

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δ. ΣΠΑΝΤΙΔΟΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ RAF ΚΑΙ RAS ΣΤΑ
ΚΑΚΟΗΘΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Κ. ΣΥΜΒΟΥΛΑΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007

στην κόρη μου

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

1. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΣΥΜΒΟΥΛΑΚΗΣ
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΕΡΑ	ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
ΟΝΟΜΑ ΜΗΤΕΡΑΣ	ΕΛΕΝΗ
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	01/10/1972
ΓΕΝΝΗΣΗΣ	
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΕΛΛΑΔΑ
ΥΠΗΚΟΟΤΗΤΑ/	ΕΛΛΗΝΙΚΗ
ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ	
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ	ΕΓΓΑΜΟΣ ΜΕ ΕΝΑ ΠΑΙΔΙ
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ	ΝΗΡΕΩΣ 1, ΠΟΡΟΣ, 71307, ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ,
ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ	ΕΛΛΑΔΑ
ΤΗΛΕΦΩΝΟ	2810242246 6937253288
E-MAIL	symvouman@yahoo.com

2. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1. Βασική εκπαίδευση

1990: Αποφοίτηση από το 1^ο Λύκειο Ηρακλείου με γενικό βαθμό «*Άριστα, 19&6/11*».

2. Πανεπιστημιακή εκπαίδευση

1991-1999

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Federico II,
Naroli, Italy

3. Μεταπτυχιακή εκπαίδευση

Μάρτιος 2004-

Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με θέμα :
Μελέτη του ρόλου των γονιδίων RAF και RAS
στα κακοήθη νεοπλάσματα του παχέος εντέρου.

Επιβλέπων: Καθηγητής Δ. Σπαντίδος.

*Συνεπιβλέποντες: Αναπλ. Καθηγητής Ο. Ζώρας,
Επικ. Καθηγητής Χ. Τσατσάνης.*

Έναρξη: Μάρτιος 2004.

Νοέμβριος 2005-Μάρτιος 2006

Εκπαιδευτική άδεια από 1.11.2005 έως
31.03.2006 σε κέντρο του Εξωτερικού
(Department of General Practice and Primary
Care, King's College London υπό την επίβλεψη
του Καθηγητή Roger Jones), σύμφωνα με την αρ.
Υ.10δ/οικ.103003/30.09.2005 απόφαση του
Υπουργείου Υγείας & Κοινωνικής Αλληλεγγύης.

3. ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ

Ιούλιος 1999

Πτυχίο Ιατρικής (με βαθμό **105/110**), Ιατρική
Σχολή Πανεπιστημίου Napoli Federico II, Italy

4. ΑΔΕΙΕΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ

Ιούλιος 2000

Άδεια άσκησης ιατρικού επαγγέλματος

Σεπτέμβριος 2006

Τίτλος ειδικότητας Γενικής Ιατρικής

5. ΚΛΙΝΙΚΟ ΕΡΓΟ-ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ

α. Κλινική

Προπτυχιακή

Οκτώβριος 1996 - Οκτώβριος
1998

Συμμετοχή στις δραστηριότητες και τις εφημερίες της
Γενικής Χειρουργικής, Θωρακοχειρουργικής,
Παθολογικής, Ορθοπαιδικής, Καρδιολογικής,
Γαστρεντερολογικής, Νευρολογικής, ΩΡΛ, Ψυχιατρικής,
Εντατικής, Ουρολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού
νοσοκομείου Napoli Federico II, Italy.

Οκτώβριος 1998 - Οκτώβριος
1999

Συμμετοχή στις δραστηριότητες και τις εφημερίες
(Senior Thesis) της Γενικής Χειρουργικής κλινικής του
Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Napoli Federico II, Italy.

Μεταπτυχιακή

Ιούλιος 2000

Επιτυχής έκβαση των προβλεπομένων εξετάσεων
(Γραφείο Κρατικών Εξετάσεων Πανεπιστημίου Σπουδών
NAPOLI ΙΤΑΛΙΑΣ, FEDERICO II) για χορήγηση
άδειας άσκησης Ιατρικού επαγγέλματος με βαθμό **84/90**
(Esame di Stato).

Σεπτέμβριος 2000-Μάιος 2002

Θητεία στην Πολεμική Αεροπορία, με την ιδιότητα
Ιατρού μονάδας. Βραχεία εκπαιδευτική άσκηση στο 251

- Γενικό Νοσοκομείο Αεροπορίας (Οκτώβριος-Δεκέμβριος 2000).
- Μάιος 2002- Μάιος 2006 Έναρξη ειδίκευσης στην ειδικότητα της Γενικής Ιατρικής στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, ΠΑ.Γ.Ν.Η., από 24.05.2002. Ημερομηνία ολοκλήρωσης της ειδίκευσης στις 23.05.2006.
- Εξετάσεις ειδικότητας (Α' εξεταστική, 4-5 Σεπτεμβρίου 2006) και χορήγηση τίτλου ειδικότητας Γενικής Ιατρικής.
- Νοέμβριος 2005 – Μάρτιος 2006 Εγγραφή στο Γενικό Ιατρικό Συμβούλιο της Μ. Βρετανίας (GMC) για χορήγηση άσκησης επαγγέλματος στη Μ. Βρετανία. Κλινική εμπειρία σε Ιατρείο Γενικής Ιατρικής και Πρωτοβάθμιας Φροντίδας (Lambeth Walk Group Practice) σε συνεργασία με τον Dr James May κατά τη διάρκεια της παραμονής.
- 18 Ιανουαρίου 2007 - Διορισμός ως επικουρικός Επιμελητής Β', Γενικής Ιατρικής, στη Μονάδα Αιμοδοσίας, ΠΑ.Γ.Ν.Η (σύμβαση 12 μηνών).

β. Εργαστηριακή

Μεταπτυχιακή

- Μάρτιος 2004 – Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής Σχολής. Εργαστήριο Ιολογίας (Καθηγητής κος Σπαντίδος). Διδακτορική διατριβή με

θέμα : Μελέτη του ρόλου των γονιδίων RAF και RAS στα κακοήγη νεοπλάσματα του παχέος εντέρου.

γ. Ειδικά προσόντα

1. DNA and RNA extraction

-PCR, RT-PCR & in situ RT-PCR-ISH

-Agarose Gel Electrophoresis, Acrylamide Gel Electrophoresis

2. Καλή γνώση χειρισμού H/Y

3. ΓΛΩΣΣΕΣ:

-Ελληνική(Μητρική)

-Αγγλική(First Certificate University of Cambridge)

-Ιταλική (άπταιστη γνώση)

6. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

α. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΤΗ ΔΙΕΘΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1:**Highly conserved sequence of exon 15 BRAF gene and KRAS codon 12 mutation among Greek patients with colorectal cancer.
Symvoulakis EK, Zaravinos A, Panutsopoulos D, Zoras O, Papalambros E, Sigala F, Spandidos DA.
Int J Biol Markers. 2007 Jan-Mar;22(1):12-8.
PMID: 17393356 [PubMed - in process]
- 2:**Headache: a 'suitable case' for behavioural treatment in primary care?
Symvoulakis EK, Clark LV, Dowson AJ, Jones R, Ridsdale L.
Br J Gen Pract. 2007 Mar;57(536):231-7.
PMID: 17359612 [PubMed - in process]
- 3:**Pattern of parotid gland tumors on Crete, Greece: A retrospective study of 131 cases.
Drivas EI, Skoulakis CE, Symvoulakis EK, Bizaki AG, Lachanas VA, Bizakis JG.
Med Sci Monit. 2007 Feb 26;13(3):CR136-140 [Epub ahead of print]
PMID: 17325637 [PubMed - as supplied by publisher]
- 4:**Clearance of technetium-99m-DTPA in pulmonary sarcoidosis.
Antoniou KM, Tzanakis N, Malagari K, Symvoulakis KE, Perisinakis K, Karkavitsas N, Siafakas NM, Bouros DE. Monaldi Arch Chest Dis. 2006 Sep;65(3):141-4.
PMID: 17220103 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- 5:**Quality of life in patients with active sarcoidosis in Greece.
Antoniou KM, Tzanakis N, Tzouveleki A, Samiou M, Symvoulakis EK, Siafakas NM, Bouros D.
Eur J Intern Med. 2006 Oct;17(6):421-6.
PMID: 16962950 [PubMed - in process]
- 6:**Epidemiologic profile of otorhinolaryngological, head and neck disorders in a tertiary hospital unit in Greece: a challenge for general practitioners?
Symvoulakis EK, Klinis S, Alegakis A, Kyrmizakis DE, Drivas EI, Rachiotis G, Philalithis A, Velegrakis GA. BMC Ear Nose Throat Disord. 2006 Jun 7;6:12.
PMID: 16759394 [PubMed - in process]
- 7:**Oral mucosal melanoma: a malignant trap.

Symvoulakis EK, Kyrmizakis DE, Drivas EI, Koutsopoulos AV, Malandrakis SG, Skoulakis CE, Bizakis JG. Head Face Med. 2006 Mar 28;2:7.

PMID: 16569245 [PubMed - in process]

8: Clearance of technetium-99m-DTPA and HRCT findings in the evaluation of patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis.

Antoniou KM, Malagari K, Tzanakis N, Perisinakis K, Symvoulakis EK, Karkavitsas N, Siafakas NM, Bouros D.

BMC Pulm Med. 2006 Feb 16;6:4.

PMID: 16483363 [PubMed - indexed for MEDLINE]

9: Primary care and pattern of skin diseases in a Mediterranean island.

Symvoulakis EK, Krasagakakis K, Komninos ID, Kastrinakis I, Lyronis I, Philalithis A, Tosca AD.

BMC Fam Pract. 2006 Jan 31;7:6.

PMID: 16448566 [PubMed - indexed for MEDLINE]

ΥΠΟ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ (In press)

1: Occupational exposure to lignite and impact on respiratory system among heavy industry personnel.

Drivas SA, Rachiotis G, Alexopoulos CG, Vlastos FD, Zacharias K, Symvoulakis EK, Vasiliou M, Behrakis PK.
Accepted Industrial Health.

β. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Comparison of sputum induction with bronchoalveolar lavage fluid cytokine IL-12 and IL-18 levels in patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF/UIP).

K. M. Antoniou, M. Alexandrakis, K. Sfiridaki, N. Tzanakis, **E. K. Symvoulakis**, I. Tsiligianni, D. Bouros, N. M. Siafakas.

ATS 2004 – Orlando 100th International Conference (Florida, USA May 21-26, 2004).

2. Relationship Between HRCT Findings and Clearance of Technetium-99m-DTPA in the Evaluation of Patients with Interstitial Lung Diseases (ILD).
M. Stathaki, K. Antoniou, K. Malagari, S. Koukouraki, E. Papadaki, **E. Symvoulakis**, K. Perisinakis, N. Siafakas, D. Bouros, N. Karkavitsas.
Annual Congress of the EANM. Helsinki, 2004
3. Angioedema related to antihypertensive agents. Points of skepticism. **E. Symvoulakis**, E. Drivas, D. Kyrmizakis, G. Velegrakis, J. Bizakis, C. Lionis. 11th Conference of European Society of General Practice / Family Medicine, Kos island, Greece 3-7 September 2005.
4. Common causes of visits in the Ear Nose and Throat Emergency Department. S. Klinis, **E. Symvoulakis**, H. Braden, T.Chimona, E. Drivas, A. Philalithis, G. Velegrakis. 11th Conference of European Society of General Practice / Family Medicine, Kos island, Greece 3-7 September 2005.
5. Foreign body ingestion in childhood. A challenge for primary care physicians? I. Komninos, **E. Symvoulakis**, I. Vlachakis, G. Sakellaris, E. Panagouloupoulou, A. Philalithis, G. Charissis. 11th Conference of European Society of General Practice / Family Medicine, Kos island, Greece 3-7 September 2005.
6. Investigation of angiogenetic markers (ENA-78 and GRO- α) in patients with pulmonary sarcoidosis. K. M. Antoniou, N. Tzanakis, E. G. Tzortzaki, I. Tsiligianni, K. Sfiridaki, E. R. Kandidaki, **E. Symvoulakis**, D. Bouros, N. M. Siafakas. ERS Congress. Denmark, September 2005.
7. Highly conserved exon 15 BRAF among Greek patients with colorectal cancer. **E. K. Symvoulakis**, D. Panutsopulos, G. Sourvinos, A. Zaravinos, O. Zoras, E. Papalambros, F. Sigala, D.A. Spandidos. 11th World Congress on Advances in Oncology and 9th International Symposium on Molecular Medicine. Hersonissos,

12-14 October 2006.

γ. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1: E. Mazokopakis, E. Symvoulakis, I. Kazakou, J. A. Papadakis, E. Barbunakis.
Aplastic anaemia induced by Epstein-Barr virus infection.
Haema.2005;8(2):314-315.

δ. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Κατάποση ξένου σώματος στα παιδιά. Η πιθανότητα αντιμετώπισης της στο χώρο της ΠΦΥ. Αναδρομική μελέτη δεκαετίας.

I. Κομνηνός, A. Φθενάκης, **E. Συμβουλάκης**, I. Βλαχάκης, A. Φιλαλήθης, Γ. Χαρίσης.
Ανακοίνωση στο 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής.
(Σιθωνία, 30.04.2003 - 04.05.2003).

2. Οι θεωρίες γήρανσης και η φροντίδα των γηριατρικών ασθενών: Ο ρόλος της Γενικής Ιατρικής.

Δ. Καρακίτσος, I, Κομνηνός, M. Παπαχατζάκη, **E. Συμβουλάκης**, A. Φθενάκης, Δ. Αλβανός, K. Κυριακόπουλος, A. Φιλαλήθης.
Ανακοίνωση στο 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής.
(Σιθωνία, 30.04.2003 - 04.05.2003).

3. Συσχέτιση HRCT ευρημάτων και πνευμονικής κάθαρσης του Technetium-99m-Diethylenetriamine pentaacetate (Tc-99m-DTPA) στην εκτίμηση ασθενών με Σαρκοείδωση και ασθενών με Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση.

Κατερίνα Αντωνίου, Κατερίνα Μαλαγάρη, Γιώργος Μαλτεζάκης, Ελένη Τζωρτζάκη, Νίκος Τζανάκης, **Εμμανουήλ Συμβουλάκης**, Δέσποινα Μωραϊτάκη, Νίκος Μ Σιαφάκας, Δημοσθένης Μπούρος.

Ανακοίνωση στο 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος.

(Αθήνα, 03.12.2003- 07.12.2003).

4. Η σπουδαιότητα της αρχικής αντιμετώπισης στην θεραπεία του παιδικού τραύματος και η δυνατότητα αντιμετώπισης του από τον γενικό γιατρό στο χώρο της ΠΦΥ.

Ι. Κομνηνός, **E. Συμβουλάκης**, Σ. Καλπαδάκης, Κ. Βελαώρας, Ι. Άρμπιρος, Γ. Σακελλάρης, Ι. Βλαχάκης, Α. Φιλαλήθης, Γ. Χαρίσης. *Ανακοίνωση στο 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής.*

(Κως, 14.04.2004 – 18.04.2004).

5. Η προοπτική βελτίωσης στην αρχική αντιμετώπιση του παιδιού – τραυματία στο χώρο της Πρωτοβάθμιας Φροντίδας Υγείας. Εμπειρία του Τ.Ε.Π. της Κλινικής Χειρουργικής Παίδων, ΠΑ.Γ.Ν.Η.

Ι. Κομνηνός, **E. Συμβουλάκης**, Μ. Ανδρεαδάκης, Α. Καραντζαλη, Γ. Μουζάκης, Κ. Βελαώρας, Ι. Άρμπιρος, Γ. Σακελλάρης, Ι. Βλαχάκης, Α. Φιλαλήθης, Γ. Χαρίσης. *Ανακοίνωση στο 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής.*

(Κως, 14.04.2004 – 18.04.2004).

6. Συνήθη δερματολογικά προβλήματα στο Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Αναδρομική μελέτη ενός έτους.

E. Συμβουλάκης, Ι. Κομνηνός, Ι. Λυρώνης, Ι. Καστρινάκης, Κ. Κρασαγάκης, Α. Τόσκα, Α. Φιλαλήθης.

Ανακοίνωση στο 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής.

(Κως, 14.04.2004 – 18.04.2004).

7. Διερεύνηση, διάγνωση και αντιμετώπιση της οξείας επιδιδυμίτιδας στην παιδική ηλικία.

Γ. Σακελλάρης, **E. Συμβουλάκης**, Σ. Καλπαδάκης, Γ. Χαρίσης.

Ανακοίνωση στο 12^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο.

(Κρήτη, 28-31 Οκτωβρίου 2004).

8. Επιδημιολογική μελέτη ασθενών με φλεγμονή των κόλπων προσώπου. Η θέση του Γενικού Ιατρού στη διαγνωστική προσέγγιση και αντιμετώπιση τους στο χώρο της ΠΦΥ.

Σ. Κλίνης, **E. Συμβουλάκης**, Χ. Γαλανάκης, Ε. Παναγιωτάκη, Α. Φιλαλήθης, Γ. Βελεγράκης.

Ανακοίνωση στο 18^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής.

(Κέρκυρα, 26.04.2006 – 30.04.2006).

9. Κλειστές κακώσεις κοιλιακής χώρας στα παιδιά. Εμπειρία 5 ετών.

Σ. Κλίνης, **E. Συμβουλάκης**, Μ. Μιχαλάκης, Ι. Καστρινάκης, Ι. Λυρώνης, Ι. Βλαχάκης, Α. Φιλαλήθης, Γ. Χαρίσης.

Ανακοίνωση στο 18^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής.

(Κέρκυρα, 26.04.2006 – 30.04.2006).

10. Εμβολιασμοί ενηλίκων και προαγωγή της υγείας. Οι απόψεις του πληθυσμού σε αγροτική περιοχή της Κρήτης.

Ι. Καστρινάκης, Ι. Λυρώνης, Σ. Κλίνης, **E. Συμβουλάκης**, Α. Αλεγκάκης, Γ. Γρηνάκης, Ε. Ροβίθης, Ε. Μαρκάκης, Α. Φιλαλήθης.

Ανακοίνωση στο 18^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής.

(Κέρκυρα, 26.04.2006 – 30.04.2006).

ε. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΒΙΒΛΙΑ

1. Μπούρος Δ. Αντωνίου Κ, **Συμβουλάκης Μ.** Θεραπεία των παραπνευμονικών πλευριτικών συλλογών. Εκδόσεις της Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας, Νοσήματα του υπεζωκότα, Αθήνα 2004.

7. ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

- α. Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα των ειδικευομένων Γενικής Ιατρικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠαΓΝΗ) (2002-2006).
- β. Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα της Παθολογικής Κλινικής Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠαΓΝΗ) (Οκτώβριος 2002).
- γ. Μέλος στη συντακτική ομάδα του Newsletter Θέματα στη Γενική Ιατρική, έτος 2004, Κλινική Οικογενειακής και Κοινωνικής Ιατρικής & Εργαστήριο Προγραμματισμού Υπηρεσιών Υγείας ΠΑ.Γ.Ν.Η (υπό την επίβλεψη του Αν. Καθηγητή κου Χ. Λιονή).

8. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΕΣ ΕΠΙΤΡΟΠΕΣ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ-ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ - ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

1. Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής του Forum Εκπαίδευσης στη Γενική Ιατρική για τα ακαδημαϊκά έτη 2005-2006 και 2006-2007.
2. Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής του 11th World Congress on Advances in Oncology and 9th International Symposium on Molecular Medicine. Hersonissos, 12-14 October 2006.
3. Μέλος της ομάδας ομοφωνίας (nominal consensus group) στο Ευρωπαϊκό πρόγραμμα INTERREG III για τη βελτίωση διαχείρισης ασθενών στα κέντρα υγείας με τη χρήση νέων τεχνολογιών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	17
Abstract.....	19
Ευχαριστίες.....	21
Συντμήσεις.....	22
1.	ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....24
1.1	Γενικά.....24
1.1.1	Βασική Γενετική.....25
1.1.2	Μοριακή Γενετική.....28
1.2	ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ.....30
1.3	ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ.....34
1.4	ΜΕΤΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ.....37
1.5	ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΕΣ.....38
1.6	ΚΛΗΡΟΝΟΜΟΥΜΕΝΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ.....40
1.6.1	Οικογενής Αδενοματώδης Πολυποδίαση.....40
1.6.2	Κληρονομικός μη πολυποδιασικός καρκίνος του παχέος εντέρου.....41
2.	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ RAF ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....45
2.1	ΔΟΜΗ ΤΩΝ RAF ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....47
2.1.1	Ρύθμιση της ενεργότητας της RAF κινάσης.....48
2.1.2	Ενεργοποίηση των καθοδικών τελεστών από την RAF.....54
2.2	RAF ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....58
2.2.1	B-raf μεταλλάξεις.....58
2.2.2	C-raf μεταλλάξεις.....64
3.	Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ RAS ΓΟΝΙΔΙΩΝ.....65
3.1	ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ RAS.....66
3.1.1	Δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών RAS.....67
3.1.2	Λειτουργικές ιδιότητες των RAS.....71
3.2	ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΚΑΙ RAS.....77
3.3	ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΚΑΙ RAS.....78
3.4	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ – ΟΡΘΟΥ.....82
3.5	ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....85
3.5.1	Συμπτώματα.....85
3.5.2	Παράγοντες κινδύνου – έλεγχος και διάγνωση.....87
3.5.3	Ιστοπαθολογία.....94
3.5.4	Σταδιοποίηση.....96
3.5.4.1	Σύστημα Dukes.....97
3.5.4.2	Σύστημα TNM.....97
3.6	Πολύποδες, γενετικές μεταβολές και καρκίνος του παχέος εντέρου.....98
4.	Σκοπός της μελέτης.....102
5.	Υλικά και μέθοδοι.....104

5.1	Υλικό από ασθενείς.....104
5.2	Εκχύλιση DNA από τους ιστούς.....105
5.2.1	Τεχνική εκχύλισης με φαινόλη-χλωροφόρμιο.....106
5.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....107
5.3.1	Η βασική αρχή λειτουργίας της PCR.....108
5.3.2	Συνθήκες αντιδράσεων PCR και εκκινητές.....110
5.4	Ηλεκτροφόρηση του DNA και των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.....112
5.5	Άμεσος έλεγχος της αλληλουχίας του εξωνίου 15 του B-raf και ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP) για το K-ras.....114
5.6	Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....117
5.7	Υλικά και προέλευση τους.....117
6.	Αποτελέσματα.....121
7.	Συζήτηση.....126
8.	Συμπεράσματα.....136
9.	Βιβλιογραφία.....138
10.	Παράρτημα – Σχετική δημοσίευση.....157

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου θεωρείται από τα συχνότερα νεοπλάσματα στον άνθρωπο. Περίπου 1.000.000 νέες περιπτώσεις καρκίνου παχέος-ορθού εμφανίζονται, παγκοσμίως, κάθε χρόνο, ενώ περίπου 500.000 άνθρωποι καταλήγουν, ετησίως, λόγω της συγκεκριμένης κακοήθειας. Φυλετικές και εθνολογικές διαφορές καθώς και περιβαλλοντικές επιδράσεις σχετίζονται με διαφορές στην επίπτωση του νεοπλάσματος. Ο καρκίνος παχέος-ορθού είναι το επιφανόμενο μιας πολυσταδιακής διεργασίας. Η απενεργοποίηση του γονιδίου APC (Adenomatous Polyposis Coli), διαταραχές της μεθυλίωσης του DNA, η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων RAS, η απώλεια του γονιδίου DCC (deleted in colon cancer), η αδρανοποίηση μέσω απάλειψης του p53, ο ρόλος των μεταλλακτικών γονιδίων MMR, αλλά και επιπρόσθετες μεταλλάξεις, είναι βήματα που επάγουν την καρκινογένεση και συνεισφέρουν στην κακοήθη συμπεριφορά.

Η οικογένεια των RAS γονιδίων (KRAS, NRAS, HRAS), στα φυσιολογικά κύτταρα, έχουν πολλαπλές λειτουργίες ρυθμίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Ο καταρράκτης Ras/Raf/MEK/MAPK πρωτεϊνικών κινασών, μέσω μηχανισμού φωσφορυλίωσης, καταλύει την επαγωγή μιτωγόνων σημάτων στον πυρήνα του κυττάρου, με αποτέλεσμα τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου KRAS στο κωδικόνιο 12 σχετίζονται ισχυρά με την ογκογόνο ενεργοποίηση του. Η ομάδα RAF γονιδίων περιλαμβάνει τρία πρωτο-ογκογονίδια, το ARAF1, το RAF1 και το BRAF. Το BRAF γονίδιο ανευρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 7q34 και είναι λειτουργικό γονίδιο. Η πρωτεΐνη, που κωδικοποιεί ανήκει στην κατηγορία πρωτεϊνών σερίνης-θρεονίνης κινάσης και ενεργοποιείται από το σύνδεσμο GTP – Ras. Εμπλέκεται στη μεταγωγή μιτωγόνων σημάτων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη στον πυρήνα. Σημειακές μεταλλάξεις με ανεπαρκή επιδιόρθωση, μάλλον, βρίσκονται πίσω από την ογκογόνο ενεργοποίηση του. Εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο ενώ φαίνεται να έχει και αντι-αποπτωτική δράση. Το BRAF, ίσως, είναι προτιμητέος στόχος μετάλλαξης αφού κωδικοποιεί πρωτεΐνη που χαρακτηρίζεται από υψηλότερη βασική δραστηριότητα κινάσης σε σχέση με το RAF1. Η πλέον συνήθης μετάλλαξη του BRAF, στον καρκίνο παχέος-ορθού, είναι η V600E (εξώνιο 15) που χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση βαλίνης με γλουταμικό οξύ, στη θέση 600 (προηγουμένως βιβλιογραφικά αναφερόμενη σαν V599E), της πρωτεϊνικής μορφής που κωδικοποιεί και φαίνεται να συναντάται πάνω από το 50% των μεταλλάξεων που παρατηρήθηκαν ενώ σε καμία περίπτωση δε συσχετίστηκε με συνύπαρξη μεταλλάξεων KRAS.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της συνεισφοράς των ογκογονικών μεταλλάξεων του BRAF στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου, της δυνητικής τους σχέση με μεταλλάξεις του KRAS στον ίδιο πληθυσμό καρκινικών δειγμάτων καθώς και η ανάδειξη πιθανών συσχετίσεων με τα κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων που εξετάστηκαν.

Στα πλαίσια αυτής της μελέτης πραγματοποιήθηκε απ' ευθείας ανίχνευση της ακολουθίας βάσεων του εξωνίου 15 του γονιδίου BRAF σε 61 δείγματα σποραδικών όγκων παχέος-ορθού, χειρουργικώς εξαιρεθέντων. Κάθε δείγμα εξετάστηκε παθολογοανατομικά για την επιβεβαίωση της ιστολογίας του (αδενοκαρκινώματα). Καταγράφησαν ατομικό και οικογενειακό ιστορικό των ασθενών, δημογραφικά και κλινικά στοιχεία. Μείζον κριτήριο αποτέλεσε η σποραδικότητα των όγκων. Για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο BRAF και KRAS ενισχύθηκαν οι περιοχές του εξωνίου 15 και του κωδικονίου 12 αντίστοιχα με την τεχνική της PCR μέσω της χρήσης κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων. Άμεσος έλεγχος της

ακολουθίας των αλληλουχιών του εξωνίου 15 του BRAF πραγματοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα με αυτόματο αναλυτή, σε κέντρο του εξωτερικού [BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems), ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer] ενώ για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων του κωδικονίου 12 στο γονίδιο KRAS ακολουθήθηκε κατά κύριο λόγο ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP) με τη χρήση περιοριστικής ενδονουκλεάσης *MvaI* (Roche Diagnostics GmbH, Germany). DNA από την καρκινική κυτταρική σειρά SW480 φέρουσα την ομόζυγη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του KRAS χρησιμοποιήθηκε ως θετικό σημείο αναφοράς και ελέγχου. Ακολούθησε τυχαιοποιημένος έλεγχος επιβεβαίωσης KRAS θετικών δειγμάτων με άμεσο έλεγχο της ακολουθίας βάσεων του κωδικονίου 12.

Βρέθηκε ότι η ακολουθία του εξωνίου 15 σε όλα τα δείγματα ήταν υψηλά διατηρηθείσα ως προς το φυσιολογικό. Δεν ταυτοποιήθηκε καμία νουκλεοτιδική μεταβολή ή απόκλιση που θα μπορούσε να επιφέρει τροποποιήσεις στην αλληλουχία αμινοξέων σε επίπεδο BRAF πρωτεΐνης. Η τεχνική ανάλυση για την ανίχνευση KRAS μεταλλάξεων, στο κωδικόνιο 12 ήταν εφικτή σε 58 δείγματα. Δεκαεπτά από τα 58 δείγματα έφεραν τις εν λόγω μεταλλάξεις. Όλες οι KRAS μεταλλάξεις ήταν ετερόζυγες. Από τους 17 όγκους φέροντες τις KRAS μεταλλάξεις 12 (34.3%) προέρχονταν από άνδρες (από 35 που εξετάστηκαν συνολικά) και 5 (21.7%) από γυναίκες (από 23 που εξετάστηκαν συνολικά). Ασθενείς με ηλικία 70 έτη ή νεότεροι έφεραν KRAS μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12, συχνότερα από ότι οι ασθενείς ηλικίας άνω των 70 ετών ($P= 0.028$, Pearson chi square test). Επίσης ασθενείς ηλικίας μεταξύ 61 και 70 ετών ήταν πιο πιθανό να 'φέρουν' τις εν λόγω μεταλλάξεις σε σχέση με άλλες ηλικιακές ομάδες (≤ 60 έτη ή >70 έτη), ($P= 0.040$, Pearson chi square test). Το 38.1% των όγκων με εντόπιση στο τυφλό, ανιόν και εγκάρσιο ενώ το 24.3% των όγκων με εντόπιση στο κατιόν κόλον και ορθό έφεραν μεταλλάξεις αντιστοίχως. Καρκινώματα σε Dukes' A στάδιο και Dukes' B στάδιο έφεραν KRAS μεταλλάξεις σε ποσοστό 20.0% και 28.6% αντιστοίχως ενώ όγκοι σε Dukes' C στάδιο και Dukes' D στάδιο είχαν τις εν λόγω μεταλλάξεις σε ποσοστό 34.6% και 27.3% αντίστοιχα. Σε δύο μόνο περιπτώσεις δεν υπήρχαν επαρκή στοιχεία για το στάδιο κατά Dukes. Η περιγραφική προσέγγιση αυτών των αποτελεσμάτων αναδεικνύει ότι όγκοι σε στάδιο Dukes' C και D έφεραν τις περισσότερες μεταλλάξεις (περίπου 60%). Από 43 καλά και μέτρια διαφοροποιημένους όγκους το 27.9% έφερε KRAS μεταλλάξεις ενώ από 8 φτωχά διαφοροποιημένους όγκους το 37.5% έφερε τις εν λόγω μεταλλάξεις (στοιχεία διαθέσιμα για 51 δείγματα όγκων). Τέλος KRAS μεταλλάξεις βρέθηκαν στο 25.6% των μη βλεννοπαραγωγών όγκων που εξετάστηκαν και στο 40% των βλεννοπαραγωγών όγκων (στοιχεία διαθέσιμα για 44 δείγματα όγκων).

Η μη ανεύρεση BRAF μεταλλάξεων είναι, ίσως, προϊόν περιβαλλοντικών, εθνολογικών διαφορών ή και άλλων μοριακών φαινομένων. Η αυτοματοποιημένη ανίχνευση της ακολουθίας βάσεων του εξωνίου 15 και τα αποτελέσματα αυτής απομακρύνουν ισχυρά την πιθανότητα παρεκκλίσεων λόγω μεθοδολογίας. Από την άλλη πλευρά, διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές παρουσιάζουν συχνότητες BRAF μεταλλάξεων με μεγάλο εύρος διακύμανσης (5% - 20%) από σειρά σε σειρά, γεγονός που έμμεσα μπορεί να υποθεθεί ότι σχετίζεται, τουλάχιστον μερικώς, με πληθυσμιακές διαφορές λόγω περιβαλλοντικών, εθνολογικών ή και φυλετικών παραγόντων. Οι KRAS μεταλλάξεις φαίνεται να παραμένουν οι «συνήθεις ύποπτοι» αφού η συχνότητα με την οποία ανευρίσκονται, στην παρούσα μελέτη, είναι περίπου 30%, εύρημα συμβατό με τη διεθνή βιβλιογραφία.

ABSTRACT

Colon cancer is one of the most common human tumors. There are approximately 1 million new cases of colorectal cancer annually world-wide, and about 500.000 deaths every year by the disease. Racial and ethnic differences as well as environmental influences are associated with differences in the incidence rates of the disease.

Colorectal cancer is the result of a multistage process. Inactivation of the APC gene (Adenomatous Polyposis Coli), DNA methylation disturbances, activation of RAS oncogene, loss of DCC gene (deleted in colon cancer), inactivation through deletion of p53, the role of MMR mutagenesis genes as well as additional mutations are steps which induce tumorigenesis and contribute to malignant behaviour.

RAS family genes (KRAS, NRAS, HRAS), in normal cells, are involved in many cellular processes, controlling cell proliferation and differentiation. The protein kinase Ras/Raf/MEK/MAPK cascade, through phosphorylation, catalyses the induction of mitogenic signals in the cell nucleus, resulting in control of the cell cycle. Point mutations of KRAS codon 12 are strongly associated with its mutagenic activation. The RAF group of genes includes three protooncogenes, the ARAF1, RAF1 and BRAF. BRAF gene is located in chromosomal position 7q34 and is a functional gene. The encoded protein is a member of serine/threonine kinase proteins and is activated by the link GTP – Ras. It is involved in the induction of mitogenic signals from the cellular membrane to the nucleus. Point mutations with inefficient mismatch repair may promote its oncogenic activation. It is involved in the cell cycle and in antiapoptotic activity. BRAF might be favorable mutation target since the encoded protein has constitutively higher kinase activity comparative to RAF1. The most common RAF mutation in colorectal cancer is V600E (exon 15) which converts a valine residue to glutamic acid at amino acid position 600 (previously reported as V599E) of the encoded protein and it represents more than 50% of the observed mutations whereas no coexistence of KRAS mutations was observed.

The aim of the present study is to investigate the contribution of oncogenic BRAF mutations to colon cancer, the potential relation with KRAS mutations in the same group of cancer specimens and the unveiling of possible correlations with clinical and histopathological features of the examined tumors.

In this study, direct sequencing was performed of exon 15 of the BRAF gene in 61 sporadic colorectal cancers, surgically excised. Every specimen was examined pathologically for confirmation of the histology (adenocarcinomas). Also, personal and family medical history of the patients was recorded as well as demographic and clinical data. Major criterion was the sporadic nature of the tumors. For the detection of point mutations in BRAF and KRAS genes, polymerase chain reaction was used to amplify exon 15 and codon 12 respectively, using specific oligonucleotide primers. Direct sequencing was performed for exon 15 BRAF analysis, in all specimens, using automated analyzer [BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems), ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer]. For the detection of point mutations in KRAS codon 12, restriction fragment length polymorphism analysis was performed (RFLP) by using restriction endonuclease MvaI (Roche Diagnostics GmbH, Germany). DNA from the cancer cell line SW480 which harbored the KRAS codon 12 mutation in homozygous status was used as a positive control. Subsequently, randomly selected samples, positive for KRAS mutations after RFLP analysis, were sequenced and the initial results were confirmed.

It was found that the coding sequence of exon 15 was perfectly conserved in all

samples. No nucleotide exchange that could interfere by modifying the aminoacid sequence of the BRAF protein was detected. Molecular analysis for the detection of KRAS mutations was possible for 58 samples. Seventeen samples were positive for KRAS mutations. All KRAS mutations were detected in heterozygous state. Among the 17 tumors with KRAS codon 12 mutations, 12 (34,3%) were male cases (among 35 male cases examined) and 5 (21.7%) were women cases (among 23 women cases examined). Patients with age 70 years or younger were more commonly carriers of KRAS codon 12 mutations than older patients (>70 years), ($P= 0.028$, Pearson chi square test). Males between 61 and 70 years were more commonly carriers of KRAS mutations compared to younger or older patients, ($P= 0.040$, Pearson chi square test). The 38.1% of the tumors located in the proximal colon (cecum, ascending colon, and transverse colon) and 24.3% of the tumors located in the distal colon (descending or sigmoid colon and rectum) harbored KRAS mutations respectively.

The 20.0% of Dukes' stage A and 28.6% of Dukes' stage B tumors harbored KRAS mutations, while Dukes' stage C and D tumors carried these mutations in rates of 34.6% and 27.3% respectively. Tumor stage was uncertain in two cases.

The descriptive approach of these results reveals that Dukes stage C and D tumors harbored most of the observed mutations (over 60%). From 43 tumors of good and moderate differentiation, 27.9% were carriers of KRAS mutations, while from 8 tumors of poor differentiation, 37.5% were carriers of the same mutations (data available for 51 tumor samples). Finally, KRAS mutations were found in 25.6% of non mucinous tumors examined and in 40% of mucinous tumors (data available for 44 tumor samples). The absence of BRAF mutations results perhaps, from environmental, ethnic differences or/and other molecular events. Sequencing of exon 15 and subsequent results make the possibility of methodological discrepancies unlikely. On the other hand, several studies report differences of BRAF mutation frequencies of wide range (5%-20%) from line to line, which presumably correlates, at least in part, with population differences due to environmental, ethnic or racial factors. KRAS mutations seem to remain "the common suspects" since their detection frequency, in the present study, is approximately 30%, which is in alignment with the international reports.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή Δημήτριο Σπαντίδο για την συνεχή και πολύτιμη επιστημονική του συνεισφορά και την υποστήριξη κατά την διάρκεια της παρούσας εργασίας. Ευχαριστώ επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή Γεώργιο Σουρβίνο για την άρτια και στοχευμένη επιστημονική καθοδήγηση κατά την διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον συνεπιβλέποντα Αν. Καθηγητή Οδυσσέα Ζώρα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την αρχή και την ηθική υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου αυτής καθώς και τον συνεπιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή Τσατσάνη Χρήστο για την ευγενική πρόθεση του να συνδράμει ουσιαστικά όποτε του ζητήθηκε. Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Αλέξανδρο Ζαφειρόπουλο για τις συμβουλές του σε επιστημονικό και τεχνικό επίπεδο. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον συνάδελφο διδάκτορα συνεργάτη και φίλο Δημήτριο Πανουτσόπουλο. Ευχαριστώ τους συνεργάτες από το χώρο του Εργαστηρίου Κλινικής Ιολογίας.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για την συμπαράσταση και την υποστήριξη της.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

APC= γονίδιο της αδενωματοδούς πολυποδιάσεως (adenomatous polyposis coli)

bp= ζεύγη βάσεων (base pair)

CDK= κινάσες εξαρτώμενες από τις κυκλίνες (cyclin-dependant kinase)

DAG= διακυλγλυκερόλη

DCC= έχει απαλειφθεί σε καρκίνο του παχέος εντέρου (deleted in colon cancer)

EGF= επιδερμικός αυξητικός παράγων (epidermal growth factor)

EGFR= υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor)

FAP= οικογενής αδενωματοδής πολυποδίαση (familial adenomatous polyposis)

FGF= αυξητικός παράγων των ινοβλαστών (fibroblast growth factor)

G0 φάση= φάση ηρεμίας

G1 και G2 φάσεις= δύο χάσματα του κυτταρικού κύκλου: το G1 (πριν τη φάση S) και το G2 (πριν τη φάση M)

GAP= GTPάση ενεργοποιός πρωτεΐνη (GTPase activating protein)

GEF= παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (guanine exchange factor)

GTP και GDP= νουκλεοτίδια γουανίνης

HGF/SF= ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγων-σκεδαστικός παράγων (scatter factor)

HNPCC= κληρονομικός μη πολυποδιασικός καρκίνος του παχέος εντέρου (hereditary non-polyposis colorectal cancer)

IGF= αυξητικός παράγων ινσουλίνης

InsP3= τριφωσφορική ινοσιτόλη

LOH= απώλεια ετεροζυγωτίας (loss of heterozigosity)

MAPKK (ή MEK1)= κινάση της μιτωγόνου ενεργοποιούσας πρωτεϊνικής κινάσης (mitogen activating protein kinase kinase)

MAPKs= και τις μιτωγόνα ενεργοποιούσες πρωτεϊνικές κινάσες (ή αλλιώς εξωκυττάρια κινάσες ρυθμιστών σήματος (extracellular signal-regulated kinases, ή ERKs)

MSI= αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA (microsatellite instability)

MMR= μεταλλακτικά γονίδια (mismatch repair genes)

NGF= αυξητικός παράγων νεύρων (nerve growth factor)

PCR= αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (polymerase chain reaction)
PDGF= αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από αιμοπετάλια (platelet-derived growth factor)
PI3-kinase= φωσφατιδύλ-ινοσιτόλη-3 κινάση
PKC= πρωτεϊνική κινάση C
R σημείο= σημείο περιορισμού (restriction point)
RFLP= ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικού θραύσματος (restriction fragment length polymorphism)
RTK= υποδοχέας κινάσης τυροσίνης (receptor tyrosine kinase)
S φάση= σύνθεσης του DNA
src= κινάση τυροσίνης
SRE= στοιχεία ανταπόκρισης ορού (serum response element)
SRF= παράγοντα ανταπόκρισης ορού (serum response factor)
TCF= τριμερής παράγων συμπλέγματος (ternary complex factor)
TCR= υποδοχέας των T κυττάρων (T cell receptor)
TGFα= μετασχηματιστικός αυξητικός παράγων α (transforming growth factor)
TGFβ= μετασχηματιστικός παράγων β
VEGF= αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων (vascular endothelial growth factor)
wt= φυσιολογικό (wild type)
ΚΠ= καρκίνος παχέος εντέρου
ΚΠΟ= καρκίνος του παχέος εντέρου και του ορθού
Μ φάση= μίτωση, ή κυτταρικός αναδιπλασιασμός

1. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

1.1 Γενικά

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι συχνή κακοήθεια τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Ένας στους 20 ανθρώπους θα αναπτύξει καρκίνο παχέος εντέρου-ορθού κατά τη διάρκεια της ζωής του, γεγονός που καθιστά τη συγκεκριμένη νόσο σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου παρουσιάζεται, δυνητικά, σαν σποραδικός, κληρονομούμενος ή οικογενής [1]. Ο σποραδικός καρκίνος, χωρίς κληρονομικής ή οικογενούς προδιάθεσης υπόστρωμα, συναντάται περίπου στο 70% των περιπτώσεων καρκίνου παχέος εντέρου-ορθού στο γενικό πληθυσμό. Ο σποραδικός καρκίνος είναι συχνός σε άτομα μεγαλύτερα των 50 ετών σαν επακόλουθο επιδράσεων διαιτητικών, περιβαλλοντικών παραγόντων καθώς και της φυσιολογικής διαδικασίας γήρανσης. Σε λιγότερο από 10% των ασθενών υπάρχει σαφής κληρονομική προδιάθεση. Τα κληρονομούμενα σύνδρομα περιλαμβάνουν εκείνα τα οποία πλαισιώνονται από την παρουσία πολυπόδων σαν μείζονα εκδήλωση και εκείνα στα οποία οι πολύποδες απουσιάζουν. Τα σύνδρομα πολυποδίασης ταξινομούνται σε εκείνα της οικογενούς αδενοματώδους πολυποδίασης (APC) και σε εκείνα με πολύποδες με χαρακτηριστικά αμαρτωμάτων. Τα σύνδρομα χωρίς χαρακτηριστικά πολυποδίασης περιλαμβάνουν τον κληρονομικό μη πολυποδιασικό καρκίνο του παχέος εντέρου (HNPCC) με διακριτές δύο νοσολογικές οντότητες, τα σύνδρομα Lynch I και Lynch II. Το τρίτο πρότυπο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου είναι γνωστό σαν οικογενής καρκίνος του παχέος εντέρου. Στις συγκεκριμένες οικογένειες ο

καρκίνος αναπτύσσεται με τέτοια συχνότητα που απομακρύνει από το σποραδικό καρκίνο αλλά από την άλλη δε στηρίζεται και στα πρότυπα ενός κληρονομικού συνδρόμου. Τα τρία αυτά πρότυπα οριοθετούν το ευρύ πλαίσιο της βιολογίας όλων των τύπων του καρκίνου του παχέος εντέρου-ορθού στον άνθρωπο. Πρόσφατες επιστημονικές ανακαλύψεις συνεισέφεραν σημαντικά στην κατανόηση της μοριακής βάσης των διαφόρων προτύπων του καρκίνου του παχέος εντέρου. Μεταλλάξεις στο σπέρμα, ωάριο ή ζυγωτό θα κληροδοτηθούν στις γενιές που ακολουθούν και θα αποτελέσουν τη βάση των κληρονομικών μορφών. Η συνάθροιση σωματικών μεταλλάξεων σε ένα κύτταρο είναι η αιτιολογική βάση του σποραδικού καρκίνου. Στους Εβραίους Ashkenazi μια μετάλλαξη που καταγράφηκε αρχικά σαν πολυμορφισμός συσχετίζεται ισχυρά με τον οικογενή καρκίνο του παχέος εντέρου. Μεταλλάξεις τριών διαφορετικών ομάδων γονιδίων έχουν περιγραφεί σαν αιτιολογικές συνιστώσες για τον καρκίνο του παχέος εντέρου.

1.1.1 Βασική Γενετική

Το DNA του γενετικού κώδικα αποτελεί έναν οδηγό για τη διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού έχουν DNA που είναι θεωρητικά πανομοιότυπο με το DNA του ζυγωτού. Μεταλλάξεις σ' αυτό το σημείο ή σε προηγούμενο στάδιο (σπέρμα, ωάριο) δυνητικά προκαλούν κάποιο 'γενετικό έλλειμμα ή αλλοίωση' που ευθύνονται για την κληροδότηση του καρκινικού 'προτύπου'.

Συχνότερα μεταλλάξεις μπορούν να επισυμβούν σε ένα κύτταρο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ενός ιστού ή οργάνου. Οι σωματικές μεταλλάξεις οδηγούν σε κλωνικό πολλαπλασιασμό του κυττάρου που περιέχει το μεταλλαγμένο γενετικό υλικό. Ο σποραδικός καρκίνος του παχέος εντέρου σχετίζεται με τη συνάθροιση πολλαπλών μεταλλάξεων στο ίδιο κύτταρο [2]. Γονίδια, συχνά μεταλλαγμένα στον καρκίνο, ανήκουν σε μία από τρεις διαφορετικές ομάδες. Οι ομάδες αυτές είναι τα ογκογονίδια, τα κατασταλτικά, και τα μεταλλακτικά γονίδια [3,4].

Τα ογκογονίδια είναι φυσιολογικά γονίδια υπεύθυνα για την επαγωγή του ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [5,6]. Όταν αυτά είναι μεταλλαγμένα η απώλεια του ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού οδηγεί στον καρκίνο. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια περιγράφησαν αρχικά από τον Knudson στη μελέτη του πάνω στην επιδημιολογία του ρετινοβλαστώματος σε παιδιά [7,8]. Ο Knudson χρησιμοποίησε στην αρχή τον όρο αντι-ογκογονίδιο για να περιγράψει το γεγονός ότι ένα φυσιολογικό γονίδιο ήταν αρκετό για τον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης και ότι μόνο η απώλεια και των δύο αλληλόμορφων ενός κυττάρου πυροδοτεί την εμφάνιση του όγκου αναδεικνύοντας την υπόθεση της υπολειπόμενης γενετικής βλάβης στον καρκίνο. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι φυσιολογικά γονίδια που θα απολέσουν τη λειτουργία τους όταν και τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου αδρανοποιηθούν. Ο Knudson διαπίστωσε ότι όταν και τα δύο αλληλόμορφα είναι φυσιολογικά δύο μεταλλακτικά γεγονότα ή 'χτυπήματα' είναι αναγκαία για την απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου [6,7]. Στην οικογενή μορφή της νόσου το πρώτο χτύπημα έχει κληροδοτηθεί από τα γαμετικά κύτταρα, όμως είναι

απαραίτητη και η σωματική μετάλλαξη δείχνοντας τον τρόπο με τον οποίο κληρονομούμενες και επίκτητες βλάβες συνεισφέρουν στην καρκινογένεση.

Τα μεταλλακτικά γονίδια (MMR genes) εμπλέκονται στον μηχανισμό επιδιόρθωσης των δυσ-ζευγοποιημένων βάσεων (mismatch repair process) προκειμένου να αποκατασταθούν λάθη στη νεοσυσταθείσα έλικα του DNA που προκύπτουν από την παρουσία αταίριαστων βάσεων. Ελαττωματικά MMR γονίδια σχετίζονται με τον λεγόμενο 'μεταλλάκτη-φαινότυπο'. Κύτταρα με MMR μεταλλάξεις αθροίζουν λάθη του DNA μέσα στο γονιδίωμα τους με αποτέλεσμα την απορρύθμιση ελεγκτικών γονιδίων για την κυτταρική αύξηση όπως το γονίδιο του υποδοχέα του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα TGF-RβII [9]. Τα γονίδια αυτά ανευρίσκονται μεταλλαγμένα στον HNPCC.

Πρόσφατα περιορισμένης έκτασης γενετικές μεταβολές που δεν επηρεάζουν την πρωτεϊνική δομή αναγνωρίστηκαν σαν πιθανές αιτίες οικογενούς καρκίνου του παχέος εντέρου. Αυτές οι περιορισμένες μεταβολές ονομάστηκαν πολυμορφισμοί, ανευρίσκονται συχνά σε ένα πληθυσμό, δεν επηρεάζουν την πρωτεϊνική δομή και χαρακτηρίζονται από αμελητέες αποκλίσεις στην νουκλεοτιδική αλληλουχία βάσεων των γονιδίων. Δεν σχετίζονται συνήθως με κλινική νόσο. Ένας πολυμορφισμός που σήμερα περιγράφεται σαν μετάλλαξη βρέθηκε στο κωδικόνιο 1307 του APC γονιδίου [10]. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη ανευρίσκεται στο 6% των Εβραίων Ashkenazi και στο 28% της ίδιας πληθυσμιακής ομάδας αλλά με ατομικό και οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του παχέος εντέρου [6,10].

1.1.2 Μοριακή Γενετική

Το μοριακό υπόβαθρο του σποραδικού καρκίνου του παχέος εντέρου περιγράφηκε από τον Fearon και Vogelstein μέσα από ένα πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης [2]. Η συνάθροιση γενετικών γεγονότων προσδίδει ένα επιλεκτικό αυξητικό πλεονέκτημα στο κύτταρο. Αυτές οι μεταβολές στο τέλος οδηγούν σε απώλεια του ελέγχου της κυτταρικής αύξησης και πολλαπλασιασμού με συνέπεια την κλωνική ανάπτυξη του όγκου. Το αθροιστικό αποτέλεσμα των σωματικών μεταλλάξεων είναι η αιτία του σποραδικού καρκίνου. Οι συνιστώσες του μοντέλου αυτού στοιχειοθετούνται από την ενεργοποίηση ογκογονιδίων και αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Πίνακας 1) [11], τη συνάθροιση πολλαπλών σωματικών μεταλλάξεων στο ίδιο κύτταρο, το αθροιστικό αποτέλεσμα πολλαπλών γενετικών μεταβολών (και όχι τόσο η χρονική αλληλουχία τους), επηρεάζοντας έτσι τη βιολογική συμπεριφορά των όγκων, και τέλος την εφαρμοσιμότητα του εν λόγω μοντέλου καρκινογενετικής διαδικασίας σε άλλους συμπαγείς όγκους όπως ο καρκίνος του μαστού ή του παγκρέατος.

Τα συνηθέστερα κληρονομούμενα σύνδρομα καρκίνου του παχέος εντέρου είναι η οικογενής αδενοματώδης πολυποδίαση και ο κληρονομικός μη πολυποδιασικός καρκίνος του παχέος εντέρου. Το καθένα από αυτά τα σύνδρομα είναι το αποτέλεσμα ειδικών μεταλλάξεων στα γαμετικά κύτταρα. Στην οικογενή αδενοματώδη πολυποδίαση η γενετική μεταβολή εμπλέκει το ογκοκατασταλτικό APC γονίδιο. Στον κληρονομικό μη πολυποδιασικό καρκίνο του παχέος εντέρου ένα από τα μεταλλακτικά γονίδια είναι μεταλλαγμένο, συνηθέστερα το hMLH1 ή

το hMSH2. Κάποια από τα πολυποδιασικά σύνδρομα με χαρακτηριστικά αμαρτωμάτων βρέθηκαν να σχετίζονται με μεταλλάξεις γαμετικών κυττάρων. Στο σύνδρομο Peutz-Jeghers παραδείγματος χάρη καταγράφηκε ανωμαλία του STK11 ογκοκατασταλτικού γονιδίου [12].

Πίνακας 1: Συνδυασμοί ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων που εμπλέκονται σε ορισμένες κακοήθειες στον άνθρωπο

Όγκοι	Γονίδια
Καρκίνος τραχήλου	HRAS, MYC, MYCN, p53, RB1
Καρκίνος παχέος εντέρου	APC, MCC, DCC, KRAS, p53, TGFBR2
Καρκίνος μαστού	MYB, MYC, cyclin D3, EGFR, HER2, HRAS, p53, RB1, BRCA1, HSTF1, INT2, YES1
Καρκίνος προστάτη	MET, HER2, p53, RB1
Καρκίνος νεφρού	VHL, EGFR, HER2, MET
Καρκίνος πνεύμονα	MYC, MYCN, MYCL, HRAS, RB1, p53, RAF1, JUN
Λέμφωμα	Cyclin D1, BCL2, BCL3, HER2, REL, NFKB2, NPM, KRAS, NRAS, YES1
Καρκίνος στομάχου	HER2, MET, K-SAM, BCL2, APC, P-cadherin, p53, KRAS, RB1

Πηγή: βιβλιογραφική αναφορά 11

Αν και οι περισσότερες μεταλλάξεις γαμετικών κυττάρων προκαλούν μεταβολές στην δομή του πρωτεϊνικού προϊόντος, η I1307 APC γαμετική μετάλλαξη αυξάνει την πιθανότητα να επισυμβούν πρόσθετες σποραδικές μεταλλάξεις σε άλλα απομακρυσμένα σημεία του γονιδίου και αυτό το γεγονός με τη σειρά του να αποτελεί αίτιο πρωτεϊνικών δομικών ανωμαλιών σε ένα πιο όψιμο στάδιο της ανάπτυξης.

1.2 ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ

Τα πρωτο-ογκογονίδια είναι γονίδια που φυσιολογικά ελέγχουν πόσο συχνά διαιρείται το κύτταρο και σε τι βαθμό αυτό διαφοροποιείται. Όταν ένα πρωτο-ογκογονίδιο ενεργοποιείται σε ογκογονίδιο το κύτταρο πολλαπλασιάζεται χωρίς έλεγχο και το γεγονός αυτό δυνητικά οδηγεί στον καρκίνο. Η ενεργοποίηση του ογκογονιδίου έχει σαν συνέπεια την έκλυση του κακοήθους δυναμικού του μέσω διαφορετικών μηχανισμών που μπορεί να σχετίζονται με την παρουσία σημειακών μεταλλάξεων, ανακατατάξεων του DNA ή με τη γονιδιακή του ενίσχυση. Οι μηχανισμοί αυτοί δυνητικά οδηγούν σε παραγωγή υπερενεργών, δομικά αλλοιωμένων, πρωτεϊνικών προϊόντων ή και σε παραγωγή μεγαλύτερου πρωτεϊνικού φορτίου χωρίς όμως δομικές αλλοιώσεις. Περισσότερα από 100 ογκογονίδια έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα και αναμφίβολα θα ανακαλυφθούν και άλλα στο μέλλον. Με βάση τη βιοχημική συμπεριφορά των πρωτεϊνικών προϊόντων που κωδικοποιούν τα ογκογονίδια αλλά και την ενδοκυττάρια εντόπιση τους η ταξινόμηση που ακολουθεί, βασισμένη στην ταξινόμηση που προτάθηκε από τον Park (1998) [13], περιλαμβάνει:

- Αυξητικούς παράγοντες με προεξέχον παράδειγμα το sis ογκογονίδιο το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που σχετίζεται στενά με την αλυσίδα B του αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια (platelet-derived growth factor, PDGF). Ανάλογα λειτουργούν ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (fibroblast growth factor, FGF). Το KGF ή αλλιώς αποκαλούμενο Hst γονίδιο βρέθηκε να κωδικοποιεί έναν FGF σχετιζόμενο αυξητικό παράγοντα που αναγνωρίστηκε σε γαστρικό καρκίνωμα και σε κύτταρα σαρκώματος Kaposi. Σε ορισμένους όγκους φαίνεται ότι παράγονται πρωτεϊνικά προϊόντα που επάγουν την αύξηση του ίδιου του όγκου έχοντας αυτοκρινή δραστηριότητα.
- Υποδοχείς τυροσίνης κινάσης και αυξητικοί παράγοντες που δρουν σαν υποδοχείς με ιδιότητες τυροσίνης κινάσης. Το c-Fms γονίδιο κωδικοποιεί τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των άωρων μορφών (colony stimulating factor 1, CSF-1) και αρχικά είχε ταυτοποιηθεί σαν ρετροϊκό ογκογονίδιο. Το Flg (Fms like gene) κωδικοποιεί μία μορφή FGF υποδοχέα. Το Neu γονίδιο αναγνωρίστηκε σαν γονίδιο σχετιζόμενο με υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR related gene). Η μετατροπή του πρωτο-ογκογονιδίου σε ογκογονίδιο Neu απαιτεί την αλλαγή ενός μόνο αμινοξέος στο διαμεμβρανικό σκέλος. Τα Trk γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες ανάλογες των υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα των νεύρων (NGFR). Το Trk γονίδιο βρέθηκε σε καρκίνο του παγκρέατος. Το Met γονίδιο κωδικοποιεί τον υποδοχέα του ηπατοκυτταρικού αυξητικού/σκεδαστικού παράγοντα HGF/SFR. Τέλος, το C-Kit γονίδιο κωδικοποιεί τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των μαστοκυττάρων.

- Κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης όπως είναι τα src, fes, fps, fgr, yes και lck. Τα προϊόντα αυτών σχετίζονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη, αλλά δεν είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Η σχέση των κινασών της οικογένειας src με την κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι βασική για την μεταλλακτική τους ικανότητα. Ογκογενετική ενεργοποίηση αυτών, όπως και των ρετροϊικών αναλόγων, γίνεται με πρόκληση σημειακών μεταλλάξεων ή απαλείψεων. Αυτές οι αλλαγές δημιουργούν πρωτεΐνες που φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες με υπολείμματα τυροσίνης με ακανόνιστο όμως τρόπο, προκαλώντας έτσι μια συνεχή μεταγωγή σήματος. Οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες-προσαρμοστές δεσμεύουν άλλες πρωτεΐνες, χωρίς όμως να έχουν καταλυτική δραστηριότητα, αλλά επιτρέπουν τη διαβίβαση σημάτων. Στην κατηγορία αυτή ανήκει και το crk. Το προϊόν του ογκογονιδίου crk προκαλεί αύξηση στις φωσφορυλιωμένες από τυροσίνη πρωτεΐνες μέσα στο κύτταρο.

- Πρωτεΐνες με δράση GTPάσης. Σ' αυτή την κατηγορία ανήκουν εκείνες που κωδικοποιούνται από τα μέλη της οικογένειας των ras: H-ras, K-ras και N-ras. Στα φυσιολογικά κύτταρα η οικογένεια ras είναι πολύ συντηρητική κατά την εξέλιξη και κωδικοποιεί για κυτταροπλασματική πρωτεΐνη 21.000 daltons (p21ras). Η p21ras δεσμεύει νουκλεοτίδια γουανίνης (GTP και GDP) και βρίσκεται με δύο μορφές: την ενεργή όταν είναι δεσμευμένη με GTP και την ανενεργή όταν είναι δεσμευμένη με GDP. Οι πρωτεΐνες των ras εμπλέκονται στην οδό μεταγωγής σήματος προς το εσωτερικό του κυττάρου και αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη raf, την κινάση της μιτωγόνου ενεργοποιούσας πρωτεϊνικής κινάσης (mitogen activating proteine kinase ή MAPKK ή MEK) και της μιτωγόνα ενεργοποιούσας

πρωτεϊνικές κινάσες MAPKS ή ERKs). Ο καταρράκτης Raf/MEK/MAPK κινάσης, μέσω μηχανισμού φωσφορυλίωσης, καταλύει την επαγωγή μιτωγόνων σημάτων στον πυρήνα του κυττάρου, με αποτέλεσμα τον έλεγχο του κυταρικού κύκλου. Ανωμαλίες στα *ras* έχουν συσχετιστεί με πολλούς καρκίνους μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος του παχέος εντέρου.

- Παράγοντες ανταλλαγής GTPάσης. Σ' αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται τα προϊόντα των *Db1*, *Vav*, *Ect*, *Tim*, *Lbc* και άλλων. Ο ρόλος τους, αν και χρήζει περαιτέρω διευκρίνισης, θεωρείται ότι σχετίζεται με κυτταροσκελετικές αναδομήσεις του κυττάρου.

- Κυτταροπλασματικές κινάσες σερίνης-θρεονίνης όπως τα ογκογονίδια *mos*, *cot*, *pim1* και *raf*. Το *B-raf* γονίδιο ανήκει στην οικογένεια των *raf* γονιδίων και ανευρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 7q34. Ανάλογα γονίδια έχουν βρεθεί σε ιούς (*v raf murine sarcoma viral oncogene homol. B1/pseudogenes homol.*) Το *B-raf* είναι λειτουργικό γονίδιο και εκτείνεται σε 190,28 kb ενώ διαθέτει 18 εξώνια. Η πρωτεΐνη, που κωδικοποιεί μοριακού βάρους 84,5 kda, αποτελείται από 765 αα, ανήκει στην κατηγορία πρωτεϊνών σερίνης-θρεονίνης κινάσης και παίζει ρόλο στη μεταγωγή μιτωγόνων σημάτων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη στον πυρήνα. Ίσως να εμπλέκεται και στις μετασυναπτικές απαντήσεις των νευρώνων του ιππόκαμπου. Σημειακές μεταλλάξεις με ανεπαρκή επιδιόρθωση, μάλλον, βρίσκονται πίσω από την ογκογόνο ενεργοποίηση του. Εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο ενώ φαίνεται να έχει και αντιαποπτωτική δράση. Σχετίζεται με νεοπλάσματα όπως το μελάνωμα και ο καρκίνος του παχέος εντέρου.

- Ογκογονίδια των οποίων τα προϊόντα εντοπίζονται στον πυρήνα όπως είναι τα fos, jun, ski, rel και myc. Τα προϊόντα αυτών σχετίζονται άμεσα με τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, που αφορά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων (μεταγραφικοί παράγοντες). Αυτά δρουν απ' ευθείας στο DNA και ελέγχουν ποια γονίδια είναι ενεργά και παράγουν RNA και πρωτεΐνη. Το καλύτερα μελετημένο είναι το myc. Σε καρκίνο του πνεύμονα, λευχαιμία, λέμφωμα αλλά και σε άλλους τύπους καρκίνου το myc είναι συχνά ισχυρά ενεργοποιημένο και επάγει την κυτταρική διαίρεση.
- Ρυθμιστές προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Τα πρωτεϊνικά προϊόντα αυτών των ογκογονιδίων εμποδίζουν ένα κύτταρο να 'αυτοκτονήσει' όταν αυτό εκτρέπεται από το φυσιολογικό. Αυτό οδηγεί σε αύξηση και πολλαπλασιασμό ανώμαλων κυττάρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το bcl-2 που ανευρίσκεται συχνά ενεργοποιημένο σε λεμφώματα.

1.3 ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

Η φυσιολογική λειτουργία του γονιδίου APC θεωρείται ότι είναι ο έλεγχος της πρωτεΐνης β-κατενίνης που είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της επαγωγής σήματος και της κυτταρικής αύξησης [14]. Το γονίδιο APC επιφέρει ανάδραση στη β-κατενίνη η οποία ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Διάφορα κυτταρικά μονοπάτια επαγωγής σήματος διασταυρώνονται με εκείνο του APC και μπορεί να οδηγήσουν στο ίδιο τελικό αποτέλεσμα σε επίπεδο καρκινογένεσης. Μεταλλάξεις του APC είναι σημαντικές για την πρόιμη κυτταρική 'μεταμόρφωση' υπέρ της κακοήθους συμπεριφοράς και γι' αυτό το συγκεκριμένο γονίδιο χαρακτηρίζεται ως

‘θυροφύλακας’ (gatekeeper) [15]. Όταν το APC υφίσταται γαμετική μετάλλαξη το αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση της οικογενούς αδеноματώδους πολυποδίασης. Όταν η μετάλλαξη είναι σωματική σχετίζεται με την πρόιμη φάση ανάπτυξης σποραδικού καρκίνου του παχέος εντέρου. Τέλος, όταν αναφερόμαστε στην I1307K μετάλλαξη, τότε το APC συνεισφέρει στην ανάπτυξη οικογενούς καρκίνου του παχέος εντέρου όπως στην περίπτωση των Εβραίων Ashkenazi (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Μεταλλάξεις γονιδίων που σχετίζονται με καρκίνο στο παχύ έντερο

ΤΥΠΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΗΣ	ΓΟΝΙΔΙΑ	ΝΟΣΟΣ
ΓΑΜΕΤΙΚΗ	APC	FAP
	MMR	HNPCC/ Lynch syndrome
ΣΩΜΑΤΙΚΗ	ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ Myc, ras, src, erbB2	ΣΠΟΡΑΔΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ
	ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ p53, DCC, APC	
	MMR hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6, hMSH3	
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ	APC	ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ (ΕΒΡΑΙΟΙ Ashkenazi)

Πηγή: βιβλιογραφική αναφορά 1

Από τα γνωστά ογκοκατασταλτικά γονίδια το p53 είναι από τα συχνότερα μεταλλαγμένα στον ανθρώπινο καρκίνο [16]. Το φυσιολογικό p53 δρα προκαλώντας επιβράδυνση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 προκειμένου να γίνει επιδιόρθωση του DNA ή να οδηγήσει σε απόπτωση. Αυτό το γονίδιο έχει χαρακτηριστεί ο φύλακας του γονιδιώματος. Υψηλότατο ποσοστό των σποραδικών όγκων του παχέος εντέρου επιδεικνύουν απενεργοποίηση του p53. Η αναγνώριση μεταλλάξεων του p53 στον καρκίνο του παχέος εντέρου έχει προγνωστική βαρύτητα. Άτομα με όγκους που φέρουν μεταλλάξεις στο p53 έχουν χειρότερη έκβαση και μικρότερη επιβίωση από τα άτομα που δεν έχουν [17]. Το 1989 αναγνωρίστηκε το DCC (deleted in colorectal cancer) [18]. Υψηλό ποσοστό καρκινωμάτων του παχέος ορθού καταγράφεται ότι φέρουν μεταλλάξεις του DCC στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 18. Το DCC γονίδιο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-εξωκυττάριας ουσίας. Μεταλλάξεις του DCC βρέθηκαν επίσης σε μεγάλο ποσοστό περιπτώσεων προχωρημένου αδενώματος. Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι το DPC4 (deleted in pancreatic cancer) που γειτνιάζει με το DCC, ίσως, είναι το πραγματικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο του οποίου η απώλεια επισυμβαίνει λόγω ανωμαλιών που εμπλέκουν το χρωμόσωμα 18 [19].

1.4 ΜΕΤΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

Όλα τα μεταλλακτικά γονίδια (hMLH1, hMSH2, hMSH3, hPMS1, hPMS2, hMSH6) εμπλέκονται στη διαδικασία επιδιόρθωσης λαθών κατά την αντιγραφή του DNA [4,20-22]. Μεταλλάξεις αυτών των γονιδίων οδηγούν σε ανώμαλες αλληλουχίες τμημάτων του DNA που ονομάζονται μικροδορυφόροι. Το μικροδορυφορικό DNA χαρακτηρίζεται από βραχείες αλληλουχίες νουκλεοτιδικών βάσεων που επαναλαμβάνονται δεκάδες έως εκατοντάδες φορές. Η ανωμαλία που προκύπτει ονομάζεται μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability, MSI). Μικροδορυφορική αστάθεια συναντάται συχνά σε καρκινικούς ιστούς από ασθενείς με κληρονομικό μη πολυποδιασικό καρκίνο του παχέος εντέρου και προκαλείται από μετάλλαξη σε γαμετικό επίπεδο ενός εκ των μεταλλακτικών γονιδίων. Έχουν μελετηθεί αρκετά τμήματα μικροδορυφορικού DNA προκειμένου να διερευνηθεί ποια υφίστανται συχνότερα ανωμαλίες στον κληρονομικό μη πολυποδιασικό καρκίνο του παχέος εντέρου. Η μικροδορυφορική αστάθεια μπορεί να είναι απύσχα, χαμηλού βαθμού (MSI-L) ή υψηλού βαθμού (MSI-H) σε συνάρτηση με τον αριθμό των τμημάτων του DNA στα οποία τεκμηριώθηκε αστάθεια [23]. Άτομα με γαμετικές μεταλλάξεις ενός εκ των μεταλλακτικών γονιδίων εμφανίζουν υψηλού βαθμού μικροδορυφορική αστάθεια αν και μετάλλαξη στο hMSH6 μπορεί να συσχετίζεται με αστάθεια χαμηλού βαθμού (MSI-L) [24]. Παρόλο που το 10-15% των περιπτώσεων σποραδικού καρκίνου του

παχέος εντέρου επιδεικνύει αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA αυτή είναι χαμηλού βαθμού [23,25].

1.5 ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΕΣ

Εκτός από τα περιγραφέντα γονίδια πολλά άλλα μοιάζουν να έχουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου αν και ο ρόλος τους καθώς και ο μηχανισμός δράσης τους δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Το γονίδιο της κυκλο-οξυγενάσης 2 (COX-2) είναι το ένα από τα δύο COX γονίδια. Το άλλο είναι το COX-1. Παρόλο που το COX-1 είναι ιδιοσυστατικό στοιχείο των κυττάρων, το COX-2 ανευρίσκεται σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου. Η πρωτεΐνη που παράγεται από το COX-2 πιθανόν να έχει ρόλο στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Αυτό το γονίδιο είναι σημαντικό γιατί σχετιζόμενοι ανταγωνιστές σε θεραπευτικό επίπεδο είναι ήδη διαθέσιμοι και μπορούν να είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι για την πρόληψη αλλά και την ύφεση πολυπόδων και καρκίνου του παχέος εντέρου. Ένας μη ειδικός COX ανταγωνιστής φαίνεται ότι προκαλεί την ύφεση πολυπόδων σε ασθενείς με οικογενή αδενοματώδη πολυποδίαση [26]. Μελέτες πάνω σε ειδικούς COX-2 ανταγωνιστές είναι σε εξέλιξη.

Το γονίδιο PPAR (peroxisome proliferator-activating receptor gene) φαίνεται επίσης να εμπλέκεται στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου. Τα PPAR είναι μία οικογένεια πυρηνικών υποδοχέων που λειτουργούν ως

μεταγραφικοί παράγοντες. Σχετίζονται με το APC (έπεται του APC στον καταρράκτη σήματος) και ίσως εμπλέκονται και στο COX μονοπάτι [27,28]. Αυτό μπορεί, ίσως μερικώς, να εξηγήσει πως μεταλλάξεις του APC προκαλούν κυτταρική καρκινογένεση.

Διάφοροι υποδοχείς της οικογένειας G-πρωτεϊνών/υποδοχέων έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου. Μεταξύ των περισσότερο μελετημένων είναι ο υποδοχέας για τη γαστρίνη και ο μουσκαρινικός χολινεργικός υποδοχέας [29-31]. Η γαστρίνη είναι ένας γνωστός τροφικός παράγοντας για τη βλεννογόνο του εντέρου και ίσως διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην ογκογένεση σε συνθήκες υπεργαστριναιμίας ή ανώμαλης παρουσίας υποδοχέων. Αν και η καταστολή της παραγωγής του γαστρικού οξέος με αναστολείς της αντλίας πρωτονίων μπορεί να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων γαστρίνης στον ορό δεν υπάρχουν δεδομένα, επί του παρόντος, που θα μπορούσαν να υποστηρίξουν αιτιολογική συσχέτιση της δράσης των αναστολέων της αντλίας πρωτονίων και καρκινογένεσης. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα χολικά οξέα προσδέονται σε μουσκαρινικούς χολινεργικούς υποδοχείς, ειδικά του υποτύπου M3 και ότι αυτός ο τύπος υποδοχέα ενισχύει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου [32]. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει το ρόλο των χολικών οξέων στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου και αυτά τα δεδομένα ίσως δώσουν πληροφορίες σχετικά με ποιο

μηχανισμό τα χολικά οξέα προδιαθέτουν στον καρκίνο του παχέος εντέρου [33-39].

1.6 ΚΛΗΡΟΝΟΜΟΥΜΕΝΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

Τα συχνώς κληρονομούμενα σύνδρομα που σχετίζονται με τον καρκίνο του παχέος εντέρου αφορούν στο 5% με 10% όλων των περιπτώσεων του συγκεκριμένου καρκίνου. Ο κληρονομικός καρκίνος στο παχύ έντερο σχετίζεται συνήθως με το αποτέλεσμα μίας γαμετικής μετάλλαξης. Οι φαινοτυπικές εκδηλώσεις ενός καρκινικού συνδρόμου εξαρτώνται ειδικά από το γονίδιο που υφίσταται την εν λόγω μετάλλαξη.

1.6.1 Οικογενής Αδενοματώδης Πολυποδίαση

Στην οικογενή αδενοματώδη πολυποδίαση, κατ' εξοχήν κληρονομούμενο σύνδρομο, τα άτομα που έχουν προσβληθεί αναπτύσσουν από εκατοντάδες έως χιλιάδες πολύποδες στο παχύ έντερο. Αν και το ποσοστό μετάπτωσης σε καρκίνο είναι μικρό ο μεγάλος αριθμός πολυπόδων είναι ικανός να 'εξασφαλίσει' θεωρητικά την ανάπτυξη του καρκίνου σε νεαρή ηλικία. Στις περισσότερες των περιπτώσεων το οικογενειακό ιστορικό είναι θετικό. Στο ένα τρίτο των περιπτώσεων το σύνδρομο εκδηλώνεται ξαφνικά και οφείλεται σε de novo APC γαμετική μετάλλαξη. Η γενετική του εν λόγω συνδρόμου είναι απλή αφού μόνο ένα γονίδιο, το APC εμπλέκεται στη νόσο. Γαμετικές μεταλλάξεις του συγκεκριμένου γονιδίου είναι το αίτιο σε μοριακό επίπεδο της οικογενούς αδενοματώδους πολυποδίασης και των

παραλλαγών της, όπως το σύνδρομο Gardner. Σχεδόν όλες οι μεταλλάξεις του APC γονιδίου προκαλούν πρόιμη ‘κατάληξη’ ή κατάτμηση του πρωτεϊνικού προϊόντος. Αυτό το γεγονός εκμεταλλεύονται τις περισσότερες φορές οι δοκιμασίες γενετικού ελέγχου όπως η *in vitro* δοκιμασία κατάτμησης της APC πρωτεΐνης που κυκλοφορεί σε εμπορικό επίπεδο από το 1994 [40]. Καρκίνος του παχέος εντέρου, θεωρητικά θα αναπτυχθεί σε όλους τους φέροντες το σύνδρομο έως την έκτη δεκαετία της ζωής τους εάν δεν έχει προηγηθεί προφυλακτική κολεκτομή.

Κληρονομικός μη πολυποδιασικός καρκίνος του παχέος εντέρου

Τα κριτήρια για αυτό το σύνδρομο ορίστηκαν το 1991 στο Άμστερνταμ από τη Διεθνή Ομάδα Συνεργασίας για τον κληρονομικό μη πολυποδιασικό καρκίνο του παχέος εντέρου [41]. Πριν να προκύψουν δεδομένα για το γενετικό υπόστρωμα του συγκεκριμένου καρκίνου τα κριτήρια του Άμστερνταμ είχαν σχεδιαστεί με ιδιαίτερη αυστηρότητα προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι οι ερευνητές που θα μελετούσαν το γενετικό υπόβαθρο του εν λόγω συνδρόμου δε θα διέτρεχαν κινδύνους μεθοδολογικής προσέγγισης. Αυτός ήταν ο λόγος [1] που τα κριτήρια ήταν περισσότερο κριτήρια αποκλεισμού. Όταν αναγνωρίστηκε η αιτιολογική σχέση των μεταλλακτικών γονιδίων και του κληρονομικού καρκίνου του παχέος εντέρου ορίστηκαν κριτήρια συμπερίληψης με μεγαλύτερη κλινική συνάφεια. Τα κριτήρια του Άμστερνταμ τροποποιήθηκαν και αργότερα αναπτύχθηκαν νέα το 1996, υπό την αιγίδα του Αμερικανικού Εθνικού

Ινστιτούτου Καρκίνου (U.S. National Cancer Institute). Τα τελευταία είναι γνωστά σαν τα κριτήρια της Βηθεσδά (Bethesda guidelines), (Πίνακας 3) [42-44].

Τα άτομα με το σύνδρομο του κληρονομικού μη πολυποδιασικού καρκίνου του παχέος εντέρου έχουν πολύ αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν τον καρκίνο αλλά δεν αναπτύσσουν τους εκατοντάδες πολύποδες που χαρακτηρίζουν την οικογενή αδενοματώδη πολυποδίαση. Κάποια άτομα εμφανίζουν μερικούς πολύποδες οι οποίοι έχουν ισχυρή επιρρέπεια στην ‘καρκινική μετάπτωση’. Η εξέλιξη είναι ταχεία και αυτό γιατί κάποιοι πολύποδες ξεκινούν με μεταλλάξεις κάποιου μεταλλακτικού γονιδίου και ‘μεταπίπτουν’ γρήγορα από τη στιγμή που θα επισυμβούν μεταλλάξεις του γονιδίου APC. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό σαν ‘επισπευμένη ογκογένεση’.

Ενώ ο σποραδικός καρκίνος εκδηλώνεται μετά από 5-10 χρόνια διεργασίας, αύξησης και μετάπτωσης ενός πολύποδα, στον κληρονομικό μη πολυποδιασικό καρκίνο η διαδικασία μπορεί να διαρκέσει 1 με 2 μόνο χρόνια. Για το λόγο αυτό το φαινόμενο της επισπευμένης ογκογένεσης έχει συνέπειες κλινικής διαχείρισης αφού απαιτείται συχνός έλεγχος των ατόμων με κολονοσκόπηση (κάθε 1 ή 2 χρόνια).

Πίνακας 3: Κλινικά κριτήρια για τον κληρονομικό μη πολυποδιασικό καρκίνο του παχέος εντέρου

Κριτήρια του Amsterdam

Τουλάχιστον τρεις συγγενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου (ΚΠ) και όλα τα ακόλουθα:

- Το άτομο που έχει προσβληθεί από τη νόσο να είναι 1^{ου} βαθμού συγγενής με τα άλλα δύο άτομα.
- Προσβολή ατόμων σε δύο διαδοχικές γενιές.
- Τουλάχιστον μια περίπτωση ατόμου με ΚΠ ηλικίας κάτω των 50 ετών.
- Αποκλεισμός FAP.

Τροποποιημένα κριτήρια Amsterdam

Όπως τα κριτήρια του Amsterdam εκτός του ότι ο καρκίνος θα πρέπει να σχετίζεται με HNPCC πρότυπο (κόλον, ενδομήτριο, λεπτό έντερο, ουρητήρες, νεφρικοί κάλυκες) και όχι μόνο με καρκίνο ειδικά εντοπιζόμενο στο παχύ έντερο.

Κριτήρια της Bethesda

Τα κριτήρια του Amsterdam ή ένα από τα ακόλουθα:

- Δύο περιπτώσεις καρκίνου που σχετίζεται με HNPCC πρότυπο στον ίδιο ασθενή, με σύγχρονη ή μεταχρονισμένη εκδήλωση.
- Άτομο με ΚΠ και 1^{ου} βαθμού συγγενής με καρκίνο που σχετίζεται με HNPCC πρότυπο και/ή αδένωμα του κόλου (μία περίπτωση καρκίνου διαγνωσμένη πριν τα 45 έτη και διάγνωση αδενώματος πριν τα 40 έτη).
- ΚΠ ή καρκίνος του ενδομητρίου με διάγνωση πριν τα 45 έτη.
- ΚΠ δεξιά με αδιαφοροποίητο πρότυπο ή δίκην 'σφραγιστήρα δακτυλίου' πριν τα 45 έτη.
- Διάγνωση αδενωμάτων πριν τα 40 έτη.

Η πρόωμη αναγνώριση των ατόμων με κληρονομικό μη πολυποδιασικό καρκίνο πιθανόν να επιτρέψει την ανίχνευση πολυπόδων προτού επισυμβούν μεταλλάξεις του γονιδίου APC.

Ο κίνδυνος καρκίνου στο παχύ είναι 85% σε άτομα με μετάλλαξη ενός μεταλλακτικού γονιδίου. Γυναίκες που φέρουν μετάλλαξη σε ένα μεταλλακτικό γονίδιο έχουν κίνδυνο σε ποσοστό 40% να εκδηλώσουν καρκίνο στο ενδομήτριο. Άτομα που φέρουν ανάλογες μεταλλάξεις έχουν αυξημένο κίνδυνο να εκδηλώσουν καρκίνο σε άλλα όργανα όπως στις ωοθήκες, στο ηπατοχολικό σύστημα, ουροποιογεννητικό, σύστημα, πάγκρεας, και λεπτό έντερο.

Γαμετικές μεταλλάξεις σε κάθε ένα από τα έξι γνωστά μεταλλακτικά γονίδια έχουν αναγνωριστεί σε διάφορες περιπτώσεις κληρονομικού μη πολυποδιασικού καρκίνου. Μεταλλάξεις βρίσκονται συχνότερα στο hMSH2 (χρωμόσωμα 2p), ή στο hMLH1 γονίδιο (χρωμόσωμα 3p). Μεταλλάξεις στα hMSH3, hPMS1, hPMS2, hMSH6 ανευρίσκονται σπάνια. Ο κληρονομικός μη πολυποδιασικός καρκίνος του παχέος εντέρου εκδηλώνεται συχνότερα στα δεξιά και τα προσβεβλημένα άτομα τείνουν να έχουν καλύτερη τελική επιβίωση από τα άτομα με σποραδικό καρκίνο.

2. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ RAF ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Τα γονίδια raf αναγνωρίστηκαν, αρχικά, σαν ογκογονίδια σε ρετροϊούς που προκαλούν όγκους σε ποντίκια και κοτόπουλα [45,46]. Το πρώτο raf γονίδιο που αναγνωρίστηκε ήταν το v-raf, γονίδιο του ιού 3611 του σαρκώματος των ποντικών που προκαλεί ινοσάρκωμα και ερυθρολευχαιμία σε νεογνήνητα ποντίκια, και το C-raf (ή raf-1) το οποίο είναι το ομόλογο πρωτο-ογκογονίδιο του [47-48]. Το A-raf βρέθηκε αργότερα εξετάζοντας cDNAs από τράπεζα δειγμάτων σπληνικού ιστού ποντικών. Μεταγενέστερα αναγνωρίστηκε το v-Rmil στον ρετροϊό των πτηνών Mill Hill no 2 (MH2) και βρέθηκε να είναι ομόλογο με το v-raf [45]. Το C-Rmil αντιστοιχεί στο τρίτο raf γονίδιο των θηλαστικών, το B-raf και είναι ογκογονίδιο [49-50].

Η οικογένεια των raf γονιδίων στα θηλαστικά περιλαμβάνει τα ακόλουθα τρία γονίδια: A-raf, B-raf, και C-raf τα οποία εδράζουν στα χρωμοσώματα Xp11, 7q34, και 3p25, αντίστοιχα. Τα raf πρώτο-ογκογονίδια κωδικοποιούν τρεις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ονομαζόμενες A-Raf, B-Raf, και C-Raf που μοιράζονται υψηλά διατηρημένες αμινο-τελικές ρυθμιστικές περιοχές και καταλυτικές καρβοξυ-τελικές περιοχές [51]. Οι Raf πρωτεΐνες ανήκουν στην κατηγορία πρωτεϊνών σερίνης-θρεονίνης κινάσης και έχουν ρυθμιστικό ρόλο στη μεταγωγή μιτωγόνων σημάτων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη στον πυρήνα. Κάθε είδος Raf πρωτεϊνών έχει διαφορετικό προφίλ έκφρασης στους ιστούς, γεγονός που συνηγορεί υπέρ του ότι οι διαφορετικές Raf πρωτεϊνικές ισοφόρμες έχουν ξεκάθαρα

ειδικές λειτουργίες [52]. Οι C-Raf πρωτεΐνες εκφράζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς. Οι A-Raf και B-Raf πρωτεΐνες έχουν πολύ πιο περιορισμένο προφίλ έκφρασης σε σχέση με την C-Raf, με την A-Raf να υπερεκφράζεται σε ιστούς του ουροποιογεννητικού και τη B-Raf να υπερεκφράζεται σε νευρικούς, σπληνικούς και αιμοποιητικούς ιστούς [53]. Οι A-raf και C-raf ανευρίσκονται στα μιτοχόνδρια, γεγονός που στηρίζει το δεδομένο της αποπτωτικής δράσης τους αλλά δεν είναι ακόμη γνωστό ποιες ακριβώς ισοφόρμες εμπλέκονται [54-58].

Αν και οι Raf πρωτεΐνες ανήκουν στην κατηγορία πρωτεϊνών σερίνης-θρεονίνης και είναι ικανές να ενεργοποιήσουν τον καταρράκτη MAPK κινάσης, έχουν ειδικούς στόχους φωσφορυλίωσης στο μεταγωγικό μονοπάτι και παίζουν συγκεκριμένους ρόλους στην επαγωγή σήματος [59]. Σε raf knockout μελέτες, η απουσία της κάθε μιας από τις τρεις πρωτεΐνες οδηγεί σε διαφορετικούς φαινότυπους [60,61]. Σε B-raf knockout ποντίκια, ενδομήτριος θάνατος επέρχεται την 12^η ημέρα, συνήθως σαν αποτέλεσμα μαζικής εσωτερικής αιμορραγίας ενώ τα A-raf και C-raf knockout ποντίκια πεθαίνουν μετά τον τοκετό λόγω εκτεταμένης διάτασης του εντέρου (A-raf knockout) ή απουσίας ωρίμανσης του πνευμονικού παρεγχύματος (C-raf knockout). Η διαφορετική λειτουργική δράση των μελών της Raf οικογένειας πρωτεϊνών στηρίζεται και από το γεγονός ότι είναι ετερογενείς οι απαντήσεις των B-Raf, και C-Raf πρωτεϊνών σε όμοια ερεθίσματα, όπως εκείνα που προέρχονται, παραδείγματος χάρη, από τη Rap1, πρωτεΐνη με

δράση GTPάσης [62]. Η Rap1 ενεργοποιεί τη B-Raf μέσω μονοφωσφορικής κυκλικής αδενοσίνης (cAMP), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την μιτωγόνα ενεργοποιούσα πρωτεϊνική κινάση (ERK) ενώ η ενεργοποίηση της C-Raf από τη Rap1 παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωση της ERK [62].

2.1 ΔΟΜΗ ΤΩΝ RAF ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η δομή των Raf χαρακτηρίζεται από τα ακόλουθα στοιχεία: (1) ένα αμινοτελικό άκρο που περιέχει τη ρυθμιστική περιοχή; (2) μια αγκύλη ενεργοποίησης και (3) ένα καρβοξυτελικό άκρο που περιέχει την περιοχή της κινάσης [63-65]. Όλες οι Raf κινάσες χαρακτηρίζονται από τρεις διατηρημένες περιοχές, την CR1 (προσκειμένη στο αμινοτελικό άκρο), την CR2, και CR3 (προσκειμένη στο καρβοξυτελικό άκρο). Η ρύθμιση της ενεργότητας της Raf κινάσης είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει φωσφορυλίωση της ρυθμιστικής και καταλυτικής περιοχής της πρωτεΐνης καθώς και δια- ή ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Η αρχική διαδικασία της ενεργοποίησης της Raf περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση της ενεργά-συνδεδεμένης με GTP-Ras με την RBD της Raf και την γειτονική περιοχή, πλούσια σε κυστεΐνη και συνδέουσα ψευδάργυρο (CRD) της CR1, διευκολύνοντας την ‘στρατολόγηση’ της Raf στην κυτταρική μεμβράνη για ενεργοποίηση [66]. Ο ρόλος της CR2, η οποία είναι πλούσια σε υπολλείματα σερίνης και θρεονίνης, είναι λιγότερο σαφής. Ωστόσο, η φωσφορυλίωση των ομάδων εντός της CR2 και οι

ποικίλες αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης με πρωτεΐνης επίσης επηρεάζουν την θέση και την ενεργοποίηση της Raf [67,68-70]. Έχουν βρεθεί απαλείφες των αμινοτελικών ρυθμιστικών περιοχών CR1 και CR2, παρόμοιες με την v-Raf, σε αρκετούς τύπους ανθρώπινου καρκίνου με ενεργές μεταλλάξεις της Raf, προτείνοντας έτσι ότι οι περιοχές αυτές ρυθμίζουν αρνητικά την λειτουργία της Raf. Η CR3, η καταλυτική περιοχή της Raf, επίσης υπόκειται σε ρύθμιση μέσω φωσφορυλίωσης.

2.1.1 Ρύθμιση της ενεργότητας της Raf κινάσης

Τα επικαλυπτόμενα λειτουργικά χαρακτηριστικά των τριών ισομορφών της Raf έχουν εξεταστεί σε μελέτες που περιλαμβάνουν knockout ποντίκια. Σε knockout ποντίκια για την C-Raf, η B-Raf μπορεί να αναπληρώσει την απώλεια της C-Raf στην ενεργοποίηση της MEK στο MAPK μονοπάτι, αλλά τα knockout ποντίκια για την C-Raf είναι πιο επιρρεπή σε αποπτωτικά ερεθίσματα, παρά την παρουσία των A- και B-Raf [71]. Λαμβάνοντας υπόψη της διαφορές στην σηματοδότηση μεταξύ των ισομορφών της Raf, η A-Raf είναι ασθενέστερος ενεργοποιητής της MEK σε σχέση με την B-Raf και την C-Raf. Επιπλέον, η A-Raf μπορεί να ενεργοποιήσει μόνο τη MEK1, ενώ η C-Raf ενεργοποιεί τόσο τη MEK1 όσο και τη MEK2 [72-74]. Οι Raf κινάσες ενεργοποιούνται από τις Ras, από άλλες μικρές πρωτεΐνες ρυθμίζουσες την GTPάση και πρωτεΐνες ικριώματος και το μέγεθος καθώς και η ποιότητα της καθοδικής σηματοδότησης εξαρτώνται από την ολοκλήρωση των γεγονότων ενεργοποίησης και τις αλληλεπιδράσεις

μεταξύ των πρωτεϊνών.

Η C-Raf βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ως πρωτεϊνικό σύμπλεγμα 300 έως 500 kd. Το σύμπλεγμα αποτελείται από την C-Raf, την πρωτεΐνη θερμικού shock 90 (Hsp90) και το διμερή πρωτεϊνικό συμπάγοντα 14-3-3. Ο παράγοντας αυτός προσδένεται σε 2 ειδικά υπολλείματα φωσφοσερίνης της C-Raf που καλύπτει την περιοχή της κινάσης και απενεργοποιεί την πρωτεΐνη. Η δέσμευση της Ras στην C-Raf μετατοπίζει το 14.3-3 διμερές, καθιστώντας την C-Raf προσβάσιμη για αποφωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική φωσφατάση 2A. [75]. Η ενέργεια αυτή καθιστά ικανή την ακόλουθη ενεργοποίηση της C-Raf από τα μιτογόνα ερεθίσματα. Η σταθερότητα και η λειτουργία της C-Raf επίσης ρυθμίζονται από την φωσφορυλίωση της ίδιας της C-Raf, την σύνδεση της C-Raf στην Ras και τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην C-Raf και στα λιπίδια του κυττάρου.

Το αρχικό γεγονός στην ενεργοποίηση της Raf είναι η ‘στρατολόγηση’ της στην έσω επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης από την μικρή Ras GTPάση. Η περιοχή τέλεσης της συνδεδεμένης με GTP-Ras προσδένεται στην C-Raf μέσω των RBD και CRD στην CR1. Αν και για την ενεργοποίηση της Raf απαιτείται σύνδεση και στις 2 θέσεις, η πιο σημαντική αλληλεπίδραση είναι μεταξύ της Ras-GTP και της RBD [76]. Όλες οι ισομορφές της Ras μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την Raf αλλά η K-Ras είναι ο πιο ικανός ενεργοποιητής ενώ η N-Ras είναι πιο αποτελεσματική από την H-Ras [77]. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των Ras και

C-Raf μόνο δεν επαρκεί για να ενεργοποιηθεί η C-Raf, αλλά συμβάλλει στην μετακίνηση της C-Raf στην κυτταρική μεμβράνη όπου μπορεί να ενεργοποιηθεί.

Η ενεργοποίηση της B-Raf από την Ras έχει μελετηθεί λιγότερο. Ωστόσο, τα αλληλεπιδρώντα αμινοξέα στην επιφάνεια επαφής των Ras-Raf είναι όμοια και για την B- και την C-Raf [78,79]. Η σύνδεση της Ras με την B-Raf επίσης μετακινεί την B-Raf στην κυτταρική μεμβράνη όπου ενεργοποιείται [73]. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι ένα, ελεύθερο μεμβράνης, σύμπλεγμα της B-Raf με τον 14-3-3 μπορεί να ενεργοποιηθεί *in vitro* με ανασυνδυασμένη Ras. Το γεγονός αυτό έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τις A-Raf και C-Raf, οι οποίες πρέπει να υποστούν μια σειρά αντιδράσεων φωσφορυλίωσης των υπολλειμάτων σερίνης και τυροσίνης στην κυτταρική μεμβράνη και δεν είναι δυνατόν να ενεργοποιηθούν μόνο από την Ras [73, 79]. Από τις ισομορφές της Raf, η B-Raf ενεργοποιείται πρώτη, και με διέγερση από την Ras, ετεροδιμερίζεται με την C-Raf, αλλά η σημασία του γεγονότος αυτού είναι άγνωστη.

Τόσο η B-Raf όσο και η C-Raf είναι δυνατόν να προσδεθούν σε άλλες μικρές GTPάσες, κυρίως τη Rap1 [62,80,81] Οι περιοχές τελεστές των Rap1 και Ras είναι σχεδόν ταυτόσημες αλλά η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών αυτών προκαλεί τελείως διαφορετικά καθοδικά αποτελέσματα. Επιπλέον, η Rap1 μεσολαβεί για διαφορετικά γεγονότα μετά την πρόσδεση σε ποικίλες Raf ισομορφές. Το σύμπλεγμα B-Raf-Rap1 ενεργοποιεί την B-

Raf , ενώ η C-Raf-Rap1 αλληλεπίδραση δεν ενεργοποιεί την C-Raf , και στην πραγματικότητα μπορεί να δρα ανασταλτικά [62,81,82]. Αυτό συμβαίνει γιατί η Rap1 προσδέεται στην CRD της C-Raf με μεγαλύτερη συγγένεια από την Ras και έτσι αποτρέπει την σύνδεση της Ras.

.Η οικογένεια Rho μικρών GTPασών, αποτελούμενη από τις Rho, Rac, και την εξαρτώμενη από την κυκλίνη κινάση (Cdc) 42, ρυθμίζει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού κατά τον κυτταρικό κύκλο και μεσολαβεί για την επαγόμενη από την Ras ενεργοποίηση της Raf, ιδιαιτέρως δε της C-Raf [83-85]. Αυτές οι GTPάσες δεν προσδέονται απευθείας στην Raf αλλά σηματοδοτούν ενεργοποιώντας καθοδικές κινάσες. Η Rho σηματοδοτεί ενεργοποιώντας τις πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης-θρεονίνης N1 και N2 και την σχετιζόμενη με την Rho κινάση 1 ενώ οι Rac και Cdc42 σηματοδοτούν μέσω της ενεργοποιημένης p21 κινάσης (PAK) [83-85].

Η Raf ενεργοποιείται κυρίως με φωσφορυλίωση ειδικών υπολλειμάτων αμινοξέων. Από εξελικτικής άποψης, οι θέσεις ενεργοποίησης της Raf διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό από τον ζυμομύκητα στον άνθρωπο. Αρκετά αμινοξέα στην Raf, ιδιαιτέρως η σερίνη S259 και η S621 που προσδέουν τον 14-3-3 και διατηρούν την C-Raf σε κλειστή αυτο-ανασταλτική διάταξη, φωσφορυλιώνονται στην βασική κατάσταση [86]. Κατά την διέγερση, η Ras-GTP μετατοπίζει τον 14-3-3 από την S259 και η C-Ras μετατοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη, όπου μπορεί να αποφωσφορυλιωθεί στην θέση S

259 από την πρωτεϊνική φωσφατάση 2A ή άλλες φωσφατάσες [75]. Η S259 επίσης αντιπροσωπεύει την θέση της ανασταλτικής φωσφορυλίωσης από τις PKB/Akt, PKA και κινάσες δυνητικώς επαγόμενες από τα γλυκοκορτικοειδή [70,87,88]. Η φωσφορυλίωση στη θέση S621 φαίνεται να έχει μεγαλύτερη σημασία λόγω του ότι οι μεταλλάξεις στην θέση αυτή απενεργοποιούν την Raf κινάση. Έτσι η ισορροπία μεταξύ φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης είναι απαραίτητη για την προετοιμασία της Raf στην βασική κατάσταση πριν την διέγερση από την Ras ή τα μιτωγόνα [86].

Η Raf επίσης φωσφορυλιώνεται σε άλλα υπολλείματα σερίνης και θρεονίνης, με το πιο σημαντικό να είναι η S338 και η τυροσίνη Y341, τα οποία πρόσκεινται στην περιοχή της C-Raf κινάσης [89]. Η φωσφορυλίωση των υπολλειμάτων αυτών μετριάζει την ανασταλτική επίδραση της ρυθμίζουσας περιοχής πάνω στην περιοχή της κινάσης [90]. Η S338, η οποία αποτελεί την PAK θέση φωσφορυλίωσης που διατηρείται κατά την εξέλιξη και που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της περιοχής κινάσης, είναι σημαντική για την ενεργοποίηση της Raf. [83-85,89,91]. Η θέση αυτή φωσφορυλιώνεται επίσης ως απάντηση στην διέγερση από αυξητικούς παράγοντες, ιντεγκρίνες, Ras, PAK1 και PAK3 [85,92]. Το ομόλογο τμήμα της B-Raf, η S445, φωσφορυλιώνεται και ευθύνεται για την υψηλή βασική ενεργότητα της B-Raf. Η Ras πιθανώς φωσφορυλιώνει τη θέση αυτή ενεργοποιώντας την PI3K. Τα ενεργοποιημένα μεταλλάγματα της Rac και της Cdc 42 επίσης μπορούν να επάγουν την φωσφορυλίωση της

S338 μέσω ενεργοποίησης της PAK. Η Y341 φωσφορυλιώνεται από την Src οικογένεια των μη-RTKs, την κινάση Janus και την ερυθροποιητίνη [93,94]. Η υποκατάσταση αυτού του υπολλείματος τυροσίνης από το ασπαρτικό στην B-Raf μπορεί να εξηγήσει το γιατί η B-Raf επάγεται πλήρως από την Ras, ενώ η A-Raf και η C-Raf απαιτούν τόσο την Ras όσο και την Src για να ενεργοποιηθεί πλήρως [73]. Ωστόσο, η μεσολαβούμενη από την Ras 'στρατολόγηση' της C-Raf στην κυτταρική μεμβράνη και η ενεργοποίηση της Src δεν είναι τα μόνα βήματα που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της C-Raf.

Η A-Raf, που είναι δομικώς παρόμοια με την C-Raf, ενεργοποιείται με παρόμοιο τρόπο. Ωστόσο τα δομικά και δραστικά χαρακτηριστικά της B-Raf διαφέρουν από εκείνα των A-Raf και C-Raf. Αν και οι δομικές περιοχές και οι θέσεις φωσφορυλίωσης των Raf πρωτεϊνών διαφέρουν, ο μεγαλύτερος βαθμός φωσφορυλιωμένων αμινοξέων στην B-Raf προσδίδουν 15 έως 20 φορές υψηλότερο επίπεδο ενεργότητας κινάσης στην βασική κατάσταση σε σχέση με τις A-Raf ή C-Raf, και η B-Raf είναι έτσι πολύ πιο ισχυρός ενεργοποιητής της φωσφορυλίωσης της ERK [95]. Το διαφορετικό splicing της B-Raf πιθανόν επίσης να ευθύνεται για την διακριτή ενεργότητα κινάσης της πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα, οι δομές αρκετών από τις μεταλλαγμένες B-Raf μιμούνται τις χωροταξικές αλλαγές που είναι μοναδικές στην φωσφορυλιωμένη αρχέτυπη B-Raf, πράγμα που πιθανόν να εξηγεί την ικανότητα των μεταλλαγμένων B-Raf να ενεργοποιούν την ERK

απουσία διέγερσης.

Επιπλέον στα γεγονότα φωσφορυλίωσης, η κατάσταση ενεργοποίησης της C-Raf ρυθμίζεται από αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης με πρωτεΐνη και πρωτεΐνης με λιπίδια. Η C-Raf αλληλεπιδρά με διαφορετική σειρά πρωτεϊνών κριώματος (καταστολέας κινάσης της Ras και MEK partner-I), πρωτεΐνες προσαρμοστές (Bel-2-associated athanogene-I), πρωτεΐνες-‘συνοδούς’ (chaperone proteins) όπως τις Hsp90 and Hsp70, υποστρώματα (πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος, Rb), λιπίδια (φωσφατιδικό οξύ και άλλα), και κυτταρικά συστατικά, πολλά από τα οποία, με την σειρά τους τροποποιούν την ενεργότητα της κινάσης [96].

2.1.2 Ενεργοποίηση των Καθοδικών Τελεστών από την Raf

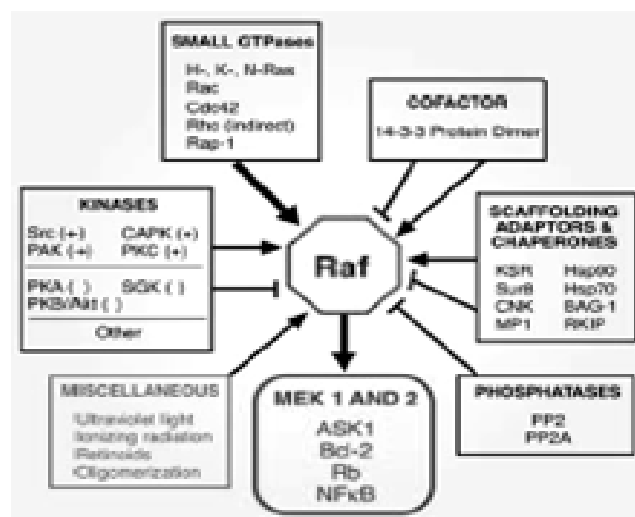
Η ενεργοποιημένη Raf αρχικώς πολλαπλασιάζει το σήμα μέσω της φωσφορυλίωσης των δύο διτής-ειδικότητας MAPKKs, MEK1 και MEK2 (αναφέρονται και ως MKK1 και MKK2) [97]. Οι ισομορφές της Raf αποτελούν τους καλύτερα χαρακτηρισμένους ενεργοποιητές των MEK1 και MEK2. Όλες οι ισομορφές της Raf ενεργοποιούν τη MEK1, ενώ μόνο η B-Raf και η C-Raf ενεργοποιούν τη MEK2. Οι MEK1 και MEK2 περιέχουν μια πλούσια σε προλίνη αλληλουχία που καθιστά δυνατή την αναγνώριση και την ενεργοποίηση από την Raf [74,98-104]. Η αλληλουχία αυτή, η οποία δεν υπάρχει σε άλλες MAPKKs, πιθανόν να εξηγεί το γιατί η

Raf ενεργοποιεί κατά προτίμηση τις MEK1 και MEK2, ενώ οι $p38^{MAPK}$ κινάσες διττής-ειδικότητας (MKK3 και MKK6) και οι JNK κινάσες (MKK4 και MKK7) φωσφορυλιώνουν τις $p38^{MAPK}$ και JNK, αντίστοιχα. Αν και τόσο η A-Raf όσο και η C-Raf είναι ικανές να ενεργοποιήσουν και άλλα στοιχεία σηματοδότησης ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK, όπως είναι ο πυρηνικός παράγοντας-kappa B (NF-κB), το Rb, και Bcl-2, οι MEK1 και MEK2 είναι τα μόνα γνωστά υποστρώματα της B-Raf [105-108]. Ένα συχνό θέμα των μελετών πάνω στην ενεργοποίηση των MEK/ERK από την Raf είναι το ότι η B-Raf έχει μεγαλύτερη ικανότητα να ενεργοποιεί τις καθοδικές κινάσες σε σχέση με τις A-Raf ή C-Raf. Επίσης αρκετά στοιχεία υποδηλώνουν ότι η B-Raf έχει πολύ μεγαλύτερη συγγένεια για το υπόστρωμα της από ό,τι άλλες ισομορφές της Raf και έχει 50 φορές μεγαλύτερη ικανότητα φωσφορυλίωσης των MEK1 και MEK2 από όσο η A-Raf ή η C-Raf [74,109].

Τα αντίστοιχα καθοδικά υποστρώματα των MEK1 και MEK2 είναι τα ERK1 ($p44^{MAPK}$) και ERK2 ($p42^{MAPK}$) τα οποία μεταφέρονται στον πυρήνα όπου επάγουν μια σειρά κυτταροπλασματικών και πυρηνικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών [110, 111-114]. Οι τελεστές περιλαμβάνουν τους πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες Elk-1, Fos, Jun, AP-1, και Myc που ρυθμίζουν τα γονίδια τα οποία με τη σειρά τους κωδικοποιούν πρωτεΐνες που έχουν ρόλους κλειδιά στον πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, την μετάσταση

και την αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά [115]. Ως αποτέλεσμα, οι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, όπως οι κυκλίνες D1 και E και η 25 φωσφατάση που ενεργοποιεί το Cdc (Cdc activator 25 phosphatase), ρυθμίζονται θετικά [116,117], ενώ η p27^{kip-1} και άλλοι αναστολείς των

Εικόνα 1: Ερεθίσματα ενεργοποίησης και αναστολής της Raf και καθοδικοί τελεστές



Πηγή: βιβλιογραφική αναφορά 60

εξαρτώμενων από την κυκλίνη κινασών (cdk) ρυθμίζονται αρνητικά [115]. Οι δράσεις αυτές ευνοούν την πρόοδο μέσω σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, της ανώμαλης ανάπτυξης, της απο-διαφοροποίησης και της κυτταρικής επιβίωσης.

Η C-Raf ενεργοποιεί άλλους κυτταρικούς τελεστές (Εικόνα 1), αλλά η έκταση της ανεξαρτησίας των δράσεων αυτών πάνω στη MEK1 και MEK2 δεν είναι ξεκάθαρη. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση της C-Raf ρυθμίζει τον σχηματισμό του κυτταροσκελετού μέσω τροποποίησης της κατάστασης πολυμερισμού της βιμεντίνης [118]. Η σηματοδότηση της κυτταρικής επιβίωσης επίσης ρυθμίζεται από την C-Raf, η οποία επάγει την φωσφορυλίωση του Iκ B στο σύμπλεγμα NF-κB-Iκ B. Η δράση αυτή απελευθερώνει τον NF-κB, ο οποίος έπειτα μεταναστεύει στον πυρήνα όπου μεσολαβεί για την μεταγραφή αντιαποπτωτικών παραγόντων [106,119]. Άλλες αντιαποπτωτικές επιδράσεις της C-Raf μεσολαβούνται από μια μιτοχονδριακή δεξαμενή πρωτεΐνης, η οποία, μετά από διέγερση, εντοπίζεται στην μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με και φωσφορυλιώνει τη Bcl-2 (Bcl-2-associated athanogene), και άλλους προ-αποπτωτικούς ρυθμιστές, ακυρώνοντας τις προ-αποπτωτικές τους επιδράσεις [108, 120]. Οι αντιαποπτωτικές επιδράσεις της C-Raf μεσολαβούνται επίσης μέσω της πρωτεΐνης Tvl-1 επανάληψης αγκυρίνης (ankyrin-repeat protein Tvl-I) και της ρυθμίζουσας αποπτωτικά σήματα κινάσης-1 [120,121,122]. Επιπρόσθετα η C-Raf φωσφορυλιώνει τις Rb, p53, Cdc25 και άλλες πρωτεΐνες ρυθμιστικές του κυτταρικού κύκλου στην μετάφαση [107,123,124]. Τέλος η C-Raf επάγει την μεταγραφή του γονιδίου της πολλαπλής φαρμακευτικής αντίστασης *mdr-1*, και η ενεργοποίησή του έχει σχετιστεί με την πολυφαρμακευτική αντοχή [125].

Συνοψίζοντας, η Raf μεσολαβεί για βασικές κυτταρικές διαδικασίες που σηματοδοτούν τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την φαρμακευτική αντοχή.

2.2 RAF ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Οι ενεργές μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Raf είναι κυρίως αποτέλεσμα σημειακών (missense) μεταλλάξεων, απαλείψεων, ενίσχυσης και ανασυνδυασμού των raf [126-129]. Τέτοιες γενετικές μεταβολές έχουν αναγνωριστεί στο κακόηθες μελάνωμα, στους καρκίνους του αιμοποιητικού και στους καρκίνους του θυρεοειδούς, του μαστού, του νεφρού, του ήπατος, του λάρυγγα, του χοληφόρου δέντρου, του παχέος εντέρου και άλλων οργάνων [126-129]. Αν και οι αρχικές προσπάθειες αναγνώρισης των raf μεταλλάξεων στον ανθρώπινο καρκίνο εστιάστηκαν στο γονίδιο C-Raf, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδίου είχε ως αποτέλεσμα την αναγνώριση των ενεργοποιούντων μεταλλάξεων του B-Raf, ως μείζονες γενετικές ανωμαλίες [130].

2.2.1 B-raf μεταλλάξεις

Πρόσφατα, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας 923 καρκινικών δειγμάτων για τα μεταλλαγμένα γονίδια ανθρώπινων καρκίνων, εντόπισε σωματικές μεταλλάξεις σε αξιοσημείωτο ποσοστό των δειγμάτων των όγκων [131]. Οι B-raf σωματικές μεταλλάξεις ανιχνεύτηκαν στο 60-70% των κακοήθων μελανωμάτων και σε μέτρια έως υψηλά επίπεδα σε καρκινώματα παχέος

εντέρου, ωοθηκών και θυρεοειδούς, προτείνοντας τις ενεργές ογκογονικές μεταλλάξεις του B-raf σαν 'κρίσιμους' εκκινητές των κακοηθειών αυτών [131,132,133]. Επιπλέον, οι σωματικές μεταλλάξεις του B-raf βρέθηκαν, μολονότι σε χαμηλότερα επίπεδα, στο γλοίωμα, σάρκωμα, non-Hodgkin's λέμφωμα, οξεία μυελογενή λευχαιμία και σε καρκινώματα μαστού, πνεύμονα και ήπατος. Έχει ενδιαφέρον το γεγονός ότι δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις του C-raf σε μια σειρά 545 δειγμάτων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων μελανωμάτων και καρκίνων παχέος εντέρου, ωοθηκών και πνεύμονα [131].

Η ανάλυση της B-raf αλληλουχίας στον ανθρώπινο καρκίνο αποκάλυψε περισσότερες από 30 'δυσνοσηματικές' μεταλλάξεις, που κωδικοποιούν κυρίως αμινοξέα στην περιοχή κινάσης του B-raf πρωτεϊνικού προϊόντος, ενώ η ιδιοσυστατική ενεργότητα και η δυναμική μετασχηματισμού της C-Raf προήλθε από την απώλεια της αυτο-ανασταλτικής αμινοτελικής περιοχής, όπως και από αναδιοργάνωση του γονιδίου [134,128,129].

Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις στο γονίδιο B-raf προκαλούνται από μετατροπή θυμίνης-σε-αδενίνη στην θέση 1799 του εξωνίου 15, που κωδικοποιεί την αντικατάσταση της βαλίνης από γλουταμικό οξύ στην θέση 600 (V600E/B-Raf) ενεργοποιούσα περιοχή κινάσης της πρωτεΐνης. Έχει ενδιαφέρον ότι οι δομικές αλλαγές στο τμήμα ενεργοποίησης ως αποτέλεσμα της προσθήκης ενός όξινου υπολλείματος κοντά σε μια θέση ρυθμιζόμενης φωσφορυλίωσης μιμείται την φωσφορυλιωμένη B-Raf [131].

Η V600E/B-Raf μετάλλαξη προσδίδει χαρακτηριστικά ογκογονικής δράσης γιατί η ενεργότητα της κινάσης της εν λόγω πρωτεΐνης είναι αρκετά αυξημένη. Διεγείρει την ERK in vivo επί απουσίας ενεργοποίησης της Ras και μετασχηματίζει τα κύτταρα NIH3T3 [94]. Επιπλέον, η βασική δραστηριότητα κινάσης της V600E/B-Raf είναι 12.5 φορές υψηλότερη από εκείνη της αρχέτυπης (wild-type) B-Raf, και η ανταπόκριση της στην διέγερση από την ογκογόνο H-Ras είναι μειωμένη. Επιπλέον, η ικανότητα μετασχηματισμού που η V600E/B-Raf προσδίδει στα κύτταρα NIH3T3 είναι 667 φορές μεγαλύτερη από εκείνη της αρχέτυπης B-Raf, ενώ η ισοδύναμη μετάλλαξη εάν εισαχθεί στην C-Raf (V492E) επιφέρει 10 φορές μικρότερη ενεργότητα κινάσης και ικανότητα μετασχηματισμού.

Η ανακάλυψη των μεταλλάξεων του B-raf στο 60% έως 70% των κακοήθων μελανωμάτων δεν ήταν αναμενόμενη επειδή πρώιμες μελέτες απέδωσαν την υπερ-ενεργοποίηση του μορίου Raf/MEK/ERK του μονοπατιού MAPK στο μελάνωμα σε πληθώρα αυτοκρινών και παρακρινών αυξητικών παραγόντων. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι, οι μεταλλάξεις του B-raf δεν συναντώνται σε μελάνωμα του οφθαλμού που διαφέρει από το δερματικό μελάνωμα στο ότι οι ανωμαλίες στο χρωμόσωμα 6 βρίσκονται μόνο στο πρώτο, προτείνοντας έτσι ότι υφίστανται διακριτά μονοπάτια για τον σχηματισμό του μελανώματος [135,136]. Περαιτέρω μελέτες για την εκτίμηση της λειτουργίας της V600E/B-Raf σε καλοήθεις και δυσπλαστικούς σπίλους είναι πιθανό να δώσουν σημαντικές

πληροφορίες για το είδος και τον χρόνο στον οποίο λαμβάνουν χώρα τα γεγονότα της ογκογένεσης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το αλληλόμορφο V600E/B-raf ανευρίσκεται σε υψηλό ποσοστό καλοήθων σπίλων, πιθανολογώντας το ρόλο του ογκογόνου B-raf στον σχηματισμό των σπίλων και στην έναρξη του μελανώματος [137]. Ωστόσο, δεν υπάρχουν άμεσες ενδείξεις που να υποστηρίζουν ότι οι καλοήθεις σπίλοι που περιλαμβάνουν την εν λόγω μετάλλαξη εξελίσσονται σε κακοήθεια και οι περισσότερες περιπτώσεις μπορεί να αντιπροσωπεύουν τελικής διαφοροποίησης βλάβες ανάλογες των μη-δυσπλαστικών ανώμαλων εστιών στις κρύπτες του παχέος εντέρου που περιλαμβάνουν μεταλλάξεις του K-ras επί απουσίας μεταλλάξεων του APC. Οι μεταλλάξεις APC γενικώς θεωρούνται χαμηλού κακοήθους δυναμικού, ενώ οι μεταλλάξεις του K-ras που προκύπτουν μετά τις μεταλλάξεις APC προάγουν την εξέλιξη των όγκων του κόλου [138,139]. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τον καθορισμό του εάν η επίπτωση των μεταλλάξεων του B-raf στο μελάνωμα σχετίζεται με την θέση του πρωτοπαθούς όγκου, την έκθεση στον ήλιο και την βλάβη από ακτινοβολία. Παρόμοια ευρήματα έχουν σημειωθεί και στο θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς, στο οποίο έως και 69% των όγκων περικλείουν την V600E, ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο με τους καλοήθεις όγκους του θυρεοειδούς και τα μυελοειδή και θηλακιώδη καρκινώματα [140,141]. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι μεταλλάξεις του B-raf είναι συχνές στο μελάνωμα και στους καρκίνους του θυρεοειδούς και η ανάπτυξη τόσο

του μελανοκυττάρου και του θυμοκυττάρου εξαρτάται θετικά από το cAMP. Να σημειωθεί ότι η B-Raf πιστεύεται ότι είναι η ισομορφή κλειδί που μεταβιβάζει τα εξαρτώμενα από το cAMP αυξητικά σήματα και στα δύο είδη κυττάρων, γεγονός που πιθανόν να ευθύνεται για την επιρρέπεια τους στον μετασχηματισμό μέσω ενεργοποιούντων μεταλλάξεων αυτής της κινάσης [142,143].

Η ανάλυση και άλλων μεταλλαγμένων προϊόντων του B-raf, τα περισσότερα από τα οποία συσσωρεύονται γύρω από τη θέση 600 ή στην G αγκύλη της συνδέουσας το ATP περιοχής, καταδεικνύει ότι οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες διαθέτουν αυξημένη δραστηριότητα κινάσης όπως στην περίπτωση της V600E/B-Raf [131]. Παρ'όλα αυτά είναι ενδιαφέρον το ότι αρκετές από αυτές τις μεταλλάξεις αφορούν καλά διατηρημένα ή αναλλοίωτα υπολλείματα της καταλυτικής περιοχής που είναι απαραίτητα για την βέλτιστη δράση άλλων κινασών. Αυτό εγείρει το ερώτημα πώς τα μεταλλάγματα αυτά προάγουν την ογκογένεση [131,144]. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι έχουν αναγνωριστεί μεταλλάξεις του B-raf εκτός της περιοχής της κινάσης και είναι πιθανόν να αναγνωριστούν και άλλες αφού η αλληλουχία του γονιδίου προσδιορίζεται και σε άλλες κακοήθειες [60].

Οι μεταλλάξεις των B-raf και ras είναι κατ' εξοχήν αμοιβαία εκλεκτικές, δηλώνοντας ότι τα γονίδια αυτά ανήκουν στο μονοπάτι σηματοδότησης ογκογένεσης. Λιγότερο από το 1 % των καρκίνων με μεταλλάξεις του B-raf

έχουν ταυτόχρονα μεταλλάξεις και στα *ras* και από το 1% εκείνων που έχουν μεταλλάξεις και στα δύο γονίδια, οι μεταλλάξεις του B-raf δεν αφορούν σχεδόν ποτέ την V600E [131, 144].

Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, και τα δύο γονίδια έχουν μεταλλάξεις με την ίδια συχνότητα στους ίδιους τύπους προ-κακοήθων βλαβών και στα ίδια στάδια της μετάβασης από το αδένωμα στο καρκίνωμα [144]. Υπάρχει μια στενή συσχέτιση ανάμεσα στην ελλειμματική επιδιόρθωση δυσζευγοποίησης και την παρουσία της μεταλλαγμένης V600E/B-Raf στον ορθοκολικό καρκίνο, η οποία ίσως είναι αποτέλεσμα του υποκείμενου ελλείματος επιδιόρθωσης του DNA [144]. Ένα μεγάλο μέρος των θηλωδών καρκίνων του θυρεοειδούς περιλαμβάνουν είτε την V600E/B-Raf, την μεταλλαγμένη K-Ras, ή την μεταλλαγμένη RET [131,145]. Ένα μέτριο ποσοστό των χαμηλού δυναμικού όγκων ωοθηκών περιλαμβάνουν είτε την V600E/B-Raf είτε την μεταλλαγμένη K-Ras [131,145]. Το εύρημα αυτό μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα μοναδικό παράδειγμα ογκογένεσης μέσω μεταλλαγμένων πρωτεϊνών σηματοδότησης που βρίσκονται σε σειρά [60,131]. Ωστόσο, έχουν αναγνωριστεί συνακόλουθες μεταλλάξεις της *ras* σε καρκίνους που περιλαμβάνουν ασυνήθεις μεταλλάξεις του B-raf στην περιοχή της αγκύλης G, υποδηλώνοντας έτσι ότι ίσως υπάρχουν διαφορές μεταξύ των μοριακών μονοπατιών που χρησιμοποιούνται από διακριτές μεταλλαγμένες B-Raf πρωτεΐνες [131].

2.2.2 C-raf μεταλλάξεις

Σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις του B-raf δεν υπάρχουν κυρίαρχοι γενετικοί μηχανισμοί στους ανθρώπινους καρκίνους που να περιλαμβάνουν μεταλλάξεις του C-raf. Έχουν καταδειχθεί αρκετοί τύποι γενετικών μεταβολών, ιδιαιτέρως αναδιοργανώσεις γονιδίων, σε δείγματα ανθρώπινων καρκίνων από ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα και T-λέμφωμα με μεταλλάξεις του C-raf [146]. Επιπρόσθετα, η ενεργή C-Raf έχει συσχετιστεί με μεταλλάξεις του C-raf σε ειδικές θέσεις και μια παρεκκλίνουσα δομικώς C-Raf πρωτεΐνη από την οποία λείπει η αμινοτελική ρυθμιστική περιοχή και έχει αναγνωριστεί σε δείγματα όγκων από ασθενείς με καρκινώματα όπως στο νεφρό, πνεύμονα (μικροκυτταρικό Ca), ήπαρ, και πάγκρεας, σαρκώματα (μαλακών ιστών και οστών) και κακοήθειες του ΚΝΣ (γλοίωμα, γλοιοβλάστωμα και επενδύωμα) [147,148]. Ωστόσο, δεν έχουν αναγνωριστεί ειδικές γενετικές και δομικές ανωμαλίες σε αρκετά μεγάλο αριθμό καρκίνων στους οποίους η C-Raf είναι ενεργοποιημένη επί απουσίας ανοδικής ενεργοποίησης της Ras.

3. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ RAS ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Ένα κύτταρο θηλαστικού περιέχει τουλάχιστον τρία διακριτά πρωτο-ογκογονίδια ras: τα H-ras, K-ras, και N-ras [149]. Οι H-Ras και K-Ras αναγνωρίστηκαν αρχικώς ως ικές (v-Ras) ογκο-πρωτεΐνες των Harvey και Kirsten ιών του σαρκώματος ποντικού και βρέθηκε ότι ήταν ικανές για κυτταρικό μετασχηματισμό. Η N-Ras ογκοπρωτεΐνη αναγνωρίστηκε σε μια κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος. Οι ανθρώπινες αλληλουχίες του DNA καταλαμβάνουν 3 kb για το H-ras, 7 kb για το N-ras, και περισσότερο από 35 kb για το K-ras και βρίσκονται στα χρωμοσώματα 11p15.5, 12p12.1, 1p13 αντίστοιχα. Το K-ras γονίδιο δίνει με εναλλακτικό splicing δύο ισομορφές: τις K-Ras A και K-Ras B [150]. Άλλα μέλη της οικογένειας των Ras γονιδίων αποτελούν τα M-Ras, R-Ras, Rap 1/2, και RaI τα οποία έχουν τουλάχιστον 50% όμοια αλληλουχία. Αρκετά μέλη της οικογένειας των μονομερών G-πρωτεϊνών (Rho/Rac/Cdc42, Rad, Ran, Arf, Rab/Ypt) παρουσιάζουν τουλάχιστον 30% ομολογία με τα γονίδια της οικογένειας Ras [151]. Η Rap 1 εμπλέκεται σε μια γκάμα κυτταρικών διαδικασιών όπως η ανεργία των T-κυττάρων και η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ενώ η λειτουργία της Rap 2 δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί.

Τα H-, K-, και N-ras έχουν παρόμοια δομή και αλληλουχίες, με πέντε εξόνια, το πρώτο εκ των οποίων δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη και σταθερές θέσεις splicing ακόμη και αν τα ιντρόνια έχουν ποικίλες διαστάσεις και αλληλουχίες [149].

Οι εκκινητές των γονιδίων αυτών έχουν λίγες TATA αλληλουχίες και διαθέτουν στην αρχή της αλληλουχίας τους στοιχεία GC που ρυθμίζουν την έκφραση τους. Το κύριο προϊόν του ras γονιδίου είναι μια μονομερής G πρωτεΐνη 21 kDa η οποία μπορεί να συνδέει και να υδρολύει GTP. Τα ras εκφράζονται παντού αν και η ανάλυση του mRNA υποδηλώνει διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στους ιστούς. Το H-ras εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο δέρμα και τους σκελετικούς μύες το K-ras εκφράζεται κυρίως στο παχύ έντερο και τον θύμο, και το N-ras στο γεννητικό ιστό του άρρενος και στον θύμο, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα μέλη της οικογένειας ras πιθανόν εκφράζονται με τρόπο ιστο-ειδικό [149]. Υποστηρίζοντας την υπόθεση αυτή, οι μεταλλάξεις σε κάθε ένα από τα γονίδια αυτά, που βρίσκονται συχνά σε ποικίλους τύπους όγκων, εμπλέκονται στην ανάπτυξη ειδικής νεοπλασίας, όπως οι μεταλλάξεις του K-ras στους όγκους του πνεύμονα, του ορθοσιγμοειδούς και του παγκρέατος, του H-ras στους όγκους της χοληδόχου κύστεως, του νεφρού και του θυρεοειδούς και του N-ras στο μελάνωμα, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και τις αιματολογικές κακοήθειες [152-157]. Οι μεταλλάξεις που εντοπίζονται στους όγκους πάντοτε οδηγούν στην έκφραση μιας ενεργού πρωτεΐνης.

3.1 ΟΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ RAS

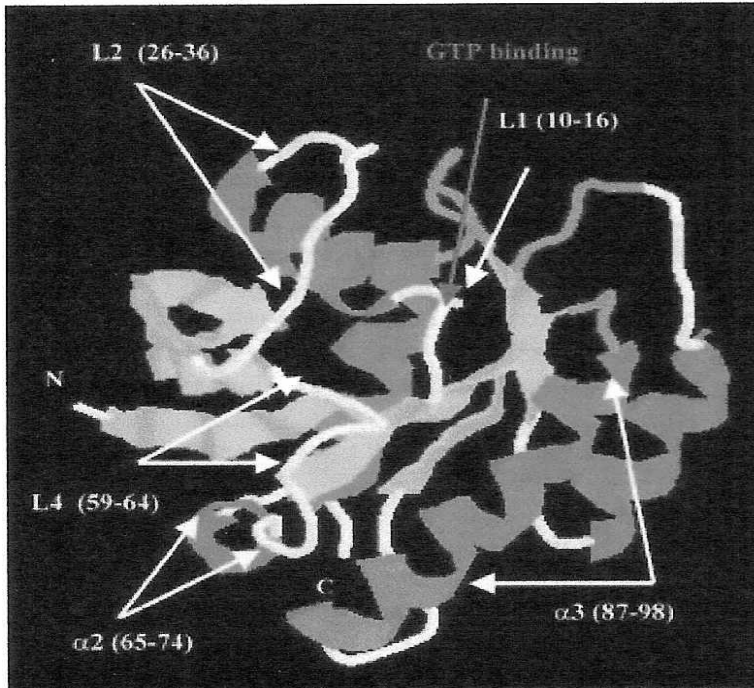
Οι τρεις κύριες Ras πρωτεΐνες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στα πρώτα 165 αμινοξέα αλλά παρουσιάζουν διαφορές στα 25 αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου που συνιστά την ετερογενή περιοχή. Όλες οι Ras

πρωτεΐνες περιέχουν ένα τελικό CAAX τμήμα στην θέση 186-189. Στο τμήμα αυτό το "C" αντιπροσωπεύει την κυστεΐνη, το "A" αντιπροσωπεύει ένα αλιφατικό αμινοξύ (λευκίνη, ισολευκίνη, ή βαλίνη), και το "X" είναι μεθειονίνη, σερίνη, λευκίνη ή γλουταμίνη. Οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, με έναρξη το αμινοξύ 186, (πάντα κυστεΐνη) αυξάνουν τη υδροφοβικότητα της καρβοξυτελικής περιοχής της πρωτεΐνης επιτρέποντας την 'εσωτερίκευση' στην πλασματική μεμβράνη. Η μεμβρανική θέση των πρωτεϊνών αυτών είναι απαραίτητη για την λειτουργία τους. Στην πραγματικότητα, οι μεταλλάξεις αυτές στην περιοχή 186-189 καθορίζουν την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, την ανενεργό Ras, και καταστέλουν την δράση μετασχηματισμού. Οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις είναι η φαρνεσυλίωση της C-186 μέσω αφαίρεσης των τριών καθοδικών αμινοξέων (AAX), που ακολουθείται από την μεθυλίωση της C-186 και τέλος με την παλμιτοΐλίωση των υπολλειμάτων κυστεΐνης στην περιοχή 165-186 [157,158]. Η μετάλλαξη της κυστεΐνης στο τμήμα CAAX προλαμβάνει την φαρνεσυλίωση και την λειτουργία των Ras.

3.1.1 Δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών Ras

Η τρισδιάστατη δομή μιας πρωτεΐνης στο τέλος της διαδικασίας αναδίπλωσης αντιπροσωπεύει μια θερμοδυναμικώς σταθερότερη δομή (Εικόνα 2).

Εικόνα 2: Τρισδιάστατη δομή της Ras πρωτεΐνης



Πηγή: βιβλιογραφική αναφορά 152

Γενικώς, η διάταξη αυτή εξαρτάται από την αλληλουχία των αμινοξέων της ή τουλάχιστον από εκείνα τα αμινοξέα από τις διατηρημένες περιοχές της τα οποία δεν μπορούν να αντικατασταθούν αφού φέρουν τις σημαντικότερες πληροφορίες για τον καθορισμό της σωστής τρισδιάστατης πρωτεϊνικής δομής. Οι πρωτεΐνες είναι ευέλικτες και ικανές για διακυμάνσεις της διάταξης τους. Η δομική αυτή κινητικότητα έχει μεγάλη λειτουργική σημασία. Οι μεταλλάξεις στις διατηρημένες περιοχές είναι υπεύθυνες για την λειτουργική τροποποίηση της πρωτεΐνης.

Πέντε μη γειτονικές περιοχές (5-63, 77-92, 109-123, 139-165, και 186-189)

είναι απαραίτητες για την δράση των Ras και οι μεταλλάξεις στις περιοχές αυτές μπλοκάρουν την ικανότητα μετασχηματισμού της ογκογόνου πρωτεΐνης [155].

Οι σημειακές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13, 59, 61 μπλοκάρουν την δράση GTPάσης, οδηγώντας σε δυνητικώς ογκογόνο πρωτεΐνη. Μεταλλάξεις σε άλλες θέσεις μπορούν να παρεμποδίσουν την είσοδό της πρωτεΐνης στην μεμβράνη όπου εντοπίζονται οι ρυθμιστές και οι τελεστές της.

Η ανάλυση του συμπλέγματος της Ras με GTP ή GDP που πραγματοποιήθηκε με χρήση ακτίνων X παρέχει μια περιγραφή της εγγενούς πρωτεΐνης και της ογκογόνου μορφής [159,160], καταδεικνύοντας έτσι ότι αυτά τα αμινοξέα είναι σημαντικά για την λειτουργία της πρωτεΐνης. Η p21-Ras αποτελείται από έξι βήτα επιφάνειες και πέντε άλφα έλικες που συνδέονται με 10 αγκύλες [155], (Εικόνα 2). Η αγκύλη L1 περιέχει υπολλείματα γλυκίνης, Gly12 και Gly13, τα οποία μεταλλάσσονται συχνότερα σε ανθρώπινους όγκους και οδηγούν σε ιδιοστατικώς ενεργό πρωτεΐνη. Τα σημαντικότερα υπολλείματα για τις αλληλεπιδράσεις της p21Ras με τους τελεστές της (θέση 32-40) βρίσκονται στην αγκύλη L2. Η αγκύλη L4 περιέχει γλουταμίνη 61 (Gln61) της οποίας η αντικατάσταση έχει ογκογονικό αποτέλεσμα. Τα υπολλείματα που εμπλέκονται σε πρωτεϊνική σύνδεση GAP/NF ενεργοποιούσα την GTPάση, βρίσκονται στην θέση 30-38 η οποία επίσης αποτελεί περιοχή αλληλεπίδρασης της Ras

με τους τελεστές της [155]. Τα αμινοξέα στις θέσεις 12, 59, και 61 είναι απαραίτητα για την ενεργότητα GTPάσης της Ras μέσω διέγερσης του GAP/NF. Συγκεκριμένα η Gln61 σταθεροποιεί την εξωτερική φωσφορική ομάδα του GTP και φέρει ένα μόριο H₂O απαραίτητο για την πυρηνοφιλική πλήξη. Οι μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 59 παρεμποδίζουν την διορθωμένη θέση της Gln61 στο σύμπλεγμα μετάβασης κατά την GTP υδρόλυση. Το GAP/NF συμβάλλει στην τοποθέτηση της Gln61 στον σχηματισμό της καταλυτικής θέσης της Ras μέσω ενός υπολλείματος αργινίνης που υπάρχει σε όλες τις GAPs. Το υπόλλειμα αυτό αλληλεπιδρά με τα φωσφορικά νουκλεοτίδια και εξουδετερώνει το αρνητικό φορτίο. Έτσι οι μεταλλάξεις στην Gly12 και Gln61, αναστέλλουν την υδρόλυση του GTP. Οι μεταλλάξεις της Ala59, μειώνουν το ανταλλαζόμενο νουκλεοτιδικό φορτίο, μπλοκάρουν το Ras στο σύμπλεγμα που συνδέει το GTP, και οδηγούν σε ιδιοσυστατικώς ενεργή πρωτεΐνη [161].

Η Ras ενεργοποιείται υπό φυσιολογικές συνθήκες ως απάντηση σε εξωκυττάρια σήματα, μέσω του αποτελέσματος που επιφέρει η αλληλεπίδραση της με παράγοντες ανταλλαγής γουανίνης (GEFs). Η κρυσταλλογραφική ανάλυση της Ras συνδεδεμένης με SOS (μια από τις πιο γνωστές GEF) αποκάλυψε ότι η GEF διεγείρει την απελευθέρωση. Η SOS επάγει την χωροταξική αλλαγή της Ras που ανοίγει τη θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου, και μπλοκάρει την αλληλεπίδραση με τα φωσφορικά του GDP και το Mg⁺⁺ [161,162].

Η SOS διαχωρίζει το νουκλεοτίδιο από την Ras σε $< 1 \text{ sec}$. Σε απουσία της SOS το νουκλεοτίδιο αυτό απελευθερώνεται με $K_d = 10^{-5} \text{ sec}$, μετά από περίπου 2 ώρες. Επιπρόσθετα, το σύμπλεγμα Ras/SOS δεν είναι πολύ σταθερό. Η θέση σύνδεσης του νουκλεοτιδίου παραμένει προσβάσιμη και το μόριο GTP, ιδιαιτέρως άφθονο στο κύτταρο, μετατοπίζει την SOS για να συνδεθεί με την Ras [162,163]. Το σύμπλεγμα Ras/GTP δεν παραμένει ενεργό για πολύ αλλά ο ενδεδειγμένος έλεγχος που πραγματοποιείται από τις GAPs, απενεργοποιεί την Ras διεγείροντας την υδρόλυση του GTP.

3.1.2 Λειτουργικές ιδιότητες των Ras

Η πρωτεΐνη Ras τροποποιεί την κυτταρική απόκριση σε αρκετά μιτωγόνα ερεθίσματα και/ή παράγοντες διαφοροποίησης (π.χ. αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, σήματα κυτταρικής προσκόλλησης) και σε εξωτερικά ερεθίσματα όπως η ακτινοβολία UV, και παράγοντες ώσμωσης μεταξύ άλλων [164-167].

Τα ερεθίσματα αυτά ενεργοποιούν μια σειρά μονοπατιών μεταγωγής του σήματος που μπορούν να είναι είτε ανεξάρτητα είτε να συνδέονται μεταξύ τους σε διάφορα σημεία. Η Ras ενεργοποιείται μετά από αλληλεπίδραση αρκετών αυξητικών παράγοντων (EGF, PDGF και άλλων) με τους υποδοχείς τους (τυροσινικής κινάσης) που αλληλεπιδρώντας με προσδέτες τους αυτοφωσφορυλιώνουν στην τυροσίνη [164,166].

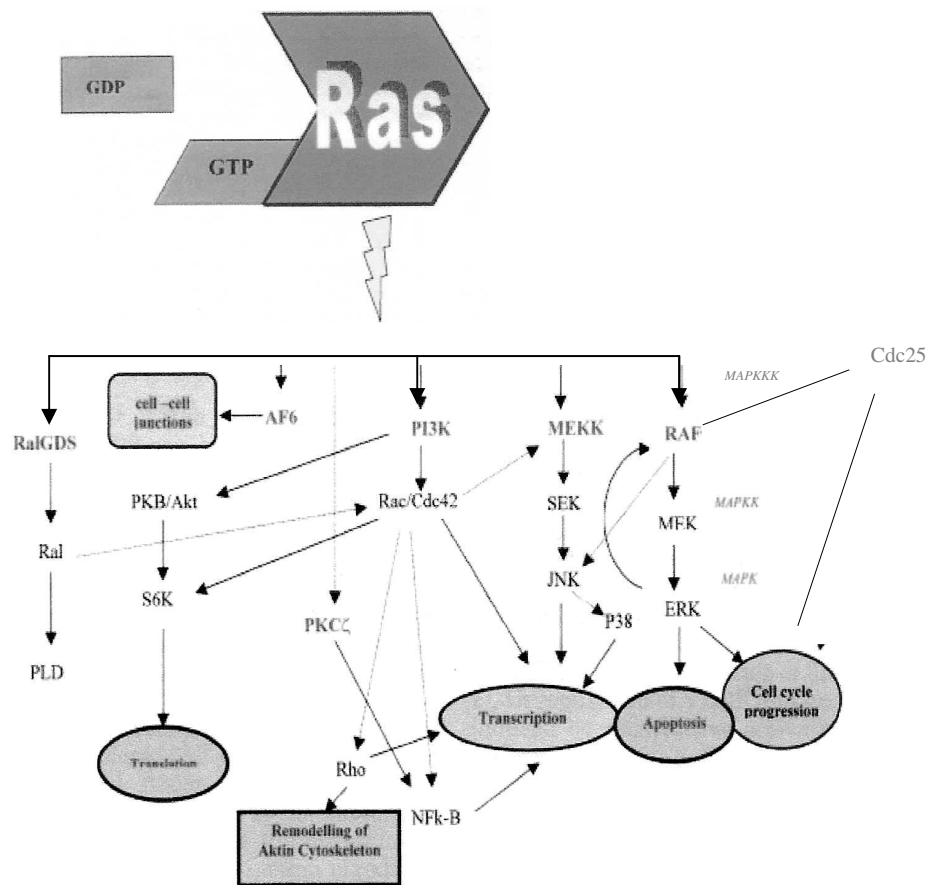
Οι πρωτεΐνες προσαρμοστές, όπως η προσδένουσα από τον υποδοχέα του

αυξητικού παράγοντα πρωτεΐνη 2 (GRB2), αλληλεπιδρούν με τις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες του υποδοχέα μέσω των SH2 περιοχών και συνδέουν την Ras-GEF μέσω της SH3 περιοχής. Οι GEFs μεταφέρονται στην μεμβράνη όπου προάγουν την μετάπτωση της RAS στο ενεργό σύμπλεγμα Ras-GTP. Η Ras ταχέως απενεργοποιείται από τις GAPs που διεγείρουν την υδρόλυση του GTP. Αν και μεταβατική, η ενεργός πρωτεΐνη Ras είναι αρκετή για να διεγείρει την κυτταρική μεταγωγή του σήματος. Ο χρόνος και ο βαθμός της ενεργοποίησης της Ras εξαρτάται από την ένταση του πρωταρχικού σήματος και από την ειδική του φύση [168]. Η ενεργοποίηση της Ras θα μπορούσε να οδηγήσει σε διαφορετικά μονοπάτια μεταγωγής του σήματος υπεύθυνα για διαφορετικές κυτταρικές αποκρίσεις. Οι υποδοχείς σερπεντίνης (Serpentine receptors, S'TMR), που αλληλεπιδρούν με τριμερικές G πρωτεΐνες μπορούν επίσης να επάγουν την ενεργοποίηση της Ras [168].

Οι τρεις κύριοι τελεστές της Ras (Εικόνα 3), η Raf κινάση, οι RAL-GEFs, και η PI3-K, συνδέουν την ίδια περιοχή του Ras-GTP, την περιοχή 32-40. Και οι τρεις τελεστές αυξάνουν την "in vivo" ενεργότητα τους μετά την πρόσδεση της Ras. Το καλύτερα γνωστό μονοπάτι που διεγείρεται από την Ras ξεκινά με την ενεργοποίηση της σερίνης-θρεονίνης Raf. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι η Ras αλληλεπιδρά με το αμινοτελικό κομμάτι της Raf που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και σχηματίζει σύμπλεγμα με την 14-3-3 πρωτεΐνη η οποία είναι απαραίτητος συμπαράγοντας για την

δραστηριότητα της Raf [169]. Η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί μια χωροταξική αλλαγή της Raf αποκαλύπτοντας ένα ή περισσότερα υπολλείματα φωσφορυλίωσης και σταθεροποιώντας μια νέα καταλυτικώς ενεργή διάταξη της Raf. Μετά από αυτές τις χωροταξικές αλλαγές, η Raf

Εικόνα 3: Ras τελεστές και καθοδικά μονοπάτια



Πηγή: βιβλιογραφική αναφορά 152

αγκυροβολεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω ενός μερικώς σαφούς μηχανισμού [169,170].

Η σύνδεση των Raf/Ras είναι παροδική και αφού συνδεθεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, η ενεργοποίηση της Raf γίνεται ανεξάρτητη από την Ras. Η φωσφορυλιωμένη Raf ενεργοποιεί μια σειρά από κινάσες που, ενισχύοντας χαμηλής επιφάνειας σήματα, τροποποιούν την ενεργότητα αρκετών κυτταροπλασματικών και πυρηνικών παραγόντων. Τέλος, τα σήματα που μεταδίδονται στον πυρήνα καθορίζουν την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, όπως τα μέλη της οικογένειας Ets [171]. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες επηρεάζουν την έκφραση ειδικών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και /ή της διαφοροποίησης. Για παράδειγμα, οι κινάσες ERK1 και ERK2 εμπλέκονται στην επαγωγή της έκφρασης του c-fos μέσω του TCF, που προσδέεται στον εκκινητή του γονιδίου αυτού. Το προϊόν του c-fos ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1, τροποποιεί την έκφραση πολλών άλλων γονιδίων. Ο ίδιος καταρράκτης των κινασών που διεγείρεται από το σύμπλεγμα Ras/Raf επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την έκφραση δύο τουλάχιστον εξαρτώμενων από κυκλίνη αναστολέων κινασών, των p21^{WAF1} και p16^{INKa} [172]. Η Ras επάγει την απόπτωση σε ορισμένους τύπους κυττάρων και σε ειδικές συνθήκες μέσω του ίδιου μονοπατιού μεταγωγής του σήματος [164]. Σε μερικές περιπτώσεις τα αποπτωτικά σήματα είναι δυνατόν να μπλοκαριστούν από την προσωρινή ενεργοποίηση του εξαρτώμενου από την Ras μεταγραφικού παράγοντα NF-kB [173]. Άλλες βιολογικές αποκρίσεις που γίνονται μέσω ενεργοποίησης της Ras

περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων την κυτταρική κίνηση και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Η οικογένεια των GEF αποτελεί έναν άλλο τελεστή της Ras (RalGDS, RGL, και Rlf/RGL2) που λειτουργούν ως ενεργοποιητές των μικρών μονομερών Ral-GTPασών [174,175]. Η RAL-GTP ενεργοποιεί την φωσφολιπάση D (PLD) που, μέσω υδρόλυσης των φωσφατιδυλχολινών, παράγει κορεσμένες και μονοκορεσμένες φωσφατιδικές ομάδες, που δυνητικώς αποτελούν μόρια ενεργοποίησης της Rho. Η RAL επίσης φαίνεται να αλληλεπιδρά με τα Cdc42 και RAC GAP [165]. Οι Rho, RAC, και Cdc42 συνιστούν μια άλλη ομάδα μονομερικών G-πρωτεϊνών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και στην ενεργοποίηση κινασών που ρυθμίζουν την ενεργότητα ποικίλων μεταγραφικών παραγόντων. Έχει δειχθεί πρόσφατα ότι η Rho καταστέλλει την έκφραση του αναστολέα των κυκλινών p21^{WAF1} [152].

Ο τρίτος τελεστής της Ras είναι η φωσφατυδιλοϊννοσιτόλ 3-κινάση (PI3-K). Η Ras-GTP μπορεί να συνδεθεί και να ενεργοποιήσει την καταλυτική υποομάδα του ενζύμου αυτού που παράγει PI(3,4,5)P3 μέσω φωσφορυλίωσης του PI(4,5)P2 στη θέση 3. Το PI(3,4,5)P3 δρα άμεσα ως 2^{ος} αγγελιοφόρος, συνδέοντας αρκετές κυτταροσκελετικές πρωτεϊνικές κινάσες και τροποποιώντας την ενεργότητα μέσω χωροταξικών αλλαγών και/ή μεμβρανικής αναδιάταξης τους. Το PKB/Akt είναι ένζυμο έμμεσα ενεργοποιούμενο από την PI3-K, το οποίο απενεργοποιεί τον BAD, προ-αποπτωτικό παράγοντα, με φωσφορυλίωση [164]. Άλλοι πιθανοί τελεστές

της Ras είναι οι AF -6, πρωτεϊνική κινάση C-zeta (PKC-zeta), και Nore1. Η AF-6 βρέθηκε ότι αποτελεί συστατικό μιας σημαντικής πρωτεΐνης σε ορισμένες λευχαιμίες [176,177]. Η λειτουργία της AF -6 στα επιθηλιακά κύτταρα είναι ο σχηματισμός ισχυρών δεσμών μεταξύ των κυττάρων και η λειτουργία της μειώνεται επί παρουσίας της Ras [178]. Η Ras ίσως χρησιμοποιεί τον τελεστή αυτό για την τροποποίηση της ενδοκυττάριας σύνδεσης και επικοινωνίας .

Ένας άλλος τελεστής είναι η PKC-zeta [179,180] που παρουσιάζει ομολογία με την Raf. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως η PKC zeta μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι της Ras ανεξάρτητα από την Ras [181]. Η Nore1 έχει αναγνωριστεί πρόσφατα αλλά η λειτουργία της παραμένει άγνωστη [182]. Οι πρόσφατες αυτές παρατηρήσεις αρχίζουν να φωτίζουν την πολύπλοκη σχέση ανάμεσα στην ενεργοποίηση της Ras, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Η Ras μπορεί να επάγει ταυτόχρονα αντι-προαποπτωτικά μονοπάτια σε συνάρτηση με σήματα ενεργοποίησης, τον κυτταρικό τύπο και τις μεταβολικές συνθήκες και μέσω ενεργοποίησης άλλων μονοπατιών εξαρτημένων και μη από την Ras. Η καλύτερη κατανόηση των διαδικασιών αυτών θα βοηθήσει στην αναγνώριση των παραγόντων που ευθύνονται άμεσα για την απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου σε αρκετούς όγκους και θα βοηθήσει στον σχεδιασμό ειδικών θεραπευτικών στρατηγικών για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων ή της απόπτωσης.

3.2 ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΚΑΙ RAS

Ο σημαντικός ρόλος της Ras στην ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης πιστοποιείται από το γεγονός ότι περίπου το 70% των νεοπλασιών παρουσιάζει, σε διαφορετικό βαθμό, μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό, ιδιαίτερα στα κωδικόνια 12 και 13 που είναι τα καλύτερα μελετημένα. Άλλα συχνά μεταλλαγμένα κωδικόνια είναι τα 59 και 61. Οι *in vivo* μεταλλάξεις των γονιδίων *ras* δεν κατανέμονται ισότιμα μεταξύ των ισομορφών τους. Το γονίδιο *K-ras* παρουσιάζει μεταλλάξεις στο μη-μικροκυτταρικό *Ca* πνεύμονα (33%), σε *Ca* ορθοσιγμοειδούς (44%), και *Ca* παγκρέατος (90%); Το *N-ras* είναι μεταλλαγμένο σε μελάνωμα (13%), σε *Ca* ήπατος (30%), και σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (30%). Το *H-ras* είναι μεταλλαγμένο σε *Ca* χοληδόχου (10%) και σε *Ca* νεφρού (10%). Τα καρκινώματα του θυρεοειδούς έχουν μεταλλάξεις και στα 3 γονίδια *ras*. Επιπρόσθετα, πολλές μελέτες πάνω σε αιματολογικές κακοήθειες και σε *Ca* παγκρέατος, ορθοσιγμοειδούς και μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα έχουν εκτιμήσει τον δυνητικό ρόλο των μεταλλάξεων των *ras* ως αρνητικοί προγνωστικοί παράγοντες, αλλά τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. [183-188]. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων *ras* παράγουν μια ογκοπρωτεΐνη που έχει εμπλακεί στην μετάσταση των όγκων και την αγγειογένεση. Η ανάπτυξη του όγκου εξαρτάται από την 'εκμετάλλευση' αγγείων (κύρια μέσω αγγειογένεσης) από τον ίδιο τον όγκο. Η διαδικασία

αυτή πιστεύεται ότι πυροδοτείται τουλάχιστον εν μέρει από την ενεργοποίηση ογκογονιδίων και την απενεργοποίηση ή την απώλεια κατασταλτικών γονιδίων. Τα δυνητικά ογκογονίδια μπορούν να απορυθμίσουν την έκφραση τόσο των διεγερτών της αγγειογένεσης όσο και των ανασταλτών σε καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα, η γενετική αποδιοργάνωση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου K-ras στον ανθρώπινο καρκίνο σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή αυξητικού παράγοντα αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) και ρύθμιση προς τα κάτω της θρομβοσπονδίνης 1 (TSP1). Η ρύθμιση προς τα πάνω του VEGF και της αγγειογένεσης μπορεί επίσης να επαχθεί από την ενεργοποίηση άλλων ογκογόνων πρωτεϊνών (π.χ EGFR, Raf, MEK, PI3K) δρώντας σε ποικίλα επίπεδα του μονοπατιού σηματοδότησης Ras [189].

3.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΚΑΙ RAS

Η ενδογενής Ras είναι σημαντική για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και η ογκογόνος Ras πρωτεΐνη προάγει την ανεξάρτητη από τον αυξητικό παράγοντα είσοδο στον κυτταρικό κύκλο [190,191]. Η διέγερση από μιτογόνα των κυττάρων σε φάση ηρεμίας (G0) προκαλεί δυο αιχμές ενεργοποίησης της Ras, που η πρώτη είναι απαραίτητη για την είσοδο στην G1 φάση και σχετίζεται με τον καταρράκτη των κινασών της Raf πρωτεΐνης. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt αντιστοιχεί στην 2^η αιχμή στην μέση της G1 φάσης. Η ενεργοποιημένη Ras από μιτογονικά ερεθίσματα είναι απαραίτητη για την ρύθμιση προς τα πάνω της κυκλίνης

D1 και της p21^{CIP1} και για την ρύθμιση προς τα κάτω της p27^{Kip1} [166,192]. Η εξαρτημένη από την Ras ρύθμιση προς τα πάνω της κυκλίνης D1 έχει κύρια αποδοθεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού Raf/MEK/ERK [193,194]. Η ρύθμιση της κυκλίνης D1 από το μονοπάτι Raf/MEK/ERK δεν αμφισβητείται, αλλά πρόσφατες μελέτες προτείνουν την συμβολή και άλλων μονοπατιών τελεστών της Ras για την επαγωγή της κυκλίνης D1 [164]. Πράγματι η έκφραση της κυκλίνης D1 εξαρτάται από την ενεργότητα της PI3K. Τέλος, το μονοπάτι PI3K/Akt μπορεί επίσης να αυξάνει την έκφραση της κυκλίνης D1 με ενίσχυση της μετάφρασης του mRNA της κυκλίνης D1 [195].

Οι Ras ή Raf προκαλούν διακοπή του κυτταρικού κύκλου μέσω επαγωγής της p21^{CIP1} [196,197]. Η ρύθμιση προς τα πάνω της p21^{CIP1} από την Ras διαμεσολαβείται εν μέρει από την ρύθμιση προς τα πάνω της μεταγραφής [152]. Σε αντίθεση με την p21^{CIP1}, τα επίπεδα του mRNA της p27^{Kip1} είναι σταθερά κατά τον κυτταρικό κύκλο και ρυθμίζονται από μεταφραστικούς ελέγχους και από πρωτεόλυση μεσολαβούμενη από την ουβικουιτίνη [198,199]. Το μονοπάτι Raf/MEK/ERK είναι ίσως το καλύτερα χαρακτηρισμένο μονοπάτι τελεστών που προκαλεί την ρύθμιση προς τα κάτω της p27^{Kip1} από την Ras. Επιπλέον η αναστολή της PI3K μπλοκάρει την επαγόμενη από αυξητικό παράγοντα ρύθμιση προς τα κάτω της p27^{Kip1}, προτείνοντας έτσι ένα ρόλο για αυτόν τον τελεστή στην ρύθμιση προς τα κάτω που μεσολαβείται από την Ras [200].

Πρόσφατες μελέτες προτείνουν συγκεκριμένη σύνδεση μεταξύ των σημάτων της Ras και της ρύθμισης της Rb στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Στην πραγματικότητα, η αναστολή της λειτουργίας της Ras προκαλεί ενεργοποίηση της υποφωσφορυλιωμένης Rb συμβάλλοντας στην διακοπή της φάσης G1 [201]. Ο ρόλος της Ras στην προαγωγή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου είναι διαφορετικός στα κύτταρα που βγαίνουν από την φάση G0 και στα κύτταρα που βρίσκονται σε συνεχή πολλαπλασιασμό [202].

Τέλος η σχέση μεταξύ της Ras και του κυτταρικού κύκλου δεν είναι απλή γιατί υπάρχουν διαφορές εξαρτώμενες από το είδος των κυττάρων σχετικά με το πως η Ras θα μπορούσε να ρυθμίζει την μηχανή του κυττάρου.

Οι πρωτεΐνες Ras είναι ενδοκυττάριοι μεταγωγείς-κλειδιά των μηνυμάτων ανάπτυξης που ρυθμίζονται από υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου. Ο μεγάλος αριθμός των ανθρώπινων όγκων που περιλαμβάνει μεταλλαγμένα ογκογονίδια ras προτείνει ότι η Ras ογκοπρωτεΐνη θα μπορούσε να είναι κατάλληλος στόχος για τον σχεδιασμό φαρμάκων. Οι κύριες θεραπευτικές προσεγγίσεις προς το παρόν, είναι η πρόληψη της μεμβρανικής εντόπισης της Ras με χρήση αναστολέων ισοπρενυλίωσης [203,204], η αναστολή των καθοδικών τελεστών της Ras όπως είναι η Raf κινάση [205] και το μονοπάτι MEK [206], και η αναστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης Ras [207,208].

Η κατανόηση των μονοπατιών που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση παίζει σημαντικό ρόλο στην διαλεύκανση των μηχανισμών που οδηγούν στην ογκογένεση. Η λειτουργία της ογκογόνου Ras και η γνώση ότι τα εξαρτώμενα από την Ras μονοπάτια σηματοδότησης είναι σημαντικά για την ογκογένεση είναι σαφή και περιγράφονται σε αυτή την ανασκόπηση.

Κάθε μέρα αναγνωρίζονται και περιγράφονται καθοδικοί τελεστές της Ras αλλά, δυστυχώς, η λειτουργία τους σε αυτό το πολύπλοκο δίκτυο σηματοδότησης μένει να διευκρινιστεί. Επί του παρόντος, βλέπουμε μόνο την κορυφή του παγόβουνου, αλλά οι μελλοντικές έρευνες, με χρήση νέων μοντέρνων και ενδιαφέροντων τεχνολογιών, θα βοηθήσουν στον καθορισμό της μοριακής και φυσιολογικής βάσης των μονοπατιών σηματοδότησης του κυττάρου. Η έκφραση του γονιδίου *ras*, στον χώρο και τον χρόνο, παίζει κύριο ρόλο στο πολύπλοκο αυτό σενάριο του μηχανισμού του κυτταρικού κύκλου και μπορεί να λεχθεί ότι η πρωτεΐνη Ras παρέχει μια ενδιαφέρουσα σύνδεση μεταξύ του καρκίνου και του κυτταρικού κύκλου.

3.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ - ΟΡΘΟΥ

Το 2000, συνολικά 944.717 περιστατικά καρκίνου παχέος εντέρου – ορθού διαγνώστηκαν παγκοσμίως: 498.754 νέες περιπτώσεις στους άνδρες και 445.963 νέες περιπτώσεις σε γυναίκες [209]. Παγκοσμίως, τα προτυποποιημένα ποσοστά της επίπτωσης του ορθοκολικού καρκίνου είναι υψηλότερα στους άνδρες από ότι στις γυναίκες [209]. Πάνω από το ένα τρίτο (36%) από τα νέα περιστατικά ορθοκολικού καρκίνου καταγράφονται σε μη βιομηχανοποιημένες χώρες. Φυλετικές και εθνολογικές διαφορές σχετίζονται με διαφορές στην επίπτωση του νεοπλασματος όμως περιβαλλοντικοί παράγοντες ευθύνονται, κατά μεγάλο μέρος, για τις διαφορές που καταγράφονται σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές [210]. Η επίπτωση καταγράφεται υψηλή στην Αμερική, Καναδά, Νέα Ζηλανδία σε αντίθεση με τη χαμηλή επίπτωση στην Αλγερία και στην Ινδία [211] (Πίνακας 4). Με τη μετανάστευση ομάδων, από ζώνες χαμηλής επίπτωσης σε ζώνες υψηλής επίπτωσης, παρατηρήθηκε αύξηση του σχετικού κινδύνου εμφάνισης του συγκεκριμένου νεοπλασματος. Μελέτες, πράγματι, καταγράφουν ότι η επίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου σε Ιάπωνες, που μετανάστευσαν, στις Η.Π.Α., αυξήθηκε κατά 3 ή 4 φορές σε σχέση με τους ομοεθνείς τους, στη γενέτειρα [210,212].

Πίνακας 4: Ετήσιες υψηλότερες και χαμηλότερες κατά μέσο όρο, προτυποποιημένες με την ηλικία συχνότητες (ανά 100.000 πληθυσμού) καρκίνου παχέος εντέρου-ορθού (ΚΠΟ) σε άνδρες και γυναίκες κάθε ηλικίας, παγκοσμίως στις αρχές της δεκαετίας του '90 (Colorectal cancer, ICD9 153-154 Registry).

ΚΠΟ/ΑΝΔΡΕΣ	N	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	ΚΠΟ/ΓΥΝΑΙΚΕΣ	N	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ
US, Hawaii: Japanese	697	53.5	New Zealand: non-Maori	5012	40.8
New Zealand: non-Maori	5000	51.3	Canada, Newfoundland	678	38.3
Japan, Hiroshima	1515	51.0	US, Detroit: Black	1172	36.6
France, Haut-Rhin	1041	49.9	US, Los Angeles: Black	1182	36.5
Italy, Trieste	547	49.4	US, San Francisco: Black	527	36.4
France, Bas-Rhin	1445	49.2	Israel, Jews born Amer/Eur	3034	35.8
Canada, Yucon	39	49.0	US, San Francisco: Japanese	76	35.4
US, Detroit: Black	1100	48.3	US, Atlanta: Black	529	35.0
Czech Republic	15,906	48.2	Canada, Nova Scotia	1400	35.0
US, Los Angeles: Black	1061	47.9	South Australia	2047	34.2
Brazil, Belem	73	7.3	Thailand, Khon Kaen	129	5.2
Ecuador, Quito	123	7.2	Uganda, Kyadondo	26	5.1
Thailand, Chiang Mai	240	7.2	India, Bangalore	300	4.8
Mali, Bamako	48	6.0	Kuwait: non-Kuwaitis	26	4.5
India, Madras	367	5.6	India, Madras	258	4.1
India, Bangalore	374	5.5	India, Trivandrum	26	3.3
India, Trivandrum	38	5.4	Algeria, Setif	34	2.9
India, Barshi, Paranda, Bhum	29	3.3	Mali, Bamako	21	2.1
Algeria, Setif	28	3.1	India, Karunagappally	6	1.6
India, Karunagappally	11	3.1	India, Barshi, Paranda, Bhum	14	1.5

Πηγή: βιβλιογραφικές αναφορές 210, 211

Τα ποσοστά θανάτων από ορθοκολικό καρκίνο μειώνονται στις ΗΠΑ. Αυτό φαίνεται να οφείλεται στις μεθόδους ελέγχου του πληθυσμού που επιτρέπουν την ανίχνευση της νόσου σε πρώιμα στάδια και στην ύπαρξη αποτελεσματικότερων θεραπευτικών σχημάτων. Παρ' όλα αυτά, τα μέσα ετήσια ποσοστά θανάτων από ορθοκολικό καρκίνο στις ΗΠΑ αυξήθηκαν στους έγχρωμους και στα δύο φύλα (27.2 και 19.5 σε Έγχρωμους άνδρες και γυναίκες αντίστοιχα και 20.1 και 13.7 σε Λευκούς άνδρες και γυναίκες ανά 100.000) [213]. Σε άλλα μέρη του κόσμου, παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά σε Σκανδιναβικές χώρες ενώ στην Αγγλία και την

Ουαλία τα ποσοστά θνησιμότητας μειώνονται σε όλες τις ηλικιακές ομάδες και στα δύο φύλα. Η θνησιμότητα από καρκίνο του παχέος εντέρου και του ορθού έχουν παραμείνει αμετάβλητα κατά την διάρκεια του αιώνα στην Ιρλανδία [214]. Ωστόσο, σημειώνονται ταχείες αλλαγές σε πολλές χώρες που πριν θεωρούνταν χαμηλού κινδύνου. Για παράδειγμα, τα ποσοστά θνησιμότητας στην Ιαπωνία έχουν αυξηθεί 5 φορές από το 1950 και 4 φορές στην Κορέα από το 1983. Ο ορθοκολικός καρκίνος δεν είναι πάντα θανατηφόρος αν και υπάρχουν τεράστιες διαφορές στην επιβίωση ανάλογα με το στάδιο της νόσου. Η πενταετής επιβίωση στο στάδιο B κατά Dukes κινείται στο 70-80% και πέφτει στο 30-60% για το στάδιο Dukes C. Η πενταετής επιβίωση σε χειρουργηθέν Ca Dukes A είναι περίπου 90% και η επιβίωση μετά από απλή εκτομή αδενωματώδους μισχωτού πολύποδα που περιέχει καρκίνωμα *in situ* (ή σοβαρή δυσπλασία) αγγίζει το 100%. Υπολογίζεται ότι μισό εκατομμύριο άνθρωποι χάνουν τη ζωή τους, παγκοσμίως, από καρκίνο του παχέος εντέρου – ορθού σε ένα έτος. Είναι ξεκάθαρο ότι ο ορθοκολικός καρκίνος αποτελεί σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας όχι μόνο στις Δυτικές χώρες αλλά με αυξανόμενους ρυθμούς και σε άλλα σημεία του κόσμου. Η γήρανση του παγκόσμιου πληθυσμού θα επηρεάσει αρνητικά την επίπτωση του συγκεκριμένου καρκίνου εκτός και αν ληφθούν αποτελεσματικά μέτρα πρόληψης και ελέγχου.

3.5 ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου – ορθού, περιλαμβάνει καρκινωμάτωδεις βλάβες στην σκωληκοειδή απόφυση, στο παχύ έντερο και το ορθό. Αποτελεί τον τρίτο συχνότερο τύπο καρκίνου και την δεύτερη αιτία θανάτου στον Δυτικό κόσμο. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η διάγνωση του εντοπισμένου καρκίνου του εντέρου τίθεται μέσω κολονοσκόπησης.

Η θεραπεία είναι συνήθως χειρουργική και συχνά μπορεί να ακολουθήσει χημειοθεραπεία ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις έχει θέση και η ακτινοθεραπεία.

3.5.1 Συμπτώματα

Ειδικά

Συχνά, ο ασθενής μπορεί να είναι ασυμπτωματικός. Αυτός είναι ένας λόγος για τον οποίο πολλοί συστήνουν περιοδικούς ελέγχους για την νόσο με μικροσκοπική εξέταση κοπράνων για αίμα και με κολονοσκόπηση. Όταν παρουσιάζονται συμπτώματα, εξαρτώνται από την θέση της βλάβης. Γενικότερα, όσο πιο κοντά βρίσκεται η βλάβη στον πρωκτό τόσο πιο εμφανή συμπτώματα παρουσιάζονται, όπως:

- Αλλαγή στις συνήθειες του εντέρου – [αλλαγή στην συχνότητα (δυσκοιλιότητα και/ή ψευδοδιάρροια), αλλαγή στην ποιότητα των κοπράνων, αλλαγή στην σύσταση των κοπράνων]
- Αιματηρά κόπρανα ή αιμορραγία από το ορθό
- Κόπρανα με βλέννη
- Αίσθημα ατελούς αφόδευσης (τεινεσμός)
- Μείωση της διαμέτρου των κοπράνων (σχετιζόμενο μόνο με καρκίνο του ορθού)
- Απόφραξη εντέρου

Γενικά

Σε περιπτώσεις καρκίνου του ανιόντος, πολλές φορές είναι παρόντα μόνο γενικά συμπτώματα όπως:

- Αναιμία, με συμπτώματα όπως ζάλη, αδιαθεσία και αίσθημα παλμών. Κλινικά υπάρχει ωχρότητα και η γενική εξέταση αίματος θα επιβεβαιώσει τα χαμηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης.
- Ανορεξία
- Ασθένεια, αδυναμία
- Αδικαιολόγητη απώλεια βάρους

Συμπτώματα μετάστασης

Μπορεί να υπάρχουν συμπτώματα αποδιδόμενα σε απομακρυσμένη μετάσταση:

- Δυσχέρεια στην αναπνοή όπως σε μεταστάσεις στους πνεύμονες.
- Άλγος επιγαστρίου ή δεξιού υποχονδρίου, όπως σε ηπατικές μεταστάσεις. Σπάνια μπορεί να υπάρχει ίκτερος εάν η δευτεροπαθής βλάβη εμποδίζει την ροή της χολής. Κλινικώς μπορεί να παρατηρηθεί ηπατομεγαλία.

3.5.2 Παράγοντες κινδύνου - έλεγχος και διάγνωση

Ο συνολικός κίνδυνος κατά την διάρκεια της ζωής για ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι περίπου 7%.

Ο κίνδυνος ανάπτυξης της νόσου αυξάνεται από ορισμένους παράγοντες.

Αυτοί περιλαμβάνουν:

Ηλικία. Ο κίνδυνος ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου αυξάνεται με την ηλικία. Οι περισσότερες περιπτώσεις σημειώνονται στην 6^η και 7^η δεκαετία της ζωής, ενώ οι περιπτώσεις πριν την ηλικία των 50 ετών είναι ασυνήθεις εκτός εάν υπάρχει οικογενειακό ιστορικό πρώιμου καρκίνου του παχέος εντέρου.

Πολύποδες παχέος εντέρου. Αδενοματώδεις πολύποδες, αποτελούν παράγοντα κινδύνου για καρκίνο του παχέος εντέρου. Η αφαίρεση των

πολυπόδων κατά την κολonosκόπηση μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης του συγκεκριμένου καρκίνου.

Ιστορικό καρκίνου. Άτομα που έχουν παρουσιάσει και έχουν λάβει θεραπεία για καρκίνο παχέος εντέρου έχουν αυξημένο κίνδυνο να εκδηλώσουν καρκίνο στο μέλλον. Γυναίκες που έχουν εκδηλώσει καρκίνο ωοθηκών, μήτρας και μαστού έχουν υψηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης ορθοκολικού καρκίνου.

Κληρονομικότητα.

- Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου παχέος εντέρου, ιδιαιτέρως σε κοντινό συγγενή πριν την ηλικία των 55 ετών ή σε πολλούς συγγενείς.
- Οικογενής αδενοματώδης πολυποδίαση συνοδεύεται από σχεδόν 100% κίνδυνο ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου έως την ηλικία των 40 ετών εάν δεν αντιμετωπιστεί.
- Κληρονομικός ορθοκολικός καρκίνος χωρίς πολύποδα (HNPCC) ή σύνδρομο Lynch.
- Μακράς πορείας ελκώδη κολίτιδα.

Κάπνισμα. Οι καπνιστές έχουν περισσότερες πιθανότητες να πεθάνουν από ορθοκολικό καρκίνο σε σχέση με τους μη καπνιστές. Γυναίκες καπνίστριες έχουν πάνω από 40% πιθανότητα να πεθάνουν από

ορθοκολικό καρκίνο σε σχέση με γυναίκες που δεν έχουν καπνίσει ποτέ. Οι άνδρες καπνιστές έχουν πάνω από 30% αυξημένο κίνδυνο να πεθάνουν από την νόσο σε σχέση με τους άνδρες που δεν έχουν καπνίσει ποτέ [215].

Δίαιτα. Μελέτες έχουν δείξει ότι μια διαίτα πλούσια σε κόκκινο κρέας [215] και φτωχή σε φρέσκα φρούτα, λαχανικά, πουλερικά και ψάρια αυξάνει τον κίνδυνο ορθοκολικού καρκίνου. Δίαιτες πλούσιες σε κόκκινο και επεξεργασμένο κρέας, όπως και εκείνες που είναι φτωχές σε ίνες σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ορθοκολικού καρκίνου. Τα άτομα που έτρωγαν συχνά ψάρι παρουσίασαν μειωμένο κίνδυνο [216]. Η φύση της σχέσης ανάμεσα στην περιεκτικότητα της διαίτας σε ίνες και στον κίνδυνο ορθοκολικού καρκίνου παραμένει αμφιλεγόμενη. Αναμφίβολα, μεταβλητές στον τρόπο ζωής και περιβαλλοντικοί παράγοντες, ειδικότερα, διαιτητικής αρχής, παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου. Η υπερβολική και συστηματική κατανάλωση ζωικού λίπους και κόκκινου κρέατος αποτελούν παράγοντες που σχετίζονται με την αύξηση του σχετικού κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου [217]. Η κατανάλωση κρέατος, επίσης, που έχει παρασκευασθεί σε υψηλές θερμοκρασίες, συνδέεται με αύξηση του σχετικού κινδύνου εμφάνισης αδενωμάτων μέσω της δράσης καρκινογόνων παραγώγων (φεκαπεντάνια, ετεροκυκλικές αμίνες) [218]. Από την άλλη πλευρά, η αύξηση της κατανάλωσης φυτικών ινών

(λαχανικά, φρούτα) φαίνεται να παίζει προστατευτικό ρόλο [219]. Τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης και β-λιποπρωτεϊνών αυξάνουν τον σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου. Η ποσότητα και η σύνθεση χοληστερόλης και χολικών οξέων φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο καρκίνου του παχέος εντέρου, γιατί οι ουσίες αυτές μετατρέπονται σε μεταβολίτες που θεωρούνται δυνητικά τοξικοί. Η ασπιρίνη και τα NSAIDs φαίνεται να λειτουργούν προστατευτικά στο επιθήλιο του παχέος εντέρου μέσω καταστολής των προσταγλανδινών [220,221,222].

Έλλειψη φυσικής δραστηριότητας. Οι άνθρωποι που ασκούνται έχουν μικρότερο κίνδυνο εκδήλωσης ορθοκολικού καρκίνου.

Ιοί. Η έκθεση σε ορισμένους ιούς (όπως σε συγκεκριμένα στελέχη του ιού του ανθρώπινου παπιλώματος) μπορεί να σχετίζεται με ορθοκολικό καρκίνο.

Πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα.

Χαμηλή πρόσληψη σελήνιου.

Αλκοόλ. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν βρει μια μικρή αλλά σταθερή δοσοεξαρτώμενη συσχέτιση ανάμεσα στην κατανάλωση αλκοόλ και στον καρκίνο παχέος - ορθού [223,224] ακόμη και όταν ελέγχονται οι διαιτητικοί παράγοντες και η κατανάλωση ινών [225,226]. Παρά την

ύπαρξη μεγάλου αριθμού μελετών η αιτιολογική σχέση δεν μπορεί να καθοριστεί πλήρως από τα διαθέσιμα έως τώρα στοιχεία [227]. Σε κάποιες μελέτες βρέθηκε ότι τα άτομα που πίνουν 30 gr αλκοόλ την ημέρα (και ειδικά εκείνοι που πίνουν πάνω από 40gr την ημέρα φαίνεται να έχουν ελαφρώς μεγαλύτερο κίνδυνο ορθοκολικού καρκίνου [228] ενώ η κατανάλωση ενός ή περισσότερων αλκοολούχων ποτών την ημέρα σε καθημερινή βάση συσχετίστηκε με περίπου 70% αύξηση του κινδύνου για καρκίνο του παχέος εντέρου [229-232]. Η κατανάλωση αλκοόλ ίσως αποτελεί αιτία πρώιμης έναρξης ορθοκολικής νεοπλασίας [233].

Έλεγχος και διάγνωση

Ο ορθοκολικός καρκίνος μπορεί να αναπτυχθεί κατά την διάρκεια πολλών ετών και η πρώιμη ανίχνευση του αυξάνει πολύ τις πιθανότητες ίασης. Γι' αυτό συστήνεται ο έλεγχος για την νόσο στα άτομα υψηλού κινδύνου. Υπάρχουν αρκετές εξετάσεις διαθέσιμες για το σκοπό αυτό:

- Δακτυλική εξέταση του ορθού: Μπορεί να ανιχνεύσει μόνο όγκους αρκετά μεγάλους στο άπω τμήμα του ορθού και στην πραγματικότητα δεν αποτελεί εξέταση ελέγχου (screening).
- Μικροσκοπική εξέταση κοπράνων για αίμα.
- Σιγμοειδοσκόπηση.
- Κολονοσκόπηση: Η κολονοσκόπηση έχει το πλεονέκτημα ότι εάν βρεθούν πολύποδες κατά την διάρκεια της διαδικασίας είναι

δυνατόν να αφαιρεθούν στον ίδιο χρόνο. Είναι δυνατόν επίσης να ληφθεί υλικό για βιοψία..

Στις ΗΠΑ η κολονοσκόπηση ή η μικροσκοπική εξέταση κοπράνων για αίμα μαζί με σιγμοειδοσκόπηση είναι οι προτιμότερες εξετάσεις ελέγχου.

Άλλες μέθοδοι ελέγχου

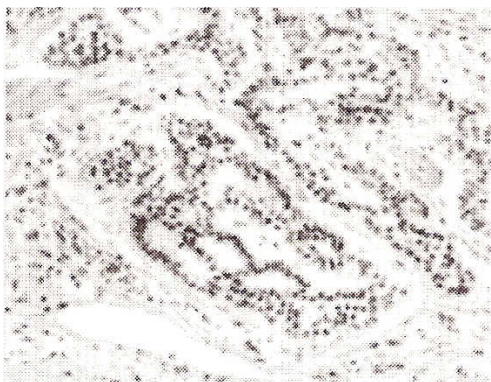
- Βαριούχος υποκλυσμός διπλής αντίθεσης.
- ‘Εικονική’ κολονοσκόπηση.
- Αξονική υπολογιστική τομογραφία.
- Εξετάσεις αίματος: Τα υψηλά επίπεδα καρκινοεμβρυικού αντιγόνου CEA στο αίμα υποδεικνύουν μετάσταση αδενοκαρκινώματος. Οι εξετάσεις αυτές είναι συχνά ψευδώς θετικές ή ψευδώς αρνητικές, και δεν συστήνονται για έλεγχο του πληθυσμού.
- Γενετική καθοδήγηση και γενετικός έλεγχος οικογενειών που είναι πιθανόν να έχουν μια κληρονομούμενη μορφή καρκίνου παχέος εντέρου, όπως ο κληρονομικός ορθοκολικός καρκίνος χωρίς πολυποδίαση ή η οικογενής αδενοματώδης πολυποδίαση.
- Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET): είναι μια τρισδιάστατη τεχνολογία απεικόνισης, όπου εγχύεται στον ασθενή ραδιενεργό σάκχαρο, το οποίο συγκεντρώνεται στους ιστούς με υψηλή μεταβολική δραστηριότητα και προσδιορίζεται η εκπομπή της

ακτινοβολίας. Επειδή τα καρκινικά κύτταρα συνήθως έχουν υψηλούς ρυθμούς μεταβολισμού, αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διαφοροδιάγνωση καλοήθων από κακοήθεις όγκους. Η PET δεν χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του πληθυσμού και δεν χρησιμοποιείται στην καθημερινή πρακτική αντιμετώπισης περιστατικών ορθοκολικού καρκίνου.

- Ολόσωμη απεικόνιση PET: αποτελεί την ακριβέστερη διαγνωστική μέθοδο για την ανίχνευση υποτροπών ορθοκολικού καρκίνου. Ενδείκνυται σε κάθε περίπτωση που η απόφαση του είδους της θεραπείας εξαρτάται από την ακριβή εκτίμηση της παρουσίας και του βαθμού έκτασης του όγκου.
- Έλεγχος του DNA κοπράνων είναι μια εξελισσόμενη μέθοδος για τον έλεγχο για ορθοκολικό καρκίνο. Τα προ-κακοήθη αδενώματα και οι καρκίνοι αποβάλλουν κύτταρα. Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης ενισχύει το DNA που εκχυλίζεται από τα συλλεχθέντα κυτταρικά υπολείματα σε ανιχνεύσιμα επίπεδα για την δοκιμασία. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ευαισθησία ανίχνευσης καρκίνου της τάξης του 71-91% [234].

3.5.3 Ιστοπαθολογία

Ο πιο συχνός τύπος καρκίνου παχέος εντέρου είναι το αδενοκαρκίνωμα που υπάρχει στο 95% των περιπτώσεων. Άλλοι, σπάνιοι τύποι είναι το λέμφωμα και το καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων. Οι καρκίνοι της δεξιάς πλευράς (ανιόν κόλον και τυφλό) τείνουν να είναι εξωφυτικοί, δηλαδή ο όγκος αναπτύσσεται προς τα έξω από μια θέση του εντερικού τοιχώματος. Αυτό πολύ σπάνια προκαλεί απόφραξη και παρουσιάζεται με συμπτώματα όπως η αναιμία. Οι όγκοι της αριστερής πλευράς τείνουν να είναι τύπου δακτυλίου και μπορούν να αποφράξουν το έντερο (σαν κρίκος πετσέτας φαγητού).



Ιστοπαθολογική εικόνα καρκίνου του παχέος εντέρου με χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη (<http://en.wikipedia.org>).

Το αδενοκαρκίνωμα αποτελεί έναν κακοήγη επιθηλιακό όγκο που προέρχεται από το αδενικό επιθήλιο του ορθοκολικού βλεννογόνου. Εισβάλλει στο τοίχωμα, διηθώντας τη βλεννογόνο μυϊκή στοιβάδα (*muscularis mucosae*), τον υποβλεννογόνο χιτώνα (*the submucosa*) και

έτσι την ίδια μυϊκή στοιβάδα (the muscularis propria). Τα κύτταρα του όγκου περιγράφουν ανώμαλες σωληνοειδείς δομές, που περιλαμβάνουν πολλαπλή διαστρωμάτωση, πολλαπλούς αυλούς μειωμένο στρώμα (προσανατολισμός 'πλάτη με πλάτη'). Τα αδenoκαρκινώματα του παχέος εντέρου χαρακτηρίζονται από αδένες μέτρια ή και καλά διαφοροποιημένους που εκκρίνουν ποσότητες βλέννας. Η βλέννα, που είναι μια μεγάλου μοριακού βάρους γλυκοπρωτεΐνη, είναι προϊόν των φυσιολογικών αλλά και των νεόπλαστων αδένων του παχέος εντέρου και γίνεται εμφανής ιστοχημικά με χρώσεις όπως είναι η χρώση του περιοδικού οξέος-Schiff (PAS). Σε χαμηλής διαφοροποίησης όγκους ο σχηματισμός των αδένων και η παραγωγή βλέννας δεν είναι κυρίαρχα στοιχεία.

Μερικοί όγκοι χαρακτηρίζονται από κύτταρα δίκην "σφραγιστήρα δακτυλίου" στα οποία ένα μεγάλο κενοτόπιο βλέννας εκτοπίζει τον πυρήνα στην μια πλευρά του κυττάρου. Οι αναπλαστικοί όγκοι αποτελούνται μόνο από κύτταρα "σφραγιστήρα δακτυλίου" είναι σπάνιοι όγκοι, παρατηρούνται σε νεότερα άτομα και έχουν πολύ κακή πρόγνωση. Σε ένα ποσοστό 15% των όγκων παρατηρούνται μεγάλες λίμνες βλέννας, που περιέχουν διάσπαρτα συναθροίσεις κυττάρων του όγκου. Η βλέννα που αθροίζεται στο τοίχωμα προκαλεί διάσπαση της συνοχής των κυτταρικών στοιχείων του τοιχώματος του εντέρου, γι' αυτό και τα βλενώδη αδenoκαρκινώματα

επεκτείνονται πιο εύκολα και έχουν χειρότερη πρόγνωση. Οι βλεννώδεις (ή κολλοειδείς) όγκοι είναι πιο συχνοί σε περιπτώσεις κληρονομικού μη πολυποδιαστικού καρκίνου, ελκώδους κολίτιδας και καρκίνου που εμφανίζεται σε μικρή ηλικία. Ο σκίρος καρκίνος δεν είναι συχνός και χαρακτηρίζεται από αραιούς σχηματισμούς αδένων με έντονη δεσμοπλασία και ινώδη ιστό που περιβάλλει τους αδένες.

3.5.4 Σταδιοποίηση

Η σταδιοποίηση του ορθοκολικού καρκίνου αφορά στην εκτίμηση του βαθμού διήθησης ενός συγκεκριμένου καρκίνου. Γίνεται για διαγνωστικούς και ερευνητικούς σκοπούς, και για να καθοριστεί η καλύτερη μέθοδος θεραπείας. Τα συστήματα σταδιοποίησης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την έκταση της τοπικής διήθησης, το βαθμό της εμπλοκής των λεμφαδένων και το εάν υπάρχει απομακρυσμένη μετάσταση.

Η οριστική σταδιοποίηση μπορεί να γίνει μόνο μετά την χειρουργική επέμβαση και αφού έχει εκτιμηθεί η παθολογική εικόνα. Μια εξαίρεση στον κανόνα αυτό είναι μετά από κολonosκοπική πολυπεκτομή κακοήθους έμμισχου με ελάχιστη διήθηση. Η προεγχειρητική σταδιοποίηση των καρκίνων του ορθού μπορεί να γίνει με ενδοσκοπικό υπερηχογραφικό έλεγχο. Πρόσθετες εξετάσεις για την σταδιοποίηση της

μετάστασης περιλαμβάνουν Υπέρηχο κοιλίας, Υπολογιστική τομογραφία, Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων και άλλες απεικονιστικές εξετάσεις.

3.5.4.1 Σύστημα σταδιοποίησης *Dukes*

Η σταδιοποίηση κατά *Dukes* [235] με τις μεταγενέστερες τροποποιητικές προσθήκες διακρίνει τα εξής στάδια:

A – Ο όγκος διηθεί βλεννογόνιο ή/και υποβλεννογόνιο χιτώνα

B – Ο όγκος διηθεί όλες τις στοιβάδες. Διαπερνά το εντερικό τοίχωμα.

C – Προσβολή περιοχικών λεμφαδένων.

D – Απομακρυσμένες μεταστάσεις

3.5.4.2 Σύστημα *TNM*

Το πιο κοινό σύγχρονο σύστημα σταδιοποίησης είναι το σύστημα *TNM* αν και πολλοί χρησιμοποιούν ακόμη το παλαιότερο σύστημα *Dukes*. Το σύστημα *TNM* ταξινομεί τους όγκους λαμβάνοντας υπ' όψιν την έκταση, την προσβολή λεμφαδένων και την παρουσία μετάστασης:

T – Ο βαθμός διήθησης του τοιχώματος του εντέρου

T0- χωρίς ενδείξεις όγκου

Tis- καρκίνος *in situ* (βλεννογόνιος όγκος, αλλά χωρίς διήθηση)

T1 – διήθηση του υποβλεννογόνιου (εισβολή στην βασική μεμβράνη)

T2 – διήθηση εντός της μυϊκής στοιβάδας

T3 – διήθηση πέραν της μυϊκής στοιβάδας

T4 – Διαπερνά πλήρως το εντερικό τοίχωμα. Διήθηση άλλων οργάνων – ιστών.

N – Ο βαθμός λεμφαδενικής προσβολής

N0 – δεν εμπλέκονται λεμφαδένες

N 1 – προσβολή ενός έως και τριών λεμφαδένων

N2 – προσβολή τεσσάρων ή περισσότερων λεμφαδένων

M – Ο βαθμός μετάστασης

M0 – χωρίς μετάσταση

M 1 – παρουσία μεταστάσεων

3.6 Πολύποδες, γενετικές μεταβολές και καρκίνος του παχέος εντέρου

Οι μεταλλάξεις σε ειδικές αλληλουχίες DNA , που εμπλέκουν γονίδια όπως τα APC, K-ras και p53, οδηγούν σε ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση. Τα ποικίλα αίτια των μεταλλάξεων αυτών περιλαμβάνουν συγγενείς γενετικές ανωμαλίες, κάπνισμα, περιβαλλοντικές επιδράσεις

και συσχετίσεις με ιούς. Ο ακριβής λόγος για τον οποίο η πλούσια σε ίνες διαίτα ίσως προλαμβάνει τον ορθοκολικό καρκίνο παραμένει άγνωστος. Η χρόνια φλεγμονή πιθανόν προδιαθέτει τους ασθενείς για ανάπτυξη κακοήθειας.

Είναι παραδεκτό ότι ο καρκίνος παχέος –ορθού είναι το επιφανόμενο μιας πολυσταδιακής διεργασίας σε επίπεδο ιστολογικής αρχιτεκτονικής, η οποία υποκινείται από πολλαπλές μοριακές μεταβολές. Σύμφωνα με το μοντέλο αλληλουχίας αδενώματος – καρκινώματος, η ανάπτυξη πολυπόδων προηγείται της εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, καθιστώντας τους επιθηλιακούς νεοπλασματικούς πολύποδες προκαρκινικές βλάβες, που επάγουν την ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου. Πράγματι, μελέτες υποδεικνύουν ότι η ενδοσκοπική εκτομή πολυπόδων σε ευρείες πληθυσμιακές ομάδες μειώνει την αναμενόμενη συχνότητα ανάπτυξης καρκίνου του παχέος εντέρου [236].

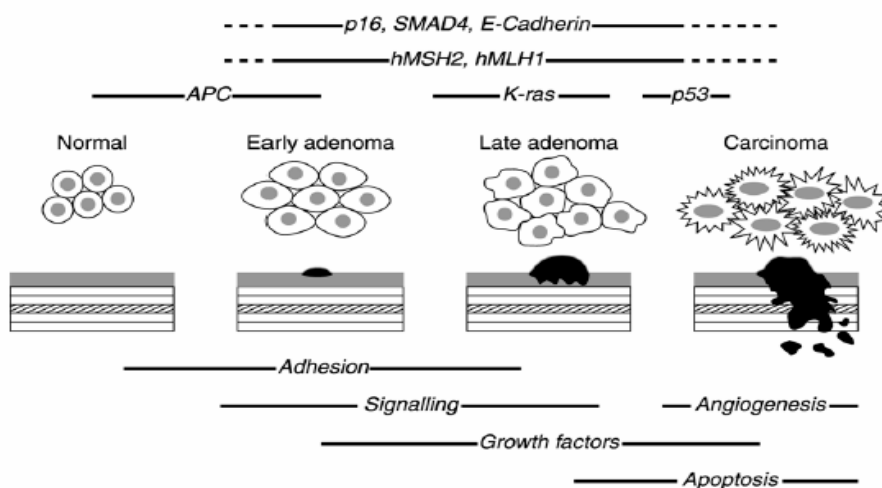
Η ηλικία αποτελεί βασικό παράγοντα αύξησης της επίπτωσης πολυπόδων [237] ενώ, σε αρκετές μελέτες, καταγράφεται η υψηλή συχνότητα ανεύρεσης πολυπόδων σε ηλικίες μεγαλύτερες των 60 ετών [238,239]. Μεγαλύτεροι πολύποδες καθώς και πολλαπλοί, με βαριά δυσπλασία, παρατηρούνται σε μεγαλύτερες ηλικίες [237]. Η πιθανότητα της κακοήθους εξαλλαγής των πολυπόδων σχετίζεται με τρία βασικά χαρακτηριστικά τους που είναι το μέγεθος, ο ιστολογικός τύπος και ο

βαθμός δυσπλασίας τους. Η εξέλιξη, από τους πολύ μικρούς πολύποδες σε αυτούς με μεγαλύτερο μέγεθος και βαθμό δυσπλασίας, σχετίζεται με την συνισταμένη επαγωγή πολλαπλών γενετικών μεταβολών.

Η ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου αποτελεί μία πολύπλοκη διαδικασία στην οποία εμπλέκονται γονιδιακές μεταλλάξεις των κυττάρων του επιθηλίου, ενεργοποίηση ογκογονιδίων και αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων [19].

Η απενεργοποίηση του γονιδίου APC (Adenomatous Polyposis Coli) θεωρείται ο φρουρός – φύλακας στη διαδικασία καρκινογένεσης [15]. Ανωμαλίες στη μεθυλίωση του DNA παρατηρείται στους όγκους του παχέος εντέρου όπως και σε μικρά αδενώματα χωρίς να έχει αποσαφηνιστεί ο ρόλος της. Η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων ras [240] συναντάται, κατά μεγάλο ποσοστό, σε ενδιάμεσου και όψιμου τύπου πολύποδες. Η απώλεια του γονιδίου DCC (deleted in colon cancer), παρατηρείται σε όψιμα στάδια της καρκινογένεσης [19]. Η αδρανοποίηση μέσω απάλειψης του p53, υφίσταται σε τελικά στάδια καρκινογένεσης. Ο ρόλος των μεταλλακτικών γονιδίων MMR, μια άλλη ομάδα γονιδίων που εμπλέκεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου [241] αλλά και επιπρόσθετες μεταλλάξεις, που είναι σημαντικές για την κακοήθη συμπεριφορά [242], είναι βήματα που επάγουν την καρκινογένεση (Εικόνα 4).

Εικόνα 4: Παράλληλο μοντέλο μοριακών και ιστοαρχιτεκτονικών γεγονότων κατά την εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Ο καρκίνος προκύπτει από την άθροιση γενετικών βλαβών.



Πηγή: βιβλιογραφική αναφορά 251

Σύμφωνα με το μοντέλο που προτάθηκε και εξελίχθηκε από τον Vogelstein υποδεικνύεται ότι αφού ανενεργοποιηθούν και τα δύο αλληλόμορφα του APC, θα προαχθεί, πιθανόν, η εμφάνιση ενός μικρού πολύποδα. Περαιτέρω γενετικές αλλοιώσεις μπορεί να πυροδοτήσουν την κλωνική εξέλιξη και το σχηματισμό αδενώματος τάξης I (πρώιμο αδένωμα). Μεταλλάξεις της ομάδας γονιδίων ras φαίνεται να προσδίδουν τη δυνατότητα σχηματισμού μεγαλύτερων αδενωμάτων τάξης II. Η άθροιση γενετικών μεταβολών σε γονίδια όπως το DCC, p53, των γονιδίων MMR και άλλων θα ευοδώσει, τελικά, τη δημιουργία αδενωμάτων τάξης III και του καρκινώματος [243].

4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο καταρράκτης μεταγωγής σήματος, Ras/Raf/MEK/ERK κινάσων καταλύει την επαγωγή μιτωγόνων σημάτων στον πυρήνα του κυττάρου, με αποτέλεσμα τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Μεταλλάξεις σε γονίδια του καταράκτη έχουν συσχετιστεί ισχυρά με την καρκινογένεση. Οι σημαντικότερες μεταλλάξεις που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα εντοπίζονται στα γονίδια ras. Πρόσφατα, νέες μεταλλάξεις με ογκογόνο δυναμικό εντοπίστηκαν στα γονίδια raf. Περιορισμένης έκτασης μελέτες, αναφέρουν ότι μεταλλάξεις του B-raf ανευρίσκονται σε κακοήθειες όπως το μελάνωμα, τον καρκίνο παχέος – ορθού και τα νεοπλάσματα των ωοθηκών, χαμηλού δυναμικού κακοήθειας.

Σημειακές μεταλλάξεις του B-raf γονιδίου επάγουν την ογκογόνο δράση του. Το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή υπερενεργών πρωτεϊνικών μορφών με επακόλουθο την ενεργοποίηση του καταρράκτη μεταγωγής σήματος χωρίς να απαιτείται, απαραίτητα, ενεργοποίηση από το ras.

Οι παραπάνω ενδείξεις ολοένα, ενδυναμώνουν το δυνητικό ρόλο του ογκογονιδίου B-raf στη διαδικασία της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου, είτε μέσω αυτόνομης δράσης είτε μέσω αλληλεπίδρασης με το ras. Το B-raf, ίσως, είναι προτιμητέος στόχος μετάλλαξης αφού κωδικοποιεί πρωτεΐνη που χαρακτηρίζεται από υψηλότερη βασική δραστηριότητα κινάσης σε σχέση με το raf1. Η πλέον συνήθης μετάλλαξη

του B-raf, στον καρκίνο παχέος-ορθού, είναι η V600E (εξώνιο 15) που χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση βαλίνης με γλουταμικό οξύ, στη θέση 600 (προηγουμένως βιβλιογραφικά αναφερόμενη σαν V599E), της πρωτεϊνικής μορφής που κωδικοποιεί και φαίνεται να συναντάται πάνω από το 50% των μεταλλάξεων που παρατηρήθηκαν ενώ σε καμία περίπτωση δε συσχετίστηκε με συνύπαρξη μεταλλάξεων K-ras.

Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της συνεισφοράς των ογκογονικών μεταλλάξεων του B-raf στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου, της δυναμικής τους σχέσης με μεταλλάξεις του K-ras στον ίδιο πληθυσμό καρκινικών δειγμάτων καθώς και η ανάδειξη πιθανών συσχετίσεων με τα κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων που εξετάστηκαν. Τα αποτελέσματα της μελέτης αναμένεται να βοηθήσουν στην παραπέρα κατανόηση του ρόλου των γονιδίων raf στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου.

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Υλικό από ασθενείς

Για την παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα, χειρουργικώς, εξαιρεθέντων ιστοτεμαχίων από καρκίνο παχέος εντέρου - ορθού. Τα δείγματα συλλέχθηκαν στην Α΄ Κλινική Γενικής Χειρουργικής του Λαϊκού Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών. Κάθε δείγμα εξετάστηκε παθολογοανατομικά για την επιβεβαίωση της ιστολογίας του (αδενοκαρκινώματα). Κατεγράφησαν ατομικό και οικογενειακό ιστορικό των ασθενών, δημογραφικά και κλινικά στοιχεία. Μείζον κριτήριο αποτέλεσε η σποραδικότητα των όγκων. Δείγματα ιστών, τελικά, από 61 άτομα πληρούσαν κριτήρια υψηλής καταλληλότητας. Όλοι οι ασθενείς από τους οποίους προήλθαν τα δείγματα ήταν Έλληνες, Λευκοί, με αρνητικό προηγούμενο ατομικό και οικογενειακό ιστορικό νεοπλασμάτων παχέος εντέρου. Η μέση ηλικία ήταν 67.1 έτη (Standard Deviation: 10.2 έτη). Οι ιστοί διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία μείον 80°C, στο εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

5.2 Εκχύλιση DNA από τους ιστούς

Το DNA απομονώθηκε σύμφωνα με γνωστά πρωτόκολλα απομόνωσης DNA από συμπαγείς ιστούς. Ο ιστός τεμαχίζεται και ομογενοποιείται σε διάλυμα λύσης. Ο ομογενοποιημένος ιστός επωάζεται σε θερμοκρασία 60°C για διάστημα 36-48 ωρών, προσθέτοντας ανά 12ωρο πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml. Ακολουθεί εκχύλιση των νουκλεϊνικών οξέων (DNA και RNA) με φαινόλη-χλωροφόρμιο, που συντελεί ταυτόχρονα στην απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης K. Στην υδατική φάση που παραμένει προστίθεται 1/20 του όγκου 5M NaCl και 2.5 όγκοι ψυχρής (-20°C) απόλυτης αιθανόλης για την κατακρήμνιση του DNA. Το DNA επανακτάται σαν ίζημα με φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 15 min στους 4°C, πλένεται με ψυχρή αιθανόλη 70% για απομάκρυνση των αλάτων και αφήνεται μετά να στεγνώσει. Επαναδιαλύεται με 30-50ml δισαπεσταγμένου-αποστειρωμένου ύδατος και διατηρείται σε θερμοκρασία 4°C, ή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στους -20°C. Η ποσότητα και καθαρότητα του DNA μπορεί να υπολογιστεί με φωτομέτρηση στα 260nm και στα 280nm [244], ή αδρά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (όσον αφορά μόνο την ποσότητα του DNA). Διάλυμα λύσης: 10 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% SDS

5.2.1 Τεχνική εκχύλισης με φαινόλη-χλωροφόρμιο

Το υδατικό διάλυμα αναμιγνύεται με ίσο όγκο φαινόλης, φυγοκεντρείται στις 13.000 στροφές για 1 min που το διαχωρίζει σε υδατική και οργανική φάση. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε καινούργιο erpendorf και επανεκχυλίζεται με ίσο όγκο φαινόλης/χλωροφορμίου 1:1. Η διαδικασία της φυγοκέντρωσης επαναλαμβάνεται και η υδατική φάση επανεκχυλίζεται με ίσο όγκο χλωροφορμίου. Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη και NaCl, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο [244].

5.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Ο Mullis και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μια τεχνική *in vitro* πολλαπλασιασμού του DNA το 1985 [245]. Η μέθοδος αυτή που είναι γνωστή ως αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) επιτρέπει την επιλεκτική παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA που υπάρχει σε ένα σύνθετο μείγμα νουκλεϊνικών οξέων, κατά τη διάρκεια μίας απλής ενζυματικής αντίδρασης.

Σε συνδυασμό με την ανακάλυψη θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών η τεχνική επιτρέπει την εύκολη και γρήγορη παραγωγή αμιγών τμημάτων DNA σε μεγάλες ποσότητες με ελάχιστο κόστος και χρόνο. Τα βασικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα της PCR αντίδρασης είναι: ευαισθησία, επιλεκτικότητα και ταχύτητα [246-250].

Η ελάχιστη ποσότητα που απαιτείται από το αρχικό υλικό DNA δεν είναι απαραίτητο να έχει την υψηλή καθαρότητα και ακεραιότητα που απαιτούνται για άλλες τεχνικές, ενώ οι πηγές προέλευσης του δύνανται να ποικίλουν (νωπός ιστός, σωματικά υγρά, μονιμοποιημένοι ιστοί και άλλα). Μοναδική προϋπόθεση είναι να υπάρχει τουλάχιστον ένα ακέραιο τμήμα DNA, το οποίο να εμπεριέχει την περιοχή που αναζητείται για ενίσχυση.

5.3.1 Η βασική αρχή λειτουργίας του PCR

Η αντίδραση PCR είναι μια χημική περισσότερο παρά βιολογική μέθοδος για την δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε σχέση με άλλες αλληλουχίες νουκλεϊνικών οξέων, οι οποίες υπάρχουν στο μείγμα της αντίδρασης [245,248]. Για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA, ή cDNA μετά από αντίστροφη μεταγραφή μίας αλληλουχίας RNA, απαιτείται η γνώση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε μικρή έκταση γύρω από το τμήμα που αποτελεί τον στόχο για ενίσχυση. Η γνώση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων στην περιοχή στόχο, αποτελεί την βάση για τον σχεδιασμό και κατασκευή δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών αλυσίδων, οι οποίες χρησιμεύουν ως εκκινητές (primers) στην αντίδραση πολυμερισμού. Το μήκος (συνήθως 20-30 βάσεις) και η αλληλουχία των εκκινητών εξασφαλίζει στατιστικά ότι οι εκκινητές έχουν ελάχιστη πιθανότητα υβριδισμού με άλλες περιοχές του γονιδιώματος, εκτός από εκείνες που έχουν καθοριστεί γύρω από το επιλεγμένο τμήμα DNA.

Η επανάληψη θερμικών κύκλων που αποτελούνται από αυστηρά επιλεγμένα και καθορισμένα στάδια αποτελεί τη βασική αρχή για την εκτέλεση της αντίδρασης PCR. Ο κάθε κύκλος αρχίζει με ισχυρή θερμική αποδιάταξη (95°C), η οποία καθιστά το δίκλωνο DNA μονόκλωνο. Στη συνέχεια ακολουθεί ένα στάδιο με χαμηλότερη θερμοκρασία (37-70°C), κατά το οποίο οι εκκινητές υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές τους περιοχές στους αντίστοιχους μονούς κλώνους DNA. Κάθε εκκινητής υβριδίζεται με τον συμπληρωματικό του κλώνο αντίστοιχα,

έχοντας το 3'-OH άκρο του στραμμένο το ένα προς το άλλο. Τελικά κάθε εκκινητής επεκτείνεται με πολυμερισμό κατά μήκος του τμήματος DNA από μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση σε τελική θερμοκρασία 72°C. Οι κύκλοι των τριών φάσεων επαναλαμβάνονται αρκετές φορές μέχρι να συσσωρευτεί ικανοποιητική ποσότητα προϊόντων PCR. Το προϊόν PCR που παράγεται από μία επιτυχημένη αντίδραση, αποτελείται εξ' ολοκλήρου από μόρια τμημάτων DNA με μήκος ίσο με το άθροισμα του μήκους των δύο ολιγονουκλεοτιδίων και το μήκος του DNA τμήματος το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των θέσεων των δύο εκκινητών.

Η επιτυχής έκβαση της PCR αντίδρασης εξαρτάται από την επιτυχή επιλογή των εξής στοιχείων:

- τη σωστή επιλογή του μεγέθους του τμήματος DNA στόχου (βέλτιστο μεταξύ 100-1000),
- το σχεδιασμό και την κατασκευή συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων τέτοιων ώστε να εξασφαλίζουν την εκλεκτική επιλογή και ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος DNA,
- την κατάλληλη επιλογή μίας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης και της συγκέντρωσης των νουκλεοτιδίων (dNTPs) που απαιτούνται κατά την διάρκεια του πολυμερισμού, όπως και της συγκέντρωσης ιόντων Mg⁺⁺ που απαιτούνται για τη δράση της πολυμεράσης,

- το σχεδιασμό του θερμικού προφίλ των κύκλων, το οποίο θα εξασφαλίσει τις συνθήκες για την επιλεκτικότητα των εκκινητών και την επιτυχή συσσώρευση ικανοποιητικού προϊόντος PCR.

Η μέση απόδοση μιας σειράς κύκλων PCR δύναται να περιγραφεί με την ακόλουθη εξίσωση: $N=n(1+e)^c$, όπου N συμβολίζει την τελική ποσότητα του προϊόντος, n συμβολίζει την αρχική ποσότητα του υποστρώματος, e συμβολίζει την απόδοση της αντίδρασης και c συμβολίζει τον αριθμό των κύκλων PCR.

Η συσσώρευση του προϊόντος PCR γίνεται με εκθετικό τρόπο, οπότε μπορεί να εκτιμηθεί και η απόδοση της ενίσχυσης. Όταν όμως η συγκέντρωση προϊόντος προσεγγίσει την 10^{-7} M, τότε παύει πλέον η παραγωγή και η αντίδραση μπαίνει σε φάση κορεσμού [245,248].

Η χρήση θερμοανθεκτικών πολυμερασών και η κατασκευή θερμικών κυκλοποιητών έδωσε την δυνατότητα αυτοματοποίησης και ταυτόχρονης ανάπτυξης πολλαπλών δειγμάτων σε σύντομο χρόνο και με ελάχιστο κόστος.

5.3.2 Συνθήκες αντιδράσεων PCR και εκκινητές

Μισό έως 2 μg του εκχυλίσματος DNA από κάθε δείγμα υφίσταται ενζυμική ενίσχυση σε τελικό όγκο 50 μl. Η αντίδραση περιλαμβάνει 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης, 150 μM από κάθε dNTP, 0.5 μM από κάθε

εκκινητή και 1.25 U πολυμεράσης. Το μίγμα αρχικά επωάζεται για 1 min στους 96°C και ακολουθούν 35 -37 κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:

B-raf: για την ενίσχυση της περιοχής του εξωνίου 15 και την ανίχνευση μεταλλάξεων σε αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές forward: 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3', και reverse: 5'-GGCCAAAATTTAATCAGTGGA-3' (MWG-Biotech AG, Germany). Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι οι εξής: 95°C για 55 sec, 55°C για 45sec και 72°C για 50 sec. 10 μl από το κάθε προϊόν της PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση της προς έλεγχο περιοχής των 224 bp.

K-ras: για την ενίσχυση της περιοχής του κωδικονίου 12 και την ανίχνευση μεταλλάξεων σε αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές forward: 5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3', και reverse: 5'-TCAAAGAATGGTCCTGGACC-3'. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι οι εξής: 95°C για 55 sec, 58°C για 45sec και 72°C για 50 sec. 10 μl από το κάθε προϊόν της PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση της προς έλεγχο περιοχής των 157 bp.

Χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Tag πολυμεράσης (Advanced Biotechnologies): 20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris-HCl pH 9.0, 0.01%

(w/v) Tween 20. Το $MgCl_2$ προστίθεται στη συνέχεια σε τελική συγκέντρωση 2.5-3.0 mM.

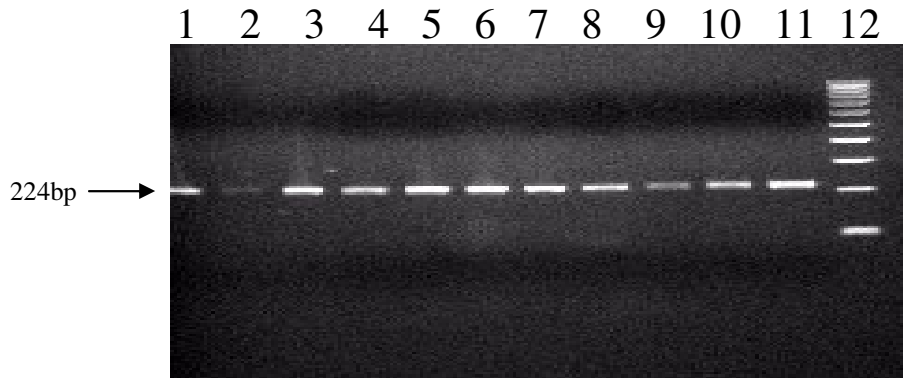
Οι πρότυπες αλληλουχίες των γονιδίων αποκτήθηκαν μέσω Internet, από την διεθνή βάση αλληλουχιών GenBank-EMBL και το δικτυακό τόπο www.ensembl.org.

5.4 Ηλεκτροφόρηση του DNA και των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

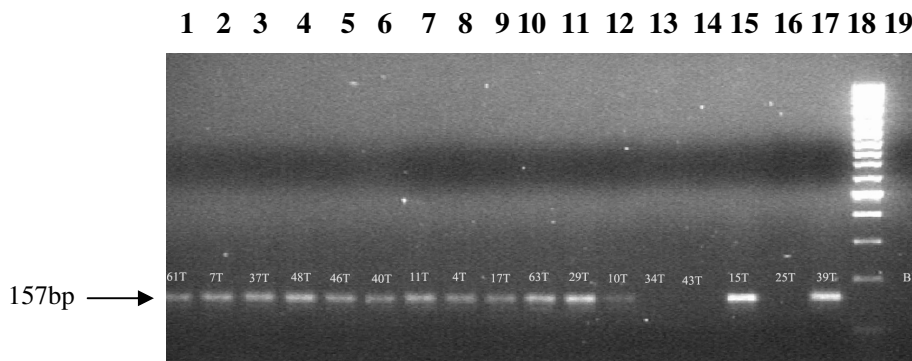
Η τελική συγκέντρωση αγαρόζης στο πήκτωμα αποφασίζεται ανάλογα με την ζητούμενη διακριτική ικανότητα του συγκεκριμένου πηκτώματος [244]. Η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης διαλύεται σε διάλυμα 0.5 X TBE και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για 5 min περίπου. Αφήνεται να κρυώσει έως τους 60°C, οπότε προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε τελική συγκέντρωση 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Αφού στερεοποιηθεί το πήκτωμα αφαιρείται η "κτένα" που δημιουργεί τα "πηγάδια" για το φόρτωμα των προϊόντων PCR, ή του DNA, και το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 0.5 X TBE.

Τα δείγματα φορτώνονται στα πηγάδια αφού αναμιχθούν με 1/10 του όγκου διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) και εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές αν εκτεθεί το πήκτωμα σε υπεριώδη ακτινοβολία (Εικόνα 5 και 6).

- Διάλυμα TBE: 10.8 gr/l Tris, 5.5 gr/l βορικό οξύ, 0.002 M EDTA.
- Διάλυμα φόρτωσης (loading buffer): 0.25% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% w/v κυανό του ξυλένιου, 25% v/v φικόλη σε 1X TBE.



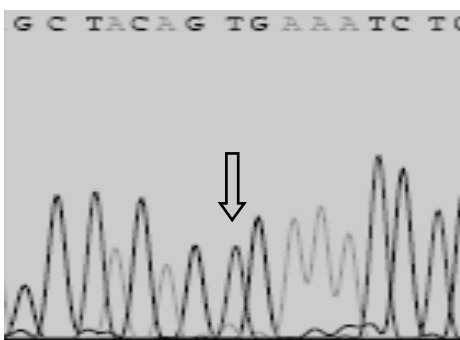
Εικόνα 5: Στήλες 1-11 B-Raf PCR product. Στήλη 12 ladder 100 bp.



Εικόνα 6: K-ras PCR product (στήλες 1-17, με εξαίρεση τη 13,14,16 όπου το DNA των αντίστοιχων δειγμάτων δεν επετεύχθει πολυμερισμός). Στήλη 18 ladder 100 bp. Στήλη 19 κενή DNA ('τυφλό' control).

5.5 Άμεσος έλεγχος της αλληλουχίας του εξωνίου 15 του B-raf και ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP) για το K-ras

Άμεσος έλεγχος των αλληλουχιών του εξωνίου 15 του B-raf, σε διπλή κατεύθυνση, πραγματοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα με αυτόματο αναλυτή, σε κέντρο του εξωτερικού [BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems), ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer] αφού πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των PCR προϊόντων (QIAquick PCR Purification Kit /Qiagen, Valencia, CA). Οι αλληλουχίες αρχικά εξετάστηκαν εμπειρικά (δευτερεύοντα επάρματα ή μη τυπικά σήματα υποστρώματος), (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Το βέλος δείχνει το σημείο που αντιστοιχεί στην 1799 T (wt) νουκλεοτιδική θέση κατά την άμεση ανίχνευση της ακολουθίας του εξωνίου 15 του B-raf PCR προϊόντος.

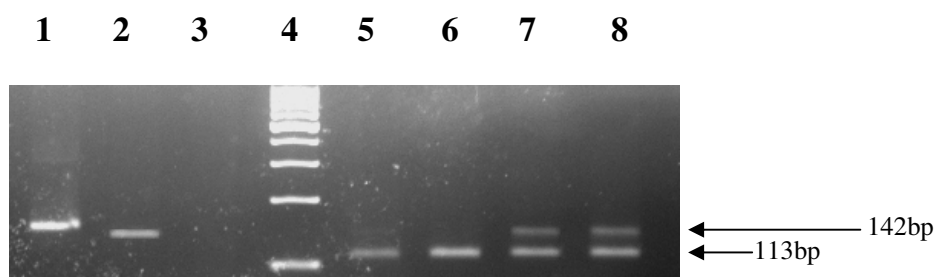
Ακολούθως, εξέταση όλων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας τις αλληλουχίες με την αντίστοιχη πρότυπη αλληλουχία του B-raf (wild-type) που έχει καταχωρηθεί στη διεθνή βάση δεδομένων www.ensembl.org.

Η τεχνική της ανάλυσης πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (restriction fragment length polymorphism ή RFLP) στηρίζεται

στην χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών. Αυτές είναι ένζυμα που το κάθε ένα αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων στο DNA και με επώαση σε κατάλληλη θερμοκρασία "κόβει" το DNA σε συγκεκριμένη θέση. Στην χρήση αυτής της μεθόδου στηρίζεται η ανίχνευση των σημειακών μεταλλάξεων. Το ένζυμο και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν έχουν ως εξής:

για την εύρεση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του K-ras έγινε εισαγωγή μίας μη ομόλογης βάσης (mismatch) στους εκκινητές με αποτέλεσμα την δημιουργία δύο θέσεων αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *MvaI*, (Roche Diagnostics GmbH, Germany) από τις οποίες η μία περιλαμβάνει το κωδικόνιο 12, ενώ η άλλη λειτουργεί ως "μάρτυρας". Με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η λανθασμένη εκτίμηση μίας ατελούς πέψης και η εύρεση ψευδών μεταλλάξεων. Αυτό έγινε γιατί δεν υπάρχουν ενδογενώς θέσεις αναγνώρισης από άλλες ενδονουκλεάσες που να περιλαμβάνουν το κωδικόνιο 12, με αποτέλεσμα να πρέπει να δημιουργηθούν τεχνητά. Ο εκκινητής που βρίσκεται στο 5' άκρο (K5') έχει ενσωματωμένο ένα κατάλοιπο C αντί για G στην πρώτη θέση του κωδικονίου 11, δημιουργώντας έτσι μια θέση αναγνώρισης για το *MvaI* (CCTGG), η οποία περιλαμβάνει τα δύο πρώτα νουκλεοτίδια του κωδικονίου 12 (GGT). Σημειακή μετάλλαξη σε μία από τις δύο αυτές θέσεις καταστρέφει την θέση αναγνώρισης του *MvaI*, ενώ σημειακή μετάλλαξη στο τρίτο νουκλεοτίδιο, το οποίο δεν ελέγχεται με το συγκεκριμένο ένζυμο, είναι μετάλλαξη "χωρίς νόημα" (non sense). Αυτό συμβαίνει γιατί τα κωδικόνια: GGA, GGC, GGT και GGG

κωδικοποιούν όλα για το αμινοξύ γλυκίνη (Gly). Επιπρόσθετα, DNA από την καρκινική κυτταρική σειρά SW480 φέρουσα την ομόζυγη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του K-ras χρησιμοποιήθηκε ως θετικό σημείο αναφοράς και ελέγχου, (Εικόνα 8 και 9). Ακολούθησε τυχαιοποιημένος έλεγχος επιβεβαίωσης K-ras θετικών δειγμάτων με άμεσο έλεγχο ακολουθίας του κωδικονίου 12. Μέρος των προϊόντων PCR (10 µl) υφίσταται πέψη με 30 U *Mva*I στους 37°C για 12 ώρες, οπότε προκύπτουν διαφορετικού μήκους τμήματα του DNA για το φυσιολογικό και το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Τα προϊόντα της πέψης αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης 3% (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ανάλυσης προϊόντων RFLP του K-ras σε αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου. Η ανάλυση των RFLP έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης. Στη στήλη 1 διακρίνεται προϊόν PCR που δεν έχει υποστεί πέψη με ένζυμο περιορισμού (157 bp). Στη στήλη 2 διακρίνεται προϊόν PCR SW480 (positive control) που έχει υποστεί πέψη με ένζυμο περιορισμού (142 bp), ομόζυγα μεταλλαγμένο στο K-ras κωδικόνιο 12. Στήλη 3 κενή DNA (‘τυφλό’ control). Στήλη 4 ladder 100 bp. Στις στήλες 5, 6 διακρίνονται φυσιολογικά δείγματα (wt: 113 bp), ενώ στις στήλες 7,8 μεταλλαγμένα (Mt:113 bp/142 bp). bp: ζεύγη βάσεων, Mt: μεταλλαγμένο, wt: φυσιολογικό (wild type).

5.6 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 14.0 (για Windows). Μεταβλητές όπως ηλικιακές ομάδες, φύλο, εντόπιση όγκου, στάδιο κατά Dukes, βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης, βλεννώδες πρότυπο καρκινωμάτων, αναλύθηκαν. Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας για τις δοκιμασίες θεωρήθηκε το $\alpha=0.05$.

5.7 Υλικά και προέλευσης τους

Αγαρόζη (Agarose) - Life Technologies (GIBCO-BRL)

Αιθανόλη (Ethanol) – BDH

Αιθυλο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA) - BOH

Βορικό οξύ (Boric acid) - BDH

Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium bromide) - Sigma

Γλυκερόλη (Glycerol) - Life Technologies (GIBCO-BRL)

DNA δείκτες μοριακού βάρους:

1 Kb DNA Ladder - Life Technologies (GIBCO-BRL)

pUC19/*Msp*I

dNTPs - Boehringer Mannheim, New England Biolabs

Ένζυμο περιορισμού (Restriction enzyme):

*Mva*I, Roche Diagnostics GmbH, Germany

Θεικό αμμώνιο (Ammonium sulphate) - Fluka

Κυανούν της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue) - Sigma

Κυανούν του ξυλένιου (Xylene blue) - Sigma

Πρωτεΐνάση-K - Sigma

SDS (Sodium dodecyl sulphate) - BDH

Tag polymerase - Perkin Elmer Cetus, Advanced Biotechnologies, NBL

Tris base – BDH

TRITON X-100-Sigma

Tween 20 - Sigma

Υδροξείδιο του νατρίου - BOH

Υδροχλωρικό οξύ - BOH

Υπεροξείδιο του υδρογόνου - BOH

Φαινόλη - BOH

Φίλτρα με διάμετρο πόρου 0.22 και 0.45 μm - Millipore

Φορμαλδεύδη - BOH

Φορμαμίδιο - BOH

Χλωριούχο μαγνήσιο - Fluka

Χλωριούχο νάτριο - Fluka

Χλωροφόρμιο - Fluka

Εικόνα 9: Αλληλουχία γονιδίου K-ras που περιέχει το φυσιολογικό κωδικόνιο 12

5' ATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGC....ATATTACTGGTGCAGGACCATTCTTTGATACAGA 3'

5' ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT 3'

3' CCAGGTCCTGGTAAGAAACT 5'

K5' εκκινητής (6410-6439)

K3' εκκινητής (6547-6566)

Ενίσχυση με PCR



5' ATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCTGGTGGC 3'5' ATATTACTGGTCCAGGACCATTCTTTGA 3'

Προϊόν PCR (157 bp)

Πέψη με *Mva* I



5' ATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACC 3'

5' TGGTGGC....ATATTACTGGTCC 3'

5' AGGACCATTCTTTGA 3'

29 bp

113 bp (φυσιολογικό)

15 bp

142 bp (μεταλλαγμένο)

Προϊόντα πέψης

Θέση περιορισμού του *Mva* I: CC*(A/T)GG

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε άμεσος προσδιορισμός της αλληλουχίας του εξωνίου 15 του γονιδίου B-raf σε 61 σποραδικά αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου - ορθού. Βρήκαμε ότι η κωδικοποιούσα αλληλουχία του εξωνίου 15 ήταν πλήρως διατηρημένη σε όλα τα δείγματα. Δεν ανιχνεύθηκε καμιά νουκλεοτιδική αλλαγή που θα μπορούσε να τροποποιήσει την αλληλουχία των αμινοξέων στην πρωτεΐνη B-raf.

Η μοριακή ανάλυση για την ανίχνευση των μεταλλάξεων του K-ras στο κωδικόνιο 12 κατέστη δυνατή για 58 αδενοκαρκινώματα. Δεκαεπτά περιπτώσεις (17/58) ήταν θετικές για τις μεταλλάξεις του K-ras. Όλες οι μεταλλάξεις του K-ras εντοπίστηκαν σε ετερόζυγη κατάσταση. Μεταξύ των 17 όγκων με μεταλλάξεις του κωδικονίου 12 του K-ras, 12 ασθενείς ήταν άνδρες (μεταξύ των 35 ανδρών που εξετάστηκαν) και 5 ήταν γυναίκες (μεταξύ των 23 περιστατικών γυναικών που εξετάστηκαν). Οι 15 από τους 39 ασθενείς που ήταν ηλικίας 70 ετών και κάτω και 2 από τους 19 ασθενείς που ήταν άνω των 70 ετών ήταν φορείς μεταλλάξεων του κωδικονίου 12 του K-ras ($p=0.028$, Pearson's chi-square test) (Πίνακας 5). Έντεκα από τους 24 ασθενείς στην ηλικιακή ομάδα από 61 έως 70 ετών ανέπτυξαν όγκους με μεταλλάξεις στο K-ras ενώ 4 από τους 15 ασθενείς ηλικίας μικρότερης ή ίσης με 60 χρόνια και 2 από τους 19 ασθενείς ηλικίας άνω των 70 ετών παρουσίασαν τις εν λόγω

Πίνακας 5: K-ras κωδικόνιο 12 μεταλλάξεις και ασθενείς ≤ ή >70 έτη.

ΗΛΙΚΙΑ	K-ras κωδικόνιο 12 μεταλλάξεις	
	ΘΕΤΙΚΑ n (%)	ΑΡΝΗΤΙΚΑ n (%)
≤70 έτη	15 (38.5)	24 (61.5)
> 70 έτη	2 (10.5)	17 (89.5)
<i>P</i>	0.028	

μεταλλάξεις ($p=0.040$, Pearson's chi-square test) (Πίνακας 6). Οι άνδρες μεταξύ 61 και 70 ετών ήταν συχνότερα φορείς των μεταλλάξεων K-ras σε σύγκριση με νεότερους ή μεγαλύτερους ασθενείς, με οριακό επίπεδο στατιστικής μη σημαντικότητας ($p=0.047$, Pearson chi-square test και $p=0.059$, Fisher exact test) (Πίνακας 7). Οκτώ όγκοι με μεταλλάξεις του K-ras εντοπίζονταν στο εγγύς κόλον (τυφλό, ανιόν και εγκάρσιο) μεταξύ 21 συνολικά όγκων της περιοχής αυτής και 9 όγκοι με μεταλλάξεις του K-ras εντοπίζονταν στο άπω κόλον (κατιόν ή σιγμοειδές και ορθό) σε σύνολο 37 όγκων της περιοχής αυτής. Ένας όγκος θετικός για την μετάλλαξη του K-ras ήταν σταδίου A κατά Dukes (από τους 5 όγκους σταδίου A κατά Dukes που εξετάστηκαν), 4 ήταν σταδίου B κατά Dukes (από τους 14 όγκους σταδίου B κατά Dukes που εξετάστηκαν), 9 ήταν σταδίου C κατά Dukes (από τους 26 όγκους σταδίου C κατά Dukes που εξετάστηκαν) και 3 ήταν σταδίου D Dukes (από τους 11 όγκους σταδίου D κατά Dukes που εξετάστηκαν).

Πίνακας 6: K-ras κωδικόνιο 12 μεταλλάξεις και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου που μελετήθηκαν

ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ ΟΡΘΟΥ	ΣΥΝΟΛΟ	K-RAS ΚΩΔΙΚΟΝΙΟ 12 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ		P
		ΘΕΤΙΚΑ N(%)	ΑΡΝΗΤΙΚΑ N(%)	
ΗΛΙΚΙΑ				
≤ 60 ΕΤΗ	15	4 (26.7)	11 (73.3)	0.040
61-70 ΕΤΗ	24	11 (45.8)	13 (54.2)	
> 70 ΕΤΗ	19	2 (10.5)	17 (89.5)	
ΦΥΛΟ				
ΑΝΔΡΕΣ	35	12 (34.3)	23 (65.7)	NS*
ΓΥΝΑΙΚΕΣ	23	5 (21.7)	17 (78.3)	
ΕΝΤΟΠΙΣΗ				
ΕΓΓΥΣ ΚΟΛΟΝ	21	8 (38.1)	13 (61.9)	NS*
ΑΠΩ ΚΟΛΟΝ	37	9 (24.3)	28 (75.7)	
ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ¹				
DUKES A	5	1 (20.0)	4 (80.0)	NS*
DUKES B	14	4 (28.6)	10 (71.4)	
DUKES C	26	9 (34.6)	17 (65.4)	
DUKES D	11	3 (27.3)	8 (72.7)	
ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ²				
ΚΑΛΗ/ΜΕΤΡΙΑ	43	12 (27.9)	31(72.1)	NS*
ΦΤΩΧΗ	8	3 (37.5)	5 (62.5)	
ΒΛΕΝΝΩΔΕΣ ΠΡΟΤΥΠΟ ³				
ΟΧΙ	39	10 (25.6)	29 (74.4)	NS*
ΝΑΙ	5	2 (40.0)	3 (60.0)	

*NS: μη στατιστικώς σημαντική αξία. **1:** Διαθέσιμα στοιχεία για 56 περιπτώσεις, **2:** Διαθέσιμα στοιχεία για 51 περιπτώσεις, **3:** Διαθέσιμα στοιχεία για 44 περιπτώσεις.

Πίνακας 7: K-ras κωδικόνιο 12 μεταλλάξεις σε άνδρες και γυναίκες διαφορετικών ηλικιακών ομάδων

ΗΛΙΚΙΑΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΚΑΙ K-RAS ΚΩΔΙΚΟΝΙΟΥ 12 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	ΣΥΝΟΛΟ (n)	ΦΥΛΟ	
		Γυναίκες (n)	Άνδρες (n)
≤ 60 έτη			
ΦΕΡΟΝΤΕΣ	4	2	2
ΜΗ ΦΕΡΟΝΤΕΣ	11	5	6
61-70 έτη			
ΦΕΡΟΝΤΕΣ	11	1	10*
ΜΗ ΦΕΡΟΝΤΕΣ	13	6	7
> 70 έτη			
ΦΕΡΟΝΤΕΣ	2	2	0
ΜΗ ΦΕΡΟΝΤΕΣ	17	7	10

* $P=0.047$ (Pearson chi-square test) και $P=0.059$ (Fisher's

Exact test)

Το στάδιο του όγκου δεν καθορίστηκε σε 2 περιπτώσεις. Στοιχεία σχετικά με τον ιστολογικό τύπο ήταν διαθέσιμα σε 51 περιπτώσεις και για το πρότυπο βλεννώδους χαρακτήρα (mucinous status) σε 44 περιπτώσεις. Συνολικά, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις μεταλλάξεις του K-ras και στην θέση του όγκου, το στάδιο, τον βαθμό διαφοροποίησης και το πρότυπο βλεννώδους χαρακτήρα (Πίνακας 6).

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η καρκινογένεση του παχέος εντέρου και του ορθού αναπτύσσεται μέσω μιας διαδικασίας πολλαπλών γενετικών και επιγενετικών γεγονότων που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ογκογονιδίων και την απενεργοποίηση γονιδίων κατασταλικών του όγκου. Γεγονότα όπως μεταλλάξεις, απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH), επιγενετική αδράνεια της μεταγραφής γονιδίων με την υπερμεθυλίωση του εκκινητή και γονιδιακή ενίσχυση επιτρέπουν την διαφυγή από τους ισχυρούς περιορισμούς που ελέγχουν τα φυσιολογικά κύτταρα [251,252].

Η οικογένεια των γονιδίων ras (K-ras, H-ras, and N-ras) κωδικοποιούν πρωτεΐνες συνδέουσες GTP. Από πρώιμες παρατηρήσεις βρέθηκε ότι αυτά τα πρωτεϊνικά μόρια έχουν επίδραση στον κυτταρικό μετασχηματισμό και στην ογκογένεση. Υπάρχει συσσώρευση ενδείξεων που υποστηρίζουν την εμπλοκή των ενεργοποιημένων γονιδίων ras σε ποικίλες κακοήθειες του ανθρώπου [253,254,255]. Τα γονίδια ras συμβάλλουν στην ογκογένεση μέσω συσσώρευσης μεταλλάξεων που προκαλούν αλλαγές στην ενεργότητα GTPάσης της πρωτεΐνης [256]. Η σημειακή μετάλλαξη του γονιδίου K-ras στο κωδικόνιο 12 είναι ένα πρώιμο γεγονός στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου και του ορθού, που κατά κύριο λόγο συμβαίνει κατά την μετατροπή ενός μικρού σε ενδιάμεσου μεγέθους αδένωμα [19,256].

Η οικογένεια των Raf πρωτεϊνών είναι κινάσες Ras ελεγχόμενες που εμπλέκονται στις αποκρίσεις της κυτταρικής ανάπτυξης. Ο καταρράκτης της Ras/Raf/MEK/MAP κινάσης μεταβιβάζει τα σήματα από την κυτταρική επιφάνεια στον πυρήνα [105,257]. Τρία γνωστά γονίδια raf (B-raf, A-raf1 και C-raf), κωδικοποιούν κυτταροπλασματικές σερίνη/θρεονίνη κινάσες και η ρύθμισή τους εξαρτάται από την σύνδεση με την Ras [105,258]. Οι ενεργοποιούσες μεταλλάξεις του B-raf έχουν αναφερθεί σε υψηλό ποσοστό στα μελανώματα του δέρματος και σε μικρότερη συχνότητα σε ποικίλους άλλους τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του παχέος εντέρου -ορθού [131,259]. Οι τρέχουσες ενδείξεις υποδηλώνουν ότι οι αναγνωρισμένες μεταλλάξεις του γονιδίου B-raf σημειώνονται εντός της περιοχής της κινάσης [131]. Η πιο συχνή μετάλλαξη του B-raf είναι μια απλή αντικατάσταση της T σε A στο εξόνιο 15 στην νουκλεοτιδική θέση 1799 (1799T/A), προηγούμενα ονομασθείσα T1796A [131,132,260]. Η μετάλλαξη αυτή μετατρέπει ένα υπόλλειμα βαλίνης σε γλουταμικό οξύ (V600E) στην θέση 600, που έχει αναφερθεί προηγούμενα ως V599E [131,132,260]. Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες B-Raf έχουν αυξημένη ενεργότητα κινάσης και είναι ικανές να μετασχηματίζουν τα κύτταρα NIH3T3 ανεξάρτητα από την λειτουργία Ras. Επιπρόσθετα, οι μεταλλάξεις του B-raf όπως η V600E, περιγράφηκαν μόνο σε K-ras αρνητικά καρκινώματα παχέος εντέρου, υποδηλώνοντας ότι οι ενεργοποιούσες B-raf/K-ras μεταλλάξεις πιθανόν να

αποτελούν εναλλακτικά γεγονότα στον καρκίνο του παχέος εντέρου [261].

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήσαμε ανάλυση των μεταλλάξεων του εξωνίου 15 B-raf και της μετάλλαξης του κωδικονίου 12 του γονιδίου K-ras σε ορθοκολικά καρκινώματα Ελλήνων ασθενών για να εκτιμηθεί ο ρόλος των πιθανών μεταλλάξεων των B-raf και K-ras. Τα αποτελέσματα μας αποκάλυψαν την απουσία μεταλλάξεων του B-raf στα δείγματα καρκινωμάτων που αναλύθηκαν (0/61). Οι Davies και συν. κατέγραψαν μια συχνότητα ίση με 18% και 12% για την παρουσία των μεταλλάξεων B-raf σε κυτταρικές σειρές ορθοκολικού καρκίνου (40 δείγματα) και σε πρωτοπαθή ορθοκολικό καρκίνο (33 δείγματα) αντίστοιχα [131], ενώ οι Yuen και συν. κατέγραψαν χαμηλότερη συχνότητα των μεταλλάξεων B-raf (5.1% σε ορθοκολικά αδενοκαρκινώματα) [261]. Σε μια πρόσφατη μελέτη, οι μεταλλάξεις του B-raf εντοπίστηκαν στο 9.1% των 44 ανθρώπινων πρωτοπαθών ορθοκολικών όγκων που εξετάστηκαν [262]. Σε 2 μεγάλες μελέτες, η μετάλλαξη βρέθηκε στο 8% των 275 ορθοκολικών καρκίνων [263] και πάνω από το 20% των 293 καρκίνων που αναλύθηκαν [264]. Οι Ikehara και συν. βρήκαν μεταλλάξεις του B-raf στο 7.2% ελέγχοντας 83 σποραδικά αδενοκαρκινώματα [265]. Σε μια προηγούμενη μελέτη, αναφέρθηκε ότι οι διαφορές στις συχνότητες των μεταλλάξεων του B-raf είναι απίθανο να σχετίζονται με μεθοδολογικές διαφορές και οι συγγραφείς πρότειναν ότι είναι απαραίτητη περαιτέρω έρευνα για να

επαναπροσδιοριστούν οι συχνότητες των μεταλλάξεων του B-raf στον καρκίνο του παχέος εντέρου [261]. Υποστηρίζοντας την παρατήρηση αυτή, προτείνουμε ότι ειδικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με διαφορετικές υποομάδες πληθυσμού ίσως ευνοούν, τουλάχιστον εν μέρει, διαφορές στην επίπτωση των μεταλλάξεων του B-raf στο συγκεκριμένο καρκίνο.

Τα κακοήθη μελανώματα των μαλακών ιστών μοιράζονται κλινικά, ιστολογικά και ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά με τα κακοήθη μελανώματα του δέρματος αλλά οι μεταλλάξεις του εξωνίου 15 του B-raf είναι σημαντικά λιγότερο συχνές στα πρώτα από τα δεύτερα [266]. Παρόμοια, σε οικογενή μελανώματα παρατηρήθηκε απουσία των μεταλλάξεων του εξωνίου 15 του B-raf [267]. Τέλος, οι Edwards και συν. ανέφεραν ότι κανένα από τα προστατευμένα από την UV ακτινοβολία βλεννογονικά μελανώματα τους δεν είχε μεταλλάξεις του εξωνίου 15 του B-raf. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι η πιθανή παρουσία μιας όχι ακόμη καθορισμένης οξειδωτικής βλάβης δρα ως πρόδρομος της B-raf T/A μετατροπής και ίσως οξειδωτικές αλλαγές σχετιζόμενες με την φλεγμονή επηρεάζουν την δημιουργία μεταλλάξεων στο B-raf [268]. Οι Panagopoulos και συν., στο σχολιασμό των αποτελεσμάτων τους κατά τον έλεγχο μελανωμάτων μαλακών ιστών, υποστήριξαν το ότι οι μεταλλάξεις του B-raf είναι απίθανο να προέρχονται από κάποιο ενδογενή γονιδιακό μηχανισμό [266]. Προτείνουμε ότι η μεταλλαξιογένεση του B-raf

είναι πιθανόν να επηρεάζεται ισχυρά από εξωγενείς, περιβαλλοντικούς ή μικρο-περιβαλλοντικούς παράγοντες ακόμη και μεταξύ τύπων όγκου που παρουσιάζουν παραδοσιακά μια τάση να περιλαμβάνουν αυτό τον τύπο μεταλλάξεων. Αυτό ίσως εξηγεί, τουλάχιστον εν μέρει, την ποικιλία που παρατηρείται όσον αφορά στην συχνότητα των μεταλλάξεων του B-raf σε διάφορες μελέτες.

Οι Glarakis και συν. ανέφεραν ότι η συχνότητα των μεταλλάξεων του K-ras είναι περίπου 36% σε Έλληνες ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου - ορθού [183]. Στην μελέτη μας, οι μεταλλάξεις του K-ras στο κωδικόνιο 12 εντοπίστηκαν περίπου στο 30% των περιπτώσεων, μια επίπτωση που βρίσκεται σε σύμπτωση δεδομένων με προηγούμενες μελέτες μεταλλάξεων του K-ras στον ορθοκολικό καρκίνο [269,270]. Οι μεταλλάξεις του ras στο συγκεκριμένο καρκίνο σημειώνονται κύρια στο κωδικόνιο 12 του K-ras (77-82%) [156,271]. Σε μια μελέτη βασιζόμενη σε πληθυσμό, οι μεταλλάξεις του K-ras ανιχνεύθηκαν στο 31.8% των 1413 περιπτώσεων που μελετήθηκαν. Από αυτές, το 77.9% βρέθηκε εντός του κωδικονίου 12 [271]. Χωρίς να αγνοήσουμε την αναφερθείσα συσχέτιση μεταξύ συγκεκριμένων μεταλλάξεων του K-ras εντός του κωδικονίου 13 και της έκβασης της νόσου (κίνδυνος υποτροπής ή θανάτου) [272], εστίασαμε στον έλεγχο του κωδικονίου 12, το οποίο παραδοσιακά παρουσιάζει την υψηλότερη επίπτωση των μεταλλάξεων

του K-ras. Βρήκαμε ότι η συχνότητα των μεταλλάξεων αυτών ήταν υψηλότερη σε νεότερους (< ή =70 έτη) σε σχέση με πιο ηλικιωμένους ασθενείς (>70 έτη). Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να είναι σημαντικό εάν λάβουμε υπόψη το ότι η ηλικία > των 70 ετών βρέθηκε ότι αποτελεί αρνητικό ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την συνολική επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου σε μια πρόσφατη μελέτη [273]. Ασθενείς ηλικίας μεταξύ 61 και 70 ετών είναι πιθανότερο να φέρουν την μετάλλαξη. Οι άνδρες ασθενείς της ομάδας 61-70 ετών παρουσίασαν συχνότερα τις μεταλλάξεις του K-ras σε σχέση με ασθενείς διαφορετικού φύλου και ηλικίας, αν και αυτό ήταν οριακά στατιστικώς μη σημαντικό. Ίσως η απαρχή της μεταλλαξιογένεσης του K-ras στον ορθοκολικό καρκίνο είναι πρόιμη και πιθανόν να σχετίζεται με συνήθειες και τρόπο ζωής που εξαρτώνται από το φύλο. Οι Samowitz και συν. ανέδειξαν την πιθανότητα να επιδρά ο διαφορετικός τρόπος ζωής που χαρακτηρίζει γυναίκες και άνδρες. Για παράδειγμα, η χρήση αλκοόλ ή καπνού, οι διαιτητικοί παράγοντες και η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης μπορεί να επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά την πιθανότητα να συμβούν οι μεταλλάξεις αυτές [271]. Ίσως η απαρχή της ογκογονικής διαδικασίας και ο χρόνος ή η διάρκεια της έκθεσης σε επιβαρυντικούς παράγοντες αντιπροσωπεύουν επιπλέον παραμέτρους που πρέπει να εκτιμηθούν.

Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, οι μεταλλάξεις του K-ras ιδιαίτερος στο

κωδικόνιο 12, βρέθηκε ότι ήταν συχνότερες σε όγκους προχωρημένου σταδίου [271]. Αν και δεν βρήκαμε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων του K-ras και του σταδίου κατά Dukes των όγκων, τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι όγκοι σταδίων C, D κατά Dukes περιείχαν το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλάξεων που παρατηρήθηκαν. Απαιτείται επιπλέον έρευνα για να διερευνηθεί το γιατί το εξόνιο 15 του B-raf διατηρεί αλληλουχία υψηλού βαθμού σταθερότητας και γιατί οι μεταλλάξεις του κωδικονίου 12 του K-ras μεταξύ των Ελλήνων ασθενών παρουσιάζουν τα ίδια ποσοστά επίπτωσης με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν αλλού.

Γεγονότα όπως η επιγενετική απενεργοποίηση του γονιδίου της επιδιόρθωσης κακόζευξης MLH1 φαίνεται να ευθύνονται για την προοδευτική συσσώρευση των μεταλλάξεων που καθορίζουν το φάσμα της μετάλλαξης στην πλειοψηφία των σποραδικών όγκων με μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability, MSI) [274]. Συνοψίζοντας τις ενδείξεις, οι μεταλλάξεις των B-raf και K-ras οδηγούν σε διαφορετικά μονοπάτια νεοπλασίας σχετιζόμενης με γήρανση στο παχύ έντερο και το ορθό, το πρώτο με υψηλό φαινότυπο μεθυλιωτή CpG νησίδας (CIMP) και υψηλή MSI και το δεύτερο με χαμηλό CIMP φαινότυπο και χαμηλή MSI [275]. Ο ρόλος της μεθυλίωσης που αφορά και τα δύο μονοπάτια raf και ras κινείται προς την κατεύθυνση της

αδρανοποίησης προαποπτωτικών και ανασταλτικών του κυτταρικού κύκλου γονιδίων, δίνοντας έμφαση σε μια πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη που εστιάζει στην γήρανση [275]. Επιπρόσθετα, η κατάσταση μεθυλίωσης των πολλαπλών εκκινήτων μπορεί να προβλεφθεί γνωρίζοντας τις ενεργοποιούσες μεταλλάξεις του B-raf και σε μικρότερο βαθμό, του K-ras, υποδηλώνοντας την στενή τους συσχέτιση με διαφορετικά μοντέλα υπερμεθυλίωσης του DNA στον ορθοκολικό καρκίνο [276]. Η χαμηλή συχνότητα των μεταλλάξεων του B-raf που παρατηρείται σε όγκους με ικανότητα επιδιόρθωσης δυσζευγοποίησης μπορεί να εξηγηθεί από την απουσία της MLH1 υπερμεθυλίωσης [132,277,278]. Σε 2 πρόσφατες μελέτες, οι συχνότητες των μεταλλάξεων του B-raf σε MSI-αρνητικούς όγκους ήταν 4% και 5%, αντίστοιχα, και σε MSI-θετικούς όγκους 39% και 52%, αντίστοιχα [263, 279]. Αν και οι μεταλλάξεις του B-raf είναι πολύ πιο κοινές στους MSI-θετικούς όγκους, η συγκριτικά μικρότερη συχνότητα του φαινότυπου αυτού σημαίνει ότι ένα σημαντικό ποσοστό συμβαίνει σε MSI-αρνητικούς όγκους [263]. Δεν αναλύσαμε τα δειγματά μας για μικροδορυφορική αστάθεια. Ωστόσο, θα περιμέναμε τουλάχιστον ένα ελάχιστο ποσοστό συχνότητας των μεταλλάξεων του B-raf ισοδύναμο με τα χαμηλά ποσοστά που αναφέρονται στην βιβλιογραφία.

Η μετάλλαξη V600E/B-raf έχει αναγνωριστεί σαν δείκτης για τον διαχωρισμό

των MSI-θετικών όγκων που είναι σποραδικοί από κληρονομικούς μη-πολυποδιακούς καρκίνου του παχέος εντέρου [280-282]. Η ανίχνευση της μετάλλαξης του V600E/B-raf στον ορθοκολικό καρκίνο υποδηλώνει μια σποραδική προέλευση της νόσου. Τα ευρήματα αυτά έχουν κάποια βαρύτητα όσον αφορά στον γενετικό έλεγχο για τον κληρονομικό μη πολυποδιακό ορθοκολικό καρκίνο και προτείνουν την δυνητική χρήση του B-raf για να αποκλειστεί η κατάσταση αυτή [283]. Στην μελέτη μας, η πλήρης απουσία της V600E είναι ενδιαφέρουσα. Ίσως πρέπει να θεωρηθεί ένα μοντέλο στη «διάσταση του χρόνου» [284]. Η απαρχή της μεταλλαξιογένεσης του B-raf στον καρκίνο του παχέος εντέρου παρατηρείται σαν όψιμο γεγονός, πιθανώς σχετιζόμενο με την προχωρημένη ηλικία [264]. Ο έλεγχος ασθενών μεγαλύτερης ηλικίας μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα να βρεθούν οι μεταλλάξεις αυτές. Οι μηχανισμοί που αλληλεπιδρούν ώστε να καταστήσουν τη V600E επηρεπής στην μεταλλακτική τροποποίηση [264] και το πώς οι μηχανισμοί αυτοί επιρεάζουν την συχνότητα της V600E μένουν να καθοριστούν.

Βρέθηκε πρόσφατα πως το κάπνισμα του τσιγάρου σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ορθοκολικού καρκίνου με φαινότυπο μεθυλιωτή νησίδος CpG και /ή μεταλλάξεις V600E/B-raf, ανεξάρτητα από την κατάσταση MSI. Αυτό καταδεικνύει πως η κατάταξη των όγκων με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά

θα μπορούσε να αποκαλύψει συσχετίσεις με παράγοντες κινδύνου που δεν ήταν ορατοί έως τώρα εξαιτίας της γενετικής ετερογένειας του καρκίνου [285]. Σε συμφωνία με αυτό, ευρήματα από μια άλλη μελέτη προτείνουν ότι οι μεταλλάξεις του B-raf θα μπορούσαν να αναγνωρίσουν μια υποομάδα ορθοκολικού καρκίνου με διακριτά κλινικά, παθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά ανεξάρτητα από την κατάσταση MSI [263]. Επιπλέον, τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης μελέτης που εκτιμά την συσχέτιση της δίαιτας και του τρόπου ζωής με τον φαινότυπο μεθυλιωτή νησίδος CpG και την επίπτωση των μεταλλάξεων του B-raf στον ορθοκολικό καρκίνο προτείνει την εμπλοκή πολλαπλών μονοπατιών στον καρκίνο του παχέος εντέρου μέσω άμεσων, ανάστροφων ή μη συσχετίσεων μεταξύ του φαινοτύπου μεθυλίωσης νησίδος CpG και των ποικίλων διαιτητικών παραγόντων και τρόπου ζωής που αναλύθηκαν [286].

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μη ανεύρεση B-raf μεταλλάξεων είναι, ίσως, προϊόν περιβαλλοντικών ή εθνολογικών επιδράσεων. Η αυτοματοποιημένη ανίχνευση της ακολουθίας βάσεων του εξωνίου 15 και τα αποτελέσματα αυτής απομακρύνουν ισχυρά την πιθανότητα παρεκκλίσεων λόγω μεθοδολογίας. Προτείνουμε ότι χαρακτηριστικά που σχετίζονται με περιβαλλοντικές ή μικρο-περιβαλλοντικές διαφορές ίσως ευνοούν και προάγουν, τουλάχιστον εν μέρει, διαφορές στη συχνότητα των μεταλλάξεων του B-raf στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Αυτό ίσως εξηγεί, τουλάχιστον εν μέρει, την ποικιλία που παρατηρείται όσον αφορά στην συχνότητα των μεταλλάξεων του B-raf σε διάφορες μελέτες. Από την άλλη πλευρά, ίσως, πρέπει να θεωρηθεί ένα μοντέλο στη «διάσταση του χρόνου». Η απαρχή της μεταλλαξιογένεσης του B-raf στον καρκίνο του παχέος εντέρου παρατηρείται σε πιο προχωρημένη ηλικία. Ο έλεγχος ασθενών μεγαλύτερης ηλικίας μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα να βρεθούν οι μεταλλάξεις αυτές.

Οι K-ras μεταλλάξεις φαίνεται να παραμένουν οι «συνήθεις ύποπτοι» αφού η συχνότητα με την οποία ανευρίσκονται, στην παρούσα μελέτη, είναι περίπου 30%. Βρήκαμε ότι η συχνότητα των μεταλλάξεων αυτών ήταν υψηλότερη σε νεότερους. Ασθενείς ηλικίας μεταξύ 61 και 70 ετών είναι πιθανότερο να φέρουν την μετάλλαξη. Οι μεταλλάξεις του K-ras στο κωδικόνιο 12, βρέθηκε

ότι ήταν συχνότερες σε όγκους προχωρημένου σταδίου αν και δεν βρήκαμε στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τα καρκινώματα παχέος εντέρου – ορθού με B-raf μεταλλάξεις τείνουν να κατατάσσονται σε πρωιμότερο κατά Dukes στάδιο. Αυτό, ίσως, υποδεικνύει την ηπιότερη βιολογική συμπεριφορά των νεοπλασμάτων που ‘ενλιμενίζουν’ τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις.

Ο συνδετικός κρίκος της βιολογικής συμπεριφοράς και της σποραδικότητας του καρκίνου παχέος εντέρου - ορθού απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να αποκτηθεί εμπειρία δυνητικά εφαρμόσιμη στην κλινική πράξη.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern. Med.* 2002;137:603-612.
2. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis *Cell.* 1990;61:759-67.
3. Weinberg RA. Oncogenes and tumor suppressor genes *CA Cancer J Clin.* 1994;44:160-70.
4. Chung DC, Rustgi AK. DNA mismatch repair and cancer *Gastroenterology.* 1995;109:1685-99.
5. Sherr CJ. Cancer cell cycles *Science.* 1996;274:1672-7.
6. Cancer Genetics and Cancer Predisposition Testing. American Society of Clinical Oncology Curriculum. Alexandria, VA: American Soc of Clinical Oncology; 1998.
7. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68:820-3.
8. Knudson AG Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes *Cancer Res.* 1985;45:1437-43.
9. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, et al. Inactivation of the type II *TGF-β* receptor in colon cancer cells with microsatellite instability *Science.* 1995;268:1336-8.
10. Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C, Ostrer H, Giardiello FM, et al. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in *APC* *Nat Genet.* 1997;17:79-83.
11. Hesketh R. The multistep nature of cancer. In Hesketh R (ed): the oncogene and tumor suppressor gene. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, pp 54-56, 1997.
12. Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, Loff S, Jeschke R, et al. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase *Nat Genet.* 1998;18:38-43.
13. Park M: Oncogenes. In Vogelstein B and Kinzler WK (eds): The genetic basis of human cancer. McGraw-Hill, New York, St. Louis, San Francisco, Auckland, Bogota, Caracas, Lisbon, London, Madrid, Mexico City, Milan, Montreal, New Delhi, San Juan, Singapore, Sydney, Tokyo, Toronto, pp 205-222, 1998.
14. Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the *APC* tumor suppressor protein with catenins *Science.* 1993;262:1734-7.
15. Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain *Science.* 1998;280:1036-7.
16. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor *p53*: implications for tumor development and prognosis *J Clin Oncol.* 1998;16:3158-68.

17. Kressner U, Inganäs M, Byding S, Blikstad I, Pählman L, Glimelius B, et al. Prognostic value of *p53* genetic changes in colorectal cancer *J Clin Oncol*. 1999;17:593-9.
18. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers *Science*. 1990;247:49-56.
19. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development *N Engl J Med*. 1988;319:525-32.
20. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Liu B, Parsons R, Lengauer C, Palombo F, et al. Mutations of GTBP in genetically unstable cells *Science*. 1995;268:1915-7.
21. Baker SM, Bronner CE, Zhang L, Plug AW, Robatzek M, Warren G, et al. Male mice defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis *Cell*. 1995;82:309-19.
22. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer *Science*. 1994;263:1625-9.
23. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer *Cancer Res*. 1998;58:5248-57.
24. Parc YR, Halling KC, Wang L, Christensen ER, Cunningham JM, French AJ, et al. *HMSH6* alterations in patients with microsatellite instability-low colorectal cancer *Cancer Res*. 2000;60:2225-31.
25. Syngal S, Weeks JC, Schrag D, Garber JE, Kuntz KM. Benefits of colonoscopic surveillance and prophylactic colectomy in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer mutations *Ann Intern Med*. 1998;129:787-96.
26. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hyland LM, Celano P, et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis *N Engl J Med*. 1993;328:1313-6.
27. He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPAR Δ is an *APC*-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs *Cell*. 1999;99:335-45.
28. Yang WL, Frucht H. Activation of the PPAR γ pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells *Carcinogenesis*. 2001;22:1379-83.
29. Frucht H, Gazdar AF, Park JA, Oie H, Jensen RT. Characterization of functional receptors for gastrointestinal hormones on human colon cancer cells *Cancer Res*. 1992;52:1114-22.
30. Frucht H, Jensen RT, Dexter D, Yang WL, Xiao Y. Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor *Clin Cancer Res*. 1999;5:2532-9.

31. Yang WL, Frucht H. Cholinergic receptor up-regulates COX-2 expression and prostaglandin E(2) production in colon cancer cells *Carcinogenesis*. 2000;21:1789-93.
32. Cheng K, Chen Y, Zimniak P, Raufman JP, Xio Y, Frucht H. Functional interaction of lithocholic acid conjugates with M₃ muscarinic receptors on a colon cancer cell line. *Biochem Biophys Acta*. 2002; 1588(1):48-55
33. Reddy BS, Wynder EL. Metabolic epidemiology of colon cancer. Fecal bile acids and neutral sterols in colon cancer patients and patients with adenomatous polyps *Cancer*. 1977;39:2533-9.
34. Hill MJ, Drasar BS, Williams RE, Meade TW, Cox AG, Simpson JE, et al. Faecal bile-acids and clostridia in patients with cancer of the large bowel *Lancet*. 1975;1:535-9.
35. Hill MJ. Bile acids and colorectal cancer: hypothesis *Eur J Cancer Prev*. 1991;1(Suppl 2):69-74.
36. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland *N Engl J Med*. 2000;343:78-85.
37. Ekblom A, Yuen J, Adami HO, McLaughlin JK, Chow WH, Persson I, et al. Cholecystectomy and colorectal cancer *Gastroenterology*. 1993;105:142-7.
38. Giovannucci E, Colditz GA, Stampfer MJ. A meta-analysis of cholecystectomy and risk of colorectal cancer *Gastroenterology*. 1993;105:130-41.
39. Zuccato E, Venturi M, Di Leo G, Colombo L, Bertolo C, Doldi SB, et al. Role of bile acids and metabolic activity of colonic bacteria in increased risk of colon cancer after cholecystectomy *Dig Dis Sci*. 1993;38:514-9.
40. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM, Luce MC, Hyland LM, Bacon JA, et al. The use and interpretation of commercial *APC* gene testing for familial adenomatous polyposis *N Engl J Med*. 1997;336:823-7.
41. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC) *Dis Colon Rectum*. 1991;34:424-5.
42. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC *Gastroenterology*. 1999;116:1453-6.
43. Syngal S, Fox EA, Li C, Dovidio M, Eng C, Kolodner RD, et al. Interpretation of genetic test results for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: implications for clinical predisposition testing *JAMA*. 1999;282:247-53.
44. Terdiman JP, Gum JR Jr, Conrad PG, Miller GA, Weinberg V, Crawley SC, et al. Efficient detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene carriers by screening for tumor microsatellite instability before germline genetic testing *Gastroenterology*. 2001;120:21-30.

45. Jansen HW, Lurz R, Bister K, et al: Homologous cell-derived oncogenes in avian carcinoma virus MH2 and murine sarcoma virus 3611. *Nature*. 1984;307:281-284.
46. Suttrave P, Bonner TI, Rapp UR, et al: Nucleotide sequence of avian retroviral oncogene v-mil: Homologue of murine retroviral oncogene v-raf. *Nature*. 1984; 309:85-88.
47. Kan NC, Flordellis CS, Mark GE, et al: A common onc gene sequence transduced by avian carcinoma virus MH2 and by murine sarcoma virus 3611. *Science*. 1984;223:813-816.
48. Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, et al: Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80:4218-4222.
49. Calogeraki I, Barnier JV, Eychene A, et al: Genomic organization and nucleotide sequence of the coding region of the chicken c-Rmil(Braf- proto-oncogene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;193:1324-1331.
50. Eychene A, Barnier JV, Apiou F, et al: Chromosomal assignment of two human B-raf(Rmil) proto-oncogene loci: B-raf-1 encoding the p94Braf/Rmil and B-raf-2, a processed pseudogene. *Oncogene*. 1992;7:1657-1660.
51. Storm SM, Rapp UR: Oncogene activation: C-raf-1 gene mutations in experimental and naturally occurring tumors. *Toxicol Lett*. 1993; 67:201-210.
52. Chong H, Vikis HG, Guan KL: Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal*. 2003;15:463-469.
53. Jaiswal RK, Weissinger E, Kolch W, et al: Nerve growth factor-mediated activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade involves a signaling complex containing B-Raf and HSP90. *J Biol Chem*. 1996;271:23626-23629.
54. Nantel A, Huber M, Thomas DY: Localization of endogenous Grb10 to the mitochondria and its interaction with the mitochondrial associated Raf-1 pool. *J Biol Chem*. 1999;274:35719-35724.
55. Majewski M, Nieborowska-Skorska M, Salomoni P, et al: Activation of mitochondrial Raf-1 is involved in the antiapoptotic effects of Akt. *Cancer Res*. 1999;59:2815-2819.
56. Wang HG, Rapp UR, Reed JC: Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell*. 1996;87:629-638.
57. Yuryev A, Ono M, Goff SA, et al: Isoform specific localization of A-RAF in mitochondria. *Mol Cell Biol*. 2000;20:4870-4878.
58. Morice C, Nothias F, Konig S, et al: Raf-1 and B-Raf proteins have similar regional distributions but differential subcellular localization in adult rat brain. *Eur J Neurosci*. 1999 ;11:1995-2006.
59. Hagemann C, Rapp UR: Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res*. 1999;253:34-46.
60. Beeram M, Patnaik A, Rowinsky EK. Raf: A strategic target for therapeutic development against cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(27):6771-6786.

61. Pritchard CA, Bolin L, Slattery R, et al: Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr Biol*. 1996;6:614-617.
62. Houslay MD, Kolch W: Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol*. 2000;58:659-668.
63. Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA: Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*. 1993;74:205-214.
64. Drugan JK, Khosravi-Far R, White MA, et al: Ras interaction with two distinct binding domains in Raf-1 may be required for Ras transformation. *J Biol Chem*. 1996;271:233-237.
65. Brtva TR, Drugan JK, Ghosh S, et al: Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras. *J Biol Chem*. 1995;270:9809-9812.
66. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, et al: Ras activation of the Raf kinase: Tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res*. 2001;56:127-155.
67. Yao B, Zhang Y, Delikat S, et al: Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature*. 1995;378:307-310.
68. Guan KL, Figueroa C, Brtva TR, et al: Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *J Biol Chem*. 2000;275:27354-27359.
69. Morrison DK, Heidecker G, Rapp UR, et al: Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J Biol Chem*. 1993;268:17309-17316.
70. Zimmermann S, Moelling K: Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science*. 1999;286:1741-1744.
71. Mikula M, Schreiber M, Husak Z, et al: Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *Embo J*. 2001 ;20:1952-1962.
72. Wu X, Noh SJ, Zhou G, et al: Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated Hela cells. *J Biol Chem*. 1996;271:3265-3271.
73. Marais R, Light Y, Paterson HF, et al: Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem* .1997;272:4378-4383.
74. Pritchard CA, Samuels ML, Bosch E, et al: Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol*. 1995;15:6430-6442.
75. Kubicek M, Pacher M, Abraham D, et al: Dephosphorylation of Ser-259 regulates Raf-1 membrane association. *J Biol Chem*. 2002;277:7913-7919.
76. Chuang E, Barnard D, Hettich L, et al: Critical binding and regulatory interactions between Ras and Raf occur through a small, stable N-terminal domain of Raf and specific Ras effector residues. *Mol Cell Biol*. 1994;14:5318-5325.
77. Voice JK, Klemke RL, Le A, et al: Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J Biol Chem*. 1999;274:17164-17170.

78. Okada T, Hu CD, Jin TG, et al: The strength of interaction at the Raf cysteine-rich domain is a critical determinant of response of Raf to Ras family small GTPases. *Mol Cell Biol.* 1999;19:6057-6064.
79. Yamamori B, Kuroda S, Shimizu K, et al: Purification of a Ras-dependent mitogenactivated protein kinase kinase kinase from bovine brain cytosol and its identification as a complex of B-Raf and 14-3-3 proteins. *J Biol Chem.*1995;270:11723-11726.
80. Vossler MR, Yao H, York RD, et al: CAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf and Rap1-dependent pathway. *Cell.* 1997;89:73-82.
81. York RD, Yao H, Dillon T, et al: Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature.* 1998;392:622-626.
82. Bos JL, de Rooij J, Reedquist KA: Rap1 signalling: Adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:369-377.
83. Chaudhary A, King WG, Mattaliano MD, et al: Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. *Curr Biol.* 2000;10:551-554.
84. Diaz B, Barnard D, Filson A, et al: Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling. *Mol Cell Biol.* 1997;17:4509-4516.
85. King AJ, Sun H, Diaz B, et al: The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature.* 1998 ;396:180-183.
86. Dhillon AS, Meikle S, Yazici Z, et al: Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *Embo J.* 2002;21:64-71.
87. Zhang BH, Tang ED, Zhu T, et al: Serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK phosphorylates and negatively regulates B-Raf. *J Biol Chem.* 2001;276:31620-31626.
88. Dhillon AS, Meikle S, Peyssonnaud C, et al: A Raf-1 mutant that dissociates MEK/extracellular signal-regulated kinase activation from malignant transformation and differentiation but not proliferation. *Mol Cell Biol.* 2003;23:1983-1993.
89. Chong H, Lee J, Guan KL: Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *Embo J.* 2001;20:3716-3727.
90. Fabian JR, Daar IO, Morrison DK: Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol.* 1993;13:7170-7179.
91. Sun H, King AJ, Diaz HB, et al: Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42/Rac and Pak. *Curr Biol.* 2000;10:281-284.
92. Campbell S, Otis M, Cote M, et al: Connection between integrins and cell activation in rat adrenal glomerulosa cells: A role for Arg-Gly-Asp peptide in the activation of the p42/p44(mapk) pathway and intracellular calcium. *Endocrinology.* 2003;144:1486-1495.

93. Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, et al: Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *Embo J*. 1999;18: 2137-2148.
94. Tilbrook PA, Colley SM, McCarthy DJ, et al: Erythropoietin-stimulated Raf-1 tyrosine phosphorylation is associated with the tyrosine kinase Lyn in J2E erythroleukemic cells. *Arch Biochem Biophys*. 2001;396:128-132.
95. Wojnowski L, Stancato LF, Lerner AC, et al: Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 2000;91:97-104.
96. Hekman M, Hamm H, Villar AV, et al: Associations of B- and C-Raf with cholesterol, phosphatidylserine, and lipid second messengers: Preferential binding of Raf to artificial lipid rafts. *J Biol Chem*. 2002;277:24090-24102.
97. Dhanasekaran N, Premkumar Reddy E: Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene*. 1998;17:1447-1455.
98. Dent P, Haser W, Haystead TA, et al: Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science*. 1992;257:1404-1407.
99. Catling AD, Reuter CW, Cox ME, et al: Partial purification of a mitogen activated protein kinase kinase activator from bovine brain: Identification as B-Raf or a B-Raf-associated activity. *J Biol Chem*. 1994;269:30014-30021.
100. Catling AD, Schaeffer HJ, Reuter CW, et al: A proline-rich sequence unique to MEK1 and MEK2 is required for raf binding and regulates MEK function. *Mol Cell Biol*. 1995;15:5214-5225.
101. Howe LR, Leever SJ, Gomez N, et al: Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell*. 1992;71:335-342.
102. Kyriakis JM, App H, Zhang XF, et al: Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*. 1992;358:417-421.
103. Jaiswal RK, Moodie SA, Wolfman A, et al: The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21ras. *Mol Cell Biol* 1994;14:6944-6953.
104. Reuter CW, Catling AD, Jelinek T, et al: Biochemical analysis of MEK activation in NIH3T3 fibroblasts: Identification of B-Raf and other activators. *J Biol Chem*. 1995;270:7644-7655.
105. Kolch W: Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*. 2000;351:289-305.
106. Baumann B, Weber CK, Troppmair J, et al: Raf induces NF-kappaB by membrane shuttle kinase MEKK1, a signaling pathway critical for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97: 4615-4620.
107. Wang S, Ghosh RN, Chellappan SP: Raf-1 physically interacts with Rb and regulates its function: A link between mitogenic signaling and cell cycle regulation. *Mol Cell Biol*. 1998;18:7487-7498.
108. Wang HG, Miyashita T, Takayama S, et al: Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene*. 1994;9:2751-2756.

109. Papin C, Denouel A, Calothy G, et al: Identification of signalling proteins interacting with B-Raf in the yeast two-hybrid system. *Oncogene*.1996;12:2213-2221.
110. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG: Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*. 1998;74:49-139.
111. Ahn NG, Seger R, Bratlien RL, et al. Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade: In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule associated protein 2 kinase. *J Biol Chem*. 1991;266: 4220-4227.
112. Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL: The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*. 1992;258:478-480.
113. Morrison DK: KSR: A MAPK scaffold of the Ras pathway? *J Cell Sci*.2001;114:1609-1612.
114. Michaud NR, Therrien M, Cacace A, et al: KSR stimulates Raf-1 activity in a kinaseindependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:12792-12796.
115. Kerkhoff E, Rapp UR: Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene*. 1998;17:1457-1462.
116. Galaktionov K, Jessus C, Beach D: Raf1 interaction with Cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation. *Genes Dev*. 1995;9:1046-1058.
117. Jinno S, Suto K, Nagata A, et al: Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *Embo J*. 1994;13:1549-1556.
118. Janosch P, Kieser A, Eulitz M, et al: The Raf-1 kinase associates with vimentin kinases and regulates the structure of vimentin filaments.*FASEB J*. 2000;14:2008-2021.
119. Li S, Sedivy JM: Raf-1 protein kinase activates the NF-kappa B transcription factor by dissociating the cytoplasmic NF-kappa B-I kappa B complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:9247-9251.
120. Peruzzi F, Prisco M, Dews M, et al: Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1999;19:7203-7215.
121. Patriotis C, Russeva MG, Lin JH, et al: Tpl-2 induces apoptosis by promoting the assembly of protein complexes that contain caspase-9, the adapter protein Tvl-1, and procaspase-3. *J Cell Physiol*. 2001;187:176-187.
122. Chen J, Fujii K, Zhang L, et al: Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:7783-7788.
123. Jamal S, Ziff EB: Raf phosphorylates p53 in vitro and potentiates p53-dependent transcriptional transactivation in vivo. *Oncogene*. 1995;10:2095-2101.
124. Nilsson I, Hoffmann I: Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res*. 2000;4:107-114.

125. Cornwell MM, Smith DE: A signal transduction pathway for activation of the *mdr1* promoter involves the proto-oncogene *c-raf* kinase. *J Biol Chem*. 1993;268:15347-15350.
126. Harris P, Morton CC, Guglielmi P, et al: Mapping by chromosome sorting of several gene probes, including *c-myc*, to the derivative chromosomes of a 3;8 translocation associated with familial renal cancer. *Cytometry*. 1986;7:589-594.
127. Miyamoto K, Tomita N, Ishii A, et al: Specific abnormalities of chromosome 14 in patients with acute type of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Cancer*. 1987 ;40:461-468.
128. Nagao M, Ishikawa F, Tahira T, et al: Activation of rat and human *c-raf(-1)* by rearrangement. *Princess Takamatsu Symp*. 1986;17:75-84.
129. Huser M, Luckett J, Chiloeches A, et al: MEK kinase activity is not necessary for *Raf-1* function. *Embo J*. 2001;20:1940-1951.
130. Niehof M, Radziwill G, Klauser S, et al: A small peptide derived from the aminotermminus of *c-Raf-1* inhibits *c-Raf-1/Ras* binding. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;206:46-50.
131. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al: Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature*. 2002;417:949-954.
132. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, et al: Tumorigenesis: *RAF/RAS* oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*. 2002;418:934.
133. Pollock PM, Meltzer PS: A genomebased strategy uncovers frequent *BRAF* mutations in melanoma. *Cancer Cell*. 2002;2:5-7.
134. Heidecker G, Huleihel M, Cleveland JL, et al: Mutational activation of *c-raf-1* and definition of the minimal transforming sequence. *Mol Cell Biol*. 1990;10:2503-2512.
135. Metzelaar-Blok JA, Jager MJ, Moghaddam PH, et al: Frequent loss of heterozygosity on chromosome 6p in uveal melanoma. *Hum Immunol*. 1999;60:962-969.
136. Cohen Y, Goldenberg-Cohen N, Parrella P, et al: Lack of *BRAF* mutation in primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:2876-2878.
137. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al: High frequency of *BRAF* mutations in nevi. *Nat Genet*. 2003;33:19-20.
138. Takayama T, Ohi M, Hayashi T, et al: Analysis of *K-ras*, *APC*, and *beta-catenin* in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*. 2001;121:599-611.
139. Yamashita N, Minamoto T, Ochiai A, et al: Frequent and characteristic *K-ras* activation in aberrant crypt foci of colon: Is there preference among *K-ras* mutants for malignant progression? *Cancer*. 1995 ;75:1527-1533.
140. Cohen Y, Xing M, Mambo E, et al: *BRAF* mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95:625-627.
141. Cohen MS, Hussain HB, Moley JF: Inhibition of medullary thyroid carcinoma cell proliferation and *RET* phosphorylation by tyrosine kinase inhibitors. *Surgery*. 2002 ;132:960-967.

142. Busca R, Abbe P, Mantoux F, et al: Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *Embo J.* 2000;19:2900-2910.
143. Iacovelli L, Capobianco L, Salvatore L, et al: Thyrotropin activates mitogen-activated protein kinase pathway in FRTL-5 by a cAMP-dependent protein kinase A independent mechanism. *Mol Pharmacol.* 2001;60:924-933.
144. Manning G, Whyte DB, Martinez R, et al: The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 2002;298:1912-1934.
145. Singer G, Oldt R III, Cohen Y, et al: Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:484-486.
146. Storm SM, Rapp UR: Oncogene activation: C-raf-1 gene mutations in experimental and naturally occurring tumors. *Toxicol Lett.* 1993;67:201-210.
147. Stanton VP Jr, Cooper GM: Activation of human raf transforming genes by deletion of normal amino-terminal coding sequences. *Mol Cell Biol.* 1987;7:1171-1179.
148. Kasid U, Pfeifer A, Weichselbaum RR, et al: The raf oncogene is associated with a radiation-resistant human laryngeal cancer. *Science.* 1987;237:1039-104.
149. Lowy DR, Willumsen BM. Function and regulation of Ras. *Annu Rev Biochem.* 1993; 62:851–891.
150. Pells S, Divjak M, Romanowski P, Impey H, Hawkins NJ, Clarke AR, Hooper ML, Williamson DJ. Developmentally-regulated expression of murine K-ras isoforms. *Oncogene.* 1997;15:1781–1786.
151. Wittinghofer A, Herrmann C. Ras-effector interactions, the problem of specificity. *FEBS Lett.* 1995; 369:643–654.
152. Macaluso M, Russo G, Cinti C, Bazan V, Gebbia N, Russo A. Ras family genes: An interesting link between cell cycle and cancer. *J Cell Physiol.* 2002;192:125-130.
153. Fujita J, Yoshida O, Yuasa Y, Rhim JS, Hatanak M, Aaronson SA. H-ras oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tracts tumours. *Nature.* 1984;309:464–466.
154. Visvanathan KV, Pocock RD, Summerhayes IC. Preferential and novel activation of H-ras in human bladder carcinomas. *Oncogene Res.* 1988;3:77–86.
155. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989;49:4682–4689.
156. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der EB AJ, Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature.* 1987;327:293–297.
157. Hesketh R. *The oncogene handbook.* Academic Press. 1995.
158. Clarke S. Protein isoprenylation and methylation at carboxylterminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:355–386.
159. De Vos AM, Tong L, Milburn MV, Matias PM, Jancarik J, Noguchi S, Nishimura S, Miura K, Ohtsuka E, Kim SH. Three-dimensional structure of

- an oncogenic protein: catalytic domain of human c-H-ras p21. *Science*. 1988;239:888–893.
160. Krenzel U, Schlichting I, Scherer A, Schumann R, Frech M, John J, Kabsch W, Pai E, Wittinghofer A. Three-dimensional structures of H-ras p21 mutant: molecular basis for their inability to function as signal switch molecules. *Cell*. 1990;62:539–548.
 161. Scheffzek K, Ahmadian MR, Wittinghofer A. GTPase-activating proteins. Helping hands to complement an active site. *TIBS*. 1998;23:257–262.
 162. Boriack-Sjodin PA, Margarit MS, Bar-Sagi D, Kuyian J. The structural basis of the activation of RAS by SOS. *Nature*. 1998;394:337–343.
 163. Wittinghofer F. Caught in the act of the switch-on. *Nature*. 1998;394:317–320.
 164. Downward J. Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev*. 1998;8:49–54.
 165. Hodgkin MN, Pettitt TR, Martin A, Michell RH, Pemberton AJ, Wakelam M. Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? *TIBS*. 1998;23:200–204.
 166. Gille H, Downward J. Multiple ras effectors pathways contribute to G(1) progression. *J Biol Chem*. 1999;274:22033–22040.
 167. Kresse H, Schönherr E. Proteoglycans of the extracellular matrix in growth control. *J Cell Physiol*. 2001; 189:266–274.
 168. Wan Y, Kurosaki T, Huang XY. Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G protein-coupled receptors. *Nature*. 1996;380:541–544.
 169. Tzivion G, Luo Z, Avruch J. A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature*. 1998;394:88–92.
 170. McPherson RA, Harding A, Roy S, Lane A, Hancock JF. Interactions of c-Raf-1 with phosphatidylserine and 14-3-3. *Oncogene*. 1999;18:3862–3869.
 171. Wasylyk B, Hagman J, Gutierrez-Hartmann A. Ets transcription factor: nuclear effectors of the RAS-MAP-kinase signaling pathway. *TIBS*. 1998;23:213–216.
 172. Lloyd AC. Ras versus cyclin-dependent kinase inhibitors. *Curr Opin Genet Dev*. 1998;8:43–48.
 173. Mayo MW, Wang CY, Cogswell PC, Rogers-Graham KS, Lowe SW, Der CJ, Baldwin AS Jr. Requirement of NF- κ B activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic RAS. *Science*. 1997;278:1812–1815.
 174. Wolthuis RM, Bos JL. Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral. *Curr Opin Genet Dev*. 1999;9:112–117.
 175. Danen EHS, Yamada KH. Fibronectin, integrins, and growth control. *J Cell Physiol*. 2001;189:1–13.
 176. Taki T, Hayashi Y, Taniwaki M, Seto M, Ueda R, Hanada R, Suzukawa K, Yokota J, Morishita K. Fusion of the MLL gene with two different genes, AF-6 and AF-5alpha, by a complex translocation involving chromosomes 5, 6, 8 and 11 in infant leukemia. *Oncogene*. 1996;13:2121–2130.
 177. Watari Y, Kariya K, Shibatohe M, Liao Y, Hu CD, Goshima M, Tamada M,

- Kikuchi A, Kataoka T. Identification of Ce-AF-6, a novel *Caenorhabditis elegans* protein, as a putative Ras effector. *Gene*. 1998;224:53–58.
178. Yamamoto T, Harada N, Kano K, Taya S, Canaani E, Matsuura Y, Mizoguchi A, Ide C, Kaibuchi K. The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Biol*. 1997;139:785–795.
 179. Diaz-Meco MT, Lozano J, Municio MM, Berra E, Frutos S, Sanz L, Moscat J. Evidence for the in vitro and in vivo interaction of Ras with protein kinase C zeta. *J Biol Chem*. 1994;269:31706–31710.
 180. Liao DF, Monia B, Dean N, Berk BC. Protein kinase C-zeta mediates angiotensin II activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1997;272:6146–6150.
 181. Anrather J, Csizmadia V, Soares MP, Winkler H. Regulation of NF-kappaB RelA phosphorylation and transcriptional activity by p21(ras) and protein kinase Czeta in primary endothelial cells. *J Biol Chem*. 1999;274:13594–13603.
 182. Vavvas D, Li X, Avruch J, Zhang XF. Identification of Nore1 as a potential Ras effector. *J Biol Chem*. 1998;273:5439–5442.
 183. Glarakis IS, Savva S, Spandidos DA. Activation of the ras genes in malignant and premalignant colorectal tumors. *Oncol Rep*. 1998;5:1451–4.
 184. Field JK, Spandidos DA. The role of ras and myc oncogenes in human solid tumours and their relevance in diagnosis and prognosis (review). *Anticancer Res*. 1990;10:1–22.
 185. Beaupre DM, Kurzock R. RAS and leukemia: from basis mechanisms to gene-directed therapy. *J Clin Oncol*. 1999;17:1071–1079.
 186. Nelson HH, Christiani DC, Mark EJ, Wiencke JK, Wain JC, Kelsey KT. Implications and prognostic value of K-ras mutation for early-stage lung cancer in women. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91:2032–2038.
 187. Pajkos G, Kiss I, Sandor J, Ember I, Kishazi P. The prognostic value of the presence of mutations at the codons 12, 13, 61 of K-ras oncogene in colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2000;20:1695–1701.
 188. Russo A, Bazan V, Migliavacca M, Tubiolo C, Macaluso M, Zanna I, Corsale S, Latteri F, Valerio MR, Pantuso G, Morello V, Dardanoni G, Latteri MA, Colucci G, Tomasino RM, Gebbia N. DNA aneuploidy and high proliferative activity but not K-ras-2 mutations as independent predictors of clinical outcome in operable gastric carcinoma: results of a 5-year Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GOIM) prospective study. *Cancer*. 2001;92:294–302.
 189. Rak J, Yu JL, Klement J, Kerber RS. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2000;5:24–33.
 190. Stacey DW, Kung HF. Transformation of NIH/3T3 cells by microinjection of Ha-ras p21 protein. *Nature*. 1984;310:508–511.
 191. Mulcahy LS, Smith MR, Stacey DW. Requirement for ras protooncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature*. 1985;313:241–243.

192. Taylor SJ, Shalloway D. Cell cycle-dependent activation of Ras. *Curr Biol*. 1996;6:1621–1627.
193. Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Müller R, Pouyse´gur J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem*. 1996;271: 20608–20616.
194. Kerkhoff E, Rapp UR. Cell cycle targets of Ras/Raf signaling. *Oncogene*. 1998;17:1457–1462.
195. Muise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tsihchlis PN, Rosen N. Cyclin D expression is controlled posttranscriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem*. 1998;273:29864–29872.
196. Sewing A, Wiseman B, Lloyd AC, Land H. High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*. 1997;17:5588–5597.
197. Woods D, Parry D, Cherwinski H, Bosch E, Lees E, McMahon M. Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*. 1997;17:5598–5611.
198. Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinases inhibitor p27. *Science*. 1995;269:682–685.
199. Hengst L, Reed S. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science*. 1996;271:1861–1864.
200. Aktas H, Cai H, Cooper GM. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol*. 1997;17:3850–3857.
201. Pruitt K, Pestell RG, Der CJ. Ras inactivation of the retinoblastoma pathway by distinct mechanisms in NIH 3T3 fibroblast and RIE-1 epithelial cells. *J Biol Chem*. 2000;275:40916–40924.
202. Hitomi M, Stacey DW. Ras-dependent cell cycle commitment during G2 phase. *FESB Lett*. 2001;490:123–131.
203. End DW. Farnesyl protein transferase inhibitors and other therapies targeting the Ras signal transduction pathway. *Invest New Drugs*. 1999;17:241–258.
204. Rowinsky EK, Windle JJ, Von Hoff DD. Ras protein farnesyltransferase: a strategic target for anticancer therapeutic development. *J Clin Oncol*. 1999;17:3631–3652.
205. Wood ER, Crosby RM, Davenport EA, Gilmer TM, Hunter BM, Keith BR. Biological effects of cRaf1 kinase inhibitors. *Proc Am Assoc Cancer Res*. 1999;40:4781.
206. Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, Van Becelaere K, Wiland A, Gowan RC, Teclé H, Barrett SD, Bridges A, Przybranowski S, Leopold WR, Saltiel AR. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumours in vivo. *Nat Med*. 1999; 5:810–816.
207. DeLong RK, Nolting A, Fisher M, Chen Q, Wickstrom E, Kligshsteyn M, Demirdji S, Caruthers M, Juliano RL. Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and tumor accumulation of phosphorothioate, and

- methylphosphonate oligonucleotides in nude mice. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1997;7:71–77.
208. Adjei AA, Erlichman C, Sloan JA, Hanson LJ, Reid J, Atheron P. A phase I trials of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras in combination with gemcitabine in patients with advanced cancer. *Proc ASCO.* 2000;19:722.
 209. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0.* IARC CancerBase No. 5. Lyon: IARC, 2001. <http://wwwdep.iarc.fr/globocan/globocan.htm>.
 210. Boyle P, Leon ME. Epidemiology of colorectal cancer. *Br Med Bull.* 2002;64:1-25.
 211. Parkin DM, Whelan S, Ferlay et al. (eds) *Cancer Incidence in Five Continents, vol VII.* Lyon: IARC, 1997; 143.
 212. Haenszel W, Kurihara M. Studies of Japanese migrants I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst.* 1968; 40: 43–68.
 213. Howe HL, Wingo PA, Thun MJ et al. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:824–42.
 214. Boyle P, Golia S, Daly P, Johnston P, Robertson C. Cancer mortality in Ireland. *Ann Oncol.* 2003; 14(2):323-332.
 215. Chao A, Thun MJ, Connell CJ, McCullough ML, Jacobs EJ, Flanders WD, Rodriguez C, Sinha R, Calle EE. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA* 2005;293:172-82.
 216. Park Y, Hunter DJ, Spiegelman D, Bergkvist L, Berrino F *et al.* Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. *JAMA* 2005;294:2849-57.
 217. Sandhu MS, White I, McPherson K. Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2001; 10: 439–46.
 218. Sinha R, Kulldorff M, Chow WH et al. Dietary intake of heterocyclic amines, meat-derived mutagenic activity, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2001; 10: 559–62.
 219. Tuyns AJ, Haeltermann M, Kaaks R. Colorectal cancer and the intake of nutrients: oligosaccharides are a risk factor, fats are not. A case-control study in Belgium. *Nutr Cancer.* 1987; 10: 181–96.
 220. Buring JE, Lee IM and Hennekens CH: Nonsteroidal antiinflammatory drugs and colorectal cancer. A promising hypothesis but not yet proven. *Cancer.* 1994;74:1837-1839.
 221. Shike M, Winawer SJ, Greenwald PH, Bloch A, Hill MJ and Swaroop SV: Primary prevention of colorectal cancer. The WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. *Bull World Health Organ.* 1990;68: 377-385.
 222. Bresalier RS and Kim YS: Malignant neoplasm of the large intestine. In Feldman M, Scharschmidt BF and Sleisenger MH (eds): *Gastrointestinal and*

- liver disease. WB Saunders, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, pp 1906-1942, 1998.
223. Longnecker, M.P. Alcohol consumption in relation to risk of cancers of the breast and large bowel. *Alcohol Health & Research World*. 1992;16(3):223-229.
 224. Longnecker, M.P.; Orza, M.J.; Adams, M.E.; Vioque, J.; and Chalmers, T.C. A meta-analysis of alcoholic beverage consumption in relation to risk of colorectal cancer. *Cancer Causes and Control*.1990;1(1):59-68.
 225. Kune, S.; Kune, G.A.; and Watson, L.F. Case-control study of alcoholic beverages as etiological factors: The Melbourne Colorectal Cancer Study *Nutrition and Cancer*.1987; 9(1):43-56.
 226. Potter, J.D., and McMichael, A.J. Diet and cancer of the colon and rectum: A case-control study *Journal of the National Cancer Institute*.1986;76(4):557-569.
 227. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism Alcohol and Cancer - Alcohol Alert No. 21-1993. <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/aa21.htm>.
 228. Alcohol Consumption and the Risk for Colorectal Cancer. <http://www.annals.org/cgi/content/summary/140/8/603>.
 229. Boston University. Alcohol May Increase the Risk of Colon Cancer. [http://www.bu.edu/act/alcohol and health/issues](http://www.bu.edu/act/alcohol%20and%20health/issues).
 230. Su LJ, Arab L. Alcohol consumption and risk of colon cancer: evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey I Epidemiologic Follow-Up Study. *Nutr and Cancer*. 2004;50(2):111–119.
 231. Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Kim DH, Malila N, Miller AB, Pietinen P, Rohan TE, Sellers TA, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter DJ. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies *Ann Intern Med* 2004 Apr 20;140(8):603-13
 232. Joseph C. Anderson, Zvi Alpern, Gurvinder Sethi, Catherine R. Messina, Carole Martin, Patricia M. Hubbard, Roger Grimson, Peter F. Ells, and Robert D. Shaw Prevalence and Risk of Colorectal Neoplasia in Consumers of Alcohol in a Screening Population *Am J Gastroenterol* Volume 100 Issue 9 Page 2049.
 233. Brown, Anthony J. Alcohol, tobacco, and male gender up risk of earlier onset colorectal cancer. <http://www.oncolink.com>.
 234. B. Greenwald. The DNA Stool Test - An Emerging Technology in Colorectal Cancer Screening, 2006. <http://www.touchalimentarydisease.com>.
 235. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *Journal of Pathological Bacteriology* 1932;35:323.
 236. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Wayne JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF, et al: Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*. 1993;329: 1977-1981.

237. Itzkowitz SH and Kim YS: Colonic polyps and polyposis syndromes. In Feldman M, Scharschmidt BF and Sleisenger MH (eds): *Gastrointestinal and liver disease*. WB Saunders, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, pp 1871-1905, 1998.
238. DiSario JA, Foutch PG, Mai HD, Pardy K and Manne RK: Prevalence and malignant potential of colorectal polyps in asymptomatic, average-risk men. *Am J Gastroenterol*. 1991; 86: 941-945.
239. Rex DK, Lehman GA, Hawes RH, Ulbright TM and Smith JJ: Screening colonoscopy in asymptomatic average-risk persons with negative fecal occult blood tests. *Gastroenterology*. 1991;100: 64-67.
240. Spandidos DA and Kerr IB: Elevated expression of the human ras oncogene family in premalignant and malignant tumours of the colorectum. *Br J Cancer*. 1984;49:681-688.
241. Jacoby RF, Marshall DJ, Kailas S, Schlack S, Harms B and Love R: Genetic instability associated with adenoma to carcinoma progression in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology*. 1995;109: 73-82.
242. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S and Vogelstein B: p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*. 1990;50:7717-7722.
243. Vogelstein B and Kinzler KW: The multistep nature of cancer. *Trends Genet*. 1993;9:138-141, 1993.
244. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (eds): *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
245. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230: 1350-1354.
246. Kawasaki E and Erlich H: Polymerase chain reaction and analysis of cancer cell markers. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82: 806-807.
247. Wright PA and Wynford-Thomas D: The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *J Pathol*. 1990;162:99-117.
248. Arnheim N and Erlich H: Polymerase chain reaction strategy. *Annu Rev Biochem*. 1992;61: 131-156.
249. Larrick JW: Message amplification phenotyping (MAPPING)-principles, practice and potential. *Trends Biotechnol*. 1992;10: 146-152.
250. Wang W, Kumar P, Schwarz M, Malone G, Haworth A and Kumar S: PCR amplification of 40 year-old paraffin-embedded tumour tissues: Comparison of four different DNA extraction and purification methods, *Int J Oncol*. 1994;5: 453-457.
251. Fearnhead NS, Wilding JL, Bodmer WF. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br Med Bull*. 2002;64:27-43.

252. Rashid A, Issa JP. CpG island methylation in gastroenterologic neoplasia: a maturing field. *Gastroenterology*. 2004;127:1578-88.
253. Kiaris H, Spandidos DA. Mutations of ras genes in human tumours. *Int J Oncol*. 1995;7:413-21.
254. Zachos G, Spandidos DA. Expression of ras proto-oncogenes: regulation and implications in the development of human tumors. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1997;26:65-75.
255. Zauber NP, Sabbath-Solitare M, Marotta SP, Bishop DT. K-ras mutation and loss of heterozygosity of the adenomatous polyposis coli gene in patients with colorectal adenomas with in situ carcinoma. *Cancer*. 1999;86:31-6.
256. Spandidos DA, Sourvinos G, Tsatsanis C, Zafiroopoulos A. Normal ras genes: their onco-suppressor and pro-apoptotic functions (review). *Int J Oncol*. 2002;21:237-41.
257. Abrams SI, Hand PH, Tsang KY, Schlom J. Mutant ras epitopes as targets for cancer vaccines. *Semin Oncol*. 1996;23:118-34.
258. Peyssonnaud C, Eychene A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell*. 2001;93:53-62.
259. Helmke BM, Mollenhauer J, Herold-Mende C, Benner A, Thome M, Gassler N, et al. BRAF mutations distinguish anorectal from cutaneous melanoma at the molecular level. *Gastroenterology*. 2004;127:1815-20.
260. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet*. 2003;33:19-20.
261. Yuen ST, Davies H, Chan TL, Ho JW, Bignell GR, Cox C, et al. Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and K-RAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res*. 2002;62:6451-5.
262. Jarry A, Masson D, Cassagnau E, Parois S, Laboisie C, Denis MG. Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E. *Mol Cell Probes*. 2004;18:349-52.
263. Li WQ, Kawakami K, Ruszkiewicz A, Bennett G, Moore J, Iacopetta B. BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. *Mol Cancer*. 2006;5:2.
264. Wang L, Cunningham JM, Winters JL, Guenther JC, French AJ, Boardman LA, et al. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res* 2003;63:5209-12.
265. Ikehara N, Semba S, Sakashita M, Aoyama N, Kasuga M, Yokozaki H. BRAF mutation associated with dysregulation of apoptosis in human colorectal neoplasms. *Int J Cancer*. 2005; 20:115:943-50.
266. Panagopoulos I, Mertens F, Isaksson M, Mandhal N. Absence of mutations of BRAF gene in malignant melanoma of soft parts (clear cell sarcoma of tendons and aponeuroses). *Cancer genetics and Cytogenetics*. 2005;156:74-76.
267. Lang J, Boxer M, MacKie R. Absence of exon 15 BRAF germline mutations in familial melanoma. *Human Mutation*. 2003;21: 327-330.

268. Edwards RH, Ward MR, Wu H, Medina CA, Brose MS, Volpe P, et al. Absence of BRAF mutations in UV-protected mucosal melanomas. *J Med Genet.* 2004; 41:270-272.
269. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer.* 2001;85(5):692-6.
270. Yuen ST, Chung LP, Leung SY, Luk IS, Chan SY, Ho JC, et al. Colorectal carcinoma in Hong Kong: epidemiology and genetic mutations. *Br J Cancer.* 1997;76(12):1610-6.
271. Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, Robertson M, Leppert M, Slattery ML. Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9(11):1193-7.
272. Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, Tubiolo C, Grassi N, Latteri MA, et al. Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype. *Ann Oncol.* 2002;13(9):1438-46.
273. Arun C, London N.J.M. , Hemingway D.M. Prognostic significance of elevated endothelin-1 levels in patients with colorectal cancer. *Int J Biol Markers.* 2004; 19: 32 - 37.
274. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 1997;57:808-11.
275. Minoo P, Jass JR. Senescence and serration: a new twist to an old tale. *J Pathol.* 2006;210(2):137-40.
276. Nagasaka T, Sasamoto H, Notohara K, Cullings HM, Takeda M, Kimura K, et al. Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. *J Clin Oncol.* 2004;22(22):4584-94.
277. Domingo E, Espin E, Armengol M, Oliveira C, Pinto M, Duval A, et al. Activated BRAF targets proximal colon tumors with mismatch repair deficiency and MLH1 inactivation. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004;39:138-42.
278. Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, Ota J, et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer.* 2004;108:237-42.
279. Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, Albertsen H, Levin TR, Murtaugh MA, Wolff RK, Slattery ML: Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res.* 2005, 65:6063-6069.
280. McGivern A, Wynter CV, Whitehall VL, Kambara T, Spring KJ, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, Simms LA, Leggett BA, Young J, Jass JR: Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish

- hereditary nonpolyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Fam Cancer*. 2004, 3:101-107.
281. Miyaki M, Iijima T, Yamaguchi T, Kadofuku T, Funata N, Mori T: Both BRAF and KRAS mutations are rare in colorectal carcinomas from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2004, 211:105-109.
282. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, French AJ, Westra J, Frebourg T, Espin E, Armengol M, Hamelin R, Yamamoto H, Hofstra RM, Seruca R, Lindblom A, Peltomaki P, Thibodeau SN, Aaltonen LA, Schwartz S: BRAF screening as a low cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet*. 2004, 41:664-668.
283. Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, Alhopuro P, Moutinho C, Espin E, Armengol M, Sijmons RH, Kleibeuker JH, Seruca R, Aaltonen LA, Imai K, Yamamoto H, Schwartz S Jr, Hofstra RM. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene*. 2005;24:3995-8.
284. Symvoulakis EK, Zaravinos A, Panutsopoulos D, Zoras O, Papalambros E, Sigala F, Spandidos DA. Highly conserved sequence of exon 15 BRAF gene and KRAS codon 12 mutation among Greek patients with colorectal cancer. *Int J Biol Markers*. 2007;22(1):12-8.
285. Samowitz WS, Albertsen H, Sweeney C, Herrick J, Caan BJ, Anderson KE, et al. Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(23):1731-8.
286. Slattery ML, Curtin K, Sweeney C, Levin TR, Potter J, Wolff RK, et al. Diet and lifestyle factor associations with CpG island methylator phenotype and BRAF mutations in colon cancer. *Int J Cancer*. 2007;120(3):656-63.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ
Σχετική δημοσίευση

