

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΟΛΟΓΙΑΣ
(Διευθυντής: Καθηγητής Δ.Α. Σπαντίδος)**

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Ν. ΠΑΠΑΔΑΚΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΟΠΩΝ ΥΠΕΥΘΥΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *H-ras*, *p53* ΚΑΙ *ATM* ΣΤΟΝ
ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2005

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΕΛΙΔΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

1.1 Γενικά	1
1.2 Στοιχεία ανατομικής	1
1.3 Σταδιοποίηση	3
Πίνακας 1.1 Ταξινόμηση TNM για τον καρκίνο του μαστού	3
1.4 Επίπτωση και επιδημιολογικά στοιχεία	5
1.5 Αιτιολογικοί παράγοντες	6
Πίνακας 1.2 Πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού	7
1.6 Παθοφυσιολογικοί παράγοντες και παθογένεση	9
1.7 Προγνωστικοί παράγοντες	11
Πίνακας 1.3. Οι κυριότεροι παράγοντες που αναφέρεται ότι προλέγουν την πρόγνωση του καρκίνου του μαστού	14

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΑΤΑΞΙΑΣ- ΤΗΛΑΓΓΕΙΕΚΤΑΣΙΑΣ (ATM)

2.1 Εισαγωγή	15
2.2 Δομή του γονιδίου <i>ATM</i>	16
Σχήμα 2.1. Χαρτογράφηση του γονιδίου <i>ATM</i> στο χρωμόσωμα 11q22.3.	16
2.3 Λειτουργία του γονιδίου	16
Σχήμα 2.2. Σχηματική παρουσίαση των περιοχών της πρωτεΐνης <i>ATM</i>	19
Σχήμα 2.3. Ο ρόλος του <i>ATM</i> στις κυτταρικές αποκρίσεις	20
2.4 Σχέση γονιδίου <i>ATM</i> και κακοήθειας	21

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο

ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ RAS

3.1. Γενικά	24
Πίνακας 3.1. Τα ογκογονίδια <i>ras</i>	25
3.2 Δομή των γονιδίων <i>ras</i>	25
Σχήμα 3.1. Δομή των γονιδίων <i>H-ras</i> , <i>N-ras</i> και <i>K-ras</i>	26
3.3 Ρύθμιση των γονιδίων <i>ras</i>	27
Σχήμα 3.2. Απεικόνιση των κυριότερων θέσεων ρύθμισης της μεταγραφής του γονιδίου <i>H-ras</i>	28
3.4 Η πρωτεΐνη p21	28
3.5 Ενεργοποίηση των γονιδίων <i>ras</i>	29
3.6 Μεταλλαγμένες πρωτεΐνες <i>ras</i>	30
Πίνακας 3.2 Συχνότητα ενεργοποίησης των γονιδίων <i>ras</i> σε καρκίνους διαφόρων οργάνων του ανθρώπου	33
Σχήμα 3.3. Μεταλλάξεις των γονιδίων <i>ras</i> σε καρκίνους διαφόρων οργάνων του ανθρώπου	33
3.7. Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του γονιδίου <i>H-ras</i>	33
3.7.1 Η μινιδορυφορική περιοχή (<i>VTR</i>) του ογκογονιδίου <i>H-ras</i>	34
3.7.2 Η μικροδορυφορική περιοχή του ογκογονιδίου <i>H-ras</i>	35
3.7.3 Σχέση μεταξύ των δυο πολυμορφικών θέσεων του γονιδίου <i>H-ras</i>	36
Σχήμα 3.4 Τμήμα του <i>Bam</i> HI που περιλαμβάνει το ανθρώπινο γονίδιο <i>H-ras</i>	37
Σχήμα 3.5 Μοντέλο που απεικονίζει την επίδραση του μινιδορυφορικού <i>H-ras</i> στην ρύθμιση της μεταγραφής	39
Σχήμα 3.6 Σχηματική αναπαράσταση των μικροδορυφορικών και <i>VTR</i> περιοχών στο γονίδιο <i>H-ras</i>	41

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο

ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΟ P53

4.1 Εισαγωγή	42
4.2 Δομή και οργάνωση του γονιδίου <i>p53</i>	43
Σχήμα 4.1 Γονιδιακή οργάνωση του γονιδίου <i>p53</i>	44
4.3 Δομικοί πολυμορφισμοί στο αμινοξύ 72 της ανθρώπινης <i>p53</i>	46
Σχήμα 4.2 Σχηματικό διάγραμμα των cDNA ανθρωπίνων <i>p53</i>	49

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

5.1 Προέλευση των δειγμάτων	50
5.2 Εκχύλιση DNA	50
5.2.1 Εκχύλιση DNA από υλικό βιοψίας	50
5.2.2 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από περιφερικό αίμα	51
5.3. Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR)	51
5.3.1 Αρχές της μεθόδου	51
5.3.2 Ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR	52
5.3.3. Ρυθμιστικά διαλύματα της PCR	54
5.3.4. Σχεδιασμός εκκινήτων και συνθήκες των αντιδράσεων PCR	54
Πίνακας 5.1. Εκκινήτες, συνθήκες PCR αντιδράσεων και προϊόντα PCR και RFLP για την ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών του ATM, της 5' HRM και VTR του H-ras και στο κωδικόνιο 72 της <i>p53</i>	57
5.4 Μέθοδοι προσδιορισμού πολυμορφισμών με ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)	58

5.5. Ηλεκτροφόρηση DNA	58
5.6. Χρώση νουκλεϊκών οξέων	59
5.6.1. Χρώση με βρωμιούχο εθίδιο	59
5.6.2. Χρώση με νιτρικό άργυρο	59
5.7 Στατιστική ανάλυση - Ηλεκτρονική επεξεργασία εικόνας	60
5.8. Εταιρείες προέλευσης των υλικών	60

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1. Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν, κλινική και ιστολογική εξέταση	63
6.2 Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στα γονίδια ATM, H-ras και p53 σε καρκινικές αλλοιώσεις του μαστού και σε δείγματα ελέγχου	63
6.2.1. Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στο γονίδιο ATM σε καρκινικές αλλοιώσεις του μαστού και σε φυσιολογικά δείγματα αίματος	63
Εικόνα 6.1	65
Πίνακας 6.1. Αλληλικές συχνότητες (C/G) στα δείγματα ασθενών με σποραδικό καρκίνο του μαστού καθώς και σε δείγματα φυσιολογικών ατόμων	65
Πίνακας 6.2. Κατανομή σημειακού πολυμορφισμού του γονιδίου ATM σε ασθενείς με καρκίνο μαστού σε συσχέτιση με την ηλικία των ασθενών, το κλινικό στάδιο, τον ιστολογικό βαθμό και τα επίπεδα των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης	66
6.2.2 Ανάλυση της 5' εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας του H-ras σε δείγματα σποραδικού καρκίνου σε μαστό καθώς και σε φυσιολογικά δείγματα	67
6.2.2.1 Γενικά	67

Εικόνα 6.2	68
6.2.2.2 Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν	68
6.2.2.3 Ανάλυση της 5' εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας του H-ras σε φυσιολογικά δείγματα περιφερικού αίματος	69
6.2.2.4 Ανάλυση της 5' εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας του H-ras σε δείγματα από γυναίκες με σποραδικό καρκίνο μαστού	69
Πίνακας 6.3. Συχνότητα των αλληλίων P1, P2 και P3 στα φυσιολογικά δείγματα αίματος	70
Πίνακας 6.4 Συχνότητα των αλληλίων P1, P2 και P3 στα δείγματα από σποραδικούς καρκίνους μαστού	70
Πίνακας 6.5 Συχνότητα των αλληλίων P1, P2 και P3 στα δείγματα αίματος από φυσιολογικές γυναίκες και στα καρκινικά δείγματα μαστού	70
6.2.2.5 Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν	71
6.2.2.6 Ανάλυση της 5' εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας του H-ras σε δείγματα σποραδικού καρκίνου σε μαστό καθώς και σε αντίστοιχα φυσιολογικά δείγματα	71
Εικόνα 6.3. Παράδειγμα δείγματος που επιδεικνύει απώλεια ετεροζυγωτίας για την πολυμορφική θέση του εσωνίου 1 του γονιδίου H-ras	72
6.2.3 Ανάλυση της VTR περιοχής του H-ras σε δείγματα σποραδικού καρκίνου σε μαστό καθώς και σε αντίστοιχα φυσιολογικά δείγματα	72
6.2.3.1 Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν	72
6.2.3.2 Ανάλυση της VTR περιοχής του γονιδίου H-ras	73
Εικόνα 6.4.	74
6.2.4 Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στο γονίδιο p53 σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού και σε φυσιολογικά δείγματα περιφερικού αίματος	74
6.2.4.1 Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν	74

6.2.4.2 Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στο γονίδιο p53 σε καρκινικά δείγματα μαστού καθώς και σε δείγματα ελέγχου	74
Πίνακας 6.6. Συχνότητες των πολυμορφισμών στο κωδικόνιο για το αμινοξύ 72 της p53	76
Εικόνα 6.5	76
Εικόνα 6.6	77
Πίνακας 6.7. Συσχέτιση των σημειακών πολυμορφισμών του γονιδίου p53 με την ηλικία, του κλινικό στάδιο, τον ιστολογικό βαθμό και τα επίπεδα των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού	78

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ -ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1 Εισαγωγή	79
7.2 Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στα γονίδια <i>ATM</i> , <i>H-ras</i> και <i>p53</i> σε καρκινικές αλλοιώσεις του μαστού και σε δείγματα ελέγχου	79
7.2.1. Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στο γονίδιο <i>ATM</i> σε καρκινικές αλλοιώσεις του μαστού και σε φυσιολογικά δείγματα αίματος	79
7.2.2 Ανάλυση της 5' εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας του <i>H-ras</i> σε δείγματα σποραδικού καρκίνου σε μαστό καθώς και σε φυσιολογικά δείγματα	80
7.2.3 Απώλεια ετεροζυγωτίας πολυμορφικής θέσης <i>HRM</i> του γονιδίου <i>H-ras</i>	81
7.2.4 Ανάλυση της <i>VTR</i> περιοχής του <i>H-ras</i> σε δείγματα σποραδικού καρκίνου σε μαστό καθώς και σε αντίστοιχα φυσιολογικά δείγματα	81
7.2.5 Ανάλυση σημειακών πολυμορφισμών στο γονίδιο <i>p53</i> σε δείγματα ασθενών με καρκίνο μαστού	82

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	84
---------------------	-----------

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Ατομικά και οικογενειακά στοιχεία.

Όνομα : Εμμανουήλ
Επίθετο: Παπαδάκης
Όνοματεπώνυμο πατέρα: Νικόλαος Παπαδάκης
Όνοματεπώνυμο μητέρας: Μαρία Παπαδάκη
Ημερομηνία γέννησης: 22/01/1974
Τόπος γέννησης: Ηράκλειο Κρήτης
Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμος
Όνοματεπώνυμο συζύγου: Δέσποινα Δοκιανάκη
Διεύθυνση: Οδός Μάνου Κατράκη, Φοινικιά
ΤΘ 531, ΤΚ 71500,
Ηράκλειο Κρήτης
Τηλέφωνο: 2810 259884
6946 110555
Εθνικότητα: Ελληνική

Εκπαίδευση.

Μέση Εκπαίδευση	18/06/1991	4ο Λύκειο Ηρακλείου, Βαθμός:19 1/11(άριστα)
Ανώτερη Εκπαίδευση	22/09/1992-27/07/1998	Πτυχίο τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης Σειρά επιτυχίας εισόδου:12ος Βαθμός : 7.26 (Λίαν Καλώς)
Υπηρεσία υπαίθρου	7/09/1998-6/12/1999	Κέντρο Υγείας Καστελλίου Πεδιάδος, Νομού Ηρακλείου
Στρατιωτική Θητεία	27/3/2000-27/9/2001	Στρατιώτης Υγειονομικού ΚΕΥΓ Άρτας, 95 ΤΥΕΘ Ρόδου, ΠΒΚ Χανίων
Διδακτορική διατριβή	10/11/1999-	Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στα εργαστήρια Ιολογίας του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης (Καθηγητής Δ. Α. Σπαντίδος) &

Παν/μιακού Νοσοκομείου
Ηρακλείου.

“Μελέτη γενετικών τόπων,
υπεύθυνων για τη λειτουργία των
γονιδίων H-ras, p53 και ATM στον
καρκίνο του μαστού”

Κλινική εμπειρία	20/12/2001- 20/7/2003	Ως ειδικευόμενος Παθολογίας στη Γ' Παθολογική Κλινική του Β.Π.Γ.Ν.Η.
	22/09/2003- 11/01/2004	Ως υπεράριθμος ειδικευόμενος στην Ογκολογική Κλινική του Β.Π.Γ.Ν.Η.
	12/01/2004- σήμερα	Ως υπεράριθμος ειδικευόμενος στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Β.Π.Γ.Ν.Η.

Ξενογλωσσες δημοσιεύσεις

1. **Papadakis EN**, Dokianakis DN, and Spandidos DA. : P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. Mol Cell Biol Res Comm. 3:389-392, 2000.
2. **E.N. Papadakis**, D.N. Dokianakis, and D.A. Spandidos : Genetic analysis of H-ras intron-1 polymorphic and variable tandem repeat regions in human breast cancer. Int J Biol Markers, Vol 18 no 3, pp 195-199 (2003).

Ανακοινώσεις σε συνέδρια:

1. **Papadakis EN**, Dokianakis DN and Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. 5th World Congress on Advances in Oncology and .3rd International Symposium on Molecular Medicine. October 19-21, 2000. Heraklion, Greece.
2. Μ. Κοζυράκη, Ι. Πεδιαδίτης, Ε. Ιωαννίδου, Ε. Ζαμπουλάκης, **Ε. Παπαδάκης**, Γ. Χατζημηνάς, Μ. Λεοντάκη, Κ. Χαριτάκης, Σ. Σουρής, Μ. Αντωνίου, Ν. Ζερβάκης. Αύξηση της επίπτωσης της σπλαγγχνικής λείσμανίασης. Υπάρχουν εστίες στην Κρήτη; 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 1-3 Νοεμβρίου 2002, Χανιά Κρήτης
3. Ι. Πεδιαδίτης, Ε. Ιωαννίδου, **Ε. Παπαδάκης**, Κ. Πετράκη, Κ. Ανυφαντάκης, Γ. Σκανδαλάκης, Ε. Ζαμπουλάκης, Ε. Χαϊνάκη, Π. Πλατάκη, Ν. Ζερβάκης. Φάσμα και δείκτες νοσηλείας σε τρεις παθολογικές κλινικές. 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 1-3 Νοεμβρίου 2002, Χανιά Κρήτης

4. Ι. Πεδιαδίτης, Ε. Ιωαννίδου, Κ. Ανυφαντάκης, Κ. Πετράκη, **Ε. Παπαδάκης**, Γ. Σκανδαλάκης, Ε. Χαϊνάκη, Ι. Καράλης, Π. Πλατάκη, Ν. Ζερβάκης. Χρήση αντιβιοτικών σε τρεις κλινικές. 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 1-3 Νοεμβρίου 2002, Χανιά Κρήτης
5. Ι. Πεδιαδίτης, Ε. Ιωαννίδου, Κ. Πετράκη, Κ. Ανυφαντάκης, **Ε. Παπαδάκης**, Γ. Σκανδαλάκης, Ε. Χαϊνάκη, Μ. Σταυρουλάκη, Π. Πλατάκη, Ν. Ζερβάκης. Χρήση επεμβατικών συσκευών στους ασθενείς τριών παθολογικών κλινικών. 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 1-3 Νοεμβρίου 2002, Χανιά Κρήτης
6. Α. Δερμιτζάκης, Μ. Ξυπάκης, Μ. Δασκαλάκη, Γ. Αβραμάκης, Γ. Κουτσοδήμου, **Ε. Παπαδάκης**, Αικ. Αποστολάκη, Σ. Δερμιτζάκης, Γ. Νικολαΐδης. Διεύρυνση του QRS και ισοογκωτική χάλαση αριστεράς και δεξιάς κοιλίας. 30ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 27 Απριλίου- 1 Μαΐου 2004, Αθήνα
7. Α. Δερμιτζάκης, Μ. Ξυπάκης, Μ. Δασκαλάκη, Α. Σελιανάκης, Κ. Τσουτσουμάνου, Κ. Μεϊδάνης, **Ε. Παπαδάκης**, Θ.Ε. Δερμιτζάκη, Γ. Στρατηγάκης. Διατάσεις δεξιού κόλπου επί εμφράγματος δεξιάς κοιλίας. 30ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 27 Απριλίου- 1 Μαΐου 2004, Αθήνα
8. Κ. Τσουτσουμάνου, Γ. Αποστολάκης, Κ. Μεϊδάνης, Ε. Λαμπρογιαννάκης, Α.Γ. Αποστολάκη, Α. Δερμιτζάκης, Γ. Στρατηγάκης, Λ. Πλουμίδης, Ε. Αστρινάκη, Α. Κιούλπαλης, Α. Κοζύρη, Η. Χαραλάμπους, **Ε. Παπαδάκης**, Γ. Νικολαΐδης. Υπολιπιδαιμική αγωγή και επίπεδα χοληστερίνης στους ασθενείς με στεφανιαία νόσο σε σύγκριση με τους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου. 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, 6-8 Φεβρουαρίου 2004, Αθήνα
9. **Ε. Παπαδάκης**, Ε. Αστρινάκη, Ο. Κουργιεράκη, Ε. Ζαμπουλάκης, Μ. Σταυρουλάκη, Σ. Καρβουνάρης, Χ. Μακρυγιαννάκη, Σ. Μανουσάκης, Α. Συκιανάκης, Α. Κιούλπαλης, Η. Χαραλάμπους, Γ. Βρούχος. Διερεύνηση των αιτιών εισόδου στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας Βενιζελείου Νοσοκομείου. 12^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 28-31 Οκτωβρίου 2004, Ελούντα Κρήτης
10. Σ. Καρβουνάρης, Η. Χαραλάμπους, Ε. Λαμπρογιαννάκης, Μ. Ζηδιανάκης, Ε. Φωτάκη, Σ. Μανουσάκης, **Ε. Παπαδάκης**, Γ. Βρούχος. Διερεύνηση της διάρκειας νοσηλείας ασθενών με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου στη στεφανιαία μονάδα ανά έτος. 12^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 28-31 Οκτωβρίου 2004, Ελούντα Κρήτης
11. Α. Δερμιτζάκης, Α. Ζαχαράκη, Κ. Τσουτσουμάνου, Γ. Αβραμάκης, Α. Σελιανάκης, Α. Αποστολάκη, Γ. Αποστολάκης, **Ε. Παπαδάκης**, Γ. Νικολαΐδης. Επίδραση της αμιοδαρόνης στη λειτουργικότητα της αορτής. 25^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, 17-20 Νοεμβρίου 2004, Αθήνα
12. Α. Δερμιτζάκης, Α. Ζαχαράκη, Κ. Τσουτσουμάνου, Ε. Λαμπρογιαννάκης, Α. Σελιανάκης, **Ε. Παπαδάκης**, Γ. Νικολαΐδης. Οι μεταεκτακτοσυστολές εκφράζουν καλύτερα τη διαστολική λειτουργία της ΑΡ κοιλίας; 25^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, 17-20 Νοεμβρίου 2004, Αθήνα.

Ξένες γλώσσες

α) Αγγλικά

First certificate in English.
University of Cambridge (Lower)
Grade: A

Εμπειρία σε Η/Υ

- Λειτουργικά συστήματα: MS-DOS, MS-Windows
- Γλώσσα προγραμματισμού: Pascal
- Μηχανοργάνωση: Office for Windows
- Εμπειρία σε σύστημα Mackintosh
- Σεμινάριο «Καταγραφή, Διαχείριση, ανάλυση και στατιστική αξιοποίηση ιατρικών δεδομένων». Ηράκλειο Κρήτης 15-30 Μαΐου 2004

Εκπαιδευτικό έργο ως εκπαιδευτής:

Ειδικότητα Χειρουργικής Νοσηλευτικής Β.Π.Γ.Ν.Η. έτους 2003-2004, στα μαθήματα «Χημειοθεραπεία και άρρωστος» και «Χημειοθεραπευτικές διαδικασίες»

Επιμορφωτικά Σεμινάρια

- 1) Σύσταση τροφίμων και ανάλυση. 1-5 Αυγούστου 1994. Ιατρική σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- 2) 6th Postgraduate Seminar Course in Liver Neoplasias-Therapeutic Options. October 1-3, 1999. Heraklion, Crete, Greece.
- 3) 9^o Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο. Νοέμβριος 12-15, 1998. Ηράκλειο, Κρήτης.
- 4) 3rd World Congress on Advances in Oncology and 1st International Symposium on Molecular Medicine. October 15-17, 1998. Island of Crete, Greece.
- 5) 5th World Congress on Advances in Oncology and 3rd International Symposium on Molecular Medicine. October 19-21, 2000. Heraklion, Greece.
- 6) 6th World Congress on Advances in Oncology and 4th International Symposium on Molecular Medicine. October 18-20, 2001. Heraklion, Greece.
- 7) 7th World Congress on Advances in Oncology and 5th International Symposium on Molecular Medicine. October 10-12, 2003. Hersonissos, Crete, Greece

- 8) 8th World Congress on Advances in Oncology and 6th International Symposium on Molecular Medicine. October 16-18, 2003. Hersonissos, Crete, Greece
- 9) 11^o Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο. Χανιά, 1-3 Νοεμβρίου 2002
- 10) ΑΘΗΡΟΘΡΟΜΒΩΣΗ: Σύγχρονες απόψεις και αμφιλεγόμενα θέματα. 17 Απριλίου 2002, Ηράκλειο Κρήτης
- 11) 16^o Διαπανεπιστημιακό Ιατρικό Συμπόσιο. 21-23 Ιουνίου 2002. Χερσόνησος, Ηράκλειο Κρήτης
- 12) 9^o Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο. Ηράκλειο Κρήτης, 5-8 Νοεμβρίου 1998
- 13) 8^η Μετεκπαιδευτική Παιδιατρική Ημερίδα. 29 Μαρτίου 1998, Ηράκλειο Κρήτης
- 14) 7^o Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής και Γυναικολογίας. Ηράκλειο, 14-17 Μαΐου 1997
- 15) 4^o Διαπανεπιστημιακό Ουρολογικό Συμπόσιο/ 3^o Συμπόσιο Ελληνογερμανικού Συνδέσμου Ουρολόγων. 12-16 Ιουνίου 1997, Ηράκλειο Κρήτης
- 16) 2^o Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος/ 2^o Πανερωπαϊκό Συμπόσιο Φοιτητών Ιατρικής. Θεσσαλονίκη 3-5 Μαΐου 1996
- 17) 9^o Διαπανεπιστημιακό Ιατρικό Συμπόσιο. Πανεπιστήμιο Κρήτης 17-19 Νοεμβρίου 1995
- 18) Μαθήματα Βασικής Ανοσολογίας. Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, 20/2/1996-14/5/1996
- 19) Ημερίδα: Από τον τραυματισμό στην επανένταξη. 16/12/1995, Ηράκλειο Κρήτης
- 20) Εκπαιδευτική ημερίδα Καρδιολογικής Κλινικής Πε.Πα.Γ.Ν.Η., Ηράκλειο 3 Οκτωβρίου 1995
- 21) Σεμινάριο Κλινικής Γαστρεντερολογίας. 14 Μαρτίου 1998, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης
- 22) 7^o Διαπανεπιστημιακό Συνέδριο Ακτινολογίας. 24-26 Οκτωβρίου 1997, Ηράκλειο Κρήτης
- 23) Επιστημονικό Συμπόσιο «Πολυπαραγοντική προσέγγιση του καρδιαγγειακού κινδύνου: Μια πρόκληση για το μέλλον». Ηράκλειο 28-29 Νοεμβρίου 2003
- 24) 1^o Παγκρήτιο Συμπόσιο Επεμβατικής Καρδιολογίας. Ηράκλειο 7 Φεβρουαρίου 2004
- 25) Σεμινάριο «Καταγραφή, Διαχείριση, ανάλυση και στατιστική αξιοποίηση ιατρικών δεδομένων». Ηράκλειο Κρήτης 15-30 Μαΐου 2004
- 26) 30^o Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο. Αθήνα 27 Απριλίου- 1 Μαΐου 2004.
- 26) 17^o Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας. Ηράκλειο Κρήτης, 29/10- 2/11/1997
- 27) 15^o Πανελλήνιο Συνέδριο Ελλήνων Νευρολόγων. Ηράκλειο Κρήτης 15-18 Οκτωβρίου 1997
- 28) 14^o Συμπόσιο Καρδιολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Κρήτης (Pulse and Cardio Electrics 2004): Διαγνωστικές και Θεραπευτικές Εξελίξεις στην Καρδιολογία. Ηράκλειο 2-4 Ιουλίου 2004
- 29) 9th World Congress on Advances in Oncology and 7th International Symposium on Molecular Medicine. Hersonissos, Crete, Greece. October 14-16, 2004
- 30) 12^o Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 28-31 Οκτωβρίου 2004, Ελούντα Κρήτης
- 31) 25^o Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, 17-20 Νοεμβρίου 2004, Αθήνα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μια από τις δυο συχνότερες μορφές καρκίνου που προσβάλλουν τις γυναίκες στον οικονομικά ανεπτυγμένο κόσμο. Οι κυριότεροι προδιαθεσικοί παράγοντες της νόσου είναι το οικογενειακό ιστορικό, η έκθεση σε ορμόνες, η έκθεση σε ακτινοβολία, καλοήθεις υπερπλαστικές αλλοιώσεις στο μαστό, προηγούμενο ιστορικό καρκίνου του μαστού στο άτομο καθώς και η πρόσληψη αλκοόλ και ζωικών λιπών.

Ο καρκίνος του μαστού παρουσιάζει υπερπλαστική πορώδη ή επιθηλιακή λοβώδη ανάπτυξη με σταδιακή εμφάνιση γενετικών αλλαγών (συμπεριλαμβανομένων αυτών στα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια) που οδηγεί σε μονοκλωνική ανάπτυξη προοδευτικά κακοηθών κυττάρων. Η συμμετοχή συγκεκριμένων κυτταρικών γονιδίων στο καρκίνο του μαστού καθώς και η προσπάθεια αναζήτησης του επακριβούς ρόλου τους αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της υψηλής συχνότητας της νόσου.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να μελετηθούν οι γενετικοί τόποι που επηρεάζουν άμεσα την λειτουργία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων *ATM* και *p53* καθώς και του ογκογονιδίου *H-ras* σε υλικό βιοψιών από γυναίκες με σποραδικό καρκίνο του μαστού.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *ATM* είναι ένα πρόσφατα κλωνοποιημένο γονίδιο. Εδράζεται στην περιοχή 11q23.1 και εμπλέκεται συχνά στην ανάπτυξη του συνδρόμου της Αταξίας Τηλαγγειεκτασίας, καθώς και στο σποραδικό καρκίνο του μαστού. Οι ετερόζυγοι φορείς του γονιδίου *ATM* διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Βασισμένοι στα ερευνητικά ευρήματα της μελέτης αυτής, δείξαμε ότι το ποσοστό της ετεροζυγωτίας στο *ATM* γονίδιο ήταν σχετικά αυξημένο στα δείγματα των γυναικών με καρκίνο του μαστού σε σχέση με τα δείγματα των φυσιολογικών γυναικών.

Το γονίδιο *H-ras* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη P21. Η ενεργοποίηση του συγκεκριμένου ογκογονιδίου εμπλέκεται στην καρκινογένεση του μαστού. Το *H-ras* περιέχει μια πολυμορφική περιοχή στο πρώτο εσώνιο κοντά στο 5' άκρο του γονιδίου. Τα αλληλία P1, P2 και P3 περιέχουν αντίστοιχα 4, 2 και 3 επαναλήψεις ενός συγκεκριμένου εξανουκλεοτιδίου στην περιοχή αυτή. Επίσης, το *H-ras* φέρει περιοχή mini satellite DNA, τη *VTR*, περίπου 1000 βάσεις μετά το τέλος του γονιδίου, που εμφανίζει ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) με την προηγούμενη περιοχή. Στα συγκεκριμένα δείγματα μελετήθηκε η παρουσία των διαφόρων αλληλίων και διαπιστώθηκε διαφορά στην κατανομή τους ανάμεσα στα καρκινικά και τα φυσιολογικά δείγματα. Η ομοζυγωτία του P1 ήταν το κυρίαρχο γεγονός στις γυναίκες με καρκίνο του μαστού και το αλληλίο P1 ήταν επίσης το συχνότερο.

Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε και η παρουσία γενετικής αστάθειας στην περιοχή *VTR* του γονιδίου *H-ras* σε ζεύγη δειγμάτων φυσιολογικού και καρκινικού ιστού από νεοπλασία μαστού. Η περιοχή *VTR* εντοπίζεται περίπου 1000 νουκλεοτιδικές βάσεις μετά από τη θέση πολυαδενυλίωσης και προκύπτει από την επανάληψη μιας αλληλουχίας 28 βάσεων. Η αλληλουχία αυτή επαναλαμβάνεται 30 ως 100 φορές. Εμφανίστηκε αστάθεια στον αριθμό επαναλήψεων του πυρήνα επανάληψης σε μικρό ποσοστό ενώ δεν εμφανίστηκε φαινόμενο απώλειας ετεροζυγωτίας.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο της *p53* παρουσιάζει πολυμορφισμό στο αμινοξύ 72 της πρωτεΐνης P53, όπου εμφανίζεται είτε το αμινοξύ της προλίνης είτε το αμινοξύ της αργινίνης. Η ομοζυγωτία της αργινίνης θεωρείται πιθανός προδιαθεσικός παράγοντας σε διάφορες μορφές καρκίνου. Ο γονότυπος της *p53* προσδιορίστηκε στα δείγματα καρκίνου του μαστού καθώς και σε φυσιολογικά δείγματα. Ταυτόχρονα έγινε προσπάθεια ανίχνευσης των συσχετίσεων μεταξύ των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων των ασθενών και της γενετικής σύστασης του κωδικονίου 72 της πρωτεΐνης P53. Από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι η ομοζυγωτία της αργινίνης στα καρκινικά δείγματα απαντάται με σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ όλα τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στατιστικά για πιθανές συσχετίσεις μεταξύ τους.

Η ταυτόχρονη ανίχνευση γενετικών αλλοιώσεων σε αυτούς τους γενετικούς τόπους, αποτελεί πιθανώς ένα σημαντικό βήμα για την δημιουργία μέρους των καρκίνων αυτών, ενώ δεν αποκλείεται η αλληλεπίδραση και η συνεργιστική δράση με άλλους παράγοντες.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the two most common types of cancer affecting women in the developed world. The etiology of breast cancer is multifactorial, and the most important predisposing factors are family history, hormonal exposure, radiation exposure, benign hyperplastic breast lesions, previous history of breast cancer, alcohol intake, and animal fat intake.

Breast cancer manifests with hyperplastic ductal or epithelial lobular growth, with gradual development of genetic alterations (including those concerning oncogenes and tumor suppressor genes) leading to monoclonal development of gradually malignant cells.

The participation of specific genes in breast cancer, together with the effort to discover their exact role, is of great interest because of the disease's high incidence.

In the present study, the implication of tumor suppressor genes *ATM* and *p53* along with the oncogene *H-ras* was investigated in biopsies from women with sporadic breast cancer.

The tumor suppressor gene *ATM* is a recently cloned gene. It is located in 11q23.1, and is often implicated in the development of the Ataxia-Telangiectasia syndrome and sporadic breast cancer. *ATM* heterozygous gene carriers bear a greater risk of developing breast cancer. In the lesions examined, *ATM* heterozygosity was elevated in sporadic breast cancer and could represent a potential risk factor for tumorigenesis in the breast.

H-ras is a member of the *ras* family of genes, codes for P21, and its' activation has been reported to be correlated with breast carcinogenesis. The first intron of *H-ras* gene (*HRM*) possesses a polymorphic site near the 5' end of the gene. Alleles P1, P2, and P3 contain 4, 2 and 3 repetitions of a single hexanucleotide region respectively. Moreover, *H-ras* bears a minisatellite *VTR*, at the 3' end of the gene, which displays linkage disequilibrium with *HRM*. There was a significant overrepresentation of P1 in the investigated breast cancer lesions. Our results possibly indicate that P1 homozygosity may represent a potential risk factor for breast carcinogenesis.

Alterations of the *VTR* minisatellite at the 3' end of the *H-ras* gene were detected. In a single case, a shift in the mobility of the *VTR* alleles was observed after comparison of the amplification patterns of *VTR* between normal and breast cancer tissue.

P53 gene is polymorphic at amino acid 72 of its' encoding protein, resulting in an arginine or proline amino acid residue. It is suggested that *p53* Arg homozygosity could represent a risk factor for

patients with breast cancer lesions. The results of *p53* polymorphism distribution were correlated with clinicopathological parameters of the patients, but no statistical correlation was observed. In the present study, there was an overrepresentation of homozygous *p53* Arg compared to heterozygous or homozygous Pro alleles.

In conclusion, detection of multiple alterations in these genetic loci may be an important step in the early diagnosis of breast cancer, while interactions with other factors can not be excluded.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιολογίας του Τμήματος Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, κατά το χρονικό διάστημα 2000-2004.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους με βοήθησαν στην πραγματοποίηση αυτής της διατριβής και κυρίως τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δ. Α. Σπαντίδο, για το αμέριστο ενδιαφέρον του, τις πολύτιμες συμβουλές του καθώς και την επιστημονική γνώση και εμπειρία που μου μετέφερε. Πολλές ευχαριστίες οφείλω και στα μέλη της τριμελούς επιτροπής αυτής της διατριβής Αναπληρωτή Καθηγητή Οδυσσέα Ζώρα και Αναπληρωτή Καθηγητή Ευάγγελο Ξυνό.

Ευχαριστώ επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή Γεώργιο Σουρβίνο, τον Επίκουρο Καθηγητή Αλέξανδρο Ζαφειρόπουλο και τον Λέκτορα Χρήστο Τσατσάνη για τη συνεχή υποστήριξή τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης και ιδιαίτερα τους: Ν. Σουλιντζή, Γ. Σούφλα, Ζ. Σαριδάκη, Κ. Μπιλίρη, Ι. Γλαράκη και Δ. Πανουτσόπουλο.

Τέλος, δεν θα πρέπει να παραλείψω να ευχαριστήσω τη σύζυγό μου κ. Δ. Δοκιανάκη καθώς και τους γονείς μου για την αμέριστη βοήθεια και κατανόησή τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

1.1 Γενικά

Στο μαστό του ανθρώπου συναντώνται διάφοροι τύποι καρκίνου, ο καθένας από τους οποίους χαρακτηρίζεται από μια συγκεκριμένη ιστολογική εμφάνιση. Ο όρος *Καρκίνος του Μαστού* συνήθως αναφέρεται στο αδenoκαρκίνωμα, το οποίο είναι το πιο συχνό κακόηθες νεόπλασμα στο μαστό και μαζί με τον καρκίνο του πνεύμονα, ένας από τους δύο πιο συχνούς καρκίνους στις γυναίκες του αναπτυγμένου κόσμου. Οι πιο σπάνιοι πρωτοπαθείς καρκίνοι του μαστού περιλαμβάνουν το φυλλοειδές κυστεοσάρκωμα, διάφορα σαρκώματα και λεμφώματα. Καρκίνοι από άλλες πρωτοπαθείς εστίες όπως το δέρμα (μελάνωμα), ο πνεύμονας, οι ωθήκες, η μήτρα, ο προστάτης και η ουροδόχος κύστη μπορούν μερικές φορές να δώσουν μεταστάσεις στο μαστό, και οι μεταστάσεις του καρκίνου του μαστού στον αντίθετο μαστό δεν είναι σπάνιες.

Ο καρκίνος του μαστού περιστασιακά διαγιγνώσκεται και στους άνδρες, σε ένα ποσοστό που φθάνει περίπου το 1% της επίπτωσης του στις γυναίκες. Ο καρκίνος του μαστού στις γυναίκες αποτελεί μια από τις παλαιότερες ασθένειες στην ιατρική βιβλιογραφία, έχοντας περιγραφεί σε αρχαία Αιγυπτιακά κείμενα. Έχει υπάρξει επίσης ένας από τους πιο καλά μελετημένους καρκίνους και παραμένει στο επίκεντρο της προσοχής της σύγχρονης επιστήμης. Αν και έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικές πρόοδοι στην κατανόηση, διάγνωση, και κλινική αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού, δεν έχει επιτευχθεί ακόμα ενιαία θεραπεία όλων των περιπτώσεων (Humes HD et al, 2000).

1.2 Στοιχεία ανατομικής

Φυσιολογικά ο μαστός αποτελείται από εξειδικευμένο επιθηλιακό μαζικό ιστό, ένα εξωτερικό στρώμα δέρματος, υποδόριο λίπος και συνδετικό ιστό, νεύρα, αίμα και λεμφαγγεία, και υποστηρικτική μεσοκυττάρια ουσία. Ο εξειδικευμένος μαζικός ιστός αποτελείται από πολυάριθμους πόρους, τοποθετημένους σε διαπλεκόμενες δενδροειδείς δομές που έχουν τη ρίζα τους στη θηλή και

καταλήγουν στα εκκριτικά λοβία. Η θηλή περιβάλλεται από μια σκουρόχρωμη άλω. Επειδή η ανάπτυξη του μαζικού ιστού επηρεάζεται θετικά από τις γυναικείες ορμόνες, συμπεριλαμβανομένης της προγεστερόνης και των οιστρογόνων, ο ανδρικός μαστός είναι ανατομικά άρτιος αλλά πλήρως υποπλαστικός σε σύγκριση με αυτόν των θηλέων μετεφηβικής ηλικίας.

Τα περισσότερα αδενοκαρκινώματα του μαστού φαίνεται ότι ορμώνται από τα πορώδη επιθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται κοντά στην ή ακριβώς πάνω στην ένωση ενός πόρου με ένα λοβίο. Αυτοί οι καρκίνοι μπορεί να είναι *in situ* ή διηθητικοί. Τα καρκινώματα *in situ* ταξινομούνται περαιτέρω ως λοβώδη καρκινώματα *in situ* (LCIS) ή πορώδη καρκινώματα *in situ* (DCIS). Το πορώδες *in situ* καρκίνωμα καλείται συχνά και ενδοπορώδες, ένας όρος που συχνά αποδίδεται εσφαλμένα στο διηθητικό πορώδες καρκίνωμα. Το DCIS και το LCIS δεν διηθούν το παρέγχυμα ή το συνδετικό ιστό του μαστού και έχουν πολύ χαμηλή πιθανότητα να δώσουν μεταστάσεις. Τα διηθητικά αδενοκαρκινώματα του μαστού που διηθούν τους γύρω φυσιολογικούς ιστούς κατατάσσονται επίσης σε λοβώδη και πορώδη, με τα τελευταία να υπερέχουν σε συχνότητα. Περίπου 15% των καρκίνων του μαστού έχουν «ειδικούς» ιστολογικούς χαρακτήρες, συμπεριλαμβανομένων των βλενωδών, θηλωδών, μυελωδών, σωληνωδών, και αδενοειδών κυστικών υποτύπων.

Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να αναπτύσσονται στο φυσιολογικό μαζικό παρέγχυμα καθώς και στο συνδετικό ιστό καλείται *διήθηση*. Αυτή η ιδιότητα σχετίζεται με την ικανότητα των κυττάρων αυτών να αναπτύσσονται σε σημεία διαφορετικά από τον ίδιο το μαστό, συμπεριλαμβανομένων και μη παρακείμενων ιστών- μια διαδικασία που καλείται *μετάσταση*. Τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν πρόσβαση σε άλλους ιστούς μέσω της ροής του αίματος και της λέμφου. Η πιο συχνή εστία μετάστασης είναι οι μασχαλιαίοι λεμφαδένες. Ο αριθμός των μασχαλιαίων λεμφαδένων που περιέχουν καρκινικά κύτταρα είναι ένας καλός δείκτης της τάσης του πρωτοπαθούς καρκίνου να μεθίσταται σε απώτερα ανατομικά σημεία όπως τα οστά, οι πνεύμονες, το ήπαρ, και ο εγκέφαλος.

1.3 Σταδιοποίηση

Ο καρκίνος του μαστού μπορεί να σταδιοποιηθεί με τον υπολογισμό του μεγέθους του όγκου (T), τη διήθηση των λεμφαδένων (N), και την παρουσία ή απουσία μεταστάσεων (M). Η ταξινόμηση TNM για τον καρκίνο του μαστού που καθιερώθηκε από τη Διεθνή Ένωση Κατά του Καρκίνου (Union International Contra le Cancrum) και την Αμερικάνικη Επιτροπή για τη Σταδιοποίηση του Καρκίνου (AJCC, 1999) φαίνεται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1 Ταξινόμηση TNM για τον καρκίνο του μαστού

T (Μέγεθος όγκου)	
Tis	<i>In situ</i>
T1	≤ 2 cm
T2	2 -5 cm
T3	> 5 cm
T4	Επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα ή το δέρμα
N (Λεμφαδενική συμμετοχή)	
N0	Καμία
N1	Ευκίνητος, σύστοιχος μασχαλιαίος
N2	Καθηλωμένος, σύστοιχος μασχαλιαίος
N3	Εσωτερικός μαστικός
M (Μεταστάσεις)	
M1	Συμπεριλαμβάνει υπερκλειδίους λεμφαδένες
ΣΤΑΔΙΑ	
0	Tis
I	T1N0
IIA	T1N1
	T2N0
IIB	T2N1

	T3N0
IIIΑ	T3N1
	Οποιοδήποτε N2
IIIΒ	Οποιοδήποτε N3
	Οποιοδήποτε T4
IV	M1

Η κατάλληλη σταδιοποίηση επιτυγχάνεται με την ιστολογική εξέταση δείγματος από το μαστό και τους μασχαλιαίους λεμφαδένες, τη φυσική εξέταση, την ακτινογραφία του θώρακα, καθώς και την εκτίμηση ορολογικών δεικτών όπως οι ηπατικές τρανσαμινάσες και οι διάφορες μορφές της αλκαλικής φωσφατάσης. Η φυσική εξέταση δεν είναι αξιόπιστος τρόπος εκτίμησης της συμμετοχής των μασχαλιαίων λεμφαδένων γιατί οι λεμφαδένες μπορεί να συμμετέχουν χωρίς να είναι ψηλαφητοί, και οι ψηλαφητοί λεμφαδένες δεν είναι όλοι θετικοί ιστολογικά για καρκίνο. Πρόσφατα έχει αναπτυχθεί και διαδοθεί μια τεχνική για την εκτίμηση της συμμετοχής των μασχαλιαίων λεμφαδένων, που ονομάζεται *χαρτογράφηση του λεμφαδένα φρουρού (sentinel lymph node mapping)* (Krag et al, 1998). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στη θεραπεία του μελανώματος. Κατά τη διαδικασία εισάγεται χρωστική ή ραδιενεργός ανιχνεύσιμη ουσία στο μαστό κατά την ώρα της εκτομής του όγκου και αφαιρείται ο ένας ή περισσότεροι λεμφαδένες που προσλαμβάνουν πρώτοι την ουσία. Αν αυτοί οι λεμφαδένες- φρουροί δεν περιέχουν καρκινικά κύτταρα, υπάρχει πολύ μεγάλη πιθανότητα και η υπόλοιπη μασχάλη να είναι ελεύθερη νόσου. Αυτό το γεγονός απαλλάσσει τον ασθενή από μια άχρηστη επέμβαση στη μασχάλη, και επιτρέπει στον παθολογοανατόμο να επικεντρωθεί στους λεμφαδένες που έχουν αφαιρεθεί.

Οι περισσότεροι ασθενείς στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη παρουσιάζονται με νόσο σταδίου I ή II. Ο καρκίνος σταδίου I, με μικρές βλάβες και χωρίς συμμετοχή της μασχάλης, έχει την καλύτερη πρόγνωση. Ο καρκίνος σταδίου II συσχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο τελικής συστηματικής υποτροπής. Ο βαθμός της λεμφαδενικής συμμετοχής μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με τον αριθμό των λεμφαδένων που συμμετέχουν, και ο παρονομαστής (συνολικός αριθμός των λεμφαδένων που αφαιρέθηκαν) υποδηλώνει τον επαρκή αριθμό των λεμφαδένων που αφαιρέθηκαν.

Οι τοπικά προχωρημένοι καρκίνοι του μαστού (κυρίως σταδίου III) είτε είναι μεγαλύτεροι από 5 εκ. σε μέγεθος και διηθούν το δέρμα ή το μυϊκό τοίχωμα, είτε συσχετίζονται με καθηλωμένους,

ιστολογικά θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες. Η πρόγνωσή τους είναι χειρότερη από αυτήν των πρωϊμότερων σταδίων, αλλά η έκβαση εξακολουθεί να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον αριθμό των λεμφαδένων που συμμετέχουν. Ασθενείς με καρκίνο μαστού σταδίου III παρουσιάζονται κυρίως σε οικονομικώς αναπτυσσόμενα μέρη του κόσμου, μάλλον λόγω αποτυχίας πρώιμης διάγνωσης και όχι λόγω ραγδαίως εξελισσόμενης νόσου.

Οι καρκίνοι σταδίου IV εμφανίζουν στοιχεία μεταστατικής νόσου σε περιοχές εκτός του μαστού και της μασχάλης, συμπεριλαμβανομένων, μετά την επανασταδιοποίηση του 1988, και των υπερκλείδιων λεμφαδένων.

Η σταδιοποίηση TNM αναπτύχθηκε πρωτίστως για να υποβοηθήσει την απόφαση για χειρουργική επέμβαση. Αυτό συμβαίνει γιατί οι περισσότεροι καρκίνοι σταδίου I, αρκετοί σταδίου II, και κάποιοι σταδίου III μπορούν να θεραπευθούν με τοπική θεραπεία μόνο. Οι ασθενείς με καρκίνο προχωρημένου σταδίου III καθώς και σταδίου IV δεν θεραπεύονται μόνο με χειρουργική επέμβαση, αν και μπορεί να έχει ένδειξη μια χειρουργική προσέγγιση για να επιτευχθεί τοπικός έλεγχος της νόσου. Οι παθολόγοι-ογκολόγοι χρησιμοποιούν την ταξινόμηση TNM αλλά επίσης κατηγοριοποιούν τους ασθενείς και με βάση τον αριθμό των μασχαλιαίων λεμφαδένων που συμμετέχουν. Αυτή η κατηγοριοποίηση έχει οδηγήσει και συνεχίζει να διευκολύνει την απόφαση για συστηματική επικουρική χημειοθεραπεία, αν και οι μοντέρνες χημειοθεραπευτικές πρακτικές αρχίζουν να γίνονται τόσο αποτελεσματικές που μπορεί σύντομα να φθάσουμε σε ένα σημείο στο οποίο όλοι οι ασθενείς θα λαμβάνουν την ίδια χημειοθεραπεία ανεξαρτήτως σταδίου.

1.4 Επίπτωση και επιδημιολογικά στοιχεία

Ο καρκίνος του μαστού και ο καρκίνος του πνεύμονα είναι οι πιο συχνές κακοήθειες στις γυναίκες στον οικονομικά αναπτυγμένο κόσμο. Κατά το έτος 2004, υπολογίζεται ότι 193.700 νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού (31% όλων των καρκίνων) διεγνώσθησαν στις Ηνωμένες Πολιτείες (American Cancer Society). Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού στις γυναίκες είναι η ηλικία. Μεταξύ του 1995 και του 1997, η πιθανότητα για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού ήταν 0,44% για γυναίκες μικρότερες των 39 ετών, 4,15% για γυναίκες ηλικίας 40- 59 ετών, και 7,02% για γυναίκες ηλικίας 60- 79 ετών. Η υπολογιζόμενη

πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του μαστού καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μιας γυναίκας είναι 12,83% (1 στις 8). Η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του μαστού είναι υψηλότερη στις λευκές γυναίκες σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη φυλή. Γυναίκες με ιστορικό καρκίνου του μαστού αναπτύσσουν αμφίπλευρο καρκίνο με ρυθμό λίγο μεγαλύτερο του 1% κατ' έτος. Αυτός ο κίνδυνος, παρ' όλ' αυτά, δεν κατανέμεται ομοιόμορφα στον πληθυσμό: οι γυναίκες με συγκεκριμένη γενετική προδιάθεση, ή αυτές που έχουν εκτεθεί σε ακτινοβολία (όπως για παράδειγμα για τη θεραπεία της νόσου του Hodgkin) σαφώς διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο.

Ο καρκίνος του μαστού γίνεται όλο και πιο συχνός, αν και παραμένει ασαφές το αν αυτό το γεγονός οφείλεται στην αυξανόμενη ηλικία του πληθυσμού, την αποτελεσματικότητα της διάγνωσης μέσω της μαστογραφίας, ή μια πραγματική αλλαγή στο χαρακτήρα της ασθένειας. Η Ευρώπη, ο Καναδάς, οι Η.Π.Α., η Αυστραλία, και οι ανεπτυγμένες περιοχές της Ν. Αμερικής παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά σε σχέση με τις περισσότερες χώρες της Ασίας. Αν και δεν υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία ότι το προσλαμβανόμενο με τη διατροφή λίπος (ή οι συνολικές θερμίδες, οι οποίες είναι αναπόσπαστα συνδεδεμένες με την περιεκτικότητα σε λίπος) είναι αιτιολογικός παράγοντας σε μια χώρα, φαίνεται ότι οι κοινωνίες που αποτελούνται από άτομα που καταναλώνουν λιγότερο λίπος, λιγότερες θερμίδες, και περισσότερα λαχανικά, παρουσιάζουν λιγότερα περιστατικά καρκίνου του μαστού. Η καθημερινή κατανάλωση ενός ποτηριού αλκοόλ ή περισσότερο σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, ιδιαίτερα μεταξύ των νεαρότερων γυναικών. Η συσχέτιση παρά ταύτα δεν είναι γραμμική, και ισχυροποιείται όσο περισσότερο αλκοόλ καταναλώνεται.

1.5 Αιτιολογικοί παράγοντες

Η αιτιολογία του καρκίνου του μαστού είναι καθαρά πολυπαραγοντική (Πίνακας 1.2). Το οικογενειακό ιστορικό είναι ένα κύριο συστατικό του προφίλ συνολικού κινδύνου. Η παρουσία καρκίνου του μαστού σε πρώτου βαθμού συγγενή (μητέρα ή αδελφή) αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε μια γυναίκα έως και τρεις φορές. Αυτός ο κίνδυνος γίνεται ακόμα πιο υψηλός αν συσχετισθεί με οικογενειακό ιστορικό αμφίπλευρης νόσου ή προεμμηνοπαυσιακού καρκίνου. Παρ' όλ' αυτά, υπολογίζεται ότι μόνο 10% των περιστατικών σχετίζεται με γενετική προδιάθεση.

Πίνακας 1.2 Πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού

<i>Οικογενειακό ιστορικό</i>
Μεταλλαγές γαμετικών κυττάρων
<i>Έκθεση σε ορμόνες</i>
Ηλικία εμμηναρχής
Ηλικία εμμηνόπαυσης
Ηλικία πρώτης τελειόμηνης κύησης
Εξωγενή οιστρογόνα
Από του στόματος αντισυλληπτικά
Οιστρογονική υποκατάσταση
<i>Έκθεση σε ακτινοβολία</i>
<i>Υπερπλαστικές καλοήθειες αλλοιώσεις του μαστού</i>
<i>Προηγούμενο ιστορικό καρκίνου του μαστού</i>
<i>Δίαιτα</i>
<i>Κατανάλωση αλκοόλ</i>

Οι μεταλλαγές των γαμετικών κυττάρων με απαλοιφή του γονιδίου *BRCA1*, που ανευρίσκεται στο χρωμόσωμα 17, και του γονιδίου *BRCA2*, που χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 13, σχετίζονται με υψηλότερο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών. Αν και αυτά τα γονίδια έχουν χαρακτηριστικά όμοια με αυτά των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και η λειτουργία τους δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη, υπάρχουν στοιχεία ότι εμπλέκονται στην κυτταρική απάντηση στη βλάβη του DNA. Οι μεταλλαγές αυτών των γονιδίων είναι πιο συχνές στα άτομα με οικογενειακό ιστορικό πρώιμης εμφάνισης καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών. Οι μεταλλαγές των *BRCA1* και *BRCA2* είναι υπεύθυνες για ένα σημαντικό ποσοστό των κληρονομικών καρκίνων του μαστού, πιθανώς μέχρι

και 90%, αλλά υπάρχουν στοιχεία ότι και άλλα μη ταυτοποιημένα γονίδια συμμετέχουν στο σύνδρομο. Τα πιο σπάνια οικογενή σύνδρομα που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού, που θεωρείται ότι κληρονομούνται κατά τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα, συμπεριλαμβάνουν τη νόσο του Cowden (πολλαπλά αμαρτώματα), το σύνδρομο Muir (όγκοι του δέρματος και του γαστρεντερικού), και το σύνδρομο Li- Fraumeni ή SBLA (σαρκώματα μαλακών ιστών και οστών, όγκοι εγκεφάλου, λευχαιμία, φλοιοεπινεφριδιακό καρκίνωμα, και άλλα). Το σύνδρομο Li- Fraumeni σχετίζεται σε πολλές περιπτώσεις με μεταλλάξεις του p53 σε γαμετικά κύτταρα.

Οι άντρες που είναι ετερόζυγοι για το *BRCA1* δεν διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Οι άνδρες που είναι ετερόζυγοι για το *BRCA2* έχουν αυξημένο κίνδυνο σε σχέση με τους υπόλοιπους άνδρες αλλά μικρότερο κίνδυνο σε σχέση με τις γυναίκες που φέρουν την ίδια μεταλλαγή. Έτσι, φαίνεται ότι τα οιστρογόνα παίζουν ρόλο στην εμφάνιση του οικογενούς καρκίνου του μαστού. Παρομοίως, για τον σποραδικό καρκίνο, σε περίπου 90% των περιπτώσεων τα οιστρογόνα φαίνεται να εμπλέκονται στην αιτιολογία. Η ασθένεια είναι σπάνια σε γυναίκες με συγγενή απουσία ωοθηκικής λειτουργίας. Οι άνδρες που είναι ομόζυγοι για φυσιολογικό *BRCA1* και *BRCA2* σπάνια αναπτύσσουν καρκίνο του μαστού εκτός αν έχουν αυξημένα οιστρογόνα λόγω π.χ. της φύσεως του συνδρόμου Klinefelter, ηπατικής νόσου, μεγάλης παχυσαρκίας, ή εξωγενούς χορήγησης ορμονών. Στις γυναίκες, η πρόωμη έναρξη της εμμηνου ρύσεως (≤ 12 έτη) και ο μεγαλύτερος συνολικός αριθμός ωορρηξιών σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο. Οι άτοκες ή οι γυναίκες με πρώτη κύηση μετά τα 35 έχουν υψηλότερη επίπτωση καρκίνου του μαστού. Μια πρόωμη τελειόμηνος κύηση μπορεί να είναι μερικώς προστατευτική. Η εντατική σωματική άσκηση ή η κακή διατροφή μπορεί να καθυστερήσουν την εμμηναρχή ή να μειώσουν τον αριθμό των ωορρηξιών. Και οι δύο αυτές καταστάσεις επίσης μειώνουν τον κίνδυνο, όπως και η φυσιολογική εμμηνόπαυση πριν την ηλικία των 45 ετών ή η αμφίπλευρη ωοθηκεκτομή πριν την ηλικία των 50 ετών. Η μέτρια σωματική άσκηση, κυρίως στην παιδική ηλικία, φαίνεται να είναι κάπως προστατευτική. Υπάρχουν κάποια στοιχεία ότι η θετική αυτή επίδραση μπορεί να επάγεται από άλλους παράγοντες διαφορετικούς από την καταστολή της ωοθηκικής λειτουργίας.

Όλες οι καταστάσεις υπερπλασίας των πόρων του μαστού φαίνεται να αυξάνουν τον κίνδυνο για καρκινογένεση, αν και δεν φέρουν όλες τον ίδιο βαθμό αρνητικής επίδρασης.

Η άτυπη πορώδης υπερπλασία, για παράδειγμα, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο, ειδικά αν συνδυάζεται με θετικό οικογενειακό ιστορικό. Οι καλοήθειες αλλοιώσεις που δεν περιλαμβάνουν υπερπλασία, όπως οι κύστες, τα περισσότερα ινοαδενώματα, ή η μαστίτιδα, δεν είναι προδιαθεσικοί παράγοντες. Είναι πιθανό, επομένως, οι υπερπλαστικές αλλοιώσεις να φέρουν κάποιες γενετικές αλλαγές που είναι αναγκαίες αλλά όχι και ικανές για την πλήρη νεοπλασματική εξαλλαγή. Σύμφωνα με αυτή την άποψη είναι και το γεγονός ότι η έκθεση στην ιονίζουσα ακτινοβολία, μέσω ακτινοθεραπείας ή εξ ατυχήματος, αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού, ιδιαίτερα αν το γεγονός συμβεί πριν την ηλικία των 20 ετών. Έχει προταθεί σε κάποιες μελέτες η συσχέτιση της καρκινογένεσης με την έκθεση σε χημικά, είτε μέσω ζιζανιοκτόνων είτε μέσω βιομηχανικής μόλυνσης, αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα σε αυτόν τον τομέα.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τη σπουδαιότητα των οιστρογόνων στην αιτιολογία του καρκίνου του μαστού, φαίνεται λογικό ότι η έκθεση σε εξωγενή οιστρογόνα με τη μορφή των αντισυλληπτικών δισκίων ή της μετεμμηνοπαυσιακής θεραπείας υποκατάστασης είναι ιδιαίτερος φθοροποιός. Υπάρχουν στοιχεία ότι και οι δύο θεραπείες σχετίζονται με ελαφρώς αυξημένο κίνδυνο, ιδιαίτερα μετά από μακροχρόνια χορήγηση, αν και είναι πιθανό οι καρκίνοι που προκύπτουν μετά από οιστρογονική θεραπεία να είναι θετικοί για ορμονικούς υποδοχείς και επομένως να έχουν καλύτερη πρόγνωση. Οι συστάσεις σχετικά με τη χορήγηση εξωγενών οιστρογόνων είναι συγκρουόμενες κυρίως επειδή τα οφέλη από τέτοιες θεραπείες μπορεί να ξεπερνούν σε σπουδαιότητα τον αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού σε ορισμένους ασθενείς. Καθώς τα νέα οιστρογόνα (όπως η ραλοξιφένη για την πρόληψη της οστεοπόρωσης) χρησιμοποιούνται όλο και ευρύτερα, οι διαφωνίες τείνουν να μειωθούν μια και τέτοιες ουσίες μπορεί να μειώσουν τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού.

1.6 Παθοφυσιολογικοί παράγοντες και παθογένεση

Το πορώδες καρκίνωμα *in situ* (DCIS) αποτελείται από μια ετερογενή ομάδα αλλοιώσεων που συνήθως θεωρούνται ως μια μονόπλευρη, πολύ πρώιμη, προ- διηθητική μορφή αληθούς καρκίνου του μαστού. Ένας τύπος χαρακτηρίζεται από φαγεσωρική νέκρωση, υψηλό ρυθμό μιτώσεων, και πλειομορφικούς πυρήνες. Σε αυτή η μορφή του DCIS συνήθως υπάρχει υπερέκφραση του υποδοχέα τυροσινικής κινάσης HER2 (γνωστού και ως *neu* και *c-erb 2*). Αυτό το καρκίνωμα συχνά

μεταλλάσσεται σε μικροδιηθητικό ή πλήρως διηθητικό καρκίνωμα μάλλον παρά στους μη φαγεσωρικούς τύπους: τον συμπαγή, το θηλώδη ή το διάτρητο. Το DCIS συνήθως είναι πολυεστιακό ή και διάχυτο σε όλο το μαστό, και συχνά εμφανίζεται ως μικροασβεστώσεις στις μαστογραφίες.

Το λοβώδες καρκίνωμα *in situ* (LCIS) συχνά θεωρείται ως δείκτης δυνητικής καρκινογένεσης μάλλον παρά πραγματικός καρκίνος. Χαρακτηρίζεται από πολλαπλασιασμό μικρών, ομοιόμορφων κυττάρων και συχνά είναι πολυεστιακό. Μια ασθενής με βιοψία θετική για LCIS διατρέχει κίνδυνο για ανάπτυξη διηθητικού καρκίνου λοβώδους ή πορώδους τύπου της τάξης του 1 με 2% ανά έτος. Και οι δύο μαστοί διατρέχουν τον ίδιο κίνδυνο. Οι αλλοιώσεις του LCIS σπάνια σχηματίζουν μικροασβεστώσεις και συνήθως είναι αόρατες στη μαστογραφία.

Μεταξύ των διηθητικών καρκίνων ο πιο συχνός ιστολογικός τύπος, που αντιπροσωπεύει περίπου το 75% των όγκων, είναι το διηθητικό πορώδες καρκίνωμα. Τα διηθητικά καρκινώματα τείνουν να αναπτύσσονται ως διακριτές μάζες, μερικές φορές με μικροασβεστώσεις, και πιο συχνά ως μονήρεις παρά ως πολλαπλές αλλοιώσεις. Η υψηλή πυρηνική διαφοροποίηση (βαθμονόμηση από 1 έως 3, με το 3 να αντιπροσωπεύει τον υψηλότερο βαθμό πυρηνικής διαφοροποίησης) σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση. Η ιστολογική ταξινόμηση είναι αντίστροφη, με το βαθμό 1 να είναι ενδεικτικός ενός καλά διαφοροποιημένου όγκου με καλύτερη πρόγνωση. Η απουσία καρκινικών κυττάρων στα λεμφαγγεία ή στα αιμοφόρα αγγεία είναι επίσης καλός προγνωστικός δείκτης.

Το διηθητικό λοβώδες καρκίνωμα αποτελεί περίπου το 10% των καρκίνων του μαστού. Συνήθως αναπτύσσεται ως εξαπλούμενο στρώμα με δυσδιάκριτα όρια. Λόγω του ότι δεν ασβεστοποιείται και δεν αναπτύσσεται ως διακριτή μάζα, είναι πιο δύσκολο να διαγνωσθεί με την ψηλάφηση ή τη μαστογραφία. Κάποιες μελέτες συνδέουν το διηθητικό λοβώδες καρκίνωμα με αμφίπλευρη διήθηση και πολυκεντρικότητα, αλλά αυτή η παρατήρηση δεν ισχύει πάντα. Το διηθητικό λοβώδες καρκίνωμα έχει την ίδια πρόγνωση με το διηθητικό πορογενές του ίδιου μεγέθους και της ίδιας λεμφαδενικής συμμετοχής. Παρ' όλ' αυτά, τα διηθητικά λοβώδη καρκινώματα έχουν πιο ισχυρή τάση να μεθίστανται στις μήνιγγες και σε ορογόνες επιφάνειες όπως το περιτόναιο.

Οι πιο σπάνιοι, ειδικοί τύποι του διηθητικού καρκίνου του μαστού (βλενωδής ή διηθητικός κολλοειδής, θηλώδης, μυελώδης, σωληνώδης, και αδενοειδής κυστικός) φαίνεται να έχουν ιδιαίτερα καλή πρόγνωση εάν δεν διηθούν τους μασχαλιαίους λεμφαδένες. Παρ' όλ' αυτά, αν είναι μεγάλοι σε μέγεθος ή έχουν διηθήσει τους λεμφαδένες μπορεί να είναι πολύ επιθετικοί, ιδιαίτερα ο μυελώδης τύπος.

Η νόσος Paget της θηλής εμφανίζεται σε 1 έως 2% των ασθενών με καρκίνο του μαστού. Η συνήθης παρουσίαση είναι μια εκζεματοειδής αλλοίωση στη θηλή όπως μια φολίδα, ή αποβολή αίματος. Αυτή η αλλοίωση σχετίζεται με καρκίνο του πορώδους παρεγχύματος του μαστού κάτω από τη θηλή. Η πρόγνωση της νόσου εξαρτάται από τον ιστολογικό τύπο και άλλα χαρακτηριστικά του υποκείμενου καρκίνου. Η ενδοπορώδης νόσος του Paget είναι θεραπεύσιμη με πλήρη εξαίρεση, που συνήθως σημαίνει μαστεκτομή.

Ο φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού είναι μια ιδιαίτερα επιθετική μορφή διηθητικού καρκίνου, που ευθύνεται για λιγότερο από 5% όλων των καρκίνων του μαστού στη Β. Αμερική. Εμφανίζεται συχνότερα σε γυναίκες σε άλλες χώρες, κυρίως στη Β. Αφρική. Τα τυπικά ευρήματα περιλαμβάνουν διάχυτο οίδημα του μαστού, ερύθημα και θερμότητα του δέρματος, μασταλγία, και οίδημα του δέρματος δίκην φλοιού πορτοκαλιού (peau d'orange). Λόγω του ότι αυτές οι αλλοιώσεις παρουσιάζουν μια επιφανειακή ομοιότητα με βακτηριακή λοίμωξη, η κατάσταση μπορεί να διαγνωσθεί εκ λάθους ως μαστίτιδα. Το αναγκαίο χαρακτηριστικό αυτής της νόσου, που αποκαλύπτεται μόνο στην ιστολογική εξέταση, είναι η διήθηση των λεμφαγγείων του χορίου. Παρά ταύτα, η διάγνωση μπορεί να τεθεί και με κλινικά κριτήρια ελλείψει θετικής ιστολογικής εικόνας λόγω κακής δειγματοληψίας.

1.7 Προγνωστικοί παράγοντες

Οι κυριότεροι παράγοντες που αναφέρεται ότι προλέγουν την πρόγνωση του καρκίνου του μαστού φαίνονται στον Πίνακα 1.3. Από αυτούς, μόνο μερικοί είναι επαρκώς χαρακτηρισμένοι ώστε να είναι χρήσιμοι για κλινική καθοδήγηση. Ο αριθμός των θετικών μασχαλιαίων λεμφαδένων είναι ο πιο αξιόπιστος προγνωστικός παράγων. Τα ποσοστά επιβίωσης μειώνονται, και τα ποσοστά υποτροπής αυξάνονται, καθώς ο αριθμός των εμπλεκόμενων λεμφαδένων αυξάνεται.

Η χειρότερη έκβαση συνήθως σχετίζεται με μεγαλύτερους όγκους, αλλοιώσεις χαμηλής διαφοροποίησης, και την απουσία υποδοχέων για οιστρογόνα και προγεστερόνη στα καρκινικά κύτταρα. Η παρουσία ορμονικών υποδοχέων μπορεί να ανιχνευθεί με την -παλαιότερη- βιοχημική μέθοδο του ενεργού άνθρακα επικαλυμμένου με δεξτράνες, που απαιτεί φρέσκο-κατεψυγμένο και άφθονο ιστό, ή με τη νεότερη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Αυτή η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε αλλοιώσεις οποιουδήποτε μεγέθους, καθώς και σε παλαιότερα (εμβαπτισμένα σε παραφίνη) δείγματα,

και παρουσιάζει λιγότερα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα λόγω σφαλμάτων χειρισμού. Ο βιοχημικός προσδιορισμός, παρ' όλ' αυτά, παρέχει ποσοτικό αποτέλεσμα, το οποίο έχει προγνωστική σημασία.

Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η ανάπτυξη καρκίνου του μαστού σε μικρή ηλικία (μικρότερη των 35 ετών) σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής, αν και αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να μην είναι ανεξάρτητο από άλλους προγνωστικούς παράγοντες όπως το μέγεθος του όγκου, η παρουσία ή όχι ορμονικών υποδοχέων, και η παρουσία λεμφαδένων. Πολλοί από τους άλλους προγνωστικούς παράγοντες, αν και ενδιαφέροντες, παραμένουν σε ερευνητικό στάδιο. Η πολυπλοϊδία του DNA υπολογίζει την ποσότητα του DNA στα κύτταρα, με την διπλοειδία να είναι φυσιολογική και την ανευπλοειδία ανώμαλη. Η ανευπλοειδία, που συνήθως σημαίνει παραπάνω από το κανονικό DNA σε κάθε κύτταρο, συσχετίζεται με τη διαφοροποίηση. Το κλάσμα των κυττάρων που ευρίσκονται σε φάση S (που μετράται με κυτταρομετρία ροής ή με το δείκτη σήμανσης θυμιδίνης) υπολογίζει το ποσοστό των κυττάρων που ετοιμάζονται για μίτωση. Αυτό το κλάσμα σχετίζεται επίσης θετικά με τη διαφοροποίηση και το μέγεθος του όγκου, και πολλοί ερευνητές πιστεύουν ότι είναι ένας αξιόπιστος και ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου. Παρ' όλ' αυτά, διαφοροποιήσεις στις τεχνικές προσδιορισμού μπορεί να κάνουν δύσκολες τις συγκρίσεις μεταξύ των μελετών.

Πρόσφατα αναπτύχθηκε ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τους αυξητικούς παράγοντες και τους υποδοχείς τους, όπως ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και ο HER2, καθώς και για τους ρυθμιστές της μίτωσης όπως η P53, που μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση και την κλινική διαδρομή της νόσου. Οι όγκοι που υπερεκφράζουν τον HER2 και περιλαμβάνουν μασχαλιαίους λεμφαδένες τείνουν να συμπεριφέρονται πιο επιθετικά, όπως και οι μεταστατικές αλλοιώσεις που είναι θετικές για το HER2. Δεν είναι ξεκάθαρο αν τα επίπεδα του HER2 είναι διαγνωστικά σε νόσο χωρίς λεμφαδένες. Παρ' όλ' αυτά, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι οι όγκοι που υπερεκφράζουν HER2 μπορεί να είναι περισσότερο ευαίσθητοι σε χημειοθεραπευτικά σχήματα που βασίζονται στη δοξορουμπισίνη και πιθανώς και στην πακλιταξέλη. Επομένως, κάποιοι από τους παράγοντες που ερευνώνται για την προγνωστική τους αξία μπορεί να είναι το ίδιο ή και περισσότερο χρήσιμοι όσον αφορά την ικανότητά τους να προβλέπουν την ανταπόκριση σε συγκεκριμένη χημειοθεραπεία. Το κλασσικό παράδειγμα αυτού του φαινομένου είναι ο υποδοχέας οιστρογόνων, που ερευνήθηκε για να προβλέψει την ανταπόκριση στην ορμονική θεραπεία αλλά έχει και κάποια προγνωστική αξία (Humes H.D et al, 2000).

Πίνακας 1.3. Οι κυριότεροι παράγοντες που αναφέρεται ότι προλέγουν την πρόγνωση του καρκίνου του μαστού

Καθιερωμένοι
Αριθμός θετικών μασχαλιαίων λεμφαδένων
Μέγεθος όγκου
Ιστολογικός τύπος όγκου
Ιστολογικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένου του σταδίου
Καθεστώς οιστρογονικών και προγεστρονικών υποδοχέων
Ηλικία ασθενούς
Κλάσμα φάσης S
Υπό διερεύνηση
Πολυπλοϊδία
Δείκτες πολλαπλασιασμού Δείκτης σήμανσης θυμιδίνης Τοποϊσομεράση II Ιστόνες Ki- 67 Κυκλίνες
Αυξητικοί παράγοντες TGFs EGFR Insulin- like growth factor
Γονίδια (<i>neu, ras, p53, myc, int2, Brca1, Brca2, nm23</i>)

Καθεψίνη D
Παράγοντες αγγειογένεσης
Αρωματάση στον όγκο και το συνδετικό ιστό
Υποδοχέας λαμινίνης
Heat- shock proteins

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΑΤΑΞΙΑΣ- ΤΗΛΑΓΓΕΙΕΚΤΑΣΙΑΣ (ATM)

2.1 Εισαγωγή

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο της αταξίας- τηλαγγειεκτασίας είναι μέλος της πρωτεϊνικής οικογένειας των κινασών της φωσφατιδυλινοσιτόλης-3, οι οποίες ανταποκρίνονται σε βλάβη του DNA με το να φωσφορυλιώνουν ουσίες- κλειδιά που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA ή/και στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου.

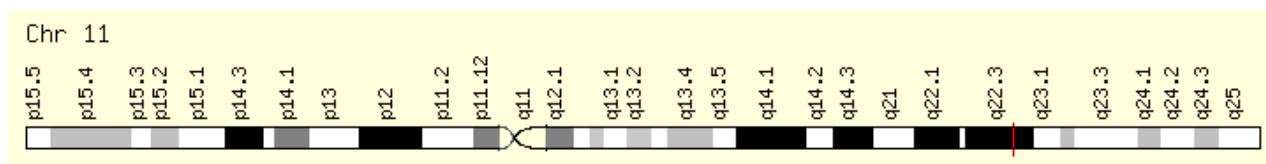
Οι Kapp et al (1992) ανέφεραν την κλωνοποίηση ενός γονιδίου που υποτίθεται ότι είναι υπεύθυνο για τη νόσο της αταξίας- τηλαγγειεκτασίας (AT) και το οποίο χαρτογραφήθηκε στην περιοχή μεταξύ των δεικτών THY1 και D11S83 στο χρωμόσωμα 11 (περιοχή q23). Η περιοχή αυτή είχε φανεί στο παρελθόν ότι περιείχε το επίτοπο AT.

Οι Savitsky et al (1995) περιέγραψαν την αλληλουχία ενός συγγενούς cDNA που εκτείνεται σε όλο το μήκος του πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου *ATM* (AT mutated). Η αναμενόμενη πρωτεΐνη των 3.056 αμινοξέων έχει μοριακό βάρος 350,6 kD και παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες στην αλληλουχία με αρκετές αντίστοιχες φωσφατιδυλινοσιτόλη-3 κινάσες της *Drosophila*, του ζυμομύκητα και κάποιων θηλαστικών, και όλες σε γενικές γραμμές σχετίζονται με την μετάδοση σήματος στην μιτογένεση, με τον μειωτικό ανασυνδυασμό, την ανίχνευση της βλάβης του DNA, και τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Μεταλλαγές σε αυτά τα γονίδια αποδίδουν μια ποικιλία φαινοτύπων με χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Οι Savitsky et al (1995) υπέθεσαν ότι η ανακάλυψη του γονιδίου *ATM* μπορεί να επιτρέψει την ταυτοποίηση των ετεροζυγωτών του AT που διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου.

2.2 Δομή του γονιδίου *ATM*

Οι Uziel et al (1996) καθόρισαν τη γενωμική οργάνωση του γονιδίου *ATM* χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) μεγάλων αποστάσεων μεταξύ των εξωνίων. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής αποκάλυψαν τη λεπτομερή δομή του γονιδίου *ATM*. Το γονίδιο *ATM* διαθέτει συνολικά 66 εξώνια που εκτείνονται σε μια περιοχή περίπου 150 kb γενωμικού DNA. Τα πρώτα 2 εξώνια, το 1a και το 1b, χρησιμοποιούνται εναλλακτικά ως διαφορετικά προϊόντα μεταγραφής. Το κωδικόνιο έναρξης εδράζεται μέσα στο εξώνιο 4 ενώ το τελικό εξώνιο, μήκους 3,8 kb, περιέχει περίπου 3,6 kb αμετάφραστης αλληλουχίας στο 3' άκρο.

Η ανάλυση σύνδεσης (linkage analysis) του γονιδίου της αταξίας- τηλαγγειεκτασίας οδήγησε στη χαρτογράφηση του γονιδίου *ATM* στο χρωμόσωμα 11q22.3 (Gatti et al., 1988, 1993) (Σχήμα 2.1).



Σχήμα 2.1. Χαρτογράφηση του γονιδίου *ATM* στο χρωμόσωμα 11q22.3.

2.3 Λειτουργία του γονιδίου

Χρησιμοποιώντας αντί-ορό που αναπτύχθηκε ώστε να δώσει ένα πεπτίδιο αντίστοιχο στην συμπεριλαμβανόμενη αλληλουχία αμινοξέων της *ATM*, οι Brown et al (1997) έδειξαν ότι η πρωτεΐνη του *ATM* είναι μονή, υψηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνη που κατά κύριο λόγο περιορίζεται στον πυρήνα των ανθρώπινων ινοβλαστών, αν και είναι παρούσα τόσο σε πυρηνικά όσο και μικροσωματικά κλάσματα

από ανθρώπινα λεμφοβλαστικά κύτταρα και λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος (Σχήμα 2.2). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα και η εντόπιση της ATM παραμένουν σταθερά καθ' όλα τα στάδια του κυτταρικού κύκλου. Δεν ανιχνεύθηκε υπόλειμμα της πρωτεΐνης AT σε λεμφοβλάστες ασθενών που ήταν ομόζυγοι για μεταλλάξεις που οδηγούσαν σε πρώιμο τερματισμό της πρωτεΐνης. Η έκθεση φυσιολογικών κυττάρων σε ακτινοβολία γ καθώς και στο ραδιομιμητικό φάρμακο νεοκαρζινοστατίνη δεν είχαν επίπτωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της ATM, σε αντίθεση με μια αξιοσημείωτη αύξηση στα επίπεδα της p53 κατά το ίδιο χρονικό διάστημα. Τα ευρήματα της συστασιακής έκφρασης και της πυρηνικής εντόπισης της πρωτεΐνης ATM ήταν σύμφωνα με το δυνητικό της ρόλο, δηλαδή στην ενορχήστρωση των κατάλληλων κυτταρικών απαντήσεων στη βλάβη του γενετικού υλικού.

Οι Brzoska et al (1995) βρήκαν ότι η πρωτεΐνη ATDC αντιδρά φυσικά με την πρωτεΐνη ενδιάμεσων ινιδίων βιμεντίνη, που είναι υπόστρωμα πρωτεϊνικής κινάσης C και συνεντοπίσιμη πρωτεΐνης, καθώς και με ένα αναστολέα της πρωτεϊνικής κινάσης C, την PKC11. Η ανάλυση έμμεσου ανοσοφθορισμού σε κυτταροκαλλιέργειες εντόπισε την πρωτεΐνη στα ινίδια βιμεντίνης. Οι Brzoska et al (1995) πρότειναν ότι οι πρωτεΐνες ATDC και PKC11 μπορεί να είναι συστατικά ενός μοναδικού μονοπατιού μεταγωγής, που επάγεται από την ιονίζουσα ακτινοβολία και στην οποία διαμεσολαβεί η πρωτεϊνική κινάση C. Το γεγονός ότι το γονίδιο *ATM* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη με πιθανή περιοχή που λειτουργεί ως φωσφατιδυλινοσιτόλ-3 κινάση, καθώς και η λειτουργία του *ATM* ως μορίου σηματοδότησης με τη διαμεσολάβηση λιπιδίων, είναι σε συμφωνία με το μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η ATDC και η PKC λειτουργούν ξεκινώντας από το *ATM* σε αυτό το μονοπάτι.

Οι Hawley και Friend (1996), προκειμένου να εξηγήσουν τα νευρολογικά, ανοσολογικά, και αναπαραγωγικά προβλήματα που παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με αταξία- τηλαγγειεκτασία, διατύπωσαν ορισμένα σχόλια σχετικά με την κατάσταση της έρευνας γύρω από το *ATM* και κατέληξαν στο ότι το γονίδιο αυτό πρέπει να παίζει κρίσιμο ρόλο σε φυσιολογικά αναπτυσσόμενα κύτταρα ή κύτταρα χωρίς βλάβη, εκτός από τον ήδη μελετημένο ρόλο του σε ακτινοβολημένα κύτταρα. Υπέθεσαν επίσης ότι το *ATM* μπορεί να σχετίζεται πολύ στενά τόσο με το p53 όσο και με τους μοριακούς μηχανισμούς που απαιτούνται για τη χρωμοσωμική ανταλλαγή, πιθανώς ως συστατικά των κομβιδίων ανασυνδυασμού.

Η υπερέκφραση του cDNA του *ATM* σε κύτταρα AT ενίσχυσε την επιβίωσή τους μετά την έκθεσή τους σε ακτινοβολία, μείωσε τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες που επάγονται από την ραδιενέργεια, μείωσε τη σύνθεση ανθεκτικού σε ακτινοβολία DNA, και εν μέρει διόρθωσε τα ελαττωματικά σημεία

ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και την επαγωγή της πρωτεϊνικής κινάσης που επάγεται από καταστάσεις στρες.

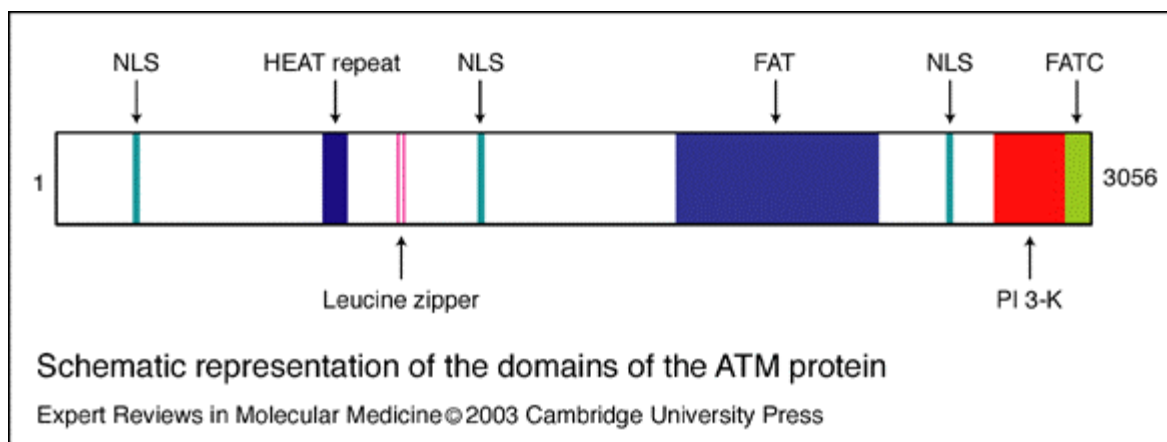
Η παραπάνω διόρθωση σφαλμάτων σε κύτταρα AT παρείχε περαιτέρω στοιχεία σχετικά με την πολυπλοκότητα των συνεργικών δράσεων της ATM πρωτεΐνης σε κάποια ένζυμα, και υποδήλωνε πιθανές προσεγγίσεις για γονιδιακή θεραπεία.

Οι Banin et al (1998) και Canman et al (1998) παρατήρησαν ενισχυμένη φωσφορυλίωση του p53 από την ATM σε απόκριση στη βλάβη του DNA. Ως συμπέρασμα των δυο ερευνητικών προσπαθειών προτάθηκε ότι η ATM είχε ενδογενή δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης και φωσφορυλίωσε την p53 στη σερίνη-15 κατά τρόπο εξαρτώμενο από μαγγάνιο. Η ιονίζουσα ακτινοβολία, αλλά όχι η υπεριώδης ακτινοβολία, ενίσχυσε ταχύτατα την δραστηριότητα κινάσης της ενδογενούς ATM που στόχευε στην p53. Η φωσφορυλίωση της p53 στη σερίνη-15 σε ανταπόκριση στην ιονίζουσα ακτινοβολία ήταν μειωμένη σε κύτταρα αταξίας- τηλαγγειεκτασίας.

Οι Khanna et al (1998) ανέφεραν απευθείας αλληλεπίδραση μεταξύ της ATM και της p53 που περιελάμβανε δυο περιοχές στο μόριο της ATM, μία στο N-τελικό άκρο και μία στο C-τελικό άκρο, που αντιστοιχούν στην περιοχή της PI-3 κινάσης. Η ανασυνδυσασμένη ATM πρωτεΐνη φωσφορυλίωσε την p53 στη σερίνη 15 κοντά στο N-τελικό άκρο. Περαιτέρω πειράματα έδειξαν ότι η ATM μπορεί να προσδεθεί απ' ευθείας με την p53 και είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωσή της στη σερίνη-15, συνεισφέροντας τοιούτοτρόπως στην ενεργοποίηση και σταθεροποίηση της p53 κατά τη διάρκεια της απάντησης στην βλάβη του DNA που επάγεται από την ιονίζουσα ακτινοβολία.

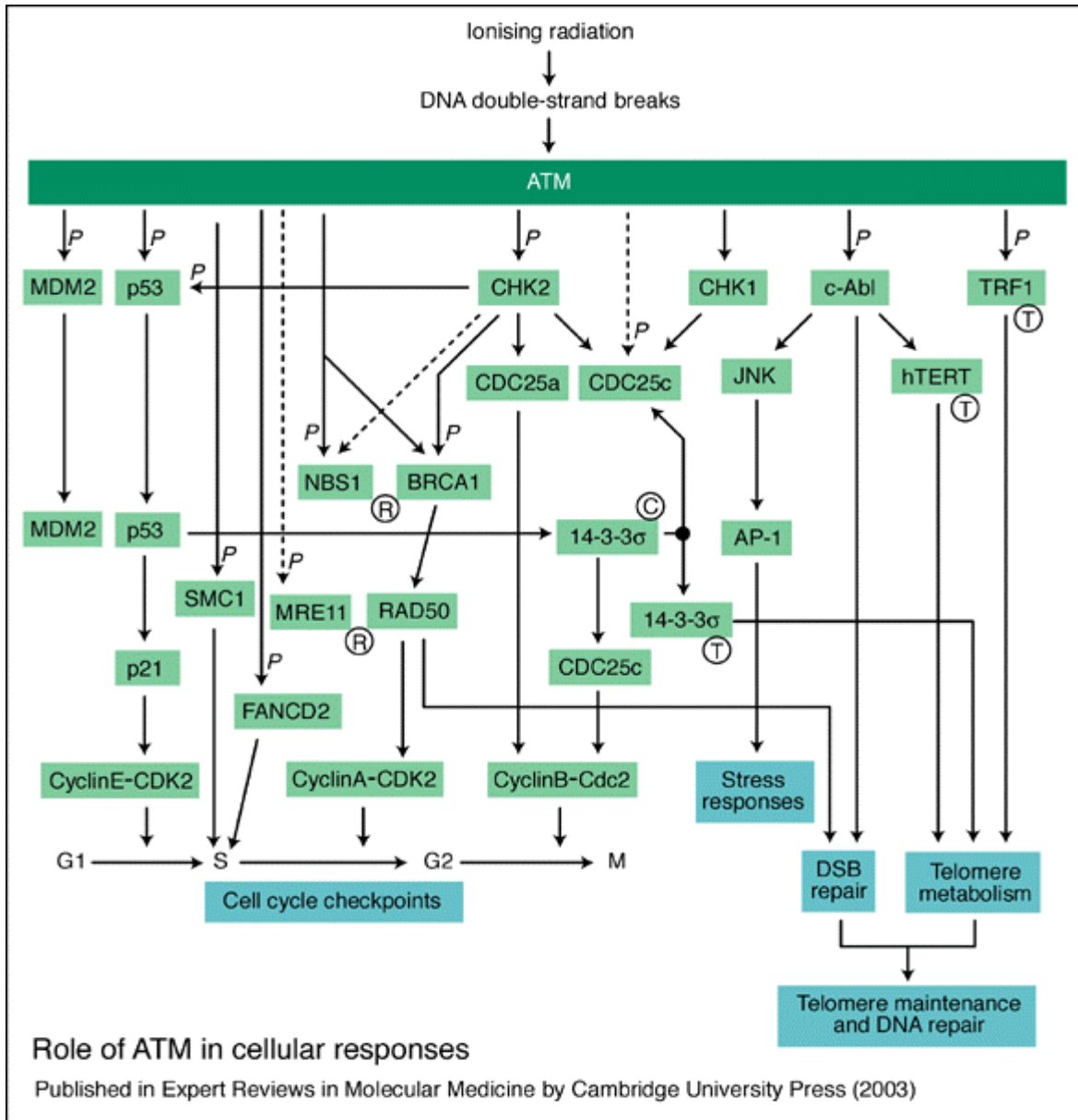
Οι Lim et al (1998) έδειξαν ότι η πρωτεΐνη ATM προσδένεται στην βήτα-ανταπτίνη, ένα από τα συστατικά του συμπλέγματος του προσαρμογέα AP-2, το οποίο εμπλέκεται στην ενδοκυττάρωση των υποδοχέων που διαμεσολαβούνται από την κλαθρίνη. Η πρωτεΐνη ATM επίσης βρέθηκε να αλληλεπιδρά *in vitro* με την beta-NAP, ένα νευρωνικό ομόλογο της βήτα-ανταπτίνης που είχε ταυτοποιηθεί ως αυτοαντιγόνο σε ένα ασθενή με παρεγκεφαλιδική εκφύλιση. Το εύρημα της συσχέτισης της ATM με τη βήτα-ανταπτίνη σε κυστίδια έδειξε ότι η ATM μπορεί να παίζει ρόλο σε ενδοκυττάρους μηχανισμούς μεταφοράς κυστιδίων και/ή πρωτεϊνών. Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να βοηθήσει στο να εξηγήσουμε το πώς οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της ATM προκαλούν την πλειοτροπική φύση του φαινοτύπου της αταξίας- τηλαγγειεκτασίας. Το μεγάλο μέγεθος της πρωτεΐνης ATM και η πολλαπλή εντόπισή της σε υποκυτταρικό επίπεδο υποδηλώνουν ότι η ATM μπορεί να έχει πάνω από μια λειτουργίες.

Οι Cortez et al (1999) έδειξαν ότι η πρωτεϊνική κινάση σημείων ελέγχου ATM απαιτείται για τη φωσφορυλίωση του BRCA1 σε απάντηση στην έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία. Η ATM προσδένεται σε ένα σύμπλεγμα με το BRCA 1 και την φωσφορυλιωμένη BRCA1 *in vivo* και *in vitro*, σε μια περιοχή που περιέχει συγκεντρωμένα αμινοξέα σερίνης- γλουταμίνης. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο ότι η φωσφορυλίωση του BRCA 1 από την ATM μπορεί να είναι κρίσιμη για την κατάλληλη ανταπόκριση στα σπασίματα της διπλής έλικας του DNA και μπορεί να δώσει μια μοριακή εξήγηση σχετικά με το ρόλο της ATM στον καρκίνο του μαστού (Σχήμα 2.3).



Σχήμα 2.2. Σχηματική παρουσίαση των περιοχών της πρωτεΐνης ATM

Η φωσφοπρωτεΐνη των 370 kDa, προϊόν του ATM γονιδίου, περιέχει 3056 αμινοξέα με μια διακριτή C-τελική αλληλουχία και αρκετές διαφορετικές περιοχές. Οι περιοχές έχουν ως εξής: NLS (σήματος εντοπισμού πυρήνα), HEAT (στοιχείο αλληλουχίας συχνό στην πρωτεΐνη Huntington -H-), παράγοντας επιμήκυνσης 3 (EVE3) (E), η ρυθμιστική υπομονάδα της πρωτεϊνικής φωσφατάσης (A) 2a (A), και η Tor 1p πρωτεΐνη (T), FAT (μια περιοχή που βρέθηκε στις FRAP (F), ATM (A) και TRRAP (T) πρωτεΐνες), PI 3-K (μια περιοχή που περιέχει στοιχεία της καταλυτικής υπομονάδα της κινάσης της phosphatidylinositol 3), FATC (η C-τελική περιοχή συχνή στις PI 3-K-σχετιζόμενες κινάσες). Συντομογραφίες: FATC= ακραίο C-άκρο των FAT πρωτεϊνών με μια συντηρημένη ουρά 30 αμινοξέων, FRAP= μια FIB και ανταποδοτική-σχετιζόμενη πρωτεΐνη, TRRAP= Trans περιοχή ενεργοποίησης μετασχηματισμού -σχετιζόμενη πρωτεΐνη.



Σχήμα 2.3. Ο ρόλος του ATM στις κυτταρικές αποκρίσεις

Η ATM δράση κίνησης αυξάνεται αυτόματα μετά από σπασίματα στην διπλή έλικα (DSBs) που συμβαίνει στο DNA μετά από έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία. Η ATM μεσολαβεί στα πρώιμα στάδια της άμεσης επαγωγής πολλών μονοπατιών σήματος που περιλαμβάνουν ρύθμιση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, ενεργοποίηση του μονοπατιού DNA-DSB, ενεργοποίηση των απαντήσεων σε στρες και διατήρηση των τελομερών. Το 'P' υποδηλώνει φωσφορυλίωση, τα διακεκομμένα βέλη αντιπροσωπεύουν πιθανά βήματα σήματος και δεν υπονοούν άμεση αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες, το 'C' δηλώνει sequestering στο κυτταρόπλασμα· το 'R' δηλώνει σύμπλοκα επιδιόρθωσης και το 'T' δηλώνει ένα ρόλο της πρωτεΐνης στον μεταβολισμό των τελομερών. Τα TRF1 (παράγοντας εύρεσης επαναλήψεων τελομερών 1), c-Abl φωσφορυλιώνει hTERT (ανθρώπινη καταλυτική μονάδα των

τελομερών) Συντμήσεις: AP-1=Apetala 1 μεταγραφικός παράγοντας· BRCA1= προϊόν γονιδίου 1 επιρρέπειας σε καρκίνο μαστού, c-Abl= Abelson πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης, CDK= κινάση εξαρτώμενη από κυκλίνη, CHK= κινάση σημείου ελέγχου, FANCD= πρωτεΐνη αναιμίας Fanconi, JNK= Jun N-τελική πρωτεϊνική κινάση· MRE11= γονιδιακό προϊόν μειωτικού ανασυνδυασμού 11, MDM2= ‘double minute 2 ποντικού’ (p53-binding πρωτεΐνη)· NBS1= πρωτεΐνη Nijmegen συνδρόμου θραύσης 1 (p95)· SMC1= ‘δομική διατήρηση του χρωμοσώματος’ 1, RAD50= πρωτεΐνη που σχετίζεται με επιδιόρθωση μετά από ιονίζουσα ακτινοβολία.

2.4 Σχέση γονιδίου *ATM* και Κακοήθειας

Σημαντικά επιδημιολογικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι υπάρχει αυξημένος κίνδυνος στην καρκινογένεση του μαστού και σε άλλα είδη καρκίνου σε ετεροζυγώτες του γονιδίου *AT*. Παρά ταύτα, η ανίχνευση των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού για μεταλλάξεις που δημιουργούν ελλείψεις στο γονίδιο *ATM* απέτυχε να αποκαλύψει κάποια αυξημένη επίπτωση σε αυτούς τους ασθενείς. Αν και κάποια στοιχεία υποδηλώνουν την εμπλοκή των σημειακών μεταλλαγών που διαφοροποιούν κωδικόνια του *ATM* στον καρκίνο του μαστού, η παρουσία μιας μεγάλης ποικιλίας σπάνιων παραλλαγών κωδικονίων καθώς και οι συχνοί πολυμορφισμοί στο *ATM* έχουν κάνει δύσκολο τον καθορισμό της σχέσης αυτής μέσω μελετών συσχέτισης. Για να ερευνηθούν τη λειτουργική σημασία αυτών των αλλαγών, οι Scott et al (2002) εισήγαγαν αντικαταστάσεις που άλλαζαν κωδικόνια -που είχαν αναγνωριστεί είτε σε ασθενείς με αταξία-τηλαγγειεκτασία είτε σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού- σε cDNA του *ATM* πριν την επίτευξη σταθερών κυτταρικών σειρών, για να καθορίσουν την επίδρασή τους στη λειτουργία του *ATM*. Οι παθογόνες μεταλλαγές και οι ουδέτερες παραλλαγές ξεχώρισαν αρχικά από την ικανότητά τους να διορθώνουν τον ευαίσθητο σε ακτινοβολία φαινότυπο στα κύτταρα *AT*. Επιπρόσθετα, οι μεταλλαγές αυτές κατήργησαν τη δραστηριότητα επαγόμενης από ραδιενέργεια λειτουργίας κινάσης του *ATM* στα φυσιολογικά κύτταρα ελέγχου, προκάλεσαν χρωμοσωμική αστάθεια, και μείωσαν την κυτταρική βιωσιμότητα σε ακτινοβολημένα κύτταρα ελέγχου, ενώ οι ουδέτερες παραλλαγές απέτυχαν να προκαλέσουν αυτά τα αποτελέσματα. Το μεταλλαγμένο *ATM* εκφράστηκε στο ίδιο επίπεδο όπως και η ενδογενής πρωτεΐνη, και η αλληλεπίδραση με τη φυσιολογική λειτουργία της *ATM* φαινόταν να είναι μέσω πολυμερισμού. Η προσέγγιση των Scott et al (2002) αντιπροσώπευσε ένα μέσο ταυτοποίησης των γνήσιων μεταλλαγών του *ATM* και παρουσίασης της σημασίας των αλλαγών στα κωδικόνια στο γονίδιο *ATM* σε μια ποικιλία καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού.

Αναλύοντας DNA καρκινικών κυττάρων από ασθενείς με σποραδική προλεμφοκυτταρική λευχαιμία από T-κύτταρα (TPLL), μια σπάνια μονοκλωνική κακοήθεια που παρουσιάζει ομοιότητες με την λευχαιμία των ώριμων T-κυττάρων που συναντάται στην αταξία-τηλαγγειεκτασία, οι Vorechovsky et al (1997) κατέδειξαν μια υψηλή συχνότητα μεταλλαγών του *ATM* στην TPLL. Σε αξιοσημείωτη αντίθεση με το πρότυπο των μεταλλαγών του *ATM* στην αταξία-τηλαγγειεκτασία, οι πιο συχνές νουκλεοτιδικές αλλαγές σε αυτή τη λευχαιμία ήταν μεταλλαγές αλλαγής κωδικονίου. Αυτές οι μεταλλαγές συσσωρεύονταν στην περιοχή που αντιστοιχεί στον επίτοπο της κινάσης. Η περιοχή αυτή διατηρείται σε μεγάλο βαθμό συντηρημένη σε συγγενείς με την *ATM* πρωτεΐνες σε ποντικούς, ζυμομύκητες, και στη *Drosophila*. Οι επακόλουθες αλλαγές στα αμινοξέα ήταν προβλεπόμενο ότι αλληλεπιδρούσαν με την πρόσδεση του ATP ή την αναγνώριση του υποστρώματος. Κάποια μεταλλαγμένα δείγματα TPLL είχαν ένα αλληλόμορφο του AT που είχε αναφερθεί προηγουμένως. Ένα από τα αλληλόμορφα, μια διαγραφή εννέα βάσεων που κατέληγε στην απώλεια μιας σειράς 3 αμινοξέων, ήταν το πιο συχνό αλληλόμορφο γονιδίου *ATM* που ανευρισκόταν στους ασθενείς με αταξία-τηλαγγειεκτασία.

Στο non-Hodgkin λέμφωμα άωρων B-κυττάρων που εδράζονται στον μανδύα των δευτερογενών λεμφοζιδίων (mantle cell lymphoma, MCL), η χρωμοσωμική μετάθεση t (11;14) θεωρείται το κυτταρογενετικό χαρακτηριστικό της νόσου. Οι Stilgenbauer et al (1999) αναγνώρισαν μια περιοχή που απαλειφόταν συχνά στο 11q22-q23, μικρότερη από 1 Mb σε μέγεθος, που περιέχει το επίτοπο του *ATM*, σε περιπτώσεις MCL. Οι Schaffner et al (2000) πραγματοποίησαν ανάλυση μεταλλαγών του *ATM* σε 12 σποραδικές περιπτώσεις MCL, σε 7 από τις οποίες υπήρχε απαλοιφή του ενός αντιτύπου του γονιδίου του *ATM*. Παρατηρήθηκε ότι και στις 7 περιπτώσεις που υπήρχε απαλοιφή του ενός γονιδίου *ATM* διαπιστώθηκε μια σημειακή μεταλλαγή στο εναπομένον αλληλίο, η οποία οδήγησε σε ανώμαλο μάτισμα (splicing) κατά τη μεταγραφή, ακρωτηριασμό, ή μεταβολή της πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα, μεταλλαγές και στα δύο αλληλία του *ATM* ανιχνεύθηκαν σε περιπτώσεις MCL που δεν παρουσίαζαν απαλοιφή στο 11q. Σε περιπτώσεις που αναλύθηκαν, οι μεταλλαγές του *ATM* που ανιχνεύθηκαν στα καρκινικά κύτταρα δεν ήταν παρούσες στα μη καρκινικά κύτταρα, καταδεικνύοντας έτσι την προέλευση από σωματικά μάλλον παρά από γαμετικά κύτταρα. Η απενεργοποίηση και των δύο αλληλίων του γονιδίου *ATM* μέσω έλλειψης γονιδίου και σημειακής μεταλλαγής που οδηγεί σε έλλειψη στην πλειοψηφία των περιπτώσεων που αναλύθηκαν έδειξε ότι το *ATM* παίζει ρόλο στην έναρξη και/ή εξέλιξη του MCL.

Η έλλειψη στις χρωμοσωμικές ζώνες 11q22-q23 είναι μια από τις πιο συχνές χρωμοσωμικές ανωμαλίες στη χρόνια λεμφογενή λευχαιμία από Β-κύτταρα (B-CLL). Συσχετίζεται με εκτεταμένη διήθηση των λεμφαδένων και πτωχή επιβίωση. Το γονίδιο ATM εμπεριέχεται στο κλάσμα που απαλείφεται. Οι Schaffner et al. (1999) μελετώντας περιπτώσεις με B-CLL και MCL έδειξαν ότι οι αλλαγές στο ATM δεν ήταν παρούσες στους γαμέτες, υποδηλώνοντας τη σωματική προέλευση των μεταλλαγών. Η μελέτη κατέδειξε σωματική διαταραχή και στα δύο αλληλία του επιτόπου του *ATM* με έλλειψη από σημειακή μεταλλαγή, και επομένως τον παθογενετικό ρόλο αυτής της διαταραχής στους σποραδικούς καρκίνους των κυττάρων της Β-σειράς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ RAS

3.1. Γενικά

Τα ογκογονίδια της οικογένειας *ras* ανακαλύφθηκαν σε ιούς που εμφάνιζαν τη δυνατότητα εξαλλαγής κυττάρων και πρόκλησης σαρκώματος σε αρουραίους.

Υπάρχουν τρεις μορφές γονιδίων *ras*: το *K-ras* (ογκογονίδιο του Kirsten murine ιού σαρκώματος, *Ki-MuSV*), το *H-ras* (ογκογονίδιο του Harvey murine ιού σαρκώματος, *Ha-MuSV*) και το *N-ras* (ανιχνεύεται σε όγκους αλλά δεν ανιχνεύεται σε ρετροϊούς) (Πίνακας 3.1). Τα γονίδια *Ha-MuSV* και *KiMuSV* απομονώθηκαν από αρουραίους με τους αντίστοιχους ιούς λευχαιμίας (*Mo-MuLV* και *KiMuLV*). Τα ανθρώπινα ομόλογα γονίδια είναι τα *K-ras2*, *H-ras1* και *N-ras*. Τα γονίδια *H-ras2* και *K-ras1* αποτελούν ανενεργά ψευδογονίδια.

Η υπεροικογένεια των γονιδίων *ras* αποτελείται από περίπου 50 γνωστά *ras*-σχετιζόμενα γονίδια που κωδικοποιούν G πρωτεΐνες. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα γονίδια *GEM*, *NRASL1*, *NRASL2*, *NRASL3*, *RRAS*, *RhoA*, *RhoB*, *RhoC*, *Rac1*, *Rac2*, *Ral*, *Rap1A* (ονομάζεται επίσης *Krev-1* ή *Smg-p21A*), *RAB2*, το γονίδιο *YPT1* του ζύμης, το *MEL* του ποντικού και του ανθρώπου, τα γονίδια *Dras* της *Drosophila*, το *let-60* του *C. elegans* και τα *RAS1* και *RAS2* του σακχαρομύκητα (Satoh, 1992). Η οικογένεια των γονιδίων *ras* εμφανίζει σημαντικό βαθμό ομολογίας με τις α- υπομονάδες των ετεροτριμερών G πρωτεϊνών καθώς και τον παράγοντα επιμήκυνσης EF- Tu της *E.coli*.

Με βάση την ομολογία της ακολουθίας, οι πρωτεΐνες της οικογένειας *ras* μπορούν να διακριθούν σε τρεις κύριες οικογένειες: τις πρωτεΐνες *ras*, τις πρωτεΐνες RHO/RAC και τις πρωτεΐνες RAB. Οι πρωτεΐνες RHO/RAC σχετίζονται με την οργάνωση του κυτταροσκελετού και οι πρωτεΐνες RAB ρυθμίζουν την ενδοκυτταρική αγγειακή μεταφορά.

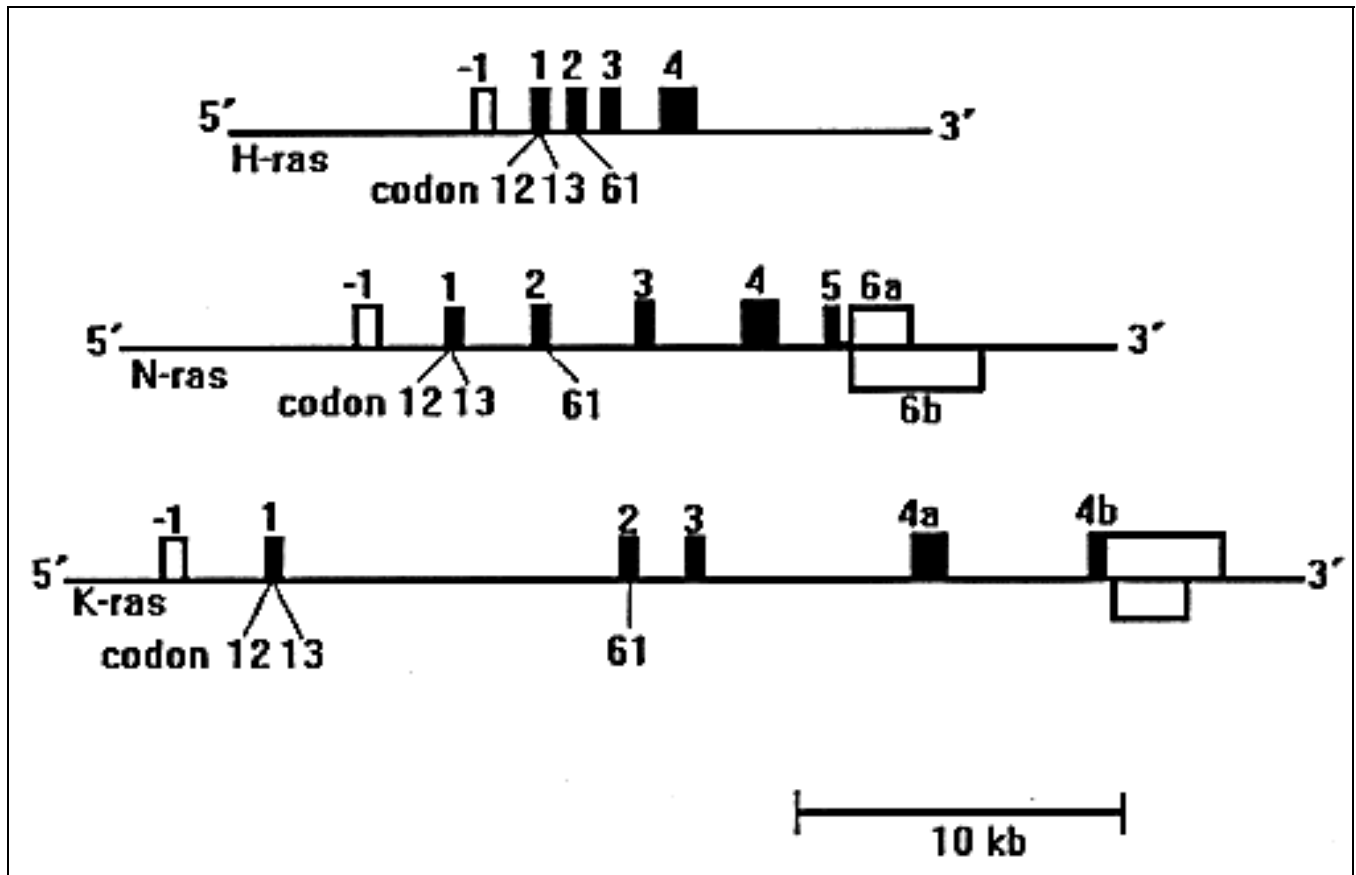
Πίνακας 3.1. Τα ογκογονίδια *ras*

	NRAS/N-<i>ras</i>	HRAS1/H-<i>ras</i>	KRAS2/K-<i>ras2</i>
Νουκλεοτίδια (kb)	32	4.5	50
Χρωμόσωμα	1p13	11p15.5	12p12.1
Μάζα (kDa)	21	21	21
Κυτταρική θέση	Στην έσω επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης		

Τα γονίδια *ras* ανήκουν στα λεγόμενα βασικά κυτταρικά γονίδια (Housekeeping genes). Με αυτόν τον όρο ονομάζονται γονίδια τα οποία είναι κατά μεγάλο τμήμα τους συντηρημένα κατά την εξελικτική διαδικασία, καθώς κρίνονται απαραίτητα για την κυτταρική επιβίωση. Πέραν του υψηλού εξαλλακτικού δυναμικού τους, τα γονίδια *ras* είναι πολύ σημαντικά και για το γεγονός ότι το φυσιολογικό τους προϊόν εμπλέκεται ουσιωδώς στη ρύθμιση των βασικών κυτταρικών λειτουργιών, δηλαδή στην ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση.

3.2 Δομή των γονιδίων *ras*

Τα γονίδια *ras* απαντώνται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και των ζυμών και παρουσιάζουν σημαντική δομική ομολογία (Lowy & Willumsen, 1993, Koffa, 1994). Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί τρία γονίδια *ras*: το *K-ras* στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 12 (12p12.1-pter), το *H-ras* στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 11 (11p15.1-p15.5), και το *N-ras* στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 1 (1p22-p32). Έχουν επίσης ταυτοποιηθεί και δυο ψευδογονίδια, τα *H-ras -2* και *K-ras -1*, τα οποία όμως δεν είναι λειτουργικά. Η δομή και των τριών γονιδίων είναι παρόμοια, έχοντας ένα 5' μη κωδικοποιό εξώνιο (εξώνιο-1), τέσσερα κωδικοποιά εξώνια και μια περιοχή πολλαπλών διαδοχικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (VTR) στο μη μεταγραφόμενο 3' άκρο του γονιδίου (Εικόνα 3.1) (Ishii, 1985, Koffa, 1994).



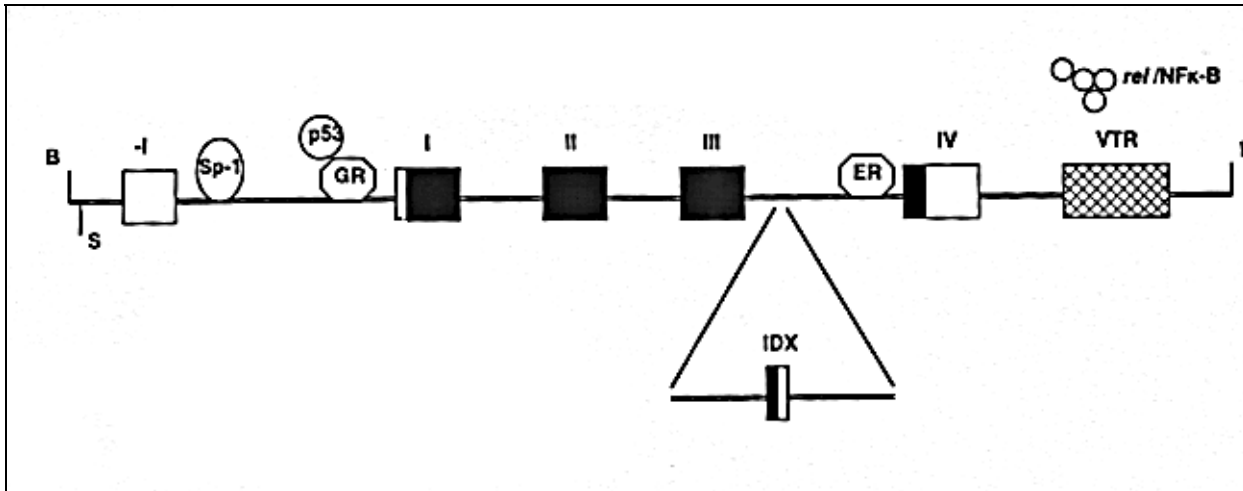
Σχήμα 3.1. Δομή των γονιδίων *H-ras*, *N-ras* και *K-ras*. Τα μαύρα κουτιά αναπαριστούν τα κωδικοποιά και τα λευκά κουτιά τα μη κωδικοποιά εξόνια, αντίστοιχα. Σημειώνονται επίσης τα κωδικόνια με αυξημένη συχνότητα μεταλλαξογένεσης.

Τα μήκη των αντίστοιχων είναι παρόμοια, ενώ τα μήκη των εσωνίων διαφέρουν αρκετά, με αποτέλεσμα τα συνολικά μήκη των τριών γονιδίων να είναι διαφορετικά: το *K-ras* έχει μήκος περίπου 50 Kb, το *H-ras* 4.5 Kb και το *N-ras* περίπου 10Kb. Το *K-ras* φέρει δυο εναλλακτικά τέταρτα εξόνια, το 4A και 4B. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα *K-ras* A, *H-ras* και *N-ras* αποτελούνται από 189 αμινοξέα, ενώ του *K-ras* B αποτελείται από 188 αμινοξέα, διότι το 4B εξόνιο έχει ένα κωδικόνιο λιγότερο. Τα τρία γονίδια *ras* φέρουν υποκινητές οι οποίοι είναι πλούσιοι σε GC ενώ δεν διαθέτουν αλληλουχίες TATA ή CAT, χαρακτηριστικά που απαντώνται σε πολλά ακόμη ογκογονίδια. Ο υποκινητής του ανθρώπινου *N-ras* περιέχει συντηρημένες περιοχές πρόσδεσης για τα *CREB/ATF*, *API*, *AP2*, *MYB*, *E4TF1*, *SP1* και *MLTF/MYC*.

3.3 Ρύθμιση των γονιδίων *ras*

Η ύπαρξη μεταγραφικού ελέγχου των γονιδίων *ras* προκύπτει από τη διαφορετική έκφρασή τους σε διάφορους ιστούς. Τα ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων *ras* έχουν μελετηθεί εκτενώς. Φαίνεται να υπάρχουν αρκετές θέσεις έναρξης της μεταγραφής εντοπισμένες σε μια περιοχή 40bp μέσα στο εσώνιο-1. Στη ρύθμιση της έκφρασης των *ras* εμπλέκονται ρυθμιστικές περιοχές (Σχήμα 3.2) που έχουν τη δυνατότητα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (Ishii, 1986). Τέτοια ρυθμιστικά στοιχεία έχουν αναγνωριστεί στην περιοχή του υποκινητή και στο πρώτο εσώνιο του H-*ras*. Τα στοιχεία του πρώτου εσωνίου τροποποιούν την έκφραση του γονιδίου σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, με θετικό και αρνητικό τρόπο. Στο ίδιο εσώνιο έχουν αναγνωριστεί δύο ακόμη θέσεις με λειτουργική σημασία για τη μεταγραφή, μια με ειδικότητα σύνδεσης της πρωτεΐνης p53 (Zachos & Spandidos, 1998) και η δεύτερη με ενεργότητα πρόσδεσης υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid response element-GRE). Παρόμοια περιοχή υπάρχει για οιστρογονικούς υποδοχείς (ERE) στο τέταρτο εσώνιο του H-*ras* (Zachos, 1996).

Στο μηχανισμό έκφρασης των γονιδίων *ras* εμπλέκονται επίσης ρυθμιστικές θέσεις της 3' περιοχής τους. Πρόκειται για επαναλαμβανόμενες μινιδουροφωρικές DNA αλληλουχίες (VTR) ευρισκόμενες 3' του πολυαδενυλικού σήματος, οι οποίες κατέχουν ενεργότητα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (Spandidos & Holmes, 1987). Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες της μεταγραφής *rel/NF-κB* προσδέονται στη VTR περιοχή του H-*ras* (Trepicchio & Krontiris, 1992) και προκαλούν την ικανότητα μετασηματισμού κυττάρων μέσω υπερέκφρασης του γονιδίου (Krontiris, 1993). Στη ρύθμιση, τέλος, της έκφρασης των *ras* υπεισέρχονται ακόμη η μεθυλίωση των υποκινητών τους και ο μηχανισμός του εναλλακτικού ματίσματος στις ρυθμιστικές αλληλουχίες του 4^{ου} εσωνίου και της 3' VTR περιοχής του H-*ras* (Hwang & Cohen, 1997).



Σχήμα 3.2. Απεικόνιση των κυριότερων θέσεων ρύθμισης της μεταγραφής του γονιδίου *H-ras*. Μεταξύ των κωδικοποιών και μη εξωνίων (μαύρα και λευκά κουτιά, αντίστοιχα) σημειώνονται οι θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (Sp-1) στον υποκινητή και οι ρυθμιστικές μεταγραφικές περιοχές των εσωνίων. Σε αυτές προσδένονται η πρωτεΐνη p53, υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (GR) και οιστρογονικοί υποδοχείς (ER). Στην περιοχή μινιδουροφορικού DNA (VTR) προσδένεται ο μεταγραφικός παράγων *rel/NFκ-B*. Η περιοχή IDX αποτελεί θέση ματίσματος (splicing) του mRNA, κατά το οποίο δεν μεταφράζεται το λειτουργικό 4^ο εξώνιο. Ο μηχανισμός αυτός μειώνει τη δράση της ογκοπρωτεΐνης p21.

3.4 Η πρωτεΐνη p21

Οι πρωτεΐνες *ras* είναι GTPάσες προσδεδεμένες στην μεμβράνη του κυττάρου. Η φυσιολογική p21 *ras* (RAS) υδρολύει GTP σε συγκρίσιμα επίπεδα με αυτά των καθαρών G πρωτεϊνών και εμφανίζεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργής μορφής (GTP-RAS) και μιας ανενεργής (GDP-RAS). Τα επίπεδα της απελευθέρωσης GDP και της υδρόλυσης GTP αυξάνονται από την επιρροή τριών κατηγοριών ρυθμιστικών πρωτεϊνών: των GAP (GTP-ase activating proteins) που αυξάνουν τα επίπεδα υδρόλυσης του GTP, των GNRP (guanine nucleotide exchange factors) που καταλύουν την απελευθέρωση του δεσμευμένου GDP, και των GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitors) που

αναστέλλουν την αντικατάσταση του GDP από το GTP και μπορούν επίσης να αναστέλλουν την δράση των GAP πρωτεϊνών. (Boguski 1993, Bourne 1990, Downward 1992, Santos 1989)

Οι φυσιολογικές πρωτεΐνες RAS εμπλέκονται στον έλεγχο την κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης αλλά ακόμα και μια μεταλλαγή σε ένα αμινοξύ μπορεί να δημιουργήσει μια ογκογόνο πρωτεΐνη. Η δράση μιας ποικιλίας αυξητικών παραγόντων αυξάνει την συγκέντρωση των GTP-RAS σε φυσιολογικά κύτταρα και η χωροταξική αλλαγή που επάγεται από την πρόσδεση του GTP ενεργοποιεί τις RAS, που μπορεί πλέον να ενωθούν με πρωτεΐνες- κυτταρικούς στόχους. Στα κύτταρα των θηλαστικών οι RAS ενεργοποιούν μια σειρά πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης που περιλαμβάνει τις RAF1, MAPKK (mitogen-activated protein kinase kinase) και τις κινάσες ERK ή MAP (de Vries-Smits 1992, Cook 1993). Το μονοπάτι RAS-RAF ενεργοποιείται επίσης από την πρωτεΐνη HBx του ιού της ηπατίτιδας B (Doria, 1995). Οι MAPK φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τα ELK1 και JUN και την CREB κινάση/ RSK2 που αποτελεί μέλος της pp 90 RSK οικογένειας (Xing 1996). Η ογκογόνος RAS ενεργοποιεί τη λειτουργία της πρωτεϊνικής κινάσης C και της αντλίας Na^+/H^+ , το μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων, και σε διάφορους τύπους κυττάρων έχει αναφερθεί να ενεργοποιεί τη μεταγραφή πολλών γονιδίων όπως τα ODC1, FOS, JUN, JUNB, MDR1, MYC, p9Ka/42A, TGF α , και TGF β . Οι RAS καταστέλλουν τη μεταγραφή των γονιδίων MYOD1, MYOH, Myf5, MRF4, μυογενίνης, υποδοχέα PDGF και της φιμπρονεκτίνης (Sistonen 1989).

Δυο οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων, οι AP1/ATF και ETS, έχουν αναγνωριστεί ως βασικοί πυρηνικοί διαμεσολαβητές της λειτουργίας των RAS. Η έκφραση του *H-ras* ενισχύει την ικανότητα ενεργοποίησης του NET, ενός παράγοντα που σχετίζεται με τον ETS και διαθέτει ομοιότητα αλληλουχίας με τρεις περιοχές του ELK1 και SAP1 (Giovane 1994). Η έκφραση της ογκογόνου Ras μπορεί να προκαλέσει απόπτωση όταν η πρωτεϊνική κινάση C ρυθμίζεται: ο κυτταρικός θάνατος που εξαρτάται από τα *ras* παρεμποδίζεται από τη δράση του *Bcl2* που φωσφορυλιώνεται με ένα τρόπο που εξαρτάται από τη RAS και σχετίζεται με τη RAS (Chen, 1995).

3.5 Ενεργοποίηση των γονιδίων *ras*

Υπερέκφραση των γονιδίων ή μεταλλάξεις κωδικοποιών αλληλουχιών τους συνεπάγονται αντίστοιχα παραγωγή της πρωτεΐνης p21 σε υπερβολικές ποσότητες ή δομικές αλλοιώσεις που σταθεροποιούν την p21-GTP μορφή. Αμφότεροι οι μηχανισμοί σημαίνουν τη μετατροπή των *ras*

πρώτο-ογκογονιδίων σε ενεργοποιημένα ογκογονίδια. Αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των *ras* είναι η προαγωγή της αντιγραφής και μεταγραφής του DNA, και συνεπώς της έκφρασης πολλών γονιδίων. Τα γεγονότα αυτά συνεισφέρουν στη γενετική αποδιοργάνωση των κυττάρων και την ανάπτυξη του καρκινικού φαινοτύπου. Τα ενεργοποιημένα *ras* παρουσιάζουν υψηλότατο εξαλλακτικό δυναμικό *in vitro* (Spandidos & Wilkie, 1984). Αλλά και *in vivo*, στον καρκίνο του παγκρέατος όπου οι μεταλλάξεις των *ras* αποτελούν σταθερό εύρημα, συμβαίνουν σε πρώιμα στάδια ή ακόμη και σε αλλοιώσεις του οργάνου που προηγούνται και σχετίζονται παθογενετικά με την ανάπτυξη της νεοπλασίας (Yanagisawa, 1993).

3.6. Μεταλλαγμένες πρωτεΐνες *ras*

Οι πρωτεΐνες *ras*, εκτός από το ρόλο που παίζουν στη διαφοροποίηση και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, συμμετέχουν και στον κυτταρικό μετασχηματισμό, όταν κωδικοποιούνται όχι από το φυσιολογικό αλλά από μεταλλαγμένο γονίδιο *ras* (Barbacid 1987, Spandidos et al 1988, Spandidos et al 1989).

Τα γονίδια *ras* των θηλαστικών αποκτούν ικανότητα μετασχηματισμού με μια σημειακή μετάλλαξη στη μεταφραζόμενη αλληλουχία τους (Seeburg et al 1984, Der et al 1986). Οι μεταλλαγές στα γονίδια *ras* εντοπίζονται στα κωδικόνια 12,13, 59 και 61. Στη θέση 12 (εξώνιο 1) των πρώτο-ογκογονιδίων *ras* κωδικοποιείται η Gly. Υποκατάσταση της Gly12 με οποιοδήποτε άλλο αμινοξύ (εκτός της Pro) οδηγεί στην ογκογονική ενεργοποίηση της p21. Όμοιο αποτέλεσμα υπάρχει και όταν παρουσιάζεται έλλειψη της Gly12. Αντικατάσταση του γειτονικού αμινοξέος Gly13 προσδίδει επίσης ιδιότητα μετασχηματισμού στην p21. Αντικατάσταση της Gln61 με οποιοδήποτε αμινοξύ εκτός από την Pro και το Glu οδηγεί σε μεταλλαγμένη *ras*. Αντικατάσταση της Ala59 με Thr έχει παρατηρηθεί σε ρετροϊκά *ras* ή σε πειράματα *in vitro* μεταλλαξογένεσης. Αν και στα γονίδια *ras* αρκεί μια μόνο μετάλλαξη ικανή να μετατρέψει το *ras* σε ογκογονίδιο (Seeburg et al 1984, Spandidos et al 1984), τα ρετροϊκά *ras* εμφανίζουν δυο μεταλλαγές (κωδικόνια 12 και 59), χωρίς αυτό να συνδέεται με αυξημένη ικανότητα μετασχηματισμού (Aguilar-Cordova et al 1991).

Οι θέσεις 12, 13, 59 και 61 βρίσκονται στις περιοχές πρόσδεσης των GTP και GDP (Grand et al 1991, Bollag et al 1991, Schweins et al 1995).

Οι μεταλλαγές δρουν σταθεροποιώντας την ενεργή GTP-p21 είτε παρεμποδίζοντας την ενδογενή ενεργότητα GTPάσης, είτε παρεμποδίζοντας την αρνητική ρύθμιση μέσω των παραγόντων GAP (*ras*-GAP, NF1), είτε αυξάνοντας το ρυθμό αντικατάστασης του GDP από το GTP, είτε επάγοντας μια στερεοδομική αλλαγή που οδηγεί σε ενεργή πρωτεΐνη χωρίς πρόσδεση νουκλεοτιδίων (Grand et al 1991, Bollag et al 1991, Scweins et al 1995). Μεταλλαγές των τριών γονιδίων έχουν περιγραφεί στους περισσότερους τύπους ανθρώπινου καρκίνου (Σχήμα 3.3, Πίνακας 3.2).

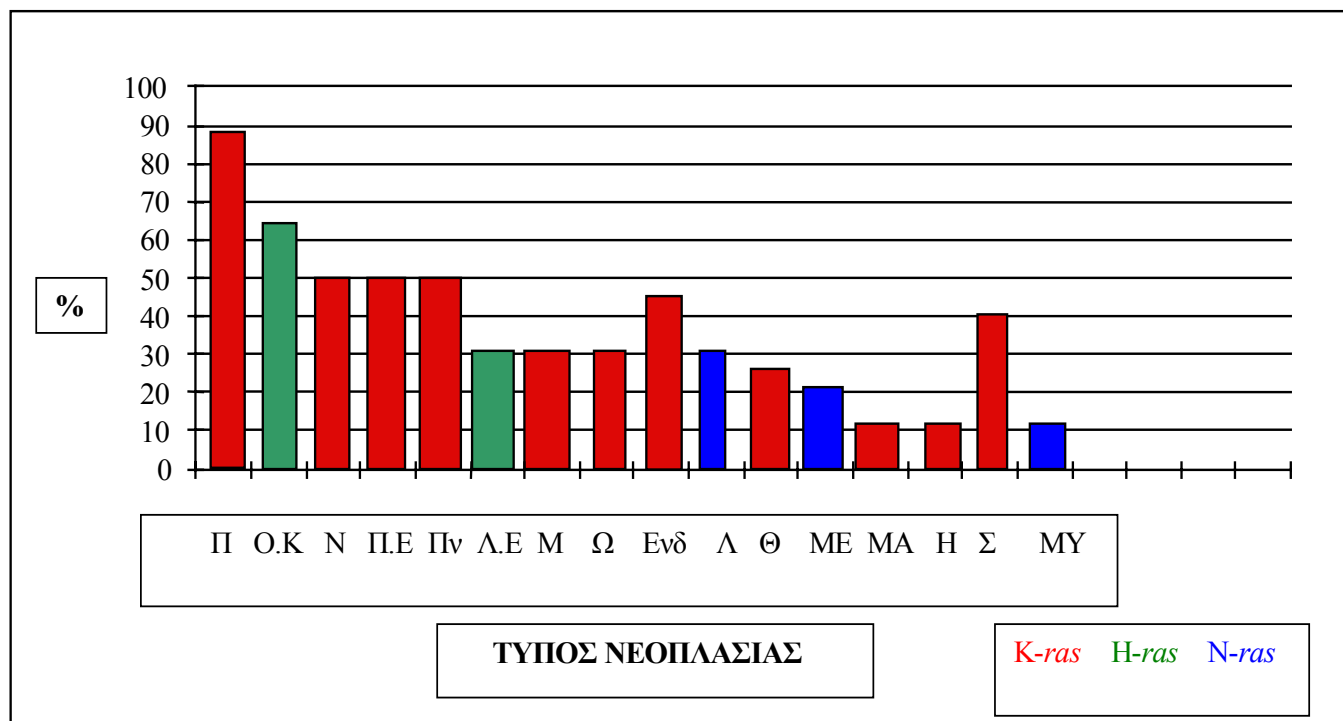
Η δυνατότητα των πρωτοογκογονιδίων *ras* να μετατραπούν σε ογκογονίδια μετασχηματισμού δεν αναδεικνύεται μόνο μέσω των ποιοτικών μεταβολών της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και κατ' επέκταση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, αλλά και μέσω ποσοτικής μεταβολής (Spandidos et al 1985, Lang et al 1986). Δηλαδή, αν το πρώτο-ογκογονίδιο βρεθεί μετά από ένα ισχυρό υποκινητή, υπερεκφράζεται και μπορεί να προκαλέσει μετασχηματισμό (Spandidos et al 1989).

Διάφορα πειραματικά δεδομένα συσχετίζουν την προδιάθεση για καρκίνο με διάφορες πολυμορφικές θέσεις μέσα και γύρω από την περιοχή των γονιδίων *ras*. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο H- *ras*, στο οποίο υπάρχει μινιδορυφορική περιοχή (VTR) μετά τη θέση πολυαδενυλίωσης (Krontiris et al 1993) και μια μικροδορυφορική περιοχή στο εσώνιο 1 (Iwahana et al 1990, Tanci et al 1992).

Πίνακας 3.2. Συχνότητα ενεργοποίησης των γονιδίων *ras* σε καρκίνους διαφόρων οργάνων του ανθρώπου.

Τύπος Νεοπλασίας	Γονίδιο	Συχνότητα (%)
Παγκρέατος (Π)	<i>K-ras</i> ,	90
Ουροδόχου κύστεως (Ο.Κ)	<i>H-ras</i> *	66
Νεφρών (Ν)	<i>K-ras</i>	50
Αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου (Π.Ε)	<i>K-ras</i>	50
Αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα (Πν)	<i>K-ras</i>	50
Λεπτό έντερο (Λ.Ε)	<i>H-ras</i>	31
Τράχηλος μήτρας (Μ)	<i>K-ras</i> , <i>H-ras</i>	26, 10.5
Ωοθήκες (Ω)	<i>K-ras</i>	30
Ενδομήτριο (Ενδ)	<i>K-ras</i>	47
Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (Λ)	<i>N-ras</i>	30
Θυρεοειδής (Θ)	<i>H-</i> , <i>K-</i> , <i>N-ras</i>	25
Μελάνωμα (ΜΕ)	<i>N-ras</i>	20
Μαστός (ΜΑ)	<i>K-ras</i>	12
Ηπατοκυτταρικό (Η)	<i>K-ras</i> *	12
Στομάχου (Σ)		0-40
Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (ΜΥ)	<i>N-ras</i>	10

Σχήμα 3.3. Μεταλλάξεις των γονιδίων *ras* σε καρκίνους διαφόρων οργάνων του ανθρώπου.



3.7. Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του γονιδίου *H-ras*

Στο ευκαρυωτικό γονιδίωμα έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA, το μήκος των οποίων ποικίλει από μερικές δεκάδες ή εκατοντάδες νουκλεοτιδικών βάσεων (minisatellites) (Jelinek et al 1982, Lewin 1990, Nowak 1994, Charlesworth et al 1994). Οι αλληλουχίες αυτές απαντώνται συχνότερα στις περιοχές των χρωμοσωμικών τελομερών. Ωστόσο πολλές σχετίζονται με διάφορα γονίδια μέσα στα χρωμοσώματα και βρίσκονται είτε ανάμεσα σε γονίδια, είτε μέσα σε γονίδια (συνήθως σε εσόνια).

Το γονίδιο *H-ras* περιέχει δυο τέτοιες περιοχές με επαναλαμβανόμενο DNA, μια μικροδορυφορική περιοχή στο 5' άκρο του γονιδίου και μια μινιδορυφορική περιοχή (VTR) στο 3' άκρο του γονιδίου (Capon et al 1983, Iwahana et al 1990).

3.7.1 Η μινιδουροφορική περιοχή (*VTR*) του ογκογονιδίου *H-ras*

Το minisatellite ή Variable Tandem Repeat (*VTR*) εντοπίζεται περίπου 1000 νουκλεοτιδικές βάσεις μετά από τη θέση πολυαδενυλίωσης και προκύπτει από την επανάληψη μιας αλληλουχίας 28 βάσεων (Caron et al 1983). Η αλληλουχία αυτή επαναλαμβάνεται 30 ως 100 φορές περίπου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός δευτέρου πολυμορφισμού μήκους στο γονίδιο *H-ras*. Έχουν περιγραφεί τριάντα αλληλόμορφα της *VTR* περιοχής με μήκος από 1000 ως 3000 βάσεις περίπου (Krontiris et al 1985). Μετά από πληθυσμιακές μελέτες, όπου εξετάστηκαν οι συχνότητες των *VTR* αλληλομόρφων, χαρακτηρίστηκαν ως κοινά (common) τέσσερα αλληλόμορφα, τα a1, a2, a3 και a4 που αντιπροσωπεύουν το 94% όλων των αλληλομόρφων στους Καυκάσιους (Krontiris et al 1993). Όλα τα υπόλοιπα αλληλόμορφα χαρακτηρίζονται ως σπάνια (rare). Χρησιμοποιώντας γενετικούς δείκτες, που εντοπίζονται αριστερά της περιοχής του *VTR*, βρέθηκε ότι τα τέσσερα κοινά αλληλόμορφα αποτελούν τους προγόνους των σπάνιων αλληλομόρφων (Kasperczyk et al 1989, Kasperczyk et al 1990). Συγκεκριμένα το κάθε σπάνιο αλληλόμορφο προέκυψε από το πλησιέστερο σε μέγεθος κοινό αλληλόμορφο, μέσω της εισδοχής ή έλλειψης κάποιων επαναλαμβανόμενων μονάδων των 28 βάσεων (Σχήμα 3.4).

Συγκριτικές μελέτες ανάμεσα σε πληθυσμιακά δείγματα φυσιολογικών ατόμων και καρκινοπαθών αποκάλυψε μια μέτρια αλλά σταθερή συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης σπανίων αλληλομόρφων *H-ras* στην περιοχή *VTR* και εμφάνισης κάποιας συχνής μορφής καρκίνου, όπως αυτής του μαστού (Krontiris et al 1985). Διαπιστώθηκε ότι περίπου 9% των καρκινοπαθών (με κάποια κοινή μορφή καρκίνου), φέρει τουλάχιστον ένα σπάνιο αλληλόμορφο *VTR* στο γονίδιο *H-ras*. Η ύπαρξη αυτού του σπάνιου αλληλομόρφου θεωρείται ως μια πιθανή αιτία πρόκλησης της νεοπλασίας. Η συχνότητα των σπάνιων αλληλομόρφων *VTR* στο γονιδίωμα καρκινοπαθών εκτιμήθηκε τριπλάσια σε σύγκριση με φυσιολογικούς πληθυσμούς χωρίς εμφάνιση καρκίνου (Krontiris et al 1993). Πολλά από τα σπάνια αλληλόμορφα έχουν αναφερθεί μόνο σε ασθενείς με καρκίνο (Krontiris et al 1986).

Πληθυσμιακές μελέτες σε υποπληθυσμούς ενός ευρύτερου δείγματος Καυκάσιων ατόμων έδειξε ότι δεν υπάρχει ετερογένεια ανάμεσα στους πληθυσμούς για τη θέση *VTR* και ότι οι συχνότητες των αλληλομόρφων ακολουθούν το ισοζύγιο Hardy-Weinberg (Devlin et al 1993). Το γεγονός αυτό θεωρήθηκε ως μια επιβεβαίωση ότι η πρόκληση νεοπλασίας οφείλεται στην παρουσία και μόνο των σπάνιων αλληλομόρφων *VTR* (Krontiris et al 1993). Ο μοριακός μηχανισμός πρόκλησης της

καρκινογένεσης λόγω παρουσίας των σπάνιων αλληλομόρφων παραμένει άγνωστος, αν και έχουν προταθεί κάποια θεωρητικά μοντέλα (Σχήμα 3.5).

Η περιοχή αυτή του *VTR* διαθέτει ενεργότητα ενισχυτή και σε συνδυασμό με τον υποκινητή του γονιδίου *H-ras* διευκολύνει την έκφραση του γονιδίου *H-ras* αλλά και ετερόλογων γονιδίων, με τρόπο ανεξάρτητο από τη θέση και τον προσανατολισμό της (Spandidos et al 1987, Cohen et al 1987, Green et al 1993). Σε *in vitro* μελέτες κυτταρικού μετασχηματισμού έχει δειχθεί ότι αλληλουχίες που περιέχουν την περιοχή *VTR* διευκολύνουν την έκφραση της πρωτεΐνης *ras*, ενώ η ικανότητα μετασχηματισμού του γονιδίου *H-ras* όταν λείπει η περιοχή *VTR* είναι μειωμένη 5-10 φορές, όπως μειωμένα είναι και τα επίπεδα του προϊόντος του γονιδίου *H-ras* (Krontiris et al 1985). Επιπλέον έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι αυτή η ενεργότητα ενισχυτή που διαθέτει η περιοχή *VTR* μπορεί να διαφέρει από αλληλόμορφο σε αλληλόμορφο με τρόπο που εξαρτάται από το μήκος των τελευταίων (Green et al 1993).

Είναι επίσης γνωστό ότι η περιοχή αυτή προσδένει τέσσερα τουλάχιστον μέλη (p85, p50, p45 και p72) της οικογένειας ρυθμιστικών παραγόντων της μεταγραφής *rel/NF-kB* και προσδένει τη συστατική μορφή τους και όχι την επαγόμενη (Trepicchio et al 1992). Πιθανολογείται ότι οι αλληλεπιδράσεις αυτών των παραγόντων μεταγραφής με το γονίδιο επηρεάζουν τη μεταγραφή του, και ότι μεταλλαγές των κοινών αλληλομόρφων *VTR* ίσως καταστρέφουν αυτά τα ρυθμιστικά δίκτυα, είτε αλλάζοντας τον αριθμό των υπομονάδων που προσδένουν εκλεκτικά κάποιους από αυτούς τους παράγοντες μεταγραφής, είτε αλλάζοντας τις συγκεντρώσεις ισορροπίας των παραγόντων αυτών, που γίνονται έτσι διαθέσιμοι για πρόσδεση σε άλλα σημεία του γονιδίου (Σχήμα 3.5) (Green et al 1993, Krontiris et al 1993).

3.7.2 Η μικροδορυφορική περιοχή του ογκογονιδίου *H-ras*

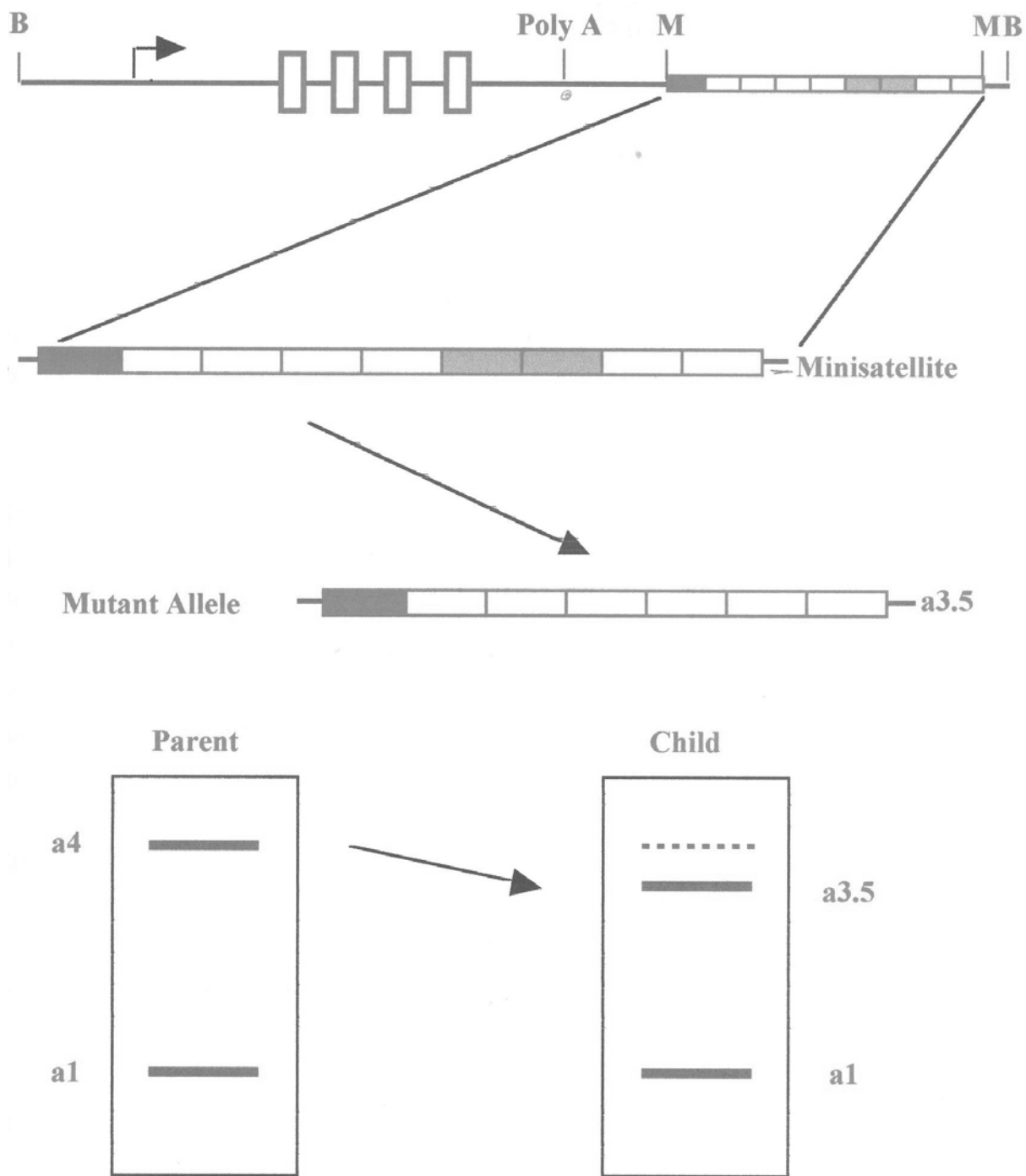
Η μικροδορυφορική περιοχή βρίσκεται μέσα στο πρώτο εσώνιο, 83 βάσεις πριν από το 5' άκρο του γονιδίου (Iwahana et al 1990). Το μικροδορυφορικό αυτό τμήμα οφείλεται στην παρουσία ενός επαναλαμβανόμενου εξανουκλεοτιδίου –του GGGCCT- και έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός πολυμορφισμού μήκους στο γονίδιο *H-ras*. Με βάση τον πολυμορφισμό αυτό είχαν αρχικά χαρακτηριστεί δυο αλληλόμορφα του γονιδίου *H-ras*, P1 και P2 που φέρουν αντίστοιχα τέσσερις και δυο επαναλήψεις του εξανουκλεοτιδίου. Ο χαρακτηρισμός των δυο αυτών αλληλομόρφων είχε γίνει αρχικά με πέψη του γονιδίου *H-ras* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *PstI*. Τα διάφορα τμήματα του

DNA που προέκυψαν μετά τη δράση του ενζύμου PstI σε διάφορα δείγματα DNA περιείχαν μέρος του εσωνίου 1 και ολόκληρο το εξώνιο 1 και διέφεραν κατά 12 βάσεις. Αργότερα απεδείχθη πειραματικά, με τη βοήθεια της PCR αντίδρασης, η ύπαρξη ενός τρίτου αλληλομόρφου, του P3, που περιείχε τρεις επαναλήψεις του εξανουκλεοτιδίου (Tanci et al 1992).

3.7.3 Σχέση μεταξύ των δυο πολυμορφικών θέσεων του γονιδίου *H-ras*

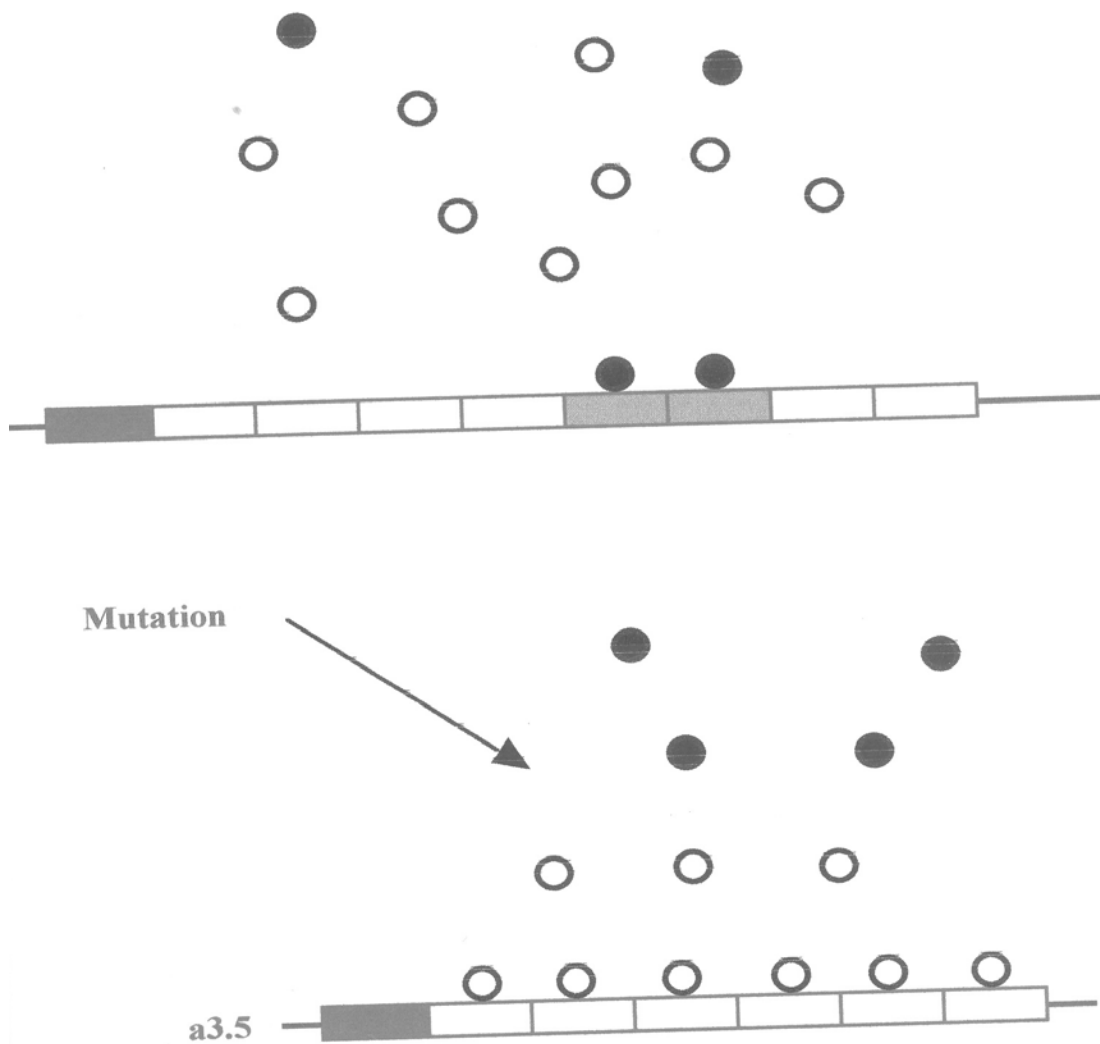
Σημαντικό πειραματικό δεδομένο αποτελεί η σχέση που συνδέει τις δυο αυτές περιοχές, την εξανουκλεοτιδική θέση και το *VTR*. Έχει βρεθεί ότι μεταξύ τους υπάρχει ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) (Iwahana et al 1990). Συγκεκριμένα έχει βρεθεί πειραματικά ότι το αλληλόμορφο της εξανουκλεοτιδικής θέσης με τις περισσότερες επαναλήψεις, το P1 (τέσσερις επαναλήψεις) βρίσκεται πάντα συνδεδεμένο με τα κοινά αλληλόμορφα a1 ή a2, ή με κάποιο από τα σπάνια παράγωγά τους (a1r ή a2r). Αντίστοιχα, το αλληλόμορφο της εξανουκλεοτιδικής θέσης με τις λιγότερες επαναλήψεις, το P2 (δυο επαναλήψεις) βρίσκεται πάντα μαζί με ένα από τα κοινά αλληλόμορφα a3 ή a4 της θέσης *VTR*, ή κάποιο από τα σπάνια παράγωγά τους (a3r ή a4r). Ανιχνεύονται δηλαδή μόνο οι συνδυασμοί P1-a1 ή a2 και P2-a3 ή a4, ενώ οι συνδυασμοί P1-a3 ή a4 και P2-a1 ή a2 δεν έχουν παρατηρηθεί μέχρι σήμερα (Σχήμα 3.6). Αυτή η ανισορροπία σύνδεσης ανάμεσα στους δυο πολυμορφισμούς υποδηλώνει ότι το γονίδιο *H-ras* με συνδυασμό P1-a3 ή a4 και P2-a1 ή a2 προσδίδει κάποιο μειονέκτημα για την κυτταρική αύξηση και ότι τα κύτταρα που έχουν αυτά τα γονίδια δεν μπορούν να επιβιώσουν.

Πρέπει να σημειωθεί ότι στην παραπάνω μελέτη της ανισορροπίας σύνδεσης δεν συμπεριλαμβάνεται το τρίτο αλληλόμορφο της εξανουκλεοτιδικής θέσης, το P3 με τις τρεις επαναλήψεις, επειδή αυτό δεν είχε ακόμη περιγραφεί (Tanci et al 1992).



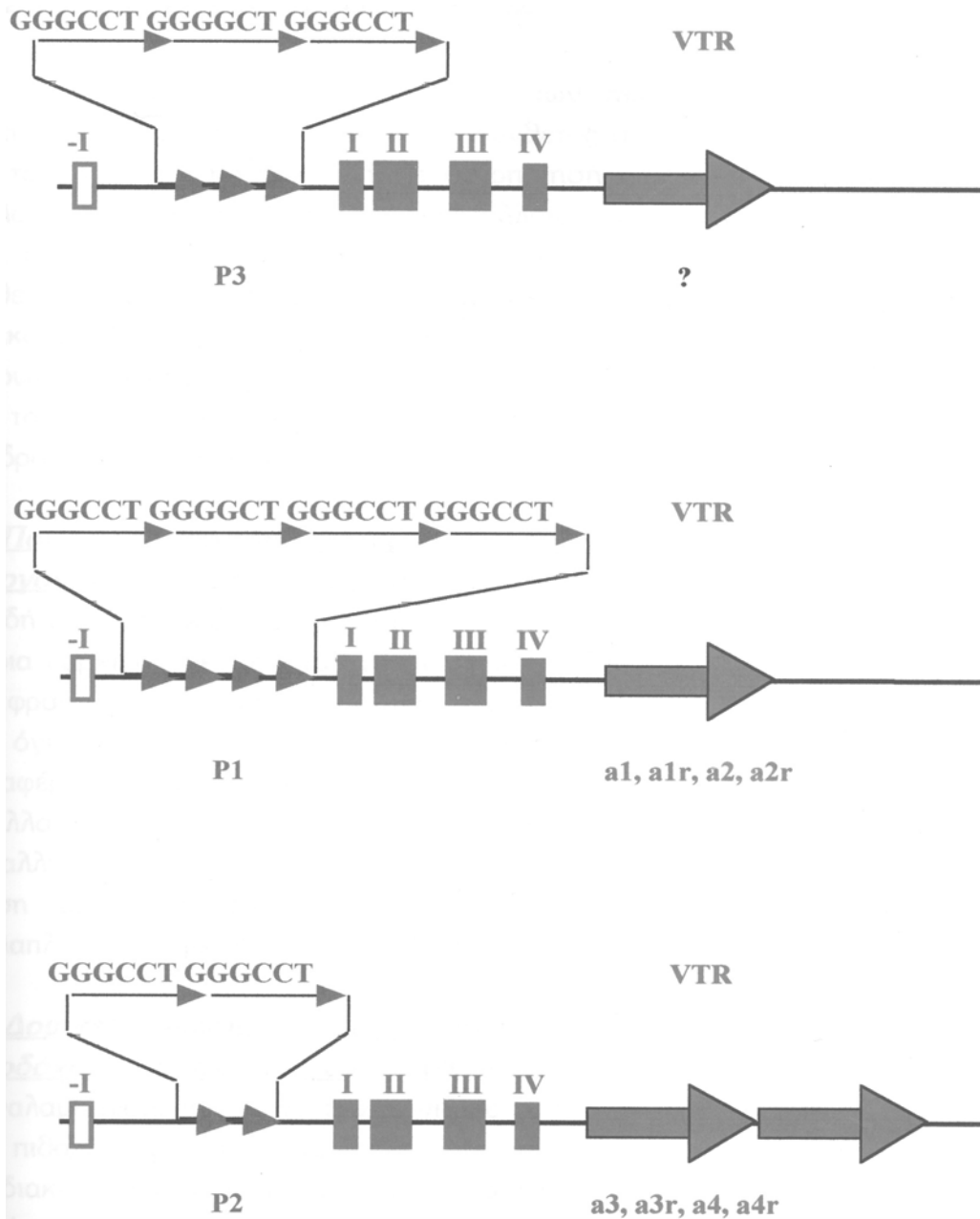
Σχήμα 3.4 Τμήμα του *Bam*HI που περιλαμβάνει το ανθρώπινο γονίδιο *H-ras*. Τα τετράγωνα αντιπροσωπεύουν τα τέσσερα μεταφραζόμενα εξώνια και το βέλος δείχνει τη θέση έναρξης της μεταγραφής καθώς και την περιοχή στην οποία προσδένονται ρυθμιστικοί μεταγραφικοί

παράγοντες. Δείχνεται επίσης η θέση πολυαδενυλίωσης (Poly A). Ακριβώς μετά από τη θέση πολυαδενυλίωσης βρίσκεται η περιοχή *VTR*. Μια πιο μεγεθυμένη άποψη της *VTR* περιοχής φαίνεται πιο κάτω, όπου παριστάνεται το αλληλόμορφο a4. Τα παραλληλόγραμμα αντιπροσωπεύουν επαναλήψεις της «consensus» αλληλουχίας των 28 βάσεων. Δείχνονται μόνο μερικές από τις 85 περίπου επαναλαμβανόμενες μονάδες του a4 αλληλομόρφου. Οι διαφορετικές μορφές των παραλληλογράμμων αντιπροσωπεύουν διαφορές στην αλληλουχία του DNA που υπάρχει από μονάδα σε μονάδα. Η αφαίρεση ή η προσθήκη επαναλαμβανόμενων μονάδων οδηγεί στην παραγωγή των σπάνιων (rare) αλληλομόρφων (Krontiris et al 1993) (B=BamHI, M=MspI).



Σχήμα 3.5 Μοντέλο που απεικονίζει την επίδραση του μινιδουροφορικού *H-ras* στη ρύθμιση της μεταγραφής. Πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από μέλη της οικογένειας *rel/NF-kB* σχηματίζουν διμερή και παράγουν μια ποικιλία DNA ρυθμιστικών παραγόντων. Οι αλληλεπιδράσεις με το DNA έχουν ως αποτέλεσμα τόσο ενεργοποιητικές όσο και κατασταλτικές επιδράσεις στη μεταγραφή. Μεταλλαγές στα κοινά αλληλόμορφα πιθανόν καταστρέφουν αυτά τα ρυθμιστικά με δυο τρόπους, οι οποίοι επηρεάζουν τη ρύθμιση της έκφρασης του *H-ras1*. Πρώτον, με τη μεταβολή του αριθμού των υπομονάδων στις οποίες δεσμεύονται εκλεκτικά ορισμένες τάξεις παραγόντων (ορισμένες υπομονάδες έχουν απαλειφθεί στο αλληλόμορφο *a3.5*) πιθανά αλλοιώνεται το ισοζύγιο των συγκεντρώσεων

παραγόντων που διατίθενται για δέσμευση και σε άλλες ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος- π.χ. στην 5' μεταγραφική ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου *H-ras1*. Δεύτερον, οι μεταλλαγές ίσως οδηγούν σε αυξημένη δέσμευση ορισμένων τάξεων πρωτεϊνών rel με περισσότερο ομοιογενείς λειτουργικές επιδράσεις που επηρεάζουν άμεσα τη μεταγραφή του *H-ras 1*. Κάθε μεταλλαγή δύναται να προκαλέσει μια ποικιλία επιδράσεων, ανάλογα με το συνδυασμό των κατασταλατικών και διεγερτικών rel αλληλεπιδράσεων που επηρεάζονται (Krontiris et al 1993). (Οι μαύροι κύκλοι παριστάνουν κατασταλατικούς παράγοντες και οι διαφορετικές μορφές παραλληλογράμμων τις περιοχές πρόσδεσης που αναγνωρίζουν. Δείχνονται μόνο μερικές από τις 85 περίπου επαναλαμβανόμενες μονάδες του a4 αλληλομόρφου).



Σχήμα 3.6 Σχηματική αναπαράσταση των μικροδορυφορικών και *VTR* περιοχών στο γονίδιο *H-ras*. Τα μικρά βέλη δείχνουν τις επαναλαμβανόμενες μονάδες μιας «consensus» αλληλουχίας έξι νουκλεοτιδίων (microsatellite), ενώ τα μεγάλα βέλη αντιπροσωπεύουν το καθένα 40 επαναλήψεις της επαναλαμβανόμενης μονάδας 28 βάσεων. Φαίνεται σχηματικά η ανισορροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) (Iwahana et al 1990).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ P53

4.1 Εισαγωγή

Το γονίδιο της *p53* εντοπίζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (Benchimol, 1985) και κωδικοποιεί για μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη 375 αμινοξέων. Αρχικά, υπήρξε η άποψη ότι το φυσιολογικό γονίδιο *p53* είναι ένα επικρατές ογκογονίδιο όπως το *ras* και το *myc*. Η άποψη όμως αυτή έπαψε να ισχύει όταν cDNA κλώνοι του γονιδίου *p53* από φυσιολογικό ιστό δεν οδήγησαν σε καρκινική εξαλλαγή φυσιολογικά κύτταρα, ενώ cDNA κλώνοι του γονιδίου *p53* που απομονώθηκαν από καρκινικές σειρές προερχόμενες από όγκους οδήγησαν σε καρκινική εξαλλαγή φυσιολογικά κύτταρα όταν χρησιμοποιήθηκαν μαζί με το γονίδιο *ras* (Jenkins 1984). Οι αλληλουχίες των cDNA του *p53* από τις κυτταρικές σειρές όγκων έδειξαν ότι οι όγκοι περιείχαν μεταλλάξεις εντός των συντηρημένων κατά την εξέλιξη περιοχών της πρωτεΐνης. Από την παρατήρηση ότι ορισμένες λευχαιμικές σειρές κυττάρων ποντικού είχαν υποστεί παρεμβολές και απαλείψεις στο γονίδιο *p53* που είχαν σαν αποτέλεσμα την πλήρη απώλεια της έκφρασης της *p53* προέκυψε η δυνατότητα ότι το φυσιολογικό *p53* θα μπορούσε να είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Η άμεση επιβεβαίωση αυτής της ιδέας προήλθε από πειράματα συν-επιμόλυνσης στα οποία φάνηκε ότι το φυσιολογικό *p53* θα μπορούσε να καταστείλει την εξαλλαγή όπως π.χ. σε πειράματα συνεργασίας ογκογονιδίων όπως του *ras* και του φυσιολογικού *p53*. Διάφοροι όγκοι του ανθρώπου έχει δειχθεί ότι περιέχουν μεταλλαγμένες πρωτεΐνες *p53* αναλύοντας τις αλληλουχίες των βάσεων του cDNA και χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανοσοκυτταροχημείας.

Το γονίδιο της *p53* αποτελεί ένα από τα πιο συχνά επηρεασμένα γονίδια στην καρκινογένεση του ανθρώπου (Levine 1991). Ανακαλύφθηκε επειδή κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που συμπλέκεται με την μεγάλη T πρωτεΐνη εξαλλαγής του ογκογόνου ιού SV40. Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη *p53* συνδέεται και με τις πρωτεΐνες εξαλλαγής άλλων DNA ογκογόνων ιών, την E1B του αδενοϊού και την E6 του HPV-16 και 18 (Sarnow 1982). Ο σχηματισμός συμπλέγματος με το μεγάλο T αντιγόνο του SV40 σταθεροποιεί την *p53* αυξάνοντας το χρόνο ημιζωής της από 6-20 λεπτά σε αρκετές ώρες (Oren 1981).

Αυτή η σταθεροποίηση είναι χαρακτηριστική της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53 στα κύτταρα των όγκων (Reich 1983).

Από την ανάλυση ενός αριθμού μεταλλάξεων στο p53 είναι εμφανές ότι υπάρχουν αρκετές κατηγορίες μεταλλάξεων. Όλες οι μεταλλάξεις που έχουν εξεταστεί μέχρι τώρα δείχνουν ότι οδηγούν στο σχηματισμό πρωτεϊνών p53 που έχουν χάσει την ικανότητα να καταστέλλουν την εξαλλαγή. Ορισμένες από τις μεταλλάξεις δύνανται να είναι μεταλλάξεις αρνητικά επικρατείς που παρεμποδίζουν τη λειτουργία του φυσιολογικού p53 στο σχηματισμό συμπλέγματος μεταξύ του μεταλλαγμένου και του φυσιολογικού p53 (Spandidos 1992).

Ορισμένα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα δεν έχουν μόνο χάσει την ογκοκατασταλτική δράση, αλλά επίσης δύνανται να δρουν ως επικρατή συνεργαζόμενα ογκογονίδια στην εξαλλαγή των πρωτογενών κυττάρων μαζί με τη ras p21. Αυτή η ιδιότητα δεν έχει σχέση με την ικανότητα να σχηματίζεται σύμπλεγμα με το φυσιολογικό p53 επειδή η εισαγωγή ενός μεταλλαγμένου γονιδίου p53 σε μια κυτταρική σειρά που είχαν απαλειφθεί και τα δυο αλληλόμορφα p53 οδηγούσε σε αύξηση της ογκογόνου ιδιότητάς της. Περαιτέρω, πολλοί όγκοι περιέχουν εκφρασμένο το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο p53 χωρίς να έχουν χάσει το φυσιολογικό αλληλόμορφο (Spandidos 1992).

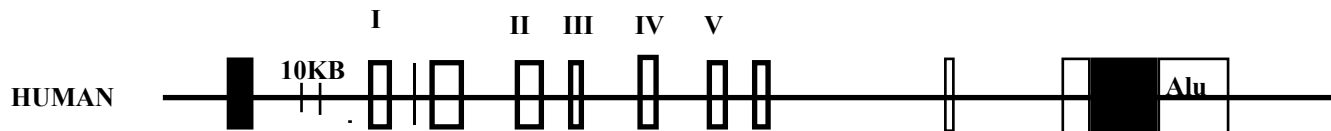
Η ύπαρξη ορισμένων όγκων στον άνθρωπο, στους οποίους αμφότερα τα αλληλόμορφα του p53 έχουν απαλειφθεί ή στους οποίους υπάρχει μια πλήρης απουσία της έκφρασής τους, υποδηλώνει ότι σε ορισμένες περιπτώσεις το p53 πραγματικά συμπεριφέρεται σαν ένα υπολειπόμενο ογκογονίδιο. Απαιτείται λεπτομερής ανάλυση για να καθοριστεί το ποσοστό των μεταλλάξεων που έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της ογκοκατασταλτικής δράσης και η οποία με τη σειρά της ενισχύει την ικανότητα να δρα ως ένα επικρατούν ογκογονίδιο. Η συμπεριφορά διαφορετικών τύπων μεταλλάξεων δύναται να επηρεασθεί από την παρουσία ενός φυσιολογικού γονιδίου p53 .

4.2 Δομή και οργάνωση του γονιδίου p53

Το γονίδιο p53 του ανθρώπου εντοπίζεται στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 17, στη θέση 17p13.1 (Benchimol 1985). Το γονίδιο της p53 έχει βρεθεί ότι περιορίζεται στα σπονδυλωτά.

Η οργάνωση του γονιδιώματος των γονιδίων p53 διαφορετικών ειδών δείχνει μια σημαντική ομοιότητα μεταξύ τους. Τα γονίδια περιέχουν 11 εξώνια στα οποία παρεμβάλλονται 10 εσώνια. Σε όλες τις περιπτώσεις το εξώνιο 1 του γονιδίου p53 είναι ένα εξώνιο που δεν μεταφράζεται.

Τα εξώνια 2, 4, 5, 7 και 8 κωδικοποιούν για 5 ομάδες αμινοξικών αλληλουχιών που είναι ιδιαίτερα συντηρημένες εξελικτικά (Σχήμα 4.1).



Σχήμα 4.1 Γονιδιακή οργάνωση του γονιδίου *p53*. Τα σύμβολα I μέχρι V αντιστοιχούν στις εξελικτικές συντηρημένες περιοχές του γονιδίου που εντοπίζονται στα διάφορα εξώνια.

Ένα βασικό χαρακτηριστικό όλων των γονιδίων *p53* είναι η παρουσία ενός μεγάλου εσωνίου στο 5' άκρο του γονιδίου. Η βιολογική σημασία του δεν είναι γνωστή. Μπορεί όμως να εμπλέκεται σε μια πορεία που σχετίζεται με την μεταγραφή ή τη σταθερότητα του mRNA του γονιδίου της *p53*.

Ένα δεύτερο χαρακτηριστικό του γονιδίου *p53* είναι ότι το πρώτο εξώνιο περιλαμβάνει, όπως προαναφέρθηκε, αποκλειστικά 5' μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες. Μια μεγάλη συντηρητική περιοχή του πρώτου εξωνίου που φέρει δυαδική συμμετρία είναι παρούσα στο πρώτο εξώνιο του γονιδίου *p53* του ποντικού, του αρουραίου και του ανθρώπου. Τα δυο κύρια σημεία έναρξης της μεταγραφής πιθανώς βρίσκονται το ένα στο 3' και το άλλο στο 5' άκρο της περιοχής του πρώτου εξωνίου που φέρει δυαδική συμμετρία.

Η έκφραση του γονιδίου της *p53* του ανθρώπου ελέγχεται από δυο υποκινητές. Ο ένας, που ονομάζεται P1, εντοπίζεται 100-250 ζευγάρια βάσεων πριν από το πρώτο εξώνιο που δεν μεταφράζεται και δεν φέρει καμιά από τις αλληλουχίες που βρίσκονται στους περισσότερους από τους υποκινητές των ευκαρυωτικών οργανισμών όπως το CAAT box, το TATA box και αλληλουχίες πλούσιες σε G/C. Ένας δεύτερος υποκινητής, ο P2, εντοπίζεται μέσα στο πρώτο εσώνιο (Reisman 1988). Έχει δειχθεί ότι μια διαφορεική ρύθμιση των δυο υποκινητών φαίνεται ότι είναι σημαντική για την έκφραση του mRNA του *p53* κατά τη διάρκεια της τελικής διαφοροποίησης (Reisman 1989). Σε μια προσπάθεια να αναγνωριστούν λειτουργικά σημαντικά στοιχεία του γονιδίου *p53* που παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική του ρύθμιση βρέθηκε ότι ο υποκινητής περιέχει μια θέση πρόσδεσης του πυρηνικού παράγοντα 1 (NF1) και μια δεύτερη θέση πρόσδεσης ενός παράγοντα που επάγεται από τον ορό ο οποίος σχετίζεται με τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1 (Ginsberg 1990). Πάντως για την έκφραση των

φυσιολογικών επιπέδων του mRNA του *p53* δεν απαιτείται μόνο η ακριβής ισορροπία μεταξύ των δυο υποκινητών του γονιδίου. Τα εσώνια του γονιδίου *p53* είναι απολύτως απαραίτητα για τα φυσιολογικά επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου *p53*. Η παρουσία του τέταρτου εσωνίου έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνει την αποδοτικότητα της έκφρασης του γονιδίου *p53* συγκριτικά με ένα χωρίς εσώνια cDNA *p53* γονίδιο. Όπως έχειδειχθεί σε διαγονιδιακά ποντίκια αυτή η δραστηριότητα ενισχυτή του τέταρτου εσωνίου φαίνεται ότι έχει ειδικευση ανάλογα με τον ιστό (Lozano 1991). Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι μόνο αυτά τα γονίδια *p53* που έχουν το τέταρτο εσώνιο στη σωστή του θέση οδηγούν σε αυξημένη έκφραση του γονιδίου δείχνοντας ότι το αποτέλεσμα του τέταρτου εσωνίου εξαρτάται από τη θέση του. Έχει βρεθεί ότι σε ένα τμήμα του τέταρτου εσωνίου δεσμεύονται με μεγάλη εξειδίκευση πρωτεΐνες και αυτή η δέσμευση φαίνεται ότι έχει λειτουργική σημασία (Beenken 1991).

Ανάλυση με Northern blot έδειξε ότι το mRNA του γονιδίου *p53* διαφορετικών ειδών είναι περίπου 2-3 kb. Η 3' μη μεταφραζόμενη ακολουθία αυτών των mRNA κυμαίνεται από 800bp για το *p53* του ποντικού μέχρι 1800bp για τον *X. laevis*. Η ακολουθία ATTTA, πλούσια σε A/T που βρίσκεται στην 3' μη κωδικοποιούσα περιοχή πολλών γονιδίων και παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα των mRNA έχει βρεθεί στο mRNA του *p53* του αρουραίου, του ποντικού και του *X. laevis*, αλλά στην περίπτωση των mRNA των γονιδίων *p53* δεν έχει βρεθεί ότι παίζει ρόλο στη σταθερότητα αυτών των mRNA. Επιπρόσθετα πρέπει να αναφερθεί ότι το mRNA του γονιδίου *p53* του ανθρώπου φέρει στο 3' άκρο του μια αλληλουχία Alu. Δεν έχουν ανακοινωθεί πολλές μελέτες πάνω στη σταθερότητα των mRNA των γονιδίων *p53*. Έχει όμωςδειχθεί ότι τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου *p53* είναι αυξημένα σε μερικούς όγκους, σε μη διαφοροποιημένα αρχέγονα κύτταρα και σε ερυθρολευχαιμικά κύτταρα, κατά τη διάρκεια της οργανογένεσης του ποντικού καθώς και στην ανάπτυξη του εμβρύου της όρνιθας. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν μια συσχέτιση των υψηλών επιπέδων της έκφρασης του γονιδίου *p53* και του μη διαφοροποιημένου σταδίου του κυττάρου.

Η έκφραση του γονιδίου *p53* φαίνεται ότι ρυθμίζεται στο μεταγραφικό ή μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Σε μη μετασχηματισμένα κύτταρα που έχει ανασταλεί η ανάπτυξή τους τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου *p53* είναι πολύ χαμηλά, ενώ διέγερση τέτοιων κυττάρων με ορό οδηγεί σε σημαντική αύξηση του mRNA του *p53* (Reich 1984). Σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται συνεχώς τα επίπεδα του mRNA του *p53* δεν διαφέρουν σημαντικά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Coulier 1985), ενώ σε έναν αριθμό κυττάρων που διαφοροποιούνται τα επίπεδα του mRNA του *p53* μειώνονται (Reich 1983). Αυτή η μείωση των επιπέδων του mRNA του γονιδίου *p53* μπορεί, τουλάχιστον εν μέρει, να

οφείλεται σε μετα-μεταφραστική ρύθμιση (Dony 1985). Αλληλουχίες DNA που βρίσκονται πριν την 5' επικαλυπτόμενη περιοχή του mRNA έχουν δραστικότητα υποκινητή σε δοκιμή CAT. Η δραστικότητα αυτή εξαφανίζεται όταν ενσωματωθούν πριν από το γονίδιο CAT αλληλουχίες που βρίσκονται πολύ πριν από αυτόν τον υποκινητή του γονιδίου *p53*. Το γεγονός αυτό δείχνει έναν πολύ πιο περίπλοκο έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *p53* (Bienz-Tadmor 1985).

Η πρωτεΐνη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου της *p53* σταθεροποιείται μετα- μεταφραστικά και επάγει αναστολή αύξησης ή απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο). Έχει γίνει φανερό ότι η *p53* λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας και ενεργοποιεί τον εξαρτώμενο από κυκλίνη αναστολέα κινάσης p21 (ή αλλιώς *waf1*) (el-Deiry et al 1993, Deng et al 1995). Επιπρόσθετα, υπάρχουν στοιχεία για μια επιπλέον διακριτή και ανεξάρτητη δράση της *p53* στη μεταγραφή. Το γονίδιο της *p53* περιέχει μια περιοχή πλούσια σε προλίνες (αμινοξέα 64-92) που γειτνιάζει με την περιοχή πρόσδεσης στην MDM-2 (αμινοξέα 17-23), παρ' όλο που δεν είναι σαφές αν εφάπτονται. Η έλλειψη της πλούσιας σε προλίνες περιοχής της *p53* επηρεάζει σημαντικά την ικανότητά της να προκαλεί απόπτωση ενώ διατηρεί την ικανότητά της να ενεργοποιεί προ-αποπτωτικά γονίδια όπως το BAX (Walker et al 1996, Sakamuro et al 1997). Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι η *p53* έχει προ-αποπτωτική δράση ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση και η δραστηριότητα αυτή χαρτογραφείται πιθανώς στην πλούσια σε προλίνες περιοχή του γονιδίου.

4.3 Δομικοί πολυμορφισμοί στο αμινοξύ 72 της ανθρώπινης *p53*

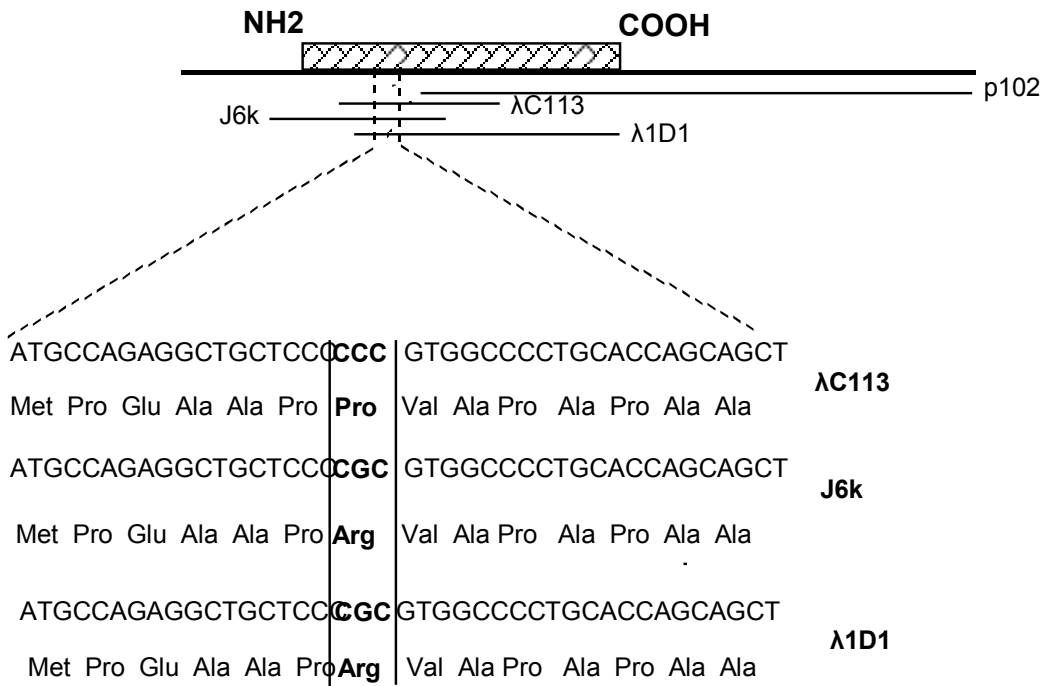
Στην περιοχή της *p53* με πλούσια παρουσία προλινών εδράζεται ένας κοινός πολυμορφισμός που κωδικοποιεί το αμινοξύ προλίνη ή αργινίνη στη θέση 72. Η μορφή με την προλίνη στη θέση 72 έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτερα σε μελέτες, διότι είναι η πρώτη μορφή της ανθρώπινης *p53* που κλωνοποιήθηκε, ενώ λιγότερες λειτουργικές μελέτες έχουν συμπεριλάβει τη μορφή με την αργινίνη στη θέση 72. Στην πορεία της μελέτης της πρωταρχικής δομής για την ανθρώπινη *p53* έγιναν πειράματα κλωνοποίησης mRNA σε cDNA της *p53* από διαφορετικά είδη οργανισμών. Τα διαφορετικά είδη cDNA της *p53* μελετήθηκαν με ανάλυση αλληλουχίας και πειράματα έκφρασης.

Στη διάρκεια αυτών των πειραμάτων βρέθηκε μια διαφοροποίηση μιας μονάχα βάσης σε μια περιοχή της *p53* σε αυτούς τους κλώνους που δεν ήταν συντηρημένη. Η αλλαγή αυτή αφορούσε ένα

αμινοξύ αργινίνης σε μια μορφή *p53* σε φυσιολογικούς ινοβλάστες ανθρώπων. Στο αμινοξύ αυτό εμφανιζόταν αντικατάστασή του από προλίνη σε κύτταρα ανθρώπινων ινοβλαστών που έχουν μετασχηματιστεί με SV40 (SV80). Ο πρώτος ανθρώπινος cDNA κλώνος της *p53* που απομονώθηκε (p102) προερχόταν από ανθρώπινους ινοβλάστες που έχουν μετασχηματιστεί με SV40 (GM637 κύτταρα) και δεν διέθετε τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (Matlashewski 1984). Μετά από αρκετές σειρές πειραμάτων (Harlow 1985, Lamb 1986, Zakut-Houri 1985) βρέθηκε ότι στο πλαίσιο ανάγνωσης του αμινοξέος 72 η βάση G του νουκλεοτιδίου 347 οδηγούσε στην σύνθεση ενός κωδικονίου αργινίνης (CGC) (Σχήμα 4.2). Μελέτες σε cDNA κλώνους της *p53* από την κυτταρική σειρά GM637 μετασχηματισμένων ανθρώπινων ινοβλαστών (Zakut-Houri 1985) και από την κυτταρική σειρά A431 από καρκίνωμα αιδοίου (Harlow 1985) ανέφεραν την ύπαρξη ενός κωδικονίου προλίνης (CCC) για το αμινοξύ 72. Υπάρχει συνεπώς μια σημαντική ετερογένεια στο κωδικόνιο που είναι υπεύθυνο για το αμινοξύ 72 και μάλιστα δεν υπάρχει άλλο κωδικόνιο με παρόμοια χαρακτηριστικά ετερογένειας. Σε πηκτώματα η *p53* με την μορφή της Arg-72 διαχωριζόταν πιο γρήγορα από αυτή με την μορφή της Pro-72 ενώ ένα μίγμα των δυο μορφών εμφανίζεται ως διπλέτα ζωνών. Με τη βοήθεια άλλων πειραματικών προσεγγίσεων (Banks 1986, Okayama 1985) οδηγούμαστε στην παρατήρηση ότι η *p53* με την Pro-72 είναι δομικά διαφορετική από την *p53* με την Arg-72 και αυτό αποτυπώνεται ξεκάθαρα στο διαφοροποιημένο ηλεκτροφορητικό κινητικό πρότυπο. Η διαφοροποίηση αυτή επηρεάζει τον διαχωρισμό της πρωτεΐνης σε SDS-PAGE (Matlashewski 1987). Μετά από αναλύσεις γενωμικών κλώνων που προέρχονται από DNA φυσιολογικού εμβρυϊκού ήπατος, βρέθηκε ότι η διαφοροποίηση στην θέση 72 της *p53* οφείλεται σε πολυμορφισμό και όχι σε μεταλλαγή στην θέση αυτή. Τα φυσιολογικά DNA μπορεί στη θέση αυτή να περιέχουν αργινίνη, προλίνη και κυστεΐνη ενώ μπορεί να υπάρχουν και επιπλέον αλλήλια.

Ο πολυμορφισμός αυτός, που ποικίλλει ανάλογα με την εθνολογική ομάδα, εστιάζεται στην περιοχή της *p53* που σχετίζεται με την διαδικασία επαγωγής της απόπτωσης (Sakamuro 1997), η οποία ομοιάζει με μια περιοχή SH3 (SRC-ομολογία-3) (περιοχή πρόσδεσης). Στην περιοχή αυτή δημιουργούνται πέντε PxxP μοτίβα, από τα οποία χάνεται ένα λόγω την αντικατάστασης της προλίνης με την αργινίνη. Τα αλληλόμορφα με προλίνη ή αργινίνη στη θέση 72 έχουν αναφερθεί να διαφοροποιούνται στη λειτουργική δραστηριότητά τους. Το αλλήλιο με την προλίνη στη θέση 72 μπορεί να επιλέγεται σε περιβάλλοντα που υπόκεινται σε υψηλά επίπεδα υπεριώδους ακτινοβολίας. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι το ομόλογο γονίδιο της *p53*, το *p73*, μπορεί να προσδένεται σε συγκεκριμένες

μεταλλαγμένες μορφές (που προέρχονται από όγκους) της p53 και ο πολυμορφισμός στο κωδικόνιο 72 επηρεάζει αυτή την πρόσδεση. Η υπόσταση του κωδικονίου 72 επηρεάζει το αν η πιθανώς μεταλλαγμένη p53 εξασθενεί τη λειτουργία του p73. Μέσα από επιστημονικές παρατηρήσεις έχει γίνει αντιληπτό ότι το αλληλίο με την Arg72 της TP53 μεταλλάσσεται επιλεκτικά και διατηρείται σε διάφορους όγκους που προκύπτουν σε ετεροζυγώτες Arg72/Pro72 της TP53 (Marin MC et al, 2000). Επίσης, η άθικτη λειτουργία του p73 έχει βρεθεί να καθορίζει με σημαντικό τρόπο την κυτταρική ευαισθησία σε αντικαρκινικούς παράγοντες. Η παρεμπόδιση της λειτουργίας του p73 από διαφοροποιημένη ή μεταλλαγμένη p53 απεμπολεί την απόπτωση και την κυτταροτοξικότητα που επάγεται από αυτούς τους παράγοντες. Ο πολυμορφισμός του κωδικονίου 72 του p53 επηρεάζει την παρεμπόδιση του p73. Η κλινική απόκριση που ακολουθεί χημειοθεραπεία που βασίζεται στην σισπλατίνη έχει βρεθεί να επηρεάζεται από αυτό τον πολυμορφισμό καθώς όγκοι που εκφράζουν την αργινίνη στην θέση 72 της p53 έχουν χειρότερη απόκριση σε σχέση με αυτούς που στην ίδια θέση εκφράζουν την προλίνη (Bergamaschi D et al 2003).



Σχήμα 4.2. Σχηματικό διάγραμμα των cDNA ανθρώπινων p53. Οι σκούρες γραμμές αντιπροσωπεύουν τους διαφορετικούς κλώνους cDNA της p53. Η p102 προκύπτει από μια cDNA βιβλιοθήκη που δημιουργήθηκε από την κυτταρική σειρά GM637 ανθρώπινων ινοβλαστών που έχουν μετασχηματιστεί με τον SV40. Η λC113 προκύπτει από την κυτταρική σειρά GM637 ανθρώπινων ινοβλαστών που έχουν μετασχηματιστεί με τον SV80. Η p53J6K προκύπτει από την κυτταρική σειρά J6 ανθρώπινων T-κυττάρων και η λ1D1 προκύπτει από φυσιολογικούς ανθρώπινους ινοβλάστες δέρματος. Στο σχήμα φαίνεται η ανάλυση των κλώνων cDNA στην περιοχή που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 66 ως 79.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

A. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 Προέλευση των δειγμάτων

Για την παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ιστού προερχόμενα από γυναίκες με καρκίνο μαστού. Τα ιστικά τεμάχια ανταποκρίνονταν σε πρωτογενείς όγκους, και προήλθαν από το Γ.Ν "Ε. Βενιζέλου" καθώς και από το Ιατρικό Διαγνωστικό Κέντρο «Πρόληψις» Αθηνών.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα παρακείμενων φυσιολογικών ιστών από τις ίδιες ασθενείς, καθώς και δείγματα περιφερικού αίματος υγιών γυναικών με ηλικία > 55 ετών που δεν έφεραν γνωστές καρκινικές βλάβες. Τα δείγματα περιφερικού αίματος υγιών γυναικών προερχόταν από το Π.Ν. Ηρακλείου.

5.2 Εκχύλιση DNA

5.2.1 Εκχύλιση DNA από υλικό βιοψίας

Χρησιμοποιήθηκαν ιστικά τεμάχια βιοψικού υλικού από γυναίκες με καρκίνο του μαστού. Τα τεμάχια αμέσως μετά την χειρουργική αφαίρεση αποθηκεύθηκαν σε θερμοκρασία -70°C για την συντήρησή τους ως την στιγμή χρήσης τους. Ακολουθεί προσθήκη 400μl διαλύματος λύσης (10 mM EDTA, 10mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 0.5% SDS) με πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml. Ακολουθεί εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) με φαινόλη/χλωροφόρμιο και αποδόμηση του RNA με RNAάση (100μg/ml) για 1h σε θερμοκρασία 37°C . Το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη 1/20 όγκου χλωριούχου νατρίου 5M και 2.5 όγκων απόλυτης αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 4°C σε 13.000 rpm και έκπλυση του κατακρημνισμένου DNA σε 70%

αιθανόλη. Αφού απομακρυνθεί η αιθανόλη, το DNA επαναιωρείται σε 50 μl διάλυμα TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0). Δημιουργήθηκαν εύχρηστα διαλύματα με διάλυση 1/10 σε ddH₂O και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -20^o C. Η ποσότητα του DNA καθώς και η καθαρότητά του υπολογίζεται έπειτα από φωτομέτρηση στα 260 nm και στα 280 nm.

5.2.2 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από περιφερικό αίμα.

Περίπου 5 ml περιφερικού αίματος συλλέγονται και διατηρούνται με αντιπηκτικό (K-Na EDTA) σε θερμοκρασία 4^oC. Αρχικά γίνεται λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (απύρηνα) με επώαση του αίματος σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 10 mM Tris HCl pH 8.0, 320 mM σουκρόζη, 5 mM MgCl₂ και 1% Triton-X-100. Ακολουθεί ήπια ανάδευση του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση σε 2.500 rpm. Το κυτταρικό ίζημα συλλέγεται και επαναιωρείται σε διάλυμα που περιέχει Tris pH 8.0 400 mM, EDTA 60 mM, NaCl 150 mM και SDS 1%. Ακολουθεί η προσθήκη υπερχλωρικού νατρίου όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο, προσθήκη χλωροφορμίου και κατακρήμνηση του DNA με αιθανόλη.

5.3. Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR)

5.3.1 Αρχές της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR) επινοήθηκε το 1985 από τον Mullis και τους συνεργάτες του (Saiki, 1985). Έφερε πραγματική επανάσταση στην μοριακή βιολογία, αντικαθιστώντας, σε καθολική βάση, τους έως τότε υπάρχοντες τρόπους ανάλυσης του DNA σε ερευνητικά και διαγνωστικά εργαστήρια. Η μέθοδος αυτή επιτυγχάνει, σε χρόνο που δεν υπερβαίνει τις 2-3 ώρες, την ειδική ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA με εκθετικό τρόπο, ώστε να είναι δυνατή η περαιτέρω μελέτη τους. Η τεράστια απόδοση της αντίδρασης κάνει δυνατή την ενίσχυση αλληλουχιών, ακόμα και όταν αυτές βρίσκονται σε ελάχιστο αριθμό αντιγράφων ή το DNA έχει υποστεί μια σχετική αποδιάταξη.

Το υποστρώμα DNA επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση προερχόμενη από θερμόφιλα βακτήρια (Thermus aquaticus- Taq, Thermus thermophilus- Tth), μίγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων και το ζεύγος των εκκινητών (primers). Οι τελευταίοι είναι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες που παρουσιάζουν ομολογία ως προς δύο θέσεις εκατέρωθεν της DNA αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί, οπότε και προσδένονται σε αυτές. Αρχικά γίνεται θερμική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 95°C για 1 min, ώστε να διαχωριστούν οι αλυσίδες και να μπορέσει να γίνει ο υβριδισμός, ο οποίος - με τη σειρά του- σηματοδοτεί την έναρξη της προσθήκης, από την DNA πολυμεράση, δεσοξυριβονουκλεοτιδίων ομολόγων προς τις αντίστοιχες θέσεις της μητρικής αλυσίδας. Ακολουθούν 30-35 κύκλοι, καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει τρία βήματα: 94°C (αποδιάταξη), 55-60°C (υβριδισμός των εκκινητών) και 72°C (πολυμερισμός), διάρκειας περίπου 30-40 sec το κάθε βήμα. Τελικό αποτέλεσμα είναι η εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του DNA σύμφωνα με την εξίσωση $N = \eta (1 + e)^c$, όπου $N =$ η τελική ποσότητα του προϊόντος, $\eta =$ η αρχική ποσότητα του υποστρώματος, $e =$ η απόδοση της αντίδρασης, και $c =$ ο αριθμός των κύκλων της PCR (Mullis & Faloona, 1987).

5.3.2 Ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR

Η επίτευξη ικανοποιητικής αντίδρασης πολυμερισμού, τόσο ως προς την απόδοση, όσο και ως προς την ειδικότητα, εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τους παρακάτω παράγοντες:

1. Την επιλογή κατάλληλων εκκινητών: Η ειδικότητα της PCR αντίδρασης ως προς την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί εξαρτάται από τους εκκινητές. Είναι στατιστικώς αποδεδειγμένο ότι όταν μια αλληλουχία DNA έχει μήκος τουλάχιστον 20bp, τότε είναι μοναδική στο γονιδίωμα. Η επιλογή, συνεπώς, εικοσαμερών για εκκινητές επιτρέπει την ειδική ενίσχυση αλληλουχιών. Πράγματι, αυτό είναι και το μέσο μήκος των εκκινητών στην συντριπτική πλειοψηφία των εφαρμογών. Τους δίνει τέτοια θερμοδυναμική σταθερότητα, ώστε σε θερμοκρασία περίπου 55°C να αποδιατάσσονται. Η συνήθης συγκέντρωση ενός 20-μερούς εκκινητή σε μια PCR αντίδραση είναι 0.5μM.

2. Τον προσδιορισμό της ακριβούς θερμοκρασίας αναδιάταξης των εκκινητών: Η θερμοκρασία υβριδισμού ποικίλλει, ανάλογα με το είδος των εκκινητών και του DNA υποστρώματος. Κυμαίνεται

μεταξύ 37°C και 60°C, τιμές ανάμεσα στις οποίες βρίσκεται η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού T_m (όπου το 50% των μορίων είναι αποδιατεταγμένο). Υψηλές θερμοκρασίες επιτυγχάνουν περισσότερο εξειδικευμένο υβριδισμό, χαμηλής όμως απόδοσης. Η επιλογή χαμηλότερης θερμοκρασίας αυξάνει την απόδοση εις βάρος της ειδικότητας, με αποτέλεσμα τον κίνδυνο δημιουργίας παραπροϊόντων της PCR αντίδρασης, εάν οι εκκινητές προσδεθούν σε άλλες θέσεις του γονιδιώματος με σχετική μόνο ομοιογία ως προς αυτούς.

3. Κατάλληλες συγκεντρώσεις δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και ιόντων Mg: Τα ιόντα Mg είναι απαραίτητος συμπαράγοντας για τη δράση της πολυμεράσης και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην ποσότητά τους. Μεγάλες συγκεντρώσεις $MgCl_2$ αυξάνουν την ενεργότητα της πολυμεράσης, μειώνοντας όμως ταυτόχρονα την πιστότητά της. Το αντίθετο ισχύει για μικρότερες συγκεντρώσεις. Οι συνήθεις ιδανικές συγκεντρώσεις ιόντων Mg κυμαίνονται περί των 25mM/αντίδραση (Myers & Gelfand, 1991).

Με δεδομένο ζεύγος εκκινητών, η κανονικοποίηση των συνθηκών σε μια αντίδραση PCR περιλαμβάνει πειράματα όπου σταδιακά μεταβάλλονται, ανεξάρτητα μεταξύ τους, η θερμοκρασία υβριδισμού και η συγκέντρωση ιόντων Mg. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR απαραίτητη προϋπόθεση είναι να τερματισθεί η αντίδραση όσο ακόμη βρίσκεται στην εκθετική της φάση. Μόνο τότε μπορεί να γίνει γραμμική αντιστοίχιση της τελικής ποσότητας προϊόντος στην αρχική ποσότητα υποστρώματος. Η ανωτέρω προϋπόθεση διασφαλίζεται με την επιτέλεση προκαταρκτικών πειραμάτων, όπου το υπόστρωμα υφίσταται διαδοχικές αραιώσεις (δημιουργία πρότυπης καμπύλης) έως ότου πάψει να διατηρείται η γραμμική αυτή σχέση.

Ακόμα περισσότερο αξιόπιστη είναι η συνενίσχυση με την αλληλουχία-στόχο, σταθερής ποσότητας υποστρώματος, στο οποίο οι θέσεις αναγνώρισης των εκκινητών ταυτίζονται με αυτή της αλληλουχίας-στόχου (Siebert & Larrick, 1992). Με τον τρόπο αυτό επιτελείται συναγωνισμός ανάμεσα στις δυο αλληλουχίες που ενισχύονται, οπότε η αφθονία των αρχικών αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου εκφράζεται συγκρινόμενη με την ένταση της ζώνης που αντιστοιχεί στον συναγωνιστή.

5.3.3. Ρυθμιστικά διαλύματα της PCR

Για την PCR χρησιμοποιούνται διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα που αφενός ρυθμίζουν την τιμή του pH και αφετέρου προμηθεύουν τους απαραίτητους συμπαράγοντες και τις σταθεροποιητικές ουσίες, για τη μέγιστη απόδοση της πολυμεράσης.

Στα πειράματα που περιγράφονται στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ρυθμιστικά διαλύματα (10X):

Ρυθμιστικό διάλυμα A: 670 mM Tris.HCl, pH 8.5, 166 mM θειικό αμμώνιο, 67 mM χλωριούχο μαγνήσιο, 1.7 mg/ml BSA, 100 μM β-μερκαπτοαιθανόλη και 1% (w/v) Triton X-100.

Ρυθμιστικό διάλυμα B: 75mM Tris-HCl pH 9.0, 20 mM θειικό αμμώνιο, 0.01% (w/v) Tween 20, 2.5 mM θειικό μαγνήσιο.

Ρυθμιστικό διάλυμα C: 50 mM Tris HCl, pH 8.3, 50 mM χλωριούχο κάλιο, 10 mM χλωριούχο μαγνήσιο, 10 mM διθειοθρεϊτόλη, 0.5 mM σπερμιδίνη.

5.3.4. Σχεδιασμός εκκινητών και συνθήκες των αντιδράσεων PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση είναι μια *in vitro* ενζυμική σύνθεση τμημάτων DNA με την βοήθεια δυο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών που βρίσκονται εκατέρωθεν της περιοχής του δίκλωνου DNA που πρόκειται να επιμηκυνθεί (Saiki, 1988).

1μl από το εκχυλισμένο DNA κάθε δείγματος υφίσταται ενζυμική ενίσχυση σε τελικό όγκο 25 μl. Η αντίδραση περιλαμβάνει 2.5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10X, 200μM από το κάθε dNTP, 0.5μM από κάθε εκκινητή και 1.25 U Taq πολυμεράση. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται δυο δείγματα με όλα τα υλικά της PCR εκτός του εκχυλισμένου DNA ως ελεγκτικά στοιχεία για πιθανή επιμόλυνση στην αντίδραση. Το μίγμα προεπωάζεται για 1min στους 95°C και ακολουθούν 30 κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:

α. **β-σφαιρίνη:** Για τον έλεγχο της ποσότητας του DNA που εκχυλίζεται από τα ιστικά τεμάχια καθώς και από τα δείγματα περιφερικού αίματος ως προς την ικανότητά τους να χρησιμοποιηθούν ως

υπόστρωμα από την Taq πολυμεράση, τα δείγματα ελέγχονται με ενίσχυση μιας περιοχής 110bp του γονιδίου της β-σφαιρίνης, το οποίο χρησιμοποιείται ως γονίδιο μάρτυρας. Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 56°C για 40 sec και 72°C για 40 sec και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5 min. Μέρος των προϊόντων PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο και ακολουθεί έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

β. **Πολυμορφική περιοχή του γονιδίου ATM:** Για την εύρεση πολυμορφισμού στο γονίδιο *ATM* ενισχύεται η αντίστοιχη περιοχή που εδράζεται στο 3' άκρο του γονιδίου, στα καρκινικά δείγματα καθώς και στα δείγματα περιφερικού αίματος των φυσιολογικών γυναικών. Στην περιοχή αυτή συναντάται ένας συχνός πολυμορφισμός γουανίνης ή κυτοσίνης του εσωνίου 48 του γονιδίου *ATM* στην νουκλεοτιδική θέση + 239 (Dork T, 1997). Η ενίσχυση πραγματοποιείται με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές (Πίνακας 6.1). Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 94°C για 40 sec, 62°C για 40 sec και 72°C για 40 sec και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5 min. Μέρος των προϊόντων PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο και ακολουθεί έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση της ζώνης των 274bp.

γ. **Ανάλυση της 5' εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας του H-ras:** Η πολυμορφική περιοχή του γονιδίου *H-ras* ενισχύθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση στα δείγματα ιστού και περιφερικού αίματος από φυσιολογικές γυναίκες, για την ενίσχυση των αλληλίων P1, P2 και P3. Στη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές που αναφέρονται στον Πίνακα 6.1. Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 94°C για 40 sec, 63°C για 35 sec και 72°C για 40 sec και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5 min. Μέρος των προϊόντων PCR αναλύεται σε πήκτωμα ακρυλαμίδιου 10%, χρωματίζεται με άργυρο και ακολουθεί έκθεση σε ορατή ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 106 bp για το P2, 112bp για το P3 και 118bp για το P1 αλληλίο.

δ. **Ανάλυση της VTR αλληλουχίας του H-ras:** Η περιοχή *VTR* του γονιδίου *H-ras* ενισχύθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση στα δείγματα καρκινικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού από γυναίκες με νεοπλασία μαστού. Στην διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές που αναφέρονται στον Πίνακα 6.1. Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι

εξής: 94°C για 30 sec, 55°C για 30 sec και 72°C για 30 sec και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5 min.

Για την ανίχνευση διαφοροποιήσεων στην κεντρική μονάδα επανάληψης των 28bp, 15 μl των προϊόντων της αντίδρασης αναλύονται σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 8% με νιτρικό άργυρο και γίνεται έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η ύπαρξη νέων αλληλίων *VTR* γινόταν εμφανής με σύγκριση των προτύπων ενίσχυσης PCR κάθε ζεύγους δείγματος (ιστού και αίματος του ίδιου ατόμου).

Οι πολυμορφισμοί μέσα στην κεντρική μονάδα επανάληψης των 28bp ανιχνεύθηκαν με σύγκριση των προτύπων της περιοριστικής πέψης (RFLP) με ειδική ενδονουκλεάση *BstNI* που αναγνωρίζει μια ειδική αλληλουχία μέσα στην κεντρική μονάδα.

ε. Πολυμορφική περιοχή του κωδικονίου 72 της p53 για κωδικοποίηση του αμινοξέος προλίνη:

Για την εύρεση πολυμορφισμού στο κωδικόνιο 72 του γονιδίου *p53* για την κωδικοποίηση του αμινοξέος προλίνη ενισχύεται η αντίστοιχη περιοχή που περιέχει το κωδικόνιο 72 με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές p53Pro+/p53- (Storey,1998). Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 54°C για 45 sec και 72°C για 40 sec και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5 min. Μέρος των προϊόντων PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 177bp.

ζ. Πολυμορφική περιοχή του κωδικονίου 72 της p53 για κωδικοποίηση του αμινοξέος αργινίνη:

Για την εύρεση πολυμορφισμού στο κωδικόνιο 72 του γονιδίου *p53* για την κωδικοποίηση του αμινοξέος αργινίνη ενισχύεται η αντίστοιχη περιοχή που περιέχει το κωδικόνιο 72 με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές p53+/Arg- (Storey,1998). Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 60°C για 45 sec και 72°C για 40 sec και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5 min. Μέρος των προϊόντων PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 141bp.

Οι εκκινητές που επελέγησαν παρατίθενται στον Πίνακα 5.1

Πίνακας 5.1. Εκκινητές, συνθήκες PCR αντιδράσεων και προϊόντα PCR και RFLP για την ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών του ATM, της 5' HRM και VTR του H-ras και στο κωδικόνιο 72 της p53

Γονίδιο	Εκκινητές	Συνθήκες PCR	PCR προϊόν (bp)	RFLP προϊόντα (bp)
<i>ATM</i> (DNA)	PrimerA:5'CCCATTTTGG AATTAGATCTGAC3' PrimerB:5'GGACTTAACT ACTGTCAGGGAC 3'.	94° for 40s (αποδιάταξη) 62° for 40s (υβριδισμός) 72° for 40s (πολυμερισμός)	274	180 bp, 94 bp
<i>H-ras</i> εξανουκλεοτιδική περιοχή (DNA)	5'CTGTGGGTTTGCCCTT CAGA3' 5'CTCCTACAGGGTCTC CTGCC3'	94° for 40s (αποδιάταξη) 63° for 35s (υβριδισμός) 72° for 40s (πολυμερισμός)	106 bp P2 112bp P3 118bp P1	
<i>H-ras VTR</i> (DNA)	5'GAGCTAGCAGGGCAT GCCGC3' 5'AGCACGGTGTGGAAG GAGCC 3'	94° for 30s (αποδιάταξη) 55° for 30s (υβριδισμός) 72° for 30s (πολυμερισμός)		
<i>p53 Pro</i> (DNA)	5'GCCAGAGGCTGCTCC CCC 3' 5'CGTGCAAGTCACAGA CTT; 3'	94° for 50s (αποδιάταξη) 54° for 45s (υβριδισμός) 72° for 40s (πολυμερισμός)	177	
<i>p53 Arg</i> (DNA)	5'TCCCCCTTGCCGTCCC AA 3' 5'CTGGTGCAGGGGCCA CGC3'	94° for 50s (αποδιάταξη) 60° for 45s (υβριδισμός) 72° for 40s (πολυμερισμός)	141	

5.4 Μέθοδοι προσδιορισμού πολυμορφισμών με ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση πολυμορφισμού στο εσώνιο 48 του γονιδίου *ATM* καθώς και για την ανίχνευση πολυμορφισμών μέσα στην βασική μονάδα επανάληψης 28bp της περιοχής *VTR* του γονιδίου *H-ras*.

ATM: Η ανάδειξη σημειακού πολυμορφισμού στο εσώνιο 48 του γονιδίου *ATM* πραγματοποιείται με τη βοήθεια της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *SnaB* I. Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης ενίσχυσης του γονιδίου *ATM* υφίστανται περιοριστική πέψη με το ένζυμο *SnaB* I (TACGTA). Το προϊόν μπορεί να τεμαχιστεί σε δυο θραύσματα 180 και 94 bp, αν υπάρχει στο προϊόν το αλληλίο της γουανίνης, ενώ αν στο προϊόν υπάρχει το αλληλίο της κυτοσίνης στην νουκλεοτιδική θέση +239, δεν παρατηρείται πέψη και παράγεται ένα θραύσμα 274bp.

Μέρος των προϊόντων της PCR αντίδρασης (40 μ l) υφίστανται πέψη με 30U της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *SnaB* I στους 37°C για 2.5 ώρες. Τα προϊόντα της πέψης αναλύονται εν συνεχεία σε πήκτωμα αγαρόζης 2% που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο, εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία όπου παρατηρούνται τα θραύσματα DNA διαφορετικού μήκους για τους δυο πολυμορφισμούς.

Περιοχή *VTR* του γονιδίου *H-ras*: Οι πολυμορφισμοί μέσα στην κεντρική μονάδα επανάληψης των 28bp ανιχνεύθηκαν με σύγκριση των προτύπων της περιοριστικής πέψης (RFLP) με ειδική ενδονουκλεάση *BstN* I που αναγνωρίζει μια ειδική αλληλουχία (CCAGG) μέσα στην κεντρική μονάδα. Μέρος των προϊόντων της PCR αντίδρασης για την ενίσχυση της *VTR* περιοχής (20 μ l) υφίστανται πέψη με 15U της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *BstN* I στους 60°C για 4 ώρες. Τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν εν συνεχεία σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 10%, χρωματίστηκαν με άργυρο και έγιναν ορατά μετά από έκθεση σε ορατή ακτινοβολία.

5.5. Ηλεκτροφόρηση DNA

Το DNA, μετά την ενίσχυση μέσω της αντίδρασης PCR, ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμιδίου. Η επιλογή του συγκεκριμένου πηκτώματος εξαρτάται αφενός από το μέγεθος του DNA

που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί και αφ' ετέρου από την διακριτική ικανότητα που προσδοκείται να επιτευχθεί. Το πήκτωμα αγαρόζης (συνήθως συγκέντρωση 1 έως 2%) είναι καταλληλότερο για την ηλεκτροφόρηση μεγάλων DNA τμημάτων καθώς και για μεγάλες διαφορές μεγέθους τμημάτων που πρόκειται να διαχωριστούν. Αντίθετα, το πήκτωμα ακρυλαμιδίου (19:1 μείγμα ακρυλαμιδίου/ bis-ακρυλαμιδίου) επιλέγεται για μικρότερα τμήματα DNA και για μικρές διαφορές μεγέθους ανάμεσα τους.

Και οι δύο τύποι πηκτωμάτων σχηματίζονται σε υδατικό μέσο που περιέχει TBE 1X ρυθμιστικό διάλυμα (0.09M TrisHCl, 0.09M βορικό οξύ, 2.5mM EDTA, pH 8.3). Η πήξη επιτυγχάνεται για την μεν αγαρόζη με στερεοποίησή της με την πτώση θερμοκρασίας (προηγείται τήξη της με βρασμό) ενώ για το ακρυλαμίδιο με την προσθήκη 50 μl τετραμεθυλ-αιθυλενο-διαμίνης (TEMED) και 160 μl υπερθειικού αμμωνίου 25% για κάθε 65 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου.

Το δείγμα DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί, επαναιωρείται σε διάλυμα φόρτωσης που περιέχει 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλενίου και 25% φυκόλη.

5.6. Χρώση νουκλεϊκών οξέων

5.6.1. Χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο

Κατά την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 10mg/ml. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες του DNA γίνονται άμεσα ορατές, κατόπιν έκθεσης του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

5.6.2. Χρώση με νιτρικό άργυρο

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται όταν το DNA έχει ηλεκτροφορηθεί σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου, συνήθως μετά από ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR. Χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλη ευαισθησία και αποφυγή της ραδιενέργειας, στοιχεία που την καθιστούν μέθοδο επιλογής. Στα μειονεκτήματά της συγκαταλέγεται η μη ειδική χρώση του δίκλωνου DNA, δεδομένου ότι χρωματίζονται επίσης το μονόκλωνο DNA, το RNA καθώς και πρωτεΐνες. Έτσι, προϋπόθεση για την εφαρμογή της είναι η ύπαρξη ιδιαίτερα καθαρού και ειδικού DNA.

Το πήκτωμα ακρυλαμιδίου τοποθετείται αρχικά υπό ανάδευση για 10 min, σε μονιμοποιητικό διάλυμα που περιέχει 10% αιθανόλη και 0.5% οξικό οξύ. Ακολουθεί η προσθήκη διαλύματος νιτρικού αργύρου 0.1% (w/v) για 20 min σε ημίφως, πλύσιμο με νερό και κατόπιν προσθήκη του διαλύματος εμφάνισης που περιέχει 0.4 N NaOH και 0.15% (v/v) φορμαλδεΐδη. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου 0.75% (w/v).

5.7 Στατιστική ανάλυση - Ηλεκτρονική επεξεργασία εικόνας

Η στατιστική επεξεργασία των εργαστηριακών ευρημάτων και των κλινικοπαθολογικών δεδομένων (Κλινικό στάδιο, Ιστολογικός βαθμός, Επίπεδα υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης, των καρκινικών δειγμάτων) έγινε με τη χρήση της δοκιμασίας SPSS 6.0 for Windows και ως στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι συσχετίσεις με μονοδύναμο επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$. Όλα τα παραπάνω έγιναν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, με τη βοήθεια του προγράμματος.

5.8. Εταιρείες προέλευσης των υλικών

1,2-δωδροξυ-αιθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο - BDH

Άγαρ-Difco

Αγαρόζη - Life Technologies

Αιθανόλη - Merck

Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ - BDH

Ακρυλαμίδιο - Life Technologies

Ανθρακικό νάτριο - Sigma

Βορικό οξύ - BDH

Βρωμιούχο αιθίδιο - Sigma

Γλυκερόλη - Life Technologies

Διαίθυλ-πυροκαρβονικό οξύ - BDH

Διθειοθρεϊτόλη - Sigma

Διμεθυλσουλφοξείδιο - BDH

Δεσοξυριβονουκλεοτίδια - Life Technologies

Ένζυμα περιορισμού - New England Biolabs/ Life Technologies
Θεικό αμμώνιο - BDH
Ισοπροπανόλη - Merck
Κιτρικό νάτριο - BDH
Κυανό της βρωμοφαινόλης - Sigma
Λυσοζύμη - Sigma
Μεθανόλη - Merck
Μεμβράνες διαπίδυσης πόρων διαμέτρου 10 mm - Sigma
MOPS - Sigma
Νιτρικός άργυρος - Sigma
Οξεικό αμμώνιο - Sigma
Οξικό κάλιο - Sigma
Οξικό νάτριο - Sigma
Οξικό οξύ - BDH
Πρωτεΐνάση K - Life Technologies
Ριβονουκλεάση A - Life Technologies
SDS - Sigma
Ταq πολυμεράση - Life Technologies
TEMED - Sigma
Tris base - BDH
Triton-X-100 - Sigma
Trizol - Life Technologies
Tween-20 - Sigma
Υδροξείδιο του νατρίου - Sigma
Υδροχλωρικό οξύ - BDH
Υπερθεικό αμμώνιο - Life Technologies
Υπεροξείδιο του υδρογόνου - BDH
Φαινόλη - Life Technologies
Φορμαλδεύδη - BDH
Φορμαμίδιο - Life Technologies

Χλωριούχο καίσιο - Sigma

Χλωριούχο κάλιο - Sigma

Χλωριούχο λίθιο - Sigma

Χλωριούχο μαγγάνιο - Sigma

Χλωριούχο μαγνήσιο - Sigma

Χλωριούχο νάτριο - Sigma

Χλωροφόρμιο- Fluka

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1. Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν, κλινική και ιστολογική εξέταση

Από την ιστολογική εξέταση 56 δειγμάτων με αλλοιώσεις σποραδικού καρκίνου στο μαστό σε βιοψικά δείγματα από πρωτογενείς όγκους προκύπτουν τα εξής: σύμφωνα με το στάδιο διαφοροποίησης (GRADE) των 56 περιπτώσεων των καρκινικών δειγμάτων μαστού, το 14 % είναι βαθμού I (n=8), το 75% (n=42) είναι βαθμού II και το 11% είναι βαθμού III (n=6). Σύμφωνα με το κλινικό στάδιο του όγκου (Union International Contra le Cancrum, AJCC, 1999) στις 56 περιπτώσεις των καρκινικών δειγμάτων μαστού, το 43% είναι βαθμού I (n=24), το 44.5% (n=25) είναι βαθμού II και το 12.5% είναι βαθμού III (n=7).

Σε τμήμα της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 30 ζεύγη δειγμάτων από ιστούς που προέρχονταν από γυναίκες με σποραδικό καρκίνο στο μαστό καθώς και από παρακείμενο φυσιολογικό ιστό από τις ίδιες ασθενείς. Τα καρκινικά ιστικά τεμάχια ανταποκρίνονταν σε πρωτογενείς και όχι σε μεταστατικούς όγκους.

6.2 Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στα γονίδια *ATM*, *H-ras* και *p53* σε καρκινικές αλλοιώσεις του μαστού και σε δείγματα ελέγχου

6.2.1. Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στο γονίδιο *ATM* σε καρκινικές αλλοιώσεις του μαστού καθώς σε φυσιολογικά δείγματα αίματος

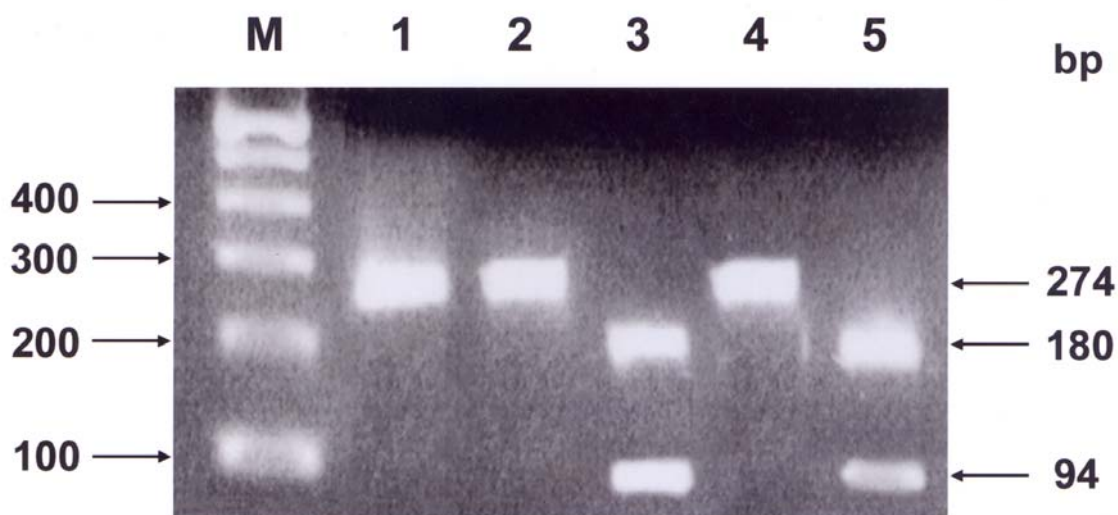
Στα πλαίσια της μελέτης ανίχνευσης σημειακού πολυμορφισμού στο γονίδιο *ATM* ενισχύεται η αντίστοιχη περιοχή που εντοπίζεται στο 3' άκρο του γονιδίου, στα καρκινικά δείγματα μαστού καθώς και στα δείγματα αίματος από φυσιολογικές γυναίκες. Τα τελευταία χρησιμεύουν ως δείγματα ελέγχου. Στην περιοχή αυτή συναντάται ένας συχνός πολυμορφισμός γουανίνης ή κυτοσίνης του εσωνίου 48 του γονιδίου *ATM* στην νουκλεοτιδική θέση + 239 (Dork T, 1997).

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει αρχικά ενίσχυση του DNA της περιοχής του εσώνιου 48 που περιέχει τον πολυμορφισμό με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR). Στη συνέχεια πέπτεται με περιοριστικές ενδονουκλεάσες το προϊόν της αντίδρασης και αναλύονται οι πολυμορφισμοί μήκους των περιοριστικών θραυσμάτων που προκύπτουν (RFLP).

Μελετήθηκαν με τη μέθοδο αυτή συνολικά 56 δείγματα νεοπλασματικού ιστού από ασθενείς με καρκίνο μαστού καθώς και 61 φυσιολογικά δείγματα περιφερικού αίματος υγιών γυναικών με ηλικία > 55 ετών που δεν έφεραν γνωστές καρκινικές βλάβες. Το ζευγάρι των ειδικών εκκινητών της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ενισχύει ένα ειδικό κομμάτι μήκους 274 bp. Μετά την ανάλυση με περιοριστική πέψη, το προϊόν μπορεί να τεμαχιστεί σε δυο θραύσματα 180 και 94 bp, αν υπάρχει στο προϊόν το αλληλίο της γουανίνης, ενώ αν στο προϊόν υπάρχει το αλληλίο της κυτοσίνης στην νουκλεοτιδική θέση +239, δεν παρατηρείται πέψη και παράγεται ένα θραύσμα 274bp διότι απουσιάζει η θέση πέψης της ενδονουκλεάσης *SnaBI* (Εικόνα 6.1).

Υπήρχε διαφορά στην κατανομή των γονότυπων του *ATM* ανάμεσα στα δείγματα γυναικών με καρκίνο μαστού και των φυσιολογικών δειγμάτων. Τα επίπεδα ετεροζυγωτίας του γονιδίου *ATM* ήταν αρκετά υψηλότερα (64.5%) σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα αίματος (50%). Οι αλληλικές συχνότητες (C/G) καθορίστηκαν στα δείγματα γενωμικού DNA από τους ασθενείς με σποραδικό καρκίνο του μαστού καθώς και από τους υγιείς δότες (Πίνακας 6.1). Τα αποτελέσματα της μελέτης ανίχνευσης του σημειακού πολυμορφισμού του γονιδίου *ATM* στο εσώνιο 48 στα καρκινικά δείγματα συσχετίστηκαν με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους των ασθενών. Από το ιστορικό των γυναικών με καρκίνο του μαστού ήταν διαθέσιμα στοιχεία όπως: Η ηλικία του ασθενούς, το κλινικό στάδιο, ο ιστολογικός βαθμός του καρκινικού δείγματος καθώς και τα επίπεδα των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης. Τα αποτελέσματα της συσχέτισης παρουσιάζονται στον πίνακα 6.2.

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα των σημειακών πολυμορφισμών του γονιδίου *ATM* και στις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους των ασθενών με καρκίνο του μαστού.



Εικόνα 6.1 Τα προϊόντα ενίσχυσης του γονιδίου *ATM* (274 bp) υπέστησαν περιοριστική πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *SnaBI* και ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Στήλες 1, 2, 4: Φορείς Κυτοσίνης, στήλες 3, 5: φορείς Γουανίνης, στήλη M: δείκτης μοριακών βαρών των 100 bp.

Πίνακας 6.1. Αλληλικές συχνότητες (C/G) στα δείγματα ασθενών με σποραδικό καρκίνο του μαστού καθώς και σε δείγματα φυσιολογικών ατόμων

	Αλληλίο 1 (C)	Αλληλίο 2 (G)
Φυσιολογικά δείγματα	0.745	0.255
Καρκινικά δείγματα μαστού	0.67	0.33

Πίνακας 6.2. Κατανομή σημειακού πολυμορφισμού του γονιδίου *ATM* σε ασθενείς με καρκίνο μαστού σε συσχέτιση με την ηλικία των ασθενών, το κλινικό στάδιο, τον ιστολογικό βαθμό και τα επίπεδα των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης

<i>Ηλικία</i>	<i>Σύνολο</i>	<i>Ετεροζυγωτία ATM</i>
<40	2	1
40-50	11	7
>50	40	26
<i>Στάδιο</i>		
I	24	14
II	25	13
III	7	4
<i>Βαθμός</i>		
I	8	5
II	42	28
III	6	3
<i>Υποδοχείς Οιστρογόνων</i>		
Θετικό ^a	30	20
Αρνητικό ^b	26	16
<i>Υποδοχείς</i>		
<i>Προγεστερόνης</i>		
Θετικό	31	19
Αρνητικό	25	17

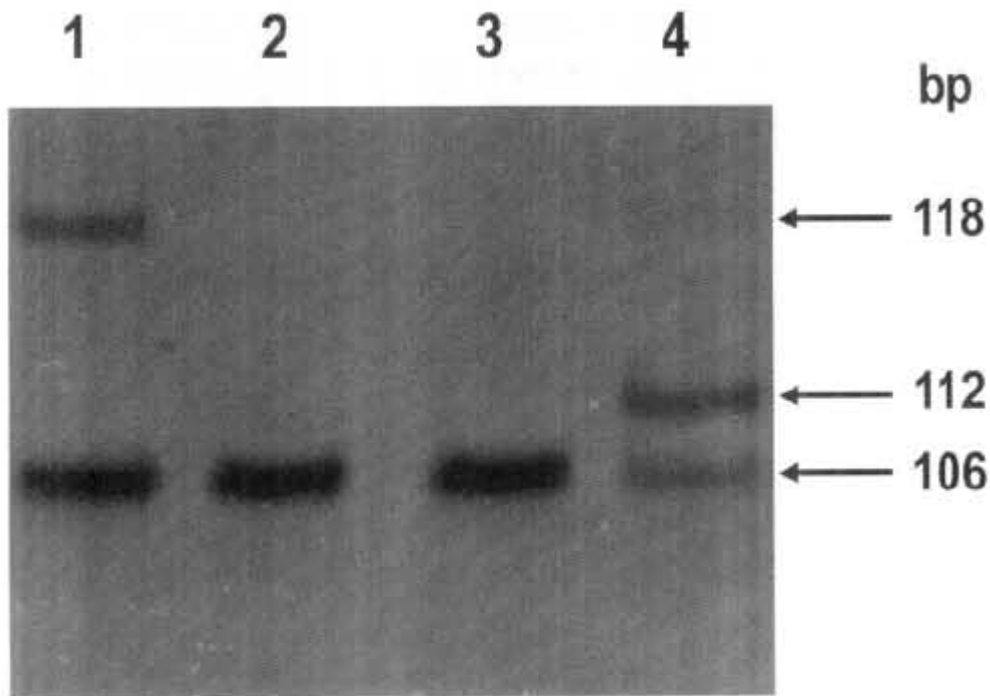
Σημείωση: Τα επίπεδα υποδοχέων ER- ή PgR-αναφέρονται σε τιμές υποδοχέων κατώτερες των 5 fmol/mg πρωτεΐνης ενώ ως ER+ ή PgR+ σε τιμές υποδοχέων ανώτερες των 5 fmol/mg πρωτεΐνης

6.2.2 Ανάλυση της 5' εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας του *H-ras* σε δείγματα σποραδικού καρκίνου σε μαστό καθώς και σε φυσιολογικά δείγματα.

6.2.2.1 Γενικά

Έχει βρεθεί ότι το γονίδιο *H-ras* εμπλέκεται σε μηχανισμούς καρκινογένεσης σε μια ποικιλία κοινών τύπων όγκων, όπως του μαστού, της ουροδόχου κύστεως, των ωοθηκών και του πνεύμονα (Barbacid 1987, Bos 1989, Field et al 1990, Liu 1993, Sandberg 1992). Οι μηχανισμοί ενεργοποίησης του ογκογονιδίου περιλαμβάνουν τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές αλλοιώσεις στη δομή και λειτουργία του πρώτο-ογκογονιδίου (Spandidos et al 1984, Lang et al 1986, Spandidos et al 1989, Barbacid 1987, Field et al 1990).

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα βιοψικού υλικού από καρκινικά δείγματα γυναικών με σποραδικό καρκίνο του μαστού καθώς και δείγματα περιφερικού αίματος από φυσιολογικές γυναίκες, για την ενίσχυση των αλληλίων P1, P2 και P3, της πολυμορφικής θέσης που εντοπίζεται στο εσώνιο 1 του γονιδίου *H-ras*. Η ανάλυση περιλαμβάνει σύγκριση της πολυμορφικής θέσης ανάμεσα στον καρκινικό και στον φυσιολογικό ιστό (Iwahana et al 1990, Tanci et al 1992, Caron et al 1983, Krontiris et al 1985). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μοριακή διαδικασία βασισμένη στην αντίδραση PCR που ανιχνεύει τα αλλήλια P1, P2 και P3 με εξειδικευμένο τρόπο. Το ζευγάρι των ειδικών εκκινητών δημιουργεί ένα ειδικό PCR προϊόν 106 bp για το P2 αλλήλιο, 112 bp για το P3 και 118 bp για το P1 αλλήλιο (Εικόνα 6.2).



Εικόνα 6.2 Τα προϊόντα ενίσχυσης πολυμορφικών αλληλουχιών του εσωνίου 1 του γονιδίου *H-ras* με τη μέθοδο της PCR (106, 112 118 bp). Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν μέσω πηκτώματος ακρυλαμιδίου 10% . Στήλη 1: P1/P2, στήλες 2 και 3: P2/P2, στήλη 4: P2/P3.

6.2.2.2 Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν

Από την ιστολογική εξέταση 56 δειγμάτων με αλλοιώσεις σποραδικού καρκίνου στο μαστό σε βιοψικά δείγματα από πρωτογενείς όγκους.

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν 61 φυσιολογικά δείγματα περιφερικού αίματος υγιών γυναικών με ηλικία > 55 ετών που δεν έφεραν γνωστές καρκινικές βλάβες.

6.2.2.3 Ανάλυση της 5' εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας του H-ras σε φυσιολογικά δείγματα περιφερικού αίματος.

Η ανάλυση αυτής της περιοχής του εσωνίου 1 του γονιδίου H-ras στα 61 φυσιολογικά δείγματα αίματος έδειξε σημαντικό βαθμό ετεροζυγωτίας των δειγμάτων στα αλλήλια P1, P2 και P3. Συγκεκριμένα εμφανίστηκαν σημαντικά ποσοστά ετεροζυγωτίας στα P2/P1 (35%) καθώς και στα P3/P1 (20%). Ο μεγαλύτερος αριθμός των φυσιολογικών δειγμάτων ήταν ομόζυγος για τα P1/P1 (39%). Η εξέταση της εξανουκλεοτιδικής περιοχής του εσωνίου 1 του γονιδίου H-ras έδειξε ότι η συνολική συχνότητα παρουσίας των αλληλίων είναι 68% για το P1, 20% για το P2 και 12% για το P3. Τα αποτελέσματα από την μελέτη των φυσιολογικών δειγμάτων συνοψίζονται στους Πίνακες 6.3 και 6.5.

6.2.2.4 Ανάλυση της 5' εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας του H-ras σε δείγματα από γυναίκες με σποραδικό καρκίνο μαστού.

Η ανάλυση της HRM περιοχής του εσωνίου 1 του H-ras στα 56 δείγματα βιοψικού υλικού από γυναίκες με σποραδικό καρκίνο μαστού έδειξε μικρό βαθμό ετεροζυγωτίας των δειγμάτων στα αλλήλια P1, P2 και P3. Συγκεκριμένα εμφανίστηκαν μικρά ποσοστά ετεροζυγωτίας στα P2/P1 (9%) καθώς και στα P3/P1 (6%). Ο μεγαλύτερος αριθμός των καρκινικών δειγμάτων ήταν ομόζυγος για P1/P1 (72%). Η εξέταση της εξανουκλεοτιδικής περιοχής του εσωνίου 1 του γονιδίου H-ras έδειξε ότι η συνολική συχνότητα παρουσίας των αλληλίων είναι 80% για το P1, 17% για το P2 και 3% για το P3. Τα αποτελέσματα από την μελέτη των καρκινικών δειγμάτων από βιοψίες μαστού συνοψίζονται στους Πίνακες 6.4 και 6.5.

Η κατανομή των αλληλίων ήταν διαφορετική στα δείγματα γυναικών με σποραδικό καρκίνο μαστού σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα αίματος. Η συχνότητα αλληλίων για την ομοζυγωτία P1/P1 ήταν σε υψηλότερη τιμή στα καρκινικά δείγματα (72%) σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα (39%). Η ομοζυγωτία P3/P3 ήταν παρούσα, αν και σε μικρό ποσοστό, μόνο στα καρκινικά δείγματα (3%).

Πίνακας 6.3. Συχνότητα των αλληλίων P1, P2 και P3 στα φυσιολογικά δείγματα αίματος

<i>Ιστολογική διάγνωση</i>	<i>P2/P2</i>	<i>P2/P3</i>	<i>P2/P1</i>	<i>P3/P3</i>	<i>P3/P1</i>	<i>P1/P1</i>
Φυσιολογικά δείγματα αίματος	1	1	21	1	12	23
Σύνολο (%)	2	2	35	2	20	39

Πίνακας 6.4 Συχνότητα των αλληλίων P1, P2 και P3 στα δείγματα από σποραδικούς καρκίνους μαστού

<i>Ιστολογική διάγνωση</i>	<i>P2/P2</i>	<i>P2/P3</i>	<i>P2/P1</i>	<i>P3/P3</i>	<i>P3/P1</i>	<i>P1/P1</i>
Καρκινικά δείγματα μαστού	7	0	5	0	3	41
Σύνολο (%)	12	0	9	0	6	73

Πίνακας 6.5 Συχνότητα των αλληλίων P1, P2 και P3 στα δείγματα αίματος από φυσιολογικές γυναίκες και στα καρκινικά δείγματα μαστού

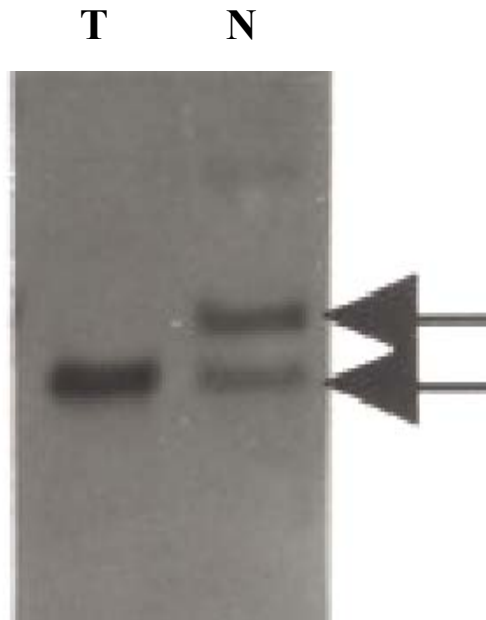
<i>Αλληλία (%)</i>	<i>Φυσιολογικά δείγματα (%)</i>	<i>Καρκινικά δείγματα μαστού</i>
P1	68	80
P2	20	17
P3	12	3

6.2.2.5 Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν

Χρησιμοποιήθηκαν 30 ζεύγη δειγμάτων από ιστούς που προέρχονταν από γυναίκες με σποραδικό καρκίνο στο μαστό καθώς και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού από τις ίδιες ασθενείς. Τα καρκινικά ιστικά τεμάχια ανταποκρίνονταν σε πρωτογενείς και όχι σε μεταστατικούς όγκους.

6.2.2.6 Ανάλυση της 5' εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας του *H-ras* σε δείγματα σποραδικού καρκίνου σε μαστό καθώς και σε αντίστοιχα φυσιολογικά δείγματα.

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν 30 βιοψικά δείγματα όγκων καρκίνου του μαστού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού. Η ανάλυση του προτύπου που παρουσιάζεται στην πολυμορφική θέση του εσωνίου 1 του γονιδίου *H-ras* έδειξε απώλειες ετεροζυγωτίας (LOH) στη μικροδορυφορική περιοχή που εδράζεται κοντά στο 5' άκρο του γονιδίου σε μικρό ποσοστό. Πιθανώς οι απώλειες αυτές να εμπλέκονται στην ανάπτυξη πρωτοπαθών όγκων καθώς υπάρχει παρατηρημένη σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση επιθετικών μορφών καρκίνου (Theillet et al 1986, Sandberg et al 1992). Η ανάλυση αυτής της περιοχής έδειξε ότι 16.5% των δειγμάτων ήταν ετερόζυγα. Η σύγκριση του προτύπου μεταξύ του καρκινικού και του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού στα παραπάνω δείγματα αποκάλυψε απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH) σε δύο από αυτά.



Εικόνα 6.3. Παράδειγμα δείγματος που επιδεικνύει απώλεια ετεροζυγωτίας για την πολυμορφική θέση του εσωνίου 1 του γονιδίου *H-ras*. N= Φυσιολογικό δείγμα, T= Καρκινικό δείγμα μαστού. Τα μαύρα βέλη δείχνουν κάθε αλληλική ζώνη

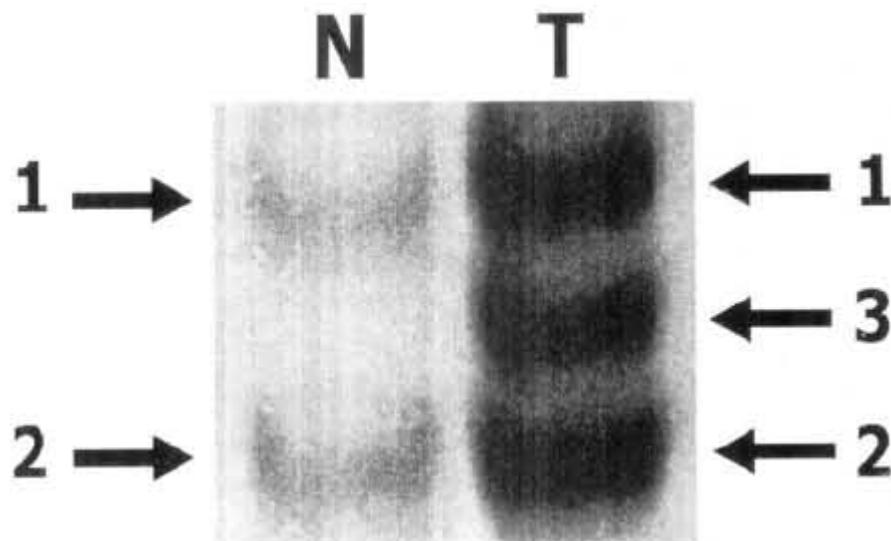
6.2.3 Ανάλυση της *VTR* περιοχής του *H-ras* σε δείγματα σποραδικού καρκίνου σε μαστό καθώς και σε αντίστοιχα φυσιολογικά δείγματα.

6.2.3.1 Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν

Χρησιμοποιήθηκαν 30 ζεύγη δειγμάτων από ιστούς που προέρχονταν από γυναίκες με σποραδικό καρκίνο στο μαστό καθώς και από παρακείμενο φυσιολογικό ιστό από τις ίδιες ασθενείς. Τα καρκινικά ιστικά τεμάχια ανταποκρίνονταν σε πρωτογενείς και όχι σε μεταστατικούς όγκους.

6.2.3.2 Ανάλυση της *VTR* περιοχής του γονιδίου *H-ras*

Η ανάλυση της *VTR* περιοχής του γονιδίου *H-ras* έδειξε μεταβολές στη μικροδορυφορική αυτή περιοχή που εδράζεται στο 3' άκρο του γονιδίου σε μικρό ποσοστό. Από τα 30 ζεύγη καρκινικών και φυσιολογικών ιστών μαστού που μελετήθηκαν εμφανίστηκαν διαφοροποιήσεις σε ένα ζεύγος (3.3%) (Εικόνα 6.3). Στο συγκεκριμένο ζεύγος παρατηρήθηκε αλλαγή στο πρότυπο κινητικότητας των αλληλίων *VTR* μετά από σύγκριση των προτύπων ενίσχυσης της περιοχής *VTR* μεταξύ των προϊόντων της αντίδρασης PCR που αφορούν το ιστολογικό τεμάχιο φυσιολογικού και καρκινικού ιστού. Οι αλλαγές που συμβαίνουν στην μονάδα επανάληψης των 28 bp, όταν υπάρχουν σε μικρό βαθμό, δεν μπορούν να ανιχνευθούν στα πηκτώματα αгарόζης 2%, συνεπώς υπάρχει η πιθανότητα να υπάρχει μια υποεκτίμηση στην αναφερόμενη συχνότητα αστάθειας. Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν πολυμορφισμοί στα συγκεκριμένα δείγματα μετά από την περιοριστική πέψη με την ενδονουκλεάση *BstNI*. Η ενδονουκλεάση *BstNI* αναγνωρίζει μια αλληλουχία 5 βάσεων από τις 28 βάσεις της μονάδας επανάληψης, οπότε θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η συχνότητα των μεταλλαγών της περιοχής *VTR* είναι υψηλότερη. Το ζεύγος με την αλλαγή στο πρότυπο κινητικότητας των αλληλίων *VTR* μεταξύ του φυσιολογικού και του καρκινικού δείγματος δεν έφερε αντίστοιχο πολυμορφισμό ανιχνεύσιμο από την περιοριστική πέψη με την ενδονουκλεάση *BstNI*, και προσδίδει έμμεσα στοιχεία ότι οι αλλαγές αυτές στα πρότυπα κινητικότητας μπορούν να αποδοθούν στην μονάδα επανάληψης του πυρήνα των 28 bp.



Εικόνα 6.4. Παράδειγμα δείγματος που επιδεικνύει μικροδορυφορική αστάθεια για την περιοχή *VTR* του γονιδίου *H-ras*. N= Φυσιολογικό δείγμα, T= Καρκινικό δείγμα μαστού. Τα μαύρα βέλη και οι αριθμοί 1, 2 δείχνουν κάθε αλληλική ζώνη. Το μαύρο βέλος και ο αριθμός 3 δείχνουν το νεοδημιουργημένο αλλήλιο.

6.2.4 Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στο γονίδιο *p53* σε δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού και σε φυσιολογικά δείγματα περιφερικού αίματος.

6.2.4.1 Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκαν 56 ιστολογικά τεμάχια βιοψικού υλικού γυναικών με καρκίνο του μαστού. Τα ιστικά τεμάχια ανταποκρίνονταν σε πρωτογενείς και όχι σε μεταστατικούς όγκους. Επίσης, μελετήθηκαν 61 δείγματα αίματος από γυναίκες φυσιολογικές, ηλικίας άνω των 55 ετών, με αρνητικό ιστορικό για προκαρκινικές και καρκινικές αλλοιώσεις.

6.2.4.2 Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στο γονίδιο *p53* σε καρκινικά δείγματα μαστού καθώς και σε δείγματα ελέγχου.

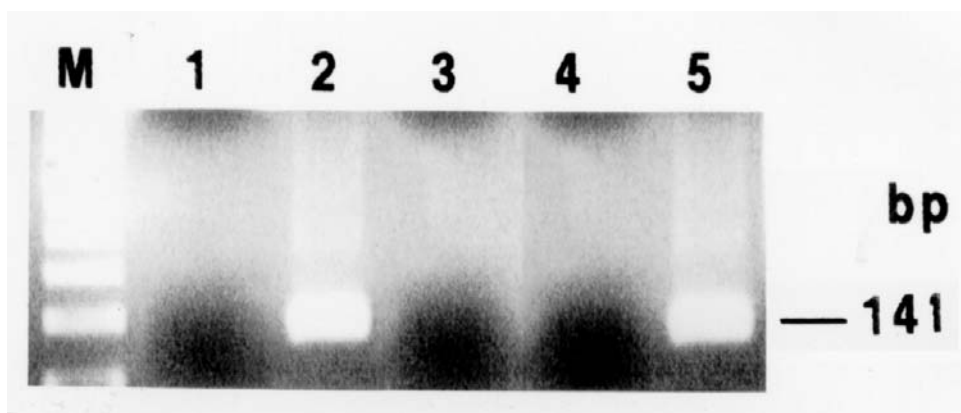
Στα πλαίσια της μελέτης της ανίχνευσης των σημειακών πολυμορφισμών του γονιδίου *p53* σε καρκινικές αλλοιώσεις σε δείγματα γυναικών με καρκίνο μαστού χρησιμοποιήθηκε μέθοδος που περιλαμβάνει ενίσχυση του DNA της περιοχής του κωδικονίου με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR). Το ζευγάρι εκκινητών *p53*+/*Arg*- δίνει PCR προϊόν 141 βάσεων για το αλληλίο της αργινίνης (Εικόνα 6.4), ενώ το ζευγάρι εκκινητών *Pro*+/*p53*- δίνει PCR προϊόν 177 βάσεων για το αλληλίο της προλίνης (Εικόνα 6.5).

Τα αποτελέσματα της κατανομής των πολυμορφισμών της *p53* για τα 56 δείγματα από γυναίκες με καρκίνο του μαστού καθώς και για τα 61 φυσιολογικά δείγματα αίματος από φυσιολογικές γυναίκες ηλικίας άνω των 55 ετών με αρνητικό ιστορικό για προκαρκινικές και καρκινικές αλλοιώσεις συνοψίζονται στον Πίνακα 6.6. Υπήρχε διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων της *p53* ανάμεσα στα δείγματα γυναικών με καρκίνο μαστού και τα φυσιολογικά δείγματα. Η αλληλική συχνότητα της *p53 Arg/Arg* ήταν αρκετά υψηλότερη (61%) σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα αίματος (20%). Τα ποσοστά της ετεροζυγωτίας *Arg/Pro* ήταν 18% στα καρκινικά δείγματα μαστού σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα (67% στα δείγματα αίματος). Η αλληλική συχνότητα της *p53 Pro/Pro* ήταν χαμηλή (21%) στα καρκινικά δείγματα και στα φυσιολογικά δείγματα (10% στα δείγματα αίματος). Τα αποτελέσματα της μελέτης ανίχνευσης του σημειακού πολυμορφισμού της *p53* στα καρκινικά δείγματα συσχετίστηκαν με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους των ασθενών. Από το ιστορικό των γυναικών με καρκίνο του μαστού ήταν διαθέσιμα στοιχεία όπως: Η ηλικία του ασθενούς, το κλινικό στάδιο, ο ιστολογικός βαθμός του καρκινικού δείγματος καθώς και τα επίπεδα των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης. Τα αποτελέσματα της συσχέτισης παρουσιάζονται στο Πίνακα 6.7.

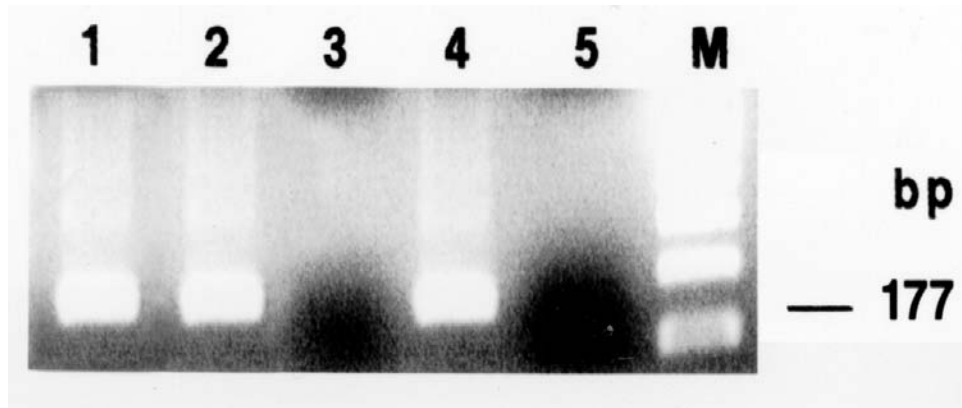
Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα των σημειακών πολυμορφισμών του γονιδίου *p53* και στις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους των ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Πίνακας 6.6. Συχνότητες των πολυμορφισμών στο κωδικόνιο για το αμινοξύ 72 της p53

Ιστολογική διάγνωση	Αριθμός δειγμάτων	Αργινίνη	Αργινίνη/ Προλίνη	Προλίνη	Άλλα
<i>Δείγματα αίματος</i>					
Σύνολο (%)	61	12 (20)	41(67)	6 (10)	2 (3)
<i>Καρκινικά δείγματα μαστού</i>					
	56	34 (61)	10 (18)	12 (21)	-



Εικόνα 6.5. Προϊόντα ενίσχυσης του αλληλίου της p53-72 Arg (141bp) με τη χρήση PCR. Τα προϊόντα του PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε 2% γέλη αγαρόζης. Οι στήλες 2, 5 αντιπροσωπεύουν θετικά δείγματα, οι στήλες 1, 3, 4 αντιπροσωπεύουν αρνητικά δείγματα και η στήλη M τον 100bp δείκτη μοριακών βαρών.



Εικόνα 6.6. Προϊόντα ενίσχυσης του αλληλίου της *p53-72 Pro* (177bp) με τη χρήση PCR. Τα προϊόντα του PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε 2% γέλη αγαρόζης. Οι στήλες 1, 2, 4 αντιπροσωπεύουν θετικά δείγματα, οι στήλες 3, 5 αντιπροσωπεύουν αρνητικά δείγματα και η στήλη M τον 100bp δείκτη μοριακών βαρών.

Πίνακας 6.7. Συσχέτιση των σημειακών πολυμορφισμών του γονιδίου p53 με την ηλικία , το κλινικό στάδιο, τον ιστολογικό βαθμό και τα επίπεδα των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού

	<i>Pro/Pro</i>	<i>Pro/Arg</i>	<i>Arg/Arg</i>
<i>Ηλικία</i>			
≤ 40		1	1
40-50		2	10
> 50	12	7	23
<i>Στάδιο</i>			
I	6	3	15
II	5	6	14
III		1	6
<i>Βαθμός</i>			
I	4		4
II	6	7	29
III	1	3	2
<i>Υποδοχείς Οιστρογόνων</i>			
Θετικοί	6	6	18
Αρνητικοί	5	4	17
<i>Υποδοχείς Προγεστερόνης</i>			
Θετικοί	6	7	18
Αρνητικοί	5	3	17

Σημείωση: Τα επίπεδα υποδοχέων ER- ή PgR-αναφέρονται σε τιμές υποδοχέων κατώτερες των 5 fmol/mg πρωτεΐνης ενώ ως ER+ ή PgR+ σε τιμές υποδοχέων ανώτερες των 5 fmol/mg πρωτεΐνης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΒΔΟΜΟ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1 Εισαγωγή

Ο καρκίνος του μαστού είναι ένας πολλαπλασιασμός των επιθηλιακών κυττάρων που επενδύουν τους πόρους ή τα λοβία του μαστού. Η θνητότητα από τη μορφή αυτή κακοήθειας έχει αρχίσει να μειώνεται τα τελευταία χρόνια. Παρ' όλ' αυτά, οι επιθηλιακές κακοήθειες στο μαστό παραμένουν ως η πιο συχνή αιτία καρκίνου στις γυναίκες, προσμετρώντας για το 1/3 των συνολικών κακοηθειών στο γυναικείο φύλο. Ο ανθρώπινος καρκίνος του μαστού αποτελεί μια μονοκλωνική ασθένεια: ένα μόνο μεταλλαγμένο κύτταρο (το τελικό αποτέλεσμα μιας σειράς από επίκτητες ή γενετικές μεταλλαγές) είναι ικανό να εκφράσει ένα πλήρες καρκινικό δυναμικό. Με αυτό τον τρόπο, ο καρκίνος του μαστού μπορεί να υπάρχει για μια μακρά περίοδο είτε ως μη διηθητική ή ως διηθητική αλλά μη μεταστατική νόσος (Lippman M.E, 2001).

7.2 Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στα γονίδια *ATM*, *H-ras* και *p53* σε καρκινικές αλλοιώσεις του μαστού και σε δείγματα ελέγχου

7.2.1. Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στο γονίδιο *ATM* σε καρκινικές αλλοιώσεις του μαστού και σε φυσιολογικά δείγματα αίματος

Το γονίδιο *ATM* παρουσιάζει πολυμορφισμό στο νουκλεοτίδιο +239 του εσωνίου 48, έτσι ώστε η αλληλουχία του DNA να περιλαμβάνει είτε ένα νουκλεοτίδιο κυτοσίνης ή ένα νουκλεοτίδιο γουανίνης σε αυτή τη θέση. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μια συγκριτική ανάλυση της κατάστασης ετεροζυγωτίας σε 56 γυναίκες με νεοπλασία στο μαστό καθώς και σε 61 δείγματα από φυσιολογικές γυναίκες >55 ετών για να εξεταστεί η πιθανή συσχέτιση της ετεροζυγωτίας του *ATM* με την εμφάνιση σποραδικού καρκίνου στο μαστό. Τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν διαφορά

στην κατανομή των γονότυπων του *ATM* ανάμεσα στους δυο υπό μελέτη πληθυσμούς. Τα επίπεδα ετεροζυγωτίας του γονιδίου *ATM* ήταν υψηλότερα (64.5%) σε σχέση με τα δείγματα φυσιολογικών γυναικών (50%). Επιπρόσθετα, οι συχνότητες των αλληλομόρφων C και G εμφάνισαν διαφορές ανάμεσα στα καρκινικά (0.67 & 0.33 αντίστοιχα) και τα φυσιολογικά δείγματα (0.745 & 0.255 αντίστοιχα). Από τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων της μελέτης με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους των ασθενών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

Ο τρόπος ανίχνευσης του σημειακού αυτού πολυμορφισμού του γονιδίου *ATM*, μέσω αυτού του RFLP, μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο ως ενδογονιδιακός ανιχνευτής για τον προσδιορισμό της ετεροζυγωτίας που πιθανολογείται ως προδιαθεσικός παράγοντας στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού.

7.2.2 Ανάλυση της 5' εξανουκλεοτιδικής αλληλουχίας του *H-ras* σε δείγματα σποραδικού καρκίνου σε μαστό καθώς και σε φυσιολογικά δείγματα.

Το γονίδιο *H-ras* είναι πολυμορφικό στο εσόνιο 1, οπότε μπορεί να περιέχει ένα από τα αλληλόμορφα P1, P2 ή P3 στη θέση αυτή. Εξετάστηκε μια εξανουκλεοτιδική περιοχή που εδράζεται σε αυτό το εσόνιο (Tanci et al 1992, Kotsinas et al 1994, Langdon et al 2003, Weitzel et al 2000). Τα τρία αλληλία ανιχνεύθηκαν σε μια σειρά από δείγματα αίματος που ελήφθησαν από 61 υγιείς γυναίκες, καθώς και σε 56 ιστικά δείγματα από γυναίκες με καρκίνο μαστού.

Στην παρούσα μελέτη εμφανίστηκε διαφορετική κατανομή στις συχνότητες των αλληλίων P1, P2 και P3 μεταξύ των υπό εξέταση κατηγοριών δειγμάτων καθώς και στην κάθε επιμέρους κατηγορία. Στην ομάδα ελέγχου των φυσιολογικών γυναικών το αλληλίο P1 βρέθηκε σε ποσοστό 68%, το αλληλίο P2 σε ποσοστό 20% και το αλληλίο P3 σε ποσοστό 12%. Η ομοζυγωτία P1/P1 εμφάνιζε τη μεγαλύτερη συχνότητα (39%), ακολουθούμενη από την ετεροζυγωτία P2/P1 (35%). Παρ' όλ' αυτά, στα δείγματα με καρκινικές αλλοιώσεις το αλληλίο P1 ήταν επίσης το συχνότερο με υψηλότερο όμως ποσοστό (80%) ενώ το αλληλίο P3 ήταν το λιγότερο συχνό (3%). Στα δείγματα αυτά δεν παρατηρήθηκαν ετεροζυγώτες P2/P3 καθώς και ομοζυγώτες P3/P3. Οι ομοζυγώτες P1/P1 ήταν οι συχνότεροι σε ποσοστό 72%. Τα δεδομένα αυτά θα μπορούσαν να υποδηλώσουν ότι η παρουσία της ομοζυγωτίας P1/P1, η αύξηση στην ομοζυγωτία P2/P2 και/ ή απουσία της ομοζυγωτίας P3/P3 στην ανάλυση της *HRM* περιοχής του γονιδίου θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν παράγοντες κινδύνου για καρκινογένεση στο μαστό. Επιπρόσθετα, θα μπορούσε να σημειωθεί ότι η πολυμορφική περιοχή της *HRM* συνδέεται με το επίτοπο

VTR του ίδιου γονιδίου στο 3' άκρο (Iwahana et al 1990). Η σύνδεση αυτή θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα μιας χαμηλής συχνότητας ανασυνδυασμού μεταξύ των δυο περιοχών λόγω μικρής γενωμικής απόστασης (~4Kb). Αυτή η σύνδεση φαίνεται ότι επηρεάζει τη φυσιολογική λειτουργία του *H-ras* (Iwahana et al 1990, Kotsinas et al 1994).

7.2.3 Απώλεια ετεροζυγωτίας πολυμορφικής θέσης *HRM* του γονιδίου *H-ras*

Στον καρκίνο του μαστού μπορούν να παρουσιαστούν ποικίλες χρωμοσωμικές ανωμαλίες ως αποτέλεσμα της πολυσταδιακής διαδικασίας της καρκινογένεσης (Theillet et al 1986). Οι ελλείψεις τμήματος του χρωμοσώματος 11, στο οποίο εδράζεται το *H-ras*, έχουν συσχετιστεί αρκετές φορές με εμφάνιση επιθετικών μορφών καρκίνου (Theillet et al 1986). Σε αυτό το πρότυπο στηρίχθηκε η μελέτη των δυο πολυμορφικών θέσεων του γονιδίου *H-ras* σε δείγματα καρκίνου του μαστού. Η ανάλυση των πολυμορφικών αυτών θέσεων έδειξε ότι δυο από τα ετερόζυγα δείγματα παρουσίασαν απώλεια της ετεροζυγωτίας στην περιοχή *HRM*. Η εξανουκλεοτιδική περιοχή πιθανόν να εμπλέκεται στη ρύθμιση του γονιδίου *H-ras*. Ο πολυμορφισμός αυτός βρίσκεται σε ένα εξελικτικά συντηρημένο τμήμα του εσωνίου 1 του γονιδίου (Hashimoto-Gotoh et al 1992). Με διάφορα πειράματα με ελλείψεις του γονιδίου έγινε φανερό ότι η διαδικασία μετασχηματισμού επηρεάζεται σημαντικά από το συντηρητικό αυτό τμήμα του εσωνίου. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η περιοχή αυτή εμπλέκεται στην ρύθμιση του γονιδίου *H-ras* (Hashimoto-Gotoh et al 1988, 1992).

7.2.4 Ανάλυση της *VTR* περιοχής του *H-ras* σε δείγματα σποραδικού καρκίνου σε μαστό καθώς και σε αντίστοιχα φυσιολογικά δείγματα.

Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η παρουσία γενετικής αστάθειας στην περιοχή *VTR* του γονιδίου *H-ras* σε 30 ζεύγη δειγμάτων φυσιολογικού και καρκινικού ιστού από νεοπλασία μαστού. Στα πλαίσια της διερεύνησης των διαφοροποιήσεων καθώς και των αλλαγών στην κινητικότητα των αλληλίων *VTR*, εμφανίστηκε αστάθεια στον αριθμό επαναλήψεων του πυρήνα επανάληψης σε μια περίπτωση (3,3%) ενώ δεν εμφανίστηκε φαινόμενο απώλειας ετεροζυγωτίας. Παρ' όλο που η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA δεν ήταν συχνό γεγονός, θα μπορούσε να αποδοθεί στο μηχανισμό ενεργοποίησης του ογκογονιδίου *H-ras* στον καρκίνο του μαστού. Στα δείγματα αυτά δεν

παρατηρήθηκε πολυμορφισμός στην περιοχή αναγνώρισης της *BstNI* της συντηρημένης αλληλουχίας 28 βάσεων του πυρήνα επανάληψης. Πιθανές μεταλλάξεις θα μπορούσαν να διαφοροποιήσουν τη συγγένεια των μεταγραφικών παραγόντων, απορυθμίζοντας έτσι την έκφραση του πρώτο-ογκογονιδίου *H-ras*.

7.2.5 Ανάλυση σημειακών πολυμορφισμών στο γονίδιο *p53* σε δείγματα ασθενών με καρκίνο μαστού

Το γονίδιο *p53* είναι πολυμορφικό στο αμινοξύ 72 της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί, συνεπώς η *p53* μπορεί να περιέχει ένα υπόλειμμα προλίνης ή αργινίνης σε αυτή τη θέση. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η πιθανότητα να αποτελεί η ομοζυγωτία στην αργινίνη παράγοντα κινδύνου στην καρκινογένεση του μαστού (Papadakis et al, 2000). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση στο γονότυπο της *p53* σε αλλοιώσεις καρκίνου του μαστού καθώς και σε φυσιολογικά δείγματα με την χρήση μοριακών τεχνικών. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι υπήρχε διαφορά στην κατανομή των γονότυπων της *p53* ανάμεσα στα δείγματα γυναικών με καρκίνο του μαστού και στα φυσιολογικά δείγματα. Η αλληλική συχνότητα της *p53* με ομόζυγη αργινίνη ήταν αρκετά υψηλότερη (61%) σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα αίματος γυναικών >55 ετών χωρίς ιστορικό κακοήθειας (20%). Στην ομάδα ελέγχου των φυσιολογικών γυναικών, η συχνότητα της ετεροζυγωτίας αργινίνης/ προλίνης εμφάνισε ποσοστό 67%, ενώ φαίνεται να υπάρχει κάποια διαφορά στη συχνότητα ομοζυγωτίας της προλίνης και της αργινίνης (10% και 20% αντίστοιχα). Επιπρόσθετα, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι οι συχνότερες των γονότυπων της *p53* που αφορούν το κωδικόνιο 72 διαφοροποιούνται ανάλογα με την εθνολογική ομάδα. Η συχνότητα ομοζυγωτίας για την αργινίνη στο κωδικόνιο 72 της *p53* εμφανίστηκε χαμηλότερη σε σχέση με αντίστοιχες ομάδες που ερευνήθηκαν στην Ιαπωνία και Νορβηγία (Scheffner et al 1990, Helland et al 1998).

Όμως, στα δείγματα από γυναίκες με καρκίνο του μαστού εμφανίστηκε σημαντική υπέρ-αντιπροσώπευση της ομοζυγωτίας σε αργινίνη στην *p53* με ποσοστό 62% σε σύγκριση με την ομοζυγωτία σε προλίνη που εμφανίζεται σε ποσοστό 21%. Η συχνότητα των ετεροζυγωτών αργινίνης/προλίνης στην *p53* ανέρχεται στο 17%.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεικνύουν την πιθανότητα η ομοζυγωτία της αργινίνης της πρωτεΐνης *P53* να αντιπροσωπεύει ένα πιθανό προδιαθεσικό παράγοντα για την ανάπτυξη

καρκίνου του μαστού. Στα υπό μελέτη καρκινικά δείγματα ήταν εμφανής η κυριαρχία της ομοζυγωτίας στην αργινίνη για την p53 σε σύγκριση με την ομοζυγωτία στην προλίνη ή στην ετεροζυγωτία προλίνης/ αργινίνης.

Ένας μικρός αριθμός από τα δείγματα ελέγχου δεν έφερε ούτε αργινίνη ή προλίνη στο αμινοξύ 72 της p53. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί σε έλλειψη στην κωδικοποιούσα περιοχή του p53 γονιδίου ή όπως ανέφεραν οι Matlashewski et al (1987) μπορεί να υπάρχουν επιπλέον αλληλία, όπως η κυστεΐνη, στην θέση του αμινοξέος 72 στην p53. Συμπερασματικά, η μελέτη μας δεικνύει ότι η ομοζυγωτία στην αργινίνη της p53 σχετίζεται με τον καρκίνο στο μαστό και μπορεί πιθανώς να αντιπροσωπεύει ένα παράγοντα επικινδυνότητας για την καρκινογένεση στο μαστό.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aguilar-Cordova E, Strange R, Young LJ, Billy HT, Gumerlock PH, Cardiff RD.

Viral Ha-ras mediated mammary tumor progression. *Oncogene* 1991 Sep; 6(9):1601-7

American Society of Clinical Oncology: 1998 update of recommended breast cancer surveillance guidelines. *J Clin Oncol* 1999, 17: 1080- 1082

Banin, S, Moyal, L, Shieh, S.-Y, Taya, Y, Anderson, C. W, Chessa, L, Smorodinsky, N. I, Prives, C, Reiss, Y, Shiloh, Y, Ziv, Y.: Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998 281: 1674- 1677

Banks L, Matlashewski G, Crawford L. Isolation of human-p53-specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression. *Eur J Biochem* 1986 Sep 15; 159(3): 529- 34

Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987 56; 779-827

Beenken SW, Karsenty G, Raycroft L, Lozano G. An intron binding protein is required for transformation ability of p53. *Nucleic Acids Res* 1991 Sep 11; 19(17): 4747- 52

Benchimol S, Lamb P, Crawford LV, Sheer D, Shows TB, Bruns GA, Peacock J. Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet* 1985 Sep; 11(5): 505- 10

Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigiante G, Yulug I, Merlano M, Numico G, Comino A, Attard M, Reelfs O, Gusterson B, Bell AK, Heath V, Tavassoli M, Farrell PJ, Smith P, Lu X, Crook T. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* 2003 Apr; 3(4): 387- 402

- Bienz-Tadmor B, Zakut-Houri R, Libresco S, Givol D, Oren M. The 5' region of the p53 gene: evolutionary conservation and evidence for a negative regulatory element. *EMBO J* 1985 Dec 1; 4(12): 3209- 13
- Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993 Dec 16; 366(6456): 643- 54
- Bollag G, McCormick F. Regulators and effectors of ras proteins. *Annu Rev Cell Biol.* 1991; 7: 601- 32. Review
- Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989 Sep 1; 49(17): 4682- 9. Review. Erratum in: *Cancer Res* 1990 Feb 15; 50(4):1352
- Bourne HR, Wrishnik L, Kenyon C. Ras proteins. Some signal developments. *Nature* 1990 Dec 20-27; 348(6303): 678- 9
- Broeks, A.; de Klein, A.; Floore, A. N.; Muijtjens, M.; Kleijer, W. J.; Jaspers, N. G.; van't Veer, L. J. : ATM germ line mutations in classical ataxia-telangiectasia patients in the Dutch population. *Hum. Mutat.* 1998 12: 330- 337
- Broeks, A.; Urbanus, J. H. M.; Floore, A. N.; Dahler, E. C.; Klijn, J. G. M.; Rutgers, E. J. Th.; Devilee, P.; Russell, N. S.; van Leeuwen, F. E.; van't Veer, L. J.: ATM-heterozygous germ line mutations contribute to breast cancer-susceptibility. *Am. J. Hum. Genet.* 2000 66: 494- 500
- Broeks, A.; Urbanus, J. H. M.; de Knijff, P.; Devilee, P.; Nicke, M.; Klopper, K.; Dork, T.; Floore, A. N.; van't Veer, L. J. : IVS10-6T-G, an ancient ATM germline mutation linked with breast cancer. *Hum. Mutat.* 2003 21: 521- 528
- Brown, K. D.; Ziv, Y.; Sadanandan, S. N.; Chessa, L.; Collins, F. S.; Shiloh, Y.; Tagle, D. A.: The ataxia-telangiectasia gene product, a constitutively expressed nuclear protein that is not up-regulated

following genome damage. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1997 94: 1840- 1845

Brzoska, P. M.; Chen, H.; Zhu, Y.; Levin, N. A.; Disatnik, M.-H.; Mochly-Rosen, D.; Murnane, J. P.; Christman, M. F. : The product of the ataxia-telangiectasia group D complementing gene, ATDC, interacts with a protein kinase C substrate and inhibitor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1995 92: 7824- 7828

Canman, C. E.; Lim, D.-S.; Cimprich, K. A.; Taya, Y.; Tamai, K.; Sakaguchi, K.; Appella, E.; Kastan, M. B.; Siliciano, J. D. : Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 1998 281: 1677- 1679

Capon DJ, Chen EY, Levinson AD, Seeburg PH, Goeddel DV. Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* 1983 Mar 3; 302(5903): 33- 7

Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 1994 Sep 15; 371(6494): 215- 20

Chen CY, Faller DV. Direction of p21ras-generated signals towards cell growth or apoptosis is determined by protein kinase C and Bcl-2. *Oncogene* 1995 Oct 19; 11(8): 1487- 98

Cohen JB, Walter MV, Levinson AD. A repetitive sequence element 3' of the human c-Ha-ras1 gene has enhancer activity. *J Cell Physiol Suppl.* 1987; Suppl 5: 75- 81

Cook SO, Ruined B, Albert I, McCormick F. RapV12 antagonizes Ras-dependent activation of ERK1 and ERK2 by LAP and EGF in Rat-1 fibroblasts. *EMBO J* 1993 Sep; 12(9): 3475- 85

Cortez, D.; Wang, Y.; Qin, J.; Elledge, S. J.: Requirement of ATM-dependent phosphorylation of Brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 1999 286: 1162- 1166

Coulier F, Imbert J, Albert J, Jeunet E, Lawrence JJ, Crawford L, Birg F. Permanent expression of p53 in FR 3T3 rat cells but cell cycle-dependent association with large-T antigen in simian virus 40 transformants. *EMBO J* 1985 Dec 16; 4(13A): 3413- 8

de Vries-Smits AM, Burgering BM, Leervers SJ, Marshall CJ, Bos JL. Involvement of p21ras in activation of extracellular signal-regulated kinase 2. *Nature* 1992 Jun 18; 357(6379): 602- 4

Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 1995 Aug 25; 82(4): 675- 84

Der CJ, Pan BT, Cooper GM. rasH mutants deficient in GTP binding. *Mol Cell Biol.* 1986 Sep; 6(9): 3291- 4

Devlin B, Krontiris T, Risch N. Population genetics of the HRAS1 minisatellite locus. *Am J Hum Genet.* 1993 Dec; 53(6): 1298- 1305

Devlin B, Risch N. Physical properties of VNTR data, and their impact on a test of allelic independence. *Am J Hum Genet.* 1993 Aug; 53(2): 324-9

Dony C, Kessel M, Gruss P. Post-transcriptional control of myc and p53 expression during differentiation of the embryonal carcinoma cell line F9. *Nature* 1985 Oct 17-23; 317(6038): 636- 9

Doria M, Klein N, Lucito R, Schneider RJ. The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors. *EMBO J* 1995 Oct 2; 14(19): 4747- 57

Dork T, Westermann S, Dittrich O, Twardowski M, Karstens JH, Schmidtke J, Stuhmann M. A frequent polymorphism of the gene mutated in ataxia telangiectasia. *Mol Cell Probes* 1997; 1: 71- 3

Downward J. Regulatory mechanisms for ras proteins. *Bioessays* 1992 Mar; 14(3): 177- 84

el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993 Nov 19; 75(4): 817- 25

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 Jan-Feb; 10(1): 1- 22

Gatti, R. A.; Berkel, I.; Boder, E.; Braedt, G.; Charmley, P.; Concannon, P.; Ersoy, R.; Foroud, T.; Jaspers, N. G. J.; Lange, K.; Lathrop, G. M.; Leppert, M.; Nakamura, Y.; O'Connell, P.; Paterson, M.; Salser, W.; Sanal, O.; Silver, J.; Sparkes, R. S.; Susi, E.; Weeks, D. E.; Wei, S.; White, R.; Yoder, F. : Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 1988 336: 577- 580

Gatti, R. A.; Peterson, K. L.; Novak, J.; Chen, X.; Yang-Chen, L.; Liang, T.; Lange, E.; Lange, K. : Prenatal genotyping of ataxia-telangiectasia. (Letter) *Lancet* 1993 342: 376

Ginsberg D, Oren M, Yantis M, Pipette J. Protein-binding elements in the promoter region of the mouse p53 gene. *Oncogene* 1990 Sep; 5(9): 1285- 90

Giovane A, Pintzas A, Maira SM, Sobieszczuk P, Wasyluk B. Net, a new ets transcription factor that is activated by Ras. *Genes Dev* 1994 Jul 1; 8(13): 1502- 13

Grand RJ, Owen D. The biochemistry of ras p21. *Biochem J.* 1991 Nov 1; 279 (Pt 3): 609- 31. Review

Green M, Krontiris TG. Allelic variation of reporter gene activation by the HRAS1 minisatellite. *Genomics* 1993 Aug; 17(2): 429- 34

Harlow E, Williamson NM, Ralston R, Helfman DM, Adams TE. Molecular cloning and in vitro expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53. *Mol Cell Biol* 1985 Jul; 5(7):1601-10

Hashimoto-Gotoh T, Mikiko T, Kikuno R, Ishihara H, Tezuka K. Unusual sequence conservation in intron 1 of c-H-ras oncogene and its effect on p21 protein synthesis. *Curr Persp Mol Cell Oncol* 1992, 1: 211-230.

Hashimoto-Gotoh T, Kikuno R, Takahashi M, Honkawa H. Possible role of the first intron of c-H-ras in gene expression: anti-cancer elements in oncogenes. *Anticancer Res.* 1988 Sep-Oct;8(5A):851-9.

Hawley, R. S.; Friend, S. H.: Strange bedfellows in even stranger places: the role of ATM in meiotic cells, lymphocytes, tumors, and its functional links to p53. *Genes Dev.*1996,10:2383-2388

Helland A, Langerod A, Johnsen H, Olsen AO, Skovlund E, Borresen-Dale AL. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature.* 1998 Dec 10;396(6711):530-1

Humes HD, DuPont HL, Gardner LB, Griffin JW, Harris Jr ED, Hazzard WR, King Jr TE, Loriaux DL, Nabel EG, Todd III RF, Traber PG. *Kelly's Textbook of Internal Medicine*, 4th edition, 2000, Lippincott Williams & Wilkins

Hwang DY, Cohen JB. A splicing enhancer in the 3'-terminal c-H-ras exon influences mRNA abundance and transforming activity. *J Virol* 1997 Sep; 71(9): 6416- 26

Ishii S, Merlino GT, Pastan I. Promoter region of the human Harvey ras proto-oncogene: similarity to the EGF receptor proto-oncogene promoter. *Science* 1985 Dec 20; 230(4732): 1378- 81

Ishii S, Kadonaga JT, Tjian R, Brady JN, Merlino GT, Pastan I. Binding of the Sp1 transcription factor by the human Harvey ras1 proto-oncogene promoter. *Science* 1986 Jun 13; 232(4756): 1410- 3

Iwahana H, Orita M, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. A new RFLP in intron 1 of the human c-Ha-ras1 gene and its close relationship with the variable tandem repeats in the region 3' to the gene. *Oncogene* 1990 Jul; 5(7): 1049- 53

Jelinek WR, Schmid CW. Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Annu Rev Biochem* 1982; 51: 813- 44. Review

Jenkins JR, Rudge K, Currie GA. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 1984 Dec 13-19; 312(5995): 651- 4

Kapp, L. N.; Painter, R. B.; Yu, L.-C.; van Loon, N.; Richard, C. W., III; James, M. R.; Cox, D. R.; Murnane, J. P.: Cloning of a candidate gene for ataxia-telangiectasia group D. *Am. J. Hum. Genet.* 1992 51: 45- 54

Kasperczyk A, Mermer BA, Parkinson DR, Lonergan JA, Krontiris TG. Allele-specific deletion in exon I of the HRAS1 gene. *Am J Hum Genet.* 1989 Nov; 45(5): 689- 96

Kasperczyk A, DiMartino NA, Krontiris TG. Minisatellite allele diversification: the origin of rare alleles at the HRAS1 locus. *Am J Hum Genet* 1990 Nov; 47(5): 854- 9

Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli B, Chan D, Lees-Miller SP, Lavin MF. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet.* 1998 Dec; 20(4): 398- 400

Koffa M, Koumantakis E, Ergazaki M, Malamou-Mitsi V, Spandidos DA. Detection of ras mutations and HPV in lesions of the human female reproductive tract. *Int J Oncol* 1994 5: 189- 195

Krag D, Weaver D, Ashikaga T, Moffat F, Klimberg VS, Shriver C, Feldman S, Kusminsky R, Gadd M, Kuhn J, Harlow S, Beitsch P. The sentinel node in breast cancer--a multicenter validation study. *N Engl J Med.* 1998 Oct 1; 339(14): 941- 6

Krontiris TG, DiMartino NA, Colb M, Parkinson DR. Unique allelic restriction fragments of the human Ha-ras locus in leukocyte and tumour DNAs of cancer patients. *Nature* 1985 Jan 31-Feb 6; 313(6001): 369- 74

Krontiris TG, DiMartino NA, Colb M, Mitcheson HD, Parkinson DR. Human restriction fragment length polymorphisms and cancer risk assessment. *J Cell Biochem* 1986; 30(4): 319- 29

Krontiris TG, Devlin B, Karp DD, Robert NJ, Risch N. An association between the risk of cancer and mutations in the HRAS1 minisatellite locus. *N Engl J Med.* 1993 Aug 19; 329(8): 517- 23

Lamb P, Crawford L. Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* 1986 May; 6(5): 1379- 85

Lang JC, Spandidos DA. The structure and function of eukaryotic enhancer elements and their role in oncogenesis. *Anticancer Res.* 1986 May-Jun; 6(3 Pt B): 437- 49. Review

Langdon JA, Armour JA. Evolution and population genetics of the H-ras minisatellite and cancer predisposition. *Hum Mol Genet.* 2003 Apr 15;12(8):891-900

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991 Jun 6; 351(6326): 453- 6

Lewin B. Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors. *Cell* 1991 Jan 25; 64(2): 303- 12. Review

Lim, D.-S.; Kirsch, D. G.; Canman, C. E.; Ahn, J.-H.; Ziv, Y.; Newman, L. S.; Darnell, R. B.; Shiloh, Y.; Kastan, M. B. : ATM binds to beta-adaptin in cytoplasmic vesicles. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1998 95: 10146- 10151

Lippman M.E. Breast cancer. Harrison's Principles of internal medicine. 15th edition. Ed. McGraw-Hill. 2001

Liu ET Oncogenes, breast cancer, and chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl.* 1993; 17G: 161- 6.
Review

Lowy DR, Willumsen BM. Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 851- 91

Lozano G, Levine AJ. Tissue-specific expression of p53 in transgenic mice is regulated by intron sequences. *Mol Carcinog* 1991; 4(1): 3- 9

Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O'Nions J, Tidy JA, James N, McGregor JM, Harwood CA, Yulug IG, Vousden KH, Allday MJ, Gusterson B, Ikawa S, Hinds PW, Crook T, Kaelin WG Jr. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behavior. *Nat Genet.* 2000 May; 25(1): 47- 54

Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 1987 Feb; 7(2): 961- 3

Matlashewski G, Lamb P, Pim D, Peacock J, Crawford L, Benchimol S. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J* 1984 Dec 20; 3(13): 3257- 62

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335- 50

Myers TW, Gelfand DH. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1991 Aug 6; 30(31): 7661- 6

Nowak R. Mining treasures from 'junk DNA'. *Science* 1994 Feb 4; 263(5147):608- 10

Okayama H, Berg P. Bacteriophage lambda vector for transducing a cDNA clone library into mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1985 May; 5(5): 1136- 42

Oren M, Levine AJ. Immunoselection of simian virus 40 large T antigen messenger rnas from transformed cells. *Virology* 1981 Sep; 113(2): 790- 3

Papadakis E.N, Dokianakis DN, Spandidos DA. P53 Codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. *Mol Cell Biol Res Comm*, 2000, 389-392

Reich NC, Oren M, Levine AJ. Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol Cell Biol* 1983 Dec; 3(12): 2143- 50

Reich NC, Levine AJ. Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* 1984 Mar 8- 14; 308(5955): 199- 201

Reisman D, Greenberg M, Rotter V. Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 Jul; 85(14): 5146- 50

Reisman D, Rotter V. Two promoters that map to 5'-sequences of the human p53 gene are differentially regulated during terminal differentiation of human myeloid leukemic cells. *Oncogene* 1989 Aug; 4(8): 945- 53

Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HH Jr, Erlich HA. Diagnosis of sickle cell anaemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* 1988 Sep 1; 319(9): 537- 41

Sakamuro D, Sabbatini P, White E, Prendergast GC. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* 1997 Aug 18; 15 (8):887- 98

Sandberg AA Chromosome changes in early bladder neoplasms. *J Cell Biochem Suppl*. 1992; 16I: 76- 9. Review

Santos E, Nebreda AR. Structural and functional properties of ras proteins. *FASEB J* 1989 Aug; 3(10): 2151- 63

Sarnow P, Hearing P, Anderson CW, Reich N, Levine AJ. Identification and characterization of an immunologically conserved adenovirus early region 11,000 Mr protein and its association with the nuclear matrix. *J Mol Biol* 1982 Dec 15; 162(3): 565- 83

Satoh T, Nakafuku M, Kaziro Y. Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. *J Biol Chem*. 1992 Dec 5; 267(34): 24149-52

Savitsky, K.; Bar-Shira, A.; Gilad, S.; Rotman, G.; Ziv, Y.; Vanagaite, L.; Tagle, D. A.; Smith, S.; Uziel, T.; Sfez, S.; Ashkenazi, M.; Pecker, I.; et al: A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995 268: 1749- 1753

Savitsky, K.; Sfez, S.; Tagle, D.A.; Ziv, Y.; Sartiel, A.; Collins, F. S. ; Shiloh, Y. ; Rotman, G.: The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum. Molec. Genet.* 1995 4: 2025- 2032

Schaffner, C.; Stilgenbauer, S.; Rappold, G. A.; Dohner, H.; Lichter, P.: Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999 94: 748- 753

Schweins T, Geyer M, Scheffzek K, Warshel A, Kalbitzer HR, Wittinghofer A. Substrate-assisted catalysis as a mechanism for GTP hydrolysis of p21ras and other GTP-binding proteins. *Nat Struct Biol.* 1995 Jan; 2(1): 36- 44

Schaffner, C.; Idler, I.; Stilgenbauer, S.; Dohner, H.; Lichter, P.: Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2000 97: 2773- 2778

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990 Dec 21;63(6):1129-36.

Scott, S. P.; Bendix, R.; Chen, P.; Clark, R.; Dork, T.; Lavin, M. F.: Missense mutations but not allelic variants alter the function of ATM by dominant interference in patients with breast cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2002 99: 925- 930

Seamark D, Abating P, White E, Prendergast GC. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest *Oncogene* 1997 Aug 18; 15(8): 887- 98

Seeburg PH, Colby WW, Capon DJ, Goeddel DV, Levinson AD. Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12. *Nature* 1984 Nov 1-7; 312(5989): 71- 5

Siebert PD, Larrick JW. Competitive PCR. *Nature* 1992 Oct 8; 359(6395): 557- 8

Sistonen L, Holtta E, Makela TP, Keski-Oja J, Alitalo K. The cellular response to induction of the p21 c-Ha-ras oncoprotein includes stimulation of jun gene expression. *EMBO J* 1989 Mar; 8(3): 815- 822

Spandidos DA, Kerr IB. Elevated expression of the human ras oncogene family in premalignant and malignant tumours of the colorectum. *Br J Cancer* 1984 Jun; 49(6): 681- 8

Spandidos DA, Wilkie NM. Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. *Nature* 1984 Aug 9-15; 310(5977): 469- 75

Spandidos DA, Freshney M, Wilkie NM Heterogeneity of cell lines derived after transformation of early passage rodent cells by the Ha-ras1 human oncogene. *Anticancer Res.* 1985 Jul-Aug; 5(4): 87- 91

Spandidos DA. Mechanism of carcinogenesis: the role of oncogenes, transcriptional enhancers and growth factors. *Anticancer Res.* 1985 Sep-Oct; 5(5): 485- 98

Spandidos DA, Holmes L. Transcriptional enhancer activity in the variable tandem repeat DNA sequence downstream of the human Ha-ras 1 gene. *FEBS Lett.* 1987 Jun 22; 218(1): 41- 6

Spandidos A, Wilkie NM. The normal human H-ras1 gene can act as an onco-suppressor. *Br J Cancer Suppl.* 1988 Dec; 9: 67- 71

Spandidos DA, Anderson ML. Oncogenes and onco-suppressor genes: their involvement in cancer. *J Pathol.* 1989 Jan; 157(1): 1- 10. Review

Spandidos DA, Lang JC. In vitro cell transformation by ras oncogenes. *Crit Rev Oncog.* 1989; 1(2): 195- 209. Review

Spandidos DA, Karaiossifidi H, Malliri A, Linardopoulos S, Vassilaros S, Tsikkinis A, Field JK. Expression of ras Rb1 and p53 proteins in human breast cancer. *Anticancer Res* 1992 Jan-Feb; 12(1): 81- 9

Stilgenbauer, S.; Winkler, D.; Ott, G.; Schaffner, C.; Leupolt, E.; Bentz, M.; Moller, P.; Muller-Hermelink, H.-K.; James, M. R.; Lichter, P.; Dohner, H.: Molecular characterization of 11q deletions points to a pathogenic role of the ATM gene in mantle cell lymphoma. *Blood* 1999 94: 3262- 3264

Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998 May 21; 393(6682): 229- 34

Tanci P, Genuardi M, Santini SA, Neri G. PCR detection of an insertion/deletion polymorphism in intron 1 of the HRAS1 locus. *Nucleic Acids Res.* 1992 Mar 11; 20(5): 1157

Theillet C, Lidereau R, Escot C, Hutzell P, Brunet M, Gest J, Schlom J, Callahan R. Loss of a c-H-ras-1 allele and aggressive human primary breast carcinomas. *Cancer Res.* 1986 Sep;46(9):4776-81

Trepicchio WL, Krontiris TG. Members of the rel/NF-kappa B family of transcriptional regulatory proteins bind the HRAS1 minisatellite DNA sequence.

Nucleic Acids Res. 1992 May 25; 20(10): 2427- 34

Uziel, T.; Savitsky, K.; Platzer, M.; Ziv, Y.; Helbitz, T.; Nehls, M.; Boehm, T.; Rosenthal, A.; Shiloh, Y.; Rotman, G.: Genomic organization of the ATM gene. *Genomics* 1996 33: 317- 320

Vorechovsky I, Luo L, Dyer MJ, Catovsky D, Amlot PL, Yaxley JC, Foroni L, Hammarstrom L, Webster AD, Yuille MA. Clustering of missense mutations in the ataxia-telangiectasia gene in a sporadic T-cell leukaemia. *Nat Genet.* 1997 Sep; 17(1): 96- 9

Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Dec 24; 93(26): 15335- 40

Weitzel JN, Ding S, Larson GP, Nelson RA, Goodman A, Grendys EC, Ball HG, Krontiris TG. The HRAS1 minisatellite locus and risk of ovarian cancer. *Cancer Res.* 2000 Jan 15;60(2):259-61.

Xing J, Ginty DD, Greenberg ME. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 1996 Aug 16; 273(5277): 959- 63

Yanagisawa A, Ohtake K, Ohashi K, Hori M, Kitagawa T, Sugano H, Kato Y. Frequent c-Ki-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res.* 1993 Mar 1; 53(5): 953- 6

Zachos G, Varras M, Koffa M, Ergazaki M, Spandidos DA. The association of the H-ras oncogene and steroid hormone receptors in gynaecological cancer. *J Exp Ther Oncol.* 1996 Nov; 1(6): 335- 41.

Review

Zachos G, Spandidos DA. Transcriptional regulation of the c-H-ras1 gene by the P53 protein is implicated in the development of human endometrial and ovarian tumours. *Oncogene* 1998 Jun 11;16(23): 3013- 7

Zakut-Houri R, Bienz-Tadmor B, Givol D, Oren M. Human p53 cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. *EMBO J* 1985 May; 4(5): 1251- 5

