

Έλεγχος του γονιδίου της φωσφατάσης, ομόλογης της τενσίνης, με δείκτες μικροδορυφορικού DNA και μελέτη της έκφρασής της σε δείγματα αίματος ασθενών με καρκίνο του μαστού

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης στα πλαίσια του διατμηματικού –διεπιστημονικού μεταπτυχιακού προγράμματος «Νανοεπιστήμες και Νανοτεχνολογίες» με επιβλέπων καθηγητή τον κ. Δημήτριο Κυριακίδη.

Αντικείμενο της διατριβής αποτελεί η μελέτη ετεροζυγωτίας του ογκοκαταστολέα *pten* και έκφρασης της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί σε δείγματα αίματος ασθενών σε διάφορα στάδια καρκίνου του μαστού.

Για τη μελέτη ετεροζυγωτίας έγινε απομόνωση DNA με χρήση του kit της εταιρίας Qiagen από το σύνολο των δειγμάτων και ακολούθησε PCR για πολλαπλασιασμό των περιοχών μικροδορυφορικού DNA σε τρεις περιοχές, με χρήση των εκκινήτων D10S549 D10S571 και D10S215. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον αναλυτή Licor, εισήχθησαν στο πρόγραμμα FSTAT όπου και επεξεργάστηκαν στατιστικά. Όπως προέκυψε η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία ήταν πολύ μεγαλύτερη από την αναμενόμενη γεγονός που επιβεβαίωσε την έλλειψη ετεροζυγωτίας στο σύνολο των δειγμάτων, όπως άλλωστε αναμενόταν και από τη βιβλιογραφία.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση της PTEN πρωτεΐνης, μιας φωσφατάσης η οποία δρα στα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών και συμμετέχει με τον τρόπο αυτό σε ένα ιδιαίτερο μονοπάτι μεταγωγής σήματος που προάγει την ογκοκαταστολή. Συγκεκριμένα η PTEN δρα ανταγωνιστικά στο μονοπάτι PI3K/AKT το οποίο στέλνει σήματα αύξησης επιβίωσης και κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Όσον αφορά τη μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης της PTEN (φωσφατάση ομόλογη της τενσίνης) οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν από τη buffy coat στοιβάδα αίματος με χρήση του αντιδραστηρίου TRI που περιέχει φαινόλη. Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, χρώση με νιτρικό άργυρο, ηλεκτρομεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης και ανοσοαποτύπωσή τους με εξειδικευμένα αντισώματα έναντι της PTEN αλλά και της φωσφορυλιωμένης μορφής της.

Από τα αποτελέσματα αποδείχθηκε μεγαλύτερη έκφραση της PTEN στους ασθενείς, από ότι στους υγιείς. Συγκεκριμένα τα άτομα που εμφάνιζαν αρχικά στάδια της νόσου (υπερπλασία και λοβιακή νεοπλασία) παρουσίαζαν τη μεγαλύτερη

έκφραση της ενεργής μη φωσφορυλιωμένης PTEN. Ελαφρώς μικρότερα εμφανίζονταν τα ποσοστά έκφρασής της στα άτομα με λοβιακό και πορογενές καρκίνωμα *in situ*, πιθανά λόγω καταστολής εσωτερικών μηχανισμών των κυττάρων, ενώ η αντίστοιχη έκφραση της στα καρκινικά κύτταρα διηθητικού καρκίνου του μαστού αυξανόταν σε μεγάλο βαθμό.

Επίσης από τα αποτελέσματα προέκυψε πως τα κύτταρα περιέχουν και τη φωσφορυλιωμένη μη ενεργή μορφή της PTEN την οποία μετατρέπουν σε ενεργή μη φωσφορυλιωμένη ανάλογα με τις ανάγκες τους για ογκοκαταστολή. Σε πολλές περιπτώσεις υπήρχε έκφραση μόνο της μίας ή μόνο της άλλης μορφής της πρωτεΐνης υποδηλώνοντας τον παραπάνω μηχανισμό.

Τέλος λόγω της πολυπλοκότητας της νόσου προκειμένου να εξαχθούν ακριβέστερα συμπεράσματα απαιτείται η μελέτη περισσότερων δειγμάτων αλλά και ταυτόχρονης έκφρασης περισσότερων μορίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι δράσης της PTEN στην ογκοκαταστολή.