



ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΙΚΡΩΝ ΜΗ-ΚΩΔΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ RNA (MICRORNA) ΣΤΟΝ ΧΗΜΕΙΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟ ΜΗ-ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ (ΜΜΚΠ)

Παπαδάκη Χ.¹, Μόρτογλου Μ.¹, Γκούρλια Κ.¹, Μαρκάκη Μ.², Λαγουδάκη Ε.³, Μπούκουρης Α. ^{1,4}, Καμαράτου Μ.^{1,4}, Κορωνάκης Γ. ^{1,4}, Βορριάς Ε.^{1,4}, Κουτσόπουλος Α.³, Τσαμαρδίνος Ι.², Μαυρουδής Δ. ^{1,4}, Αγγελάκη Σ. ^{1,4}

¹Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάδα
²Τμήμα Επιστήμης Υπολογιστών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάδα
³Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάδα
⁴Παθολογική-Ογκολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Ηράκλειο, Ελλάδα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μη-Μικροκυτταρικός Καρκίνος του Πνεύμονα (ΜΜΚΠ)

- Συχνότερη μορφή καρκίνου του πνεύμονα (85% των περιπτώσεων).
- Χαρακτηρίζεται από υψηλή ετερογένεια και περιορισμένη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία.

Χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα στον ΜΜΚΠ

- Βασικός παράγοντας της συστηματικής θεραπείας τόσο του πρώιμου όσο και του μεταστατικού ΜΜΚΠ.
- Η δραστηριότητά της εξαρτάται από διάφορους παράγοντες στους οποίους περιλαμβάνεται και η λειτουργικότητα των μηχανισμών επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA (DDR).
- Η αναζήτηση βιοδεικτών ανταπόκρισης στην πλατίνα, εξακολουθεί να αποτελεί σημαντική πρόκληση.

MicroRNAs/miRNAs

- Μικρά μη-κωδικά μόρια RNA αποτελούμενα από 20-22 νουκλεοτίδια, ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων-στόχων τους σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο.
- Δρούν είτε ως ογκογονίδια είτε ως ογκοκατασταλτικά γονίδια σε πολλαπλές βιολογικές διεργασίες κατά την ογκογένεση, την εξέλιξη του όγκου, τη μετάσταση και την απόκριση των καρκινικών κυττάρων στην κυτταροτοξική θεραπεία, συμπεριλαμβανομένης της πλατίνας.

ΣΤΟΧΟΣ

- Ο εντοπισμός μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης, miRNAs με διαφορεική έκφραση μεταξύ ασθενών με ΜΜΚΠ που παρουσίασαν αντικειμενική ανταπόκριση ή μη-ανταπόκριση στην θεραπεία με βάση την πλατίνα.
- Η ανάλυση της έκφρασης τους σε δείγματα καρκινικού και παρακείμενου υγιούς ιστού.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η μελέτη βασίστηκε σε δύο σύνολα δεδομένων μικροσυστοιχιών miRNA από τη βάση Gene Expression Omnibus (GEO) που περιλάμβαναν δείγματα ασθενών με ΜΜΚΠ (n=69) που έλαβαν θεραπεία με βάση την πλατίνα. Η ανάλυση διαφορικής έκφρασης μεταξύ ασθενών που ανταποκρίθηκαν (n=33) και όσων δεν ανταποκρίθηκαν (n=36) πραγματοποιήθηκε με το πακέτο Limma (Linear Models for Microarray) στο R. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs αξιολογήθηκαν μέσω ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) σε ζεύγη δειγμάτων καρκινικού και παρακείμενου υγιούς ιστού (n=20).

Πίνακας 1: Πληροφορίες για τα σύνολα δεδομένων GEO που χρησιμοποιήθηκαν για την αναγνώριση των miRNAs προς μελέτη.

Accession	Platform	Responders (N)	Non-responders (N)	Material	PMID	Year
GSE56036	GPL15446	17	12	Frozen tissue	25597412	2015
GSE56264	GPL16770	16	24	Frozen tissue	25142144	2014

Characteristic	Category	N (Total = 20)
Age, median (range)	66 years (56-83)	
Age Group	<66 years	10 (50%)
	≥66 years	10 (50%)
Gender	Male	16 (80%)
	Female	4 (20%)
Stage	I	5 (25%)
	II	9 (45%)
	III	6 (30%)
Grade	1	2 (10%)
	2	8 (40%)
	3	5 (25%)
	4	5 (25%)
Lymph nodes	Negative	14 (70%)
	Positive	6 (30%)

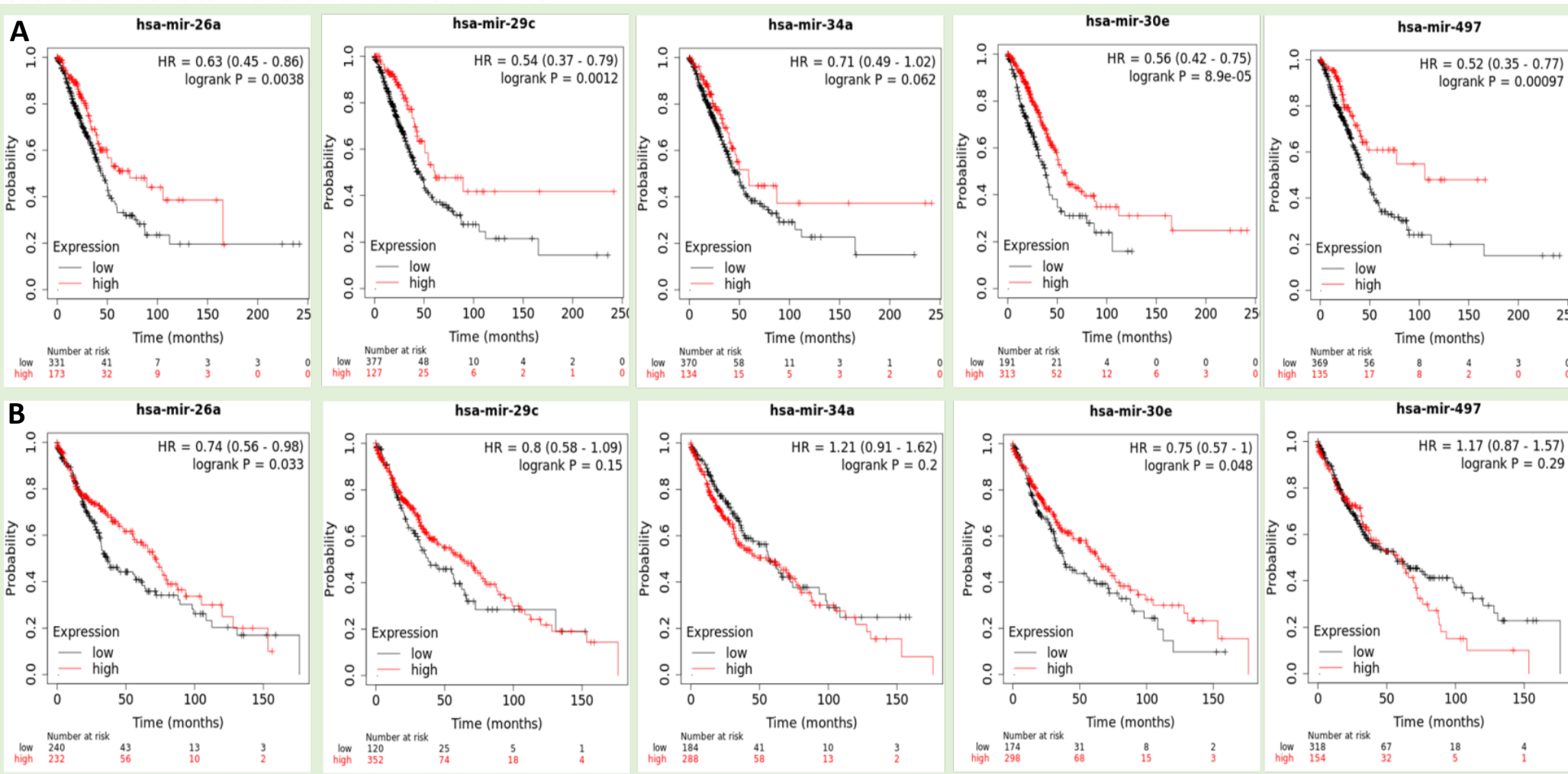
Πίνακας 2: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Συμπεριλήφθηκαν είκοσι (N=20) ασθενείς με χειρουργήσιμο ΜΜΚΠ, που διαγνώστηκαν το 2010 στην Παθολογική Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου, με Αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα. Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε λάβει χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία πριν από τη χειρουργική επέμβαση. Όλοι οι συμμετέχοντες είχαν υπογράψει ενημερωμένη συγκατάθεση για τη συμμετοχή τους στη μελέτη, η οποία είχε εγκριθεί από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας και την Επιστημονική Επιτροπή του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ID 7696, Κρήτη).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

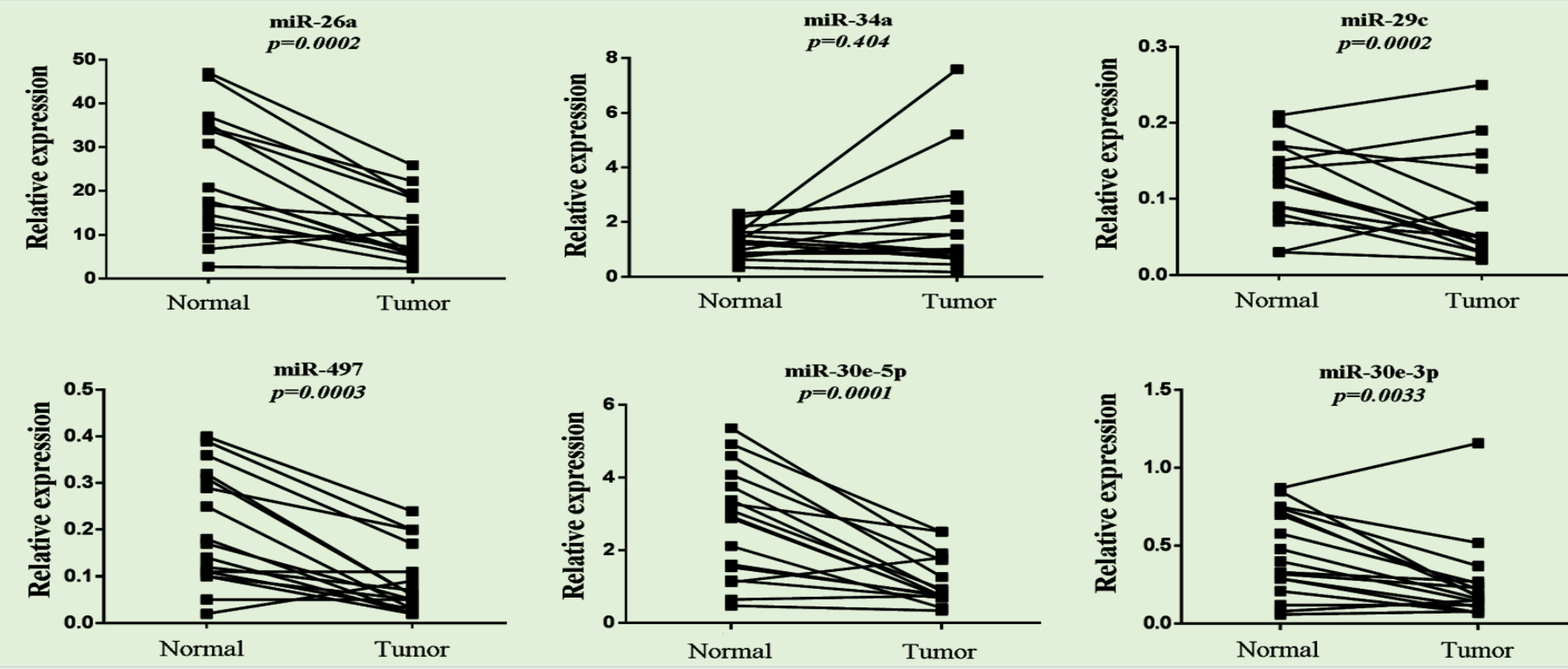
Η ανάλυση Limma εντόπισε 112 miRNAs με διαφορεική έκφραση μεταξύ ασθενών που ανταποκρίθηκαν (n=33) και έναντι όσων δεν ανταποκρίθηκαν (n=36) ενώ αναδείχθηκαν 24 miRNAs με σταθερά πρότυπα υπερέκφρασης ή υποέκφρασης. Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier ανέδειξε 22 miRNAs με στατιστικά σημαντική προγνωστική αξία στον ΜΜΚΠ. Η λειτουργική ανάλυση συνέδεσε αυτά τα miRNAs με βασικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην DDR, όπως των p53, Hippo, PI3K και TGF-β. Παράλληλα, αναγνωρίστηκε υπογραφή 6-miRNAs (miR-26a, miR-29c, miR-34a, miR-30e-5p, miR-30e-3p, και miR-497) με υποέκφραση σε ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία με βάση την πλατίνα και συμμετοχή σε τουλάχιστον τρία μονοπάτια DDR. Η συγκριτική ανάλυση έκφρασης με ποσοτική PCR, σε δείγματα ασθενών με ΜΜΚΠ, επιβεβαίωσε τη διαφορική έκφρασή τους μεταξύ καρκινικού και παρακείμενου υγιούς ιστού [Σχήμα 2].

Πίνακας 3: LogFC and p-values που αντλήθηκαν από την ανάλυση Limma και KM Plotter για τα 6-miRNAs.							
DE miRNAs	GSE56036 logFC	p-Value	GSE56264 logFC	p-Value	ADC HR	SqCC p-Value	HR
hsa-miR-26a	-1.4049	0.016655	-0.52735	0.023449	0.63	0.038	0.74
hsa-miR-29c	-1.0811	0.013295	-0.82175	0.003344	0.54	0.012	0.8
hsa-miR-30e-5p	-1.19279	0.024696			0.56	8.9 x 10 ^{-0.5}	0.75
hsa-miR-30e-3p			-0.53971	0.043327	0.56	8.9 x 10 ^{-0.5}	0.75
hsa-miR-34a	-1.31859	0.01225	-0.45893	0.041946	0.71	0.062	1.21
hsa-miR-497	-0.99268	0.010906	-0.82107	0.019803	0.52	0.0009	1.17

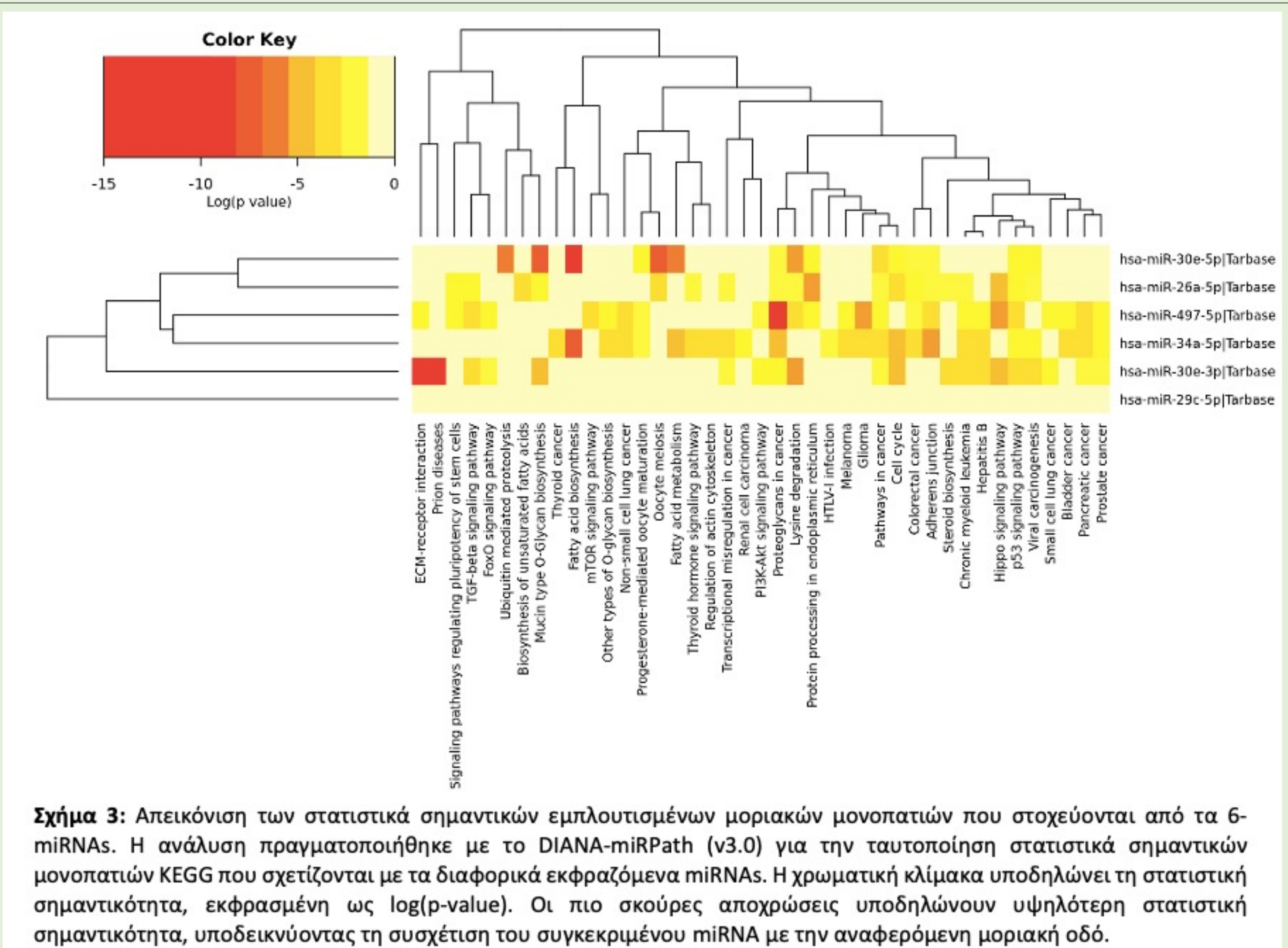
ADC, Adenocarcinoma; DE, Differentially Expressed; HR, Hazard Ratio; KM plotter, Kaplan Meier plotter; LogFC, Log Fold Change; SqCC, Squamous Cell Carcinoma.



Σχήμα 1: Ανάλυση επιβίωσης για τα miRNAs hsa-miR-26a, hsa-miR-29c, hsa-miR-34a, hsa-miR-30e και hsa-miR-497 σε ασθενείς με (Α) Αδενοκαρκίνωμα (N=504) και (Β) Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα (N=472) στο σύνολο δεδομένων KM plotter. Τα δείγματα κατηγοριοποιούνται σε ομάδες υψηλής (κόκκινο) και χαμηλής (μαύρο) έκφρασης για κάθε miRNA. Το Hazard Ratio (HR) και οι τιμές p-value για κάθε miRNA σε σχέση με την επιβίωση εμφανίζονται στο αντίστοιχο διάγραμμα.



Σχήμα 2: Έκφραση των 6-miRNAs που περιλαμβάνονται στην υπογραφή σε ζεύγη δειγμάτων καρκινικού και παρακείμενου υγιούς ιστού από ασθενείς με εξαιρέσιμο ΜΜΚΠ. Η σύγκριση για κάθε miRNA πραγματοποιήθηκε με το Wilcoxon signed-rank test. Ο άξονας Y δηλώνει τα επίπεδα έκφρασης για κάθε miRNA, με τη μέθοδο 2^{-ΔCT}, χρησιμοποιώντας το miR-1228 ως γονίδιο αναφοράς.



Σχήμα 3: Απεικόνιση των στατιστικά σημαντικών εμπλουτισμένων μοριακών μονοπατιών που στοχεύονται από τα 6-miRNAs. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το DIANA-miRPath (v3.0) για την ταυτοποίηση στατιστικά σημαντικών μονοπατιών KEGG που σχετίζονται με τα διαφορικά εκφραζόμενα miRNAs. Η χρωματική κλίμακα υποδηλώνει τη στατιστική σημαντικότητα, εκφρασμένη ως log(p-value). Οι πιο σκούρες αποχρώσεις υποδηλώνουν υψηλότερη στατιστική σημαντικότητα, υποδεικνύοντας τη συσχέτιση του συγκεκριμένου miRNA με την αναφερόμενη μοριακή οδό.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η μελέτη μας ανέδειξε μια υπογραφή 6-miRNAs, με πιθανή προβλεπτική αξία για την ανταπόκριση στην πλατίνα.
- Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την αξιολόγηση της προγνωστικής σημασίας της υπογραφής των 6-miRNAs σε περισσότερα κλινικά δείγματα ασθενών με ΜΜΚΠ.
- Επιπλέον αναλύσεις είναι απαραίτητες για την αποσαφήνιση των ρυθμιστικών μηχανισμών των σχετικών μοριακών οδών, καθώς και για τη διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των έξι miRNAs της υπογραφής και των αντίστοιχων στόχων τους σε επίπεδο mRNA.
- Τα ευρήματά μας ενισχύουν και επεκτείνουν προηγούμενες μελέτες που έχουν εξετάσει τη συσχέτιση miRNAs με την ανταπόκριση στην πλατίνα, παρέχοντας νέες προοπτικές για την κλινική εφαρμογή αυτών των μορίων.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστούμε την Εταιρεία Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδας (ΕΟΠΕ), την Εταιρεία Στήριξης Αντικαρκινικής Έρευνας (ΕΣΑΕ) και την Gnosis Data Analysis για την υποστήριξη τους.

ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ

Σοφία Αγγελάκη MD, PhD
Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας
Email: agelakisofia@gmail.com
Phone: 2810392438