNAses) κάνουν το mRNA ασταθές σε σχέση με το cDNA¹⁰.
- Οι τεχνικές PCR έχουν στόχευση την ενίσχυση DNA τμημάτων και όχι RNA. Θεωρητικά ένα πείραμα θα μπορούσε να διεξαχθεί με προσαρμογή της τεχνικής σε περιβάλλον RNA, αντικαθιστώντας την DNA-πολυμεράση με την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp), αλλά η RdRp είναι μια ιική πρωτεΐνη με μεγάλο ποσοστό σφάλματος ως προς την ταχύτητα εξέλιξης του ιού. Γι' αυτό χρησιμοποιούμε την κλασσική διαδικασία της PCR, όπως περιγράφεται πιο πάνω.
- Ο αριθμός των τμημάτων RNA που απομονώνονται μπορεί να είναι ισχνός. Μέσω της αντίστροφης μεταγραφής έχουμε τη δυνατότητα να παράξουμε τεράστιους αριθμούς αντιγράφων, ενισχύοντας το τμήμα που μας ενδιαφέρει.
- Τα περισσότερα πρωτόκολλα προσδιορισμού αλληλουχίας είναι από κατασκευής εστιασμένα στην προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA (DNA-sequencing) και όχι του RNA.

Ύστερα, τα cDNA σημαίνονται με φθορίζουσες βαφές και αφήνονται να υβριδοποιηθούν με τις εντυπωμένες αλληλουχίες (probes) στις κουκκίδες της μικροσυστοιχίας. Έπειτα από αρκετές ώρες οι μικροσυστοιχίες πλένονται, ο φθορισμός με χρήση laser ανιχνεύεται και το πλήθος των δεδομένων

¹⁰ Η σταθερότητα του cDNA εγγυάται τη διατήρηση της πληροφορίας. Οι αντίστοιχες παρούσες δεοξυριβονουκλεάσες (DNAses) μπορούν εύκολα να απενεργοποιηθούν μέσω χηλικοποίησης (ικανότητα δημιουργίας δακτυλίου γύρω από ένα άτομο μετάλλου) των μεταλλικών ιόντων τους.

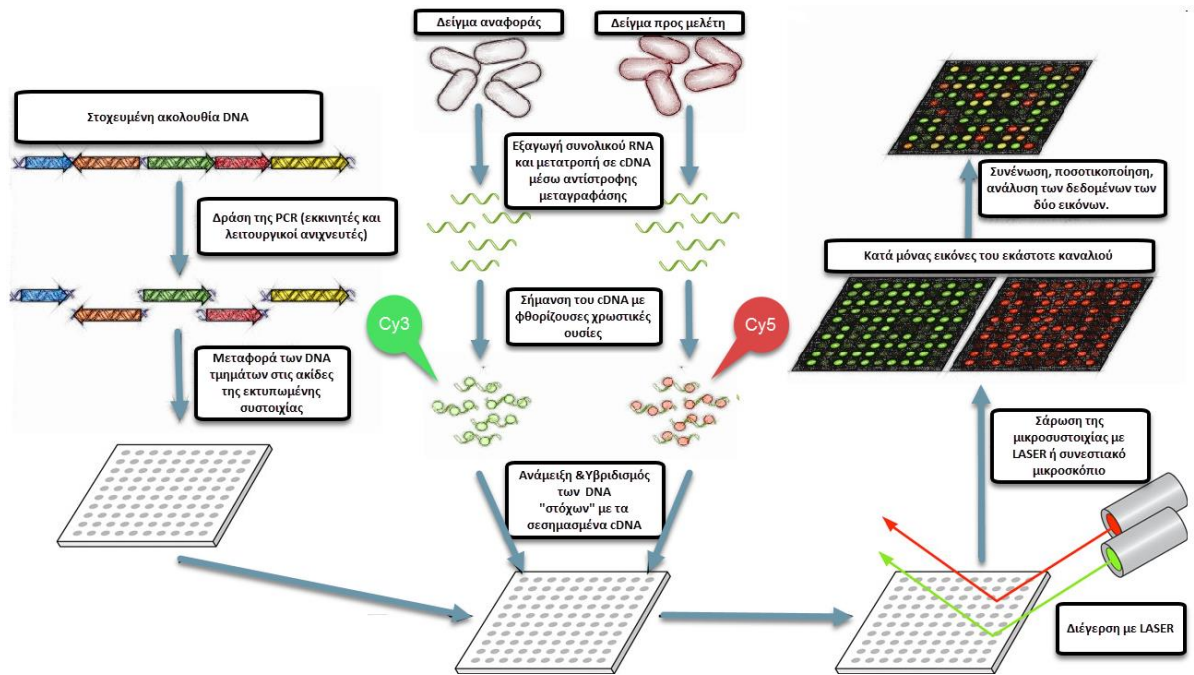
κανονικοποιείται και ερμηνεύεται. Η ποσοτικοποίηση των δεδομένων για τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης στηρίζεται στη λογική πως τα σημεία που παρουσιάζουν έντονο φθορισμό στη μικροσυστοιχία έχουν κατ' αντιστοιχία υψηλά επίπεδα μεταγραφόμενου mRNA από την εντυπωμένη αλληλουχία-στόχο [23].

Το μεγάλο πλεονέκτημα των cDNA μικροσυστοιχιών είναι πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν mRNAs από δυο δείγματα (ένα αναφοράς και ένα ελέγχου) και να σημειωθούν με διαφορετικές χρωστικές για αντιπαραβολή (π.χ. κατάσταση νόσου ή υγείας). Οι διχρωματικές είναι και οι πιο ευρέως διαδεδομένες. Τα βήματα ενός πειράματος με τέτοιες μικροσυστοιχίες είναι τα εξής:

- Κλώνοι DNA (στοχευμένες αλληλουχίες) ενισχύονται μέσω PCR. Ύστερα με τη βοήθεια ρομποτικού βραχίονα εντυπώνονται οι κηλίδες. Οι μικρές ποσότητες των αλληλουχιών - στόχων ,μεταφέρονται στο γυαλί είτε με επαφή των ακίδων, είτε με τεχνολογία τύπου ink-jet.
- Απομονώνονται τα mRNA από τα δύο δείγματα ξεχωριστά. Από τη μία το mRNA των κυττάρων αναφοράς και από την άλλη το mRNA αυτών των υπό μελέτη
- Μετατροπή των mRNA σε cDNA με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής.
- Σήμανση των cDNA με φθορίζουσες ουσίες. Συνήθως οι χρωστικές είναι η κυανίνη 3 (Cy3) και η κυανίνη 5 (Cy5). Η Cy3 έχει μήκος κύματος εκπομπής ~570nm (πράσινο χρώμα), ενώ αντίστοιχα η Cy5 έχει μήκος κύματος εκπομπής ~670nm (κόκκινο χρώμα).
- Ανάμειξη των cDNA δειγμάτων και υβριδοποίηση με τους DNA στόχους της μικροσυστοιχίας.
- Απομάκρυνση του μη υβριδοποιημένου cDNA με πλύση του πλακιδίου.
- Σάρωση της μικροσυστοιχίας αφού διεγερθούν τα τμήματά της από laser.
- Κανονικοποίηση των δεδομένων-ανάλυση.

Στο τέλος του πειράματος σχηματίζονται λόγοι $\log \frac{Cy5}{Cy3}$ για κάθε κουκίδα της μικροσυστοιχίας. Όταν $\log \frac{Cy5}{Cy3} > 0$, υπάρχει σχετικό πλεόνασμα μεταγράφων του γονιδίου στο δείγμα που εξετάζουμε. Εάν $\log \frac{Cy5}{Cy3} < 0$, τότε υπάρχει πλεόνασμα στο δείγμα αναφοράς. Έπειτα κατασκευάζεται πίνακας

με τα ομαδοποιημένα δεδομένα. Κάθε επόμενο πείραμα παίρνει τιμές στον οριζόντιο άξονα, ενώ το πλήθος των διαφορετικών γονιδίων αποτελεί τα σημεία του κατακόρυφου [1,2].



Εικόνα 3.8: Λειτουργία διχρωματικής μικροσυστοιχίας cDNA [27].

3.10.3 Ολιγονουκλεοτιδικές Μικροσυστοιχίες (Oligonucleotide arrays)

Οι ολιγονουκλεοτιδικές μικροσυστοιχίες είναι συσκευές εξαιρετικά υψηλής πυκνότητας. Ο κύριος κατασκευαστής και προμηθευτής της εν λόγω τεχνολογίας είναι η εταιρεία Affymetrix (GeneChip®). Σε αντίθεση με τη λογική των παραπάνω, οι μικροσυστοιχίες αυτές δε χρησιμοποιούν την τεχνική της εντύπωσης κηλίδων με ρομποτικό βραχίονα, αλλά οι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές συντίθενται απευθείας πάνω στην επιφάνεια. Λόγω του μικρού μήκους τους (25 bp) συμπεριλαμβάνονται αρκετοί ανιχνευτές ανά στόχο, με σκοπό τη βελτίωση της στόχευσης, της στατιστικής ακρίβειας και της ευαισθησίας [24]. Κάθε γονίδιο αντιπροσωπεύεται από 25μερή νουκλεοτίδια, από τα οποία υπάρχει μία ακολουθία πλήρους στοίχισης (perfect match PM) και μία να διαφέρει σε ένα ζεύγος (1bp) στο κέντρο (mismatch, MM). Ο MM ανιχνευτής (αναντιστοιχίας) δρα ως αρνητικός έλεγχος του μη εξειδικευμένου υβριδισμού [2].



Εικόνα 3.9: Το Affymetrix GeneChip (www.thermofisher.com)

Το «χτίσιμο» των ανιχνευτών στηρίζεται στη φωτοχημική σύνθεση με βάση τους ημιαγωγούς. Οι δύο τεχνικές που εμπλέκονται στη δημιουργία των ολιγονουκλεοτιδίων είναι αυτή της *in situ* σύνθεσης DNA, όπως και αυτή της φωτολιθογραφίας.

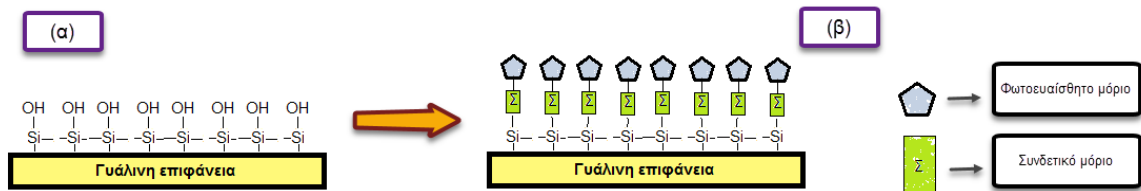
Η ακρίβεια του συγκεκριμένου τύπου μικροσυστοιχιών επιτυγχάνεται με τη στρατηγική τοποθέτηση στην επιφάνειά τους βάσεων (1bp) και στα επόμενα βήματα την πρόσθεση στις προϋπάρχουσες μέσω χημικής σύζευξης. Καθεμία από τις βάσεις είναι «δεσμευμένη» από μια χημική ομάδα, η οποία παρεμποδίζει τον πολυμερισμό του DNA, αλλά παρουσιάζει ευαισθησία στην υπεριώδη ακτινοβολία.

Με τη χρήση κατάλληλων φίλτρων UV ακτινοβολίας η χημική (προστατευτική) ομάδα απομακρύνεται και λειτουργεί ως υπόστρωμα για την πρόσθεση μιας καινούριας βάσης. Η στόχευση συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων σε ακριβείς θέσεις στους ανιχνευτές γίνεται με τη χρήση φωτολιθογραφικών масκών, οι οποίες έχουν συγκεκριμένα μοτίβα παραθύρων που δρουν ως φίλτρα είτε για να εστιάσουν είτε για να μπλοκάρουν την UV ακτινοβολία που κατευθύνεται στη χημικά προστατευμένη επιφάνεια της μικροσυστοιχίας. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται (<100 φορές), επιλέγοντας κάθε φορά κατάλληλο φίλτρο. Η *in situ* σύνθεση των ανιχνευτών επιτυγχάνεται επομένως μέσω του κύκλου της κάλυψης, της έκθεσης στο φως και της προσθήκης βάσεων στο αναπτυσσόμενο ολιγονουκλεοτίδιο [25,26].

3.10.3.1 Διαδικασία κατασκευής 25μερών ολιγονουκλεοτιδίων

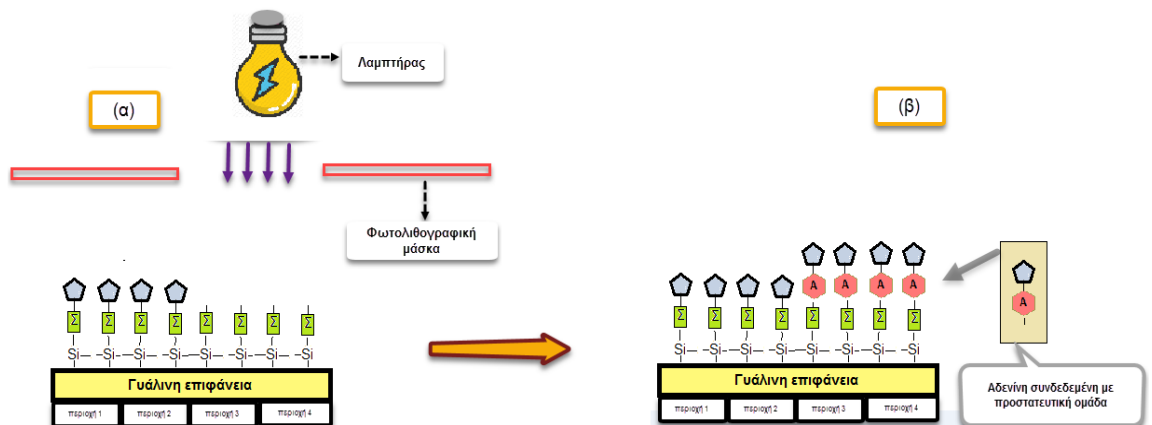
Η σύνθεση των ανιχνευτών γίνεται σε μια γυάλινη επιφάνεια αφού πρώτα αυτή βυθιστεί και καλυφθεί με σιλάνιο (Si). Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη καθώς με αυτόν τον τρόπο προάγεται η προσκόλληση των νουκλεοτιδίων πάνω στο υπόστρωμα, κάνοντας ευκολότερη και σταθερότερη τη διαδοχική πρόσθεση των επόμενων. Ύστερα το πλακίδιο χωρίζεται σε τμήματα, καθένα από τα οποία λόγω της κάλυψής του από το σιλάνιο είναι η αφετηρία για το σχηματισμό της εκάστοτε αλληλουχίας. Όσο πιο κοντά βρίσκονται τα τμήματα του σιλάνιου στο ψηφιδωτό,

τόσο πιο πυκνοί θα είναι οι σχηματισμοί των ανιχνευτών. Ένα συνδετικό μόριο προσδεμένο σε ένα αντίστοιχο φωτοευαίσθητο (π.χ. MeNPOC) τοποθετείται στην επιφάνεια. Από εκεί θα ξεκινήσει η αλυσίδα των 25μερών, αλλά σε αυτό το στάδιο το φωτοευαίσθητο μόριο εμποδίζει την πρόσδεση βάσεων.



Εικόνα 3.10: (α) Η γυάλινη επιφάνεια σύνθεσης των ανιχνευτών, (β) Προσκόλληση συνδετικού μορίου με φωτοευαίσθητο μόριο.

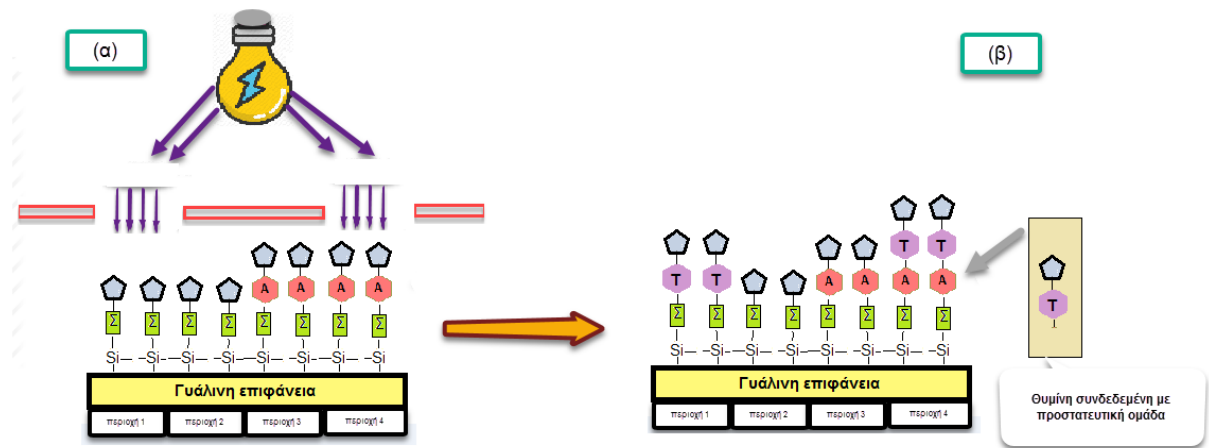
Ύστερα τοποθετείται η λιθογραφική μάσκα σε πλήρη στοίχιση με τη πλακίδιο με χρήση υπολογιστή και ακτινοβολείται με υπεριώδες φως. Τα στοιχεία που βρίσκονται απέναντι από τις οπές της μάσκας αποδεσμεύουν το συνδετικό μόριο και το αφήνουν ελεύθερο για πρόσδεση. Κατόπιν, προσθέτουμε στη μικροσυστοιχία μια αζωτούχο βάση (π.χ. αδενίνη) με προσκολλημένη μια προστατευτική ομάδα στο ένα άκρο της. Όσα μόρια έχουν εκτεθεί στην υπεριώδη ακτινοβολία θα προσδεθούν με αυτή, ενώ τα υπόλοιπα θα παραμείνουν ως έχουν.



Εικόνα 3.11: (α) Τοποθέτηση λιθογραφικής μάσκας, ακτινοβολήση επιφάνειας και αποπροστασία των εκτεθειμένων στις οπές συνδετικών μορίων, (β) εισαγωγή αζωτούχου βάσης (με προσδέτη φωτοευαίσθητο μόριο) στις «ελεύθερες» περιοχές του πλακιδίου.

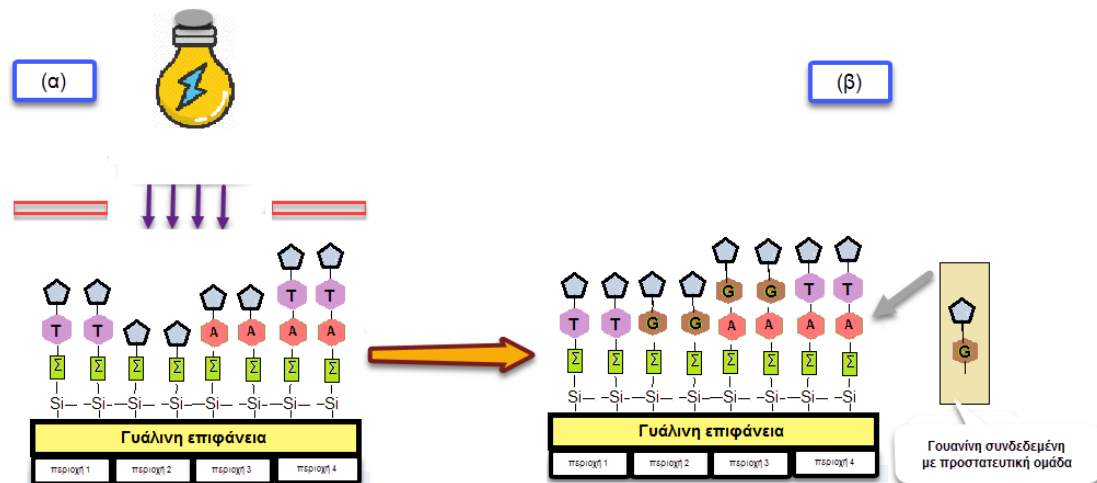
Η διαδικασία έπειτα θα επαναληφθεί με χρήση μιας επόμενης μάσκας, για να ξεκινήσει η προσκόλληση βάσεων στις επόμενες περιοχές. Για παράδειγμα, τοποθετείται η μάσκα με τις οπές τις στις περιοχές 1 και 4. Οι περιοχές που

ακτινοβολήθηκαν έχουν αποπροστατευτεί και πλέον είναι δυνατόν να ξεκινήσουμε και εκεί το «χτίσιμο» αλληλουχίας. Για παράδειγμα προσθέτουμε Θυμίνη, η οποία κατά τα προηγούμενα είναι δεσμευμένη με προστατευτική ομάδα.



Εικόνα 3.12: (α) Χρήση μιας επόμενης λιθογραφικής μάσκας και εκ νέου ακτινοβόληση του πλακιδίου, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των εκτιθέμενων βάσεων, (β) Εισαγωγή νέας βάσης με προστατευτικό μόριο στις κενές περιοχές.

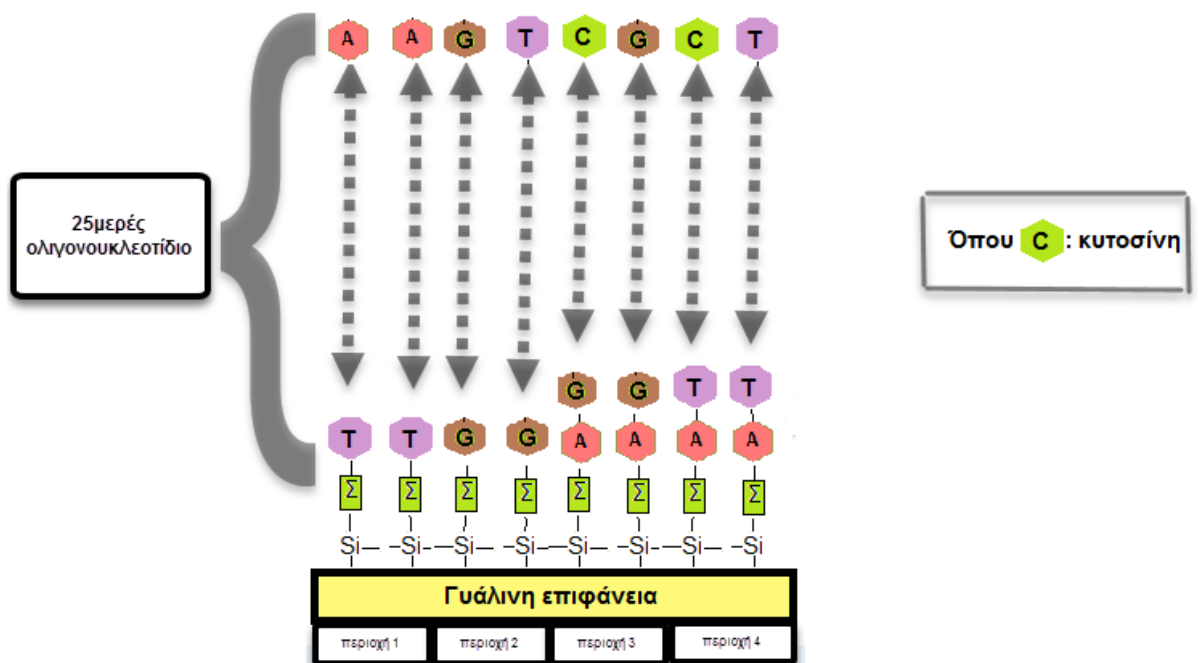
Με μια νέα επιλογή μάσκας απελευθερώνουμε τις επόμενες περιοχές κατά τον ίδιο τρόπο. Έστω πως στοχεύουμε τις περιοχές 2 και 4 και κατά τα άνω προσθέτουμε την επόμενη βάση (π.χ. γουανίνη).



Εικόνα 3.13: (α) Συνέχιση κύκλου ακτινοβόλησης με υπεριώδη με χρήση νέας μάσκας και απελευθέρωση καινούριων βάσεων απέναντι από τις σπές τις. (β) Εισαγωγή βάσης κ με προστατευτική ομάδα.

Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό από τη στιγμή που τα υλικά είναι οι 4 αζωτούχες βάσεις και οι ανιχνευτές είναι μήκους 25 νουκλεοτιδίων η διαδικασία της

κατασκευής τους απαιτεί λιγότερες από 100 επαναλήψεις και προφανώς καταλήγει όταν προστεθεί και το 25^ο νουκλεοτίδιο στην τελευταία αλληλουχία [29].



Εικόνα 3.14: Σύνθεση 25μερών ολιγονουκλεοτιδίων

Με αυτόν τον τρόπο κάθε μικροσυστοιχία μπορεί να έχει στο δυναμικό της έως και 20.000 σύνολα ανιχνευτών, τα οποία αντιστοιχούν σε ένα γονίδιο.

3.10.4 Μικροσυστοιχίες μικροσφαιριδίων

Σε αντίθεση με τις συμβατικές μικροσυστοιχίες που κατασκευάζονται στις δύο διαστάσεις μιας επιφάνειας, η τεχνολογία των Bead Arrays βασίζεται στην τεχνική της αυτοσυναρμολόγησης ενός συνόλου μικροσφαιριδίων, τα οποία διατάσσονται κατά το μήκος οπτικών ινών ή σε γυάλινες πλάκες, καλυμμένες με στρώμα πυριτίου σε θέσεις-οπές [32]. Η σταθερότητά τους στις θέσεις αυτές επιτυγχάνεται μέσω των διαμοριακών ηλεκτροστατικών δυνάμεων van der Waals. Η στοίχιση των σφαιριδίων είναι εξαιρετικά πυκνή, με ομοιόμορφη κατανομή, εξασφαλίζοντας έναν συμπαγή συνωστισμό ανά μονάδα επιφάνειας πλακιδίου ή ίνας. Για παράδειγμα, μια μικροσυστοιχία illumina διαμέτρου 300 nm διαθέτει 40.000 φορές υψηλότερη πυκνότητα από μια τυπική μικροσυστοιχία με στίγματα [33].

Κάθε illumina Bead Chip αποτελείται από έναν αριθμό ανεξάρτητων μικροσυστοιχιών (6,8,12...) που εξαρτάται από την πολυπλοκότητα του υπό εξέταση δείγματος. Για το ανθρώπινο γονιδίωμα χρησιμοποιούνται τα chip των 12 θέσεων.



Εικόνα 3.15: To illumina BeadChip.

Ο προσδιορισμός της θέσης και της ταυτότητας των χαντρών στο παρελθόν διερευνούνταν μέσω τεχνικών εμποτισμού χρωστικών στα μικροσφαιρίδια. Η προσέγγιση αυτή μέσα στα χρόνια εξελίχθηκε με σκοπό να εξυπηρετήσει καλύτερα τον ποιοτικό έλεγχο, δίνοντας ακριβέστερα δεδομένα, απαλλαγμένα από φαινόμενα ανομοιομορφίας χρωστικών ανά μικροσυστοιχία [33]. Ως προς την χωροταξική διεύθυνση των χαντρών, η φυσική θέση των μικροσφαιριδίων καθορίζεται από σειριακά βήματα υβριδισμού με χρήση σεσημασμένων συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων (molecular barcode). Ακόμα κάθε χάντρα στην επιφάνεια των μικροσυστοιχιών υβριδοποιείται με ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές μοναδικής ακολουθίας. Τα επισημασμένα με χρωστική ολιγονουκλεοτίδια στη συνέχεια υβριδοποιούνται με αυτά των διευθύνσεων (στάδιο αποκωδικοποίησης). Με αυτήν τη διαδικασία καθώς και με τη χρήση ενός αλγόριθμου αποκωδικοποίησης επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των ανιχνευτών σε συγκεκριμένες, γνωστές θέσεις στη μικροσυστοιχία [34].

Οι επιδόσεις των μικροσυστοιχιών illumina σε σχέση με τις αντίστοιχες της Affymetrix στο επίπεδο ποιότητας παραγωγής δεδομένων είναι παρόμοιες, αλλά απαιτούν μικρότερες ποσότητες δείγματος και εμφανίζουν μικρότερο κόστος ανά πείραμα.

3.10.5 Μικροσυστοιχίες Agilent

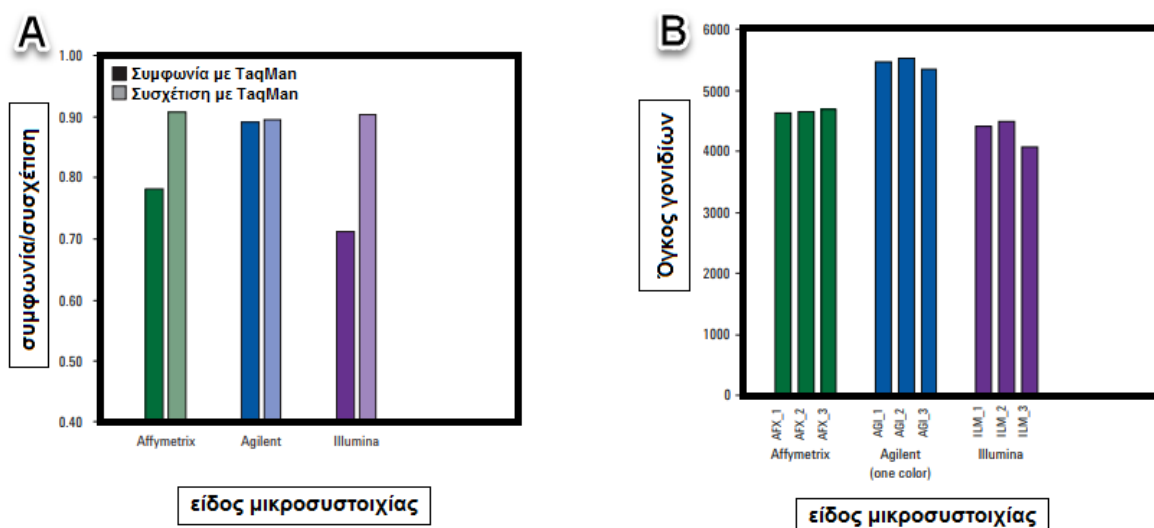
Ο τελευταίος τύπος DNA μικροσυστοιχιών που θα εξετάσουμε είναι αυτές της εταιρείας Agilent. Η τεχνολογία αυτή χρησιμοποιεί τη μέθοδο inkjet για την in-situ σύνθεση ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών μήκους 60 βάσεων σε γυάλινες επιφάνειες. Η λογική της σύνθεσης των ανιχνευτών στην εν λόγω τεχνολογία στηρίζεται στη σταδιακή εκτύπωση ελαχίστων όγκων (πικόλιτρα [10^{-12} lt]) νουκλεοτιδίων στην επιφάνεια της μικροσυστοιχίας σε μια επαναλαμβανόμενη

κυκλική διαδικασία έως βάση-βάση να σχηματιστούν οι ακολουθίες των ολιγονουκλεοτιδίων. Τα 60μερή που παράγονται προσδίδουν ευαισθησία και εξειδίκευση στα τσιπ σε σχέση με τα μικρότερου μήκους αντίστοιχα ολιγονουκλεοτίδια των προηγούμενων εταιριών. Ο αριθμός των ανιχνευτών στην πλέον διαδεδομένη 4X44K έκδοση της Agilent είναι 176.000 (44.000/συστοιχία) [35,37].



Εικόνα 3.16: Η μικροσυστοιχία Agilent

Το 2006 το Πρόγραμμα Ελέγχου Ποιότητας Μικροσυστοιχιών (MAQC) της FDA κυκλοφόρησε μια έρευνα σύγκρισης των επιδόσεων των μικροσυστοιχιών όλων των κύριων προμηθευτών. Για τις ανάγκες της έρευνας μετρήθηκαν επίπεδα έκφρασης γονιδίων από ανιχνευτές TaqMan^{®11}. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι πλατφόρμες έκφρασης της Agilent σε συντελεστή συμφωνίας-συσχέτισης (r_c) υπερέρχουν από τις υπόλοιπες. Σε ένα άλλο κομμάτι της ίδιας μελέτης συγκρίθηκαν οι αριθμοί των εκφρασμένων ανιχνεύσιμων γονιδίων ανά πλατφόρμα. Από περίπου 12.000 εκφρασμένα γονίδια (κοινά σε όλες τις πλατφόρμες) οι μικροσυστοιχίες της Agilent είχαν περίπου 20% καλύτερη απόδοση στην ταυτοποίηση των στοιχείων [37].



Εικόνα 3.17: (Α) Δείκτης αναλογίας με TaqMan δεδομένα, (Β) Ανίχνευση έκφρασης ανά πλατφόρμα [36]

¹¹ TaqMan είναι υψηλής ακρίβειας, βιομηχανικό πρότυπο ποσοτικοποίησης δεδομένων γονιδιακής έκφρασης.

3.10.6 Παραγωγή δεδομένων από πρωτεΐνες

Η ολοκλήρωση του προγράμματος χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος (HGP) θεωρήθηκε ένα εγχείρημα τόσο σημαντικό για τον τομέα της μοριακής βιολογίας όσο η επιτυχής προσελήνωση για την επιστήμη της αστροφυσικής. Η διάδοχη πρόκληση για την τεχνολογία των «-omics» ήταν να περάσει η έρευνα στο επίπεδο του ανθρώπινου πρωτεώματος χρησιμοποιώντας τα πολύτιμα δεδομένα από την αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος. Η έρευνα αυτή περιλαμβάνει τα στάδια της κατανόησης της λειτουργίας, του προσδιορισμού της δομής, της διερεύνησης των αλληλεπιδράσεών τους με άλλα μακρομόρια και της εξακρίβωσης του ρόλου των πρωτεϊνών σε ρυθμιστικά δίκτυα στους διάφορους κυτταρικούς τύπους. Μια επιφανειακή εκτίμηση των δεδομένων και μια αξιολόγηση των εργαλείων που διαθέτει σήμερα η επιστήμη θα κατέληγε στο συμπέρασμα πως αφού είναι γνωστό το γονιδίωμα και υπάρχουν τα ισχυρά εργαλεία παραγωγής δεδομένων (DNA μικροσυστοιχίες, PCR) η κατανόηση του πρωτεώματος είναι μια εύκολη υπόθεση. Όμως η εξαγωγή δεδομένων από DNA μικροσυστοιχίες όσον αφορά το πρωτέωμα είναι σχεδόν αδύνατη, καθώς ακόμα και με ευρήματα που αφορούν την γονιδιακή έκφραση είναι δύσκολο να προσδιοριστεί μια πρωτεΐνη. Τα επίπεδα παραγωγής της όπως και η δράση της εξαρτώνται εκτός από τα αντίστοιχα γονίδια (που σε κάποιες ασθένειες μπορεί να έχουν υποστεί αλλοίωση), από εξωτερικές συνθήκες (περιβάλλον) ή από την κατάσταση του οργανισμού (υγιής/ασθενής) ή ακόμα και από τη χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής. Άρα, έχοντας ως δεδομένες τις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις και τον επηρεασμό από εξωτερικούς παράγοντες, τα επίπεδα παραγωγής πρωτεϊνών σίγουρα αποκλίνουν από τα προβλεπόμενα [38]. Ακόμα πιο σημαντικό στάδιο που βλέπουμε διαφοροποιήσεις στο τελικό προϊόν της γονιδιακής έκφρασης είναι το στάδιο μετά τη μετάφραση, καθώς οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως φωσφορυλίωση η γλυκοσυλίωση, η ακετυλίωση και η πρωτεόλυση «σμιλεύουν» τη μορφή και τη δράση της πρωτεΐνης. Μια μικροσυστοιχία με βάση τα νουκλεϊκά οξέα θεωρείται «τυφλή» στις διεργασίες αυτές. Όλα τα άνω σε συνδυασμό με την αδυναμία της χρήσης PCR για την παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων πρωτεϊνών (αποκλειστικό προνόμιο των νουκλεϊκών) έκαναν τη μοριακή βιολογία να στραφεί σε διαφορετικούς τρόπους προσέγγισης για την ανάλυση του πρωτεώματος.

3.10.7 Κλασσική μεθοδολογία της Πρωτεωμικής.

Η λύση ήρθε με την εφαρμογή της λογικής της απευθείας ανάλυσης των πρωτεϊνών. Η παραγωγή βιολογικών δεδομένων στην Πρωτεωμική καλείται να ανιχνεύσει μεγάλους αριθμούς πρωτεϊνών σε δείγματα, οι οποίες εμφανίζονται σε μικρές ποσότητες και συγκεντρώσεις. Γι' αυτό μια σειρά διεργασιών ακολουθείται μέχρι να φτάσουμε στην παραγωγή δεδομένων. Πρώτα λαμβάνεται δείγμα από ένα κυτταρικό σύνολο είτε με συμβατικούς τρόπους όπως δείγμα πλάσματος ή βιοψία ιστού, είτε με πιο σύνθετες τεχνικές για πιο συγκεκριμένους στόχους όπως η χρήση laser για την απομόνωση κυτταρικών τύπων. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες απομονώνονται αφού αφαιρεθούν ίχνη νουκλεϊκών, λιπιδίων και υδατανθράκων από το δείγμα. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται και στη συνέχεια καθορίζονται οι αμινοξικές αλληλουχίες τους. Τέλος για να επιτευχθεί η ανάλυση γίνεται αντιπαραβολή με γνωστές αλληλουχίες (ταυτοποίηση)[1].

- **Λήψη δείγματος και απομόνωση των πρωτεϊνών.** Πρώτα λαμβάνεται δείγμα από ένα κυτταρικό σύνολο. Ύστερα από το δείγμα απομονώνονται οι πρωτεΐνες με τη χρήση μιας σειράς παραγόντων όπως :
 - Απορρυπαντικά (π.χ., SDS, 3 - ([3-χολαμιδοπροπυλ] διμεθυλαμμώνιο) -1-προπανοσουλφονικό (CHAPS), Tween), τα οποία βοηθούν στη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών της μεμβράνης και βοηθούν τον διαχωρισμό τους από τα λιπίδια.
 - Αναγωγικά (π.χ., διθειοθρεϊτόλη [DTT], μερκαπτοαιθανόλη, θειουρία), που μειώνουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς εμποδίζοντας την οξειδωση των πρωτεϊνών.
 - Μετουσιωτικοί παράγοντες (π.χ. ουρία και οξέα), οι οποίοι διαταράσσουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών μεταβάλλοντας την ισχύ του ιονισμού του διαλύματος και το pH.
 - Ένζυμα (π.χ. DNase, RNase), τα οποία λύνουν τα νουκλεϊκά οξέα, τους υδατάνθρακες και τα λιπίδια [1,39].
- **Διαχωρισμός των πρωτεϊνών.** Η πιο συνηθισμένη τεχνική για αυτό το στάδιο είναι η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων σε πήκτωμα (two-dimensional gel electrophoresis. 2-DE). Το δείγμα τοποθετείται σε μια ταινία η οποία φέρει μια βαθμίδωση οξύτητας (pH). Ύστερα εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο στην ταινία, κατάσταση που αναγκάζει τις πρωτεΐνες να μετακινηθούν στο μήκος της έως ότου φτάσουν στο σημείο που εξασφαλίσουν την ουδετερότητά τους ως φορτία (διαδικασία

ισοηλεκτρικής εστίασης (IEF)- 1^η ηλεκτροφόρηση). Έπειτα η ταινία τοποθετείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου και φορτίζεται για μία δεύτερη φορά (ηλεκτροφόρηση στη 2^η διάσταση). Το αποτέλεσμα είναι πάλι να μετακινηθούν κατά μήκος της ταινίας οι πρωτεΐνες και να διαχωριστούν. Σε αντίθεση με την πρώτη ηλεκτροφόρηση, η δεύτερη τις διαχωρίζει βάσει μοριακής μάζας. Η τεχνική 2-DE μπορεί να διαχωρίσει μέχρι και 10.000 πρωτεΐνες αλλά θεωρείται ως διαδικασία σχετικά ελλιμματική, αφού δε μπορεί σε όλα τα πειράματα να φτάσει στα επίπεδα ευαισθησίας που απαιτούνται για την διεκπεραίωση ενός πειράματος. Ακόμα, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως πρωτεΐνες χαμηλής ποσότητας είναι πολλές φορές μη ανιχνεύσιμες, με αποτέλεσμα να δημιουργείται η ανάγκη για μεγάλες ποσότητες δείγματος [40]. Λόγω αυτής της έλλειψης ακρίβειας χρησιμοποιείται συχνά μια παραλλαγή της τεχνικής, η τεχνική DIGE (Differential In-Gel Electrophoresis). Η διαφορική ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων χρησιμοποιεί φθορίζουσες ουσίες για την ετικετοποίηση του δείγματος, έχει υψηλότερη ευαισθησία από την κλασική 2-DE, χρησιμοποιεί και αναλύει έως και 3 δείγματα ανά ταινία (σε αντίθεση με το 1 δείγμα ανά ταινία της 2-DE). Έτσι η τεχνική αυτή δίνει ακριβέστερα αποτελέσματα επιτρέποντας την ποσοτικοποίησή τους [41].

- **Καθορισμός αμινοξικής ακολουθίας και ταυτοποίηση με γνωστές αλληλουχίες.** Η αλληλούχιση των πρωτεϊνών γίνεται με χρήση τεχνικών φασματογραφίας μάζας (mass spectrometry, **MS**). Στη μέθοδο αυτή οι πρωτεΐνες μετατρέπονται σε φορτισμένα σωματίδια και διαχωρίζονται βάσει του λόγου μάζας/φορτίου (m/z) [1]. Η συνεισφορά της φασματοσκοπίας μάζας στον κλάδο της πρωτεωμικής χωρίζεται στους άξονες της πρωτεϊνικής αναγνώρισης και προσδιορισμού, στην εξακρίβωση ομοιοπολικών και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (PTMs) και στον έλεγχο ποιότητας των ανασυνδυαζόμενων πρωτεϊνών (recombinant proteins). Μια τυπική διάταξη ενός φασματογράφου μάζας περιλαμβάνει:

- Ένα σύστημα εισαγωγής δείγματος, με το δείγμα να είναι συνήθως σε αέρια ή υγρή κατάσταση.
- Μια πηγή ιόντων, η οποία ιονίζει το δείγμα.
- Έναν αναλυτή μάζας, στον οποίο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός ανάμεσα στις πρωτεΐνες του δείγματος βάσει του m/z . Αμέσως μετά τον ιονισμό της εκάστοτε πεπτιδικής αλυσίδας (με χρήση

laser) τα ιόντα εξαπολύονται προς την κατεύθυνση ενός ανιχνευτή. Η διάρκεια «πτήσης» των ιόντων (Time of Flight, TOF) εξαρτάται από τη μάζα που φέρουν και μέσω αυτής της τεχνικής γίνεται η αναγνώριση και η κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνών. Στους MS-TOF υπάρχει και ένας δεύτερος ανακλαστήρας που επανεκτρέπει τα ιόντα προσδίδοντας μεγαλύτερη ακρίβεια.

- Έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος αναλύει και αξιολογεί τα δεδομένα.

Όλη η διάταξη του φασματογράφου μάζας λειτουργεί σε καθεστώς κενού, μέσα σε μεταλλικό σωλήνα. Σήμερα υπάρχουν βελτιωμένες τεχνολογίες MS όπως η ESI-MS (electrospray ionization) η οποία χρησιμοποιείται για τον ιονισμό μορίων από δείγμα σε υγρή κατάσταση και η MALDI που χρησιμοποιεί παλμούς laser για τον ιονισμό πρωτεϊνών ενσωματωμένων σε υπόστρωμα. Η ευαισθησία των κλασσικών αυτών τεχνικών διαχωρισμού και επεξεργασίας βρίσκεται σε επίπεδα attomole (10^{-18} mol).

- Τελευταίο στάδιο είναι η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών η οποία γίνεται με βάσεις δεδομένων πρωτεϊνών. Οι βιβλιοθήκες αυτές είναι ελεύθερες για το κοινό και αυξάνουν τον όγκο δεδομένων τους καθημερινά. Συχνά παρατηρούνται αναντιστοιχίες ή παρεκκλίσεις ανάμεσα σε πειραματικά δεδομένα και βάσεις δεδομένων καθώς εκατέρωθεν μπορεί να υπάρχουν σφάλματα. Σε κάθε πείραμα από τη μια, υπάρχει πάντα το θέμα της ακρίβειας, του θορύβου και του σφάλματος, ενώ οι βάσεις δεδομένων μπορεί να μην είναι σωστά ενημερωμένες, καθώς τα πρωτεϊνικά δεδομένα της μπορεί να προέρχονται απευθείας από μεταφρασμένο γονιδίωμα αγνοώντας τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Το κενό αυτό συχνά γεφυρώνεται με χρήση μαθηματικών εργαλείων και εξελιγμένων αλγόριθμων όπως ο Profound ο οποίος αντιμετωπίζει τα σφάλματα απόκλισης στην μέτρηση της πρωτεϊνικής μάζας και στις συχνότητες των ιόντων και δίνει ένα εύρος πιθανοτήτων ταιριάσματος ανά πρωτεΐνη [42].

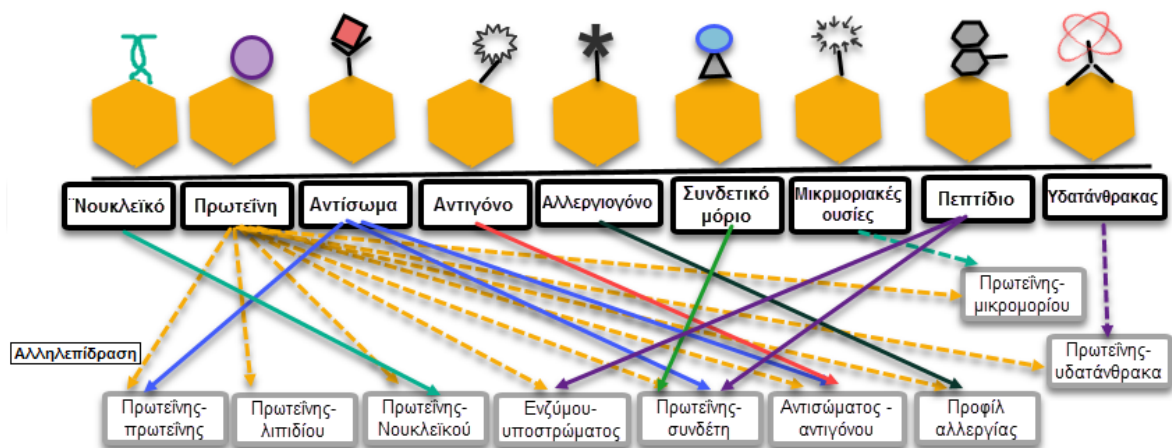
3.10.8 Μικροσυστοιχίες Πρωτεϊνών

Ο τομέας της πρωτεωμικής συνεχώς εξελίσσεται και μαζί του πολλαπλασιάζεται και ο όγκος δεδομένων που παράγεται. Η πρόοδος της τεχνολογίας στην παραγωγή αξιόπιστων δεδομένων έχει καταλήξει στη δημιουργία και χρήση των μικροσυστοιχιών πρωτεϊνών, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλότερη ευαισθησία έναντι των κλασσικών τεχνικών της πρωτεωμικής (10^{-21} mol). Η διαδικασία της σύνθεσής τους δε διαφέρει στη λογική από τις DNA. Η τεχνική που

χρησιμοποιείται είναι αυτή της κηλίδωσης, με μόρια σχεδιασμένα να αντιδρούν με πρωτεΐνες (protein recognition molecules, PRM) να διατάσσονται σε συγκεκριμένες θέσεις στις ψηφίδες μιας γυάλινης συνήθως επιφάνειας με χρήση ρομποτικού μηχανήματος. Ύστερα οι ανιχνευτές επωάζονται με βιολογικά μακρομόρια που προέρχονται από δείγματα όπως π.χ. ορός, ούρα, αίμα και σημαίνονται με χρωστικές. Η σήμανση επιτυγχάνεται με διάφορες μεθόδους(συνηθέστερη η Enzyme Linked Immunoassay Antibody, **ELISA**), ανάλογα τον τύπο του ιχνηθέτη. Στο τέλος μέσω του προσδιορισμού της έντασης του σήματος του φθορισμού ποσοτικοποιούνται τα δεδομένα. Τα νούμερα των κηλίδων, τα υλικά της σύνθεσης των μορίων αναγνώρισης όπως και οι τεχνικές εντύπωσης διαφέρουν από συστοιχία σε συστοιχία και είναι πάντα οι κατάλληλες για το επίπεδο αναλυτικότητας που στοχεύουμε. Για να επιτευχθεί η μέγιστη ανάλυση του πειράματος χρησιμοποιείται μια πληθώρα από τεχνικές. Παράδειγμα αποτελεί η τεχνολογία της επιφανειο-ενισχυόμενης εκρόφησης/ιονισμού με λέιζερ (surface-enhanced laser desorption/ionization, **SELDI**), προσέγγισης, διαλογής και καθαρισμού πρωτεϊνών στις μικροσυστοιχίες. Μέσω της SELDI οι ακινητοποιημένες πρωτεΐνες ιονίζονται και ταξινομούνται βάσει του λόγου m/z . Ακόμα μία σημαντική τεχνολογία που εφαρμόζεται για την ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων είναι αυτή του συντονισμού επιφάνειας πλασμονίου (Surface Plasmon Resonance, **SPR**), μέσω της οποίας γίνεται δυνατή η ανίχνευση προσδεμένων πρωτεϊνών βάσει εντάσεως σήματος [43].

Οι πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

- Μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών ή λειτουργικές μικροσυστοιχίες (**Protein Chips**), οι οποίες χρησιμοποιούνται στην έρευνα της πρωτεϊνικής λειτουργίας. Η τεχνολογία αυτή δίνει τη δυνατότητα παράλληλης ανάλυσης μεταξύ διάφορων βιοχημικών διεργασιών και αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-μακρομορίων (DNA, RNA, πρωτεϊνών, μικρομοριακών ουσιών).
- Αναλυτικές μικροσυστοιχίες ή μικροσυστοιχίες αντισωμάτων (**Antibody Chips**). Το πνεύμα της λειτουργίας τους θυμίζει αρκετά τις DNA αφού η χρήση τους γίνεται για την μέτρηση των επιπέδων των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Έχουν πολύ μεγάλο βεληνεκές χρησιμοποίησης στην κλινική έρευνα, καθώς συνεπικουρούν στην εξαγωγή συμπερασμάτων με τεστ που προσδιορίζουν το πρωτεϊνικό προφίλ έκφρασης σε αλλαγές περιβάλλοντος. Μέσω των Antibody Chips έχει γίνει εύκολη και γρήγορη και αξιόπιστη η διάγνωση αλλεργιών, είναι ισχυρά εργαλεία για την αντιπαραβολή υγιών και ασθενών ιστών, ενώ συνεχώς προωθούνται πειράματα μέσω αυτών που αφορούν τη διάγνωση αυτοάνοσων νοσημάτων.



Εικόνα 3.18: Είδη πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών (αναλυτικών και λειτουργικών) ανάλογα τον ανιχνευτή που χρησιμοποιούν και αντιστοιχία με τα εξαγόμενα δεδομένα ανάλογα των τύπων αλληλεπιδράσεων.

- Ο τρίτος τύπος είναι οι μικροσυστοιχίες ανάστροφης φάσης (**Reverse Phase Array, RPA**) και είναι ένα παρακλάδι της παραπάνω κατηγορίας. Στην τεχνολογία αυτή απομονώνονται κύτταρα από ιστούς ενδιαφέροντος και ύστερα λύονται. Ύστερα εκτυπώνονται πεπτιδία αναφοράς σε αντικειμενοφόρες πλάκες για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων και μέσω τεχνικών σήμανσης ανιχνεύονται τα αντισώματα που είναι υπό εξέταση. Η χρήση τους είναι κυρίως πάνω στον προσδιορισμό των τροποποιημένων πρωτεϊνών (κυρίως των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεών τους), υποβοηθώντας το πεδίο της διάγνωσης και αντιμετώπισης της ασθένειας [44,45].

Οι μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών είναι ένα σημαντικό κομμάτι της έρευνας στην πρωτεωμική. Ειδικά δε αν θεωρήσουμε πως οι δεκαετίες που βιώνουμε είναι η επανάσταση της μοριακής βιολογίας, τότε η πρόβλεψη για τα επόμενες δύο δεκαετίες είναι πως τα Protein Chips θα έχουν κυρίαρχο ρόλο σε αυτή. Με νέες τεχνικές που προσπαθούν να ξεπεράσουν τους σημερινούς περιορισμούς, όπως ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ταυτόχρονη διατήρηση της δομής και της λειτουργίας τους, η ακινητοποίησή τους στη μικροσυστοιχία, ο σαφής προσανατολισμός τους πάνω σε αυτή, η ικανότητα και ποικιλία των συνδετών-αντιγόνων για το σύνολο των δειγμάτων και η ακρίβεια των τεχνικών εντοπισμού και ανάλυσης [46], η παραγωγή πρωτεϊνικών δεδομένων θα γίνει γρηγορότερη, ακριβέστερη και οικονομικότερη.

3.10.9 Εφαρμογές των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών

Οι μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών έχουν βρει εφαρμογή σε πολλά πεδία στη μοριακή βιολογία και στην ιατρική από τη διάγνωση ως και τη θεραπεία. Οι κύριοι άξονες εφαρμογών τους είναι η εξής:

- **Ανάλυση του πρωτεώματος.** Οι πρωτεΐνες είναι μια εξαιρετικά ευρεία κατηγορία μακρομορίων. Η διερεύνηση των διάφορων τύπων και η κατηγοριοποίησή τους, όπως και η ανακάλυψη των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων και τα βιολογικά μονοπάτια που συμμετέχουν είναι μια επίπονη και χρονοβόρος εργασία, στην οποία συμμετέχουν όλο και περισσότερο τα δεδομένα που εξάγονται πειραματικά από πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες.
- **Φαρμακολογία.** Τα δεδομένα που προσφέρουν οι μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών (ειδικά των πρωτεϊνών-μικρομοριακών ουσιών) στο πεδίο της ανάπτυξης φαρμάκων είναι καθοριστικής σημασίας. Ασθένειες που παρουσιάζουν παρόμοια συμπτώματα μέσω ανακατασκευής των βιοχημικών μονοπατιών μπορούν πλέον να προσδιοριστούν και να ανακαλυφθούν επακριβώς τα αίτια οδηγώντας σε φάρμακα με καλύτερη στόχευση, λιγότερες παρενέργειες και γενικότερα μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα.
- **Έγκαιρη διάγνωση.** Ένας από τους βασικούς λόγους που οι μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών θεωρούνται σημαντικό κομμάτι της πρωτεωμικής και της μοριακής ιατρικής είναι η συνεισφορά τους στην ανακάλυψη βιοδεικτών. Ο σκοπός τους είναι η αναζήτηση σημαντικών στατιστικών διαφοροποιήσεων σε αντιπαραβολές υγιών και ασθενών δειγμάτων. Οι πρόωροι (early on-set) βιοδείκτες είναι το απόλυτο εργαλείο στην έγκαιρη διάγνωση, δίνοντας στην ιατρική ένα χρονικό προβάδισμα έναντι της εκδήλωσης της ασθένειας, ώστε αυτή να τερματιστεί με χρήση κατάλληλου σχήματος πριν ο ασθενής καταληφθεί από συμπτώματα [47]. Αυτός ο τύπος, τα χαρακτηριστικά του και η συνεισφορά του στο πεδίο της πρωτεωμικής θα αναλυθούν παρακάτω.

3.10.10 Πρωτεωμική και καρκίνος

Όπως είδαμε στο 2^ο κεφάλαιο ο καρκίνος είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη ασθένεια η οποία ευθύνεται για εκατομμύρια θανάτους κάθε χρόνο. Έως το 2030 εκτιμάται πως θα υπάρξουν 21.7 εκατομμύρια νέα περιστατικά παγκοσμίως, ενώ ο απολογισμός των θανάτων θα ανέλθει σε 13 εκατομμύρια σύμφωνα με τον οργανισμό American Cancer Society. Η υψηλή θνησιμότητα του καρκίνου δεν προκύπτει από την καθαυτή έλλειψη διαθέσιμων θεραπευτικών αγωγών αλλά από τη διάγνωση της ασθένειας σε προχωρημένα στάδια όπου και τα διαθέσιμα σχήματα εμφανίζουν χαμηλή αποτελεσματικότητα. Συνεπώς τα στάδια της πρόληψης και της έγκαιρης διάγνωσης είναι οι πρωταρχικές κατευθύνσεις στη μάχη ενάντια στον καρκίνο. Με την παραδοχή πως η πρόληψη με κατάλληλη ενημέρωση, τακτικούς

ελέγχους και μια ποιότητα καθημερινότητας σήμερα είναι εφικτή, η έγκαιρη διάγνωση είναι ο μεγάλος στόχος της πρωτεωμικής.

3.10.10.1 Καρκινικοί δείκτες (tumor markers)

Οι πρωτεΐνες είναι οι βασικοί τελεστές των κυτταρικών διεργασιών και ως εκ τούτου η έκφραση, η μορφή και η ενεργότητά τους αποτελούν μοριακό δείκτη για την υγεία ή την ασθένεια. Η ανακάλυψη μεταβολών (προερχόμενες από γενετικές, επιγενετικές, περιβαντολογικές αλλαγές) στα δίκτυα σηματοδότησης που αυτές συμμετέχουν βοηθά στην κατανόηση του μηχανισμού της καρκινογένεσης και της προόδου της ασθένειας και ο προσδιορισμός τους στα επίπεδα έκφρασης (μοριακές υπογραφές) αποτελεί ένα πολυβάθμιο μοντέλο εντοπισμού του καρκίνου. Οι μοριακές υπογραφές αυτές ονομάζονται καρκινικοί δείκτες (tumor markers) και είναι χαρακτηριστικές για τον εκάστοτε τύπο καρκίνου, όπως και για το στάδιο που βρίσκεται [49].

Οι καρκινικοί (αλλιώς νεοπλασματικοί ή βιοχημικοί) δείκτες είναι βιομόρια των οποίων η ύπαρξη ή η υψηλή –άνω των φυσιολογικών τιμών-συγκέντρωσή τους σχετίζεται με την παρουσία όγκων. Η λογική στον εντοπισμό τους σχετίζεται με την καθαυτή παρουσία καρκινικών κυττάρων και χωρίζεται σε δύο άξονες:

- Εντοπισμός βιομορίων που παράγονται σε ογκογόνα κύτταρα αυτά ή αντίστοιχα καρκινικά προϊόντα κυκλοφορούντα στα βιολογικά υγρά
- Μετρήσεις ουσιών που αποδεδειγμένα σχετίζονται με την ύπαρξη καρκινικών όγκων. Οι ουσίες αυτές ονομάζονται ογκοσχετιζόμενα αντιγόνα (tumor associated antigen) και πέραν της ύπαρξής τους σε φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού (έκφραση από εμβρυονικά κύτταρα σε συνθήκες υγείας), απαντώνται σε ανώτερες ποσότητες σε καταστάσεις της νόσου. Πιο συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις τους στο αίμα αυξάνουν αναλογικά με τη σοβαρότητα της νόσου και την πρόοδο του μεγέθους των όγκων [50].

Τα βασικότερα μόρια που χρησιμοποιούνται ως δείκτες στην ογκολογία είναι τα εξής:

Πίνακας 3.2: Γνωστοί καρκινικοί δείκτες

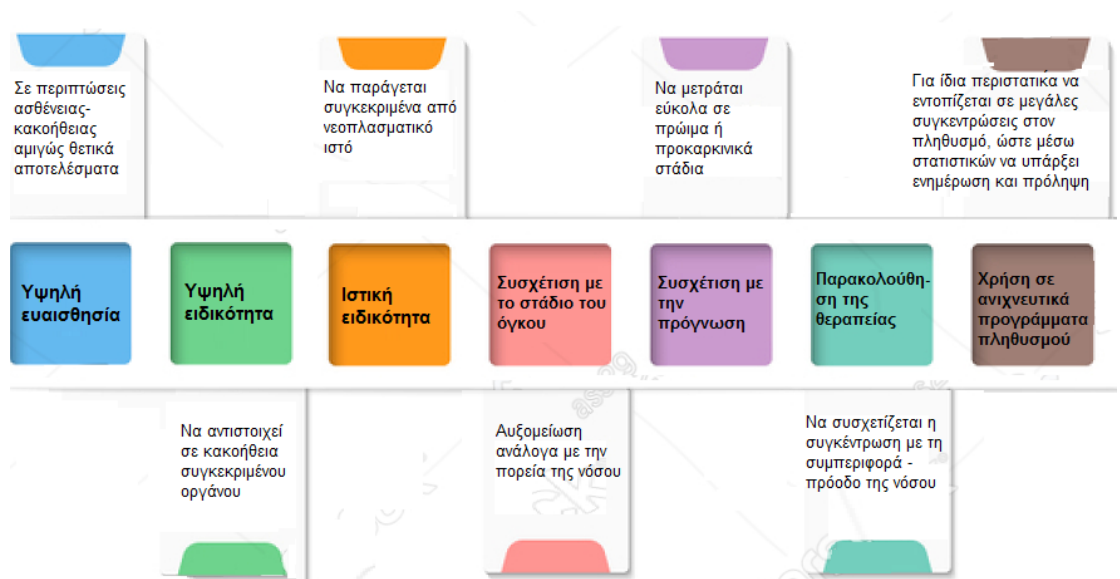
Γνωστοί καρκινικοί δείκτες	
Ογκοεμβρυικά αντιγόνα	Καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (CEA), άλφα-φετοπρωτεΐνη (α-FP), β-χοριακή γονιαδοτροπίνη (b-HCG).

Ορμόνες	ACTH, PTHrp, HPL, καλσιτονίνη, VMA, HVA, 5-HIAA γλουκαγόνο, νευροτενσίνη, PGE2 κ.α.
Γλυκοπρωτεΐνες καρκινικών κυττάρων	CA12-5, CA 15-3, CA 19-9, CA 72-4
Ένζυμα	Γαλακτική δεϋδρογονάση (LDH), PACP, γ-GT
Πρωτεΐνες	S-100, θυρεοσφαιρίνη, καταλάση, προφιλίνη 1, PSA (ειδικό προστατικό αντιγόνο), PSMA
Πρωτεΐνες οξείας φάσης	CRP, β2- μικροσφαιρίνη
Ανοσοσφαιρίνες	IgM, IgG, IgA, IgDS, IgE
Ογκοπρωτεΐνες	HER2/neu, RAS
Ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες	p53 , APC
Μόρια προσκόλλησης	Ιντεγκρίνες, σελεκτίνες, VCAM, ICAM
Μιτοχονδριακό DNA	mtDNA ¹²

3.10.10.2 Ιδανικά χαρακτηριστικά καρκινικού δείκτη

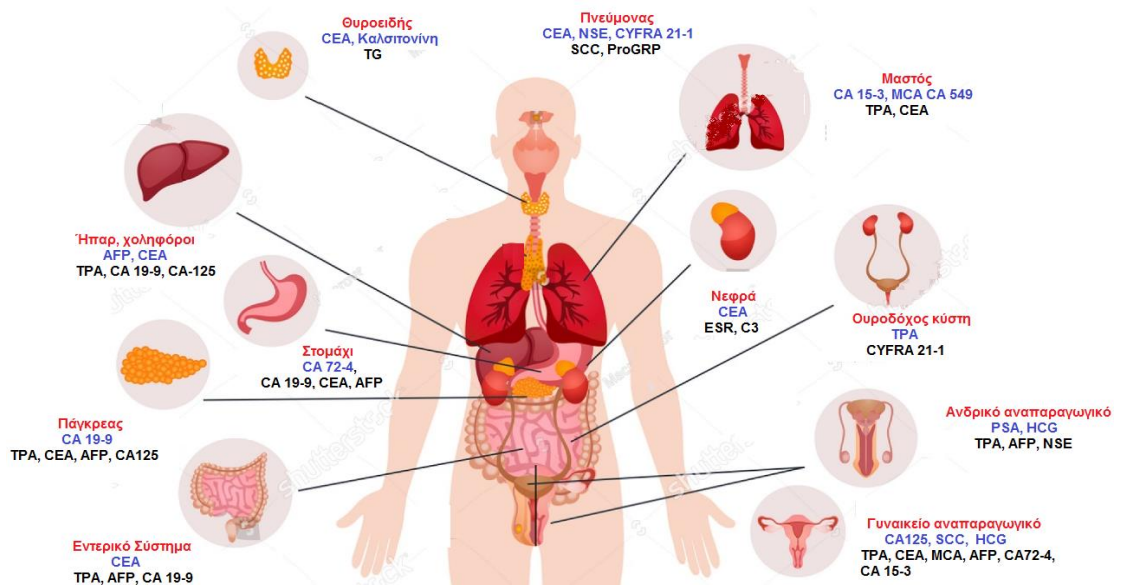
Παρά την μεγάλη πρόοδο στον τομέα της έρευνας πολύ λίγοι από τους εν δυνάμει καρκινικούς δείκτες χρησιμοποιούνται στην πράξη. Για να κριθεί ικανός ένας δείκτης πρέπει να πληροί κάποια χαρακτηριστικά ώστε να είναι αξιόπιστος στα πειράματα, όπως η εξειδίκευση κατάδειξης της ασθένειας του εκάστοτε τύπου. Ένας ιδανικός καρκινικός δείκτης έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

¹² Τα μιτοχόνδρια περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα του δικού τους γονιδιώματος, καθώς και των περισσότερων συστατικών μεταγραφής, μετάφρασης και πρωτεϊνοσύνθεσης. Πολλές μεταλλάξεις στο mtDNA ειδικά στην περιοχή του βρόγχου D (περιοχή που δεν κωδικοποιεί αλλά περιέχει τις αρχικές θέσεις για την αντιγραφή του mtDNA και τη μεταγραφή του σε RNA) έχουν σχετιστεί με πληθώρα τύπων καρκίνου [51].



Εικόνα 3.19: Χαρακτηριστικά ιδανικού καρκινικού δείκτη

Είναι εύκολα αντιληπτό πως ένα μόριο που απαντά σε όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά είναι εξαιρετικά δύσκολο να βρεθεί. Ειδικά οι κατηγορίες της ευαισθησίας και της ειδικότητας είναι δύσκολο στους συμβατικούς βιοδείκτες να πληρούνται σε ποσοστά κοντά στο 100%, γι' αυτό και στη διάγνωση χρησιμοποιούνται λίγοι από αυτούς. Καρκίνοι όπως αυτός του προστάτη, του μαστού ή το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα είναι ανιχνεύσιμοι από τα πρώτα στάδια χάρις σε καρκινικούς δείκτες με υψηλά ποσοστά ευαισθησίας ή ειδικότητας (PSA, HER-2 και AFP αντίστοιχα). Στον αντίποδα άλλοι τύποι ανιχνεύονται δυσκολότερα ή σε συμπτωματικές καταστάσεις, δυσχεραίνοντας τη διαδικασία της θεραπείας. Οι πιο διαδεδομένοι κλασσικοί βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο ανά όργανο εμφανίζονται στην παρακάτω εικόνα.



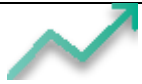


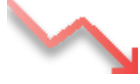




Εικόνα 3.20: Συνηθέστεροι καρκινικοί δείκτες για κάθε όργανο, πρώτη σειρά 1^{ης} (μπλε) και δεύτερη 2^{ης} εκλογής (μαύρο).

3.10.10.3 Συμβολή της πρωτεωμικής στην εύρεση νέων καρκινικών δεικτών


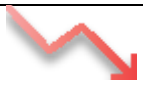
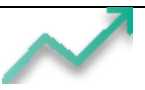
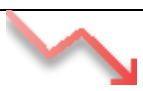

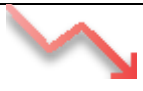
Η έρευνα στο πεδίο της πρωτεωμικής όσον αφορά την ανακάλυψη υποψήφιων βιοδεικτών έχει ενταθεί την τελευταία δεκαετία και συνεχώς παράγει νέα δεδομένα προκρίνοντας καινούρια μόρια ως υποψήφια για αναγνώριση του καρκίνου έγκαιρα, ακόμα ίσως και σε ασυμπτωματικό στάδιο. Βασική στόχευση παραμένει η εκπλήρωση των χαρακτηριστικών του ιδανικού βιοδείκτη, με την ειδικότητα και την ευαισθησία να είναι τα σημαντικότερα. Τα εργαλεία παραγωγής δεδομένων είναι όλα αυτά που χρησιμοποιεί ο κλάδος (2-DE, MS, μικροσυστοιχίες), όπως και όλα τα εργαλεία που μπορεί να διαθέσει η βιοπληροφορική. Μερικοί από τους υποσχόμενους καρκινικούς δείκτες που ανέδειξε η πρωτεωμική με χρήση των κλασσικών τεχνικών της είναι οι εξής:

Πίνακας 3.3 : Καρκινικοί δείκτες μέσω κλασσικών εργαλείων πρωτεωμικής [48].

Είδος καρκίνου	Τεχνολογία /Μέθοδος	Πρωτεΐνη	Επίπεδα έκφρασης (Αύξηση/ Μείωση)
		Αννεξίνη I V, γαλεκτίνη, λυσωφωσφολιπάση,	

Ουροδόχου κύστης	2-DE/ MS	πρωτεΐνη θερμικού σοκ 27 (HSP27),γαλακτική αφυγοδρονάση	Αλλοιωμένα ποσοστά έκφρασης
Μαστού	MS	Λιποφιλίνη Β, Β-σφαιρίνη, αιμοπηξίνη	
		Alpha-2-HS-γλυκοπρωτεΐνη	
Παχέος εντέρου	2-DE	Periplakin (πρωτεΐνη του γονιδίου PPL)	
Οισοφάγου	2-D DIGE	ANXA3, BMP4, SPAPC, MMP7, LCN2, MMP11 ¹³	
Γαστρεντερικός	2-DE/MALDI-TOF MS	Γλουταμινική αφυγοδρονάση τύπου 1, πρωτεΐνες ομάδας υψηλής κινητικότητας, αννεξίνη V,C13orf2, ινωδογόνο	
		RoXan	
Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	2-DE, 2-D DIGE / MALDI-TOF MS	Alpha-1-αντιπρυμίνη	
		Alpha-2-HS, προ-απολιποπρωτεΐνη A-IV	
		Ανοσοσφαιρίνη, τρανσθυρετίνη,	

¹³ LCN2, MMP11 σε προχωρημένα στάδια Duke (στάδια προόδου του όγκου στην ασθένεια του καρκίνου του παχέος εντέρου) εμφανίζονται σε μεγαλύτερο ακόμα επίπεδα έκφρασης

Πνεύμονα	2-DE/MALDI-TOF MS	απποσφαιρίνη- (άλφα σφαιρίνες), 2 ισομορφές του Αμυλοειδούς Α(SAA)	
		Θραύσματα απολιποπρωτεΐνης	
Ωοθηκών	MALDI-TOF MS	Πρόδρομη μορφή απποσφαιρίνης	
		Τρανσφερρίνη	
Παγκρέατος	2-DE/MS	Αννεξίνη Ι	
Προστάτη	2-DE/MS	Φιμπρινογόνο γ	

Οι πιο πρόσφατες μελέτες επικεντρώθηκαν στη χρήση μικροσυστοιχιών για τον εντοπισμό αντιγόνων που σχετίζονται με τον καρκίνο. Σε μια ετερογενή ασθένεια όπως ο καρκίνος, είναι αδύνατο ένας μοναδικός βιοδείκτης να συλλάβει την πολυπλοκότητα της νόσου. Η πυκνότητα και η δυνατότητα παράλληλων δοκιμών μεγάλων ποσοτήτων βιολογικών δειγμάτων είναι το μεγάλο πλεονέκτημα των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών που τις βάζει στη θέση του οδηγού ανάμεσα στις τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση υποψήφιων καρκινικών αντιγόνων-δεικτών. Μερικοί από αυτούς καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα [53]:

Πίνακας 3.4: Ανακάλυψη υποψήφιων καρκινικών δεικτών με χρήση πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών [53].

Μέθοδος	ΔΕΙΓΜΑ			Υποψήφιοι βιοδείκτες
	Αριθμός αντισωμάτων τυπωμένα στη μικροσυστοιχία	Υπό εξέταση δείγμα	Τύπος καρκίνου	
	146	Κυτταρόλυμα	Παχέως εντέρου	p53, DEF44, DEF45, ICAD
	184	Ορός	Προστάτη	Ανοσοσφαιρίνη M, G, άλφα-1

Μικροσυστοιχίες αντισωμάτων (Antibody Chips)				αντιχυμοθρυψίνη.
	378	Ιστός	Μαστού	Καζεΐνη, p53, αννεξίνη XI, CDC25C
	224	Κυτταρόλυμα	Μαστού	κυκλίνη D2, κυτοκερατίνη 18, κυκλίνη B1, ετερογενής πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη m3
	86	Ορός	Προστάτη	θρομβοσπονδίνη-1(διαχωρισμός καλοήθειας/κακοήθειας)
	254	Ορός	Ουροδόχου κύστης	Νεφροποντίνη 1, πρωτεϊνική κινάση CDC28, προκολλαγόνο C
	92	Ορός	Παγκρέατος	τροπίνη, θειορεδοξίνη, αλκαλική φωσφατάση
	84	Ορός	Πνεύμονα	βλεννίνη 1, α-1-αντιθρυψίνη, τρανσφερρίνη, γελσολίνη
	42	Κυτταρική καλλιέργεια/	Μαστού	Ογκογονίδιο σχετιζόμενο με την

		ορός		ανάπτυξη –GRO, IL-8
Μικροσυστοι- χίες ανάστροφης φάσης	Κυτταρόλυμα	Ιστός	Προστάτη	αύξηση της φωσφορυλίωσης της Akt και μείωσης της φωσφορυλίωσης του ERK
		Καρκινικά κύτταρα	Διάφοροι τύποι καρκίνου	Βιλλίνη και μοασίνη
		Κυτταρικές γραμμές	Ουροδόχου κύστης	Σύνδεση της γελσολίνης με την κατάσταση TP53 κατά την εξέλιξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστης

Η ευχέρεια των μικροσυστοιχιών των πολλαπλών πειραμάτων καθώς και ο τεράστιος όγκος δεδομένων που προκύπτουν ανά πείραμα θα ήταν ένα ανεκμετάλλετο δώρο δίχως τη συμβολή της βιοπληροφορικής . Βάσεις δεδομένων για βιοδείκτες, εργαλεία ανάλυσης και διερεύνησης των πρωτεϊνικών μονοπατιών στην καρκινική νόσο (και ειδικότερα για κάθε τύπο της), εργαλεία εξόρυξης δεδομένων, ποσοτικοποίησης και σχεδίασης έχουν ανοίξει καινούρια μονοπάτια στην εύρεση καρκινικών δεικτών. Πλατφόρμες όπως η ILOOP (Interwoven Loop) βοηθούν στην πειραματική κατασκευή πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών δύο καναλιών, ενώ στον τομέα της ανάλυσης, της στατιστικής και κανονικοποίησης υπάρχει το εργαλείο MAGMA, όπως και τα CARMAweb (ιστότοπος περιβάλλοντος R, <https://carmaweb.genome.tugraz.at/carma/>) και GenePattern στα οποία ενσωματώνονται αρκετά εργαλεία βιοπληροφορικής τα οποία είναι αρκετά φιλικά στον χρήστη. Τα βιολογικά μονοπάτια του καρκίνου, όπως και καρκινικοί δείκτες για τον εκάστοτε τύπο μπορούν να βρεθούν σε βάσεις δεδομένων όπως η Cancer Gene Marker Database (CGMD, <http://cgmd.in/index.php>) όπου μπορεί ο χρήστης να ενημερωθεί για τις γονιδιακές μεταλλαγές και τις αλλαγές στην έκφρασή τους [57].

Μεταλλαγές στο πρωτέωμα μπορούν να μελετηθούν σε δύο βάσεις δεδομένων, την Human Protein Mutant Database (HPMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) και την Human Cancer Proteome Variation Database (CanProVar, <http://canprovar2.zhang-lab.org>). Για μεγαλύτερο εύρος δεδομένων υπάρχει η Cancer Mutant Proteome Database (CMPD, <http://cgbc.cgu.edu.tw/cmpd/>) η οποία προσπαθεί να ζεύξει τα πεδία της γονιδιωματικής και της πρωτεωμικής έχοντας με πάνω από 2 εκατομμύρια γενετικές τροποποιήσεις καταχωρημένες. Μέσω των δεδομένων της CMPD διευκολύνεται η εξέταση και η επιβεβαίωση των πιθανών βιοδεικτών [58].

Η χρήση όλων των εργαλείων της πρωτεωμικής έχει εκτοξεύσει την παραγωγή δεδομένων στο πεδίο των καρκινικών δεικτών. Οι πιθανοί πρωτεωμικοί δείκτες συνήθως υπερέχουν των αντίστοιχων συνηθισμένων εργαστηριακών. Για κάποιες από τις πιο συχνές μορφές καρκίνου γίνεται η αντιπαραβολή μεταξύ τους για τα δύο βασικότερα χαρακτηριστικά :

Πίνακας 3.5: Αντιπαραβολή πρωτεωμικών /κλασσικών βιοδεικτών ως προς την ευαισθησία και την ειδίκευση.

Καρκίνος	Βιοδείκτες πρωτεωμικής		Δείκτης	Κλασσικοί Βιοδείκτες	
	Ευαισθησία	Εξειδίκευση		Ευαισθησία	Εξειδίκευση
Ουροδόχου κύστης	80%	90-97%	NMP22	31%	95%
Μαστού	93%	91%	CA 15-3	63%	80-88%
Παχέος εντέρου	91%	93%	CEA	43%	60-90%
Στομαχικός	83%	95%	CEA	49%	25-50%
Ηπατικός	94%	86%	AFP	50%	90%
Πνεύμονα	87%	80%	Cyfra 21-1	63%	94%
Ωοθηκών	83%	94%	CA-125	57%	50% ¹⁴
Παγκρέατος	78%	97%	CA 19-9/CEA	72%	90%/50–80%
Προστάτη	83%	97%	PSA	86%	20-34%

¹⁴ Η κακή επίδοση του CA-125 εμφανίζεται στα πρώιμα στάδια. Στα στάδια που έχει δημιουργηθεί όγκος οι δείκτες ευαισθησίας/ειδίκευσης ανεβαίνουν 75-90% [54], [48], [55] .

3.10.10.4 Μελλοντικές προκλήσεις για την πρωτεωμική στο πεδίο των καρκινικών δεικτών.

Το μέλλον επιφυλάσσει πολλές προκλήσεις για την εργαλειοθήκη που χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Όσο προοδεύουν τα πεδία της γονιδιωματικής και της πρωτεωμικής, τόσο πιο κοντά θα βρισκόμαστε στην κατανόηση και τη θεραπεία της καρκινικής νόσου. Γονιδιακά ή πρωτεϊνικά προφίλ αποτελούμενα από συστάδες βιοδεικτών θα δώσουν νέα πνοή στην έγκαιρη διάγνωση, ενώ σίγουρη πρέπει να θεωρείται η επίτευξη της κατασκευής μικροσυστοιχιών που θα περιλαμβάνουν όλα τα μακρομόρια ή ακόμα και κύτταρα με στόχο την πλήρη εικόνα της καρκινογένεσης από σκοπιά ολιστική. Ακόμα, η ραγδαία εξέλιξη της νανοτεχνολογίας θα επιτρέψει την κατασκευή νανοσωματιδίων με σχεδιασμό χαρακτηριστικών που θα αποσκοπούν στην ταυτόχρονη μοριακή απεικόνιση και θεραπεία ή ακόμα και στη διάγνωση μέσω συζευγμένων ανιχνευτών. Όλα αυτά τα πεδία αναμένεται να ενωθούν μέσω της βιοπληροφορικής. Σε ένα ολοκληρωμένο σύστημα υγείας στις επόμενες δεκαετίες τα εργαλεία πρωτεωμικής θα έχουν μία ξεχωριστή θέση στα εργαστήρια και θα αποτελούν ίσως το πιο σημαντικό σύμμαχο στην εύρεση βιοδεικτών και την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου [56].

Βιβλιογραφία 3^{ου} κεφαλαίου

1. Νικήτα Σ.Π (2011), **Προσομοίωση Φυσιολογικών Συστημάτων**.
2. Δ. Γιόβα (2011), **Εισαγωγή Στη Νανοβιοφυσική Και Οπτική Απεικόνιση**.
3. Venter et al. (2001) *Science* **291**:1304–1351. Copyright 2001, American Association for the Advancement of Science.
4. O’leary, J., Engels, K., & Dada, M. (1997). **The polymerase chain reaction in pathology**. *Journal of Clinical Pathology*, 805–810.
5. Parkinson J, Blaxter M (2009). **Expressed Sequence Tags: An Overview, Methods in Molecular Biology**, vol. 533 pp. 1-12
6. Josefsen K. (2010), **Northern Blotting Analysis**. *Methods in Molecular Biology*, vol.703, pp. 87-105.
7. Sangdun C (2007), **Introduction to Systems Biology**.
8. Luscombe N. M., Greenbaum D, Gerstein M.(2001). **What is bioinformatics? An introduction and overview**. *Yearbook of Medical Informatics*, pp 83-100.
9. Bairoch A, Apweiler R. (2000) **The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000**. *Nucleic Acids Res*, Jan; 28(1):45-8.
10. Strasser B.J (2010). **Collecting, Comparing and Computing Sequences: The Making of Margaret O. Dayhoff’s Atlas of Protein Sequence and Structure, 1954-1965, Journal of History of Biology**, vol.43, pp 623-660.
11. Baxevanis A.D, Ouellette B.F (2001), **Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Second edition**, John Willey ad Sons.
12. Chou P.Y, Fasman G.D (1974), **Conformational parameters for amino acids in helical β - sheet and random coil regions calculated from proteins**, *Biochemistry*, 13(2), pp.221-222.
13. Xiong J. (2006), **Essential Bioinformatics**, Cambridge University Press.
14. Berg J.M., Tymoczko (2002), **Biochemistry Fifth Edition**.
15. Gracey A.Y, (2007). **Interpreting physiological responses to environmental change through gene expression profiling**, *The Journal of Experimental Biology* 209, 1584-1592.

16. Sobek J et.al. (2006), **Microarray technology as a universal tool for high-throughput analysis of biological systems, combinatorial chemistry & high throughput screening**, Jun 9 (5):365-80.
17. Schena M (1996). **Genome analysis with gene expression microarrays**, **Bioessays**, May 18(5):427-31.
18. Trevino V et al. (2007). **DNA microarrays: a powerful genomic tool for biomedical and clinical research**, *Molecular Medicine*, Sept-Oct; 13(9-10):527-541.
19. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977), **Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**(12): 5350-4.
20. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. **Molecular Biology of the Cell, 5th ed. Garland Science**, Taylor & Francis Group, NY, pp 538–539.
21. Gracey AY(2007), **Interpreting physiological responses to environmental change through gene expression profiling**, *The Journal of Experimental Biology* 209, 1584-1592
22. Schena M, Shalon D, Davis RW et al. (1995). **Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray**, *Science*, 270: 467-70.
23. Quackenbush J, (2002). **Microarray data normalization and transformation**, *Nature Genetics* 32:496-501.
24. Dalma-Weiszhausz DD, Warrington J, Tanimoto EY, Miyada CG (2009), **The Affymetrix GeneChip platform: an overview**. *Methods Enzymol*; 410:3-28.
25. M.B. Miller, Y. Tang (2009), **Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology**, *Clinical Microbiology Reviews*, Oct; 22(4): 611–63.
26. Lipshutz R.J., Fodor S.P., Gingeras T.R., Lockhart D.J (2009), **High density synthetic oligonucleotide arrays**, *Nature Genetics*, Jan;21: 20-4.
27. Ehrenreich, A. (2006). **DNA microarray technology for the microbiologist: an overview**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:255–273.
28. Bumgarner R (2013), **DNA microarrays: Types, Applications and their future**, **Current Protocols in Molecular Biology**, 1 Jan 2013: Unit-22.1.
29. www.thermofisher.com
30. Kwok P.Y, Chen X (2013). **Detection of single nucleotide polymorphisms**, *Curr. Issues Mol. Biol.* 5, 43-60.

31. Syvanen A.C, (2005). **Toward genome-wide SNP genotyping.** Nat. Genet. 37(Suppl.), 5–10.
32. Oliphant, A., Barker, D. L., Stuelpnagel, J. R., and Chee, M. S. (2002). **BeadArray technology: Enabling an accurate, cost-effective approach to high-throughput genotyping.** Biotechniques (Suppl.), 56–58, 60–61.
33. Michael K.L, Taylor, L.C, Schultz, S.L, Walt, D. R, (1998). **Randomly ordered addressable high-density optical sensor arrays.** Anal. Chem. 70, 1242–1248.
34. Gunderson, K. L., Steemers, F. J., Lee, G., Mendoza, L. G., and Chee, M. S. (2005). **A genome wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology.** Nat. Genet. 37, 549–554.
35. Agilent Microarray Technology, www.genomics.agilent.com
36. LeProust E, **Agilent’s Microarray Platform: How High-Fidelity DNA Synthesis Maximizes the Dynamic Range of Gene Expression Measurements,** www.agilent.com
37. Han M, Gao X, Su J.Z, Nie S, (2001). **Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of molecules.** Nat. Biotechnol. 19: 631-635.
38. Gygi S.P, Rochon Y, Franza B.R, Aebersold R, (1999). **Correlation between protein and mRNA abundance in yeast,** Mol. Cell Biol. 19: 1720-1730.
39. Liebler D. (2002), **Introduction to proteomics-Tools for the new biology,** Humana Press.
40. Gygi S.P, Corthals G.L, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R, (2000). **Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology.** Proc. Natl. Acad, Sci. USA; 97: 9390-9395.
41. **Why run 2D DIGE instead of 2D gels,** <http://www.appliedbiomics.com>
42. Zhang W, Chait B.T (2000). **‘Profound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information.’** Anal. Chem 72(11): 2482-9.
43. Hall D.A, Ptacek J, Snyder M, (2007). **Protein microarray technology,** Mechanisms of Ageing and Development, 128:161-167.
44. Cretich M, Damin F, Pirri G, Chiari M,(2006), **Protein and peptide arrays: Recent trends and new directions,** Biomol. Engineering, 23: 77-88.
45. Kodadek T, (2001). **Protein Microarrays: prospects and problems,** Chemistry & Biology, 8: 105-115.
46. Stuchlý J, Kanderová V, Fišer K, Cerná D, Holm A, et al. (2012). **An automated analysis of highly complex flow cytometry-based proteomic data.** Cytometry A. 81: 120-129.

47. Lee JW, Weiner RS, Sailstad JM, Bowsher RR, Knuth DW, O'Brien PJ, et al. (2005). **Method validation and measurement of biomarkers in nonclinical and clinical samples in drug development: a conference report.** *Pharm Res*; 22: 499–511.
48. Cho W.C, (2007). **Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery,** *Molecular Cancer*, Apr 2; 6: 25.
49. Zhang DY et al (2009), **Proteomics, pathway array and signaling network-based medicine in cancer.** *Cell Div.* Oct 28; 4():20.
50. Kilpatrick E.S, Lind M.J, (2009). **Appropriate requesting of serum tumor markers,** *BMJ*, Sep. 22; 339:b3111.
51. Bankier A.S, Barrell B.G et al, (1981). **Sequence and organization of the human mitochondrial genome.** *Nature* 290, 457-465.
52. Anderson KS, LaBaer J. (2005). **The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers.** *J Proteome Res.* Jul-Aug; 4(4):1123-33.
53. Ramachandran N, Srivastava S, LaBaer J (2008). **Applications of protein microarrays for biomarker discovery.** *Proteomics Clin. Appl.* Oct; 2(10-11): 1444–1459.
54. Moss E.L., Hollingworth J., Reynolds T.M. (2005). **The role of CA 125 in clinical practice,** *Journal of Clinical Pathology*, Mar; 58(3): 308–312.
55. Madhav N., Shreya S., et.al. (2016). **Tumor markers: A diagnostic tool,** *National Journal of Maxillofacial Surgery*, Jan-Jun; 7(1): 17–20.
56. Phan J. H. et. al (2009), **Convergence of biomarkers, bioinformatics and nanotechnology for individualized cancer treatment,** *Trends in Biotechnology*, doi.org/10.1016/j.tibtech.02.010
57. Pradeepkiran J.A et.al. (2015), **CGMD: An integrated database of cancer genes and markers,** *Scientific Reports*, Jul 10, 5: 12035
58. Jung H et al. (2014), **CMPD: Cancer Mutant Proteome Database,** *Nucleic Acids Research*, Nov 14, doi: 10.1093/nar/gku1182.
59. Hood L., Rowen L. (2013), **The Human Genome Project: big science transforms biology and medicine.** *Genome Medicine*, 5(9): 79.
60. David W. Mount (2001), **Bioinformatics Sequence and Genome Analysis,** Cold Spring Harbor Laboratory Press.
61. Pearson W.R, Lipman D.J, (1988). **Improved tools for biological sequence comparison,** *Proc Natl Acad Sci.*, 85(8), 2444-8.
62. Lipman D. J, Pearson W.R, (1985). **Rapid and Sensitive Protein Similarity Searches,** *Science*, 227:1435-1441.

4

Η Καρκινική νόσος

Η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου προϋποθέτει την κατανόηση του μηχανισμού της δημιουργίας του. Αν και γνωρίζουμε τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων, η πολυπλοκότητα των παθογενετικών μηχανισμών και η μη ξεκάθαρη αιτιολογία της κυτταρικής απορρύθμισης δυσχεραίνουν τον γρήγορο εντοπισμό της νόσου. Έτσι η ιατρική έστρεψε την προσοχή της στις «σκιές» των καρκινικών αλλαγών που αντικατοπτρίζονται στη διατάραξη της ομαλής κυτταρικής λειτουργίας.

4.1 Μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης (ΜΚΣ) και καρκίνος

Όλες οι διεργασίες ενός κυττάρου (κυτταρικός κύκλος) ελέγχονται από μια πλειάδα σύνθετων, πρωτεϊνικά ελεγχόμενων μονοπατιών, τα οποία ονομάζονται Μονοπάτια Κυτταρικής Σηματοδότησης (ΜΚΣ). Τα ΜΚΣ είναι υπεύθυνα για την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, τη μετακίνηση και κατάληψη συγκεκριμένων θέσεων στο χώρο, την πρωτεϊνοσύνθεση και την απόπτωση. Η ενεργοποίηση των δικτύων σε κάθε κύτταρο πραγματοποιείται με τη συμμετοχή εξωκυττάριων μορίων όπως οι αυξητικοί παράγοντες, τα μόρια μεταγωγής σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου (υποδοχείς κυτταρικής μεμβράνης), καθώς και ενδοκυττάριων με χαρακτηριστικά δράσης ογκογονιδίων. Από το δεύτερο κεφάλαιο υπήρξε μνεία των συνηθέστερων ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων, ωστόσο σε αυτό θα τα συσχετίσουμε με μορφές καρκίνου, εντοπίζοντας αυξητικούς παράγοντες, αντίστοιχους υποδοχείς και μεταγωγείς σήματος. Τα πρωτεϊνικά αυτά μόρια είναι τα κρίσιμα σημεία στα ΜΚΣ καθώς είτε δρουν ως δέκτες εξωκυττάριων σημάτων είτε ως πομποί εντολών προς το γενετικό υλικό [1].

Οι γενετικές μεταβολές των καρκινικών κυττάρων επιδρούν στα ΜΚΣ απορρυθμίζοντας τη σηματοδότηση «κόβοντας» τη διαδικασία του κυτταρικού κύκλου. Η ενεργοποίηση των μορίων εκκίνησης πολλαπλασιασμού όπως οι υποδοχείς κινάσες τυροσίνης¹⁵ (RTKs, υποδοχέας αυξητικού παράγοντα EGFR),

¹⁵Κινάσες: Πρωτεϊνικά προϊόντα καταλύτες της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης.

κινάσες σερίνης/θρεονίνης (Raf, Akt), λιπιδικές και κυτταροπλασματικές κινάσες (PI3Ks, Src, Abl) και μικρές GTP-άσες¹⁶ (Ras) διαταράσσουν τα ΜΚΣ που ευθύνονται για την κυτταρική αύξηση . Στον αντίποδα, μέσω διαγραφών και άλλων μεταλλαγών αποπτωτικά μονοπάτια που ελέγχουν τον τερματισμό της κυτταρικής αύξησης και τον κυτταρικό θάνατο απενεργοποιούνται. Μετάλλαξη του γονιδίου p53 ή των ογκοκατασταλτικών pRB, CKIs όπως και ρυθμιστών της σηματοδότησης στο κυτταρόπλασμα (APC, λιπική φωσφατάση PTEN) οδηγούν σε απώλεια ικανότητας τερματισμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [2]. Μέσω της βιοπληροφορικής δημιουργήθηκαν βάσεις δεδομένων που χαρτογραφούν και καταχωρούν τις οδούς των ΜΚΣ, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους και τις αλλοιώσεις τους . Από τις πιο γνωστές είναι η Pathway Commons, (<https://www.pathwaycommons.org/>) η οποία ενώνει άλλες όπως η REACTOME, (<https://reactome.org/>) και η KEGG, (<https://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>) [3].

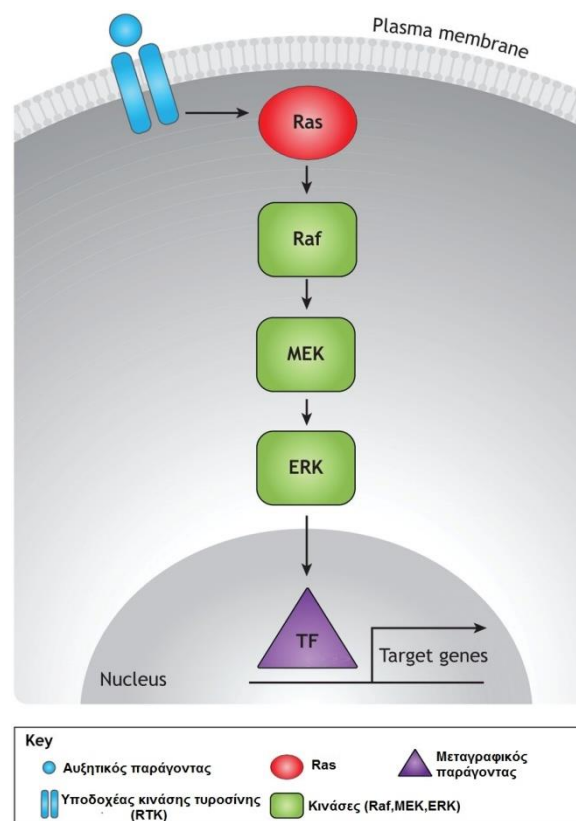
Το 2005 ξεκίνησε η πρωτοβουλία των National Cancer Institute (NCI) και National Human Genome Research Institute (NHGRI) με το όνομα **The Cancer Genome Atlas (TCGA)**. Ο στόχος του ήταν η καταχώρηση γενετικών αλλοιώσεων μέσω εργαλείων αλληλούχησης γονιδιώματος και βιοπληροφορικής. Για μια πιο ολιστική ανάλυση συμπεριλήφθηκε και το κομμάτι της πρωτεωμικής ανάλυσης μέσω του **The Cancer Proteome Atlas (TCPA)**. Η πρωταρχική σκέψη να αναλυθούν τρεις καρκίνοι (εγκεφαλικός, του πνεύμονα και των ωοθηκών) επεκτάθηκε σε δεκάδες, ώσπου σήμερα υπάρχουν καταχωρήσεις για 33 καρκινικά είδη [4,5]. Στο πεδίο της αναγνώρισης και καταχώρησης σχετιζόμενες με τον καρκίνο πρωτεϊνών το TCPA έχει αποφέρει μεγάλη ποσότητα αποτελεσμάτων με χιλιάδες πρωτεΐνες να έχουν σημανθεί για το ρόλο τους στην απορρύθμιση των ΜΚΣ. Η παραγωγή των δεδομένων έγινε επιτυχώς μέσω των μικροσυστοιχιών ανάστροφης φάσης (RPPAs), τεχνολογία που όπως είδαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο είναι γρήγορη, αποδοτική και χαμηλού κόστους λόγω της ταυτόχρονης προσπέλασης μεγάλου δείγματος σε ένα πείραμα[6]. Εξετάζοντας πάνω από 9000 όγκους το TCGA ανέλυσε το μηχανισμό επίδρασης σωματικών αλλαγών σε δέκα ΜΚΣ: Ras/MAPK, PI3-Kinase/Akt, β-catenin/Wnt, TGFβ, cell cycle, Hippo, Myc, Notch, Nrf2, p53. Σε 33 διαφορετικούς καρκινικούς τύπους το 89% των όγκων παρουσίασαν τουλάχιστον μια αλλαγή σε κάποιο από τα μονοπάτια αυτά καταδεικνύοντας τη σημασία τους και τη σοβαρότητα της απορρύθμισής τους. Για την κατανόηση της λειτουργίας των ΜΚΣ θα ακολουθήσουμε τη ροή κάποιων εκ των πιο χαρακτηριστικών (RTK/Ras/ERK,

¹⁶ GTP-άσες: Οικογένεια σηματοδοτικών πρωτεϊνών.

PI3/Akt, Wnt, cell cycle/p53), εξετάζοντας τα σημεία απορρύθμισης στην καρκινική νόσο.

4.1.1 Το μονοπάτι (RTK)/Ras/ERK.

Το μονοπάτι RTK(Receptor Tyrosine Kinase)/Ras/ERK(Extracellular signal-Regulated Kinase) ξεκινά με την ενεργοποίηση ενός υποδοχέα με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης. Με τη σύναψη προσδέτη-υποδοχέα και μέσω πρωτεϊνών ενεργοποιείται το μονοπάτι Ras. Στη συνέχεια ενεργοποιείται η Raf κινάση η οποία ενεργοποιεί την MEK (MAPK(Mitogen Activated Protein Kinase) κινάση) και ακολούθως αυτή την ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) η οποία ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση, τη διαφοροποίηση, την κινητικότητα και την απόπτωση[7].



Εικόνα 4.1: Το μονοπάτι Ras/ERK [12].

Οι υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (RTKs) αποτελούν μια μεγάλη ομάδα υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης. Οι προσδέτες τους συνήθως είναι αυξητικοί παράγοντες(EGF, PDGF, NGF, FGF) ή η ινσουλίνη και η σύναψή τους ενεργοποιεί την ενδογενή δραστηριότητα της κινάσης τυροσίνης και ακολούθως διεγείρει και εκκινεί ένα σηματοδοτικό καταρράκτη. Μέσω αυτού ενεργοποιείται η μικρή GTP-άση Ras η οποία έχει κεντρικό ρόλο στο ΜΚΣ RTK/Ras/ERK. Σε απόκριση αυξητικών σημάτων η Ras «ανοίγει» το πράσινο φως μέσω ενεργοποίησης πρωτεϊνών για τη διαδικασία

του πολλαπλασιασμού. Η λειτουργία ενός απορυθμισμένου Ras γονιδίου καταλήγει σε μια μόνιμη έκφραση ενεργής Ras πρωτεΐνης με συνέπεια τη μόνιμη διέγερση της κυτταρικής αύξησης οδηγώντας στον καρκίνο. Δεν είναι τυχαίο πως τα γονίδια Ras (KRas, HRas, NRas) είναι τα πιο διαδεδομένα στην καρκινική νόσο με μεταλλάξεις τους να εντοπίζονται σε ποσοστό άνω του 20% σε όλους τους καρκινικούς όγκους [8]. Με την ενεργή Ras το κυτταρικό σήμα περνάει από τους διεκπεραιωτές του ERK μονοπατιού τις Raf, μια οικογένεια κινασών (Raf-1, B-Raf, A-Raf) σερίνης/θρεονίνης οι οποίες επάγουν τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών. Μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις στο B-Raf ενέχονται σε διαφορετικά ποσοστά σε διάφορους καρκινικούς τύπους (27-70% στο μελάνωμα, 36-53% του θυρεοειδή, 30% των ωθηκών, 5-22% ορθοκολικό)[10]. Ο επόμενος κύριος σηματοδοτικός κόμβος στον καταρράκτη είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες MEK (MEK1, MEK2) οι οποίες είναι καταλύτες των διεργασιών της απόπτωσης, της διαφοροποίησης, του πολλαπλασιασμού και του μεταβολισμού. Τέλος, ο καταληκτικός σταθμός του ΜΚΣ είναι η οικογένεια ERK (ERK1,2), μιας υποοικογένειας της υπεροικογένειας MAPK. Η ενεργοποιημένη μορφή της ERK μπορεί να φωσφορυλιώσει αντίστοιχες κινάσες στο κυτταρόπλασμα, στην κυτταρική μεμβράνη και στον πυρήνα [9,10], ενώ καταλύει και τη φωσφορυλίωση εκατοντάδων κυτταροπλασματικών και πυρηνικών μορίων συμπεριλαμβανομένων ρυθμιστικών και μεταγραφικών παραγόντων όπως οι Elk-1, c-jun, Ets, AP-1[11]. Ακόμα μέσω αυτής επάγεται η κυτταρική διαίρεση και η έκφραση πρωτεϊνών που κατέχουν βασικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο (πχ κυκλίνη D1).

Το RTK/Ras είναι το μονοπάτι με τη μεγαλύτερη εμπλοκή στα καρκινικά δείγματα που αναλύθηκαν στο TCGA. Σε ποσοστό 46% του συνόλου των τύπων που μελετήθηκαν το εν λόγω ΜΚΣ εμφανίζεται αλλοιωμένο, με τα μεγαλύτερα ποσοστά αλλοίωσής του να ελέγχονται στους: δερματικός καρκίνος (μελάνωμα, 94% αλλοίωση), καρκίνος παχέος εντέρου (88%), Her-2 εμπλουτισμένος καρκίνος του μαστού (82%), καρκίνος παγκρέατος (PAAD, 78%), αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα (74%) και καρκίνος του θυρεοειδούς (THCA, 84%) [4].

4.1.2 Το μονοπάτι PI3K-PKB/Akt

Το ΜΚΣ PI3K/Akt είναι ένα ενδοκυτταρικό μονοπάτι με εμπλοκή στο μεταβολισμό, τον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη, την επιβίωση και την αγγειογένεση σε απόκριση εξωκυττάρων σημάτων. Η λειτουργία του ενεργοποιείται από τη φωσφορυλίωση σερίνης και θρεονίνης καθοδικά πλειάδων στόχων και τα βασικά πρωτεϊνικά μόρια που συμμετέχουν είναι τα εξής: Οι υποδοχείς κινάσες τυροσίνης (RTKs), η 3-κινάση φωσφατιδυλινοσιτόλη (PI3K), η 4,5-φωσφορική

φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP2), η 3,4,5-φωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη(PIP3) και η Akt ή PKB (Protein Kinase B), μια κινάση σερίνης/θρεονίνης με τρεις υποτύπους (Akt1, Akt2, Akt3). Το μονοπάτι ξεκινά με το αρχικό σήμα της σύναψης πρόσδεσης όπως είδαμε και στο μονοπάτι Ras/ERK ή μέσω μορίων προσαρμογής όπως οι υποδοχείς ινσουλίνης. Ακόμα η ενεργοποίηση του PI3K μπορεί να επιτευχθεί μέσω πρωτεϊνών Ras. Τα PIP2, PIP3 είναι φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης και συμπεριλαμβάνονται σε έναν σεβαστό αριθμό κυτταρικών διεργασιών κατευθύνοντας δύο ανεξάρτητες σηματοδοτικές σειρές. Το PIP3 είναι κομβικό κομμάτι του ΜΚΣ PI3K όντας τελεστής της ροής σε κάτωθεν μόρια του σηματοδοτικού καταρράκτη [13]. Επόμενος κόμβος είναι η Akt, η οποία μετακινείται με προσανατολισμό την κυτταροπλασματική μεμβράνη ως συνέπεια της αύξησης της ενεργότητας και την αύξηση της συγκέντρωσης του PIP3, με το οποίο και προσδέεται. Το επόμενο βήμα είναι η φωσφορυλίωσή της από τις κινάσες mTORC2 και PDK1 και η απαγκίστρωση από τη μεμβράνη. Όταν βρεθεί στον ενδοκυτταρικό χώρο επιδρά στα οργανίδια του κυττάρου (πυρήνα και μιτοχόνδρια), φωσφορυλιώνοντας κάτωθεν πρωτεϊνικά υποστρώματα, ρυθμίζοντας λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός(mTOR), η αγγειογένεση (VGEF), η επιβίωση(Bcl-2) και η κυτταρική μετανάστευση (Rac-1).

Αξίζει να σημειωθεί η αρνητική ρύθμιση της Akt. Η φωσφατάση PTEN έχει τη δυνατότητα να επιδρά στο ΜΚΣ αλλάζοντας τη φορά της σηματοδότησης, ρυθμίζοντας αρνητικά την Akt αποκόπτοντας τα αυξητικά σήματα και ενεργοποιώντας αντ' αυτών διάφορους αποπτωτικούς παράγοντες . Η ενζυμική δραστηριότητα του PTEN περιλαμβάνει την αποφωσφορυλίωση της PIP3, μειώνοντας τα επίπεδα συγκέντρωσης στην μεμβράνη, με συνέπεια χαμηλότερα επίπεδα φωσφορυλιωμένης Akt. Η αντιστροφή αυτή του αρχικού σήματος της PI3K καθιστά την PTEN ως αρνητικό ρυθμιστή των διεργασιών που αποσκοπεί το συγκεκριμένο ΜΚΣ και χαρακτηρίζει τη λειτουργία της ως ογκοκατασταλτική [14].

Αλλοιώσεις στο PI3K/Akt έχουν παρατηρηθεί σε κατηγορίες του καρκίνου του πνεύμονα (LUSC, 68%), οισοφαγογαστρικού καρκίνου (STES EBV, 80%) και καρκίνου του πνεύμονα (86-95%)[4].

4.1.3 Το μονοπάτι Wnt

Το μονοπάτι Wnt εμπλέκεται σε πολυάριθμες θεμελιώδεις διεργασίες διαδικασίες, απαραίτητες για την εμβρυϊκή ανάπτυξη και την ενήλικη ομοιόσταση. Μία από τις σπουδαιότερες λειτουργίες του είναι η διεκπεραίωση της επαγωγής της

διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των οστεοβλαστών¹⁷. Το όνομά του είναι μια σύμπτυξη των «-int,w-», από το πρώτο μέλος της οικογένειας που ανακαλύφθηκε (πρωτο - ογκογονίδιο «Int-1») και του ομολόγου «Wingless» γονιδίου της μύγας δροσόφιλας το οποίο εντοπίστηκε πέντε χρόνια μετά. Το παρακρινές αυτό μονοπάτι στον ανθρώπινο οργανισμό αποτελείται από μια οικογένεια 19 γλυκοπρωτεϊνών με δράση προσδέτη για περισσότερους από 15 υποδοχείς και συνυποδοχείς. Η απορρύθμιση του μονοπατιού διαταράσσει τον κυτταρικό κύκλο (πολλαπλασιασμό, επιβίωση, διαφοροποίηση) και σχετίζεται με πληθώρα κατηγοριών ασθενειών (μεταβολικών όπως ο διαβήτης, εκφυλιστικών όπως Parkinson's, Alzheimer και κυρίως καρκίνους).

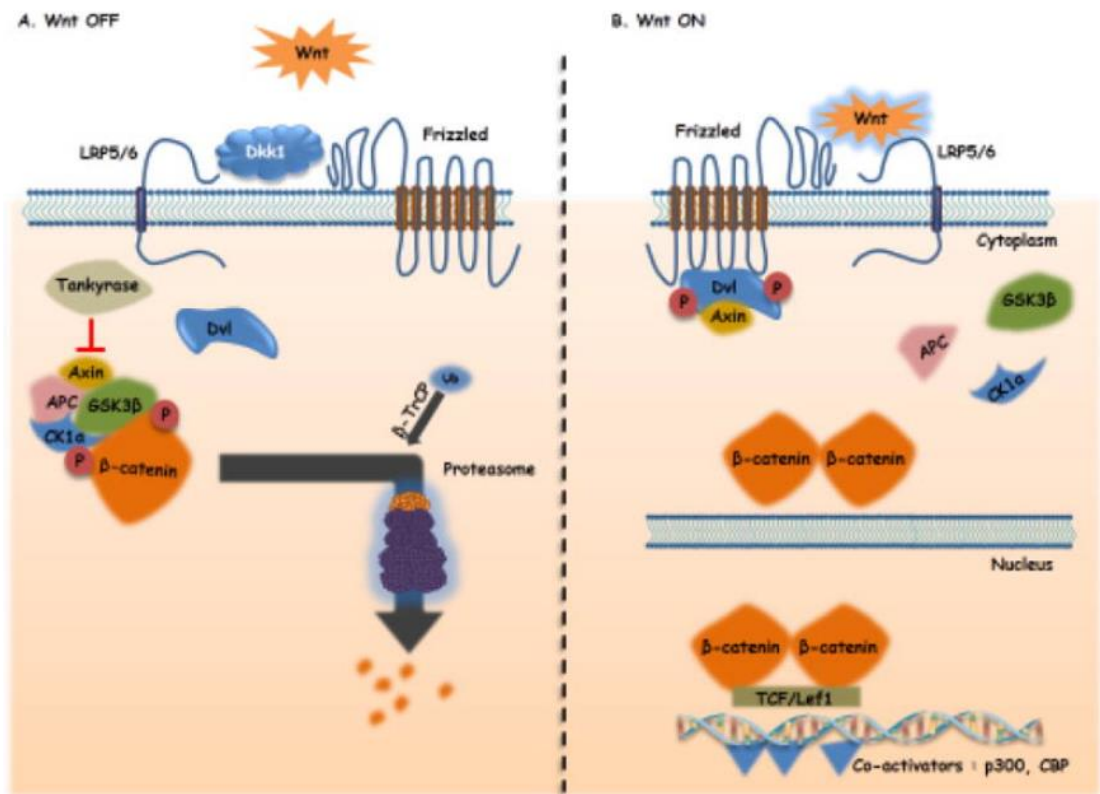
Η οδός Wnt χωρίζεται σε δύο βασικές κατηγορίες, την κανονική και τη μη κανονική. Η πρώτη απαιτεί την πρόσδεση των γλυκοπρωτεϊνών Wnt στον υποδοχέα Frizzled (υποδοχέας 7 θέσεων) και του συνυποδοχέα LRP5/6 ώστε να εκκινήσει η ενδοκυτταρική σηματοδότηση μέσω της πυρηνικής πρωτεΐνης **β-κατενίνη** [15]. Απουσία προσδετών Wnt (μη κανονικό μονοπάτι) η β-κατενίνη που εδρεύει στο κυτταρόπλασμα γίνεται στόχος ενός αποδομητικού συμπλόκου αποτελούμενο από τον ογκοκαταστολέα APC (Adenomatous Poliposis Coli), την πρωτεΐνη ικρίωμα¹⁸ AXIN και δύο κινάσες, τις CK1α και GSK-3β, από τις οποίες και φωσφορυλιώνεται. Η απομάκρυνσή της ύστερα επάγεται από σύστημα ουβικουΐίνης-πρωτεασώματος. Στην κανονική οδό υπάρχει παρουσία των παραγόντων Wnt οι οποίοι προσδένονται με τον Frizzled και σε συνδυασμό με τον LRP5/6 επάγουν τη φωσφορυλίωση των κυτταροπλασματικών φωσφοπρωτεϊνών Dvl. Αυτές δεσμεύουν την AXIN καταστρέφοντας το αποδομητικό σύμπλοκο της β-κατενίνης, με αυτή να εμφανίζεται άρτια και ελεύθερη στο χώρο του κυτταροπλάσματος με κατεύθυνση προς τον πυρήνα. Εκεί δεσμεύει τα μέλη της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων TCF/LEF τα οποία ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και «στρατολογεί» τους μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές p300/CBP.

Οι μεταβολές στο ΜΚΣ Wnt εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ποικιλία μεταξύ των διάφορων τύπων καρκίνου. Στην περίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου η ενεργοποίηση του ΜΚΣ είναι σχεδόν καθολική, ενώ η παρουσία μεταλλαγμένης β-κατενίνης συγκεκριμένα ελέγχεται στο 50% των ηπατοβλαστωμάτων και στο 20%

¹⁷ Οι οστεοβλάστες συνθέτουν το οργανικό κομμάτι του εξωκυττάριου μέρους των οστών.

¹⁸ Πρωτεΐνες-ικρίωματα (scaffold proteins): Πρωτεΐνες που επιστρατεύονται κυτταρικά για την ταυτόχρονη, γρήγορη και ακριβή μετάδοση σημάτων, μαζεύοντας τις πέριξ πρωτεΐνες εμποδίζοντας τα λάθη.

των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων. Σε άλλους τύπους όπως ο νεφρικός ή ο καρκίνος του μαστού εμφανίζουν πολύ μικρά ποσοστά αλλοίωσης[1, 16].



Εικόνα 4.2: (A). Η μη κανονική οδός Wnt, (B). Η κανονική οδός Wnt.

4.1.4 Το μονοπάτι του κυτταρικού κύκλου (cell cycle) και του p53.

Η κυτταρική αναπαραγωγή είναι ένα αριστούργημα μηχανικής. Στη διαδικασία εμπλέκονται μακρομόρια που συμμετέχουν στον αναδιπλασιασμό, το διαχωρισμό και την κυτταρική κίνηση. Ο συντονισμός της όλης διαδικασίας ελέγχεται από ένα βιοχημικό ρολόι κατασκευασμένο και καθοδηγούμενο από το ΜΚΣ του κυτταρικού κύκλου, το οποίο διασφαλίζει την εκκίνηση του πολλαπλασιασμού την κατάλληλη στιγμή, με τη σωστή σειρά των γεγονότων που τον απαρτίζουν. Η αυστηρότητα και ο χρονισμός της ρύθμισης εξασφαλίζουν πως το DNA αντιγράφεται μια φορά κατά τη φάση S δίχως σφάλματα και ότι το προϊόν στο τέλος είναι δύο θυγατρικά κύτταρα ταυτόσημα με το μητρικό στο τέλος της φάσης M. Η όλη διαδικασία περιγράφεται ως κύκλος με δύο βασικές διεργασίες (S-synthesis, M-mitosis) και περιόδους ελέγχου μεταξύ τους (φάσεις G). Όσο αυστηρά και αν είναι τα πρότυπα στον πολλαπλασιασμό, δεν είναι ασυνήθιστο να συμβαίνουν λάθη σε κάποιες από τις φάσεις του. Το κύτταρο διαθέτει μηχανισμούς ανίχνευσης και τερματισμού σε

περίπτωση σφάλματος σε κόμβους ελέγχου ανάμεσα στις βασικές φάσεις με στόχο την προστασία από τη γενετική αστάθεια και την ανεξέλεγκτη κυτταρική αύξηση. Δυστυχώς όμως, μεταλλάξεις στο γονιδίωμα μπορεί να προκαλέσουν διαταραχές των σημείων ελέγχου του ΜΚΣ, διαταράσσοντας την ομαλή διεκπεραίωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή και την απαγκίστρωσή του από μηνύματα τερματισμού, το οποίο είναι και ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της ογκογένεσης [17]. Τα βασικά μόρια που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο είναι οι κυκλίνες¹⁹, οι κινάσες εξαρτώμενες από την κυκλίνη (cyclin-dependent kinases-**Cdks**), οι αναστολείς τους (**CKIs**), οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες (**p53**, **pRb**) και οι μεταγραφικοί παράγοντες (**E2F**).

Τα Cdks αποτελούνται στην ενεργή τους μορφή από μια υπομονάδα ενεργού κινάσης σε σύμπλεγμα με μία κυκλίνη. Στα ετεροδιμερή αυτά η κινάση φέρει την καταλυτική δράση ενώ η κυκλίνη την εξειδίκευση και τον «διακόπτη» της ενεργότητάς του που ανοιγοκλείνει μέσω της διαδικασίας της φωσφορυλίωσης. Το σχήμα Cdk/κυκλίνη υπόκειται σε πολλά είδη ρυθμίσεων και είναι βασικός αρωγός της μετάβασης των φάσεων.

Οι αναστολείς των Cdks, τα CKIs είναι παράγοντες αρνητικής ρύθμισής τους και χωρίζονται σε δύο οικογένειες, την Cip/Kip (p21Cip /Kip, p27Cip /Kip και p57Cip / Kip) και την INK4a (p15INK4a, p16INK4a και p18INK4a). Οι αναστολείς διαμεσολαβούν στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου σε απόκριση σε αντιμιτογόνα μηνύματα.

Μια ακόμα ομάδα μορίων που συμμετέχουν στη διαδικασία είναι οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και pRb. Η pRb αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F, μια πυρηνική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στον κυτταρικό αναδιπλασιασμό στη φάση S, του οποίου εμποδίζει τη δράση. Στην καρκινική νόσο μεταλλαγμένες pRb εμφανίζονται σταθερά φωσφορυλιωμένες και δε δεσμεύουν την E2F δίνοντας το έναυσμα για ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση στη φάση S. Μια ακόμα ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, εξαιρετικά σημαντική στον κυτταρικό κύκλο είναι η p53. Αυτή και το γονίδιο που την κωδικοποιεί TP53 έχουν εξεταστεί ενδελεχώς λόγω της εμπλοκής τους στην ογκογένεση. Μέρος της δράσης τους εδράζει στην επαγωγή του αναστολέα συγκεκριμένων CDKs, p21, διατηρώντας την pRb στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή της. Η πρωτεΐνη ενεργοποιείται σε περίπτωση ανίχνευσης καταστροφής του DNA[18]. Οι οδοί των p53 και κυτταρικού κύκλου στην ασθένεια

¹⁹ Κυκλίνες: Οικογένεια πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Απατώνται κυρίως στον πυρήνα και διαχωρίζονται βάσει της δραστηρότητάς τους στις φάσεις που ρυθμίζουν. Έτσι υπάρχουν οι κυκλίνες της φάσης G1/S (D,E), των S, G2 (A) και της M (B).

του καρκίνου συνήθως εμφανίζονται αμοιβαία αλλοιωμένες, με αρκετές μεταβολές σχετιζόμενες με την εμπλοκή του pRb στον κυτταρικό κύκλο να προκύπτουν συνεπαγόμενες μεταλλάξεων του TP53 γονιδίου. Συνολικά δηλαδή εκτός των μεμονωμένων αλλοιώσεων που μπορούν να συμβαίνουν σε ένα καρκινικό δείγμα (μεταλλαγές στο TP53 και στο Rb γονίδιο) έχουν εντοπιστεί και αλλαγές που επηρεάζουν και τα δύο μονοπάτια. Ένα τρανό παράδειγμα είναι η μετάλλαξη του γονιδίου CDKN2A (cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A) το οποίο είναι υπεύθυνο για αρκετές πρωτεΐνες, με δύο από τις πιο γνωστές να είναι η p16(INK4A) και p14. Τα μέλη και των δύο οικογενειών όπως είδαμε και λίγο πιο πάνω έχουν ογκοκατασταλτική δράση. Πιο συγκεκριμένα η p16 είναι αναστολέας δύο CDKs (CDK4/6) και ενεργοποιητής της Rb. Η p14 με τη σειρά της ενεργοποιεί και εμπλέκει την p53 [19]. Μοτίβα όπως του παραδείγματος, αλλοιώσεις που επηρεάζουν δύο ή και περισσότερα MKΣ εξετάζονται με σκοπό την καλύτερη κατανόηση, την εγκυρότερη διάγνωση και την πιο στοχευμένη θεραπεία.

Στη χαρτογράφηση των αλλοιώσεων και στην απόπειρα να ευρεθούν ταιριάσματα μεταξύ των MKΣ που επηρεάζονται έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετοί αλγόριθμοι. Ένας από αυτούς, είναι ο SELECT, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στο TCGA.

4.1.5 Μοτίβα αλλοιώσεων μεταξύ MKΣ.

Τα αίτια του καρκίνου είναι αρκετά και λειτουργούν αθροιστικά. Όσο πολυπαραγοντικός και αν είναι ως νόσος και τα συμβάντα μοιάζουν τυχαία, η μεγάλη προσπέλαση καρκινικών δειγμάτων ανά τις δεκαετίες μελέτης καταδεικνύουν πως σε μοριακό επίπεδο τουλάχιστον εμφανίζονται συνεργές τροποποιήσεις, δίνοντας μια αρχική οπτική για κάποια πρότυπα που υπάρχουν στην ογκογένεση. Τα πρότυπα αυτά μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: αυτά του περιλαμβάνουν μεμονωμένες αλλαγές που μπορούν να βρεθούν σε μεγάλο εύρος όγκων όπως είδαμε για το μεταλλαγμένο Ras γονίδιο και την σχεδόν καθολική του ύπαρξη σε αρκετούς καρκίνους (ERK-MKΣ) και αυτά που περικλείουν τροποποιήσεις που συνυπάρχουν και επηρεάζουν πολλαπλές οδούς σηματοδότησης. Η μέθοδος SELECT (Selected Events Linked by Evolutionary Conditions across human Tumors) χρησιμοποιήθηκε για την κατάταξη των μοτίβων σε αυτές τις δύο κατηγορίες. Ζευγάρια δειγμάτων εξετάζονται για την ύπαρξη προτύπων (συνυπάρχουσες εμφανίσεις αλλοιώσεων ή αποκλειστικές τροποποιήσεις) σε δύο στάδια. Αρχικά ο αλγόριθμος δίνει μια τιμή η οποία εξαρτάται από τη γνώση πως μια τροποποίηση οδηγεί σε μια επόμενη. Αυτή είναι μια πρώτη εκτίμηση με βάρος (wMI) που εν συνεχεία συγκρίνεται για κάθε ζεύγος με την τιμή που θα λάμβανε σε απουσία

εξάρτησης των μετέπειτα τροποποιήσεων από τις αρχικές [20]. Ο αλγόριθμος στο TCGA ανάμεσα σε 410 γνωστές αλλοιώσεις αναγνώρισε 156 ζεύγη αμοιβαίων αποκλειστικών τροποποιήσεων και 117 ζεύγη συνυπάρχοντων μεταβολών. Για τα ΜΚΣ που αναλύσαμε πιο πάνω (RTK-Ras-ERK, PI3K-Akt, Wnt, cell cycle, p53) σε όλα πλην του Wnt βρέθηκαν πολυάριθμα αποκλειστικά ζεύγη, εύρημα που υποδηλώνει πως μια τροποποίηση είναι ικανή να μεταβάλλει τη λειτουργικότητα για καθεμία από τις οδούς. Ακόμα αναγνωρίστηκε η αλληλεξάρτηση αρκετών διαφορετικών μονοπατιών. Για παράδειγμα, όπως θα φανεί και στους πίνακες που θα παρουσιαστούν κάτωθι, η ενεργοποίηση των RTKs είναι συμβάν που συνδέεται σχεδόν αποκλειστικά με τις σηματοδοτικές οδό Ras και PI3K, τις οποίες μπορεί να ενεργοποιήσει δίχως άλλες τροποποιήσεις [20,4].

Πίνακας 4.1: Αλλοιώσεις εντός ενός ΜΚΣ.

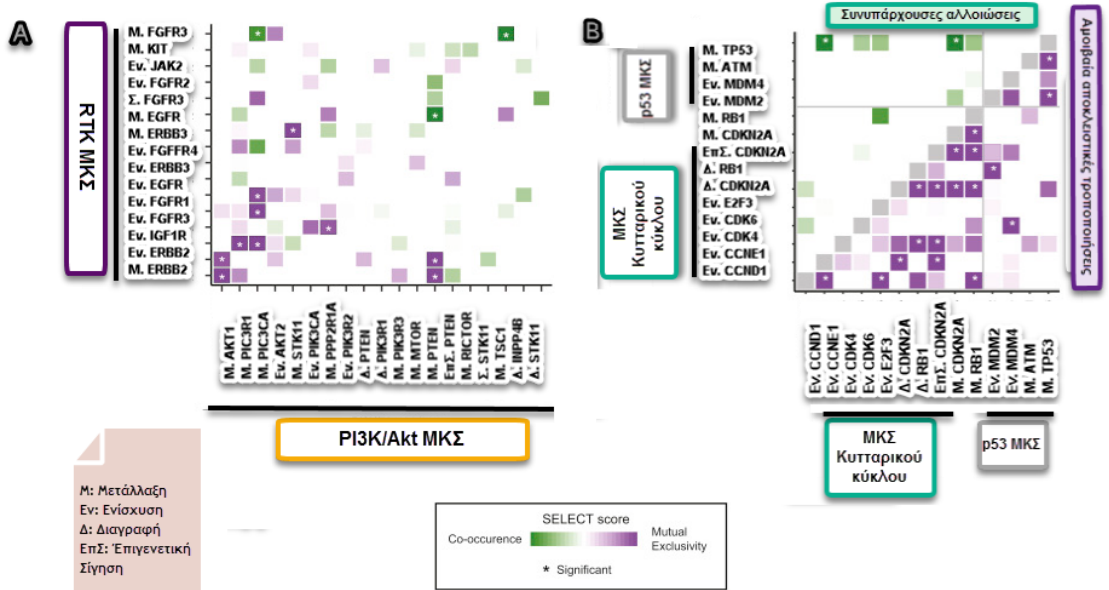
Αλλίωση_1	Αλλίωση_2	Μονοπάτι_1	Μονοπάτι_2	Αλλίωση_1	Αλλίωση_2	Μονοπάτι_1	Μονοπάτι_2
Διαγραφή CDKN2A	Επ. Σιώπηση CDKN2A	Cell Cycle	Cell Cycle	Μετάλλαξη PIK3R1	Μετάλλαξη PTEN	PI3K	PI3K
Διαγραφή CDKN2A	Μετάλλαξη CDKN2A	Cell Cycle	Cell Cycle	Ενίσχυση PIK3R2	Μετάλλαξη PTEN	PI3K	PI3K
Διαγραφή CDKN2A	Μετάλλαξη RB1	Cell Cycle	Cell Cycle	Διαγραφή PTEN	Μετάλλαξη PIK3CA	PI3K	PI3K
Ενίσχυση CCND1	Μετάλλαξη RB1	Cell Cycle	Cell Cycle	Ενίσχυση PIK3R2	Ενίσχυση RICTOR	PI3K	PI3K
Μετάλλαξη CDKN2A	Επ. Σιώπηση CDKN2A	Cell Cycle	Cell Cycle	Μετάλλαξη AKT1	Μετάλλαξη PTEN	PI3K	PI3K
Διαγραφή CDKN2A	Διαγραφή RB1	Cell Cycle	Cell Cycle	Ενίσχυση RPTOR	Μετάλλαξη PPP2R1A	PI3K	PI3K
Μετάλλαξη CDKN2A	Μετάλλαξη RB1	Cell Cycle	Cell Cycle	Μετάλλαξη AKT1	Μετάλλαξη PIK3R1	PI3K	PI3K
Μετάλλαξη RB1	Επ. Σιώπηση CDKN2A	Cell Cycle	Cell Cycle	Ενίσχυση RICTOR	Μετάλλαξη STK11	PI3K	PI3K
Ενίσχυση CCNE1	Επ. Σιώπηση CDKN2A	Cell Cycle	Cell Cycle	Μετάλλαξη PIK3CA	Μετάλλαξη STK11	PI3K	PI3K
Ενίσχυση CDK4	Διαγραφή RB1	Cell Cycle	Cell Cycle	Ενίσχυση EGFR	Μετάλλαξη EGFR	RTK	RTK
Ενίσχυση CCND1	Ενίσχυση CCNE1	Cell Cycle	Cell Cycle	Ενίσχυση EGFR	Συγχώνευση EGFR	RTK	RTK
Ενίσχυση CCND1	Ενίσχυση E2F3	Cell Cycle	Cell Cycle	Ενίσχυση PDGFRA	Συγχώνευση PDGFRA	RTK	RTK
Ενίσχυση CDK4	Επ. Σιώπηση CDKN2A	Cell Cycle	Cell Cycle	Ενίσχυση FGFR3	Συγχώνευση FGFR3	RTK	RTK
Ενίσχυση CCNE1	Διαγραφή CDKN2A	Cell Cycle	Cell Cycle	Ενίσχυση IGF1R	Ενίσχυση ERBB2	RTK	RTK
Μετάλλαξη BRAF	Μετάλλαξη NRAS	RAS	RAS	Ενίσχυση EGFR	Μετάλλαξη ERBB2	RTK	RTK
Μετάλλαξη BRAF	Μετάλλαξη KRAS	RAS	RAS	Ενίσχυση EGFR	Ενίσχυση PDGFRA	RTK	RTK
Μετάλλαξη KRAS	Μετάλλαξη NRAS	RAS	RAS	Ενίσχυση EGFR	Ενίσχυση ERBB2	RTK	RTK
Μετάλλαξη BRAF	Μετάλλαξη HRAS	RAS	RAS	Μετάλλαξη APC	Μετάλλαξη TCF7L2	WNT	WNT
Μετάλλαξη KRAS	Μετάλλαξη NF1	RAS	RAS	Επ. Σιώπηση ZNF3	Επ. Σιώπηση TCF7L2	WNT	WNT
Ενίσχυση KRAS	Μετάλλαξη BRAF	RAS	RAS	Μετάλλαξη AXIN1	Μετάλλαξη CTNNB1	WNT	WNT
Μετάλλαξη BRAF	Μετάλλαξη NF1	RAS	RAS	Μετάλλαξη AXIN1	Μετάλλαξη AXIN2	WNT	WNT
Ενίσχυση RAC1	Μετάλλαξη NF1	RAS	RAS	Μετάλλαξη AXIN2	Μετάλλαξη TLE2	WNT	WNT
Ενίσχυση BRAF	Μετάλλαξη NRAS	RAS	RAS	Μετάλλαξη AXIN2	Μετάλλαξη SFRP2	WNT	WNT
Ενίσχυση BRAF	Ενίσχυση NF1	RAS	RAS	Μετάλλαξη APC	Μετάλλαξη CTNNB1	WNT	WNT
Ενίσχυση MDM2	Μετάλλαξη TP53	TP53	TP53	Μετάλλαξη APC	Μετάλλαξη RNF43	WNT	WNT
Διαγραφή PTEN	Επ. Σιώπηση PTEN	PI3K	PI3K	Μετάλλαξη AMER1	Μετάλλαξη APC	WNT	WNT

Πίνακας 4.2: Αλληλεξάρτηση μεταξύ μονοπατιών. Αλλαγές που πυροδοτούν εκκίνηση ΜΚΣ (A).

Αλλίωση_1	Αλλίωση_2	Μονοπάτι_1	Μονοπάτι_2	Αλλίωση_1	Αλλίωση_2	Μονοπάτι_1	Μονοπάτι_2
Ενίσχυση PIK3CA	Μετάλλαξη KRAS	PI3K	RAS	Συγχώνευση AXIN1	Συγχώνευση NPRL3	WNT	PI3K
Διαγραφή PTEN	Μετάλλαξη NF1	PI3K	RAS	Ενίσχυση RICTOR	Επ. Σιώπηση TCF7	PI3K	WNT
Ενίσχυση RICTOR	Μετάλλαξη KRAS	PI3K	RAS	Μετάλλαξη DKK3	Μετάλλαξη INPP4B	WNT	PI3K
Ενίσχυση RPTOR	Ενίσχυση BRAF	PI3K	RAS	Μετάλλαξη CTNNB1	Μετάλλαξη PTEN	WNT	PI3K
Ενίσχυση RAF1	Διαγραφή PTEN	RAS	PI3K	Διαγραφή PTEN	Διαγραφή DKK4	PI3K	WNT
Μετάλλαξη KRAS	Μετάλλαξη STK11	RAS	PI3K	Διαγραφή PTEN	Διαγραφή SFRP1	PI3K	WNT
Ενίσχυση RICTOR	Ενίσχυση KRAS	PI3K	RAS	Διαγραφή DKK4	Μετάλλαξη PIK3R1	WNT	PI3K
Μετάλλαξη FGFR3	Μετάλλαξη PIK3CA	RTK	PI3K	Διαγραφή PTEN	Διαγραφή APC	PI3K	WNT
Ενίσχυση ERBB2	Μετάλλαξη AKT1	RTK	PI3K	Διαγραφή APC	Επ. Σιώπηση PTEN	WNT	PI3K
Μετάλλαξη EGFR	Μετάλλαξη STK11	RTK	PI3K	Μετάλλαξη CDKN1B	Μετάλλαξη PIK3R1	Cell Cycle	PI3K
Ενίσχυση ERBB2	Μετάλλαξη PTEN	RTK	PI3K	Ενίσχυση CCNE1	Μετάλλαξη PPP2R1A	Cell Cycle	PI3K
Ενίσχυση IGF1R	Μετάλλαξη PIK3R1	RTK	PI3K	Ενίσχυση CCND2	Ενίσχυση RICTOR	Cell Cycle	PI3K
Ενίσχυση FGFR1	Μετάλλαξη PIK3CA	RTK	PI3K	Μετάλλαξη PTEN	Μετάλλαξη TP53	PI3K	TP53
Μετάλλαξη FGFR2	Μετάλλαξη PTEN	RTK	PI3K	Μετάλλαξη ATM	Μετάλλαξη INPP4B	TP53	PI3K
Μετάλλαξη AKT1	Μετάλλαξη ERBB2	PI3K	RTK	Ενίσχυση MDM2	Διαγραφή .PTEN	TP53	PI3K
Ενίσχυση IGF1R	Μετάλλαξη PIK3CA	RTK	PI3K	Ενίσχυση PIK3CA	Μετάλλαξη TP53	PI3K	TP53
Μετάλλαξη ERBB2	Μετάλλαξη PTEN	RTK	PI3K	Ενίσχυση EGFR	Μετάλλαξη PIK3CA	RTK	PI3K
Μετάλλαξη TP53	Επ. Σιώπηση PTEN	TP53	PI3K	Ενίσχυση FGFR3	Μετάλλαξη PPP2R1A	RTK	PI3K

Πίνακας 4.3: Αλληλεξάρτηση μεταξύ μονοπατιών. Αλλαγές που πυροδοτούν εκκίνηση ΜΚΣ (B).

Αλλίωση_1	Αλλίωση_2	Μονοπάτι_1	Μονοπάτι_2	Αλλίωση_1	Αλλίωση_2	Μονοπάτι_1	Μονοπάτι_2
Ενίσχυση E2F1	Μετάλλαξη APC	Cell Cycle	WNT	Μετάλλαξη BRAF	Επ. Σιώπηση TCF7	RAS	WNT
Διαγραφή CDKN1B	Διαγραφή DKK4	Cell Cycle	WNT	Μετάλλαξη APC	Μετάλλαξη BRAF	WNT	RAS
Μετάλλαξη CDK6	Μετάλλαξη TCF7L1	Cell Cycle	WNT	Μετάλλαξη ERRF1	Μετάλλαξη TCF7L1	RAS	WNT
Μετάλλαξη AXIN2	Μετάλλαξη CDKN2C	WNT	Cell Cycle	Μετάλλαξη ERF	Μετάλλαξη RNF43	RAS	WNT
Μετάλλαξη CTNNB1	Μετάλλαξη TP53	WNT	TP53	Διαγραφή APC	Μετάλλαξη BRAF	WNT	RAS
Μετάλλαξη TP53	Επ. Σιώπηση TCF7	TP53	WNT	Μετάλλαξη CBL	Μετάλλαξη DKK2	RAS	WNT
Μετάλλαξη ATM	Μετάλλαξη CTNNB1	TP53	WNT	Μετάλλαξη CTNNB1	Μετάλλαξη FGFR2	WNT	RTK
Επ. Σιώπηση TCF7	Συγχώνευση RET	WNT	RTK	Ενίσχυση FGFR1	Διαγραφή DKK4	RTK	WNT
Ενίσχυση EGFR	Επ. Σιώπηση TCF7	RTK	WNT	Ενίσχυση FGFR1	Μετάλλαξη CTNNB1	RTK	WNT
Ενίσχυση FGFR1	Μετάλλαξη KRAS	RTK	RAS	Ενίσχυση FGFR4	Μετάλλαξη ATM	RTK	TP53
Ενίσχυση MET	Ενίσχυση KRAS	RTK	RAS	Ενίσχυση FGFR1	Ενίσχυση MDM4	RTK	TP53
Μετάλλαξη EGFR	Μετάλλαξη KRAS	RTK	RAS	Μετάλλαξη CDKN2A	Μετάλλαξη TP53	Cell Cycle	TP53
Μετάλλαξη FGFR3	Μετάλλαξη TSC1	RTK	PI3K	Ενίσχυση MDM2	Διαγραφή RB1	TP53	Cell Cycle
Ενίσχυση EGFR	Μετάλλαξη BRAF	RTK	RAS	Ενίσχυση CCNE1	Μετάλλαξη TP53	Cell Cycle	TP53
Μετάλλαξη BRAF	Μετάλλαξη KIT	RAS	RTK	Ενίσχυση CDK6	Ενίσχυση MDM4	Cell Cycle	TP53
Ενίσχυση EGFR	Μετάλλαξη NF1	RTK	RAS	Διαγραφή CDKN2A	Συγχώνευση EGFR	Cell Cycle	RTK
Ενίσχυση ERBB2	Ενίσχυση KRAS	RTK	RAS	Ενίσχυση EGFR	Διαγραφή CDKN2A	RTK	Cell Cycle
Ενίσχυση EGFR	Μετάλλαξη KRAS	RTK	RAS	Διαγραφή CDKN2A	Μετάλλαξη FGFR3	Cell Cycle	RTK
Ενίσχυση EGFR	Διαγραφή RASA1	RTK	RAS	Μετάλλαξη CDKN2A	Μετάλλαξη KIT	Cell Cycle	RTK
Μετάλλαξη KIT	Μετάλλαξη NRAS	RTK	RAS	Ενίσχυση CCND2	Ενίσχυση FGFR2	Cell Cycle	RTK
Μετάλλαξη BRAF	Μετάλλαξη ERBB2	RAS	RTK	Διαγραφή CDKN2A	Μετάλλαξη EGFR	Cell Cycle	RTK
Ενίσχυση KIT	Μετάλλαξη BRAF	RTK	RAS	Ενίσχυση ERBB3	Μετάλλαξη RB1	RTK	Cell Cycle
Διαγραφή RB1	Μετάλλαξη KRAS	RAS	RAS	Μετάλλαξη CDKN1A	Μετάλλαξη FGFR3	Cell Cycle	RTK
Ενίσχυση E2F3	Ενίσχυση RAF1	Cell Cycle	RAS	Μετάλλαξη BRAF	Μετάλλαξη CDK4	RAS	Cell Cycle
Μετάλλαξη CDKN2A	Μετάλλαξη RAC1	Cell Cycle	RAS	Μετάλλαξη NRAS	Επ. Σιώπηση CDKN1A	RAS	Cell Cycle
Ενίσχυση CDK4	Μετάλλαξη BRAF	Cell Cycle	RAS	Ενίσχυση CCND1	Μετάλλαξη HRAS	Cell Cycle	RAS
Ενίσχυση RAF1	Διαγραφή CDKN2A	RAS	Cell Cycle	Ενίσχυση MDM2	Μετάλλαξη BRAF	TP53	RAS



Εικόνα 4.3: Παράδειγμα σχέσεων, συνυπάρχουσες και αμοιβαία αποκλειστικές αλλοιώσεις στα ΜΚΣ: (A) PI3K-RTK και (B) Κυτταρικό κύκλο και p53[4,20]

Η διερεύνηση των αμοιβαίων αποκλειστικών τροποποιήσεων, των συνυπάρχουσών αλλοιώσεων και της συνεργίας μεταξύ μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης βελτιώνει συνεχώς την κατανόηση για την καρκινική νόσο και βοηθάει στην αποκάλυψη νέων διαγονιδιακών σχέσεων μεταξύ μονοπατιών που εμπλέκονται σε αυτή [21]. Μια φρέσκια οπτική μπορεί να αποδειχτεί εξαιρετικά χρήσιμη στην παρακολούθηση της προόδου της ασθένειας, την αποτελεσματική αντιμετώπισή της και την έγκαιρη διάγνωσή της, βρίσκοντας νέους βιοδείκτες.

Κλασσικοί και νέοι υποψήφιοι καρκινικοί δείκτες για διάφορους τύπους καρκίνου θα αναλυθούν στη συνέχεια[22].

4.2 Τύποι καρκίνου και έγκαιρη διάγνωσή τους, εξερεύνηση νέων καρκινικών δεικτών μέσω πρωτεωμικής.

Σύμφωνα με το World Health Organization ο καρκίνος είναι υπεύθυνος για 9,6 εκατομμύρια θανάτους στο 2018, όντας κύριος υπαίτιος για έναν θάνατο στους έξι. Όπως είδαμε στο δεύτερο κεφάλαιο υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που πυροδοτούν την ασθένεια (κάπνισμα, αλκοόλ, κακή διατροφή, παχυσαρκία, έλλειψη συχνής άσκησης, περιβαλλοντικοί παράγοντες). Η αντιμετώπιση του καρκίνου είναι εξαρτάται από την οικονομική δυνατότητα της εκάστοτε χώρας. Τα 2017 μόνο το 27% των αναπτυσσόμενων χωρών είχαν διαγνωστικές υπηρεσίες ενσωματωμένες στο δημόσιο σύστημα υγείας του με μόλις μία στις πέντε από τις χώρες αυτές να έχει τους πόρους να συντηρήσει μια συμπαγή πολιτική ενάντια στον καρκίνο. Οι συνηθέστεροι τύποι καρκίνου είναι για το 2018: Του πνεύμονα (>2 εκατομμύρια), ο ορθοκολικός (1,800,000) , του μαστού (>2 εκατομμύρια) και ο δερματικός (>1,000,000)[23].

4.2.1 Καρκίνος του πνεύμονα

Στην πάροδο του αιώνα που έκλεισε ο καρκίνος του πνεύμονα αναρριχήθηκε από μια σπάνια μορφή καρκίνου με σποραδική εμφάνιση στην αδιαμφισβήτητη συνηθέστερη. Το 1912 υπήρχαν 374 καταγεγραμμένες περιπτώσεις ενώ σήμερα τα κρούσματα ξεπερνούν τα δύο εκατομμύρια [24], με το ποσοστό τους να καλύπτει το 14% των νέων κρουσμάτων σε άντρες και το 13% σε γυναίκες στις ΗΠΑ. Οι πιο γνωστοί παράγοντες που εμπλέκονται στον καρκίνο του πνεύμονα είναι η περιβαλλοντική ρύπανση και το κάπνισμα, παράγοντες που δίνουν μια επιπλέον διάσταση, καθώς και στους δύο εμπλέκονται χαρακτηριστικά μοντέλων οικονομικής ανάπτυξης, κρατικής οικονομίας και κουλτούρας. Στο δεύτερο κεφάλαιο αναπτύχθηκαν οι παράγοντες καρκινογένεσης, αλλά για το κάπνισμα πρέπει να γίνει μια ειδική μνεία καθώς η συστηματικοί καπνιστές αποτελούν ένα πολύ συγκεκριμένο δείγμα. Το άγχος και η αβεβαιότητα είναι χαρακτηριστικά συνυφασμένα με πληθυσμούς που κατατάσσονται σε μικρά και μεσαία οικονομικά στρώματα. Οι άνθρωποι που τα απαρτίζουν έχουν καταχωρηθεί ως φανατικότεροι καπνιστές σε σχέση με οικονομικά δυνατότερους (όπως διαφαίνεται και μια διαφοροποίηση σε διαφορετικά στυλ εργασίας, πχ χειρωνακτική/ δουλειά γραφείου) και στατιστικά

σχετικά αναποφασιστικοί στο “κόψιμο” του τσιγάρου [25]. Είναι μια θλιβερή πραγματικότητα το γεγονός πως το 49,9% των κρουσμάτων συμβαίνει σε χώρες χαμηλού και μεσαίου οικονομικού βεληνεκούς. Παράγοντες όπως η εσφαλμένη αίσθηση ωριμότητας, η έλλειψη ενημέρωσης, η αναπαραγωγή οικογενειακών προτύπων με αισθητική που παραπέμπει σε προηγούμενες δεκαετίες και η άρνηση κυβερνητικής πρωτοβουλίας σε θέματα όπως ο παρεμβατισμός σε διαφημίσεις και η νομοθέτηση κατά του καπνίσματος έχει οδηγήσει πολλούς νέους σε χώρες του τρίτου κόσμου, αλλά και σε αναπτυσσόμενες οικονομίες (Μαλάουι, Ζιμπάμπουε, Νότιος Αφρική κ.ά.) στην εξάρτηση από το τσιγάρο[26,27].

Στην αναπτυσσόμενη Δύση μέσω κυρίως κρατικών και Μ.Κ.Ο. αντικαπνιστικών πρωτοβουλιών, καθώς και με τη στροφή σε νομοθεσίες προστασίας του περιβάλλοντος (πράσινη ενέργεια, απόσυρση παλαιών αυτοκινήτων, δημιουργία προτύπων για τη βιομηχανία) δίνεται μια συνεχόμενη μάχη με τα ποσοστά του καρκίνου του πνεύμονα. Η μάχη αυτή είναι εξαιρετικά σημαντική καθώς ο εχθρός είναι μια ασθένεια με χαμηλότατα ποσοστά επιβίωσης, όντας καρκινικός τύπος που συνήθως εντοπίζεται σε προχωρημένο στάδιο, με την 5ετή επιβίωση να έχει καλύτερεύσει ελάχιστα στην πάροδο των δεκαετιών. Αυτό σημαίνει πως έχουμε να κάνουμε με κακή έγκαιρη διάγνωση, δεδομένο που από μόνο του εγείρει την εντατικοποίηση της εύρεσης νέων καρκινικών δεικτών [28,29].

Ο καρκίνος του πνεύμονα χωρίζεται σε δύο ευρείες κατηγορίες. Τον μικροκυτταρικό (small cell lung cancer-SCLC) και τον μη μικροκυτταρικό (non-small cell lung cancer-NSCLC). Τα άτομα της πρώτης κατηγορίας είναι σχεδόν αποκλειστικά καπνιστές (μη καπνιστές περίπου 2.9%) και υποφέρουν από ταχύ ρυθμό κυτταρικού διπλασιασμού και ανάπτυξης και πρώιμη ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων. Η κατηγορία αυτή αποτελεί το 20% περίπου των περιστατικών. Ο μη μικροκυτταρικός αντιπροσωπεύει την πλειονότητα των καρκίνων του πνεύμονα (70%-80%) και χωρίζεται σε 3 υποκατηγορίες : Το αδenoκαρκίνωμα, το πλακώδες καρκίνωμα και το καρκίνωμα του πνεύμονα από μεγάλα κύτταρα [30]., με πιο συχνές τις δύο πρώτες.

4.2.1.1 Βιολογία του Καρκίνου του Πνεύμονα

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν επίδραση στα ρυθμιστικά δίκτυα που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, την ομοιόσταση και την απόπτωση. Ο μετασχηματισμός από φυσιολογικό σε κακοήγη φαινότυπο προκύπτει από μια σειρά γενετικών και επιγενετικών τροποποιήσεων. Γονιδιακές μεταβολές περιλαμβάνουν αλλαγές σε

πρωτο-ογκογονίδια (KRAS, EGFR, BRAF, PI3K, MEK and HER2), δομικές αλλαγές στο ALK, ROS1 και ίσως του RET, ενίσχυση πρωτο-ογκογονιδίων όπως το MET στα αδενοκαρκινώματα, FGFR1 και DDR2 στα πλακώδη καρκινώματα. Ακόμα υπάρχει η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (TP53, RB1, CDKNA2A, FHIT, RASSF1A και PTEN). Τέλος, παρατηρείται υπερδιέγερση της τελομεράσης η οποία συμβάλλει στην αθανατοποίηση του καρκινικού κυττάρου (100% SCLC και 80-85% NSCLC)[31].

Πίνακας 4.4: Ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά που εμφανίζονται τροποποιημένα στους καρκίνους του πνεύμονα και τα ΜΚΣ που συμμετέχουν[31, 33].

ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΟ	ΤΥΠΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	ΜΚΣ	ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΟ	ΤΥΠΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	ΜΚΣ
AKT1, AKT2, AKT3	AdenoCA (rare), SQCLC (20%, AKT3: 16%)	PI3K-Akt	PTEN	AdenoCA (rare), SQCLC (8%)	PI3K-Akt
ALK	AdenoCA (3-13%)	RTK	ARID1A	AdenoCA (8%)	Επιγενετικοί Ρυθμιστές
BRAF	AdenoCA (6%), SQCLC (4%)	RAF	ASCL4	SQCLC (3%)	ΜΚΣ Ανάπτυξης
CCNE1	AdenoCA (12%)	RB1/CDK	CDKNA2/p16INK 4	AdenoCA (>20%), SQCLC (72%)	RB1/CDK
DDR2	SQCLC (3-8%)	RTK	CEBBP	SCLC (9%)	Επιγενετικοί Ρυθμιστές
EGFR	AdenoCA (40-50%), SQCLC (7%)	RTK	CUL3	SQCLC (7%)	Απόκριση στο Οξειδωτικό στρες
ERBB2	AdenoCA (7-14%)	RTK	EP300	SCLC (9%)	Επιγενετικοί Ρυθμιστές
ERBB3	SQCLC (2%)	RTK	KEAP1	AdenoCA (11%), SQCLC (12%)	Απόκριση στο Οξειδωτικό στρες
FGFR1	AdenoCA (1-3%), SQCLC (22%), SCLC (6%)	RTK	LKB1	AdenoCA (15-30%), SQCLC (2%)	LKB1/AMPK
HRAS	SQCLC (3%)	RAS	MLL2	SQCLC (19%)	Επιγενετικοί Ρυθμιστές
IGF1R	SCLC (95%)	RTK	NF1	AdenoCA (8-10%), SQCLC (11%)	RAS
KRAS	AdenoCA (30%), SQCLC (5%)	RAS	NOTCH	SQCLC (13%)	ΜΚΣ Ανάπτυξης
MDM2	AdenoCA (20%)	TP53	RASA1	SQCLC (4%)	RAS
MET	AdenoCA (25%)	RTK	RB1	AdenoCA (rare), SQCLC (7%), SCLC (100%)	RB1/CDK
MLL	SCLC (10%)	Επιγενετικοί Ρυθμιστές	SETD2	AdenoCA (5%)	Επιγενετικοί Ρυθμιστές
MYC, MYCN, MYB	AdenoCA (31%), SQCLC (rare), SCLC (16%)	Μεταγραφικοί Ρυθμιστές	SMARCA4	AdenoCA (10%)	Επιγενετικοί Ρυθμιστές
NKX2.1/TTF1	AdenoCA (20%)	ΜΚΣ Ανάπτυξης	TP53	AdenoCA (70%), SQCLC (80%), SCLC (70%)	TP53
NRAS	AdenoCA (<1%), SQCLC (<1%)	RAS	TSC1, TSC2	SQCLC (6%)	PI3K-Akt
NRF2	SQCLC (19%)	Απόκριση στο Οξειδωτικό στρες			
PIK3CA	AdenoCA (rare), SQCLC (16%)	PI3K-Akt			
RET	AdenoCA (1-2 %)	RTK		SCLC	Μικροκυτταρικός
ROS	AdenoCA (1.5%)	RTK		NSCLC	Μη μικροκυτταρικός
SOX2	SQCLC (21%)	ΜΚΣ Ανάπτυξης		SQCLC	Πλακώδες καρκίνωμα
TP63	SQCLC (16%)	ΜΚΣ Ανάπτυξης		LCAC	Μεγάλων κυττάρων

4.2.1.2 Βιοδείκτες καρκίνου του πνεύμονα

Η αδυναμία έγκαιρης και σίγουρης διάγνωσης από τα πρώτα στάδια αποτελεί τη βάση της πρωτοκαθεδρίας που έχει ο καρκίνος του πνεύμονα ανάμεσα στους υπόλοιπους τύπους. Οι βιοδείκτες που κατά κόρον χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή του είναι το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA) και η CYFRA 21-1 (θραύσματα της κυτοκερατίνης 19), οι οποίοι και εμφανίζονται με ανεβασμένες τιμές στους καρκινοπαθείς. Η χρήση τους όμως στην έγκαιρη διάγνωση είναι αρκετά περιορισμένη, καθώς η άνοδος των συγκεντρώσεων τους μπορεί να προκληθεί από πνευμονικές φλεγμονές ή ακόμα και από το κάπνισμα. Γι' αυτό μέσα στην δεκαετία έχουν εξεταστεί και χρησιμοποιηθεί κατά μόνος και συνδυαστικά καινούριοι καρκινικοί δείκτες με καλύτερα αποτελέσματα όπως η άλφα- φετοπρωτεΐνη (AFP), η πρωτεΐνη CA-125, η CA-19.9, η φερριτίνη και η ειδική νευρωνική ενολάση (neuron-specific enolase-NSE). Οι μεταβολές στα επίπεδα των CEA, CA-125 και φερριτίνης

έχουν συνδεθεί με το αδενοκαρκίνωμα, ενώ η CYFRA 21-1 δείχνει τη μεγαλύτερη σχετικότητα με το πλακώδες καρκίνωμα. Οι περισσότεροι από τους δείκτες δυστυχώς δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες πρώιμης διάγνωσης (π.χ. χαμηλή συγκέντρωση των CEA, CYFRA 21-1). Έχει ελεγχθεί πειραματικά εάν η χρήση μεγαλύτερου αριθμού από ένα βιοδείκτη τη φορά μπορεί να διορθώσει τα χαρακτηριστικά του και όντως ο συνδυασμός σε ένα διαγνωστικό τεστ μεταξύ βιοδεικτών έχει δώσει ενδιαφέροντα αποτελέσματα πάνω στη συνολική ευαισθησία που μπορεί να έχει μια μέτρηση. Για παράδειγμα, ο συνδυασμός CEA και NSE επέδειξε ευαισθησία της τάξης του 75%, ενώ η NSE συνδυασμένη με τη CYFRA 21-1, όπως και η CYFRA 21-1 συνδυασμένη με την CA-125 αναδείχθηκαν τα ζευγάρια με τη μεγαλύτερη ευαισθησία για το πλακώδες καρκίνωμα (82,35%) και αδενοκαρκίνωμα (73,17%) αντίστοιχα [33]. Το CEA μαζί με την NSE και την CA-125 έχει 83,33% ευαισθησία για το μικροκυτταρικό καρκίνωμα, ποσοστό μέγιστο, ακόμα και με την προσθήκη άλλων βιοδεικτών, ενώ η πρόσθεση CEA, NSE και CYFRA 21-1 έχει ευαισθησία 88,24% για το πλακώδες καρκίνωμα, το οποίο ανεβαίνει στο 94,11% με πρόσθεση του CA-125. Τέλος, η προσθήκη στο CEA των NSE, CYFRA 21-1 και αντίστοιχα των CA-125, CYFRA-21-1 δίνει δείκτη ευαισθησίας της τάξης του 75,61% για το αδενοκαρκίνωμα, για το οποίο ο συνδυασμός CA-125, φερριτίνης και CA-19.9 φτάνει το ποσοστό ευαισθησίας στο 80,49% [32]. Η συνδυαστική χρήση των παραπάνω δεικτών, της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH), της C- αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) και άλλων βιοδεικτών έχουν ενισχύσει τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα, φτάνοντας την ευαισθησία των εξετάσεων στο 94,8% [34]. Μια άλλη προσέγγιση είναι μια συστοιχία βιοδεικτών που περιλαμβάνει : προλακτίνη (PRL), θρομβοσπονδίνη 1 (thrombospondin 1), τρανσθυρετίνη (TTR), παράγοντα αναστολής της μετανάστευσης μακροφάγων (MIF), σελεκτίνη E (SELE), εκκινήτη πλασμινογόνου (PLAT), EGFR, ERBB2, CYFRA 21-1 και ορό APBA για διάγνωση σε πρώιμα στάδια με ευαισθησία 77,1% και 76,2% ειδικότητα [35]. Ένας ακόμα συνδυασμός CEA, δεσμευτικής πρωτεΐνης της ρετινόλης (retinol-binding protein, RBP), αναστολέων πεπτιδάσης (SERPIN) και START (U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1) είχε χαρακτηριστικά: 77,8% ευαισθησία-75,4% ειδικότητα) [36].

Παρά τα ομολογουμένως ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε ευαισθησία και ειδικότητα που παρουσιάστηκαν με τις συνθέσεις των καρκινικών δεικτών, δεν έχουμε βρει καρκινικό δείκτη τόσο ευαίσθητο και ειδικό όσο χρειάζεται. Η ετερογένεια των όγκων είναι ένας βασικός παράγοντας, όπως και η ύπαρξη μικρής συγκέντρωσης των αναλυόμενων δεικτών. Η έλλειψη μέσων για να αλλαχθεί η ρουτίνα των πειραματικών διαδικασιών έχει εδώ και λίγα χρόνια πάψει να υπάρχει με

την έκρηξη του όγκου βιολογικών δεδομένων και την άνθιση των -omics, οπότε πρέπει να περιμένουμε μεγάλα άλματα στην πάροδο της επόμενης δεκαετίας.

4.2.1.3 Καρκινικοί δείκτες Πρωτεωμικής

Τα εργαλεία που χρησιμοποιεί η πρωτεωμική επιτρέπουν το διαχωρισμό και την ανάλυση μεγάλων δειγμάτων πρωτεϊνών. Αν και υφίστανται βασικά προβλήματα στην χρήση των τεχνικών όπως η χαμηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών/πεπτιδίων στόχων στο δείγμα ή η έλλειψη εργαστηριακού εξοπλισμού σε νοσοκομεία, μέσω αυτών προκύπτουν συνεχώς υποψήφιοι βιοδείκτες, όπως η β-αλυσίδα της απποσφαιρίνης (HP), η απολιποπρωτεΐνη A-1 (APOA1), η αννεξίνη (ANXA), η βιμεντίνη (VIM), η καλμοδουλίνη (CALM) και ο EGFR [37]. Μια πιο εκτενής λίστα υποψήφιων καρκινικών δεικτών παρουσιάζεται πιο κάτω. Μία πολύ πρόσφατη σημαντική ανακάλυψη φέρει τη πρωτεΐνη κυτταροσκελετού (CKAP4) ως μια ενθαρρυντική υποψηφιότητα βιοδείκτη για τις υποπεριπτώσεις των NSCLC και πλακώδους καρκινώματος. Η πειραματική διαδικασία μεταξύ 271 ατόμων με καρκίνο του πνεύμονα και 100 υγιών ως έλεγχο, περιλάμβανε τη χρήση μικροσυστοιχιών ανάστροφης φάσης, στις οποίες από μια πλειάδα μονόκλωνων αντισωμάτων ένα συγκεκριμένο αναγνώριζε τη CKAP4 και τη δέσμευε, αντιδρώντας έτσι μόνο με τα καρκινικά δείγματα, γεγονός που επαληθεύτηκε μέσω φασματοσκοπίας μάζας. Ενώ άλλοι βιοδείκτες τύχχαναν ευαισθησία του εύρους 17%-52%, η αντίστοιχη του CKAP4 έφτανε το 81.1% με 86% ειδικότητα στην πειραματική διαδικασία. Αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν την προοπτική να ανέβουν με τη σύνθεση πάνελ με παραπάνω από ένα δείκτη, όπως είδαμε και σε άλλες πρακτικές [39]. Για κάθε νέο υποψήφιο καρκινικό δείκτη, ειδικά αν εμφανίζει ενθαρρυντικά χαρακτηριστικά εξετάζεται η επίδρασή του σε συστοιχίες με αθροίσματα άλλων βιοδεικτών. Τέτοια παραδείγματα είναι:

- Πρωτεΐνη δέσμευσης της ρετινόλης(RBP)+ α1-Αντιθρυψίνη (AAT)+ Αντιγόνο εκ καρκινώματος πλακωδών κυττάρων (SCC Antigen)+CEA, με ευαισθησία 89,3% και ειδικότητα 84,7%, με μια μείωση των τιμών (77.8 και 75.4%) σε μια ανεξάρτητη επαλήθευση[40].
- MIF+προλακτίνη+θρομβοσπονδίνη, με ευαισθησία 70% και ειδικότητα 93%[41]

Πίνακας 4.5: Πρωτεϊνικοί δείκτες που βρέθηκαν με εργαλεία πρωτεωμικής.

Τύπος Καρκίνου	Πιθανός Καρκινικός βιοδείκτης
SCLC, NSCLC	AGER, C10orf116, ADD2, PRX, LAMB3, SYNM, SPTA1, ANK1, HBE1, GSN, HBG1, CA1, TNXB, MMRN2, HBA1, CAV1, HBB, COL6A6, C1orf198, CLIC2, SDPR, EHD2, APOA2, NDUFB7, PRKCDBP, LAMA3, LBN, CNDP1, ACT, 3 IGFBP3, L-PGDS, SAA, HAP, HGF, TTR, AAG1/2, APOA4, FIBA, LBN, CP, HP, KRT2A, GLT1B, CK1, AKT, MBL2, AAG1-2, FGA, FCN3
Αδενοκαρκίνωμα Πνεύμονα	CALCA, CPS1, CHGB, IVL, AGR2, NASP, PFKP, THBS2, TXNDC17, PCSK1, CRABP2, ACBD3, DSG2, LRBA, STRAP, VGF, NOP2, LCN2, CKMT1B, AKR1B10, PCNA, CPD, PSME3, VIL1
Πλακώδες καρκίνωμα	SERPINB5, RPL5, PKP1, RPL10, AKR1B10, AKR1C1, PCNA, RPS2, IGFBP7, AKR1C3, THBS2, ACBD3, VSNL1, AHCY, MMP10, PAK2, IVL, IARS, MMP14, PSMD2, GBP5, MCM6, NDRG1, NOP58, S100A2, NRG1-2, CNDP1, THBS1, UCRP, CER, UPA, MT1-MMP, SFN, TF, ALB, S100A9, STMN, ENO, PLAU, TTR

4.2.1.4 Καρκινικά αυτοαντισώματα στην υπηρεσία της διάγνωσης του καρκίνου του πνεύμονα

Η εξαιρετική ιδιότητα του ανθρώπινου σώματος να αναγνωρίζει την ίδια του τη δομή και να επιτίθεται σε ξένα στοιχεία βασίζεται σε πολύ μεγάλο μέρος στην παραγωγή αντισωμάτων, αντιγόνων που έχουν εξειδικευμένη δράση έναντι ξενικών στόχων. Σε ειδικές περιπτώσεις παρατηρείται λανθασμένη απόκριση του ανοσοποιητικού, το οποίο βάλει εναντίων μορίων ή κυττάρων του ίδιου του οργανισμού. Αυτού του είδους τα αντισώματα αναφέρονται ως αυτοαντισώματα και συνήθως αποτελούν ενδείξεις αυτοάνοσων διαταραχών όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος [44].

Στην καρκινική νόσο έχει αποδειχθεί πως ενεργοποιούνται τέτοια μόρια, τα αποκαλούμενα καρκινικά αντιγόνα (tumor associated antigens- TAAs), με μηχανισμό παραγωγής μη ξεκαθαρισμένο απόλυτα. Ωστόσο μόνο και μόνο η ύπαρξή τους και σίγουρα η ανίχνευση ανωμαλιών στη έκφρασή τους σε καταστάσεις καρκινογένεσης έχουν δώσει ερωτήματα για το αν είναι μια ακόμα δεξαμενή υποψηφίων καρκινικών δεικτών. Αρκετές μελέτες και πρωτοβουλίες έχουν εκπονηθεί πάνω στην ευαισθησία, την ειδικότητα, την έκφραση σε πρώιμα (ακόμα και σε ασυμπτωτικά) στάδια. Σε αυτό το κομμάτι θα ασχοληθούμε με έρευνες σε Αμερική, Ευρώπη και Κίνα με αντικείμενο και τους δύο βασικούς τύπους του καρκίνου του πνεύμονα (SCLC, NSCLC) καθώς διαφαίνεται πως υπάρχει μεγάλη δυναμική στην έγκαιρη διάγνωσή τους από τα TAAs. Σημειώνουμε πως οι βιοδείκτες που χρησιμοποιούμε κατά κόρον (CEA, CA 125, CA 19-1, CYFRA 21-1) ενώ έχουν υψηλή ευαισθησία στα τελευταία στάδια[45], σπάνια χρησιμοποιούνται στη διάγνωση των αρχικών σταδίων. Αντ' αυτών χρησιμοποιούνται τεχνικές απεικόνισης, με πιο διάσημες την ακτινογραφία, την κυτταρολογική εξέταση πτυέλων και την χαμηλής δόσης ελικοειδή αξονική τομογραφία (low dose spiral computed tomography - LDCT).

Η LDCT συγκεκριμένα έχει επιδείξει υψηλή ευαισθησία στον εντοπισμό πνευμονικών οζιδίων και συνεπώς έχει μειώσει τα ποσοστά θνησιμότητας κατά 20%[46,42].

Τα αυτοαντισώματα απαντώνται στην καρκινική ασθένεια ως μεταλλαγμένα αντισώματα, ως αντιγόνα σε υπερέκφραση ή με αλλοιωμένη δομή [48] και συναντώνται σε ασθενείς ακόμα και πριν την εμφάνιση κλινικών ευρημάτων. Οι δείκτες TAAbs, θεωρούνται ένα ιδανικό μη επεμβατικό συμπλήρωμα με υψηλή απόδοση και για την LDCT καλύπτοντας τους περιορισμούς της (συσχετισμός false/positive και τη συνεχή έκθεση σε ακτινοβολία) [47, 49].

Η διαλογή των TAAbs γίνεται με τη βοήθεια πρωτεωμικών τεχνικών εντοπισμού, διαχωρισμού, οπτικοποίησης και ποσοτικοποίησης όπως η τεχνολογία των πρωτεϊνικών μικροσυτοιχιών, της ανοσοτύπωσης (Western blotting), την κυτταρομετρία ροής και τον ανοσοφθορισμό ELISA ή παρόμοιες τεχνολογίες.

Μία μελέτη πάνω σε Κινέζους ασθενείς διεξήχθη το 2012 με κατασκευή συτοιχιών TAAbs απαρτιζόμενη από NOLC1, HMMR, MALAT1 και SMOX για τη διερεύνηση της ικανότητας τέτοιων συσκευών στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα με αποτελέσματα σχετικά θετικά παρά την οριακά αποδεκτή τιμή της ειδικότητας (60%). Με δεδομένη την ετερογένεια της νόσου θεωρήθηκε αναγκαία η πρόσθεση περισσότερων TAAbs ώστε να αυξηθεί η ευαισθησία[50]. Πιο πρόσφατα χρησιμοποιήθηκαν σε ένα πολύ μεγαλύτερο δείγμα (n= 2308) κατασκευάστηκε πάνελ 7 TAAbs (p53, PGP9.5, SOX2, GAGE7, GBU4-5, MAGEA1 and CAGE) με ευαισθησία πάνω από 60% σε καρκινοπαθείς στο στάδιο I, περίπου 60% στο II και ειδικότητα περίπου 90%[53]. Σε μία άλλη μελέτη που χρησιμοποιήθηκαν 7 TAAbs (p53, c-myc, HER2, NY-ESO-1, CAGE, MUC1 και GBU4-5) με Ευρωπαίους ασθενείς (αριθμός 104), τα αποτελέσματα ήταν ακόμα καλύτερα, με ευαισθησία 76% και ειδικότητα 92% [51]. Σε παρόμοιο πνεύμα στην Αμερική υπήρξε η πρωτοβουλία του EarlyCDT-Lung (αριθμός δείγματος 1613). Σε πρώτη διαλογή κατασκευάστηκαν πάνελ 6 TAAbs (p53, NY-ESO-1, Annexin I, CAGE, GBU4-5 και SOX2). Μια βελτιωμένη έκδοση περιλαμβάνει μία απουσία και δύο νέες εισόδους TAAbs. Σε αυτήν τη λογική απουσιάζει η αννεξίνη και εισέρχονται τα MAGE4 και το HuD. Οι δύο τύποι έδειξαν μεγάλη ειδικότητα (83% τα 6 TAAbs και 91% τα 7 TAAbs) [52]. Οι γενετικές διαφορές μεταξύ Ασιατών, Ευρωπαίων, Αμερικάνων έχουν δώσει ένα χαρακτήρα προσέγγισης με μεταβλητές φυλετικών καταβολών, αφού αποδεικνύεται πως η έκφραση των αυτοαντισωμάτων διαφέρει μεταξύ των διάφορων φύλων.

Πίνακας 4.6: Πίνακας TAAbs με καταγραφή των κλινικών επιδόσεών τους [65].

Χώρα/ Χρονιά	TAAbs	Αριθμός ασθενών	Αριθμός ελέγχου	Μέθοδος ανίχνευσης	Ευαισθη- σία σε όλα τα στάδια(%)	Ευαισθη- σία σε πρώιμα στάδια(%)	Ειδικότη- τα σε πρώιμα στάδια(%)
Κίνα / 2012 [50]	NOLC1, HMMR, MALAT1, SMOX	40- (19)	36	ELISA	47.5	63,2	97.3
Κίνα / 2015 [54]	ChgA peptides (Pep16 and Pep29)	168- (168)	97	SAM	47.6	47.6	80.0
Αμερική/ 2006 [55]	L1919,L1896, G2004,G1954 , G1689	(23)	23	Διαγνωστι- κή συστοιχία	----- ---	91,3	91,3
Αμερική/ 2007 [56]	4-3-3 θ, Annexin 1, PGP 9.5	(18)	19	Western Blotting	----- ---	55	95
Γερμανία/ 2008 [57]	80 phage-peptide clones	(18)	40	Bayes classifier	----- ---	79	92,9
Ην. Βασίλειο/ 2008 [51]	p53, c-myc, HER2, NY-ESO-1, CAGE, MUC1, GBU4-5	104- (9)	50	ELISA	76	88,9	92
Κίνα/ 2010 [58]	Six-Phage peptides clones 72,91,96,252,286, 290	90- (21)	90	Bayes classifier	92,2	92,2	85,7
Γερμανία/ 2010 [59]	1827 πρωτεΐνες	47- (22)	106 (26-80)	SVMs	97,9	75,9	97,6
Γαλλία/ 2011 [60]	C9,LRG1,Hpt,ACT, CYFRA	301- (129)	347- (112- 235)	ELISA	84	83	95
Ην. Βασίλειο/ 2011 [61]	p53, NY-ESO-1, HuD, CAGE, GBU4-5, Annexin 1, SOX2	243- (14)	247	ELISA	42	50	99
Κίνα/ 2013 [62]	NY-ESO-1, XAGE-1, ADAM29, MAGEC1	120- (69)	68	Μικρο- συστοιχίες	33	27,5	96
Αμερική/ 2013 [63]	6 επιλεγμένα scFvs (B6, 3E,G1, P6,J1)	(22)	21	MSD Assay	----- ---	61	71
Αμερική/ 2014 [64]	APEX1,NOLC1,SF3A3 ,PXN,R-580E16, MT- RNR2	19- (5)	237	ELISA	58	80	43
Σε παρένθεση με μπλε χρώμα ο αριθμός των ασθενών σε πρώιμο στάδιο				Με κόκκινο χρώμα οι υγιείς δότες, με μωβ οι περιπτώσεις καλοήθειας			

4.2.1.5 Βιοπληροφορική ανάλυση των πρωτεϊνών που σχετίζονται άμεσα με τον καρκίνο του πνεύμονα.

Στα εργαλεία που διαθέτει η πρωτεωμική εκτός της συνδρομής στις πειραματικές διαδικασίες όπως αυτές που ακολουθήθηκαν στα παραπάνω περιλαμβάνονται και αυτά που χρησιμοποιούμε για την ανάλυση όλων των σχέσεων που ξεκινούν από αλλαγές σε βασικά γονίδια και καταλήγουν να μεταβάλλουν

ολόκληρα ΜΚΣ. Ακολουθώντας τη διαδρομή των μονοπατιών εντοπίζονται τα βασικά γονίδια που ενέχονται στην τροποποίηση, δίνοντας νέους στόχους τόσο για την κατανόηση, όσο και για τη διάγνωση και την αντιμετώπιση της ασθένειας. Αντλώντας από τη βάση KEGG πληροφορίες για τα δίκτυα των τύπων καρκίνων του πνεύμονα (SCLC, NSCLC) παρατηρούμε εκείνους τους κόμβους που διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην συγκεκριμένη νόσο, γονίδια δηλαδή (ογκοκατασταλτικά και ογκογονίδια) και εξετάζουμε ποσοστά συγγένειας με άλλα είδη κάνοντας μια φυλογενετική σύγκριση των πρωτεϊνών τους στο UniProt. Η σημασία αυτής της διαδικασίας είναι εξέχουσα, καθώς ένας υψηλός συσχετισμός δίνει τη δυνατότητα διεξαγωγής περαιτέρω πειραματικών ερευνών τόσο για τη διάγνωση, όσο και για την αντιμετώπιση.

4.2.1.6 Ανάλυση πρωτεϊνών στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC).

Από τη ΒΔ ΜΚΣ KEGG [66] βλέπουμε πως τα βασικά ογκογονίδια για το NSCLC είναι τα **K-Ras** (Μονοπάτι RAS), **EGFR** (Μονοπάτι ERK, PI3K, Ca) και **EML4-ALK**(ΜΚΣ PI3K-Akt, JAK/STAT) και τα αντίστοιχα ογκοκατασταλτικά τα **RARβ**, **FHIT**, **RASSF1**, **INK4a/ARF** (ΜΚΣ κυτταρικού κύκλου), **p53** (ΜΚΣ p53).

Γονίδιο: CDKN2A (p16ink4a)

Πρωτεΐνη: Κυκλινο-εξαρτώμενος αναστολέας 2-A.

Ακολουθία FASTA:

```
MEPAAGSSMEPSADWLATAAARGRVEEVRALLEAGALPNAPNSYGRRRIQVMMMGSARVA
ELLLLHGAEPNCADPATLTRPVHDAAREGFLDTLVVLRHAGARLDVRDAWGRLPVDLAE
LGHRDVARYLRAAAGGTRGSNHARIDAAEGPSDIPD
```

Οργανισμός	Ομοιότητα
Mus musculus (CDKN2b)	89,2%
Rattus norvegicus(CDKN2b)	87,5
Bos taurus(CDKN2b)	87,5
Rattus norvegicus	78%
Mus musculus	70&
Monodelphis domestica	70%

Γονίδιο: TP53

Πρωτεΐνη: p53

Ακολουθία FASTA:

```
MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGP
```

DEAPRMPEEAAPPVAPAPAAAPTPAAPAPAPSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRIGFLHSGTAK
 SVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGRTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHE
 RCSDSDGLAPPQHILIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCCTTIHYNMNCNS
 SCMGMNRRPILTIITILEDSSGNLLGRNSFEVVRVCACPGRDRRTEENLRKKGEPHHELP
 PGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDQAQAGKEPG
 GSAHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDSD

Οργανισμός	Ομοιότητα
Macaca mulatta	95,7%
Macaca fuscata fuscata	95,7%
Macaca fascicularis	95,7%
Chlorocebus aethiops	95,7%
Tupaia belangeri	93,1%
Marmota monax	86%
Oryctolagus cuniculus	86%
Delphinapterus leucas	85,5%
Sus scrofa	82,5%
Felis catus	80,5%
Canis lupus familiaris	80,5%
Bos taurus	80,2%
Bos indicus	80,2%
Cavia porcellus	78,2%
Mesocricetus auratus	78,3%
Ovis aries	78,9%
Cricetulus griseus	77,2%
Rattus norvegicus	77%
Mus musculus	77,4%
Otospermophilus beecheyi	86%

Γονίδιο: EML

Πρωτεΐνη: Εχινόδερμική πρωτεΐνη 4 σύνδεσης σε μικροσωληνίσκους EML-4

Οργανισμός	Ομοιότητα
Mus musculus	87,8%
Mus musculus (Isoform 2)	82%
Mus musculus (Isoform 3)	81%

Γονίδιο: ALK

Πρωτεΐνη: Κινάση του αναπλαστικού λεμφώματος.

Οργανισμός	Ομοιότητα
Mus musculus	87,1%

4.2.1.7 Ανάλυση πρωτεϊνών στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC).

Αντίστοιχα στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα [67] παρατηρούμε το ογκογονίδιο **Myc** (ΜΚΣ κυτταρικού κύκλου) και τα ογκοκατασταλτικά **FHIT, RARβ, p53, RB, PTEN** (ΜΚΣ PI3K-Akt).

Γονίδιο: MYC

Πρωτεΐνη: Πρωτεΐνη πρωτο-ογκογονιδίου Myc.

Οργανισμός	Ομοιότητα	Οργανισμός	Ομοιότητα
Pan troglodytes	99,5%	Pteropus hypomelanus	92%
Pan paniscus	99,3%	Feline leukemia virus FTT	92,7%
Macaca mulatta	98,6%	Sylvilagus floridanus	92,5%
Hylobates lar	97,9%	Marmota monax	91,6%
Pongo pygmaeus	97,7%	Tadarida brasiliensis	90,7%
Callithrix jacchus	96,1%	Mus musculus	91,6%
Tupaia glis	94,5%	Rattus norvegicus	91,4%
Galeopterus variegatus	94,5%	Gallus gallus	62,9
Canis lupus familiaris	94,1%	Avian myelocytomatosis virus	62,9%
Sus scrofa	93,8%	Avian retrovirus OK10	62,4%
Feline leukemia virus	93,2%	Avian myelocytomatosis virus	62,2%
Felis catus	93,2%	Avian myelocytomatosis virus	61,4%
Ovis aries	92,7%	Avian retrovirus MH2	59,6%
Bos taurus	92%	Avian retrovirus MH2E21	59,4%
Xenopus laevis	58,9%	Xenopus laevis	59,3%
Carassius auratus	57,2%		

Γονίδιο: Rb

Πρωτεΐνη: Πρωτεΐνη Ρετινοβλαστώματος.

Οργανισμός	Ομοιότητα
Mus musculus	90,6%

Rattus norvegicus	89,8%
Gallus gallus	72,1%

Γονίδιο: PTEN.

Πρωτεΐνη: Φωσφατιδυλινοσιτόλη 3-φωσφατάση.

Οργανισμός	Ομοιότητα
Canis lupus familiaris	100%
Mus musculus	99,8%
Xenopus laevis	88,6%

Βλέπουμε μέσα από τη διαδικασία blast για αρκετές από τις ογκοπρωτεΐνες και τις πρωτεΐνες ογκοκατασταλτικών εμφανίζεται υψηλός βαθμός συγγένειας με είδη όπως μέλη της οικογένειας του κοινού χιμπαντζή (pan), των αρουραίων και ποντικών, του ταύρου, του σκύλου και του σκίουρου.

4.2.2 Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο κοινότυπη μορφή σε γυναίκες πληθυσμούς και συνάμα η δεύτερη αιτία θανάτου για τις γυναίκες παγκοσμίως, με μία στις δέκα από το σύνολο των καρκινοπαθών να διαγιγνώσκεται με την εν λόγω ασθένεια. Από τα εκατομμύρια των κρουσμάτων περίπου οι μισές των διαγνώσεων και περίπου το 60% των θανάτων συμβαίνουν σε χώρες χαμηλών εισοδημάτων, με την 5ετή επιβίωση να έχει μεγάλη ψαλίδα μεταξύ των τελευταίων και χωρών υψηλού εισοδήματος (40%-80%) [68]. Από τη δεκαετία του '70 και ως και σήμερα ωστόσο με τη είσοδο της μαστογραφίας και των σύγχρονων τεχνικών διάγνωσης και θεραπείας υπάρχει μια σταθερή βελτίωση στην αντιμετώπιση της νόσου [69]. Η ηλικία είναι ένας από τους παράγοντες κινδύνου, καθώς 1 στις περίπου 200 εμφανίζει καρκίνο του μαστού από την γέννηση ως τα 39 της χρόνια, 1 στις 26 στο εύρος από 40 ως 59 χρονών και μία στις 28 από 60 ως 69 [70]. Μία ακόμα παράμετρος είναι το οικογενειακό ιστορικό. Οι γυναίκες με μητέρα που είχε διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού πριν από τα 50 της επέδειξαν προσαρμοσμένο σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της τάξης 1,69 σε σύγκριση με άλλες που δεν είχαν οικογενειακό ιστορικό, ενώ αντίστοιχες με μητέρες που εμφάνισαν καρκίνο σε ηλικία άνω των 50 υπόκειντο σε αντίστοιχο κίνδυνο της τάξης του 1,37. Ο εν λόγω κίνδυνος αυξάνει ανάλογα τον αριθμό πασχόντων σε πρώτου βαθμού συγγένεια (1.8, 2.93 και 3.9 για 1,2,3 μέλη αντίστοιχα) [71]. Όπως είδαμε στο δεύτερο κεφάλαιο, ενώ δεδομένα το οικογενειακό ιστορικό δείχνει την προδιάθεση (20%-25% των ασθενών έχει νοσούντα μέλη της

οικογένειας), τα οικογενή χαρακτηριστικά, η κληρονομικότητα αποδίδεται στο 5% με 10% του συνόλου των καρκίνων του μαστού. Επιπλέον, η κατανάλωση αλκοόλ, η παχυσαρκία και η έλλειψη σωματικής άσκησης έχει αποδειχθεί πως είναι και αυτοί παράγοντες αύξησης του κινδύνου όπως και η έκθεση σε ραδιενέργεια, με τα δύο τραγικά ιστορικά συμβάντα, της ρίψης των ατομικών βομβών σε Χιροσίμα και Ναγκασάκι και της έκρηξης του αντιδραστήρα στο Τσέρνομπιλ, να πυροδοτούν καρκίνους του μαστού σε γυναίκες κάτω των 35 ετών στις ευρύτερες περιοχές των δυστυχημάτων. Τέλος, οι ορμονικές αλλαγές που συμβαίνουν στο γυναικείο σώμα πριν και κατά τη διάρκεια της εμμηνόπαυσης, όπως και η ηλικία που αυτή συμβαίνει είναι παράγοντες κινδύνου (υψηλή τεστοστερόνη, καθυστέρηση εμμηνόπαυσης οδηγούν σε αύξηση κινδύνου, 2.86-3.28 σχετικό κίνδυνο και 17% αύξηση για κάθε 5 χρόνια αντίστοιχα).

Στον αντίποδα, η καθημερινή άσκηση μπορεί να μειώσει μέχρι και 5% τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, ενώ έχει παρατηρηθεί πως οι γυναίκες που τεκνοποιούν έχουν μειωμένο κίνδυνο συγκριτικά με αυτές που δεν έχουν γεννήσει εάν η γέννες είναι σε ηλικίες κάτω των 35 ετών (20% ως τα 20 χρόνια, 10% ως τα 25). Στις γέννες άνω των 35, οι μητέρες εμφανίζουν μεγαλύτερο ποσοστό κινδύνου από τις άτεκνες γυναίκες (5% αύξηση για ≥ 35). Έρευνες έχουν δείξει πως ο θηλασμός για μητέρα ρυθμίζοντας τα επίπεδα των σεξουαλικών ορμονών μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα, για κάθε χρόνο θηλασμού η μείωση είναι περίπου στο 4,3% [72]. Τέλος, η καθυστέρηση της εισόδου στην εφηβεία, η καθυστέρηση της εμμηναρχής, έχει αποδειχθεί πως σχετίζεται με την μείωση κατά 10% του ρίσκου εμφάνισης καρκίνου του μαστού εάν αυτή είναι 2ετής [73]. Αξίζει να σημειωθεί πως οι πρωτοβουλίες μείωσης των θεραπειών ορμονικής υποκατάστασης (HRT) από τις αρχές του 2000 στα κράτη του δυτικού κόσμου βοήθησαν στη μείωση των ποσοστών εμφάνισης της νόσου.

Ο βασικός διαχωρισμός των ειδών του καρκίνου του μαστού γίνεται βάσει κλινικής εικόνας των ιστών και της συμπεριφοράς των καρκινικών κυττάρων σε αυτούς. Έτσι υπάρχουν δύο βασικοί τύποι, ο *in situ* καρκίνος του μαστού και ο διηθητικός. Ο πρώτος είναι από μόνος του μια ομάδα υποτύπων, του πορογενή (Ductal Carcinoma *in situ*- DCIS) ο οποίος εντοπίζεται στα κύτταρα των πόρων του μαστού που μεταφέρουν γάλα και του λοβιακού (Lobular Cancer *in situ*-LCIS), καρκίνου των κυττάρων των αδενικών λοβίων, τα οποία παράγουν το γάλα. Οι διηθητικοί καρκίνοι χωρίζονται κι αυτοί σε κατηγορίες. Οι επιθηλιακοί υπότυποι DCIS, LCIS είναι οι πιο συνηθισμένοι με το πορογενές να είναι το πλέον συχνό διηθητικό καρκίνωμα (80% των διαγνώσεων) και το λοβιδιακό το αμέσως επόμενο (10%).

Άλλοι επιθηλιακοί τύποι διηθητικού καρκίνου είναι το βλεννώδες, το θηλώδες, το μυελοειδές, το σωληνώδες και η νόσος του Paget. Στους μη επιθηλιακούς διηθητικούς τύπους περιλαμβάνονται τα σαρκώματα και τα λεμφώματα[75]

4.2.2.1 Βιολογία του Καρκίνου του Μαστού

Ο καρκίνος του μαστού διαχωρίζεται και σε επίπεδο γονιδιακό και πρωτεϊνικό. Οι εγγενείς υπότυποι του καρκίνου του μαστού πρώτη φορά καταχωρήθηκαν το 2000 με τη βοήθεια μικροσυστοιχιών DNA σε 5 κατηγορίες, με διακριτά χαρακτηριστικά που εδράζουν στους δύο κύριους φυσιολογικούς τύπους επιθηλιακών κυττάρων του μαστού (Luminal/Basal) και στις δύο βασικές γενετικές αλλαγές που συνεπικουρούν στην ασθένεια (ER, ERBB2). Οι καρκινικοί όγκοι που διαθέτουν ενεργούς οιστρογονικούς και/ή προγεστερονικούς υποδοχείς (ER+/PR+) ονομάζονται ορμονοευαίσθητοι και χωρίζονται στους τύπους Luminal A, Luminal B, με παρόμοια έκφραση. Ο ίδιος ο Luminal B χωρίζεται σε δύο ακόμα υποτύπους που σχετίζονται με την κατάσταση του υποδοχέα HER2 (HER2 negative, HER2 positive). Οι καρκινικοί όγκοι με έλλειψη υποδοχέων (ER-/PR-) ονομάζονται μη ορμονοευαίσθητοι και χωρίζονται σε εκ νέου κατηγορίες. Ο πρώτος που σχετίζεται με τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα του μαστού ονομάστηκε Basal, ενώ ο άλλος ονομάστηκε normal-like [74].

Στους διάφορους τύπους εντοπίζονται κοινές συνισταμένες στις γενετικές τροποποιήσεις, με συχνές εμφανίσεις μεταλλαγμένων γονιδίων όπως τα BRCA1/2, p53, PTEN, NSB1, LKB1, ενώ λιγότερο συχνές περιλαμβάνουν τα γονίδια που κωδικοποιούν το ενζυμικό σύστημα κυτόχρωμα P450 (CYP1A1, CYP2D6, CYP19) , αυτά της οικογένειας των ενζύμων της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GSTM1, GSTP1), τα γονίδια επισκευής DNA (XRCC1, XRCC3, ERCC4/XPF) και άλλα που προωθούν την κυτταρική σηματοδότηση (PR, ER, TNF-alpha, HSP70).

Πίνακας 4.7: Γονίδια που μετέχουν στον καρκίνο του μαστού ανά μοριακό υπότυπο

Γονίδιο	Τύπος Καρκίνου	ΜΚΣ	Γονίδιο	Τύπος Καρκίνου	ΜΚΣ
MAPK1	BRCA Lumina B	RTK	RAF1	BRCA Basal	RAS
RAF1		RAS	BRAF		RAF
BRAF		RAF	Kras		RAS
Kras		RAS	RASA 1		RAS
NF1		RAS	NF1		RAS
ERRF1		PI3K-Akt	JAK2		JAK-STAT
CBL		RTK	PDGFRA		RTK
JAK2		JAK-STAT	KIT		JAK/PI3K/RAS
KIT		JAK/PI3K/RAS	MET		RTK
MET		RTK	FGFR 1,2,4		RAS
FGFR 1,2,3,4		RAS	EGFR		RTK
ERBB 2,3		RTK	IGF1R		RTK
IGF1R		RTK	PTEN		PI3K-Akt
EGFR		RTK	CCND1		RB1/CDK
PTEN		PI3K-Akt	p53		TP53
PI3KCA		PI3K-Akt	MYC		Μεταγραφικοί Ρυθμιστές
CCND1		RB1/CDK	AKT 1,2,3		PI3K-Akt
p53		TP53	PAK1		ERK/Akt
PAK1		ERK/Akt	EGFR		RTK
Hras		BRCA Lumina A	RAS		ERBB 2,3
Kras	RAS		FGFR1	RAS	
NF1	ERK		JAK 2	JAK-STAT	
CBL	RTK		NF1	RAS	
FGFR 1,2,4	RAS		RAC1	ERK/Akt	
ERBB 2,3	RTK		Kras	RAS	
IGF1R	RTK		RAF1	RAS	
CCND1	RB1/CDK		PTEN	PI3K-Akt	
p53	TP53		PI3KCA	PI3K-Akt	
PAK1	ERK/Akt		CCND1	RB1/CDK	
RAF1	BRCA N.	RAS	p53	TP53	
PTPN11		RAS	PAK1	ERK/Akt	
NTRK3		RTK	HER-2	PI3K-Akt	
FGFR 1,2		RAS	IGFF1R	RTK	
ERBB 2,3		RTK	BRCA1	Cell Cycle	
EGFR		RTK	BRCA2		
			Οικ. BRCA		

4.2.2.2 Τεχνικές διάγνωσης του καρκίνου του Μαστού

Πριν μιλήσουμε για τους καρκινικούς δείκτες , θα πρέπει να δούμε τους βασικούς τρόπους διάγνωσης του καρκίνου του μαστού μιας και χρησιμοποιούνται κατά κόρον τεχνικές που έχουν αποδειχθεί ικανές για έγκαιρη πρόβλεψη. Η πρώτη που θα συναντήσουμε είναι η μαστογραφία, μια εξέταση που συστήνεται να γίνεται κάθε χρόνο από γυναίκες μεταξύ 40 και 70 ετών. Η πλέον διαδεδομένη αυτή διαγνωστική εξέταση για να ανιχνεύσει μαστικές αλλοιώσεις χρησιμοποιεί μικρές

δόσεις ακτινοβολίας. Αν και θεωρείτο μέχρι πρόσφατα πολύτιμο εργαλείο για την διάγνωση, η ευαισθησία της εξέτασης εξαρτάται από την ηλικία της εξεταζόμενης, την εθνικότητά της, το ιστορικό της, την ικανότητα και εμπειρία του ραδιολόγου και την ποιότητα του εξοπλισμού, ενώ παράλληλα παρουσιάζει υψηλό βαθμό ψευδώς αληθινών και ψευδώς ψευδών αποτελεσμάτων (Ευαισθησία:67,8%, Ειδ:75%). Στα αρνητικά της συμπεριλαμβάνεται η ούτως ή άλλως αρνητική επίδραση της ionίζουσας ακτινοβολίας, όπως και η επίπονη και άβολη διαδικασία που εμπεριέχεται στην εξέταση. Μια ακόμα διαδεδομένη εξέταση είναι αυτή του υπερήχου που ως ασφαλέστερη τεχνική (ακουστικά κύματα και όχι ionίζουσα ακτινοβολία) συστήνεται ως υποκατάστατη εξέταση για γυναίκες υψηλού ρίσκου και έγκυες. Δυστυχώς λόγω της αδιάκριτης συχνά ηχητικής εμπέδησης μεταξύ υγιών ιστών και νοσούντων η διαδικασία δε μπορεί να θεωρηθεί υψηλής ειδικότητας (Ευ:83%, Ειδ:34%). Όπως και η μαστογραφία εξαρτάται κατά πολύ από την ικανότητα του εξετάζοντα. Μια όλο και πιο προσβάσιμη τεχνολογία είναι αυτή της Μαγνητικής τομογραφίας (MRI). Η MRI προτείνεται ως απεικονιστική μέθοδος σε άτομα υψηλού κινδύνου, αλλά όχι για το ευρύτερο σύνολο, καθώς είναι αρκετά ακριβή, χρονοβόρα (40-60min), χρειάζεται διάθεση χώρου εξοπλισμού και επιστημονική επάνδρωση. Η MRI σαν πρόσθετο εργαλείο της μαστογραφίας χρησιμοποιείται κυρίως για πληθυσμούς με μετάλλαξη των BRCA εμφανίζοντας μεγαλύτερη ευαισθησία από τις δύο προηγούμενες αλλά ούσα ελλειμματική ως προς την ειδικότητα (Ευ:94,4%, Ειδ:26,4%). Τέλος, δύο ακόμα διαγνωστικές τεχνικές, η Υπολογιστική Τομογραφία (CT scan) και η ποζιτρονική (PET) χρησιμοποιούνται αρκετά τα τελευταία χρόνια για τη διερεύνηση μεταστάσεων και την απόκριση στη θεραπεία. Η πρώτη θεωρείται σχετικά επισφαλής ως προς την ευαισθησία (Ευ:91%, Ειδ:93%), η δεύτερη(Ευ:61%, Ειδ:80%) χρονοβόρα (90-240 min), ενώ και οι δύο χρησιμοποιούν δόσεις ionίζουσας ακτινοβολίας και είναι κοστοβόρες διαδικασίες.

Μια ανταγωνιστική τεχνολογία των MRI και CT scan είναι αυτή της μικροκυμματικής τομογραφίας, η οποία βασίζεται σε συχνότητες μεταξύ 2GHz-3,5GHz και εκμεταλλεύεται τη διαφορά της διηλεκτρικής σταθεράς ενός υγιούς ιστού έναντι ενός ασθενούς. Είναι φθηνότερη από τις δύο τελευταίες τεχνολογίες και χρησιμοποιεί ένα σχετικά αβλαβές εύρος συχνοτήτων, χαμηλών επιπέδων ισχύος.

4.2.2.3 Βιοδείκτες του καρκίνου του Μαστού

Οι καρκινικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση του καρκίνου του μαστού είναι πρωτεΐνες ορού αίματος (CA 27-29, CA 15-3, CA27.29, CEA, PSA, RS/DJ-1, p53, Καθεψίνη D, Κυκλίνη E και το Her-2, HSP60, HSP90, MUC1),

πρωτεΐνες πόρων από υγρά θηλών (α -2-HS- Γλυκοπρωτεΐνη, Λιποφιλίνη B, β -σφαιρίνη, Αιμοπηξίνη και πρωτεΐνη πρόσδεσης βιταμίνης D) κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα στο αίμα (CTCs), κυκλοφορούν DNA στο αίμα (cfDNAs) και miRNAs.

Αρκετοί από τους πρωτεϊνικούς βιοδείκτες αν και εμφανίζουν καλά χαρακτηριστικά σε προχωρημένα στάδια, δεν είναι αρκετά ευαίσθητοι στα πρώιμα, όπως το CA 15-3, το p53, και οι HSP60, HSP90. Από την άλλη ο υποδοχέας επιδερμικού παράγοντα Her-2 έχει αποδειχθεί πως εκφράζεται σε ποσοστό 30% σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού έναντι υγιών, ενώ υψηλότερη συγκέντρωση σε πειράματα για συγκεκριμένους τύπους καρκίνου έχει εμφανίσει και η πρωτεΐνη RS/DJ-1 [76,77].

Οι κυκλοφορούντες βιοδείκτες αίματος είναι μια ακόμα μέθοδος μη επεμβατικής διάγνωσης και στηρίζονται πάνω σε ίχνη από ελεύθερα DNA και καρκινικά κύτταρα και συνήθως ενσωματώνονται σε άλλες κλινικές δοκιμές με σκοπό την καλύτερευση της εικόνας της διάγνωσης, την καλύτερη εικόνα της ανατομίας των όγκων και της ετερογένειάς τους καθώς και την πρόβλεψη και την πρόγνωση της ασθένειας. Ως σύνολο αναφέρονται συνήθως ως γονιδιακοί βιοδείκτες και είναι ένας τομέας που παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον καθώς εμφανίζει μεγάλη ευελιξία ως προς το σχεδιασμό κλινικών δοκιμών και το εύρος των τεχνολογιών που μπορεί να ενσωματώσει [79].

Τα CTCs, οι γονιδιακοί δείκτες, τα miRNAs και πρωτεϊνικοί βιοδείκτες μπορούν να εντοπιστούν με έναν ακόμα τρόπο, τους βιοαισθητήρες. Οι βιοαισθητήρες είναι μια συνομοταξία συσκευών, που χαρακτηρίζονται από τον τρόπο ανίχνευσης που χρησιμοποιούν και είναι μια ευαίσθητη και ειδική τεχνολογία που διαφαίνεται πως θα απασχολήσει αρκετά τα επόμενα χρόνια, καθώς πέραν των άρτιων χαρακτηριστικών τους προσφέρουν ταχύτητα, είναι απαλλαγμένες από ακτινοβολία και μαζί με την πρόοδο της νανοτεχνολογίας θα καταλήξουν ως εξέταση φθηνοί [80]. Οι πιο διάσημοι τύποι βιοαισθητήρων είναι οι οπτικοί, οι πιεζοηλεκτρικοί και οι ηλεκτροχημικοί. Ένα τρανό παράδειγμα των τελευταίων είναι οι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των γονιδίων BRCA1/2 και p53 που εμφανίζονται συχνά (έως και 35%) μεταλλαγμένα στον καρκίνο του μαστού. Οι συσκευές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των αλλαγών συνήθως είναι συστοιχίες νανοσωματιδίων χρυσού, οξειδίου του ρουθηνίου ή του γραφένιου (μικροσφαιριδίων) οι οποίες δεσμεύουν αποδιαταγμένα μονοκλωνικά θραύσματα

DNA κατά τον κανόνα της συμπληρωματικότητας με αντίστοιχους κλώνους. Τα όποια ασθενή σήματα προκύπτουν ενισχύονται μέσω ενός ηλεκτροχημικού αισθητήρα [78].

4.2.2.4 Καρκινικά αυτοαντισώματα στην υπηρεσία της διάγνωσης του καρκίνου του Μαστού

Η έγκαιρη διάγνωση είναι το ζητούμενο σε όλους τους τύπους καρκίνου. Έτσι, συνεχώς εξετάζονται ως προς τα χαρακτηριστικά τους και ειδικά αυτά των αρχικών σταδίων. Ατομικά τα πιο συνήθη αυτοαντισώματα που χρησιμοποιούνται κλινικά είναι τα p53, MUC1, HER2 και Κυκλίνη B1, με τα αποτελέσματα να έχουν δείξει διακύμανση ανάλογα το στάδιο του καρκίνου ή το ιστορικό των ασθενών. Η όποια αδυναμία εμφανίζεται για καθένα ξεχωριστά καλύπτεται μερικώς από τη σύνθεση πάνελ όπως είδαμε και στην περίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα. Εργαστηριακά έχουν χρησιμοποιηθεί πολλοί συνδυασμοί, όπως για παράδειγμα η πειραματική κατασκευή το 2009 συστοιχίας μικροσφαιριδίων με 35 αντιγόνα που επέδειξε υποσχόμενα χαρακτηριστικά [90] ειδικά σε συγκεκριμένα ταιριάσματα αντιγόνων όπως ο συνδυασμός EGF, sCD40L, HMWK, ApoA1, PAI-1, DD, VDBP, VN που είχε το καλύτερο σκορ σε ευαισθησία/ ειδικότητα (93,8%/94,7%), με ειδικότητα στα δύο πρώτα στάδια του καρκίνου στο 90,2%.

Πίνακας 4.8: Πίνακας TAABs με καταγραφή των κλινικών επιδόσεών τους [91].

Χρονιά	TAABs	Αριθμός ασθενών	Αριθμός ελέγχου	Μέθοδος ανίχνευσης	Ευαισθησία σε όλα τα στάδια (%)	Ειδικότητα σε όλα τα στάδια (%)
2014 [81]	ANGPTL4, DKK1, GAL1, MUC1, GFRA1, GRN, LRRC15(+ ηλικία+BMI+ Εθνικότητα)	200	200	ELISA	73	76
2015 [82]	CTAG1B, CTAG2, TP53, RNF216, PPHLN1, PIP4K2C, ZBTB16, TAS2R8, WBP2NL, DOK2, PSRC1, MN1, TRIM21	45	45	Πρωτεϊνικές Μικροσυστοιχίες	33	98
2016 [83]	HSPB1, HSPD1, HSP70, HSP90, HSPA5, HSP90B1, HSP110	50	26	Πρωτεϊνικές Μικροσυστοιχίες	86	100
2012 [84]	HER-2, p53, CEA, Cyclin B1	33	45	Western Blotting/ ELISA/Πρ. Μ.Συσ.	79	68
2007 [85]	p53, c-myc, HER-2, NY-ESO-1, BRCA1, BRCA2, MUC1	DCIS (40) Primary (97)	94	ELISA	45	85

2013 [86]	IMP1, p62, Koc, p53, c-myc, surviving, p16, cyclin B1, cyclin D1, CDK2	41	82	ELISA	61	86.6
2016 [87]	CA15-3, LGALS3, PHB2, MUC1, GK2	100	50	Πρωτεϊνικές Μικροσυστοιχίες	87	76
2017 [88]	p16, c-myc, TP53, ANXA-1	102	146)	ELISA	31.7-33.3	90
2012 [89]	RBP-Jκ, HMG1, PSRC1, CIRBP, ECHDC1	DCIS (20) - Διηθητικό (20)	DCIS (61) - Διηθητικό (59)	ELISA	83,3	72,7

4.2.2.5 Βιοπληροφορική ανάλυση των πρωτεϊνών που σχετίζονται άμεσα με τον καρκίνο του Μαστού.

Από τη ΒΔ KEGG παρατηρούμε πως τα BRCA1, BRCA 2 και p53 ογκοκατασταλτικά γονίδια και το CCND1 πρωτο-ογκογονίδιο διαδραματίζουν ρόλο στον καρκίνο του μαστού. Άλλα ογκογονίδια όπως το PI3KCA και το FGFR1 των ΜΚΣ PI3K-Akt, MAPK εμφανίζονται τροποποιημένα σε διάφορους υποτύπους (luminal, Her2 positive, basal).

Γονίδιο: BRCA1

Πρωτεΐνη: Breast cancer type 1 susceptibility protein.

Οργανισμός	Ομοιότητα
Pan troglodytes	98,4%
Gorilla gorilla gorilla	98%
Pongo pygmaeus	96,8%
Macaca mulatta	93%
Canis lupus familiaris	74,1%
Bos taurus	71,7%
Mus musculus	56%
Rattus norvegicus	56,1%

Γονίδιο: BRCA2

Πρωτεΐνη: Breast cancer type 2 susceptibility protein.

Οργανισμός	Ομοιότητα
Felis catus	67,9%
Rattus norvegicus	56,3%
Mus musculus	57,4%

Γονίδιο: FGFR1

Πρωτεΐνη: Υποδοχέας αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών 1.

Οργανισμός	Ομοιότητα
Mus musculus	98,3%
Rattus norvegicus	97,7%
Gallus gallus	91,6%
Pleurodeles waltii	85,2%

Γονίδιο: PIK3CA

Πρωτεΐνη: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

Οργανισμός	Ομοιότητα
Bos taurus	99,8%
Rattus norvegicus	98,8%
Mus musculus	98,7%

Γονίδιο: CCND1

Πρωτεΐνη: G1/S-specific cyclin-D1..

Οργανισμός	Ομοιότητα
Pongo abelii	99,3%
Rattus norvegicus	93,9%/ 62,7% CCND2
Mus musculus	93,9%/ 63,4% CCND2
Canis lupus familiaris	93,9%/
Bos taurus	93,2%
Gallus gallus	86,1%/ 62,5% CCND2
Danio rerio	76,3%
Xenopus laevis	77,7%
Sus scrofa	62,5% CCND2

Παρατηρούμε μέσω των blast που πραγματοποιήσαμε, πρωτεΐνες που εμφανίζονται αλλοιωμένες ή σε υπερέκφραση στον καρκίνο του μαστού έχουν υψηλή συγγένεια με αντίστοιχες ειδών όπως ο πεδινός δυτικός γορίλλας (gorilla gorilla gorilla), ο κοινός χιμπατζής (Pan troglodytes), ο κοινός καστανός αρουραίος (Rattus norvegicus), ο ταύρος (Bos taurus) και ο αφρικανικός ονυχοφόρος βάτραχος (Xenopus laevis).

4.2.3 Καρκίνος του παχέος εντέρου.

Μαζί με τους δύο προηγούμενους τύπους ο καρκίνος του παχέος εντέρου (ή ορθοκολικός- CRC) αποτελεί τον τρίτο κατά σειρά πιο κοινό καρκίνο για τα δύο

φύλλα (τρίτος για άνδρες, δεύτερος για τις γυναίκες) με παραπάνω από 1,8 εκατομμύρια περιστατικά καταγεγραμμένα το 2018. Στο σύνολό τους οι τρεις τύποι ευθύνονται για το ένα τρίτο όλων των καρκίνων παγκοσμίως. Η συχνότητα εμφάνισης του CRC για τις δεκαετίες που διανύουμε ακολουθεί μια πορεία αντίρροπη εν συγκρίσει με αυτήν της θνησιμότητας. Χάρης σε σύγχρονες τεχνικές διάγνωσης και σε μεθοδολογίες έγκαιρης παρέμβασης η επιστήμη μπορεί να παρεμβαίνει γρήγορα και αποτελεσματικά σε αρχικά στάδια, μειώνοντας τους θανάτους από τη νόσο. Στον αντίποδα παράγοντες που σχετίζονται με την αύξηση ρίσκου της εμφάνισής της κυριαρχούν στο σύγχρονο κόσμο και έχουν συμβάλει στην αύξηση των κρουσμάτων, ειδικά σε νεανικές ηλικιακές ομάδες. Για παράδειγμα, στατιστικά παρατηρείται αύξηση των διαγνώσεων κατά 1% από αυτές των 2007 και 2016 σε ανθρώπους με ηλικία κάτω των 55 ετών στην Αμερική σύμφωνα με το American Cancer Society [92]. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου θεωρείται ένα από τα πιο ξεκάθαρα παραδείγματα κοινωνικοοικονομικού και εθνολογικού προφίλ της ασθένειας όπως σε αδρές γραμμές είδαμε στο δεύτερο κεφάλαιο και θα αναπτύξουμε κάτωθεν.

Ξεκινώντας από τα ατομικά και οικογενή χαρακτηριστικά μπορούμε να πούμε πως ένας βασικός παράγοντας είναι η ηλικία. Συντριπτικά οι διαγνώσεις αφορούν ανθρώπους ηλικίας άνω των 50 ετών, καθώς η πιθανότητα εμφάνισης μετά τα 40 αυξάνει απότομα και όχι γραμμικά, με άτομα μεταξύ των 60-79 ετών να έχουν περισσότερο από 50πλάσιες διαγνώσεις από άτομα κάτω των 40 [93]. Ακόμα, έχει αποδειχθεί η εμπλοκή ασθενειών όπως οι αδενωματώδεις πολύποδες και οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (νόσος Crohn, ελκώδης κολίτιδα) στη νόσο. Οι πολύποδες θεωρούνται πρόδρομες αλλοιώσεις του CRC, με σχεδόν το 95% των καρκίνων να έχουν αυτά τα αδενώματα ως αφετηρία, ύστερα από μια λανθάνουσα περίοδο εμφάνισης που μπορεί να διαρκέσει έως και 10 χρόνια, γι αυτό και συνίσταται η έγκαιρη αφαίρεσή τους αμέσως μετά του εντοπισμού τους. Η αφαίρεση δεν αποτελεί πάντα απαλλαγή (αν και απομακρύνει μια επίφοβη εστία τοπικά), το αντίθετο μάλιστα, μιας και από μόνη της η εμφάνιση συνεπάγεται αυξημένο κίνδυνο για επανεμφάνιση μεταχρονικού καρκίνου σε κάποιο άλλο σημείο του παχέος εντέρου [94]. Οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (Inflammatory bowel disease-IBD), με τη σειρά τους αυξάνουν το σχετικό κίνδυνο σε σχέση με υγιή άτομα μεταξύ 4-20 φορές. Η νόσος του Crohn προκαλεί φλεγμονή των τοιχωμάτων του παχέος εντέρου σε οποιοδήποτε σημείο της πεπτικής οδού, από το στόμα ως τον πρωκτό, αυξάνοντας το συνολικό κίνδυνο για εμφάνιση της νόσου. Άτομα που ανήκουν και στις δύο κατηγορίες συστήνεται να εξετάζονται συχνά για CRC. Πέραν του ατομικού ιατρικού ιστορικού, έχει αποδειχθεί πως ένα 20% των διαγνωσμένων ατόμων με

CRC έχουν μέλη της οικογένειας με ίδια διάγνωση ή με ιστορικό ανεδωματοδών πολυπόδων [95]. Ο τελευταίος παράγοντας που άπτεται σε ιστορικό, είναι η κληρονομικότητα. Πράγματι, ένα ποσοστό 5%-10% των ορθοκολικών καρκίνων σχετίζεται με αναγνωρισμένες κληρονομικές ασθένειες, με κοινότερες την οικογενή αδενωματούδη πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis – FAP) και τον κληρονομικό μη πολυποδιασικό ορθοκολικό καρκίνο (HNPCC-Σύνδρομο Lynch), ενώ συσχέτιση έχει βρεθεί και ανάμεσα στον συγκεκριμένο καρκίνο με τα υψηλά ποσοστά ινσουλίνης στο αίμα (πχ υπερινσουλιαιμία). Άτομα με FAP που εμφανίζουν ορθοκολικό καρκίνο είναι ως ποσοστό μικρό στο σύνολο των διαγνώσεων (~1%), αλλά η εμφάνιση πολυπόδων είναι επιθετική και ο αριθμός τους μπορεί να είναι της τάξης των εκατοντάδων. Η εμφάνισή τους χαρακτηριστικά συμβαίνει σε νεαρή ηλικία (~20 έτη ηλικίας) [96] και συνήθως μέσα σε μια 20ετία παρατηρείται ο κακοήθης μετασχηματισμός τους. Από την άλλη ασθενείς με HNPCC αναπτύσσουν λίγα αδενώματα, αλλά ως ποσοστό είναι μεγαλύτερο κλάσμα των συνολικών CRC καρκίνων (2%-6%).

Μια ακόμα παράμετρος που αναφέρθηκε για τον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι η γεωγραφική. Είναι γεγονός πως τα πρωτεία του αριθμού των κρουσμάτων τα κατέχουν η ΗΠΑ, η Ευρώπη, η Αυστραλία και η Νέα Ζηλανδία. Όπως είδαμε και στο δεύτερο κεφάλαιο χώρες όπως η Ιαπωνία και η Νότιος Κορέα σημειώνουν αύξηση των περιστατικών. Στις χώρες της αραβικής ανατολής διαπιστώνεται και εκεί αύξηση των αριθμών. Το γεωγραφικό στοιχείο γίνεται ακόμα πιο εμφανές κοιτάζοντας τα ποσοστά CRC για ασθενείς κάτω των 40 ετών ανάμεσα σε Δύση και Ανατολή. Σε ΗΠΑ και Ευρώπη το ποσοστό είναι μεταξύ 2%-8% ενώ σε κράτη όπως η Αίγυπτος, η Σαουδική Αραβία, οι Φιλιππίνες και το Ιράν τα ποσοστά είναι 38%, 17% και 15-35% αντίστοιχα. Πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί με αντικείμενο την αύξηση των ορθοκολικών καρκίνων σε χώρες που υιοθετούν δυτικοποιημένο τρόπο ζωής, εντάσσοντας την κατανάλωση κόκκινου κρέατος σε συχνή βάση, την πρόσληψη πολλών θερμίδων με υψηλά ποσοστά λιπαρών και χαμηλής περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες. Η διατροφική απόκλιση σε συνδυασμό με την έλλειψη σωματικής άσκησης, καθιστικού τρόπου εργασίας και καθημερινότητας προάγουν την παχυσαρκία [97]. Καθεμία από τις άνω συνήθειες μεμονωμένα έχει αποδειχθεί παράγοντας αύξησης κινδύνου για το CRC, οπότε γίνεται εύκολα αντιληπτό πως ως σύνολο αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο. Επιπροσθέτως, η κατανάλωση αλκοόλ και το κάπνισμα είναι γνωστό πως αυξάνουν τις πιθανότητες ανάπτυξης CRC και μάλιστα από το 2007 καταχωρήθηκαν επίσημα ως καρκινογόνοι παράγοντες από το IARC (International Agency for Research on Cancer). Δεδομένα από δεκαετίες

έρευνας έχουν αποδείξει πως άτομα που καταναλώνουν τουλάχιστον 4 ποτά ημερησίως φέρουν αυξημένο κίνδυνο κατά 52% έναντι αυτών που δεν πίνουν ή τουλάχιστον δεν καταναλώνουν καθημερινά [98], ενώ αντίστοιχες έρευνες που αφορούσαν χρόνιους καπνιστές (στατιστικά σημαντική διαφορά για συστηματικούς καπνιστές με 30 τουλάχιστον χρόνια καθημερινής χρήσης) έδειξαν πως ο σχετικός κίνδυνος αυξάνει από 1.11 έως 1.25 [99]. Τέλος, ο CRC έχει συνδεθεί με τη κοινωνικοοικονομική κατάσταση. Στατιστικά στον δυτικό κόσμο και τις δυτικοποιημένες οικονομίες οι κακές συνήθειες του καπνίσματος, της κατανάλωσης αλκοόλ, της κακής διατροφής είναι κυριαρχούσες σε ανθρώπους που βιώνουν στο όριο της φτώχειας. Το μεγαλύτερο ποσοστό αφορά άτομα χαμηλού μορφωτικού επιπέδου, χαμηλόμισθους, άτομα δίχως σταθερό εισόδημα και ανέργους [100]. Πέραν των χαρακτηριστικών που τους αποδίδονται, σε αρκετά δυτικά κράτη οι πληθυσμιακές ομάδες αυτές δεν έχουν πάντα ελεύθερη πρόσβαση σε υπηρεσίες υγείας ή και στην ενημέρωση. Ειδική μνεία πρέπει να γίνει στους μετανάστες, ειδικά αυτών που οι χώρες προέλευσής τους είναι αρκετά κάτω από το μέσο όρο στις διαγνώσεις του καρκίνου του παχέος εντέρου (βασικές αφετηρίες: Αφρικανικές χώρες, Ινδία, Πακιστάν, Κίνα). Οι ίδιοι οι μετανάστες ή συνηθέστερα οι απόγονοί τους υιοθετώντας τα χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν εμφανίζουν στατιστική έκρηξη στους CRC. Γενικά η μετάβαση από χώρες χαμηλού ρίσκου σε υψηλού συνοδεύεται με εναρμόνιση του κινδύνου εμφάνισης CRC των μεταναστών ή των απογόνων τους με τους γηγενείς πληθυσμούς [101].

4.2.3.1 Βιολογία του Καρκίνου του Παχέος Εντέρου

Ανάλογα της φύσης της μετάλλαξης που συμβαίνει οι CRCs καταχωρούνται σε τρεις κατηγορίες, τους σποραδικούς (70%), κληρονομικούς (5%) και οικογενείς (25%). Οι μηχανισμοί που οδηγούν στην καρκινογένεση χωρίζονται και αυτοί σε τρεις κατηγορίες, το μονοπάτι χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN, chromosomal instability), της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI, microsatellite instability) και αυτό του φαινότυπου μεθυλιωτή CpG νησίδων (CIMP, CpG Island Methylator Phenotype) [102]. Μεταξύ τους παρατηρούνται τροποποιήσεις σε γονίδια όπως k-RAS, cMYC, BRAF, PIK3CA, PTEN, SMAD2/4 που διαταράσσουν MKΣ όπως τα Wnt, PI3K, Ras, TGF-β, TP53. Οι ασθένειες FAP, HNPCC που συμβάλλουν στον CRC έχουν διακριτά δικά τους γονίδια που εμφανίζουν αλλοιώσεις όπως για παράδειγμα στο FAP είναι κυρίαρχη η μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού APC (το οποίο και κληρονομείται με τρόπο επικρατή) ή στο HNPCC παρατηρούμε μεταλλάξεις στα MLH1, MSH2 και γονίδια που συμμετέχουν σε επιδιορθωτικά μονοπάτια του DNA. Σημειακές

μεταλλάξεις όπως αυτές του γονιδίου POLE που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα της DNA πολυμεράσης Ε και εμπλέκεται στην επιδιόρθωση και την αντιγραφή του DNA έχουν σχετιστεί με τύπους CRC. Αρκετά συχνά το συγκεκριμένο γονίδιο εμφανίζεται συν-αλλοιωμένο με το PTEN [103].

Πίνακας 4.9: Γονίδια που συμμετέχουν στον CRC και τα μονοπάτια που ανήκουν.

Γονίδιο	Τύπος Καρκίνου	ΜΚΣ	Γονίδιο	Τύπος καρκίνου	ΜΚΣ
MAP2K1	POLE	RTK	RAF1	CIMP	RAS
RAF1		RAS	BRAF		RAF
NRAS		RAS	NRAS		RAS
KRAS		RAS	KRAS		RAS
RASA1		RAS	RAC1		ERK/Akt
NF1		RAS	NF1		RAS
ERRFI1		PI3K-Akt	ERRFI1		PI3K-Akt
PTPN11		RAS	ERBB2,4		RTK
CBL		RTK	ERBB2,3,4		RTK
JAK2		JAK-STAT	KIT		JAK/PI3K/RAS
KIT		JAK/PI3K/RAS	RAC1	ERK/Akt	
FGFR3		RAS	RASA1	RAS	
ERBB2,3		RTK	NF1	RAS	
PTEN		PI3K-Akt	ERRFI1	PI3K-Akt	
BRAF		RAF	KRAS	RAS	
NRAS		RAS	BRAF	RAF	
KRAS		RAS	RAF1	RAS	
RAC1	ERK/Akt	β-Κατενίνη	WNT		
RASA1	RAS	MLH1	Επιδιορθωτικά μονοπάτια		
NF1	RAS	MSH2,3,6	Επιδιορθωτικά μονοπάτια		
ERRFI1	PI3K-Akt	Bax	cell cycle		
PDGFRA	RTK	TGFβ2	TGF-β		
KIT	JAK/PI3K/RAS	p53	TP53		
FGFR1	RAS	DCC	ΜΚΣ Απόπτωσης		
ERBB2	RTK	Smad 2,3	TGF-β		
APC	Wnt	TGFβ2	TGF-β		

4.2.3.2 Διάγνωση και βιοδείκτες του Καρκίνου του παχέος

Εντέρου

Η 5ετής επιβίωση των ασθενών με CRC εξαρτάται κατά πολύ από το στάδιο της αρχική διάγνωσης. Ασθενείς με τοπικότητα του καρκίνου έχουν 90%, περιπτώσεις ευρύτερης τοπικής διασποράς έχουν 69%, ενώ καρκίνοι με μεταστατικότητα έχουν γύρω στο 12% [104]. Ο διαχωρισμός της κατάταξης των CRCs γίνεται λαμβάνοντας υπ' όψιν το βάθος διείσδυσης (Στάδιο T), την εμπλοκή των λεμφαδένων (Στάδιο N) και η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (Στάδιο M).

Η πιο συνηθισμένη τακτική που ακολουθείται ως έλεγχος είναι η κολonosκόπηση ή σιγμοειδισκόπηση μέσω ενδοσκοπίου, εξέταση που συστήνεται προληπτικά για άτομα άνω των 50. Έρευνες έχουν δείξει πως η εξέταση αυτή έχει μειώσει τα ποσοστά κρουσμάτων (18%-23%) και τους θανάτους (22%-31%), καθώς κάνει δυνατό τον εντοπισμό των πολυπόδων έγκαιρα και πιστά ξεχωρίζοντας αυτούς από φλεγμονές και συμπτώματα ασθενειών που έχουν συναφείς ενδείξεις (έλκη στη βλεννογόνο, αιμορραγία, μόλυνση). Η συγκεκριμένη εξέταση μαζί με εξέταση κοπράνων-αίματος (fecal blood test-FOBT) και την κολεκτομή (αφαίρεση τμήματος του παχέος εντέρου)-αν χρειαστεί-έχουν καταφέρει σε περιπτώσεις να πετύχουν μείωση κινδύνου από 57% έως αι 60%[105]. Νέες τεχνολογίες όπως η υπολογιστική τομογραφία-κολονογραφία (CTC), η μαγνητική τομογραφία-κολονογραφία (MRC) και η ενδοσκοπική κάψουλα του παχέος εντέρου (CCE) έρχονται να αυξήσουν τη διαγνωστική ικανότητα των εξετάσεων και μαζί με συνεκτίμηση αποτελεσμάτων από εξετάσεις κοπράνων και αίματος μπορούν να αγγίξουν υψηλές ευαισθησίες ανάλογα με τις διαστάσεις των αδενωμάτων που υπάρχουν. Η CTC μπορεί να ξεπεράσει το 90% για αδενώματα $\geq 10\text{mm}$, η MRC 78% για αδενώματα $\geq 6\text{mm}$ και η CCE 88% για πολύποδες $\geq 10\text{mm}$.

Οι μεταβολές που μπορούν να συμβούν όπως είδαμε στο CRC μπορούν να χωριστούν σε τρεις βασικές κατηγορίες, MSI, CIN, και CpG (CIMP), οι οποίες παράγουν τροποποιημένα μακρομόρια (DNA, RNA, πρωτεΐνες και μεταβολίτες) που με τη σειρά τους μπορούν να ανιχνευτούν σε αίμα και κόπρανα και ως εκ τούτου είναι εν δυνάμει βιοδείκτες. Η μοριακή διερεύνησή τους μπορεί να προσφέρει υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα, ενώ συγχρόνως ως εξέταση είναι σίγουρα λιγότερο άβολη για τους ασθενείς. Οι συνηθέστεροι καρκινικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται σήμερα, το CEA, η καλπροτεκτίνη, το CA19-9, το TPA και η AFP ενώ χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία είναι ελλειμματικοί ως προς την ειδικότητα. Συνήθης εξέταση, όντας φτηνή, απλή και μη επεμβατική ως διαδικασία είναι αυτή της αιμοσφαιρίνης κοπράνων, η οποία όμως εμφανίζει μικρή ευαισθησία ειδικά σε αρχικά στάδια (~10% για αδενώματα, 40%-85% για CRCs). Μια πιο ασφαλής ως προς την πιστότητα των τεστ προσέγγιση ειδικά σε αρχικά στάδια είναι η διερεύνηση των μεταλλάξεων των k-Ras, p53, APC και ο προσδιορισμός των επιγενετικών αλλαγών όπως του MSI, εξετάζοντας κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα στο αίμα (CTCs), cfDNAs, LncRNAs και miRNAs. Η ικανότητα που προσφέρουν ως αντικείμενο εδράζει στο πολύ υψηλό ποσοστό μεταλλαγμένων γονιδίων που υπάρχουν στην συγκεκριμένη ασθένεια (40%-50% μεταλλαγμένα k-Ras σε σποραδικούς CRCs και αδενώματα και 13%-95% σε πρόδρομες προκαρκινικές αλλοιώσεις, μεταλλαγμένο p53 σε 30%-60% σε όλους

τους CRCs). Οι αλλοιώσεις του MSI (15% των CRCs) μπορούν να προσδιοριστούν μέσω δεικτών του όπως ο BAT26 και μαζί με το APC έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν κι αυτοί ως καρκινικοί διαγνωστικοί δείκτες πρώιμων σταδίων. Τέλος, μια ακόμα ένδειξη ύπαρξης καρκίνου είναι η υπερμεθυλίωση συγκεκριμένων γονιδίων. Σήμερα μπορούμε να την εντοπίσουμε με συγκεκριμένα τεστ ορού του αίματος συγκεκριμένων γονιδίων, όπως των SEPT9, NGFR, TMEEF2. Μελέτες έχουν δείξει πως το SEPT9 έχει ευαισθησία 50%-70% και ειδικότητα 85%-90%. Μια πολύ ενδιαφέρουσα προσέγγιση για τον εγκλωβισμό κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων περιλαμβάνει μικροσυστοιχίες μακροσφαιριδίων από αγαρόζη με διαμορφωμένες οπές ανάμεσα στα σφαιρίδια ικανές να χωρέσουν καρκινικά κύτταρα. Αμέσως μετά την ενθυλάκωση των κυττάρων ξεκινά ο πολλαπλασιασμός τους καταλήγοντας σε αποικίες εκατοντάδων με ελεγχόμενο, επιβραδυνόμενο ρυθμό. Το περιοριστικό καθεστώς που επιβάλλεται επάγει την παραγωγή καρκινικών αναστολέων πολλαπλασιασμού στα μη εγκλωβισμένα κύτταρα, με μια πρωτεϊνική γκάμα 10 πρωτεϊνών: Gelsoin (GSN), Fibulin (FLBN1), νουκλεονίνη (NCL), προσαποσίνη (PSAP), χρωστικοφόρο επιθήλιο παράγοντα (PEDF), Serpine1 (Serbp1), αναστολέα της μεταλλοπρωτεϊνάσης 2 (TIMP2), πρωτεΐνη σύνδεσης φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PEBP1), peroxiredoxin1 (PRDX1) και εκκρινόμενη πρωτεΐνη όξινη και πλούσια σε κυστεΐνη (SPARC) [117]. Στη συνέχεια θα δούμε όπως και στους δύο προηγούμενους καρκίνους καρκινικούς δείκτες πρωτεωμικής και TAABs[106, 107].

4.2.3.3 Καρκινικά αυτοαντισώματα και πρωτεΐνες ως βιοδείκτες του Καρκίνου του Παχέος Εντέρου.

Αρκετοί πρωτεϊνικοί δείκτες έχουν δοκιμαστεί για τα χαρακτηριστικά τους εδώ και δεκαετίες. Τα ειδικά αντιγόνα CCSA-2/3/4 έχουν δείξει αρκετά υψηλά ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας (78%-89% αντίστοιχα) σε αδενώματα προχωρημένων σταδίων, ενώ άλλες πρωτεΐνες έχουν χρησιμοποιηθεί για εντοπισμό επιθηλιακών ανωμαλιών, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP9 και MMR7 οι οποίες μαζί με την γλυκοπρωτεΐνη λαμινίνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ξεχωριστός προγνωστικός βιοδείκτης. Άλλες προσεγγίσεις περιλαμβάνουν ανάλυση προϊόντων έκφρασης μέσω μικροσυστοιχιών. Σε έρευνα το 2007 χρησιμοποιήθηκαν συστοιχίες 5 μακρομορίων: BANK1, BCNPI, CDS, MGC20553, MS4AI, με χαρακτηριστικά 88%-94% ευαισθησία και 64%-77% ειδικότητα [108]. Όπως και στους προηγούμενους καρκίνους πολλά κλινικά πειράματα έχουν διεξαχθεί με αντικείμενο τα αυτοαντισώματα και την ικανότητά τους στην έγκαιρη διάγνωση. Από το 2005 ως το

2013 μια ευρεία προσπάθεια ανέδειξε συγκεκριμένα TAAbs ως υποσχόμενους καρκινικούς δείκτες. Το TAAB του MAGEA4 είχε σταθερά τις καλύτερες επιδόσεις στον εντοπισμό CRC σε πρώτα στάδια. Στο εγχείρημα να ενσωματωθεί με άλλα TAAbs υψηλών χαρακτηριστικών (p53, IMPDH2, MDM2, CTAG1, MTDH, TPM3_iso1, SAG, RPL13, IGF2BP1) σε συστοιχίες 4,5 και 6 συνδυασμών τα πάνελ επέδειξαν αυξημένη ευαισθησία με μια μικρή έκπτωση στην ειδικότητα. Ο βέλτιστος συνδυασμός 6 TAAbs (TP53 + IMPDH2 + MDM2 + MAGEA4 + CTAG1+ MTDH) για τα τρία πρώτα στάδια του CRC επέδειξε ευαισθησία 30%, για προχωρημένα αδενώματα 25% και 17% για μη προχωρημένα αδενώματα, ενώ η ειδικότητά του ήταν 85% [109]. Ακόμα καλύτερες επιδόσεις κατέγραψε σε μελέτη το 2016 ο συνδυασμός CEA, CA19-9, anti-Fn-IgA (40% ευαισθησία, 94,22% ειδικότητα για στάδια I, II) [110].

Πίνακας 4.10: Πίνακας TAAbs με καταγραφή των κλινικών επιδόσεών τους

Χώρα/ Χρονιά	TAAbs	Αριθμός ασθενών	Αριθμός ελέγχου	Μέθοδος ανίχνευσης	Ευαισθη- σία σε όλα τα στάδια(%)	Ευαισθη- σία σε πρώμα στάδια(%)	Ειδικότη- τα (%)
2017[114]	SLP2, -p53, - SEC61B, and - PLSCR1, CEA	92	100	ELISA	64.1	66.7	80.0
ΗΠΑ, Ην. Βασίλειο [115]	32 TAAbs ²⁰	131	131	Antigen Microarray	61.1	73.6-75	80.9
2016[111]	GTF2B, EDIL3, HCK, PIM1, STK4, p53	307	307	Συστ. Μικροσφαι- ριδίων	---	66	90
2013[112]	CEA, GDF15, p53	186	186	Συστ. Μικροσφαι- ριδίων- VeraCode ™	54	---	98
2017[113]	GDF-15, AREG, FasL, Flt3L, p53	147	107	Proseek Multiplex Oncology (Oncology II panel)	56,4-22	---	90
20013[116]	MUC1, p53	157	40	Μικροσυ- στοιχίες	32	---	95
Καναδάς [118]	ANXA3, CLEC4D, LMNB1, PRRG4,	202	208	RNA Panel	72	---	70
Μαλαισία {118}		99	111		61	---	77

²⁰ 32 TAAbs: P53, SOX2, NY-ESO-1, GBU, MAGE A4, HuD, AFP, Gankyrin, GRP78, HCC1, HDGF, H-Ras1, IMP, p62, RalA, MUC1, CEA, Annexin A1, rhUteroglobulin (CCSP1), K-Ras, APC1, APC2 blocking peptide, SDCCAG8 (NY-CO-8), TDRD6 (NY-CO-45), vWFA2 (CCSP2), ErbB2, RAF1, SCGB1A1, CA19-9, UTP14A (NY-CO-16), K-RAS-Q61H and APC-N

ΗΠΑ-Καναδάς [118]	TNFAIP6, VNN1, IL2RB	314	328	RT-qPCR	78		65
-------------------	----------------------	-----	-----	---------	----	--	----

4.2.3.4 Βιοπληροφορική ανάλυση των πρωτεϊνών που σχετίζονται άμεσα με τον καρκίνο του Παχέος Εντέρου.

Από τη ΒΔ KEGG παρατηρούμε πως στον CRC εμπλέκονται ογκογονίδια (β-κατενίνη, k-Ras), σε ογκοκατασταλτικά (APC, DCC, TGFβRII, Smad2/4, Bax, p53) και γονίδια επιδιόρθωσης DNA (hMLH1/2/3/6). Το μονοπάτι MSI έχει διακριτά αποκλειστικά κάποια από αυτά τα γονίδια (β-κατενίνη, TGFβRII, Smad2/4, Bax, hMLH1/2/3/6)

Γονίδιο: CTNNB1

Πρωτεΐνη: Catenin beta-1

Οργανισμός	Ομοιότητα
Canis lupus familiaris	99,9%
Bos taurus	99,9%
Mus musculus	99,9%
Rattus norvegicus	99,7%
Danio rerio	97,4%
Xenopus laevis	97,4%
Urechis caupo	71,8%
Tripneustes gratilla	70,1%
Drosophila melanogaster (Armadillo segment polarity protein)	67,6%
Musca domestica (ASPP)	69,4%
Drosophila pseudoobscura pseudoobscura (ASPP)	68,2%
Aedes aegypti (ASPP)	66,7%
Anopheles gambiae (ASPP)	69,5%

Πρωτεΐνη: DNA mismatch repair protein Mlh1

Γονίδιο: MLH1

FASTA: MSFVAGVIRRLDETVVNRIAAGEVIQRPANAIAKEMIENCLDAKSTSIQVIVKEGGLKLIQ
IQDNGTGIRKEDLDIVCERFTTSKLSQSFEDLASISTYGFGEALASISHVAHVTTITTKTA
DGKCAIRASYSYDGLKAPPKPCAGNQGTQITVEDLFYNIATRRKALKNPSEYEGKILEVV
GRYSVHNAGISFSVKKQGETVADVRTLPNASTVDNIRSIFGNVAVSRELIEIGCEDKTALF
KMNGYISNANYSVKKCIFLLFINHRLVESTSLRKAIAETVYAAYLPKNTHPFLYLSLEISP
QNVDVNVHPTKHEVHFLHEESILERVQQHIESKLLGSNSSRMFTQTLLPGLAGPSGEMV
KSTTSLTSSSTSGSSDKVVAHQMVRTDSREQKLDALFQPLSKPLSSQPQAIKTEDKTDIS
SGRARQQDEEMLELPAPAEVAANKQSLEGDTTKGTSEMSEKRGPTSSNPRKRHREDSVDE

MVEDDSRKEMTAACTPRRRIINLTSVLSLQEEINEQGHVEVLREMLHNHSFVGCVPNPQWAL
 AQHQTKLYLLNTTKLSEELFYQILIYDFANFGVLRLEPAPLFDLAMLALDSPESGWTEE
 DGPKEGLAEYIVEFLKKAEMLADYFSLEIDEEGNLIGLPLLDNYVPPLEGLPIFILRL
 ATEVNWDEEKECFESLSKECAMFYRSIRKQYISEESTLSGQQSEVPGSIPNSWKWTVEHIV
 YKALRSHILPPKHFTEDGNILQLANLPDLYKVFERC

Οργανισμός	Ομοιότητα
Mus musculus	88,4%
Rattus norvegicus	86,9%
Dictyostelium discoideum	40,1%

Η πρωτεΐνη Mlh1 (μήκος 756 αμινοξέα) έχει δύο ισομορφές, Isoform 2/3 of DNA mismatch repair protein Mlh1 (515 και 658 αντίστοιχα). Σε στοίχιση μεταξύ της αρχικής πρωτεΐνης με την ισομορφή 2 υπήρξε ομοιότητα 68,12%, με την ισομορφή 3 86,64% και σε στοίχιση και των τριών 68,122% . Οι διαφορές εντοπίζονται στις εξής ακολουθίες και ύστερα από το 142^ο , 2^ο , 144^ο αμινοξύ αντίστοιχα της κάθε στοιχισμένης αλληλουχίας έχουμε απόλυτη ομολογία.

>P40692

MSFVAGVIRRLDETVVNRIAAGEVIRPANAIEKEMIENCLDAKSTSIQVIVKEGGLKLIQ
 IQDNGTGIRKEDLDIVCERFTTSKLSQSFEDLASISTYGFGEALASISHVAHVITITTKTA
 DGKCA YRASYS DGK LKAPPKPCAGNQG TQITVEDLFYNIATRRKALKNPSEEY GKILEVV
 GRYSVHNAGISFSVKKQGETVADVRTL PNAS TVDNIRSI FGNAV SRELIEIGCEDKT LAF
 KM

>P40692-2

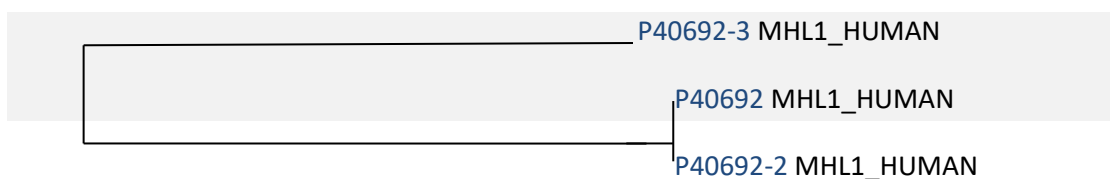
-M

>P40692-3

-----MAFEALASISHVAHVITITTKTA
 DGKCA YRASYS DGK LKAPPKPCAGNQG TQITVEDLFYNIATRRKALKNPSEEY GKILEVV
 GRYSVHNAGISFSVKKQGETVADVRTL PNAS TVDNIRSI FGNAV SRELIEIGCEDKT LAF
 KM

*

Δένδρο



Πρωτεΐνη: DNA mismatch repair protein MSH2

Γονίδιο: MSH2

Οργανισμός	Ομοιότητα
Chlorocebus aethiops	99,3%
Bos taurus	95,4%
Mus musculus	92,8%
Rattus norvegicus	91,7%

Η πρωτεΐνη MSH2 έχει κι αυτή μια ισομορφή με την οποία εμφανίζει 92,934% ομοιότητα, με τις αλληλουχίες να ταυτίζονται απόλυτα από το 67^ο αμινοξύ της MSH2 :

>P43246

MAVQPKETLQLESAAEVGFVRRFFQGMPEKPTTTVRLFDRGDFYTAHGEDALLAAREVFKT
QGVIKYM

>P43246-2

-----M

*

Πρωτεΐνη: TGF-beta receptor type-2

Γονίδιο: TGFBR2

Οργανισμός	Ομοιότητα
Rattus norvegicus	91,5%
Mus musculus	88,2%
Gallus gallus	75,4%
Sus scrofa	87,5%

Με την ισομορφή του το TGR-beta receptor type-2 εμφανίζει 95,608% ομοιότητα.

>P37173

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKS-----VNND

>P37173-2

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRRTAHLRHIINND

:***

Πρωτεΐνη: Apoptosis regulator BAX

Γονίδιο: BAX

Οργανισμός	Ομοιότητα
Bos taurus	97,4%
Rattus norvegicus	93,2%
Mus musculus	92,2%

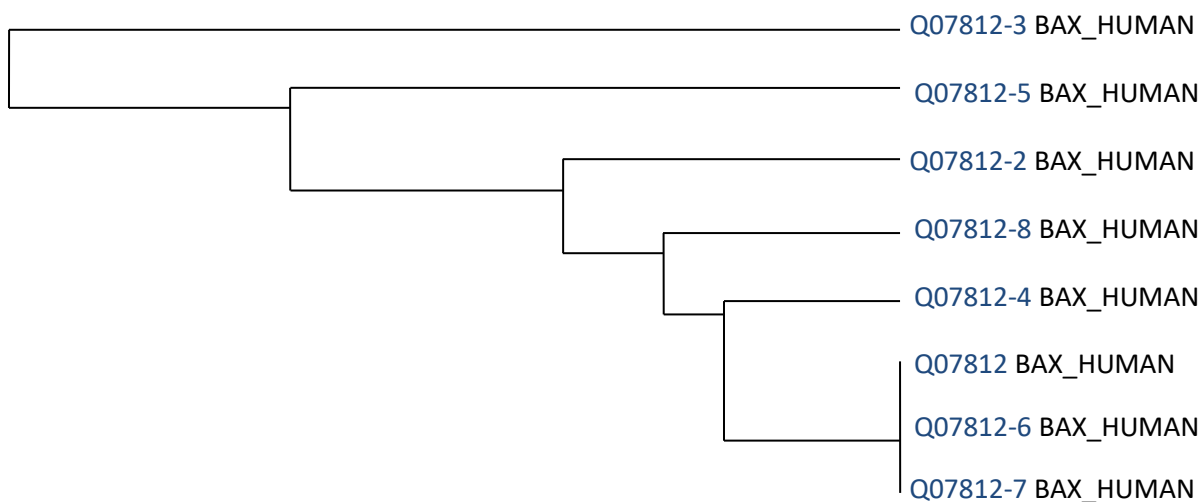
Το BAX έχει τις ισομορφές Beta, Gamma, Delta, Epsilon, Zeta. Psi, Sigma (Isoforms-2/3/4/5/6/7/8). Οι διαφορές ανάμεσα στη βασική πρωτεΐνη και την

ισομορφή Beta ξεκινούν στο 156^ο αμινοξύ της BAX σε στοίχιση με το 159^ο της BAX_Isoform Beta:

```
>Q07812
WDGLLSYFGTPTWQTVTTFV-----AGVLTASLTIWKKMG-----
>Q07812-2
WVRLKPPHPHHRALTTAPAPPSLPPATPLGPWAFWSRSQWCPLPIFRSSDVVYNAFSLRV
*  ** .          . * .          .. .  :*: :
```

Εργαζόμενοι αντίστοιχα νε τις υπόλοιπες ισομορφές Gamma, Delta, Epsilon, Zeta. Psi, Sigma παρατηρούμε alignment scores: 9,375%, 74,479%, 67,188%, 59,375%, 90,104% και 92,708% αντίστοιχα.

Δένδρο



Πρωτεΐνη: Netrin receptor DCC
Γονίδιο: DCC

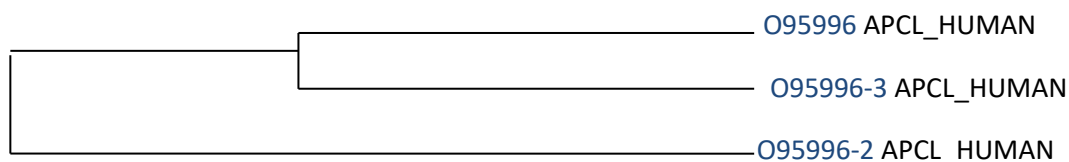
Οργανισμός	Ομοιότητα
Mus musculus	96,5%
Rattus norvegicus	96,4%
Gallus gallus (Neogenin)	51,3%

Πρωτεΐνη: Adenomatous Polyposis coli protein
Γονίδιο: APCL

Οργανισμός	Ομοιότητα
Mus musculus	81,1%
Rattus norvegicus	49,7%

Το APC έχει δύο ισομορφές τις Isoform 2/3 of Adenomatous Polyposis coli protein. Σε στοίχιση των τριών ακολουθιών υπήρξε ομολογία 88,102%, ενώ στις επιμέρους με τις ισομορφές 2,3 η ταύτιση ήταν 88, 1% και 99,957%.

Δένδρο



Παρατηρούμε πως πρωτεΐνες που εμφανίζουν αλλοιώσεις στον καρκίνο του παχέος εντέρου παρουσιάζουν ομοιότητα με αυτές ζώων όπως ο πρασινοπίθηκος (*Chlorocebus aethiops*), ο κοινός καστανός αρουραίος (*Rattus norvegicus*), ο ταύρος (*Bos taurus*) και ο σπιτικός ποντικός (*Mus musculus*).

4.2.4 Καρκίνος του δέρματος

Ο δερματικός καρκίνος είναι η πιο διαδεδομένη αλλοίωση στους καυκάσιους πληθυσμούς. Η νόσος αναπτύσσεται από δερματικά κύτταρα υπεύθυνα για τη σύνθεση της χρωστικής του δέρματος (μελανίνη), τα οποία ονομάζονται μελανοκύτταρα. Οι σπίλοι (ελιές) αποτελούν μια καλοήγη εκδοχή αλλοιώσεων που σχηματίζεται από τα μελανοκύτταρα μαζί με τον περιβάλλοντα ιστό τους. Στον καρκίνο του δέρματος οι αλλοιώσεις αυτές είναι κακοήθεις, στα πρώτα στάδια εξαπλώνονται με ακτινοειδή, τοπική στρατηγική στην επιφάνεια του δέρματος, ενώ καταλήγουν αν δεν αντιμετωπιστούν εγκαίρως να αναπτύσσονται κάθετα, διηθώντας στα ενδότερα δερματικά στρώματα, φτάνοντας στη λέμφο και τα όργανα απ' όπου και ξεκινούν τη μετάσταση.

Η ασθένεια χωρίζεται αρχικά σε δύο τύπους κακοήθειας, το μελάνωμα και τον μη μελανωματικό καρκίνο του δέρματος (NMSC), με τον τελευταίο να έχει κι αυτός δύο υποτύπους, το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (Basal Cell Carcinoma- BCC), το οποίο είναι και πιο κοινό και το ακανθοκυτταρικό (Squamous Cell Carcinoma- SCC) που κατατάσσεται δεύτερο σε συχνότητα. Συνολικά το NMSC έχει 18-20 φορές μεγαλύτερη συχνότητα από το μελάνωμα. Για το έτος 2018 καταγράφηκαν πάνω από 1 εκατομμύριο περιπτώσεις δερματικού καρκίνου NMSC παγκοσμίως. Αν και δεν έχει παρατηρηθεί αύξηση της θνησιμότητας τα τελευταία χρόνια, τα ποσοστά των κρουσμάτων έχουν αυξηθεί με ιδιαιτερότητες τοπικές όπως θα δούμε και πιο κάτω.

Το μελάνωμα είναι ασθένεια με χροιά φυλετική, εθνολογική και γεωγραφική συνάμα, με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης στους Καυκάσιους πληθυσμούς (2,4%) έναντι των Λατινοαμερικάνων (0,5%) και των Αφρικανικών πληθυσμών (0,1%). Ακόμα, στατιστικά έχει παρατηρηθεί μια αυξημένη συχνότητα στους άντρες έναντι των γυναικών (1,5 φορά παραπάνω), ενώ η και ηλικία διαδραματίζει μεγάλο ρόλο στη διαφοροποίηση αυτή, με το ποσοστό κινδύνου στους άντρες να τριπλασιάζεται σε σχέση με αυτό των γυναικών μετά την ηλικία των 75. Τέλος, το γεωγραφικό πλάτος που βρίσκονται τα άτομα και η τοποθεσία είναι μια ακόμα παράμετρος. Για το 2018 σύμφωνα με το World Cancer Research Fund οι δύο χώρες που και τα δύο φύλα εμφανίζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά δερματικών καρκίνων είναι η Αυστραλία και η Νέα Ζηλανδία, ακολουθούμενες από χώρες της Βόρειας Ευρώπης, ύστερα της κεντρικής, της Αμερικής και τον Καναδά [119]. Με αυτά τα δεδομένα είναι εύκολα αντιληπτό πως ο τύπος του δέρματος²¹, η διαλείπουσα και έντονη έκθεση στον ήλιο είναι βασικοί λόγοι για την καλπάζουσα αυτή μορφή καρκίνου τις τελευταίες δεκαετίες. Οι Whiteman και οι συνεργάτες του μελέτησαν στατιστικά τριών δεκαετιών (1982-2011) για να καταγράψουν τις τρέχουσες τάσεις και να προβλέψουν το μέλλον για τον δερματικό καρκίνο. Οι χώρες μελέτης ήταν οι ΗΠΑ, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Σουηδία, η Νορβηγία, η Αυστραλία και η Ν. Ζηλανδία και το αντικείμενο ήταν λευκοί άνδρες και γυναίκες. Σε όλες τις χώρες πλην των δύο τελευταίων παρατηρείται σταθερή αύξηση της τάξης του 3% ετησίως με τον χρονικό ορίζοντα αύξησης να υπολογίζεται ως το έτος 2022. Στις δύο τελευταίες από την άλλη χώρες, στην Αυστραλία η συχνότητα εμφάνισης μελανώματος απο το 2005 και μετά εμφανίζει μείωση, ενώ σύντομα θα αρχίζει να μειώνεται και ο αριθμός κρουσμάτων στη Νέα Ζηλανδία[119].

Το πιο κοινό καρκίνωμα, το BCC, αν και αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό των δερματικών καρκίνων είναι το λιγότερο επιθετικό παρουσιάζοντας χαμηλό ποσοστό κακοήθειας και χαμηλό δυναμικό μετάστασης. Πέραν των παραγόντων της ηλικίας και του φύλου, το BCC σχετίζεται με γενετικές ασθένειες (πχ σύνδρομο Gorlin-Goltz) και τον τύπο του δέρματος (κίνδυνος σε άτομα που ανήκουν στις δύο πρώτες κατηγορίες του Fitzpatrick scale). Ωστόσο ο σημαντικότερος παράγοντας ανάπτυξης BCC είναι η υπεριώδης (UV) ακτινοβολία.

Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα από την άλλη είναι μια κατηγορία αυξημένου κινδύνου, με βασικό χαρακτηριστικό τη διηθητικότητα των πλακωδών κυττάρων και

²¹ Τύπος δέρματος κατά σκάλα Fitzpatrick: Τρόπος κατάταξης κατηγορίας δέρματος ανάλογα τη συχνότητα «κοκκινίσματος» από ήλιο και την ικανότητα στο μαύρισμα από τον ήλιο. Τα στάδια κατάταξης είναι 6, Type I – Type VI.

τη μετάστασή τους. Ακόμα, το SCC παρουσιάζει αξιοσημείωτη υποτροπή ανάλογα το μέγεθος του όγκου, το βάθος διήθησης, την ιστολογική διαφοροποίηση και το ανοσοποιητικό σύστημα του πάσχοντα. Όπως και στο BCC ο δερματικός τύπος παίζει μεγάλο ρόλο στην εμφάνιση του συγκεκριμένου υποτύπου με άτομα που ανήκουν στην 1^η και 2^η βαθμίδα της σκάλας Fitzpatrick. Κληρονομικές δερματικές παθήσεις όπως ο αλμπινισμός, η ακροχορδονοειδής επιδερμοδυσπλασία (EV), η μελαγχρωματική ξηροδερμία, αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης του SCC ενώ πολλές μελέτες έχουν αποδείξει τη σχέση μεταξύ τύπων HPV και ανθοκυτταρικού καρκινώματος. Και σε αυτόν τον τύπο καρκίνου η μεγαλύτερη αιτία εμφάνισής του είναι η UVB ακτινοβολία. Πράγματι, οι περισσότερες διαγνώσεις και στο SSC συμβαίνουν στις χώρες με καυκάσιους πληθυσμούς και με συνεχή ήλιο. Το συνηθέστερο σημείο εμφάνισης SCC στο ανθρώπινο σώμα είναι το κεφάλι και ο λαιμός, τα χέρια και τα πόδια με ποσοστά 55%, 18%, 13% αντίστοιχα [120].

Συνοψίζοντας, η βασική κοινή συνιστώσα και των δύο βασικών δερματικών καρκίνων, του μελανώματος και του NMSC, είναι η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία και ο τύπος δέρματος. Η στατιστική πρωτιά των κατοίκων της Αυστραλίας και Νέας Ζηλανδίας σχετίζεται ευθέως με την αραίωση των στρωμάτων όζοντος που υπάρχει στην περιοχή («τρύπα του όζοντος»), ενώ και οι έποντες στη στατιστική κάτοικοι της βόρειας Ευρώπης με τον ανοιχτό τύπο επιδερμίδας δικαιολογούν τις υψηλές θέσεις που καταλαμβάνουν στη σχετική κατάταξη του World Cancer Research Fund.

4.2.4.1 Βιολογία του Δερματικού Καρκίνου.

Κάθε καρκινικός τύπος έχει δικά του μοριακά χαρακτηριστικά και καρκινικές υπογραφές. Για το μελάνωμα ο World Health Organization ταξινομεί την ασθένεια σε 4 βασικούς υποτύπους: το μελάνωμα επιφανειακής εξάπλωσης (SSM), το φακοειδές μελάνωμα (LMM), το οζώδες μελάνωμα (NM) και το ακραίο φακοειδές μελάνωμα (ALM). Μια ακόμα κατάταξη περιλαμβάνει τα καρκινώματα από επιδερμική ζημιά από χρόνια έκθεση στον ήλιο (SCD) και τα μη οφειλόμενα από χρόνια έκθεση στον ήλιο (non-SCD). Στην πρώτη κατηγορία έχουμε μη συχνή εμφάνιση μεταλλαγμένου BRAF, ενώ μεταλλάξεις του c-KIT²² γονιδίου έχουν ποσοστό εμφάνισης γύρω στο 20%. Στη δεύτερη υπάρχει αντιστροφή, καθώς το BRAF είναι συχνά μεταλλαγμένο ενώ δεν υπάρχει μεταλλαγμένο c-KIT. Οι μεταλλάξεις του BRAF είναι αρκετά συχνές

²² Το γονίδιο c-KIT κωδικοποιεί τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη CD117 που ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων κινάσης.

και στο SSM και στο NM ενώ και στους δύο τύπους φακοειδών καρκινωμάτων κυριαρχεί η παρουσία μεταλλαγμένου KIT. Επίσης το γονίδιο NRAS παρατηρείται μεταλλαγμένο σε πρωτογενή μελανώματα σε ποσοστά της τάξης του 15%-20%. Στα φακοειδή και ακραία φακοειδή μελανώματα εντοπίζονται κατά κύριο λόγο πλην του KIT τα TP53, BRAF, NRAS, CDKN2A και MIFT ως από κοινού μεταλλάξεις. Στο BCC κυριαρχούν τα PTCH1/2, TP53 και SMO και στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα οι μεταλλάξεις των TP53, HRAS/KRAS. Τα ΜΚΣ RTK-RAS-ERK, του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης, HIPPO και NF-κΒ είναι τα βασικά μονοπάτια που αλλοιώνονται κατά κόρον στην ασθένεια του δερματικού καρκίνου.

Πίνακας 4.11: Γονίδια που εμπλέκονται στο δερματικό καρκίνο ανά υπότυπο και τα ΜΚΣ που μετέχουν [121-124].

Γονίδιο	Τύπος Καρκίνου	ΜΚΣ	Γονίδιο	Τύπος Καρκίνου	ΜΚΣ
MTAP	NM,SSM	Meth. Salvage	CDKN2A	LMM, ALM	Cell Cycle
G3BP2		NF-κΒ	TP53		TP53
SEC23IP		NF-κΒ	PITCH 1/2	BASAL	HIPPO
USO1		ERK	SMO		HIPPO
ZNF668		TP53	TP53		TP53
DIS3		Cell Cycle	MYC		Μεταγραφικοί Ρυθμιστές
FGFR10P		Hedgehog	PPP6C		Cell Cycle
EPB4IL3		PI3K-Akt	PTPN14		HIPPO
ALDH7A1		Καταβολισμού Λυσίνης	STK19		RAS
G3BP2		NF-κΒ	LATS1		HIPPO
SEC23IP	Early secretory	TERT	ERK		
USO1	ERK/Akt	TP53	TP53		
DIS3	Cell Cycle	CDKN2A	Cell Cycle	SQUAMOUS	
FGFR10P	Hedgehog	NOTCH1	NOTCH		
BRAF	RAF	AJUBA	HIPPO		
NRAS	RAS	HRAS	RAS		
KIT	JAK/PI3K/RAS	CASP8	Αποπτωτικό ΜΚΣ		
CCND1	RB1/CDK	FAT1	ERK		
MIFT	Wnt/β-Κατενίνης	KMT2C	Wnt		

4.2.4.2 Διάγνωση και βιοδείκτες του Καρκίνου του δέρματος.

Η πιο συνηθισμένη τεχνική διάγνωσης εδώ και δεκαετίες για τον δερματικό καρκίνο είναι η δερματοσκόπηση. Είναι μια μη επεμβατική, ανώδυνη τεχνική που βασίζεται στη χρήση προσπίπτοντος φωτός (πολωμένου/μη πολωμένου φωτός) ώστε να γίνουν αντιληπτές δερματικές βλάβες, μεγεθύνοντας τις δερματικές δομές σε επίπεδα ανώτερα του μεγεθυντικού φακού. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται η ψηφιακή δερματοσκόπηση, η οποία έχει δύο στάδια: πρώτα αξιολογείται η βλάβη και ύστερα εάν εντοπιστεί μελανοκυτταρική αλλοίωση ταυτοποιείται ως προς την κακοήθεια. Μετα-αναλύσεις κλινικές και πειραματικές καταδεικνύουν πως η

δερματοσκόπηση είναι τεχνική υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας στη διερεύνηση δερματικών βλαβών και την αναγνώριση των κακοηθειών, ειδικά αν αυτή συνδυάζεται με την ολόσωμη χαρτογράφηση δέρματος. Μια πιο σύγχρονη αλλά και πιο ακριβή τεχνική είναι η διάγνωση μέσω συνεστιακής μικροσκόπησης (reflectance confocal microscopy). Η τεχνική αυτή επιτρέπει υψηλή διαγνωστική ευχέρεια και ανάλυση σε πραγματικό χρόνο σε κυτταρικό επίπεδο (0,5-1μm), επικαλύπτει αυτή της δερματοσκόπησης, καθώς εντοπίζει βλάβες που δεν είναι δυνατό να εντοπιστούν από την τελευταία, δίνει ακρίβεια στη διαφορική διάγνωση όπως και τη δυνατότητα του χαρακτηρισμού και της κατάταξης των βλαβών σε καρκινικούς υποτύπους.

Οι σύγχρονες οπτικές τεχνικές είναι αρκετά ακριβείς οπότε η ύπαρξη καρκινικών δεικτών είναι σχετικά περιορισμένη. Ας μην ξεχνάμε πως εν αντιθέσει με τους άλλους τύπους καρκίνου ο δερματικός είναι ασθένεια που ξεκινά με αλλοιώσεις της επιδερμίδας, οπότε η επιστήμη προσανατολίζεται στην καλύτερη οπτική διάγνωση. Οι βιοδείκτες της νόσου είναι συνηθέστερα αυτοί του μελανώματος, καθώς αυτό είναι η επιθετικότερη μορφή από τους δύο βασικούς υποτύπους. Θα κάνουμε καταγραφή των δεικτών και για τους δύο βασικούς υποτύπους ξεκινώντας από αυτό.

Δεδομένης της ιστολογικής πολυμορφίας του μελανώματος η διάγνωση με τις παραπάνω τεχνικές μπορεί να αποδειχθεί εξαιρετικά προκλητική. Η χρήση βιοδεικτών μπορεί να συνεπικουρήσει στην έγκαιρη διάγνωση δίνοντας μια αποφασιστική κατεύθυνση ως προς τη φύση των αλλοιώσεων όπου τα οπτικά μέσα αποτυγχάνουν να δώσουν με βεβαιότητα αποτελέσματα. Οι πρωτεΐνες δέσμευσης ασβεστίου της οικογένειας S100 και πιο συγκεκριμένα οι S100B, S100A4 έχουν θεωρηθεί αρκετά υποσχόμενοι βιοδείκτες μιας και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πληθώρα τεστ, όπως ως δείκτες προόδου του μελανώματος, δείκτες αιτιολογίας της ασθένειας ή ακόμα και ως αρωγοί της θεραπείας. Άλλοι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες (IHC Markers) που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση του μελανώματος είναι ο HMB-45. Η Melan-A, η τυροσινάση και ο μεταγραφικός παράγοντας μικροφθάλμιας (MIFT).

Πίνακας 4.12: Καρκινικοί δείκτες και τα χαρακτηριστικά τους στο μελάνωμα

Είδος Πρωτεΐνης /Αντιγόνου	Γονίδιο	IHC Δείκτης	Ευαισθησία	Ειδικότητα (Μελανοκυτταρικό έναντι μη μελανοκυτταρικού)	Ευαισθησία σε μεταστατικές αλλοιώσεις
Pmel/Pmel 17/ SILV/gp100	PMEL	HMB-45	72%-100%	91%-100%	58%-95%

Melan-A	MLANA	A103	83%-100%	81%-98%	71%-88%
Tyrosinase	TYR	T311	90%-100%	97%-100%	66%-93%
MITF	MITF	C5, D5	100%	87%-100%	77%-100%
SM5-1	FN1	SM5-1 IgG1	95%-99%	100%	86%-100%
Υπεροικο- γένεια S100 (S100B, S100A2, S100A4, S100A6, S100A8/A9, S100A13, S100P)	-----	Polyclon al antibody	89%-100%	70%-79%	91%-96%
CSPG4/HM W-MAA	CSPG4	VF1- TP41.2, and VT80.12	89%	-----	86%-100%

Μαζί με τους ανοσοϊστοχημικούς δείκτες, οι δείκτες ορού έχουν κερδίσει έδαφος στη μελέτη του μελανώματος. Αντιγόνα σχετιζόμενα με το μελάνωμα, τη μελανίνη, τα μόρια προσκόλλησης, οι παράγοντες αγγειογένεσης και οι κυτοκίνες αποτελούν βασικές επιλογές. Από τους πρώτους βιοδείκτες που έχουν μελετηθεί η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH), χρησιμοποιείται ως δείκτης προόδου της ασθένειας λόγω της υψηλής ειδικότητας που την χαρακτηρίζει (σε προχωρημένα στάδια κυρίως). Δυστυχώς η ευαισθησία του LDH (72%) δεν είναι ακόλουθη των επιπέδων της ειδικότητας (92%). Η πρωτεΐνη CRP (C-reactive protein) έχει κι αυτή μελετηθεί ως προς τα χαρακτηριστικά της, ειδικά στα πρώτα στάδια, καθώς η αύξησή της έχει συσχετιστεί με διάφορες κακοήθειες. Πράγματι, μια αυξημένη της τιμή μπορεί να θεωρηθεί ως ικανός δείκτης παρακολούθησης της προόδου των πρώτων σταδίων του μελανώματος. Ως ισχυρός δείκτης της προόδου της ασθένειας λογίζεται και η MIA (Melanoma Inhibitory Activity protein), πρωτεΐνη που εκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα του μελανώματος αλλά όχι σε υγιή μελανοκύτταρα και ο ρόλος της είναι η ρύθμιση της προόδου των καρκινικών κυττάρων και η μετάστασή τους. Μέσω της MIA ρυθμίζεται η έκφραση μεταγραφικών ρυθμιστών όπως ο MITF, ο οποίος παίζει κυρίαρχο ρόλο στην ασθένεια. Η MIA ενώ είναι ως δείκτης ευαίσθητος, η ειδικότητά της όμως είναι ελλειμματική, καθώς μια ανεβασμένη τιμή της μπορεί να σηματοδοτεί την ύπαρξη άλλων νεοπλασμάτων όπως αυτά των πλακωδών κυττάρων. Ως δυνητικοί προγνωστικοί βιοδείκτες πρέπει να θεωρούνται και τα pSTAT1, pSTAT3. Έχει αποδειχθεί πως το STAT3 είναι ενεργοποιημένο στο μελάνωμα όπως επίσης και πως μια υψηλή τιμή του λόγου pSTAT1/ pSTAT3 σηματοδοτεί θετική πρόγνωση για την επιβίωση [127]. Μέλη μιας ακόμα υπεροικογένειας, αυτής των

μεταλλοπρωτεΐναιών (MMPs), τα MMP-2, MMP-23, MMP-12 έχει αποδειχθεί πως έχουν και αυτά ισχυρή παρουσία στο μελάνωμα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες. Για την διάγνωση του μελανώματος σε αρχικά στάδια έχουν επιστρατευτεί και τεχνικές που περιλαμβάνουν TAAbs. Σε μία από τις πιο πρόσφατες απόπειρες κατασκευής ενός ευαίσθητου πάνελ σε αντιγόνα πρωταρχικών αλλοιώσεων οι Zaenker και συνεργάτες χρησιμοποίησαν συστοιχία 1627 πρωτεϊνών και ορό από 245 από ασθενείς με πρωταρχικό μελάνωμα και κατέληξαν σε 10 καρκινικούς δείκτες, των οποίων ο συνδυασμός δίνει τη βέλτιστη συσχέτιση ευαισθησίας/ειδικότητας. Τα 10 αντιγόνα ήταν: ZBTB7B, PRKCH, TP53, PCTK1, PQBP1, UBE2V1, IRF4, MAPK8_tv2, MSN,TPM1, με το ποσοστό ευαισθησίας 79% και ειδικότητα στο 84% [129]. Τα χαρακτηριστικά αυτά θα μπορούσαν να προσθέσουν στις μεθόδους εξέτασης, αυξάνοντας την ακρίβεια της διάγνωσης στα αρχικά στάδια.

Πέραν των πρωτεϊνικών βιοδεικτών, ως τέτοιοι χρησιμοποιούνται και νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA), μετά από διερεύνηση μέσω τεχνικών PCR και μικροσυστοιχιών. Ο παράγοντας 3 μεταγραφής PAX-3 και το MAGE-A3 έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, ενώ τεχνικές ιστολογικής ανίχνευσης μεταλλαγμένου BRAF με πιο συνηθισμένη τη V600E έχουν δείξει αρκετά καλά χαρακτηριστικά, ανακηρύσσοντας το BRAF ως καλό προγνωστικό δείκτη και δείκτη προσανατολισμού κατάλληλης θεραπείας. Η υπερμεθυλίωση νησίδων CpG που οδηγεί σε γονιδιακή σίγηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή γονιδίων που σχετίζονται με την ογκογένεση (TRGs) έχει παρατηρηθεί πως εμπλέκεται στη διάρκεια ανάπτυξης των μελανωμάτων. Η επιγενετική αυτή αδρανοποίηση των TRGs είναι χαρακτηριστικό όλων των σταδίων εξέλιξης της κακοήθειας, από την δημιουργία ως τη μετάσταση. Έτσι η διερεύνηση και αξιολόγηση των επιπέδων μεθυλιωμένου DNA και η εξέταση για την ύπαρξη τροποποιημένων TRGs είναι μια καλή προσέγγιση για τη διάγνωση του δερματικού καρκίνου. Όντως τα TRGs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καρκινικοί δείκτες διάγνωσης και αξιολόγησης προόδου. Για παράδειγμα το ογκοκατασταλτικό RASSF1A που εμπλέκεται στην απόπτωση, στη μετανάστευση και στη μετάσταση στο μελάνωμα εμφανίζεται αδρανοποιημένο. Με τη χρήση PCR και τεχνικών ηλεκτροφόρησης οι Temura και συνεργάτες εξέτασαν τη μεθυλίωση των CpG νησίδων έξι TRGs του μελανώματος (WIF1, TFPI2, RASSF1A, RAR-β2, SOCS1 και GATA4) και μια ομάδα μεθυλιωμένων σε όγκους (methylated-in-tumor-MINT) μη κωδικοποιούντων αλληλουχιών (MINT1, MINT2, MINT3, MINT12, MINT17, MINT25 και MINT31). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως παρατηρείται αύξηση της υπερμεθυλίωσης των WIF1,

TFPI2, RASSF1A και SOCS1 παράλληλα με την πρόοδο των σταδίων του όγκου[125]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει και η χρησιμοποίηση των miRNAs στη διάγνωση, τη πρόγνωση και στη θεραπευτική διαδικασία. Είναι αποδεδειγμένο γεγονός πως μέσω της μεθυλίωσης των CpG νησίδων ρυθμίζεται η έκφραση του miR-375 στα μελανωματικά κύτταρα, με παράλληλο ρυθμό αύξησης ανάλογα του σταδίου του μελανώματος. Ένα άλλο miRNA, το miR-34b είναι ένας ακόμα πιθανός βιοδείκτης της ασθένειας με παρόμοια χαρακτηριστικά επιπέδων ρύθμισης με το miR-375, ανάλογα με το στάδιο της νόσου [126, 128].

4.2.4.3 Βιοπληροφορική ανάλυση των πρωτεϊνών που σχετίζονται άμεσα με τον καρκίνο δέρματος.

. Παρατηρούμε ανά κατηγορία τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον δερματικό καρκίνο. Ξεκινώντας από τους μη μελανωματικούς τύπους και συγκεκριμένα το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα βλέπουμε πως τα γονίδια TP53, HRAS, KRAS και CDKN2A είναι βασικά γονίδια στην ογκογένεση.

Πρωτεΐνη: GTPase HRas
Γονίδιο: HRAS

Οργανισμός	Ομοιότητα
Rattus norvegicus	100%
Mus musculus	100%
Murine sarcoma virus NS.C58	99,5%
Moloney murine sarcoma virus	98,9%
Gallus gallus	97,9%
Harvey murine sarcoma virus(p29)	98,4%
Rasheed rat sarcoma virus(p29)	98,4%
Sus scrofa(NRAS)	85,6%
Mus musculus(NRAS)	86,7%
Gallus gallus (NRAS)	85,1%
Cavia porcellus(NRAS)	85,6%
Rattus norvegicus(NRAS)	86,8%
Mus musculus(KRAS)	86,8%
Rattus norvegicus(KRAS)	85,1%
Pongo abelii (KRAS)	85,1%
Monodelphis domestica (NRAS)	84,6%
Xenopus laevis(NRAS)	84,6%
Carassius auratus (Ras-like protein)	90,4%

Το γονίδιο HRAS έχει μία ισομορφή το HRAS Isoform 2 με το οποίο εμφανίζει ποσοστό ομοιότητας 81,481%, με τις αλληλουχίες στην πολλαπλή στοίχιση να είναι ταυτόσημες από το 1^ο έως το 151^ο αμινοξύ.


```

>P01112
121 AARTVESRQAQDLARSYGIPYIETSAKTROGVEDAFYTLVREIRQHKLRKLNPPDESGPG 180
181 CMSCKCVLS 189
>P01112-2
121 AARTVESRQAQDLARSYGIPYIETSAKTROGSRSGSSSSSGTL-----WDPPG----- 168
***** ... : : :**
169 PM----- 170
*

```

Πρωτεΐνη: GTPase KRas
Γονίδιο: KRAS

Οργανισμός	Ομοιότητα
Rattus norvegicus	98,9%
Mus musculus	98,9%
Kirsten murine sarcoma virus	96,8%
Carassius auratus(Ras-like protein)	95,6%
Meleagris gallopavo	90,5%
Gallus gallus (HRAS)	88,4%
Cyprinus carpio	89,4%
Oryzias latipes	89,4%
Monodelphis domestica	89,9%
Rattus norvegicus (Isoform 2B)	88,9%
Xenopus laevis (NRAS)	90,2%
Kryptolebias marmoratus	89,4%
Mus musculus (Isoform 2B)	88,4%
Gallus gallus (NRAS)	87,9%
Rattus norvegicus (NRAS)	87,4%
Rattus norvegicus (HRAS)	86,8%
Mus musculus (HRAS)	86,8%
Sus scrofa (NRAS)	86,8%
Cavia porcellus (NRAS)	86,8%

Η GTPase KRas έχει ισομορφή την Isoform 2b of GTPase KRas και εμφανίζουν ποσοστό ομοιότητας 89,947%. Οι δύο αλληλουχίες η ταυτίζονται από το 1^ο αμινοξύ ως το 150^ο. Οι αλληλουχίες που δίνονται ξεκινούν από το 121^ο αμινοξύ.

```

>P01116
PSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTROGVEDAFYTLVREIRQYRLKKISKEEKTIPG
VKIKKCIIM
>P01116-2
PSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTROGVDDAFYTLVREIRKHKKEKM-SKDGKKKK
***** * :*****::: * **: *.
KSKTKCVIM
. .**:**

```

Στο βασικοκυτταρικό καρκίνωμα συναντάμε τα ογκογονίδια SHH, SMO και τα ογκοκατασταλτικά TP53, PTCH1.

Πρωτεΐνη: Sonic Hedgehog protein
Γονίδιο: SHH

Οργανισμός	Ομοιότητα
Rattus norvegicus	87,5%
Mus musculus	87,4%
Gallus gallus	77,1%
Cynops pyrrhogaster	67,7%
Danio rerio(A)	64,5%
Xenopus laevis	66,2%
Danio rerio(Tiggy-winkle)	63,2%
Gallus gallus (Indian)	59,7%
Mus musculus	57,0%
Xenopus laevis	56,0%
Danio rerio (Indian B)	57,2%
Mus musculus (Desert)	54,1%

Πρωτεΐνη: Smoothened homolog
Γονίδιο: SMO

Οργανισμός	Ομοιότητα
Rattus norvegicus	92,9%
Mus musculus	92,8%
Gallus gallus	76,6%
Drosophila melanogaster (protein smoothened)	42,8%

Πρωτεΐνη: Protein patched homolog1
Γονίδιο: PTCH1

Οργανισμός	Ομοιότητα
Mus musculus	95,3%
Gallus gallus	88,1%
Dario dario	63,1%

Οι ισομορφές του Protein patched homolog 1 (μήκος 1447 αα) είναι 3: Isoform L, M και S of Protein patched homolog 1 (μήκος 1446, 1381 και 1296 αα αντίστοιχα). Στην πολλαπλή στοίχιση με την αρχική εμφάνισαν συνολικό ποσοστό ομοιότητας 88,767%.

>Q13635

-----MASAGNAAEPQDRGGGGS-GC--IGAPGRPAGGGR-RRRTGGLRRAAAPDR 47
DYLHRPSYCDAAFALEQISKGKATGRKAPLWLRKAFQRLLEFKLGCYIQKNCGKFLVVGLL 107
IFGAFAVGLKAAANLETNVEELWVEVGGGRVSRELNYTRQKIGEEAMFNPQLMIQTPKEEGA 167

>Q13635-2

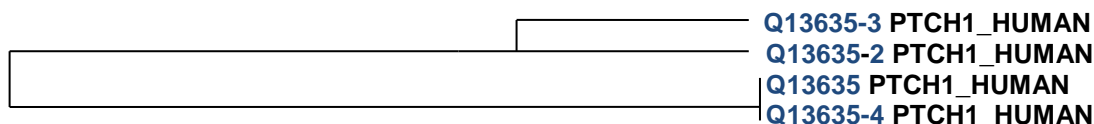
MELLNRNRLVIVSPRCTPPKASGGPARRGFYTFRSFCKDGGGGEEEEENGGEKDDR--- 57
-----GDKETRSDK GKATGRKAPLWLRKAFQRLLEFKLGCYIQKNCGKFLVVGLL 106
IFGAFAVGLKAAANLETNVEELWVEVGGGRVSRELNYTRQKIGEEAMFNPQLMIQTPKEEGA 166

```

>Q13635-3
----- 0
-----MGKATGRKAPLWLRAKFQRLLEFKLGCYIQKNCGKFLVVGLL 41
IFGAFAVGLKAANLETNVEELWVEVGGGRVSRRELNYTRQKIGEEAMFNPNQLMIQTPKEEGA 101
>Q13635-4
----- 0
----- 0
-----MFNPNQLMIQTPKEEGA 16
*****

```

Δένδρο



Στο μελάνωμα τα βασικά ογκογονίδια που εμπλέκονται είναι το BRAF, το NRAS, το CDK4 και το MITF. Από τα ογκοκατασταλτικά παρατηρούμε το PTEN, το INK4a/ARF και p53.

Πρωτεΐνη: GTPase NRas

Γονίδιο: NRAS

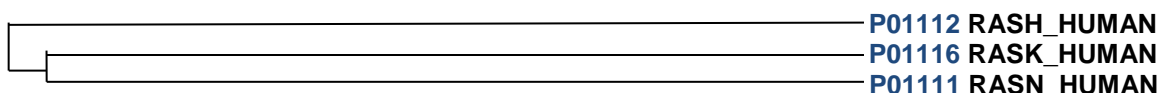
Οργανισμός	Ομοιότητα
Sus scrofa	100,0%
Cavia porcellus	99,5%
Rattus norvegicus	99,5%
Pongo abelii	99,5%
Mus musculus	98,4%
Monodelphis domestica	98,4%
Gallus gallus	96,8%
Xenopus laevis	92,6%
Danio rerio	90,5%
Gallus gallus (HRAS)	86,7%
Rattus norvegicus (KRAS)	87,9%
Mus musculus (KRAS)	87,9%
Rattus norvegicus (HRAS)	85,6%
Mus musculus (HRAS)	85,6%
Murine sarcoma virus NS.C58 (HRAS)	85,1%

Οι πρωτεΐνες GTPases NRas, HRas, KRas είναι μέλη της GTPase υπεροικογένειας συνολικά και παράλληλα σχηματίζουν οι τρεις τους μια οικογένεια, την RAS. Στη μέθοδο blast που εκτελέστηκε άνω για τις τρεις πρωτεΐνες παρατηρήθηκε μεγάλο ποσοστό ομοιότητας μεταξύ τους. Στοιχίζοντας τις τρεις ακολουθίες παρατηρούμε τα εξής: η KRas με τη HRas εμφάνισαν ποσοστό ομοιότητας 86,316%, όσο και η KRas με την NRas, ενώ το ζευγάρι HRas-NRas έχει

ομοιότητα της τάξης του 85,185%. Στο σύνολό τους μέσω στοίχισης και των τριών παρατηρούμε πους εμφανίζουν 81,053% ομοιότητα.

```
>P01116
QEEYSAMRDQYMRGTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKRVKDSDDVPMVLVGNKCDL 120
PSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGVEDAFYTLVREIRQYRLKKISKEE-KTPG 179
CVKIKKCIIM 189
>P01112
QEEYSAMRDQYMRGTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHQYREQIKRVKDSDDVPMVLVGNKCDL 120
AARTVESRQAQDLARSYGIPYIETSAKTRQGVEDAFYTLVREIRQHKLRLKNPPDES GPG 180
CMSCK-CVLS 189
>P01111
QEEYSAMRDQYMRGTGEGFLCVFAINNSKSFADINLYREQIKRVKDSDDVPMVLVGNKCDL 120
*****:*** **: *****:*****
PTRTVDTKQAHELAKSYGIPFIETSAKTRQGVEDAFYTLVREIRQYRMKLNSSDDGTQG 180
:***::*:**:*:***** *****:.*: *
CMGLP-CVVM 189
*: *::
```

Δένδρο



Πρωτεΐνη: Serine/threonine-protein kinase B-raf

Γονίδιο: BRAF

Οργανισμός	Ομοιότητα
Gallus gallus (Isoform)	93,9%
Gallus gallus	89,2%
Coturnix japonica	89,2%
Mus musculus	87,2%
Avian rous-associated virus type 1 (transforming protein Rmil)	97,9%
Bos taurus (RAF proto-ocogene)	56,7%
Rattus norvegicus(RAF proto-ocogene)	57,1%
Gallus gallus (RAF proto-ocogene)	59,1%

Πρωτεΐνη: Cyclin-dependent kinase 4

Γονίδιο: CDK4

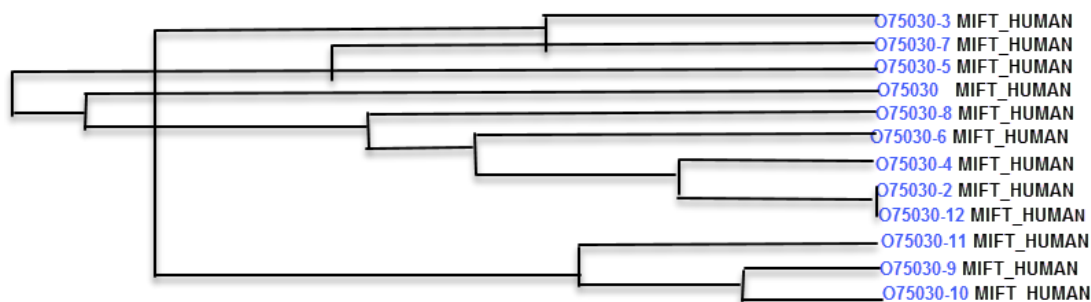
Οργανισμός	Ομοιότητα
Sus scrofa	98,0%
Ovis aries	97,0%
Bos taurus	97,0%
Rattus norvegicus	95,0%
Mus musculus	94,7%
Xenopus laevis	77,2%
Mus musculus (CDK6)	70,7%

Πρωτεΐνη: Microphthalmia-associated transcription factor
Γονίδιο: MITF

Οργανισμός	Ομοιότητα
Mus musculus	94,5%
Rattus norvegicus	94,1%
Mus musculus (Isoform H)	94,3%
Mus musculus (Isoform M)	93,9%

Η πρωτεΐνη Microphthalmia –associated transcription factor έχει 11 ισομορφές, τις Isoform A2 (Uniprot entry:[O75030-2](#)), Isoform B1 (Uniprot entry:[O75030-3](#)), Isoform B1 (Uniprot entry:[O75030-3](#)), Isoform B2 (Uniprot entry:[O75030-4](#)), Isoform C1 (Uniprot entry:[O75030-5](#)), Isoform C2 (Uniprot entry:[O75030-6](#)), Isoform H1 (Uniprot entry:[O75030-7](#)), Isoform H2 (Uniprot entry:[O75030-8](#)), Isoform M1 (Uniprot entry:[O75030-9](#)), Isoform M2 (Uniprot entry:[O75030-10](#)), Isoform Mdel (Uniprot entry:[O75030-11](#)) of Microphthalmia-associated transcription factor. Στην πολλαπλή στοίχιση και των 12 ακολουθιών ανακαλύψαμε πως έχουν ποσοστό ομοιότητας 64,972% μεταξύ τους.

Δένδρο:



Και πάλι παρατηρούμε έπειτα από ανάλυση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον δερματικό καρκίνο πως αυτές εμφανίζουν ομοιότητα με οργανισμούς όπως ο κοινός καστανός αρουραίος (*Rattus norvegicus*), ο ταύρος (*Bos taurus*) και ο σπιτικός ποντικός (*Mus musculus*) και το ψάρι ζέβρα (*Danio rerio*).

Βιβλιογραφία 4^{ου} κεφαλαίου

1. Χρυσανθακόπουλος Α. Νικόλαος (2016). **Μονοπάτια Κυτταρικής Σηματοδότησης στην Παθολογία του Καρκίνου**, Αχαϊκή Ιατρική, Τόμος 35^{ος}, Τεύχος 1.
2. Sever R, Brugge J.S (2015). **Signal transduction in Cancer**, Cold Spring Perspectives in Medicine, April, 5(4): a006098.
3. Cerami E.G., Gross B.E. et al. (2011). **Pathway Commons, a web resource for biological pathway data**. Nucleic Acids Res, 39: D685-D690.
4. Weinstein J.N, et al. (2013). **The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project**, Nature Genetics, Oct; 45(10):1113-20.
5. Nature Human Genome Research Institute (2018). **The Cancer Genome Atlas: Charting the Course for Cancer Research**, June 7.
6. Jun Li, Yiling Lu et al, (2013). **TCPA: a resource for cancer functional proteomics data**, Nature Methods **10**, 1046-1047.
7. Cargnello M, Roux P.P (2011). **Activation and function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK Activated Protein Kinases**, Microbiology and Molecular Biology Reviews, Mar; 75(1): 50-83.
8. Sundaram M.V (2005-2018). **Canonical RTK-RAS-ERK signaling and related alternative pathways**, Wormbook: The online Review of C. elegans Biology, Pasadena (CA)
9. Li Lei, Zhao G,D (2016), **The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC**, Oncology Letters, Nov; 12(5): 3045-3050.
10. Fransén K, Klintenäs M (2004), **Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas**. Carcinogenesis. Apr; 25(4):527-33.
11. Roskoski R.Jr. (2012). **ERK1/2 MAP Kinases: structure, function and regulation**. Pharmacological Research, Aug; 66(2): 105-43.
12. Patel A.L, Shvartsman S.Y (2018). **Outstanding questions in developmental ERK signaling**. Development, 26July, 145:dev143818.
13. Check M.P, (2000). **PIP2 and PIP3, Complex Roles at the Cell Surface**, Cell vol.100, March 17, P603-606.
14. <https://www.creative-diagnostics.com/PI3K-AKT-Signaling-Pathway.htm>

15. Ducharte Y, Kim Yong-Mi, Kahn M (2016). **The Wnt Signaling Pathway in Cancer**, Critical Reviews in Oncology/Hematology, Mar: 99:141-149.
16. Boutros M, Zhan T, Rindtorff N (2017). **Wnt signaling in cancer**, Oncogene, Mar; 36(11): 1461-1473.
17. Brenner S, Miller J (2001). **Brenner's Online Encyclopedia of Genetics**, Academic Press.
18. Sandal T (2002). **Molecular Aspects of the Mammalian Cell and Cancer**. The Oncologist, Jan 11.
19. CDKN2A gene, **cyclin dependent kinase inhibitor 2A**. U.S. National Library of Medicine. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CDKN2A>
20. Mina et al (2017). **Conditional Selection of Genomic Alterations Dictates Cancer Evolution and Oncogenic Dependencies**, Cancer Cell32, 155–168.
21. Dao P, Kim Y.A. (2017). **Bewith: A Between- Within Method to discover relationships between cancer modules via integrated analysis of mutual exclusivity, co-occurrence and functional interactions**, Plos Computational biology, Oct 12, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005695.
22. Szczurek, E., & Beerenwinkel, N. (2014). **Modeling Mutual Exclusivity of Cancer Mutations**. Plos Computational biology, 10(3), doi:10.1371/journal.pcbi.1003503
23. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
24. Rubin SA (1991). **Lung cancer: Past, Present and Future**, Journal of Thoracic Imaging, Dec; 7(1): 1-8.
25. Peretti-Watel P, Constance J (2009). **"It's All We Got Left". Why Poor Smokers are Less Sensitive to Cigarette Price Increases**. International Journal of Environmental Research and Public Health, Feb; 6(2): 608-621.
26. Yach D, (1986). **The impact of smoking in developing countries with special reference to Africa**, International journal of health services: planning, administration, evaluation, 16(2): 279-92.
27. Bayat M, Pillay B, Cassimjee M, (1998). **Cigarette smoking behavior among South African Indian high school students**. Journal of family and Community Medicine, Jan-Jun; 5(1): 51-57.
28. De Groot P, Wu C, (2018). **The epidemiology of lung Cancer**. Translational Lung Cancer Research, Jun7 (3):220-233.
29. Dela Cruz C, Tanoue L.T, Matthay R, (2016). **Lung Cancer: Epidemiology, Etiology and Prevention**. Clinics in Chest Medicine, Dec; 32(4): 10.1016
30. <https://www.hesmo.gr/images/ESMO/ESMO-ACF-Greek-NSCLC-Guide-for-Patients.pdf>

31. Lynch TJ, Bell DW (2004). **Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib.** *The New England journal of medicine.* 20; 350(21):2129-39.
32. Li X, Asmitanada T, Gao L (2012). **Biomarkers in the lung cancer diagnosis: a clinical perspective,** *Neoplasma* 59(5): 500-7.
33. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan Om, (2015). **Lung cancer: biology and treatment options.** *Biochimica et Biophysica Acta,* Dec; 1856(2): 189-210.
34. Yu Z., Chen X., Cui L., Si H., Lu H., Liu S. (2014). **Prediction of lung cancer based on serum biomarkers by gene expression programming methods.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention;* 15:9367–9373. doi: 10.7314
35. Bigbee WL, Gopalakrishnan V, Weissfeld JL, (2012). **A multiplexed serum biomarker immunoassay panel discriminates clinical lung cancer patients from high-risk individuals found to be cancer-free by CT screening.** *Journal of Thoracic Oncology,* Apr; 7(4):698-708.
36. Patz EF Jr, Campa MJ, Gottlin EB, (2007). **Panel of serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer.** *Journal of Clinical Oncology.* Dec 10; 25(35):5578-83.
37. Indovina P, Marcelli E, Maranta P, Tarro G, (2011). **Lung cancer proteomics: recent advances in biomarker discovery.** *International Journal of Proteomics:*726869.
38. Zamay T, Zamay G, Kolovskaya OI, et al (2017). **Current and Prospective Protein Biomarkers of Lung Cancer.** *Cancers,* Nov;9(11):155.
39. Yanagita K, Nagashino R, Jiang SX et al (2018). **Cytoskeleton-Associated Protein 4 Is a Novel Serodiagnostic Marker for Lung Cancer.** *The American journal of Pathology,* Jun; 188(6):1328-1333
40. Patz EF Jr, Campa MJ, Gottlin EB et al. (2007). **Panel of serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer.** *Journal of Clinical Oncology,* Dec 10; 25(35):5578-83.
41. Nolen BM, Langmead CJ et al. (2011). **Serum biomarker profiles as diagnostic tools in lung cancer.** *Cancer Biomarkers;* 10(1):3-12
42. Boyle P, Chapman CJ, Holdenrieder S et al. (2011). **Clinical validation of an autoantibody test for lung cancer.** *Ann Oncol.* 2011 Feb; 22(2):383-9.
43. Charman CJ, Graham H et al (2012). **Early CDT – Lung Test: improved clinical utility through additional autoantibody assays.** *Tumour Biology,* Oct; 33(5):1319-1326.

44. Brichory FM, Misek DE, Yim A, et al (2001). **An immune response manifested by the common occurrence of annexins I and II autoantibodies and high circulating levels of IL-6 in lung cancer.** PNAS Medical Science;98:9824-9
45. Tarro G, Perna A, Esposito C, (2005). **Early diagnosis of lung cancer by detection of tumor liberated protein.** Journal of Cellular Physiology, Apr; 203(1):1-5.
46. Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, et al. (2011).**Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening.** The New England Journal of Medicine; 365:395–409.
47. Brenner DJ, Hall EJ.(2007) **Computed tomography—an increasing source of radiation exposure.** The New England Journal of Medicine; 357:2277–2284.
48. Pazhouhandeh M, Samiee F, Boniadi T, et al (2017). **Comparative network analysis of patients with non-small cell lung cancer and smokers for representing potential therapeutic targets.** Scientific Reports;7: 13812.
49. Zaenker P, Ziman MR (2013). **Serologic autoantibodies as diagnostic cancer biomarkers--a review.** Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention;22: 2161-81.
50. Yao Y, Fan Y, Wu J et al (2012). **Potential application of non-small cell lung cancer-associated autoantibodies to early cancer diagnosis.** Biochemical and Biophysical Research Communications;423(3):613-9.
51. Chapman CJ, Murray A et al (2008). **Autoantibodies in lung cancer: Possibilities for early detection and subsequent cure.** Thorax;63(3):228-33.
52. Jett JR, Peek LJ, Fredericks L, Jewell W, Pingleton WW, Robertson JF (2014). **Audit of the autoantibody test, EarlyCDT(R)-lung, in 1600 patients: an evaluation of its performance in routine clinical practice.** Lung Cancer.;83(1):51-5.
53. Shengxiang R, Shucaiz Z et al (2017). **Early detection of lung cancer by using an autoantibody panel in Chinese population.** Oncolmmunology, vol.7, Issue 2.
54. Qi S, Huang M, Teng H, Lu Y, Jiang M, Wang L, et al (2015). **Autoantibodies to chromogranin A are potential diagnostic biomarkers for non-small cell lung cancer.** Tumor Biology; 36:9979–85.

55. Zhong L, Coe SP, Stromberg AJ, Khattar NH, Jett JR, Hirschowitz EA (2006). **Profiling tumor-associated antibodies for early detection of non-small cell lung cancer.** *Journal of Thoracic Oncology*; 1:513–9.
56. Pereira-Faca SR, Kuick R, Puravs E, Zhang Q, Krasnoselsky AL, Phanstiel D, et al. (2007). **Identification of 14-3-3 theta as an antigen that induces a humoral response in lung cancer.** *Cancer Res*; 67:12000–6.
57. Leidinger P, Keller A, Ludwig N, Rheinheimer S, Hamacher J, Huwer H, et al (2008). **Toward an early diagnosis of lung cancer: An autoantibody signature for squamous cell lung carcinoma.** *International Journal of cancer.*;123:1631–6.
58. Wu L, Chang W, Zhao J, Yu Y, Tan X, Su T, et al (2010). **Development of autoantibody signatures as novel diagnostic biomarkers of non-small cell lung cancer.** *Clinical Cancer Research.*;16:3760–8.
59. Leidinger P, Keller A, Heisel S, Ludwig N, Rheinheimer S, Klein V, et al (2010). **Identification of lung cancer with high sensitivity and specificity by blood testing.** *Respiratory Research*; 11.
60. Guergova-Kuras M, Kurucz I, Hempel W, Tardieu N, Kádas J, Malderez-Bloes C, et al (2011). **Discovery of lung cancer biomarkers by profiling the plasma proteome with monoclonal antibody libraries.** *Molecular and Cellular Proteomics.*;10.
61. Chapman CJ, Thorpe AJ, Murray A, Parsy-Kowalska CB, Allen J, Stafford KM, et al (. 2011). **Immunobiomarkers in small cell lung cancer: potential early cancer signals.** *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*; 17 :1474–80.
62. Shan Q, Lou X, Xiao T, Zhang J, Sun H, Gao Y, et al (2013). **A cancer/testis antigen microarray to screen autoantibody biomarkers of non-small cell lung cancer.** *Cancer Letters*; 328:160–7.
63. Pedchenko T, Mernaugh R, Parekh D, Li M, Massion PP (2013). **Early Detection of NSCLC with scFv Selected against IgM Autoantibody.** *PLoS One*; 8.
64. Trudgen K, Khattar NH, Bensadoun E, Arnold S, Stromberg AJ, Hirschowitz EA (2014). **Autoantibody profiling for lung cancer screening longitudinal retrospective analysis of CT screening cohorts.** *PLoS One*; 9
65. Tang ZM, Ling ZG, Wang C, Wu YB (2017). **Serum tumor-associated autoantibodies as diagnostic biomarkers for lung cancer: A systematic review and meta-analysis.** *PLoS One*; 12(7): e0182117.
66. https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa05223

67. https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=hsa05222&show_description=show
68. Coleman MP, Quaresma M, et al (2008). **Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD)**. The Lancet Oncology. Aug; 9(8):730-56.
69. Ries LAG, Melbert D et al, (1975-2005). **SEER Cancer Statistics Review**. National Cancer Institute.
70. Siegel R, Naishadham D, Jemal A, (2013). **Cancer statistics**. CA: A Cancer Journal for Clinicians, Jan; 63(1):11-30.
71. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2001). **Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease**. Lancet, Oct 27; 358(9291):1389-99.
72. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2002). **Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease**. Lancet, Jul 20; 360(9328):187-95.
73. Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S (1990). **Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study**. International Journal of Cancer. Nov 15; 46(5):796-800.
74. Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D (2012). **Basal Breast Cancer: A Complex and Deadly Molecular Subtype**. Current Medical Medicine, Jan ; 12(1):96-110.
75. Nounou M, Ahmed N, Goda S et al (2015). **Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Patents and Technologies**. Breast Cancer: Basic and Clinical Research, Sep 27: 17-24.
76. Le Naour F, Misek DE et al (2001). **Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer**. Clin Cancer Res. Nov; 7(11):3328-35.
77. Asif HM, Sultana S, Ahmed S, Akhtar N, Tariq M (2016). **HER-2 Positive Breast Cancer - a Mini-Review**. Asian Pac J Cancer Prev ; 17(4):1609-15.
78. Rasheed P.A., Sandhyarani N. (2014). **A highly sensitive DNA sensor for attomolar detection of the brca1 gene: signal amplification with gold nanoparticle clusters**. The analyst;204: 777–782.

79. De Mattos Ar, Cortes J, Santarpia L, Vivancos A, Tabernero J (2013). **Circulating tumour cells and cell-free DNA as tools for managing breast cancer.** *Nature Reviews, Clinical Oncology*, Jul; 10(7): 377-89.
80. Mittal S, Kaur H, Gautam N, Mantha An. (2017). **Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies.** *Biosensors and Bioelectronics*, v.88, Feb; 217-231.
81. Evans RL, Pottala JV, Eglund K (2014). **Classifying patients for breast cancer by detection of autoantibodies against a panel of conformation-carrying antigens.** *Cancer Prevention Research*, May;7 (5): 545-55.
82. Wang J, Figueroa JD et al. (2015). **Plasma Autoantibodies Associated with Basal-like Breast Cancers.** *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* . Sep; 24(9):1332-40.
83. Shi L, Gehin T, Chevolut Y, Souteyrand E, Mangé A, Solassol J, Laurenceau E (2016). **Anti-heat shock protein autoantibody profiling in breast cancer using customized protein microarray.** *Analytical and Bioanalytical chemistry*, Feb; 408(5):1497-506.
84. Lu H., Ladd J., Feng Z., Wu M., Goodell V., Pitteri S.J., Li C.I., Prentice R., Hanash S.M., Disis M.L (2012). **Evaluation of known oncoantibodies, HER2, p53, and cyclin B1, in prediagnostic breast cancer sera.** *Cancer Prev. Res.*; 5:1036–1043.
85. Chapman C, Murray A, Chakrabarti J, Thorpe A, Woolston C, Sahin U, Barnes A, Robertson J (2007). **Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis.** *Ann Oncol*. May; 18(5):868-73.
86. Ye H.U.A., Sun C., Ren P., Dai L., Peng B.O., Wang K., Qian W.E.I., Zhang J (2013). **Mini-array of multiple tumor-associated antigens (TAAs) in the immunodiagnosis of breast cancer.** *Oncology Letters*; 5:663–668.
87. Zuo X., Chen L., Liu L., Zhang Z., Zhang X., Yu Q., Feng L., Zhao X., Qin T. (2016). **Identification of a panel of complex autoantigens (LGALS3, PHB2, MUC1, and GK2) in combination with CA15-3 for the diagnosis of early-stage breast cancer.** *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* ;37:1309–1317.
88. Liu Y., Liao Y., Xiang L., Jiang K., Li S., Huangfu M., Sun S (2017). **A panel of autoantibodies as potential early diagnostic serum biomarkers in patients with breast cancer.** *Int. J. Clin. Oncol.*;22:291–296.
89. Mangé A., Lacombe J., Bascoul-Mollevis C., Jarlier M., Lamy P.-J., Rouanet P., Maudelonde T., Solassol J (2012). **Serum autoantibody signature of**

- ductal carcinoma in situ progression to invasive breast cancer.** Clin. Cancer Res.;18:1992–2000.
90. Kim BK, Lee JW et al (2009). **The multiplex bead array approach to identifying serum biomarkers associated with breast cancer.** Breast Cancer Res; 11(2):R22.
 91. Jingyi Q, Keyser B, Lin Z, Wu T, (2018). **Autoantibodies as Potential Biomarkers in Breast Cancer.** Biosensors, Sep; 8(3): 67.
 92. <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/key-statistics.html>
 93. Ries L AG, Melbert D, Krapcho M, et al (2008). **SEER cancer statistics review, 1975–2005. Bethesda, MD.**
 94. Bethesda, MD: U.S. Department of Health and Human Services & National Institutes of Health (2006). **National Institutes of Health what you need to know about Cancer of the Colon and Rectum.**
 95. Boardman LA, Morlan BW, Rabe KG, Petersen GM, Lindor NM, Nigon SK, Goldberg J, Gallinger S (2007). **Colorectal cancer risks in relatives of young-onset cases: is risk the same across all first-degree relatives?.** Clinical Gastroenterology and Hepatology, Oct; 5(10):1195-8.
 96. Davies RJ, Miller R, Coleman N (2005). **Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis.** Nature Reviews Cancer. Mar; 5(3):199-209.
 97. Harris R, 2016. **Global epidemiology of cancer.** Burlington, MA: Jones Bartlett
 98. Pelucchi C, Tramacere I, Boffetta P, Negri E, La Vecchia C (2011). **Alcohol consumption and cancer risk.** Nutrition and Cancer; 63(7):983-90.
 99. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P (2008). **Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis.** JAMA. Dec 17; 300(23):2765-78.
 100. Doubeni CA, Schootman M, Major JM, Stone RA, Laiyemo AO, Park Y, Lian M, Messer L, Graubard BI, Sinha R, Hollenbeck AR, Schatzkin A (2012). **Health status, neighborhood socioeconomic context, and premature mortality in the United States: The National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study.** American Journal of Public Health. Apr; 102(4):680-8.
 101. Johnson IT, Lund EK (2007). **Nutrition, obesity and colorectal cancer.** Alimentary Pharmacology & Therapeutics. Jul 15; 26(2):161-81.
 102. Harrison S, Benziger H (2011). **The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: a review.** Surgeon, Aug;9(4): 200-10.

103. Hatakeyama K, Ohshima K, Nagashima T, Ohnami S et al, (2018). **Molecular profiling and shift in hypermutator tumours harboring POLE mutations**. Scientific Reports Jun7; 8:8700.
104. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K (2012). **Cancer treatment and survivorship statistics, 2012**. CA a Cancer Journal for Clinicians. Jul-Aug; 62(4):220-41.
105. Nishihara R, Wu K, Lochhead P, Morikawa T, Liao X (2013). **Long-term colorectal-cancer incidence and mortality after lower endoscopy**. New England Journal of Medicine. Sep 19; 369(12):1095-105.
106. Kolligs F (2016). **Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer**. Visceral Medicine, Jun;32(3):158-164.
107. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D (2015). **COLORECTAL CANCER**. Nature Reviews Disease Primers. Jan;(1):15065.
108. Han M, Liew CT, Zhang HW, Chao S, Zheng R, Yip KT, Song ZY, Li HM, Geng XP, Zhu LX, Lin JJ, Marshall KW, Liew CC (2008). **Novel blood-based, five-gene biomarker set for the detection of colorectal cancer**. Clinical Cancer Research. Jan 15; 14(2):455-60.
109. Chen H, Werner S (2016). **Prospective evaluation of 64 serum autoantibodies as biomarkers biomarkers for early detection of colorectal cancer in a true screening setting**. Oncotarget, Mar 29;7(13): 16420-16432.
110. Wang H, Li L, Guo S, ZengS, Ning F (2016). **Evaluation of antibody level against Fusobacterium nucleatum in the serological diagnosis of colorectal cancer**. Scientific reports; 6:33440.
111. Vazquez R, Padilla G, Suarez A et al (2016). **Development of a novel multiplex beads-based assay for autoantibody detection for colorectal cancer diagnosis**. Proteomics, Apr;16(8): 1280-90.
112. Ostendoff H, Awad A, Liu Z, Wan Z et al (2013). **Multiplex VeraCode Bead-Based Serological Immunoassay for Colorectal Cancer**. Jpurnal of Immunological Methods. Oct; 24.
113. Chen H, Qian J, Werner S. Cuk S, Knebel P, Brenner H (2017). **Development and validation of a panel of five proteins as blood markers for early detection of colorectal cancer**. Clinical Epidemiology, Oct; 9:517-526.
114. Fan CW, Kuo YB, Chen SM, Chang SH, Li BA, Chan EC (2017). **Development of a multiplex tumor-associated autoantibody-based blood test for the detection of colorectal cancer**. Dec; 475: 157-163.

115. Negm O, Hamed MR, Schoen RE et al (2016). **Human Blood Antibodies in the Detection of Colorectal Cancer**. PLoS One Jul; 11(7): e0156971.
116. Pedersen JW, Gentry-Maharaj A, Nistdal A, Fourkala F et al (2013). **Cancer-associated autoantibodies to MUC1 and MUC4—Ablinded case-control study of colorectal cancer in UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening**. International Journal of Cancer: 00, 00-00.
117. Marmol I, Sanchez-de Diego C, Dieste A, Cerrada E, Rodriguez MJ (2017). **Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer**. International Journal of Molecular Sciences, Jan;18(1): 197.
118. Ganepola AP, Nizin J, Rutledge JR, Chang DH (2014). **Use of blood-based Biomarkers for early diagnosis and surveillance of colorectal cancer**. World Journal of Gastrointestinal Oncology, Apr 15; 6(4):83-97.
119. Aalla Z, Lallas A, Sotiriou E, Lazaridou E, Ioannides D (2017). **Epidemiological trends in skin cancer**. Dermatology Practical & Conceptual, Apr; 7(2): 1-6
120. Didona D, Paolino G, Bottoni U, Cantisani C (2018). **Non Melanoma Skin Cancer Pathogenesis Overview**. Biomedics, Mar;6(1):6.
121. Xiong M, Charifa A, Shan C, Chen J (2019). **Cancer, Lentigo Maligna Melanoma**. Stat Pearls.
122. Pickering CR, Zhou JH, Lee JJ et al (2015). **Mutational landscape of cutaneous squamous cell carcinoma**. Clinical Cancer Research, Dec 15;20(24):6582-6592.
123. Rose AE, Poliseno LP, Clark M et al (2011). **Integrative genomics identifies molecular alterations that challenge linear model of melanoma progression**. Clinical Cancer Research, Apr1;71(7): 2561-2571.
124. Pellegrini C, Maturo MG, Di Nardo L, Ciciarelli V, Garcia-Rodrigo C, Fagnoli MC. **Understanding the Molecular Genetics of Basal Cell Carcinoma**. International Journal of Molecular Sciences, Nov;18(11): 2485.
125. Greenberg ES, Chong KK, Huynh KT, Tanaka R, Hoon D, (2014). **Epigenetic Biomarkers in Skin Cancer**. Cancer Letters, Jan 28;342(2).
126. Ward WH, Farma JM (2017). **Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy**. Brisbane.
127. Greinert, R. (2009). **Skin Cancer: New Markers for Better Prevention**. Pathobiology; 76:64-81.

128. Weinstein D, Leininger J, Hamby C, Safai B (2014). **Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Melanoma**. The journal of Clinical and Aesthetic Dermatology, Jun;7(6):13-24.
129. Zaenker P, Lo J, Pearce R, Cantwell P, Cowell L, Lee M, Quirk C, Law H, Gray E, Ziman M, (2018). **A diagnostic autoantibody signature for primary cutaneous melanoma**. Oncotarget, Jul 17;9(55): 30539-30551.

5

Συμπεράσματα

5.1 Συμπεράσματα για τη συμβολή της πρωτεωμικής στην έγκαιρη διάγνωση.

Ο καρκίνος είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια. Η ετερογένεια και η ποικιλομορφία που επικρατεί σε όλους τους τύπους του τον καθιστούν ένα πολύ δύσκολο πρόβλημα που φαντάζει άλυτο. Μέσω της παρούσας διπλωματικής επιχειρήθηκε να αναλυθεί η σύνθετη φύση του σε συνιστώσες έτσι ώστε να καταδειχθεί η επίδραση όλων των εξωγενών παραγόντων που ευθύνονται για την καλπάζουσα πληθυσμιακή επέλαση που τον χαρακτηρίζει στον αιώνα που ζούμε. Όντως, συνήθειες διατροφικές, κάπνισμα και αλκοόλ, κοινωνικοοικονομικές διαφορές, γρήγορος και αγχώδης τρόπος ζωής σε αστικοποιημένες κοινωνίες σε συνδυασμό με την ατμοσφαιρική ρύπανση στατιστικά και γεωγραφικά αποδεικνύεται πως παίζουν τεράστιο ρόλο στην καρκινογένεση. Οι τεχνολογικές εξελίξεις και η παγκοσμιοποίηση έχουν ωθήσει τα κράτη στην εντατικοποίηση της βιομηχανικής παραγωγής, την αποψίλωση των δασικών εκτάσεων και τη δυτικοποίηση τη ζωής, με όλες τις συνέπειες που όπως είδαμε επιφέρονται. Πριν μιλήσουμε για τη συνεισφορά της πρωτεωμικής στη διάγνωση του καρκίνου υπάρχουν δύο βασικά ζητούμενα που πρέπει να απαιτηθούν από κάθε σύγχρονο άνθρωπο και από κάθε σύγχρονο κοινωνικό κράτος, μιας και η πρόληψη μιας δυσμενούς κατάστασης είναι πάντα προτιμότερη από τη διάγνωση και την προσπάθεια επίλυσής της. Το πρώτο ζητούμενο για τον καθένα μας είναι η συνεχής ενημέρωση. Είναι ευθύνη ενός ατόμου να ενημερώνεται για την υγεία του, να εντάσσει στη ζωή του ήθη και έθιμα που βελτιώνουν την ποιότητα της ζωής του, όπως η μείωση της κατανάλωσης του κόκκινου κρέατος, η διακοπή του καπνίσματος, η μείωση της κατάποσης αλκοόλ, η γενναία απόφαση να απορρίπτει από τον καθιστικό τρόπο ζωής-στον ελεύθερο χρόνο του τουλάχιστον-και να κρατάει το σώμα του σε φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος μέσω υγιεινής διατροφής και συχνής γυμναστικής. Όσο για την κρατική μέριμνα, στις σύγχρονες κοινωνίες η δαπάνη για την υγεία συνήθως είναι αρκετά υψηλή, με μεγάλο κομμάτι των εξόδων να προκύπτει λόγω των ακριβών μεθόδων θεραπείας του καρκίνου. Ο καλύτερος τρόπος να μειωθούν τα έξοδα και να προαχθεί η καλύτερευση της υγείας των πολιτών είναι να επικοινωνήσει το κράτος όσο το

δυνατόν καλύτερα μέσα από καμπάνιες υπέρ όλων των παρεμβάσεων που περιγράφηκαν πιο πάνω και να θεσμοθετήσει πάνω σε καίριες αλλαγές κουλτούρας, όπως για παράδειγμα ο αντικαπνιστικός νόμος, η απαγόρευση πώλησης τσιγάρων και ποτών σε ανήλικους, η προστασία του περιβάλλοντος, η δημιουργία και συντήρηση χώρων άσκησης και άθλησης, η μείωση του ΦΠΑ και η γενικότερη προώθηση σε τροφές με μικρή ή καθόλου επεξεργασία (όσπρια, λαχανικά, φρούτα). Ακόμα πρωτοβουλίες πληθυσμιακού ελέγχου όπως για τον καρκίνο της μήτρας, τον καρκίνο του μαστού ή ακόμα και δερματοσκοπήσεις σε χώρες υψηλού κινδύνου έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά αποδοτικές. Τέτοιες πρωτοβουλίες είναι απόδειξη πολιτισμού και σύγχρονης κοινωνίας.

Ο βασικός λόγος του υψηλού αριθμού θανάτων από τον καρκίνο έγκειται στην καθυστερημένη διάγνωση. Τις τελευταίες δεκαετίες η αλματώδης ανάπτυξη στον τομέα της τεχνολογίας, η χρήση των υπολογιστών και των μαθηματικών μοντέλων και όλων των τεχνολογιών που συντάσσουν τον τομέα της πρωτεωμικής έχει δώσει λύσεις στη διάγνωση από τα πρώτα στάδια της καρκινικής νόσου ή ακόμα και σε ασυμπτωματικά προκαρκινικά στάδια. Μέσω των μεθόδων διαχωρισμού πεπτιδίων, των συσκευών ανάλυσης, και τις τεχνικές παραγωγής δεδομένων που αναλύσαμε στο 3^ο κεφάλαιο που έχουν αναπτυχθεί και αναπτύσσονται συνεχώς η επιστήμη εφοδιάζεται συνεχώς με νέες γνώσεις για τη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων. Η καλύτερη κατανόηση της γονιδιακής έκφρασης, των μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης και των αλλοιώσεών τους στην νόσο είναι ένα κεκτημένο του κλάδου της πρωτεωμικής. Μέσω αυτών χρόνο με τον χρόνο ξεπηδούν νέα πρωτεϊνικά μόρια ως υποψήφιοι βιοδείκτες. Για την συγγραφή των υποενοτήτων του 4^{ου} κεφαλαίου περί της χρήσης των TAAs για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα, του μαστού και του παχέος εντέρου χρησιμοποιήθηκαν επιστημονικά άρθρα ερευνών ως επί το πλείστον της δεκαετίας που διανύουμε και είναι πράγματι εντυπωσιακός ο αριθμός των πειραματικών-κλινικών μελετών που εκτελούνται, γεγονός που δείχνει πως η κατεύθυνση της επιστήμης έχει χρόνια στραφεί στην διάγνωση των αρχικών σταδίων. Ο όγκος δεδομένων που παράγεται δε θα μπορούσε να είναι διαχειρίσιμος χωρίς τη συνδρομή της βιοπληροφορικής. Οι βάσεις δεδομένων ακολουθιών ανανεώνονται συνεχώς και θα γιγαντώνονται έως και την πλήρη ανάλυση του πρωτεώματος. Ακόμα, η ανάλυση του πρωτεώματος θα «ξεσκεπάσει» όλα εκείνα τα κρίσιμα γονίδια και τα προϊόντα τους που συμμετέχουν στα ΜΚΣ που εμπλέκονται σε κάθε τύπο καρκίνου ξεχωριστά, αποκαλύπτοντας έτσι όχι μόνο διαγνωστικούς δείκτες αλλά και θεραπευτικούς στόχους. Τέλος, μέσω των εργαλείων που σε ποσότητα προσφέρονται από ελεύθερες ή μη βάσεις δεδομένων μπορεί να γίνει αλληλούχιση και σύγκριση ακολουθιών. Στην παρούσα διπλωματική

αντλήσαμε από βάσεις πρωτεϊνικών δεδομένων και από βάσεις ανάλυσης μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης και αισίως εκτελέσαμε το πρόγραμμα Blast στο UniProt τόσο για αλληλουχίες προερχόμενες από κρίσιμα γονίδια ανά καρκινικό τύπο και ανά ΜΚΣ, όσο και για ισομορφές αυτών των πρωτεϊνών. Η στοίχιση των ισομορφών και η διερεύνησή τους βοηθά στην καλύτερη γνώση του πρωτεώματος, ενώ μέσω του blast αναδείξαμε την εξελικτική σχέση του ανθρώπου με άλλα είδη οργανισμών. Τα υψηλά ποσοστά ομοιότητας που ανακαλύφθηκαν για τις πρωτεΐνες που εξετάσαμε ανοίγουν νέους ορίζοντες για τις πειραματικές διαδικασίες του μέλλοντος.

Η 5-ετής επιβίωση για τους περισσότερους καρκίνους τις τελευταίες δεκαετίες έχει σημειώσει πρόοδο εν πολλοίς χάρις στους όλο και πιο ικανούς καρκινικούς δείκτες που χρησιμοποιούνται. Η πιο αισιόδοξη πρόβλεψη για το 2050 περιγράφει ένα μέλλον που οι θάνατοι προερχόμενοι από τον καρκίνο θα εκλείψουν για ασθενείς κάτω της ηλικίας των 80. Η πρόβλεψη αυτή περνά από το κατώφλι της πρωτεωμικής και της εξέλιξης των τεχνολογιών της. Μέχρι την έλευση της ημέρας που οι κβαντικοί υπολογιστές μαζί με προϊόντα νανοτεχνολογίας θα μπορούν να υπερβούν τους σημερινούς ανθρώπινους περιορισμούς και να επιλύσουν προβλήματα σε μοριακό επίπεδο, ας ευχηθούμε οι προβλέψεις να εκπληρωθούν πριν το μέσο του αιώνα και το φουτουριστικό σενάριο της απόλυτης θεραπείας να απαλλάξει όσο περισσότερους ασθενείς από μια ασθένεια που στο μέλλον θα διδάσκεται αποκλειστικά σε μαθήματα Ιστορίας.