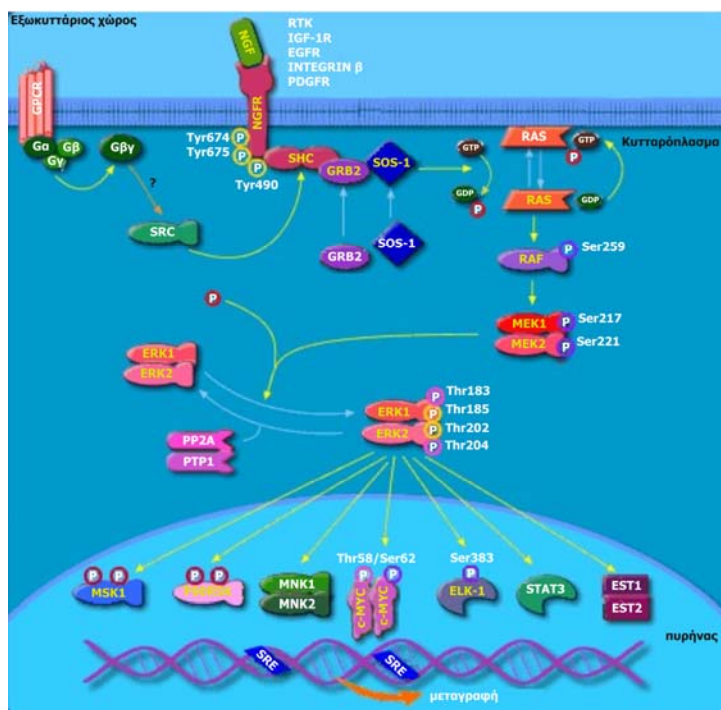




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ
(Διευθυντής: Καθηγητής Δ. Α. Σπαντίδος)

ΖΑΡΑΒΙΝΟΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ

ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ RAS ΚΑΙ BRAF ΚΑΘΩΣ
ΚΑΙ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ DNA ΙΩΝ ΣΕ ΡΙΝΙΚΟΥΣ ΠΟΛΥΠΟΔΕΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2008

Στην οικογένεια μου

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ:

ΕΠΩΝΥΜΟ: Ζαραβίνος
ΟΝΟΜΑ: Απόστολος
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ: Σταύρος
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 14/11/1982
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: Τρίπολη Αρκαδίας
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: Άγαμος
ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ: Ελληνική
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: Καραϊσκάκη 28, Τ.Κ. 22100, Τρίπολη Αρκαδίας
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: 2810 259424, 6978660185
E-MAIL: bio885@edu.biology.uoc.gr

ΣΠΟΥΔΕΣ:

Μέση εκπαίδευση

2000 3^ο Ενιαίο Λύκειο Τρίπολης Βαθμός: 18.9/11 (άριστα)

Ανώτερη εκπαίδευση

2000-2005 Πτυχίο Τμήματος Βιολογίας, Σχολής Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Βαθμός Πτυχίου: 7.04 (Λίαν καλώς)

2003-2004 Τμήμα Βιολογίας, Universitat de Barcelona, Spain (Erasmus-Socrates)

2005- Έναρξη εκπόνησης Διδακτορικής διατριβής, με τίτλο "Μεταλλαγές και έκφραση των ογκογονιδίων *ras* και *BRAF* καθώς και αναζήτηση DNA ιών σε ρινικούς πολύποδες του ανθρώπου". Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας (Επιβλέπων Καθηγητής: Δ. Α. Σπαντίδος), Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ/ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

2003, Εργαστηριακή πρακτική άσκηση. “Το σύνδρομο *fraser* και ο φαινότυπος *blebbed* που προκαλείται στα ποντίκια από μεταλλαγές στο γονίδιο *Fras1*” (Πρόγραμμα ΕΠΕΑΕΚ). Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας (Επιβλέπων Καθηγητής: Γ. Χαλεπάκης), Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

2004, Φιλοξενούμενος ερευνητής στο Laboratori de Neurobiologia Cellular i Molecular, Department of Pathology and Experimental Therapies, Institute of Biomedicine Investigations, Universitat de Barcelona, Campus de Bellvitge, L’Hospitalet de Llobregat, Spain. Ερευνητική εργασία στη μελέτη της λειτουργικής σημασίας των ομόλογων ισομορφών των γονιδίων *synaptobrevin/VAMP 1* και *synaptobrevin/VAMP 2* στον εγκέφαλο του ποντικού (Επιβλέποντες, Dr Adriana Raptis και Καθηγητής Dr Juan Blasi).

2004, Παρακολούθηση Τεχνικών Σεμιναρίων Εργαστηριακής Βιολογίας στο Department de Biologia Cellular i Anatomia Patologica (Επιβλέποντες Καθηγητές: Dr Juan Blasi, Dpt Biologia Cellular y Anatomia Patologica; Dr Jose Garcia Valero, Dpt Biologia Celular).

2004-2005, Διπλωματική εργασία. “Απομόνωση και περιοριστική χαρτογράφηση τμήματος του γενωμικού DNA του γονιδίου *Frem3* στον ποντικό”. Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας (Επιβλέπων Καθηγητής: Γ. Χαλεπάκης), Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

2005-2008, Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής, “Μεταλλαγές και έκφραση των ογκογονιδίων *ras* και *BRAF* καθώς και αναζήτηση DNA ιών σε ρινικούς πολύποδες του ανθρώπου”. Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας (Επιβλέπων Καθηγητής: Δ. Α. Σπαντίδος), Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

2005-2008, Συμμετοχή στο πρόγραμμα με KA847 του ειδικού λογαριασμού κονδυλίων έρευνας του Πανεπιστημίου Κρήτης στο έργο «Ανίχνευση ιών με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR)».

ΜΕΛΟΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΟΡΓΑΝΩΣΕΙΣ:

2005-2008 European Association for Cancer Research (EACR)

2007-2008 European Society for Clinical Virology (ESCV)

2008 European Tissue Culture Society (ETCS)

ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

2005 Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων "10th World Congress on Advances in Oncology" και "8th International Symposium on Molecular Medicine", Οκτώβριος 2005, Χερσόνησος, Κρήτη.

2006 Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων "11th World Congress on Advances in Oncology" και "9th International Symposium on Molecular Medicine", Οκτώβριος 2006, Χερσόνησος, Κρήτη.

2007 Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων "12th World Congress on Advances in Oncology" και "10th International Symposium on Molecular Medicine", Οκτώβριος 2007, Χερσόνησος, Κρήτη.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

- 1) Γερμανάκης Α, Κληρονόμος Ε, Πατρωνίδου Α, Γαλατσάνος Α, Παπαδάκη Α, Τράνακα Ε, Κανέλλου Π, Σαλούστρος Ηλίας, Σπυριδάκη Ε και **Ζαραβίνος Α.** Mollaret's Μηνιγγίτις από HSV τύπου 1. 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εσωτερικής Παθολογίας, Οκτώβριος, 2006.
- 2) **Ζαραβίνος Απόστολος**¹, Δημητροπούλου Παναγιώτα¹, Σούφλα Γιαννούλα, Μπαριτάκη Σταυρούλα, Κουρεπίνη Ευαγγελία, Σπαντίδος Δ.Α. Ανίχνευση των ερπητοϊών HSV, CMV, EBV και VZV σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με συμπτώματα εγκεφαλίτιδας με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR). 3^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Υγιεινής, Αθήνα, Φεβρουάριος 2007 (¹, ισότιμη συνεισφορά).
- 3) Δημητροπούλου Παναγιώτα¹, **Ζαραβίνος Απόστολος**¹, Σούφλα Γιαννούλα, Μπαριτάκη Σταυρούλα, Κουρεπίνη Ευαγγελία, Σηφάκης Σταύρος, Σπαντίδος Δ.Α. Ανίχνευση και τυποποίηση του ιού HPV σε τραχηλικό κυτταρολογικό υλικό γυναικών της Κρήτης με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με

πολυμεράση (PCR). 3^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Υγιεινής, Αθήνα, Φεβρουάριος 2007 (¹, ισότιμη συνεισφορά).

- 4) **Ζαραβίνος Απόστολος** (ομιλία). Έλεγχος της διαφορικής έκφρασης των ογκογονιδίων *ras* και BRAF, των κυριότερων αγγειογενετικών παραγόντων VEGFA, TGFβ1, IGF, FGF2, EGF και του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53 σε ρινικούς πολύποδες του ανθρώπου. 1^η Ημερίδα χρηστών Συστημάτων Real-Time qPCR του οίκου Stratagene, Ινστιτούτο Pasteur, Αθήνα, Μάρτιος 2007.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

- 1) **Apostolos S. Zaravinos**, John Bizakis, Giannoula Soufla, George Sourvinos, Demetrios A. Spandidos. Mutation and expression analysis of the *ras* family genes in human nasal polyposis using real-time PCR assay. "11th World Congress on Advances in Oncology" and "9th International Symposium on Molecular Medicine", 2006, Hersonissos, Crete, Greece.
- 2) Emmanouil K. Symvoulakis, **Apostolos Zaravinos**, Dimitrios Panutsopoulos, Odysseas Zoras, Efstathios Papalambros, Fragiska Sigala and Demetrios A. Spandidos. Highly conserved sequence of exon 15 BRAF gene among greek patients with colorectal cancer. "11th World Congress on Advances in Oncology" and "9th International Symposium on Molecular Medicine", October 2006, Hersonissos, Crete, Greece.
- 3) **Apostolos Zaravinos**, John Bizakis, Giannoula Soufla, George Sourvinos, Demetrios A. Spandidos. The activated RAS family genes play a potential key role to the development of nasal polyps and to the hypertrophy of their adjacent turbinates. "12th World Congress on Advances in Oncology" and "10th International Symposium on Molecular Medicine", October 2007, Hersonissos, Crete, Greece.
- 4) **Apostolos Zaravinos**, John Bizakis, Demetrios A. Spandidos. mRNA expression of genes BRAF and RKIP, as well as mutation analysis of BRAF exons 14 and 15 in human nasal polyposis. "12th World Congress on Advances in Oncology" and "10th International Symposium on Molecular Medicine", October 2007, Hersonissos, Crete, Greece.
- 5) **Apostolos Zaravinos**, Giannoula Soufla, John Bizakis, Yannis Hajioanou, Demetrios A. Spandidos. Expression analysis of VEGFA, FGF2, TGFβ1, EGF and IGF1 in human nasal polyposis. "12th World Congress on Advances in

Oncology” and “10th International Symposium on Molecular Medicine”, October 2007, Hersonissos, Crete, Greece.

- 6) Kanellou P, **Zaravinos A**, Zioga M, Stratigos A, Zoras O and Spandidos DA. Expression analysis of the p14^{ARF}, p15^{INK4b} and p16^{INK4a} genes in patients with actinic keratosis and non-melanoma skin cancers. “12th World Congress on Advances in Oncology” and “10th International Symposium on Molecular Medicine”, October 2007, Hersonissos, Crete, Greece.
- 7) Boulalas I, **Zaravinos A**, Karyotis I, Delakas D, Spandidos D A. Absence of BRAF mutations in urinary bladder cancer. Panhellenic Urological Congress, 1-5/10/2008 Chlakidiki, Greece (abstract submitted).
- 8) Boulalas I, **Zaravinos A**, Karyotis I, Delakas D, Spandidos D A. Incidence of the RAS gene mutations in urinary bladder cancer. Panhellenic Urological Congress, 1-5/10/2008 Chlakidiki, Greece (abstract submitted).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ:

- 1) Symvoulakis EK, **Zaravinos A**, Panutsopoulos D, Zoras O, Papalambros E, Sigala F, Spandidos DA. Highly conserved sequence of exon 15 BRAF gene and KRAS codon 12 mutation among Greek patients with colorectal cancer. Int J Biol Markers. 2007 Jan-Mar;22(1):12-8.
- 2) **Zaravinos A**, Bizakis J, Soufla G, Sourvinos G, Spandidos DA. Mutations and differential expression of the ras family genes in human nasal polyposis. Int J Oncol. 2007 Nov;31(5):1051-9.
- 3) **Zaravinos A**, Soufla G, Bizakis J, Spandidos DA. Expression analysis of VEGFA, FGF2, TGFbeta1, EGF and IGF1 in human nasal polyposis. Oncol Rep. 2008 Feb;19(2):385-91.
- 4) **Zaravinos A**, Bizakis J, Spandidos DA. RKIP and BRAF aberrations in human nasal polyps and the adjacent turbinate mucosae. Cancer Lett. 2008 Jun 18;264(2):288-98. Epub 2008 Mar 10.
- 5) Kanellou P, **Zaravinos A**, Zioga M, Stratigos A, Baritaki S, Soufla G, Zoras O, Spandidos DA. Genomic instability, mutations and expression analysis of the tumour suppressor genes p14(ARF), p15(INK4b), p16(INK4a) and p53 in actinic keratosis. Cancer Lett. 2008 Jun 8;264(1):145-61. Epub 2008 Mar 10.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:

- Αγγλικά 1) First Certificate In English.
 2) Certificate of Proficiency in English, The University of Michigan.
- Ισπανικά 1) Diploma de Español como lengua extranjera - Nivel Intermedio.
 2) Diploma de Español como lengua extranjera - Nivel Superior.
- Γαλλικά Βασικές γνώσεις

ΓΝΩΣΕΙΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ:

Λειτουργικό σύστημα MS DOS, Windows, Word, Excel, Power Point, CorelDraw, Internet Explorer, SPSS for Windows.

ΕΠΙΜΟΡΦΩΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ:

- 2006** α) Ημερίδα οργανωμένη από την ΩΡΛ Εταιρία Κρήτης και την ΩΡΛ Κλινική του Γ.Ν. Χανίων με θέμα «Παθήσεις Τραχήλου και Ρινός Παραρρινίων», Γενικό Νοσοκομείο Χανίων, 4 Νοεμβρίου 2006.
 β) 14^ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Χερσόνησος Ηρακλείου Κρήτης, 25-29 Οκτωβρίου 2006.
 γ) 13ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 9-12 Νοεμβρίου 2006.
- 2007** α) 15^ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Χερσόνησος Ηρακλείου Κρήτης, 1-11 Νοεμβρίου 2007.
 β) 3^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας – 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Υγιεινής.
- 2008** α) 1^ο Παγκρήτιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Μαιευτικής-Γυναικολογίας. Παθολογία Κυήσεως – Προγεννητικός Έλεγχος. Ηράκλειο, 12-13 Απριλίου 2008.

Με εκτίμηση,
Απόστολος Σ. Ζαραβίνος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή σχεδιάστηκε και εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας, του τομέα Εργαστηριακής Ιατρικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, στο Ηράκλειο κατά το χρονικό διάστημα 2005-2008.

Με την ολοκλήρωση αυτής της επιστημονικής προσπάθειας αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όσους με βοήθησαν για την ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας. Πρωτίστως, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Δ.Α. Σπαντίδο, τόσο για τις επιστημονικές γνώσεις και εμπειρίες που μου μετέδωσε, όσο και για την εμπιστοσύνη, την ηθική συμπαράσταση, το αμέριστο ενδιαφέρον και την πολύτιμη καθοδήγηση που μου παρείχε καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τα λοιπά μέλη της τριμελούς επιτροπής αυτής της διατριβής: ιδιαίτερα τον Επ. Καθηγητή κ. Γ. Σουρβίνο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στο ξεκίνημα της προσπάθειάς μου, το αδιάλειπτο ενδιαφέρον του, αλλά κυρίως για την επιστημονική και ψυχολογική υποστήριξη, όποτε κι αν χρειάστηκε κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, καθώς επίσης και τον Αν. Καθηγητή κ. Ι. Μπιζάκη για την άριστη συνεργασία του, την εξαιρετική προθυμία του, την ενθάρρυνση και τις πολύτιμες συμβουλές και προτροπές του. Ευχαριστώ επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, Καθηγητές κ. Γ. Σαμώνη και κ. Η. Κραμποβίτη, και τους Επίκουρους Καθηγητές κ. Α. Ζαφειρόπουλο και κ. Χ. Τσατσάνη για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Για την άριστη συνεργασία και τη φιλία τους θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Διδάκτορες Π. Κανέλου, Ν. Σουλιτζή, Ε. Λατσούδη, Γ. Σούφλα, Σ. Αποστολάκη, Σ. Μπαριτάκη, Φ. Πορίχη και τους υποψήφιους διδάκτορες Χ. Φιλιππάκη, Κ. Δημητροπούλου, Ε. Νεοφύτου, Ν. Γουλιδάκη, Κ. Βογιατζή, Ρ. Λυμπουρίδου, Β. Μπαλή, Ξ. Κατζόλη, Γ. Σιακαλή και Α Μώρου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογενειά μου για την αμέριστη αγάπη τους, και την στήριξη τους στην προσπάθεια μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παρόλο που είναι αρκετά καθιερωμένη η συνεισφορά των ογκογονιδίων *ras* στην καρκινογένεση, είτε μέσω της συσσώρευσης σε αυτά μεταλλαγών, είτε μέσω της μη φυσιολογικής τους έκφρασης σε έναν μεγάλο αριθμό καρκίνων του ανθρώπου, λίγα είναι γνωστά όσο αναφορά τον ρόλο τους στους ρινικούς πολύποδες του ανθρώπου (NPs). Επίσης, λίγα είναι γνωστά για την έκφραση των γονιδίων BRAF και RKIP, ή για την ύπαρξη πιθανών BRAF μεταλλαγών, στον σχηματισμό των ρινικών πολυπόδων, όπως και για την παρουσία ιών με την εμφάνισή τους.

Στην παρούσα μελέτη, ερευνήθηκε η εμφάνιση μεταλλαγών στα κωδικόνια 11, 12 και 13 της οικογένειας των γονιδίων *ras*, με τεχνικές PCR/RFLP και άμεση αλληλούχιση, σε 23 NPs και τις παρακείμενες σε αυτούς ρινικές κόγχες (κάτω και μέσες) [Control Inferior Turbinates (CIT) και Control Middle Turbinates (CMT)], καθώς επίσης και σε ρινικές κόγχες από 13 φυσιολογικά άτομα (CIT και CMT). Επιπλέον, μελετήθηκε το προφίλ της έκφρασης των ογκογονιδίων *ras* στο επίπεδο του mRNA στους ρινικούς πολύποδες, και συγκρίθηκε με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης στις παρακείμενες και φυσιολογικές ρινικές κόγχες. Όσο αναφορά το δεύτερο κομμάτι της μελέτης αυτής, καθορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων BRAF και RKIP, και μελετήθηκε η συχνότητα εμφάνισης BRAF μεταλλαγών, στα εξόνια 11, 14 και 15, στους ρινικούς πολύποδες και στις παρακείμενες αλλά και φυσιολογικές ρινικές κόγχες. Αναλύσαμε 24 δείγματα ρινικών πολυπόδων και τις παρακείμενες κάτω και μέσες ρινικές τους κόγχες (AIT και AMT), καθώς επίσης και 14 φυσιολογικά άτομα [συνολικά 14 φυσιολογικές κάτω ρινικές κόγχες και 14 φυσιολογικές μέσες ρινικές κόγχες. Το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων BRAF και RKIP αποκτήθηκε με την τεχνική *real-time* RT-PCR. Επίσης, χρησιμοποιήσαμε *real-time* allele-specific PCR, σε συνδυασμό με άμεση αλληλούχιση, για να εντοπίσουμε την συχνότητα της μεταλλαγής V600E στο εξόνιο 15, και για να εξετάσουμε την ύπαρξη μεταλλαγών στα εξόνια 11 και 14. Η μελέτη της ύπαρξης του ιού του θηλώματος HPV, και των ερπητοϊών EBV και HSV, καθώς επίσης και η συσχέτισή τους με την εμφάνιση ρινικών πολυπόδων, έγινε με ειδικούς εκκινητές χρησιμοποιώντας PCR, αφού προηγουμένως επιβεβαιώθηκε η παρουσία DNA με εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο της β2-μικροσφαιρίνης.

Εντοπίσαμε μεταλλαγές στα κωδικόνια 11 και 12 του *K-ras* στους NPs, σε ποσοστά 17 και 35%, αντίστοιχα, ενώ επίσης εντοπίστηκαν στις παρακείμενες κάτω ρινικές κόγχες (AIT) (22 και 16%, αντίστοιχα) και τις παρακείμενες μέσες ρινικές

κόγχες (AMT) (16 και 26%, αντίστοιχα). Τα επίπεδα έκφρασης των K- και H-*ras*, ήταν αυξημένα, ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA του N-*ras* ευρέθησαν να είναι χαμηλότερα στους NPs και τις παρακείμενες ρινικές κόγχες, σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Τα επίπεδα mRNA του K-*ras* ήταν αυξημένα στους ρινικούς πολύποδες προχωρημένου σταδίου ($P=0.037$), ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα του N-*ras* ευρέθησαν να είναι αυξημένα στους μικρού μεγέθους πολύποδες ($P=0.046$). Επίσης προέκυψαν στατιστικά σημαντικές αρνητικές συσχετίσεις ανάμεσα στα προφίλ έκφρασης των K- και N-*ras*, στους NPs και τις AITs ($P=0.009$ και $P=0.003$, αντίστοιχα). Σχετικά με το δεύτερο κομμάτι της μελέτης μας, τα αποτελέσματά είχαν ως εξής: Ο βλεννογόνος από τις φυσιολογικές κόγχες παρουσίασε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα mRNA και για τα δυο γονίδια, σε σχέση με τους NP και τις AIT-AMT. Επίσης, στους NP, τις AIT και AMT, το RKIP βρέθηκε να παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα mRNA, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές του γονιδίου BRAF ($P=0.003$ στους NP; $P<0.001$ σε AIT και AMT). Δεν εντοπίστηκε καμία μεταλλαγή στο εξόνιο 14, ενώ παρατηρήθηκε μια σιωπηλή μεταλλαγή (A1380G, G460G) για ένα δείγμα NP στο εξόνιο 11. Ένα άλλο δείγμα πολύποδα βρέθηκε να φέρει δύο μεταλλαγές, μια T1799A (V600E) και μια A1801G (K601E). Επίσης παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση για τα δύο γονίδια, στους ρινικούς πολύποδες ($P=0.012$) και τις παρακείμενες κάτω ρινικές κόγχες ($P=0.019$). Αναφορικά με τη μελέτη της ύπαρξης ιών, τρία δείγματα ρινικών πολυπόδων (3/23, 13%), και ένα δείγμα για κάθε παρακείμενη ρινική κόγχη [AIT, 1/23 (4%); AMT, 1/12 (4%)], βρέθηκαν θετικά για τον ιό HPV, ωστόσο δεν αναγνωρίστηκε κανένα ογκογόνο στέλεχος (HPV-11, 16, -18, -33). Οκτώ δείγματα ρινικών πολυπόδων (8/23, 35%) ήταν θετικά για τον ιό EBV, και δύο δείγματα (2/23, 8%) ήταν θετικά για τον ιό HSV αντίστοιχα, ενώ καμία παρακείμενη ρινική κόγχη δεν ήταν θετική για την ύπαρξη κανενός από τους δύο τύπους ιών. Όλες οι φυσιολογικές ρινικές κόγχες ήταν επίσης αρνητικές για την ύπαρξη των ιών HPV, EBV και HSV.

Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη αναφορά πάνω σε μεταλλαγές των ογκογονιδίων *ras* και της ανάλυσης της έκφρασής τους, στους ρινικούς πολύποδες του ανθρώπου. Τα ευρήματά μας προτείνουν ένα πιθανό ρόλο κλειδί για τα ενεργοποιημένα μέλη της οικογένειας των γονιδίων *ras*, στα πλαίσια της συνεισφοράς τους στην εξέλιξη των NPs, καθώς επίσης και στην υπερτροφία των παρακείμενων ρινικών κογχών. Τα συμπεράσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων RKIP και BRAF, αντικατοπτρίζουν την ισχυρή συσχέτιση που υπάρχει ανάμεσα τους. Το RKIP θα μπορούσε να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην μείωση της έκφρασης του αγρίου

τύπου BRAF, δρώντας έτσι ως ενδογενής αναστολέας του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK στους ρινικούς πολύποδες και στον βλεννογόνο των παρακείμενων σε αυτούς ρινικών κογχών. Τα δεδομένα της μελέτης για την ύπαρξη ιών σε ρινικούς πολύποδες, επιβεβαιώνουν την υπόθεση ότι ο ιός HPV δεν συνδέεται συχνά με την εμφάνιση ρινοκολπικών πολυπόδων, και συσχετίζεται σε μικρότερο βαθμό με μολυσματικές βλάβες του βλεννογόνου, παρά με πολλαπλασιαστικές βλάβες. Αναφορικά με τον ιό EBV, το ποσοστό μόλυνσης δείχνει πως ο ρινικός βλεννογόνος ίσως να είναι από τα σημεία επιμονής του ιού EBV, και μπορεί να ευθύνεται για την εμφάνιση ρινικών όγκων που συσχετίζονται με ιούς, ενώ ο HSV δεν φαίνεται να εμπλέκεται στον σχηματισμό των ρινικών πολυπόδων.

ABSTRACT

Although it is well established that *ras* genes contribute to tumourigenesis either through the accumulation of mutations or by aberrant expression in a wide range of human cancers, little is known regarding their involvement in human nasal polyps (NPs). Moreover, little is known about the implication of BRAF and RKIP expression, or about the incidence of BRAF mutations, as well as about the presence of viral DNA in the formation of nasal polyps.

In the present study, the occurrence of mutations in codons 11, 12 and 13 of the *ras* family genes was examined by PCR/RFLP and direct sequencing in 23 human NPs and their adjacent turbinates [Control Inferior Turbinates (CIT) and Control Middle Turbinates (CMT)], as well as in turbinates from 13 control subjects (CIT and CMT). Moreover, the expression pattern of *ras* mRNA levels was assessed in NP specimens and compared to adjacent and control tissues. Regarding the second part of this study, we determined the expression levels of the genes BRAF and RKIP, and inspected the frequency of BRAF mutations in exons 11, 14 and 15 in the nasal polyps and their adjacent and control turbinates. We analysed 24 NPs and their adjacent turbinates (CIT and CMT), as well as 14 CITs and 14 CMTs. The expression pattern of BRAF and RKIP was assessed with real-time RT-PCR. A real-time allele-specific PCR method, in combination with direct sequencing, was performed in order to inspect the frequency of the V600E mutation in exon 15, and to examine mutation status within exons 11 and 14. The presence of amplifiable DNA was confirmed with β 2-microglobulin primers, and the HPV, EBV and HSV viral DNA detection was performed with specific primer sets, using PCR.

K-*ras* codon 11 and 12 mutations were detected in 17 and 35% of NPs, respectively, and were found in the adjacent inferior turbinate (AIT) (22 and 16%, respectively) and adjacent middle turbinates (AMT) (16 and 26%, respectively). K- and H-*ras* expression levels were elevated, whereas N-*ras* mRNA levels were lower in NPs and adjacent turbinates as compared to the control tissues. K-*ras* mRNA levels were up-regulated in advanced-stage polyps ($P=0.037$), while N-*ras* levels were found elevated in small polyps ($P=0.046$). Statistically significant negative correlations between K- and N-*ras* expression profiles arose in NPs and AITs ($P=0.009$ and 0.003 , respectively). Regarding the second part of our study, our results were as follows: The control mucosae presented significantly higher mRNA levels for both genes, compared to the NP and the AIT-AMT. Moreover, in NP, AIT and AMT, RKIP was found to

present higher mRNA levels, in relation to the equivalent values of the BRAF gene ($P = 0.003$ in NP; $P < 0.001$ both in AIT and AMT). No mutation was detected in exon 14, whereas a silent mutation (A1380G, G460G) was noted for one NP sample in exon 11. Another NP sample was found to carry two mutations, one T1799A (V600E) and one A1801G (K601E). A significant co-expression of the two genes was noted in NP ($P = 0.012$) and AIT ($P = 0.019$). Regarding the viral DNA detection, three NP samples (3/23, 13%) and one sample from each adjacent turbinate [AIT, 123 (4%); AMT, 1/12 (4%)] were found to be positive for the HPV virus, yet no oncogenic type (HPV-11, 16, -18, -33) was recognized. Eight NP samples (8/23, 35%) were EBV positive, and two NP samples (2/23, 8%) were HSV positive, respectively. No adjacent turbinate was positive for the presence of neither of these two herpes viruses. Moreover, all the control turbinates were also found to be negative for the presence of the HPV, EBV and HSV viruses.

This, to our knowledge, is the first report on *ras* mutations and expression analysis in NPs. Our findings suggest a potential key role for activated members of *ras* family genes in terms of their contribution to the development of NPs as well as to the hypertrophy of adjacent turbinates. The results of the expression levels of RKIP and BRAF, reflect the strong connection between the two genes. RKIP could play an important role in the down-regulation of wild-type BRAF, serving thus as an endogenous inhibitor of the MAPK pathway in nasal polyps and their adjacent turbinate mucosa. The results upon the presence of viral DNA in the nasal polyps, confirm the hypothesis that HPV is not frequently associated with sinonasal polyposis, and it is correlated to a lesser extent to infectious mucosal lesions, than to proliferative lesions. Regarding EBV, the percentage of infection shows that nasal mucosa could be one of the sites of persistence of the virus, and there's a possibility that it is responsible for presence of viral-associated nasal tumors, whereas, HSV does not seem to be implicated in the development of nasal polyps.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	i
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	vii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	viii
ABSTRACT	xi
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	xiii

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Σελίδα

Μοριακή ογκολογία

1.1. Ογκογονίδια	1
1.1.1. Τα ογκογονίδια αποτελούν συντηρητικές περιοχές στο DNA	1
1.1.2. Δράση και κατηγορίες ογκογονιδίων	2
1.1.3. Ογκογονίδια και κυτταρικός κύκλος	6
1.1.4. Ογκογονίδια και απόπτωση	8
1.2. Ογκοκατασταλτικά γονίδια	8
1.2.1. Διερεύνηση και ταυτοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων	10
1.2.2. Λειτουργία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων	11
1.2.3. Χαρακτηρισμός υποψήφιων ογκοκατασταλτικών γονιδίων	12
1.3. Μεταλλακτικά γονίδια	13
1.4. Η πολυσταδιακή φύση του καρκίνου	14
1.5. Ογκογόνοι ιοί	16
1.5.1. DNA ογκογόνοι ιοί	17
1.5.2. Ρετροϊοί	17
1.6. Χημικά και φυσικά καρκινογόνα	17

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Τα γονίδια *ras*

2.1. Δομή των γονιδίων <i>ras</i>	19
2.2. Πρωτεΐνες <i>ras</i>	22
2.2.1. Δομή των πρωτεϊνών <i>ras</i>	22
2.2.2. Έκφραση των πρωτεϊνών <i>ras</i>	23
2.2.3. Υποκυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών <i>ras</i>	23
2.2.4. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών <i>ras</i>	24
2.2.5. Βιοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών <i>ras</i>	24

	Σελίδα
2.2.6. Ογκοκατασταλτική δράση των αγρίου τύπου γονιδίων <i>ras</i>	26
2.2.7. Συμμετοχή των γονιδίων <i>ras</i> στην απόπτωση	29
2.2.8. Ενεργοποίηση των γονιδίων <i>ras</i>	30
2.2.8.1. Μεταλλάξεις των <i>ras</i>	30
2.2.8.2. Υπερέκφραση των <i>ras</i>	32
2.3. Λειτουργικός ρόλος των <i>ras</i>	33
2.4. Οδοί μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται από τα <i>ras</i>	34
2.5. Η συνεργική δράση των γονιδίων	36

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Τα γονίδια Raf

3.1. Εισαγωγή	37
3.2. Πρωτεΐνες Raf και νεοπλασματικές νόσοι	38
3.2.1. Πρωτεΐνες Raf ως επιτελείς των ογκογονιδίων Ras σε ανθρώπινες νεοπλασίες	38
3.2.2. <i>B-Raf</i> μεταλλάξεις σε ανθρώπινους όγκους	39
3.3. Έκφραση των πρωτεϊνών Raf	43
3.4. Δομή των πρωτεϊνών Raf και μηχανισμοί αλλαγής στον καρκίνο	45
3.5. Ρύθμιση της ενεργότητας της Raf κινάσης	49
3.5.1. Σύνδεση με την Ras	49
3.5.2. Φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση	51
3.5.3. Οι πρωτεΐνες Raf ως συστατικά σύμπλοκων μοριακών μονοπατιών	54
3.6. Ένα μοντέλο για την ενεργοποίηση της B-Raf	54
3.7. Η B-Raf είναι ο σημαντικός φυσιολογικός ενεργοποιητής των MEK	55
3.8. Αντικαρκινική θεραπεία στοχεύοντας τις Raf πρωτεΐνες	56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Η πρωτεΐνη αναστολέας της Raf Κινάσης (RKIP)

4.1. Εισαγωγή – Δομή της RKIP	59
4.2. Εντοπισμός της RKIP	60
4.3. Λειτουργία της RKIP	60
4.4. RKIP και ενδοκυττάρια σηματοδότηση	61
4.5. Η RKIP ως αναστολέας της μετάστασης	64

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**Ο ιός του θηλώματος του ανθρώπου (HPV)**

5.1. Γενικά	67
5.2. Δομή των ιικών σωματιδίων και ταξινόμηση	68
5.2.1. Ιικά σωματίδια	68
5.2.2. Δομή και ρύθμιση του ιικού γενώματος	68
5.3. Ονοματολογία και ταξινόμηση	70
5.4. Λειτουργίες των ιικών πρωτεϊνών E6 και E7	71
5.4.1. E6 πρωτεΐνη	71
5.4.2. E7 πρωτεΐνη	72
5.5. Λειτουργίες των ιικών πρωτεϊνών E1, E2, E4 και E5	73

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6**Ερπητοϊοί**

6.1. Εισαγωγή	75
6.2. Οι ιοί του απλού έρπητα HSV-1 και HSV-2	77
6.2.1. Κλινική εικόνα	79
6.2.2. Διάγνωση και θεραπεία	80
6.3. Ο ιός Epstein-Barr (EBV)	81
6.3.1. Γενικά	81
6.3.2. Κλινική εικόνα	83
6.3.3. Διάγνωση και θεραπεία	83

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7**Ρινικοί πολύποδες**

7.1. Εισαγωγή	85
7.2. Ιστορία των ρινικών πολυπόδων	86
7.2.1. Επιδημιολογία - Η επικράτηση των ρινικών πολυπόδων	87
7.2.2. Ρινικοί πολύποδες, άσθμα και δυσανεξία στην ασπιρίνη	88
7.3. Κλινική εικόνα και διάγνωση	88
7.3.1. Κλινικά συμπτώματα και επιπλοκές	88
7.3.2. Επανεμφάνιση των ρινικών πολυπόδων	90
7.3.3. Απώλεια της όσφρησης	91
7.3.4. Η διάγνωση των ρινικών πολυπόδων	92

	Σελίδα
7.3.4.1. Κλινική εξέταση	92
7.3.4.2. Απεικονιστικές μέθοδοι	93
7.3.5. Ιστολογικά ευρήματα	93
7.3.5.1. Οιδηματώδεις ηωσινοφιλικοί πολύποδες	94
7.3.5.2. Άλλοι τύποι πολυπόδων	94
7.3.6. Αιτιολογία των ρινικών πολυπόδων	94
7.3.6.1. Αλλεργία	95
7.3.6.2. Μολύνσεις	95
7.3.7. Ασθένειες που συσχετίζονται με τη ρινική πολυποδίαση	97
7.3.8. Παθογένεση των ρινικών πολυπόδων	100
7.3.9. Χημικοί μεταβιβαστές	101
7.3.10. Αντιμετώπιση των ρινικών πολυπόδων	101
7.3.10.1. Φαρμακευτική αντιμετώπιση	102
7.3.10.2. Χειρουργική αντιμετώπιση	104

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Σκοπός της μελέτης αυτής	106
---------------------------------	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

Μέθοδοι και Υλικά

9.1. Ασθενείς και φυσιολογικά άτομα	107
9.2. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από συμπαγείς ιστούς	109
9.3. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	110
9.3.1. Η βασική αρχή λειτουργίας του PCR	110
9.3.2. Συνθήκες αντιδράσεων PCR και εκκινήτες	113
9.4. Ηλεκτροφόρηση του DNA και των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης	117
9.5. Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)	117
9.6. Άμεση αλληλούχιση DNA	121
9.7. Απομόνωση RNA και αντίστροφη μεταγραφή	123
9.8. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR)	123
9.9. Εντοπισμός της μεταλλαγής BRAF V600E	126
9.10. Στατιστική ανάλυση	127
9.11. Διαλύματα	128

	Σελίδα
9.11.1. Διαλύματα απομόνωσης DNA και RNA	128
9.11.2. Ηλεκτροφορητικά διαλύματα	128
9.12. Ένζυμα	128
9.13. Υλικά και εταιρείες προέλευσης	129
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10	
Αποτελέσματα	
10.1. Μεταλλαγές και επίπεδα έκφρασης των γονιδίων <i>ras</i>	130
10.1.1. Ανάλυση των <i>ras</i> μεταλλαγών	130
10.1.2. Επίπεδα έκφρασης	133
10.2. Τα επίπεδα της έκφρασης των γονιδίων <i>ras</i> σε σύγκριση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά	137
10.3. Ανάλυση της mRNA έκφρασης των γονιδίων <i>ras</i> ανά ζεύγη	138
10.4. Μεταλλαγές και επίπεδα έκφρασης του γονιδίου BRAF	139
10.4.1. Ανάλυση μεταλλαγών στο γονίδιο BRAF	139
10.4.2. Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων BRAF και RKIP	143
10.5. Ανίχνευση των ιών HPV, EBV και HSV σε ρινικούς πολύποδες	145
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11	
Συζήτηση-Συμπεράσματα	
11.1. Εισαγωγή- Ras γονίδια	147
11.2. <i>Ras</i> μεταλλαγές στους ρινικούς πολύποδες	146
11.3. Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων <i>ras</i>	149
11.4. Συμπεράσματα – Ras	150
11.5. Εισαγωγή- BRAF και RKIP	151
11.6. BRAF μεταλλαγές στους ρινικούς πολύποδες	152
11.7. Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων BRAF και RKIP	153
11.8. Συμπεράσματα - BRAF και RKIP	154
11.9. Ανίχνευση των ιών HPV, EBV και HSV σε ρινικούς πολύποδες	154
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12	
Βιβλιογραφία	158
Παράρτημα	172
Δημοσιευμένες Εργασίες	173

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Μοριακή ογκολογία

Από τις αρχές του 20ου αιώνα φάνηκε με τη βοήθεια του μικροσκοπίου, ότι τα χρωματοσώματα των καρκινικών κυττάρων είχαν συχνά ανώμαλο μέγεθος και σχήμα, συγκρινόμενα με αυτά των φυσιολογικών κυττάρων. Όμως η ιδέα ότι ο καρκίνος μπορεί να οφείλεται σε βλάβη του γενετικού υλικού εμφανίστηκε νωρίτερα, στις αρχές περίπου του 19^{ου} αιώνα, όταν παρατηρήθηκε ότι μερικές οικογένειες εμφάνιζαν προδιάθεση για ανάπτυξη καρκίνου ¹. Από τότε και ιδίως την τελευταία 20ετία, έχει γίνει μεγάλη πρόοδος όσον αφορά τη μελέτη της βιολογικής συμπεριφοράς του καρκίνου. Έχουν απομονωθεί τρεις βασικές κατηγορίες γονιδίων που φαίνεται να εμπλέκονται στην καρκινογένεση: τα ογκογονίδια, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και τα μεταλλακτικά γονίδια.

1.1. Ογκογονίδια

Η σκέψη ότι υπάρχουν γονίδια ικανά να προκαλέσουν καρκίνο, βασίστηκε σε μελέτες που έδειχναν ότι κάποια νεοπλάσματα μπορούσαν να μεταμφυτευθούν σε ζώα ². Τα ογκογονίδια αρχικά απομονώθηκαν από ιούς (v-onc) ικανούς να μετασχηματίσουν κύτταρα *in vitro*, ή να προκαλέσουν όγκους σε ζώα. Κλωνοποιήθηκε πρώτα το ογκογονίδιο v-src από τον ιό του σαρκώματος Rous που προσβάλλει τα πουλερικά. Αργότερα βρέθηκε ότι στο γονιδίωμα των πουλερικών αλλά και άλλων σπονδυλωτών υπήρχαν αλληλουχίες DNA παρόμοιες με τον v-src ^{3, 4}. Μελέτη όγκων από ανθρώπους φανέρωσε ότι περιείχαν γονίδια αντίστοιχα με τα ιικά ογκογονίδια. Θεωρήθηκε λοιπόν πιθανό, ότι τα v-onc προέρχονται από φυσιολογικά κυτταρικά γονίδια (πρωτο-ογκογονίδια), που όταν απορρυθμιστούν μετατρέπονται σε ενεργά ογκογονίδια απελευθερώνοντας έτσι το μεταλλακτικό τους δυναμικό. Τα ογκογονίδια ταυτοποιήθηκαν αργότερα, μεταφέροντας DNA από κυτταρικούς κλώνους που προέρχονταν από όγκους ⁵.

1.1.1. Τα ογκογονίδια αποτελούν συντηρητικές περιοχές στο DNA

Το γεγονός ότι αντίστοιχες αλληλουχίες πρωτο-ογκογονιδίων έχουν βρεθεί σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς που έχουν ελεγχθεί μέχρι τώρα, δείχνει ότι οι

πρωτεΐνες που κωδικοποιούν, παίζουν βασικό ρόλο στη λειτουργία των κυττάρων. Υπάρχουν τρεις βασικοί βιοχημικοί οδοί με τους οποίους δρουν τα πρωτο-ογκογονίδια. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά την φωσφορυλίωση πρωτεϊνών σε αμινοξέα σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης ⁶. Οι πρωτεΐνες αυτής της τάξεως μεταφέρουν φωσφορικές ομάδες από το ATP στην πλάγια αλυσίδα των περιοχών αυτών. Η φωσφορυλίωση εξυπηρετεί δύο βασικούς μηχανισμούς στη μετάδοση σήματος. Πρώτον, σε αρκετές περιπτώσεις αλλάζει τη διαμόρφωση ενεργοποιώντας την δράση κινάσης της πρωτεΐνης. Δεύτερον, η φωσφορυλίωση της τυροσίνης δημιουργεί κενές θέσεις πρόσδεσης που κινητοποιούν πρωτεΐνες στόχους, τις οποίες η ενεργοποιημένη κινάση μπορεί να φωσφορυλιώσει. Ως εκ τούτου η φωσφορυλίωση ενδυναμώνει τη μετάβαση σημάτων, μέσα από τη δημιουργία συμπλεγμάτων μορίων που μεταφέρουν μηνύματα μέσα στο κύτταρο στις θέσεις που πρέπει να δράσουν. Ο δεύτερος μηχανισμός με τον οποίο ενεργούν τα πρωτο-ογκογονίδια για να μεταφέρουν μηνύματα, σχετίζεται με τις GTPάσες ^{7, 8}. Τέτοια συμπεριφορά έχουν οι πρωτεΐνες που παράγονται από τα γονίδια της οικογένειας *ras*. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας *ras* λειτουργούν σαν μοριακοί διακόπτες που ανοίγουν και κλείνουν μέσω ενός ρυθμισμένου κύκλου GDP/GTP. Οι πρωτεΐνες *ras* έχουν παρομοιασθεί σαν ενδιάμεσα κλειδιά σε οδούς μεταγωγής σήματος, από τις κινάσες τυροσίνης, προς τις κινάσες σερίνης και θρεονίνης. Ο τρίτος μηχανισμός με τον οποίο δρουν τα πρωτο-ογκογονίδια αναφέρεται σε πρωτεΐνες που εντοπίζονται στον πυρήνα (μεταγραφικοί παράγοντες). Ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την έκφραση των γονιδίων, κωδικοποιούνται από πρωτο-ογκογονίδια, μερικά από τα οποία μπορεί να εμπλέκονται και στον αναδιπλασιασμό του DNA ^{9, 10}. Ως εκ τούτου η απαγκίστρωση των απαιτήσεων μετασχηματισμένων κυττάρων για αυξητικούς παράγοντες, μπορεί να αντικατασταθεί από ένα ενεργοποιημένο ογκογονίδιο, σε πολλαπλά επίπεδα στα μονοπάτια μετάδοσης σημάτων.

1.1.2. Δράση και κατηγορίες ογκογονιδίων

Η απορρύθμιση του πρωτο-ογκογονιδίου και η μετατροπή του σε ενεργό ογκογονίδιο, έχει σαν αποτέλεσμα την έκλυση του κακοήθους δυναμικού του και μπορεί να γίνει με διαφορετικούς μηχανισμούς, όπως είναι οι σημειακές μεταλλάξεις, οι ανακατατάξεις του DNA και η γονιδιακή ενίσχυση του. Αυτοί οι μηχανισμοί έχουν σαν αποτέλεσμα ή την παραγωγή υπερενεργών πρωτεϊνικών παραγώγων, λόγω δομικών ανωμαλιών τους (ποιοτικές μεταβολές), ή/και την παραγωγή μεγαλύτερων από το

φυσιολογικό ποσοτήτων πρωτεϊνών (ποσοτικές μεταβολές), φυσιολογικών όμως δομικά. Και στις δύο περιπτώσεις τα αποτελέσματα είναι ανάλογα. Στον **πίνακα 1** αναφέρονται ογκογονίδια, τα νεοπλάσματα με τα οποία συσχετίζονται, καθώς και ο μηχανισμός ενεργοποίησής τους.

Τα ογκογονίδια λειτουργούν κατά τον επικρατούντα χαρακτήρα, δηλαδή μία μετάλλαξη στο ένα αλληλόμορφο, παρά την παρουσία του άλλου φυσιολογικού αλληλομόρφου, είναι αρκετή και ικανή για να τροποποιήσει την συμπεριφορά του κυττάρου, και να προάγει καρκινικό φαινότυπο. Στην πραγματικότητα αυτό δεν γίνεται ακριβώς έτσι (βλέπε παράγραφο 1.4: η πολυσταδιακή φύση του καρκίνου, και παράγραφο 2.3.7: η συνεργική δράση των γονιδίων). Ανάλογα με τη βιοχημική συμπεριφορά των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα ογκογονίδια και την εντόπιση τους στο κύτταρο, μπορούν να καταταχθούν στις εξής κατηγορίες:

α. Αυξητικοί παράγοντες, όπως το sis ογκογονίδιο που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη που σχετίζεται στενά με τη B αλυσίδα του αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια (platelet-derived growth factor, PDGF). Ανάλογα με τον PDGF και το αντίστοιχο ογκογονίδιο, λειτουργούν ο αυξητικός παράγων των ινοβλαστών (fibroblast growth factor, FGF), ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγων -α (transforming growth factor, TGF-α) και η ιντερλευκίνη -2 και -3 (IL-2 και IL-3). Επίσης ορισμένοι όγκοι φαίνεται ότι εκφράζουν ογκοπρωτεΐνες που προάγουν την αύξηση του ίδιου του όγκου, έχουν δηλαδή αυτοκρινή δραστηριότητα.

β. Υποδοχείς αυξητικών παραγόντων που χωρίζονται σε υποκατηγορίες:

β.1. Υποδοχείς με ιδιότητα κινάσης τυροσίνης. Αυτοί χωρίζονται πάλι σε δύο υποομάδες, σ' αυτούς που εμπεριέχονται μέσα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, όπως ο EGFR (epidermal growth factor receptor) και σ' αυτούς που βρίσκονται μέσα στο κυτταρόπλασμα, αλλά σχετίζονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη, όπως είναι το c-src. Οι κινάσες τυροσίνης ρυθμίζουν θέσεις κλειδιά σε οδούς μεταγωγής σημάτων, ελέγχοντας έτσι το σχήμα του κυττάρου και την ανάπτυξη του. Για το λόγο αυτό η φωσφορυλίωση της τυροσίνης λειτουργεί στιγμιαία σε φυσιολογικά κύτταρα όσο διαρκεί η μετάδοση του σήματος.

β.2. Αυξητικοί παράγοντες που δρουν σαν υποδοχείς, με ικανότητες κινάσης τυροσίνης. Αυτές περιλαμβάνουν υποδοχείς για γνωστούς αυξητικούς παράγοντες, όπως του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor) (v-erbB), του αυξητικού παράγοντα των άωρων μορφών (colony stimulating factor-1

receptor) (v-fms), του αυξητικού παράγοντα των νεύρων (nerve growth factor receptor) (trk), ακόμα οι met, ret και ros. Αυτοί οι υποδοχείς έχουν ένα εξωμεμβρανικό, ένα διαμεμβρανικό και ένα ενδομεμβρανικό σκέλος. Σύνδεση αυξητικών παραγόντων στον έξω υποδοχέα προκαλεί διμερισμό του υποδοχέα και ενεργοποιεί την εσωτερική κινάση τυροσίνης, προκαλώντας την διαμοριακή φωσφορυλίωση όλων των υποδοχέων σε συγκεκριμένες περιοχές τυροσίνης.

β.3. Κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης όπως είναι τα src, fes, fps, fgr, yes και lck. Τα προϊόντα αυτών σχετίζονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη, αλλά δεν είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Η σχέση των κινασών της οικογένειας src με την κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι βασική για την μεταλλακτική τους ικανότητα. Ογκογενετική δραστηριοποίηση αυτών, όπως και των ρετροϊικών αναλόγων, γίνεται με πρόκληση σημειακών μεταλλάξεων ή απαλείψεων. Αυτές οι αλλαγές δημιουργούν ογκοπρωτεΐνες που φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες με υπολείμματα (κατάλοιπα) τυροσίνης με ακανόνιστο όμως τρόπο, προκαλώντας έτσι μια συνεχή μεταγωγή σήματος.

β.4. Κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες-προσαρμοστές. Είναι πρωτεΐνες που δεσμεύουν άλλες πρωτεΐνες, χωρίς όμως να έχουν καταλυτική δραστηριότητα, αλλά επιτρέπουν τη διαβίβαση σημάτων. Στην κατηγορία αυτή ανήκει και το crk. Το προϊόν του ογκογονιδίου crk προκαλεί αύξηση στις φωσφορυλιωμένες από τυροσίνη πρωτεΐνες μέσα στο κύτταρο.

γ. Πρωτεΐνες με δράση GTPάσης. Τέτοιες είναι τα μέλη της οικογένειας των ras: το c-H-ras, το c-K-ras και το N-ras. Στα φυσιολογικά κύτταρα η οικογένεια ras είναι πολύ συντηρητική κατά την εξέλιξη, και κωδικοποιεί για μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη 21.000 daltons (p21^{ras}). Η σχέση της p21^{ras} με τη μεμβράνη είναι βασική για τη λειτουργία της. Η p21^{ras} δεσμεύει νουκλεοτίδια γουανίνης (GTP και GDP) και βρίσκεται με δύο μορφές: την ενεργή όταν είναι δεσμευμένη με GTP και την ανενεργή όταν είναι δεσμευμένη με GDP. Οι πρωτεΐνες ras συμμετέχουν σε οδούς μεταγωγής μηνυμάτων που ρυθμίζουν το σχήμα του κυττάρου, την κινητικότητα και την ανάπτυξη του, δεχόμενες ερεθίσματα από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων.

δ. Παράγοντες ανταλλαγής GTPάσης όπως τα Dbl, Vav, Ect-2, Ost, Tim και Lbc των οποίων ο μηχανισμός δράσης δεν έχει σαφώς διευκρινιστεί. Προς το παρόν θεωρείται ότι ο ρόλος τους είναι η διαμεσολάβηση σε διάφορους κυτταροσκελετικούς ανασχηματισμούς του κυττάρου.

ε. Κυτταροπλασματικές κινάσες σερίνης-θρεονίνης όπως τα ογκογονίδια *mos*, *cot*, *rim1* και *raf*. Αυτά φαίνεται να λειτουργούν σαν κυτταροστατικοί παράγοντες, ιδίως κατά τη μείωση. Όμως η έκτοπη έκφραση τους σε ινοβλάστες οδηγεί σε διαμελισμό των χρωματοσωμάτων, πιθανώς ως αποτέλεσμα πρώιμης έναρξης μίτωσης. Η διακοπή του χρονοδιαγράμματος ενός κυτταρικού κύκλου μπορεί να προκαλέσει την ανευπλοειδική εικόνα που παρατηρείται σε μερικά καρκινικά κύτταρα.

στ. Πυρηνικά ογκογονίδια όπως είναι τα *fos*, *jun*, *ski*, *rel* και *myb*. Τα προϊόντα αυτών εντοπίζονται στον πυρήνα και σχετίζονται άμεσα με τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, που αφορά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Το RNA και οι πρωτεΐνες που παράγουν αυτά τα πρωτο-ογκογονίδια έχουν πολύ μικρή ημιπερίοδο ζωής και ως εκ τούτου η δράση τους είναι πολύ βασική αλλά και ευαίσθητη. Έχει γίνει πλέον αποδεκτό ότι αυτά τα ογκογονίδια είναι απαραίτητα για να περάσει το κύτταρο από το στάδιο της ηρεμίας (G0), στη φάση (G1) που μπορεί να ακολουθήσει πολλαπλασιασμός του. Επίσης αρρυθμιστη, ή έκτοπη έκφραση αυτών των γονιδίων σε διαφοροποιημένα κύτταρα, υποκαθιστά την ανάγκη που υπάρχει για αυξητικούς παράγοντες στο στάδιο G1 και δίνει συνεχή μηνύματα πολλαπλασιασμού, παρά την απουσία αυξητικών παραγόντων.

Πίνακας 1.1. Πρωτο-ογκογονίδια, μηχανισμός αλλοίωσης τους και συμμετοχή τους σε ανθρώπινες νεοπλασίες.

Πρωτο-ογκογονίδιο	Γενετική βλάβη	Νεοπλασίες
EGFR	ενίσχυση	καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων
TRK	ανασυνδιασμός	καρκίνωμα του παχέως εντέρου
NEU	σημειακή μετάλλαξη, ενίσχυση	νευροβλάστωμα, καρκίνωμα του μαστού
H-RAS	σημειακή μετάλλαξη	καρκίνωμα ουροποιητικού, παγκρέατος, πνεύμονα
K-RAS	σημειακή μετάλλαξη	καρκίνωμα παγκρέατος, παχέως εντέρου
N-RAS	σημειακή μετάλλαξη	καρκίνωμα θυροειδούς, μελάνωμα
Dbl	ανασυνδιασμός	διάχυτο λέμφωμα από B-κύτταρα
Vav	ανασυνδιασμός	αιμοποιητικών κυττάρων
Ost	?	οστεοσάρκωμα
BCR/RBL	χρωμοσωμική μετατόπιση	χρόνια μυελογενής λευχαιμία
N-MYC	γονιδιακή ενίσχυση	νευροβλάστωμα, καρκίνωμα πνεύμονα
L-MYC	γονιδιακή ενίσχυση	καρκίνωμα πνεύμονα
RET	ανασυνδιασμός	καρκίνωμα θυροειδούς, Men 2A, Men 2B
SRC	?	καρκίνωμα του παχέως εντέρου

1.1.3. Ογκογονίδια και κυτταρικός κύκλος

Τα μηνύματα από τα ογκογονίδια συγκλίνουν προς τη ρύθμιση ενός βασικού μηχανισμού ελέγχου: του ρολογιού του κυτταρικού κύκλου που ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Κατά την εξέλιξη του κύκλου των κυττάρων των θηλαστικών, τα δύο βασικά διακριτά γεγονότα που είναι η σύνθεση του DNA (φάση S) και η μίτωση (φάση M, ή κυτταρικός αναδιπλασιασμός), διαχωρίζονται από δύο χάσματα: το G1 (πριν τη

φάση S) και το G2 (πριν τη φάση M). Εκτός όμως από τις 4 αυτές διακριτές φάσεις, τα κύτταρα μπορούν να βρίσκονται και σε ένα «εναλλακτικό» στάδιο πολύ χαμηλού μεταβολισμού, που ονομάζεται φάση ηρεμίας (φάση G0). Το μέγεθος ενός κυτταρικού πληθυσμού καθορίζεται βασικά από το σχετικό αριθμό των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση ηρεμίας (G0), προς τον αριθμό των κυττάρων που βρίσκονται σε κάποια από τις άλλες 4 φάσεις του κύκλου. Υπάρχουν αρκετά ρυθμιστικά σημεία που χρειάζεται να ενεργοποιηθούν για να προχωρήσει το κύτταρο στον κύκλο του και αυτά τα σημεία αποτελούν στόχο πολλών ογκογονιδίων.

Είναι πλέον γνωστό ότι ο κυτταρικός κύκλος ελέγχεται σε δύο βασικά σημεία. Το πρώτο είναι το στάδιο G1 που το κύτταρο προετοιμάζεται για να αρχίσει την σύνθεση του DNA (φάση S) και το δεύτερο είναι το στάδιο G2 που είναι το όριο πριν τη μίτωση (φάση M) ¹¹. Τα περισσότερα κύτταρα στον οργανισμό βρίσκονται σε φάση ηρεμίας (G0) και η απόφαση να προχωρήσουν σε πολλαπλασιασμό εξαρτάται από την ισορροπία ανάμεσα σε αυξητικά ή ανασταλτικά μηνύματα. Κύτταρα καλλιιεργειών μπορούν να περάσουν από τη φάση ηρεμίας στη φάση του πολλαπλασιασμού και αντίστροφα, εξαιτίας μεταβολών των εξωκυττάρων συνθηκών (συγκέντρωση μιτωγόνων, θρεπτικών συστατικών). Υπάρχει γενικά η αντίληψη, ότι της όλης διαδικασίας ηγείται ένας κεντρικός μηχανισμός που ονομάστηκε σημείο περιορισμού (restriction point, ή σημείο R). Το σημείο R θεωρείται ότι βρίσκεται κατά το μέσο προς το τέλος της φάσης G1. Στο τέλος της φάσης G1 το κύτταρο θα αποφασίσει να προχωρήσει στον αναδιπλασιασμό του DNA (φάση S), εφόσον τα ερεθίσματα που έχει είναι αρκετά. Σε αυτό το σημείο τα καρκινικά κύτταρα δύνανται να ξεφύγουν από τα ανασταλτικά ερεθίσματα που δέχονται με δύο μηχανισμούς. Ο πρώτος αφορά την ενεργοποίηση αυξητικών προωθητικών γονιδίων, αυξητικών παραγόντων των γονιδίων *ras* και πυρηνικών ογκοπρωτεϊνών, ενώ ο δεύτερος τρόπος σχετίζεται με την απώλεια υποδοχέων που στέλνουν ανασταλτικά μηνύματα από γονίδια, όπως είναι το TGFβ ¹². Αν ξεπεράσει το κύτταρο το τέλος της φάσης G1, η είσοδος στην S φάση εξαρτάται πλέον από την ενεργοποίηση κινασών εξαρτώμενων από τις κυκλίνες (cyclin-dependant kinase, CDK). Μεταβολές στις κυκλίνες D και E της φάσης G1 σε αυτό το σημείο, μπορεί να προκαλέσουν μετασχηματισμό του κυττάρου. Τα γονίδια αυτών των κυκλινών φαίνεται να υπερεκφράζονται σε αρκετούς όγκους ¹³. Σε αυτό το σημείο (G1 προς S), έλεγχος ασκείται και από ογκοκατασταλτικά γονίδια (όπως το Rb1 και p53). Απενεργοποίηση ή μετάλλαξη στο Rb1 θεωρείται απαραίτητο βήμα στην ογκογένεση.

Ένα άλλο γονίδιο που η υπερέκφραση του σχετίζεται με την πολυπλοειδική εικόνα του DNA που παρουσιάζουν πολλά καρκινικά κύτταρα είναι το *c-mos* ¹⁴. Αυτό

παράγει μια κινάση σερίνης-θρεονίνης που σχετίζεται με την αναδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων που σχηματίζουν την άτρακτο κατά τη μείωση.

1.1.4. Ογκογονίδια και απόπτωση

Η απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) είναι ένας μηχανισμός άμυνας κατά τον οποίο προκαλείται ο θάνατος κυττάρων με βλάβες στο DNA, ή κυττάρων με πρόδρομες νεοπλασματικές αλλαγές, ή ακόμη κυττάρων που ακολουθούν μεγάλους και ακανόνιστους κυτταρικούς κύκλους. Η διαφορά της απόπτωσης από το φυσιολογικό κυτταρικό θάνατο (ή νέκρωση), είναι ότι η πρώτη είναι ενεργό φαινόμενο και αποτελεί φυσιολογική απάντηση σε φυσιολογικά μηνύματα ή σε έλλειψη τέτοιων μηνυμάτων, ενώ η δεύτερη είναι «παθολογική» διαδικασία, αποτέλεσμα βαριάς κυτταρικής βλάβης που καθιστά το κύτταρο μη βιώσιμο.

Πρόσφατα έχουν βρεθεί ογκογονίδια που έχουν την ικανότητα να προκαλούν απόπτωση. Το c-myc πρωτο-ογκογονίδιο μπορεί να προκαλέσει απόπτωση ή και πολλαπλασιασμό του κυττάρου ¹⁵. Αντίθετα πολλές κυτοκίνες φαίνεται ότι αναστέλλουν την απόπτωση. Οι πολύπλοκοι αυτοί μηχανισμοί δημιουργούν δικλείδες ασφαλείας, για το πέρασμα ή όχι ενός κυττάρου σε νεοπλασματικό φαινότυπο.

Με την απόπτωση σχετίζεται επίσης και το p53. Αυτό το ογκοκατασταλτικό γονίδιο όταν λειτουργεί, φαίνεται να διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο όταν συμβαίνουν βλάβες στο DNA, μέχρι αυτές να διορθωθούν, ή εναλλακτικά να μπει το κύτταρο στη διαδικασία της απόπτωσης. Το p53 φαίνεται να καταστέλλει τις CDKs, που είναι απαραίτητες για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου ^{6, 16}. Το αποτέλεσμα της βλάβης του p53 μετά από μετάλλαξη του, είναι ότι κύτταρα με βλάβη του DNA ή με ενεργοποιημένα ογκογονίδια, δεν αποπίπτουν.

Ανάλογα λειτουργεί το ογκογονίδιο Bcl-2, του οποίου η απορυθμισμένη έκφραση μπορεί να μπλοκάρει την φυσιολογική αποπτωτική ικανότητα του c-myc, ή να αναστείλει την απόπτωση διαμέσου αναστολής του p53 ^{17, 18}.

1.2. Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Αν και τα ογκογονίδια ανακαλύφθηκαν με άμεσες τεχνικές εξαιτίας της επικρατητικής τους ικανότητας να μεταλλάσσουν το φαινότυπο φυσιολογικών κυττάρων, η ανίχνευση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων ήταν πιο κοπιώδης λόγω του υπολειπόμενου χαρακτήρα τους. Η επιτυχής μεταφορά ενός φυσιολογικού

ογκοκατασταλτικού γονιδίου σε ένα μετασχηματισμένο κύτταρο, θα ήταν αναμενόμενο να αναστρέψει το νεοπλασματικό του φαινότυπο. Αυτό σε πρώιμα πειράματα αποδείχθηκε πρακτικά αρκετά δύσκολο, αφού έπρεπε να ανιχνευθούν τα ανεστραμμένα και πλέον φυσιολογικά κύτταρα μέσα στη μεγάλη μάζα των μετασχηματισμένων κυττάρων του όγκου.

Ο Harris και οι συνεργάτες του, κατάφεραν να δείξουν ότι η ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων όγκου ποντικού σε συγγενικά ζώα μπορούσε να κατασταλεί, όταν τα καρκινικά κύτταρα συντήκονταν με φυσιολογικά^{19, 20}. Πρότειναν λοιπόν την ιδέα ότι ο καρκίνος είναι υπολειπόμενη διαταραχή και μπορεί να αναχαιπιστεί. Συντήκοντας κύτταρα όγκων ανθρώπων με ανθρώπινους διπλοειδικούς ινοβλάστες και μετεμφυτεύοντας τα υβρίδια σε αθυμικό ποντικό, είδαν ότι καταστέλλονταν η ογκογόνος ανάπτυξη των υβριδίων. Αργότερα, πρότειναν ότι η ογκογόνος δράση σχετιζόταν με την απώλεια τμημάτων συγκεκριμένων χρωματοσωμάτων. Για να επιβεβαιώσουν αυτή την υπόθεση μετεμφύτευσαν συγκεκριμένα φυσιολογικά χρωματοσώματα σε καρκινικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να καταστέλλονται οι ογκογόνες ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων^{21, 22}.

Ταυτόχρονα με τις ανωτέρω μελέτες, ο Knudson διαπίστωσε σε επιδημιολογικές μελέτες για το ρετινοβλάστωμα, ότι οι περισσότερες περιπτώσεις της νόσου ήταν σποραδικές, αλλά υπήρχαν και οικογενείς μορφές όπου φαινόταν ότι η νόσος κληρονομείται με αυτοσωματικό κυρίαρχο χαρακτήρα. Ιδίως στις τελευταίες περιπτώσεις η πάθηση ήταν πολυεστιακή, αμφοτερόπλευρη και εμφανιζόταν σε μικρότερη ηλικία. Διατύπωσε τότε την υπόθεση των δύο «χτυπημάτων»²³, κατά την οποία δύο μεταλλακτικά γεγονότα ήταν απαραίτητα για να εκδηλωθεί το ρετινοβλάστωμα. Θεώρησε λοιπόν ότι στην οικογενή μορφή της νόσου το πρώτο γεγονός είχε κληρονομηθεί με τα γαμετικά κύτταρα, όμως ήταν απαραίτητη και η σωματική μετάλλαξη στο δεύτερο αλληλόμορφο για να εκδηλωθεί ο όγκος. Στη σποραδική μορφή της νόσου, έπρεπε να συμβούν επιγενώς σωματικές μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα ενός κυττάρου, για να αναπτυχθεί όγκος. Μελέτες απώλειας ετεροζυγωτίας που έγιναν αργότερα, έδειξαν ότι στο υπεύθυνο γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (RB1), υπήρχε βλάβη σε συγκεκριμένη γενετική θέση (13q14) και στα δύο αλληλόμορφα. Η υπόθεση του Knudson συνεισέφερε με δύο τρόπους. Πρώτον, έδειξε τον τρόπο με τον οποίο κληρονομούμενες και επίκτητες βλάβες συνεργάζονται στην καρκινογένεση και δεύτερον, ανέδειξε την ιδέα της υπολειπόμενης γενετικής βλάβης στον καρκίνο.

1.2.1. Διερεύνηση και ταυτοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων

Αρχικά για την εντόπιση χρωμοσωμικών περιοχών που περιείχαν ογκοκατασταλτικά γονίδια χρησιμοποιήθηκαν κυτταρογενετικές μελέτες, που ανίχνευαν δομικές ανωμαλίες των χρωματοσωμάτων σε ασθενείς με καρκίνο. Έτσι μπόρεσαν να εντοπίσουν χρωμοσωμικές μετατοπίσεις, ή απαλείψεις, γεγονός που πιθανολογούσε την ευρύτερη περιοχή που βρισκόταν ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Έτσι βρέθηκε ότι οι ασθενείς με ρετινοβλάστωμα εμφανίζουν στα κύτταρα του περιφερικού τους αίματος ενδιάμεσες απαλείψεις της περιοχής q14 του χρωματοσώματος 13, σε ποσοστό μεγαλύτερο του 5% ²⁴. Επίσης κυτταρογενετικές μελέτες διανοητικά καθυστερημένων ανδρών, που είχαν εκατοντάδες πολύποδες στο έντερο τους, χωρίς κληρονομικό ιστορικό νόσου, ανέδειξαν ενδιάμεσες απαλείψεις στο χρωμόσωμα 5q ²⁵. Έτσι πιθανολογήθηκε η ύπαρξη μεταλλαγμένων αλληλομόρφων στη συγκεκριμένη περιοχή, που ήταν υπεύθυνα για τη νόσο.

Η μελέτη δομικών αλλαγών στα χρωματοσώματα δεν είναι επαρκής για να πιστοποιηθεί η υπόθεση ότι τα ύποπτα γονίδια λειτουργούν σαν ογκοκατασταλτικά και ότι ακολουθούν τους κανόνες της κληρονομικότητας. Χρησιμοποιήθηκε λοιπόν η ανάλυση γενετικής σύνδεσης (linkage analysis), για να αποδειχθεί ότι γενετικοί δείκτες από την υποψήφια γονιδιακή περιοχή μεταφέρονται κατά την κληρονόμηση του φαινοτύπου, σε μεγάλο αριθμό συγγενών διαδοχικών γενεών, μιας οικογένειας με κληρονομούμενη μορφή καρκίνου. Αν και η ανάλυση γενετικής σύνδεσης μπορούσε να εντοπίσει με μεγαλύτερη ακρίβεια τη θέση ενός ύποπτου γονιδίου, η ταυτοποίηση και χαρτογράφηση του γονιδίου μπορεί να γίνει μόνο με κλωνοποίηση της θέσεως του και λεπτομερή ανάλυση των μεταλλάξεων.

Περαιτέρω στοιχεία για τη θέση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, έδωσαν οι μελέτες απώλειας ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity ή LOH). Αυτές ξεκίνησαν, όταν παρατήρησαν ότι ασθενείς με ρετινοβλάστωμα στους οποίους είχε βρεθεί απάλειψη στη περιοχή 13q14, εμφάνιζαν κατά 50% χαμηλότερα επίπεδα ενός ενζύμου, της εστεράσης D. Τα επίπεδα της εστεράσης D βρέθηκαν κατά το ίδιο ποσοστό μειωμένα σε οικογένειες με κληρονομικό ρετινοβλάστωμα. Θεώρησαν λοιπόν ότι το γονίδιο της εστεράσης D βρίσκεται κοντά στο RB1. Επιπρόσθετα τα κύτταρα του όγκου του ρετινοβλαστώματος δεν είχαν καμία δράση εστεράσης D ²⁶. Αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας γενετικούς δείκτες που εντοπίζονταν δίπλα σε ύποπτες περιοχές, μπορούσαν να ανιχνεύσουν την απώλεια της ετεροζυγωτίας, ή την απώλεια και των δύο αλληλομόρφων. Όταν όμως υπάρχει ανακατάταξη γενωμικού υλικού, η LOH

επηρεάζει στις περισσότερες περιπτώσεις πολλούς, ή και όλους τους δείκτες σ' ένα συγκεκριμένο βραχίονα χρωματοσώματος. Ως εκ τούτου, η ακριβής εντόπιση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου μπορεί να γίνει σε ελάχιστες περιπτώσεις μόνο με την τεχνική της ανάλυσης απώλειας ετεροζυγωτίας.

1.2.2. Λειτουργία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων

Μέχρι τώρα έχουν ανιχνευθεί και κλωνοποιηθεί αρκετά ογκοκατασταλτικά γονίδια, ενώ έχουν προταθεί και άλλα υποψήφια. Δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως η λειτουργία όλων των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Είναι βέβαια γνωστό ότι δρουν σε διάφορες θέσεις μέσα στο κύτταρο και με διαφορετικούς τρόπους. Μερικά απ' αυτά φαίνεται να ανταγωνίζονται άμεσα ή έμμεσα την λειτουργία πρωτο-ογκογονιδίων όσον αφορά τη ρύθμιση της αύξησης του κυττάρου.

Τα περισσότερα ογκοκατασταλτικά γονίδια εκφράζονται σε παρόμοια επίπεδα σ' όλους τους ιστούς των ενηλίκων. Αυτό όμως δυσκολεύει την ερμηνεία της παρατήρησης, ότι σε ανθρώπους με κληρονομούμενη βλάβη του αλληλομόρφου ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, εμφανίζεται ένα περιορισμένο μόνο είδος όγκων. Για παράδειγμα οι ασθενείς που έχουν κληρονομήσει μετάλλαξη στο RB1, δύνανται να αναπτύξουν μια περιορισμένη μόνο σειρά όγκων, όπως το ρετινοβλάστωμα σε παιδική ηλικία, οστεοσαρκώματα και σαρκώματα μαλακών μορίων καθώς επίσης και μελανώματα σε μεγαλύτερη ηλικία. Αυτό συμβαίνει παρά το γεγονός ότι έχουν βρεθεί σωματικές μεταλλάξεις στο RB1 σε καρκίνους του πνεύμονα, του μαστού, της ουροδόχου κύστεως και του προστάτη²³. Με ανάλογο τρόπο, κληρονομούμενες μεταλλάξεις του p53 προδιαθέτουν σε ανάπτυξη περιορισμένου φάσματος καρκίνων, όπως του μαστού, του εγκεφάλου, σαρκώματα και λεμφώματα. Είναι πιο πιθανό ότι μεταλλάξεις που απενεργοποιούν το p53 προσφέρουν μια εκλεκτική ικανότητα ανάπτυξης σε μεταγενέστερα στάδια της καρκινογένεσης, όπως δηλαδή όταν τα νεοπλασματικά κύτταρα ανακόπτονται εξαιτίας περιβαλλοντικών παραγόντων που τα ωθούν σε απόπτωση. Στον **πίνακα 1.2** αναφέρονται μερικά ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως επίσης οι καρκίνοι και τα σύνδρομα που συσχετίζονται με τα γονίδια αυτά.

Πίνακας 1.2. Ογκοκατασταλτικά γονίδια, συσχετιζόμενα σύνδρομα και καρκίνοι.

Γονίδια	Σύνδρομα	Συχνότερα νεοπλάσματα
RB1	Ρετινοβλάστωμα	Οστεοσάρκωμα, ρετινοβλάστωμα
p53	Li-Draumeni	Όγκοι μαστού, εγκεφάλου, σαρκώματα
p16	Κληρονομικό μελάνωμα	Μελάνωμα, παγκρεατικός καρκίνος
APC	Οικογενής αδενωματοώδης πολυποδίαση	Αδενωματοώδεις πολύποδες, καρκίνος παχέως εντέρου
NF-1	Νευροϊνωμάτωση τύπου 1	Νευροϊνώματα, σαρκώματα, γλοιώματα
NF-2	Νευροϊνωμάτωση τύπου 2	Σβανώματα, μηνιγγιώματα
BRCA1	Κληρονομικός καρκίνος μαστού	Καρκίνος μαστού, ωοθηκών
BRCA2	μαστού	Καρκίνος μαστού
VHL	Von-Hippel Lindau	Φαιοχρωμοκύττωμα, όγκοι νεφρού, αιμαγγειώματα
WT-1	Όγκος Wilms	Νεφροβλάστωμα
MEN-1	Κληρονομική πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία	Όγκοι παραθυροειδών, υπόφυσης, καρκινοειδή, λιπώματα
TSC2	Tuberous sclerosis	Όγκοι νεφρού, εγκεφάλου

1.2.3. Χαρακτηρισμός υποψηφίων ογκοκατασταλτικών γονιδίων

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η ανίχνευση ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι σχετικά δύσκολη διαδικασία. Ένας τρόπος για να εντοπιστούν ογκοκατασταλτικά γονίδια, είναι να διερευνηθούν διαφορετικού είδους καρκινικά κύτταρα, για απώλεια αλληλομόρφων σε συγκεκριμένες χρωμοσωμικές περιοχές.

Υπάρχουν περιορισμοί όσον αφορά τον τελικό χαρακτηρισμό κάποιων γονιδίων ως ογκοκατασταλτικών. Μέχρι τώρα έχει βρεθεί ένας αριθμός πιθανών ογκοκατασταλτικών γονιδίων που συχνά είναι στόχος απώλειας της ετεροζυγωτίας, όμως δεν έχει βρεθεί συσχέτιση τους με συγκεκριμένο είδος όγκων (**Πίνακας 1.3**). Κάποια από τα υποψήφια γονίδια υποεκφράζονται ή απουσιάζουν σε μερικούς όγκους, ενώ άλλα δείχνουν να καταστέλλουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων *in vitro*. Επιπρόσθετα για να καταλήξει κάποιος στο συμπέρασμα τότε ένα γονίδιο είναι

ογκοκατασταλτικό ή όχι, πρέπει να αποκλείσει το ενδεχόμενο ότι η αλλοιωμένη έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου είναι αποτέλεσμα των τροποποιημένων ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων. Στον **πίνακα 1.3** αναφέρονται υποψήφια ογκοκατασταλτικά γονίδια και τα πιθανά νεοπλάσματα με τα οποία συσχετίζονται.

Πίνακας 1.3. Υποψήφια ογκοκατασταλτικά γονίδια και πιθανά συσχετιζόμενα σύνδρομα και νεοπλάσματα.

Γονίδιο	Σύνδρομο	Συχνότερο νεοπλάσμα
DPC4		Παγκρέατος, παχέως εντέρου και άλλα
E-κατενίνη		Στομάχου, μαστού, ενδομητρίου, ωοθηκών
α-κατενίνη		Προστάτη, πνεύμονα
DCC		Παχέως εντέρου, εγκεφάλου, νευροβλάστωμα
PTEN	Σύνδρομο Cowden	Πολλαπλά αμαρτώματα, καρκίνος μαστού, θυρεοειδούς
TGF-II R		Παχέως εντέρου

1.2. Μεταλλακτικά γονίδια

Λάθη που προκύπτουν κατά τον αναδιπλασιασμό του DNA και δεν διορθώνονται από την επιδιορθωτική (proofreading) ικανότητα της DNA πολυμεράσης, μπορούν να διορθωθούν από ένα μηχανισμό που λέγεται μηχανισμός επιδιόρθωσης των κακοζευγαρωμένων βάσεων (mismatch repair process). Αυτός ο μηχανισμός αφορά την αναγνώριση αταίριαστων βάσεων, ή απαλείψεων, ή παρεμβολών (insertions) στη νεοσυσταθείσα έλικα του DNA και την διόρθωση των λαθών. Τα γονίδια που εμπλέκονται σε αυτό το μηχανισμό ονομάζονται μεταλλακτικά γονίδια.

Τα μεταλλακτικά γονίδια (ή γονίδια επιδιόρθωσης του DNA) βρέθηκαν για πρώτη φορά στο κολοβακτηρίδιο (*E.coli*) και ονομάστηκαν *mutH*, *mutL* και *mutS*. Μετάλλαξη σε οποιοδήποτε από αυτά τα γονίδια δημιουργούσε ένα τροποποιημένο φαινότυπο του κυττάρου, επειδή συχνά ακολουθούσαν και άλλες μεταλλάξεις σε πολλές θέσεις στο γονιδίωμα του κυττάρου ²⁷. Μέχρι τώρα έχουν βρεθεί έξι μεταλλακτικά γονίδια στα

ανθρώπινα κύτταρα. Το πρώτο ήταν το MSH2 (ομόλογο του mutS του E.coli) και ακολούθησαν τα MLH1, PMS1, PMS2, MSH3 και το MSH6 (ή GTBP). Μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά βρέθηκαν πρώτη φορά στον οικογενή μη πολυποσικό καρκίνο του παχέως εντέρου (HNPCC) και ήταν κληρονομικές μεταλλάξεις (germ line mutations). Τουλάχιστον 40% αυτών των μεταλλάξεων εντοπίζονται στο MSH2.

Βλάβες των μεταλλακτικών γονιδίων προδιαθέτουν την άθροιση μεταλλάξεων σε άλλα γονίδια και αυτό αντανακλάται στην αστάθεια μήκους του μικροδορυφορικού DNA. Το μικροδορυφορικό DNA αφορά επαναλήψεις 10 έως 50 φορών μικρών αλληλουχιών του DNA (μέχρι 6 βάσεων), κληρονομείται με Μεντελικό τρόπο και παρουσιάζει πολυμορφισμό μεταξύ των ανθρώπων. Η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA (microsatellite instability, MSI) αποτελεί ένα έμμεσο δείκτη ανίχνευσης βλαβών στο μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA. Αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA και σωματικές μεταλλάξεις του MSH2 εμφανίζονται συχνά στο σποραδικό καρκίνο του παχέως εντέρου.

1.4. Η πολυσταδιακή φύση του καρκίνου

Οι πρώτες παρατηρήσεις που οδήγησαν στην υπόθεση των «πολλαπλών χτυπημάτων» προήλθαν από το προοδευτικά υψηλότερο ποσοστό κρουσμάτων καρκίνου προϊούσης της ηλικίας. Η συσχέτιση των κρουσμάτων καρκίνου με την πάροδο της ηλικίας ακολουθεί εκθετικό μοντέλο. Αν και υπήρξαν πολλές θεωρητικές εξηγήσεις για την εκθετική αυτή σχέση, εντούτοις με βάση τις πειραματικές παρατηρήσεις που ακολούθησαν, η επικρατέστερη προς το παρόν εξήγηση είναι ότι απαιτούνται περίπου 12 «χτυπήματα» για τη γένεση ενός συγκεκριμένου όγκου (**Πίνακας 1.4**). Αυτά τα χτυπήματα θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν προσβολές σε ξεχωριστά κύτταρα, όμως επειδή ο κάθε όγκος προκύπτει από ένα προγονικό κύτταρο (κλωνική αύξηση), είναι πιο πιθανό να αντιπροσωπεύουν διαδοχικές μεταλλαγές σε γονίδια ενός και μόνο κυττάρου και των κυτταρικών απογόνων αυτού^{5,28,29}.

Πίνακας 1.4. Συνδυασμοί ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων που εμφανίζονται σε ορισμένα νεοπλάσματα του ανθρώπου.

όγκοι	γονίδια
Καρκίνος τραχήλου	HRAS, MYC, MYCN, p53, RB1
Καρκίνος παχέως εντέρου	APC, MCC, DCC, KRAS2, p53, TGFBR2
Καρκίνος μαστού	MYB, MYC, cyclin D3, EGFR, HER2, HRAS, p53, RB1, BRCA1, HSTF1, INT2, YES1
Καρκίνος προστάτη	MET, HER2, p53, RB1
Καρκίνος νεφρού	VHL, EGFR, HER2, MET
Καρκίνος πνεύμονα	MYC, MYCN, MYCL, HRAS2, RB1, p53, RAF1, JUN
Λέμφωμα	Cyclin D1, BCL2, BCL3, HER2, REL, NFKB2, NPM, ALK, KRAS2, NRAS, YES1
Καρκίνος στομάχου	HER2, MET, K-SAM, BCL2, APC, P-cadherin, p53, KRAS, RB1
Χρόνια μυελογενής λευχαιμία	ABL, BCR, MYC, NRAS, RB1, p53, ERG, TLS/FUS, HOXA9, NUP98, AML1, EAP, EVI1, MN1, TEL1, MDS1

Σύμφωνα με αυτή την άποψη, οι όγκοι αναπτύσσονται με μια κλωνική εξελικτική διαδικασία κατευθυνόμενη από μεταλλαγές. Η πρώτη μεταλλαγή έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμένο πολλαπλασιασμό των κυτταρικών απογόνων ενός και μόνο κυττάρου. Στη συνέχεια ένα από τα κύτταρα αυτά αποκτά μια δεύτερη μεταλλαγή, επιτρέποντας πιθανόν την ανάπτυξη ενός μικρού καλοήθους όγκου. Κάποιο από τα κύτταρα του καλοήθους όγκου μπορεί να υποστεί και μια τρίτη μεταλλαγή, να πολλαπλασιαστεί έναντι των άλλων κυττάρων του όγκου και να σχηματίσει μια πιο εξελιγμένη μορφή του όγκου. Ο όγκος αυτός θα αποτελείται από κύτταρα που έχουν υποστεί και τις τρεις μεταλλαγές. Τελικά, κάποια κλωνικά κύτταρα θα συσσωρεύσουν έναν ικανοποιητικό αριθμό γενετικών αλλοιώσεων που επιτρέπει την διήθηση στους γύρω ιστούς και την πρόκληση μετάστασης σε άλλα όργανα ^{5, 28, 29}.

Στη διατύπωση αυτής της υπόθεσης οδήγησαν και άλλες επιδημιολογικές και κλινικές παρατηρήσεις. Για παράδειγμα ασθενείς που έχουν εκτεθεί σε ακτινοβολία

(ραδιενέργεια ή ακτίνες Χ) αναπτύσσουν όγκους που εμφανίζονται μετά από δεκαετίες. Το ερώτημα που είχε τεθεί από την αρχή ήταν, ποία είναι η αιτία της τόσο μεγάλης χρονικής υστέρησης στην εμφάνιση της νόσου. Μια πιθανή εξήγηση ήταν ότι η ακτινοβολία προκαλεί μεταλλαγές σε κάποια κύτταρα, όμως απαιτούνται πρόσθετες μεταλλαγές στους κλώνους αυτών των κυττάρων για την ανάπτυξη του όγκου ^{15, 29}.

Προς το μοντέλο των πολλαπλών χτυπημάτων συγκλίνουν επίσης και οι μορφολογικές παρατηρήσεις. Ένα από τα καλύτερα τεκμηριωμένα μοντέλα καρκινογένεσης προέρχεται από τη μελέτη εξέλιξης των όγκων στον καρκίνο του παχέως εντέρου. Κατά το μοντέλο αυτό, μικρά σε μέγεθος καλοήγη ογκίδια (αδενώματα) αποτελούν τις πρώτες εκδηλώσεις νεοπλασίας στο επιθήλιο του παχέως εντέρου. Οι μικροί αυτοί όγκοι έχουν διάμετρο ελαχίστων χιλιοστών και έχουν μια σχεδόν φυσιολογική ιστολογική διοργάνωση σε ενδο- και δια-κυτταρικό επίπεδο. Με την πάροδο του χρόνου οι όγκοι αναπτύσσονται, ενώ τα κύτταρα από τα οποία απαρτίζονται αποδιοργανώνονται όλο και περισσότερο. Τελικά ο όγκος εξελίσσεται σε καρκίνωμα, ίσως επειδή ένα από τα κλωνικά κύτταρα του αδενώματος έχει συσσωρεύσει έναν ικανοποιητικό αριθμό μεταλλαγών για να ακολουθήσει η διαδικασία της διήθησης και μετάστασης. Έχει αποδειχθεί ότι τα κακοήγη κύτταρα ενός όγκου φέρουν το ίδιο σύνολο μεταλλαγών που βρίσκονται και στις καλοήθεις περιοχές του ίδιου όγκου, αλλά με την προσθήκη τουλάχιστον μιας επιπλέον μεταλλαγής, η οποία απουσιάζει από τα πρόδρομα καλοήγη κύτταρα ³⁰.

1.5. Ογκογόνοι ιοί

Οι πρώτες ενδείξεις περί της συμμετοχής ιών στην ογκογενετική διαδικασία προήλθαν πριν από σχεδόν έναν αιώνα και η αξία της πληροφορίας αυτής αναγνωρίστηκε με την απονομή του βραβείου Nobel το 1968 στον Rous που ήταν ο εμπνευστής της ιδέας. Σήμερα υπάρχει αποδεδειγμένη συμμετοχή ιογενών λοιμώξεων στην αιτιολογία ενός στους επτά καρκίνους που συμβαίνουν παγκοσμίως ³¹, με τον ιό του θηλώματος του ανθρώπου (HPV) και τους ηπατοτρόπους ιούς (HBV, HCV) να ευθύνονται για πάνω από 80% των περιπτώσεων αυτών. Τόσο DNA, όσο και RNA ιοί μπορούν με τη δράση τους να συμβάλλουν στη δημιουργία όγκων στον άνθρωπο.

1.5.1. DNA ογκογόνοι ιοί

Οι DNA ογκογόνοι ιοί (π.χ. HPV, HBV) έχουν την ικανότητα να ενσωματώνουν περιοχές του γονιδιώματός τους στο γενετικό υλικό των ξενιστών. Οι ιϊκές πρωτεΐνες εκφράζονται στα προσβεβλημένα κύτταρα, τροποποιώντας τη συμπεριφορά γονιδίων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση. Με τέτοιο μηχανισμό προκύπτει απενεργοποίηση του ογκο-κατασταλτικού γονιδίου p53 στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, μετά από ενσωμάτωση του γονιδίου ORF X του ιού της Ηπατίτιδος Β στα ηπατοκύτταρα πασχόντων από τη νόσο. Στο 70% περίπου των περιπτώσεων τραχήλου της μήτρας ανευρίσκονται τα στελέχη HPV-16 και HPV-17. Ενσωμάτωση των ιϊκών γονιδίων E6 και E7 στα καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε απώλεια δράσης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων p53 και Rb ^{32, 33}.

1.5.2. Ρετροϊοί

Οι RNA ογκογόνοι ιοί (ρετροϊοί) κατατάσσονται σε δυο κατηγορίες, ανάλογα με το ογκογενετικό τους δυναμικό. Ορισμένοι επάγουν αμέσως και ταχέως καρκινικό φαινότυπο σε όλα τα κύτταρα τα οποία μολύνουν. Αυτοί οι ταχέως εξαλάσσοντες ιοί (transducing viruses) ενσωματώνουν στο γονιδιώμά τους φυσιολογικά κυτταρικά γονίδια (πρωτο-ογκογονίδια) και μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας τα μετατρέπουν σε ενεργοποιημένα ογκογονίδια μέσα στο προσβεβλημένο κύτταρο. Η μετατροπή (transduction) γίνεται με απάλειψη ρυθμιστικών περιοχών του πρωτο-ογκογονιδίου, ή με αύξηση της μεταγραφικής του δραστηριότητας ³⁴. Οι βραδέως εξαλάσσοντες (slowly transforming) ρετροϊοί προκαλούν καρκινική εξαλλαγή πολύ αργότερα από τη λοίμωξη και μετά από μεσολάβηση επιπρόσθετων αλλοιώσεων του DNA του ξενιστή. Στην περίπτωση αυτή, το RNA του ιού ενσωματώνεται κοντά σε κυτταρικά πρωτο-ογκογονίδια, προκαλώντας αλλοιώσεις του γονιδιακού υποκινητή (promoter) ή ενισχυτή (enhancer) που καταλήγουν σε αυξημένη μεταγραφή του εν λόγω γονιδίου ³⁵.

1.6. Χημικά και φυσικά καρκινογόνα

Παρότι οι περισσότερες χημικές ουσίες δεν είναι καρκινογόνες, εντούτοις χημικά καρκινογόνα ενέχονται στην ογκογένεση των περισσότερων μορφών καρκίνου στον άνθρωπο. Οι ουσίες αυτές συνήθως μετατρέπονται από συγκεκριμένα ενζυμικά συστήματα του κυττάρου (π.χ. κυτόχρωμα P-450) σε ενεργούς μεταβολίτες που δρουν

άμεσα στο κυτταρικό DNA, προκαλώντας από σημειακές μεταλλάξεις έως απαλείψεις γονιδιακών τμημάτων και μείζονες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις³⁶. Φυσικά καρκινογόνα αποτελούν κυρίως η ιονίζουσα και η υπεριώδης ακτινοβολία. Χαρακτηριστικότερα παραδείγματα αποτελούν η μεταγενέστερη έξαρση των νεοπλασιών στους πληθυσμούς που υπέστησαν την ατομική επίθεση το 1945 και η τεκμηριωμένη σχέση κακοήθους μελανώματος και υπεριώδους ακτινοβολίας. Η ακτινοβολία φαίνεται ότι είναι ικανή να προκαλεί άμεσα γενετικές βλάβες, όπως απαλείψεις και μεταθέσεις χρωμοσωμικών τμημάτων και σπανιότερα σημειακές μεταλλάξεις³⁷. Η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί, επιπλέον, αλλοιώσεις στη δομή και λειτουργία γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη διόρθωση βλαβών που φυσιολογικά συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA. Ο μηχανισμός αυτός, συμβάλλει στη δημιουργία κακοήθων δερματικών όγκων στους πάσχοντες από το σύνδρομο μελαγχρωστικής ξηροδερμίας (Xeroderma Pigmentosum)

³⁸.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Τα γονίδια *ras*

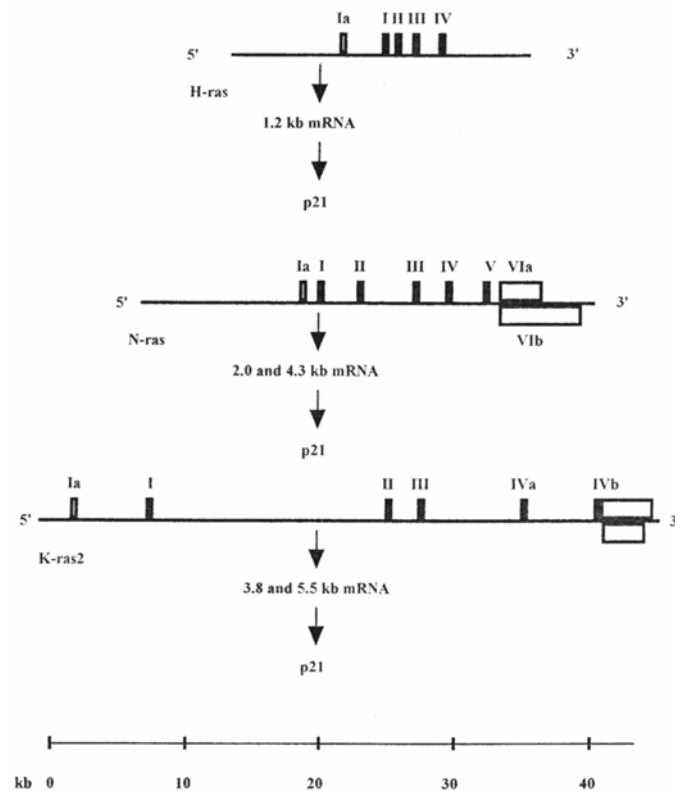
Τα γονίδια *ras* έχουν εντοπιστεί σε πολλά είδη ευκαρυωτικών οργανισμών και εμφανίζουν δομική αναλογία, ενώ και η λειτουργία τους εμφανίζεται πολύ συντηρημένη κατά την εξέλιξη³⁹⁻⁴¹. Τα *ras* στα φυσιολογικά κύτταρα έχουν πολλαπλές λειτουργίες, ρυθμίζοντας την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση. Στα θηλαστικά οι πρωτεΐνες *ras* ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση, την προαγωγή στην S φάση του κυτταρικού κύκλου και ανοσολογικές αποκρίσεις. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα *ras* είναι απαραίτητοι μεταφορείς διαφόρων φυσιολογικών μηνυμάτων, ενώ οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες συνεισφέρουν στο νεοπλασματικό φαινότυπο. Η ενεργοποίηση του πρωτο-ογκογονιδίου *ras* σε ογκογονίδιο μετασχηματισμού γίνεται συνήθως με σημειακή μετάλλαξη.

2.1. Δομή των γονιδίων *ras*

Στον άνθρωπο και τα τρωκτικά τα αντιπροσωπευτικά μέλη της οικογένειας *ras* είναι: το c-H-*ras*1, το c-K-*ras*2 και το N-*ras*. Τα δύο πρώτα έχουν ανάλογα γονίδια σε ρετροϊούς (v-H-*ras* και v-K-*ras*), ενώ υπάρχουν και τα αντίστοιχα κυτταρικά ψευδογονίδια (H-*ras*2 και K-*ras*1) με δομή mRNA που έχει υποστεί ωρίμανση στο γονιδίωμα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Το N-*ras* βρέθηκε σε κύτταρα νευροβλαστώματος ως ογκογονίδιο μετασχηματισμού και παρουσίαζε ομολογία με τα άλλα γονίδια *ras*^{39, 41, 42}. Το γονίδιο H-*ras* αποτελείται από 5 εξώνια, το K-*ras* από 6, ενώ το N-*ras* από 7 εξώνια. Το πρώτο εξώνιο στο 5' άκρο (εξώνιο-1 ή Φ) και των τριών γονιδίων μεταγράφεται, αλλά δεν μεταφράζεται. Τα επόμενα 4 κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη (την p21) μοριακού βάρους 21 kDa. Κάθε εξώνιο και στα τρία γονίδια κωδικοποιεί το αντίστοιχο τμήμα της πρωτεΐνης. Το γονίδιο K-*ras* διαθέτει δύο εναλλακτικά εξώνια, IVa και IVb^{43, 44}. Το αποτέλεσμα αυτού είναι ότι το γονίδιο μπορεί να κωδικοποιήσει δύο ισομορφικές μορφές της πρωτεΐνης p21. Τα επίπεδα παραγωγής της K-*ras* A είναι αμελητέα (20 φορές χαμηλότερα) σε σύγκριση με της K-*ras* B σε φυσιολογικά κύτταρα. Η πρωτεΐνη p21 και των τριών γονιδίων αποτελείται από 189 αμινοξέα, εκτός από την K-*ras* B που αποτελείται από 188 αμινοξέα, επειδή το εξώνιο IVb έχει ένα λιγότερο κωδικόνιο⁴¹⁻⁴⁴.

Η υψηλή ομολογία που υπάρχει ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας των ras οφείλεται στη συντηρητικότητα που υπάρχει ανάμεσα στις κωδικές περιοχές³⁹⁻⁴¹. Οι μη κωδικές και οι γειτονικές περιοχές των εξωνίων παρουσιάζουν πολυμορφισμό μήκους, με αποτέλεσμα το συνολικό μέγεθος του γονιδίου να διαφέρει σημαντικά. Έτσι το H-ras εκτείνεται σε μια γενωμική περιοχή περίπου 4.5 kb, το N-ras σε 7 kb περίπου, ενώ το K-ras καταλαμβάνει περίπου 40 kb^{41, 42} (**Εικόνα 2.1**).

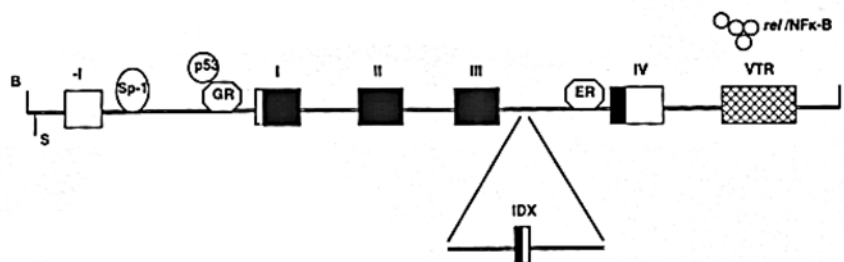
Και τα τρία γονίδια ras φέρουν υποκινητές, πλούσιους σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες GC, ενώ λείπουν οι χαρακτηριστικές περιοχές TATA. Αυτές οι ιδιότητες είναι χαρακτηριστικές για housekeeping γονίδια, καθώς και για άλλα πρωτο-ογκογονίδια. Οι περισσότερες θέσεις μεταγραφικής ενεργοποίησης εντοπίζονται σε μια περιοχή 40bp στο 5' άκρο του εξωνίου -1, αν και ο ακριβής αριθμός των θέσεων καθώς και τα σημεία έναρξης της μεταγραφής διαφέρουν από αναφορά σε αναφορά^{41, 42, 45, 46}. Το εξώνιο-1 αποτελείται από 125-150 bp. Ένα τμήμα 350 βάσεων το οποίο περιλαμβάνει το εξώνιο-1, παρουσιάζει υψηλή ομολογία ανάμεσα στα γονίδια των τρωκτικών και του ανθρώπου. Αν το μήκος του εξωνίου θεωρηθεί 150 bp, τότε η ομολογία εκτείνεται περίπου 175 bp προς το 5' άκρο του εξωνίου και περίπου 25 bp προς το 3' άκρο του εξωνίου-1.



Εικόνα 2.1. Δομή των γονιδίων H-ras1, N-ras και K-ras2 του ανθρώπου⁴⁷.

Αλληλουχίες πέραν του 5' άκρου αυτής της ομόλογης περιοχής, δεν φαίνεται να συμβάλλουν στην ενεργότητα του υποκινητή, ο οποίος έχει μελετηθεί με αναλύσεις ελλείψεων και μεταλλαξιγένεσης^{41, 46, 48, 49}. Στη συντηρητική περιοχή των 175 bp, στο 5' άκρο του εξωνίου-1, υπάρχουν χαρακτηριστικές αλληλουχίες GC οι οποίες είναι αναγκαίες για μεταγραφική έκφραση (**Εικόνα 2.2**). Υπάρχει όμως ασυμφωνία ανάμεσα στις διάφορες αναφορές για το ποιές από όλες αυτές τις θέσεις είναι πιο σημαντικές. Έχει αποδειχθεί ότι ορισμένες από αυτές τις αλληλουχίες δεσμεύουν πυρηνικές πρωτεΐνες^{41, 46, 47, 50}, έλλειψη όμως ή μεταλλαγή στις θέσεις αυτές παρουσιάζει ελάχιστη επίδραση στην έκφραση του γονιδίου⁴¹. Υπάρχει επίσης ένα ομόλογο τμήμα 235 bp στο δεύτερο μισό του πρώτου ιντρονίου, η έλλειψη του οποίου σχετίζεται με μείωση της έκφρασης της p21 κατά 3 με 10 φορές⁴¹. Είναι πιθανό ότι η ρύθμιση της έκφρασης του H-ras εξαρτάται τόσο από το πρώτο ιντρόνιο, όσο και από αλληλουχίες που εντοπίζονται 150 βάσεις από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Παρόμοια χαρακτηριστικά έχουν βρεθεί και για τους υποκινητές του K-ras και N-ras^{39, 41, 43, 44}.

Εκτός των ρυθμιστικών περιοχών στο 5' άκρο του γονιδίου, υπάρχουν και στο 3' άκρο αλληλουχίες που συμβάλλουν στην έκφραση του H-ras. Μια από αυτές που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες διαδοχικές αλληλουχίες διαφορετικού μήκους (variable tandem repeats), εντοπίζεται περίπου 1000 bp μετά τη θέση πολυαδενυλίωσης και έχει δράση ενισχυτή⁵¹⁻⁵³. Η άλλη περιοχή αποτελείται από ένα συντηρημένο εναλλακτικό εξώνιο IDX, στο ιντρόνιο μεταξύ των εξωνίων 3 και 4⁵⁴ (**Εικόνα 2.2**). Ώριμα μετάγραφα με αυτό το εξώνιο βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα στο κύτταρο, αντανακλώντας πιθανόν χαμηλή σταθερότητα. Πειράματα επιμόλυνσης με cDNA που κωδικοποιεί το μετάγραφο, δεν έδειξαν σημαντική βιολογική δραστηριότητα. Ωστόσο η παρουσία του εξωνίου φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στα επίπεδα της p21. Μεταλλαγές στη θέση συρραφής (splice donor site) αυτού του εξωνίου σε ενεργοποιημένο γονίδιο H-ras, έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής ώριμης ras p21 πρωτεΐνης κατά 10 φορές⁵⁴.



Εικόνα 2.2. Απεικόνιση των κυριότερων θέσεων ρύθμισης της μεταγραφής του γονιδίου H-ras. Μεταξύ των κωδικοποιών και μη εξονίων (μαύρα και λευκά κουτιά, αντίστοιχα) σημειώνονται οι θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (Sp-1) στον υποκινητή και οι ρυθμιστικές μεταγραφικές περιοχές των ιντρονίων. Σε αυτές προσδένονται η πρωτεΐνη p53, υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (GR) και οιστρογονικοί υποδοχείς (ER). Στην περιοχή μινι-δορυφορικού 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 4ο εξόνιο. Ο μηχανισμός αυτός μειώνει τη δράση της ογκοπρωτεΐνης p21.

2.2. Πρωτεΐνες *ras*

2.2.1. Δομή των πρωτεϊνών *ras*

Όπως αναφέρθηκε τα γονίδια *ras* των θηλαστικών κωδικοποιούν πρωτεΐνες με μοριακό βάρος 21 kDa. Η p21 αποτελείται από 189 αμινοξέα και εμφανίζει τις εξής τρεις περιοχές: α) την καταλυτική περιοχή (αμινοξέα 1-164) που παρουσιάζει μεγάλη ομολογία μεταξύ των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα τρία ανθρώπινα γονίδια *ras*, β) την ετερογενή περιοχή (αμινοξέα 165-186) που διαφέρει μεταξύ των τριών πρωτεϊνών p21, εκτός από την Cys186 και γ) την περιοχή πρόσδεσης στη μεμβράνη (αμινοξέα 186-189)^{39, 41, 55}. Σύγκριση των ισομορφών της p21 και των τριών ανθρώπινων γονιδίων *ras*, δείχνει ότι υπάρχει υψηλή ομολογία στα πρώτα 164 αμινοξέα (τα 86 αμινοτελικά αμινοξέα είναι απόλυτα όμοια, ενώ τα επόμενα 78 αμινοξέα παρουσιάζουν κατά 79% ομολογία)^{40, 41}. Τα τελευταία 25 καρβοξυτελικά αμινοξέα αποκλίνουν σημαντικά, εκτός από την Cys στη θέση 186. Αυτό υποδηλώνει ότι η

ετερογενής περιοχή μεταξύ των διαφόρων ομολόγων πρωτεϊνών p21 πιθανόν σχετίζεται με διακριτές λειτουργίες. Αν και τα καρβοξυτελικά αμινοξέα της ετερογενούς περιοχής πιθανόν συμμετέχουν διαφορετικά στην κατάλληλη διαμεσολάβση για την υποκυτταρική τοποθέτηση της πρωτεΐνης, καμιά λειτουργικότητα δεν έχει αναφερθεί για το αμινοτελικό άκρο αυτής της περιοχής. Έλλειψη των κωδικονίων 164-179 σε ενεργοποιημένα γονίδια ras δεν έχει καμιά επίδραση στην ικανότητα μετασχηματισμού των κυττάρων από τα γονίδια αυτά ^{41, 55}. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα γονίδια αυτά δεν παίζουν σπουδαίο ρόλο στη δομική ακεραιότητα, ή στην ενεργότητα των πρωτεϊνών ras.

2.2.2. Έκφραση των πρωτεϊνών ras

Ιστολογικές αναλύσεις σε ιστούς ποντικού για τα προϊόντα και των τριών γονιδίων ras έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες ras υπάρχουν σε όλους τους ιστούς, διαφοροποιημένους και εμβρυϊκούς. Ορισμένα διαιρούμενα κύτταρα έδειξαν μάλιστα ότι βάφονται εντονότερα (με αντισώματα) από τα αντίστοιχα διαφοροποιημένα κύτταρα ⁵⁶. Ραδιο-ανοσολογικές μετρήσεις εκχυλισμάτων από NIH3T3 κύτταρα καθόρισαν ότι η περιεκτικότητα σε ras p21 είναι περίπου 3×10^6 μόρια ανά κύτταρο. Τα αντίστοιχα κύτταρα μετασχηματισμένα με ιικό H-ras εκφράζουν πάνω από 6 φορές περισσότερη πρωτεΐνη ras ⁴¹. Σε αναλύσεις mRNA, όπου τα τρία γονίδια ras είναι διακριτά, βρέθηκε ότι τα mRNA τους παρουσιάζουν διαφορές μέχρι και 10 φορές σε διαφορετικούς ιστούς ποντικού ⁵⁷. Για παράδειγμα τα επίπεδα έκφρασης του H-ras είναι υψηλά στην επιδερμίδα και στους σκελετικούς μυς και χαμηλά στο ήπαρ, η έκφραση του K-ras είναι υψηλή στο πεπτικό σύστημα και στο θύμο αδένα και χαμηλή στην επιδερμίδα και τους σκελετικούς μυς, ενώ τα επίπεδα του N-ras είναι υψηλά στους όρχεις και το θύμο αδένα και χαμηλά στο ήπαρ και τα νεφρά ^{56, 57}. Αυτά τα πρότυπα έκφρασης οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τουλάχιστον ένα από τα τρία γονίδια ras εκφράζεται σε κάθε κυτταρικό τύπο και ότι υπάρχει εξειδικευμένη συμμετοχή του κάθε γονιδίου ras στη λειτουργία των διαφόρων τύπων κυττάρων ^{39, 47, 56, 57}.

2.2.3. Υποκυτταρική κατανομή των πρωτεϊνών ras

Η πρωτεΐνη ras συντίθεται στο κυτταρόπλασμα σε ελεύθερα ριβοσωμάτια ως pro-p21 και έχει χρόνο ημίσειας ζωής τουλάχιστον 24 ώρες ⁵⁵. Η pro-p21 υπόκειται σε μια σειρά μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στο καρβοξυτελικό άκρο της, οι οποίες

αυξάνουν την υδροφοβικότητα της πρωτεΐνης, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την πρόσδεση της στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις είναι αναγκαίες ακόμα και για τον μετασχηματισμό κυττάρων με ras, καθώς ενεργοποιημένα γονίδια ras χάνουν την ικανότητα τους για μετασχηματισμό όταν εισάγονται επιπρόσθετες μεταλλαγές που καθιστούν την πρωτεΐνη κυτταροπλασματική^{55, 58}. Οι αλληλουχίες στο C-τελικό άκρο είναι αναγκαίες για τη δέσμευση πάνω στη μεμβράνη⁵⁵ και η συντηρημένη Cys186 απαιτείται για την έκφραση των μετα-μεταφραστικών διαδικασιών της προ-p21. Μεταλλαγμένες πρωτεΐνες με αλλοιώσεις σε αυτή τη θέση, είναι ελαττωματικές ως προς το μετασχηματισμό και παραμένουν στο κυτταρόπλασμα. Η ιδιότητα μετασχηματισμού μπορεί να διασωθεί, εάν το τμήμα πρόσδεσης στη μεμβράνη αντικατασταθεί στη θέση της Cys186 με ένα άλλο, όπως για παράδειγμα η θέση μυριστιλίωσης από το γονίδιο src⁴¹.

2.2.4. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών ras

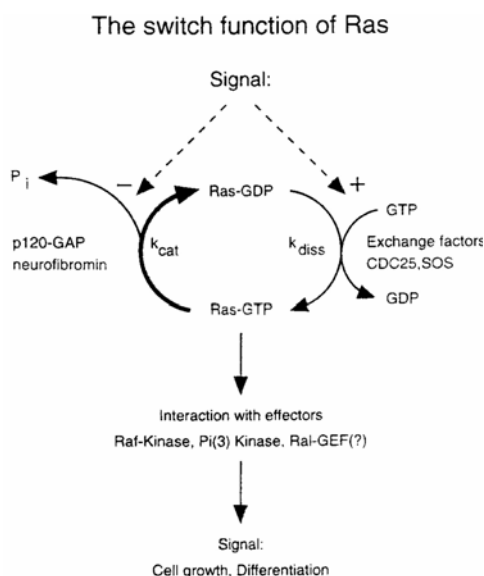
Βιοχημικές αναλύσεις των διαδικασιών μετα-μεταφραστικής ρύθμισης των πρωτεϊνών ras έδειξαν ότι πρώτα τροποποιείται η Cys186 από το φαρνεσυλοισοπρενοειδές που είναι προϊόν του μονοπατιού βιοσύνθεσης της χοληστερόλης. Στη συνέχεια τα τρία καρβοξυτελικά αμινοξέα πέπτονται πρωτεολυτικά, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο της Cys186 μεθυλιώνεται^{41, 55}. Το προϊόν που προκύπτει παρουσιάζει ακόμα υψηλότερη υδροφοβικότητα καθώς και συγγένεια πρόσδεσης στη μεμβράνη. Τελικά τα κυστεϊνικά κατάλοιπα αριστερά της φαρνεσυλιωμένης κυστεΐνης στις πρωτεΐνες ras παλμιτυλιώνονται. Αυτό αυξάνει περισσότερο τη συγγένεια πρόσδεσης στη μεμβράνη, καθώς και τη βιολογική ενεργότητα.

Η πρόσδεση του παλμιτικού οξέος είναι αντιστρεπτή και γίνεται σε κυστεΐνες μεταξύ των αμινοξέων 180 και 185, αν εμποδιστεί η φαρνεσυλίωση της πρωτεΐνης ras, π.χ. ελαττώνοντας την ενδοκυτταρική διαθεσιμότητα φαρνεσυλίου, η πρωτεΐνη δεν μπορεί να προσδεθεί στη μεμβράνη με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και να μην διαθέτει ικανότητα μετασχηματισμού⁵⁵.

2.2.5. Βιοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών ras

Οι πρωτεΐνες ras έχουν δύο κύριες ιδιότητες: α) την πρόσδεση νουκλεοτιδίου γουανίνης (GTP/GDP) και β) την υδρόλυση του GTP (**Εικόνα 2.3**)^{55, 59-61}. Οι πρωτεΐνες

p21 προσδένουν νουκλεοτίδια γουανίνης GTP, GDP, dGTP, ppGpp και αρκετά μη φυσιολογικά ανάλογα GTP και GDP με υψηλή συγγένεια. Οι θέσεις πρόσδεσης εντοπίζονται στα αμινοξέα 10-17 (πρόσδεση α- και β- φωσφορικής ομάδας), 57-60 (πρόσδεση γ- φωσφορικής ομάδας όταν προσδένεται GTP) και 116-119 (πρόσδεση του δακτυλίου της γουανίνης) ⁶¹.



Εικόνα 2.3. Σχηματική παράσταση του διακόπτη λειτουργίας του ras μεταξύ της GDP-συνδεδεμένης-ανενεργούς θέσης και της GTP-συνδεδεμένης-ενεργούς-θέσης. Η ενεργοποίηση ενισχύεται από τη δράση του GEF, που είναι ειδικός παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης και αυξάνει τον ρυθμό αποσύνδεσης του ras από το GDP ή αναστέλλει την GAP. Η πρωτεΐνη ras δύναται να επιδράσει σε άλλες πρωτεΐνες για τη μεταγωγή μηνυμάτων όταν βρίσκεται στην ενεργή μορφή και είναι συνδεδεμένη με GTP. GEF = παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης ⁶².

Η υδρόλυση της GTP-p21 δεν εξαρτάται μόνο από την καταλυτική ενεργότητα της πρωτεΐνης ras, αλλά ρυθμιστικό ρόλο διαδραματίζουν και ορισμένοι κυτταρικοί παράγοντες ^{59, 60}. Οι πιο γνωστοί και χαρακτηρισμένοι παράγοντες που ρυθμίζουν τη δράση της ras είναι οι πρωτεΐνες GAP (GTPase activating protein) και NF1 (neurofibromin). Η GAP είναι ένας κυτταροπλασματικός παράγοντας που προσδένεται στη GTP-p21 και επιταχύνει 5 φορές την ενεργότητα GTPάσης της φυσιολογικής p21. Η NF1, που είναι μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη νευροϊνωμάτωση, έχει μια περιοχή

που εμφανίζει ομολογία με την GAP πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα και η NF1 να δρα επιταχύνοντας την υδρόλυση της GTP-p21.

Αντικαταστάσεις αμινοξέων, σημαντικών για την αλληλεπίδραση με τα νουκλεοτίδια γουανίνης, οδηγούν στη παραγωγή ενεργοποιημένων πρωτεϊνών p21 (ικανών για μετασχηματισμό)^{42, 63, 64}. Ανάλογα με τη θέση της σημειακής μετάλλαξης, η μη φυσιολογικά αυξημένη δέσμευση του GTP είναι το αποτέλεσμα της πτώσης της ενεργότητας της GTPάσης ή/και της αύξησης του ρυθμού νουκλεοτιδικής ανταλλαγής^{55, 61}. Τα ογκογονίδια ras που απαντώνται συχνότερα στους όγκους, φέρουν συνήθως μια μετάλλαξη στα κωδικόνια 12, 13, ή 61^{39, 42, 55, 65}. Εκτός από τις πρωτεΐνες που συντελούν στην υδρόλυση της GTP-p21, υπάρχουν κυτταροπλασματικοί παράγοντες που σταθεροποιούν τη μορφή της p21 που φέρει προσδεμένο GTP. Χαρακτηριστικό παράδειγμα στα θηλαστικά αποτελεί το γονίδιο cdc25Mm που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CDC25Mm, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την αποδέσμευση του GDP από την GDP-p21, με αποτέλεσμα να μένει ελεύθερη θέση στην p21 για πρόσδεση του GTP. Σε ανθρώπινα κύτταρα έχουν περιγραφεί τουλάχιστον τρεις οικογένειες πρωτεϊνών που ευθύνονται για την ρύθμιση της ανταλλαγής των νουκλεοτιδίων. Αυτές αποτελούνται από τις GRF, mSOS και GDS οικογένειες πρωτεϊνών. Ξεχωρίζουν με βάση την αμινοξική τους ομολογία, την κατανομή στους διάφορους τύπους κυττάρων και την αλληλεπίδραση με τις διάφορες ισομορφές της πρωτεΐνης ras^{59, 60}.

2.2.6. Ογκοκατασταλτική δράση των αγρίου τύπου γονιδίων ras

Οι πρωτεΐνες Ras είναι μικρές GTP binding πρωτεΐνες, και ήταν από τα πρώτα μόρια που αναγνωρίστηκαν για την συμμετοχή τους στον κυτταρικό μετασχηματισμό και την ογκογένεση. Από τότε, έχουν προκύψει πολλά στοιχεία για την ενεργοποίηση των γονιδίων ras σε διάφορες ανθρώπινες κακοήθειες^{66, 67}. Τα ras συμβάλλουν στην ογκογένεση μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων οι οποίες καθιστούν την πρωτεΐνη ιδιαίτερα ενεργή. Συνεπώς τα wild type ras κατέχουν ασθενή ενεργότητα GTPάσης, ενώ τα μεταλλαγμένα έχουν αρκετές φορές ισχυρότερη καταλυτική ικανότητα. Τα μεταλλαγμένα ras είναι ικανά να επάγουν τον κακοήθη μετασχηματισμό των κυττάρων NIH3T3. Εφόσον αυτά τα κύτταρα περιέχουν και εκφράζουν τα φυσιολογικά αλληλόμορφα ras, θεωρήθηκε πως τα μεταλλαγμένα ras ήταν επικρατή στον καθορισμό του μετασχηματισμένου φαινότυπου. Ωστόσο, τα επιμολυσμένα κύτταρα συχνά εκφράζουν τα εξωγενή γονίδια σε πολύ υψηλότερα επίπεδα από τα παρόντα αλληλόμορφα, λόγω της ενσωμάτωσης πολλαπλών κοπιών ή λόγω της μεταγραφικής

ρύθμισης, αφού η έκφραση των επιμολυσμένων γονιδίων, συχνά καθορίζεται από ισχυρούς ιϊκούς υποκινητές. Για να απαντήσουν στο ερώτημα εάν τα μεταλλαγμένα *ras* γονίδια είναι επικρατή έναντι των αγρίου τύπου *ras*, οι Spandidos et al⁶⁸ επιμόλυναν ποντικίσσιους 208F ινοβλάστες, με διαφορετικές αναλογίες μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου *ras* γονιδίων, τα οποία εκφράζονταν υπό τον ίδιο υποκινητή. Η έκφραση των αγρίου τύπου *ras* εμποδίζει σημαντικά την ανεξάρτητη από την προσκόλληση αύξηση και τον σχηματισμό αποικίας, που επάγεται ισχυρά από το μεταλλαγμένο *ras*⁶⁸. Επιπροσθέτως, η επιμόλυνση του αγρίου τύπου *ras*, σε κύτταρα μετασχηματισμένα με το T24 μεταλλαγμένο *ras* γονίδιο, ήταν επαρκής για να αντιστρέψει τον κακοήθη φαινότυπο. Σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους, το ποσό της αγρίου τύπου πρωτεΐνης έπρεπε να είναι σημαντικά υψηλότερο από την αντίστοιχη μεταλλαγμένη, για να αντιστραφεί ο κακοήθης φαινότυπος, όπως φάνηκε από πειράματα στην EJ κυτταρική σειρά καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε αγρίου τύπου και μεταλλαγμένο H-*ras*. Στα HT-1080 κύτταρα, μετασχηματισμένα με το μεταλλαγμένο N-*ras*, η έκφραση του αγρίου τύπου H-*ras*, ανέστρεψε εν μέρει τον προκαλούμενο από το μεταλλαγμένο N-*ras* φαινότυπο^{68, 69}. Η παρατήρηση αυτή έδειξε ότι όλα τα γονίδια *ras* μπορεί επίσης να έχουν ογκο-κατασταλτική δράση.

Το K-*ras* σχετίζεται με πολλούς ανθρώπινους όγκους, συμπεριλαμβανομένων και των καρκίνων κεφαλής-τραχήλου και πνεύμονα. Τα προκαλούμενα από methylene chloride καρκινώματα στον πνεύμονα ποντικών, συσχετίστηκαν με την έλλειψη και των δύο αγρίου τύπου αλληλομόρφων K*ras2*. Τα ανεπαρκή σε K*ras2* ποντίκια, αποτέλεσαν ένα καινούριο εργαλείο για την μελέτη των μηχανισμών της επαγόμενης από το K-*ras*, ογκογένεσης. Τα ποντίκια που τους έλειπαν και τα δυο K*ras2* αλληλόμορφα, πέθαιναν στις πρώτες 14 ημέρες της κυοφορίας. Τα ποντίκια που τους έλειπε το ένα K*ras2* αλληλόμορφο, είναι περισσότερο προδιατεθειμένα να αναπτύξουν καρκίνο στον πνεύμονα από καρκινογόνα, σε σύγκριση με τα ποντίκια που τους λείπουν και τα δυο αλληλόμορφα. Παρόμοια, στην ποντικίσια καρκινική κυτταρική σειρά LM2, η έκφραση του αγρίου τύπου K*ras2* εμποδίζει την ανάπτυξη και τον σχηματισμό αποικιών, υπονοώντας ότι το αγρίου τύπου K*ras2*, έχει παρόμοιες με το H-*ras* αντι-ογκογενετικές ιδιότητες^{70, 71}.

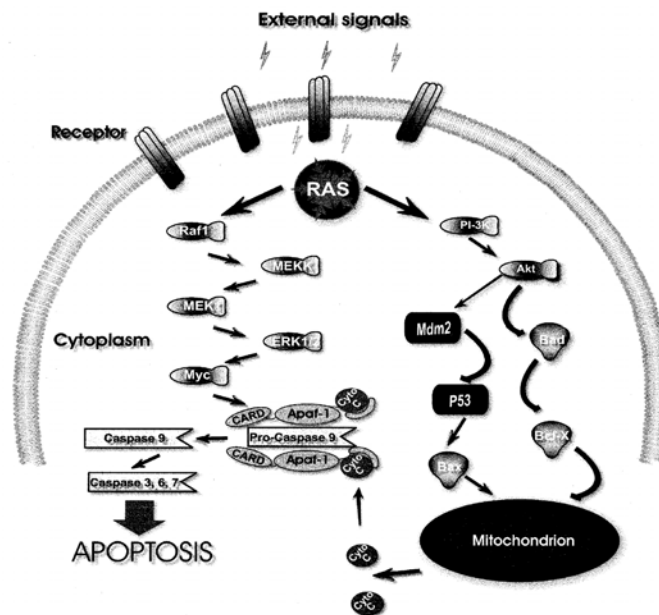
Ο μηχανισμός υπό τον οποίο το *ras* προκαλεί μετασχηματισμό έχει εκτενώς μελετηθεί. Ο ρόλος κλειδί του *ras* σε πολλά φυσιολογικά και ογκογόνα σήματα έχει αναλυθεί λεπτομερώς. Η Ras είναι ένας δυαδικός διακόπτης GDP/GTP, στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, μεταφέροντας σήματα από τους υποδοχείς στο κυτταρόπλασμα (βλ. παράγραφο 2.2.5. Βιοχημικές ιδιότητες των

πρωτεϊνών *ras*). Η ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού, είναι ζωτικής σημασίας για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και η αυξημένη ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού συμβάλλει στην ανάπτυξη του μετασχηματισμένου φαινοτύπου. Μια πιθανή εξήγηση του μηχανισμού δράσης του *Kras2*, έρχεται από την παρατήρηση ότι υπάρχει αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του αγρίου τύπου *Kras2* και της ERK ενεργοποίησης, καθώς επίσης και με τον βαθμό μετασχηματισμού. Έτσι, στα κύτταρα που εκφράζουν υψηλά επίπεδα αγρίου τύπου *Kras2*, η ενεργοποίηση της ERK από τον EGF, είναι χαμηλότερη από ότι στα κύτταρα που εκφράζουν χαμηλά επίπεδα του *Kras2*.

Σε μελέτες κυτταροκαλλιιεργειών αποδείχτηκε ότι η έκφραση των γονιδίων *ras* όχι μόνο συμβάλλει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετασχηματισμό, αλλά υπό ορισμένες συνθήκες, οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση. Η έκφραση των ογκογόνων *ras* μπορεί να επάγει τον μετασχηματισμό μόνο σε συνεργασία με κάποιο άλλο ογκογονίδιο, όπως τα *myc*, E1A, SV40 large T antigen, ή όταν ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο όπως το p53 ή το p16 απενεργοποιείται ⁷². Όταν το μεταλλαγμένο *ras* εκφράζεται σε μη-διαφοροποιημένους ινοβλάστες, οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων p53, p16 ή p21 και σε κυτταρική απόπτωση ⁷³. Παρόμοια, η έκφραση της Raf κινάσης, του κύριου σηματοδοτικού στόχου του *ras*, οδηγεί τους ινοβλάστες σε απόπτωση, προτείνοντας ότι η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού *ras/Raf* προάγει την απόπτωση, τονίζοντας έναν άλλο κυτταρικό μηχανισμό αποτροπής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων που έχουν αποκτήσει μεταλλαγές στα γονίδια *ras* ⁷⁴. Η ακόλουθη απενεργοποίηση των p53 ή p16 καταστέλλει αυτό τον μηχανισμό. Θα έπρεπε συνεπώς να εξεταστεί εάν η παρουσία του αγρίου τύπου *ras* γονιδίου έχει κάποια επίδραση στην ενεργοποίηση των p53, p16 ή άλλων γονιδίων που προάγουν την παύση του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η έκφραση του αγρίου τύπου γονιδίου *ras* εμποδίζει την δράση του μεταλλαγμένου τύπου, μπορεί να βρίσκεται στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών, που προάγουν είτε την κυτταρική γήρανση είτε την απόπτωση. Ή εναλλακτικά να βρίσκεται στον ανταγωνισμό για τα ίδια υποστρώματα. Ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει ακόμα διασαφηνιστεί.

2.2.7. Συμμετοχή των γονιδίων *ras* στην απόπτωση

Αν και αρχικά το *ras* είχε αναγνωριστεί ως ογκογόνος παράγοντας, αναφαίνεται πλέον πειστικά η συμμετοχή του στην ρύθμιση της απόπτωσης, και συνεπώς του κυτταρικού θανάτου. Πολλές μελέτες έχουν συσχετίσει τα *ras* με ογκοκατασταλτικές και αποπτωτικές επιδράσεις. Τα πειράματα των Wyllie et al σε ινοβλάστες 208, έδειξαν ότι το φυσιολογικό *Ha-ras* προάγει την απόπτωσή τους, με τρόπο παρόμοιο αυτού του *c-myc*, ενώ το *T24ras* εμπόδιζε την απόπτωση και προήγαγε ισχυρά τον πολλαπλασιασμό⁷⁵. Από την άλλη, σημαντική δουλειά αποδεικνύει ότι η έκφραση του *ras* προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση. Αρχικά, αυτές οι έννοιες μοιάζουν αντιφατικές, ωστόσο θα μπορούσαν να συνυπάρξουν λαμβάνοντας υπόψη τα πολλά ρυθμιστικά στοιχεία στα διαφορετικά κυτταρικά συστήματα, καθώς επίσης και τις διαφορές στο εύρος και την επιμονή των εξωκυττάριων ερεθισμάτων που ενισχύονται. Στην **εικόνα 2.4** φαίνονται τα κύρια μονοπάτια που περιλαμβάνουν το *ras* και οδηγούν στην ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου.



Εικόνα 2.4. Σχηματική αναπαράσταση του κυριότερων διαμεσολαβούμενων από το Ras μονοπατιών, που σχετίζονται με τη ρύθμιση της απόπτωσης³⁹⁶.

2.2.8. 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 πρωτο-ογκογονιδίων σε ενεργοποιημένα ογκογονίδια. Αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των ras είναι η προαγωγή της αντιγραφής και μεταγραφής του DNA, συνεπώς της έκφρασης πολλών γονιδίων. Τα γεγονότα αυτά συνεισφέρουν στη γενετική αποδιοργάνωση των κυττάρων και ανάπτυξη του καρκινικού φαινότυπου. Τα ενεργοποιημένα ras παρουσιάζουν υψηλότατο εξαλλακτικό δυναμικό *in vitro*⁶⁹. 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 νεοπλασίας⁷⁶.

2.2.8.1. Μεταλλάξεις των ras

Οι μεταλλάξεις των γονιδίων ras απαντώνται σε ορισμένα κωδικόνια, τα 12, 13 και 61. Πιθανή εξήγηση γι' αυτό είναι ότι τα κύτταρα που υφίστανται τις συγκεκριμένες αλλοιώσεις πολλαπλασιάζονται επιλεγόμενα έναντι άλλων που πιθανά φέρουν μεταλλάξεις σε διαφορετικές θέσεις³⁹. Οι μεταλλαγμένες p21 -δηλαδή οι ογκοπρωτεΐνες Ras- είτε στερούνται δράσης GTPάσης, είτε σε αυτές η αποδέσμευση του GTP από την p21 καθίσταται δυσχερής. Η αντικατάσταση π.χ. Γλυκίνης από Βαλίνη στο κωδικόνιο 12 του K-ras, που αποτελεί τη συχνότερη μετάλλαξη στα ras, προκαλεί δεκαπλάσια ελάττωση του ρυθμού υδρόλυσης GTP και ως εκ τούτου συσσώρευση των συμπλεγμάτων p21-GTP⁷⁷.

Οι μεταλλάξεις των γονιδίων ras ανιχνεύονται είτε με τη βοήθεια πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP), είτε με συνδυασμό ανάλυσης πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονής έλικας (SSCP) και ανάλυσης ετεροδίκλωνου DNA (heteroduplex), ακολουθούμενων από ανάλυση αλληλουχίας DNA (sequencing). Με τις τεχνικές αυτές, μεταλλάξεις των τριών γονιδίων έχουν περιγραφεί στους περισσότερους τύπους ανθρώπινου καρκίνου (**Πίνακας 2.1**). Η ανεύρεση σημειακών μεταλλάξεων του κωδικονίου 12 του K-ras στο 90% των αδενοκαρκινωμάτων παγκρέατος αποτελεί μία από τις ισχυρότερες συσχετίσεις γονιδιακής συμμετοχής στον ανθρώπινο καρκίνο. Οι μεταλλάξεις των K-ras και H-ras

αφορούν περισσότερο συμπαγείς όγκους, κυρίως αδενοκαρκινώματα και επιθηλιακά νεοπλάσματα αντίστοιχα, ενώ αυτές του N-ras απαντώνται ως επί το πλείστον σε αιματολογικές κακοήθειες. Συχνά ανευρίσκονται στον ίδιο τύπο καρκίνου μεταλλάξεις σε περισσότερα από ένα γονίδια της οικογένειας (π.χ. μεταλλάξεις των H-ras και K-ras σε καρκινώματα ήπατος και νεφρού, καθώς και των H-ras και N-ras σε καρκινώματα θυρεοειδούς αδένου). Μεταλλάξεις παρατηρούνται συχνότερα στο K-ras από ότι στα υπόλοιπα γονίδια της οικογένειας. Η ερμηνεία πηγάζει από τη θεώρηση του καρκίνου σαν υπερμεταλλακτικού φαινοτύπου, αποτελέσματος πολλαπλών μη ειδικών μεταλλάξεων, διάσπαρτων στο γονιδίωμα. Στατιστικά, επομένως, το πολύ μεγαλύτερο K-ras υφίσταται συχνότερα μεταλλαξογένεση.

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

Πίνακας 2.1. Συχνότητα ενεργοποίησης των γονιδίων ras σε καρκίνους διαφόρων οργάνων του ανθρώπου.

Στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα οι μεταλλάξεις του K-ras δημιουργούνται σε πρώιμα στάδια, υπό την επίδραση των καρκινογόνων του τσιγάρου και σχετίζονται με πτωχή πρόγνωση ⁷⁸. Μεταλλάξεις υποκατάστασης του συντηρητικού αμινοξέος κυστεΐνη στη θέση 186 του καρβοξυ-τελικού άκρου της p21 συνεπάγονται αδυναμία μετασχηματισμού κυττάρων, αφού δεν επιτρέπουν στην πρωτεΐνη να λάβει τη λειτουργική της θέση. Η παρατήρηση αυτή αποτέλεσε το έναυσμα προσπάθειας αξιοποίησης των γονιδίων ras για γονιδιακή θεραπεία, μέσω αναστολής της μεταγραφικής φαρνεσυλίωσης ⁷⁹. Οι μεταλλάξεις του K-ras στο παχύ έντερο συμβαίνουν αρκετά νωρίς κατά τη διαδικασία εξέλιξης του όγκου από αδένωμα σε καρκίνωμα ⁸⁰, προσφέροντας έτσι ένα διαγνωστικό μέσο πρώιμης ανίχνευσης της νόσου στα κόπρανα ασθενών ⁸¹.

2.2.8.2. Υπερέκφραση των ras

Ενεργοποίηση των ογκογονιδίων ras μέσω υπερέκφρασης έχει τεκμηριωθεί στις περισσότερες μορφές καρκίνου στον άνθρωπο (**Πίνακας 2.2**). Η αυξημένη έκφραση προκύπτει έπειτα από γονιδιακή επέκταση και παραγωγή πολλών αντιγράφων του γονιδίου στο κύτταρο ή από αλλοιώσεις ρυθμιστικών αλληλουχιών που καταλήγουν σε απώλεια της μεταγραφικής ρύθμισης. Στη δεύτερη περίπτωση συγκαταλέγονται μετατοπίσεις περιοχών λόγω εναλλακτικού ματίσματος, ενσωμάτωση ιικών αλληλουχιών στις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου ή αυξημένη πρόσδεση στις τελευταίες μεταλλαγμένου ή υπερπαραγώμενου μεταγραφικού παράγοντα. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η απρόσφορη παραγωγή φυσιολογικής δομικά πρωτεΐνης p21. Το φαινόμενο ανιχνεύεται είτε σε επίπεδο mRNA, με υβριδισμό κατά Northern ή συνδυασμό αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση σε πραγματικό χρόνο, (real-time RT-PCR), είτε σε επίπεδο πρωτεΐνης με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους ή υβριδισμό κατά Western.

Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στον καρκίνο του πνεύμονα τα ογκογονίδια ras ενεργοποιούνται μέσω υπερέκφρασης σε διαφορετικό ιστολογικό τύπο απ' ότι με μεταλλάξεις ⁸². Η υπερέκφραση του ras στον πνεύμονα αποτελεί όψιμο γεγονός, σε αντίθεση με άλλες θέσεις εντόπισης καρκίνου όπου συμβαίνει πρώιμα (κεφαλή και τράχηλος, ουροδόχος κύστη). Η αυξημένη έκφραση του γονιδίου H-ras συσχετίζεται με τα επίπεδα πρόσδεσης στους αντίστοιχους υποδοχείς. Αυτό συμβαίνει με τα ρυθμιστικά στοιχεία της p53 και τους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών και οιστρογόνων σε γυναικολογικούς καρκίνους ⁸³. Η σύνδεση της p53 με το ρυθμιστικό

της στοιχείο συνεπάγεται αυξημένη έκφραση τόσο της p21, όσο και της ίδιας της φυσιολογικής p53⁸⁴. Στον καρκίνο του μαστού η υπερέκφραση των γονιδίων ras αποτελεί πρώιμο ογκογενετικό γεγονός⁸⁵ και η ανοσοϊστοχημική έκφραση της p21 σχετίζεται με δυσμενή πορεία νόσου⁸⁶, εν αντιθέσει με τη συσχέτιση του φαινομένου με ευνοϊκή πρόγνωση σε περιπτώσεις νευροβλαστώματος⁸⁷.

Τύπος Ογκου	Γονίδιο	Συχνότητα (%)
Λάρυγγας	H-ras , K-ras, N-ras	100
Ενδομήτριο	ras *	92
Λεπτό έντερο	ras	85
Νευροβλάστωμα	ras	80
Ωοθήκες	ras	78
Λευχαιμίες	H-ras , K-ras, N-ras	77
Ουροδόχος κύστη	H-ras , K-ras, N-ras	73
Πνεύμονας	ras	72
Μαστός	H-ras , K-ras, N-ras	67
Ήπαρ	ras	60
Θυρεοειδής	ras	55
Κεφαλή-τράχηλος	H-ras , K-ras	54
Οισοφάγος	H-ras	40
Στόμαχος	ras *	35
Παχύ έντερο	K-ras, H-ras	31

Πίνακας 2.2. Υπερέκφραση των γονιδίων ras σε καρκίνους διαφόρων οργάνων του ανθρώπου.

2.3. Λειτουργικός ρόλος των ras

Τα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση ηρεμίας (G0) έχουν γενωμικό περιεχόμενο DNA 2N, όπως επίσης και αυτά που βρίσκονται στη φάση G1, γεγονός που πιθανολογεί ότι ο διακόπτης που κινεί τον εξελικτικό μηχανισμό βρίσκεται στη φάση G0. Αρχικές παρατηρήσεις του Pardee έδειξαν ότι υπάρχει ένα «παράθυρο» στη φάση G1, όπου οι παράγοντες του ορού είναι απόλυτα απαραίτητοι για την περαιτέρω εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου⁸⁸. Αμέσως μετά, ακολουθεί ένα άλλο σημείο όπου το κύτταρο χάνει πλέον την εξάρτηση που έχει από τους εξωκυττάριους παράγοντες για να προχωρήσει στον κυτταρικό κύκλο (αυτό ονομάστηκε σημείο R). Σε ινοβλάστες ποντικού το R

βρίσκεται δύο περίπου ώρες πριν την έναρξη της φάσης S, ενώ σε πουλερικά βρέθηκε ότι το R βρίσκεται κατά το μέσο προς το τέλος της φάσης G1^{89, 90}.

Για να διπλασιαστεί ένα κύτταρο πρέπει να διπλασιαστεί το DNA του, αλλά και όλη η βιομάζα του. Αυτό προϋποθέτει ότι υπάρχουν κάποιοι συγχρονισμένοι μηχανισμοί ελέγχου του χρωμοσωμικού κύκλου και της κυτταρικής σύνθεσης πρωτεϊνών. Έτσι όταν σε πειράματα εφαρμόστηκαν πριν το σημείο R εξωγενείς ουσίες που μπορούσαν να σταματήσουν το διπλασιασμό του DNA και την σύνθεση πρωτεϊνών, το κύτταρο διέκοπτε τον κυτταρικό κύκλο, ενώ όταν οι ίδιες ουσίες εφαρμόζονταν μετά το σημείο R, το κύτταρο συνέχιζε τον κύκλο του μέχρι να ξαναβρεθεί στο επόμενο σημείο R. Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι απαιτείται επαρκής βιοσυνθετική ικανότητα αλλά και εξωγενείς παράγοντες για να περάσει το κύτταρο το σημείο R και να εκτελέσει διπλασιασμό^{89, 90}. Δεν έχει απαντηθεί ακόμα σαφώς το ερώτημα, αν τα μιτωγόνα ερεθίσματα δρουν ταυτόχρονα και ανεξάρτητα σε πολλά σημεία, ή μόνο σε ένα, που αργότερα προκαλεί τη συνεργατική ρύθμιση και άλλων σημείων.

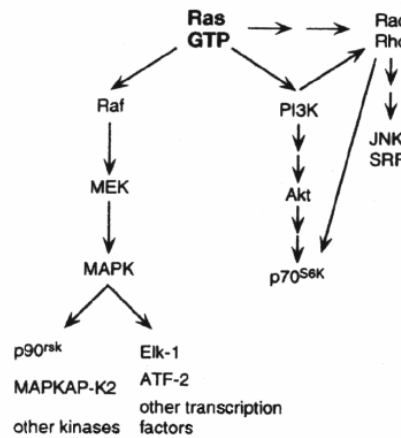
2.4. Οδοί μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται από τα ras

Η πιο εκτενώς μελετημένη οδός μεταγωγής σήματος από τα ras προς το εσωτερικό του κυττάρου, σχετίζεται με τη Raf-1, την κινάση της μιτωγόνου ενεργοποιούσας πρωτεϊνικής κινάσης (mitogen activating protein kinase kinase, ή MAPKK, ή MEK1) και τις μιτωγόνα ενεργοποιούσες πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs) [ή αλλιώς εξωκυττάρειες κινάσες ρυθμιστών σήματος (extracellular signal-regulated kinases, ή ERKs)] (**Εικόνα 2.5**). Η Raf είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που αλληλεπιδρά ειδικά και ενεργοποιείται από τον σύνδεσμο GTP-p21^{ras}. Παραμένει ασαφής ο μηχανισμός με τον οποίο η ras ενεργοποιεί την Raf-1. Φωσφορυλίωση σερίνης της MEK1 από την Raf-1, οδηγεί σε ενεργοποίηση αυτής (της MEK1), που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει υπολείμματα τυροσίνης και θρεονίνης στην MAPK και την ενεργοποιεί⁹¹. Περιφερικότερα της MAPK βρίσκεται η p90 ριβοσωμική S6 κινάση (p90^{S6k}) και μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο τριμερής παράγων συμπλέγματος (ternary complex factor, ή TCF). Ο TCF δρα μαζί με παράγοντα ανταπόκρισης ορού (serum response factor, ή SRF) για να προάγει την μεταγραφή υποκινητών που περιέχουν στοιχεία ανταπόκρισης ορού (serum response element, ή SRE), όπως είναι αυτό του αμέσως πρώιμου γονιδίου c-fos (immediate early gene)⁹². Ως εκ τούτου,

τουλάχιστον σ' αυτή την περίπτωση το μονοπάτι Ras/Raf/MEK/MAPK συνδέει τα μιτωγόνα σήματα της G0/G1 με την άμεση πρώιμη απάντηση ⁹⁰.

Μία άλλη οδός μεταγωγής σήματος των ras, εμπλέκει το RalGDS (ένα παράγοντα ανταλλαγής υπεύθυνο για την ενεργοποίηση των Ral GTPασών), την φωσφατιδυλινοσιτόλη 3-κινάση (PI3K) και πιθανά την p120GAP (ενεργοποιό πρωτεΐνη GTPασών, GTPase activating protein). Από τα παραπάνω είναι σημαντικό να συγκρατήσουμε ότι τα ras, εκτός του ότι επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο, επηρεάζουν και πολλές άλλες βιολογικές λειτουργίες, όπως τη διαφοροποίηση, τη μορφολογία των κυττάρων και την απόπτωση.

Εξαιτίας των διαφόρων διακλαδώσεων αλλά και επικαλύψεων των ενδοκυττάρων οδών, είναι δύσκολο να εκτιμηθεί με σαφήνεια η λειτουργία των ras.



Εικόνα 2.6. Σχηματική αναπαράσταση μερικών οδών μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται από την πρωτεΐνη ras. Ο καταρράκτης Raf/MEK/MAPK κινάσης καταλήγει τελικά στη ρύθμιση της μεταγραφής, προκαλώντας τη φωσφορυλίωση και άλλων κινασών που εμπλέκονται στον έλεγχο της αύξησης. Οι οδοί διαμέσου του Rac και του Rho οδηγούν στην ενεργοποίηση του JNK και του αυξητικού παράγοντα του ορού (SRF). Η ενεργοποίηση της p70^{S6k} είναι εξαρτώμενη από το PI3K ⁹⁰.

2.5. Η συνεργική δράση των γονιδίων

Η εξαλλαγή των κυττάρων οδηγεί μεταξύ άλλων και στον αρρύθμιστο πολλαπλασιασμό τους. Το $p16^{INK4a}$ βρίσκεται μεταλλαγμένο (υπολειπόμενο) σε πολλά είδη καρκίνου του ανθρώπου. Η απενεργοποίηση του σχετίζεται με την αθανατοποίηση των κυττάρων, που σε ένα δεύτερο βήμα μπορούν να μετασχηματιστούν εξαιτίας της ενεργοποίησης του *ras*⁹³. Μια περιεργη παρατήρηση ήταν ότι η έκτοπη έκφραση ογκογονιδίου *ras* σε ινοβλάστες ανθρώπου και ποντικού, προκαλούσε μόνιμα αναχαίτιση της προόδου της G1 φάσης και χαρακτηριστικά γήρανσης στα κύτταρα⁷². Όταν όμως ταυτόχρονα απουσίαζε η φυσιολογική έκφραση του *p53*, ή του $p16^{INK4a}$, τότε τα κύτταρα άρχιζαν να εξαλλάσσονται^{72, 93}. Αυτό δείχνει ότι τα ανωτέρω γονίδια πρέπει να συνεργάζονται για να χαθεί η φυσιολογική ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και ότι το κύτταρο από μόνο του έχει μια αυτο-προστατευτική ικανότητα απέναντι στο μεταλλαγμένο *ras*. Η ικανότητα αυτή οφείλεται εν μέρει στους αναστολείς CDK.

Επιπρόσθετα βρέθηκε ότι η θέση *INK4a* περιέχει δύο εναλλακτικά πρώτα εξώνια (το $E1_{\alpha}$ και το $E1_{\beta}$) και ένα δεύτερο εξώνιο⁹⁴. Το μετάγραφο που χρησιμοποιεί το $E1_{\alpha}$ είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του $p19^{ARF}$, ενώ αυτό που χρησιμοποιεί το $E1_{\beta}$ παράγει το $p16^{INK4a}$. Μεταξύ τους δεν υπάρχει ομολογία. Τα στοιχεία που προέκυψαν από τη μελέτη της λειτουργίας των ανωτέρω εναλλακτικών μεταγράφων, δείχνουν ότι είναι απαραίτητη η απώλεια του $p19^{ARF}$, του *p53* και πιθανόν του $p16^{INK4a}$ για να μετασχηματιστούν τα κύτταρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Τα γονίδια Raf

3.1. Εισαγωγή

Τα γονίδια Raf αρχικά προσδιορίστηκαν ως ογκογονίδια σε ρετροϊούς που είναι οι αιτιολογικοί παράγοντες όγκων σε ποντίκια και κοτόπουλα ⁹⁵⁻⁹⁷. Οι προσπάθειες να αναγνωριστούν οι ενεργοποιημένες μορφές των γονιδίων RAF στους ανθρώπινους καρκίνους, δεν παρουσίασαν καμία σημαντική συσχέτιση. Αντιθέτως, το κίνητρο για την μελέτη των Raf πρωτεϊνών στους ανθρώπινους όγκους, ήταν η ανακάλυψη ότι αυτές αποτελούν τελεστές-κλειδιά των πρωτεϊνών Ras ⁹⁸, οι ογκογόνες μεταλλάξεις των οποίων εντοπίζονται σε ένα μεγάλο ποσοστό των ανθρώπινων όγκων ⁶⁵.

Το γονίδιο BRAF (*v-raf*, murine sarcoma viral oncogene homologue B1, location 7q34) αποτελεί ένα πρωτο-ογκογονίδιο, κινάση σερίνης/θρεονίνης. Οι πρωτεΐνες Raf παίζουν κεντρικούς ρόλους στο συντηρημένο μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK, συμμετέχοντας στη μεταφορά μιτογόνων σημάτων από τις ενεργοποιημένες πρωτεΐνες Ras διαμέσου των κινάσων MAPK/ERK kinase 1/2 (MEK1/2) στις MAP κινάσες p42/p44 ή ERK1/2, τα βασικά στελέχη αυτού του μοριακού μονοπατιού ^{91, 99}. Πρόσφατες μελέτες επιβεβαίωσαν την παρουσία ενεργοποιών μεταλλάξεων στο γονίδιο BRAF σε 70% των ανθρώπινων κακοήθων μελανωμάτων και σε 15% των ανθρώπινων καρκίνων του παχέως εντέρου ¹⁰⁰. Η συναρπαστική αυτή πρόοδος αποτελεί την πρώτη φορά που οι πρωτεΐνες Raf ξεχωρίζουν από τις Ras αναφορικά με την ανάπτυξη ανθρώπινων όγκων. Ενώ από μόνες τους οι *BRAF* μεταλλάξεις μπορεί να μην αποτελούν την κύρια αιτία των καρκίνων, η υψηλή συσχέτιση τους με τα κακοήθη μελανώματα προτείνει ότι η απόκτηση *BRAF* μεταλλαγών είναι πιθανώς απαραίτητη για την ανάπτυξη αυτών των όγκων.

Για πολλούς, αποτέλεσε έκπληξη το γεγονός ότι οι μελέτες κατά του καρκίνου αναγνώρισαν το B-Raf και όχι το ομόλογό του Raf-1, το οποίο παραδοσιακά θεωρούταν ως η πιο σημαντική από τις Raf πρωτεΐνες για την μεταγωγή των σημάτων από τις Ras και για την ενεργοποίηση των MEK/ERK. Λαμβάνοντας υπόψιν δύο πρόσφατα αποτελέσματα, δεν θα έπρεπε να αποτελεί και τόσο μεγάλη έκπληξη το *BRAF*. Αρχικά, μελέτες σε ποντίκια με στοχευμένες γενετικές μεταλλάξεις στα γονίδια *raf* έδειξαν ότι η Raf-1 είναι περιττή για την ενεργοποίηση των MEK/ERK και ότι η B-Raf φαίνεται να είναι ο ενεργοποιητής-κλειδί των MEK/ERK στους περισσότερους ιστούς και τύπους

κυττάρων^{101, 102}. Δεύτερον, μελέτες στον μηχανισμό ρύθμισης της ενεργοποίησης της B-Raf, έχουν δείξει ότι στις πρωτεΐνες B-Raf λαμβάνουν μέρος φωσφορυλιώσεις σε θέσεις κλειδιά που τις προδιαθέτουν να έχουν μεγαλύτερη ενεργότητα απέναντι στην MEK, απ'ότι η Raf-1^{103, 104}. Τα μέχρι τώρα στοιχεία δείχνουν ότι ο B-Raf ισότυπος έχει διαφορετικές ιδιότητες που τον ξεχωρίζουν από τους Raf-1 και A-Raf. Οι διαφορετικές αυτές ιδιότητες μπορούν να εξηγήσουν γιατί είναι αυτή και όχι οι άλλες δύο πρωτεΐνες Raf, που συσχετίζεται με την ανάπτυξη του όγκου.

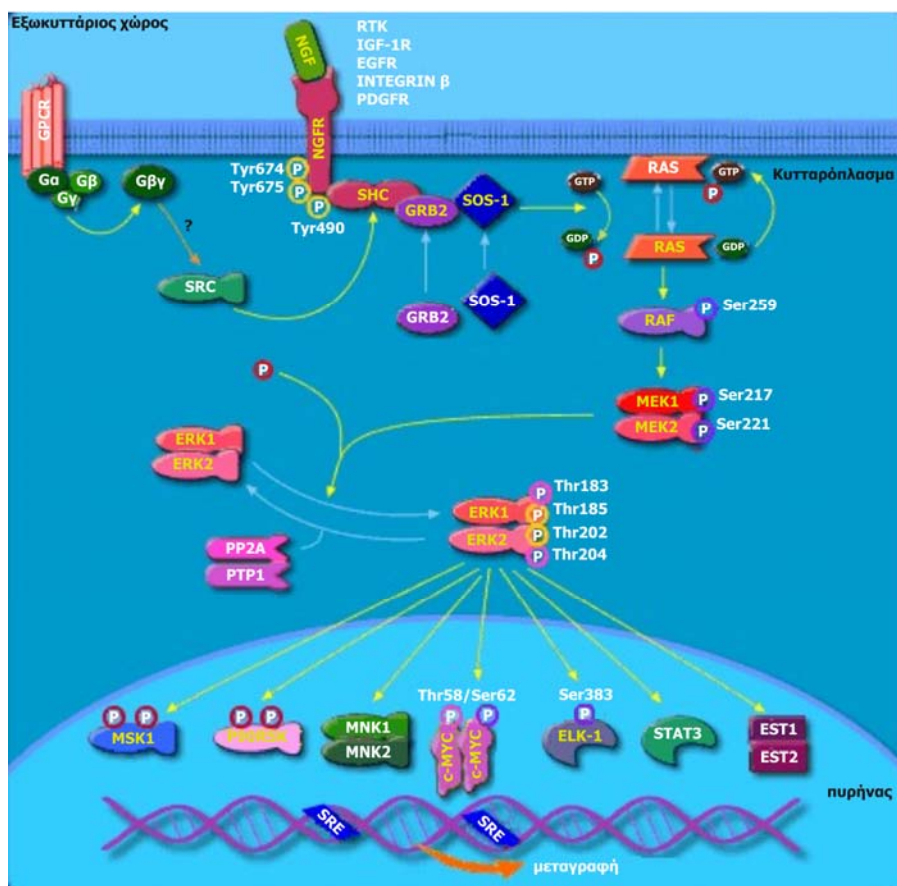
3.2. Πρωτεΐνες Raf και νεοπλασματικές νόσοι

3.2.1. Πρωτεΐνες Raf ως επιτελείς των ογκογονιδίων Ras σε ανθρώπινες νεοπλασίες

Περίπου το 30% των ανθρώπινων νεοπλασιών περιέχουν μεταλλάγες σε ένα από τα τρία γονίδια Ras: τα *K-ras*, *N-ras* και *H-ras*⁶⁵. Το γονίδιο *K-ras* είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο μέλος της οικογένειας, και οι μεταλλάγες του αναφέρονται σε ποσοστό 70-90% των αδενοκαρκινωμάτων του παγκρέατος, περίπου στο 50% των καρκινωμάτων του παχέως εντέρου και σε 25-50% των αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονος. Οι *ras* μεταλλάγες παρατηρούνται επίσης σε ένα μεγάλο αριθμό σποραδικών και χημικά επαγόμενων όγκων στα ποντίκια¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Οι παρανοηματικές μεταλλάξεις του *K-ras* επηρεάζουν τα κωδικόνια 12, 13 και 61 και όλες τους συσχετίζονται με αυξημένα επίπεδα της Ras-GTP και την ιδιοσυστατική ενεργοποίηση των κάτωθεν σηματοδοτικών μονοπατιών.

Τα ενεργοποιημένα αλληλόμορφα *ras* είναι γνωστό ότι ενεργοποιούν πολλαπλά καθοδικά σηματοδοτικά μοριακά μονοπάτια, όμως σήμερα το καλύτερα χαρακτηρισμένο από αυτά είναι το μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK (**Εικόνα 3.1**). Το μονοπάτι είναι οργανωμένο ως καταρράκτης στον οποίο οι πρωτεΐνες Raf ενεργοποιούνται κατά τρόπο εξαρτώμενο από τις Ras. Μόλις ενεργοποιηθούν, δύνανται να φωσφορυλιώσουν και να ενεργοποιήσουν τις MEK1/2, οι οποίες στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις ERK1/2 (p44/p42 MAPKs)^{91, 99}. Οι ERKs έχουν πολλές πρωτεΐνες-υποστρώματα που εντοπίζονται σε διαφορετικά μέρη μέσα στο κύτταρο, συμπεριλαμβανομένων μεταγραφικών παραγόντων, ριβοσωμικών πρωτεϊνών, ενζύμων και πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού που μπορούν να επηρεάσουν την μοίρα του κυττάρου^{108, 109}. Μέσω της φωσφορυλίωσης αυτών των διαφόρων υποστρωμάτων, οι ιδιοσυστατικά ενεργές ERKs μπορούν να επηρεάζουν πολλά από τα ορόσημα στον καρκίνο, όπως αυτά ορίζονται από τους Hanahan και Weinberg¹¹⁰. Μια

ευρεία σειρά παρεγχυματικών όγκων όπως είναι οι όγκοι του παγκρέατος, του παχέως εντέρου και του πνεύμονα, που περιέχουν ενεργοποιημένα αλληλόμορφα ras, είναι γνωστό πως εκφράζουν σημαντικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ERK ¹¹¹. Η συνεχής ενεργοποίηση της Raf-1 έχει επίσης παρατηρηθεί σε ορισμένα καρκινικά δείγματα που φέρουν ενεργοποιημένα αλληλόμορφα ras, αλλά όχι σε όλα ¹¹². Η ενεργότητα της B-Raf στις νεοπλασίες δεν έχει μελετηθεί αρκετά έως σήμερα. Η Raf είναι επίσης ενεργοποιημένη στα καρκινικά κύτταρα που περιέχουν ενισχυμένα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως οι καρκίνοι του μαστού ¹¹³.



Εικόνα 3.1. Το σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK.

3.2.2. B-Raf μεταλλάξεις σε ανθρώπινους όγκους

Μετά από την ανακάλυψη των raf γονιδίων ως ογκογονιδίων στα ποντίκια και τα κοτόπουλα, έγιναν πολλές προσπάθειες για να συνδεθούν οι ενεργοποιούσες μεταλλάξεις στα ανθρώπινα γονίδια, με τους ανθρώπινους όγκους ¹¹⁴. Οι προσπάθειες

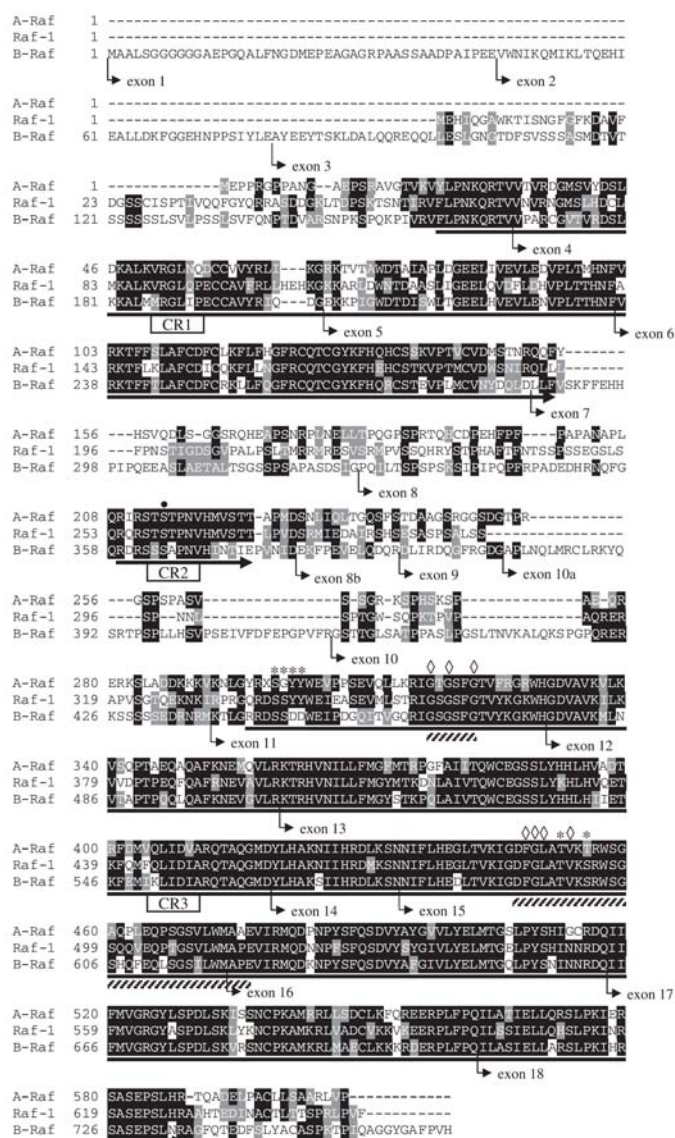
αυτές βασίστηκαν είτε σε Southern blot ανάλυση για να εντοπίσουν ανακατατάξεις στο DNA στα δείγματα των όγκων, ανάλυση χρωμοσωμικών αναδιατάξεων για τον εντοπισμό αλληλικών αλλαγών κοντά στο γονίδιο *RAF1* του ανθρώπινου χρωμοσώματος 3, είτε πειράματα μετασχηματισμού της σειράς NIH3T3 χρησιμοποιώντας ανθρώπινο ογκογόνο DNA για τον εντοπισμό ογκογόνων μορφών του *RAF1* στα δείγματα των νεοπλασιών. Καμία από αυτές τις προσπάθειες δεν ανίχνευσε σταθερές αναδιατάξεις στο DNA στους ίδιους τύπους καρκίνων. Οι λόγοι γι' αυτό είναι πλέον γνωστοί, και οφείλονται εν μέρει στο γεγονός ότι οι τεχνικές αυτές δεν ήταν αρκετά ευαίσθητες για να εντοπίσουν μια μόνο σημειακή μεταλλαγή, καθώς επίσης και στο γεγονός ότι οι περισσότερες προσπάθειες κατευθύνονταν προς το γονίδιο *RAF1*, παρά προς το πιο ογκογόνο γονίδιο *BRAF*. Η πρόοδος τεχνικών όπως η αλληλούχιση (sequencing) παρέχει πλέον ένα πολύ πιο δυναμικό τρόπο εντοπισμού μικρών αλλαγών στα δείγματα ανθρώπινων όγκων, και αυτή η δουλειά έχει πλέον αναγνωρίσει ενεργοποιούσες σημειακές μεταλλαγές *BRAF* στους ανθρώπινους όγκους¹⁰⁰.

Οι Davies et al. εφάρμοσαν sequencing για να σαρώσουν 923 καρκινικά δείγματα και αναγνώρισαν παρανοηματικές μεταλλάξεις (missense mutations) στο γονίδιο *BRAF* σε περίπου 70% των ανθρώπινων κακοήθων μελανωμάτων και σε 15% των καρκίνων του παχέως εντέρου. Μεταλλαγές εντοπίστηκαν επίσης σε χαμηλό ποσοστό σε γλοιώματα, καρκίνους του πνεύμονα, σαρκώματα, καρκίνους των ωοθηκών, καρκίνους του μαστού και του παγκρέατος. Δεν εντοπίστηκε καμία *RAF1* μεταλλαγή σε σύνολο 545 καρκινικών κυτταρικών σειρών. Ογδόντα εννέα τις εκατό των *BRAF* μεταλλαγών κωδικοποιούν για αμινοξικές αλλαγές μέσα στο τμήμα ενεργοποίησης (activation segment), το 92% από τις οποίες είναι η μετάλλαξη V600E (T-A αλλαγή στο νουκλεοτίδιο 1799) (**Εικόνα 3.2**). Η μετάλλαξη αυτή παλαιότερα ονομαζόταν T1796A, βασιζόμενη στη νουκλεοτιδική αλληλουχία NM_004333 του NCBI GenBank, το οποίο είχε παραλείψει ένα κωδικόνιο στο εξόνιο 1 του γονιδίου. Με τη νέα έκδοση (NCBI GenBank nucleotide sequence NT_007914) αναγνωρίστηκε η μετάλλαξη V600E (T1799A). Η μεταλλαγμένη μορφή V600E έχει 12,5 φορές μεγαλύτερη δραστικότητα κινάσης. Άλλες μεταλλαγές που εντοπίστηκαν μέσα στην θηλειά ενεργοποίησης (activation loop) σε μικρότερη συχνότητα, είναι οι V599D, L596V, L596R, G595R και F594L. Έντεκα τις εκατό των μεταλλαγών εντοπίζονται στα αμινοξέα γλυκίνης του μοτίβου GXGXXG στο G loop στην ATP-binding περιοχή της περιοχής κινάσης, επηρεάζοντας τα αμινοξέα G463, G465 και G468 (**Εικόνα 3.2**). Άλλες μεταλλαγές που αναγνωρίζονται έξω από αυτές τις περιοχές είναι οι: E585K, R681Q, I1325T και A727V. Μια πρόσφατη μελέτη εκτίμησε το χρόνο εμφάνισης των *BRAF*

μεταλλαγών κατά τη μελανοκυτταρική νεοπλασία, και έδειξε ότι οι V600E μεταλλαγές βρίσκονται στο 82% των πρωταρχικών μελανωμάτων και το 82% των παενί, τα οποία είναι οι πρώτες βλάβες που συσχετίζονται με την ανάπτυξη των μελανωμάτων ¹¹⁵.

Σε μια άλλη μελέτη με όγκους του παχέως εντέρου, οι Rajagoralan et al. ¹¹⁶ εντόπισαν *BRAF* μεταλλαγές σε 32/330 (10%) δείγματα. Είκοσι οκτώ από αυτά τα 32 δείγματα περιείχαν την μεταλλαγή V600E κι ένα άλλο περιείχε μια μετάλλαξη στο activation loop, στο αμινοξύ K601E. Οι υπόλοιπες μεταλλαγές αντιπροσωπεύουν την G463E που υπάρχει μέσα στο G loop και δυο άλλες που είναι έξω από αυτό, αλλά σε γειτνίαση με το G loop, στα R461I και I462S. Στη μελέτη των Yuen et al. ¹¹⁷, οι *BRAF* μεταλλαγές εντοπίστηκαν σε 16/389 (4%) δείγματα καρκίνου του παχέως εντέρου, τα μισά από τα οποία ήταν μεταλλαγές V600E. Πέντε από τις μεταλλαγές ήταν επίσης μέσα στο activation segment και δυο μέσα στο G loop. Σε ένα σάρωμα 179 μη-μικροκυτταρικών καρκίνων του πνεύμονα, οι *BRAF* μεταλλάξεις εντοπίστηκαν σε 5 δείγματα (3%), από τα οποία μόνο ένα περιείχε την V600E μετάλλαξη ¹¹⁸. Επίσης εντοπίστηκαν μια μεταλλαγή στο activation segment στο L596R και μια στο G loop στο G465V, σε 2/127 (1.5%) αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα ¹¹⁹. Καθώς η αλληλουχία του γονιδίου *BRAF* διαβάζεται σε όλο και περισσότερα δείγματα καρκίνου, είναι πιθανό να αναγνωριστούν στο μέλλον επιπλέον *BRAF* μεταλλάξεις σε ένα μεγαλύτερο εύρος καρκίνων.

Λιγότερο από το 1% των δειγμάτων καρκίνου με *BRAF* μεταλλαγές έχουν ταυτόχρονες *RAS* μεταλλαγές και από το 1% που έχουν μεταλλαγές και στα δύο γονίδια, οι μεταλλάξεις στο *BRAF* είναι σχεδόν αποκλειστικά μη-V600E ^{100, 116, 117}. Παρόλα αυτά, οι καρκινικοί τύποι με *BRAF* μεταλλάξεις είναι παρόμοιες με αυτούς που φέρουν *RAS* μεταλλαγές, και στους καρκίνους του παχέως εντέρου, αμφότερα τα γονίδια είναι μεταλλαγμένα σε υψηλή συχνότητα στους ίδιους τύπους των προκακοήθων βλαβών με ανεπάρκεια στην επιδιόρθωση των λανθασμένων ζευγών βάσεων και στο ίδιο στάδιο της μετάβασης από αδένωμα σε καρκίνωμα ^{116, 117}. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, προτάθηκε ότι τα γονίδια *BRAF* και *KRAS* είναι ισοδύναμα ως προς τις ογκογονικές τους δράσεις ¹⁰⁰. Οι ογκογόνες *RAS* μεταλλάξεις και η *BRAF* V600E μεταλλαγή, προκαλούν την συνεχή ενεργοποίηση της ERK, μόλις εκφραστούν σε ιστική κυτταροκαλλιέργεια cDNAs, τα οποία κωδικοποιούν τις μεταλλαγμένες εκδοχές. Αυτή η παρατήρηση αποτέλεσε στοιχείο του ότι και τα δύο ογκογονίδια συνδέονται με την ανάπτυξη ανθρώπινων όγκων, μέσω της απορύθμισης της ενεργότητας της ERK.



Εικόνα 3.2. Σύγκριση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των ανθρώπινων πρωτεϊνών Raf. Με μαύρα βέλη υπογραμμίζονται οι τρεις συντηρητικές περιοχές (conserved regions) CR1-3. Τα υπογραμμισμένα με μαύρο αμινοξέα είναι ταυτόσημα και τα υπογραμμισμένα με γκρι είναι παρόμοια. Δηλώνονται τα εξόνια 1-18 για το B-Raf συμπεριλαμβανομένων των εξονίων 8b και 10a τα οποία ματίζονται σε ορισμένες μορφές του B-Raf (η αρίθμηση δεν συμπεριλαμβάνει αυτά τα επιπλέον αμινοξέα). Τα σημαντικά ρυθμιστικά σημεία φωσφορυλίωσης του B-Raf δηλώνονται με (*), ενώ τα ανασταλτικά σημεία φωσφορυλίωσης με (•) και τα αμινοξέα του B-Raf που είναι μεταλλαγμένα στους ανθρώπινους καρκίνους με (◇). Το μοτίβο GXGXXG και το τμήμα ενεργοποίησης (activation segment) δηλώνονται με διαγραμμισμένες μπάρες.

3.3. Έκφραση των πρωτεϊνών Raf

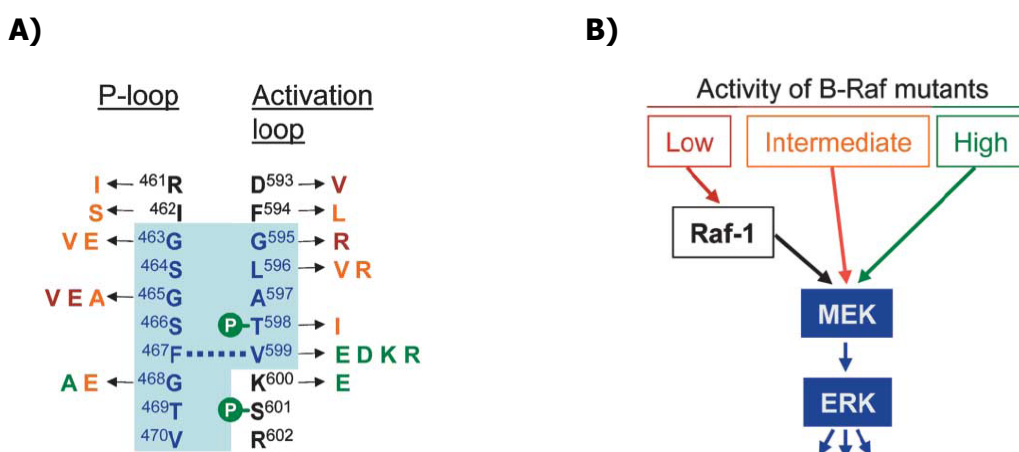
Η πρωτεΐνη Raf-1 εκφράζεται ευρέως σε υψηλά επίπεδα στους περισσότερους τύπους ιστών και κυττάρων¹¹⁴. Η πρωτεΐνη A-Raf εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε ιστούς που περιλαμβάνουν το ουρογεννητικό σύστημα αλλά επίσης είναι ανιχνεύσιμη και σε πολλούς άλλους ιστούς και κυτταρικές σειρές^{114, 120}. Αντιθέτως, η πρωτεΐνη B-Raf εμφανίζει αυστηρό πρότυπο έκφρασης. Εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε νευρωνικό ιστό, και γι' αυτό τον λόγο οι περισσότερες μελέτες του B-Raf εστιάζονται σε κυτταρικές σειρές νευρωνικής προέλευσης. Επιπλέον, η πρωτεΐνη B-Raf είναι ανιχνεύσιμη στους όρχεις και τον σπλήνα.

Παρά τα ποικίλα επίπεδα έκφρασης, το γονίδιο *B-raf* με διαφορετικό μάτισμα μπορεί να παραγάγει τουλάχιστο 10 διαφορετικές ισομορφές, οι οποίες εκφράζονται ποικιλοτρόπως σε διαφορετικούς ιστούς ενήλικων ποντικών¹²¹. Αυτές προκύπτουν μέσω διαφορετικού ματίσματος (splicing) των εξονίων 8b και 10a, κι επίσης από την παρουσία δύο διαφορετικών N άκρων για την B-Raf, οδηγώντας σε ισομορφές οι οποίες ποικίλλουν σε μέγεθος από 67 έως 99 kDa (**Εικόνα 3.2**). Οι μεγάλες μορφές της B-Raf περιέχουν επιπλέον 115 αμινοξέα που κωδικοποιούνται από τα εξόνια 1, 2 και μέρος του εξονίου 3. Δεν είναι σαφές εάν αυτά τα διαφορετικά άκρα προκύπτουν από τη χρήση διαφορετικών υποκινητών, από τη χρήση διαφορετικών εναρκτήριων σημείων μετάφρασης και των ίδιων υποκινητών, ή από διαφορετικό μάτισμα. Το εξόνιο 8b αντιπροσωπεύει μια σειρά 36 νουκλεοτιδίων ανάμεσα στα εξόνια 8 και 9 που είναι in frame με την κωδική αλληλουχία του *B-raf* (**Εικόνα 3.2**). Εκδοχές του *B-raf* cDNA που περιέχει αυτό το εξόνιο εντοπίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα, την καρδιά, τις ωοθήκες, τους όρχεις και τον σπλήνα. Το εξόνιο 10a αντιπροσωπεύει 102 νουκλεοτίδια ανάμεσα στα εξόνια 9 και 10, και παρουσιάζει ένα πιο αυστηρό πρότυπο έκφρασης, η οποία είναι πιο υψηλή στον νευρωνικό ιστό. Οι εκδοχές της κοντής μορφής της B-Raf δεν συσχετίζονται ποτέ με την παρουσία του εξονίου 10a¹²¹.

Ενώ η πρωτεΐνη B-Raf είναι μόλις ανιχνεύσιμη σε πολλούς ιστούς, τα μετάγραφα mRNA είναι σαφώς παρόντα¹²¹. Εντούτοις, η έως τώρα εμπειρία έχει δείξει ότι ακόμα και αν η πρωτεΐνη εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα, μπορεί να έχει σημαντική ικανότητα MEK κινάσης. Σημείο αναφοράς αποτελούν οι εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικών (MEFs). Η πρωτεΐνη B-Raf είναι μόλις ανιχνεύσιμη σε αυτά τα κύτταρα, ενώ τόσο η Raf-1 όσο και η A-Raf εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα. Παρά αυτό, η B-Raf έχει ένα σημαντικά υψηλότερο επίπεδο βιοχημικής δραστηριότητας από τις άλλες δύο πρωτεΐνες και φαίνεται να είναι ο σημαντικότερος παράγοντας ενεργοποίησης των

MEK/ERK έπειτα από διέγερση από αυξητικούς παράγοντες ¹²². Αναφορικά με τα μελανοκύτταρα και το κακοήθες μελάνωμα, δεν είναι γνωστό εάν η B-Raf εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε αυτά τα κύτταρα ή όχι, και δεν είναι επίσης γνωστό ποιά συγκεκριμένη ισομορφή της B-Raf εκφράζεται. Είναι γνωστό ότι η B-Raf είναι ενεργή στα μελανοκύτταρα και είναι ένας σημαντικός ενεργοποιητής των MEK/ERK σε αυτά τα κύτταρα ¹²³.

Οι Wan et al. ¹²⁴ βρήκαν ότι σχεδόν όλες οι μεταλλαγμένες μορφές της B-RAF (>80%) εντοπίζονται είτε εντός του P loop, είτε εντός του activation segment, μέσα στο μοτίβο DGF ή δίπλα σε αυτό. Κατόπιν, ταξινόμησαν τις μεταλλαγμένες μορφές της B-RAF σε ομάδες υψηλής, ενδιάμεσης ή ελαττωμένης ενεργότητας, ανάλογα με την ικανότητα τους να διεγείρουν in vitro, την ενεργότητα κινάσης της B-RAF (**Εικόνες 3.3 (B)** και **3.4 (B)**).



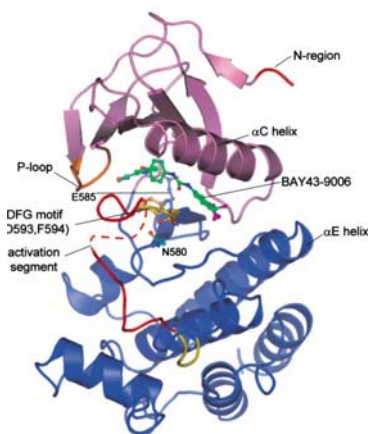
Εικόνα 3.3. Ενεργοποίηση της B-Raf μέσω μετάλλαξης. A) Οι B-Raf μεταλλαγές συγκεντρώνονται στο P loop και το activation loop. Οι βρόγχοι αυτοί αλληλεπιδρούν μέσω μιας υδρόφοβης επιφάνειας (μπλε σκιά) συμπεριλαμβανομένης μιας σημαντικής επαφής ανάμεσα στα F467 και V599 (πλέον F468 και V600). Υποδεικνύονται οι ενεργοποιές φωσφορυλιώσεις στα T598 και S601. Οι μεταλλάξεις που αναλύθηκαν από τους Wan et al. είναι κωδικοποιημένες με χρώματα (κόκκινο, χαμηλής ενεργότητας, πορτοκαλί, ενδιάμεσης ενεργότητας, πράσινο, υψηλής ενεργότητας). **B)** Τα χαμηλής ενεργότητας B-Raf mutants διεγείρουν την ERK διαμέσω της Raf-1.

Η ομάδα υψηλής ενεργότητας υπερέβαινε την ενεργότητα της wild type B-RAF 100-έως 700-φορές, με την μεταλλαγή V600E να είναι ενεργοποιημένη κατά 460 φορές. Η ομάδα ενδιάμεσης ενεργότητας περιείχε B-RAF mutants με 1- έως 10-πλάσια ενεργότητα, ενώ η ομάδα ελαττωμένης ενεργότητας ήταν λιγότερο ενεργή από την B-RAF. Το εκπληκτικό ήταν ότι αυτή η μεγάλη ποικιλία σε ενεργότητες mutant B-Raf κινάσης, δεν μεταφραζόταν σε διαφορετικές ενεργότητες της ERK. Τα υψηλής και ενδιάμεσης ενεργότητας mutants αύξαναν την ενεργότητα της ERK μόνο κατά 2- έως 4,6 φορές. Πώς όμως αυτό το μεγάλο εύρος των B-RAF ενεργοτήτων ρυθμίζεται σε ένα τόσο μικρό εύρος ενεργοτήτων ERK; Προφανώς, η εξήγηση βρίσκεται στην ύπαρξη ρυθμιστικών διόδων που ελέγχουν την ροή του σήματος από τη Raf προς τις MEK και ERK. Υποψήφιες πρωτεΐνες είναι οι KSR και RKIP. Το ενδιαφέρον ήταν ότι τρία από τα τέσσερα ελαττωμένης ενεργότητας B-RAF mutants, επίσης μπορούσαν να επάγουν την ενεργοποίηση της ERK. Οι Wan et al. έδειξαν ότι αυτό οφείλεται στην ενεργοποίηση της Raf-1 από τα σχετικά B-RAF mutants. Τα υψηλής και ενδιάμεσης ενεργότητας B-RAF mutants ενεργοποιούσαν επίσης την Raf-1, αλλά σε αντίθεση με τα χαμηλής ενεργότητας B-RAF mutants, δεν βασίζονταν στο Raf-1 για την διέγερση της ERK (Εικόνα 3.3).

3.4. Δομή των πρωτεϊνών Raf και μηχανισμοί αλλαγής στον καρκίνο

Η αμινοξική αλληλουχία των τριών πρωτεϊνών Raf στα θηλαστικά συγκρίνεται στην **εικόνα 3.2**, ενώ η δομή της περιοχής κινάσης της B-Raf, φαίνεται στην **εικόνα 3.4**.

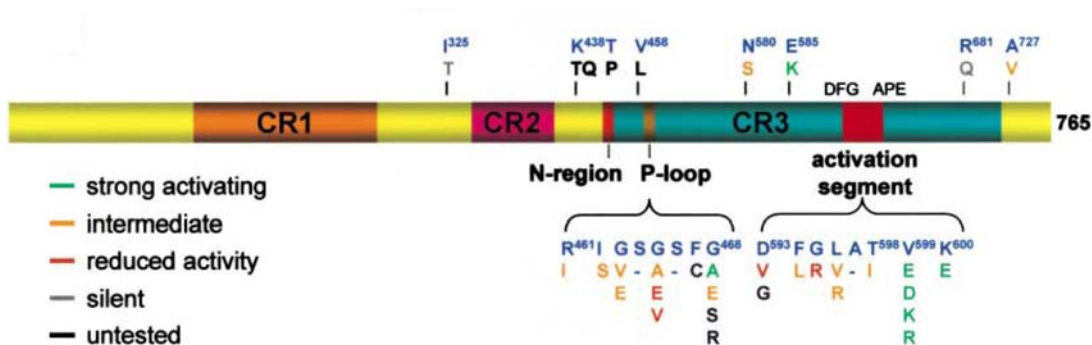
(A)



Εικόνα 3.4. Δομή της περιοχής κινάσης της B-Raf.

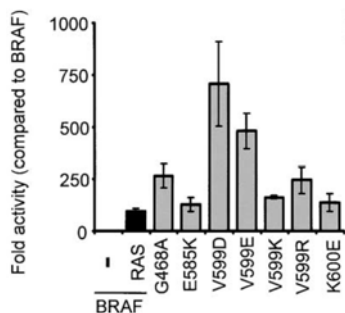
(A) Διάγραμμα της ^{WT}ΔB-RAF περιοχής κινάσης ως σύμπλοκο με τον αναστολέα BAY43-9006. Φαίνονται οι θέσεις των Asn593 και Phe594 του μοτίβου DFG, η Asn580 του catalytic loop, και το Glu585. Τα μοτίβα DFG και APE απεικονίζονται με κίτρινο, το υπόλοιπο activation segment και η N περιοχή είναι με κόκκινο. Το N άκρο είναι με βαθύ κόκκινο, το C άκρο με θαλασσί χρώμα, και το P loop με πορτοκαλί. Τα αμινοξέα 600-611 του activation loop είναι με διακεκομμένες γραμμές.

(B)

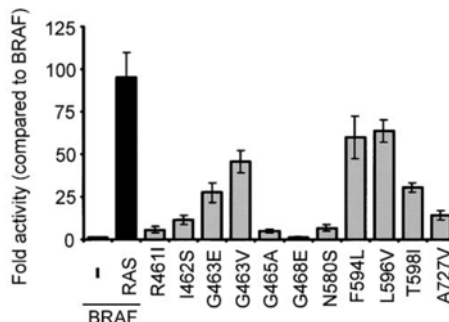


(B) Σχηματική αναπαράσταση της πρωτοταγούς δομής της BRAF, όπου φαίνονται οι λειτουργικές περιοχές και η θέση 32 παρατηρημένων, σχετιζόμενων με καρκίνο, μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης. Οι υποκαταστάσεις των αμινοξέων είναι κωδικοποιημένες με χρώματα, ανάλογα με την ενεργότητα τους.

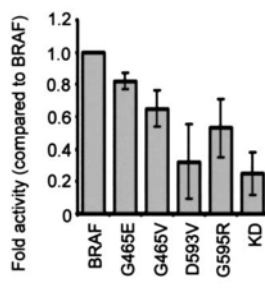
(A)



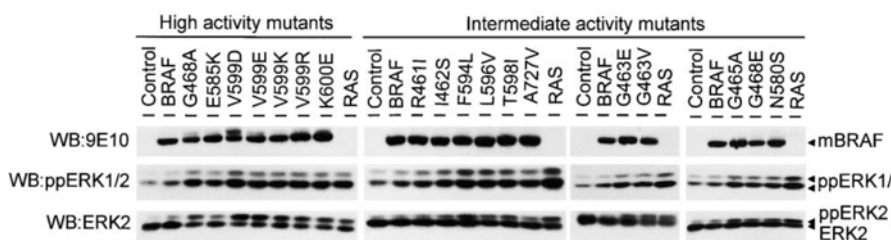
(B)



(Γ)

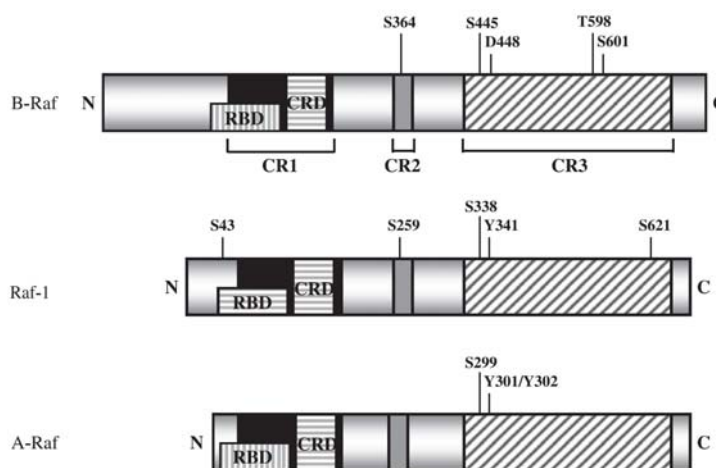


(Δ)



Εικόνα 3.5. Χαρακτηρισμός των ενεργοποιημένων μεταλλαγμένων B-RAF πρωτεϊνών από ανθρώπινους όγκους. Η ενεργότητα κίνησης της B-RAF για τις υψηλής (A), για τις ενδιάμεσης (B) και για τις ελαττωμένης ενεργότητας (Γ) μεταλλαγμένες μορφές της (πολλαπλάσια ενεργότητα σε σύγκριση με την BRAF). (Δ) Western blot των c-myc tagged B-RAF, των ολικών ERK2 και των ppERK σε κύτταρα COS που εκφράζουν υψηλής και ενδιάμεσης ενεργότητας μεταλλαγμένες μορφές.

Και οι τρεις πρωτεΐνες Raf μοιράζονται τρεις υψηλά συντηρημένες περιοχές (CR1, CR2 και CR3), που εγκλείονται από τις διαφορετικές αλληλουχίες που ποικίλλουν κατά πολύ αναμεταξύ τους. Στην Raf-1, η περιοχή CR1 καλύπτει τα αμινοξέα 61-194 και περιέχει δύο περιοχές που δεσμεύουν το Ras-GTP. Η δεσμευτική του Ras περιοχή (Ras binding domain- RBD) καλύπτει τα αμινοξέα 51-131 της Raf-1^{125, 126}, και η cysteine-rich domain (CRD) εκτείνεται στα αμινοξέα 139-184 της Raf-1¹²⁷ (**Εικόνες 3.2 και 3.6**). Η CR1 περιέχει επίσης μια θεωρούμενη zinc-binding domain. Η CR2 περιλαμβάνει τα αμινοξέα 254-269 της Raf-1 και είναι πλούσια σε αμινοξέα σερίνης και θρεονίνης, μερικά από τα οποία είναι ρυθμιστικές περιοχές φωσφορυλίωσης (**Εικόνες 3.2 και 3.6**). Η CR3 καλύπτει τα αμινοξέα 335-627 της Raf-1 και περιέχει την περιοχή κινάσης που είναι η πιο ομόλογη περιοχή ανάμεσα στις πρωτεΐνες Raf^{128, 129}.

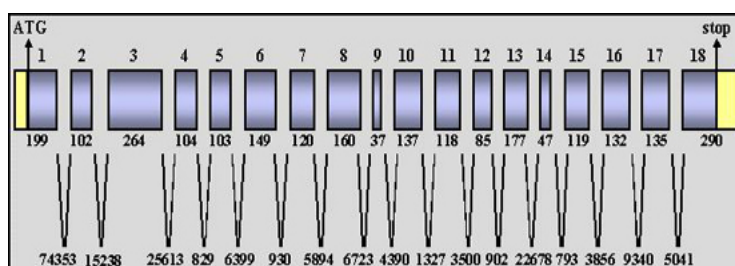


Εικόνα 3.6. Οι περιοχές των τριών μελών της οικογένειας Raf, που υποδεικνύουν τις θέσεις των πιθανών σημαντικών θέσεων φωσφορυλίωσης που σχετίζονται με την ρύθμιση της ενεργοποίησης.

Σε καμία από τις πρωτεΐνες Raf δεν έχει γίνει ανάλυση της κρυσταλλικής δομής, όμως κύρια δομή της περιοχής κινάσης έχει αποσαφηνιστεί μέσω σύγκρισης με τις κρυσταλλικές δομές άλλων πρωτεϊνικών κινασών¹³⁰. Οι περιοχές κινάσης χωρίζονται σε αμινο-τελικά και καρβοξυ-τελικά άκρα και το ATP-binding site εντοπίζεται στο μεσοδιάστημα των δύο άκρων. Το N-terminal άκρο περιέχει το glycine loop που είναι σημαντικό για την τοποθέτηση των φωσφορικών ομάδων του ATP, ενώ το C-terminal άκρο περιέχει την αλληλουχία αναγνώρισης του υποστρώματος. Ένα σημαντικό στοιχείο μέσα σε αυτό το άκρο είναι το activation segment, η περιοχή που συνδέει τις

συντηρημένες αλληλουχίες DFG και APE, που παίρνει μέρος στην πρόσδεση ενός ATP. Η φωσφορυλίωση της θρεονίνης 598 και της σερίνης 601 εντός αυτής της περιοχής, έχει αποδειχτεί πως παίζει ένα ρόλο κλειδί στην ενεργοποίηση της B-Raf (**Εικόνες 3.2** και **3.6**).

Η B-Raf έχει αρκετές δομικές διαφορές από τις άλλες δύο πρωτεΐνες Raf. Στις συντηρημένες περιοχές, η B-Raf έχει αρκετές διαφορές στα αμινοξέα (**Εικόνα 3.2**). Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε, η μεταβλητή περιοχή ανάμεσα στα CR2 και CR3 υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα των εξονίων 8b και 10a (**Εικόνα 3.2**)¹²¹. Το εναλλακτικό αυτό μάτισμα μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα της B-Raf να ενεργοποιεί την MEK καθώς έχει δείχτεί ότι η παρουσία του εξονίου 10a στο B-Raf, αυξάνει την συγγένεια και την βασική ενεργότητα κινάσης ως προς την MEK, ενώ η παρουσία του εξονίου 8b έχει το αντίθετο αποτέλεσμα¹³¹. Τα δύο εξόνια εντοπίζονται στην συνδετική περιοχή ανάμεσα στην αμινοτελική ρυθμιστική περιοχή και την καταλυτική περιοχή και μπορούν να δρουν ως καθοριστικοί παράγοντες στην μετάβαση από την ενεργή στην ανενεργή μορφή. Τα εξόνια 1 και 2 είναι παρόντα στις B-Raf πρωτεΐνες με το μεγάλο, αλλά όχι σε αυτές με το μικρό N terminal άκρο¹²¹. Τα εξόνια αυτά κωδικοποιούν μια αλυσίδα 115 αμινοξέων, πλούσιων σε γλυκίνες, η λειτουργία των οποίων δεν είναι σήμερα γνωστή, και δεν έχουν ομολογία με αλληλουχίες των A-Raf ή Raf-1¹³².



Εικόνα 3.7. Δομή του γονιδίου BRAF. Τα εξόνια αντιπροσωπεύονται από κουτιά, με τους αριθμούς των εξονίων στην κορυφή και τον αριθμό των ζευγαριών βάσεων στο κατώτερο σημείο. Τα ιντρόνια με τον αριθμό των ζευγαριών βάσεων, αντιπροσωπεύονται από τις μαύρες αγκύλες. Τα βέλη παρουσιάζουν τα κωδικόνια έναρξης και λήξης, αντίστοιχα. Το γονίδιο BRAF αποτελείται από 18 εξόνια που εκτείνονται σε μια περιοχή 190284 bp. Το μεταγραφόμενο mRNA έχει μήκος 2513 bp.

Συνοπτικά οι πιο κοινές BRAF μεταλλάξεις που εντοπίζονται στους ανθρώπινους καρκίνους φαίνονται στην **εικόνα 3.2**. Όλες οι B-Raf πρωτεΐνες που φέρουν τις μεταλλάξεις V600E, L597V, G464A και G469A, έχει δείχτεί ότι παρουσιάζουν αυξημένη

ενεργότητα κινάσης στα κύτταρα COS^{100, 117}. Πώς όμως αυτές οι μεταλλαγές οδηγούν σε αυξημένη ενεργότητα κινάσης; Η μεταλλαγή V600E εντοπίζεται στο activation segment της B-Raf και πιστεύεται πως εισαγάγει ένα αρνητικό φορτίο το οποίο μιμείται την φωσφορυλίωση που επιτελείται στα αμινοξέα θρεονίνης 598 και σερίνης 601. Αυτό θα ξεπερνούσε την απαίτηση για φωσφορυλίωση σε αυτά τα σημεία στην ενεργοποίηση της B-Raf. Παρόλα αυτά, είναι δύσκολο να εξηγηθεί το πώς οι υπόλοιπες μορφές με μεταλλαγή στο activation loop οδηγούν σε αυξημένη ενεργότητα της B-Raf, επειδή δεν εισαγάγουν όλες τους ένα τέτοιο αρνητικό φορτίο. Το γεγονός ότι έχουν αναγνωριστεί μεταλλαγές εντός του G loop της B-Raf, είναι επίσης δύσκολο να εξηγηθεί, καθώς παρόμοιες μεταλλαγές στην Protein Kinase A οδηγούν σε μειωμένη ενεργότητα κινάσης^{133, 134}. Μια σειρά μεταλλαγών δίπλα στο G loop έχουν εντοπιστεί σε ορισμένα δείγματα όγκου, ενώ άλλες έχει δείχτει πως επηρεάζουν τις συναινετικές αλληλουχίες στα σημεία φωσφορυλίωσης S428, T439 και S364 του Akt^{133, 134}. Η μεταλλαγή αυτών των σημείων μπορεί να επιτρέψει την αυξημένη ενεργότητα της B-Raf, επειδή η Akt έχει προταθεί πως ρυθμίζει αρνητικά την ενεργότητα της Raf¹³⁵. Παρόλα αυτά, πρέπει να γίνουν επιπλέον λειτουργικές και βιοχημικές μελέτες της B-Raf, για να κατανοηθεί πλήρως το πώς αυτές οι ποικίλες μεταλλαγές οδηγούν σε αλλαγές στην ενεργότητα της πρωτεΐνης.

3.5. Ρύθμιση της ενεργότητας της Raf κινάσης

3.5.1. Σύνδεση με την Ras

Η αρχική εντύπωση του ότι η Raf-1 δρά καθοδικά του Ras, ήρθε επειδή dominant negative μεταλλαγές σε *raf-1* και *raf-1* antisense constructs, μπλόκαραν τον πολλαπλασιασμό και τον μετασχηματισμό που επάγεται από τα ενεργοποιημένα Ki-Ras και Ha-Ras¹³⁶. Χρησιμοποιώντας in vitro πειράματα πρόσδεσης πρωτεϊνών και το in vivo yeast two-hybrid system, παρατηρήθηκε από ξεχωριστές ομάδες, μια άμεση φυσική αλληλεπίδραση ανάμεσα στην Ras-GTP και το N-terminal άκρο της Raf¹³⁷⁻¹³⁹. Συγκεκριμένα η Ras αλληλεπιδρά με δύο περιοχές του αμινοτελικού άκρου της Raf-1: την Ras binding domain (RBD, αμινοξέα 51-131) και την cysteine-rich domain (CRD, αμινοξέα 139-184), η οποία σχηματίζει μια zinc finger δομή (**Εικόνα 3.6**)^{96, 140}.

Η πιο ισχυρή αλληλεπίδραση είναι ανάμεσα στο Ras-GTP και την RBD της Raf-1, και βρέθηκε πως αυτή είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της Raf-1¹⁴¹. Και οι τέσσερις ισομορφές του Ras (H-Ras, N-Ras, K-Ras4A και K-Ras-4B) είναι ικανές να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες Raf, αν και η K-Ras φαίνεται πως είναι η πιο

αποτελεσματική στην πρόσδεσή της με την Raf-1, και έπονται κατά σειρά αποτελεσματικότητας πρόσδεσης, οι N-Ras και Ha-Ras ¹⁴². Οι πρωτεΐνες Ras εντοπίζονται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, όπου και δρουν ως διπτοί μοριακοί διακόπτες. Η αλληλεπίδραση της Ras με την Raf-1 μέσω του RBD, δεν επαρκεί για να ενεργοποιήσει την ενεργότητα της Raf-1 κινάσης, αλλά δρα με το να επάγει την μεταφορά της Raf-1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, όπου ενεργοποιείται από γεγονότα που περιλαμβάνουν φωσφορυλίωση ^{143, 144}. Η χαμηλότερη αλληλεπίδραση συγγένειας της Ras με το CRD της Raf-1, μπορεί να λαμβάνει μέρος σε αυτά τα επιπλέον γεγονότα, αλλά όχι στην μεταφορά της στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, καθώς το CRD μπορεί να προσδένεται στο μεμβρανικό φωσφολιπίδιο της φωσφατιδυλοσερίνης, το οποίο μπορεί να είναι συμπαράγοντας για την Raf-1 ¹⁴⁵.

Η ρύθμιση της B-Raf από την Ras, έχει μελετηθεί λίγο σε σχέση με την Raf-1. Τα αλληλεπιδρώντα αμινοξέα στο μεσοδιάστημα των Ras/Raf, είναι πανομοιότυπα για τις B-Raf και Raf-1, και οι δύο προσδένονται εξίσου καλά με την Ha-Ras *in vitro* ^{146, 147}. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η συσχέτιση της Ras με την B-Raf, έχει σαν αποτέλεσμα τη μεταφορά της B-Raf στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, οδηγώντας στην ενεργοποίησή της ¹⁴⁸. Το ελεύθερο κυτταροπλασματικής μεμβράνης σύμπλοκο των πρωτεϊνών B-Raf και 14-3-3, μπορεί να ενεργοποιηθεί *in vitro* από την ανασυνδιασμένη Ras ¹⁴⁹. Αυτό έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τις Raf-1 και A-Raf, οι οποίες για να ενεργοποιηθούν πλήρως, απαιτούν φωσφορυλίωσεις σερίνης και τυροσίνης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, και δεν μπορούν να ενεργοποιηθούν μόνο από την Ras *in vitro* ¹⁴⁸.

Σε επιμολυσμένους με το ενεργό (G12V) Ha-ras ινοβλάστες, η ενδογενής πρωτεΐνη Raf-1, ευρίσκεται να συσχετίζεται με το c-N-ras, όχι με το ενεργοποιημένο Ha-ras ¹⁵⁰. Η αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται πως είναι σημαντική για την διαμεσολάβηση της ERK ενεργοποίησης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Βιοχημικά, η ανενεργή Raf-1 έχει εντοπιστεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη σε κύτταρα που βρίσκονται στην φάση ηρεμίας σε ένα latent σύμπλοκο με τις c-N-ras και PKCε, που μπορεί να ενεργοποιηθεί με ερεθισμό από αυξητικούς παράγοντες ¹⁵¹. Παρά ταύτα, η αλληλεπίδραση με την B-Raf δεν εντοπίστηκε σε αυτά τα πειράματα, πιθανώς επειδή η B-Raf είναι παρούσα σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα σε αυτά τα κύτταρα. Μια ενδιαφέρουσα πρόσφατη πλοκή, αποτελεί η ανακάλυψη ότι η ενεργή Ras επάγει τον ετεροδιμερισμό των B-Raf και Raf-1 ¹⁵² και πως αυτό ίσως να είναι σημαντικό για την ενεργοποίηση της Raf-1 ¹⁵³. Αυτό δείχνει πως η ρύθμιση των πρωτεϊνών Raf από την Ras είναι περίπλοκη, και απαιτείται επιπλέον μελέτη.

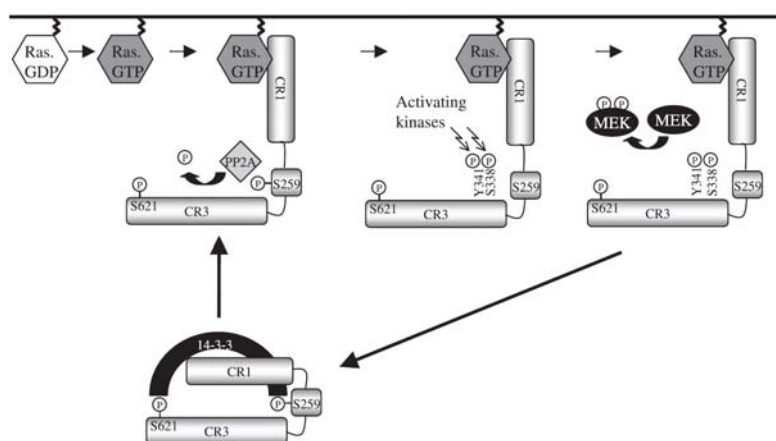
Τόσο η B-Raf όσο και η Raf-1, μπορούν να προσδένονται σε άλλες μικρές GTPases, κυρίως την Rap1, αν και η αλληλεπίδραση B-Raf/Rap1 θεωρείται ειδική για τα νευρωνικά κύτταρα^{154, 155}. Ωστόσο, ενώ το σύμπλοκο Rap1/ B-Raf πιστεύεται πως οδηγεί σε ενεργοποίηση του B-Raf, η αλληλεπίδραση των Rap1/Raf-1 δεν προκαλεί την ενεργότητα της Raf-1^{155, 156}. Με domain shuffling πειράματα δείχτηκε πως η διαφορά ανάμεσα στην Raf-1 και την B-Raf, φαίνεται πως ανήκει στη δύναμη της αλληλεπίδρασης της Rap1 με τις CRD domains των Raf-1 και B-Raf. Αμφότερες οι Raf-1 και B-Raf, ενεργοποιούνται από ενεργές μορφές της GTPase TC21¹⁵⁷.

3.5.2. Φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση

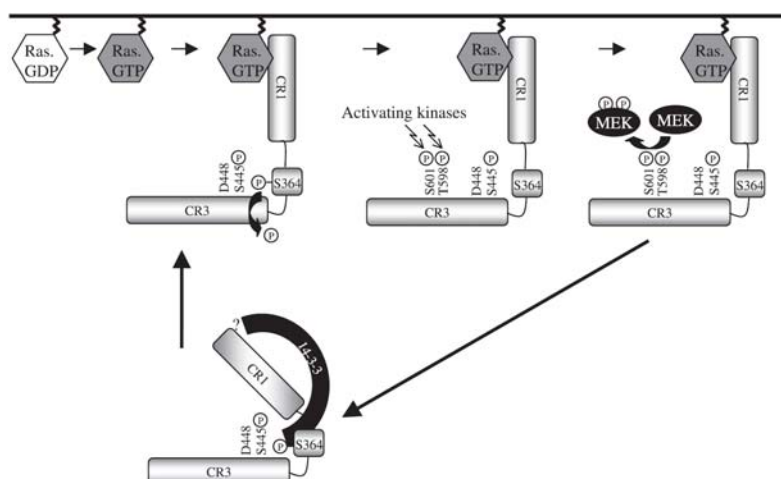
Τόσο η φωσφορυλίωση όσο και η αποφωσφορυλίωση απαιτούνται για την ενεργοποίηση της Raf. Οι γνωστές ρυθμιστικές θέσεις φωσφορυλίωσης κάθε μιας από τις Raf πρωτεΐνες απεικονίζεται στην **εικόνα 3.6**. Πρόσφατα προτάθηκε ένα μοντέλο για την Raf-1 ενεργοποίηση από τους Dhillon et al¹⁵⁸ (**Εικόνα 3.8**). Στα μη διεγερμένα κύτταρα, η Raf-1 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και φωσφορυλιώνεται σε δύο υπολείμματα σερίνης, την σερίνη 259 και την σερίνη 621, οι οποίες δεσμεύουν τις πρωτεΐνες 14-3-3, διατηρώντας την Raf-1 σε ανενεργή, κλειστή διαμόρφωση. Στα διεγερμένα κύτταρα, η Ras-GTP μετατοπίζει τις πρωτεΐνες 14-3-3 από την σερίνη 259 και η Raf-1 μεταφέρεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, όπου και αποφωσφορυλιώνεται στη σερίνη 259 από φωσφατάσες, όπως είναι η PP2A. Στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ξεχωριστές φωσφορυλίωσεις σερίνης και τυροσίνης λαμβάνουν χώρα. Ένα σημαντικό γεγονός στην επαγόμενη από το Ras ενεργοποίηση της Raf-1, είναι η φωσφορυλίωση της σερίνης 338. Οι King et al. πρότειναν ότι η p21-activated kinase 3 (Pak3) ίσως να ευθύνεται για αυτή την φωσφορυλίωση¹⁵⁹. Η Pak3 ενεργοποιείται από την απευθείας πρόσδεση με τις Cdc42 και Rac, οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται από την PI3-Kinase, ένα άλλο μόριο τελεστή του Ras-GTP^{160, 161}, υπονοώντας συνεπώς ότι το Ras ενεργοποιεί με άμεσο τρόπο την Raf-1, μέσω της ενεργοποίησης του Pak3¹⁶². Ωστόσο, οι Chiloeches et al.¹⁶³ έφεραν αντίρρηση ως προς την πρόσμιξη των Pak3 στην ενεργοποίηση της Raf-1, καθώς οι PI3-K inhibitors δεν μπορούν να παρεμποδίσουν την φωσφορυλίωση της σερίνης 338, και τα ενεργοποιημένα mutants της Pak-3, είναι ικανά να επάγουν την φωσφορυλίωση της σερίνης 338, αλλά όχι και την ενεργοποίηση της Raf-1¹⁶³. Η φωσφορυλίωση της τυροσίνης 341, πιθανώς από μέλη της οικογένειας Src, είναι ένα επίσης σημαντικό γεγονός για την ενεργοποίηση της Raf-1 στην κυτταροπλασματική

μεμβράνη¹⁰³. Δεν είναι δυνατή η πλήρης επέκταση αυτού του μοντέλου στην B-Raf, καθώς υπάρχουν σημαντικές διαφορές στον τρόπο ρύθμισης της Raf-1 και της B-Raf. Μια από τις διαφορές είναι στα πρότυπα φωσφορυλίωσής τους (**Εικόνα 3.6**). Στην ισοδύναμη θέση τυροσίνης 340 και 341 της Raf-1, υπάρχουν υπολείμματα ασπαρτικού οξέως στα αμινοξέα 447 και 448 στην B-Raf. Λόγω του αρνητικού τους φορτίου, τα αμινοξέα αυτά μπορεί να μιμούνται αυτά ενός φωσφορυλιωμένου υπολείμματος, και ως αποτέλεσμα, η B-Raf δεν απαιτεί σήματα κινάσης τυροσίνης για μέγιστη ενεργοποίηση. Η B-Raf έχει επίσης μια συντηρημένη σερίνη στην ισοδύναμη θέση της σερίνης 338 της Raf-1 (σερίνη 445 στην B-Raf). Η σερίνη 445 είναι συνεχώς φωσφορυλιωμένη στην B-Raf, και αυτή η φωσφορυλίωση σε συνδυασμό με το ασπαρτικό οξύ στην θέση 448 (ισοδύναμο της τυροσίνης 341 της Raf-1), πιστεύεται πως συμβάλλει στην υψηλή ενεργότητα κινάσης της B-Raf, η οποία είναι 15-20 φορές υψηλότερης της Raf-1¹⁰³. Δεν είναι γνωστό εάν η Pak3 είναι ικανή να φωσφορυλιώνει την σερίνη 445 της B-Raf ή όχι. Η θρεονίνη 598 και η σερίνη 601, εντός του activation segment, έχουν αναγνωριστεί ως επιπλέον κύρια σημεία φωσφορυλίωσης της B-Raf στην μεμβράνη, ως απόκριση στο ογκογόνο Ras¹⁰⁴. Η υπεύθυνη για αυτές τις φωσφορυλίώσεις κινάση, δεν έχει αναγνωριστεί. Επιπροσθέτως, η φωσφορυλίωση της σερίνης 364, ισοδύναμη της σερίνης 259 της Raf-1, φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά την ενεργότητα της B-Raf και αυτό μπορεί να διαμεσολαβείται από την serum- and glucocorticoid inducible kinase (SGK)¹⁶⁴ ή την Akt¹³⁵. Επιπλέον, συναινετικές θέσεις φωσφορυλίωσης εντοπίζονται στα S428 και T439 στην B-Raf, όμως δεν είναι γνωστό εάν αυτές οι θέσεις φωσφορυλιώνονται in vivo.

A) Μοντέλο για την ενεργοποίηση της Raf-1



B) Μοντέλο για την ενεργοποίηση της B-Raf



Εικόνα 3.8. Μοντέλα του πως οι Raf-1 και B-Raf μπορούν να ενεργοποιηθούν. **(A)** Ενεργοποίηση της Raf-1. Σε μη διεγερμένα κύτταρα, η 14-3-3 διατηρεί την Raf-1 σε αδρανή διαμόρφωση, με το να προσδένεται στα phospho-S259 και phospho-S621. Έπειτα από διέγερση μέσω συνδέτη, και τον σχηματισμό της Ras-GTP, η Raf-1 προσδένεται στην Ras και μεταφέρεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η PP2A τότε απομακρύνει την φωσφορική ομάδα από τις S259 και η πρόσδεση με την 14-3-3, χάνεται. Έπειτα, ενεργοποιούσες κινάσες σερίνης και τυροσίνης μπορούν να φωσφορυλιώσουν τα αμινοξέα Y341 και S338, οδηγώντας στην πλήρη ενεργοποίηση της Raf-1. **(B)** Ενεργοποίηση της B-Raf. Σε μη διεγερμένα κύτταρα, η B-Raf διατηρείται στο κυτταρόπλασμα ως σύμπλοκο με την 14-3-3. Όπως και με την Raf-1, είναι πιθανό η 14-3-3 να προσδένεται με την B-Raf στα phospho-S364 και phospho-S728. Σε αντίθεση όμως με την Raf-1, η B-Raf στο κυτταρόπλασμα έχει ανοιχτή διαμόρφωση εξαιτίας της παρουσίας των phospho-S445, D448 καθώς επίσης και πιθανών αμινοξέων που κωδικοποιούνται από το εξόνιο 10a. Κατόπιν διέγερσης μέσω συνδέτη και έπειτα από τον σχηματισμό του Ras-GTP, η B-Raf προσδένεται στην Ras και μετατοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Όπως και στην Raf-1, η PP2A απομακρύνει την φωσφορική ομάδα από την S364. Έπειτα, ενεργοποιούσες κινάσες μπορούν να φωσφορυλιώσουν τα αμινοξέα S601 και T598, οδηγώντας σε πλήρη ενεργοποίηση της B-Raf. Η απενεργοποίηση των Raf-1 και B-Raf συμβαίνει τόσο μέσω φωσφορυλιώσεων όσο και αποφωσφορυλιώσεων με επακόλουθη πρόσδεση της 14-3-3. Από τα δύο αυτά μοντέλα έχει παραληφθεί η πρόσδεση των scaffold proteins RKIP, MP-1 και KSR (βλ. κείμενο).

3.5.3. Οι πρωτεΐνες Raf ως συστατικά σύμπλοκων μοριακών μονοπατιών

Όλο και περισσότερα στοιχεία δείχνουν ότι τα συστατικά του σηματοδοτικού μονοπατιού Raf/MEK/ERK είναι οργανωμένα σε πολυπρωτεϊνικά σηματοδοτικά σύμπλοκα από δομικές πρωτεΐνες. Διάφορες δομικές πρωτεΐνες έχουν αναγνωρισθεί για αυτό το μονοπάτι, από τις οποίες οι καλύτερα χαρακτηρισμένες είναι η 14-3-3, η MP1 (MEK-1 Partner 1), η RKIP (Raf-1 kinase Inhibitory Protein) και η KSR (Kinase suppressor of Ras). Ο ρόλος των πρωτεϊνών 14-3-3 στην ενεργοποίηση της Raf, προαναφέρθηκε. Η MP-1 επιλεκτικά αλληλεπιδρά με τις ERK-1 και MEK-1, αλλά όχι με την Raf-1, στην επιφάνεια των κυτταροπλασματικών όψιμων ενδοσωμάτων και λυσοσωμάτων¹⁶⁵. Η RKIP προσδέεται στις Raf-1 και MEK. Ωστόσο, τα σημεία πρόσδεσης επικαλύπτονται τόσο, που απαιτείται η διέγερση των κυττάρων με αυξητικούς παράγοντες για να απελευθερωθεί το RKIP από την Raf-1, έτσι ώστε αυτή να έχει πρόσβαση στο υπόστρωμά της. Διάφορες προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η KSR αλληλεπιδρά με τις MEK, ERK και Raf¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα από *Ksr^{-/-}* κύτταρα, δείχνουν ότι τα πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα που περιέχουν τις MEK και ERK, διακόπτονται παρουσία της KSR, αλλά αυτά που περιέχουν την Raf, δεν διακόπτονται¹⁶⁹. Η δομική ομοιότητα της KSR με τις πρωτεΐνες Raf, υπονοεί ότι η πρόσδεση των Raf και KSR στην MEK, είναι αμοιβαία αποκλειόμενα γεγονότα, και όπως και η RKIP, έτσι και η KSR ίσως να ρυθμίζει την πρόσβαση των Raf στην MEK. Προς το παρόν δεν είναι γνωστό εάν η B-Raf αποτελεί ομοίως μέρος σε πολυπρωτεϊνικά σηματοδοτικά σύμπλοκα με οποιοδήποτε από τα ανωτέρω μόρια.

3.6. Ένα μοντέλο για την ενεργοποίηση της B-Raf

Η πρωτεΐνη B-Raf εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα προσδεδεμένη με τις πρωτεΐνες 14-3-3 στην φωσφοσερίνη 364, και με την σερίνη 445 φωσφορυλιωμένη. Στο κυτταρόπλασμα, η B-Raf φαίνεται να έχει πιο ανοιχτή διαμόρφωση από την Raf-1. Έπειτα από την ενεργοποίηση της Ras, η B-Raf μετατοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, η φωσφοσερίνη 364 αποφωσφορυλιώνεται, χάνεται η πρόσδεση με την 14-3-3, και λαμβάνουν χώρα επιπλέον φωσφορυλιώσεις στην θρεονίνη 598 και στην σερίνη 601. Μια από τις γνωστές ανωμαλίες με την B-Raf, είναι ότι έχει υψηλό επίπεδο ενεργότητας στην βασική της κατάσταση, όμως η ενεργότητα αυτή δεν μεταφράζεται σε ενεργή MEK ή ERK μέσα στο κύτταρο. Υπάρχουν αρκετές εξηγήσεις για αυτήν την ανωμαλία. Είναι πιθανό η B-Raf να είναι προσδεδεμένη με ένα συμπληρωματικό

παράγοντα στο κύτταρο, ο οποίος εμποδίζει την ενεργοποίηση της MEK, παρά την ενεργή B-Raf. Ένας υποψήφιος παράγοντας είναι το μόριο RKIP. Εναλλακτικά, η B-Raf μπορεί να είναι ικανή να φωσφορυλιώνει και να ενεργοποιεί την MEK στα μη-διεγερμένο κύτταρο, αλλά μπορεί να μην είναι μέσα σε φυσική γειτνίαση με το υπόστρωμά της. Έπειτα από διέγερση και ενεργοποίηση της Ras, η B-Raf είναι γνωστό ότι μετακινείται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, όπου μπορεί να έρθει κοντά με το υπόστρωμά της, ως τμήμα ενός παραγωγικού πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου, το οποίο περιλαμβάνει τις MEK/ERK/KSR και πιθανώς και την MP-1. Όλες αυτές οι αβεβαιότητες αναφορικά με την ενεργοποίηση της B-Raf πρέπει να εξεταστούν πιο λεπτομερώς, για να κατανοηθεί πλήρως το πώς η ενεργότητα της B-Raf ρυθμίζεται στον ανθρώπινο καρκίνο (**Εικόνα 3.8**).

3.7. Η B-Raf είναι ο σημαντικός φυσιολογικός ενεργοποιητής των MEK

Οι MEK1/2 είναι τα μοναδικά αποδεκτά καθοδικά υποστρώματα των τριών πρωτεϊνών Raf. Ορισμένα ακόμη υποστρώματα έχουν προταθεί για τις Raf-1 και A-Raf, όμως κανένα έως τώρα δεν έχει αναγνωριστεί για το B-Raf¹⁷⁰. Οι ERK1/2 ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση μιας τυροσίνης και μιας θρεονίνης στο TEY μοτίβο του activation loop, και αυτές οι φωσφορυλίωσεις καταλύονται από τις MEK1/2. Οι πρωτεΐνες Raf είναι οι καλύτερα χαρακτηρισμένοι ενεργοποιητές των MEK1/2, και όλες οι Raf είναι ικανές να φωσφορυλιώνουν και να ενεργοποιούν τις MEK1 (44 kDa) και MEK2 (45 kDa) *in vitro*¹⁷¹⁻¹⁷³. Η MEK1 ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση δύο καταλοίπων σερίνης στις θέσεις 218 και 222 του activation loop^{173, 174}. Οι MEK1 και MEK2 περιέχουν μια αλληλουχία πλούσια σε προλίνες, η οποία θεωρείται πως απαιτείται για την αναγνώριση και την ενεργοποίηση από τις πρωτεΐνες Raf¹⁷⁵. Η αλληλουχία αυτή δεν συναντάται σε άλλες MAPKKs και συνεπώς είναι μια βάση για την ειδική σηματοδότηση των MEK1/2 από τις πρωτεΐνες Raf, παρά των MKK4 (ενεργοποιητής των JNK και p38^{MAPK}) για παράδειγμα. Τα σημεία S218 και S222 επίσης φαίνεται να είναι οι κύριες θέσεις φωσφορυλίωσης των MEK1 από την B-Raf¹⁷⁶.

Ένα σημαντικό στοιχείο που προέκυψε από τις μελέτες της ενεργοποίησης των MEK/ERK από τις Raf πρωτεΐνες, είναι ότι η B-Raf έχει μια πολύ μεγαλύτερη ικανότητα να ενεργοποιεί αυτές τις αυτές τις καθοδικές κινάσες, από ότι οι άλλες δύο Raf πρωτεΐνες. Αυτό συμβαίνει σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων και των ινοβλαστών, του νευρωνικού ιστού και των λεμφοκυττάρων, ανεξάρτητα από το εάν η B-Raf εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα ή όχι^{177, 178}. Όλες οι προσπάθειες

καθαρισμού των MEK ενεργοποιητών από διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, όπως τα κύτταρα PC12, εγκέφαλος και ινοβλάστες, οδήγησαν στην αναγνώριση της B-Raf¹⁷⁷. Η B-Raf έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το υπόστρωμά της από ότι οι άλλες δύο Raf. Μόλις υπερεκφραστούν σε ιστική κυτταροκαλλιέργεια και ανοσοκατακρημνιστούν, και οι τρεις Raf μπορούν να φωσφορυλιώσουν και να ενεργοποιήσουν την MEK, όμως η B-Raf έχει 50 φορές μεγαλύτερη ικανότητα να το κάνει, έναντι της Raf-1¹⁴⁸. Στα ποντικίσια κύτταρα μελανώματος B16, για την ενεργοποίηση της ERK, απαιτείται προηγουμένως η ενεργοποίηση της B-Raf από την Ras και το cAMP¹²³. Ωστόσο οι πρωτεΐνες Raf, σαφώς και δεν είναι οι μόνοι ενεργοποιητές των MEK, αφού σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους, έχει εντοπιστεί ενεργοποίηση της ERK, απουσία αξιοσημείωτης Raf ενεργότητας¹⁷⁹.

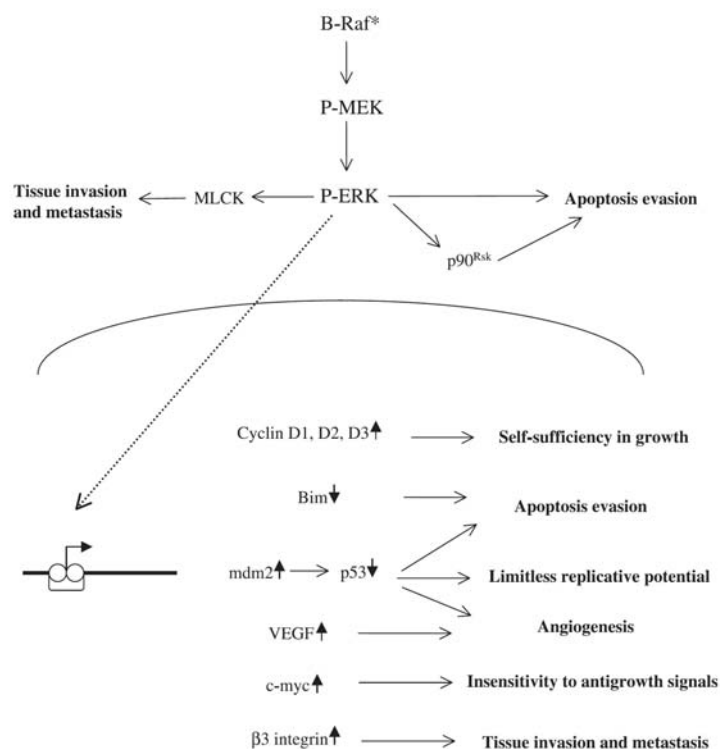
3.8. Αντικαρκινική θεραπεία στοχεύοντας τις Raf πρωτεΐνες

Η πρωτεΐνη B-Raf αποτελεί έναν ιδανικό στόχο για την ανάπτυξη νέων θεραπειών, καθώς το γονίδιο *BRAF* είναι μεταλλαγμένο σε ένα υψηλό ποσοστό ανθρώπινων όγκων.

Στο παρελθόν έγιναν πολλές προσπάθειες για να αναπτυχθούν αντικαρκινικοί παράγοντες έναντι των Raf πρωτεϊνών. Ωστόσο οι περισσότεροι από αυτούς τους παράγοντες αναπτύχθηκαν έναντι της Raf-1, παρά έναντι της B-Raf. Τα φάρμακα που στοχεύουν την Raf-1, αποτελούν antisense σύμπλοκα, αναστολείς κινάσων και dominant interfering DNA constructs¹⁸⁰⁻¹⁸². Ορισμένα από αυτά τα σύμπλοκα έχουν περάσει σε κλινικές δοκιμές. Για παράδειγμα, ο αναστολέας της Raf-1 Κινάσης, Bay439006, που αναπτύχθηκε από τις Bayer και Onyx, και το 20-μερές φωσφορικών ολιγονουκλεοτιδίων συμπληρωματικό του *raf-1* mRNA, ISIS 5132, είναι και τα δύο στην φάση I κλινικών δοκιμών ενάντια στον μεταστατικό καρκίνο, έχοντας επιδείξει αποτελεσματικότητα σε δοκιμές σε κύτταρα και σε ζώα^{183, 184}. Καμία από αυτές τις δοκιμές δεν περιλαμβάνει την εξειδικευμένη στόχευση των καρκινικών κυττάρων με το anti-Raf σύμπλοκο. Ωστόσο, οι Hood et al¹⁸⁵, περιέγραψαν πρόσφατα μια νέα συναρπαστική μέθοδο στόχευσης συγκεκριμένα των καρκινικών κυττάρων, με γονίδια *anti-raf*.

Επειδή είναι πιθανό ότι η B-Raf λαμβάνει μέρος στον σχηματισμό νεοπλασιών κυρίως μέσω της απορύθμισης της ενεργοποίησης της ERK, οι καινούριοι αντικαρκινικοί παράγοντες που στοχεύουν το B-raf, πρέπει να είναι αποτελεσματικοί ως προς της παρεμπόδιση της ενεργοποίησης των MEK/ERK. Η απάντηση στην ανάπτυξη τέτοιων

παραγόντων, μπορεί να βρίσκεται στην κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης της ενεργότητας κινάσης της B-Raf. Εναλλακτικά, η απάντηση ίσως να υπάρχει στη δοκιμή των αναστολέων της MEK, όπως είναι ο inhibitor CI-1040. Η φαρμακολογική μεσολάβηση του άξονα B-Raf/MEK/ERK, είναι πιθανό να παράσχει έναν εξαιρετικά ισχυρό τρόπο διακοπής της εξέλιξης του όγκου, αφού ο άξονας αυτός σχετίζεται με την μεσολάβηση πολλών καθοριστικών σημείων στον καρκίνο ¹⁸⁶ (Εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.9. Συμβολή των ενεργοποιημένων αλληλομόρφων BRAF, στα καθοριστικά σημεία του καρκίνου. Τα ενεργοποιημένα αλληλόμορφα BRAF μπορεί να οδηγούν στη συνεχή ενεργοποίηση των MEK/ERK, και αυτές μπορούν να επηρεάζουν την πρόοδο της νεοπλασίας μέσω μεταγραφικών και μη-μεταγραφικών μεθόδων. Στο κυτταρόπλασμα, οι ERKs φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις p90^{RSKs}, οι οποίες μπορούν να επιτρέπουν την αποφυγή της απόπτωσης, απενεργοποιώντας τον μεταγραφικό παράγοντα CREB, ο οποίος σχετίζεται με την επαγωγή της έναρξης γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση. Οι ενεργές ERKs μπορούν επίσης να επηρεάζουν την ενεργότητα κινάσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης, επηρεάζοντας την διήθηση και τη μετάσταση. Οι ενεργές ERKs μπορούν ακαι μεταφέρονται στον πυρήνα όπου μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση πολλών γονιδίων που σχετίζονται με την διαμεσολάβηση των καθοριστικών σημείων του

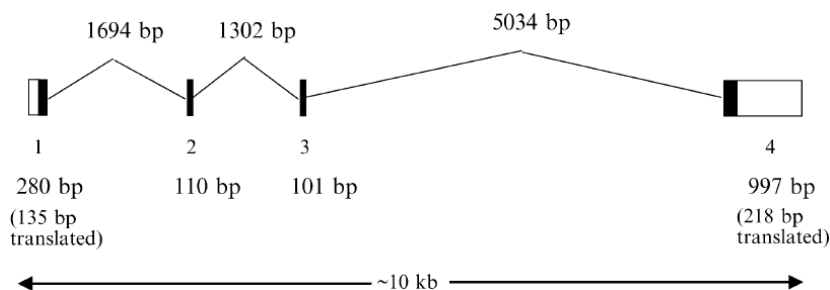
καρκίνου. Η έκφραση των D-κυκλινών αυξάνεται όταν υπάρχει ενεργή ERK, και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αυτό-επάρκεια στην ανάπτυξη. Τα γονίδια που κωδικοποιούν πολλούς παράγοντες που σχετίζονται με την απόπτωση και την κυτταρική επιβίωση, όπως τα μέλη της οικογένειας Bim των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, επηρεάζονται από τις ενεργοποιημένες ERKs, όπως και η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση (VEGF), την διήθηση (integrins) και την απευαισθητοποίηση σε αντι-αυξητικά μηνύματα (c-myc). Τα επίπεδα έκφρασης του p53 ρυθμίζονται στενά από τις ERKs, καθώς επάγουν την έκφραση του mdm2, μιας πρωτεΐνης που λαμβάνει μέρος στην παρεμπόδιση της ενεργότητας της p53. Οι ERKs ενεργοποιούν επίσης την p19^{ARF} (αναστολέας της mdm2), έτσι ώστε τα συνολικά επίπεδα της p53 να καθορίζονται από μια ισορροπία που υπάρχει ανάμεσα στην έκφραση της επαγόμενης από την ERK, mdm2 και της p19^{ARF}. Στα κύτταρα μελανώματος, υπάρχουν μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο ARF. Η συνδιασμένη επίδραση των BRAF και ARF μεταλλάξεων, είναι η πρόκληση υψηλών επιπέδων της mdm2 και η αναστολή της δράσης της p53.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Η πρωτεΐνη αναστολέας της Raf Κινάσης (RKIP)

4.1. Εισαγωγή – Δομή της RKIP

Η πρωτεΐνη αναστολέας της Raf Κινάσης (Raf kinase inhibitor protein) είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών PEBP (phosphatidylethanolamine binding protein). Η οικογένεια των πρωτεϊνών RKIP είναι υψηλά συντηρημένη και δεν μοιράζεται σημαντική ομολογία με άλλες οικογένειες πρωτεϊνών¹⁸⁷. Η RKIP είναι μια μικρή, κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, που απομονώθηκε αρχικά από τον εγκέφαλο των βοοειδών και αναγνωρίστηκε πως προσδένεται σε φωσφολιπίδια^{188, 189}. Αναγνωρίστηκε αρχικά ως ανθρώπινη PEBP όπου δείχτηκε πως παίζει ρόλο στον μεταβολισμό των λιπιδίων και στον σχηματισμό φωσφολιπιδικής μεμβράνης. Το ανθρώπινο RKIP mRNA έχει μέγεθος 1434 bp και μεταγράφεται από ένα γονίδιο το οποίο αποτελείται από 4 εξόνια που εκτείνονται σε μια περιοχή ~10 kb, του χρωμοσώματος 12q24.23, με ένα ομόλογο *PEBP* στο χρωμόσωμα 2p (**Εικόνα 4.1**). Το ανθρώπινο RKIP mRNA έχει 95% ομοιότητα με το βόειο mRNA, και 85.5% ομοιότητα με το ποντικίσιο mRNA. Το ανθρώπινο RKIP mRNA, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 187 αμινοξέων, που μοιράζεται μια επικάλυψη 186 αμινοξέων με την βόεια 21 kDa RKIP και μια επικάλυψη 187 αμινοξέων με την ποντικίσια 23 kDa RKIP. Πρόσφατες μελέτες, από τις οποίες προέρχεται και η ονομασία της, βρήκαν πως η RKIP εμποδίζει την ενεργοποίηση της MEK από την Raf. Η ανώμαλη ενεργότητα της RKIP σχετίζεται με ένα μεγάλο αριθμό ασθενειών, μέσω της συσχέτισής της με μονοπάτια μεταγωγής σήματος^{187, 190-192}.



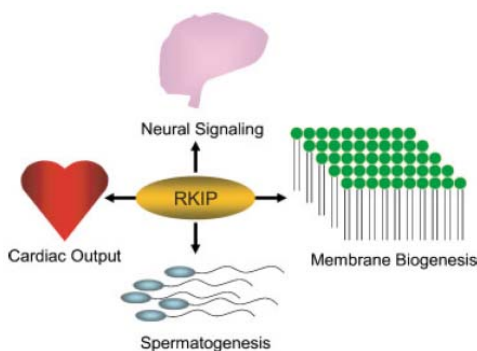
Εικόνα 4.1. Δομή εξονίων-ιντρονίων του ανθρώπινου γονιδίου RKIP.

4.2. Εντοπισμός της RKIP

Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση της έκφρασης της RKIP έδειξε πως συχνά ευρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και την κυτταροπλασματική μεμβράνη σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς ¹⁸⁹. Η RKIP εκφράζεται σε πολλά νευρωνικά κύτταρα όπως τα εγκεφαλικά ολιγοδενδροκύτταρα, τα κύτταρα Schwann, τα κύτταρα Purkinje της παρεγκεφαλίδας, και στα στρώματα του φλοιού και του ιπποκάμπου του εγκεφάλου ¹⁹³⁻¹⁹⁵. Επίσης, η RKIP εκφράζεται και σε πολλούς μη-νευρωνικούς ιστούς, όπως είναι οι σπερματίδες, τα κύτταρα Leydig, και το επιθήλιο της επιδιδυμίδας των όρχεων. Επίσης έχει βρεθεί στα επινεφρίδια, στο επιθήλιο των νεφρών, στα εντεροκύτταρα, στα καλικοειδή κύτταρα, και στα πλασματοκύτταρα του λεπτού εντέρου, του λεμφαδένα και στα μεγακαρουκύτταρα του σπλήνα, της καρδιάς, του ήπατος και της επιδιδυμίδας, των βρογχιολίων του πνεύμονα, του μεσεντερικού λεμφαδένα, στις σάλπιγγες, στις ωοθήκες, στους γαλακτοφόρους αδένες, στη μήτρα, στο επιθήλιο του προστάτη και στον θυρεοειδή αδέν ^{196, 197}. Παρόλο που δεν ευρίσκεται σε πολλά εκκριτικά όργανα, η RKIP δεν ευρίσκεται σε εξωκυττάρια υγρά όπως το αίμα, το σάλιο, το γάλα, τα υγρά της μήτρας, οι εκκρίσεις του προστάτη ή τα σπερματικά υγρά ¹⁹⁸.

4.3. Λειτουργία της RKIP

Η ευρεία κατανομή της RKIP σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς, προτείνει πως παίζει ρόλο σε πολλές διαφορετικές φυσιολογικές διαδικασίες (**Εικόνα 4.2**). Στους νευρικούς ιστούς, η RKIP βρέθηκε πως ενισχύει την *in vitro* σύνθεση της ακετυλοχολίνης, με το να ρυθμίζει θετικά την ακετυλ-τρανσφεράση της χολίνης και πιθανώς με το να ερεθίζει τα χολινεργά νευρωνικά μονοπάτια στους ποντικίσσιους μεμβρανικούς πυρήνες ^{190, 199-201}.

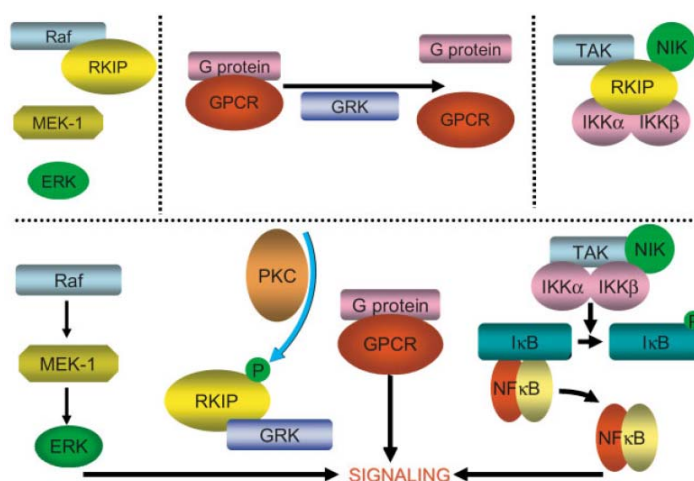


Εικόνα 4.2. Οι φυσιολογικές λειτουργίες της RKIP. Η RKIP έχει πολλαπλές δράσεις σε όργανα όπως η καρδιά και ο εγκέφαλος, καθώς επίσης και σε κυτταρικό επίπεδο, όπως φαίνεται.

Η RKIP έχει επίσης αρκετές λειτουργίες στους γοναδικούς ιστούς. Για παράδειγμα, οι ποντικίσιες εκκρίσεις της επιδιδυμίδας και κυτταροπλασματικές μεμβράνες από σπέρμα περιέχουν πρωτεΐνες με αλληλουχίες παρόμοιες με την βόεια RKIP από εγκέφαλο ²⁰². Επίσης, η απομονωμένη από σπερματοζωα RKIP, μπορεί να σχετίζεται με τον σχηματισμό των μεμβρανών και την διατήρηση της έκκρισης αντιγόνων στα σπερματοζωα ²⁰³. Μελέτες σε όρχεις ποντικών έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες RKIP μπορεί να σχετίζονται με την οργάνωση του σπερματοφόρου επιθηλίου ή με την μεταφορά της φωσφατιδυλεθανολαμίνης σε άλλα γαμετικά κύτταρα ²⁰⁴. Λόγω της παρουσίας της στα κύτταρα Leydig, οι Frayne et al υποστήριξαν πως η RKIP έχει κάποιο ρόλο στην λιπιδική μεταφορά ή δρα ως πρωτεΐνη πρόσδεσης μέσα στους όρχεις των ποντικών, που συμβάλλει στην οργάνωση της μεμβράνης κατά την σπερματογένεση.

4.4. RKIP και ενδοκυττάρια σηματοδότηση

Η RKIP ρυθμίζει πολλαπλά διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια (**Εικόνα 4.3**). Ένας ρόλος της RKIP στην κυτταρική σηματοδότηση αναγνωρίστηκε με πείραμα yeast two-hybrid, για την σάρωση κλώνων από μια ανθρώπινη βιβλιοθήκη T-κυττάρων, που προσδενόταν στις binding domains της Raf-1 κινάσης ¹⁸⁸. Δείχθηκε πως η RKIP προσδέεται στις Raf-1, MEK-1, και ασθενώς στην ERK-2, παρεμβαίνοντας στην φωσφορυλίωση της MEK και την ενεργοποίηση της από την Raf-1. Παρόλα αυτά, η RKIP δεν ήταν υπόστρωμα για την Raf-1 ή την MEK. Η RKIP δεν προσδενόταν στην Ras, ούτε και βρέθηκε να κατέχει ενεργότητα κινάσης. Φαίνεται πως η RKIP καθορίζει το κατώφλι για την ενεργοποίηση της Raf-1 και για επακόλουθη ενεργοποίηση του μονοπατιού MEK/ERK.



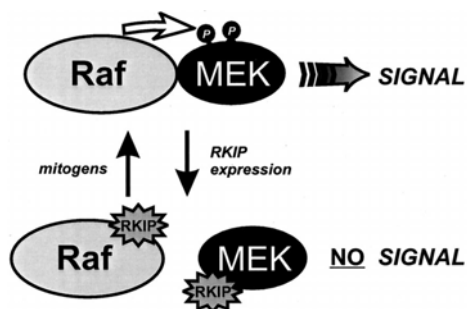
Εικόνα 4.3. Ο ρόλος της RKIP στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση.

Άνω τμήμα: Στην ανενεργή κατάσταση, η RKIP είναι αποφωσφορυλιωμένη και προσδένεται στην ενεργοποιημένη Raf, εμποδίζοντας την ικανότητα της να ενεργοποιήσει την MEK. Επίσης, η RKIP προσδένεται και σε άλλες πρωτεΐνες που επάγουν την ενεργότητα του NF-κB, όπως οι transforming growth factor β -activated kinase-1, (TAK), I- κ B kinase α (IKK α), I- κ B kinase β (IKK β), και NF- κ B-inducing kinase (NIK). Επίσης η G-protein-coupled receptor kinase-2 (GRK-2) προσδένεται στον υποδοχέα G-protein-coupled receptor (GPCR), οδηγώντας στην αναστολή της ενεργότητάς του.

Κάτω τμήμα: Μόλις οι μεμβρανικοί υποδοχείς προσδεθούν από τους συνδέτες (ligands), η protein kinase C (PKC) ενεργοποιείται οδηγώντας στην φωσφορυλίωση της RKIP. Η φωσφορυλιωμένη RKIP απελευθερώνεται από τη Raf, η οποία με τη σειρά της δύναται να φωσφορυλιώσει την MEK, και αυτή με τη σειρά της, την ERK. Η φωσφορυλιωμένη RKIP έπειτα μπορεί να προσδεθεί στην GRK-2, προκαλώντας την απελευθέρωσή της από τον υποδοχέα GPCR, ο οποίος μπορεί να φωσφορυλιώνει τους καθοδικούς του στόχους, όπως είναι και η Raf. Η απελευθέρωση της RKIP από τις TAK, IKK α , IKK β και NIK, έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση και την αποδόμηση του I- κ B, η οποία καταλήγει στην απελευθέρωση του NF- κ B, ο οποίος μεταφέρεται στον πυρήνα και προσδένεται σε υποκινητές γονιδίων στόχων. Το συνολικό αποτέλεσμα είναι μια θετική ενίσχυση της ενεργότητας της Raf.

Παρουσία της RKIP, η Raf-1 αποδιατάσσεται από το σύμπλοκο της με την MEK, έχοντας ως αποτέλεσμα την ελάττωση και διακοπή της καθοδικής MAPK

σηματοδότησης. Όπως προαναφέρθηκε, η RKIP μπορεί να προσδένεται στην Raf-1 ή την MEK, αν και όχι ταυτόχρονα, και η πρόσδεση σε μια από τις δύο, είναι αρκετή για να προκαλέσει την καθοδική αναστολή²⁰⁵ (**Εικόνα 4.4**). Προτάθηκε επίσης ότι η RKIP συμμετέχει στην ανάπτυξη, την εξαλλαγή και τη διαφοροποίηση¹⁸⁸, καθώς τα μονοπάτια αυτά είναι συχνά απορυθμισμένα στον καρκίνο.



Εικόνα 4.4. Μοντέλο δράσης της RKIP. Η ενεργοποίηση της MEK από τη Raf-1 απαιτεί την αλληλεπίδραση ανάμεσα στις Raf-1 και MEK. Η πρόσδεση της RKIP είτε με τη Raf-1, είτε με την MEK, αποδιατάσσει τα σύμπλοκα των Raf-MEK με αποτέλεσμα την διακοπή της ενεργοποίησης της MEK και της καθοδικής σηματοδότησης. Η πρόσδεση της RKIP στην Raf-1, ρυθμίζεται αρνητικά από μιτωγόνα.

Η RKIP αλληλεπιδρά με μικρές GTP-binding πρωτεΐνες, ωστόσο όχι με το ίδιο το GTP²⁰⁶ και μπορεί να καθαριστεί μαζί με μ οπιοειδείς υποδοχείς με χρωματογραφία συγγένειας με τη μορφίνη, από ποντικίσιους εγκεφάλους²⁰⁷. Οι Grandy et al. είκασαν ότι η RKIP είναι μια σχετιζόμενη με μεμβράνες πρωτεΐνη, που μπορεί να αλλάζει την πρόσδεση του οπιοειδούς μέσω μιας ενζυμικά ή δομικά επαγόμενης αντίδρασης. Χρησιμοποιώντας υδροφοβική cluster analysis και μοριακή μοντελοποίηση, οι Schoentgen et al., έδειξαν ότι η βόεια RKIP μπορεί να κατέχει μια πιθανή νουκλεοτιδική θέση πρόσδεσης και πρότειναν πως αυτή ανήκει στην οικογένεια κινασών και προάγει τη μεταφορά υδροφοβικών ligands στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η συν-έκφραση της ανθρώπινης RKIP με τους υποδοχείς οπιοειδούς ή σωματοστατίνης (G-protein-coupled receptors) σε ωκύτταρα του *Xenopus laevis*, έδωσε in vivo απόδειξη ότι η RKIP μπορεί να ρυθμίζει την G-protein-coupled σηματοδότηση²⁰⁸.

Η Protein kinase C (PKC), η οποία φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες στόχους που ελέγχουν την αύξηση, τη διαφοροποίηση και τη μεταγραφή, μπορεί να απενεργοποιεί την RKIP μέσω της φωσφορυλίωσης της RKIP στην σερίνη 153, και να ελαφρύνει την αναστολή της Raf-1²⁰⁹. Κανονικά η PKC επιστρατεύεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και ενεργοποιείται από τη διακυλογλυκερόλη. Η τοποθέτηση της κοντά στην

κυτταροπλασματική μεμβράνη, την τοποθετεί σε γεινίαση με την RKIP, η οποία επίσης προσδένεται στα φωσφολιπίδια ²¹⁰. Ως αποτέλεσμα, η PKC σε συνδιασμό με την RKIP, δρουν ως μοναδικοί ρυθμιστές του σηματοδοτικού μονοπατιού Raf-1/MEK/ERK. Μόλις φωσφοριλυωθεί η RKIP, απελευθερώνεται από την Raf-1 και προσδένεται στην G-protein-coupled receptor kinase-2 (GRK-2), εμποδίζοντας την ικανότητα της GRK-2 να εμποδίζει την δράση του υποδοχέα G-protein-coupled receptor ²¹¹.

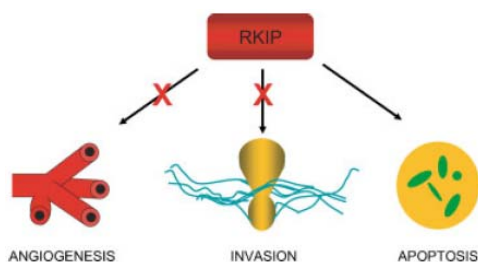
Συνοπτικά, η RKIP επιδρά σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια και η ίδια η ενεργότητα της RKIP, ρυθμίζεται από την PKC. Λόγω της συμμετοχής της σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, η RKIP ρυθμίζει κυτταρικές λειτουργίες που εξαρτώνται ή αλλάζουν από αυτά τα μονοπάτια.

4.5. Η RKIP ως αναστολέας της μετάστασης

Η μετάσταση, ορισμένη ως ο σχηματισμός προοδευτικά αυξανόμενων δευτερευόντων εστιών όγκου σε ασυνεχή από την πρωτεύουσα βλάβη σημεία ²¹², είναι μια διαδικασία πολλών σταδίων. Αρχικά, ένα μεταστατικό καρκινικό κύτταρο ξεφεύγει από τον αρχικό όγκο, μπαίνει στην κυκλοφορία, εισβάλλει σε κάποιο μακρινό σημείο και μεγαλώνει ως μακροσκοπικός όγκος στο σημείο-στόχο. Μιας και απαιτούνται πολλά στάδια για να συμβεί μετάσταση, είναι πιθανή η εμπόδισή της με την αναστολή μιας πρωτεΐνης που είναι απαραίτητη για την ολοκλήρωση οποιουδήποτε από αυτά τα βήματα ²¹³. Η υπόθεση αυτή γέννησε την ιδέα των γονιδίων καταστολέων της μετάστασης (metastasis suppressor genes-MSGs). Συνοπτικά, τα MSGs είναι γονίδια που εμποδίζουν την μεταστατική διεργασία, αλλά όχι την πρωτογενή ογκογένεση. Αρκετές μελέτες που έχουν δείξει ότι η έλλειψη της λειτουργίας συγκεκριμένων γονιδίων είναι ένα σημαντικό γεγονός στην πρόοδο προς την κακοήθεια, υποστηρίζουν τη ιδέα των MSGs ^{212, 214-216}. Λόγω της ικανότητας τους να ρυθμίζουν την μεταστατική διαδικασία, τα MSGs είναι πιθανοί διαγνωστικοί και θεραπευτικοί στόχοι. Επομένως, η αναγνώριση των MSGs ίσως να οδηγήσει σε προόδους στη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη.

Το RKIP έχει αναγνωριστεί πως έχει τις ικανότητες ενός MSG στον καρκίνο του προστάτη, με το να αναστέλλει πολλές προ-μεταστατικές λειτουργίες (**Εικόνα 4.5**). Το αρχικό στοιχείο ότι η RKIP παίζει ρόλο ως MSG στον καρκίνο του προστάτη, ήταν ότι η έκφραση του RKIP mRNA ελαττωνόταν σε μια κυτταρική σειρά από μεταστατικό καρκίνο του προστάτη, σε σύγκριση με τη μη-μεταστατική πατρική κυτταρική σειρά της ²¹⁷. Η σχέση αυτή επιβεβαιώθηκε στο πρωτεϊνικό επίπεδο με ανοσοϊστοχημεία, για να

συγκριθεί η έκφραση της RKIP σε μη-νεοπλαστικό προστάτη, πρωτογενή καρκίνο του προστάτη και προστατικές καρκινικές μεταστάσεις ¹⁹⁷. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης του RKIP ήταν υψηλότερα για τον καλοήγη ιστό, χαμηλότερα για τον καρκινικό ιστό, και μη-ανιχνεύσιμα στις μεταστάσεις (αρκετών διαφορετικών σημείων). Τα αποτελέσματα αυτά έδωσαν ισχυρά στοιχεία ότι η απουσία της RKIP σχετίζεται με την ανάπτυξη μετάστασης του καρκίνου του προστάτη.



Εικόνα 4.5. Πιθανός ρόλος της RKIP στην μετάσταση. Η RKIP μπορεί να ρυθμίζει πολλές κυτταρικές λειτουργίες οι οποίες μπορούν να επιδρούν στον σχηματισμό επιτυχών μεταστάσεων. Για παράδειγμα, η RKIP μπορεί να εμποδίζει την αγγειογένεση και την κυτταρική διηθητικότητα, και να προάγει την απόπτωση. Συνεπώς, η μειωμένη έκφραση του RKIP, προάγει την αγγειογένεση, την κυτταρική διήθηση και προκαλεί αντίσταση στην απόπτωση.

Για να εξεταστεί η δράση της RKIP κατά τη διάρκεια της προόδου του καρκίνου του προστάτη, ρυθμίστηκε η έκφραση του RKIP σε καρκινικά κύτταρα προστάτη για να καθοριστεί η επίδραση των διαφορετικών RKIP επιπέδων, στην μεταστατική ικανότητα των προστατικών καρκινικών κυττάρων. Η ρύθμιση της RKIP έκφρασης δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στην ικανότητα των κυττάρων να μεγαλώνουν *in vitro* ή στην ικανότητα τους να σχηματίζουν αποικίες στο άγαρ. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι το RKIP δεν έχει καμία επίδραση σε αυτές τις δύο ογκογενετικές ιδιότητες των ανθρώπινων καρκινικών προστατικών κυττάρων. Ωστόσο, η αύξηση της RKIP έκφρασης στα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα, μείωσε την ικανότητα της *in vitro* διήθησης ¹⁹⁷. Αντιστρόφως, η μείωση της έκφρασης του RKIP χρησιμοποιώντας antisense μόριο, σε μη-μεταστατικά κύτταρα καρκίνου του προστάτη, αύξησε την *in vitro* διηθητική τους ικανότητα. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η έκφραση του RKIP σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με την διήθηση των καρκινικών κυττάρων προστάτη *in vitro*.

Μόλις ενέθηκαν σε ποντίκια μεταστατικά καρκινικά κύτταρα που είχαν αποκαθισταμένη έκφραση του RKIP, αυτά ανέπτυξαν 70% λιγότερες μεταστάσεις (στον πνεύμονα) από ότι ποντίκια που έλαβαν μεταστατικά κύτταρα που είχαν επιμολυνθεί με έναν άδειο vector. Επιπλέον, στα ποντίκια που είχαν λάβει κύτταρα που εξέφραζαν το αποκαθισταμένο RKIP και ανέπτυσσαν μεταστάσεις, ο αριθμός των μεταστάσεων ήταν κατά πολύ λιγότερος από αυτό των ποντικίων που είχαν λάβει τα κύτταρα που εξέφραζαν χαμηλά επίπεδα της RKIP. Επιπροσθέτως, υπήρχε λιγότερος αγγειακός σχηματισμός και λιγότερη αγγειακή διήθηση στους πρωτογενείς όγκους που προέρχονταν από τα ποντίκια που είχαν λάβει τα τροποποιημένα να εκφράζουν το RKIP, κύτταρα. Όλα αυτά τα αποτελέσματα μαζί, προτείνουν ότι το RKIP δρα ως αναστολέας της μετάστασης, μέσω της μείωσης της αγγειογένεσης και της αγγειακής διήθησης.

Εκτός από αντι-μεταστατικές ιδιότητες, το RKIP έχει και προ-αποπτωτικές ιδιότητες στα καρκινικά κύτταρα. Η έκθεση καρκινικών κυττάρων του μαστού και του προστάτη σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, επάγει την έκφραση του RKIP και την απόπτωση²¹⁸. Το small interfering RNA (siRNA), το οποίο στοχεύει και μειώνει την έκφραση του RKIP, ελαττώνει την απόπτωση που προκαλείται από την χημειοθεραπεία. Επιπροσθέτως, τα καρκινικά κύτταρα του μαστού και του προστάτη που έχουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης του RKIP, είναι ανθεκτικά στην επαγόμενη-από-χημειοθεραπεία απόπτωση²¹⁸. Η αποκατάσταση των επιπέδων RKIP ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στην απόπτωση. Όλα μαζί τα αποτελέσματα συνιστούν πως η απώλεια του RKIP, όπως συμβαίνει στον καρκίνο του προστάτη, μπορεί να προσφέρει χημειοθεραπευτική αντοχή στα καρκινικά κύτταρα και γενικά να ενισχύει την πρόοδο του όγκου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Ο ιός του θηλώματος του ανθρώπου (HPV)

5.1. Γενικά

Η μολυσματική φύση των ανθρώπινων αλλά και των ζωϊκών περιοχών με μυρμηγκιές (warts), δείχθηκε στις αρχές του 20ου αιώνα ³¹. Τα πρώτα πειράματα που προσπάθησαν να συσχετίσουν τις μολύνσεις αυτές με την ανάπτυξη καρκινικών γεγονότων και να μελετήσουν την αλληλεπίδραση με άλλους καρκινογενετικούς παράγοντες πραγματοποιήθηκε από τον Rous και τους συνεργάτες του κατά το 1930 και τις επόμενες δυο δεκαετίες. Η πρώτη οπτικοποίηση σωματιδίων ιών θηλώματος σε ανθρώπινες μυρμηγκιές με μεθόδους ηλεκτρομικροσκοπίας αναφέρθηκε το 1949 ²¹⁹. Η δομή του γονιδιώματος των ιών του θηλώματος αναπτύχθηκε από τους Crawford και Crawford το 1963 ²²⁰. Η μη διαθεσιμότητα συστημάτων κυτταροκαλλιέργειας, παρόλα αυτά, και η προφανής καλοήθης φύση των ανθρώπινων μυρμηγκιών δεν οδήγησε σε αρκετά πειράματα τα επόμενα χρόνια. Το 1959 αναφέρθηκε η επαγωγή όγκων της ουροδόχου κύστεως στα βοοειδή από ένα ιό θηλώματος των βοοειδών που βρισκόταν σε ινωθελώματα του δέρματος. Οι ιοί αυτοί εμφανίζουν ογκογόνο δυναμικό σε ποντίκια χάμστερ ²²¹ και σε μετασχηματισμένα κύτταρα από μοσχάρι και ποντίκια σε κυτταροκαλλιέργειες ²²².

Μελέτες που ξεκινούν από το 1922 περιγράφουν μια σπάνια και προφανώς κληρονομική γενικευμένη θηλωμάτωση στους ανθρώπους με καρκίνωμα του δέρματος που αναπτύσσεται σε περιοχές εκτεθειμένες στον ήλιο. Το σύνδρομο αυτό ονομάστηκε Epidermodysplasia verruciformis και δεν ήταν γνωστή τότε η πιθανώς μολυσματική προέλευση των θηλωματικών πλακών και σπύλων που κάλυπταν το προσβεβλημένο δέρμα.

Σταδιακά η ανάπτυξη του ενδιαφέροντος για του ιούς του θηλώματος αναπτύχθηκε στο δεύτερο μισό της δεκαετίας του 1970, εξαιτίας της υπόθεσης ότι οι ιοί του θηλώματος μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ²³⁹. Επιπλέον, οι Meisels και Fortin ²²³ πρότειναν την ιϊκή προέλευση του θηλώματος της κοιλοκυτταρικής ατυπίας, που την διαχώρισε από τις "πραγματικές" νεοπλαστικές βλάβες. Η έρευνα στον τομέα των ιών του θηλώματος ενισχύθηκε από την αναγνώριση καινούργιων τύπων HPV σε βλάβες ασθενών με

Epidermodysplasia verruciformis (EV), και ιδιαίτερα σε κακοήθεις όγκους τέτοιων ασθενών^{224, 225}.

Στην δεκαετία του 1980 απομονώθηκαν νέοι τύποι όπως ο HPV-6 και -11 από γεννητικές βλάβες³¹ ενώ άμεσα από βιοψίες καρκίνου τραχήλου μήτρας απομονώθηκαν οι τύποι HPV-16 και -18²²⁶. Σήμερα, το ενδιαφέρον εστιάζεται στη διερεύνηση των μηχανισμών καρκινογένεσης από τους ιούς του θηλώματος. Οι ιοί του θηλώματος προκύπτουν ως οι πιο συχνοί ιοί καρκινώματος και εμφανίζονται να διαδραματίζουν ένα «μυστικό» ρόλο ως κύρια καρκινικά παθογόνα.

5.2. Δομή των ιϊκών σωματιδίων και ταξινόμηση

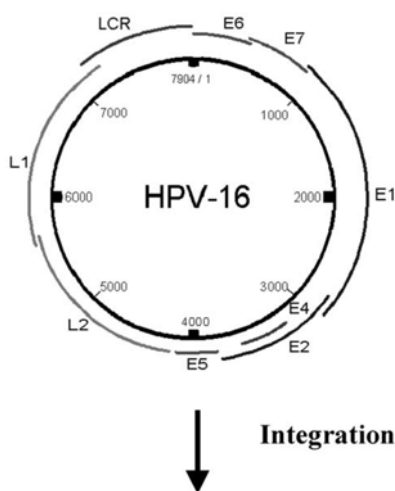
5.2.1. Ιϊκά σωματίδια

Η διάμετρος των ιών του θηλώματος (HPV) είναι περίπου 55nm. Τα πλήρη σωματίδια περιέχουν το διπλής αλυσίδας κλειστό κυκλικό DNA γονιδίωμα. Το ιϊκό DNA σχετίζεται με πρωτεΐνες παρόμοιες με ιστόνες^{227, 228} και περιβάλλεται από καψίδιο που αποτελείται από 72 καψομερή²²⁹. Η κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου κωδικοποιείται από L1 ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης. Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης L2 κωδικοποιεί για ένα πρόσθετο δομικό συστατικό του ιϊκού καψιδίου. Η πρωτεΐνη L1 έχει μοριακό βάρος περίπου 55000 και έχει υψηλό βαθμό συντήρησης στους διαφορετικούς ιούς θηλώματος. Η δεύτερη δομική πρωτεΐνη, η L2, είναι λιγότερο συντηρημένη και το μοριακό βάρος της είναι περίπου 75000. Η μη εισαγωγή τους σε φάκελο, τους καθιστά ανθεκτικούς στην θερμότητα και στους οργανικούς διαλύτες²³⁰.

5.2.2. Δομή και ρύθμιση του ιϊκού γενώματος

Το γονιδίωμα αποτελείται από 7200-8000 ζεύγη βάσεων από κλειστό-κυκλικό δίκλωνο DNA που έχει περίπου 20 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (**Εικόνα 5.1**). Η δομή των ιϊκών γονιδιωμάτων αποκαλύπτει σημαντικές ομοιότητες μεταξύ των διαφορετικών μελών αυτής της ιϊκής ομάδας. Γενικά, μονάχα η μια αλυσίδα είναι μεταγραφικά ενεργή, γι'αυτό η μεταγραφή γίνεται μονάχα προς την μια κατεύθυνση, και η θέση των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης αποκαλύπτει σημαντικό βαθμό ανταπόκρισης^{231, 232}. Τα γενώματα των ιών του θηλώματος μπορούν να χωριστούν σε τρεις περιοχές: την μακρά περιοχή ελέγχου (LCR) που αποτελεί το 10% του γενώματος, και την πρώιμη (E) και όψιμη (L) περιοχή. Τα γονίδια L κωδικοποιούν για δομικές πρωτεΐνες, η περιοχή E

κυρίως για ρυθμιστικές λειτουργίες που σχετίζονται με την παρουσία του γονιδιώματος, την αντιγραφή του DNA, και την ενεργοποίηση του λυτικού κύκλου.



Εικόνα 5.1. Οργάνωση του γονιδιώματος του HPV-16. Αναφέρονται οι περιοχές των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης που κωδικοποιούν τις πρώιμες (E1-E7) και όψιμες (L1, L2) πρωτεΐνες, καθώς επίσης και τη μακρά περιοχή ελέγχου (LCR).

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του ιού είναι πολύπλοκη και ελέγχεται από κυτταρικούς και ιικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Η περιοχή LCR των ιών HPV του γεννητικού συστήματος ποικίλει σε μέγεθος από 800-900 bp, ενώ σε άλλους ιούς θηλώματος είναι μικρότερη. Στην περιοχή LCR εδράζουν στοιχεία cis-active που ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων E6/E7, τα οποία αντιπροσωπεύουν τα γονίδια μετασχηματισμού και ευθύνονται για την αθανатоποίηση και τη διατήρηση του κακοήθους φαινοτύπου στα HPV-θετικά κύτταρα καρκίνου τραχήλου της μήτρας ^{32, 233, 234}.

Έχουν αναγνωρισθεί αρκετοί κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται στην περιοχή LCR του ιού HPV-18. Τέτοιοι είναι οι παράγοντες NF-1, AP1, KRF-1, Oct-1, SP-1, YY-1 και ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών ²³⁵⁻²³⁸. Η δυσλειτουργία κάποιων από αυτούς φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση που σχετίζεται με ιούς του θηλώματος ³¹. Οι περισσότεροι παράγοντες προσδένονται στην κεντρική περιοχή του LCR, που αντιπροσωπεύει περιοχή-ενισχυτή και ρυθμίζουν την μεταγραφή του υποκινητή των γονιδίων E6/E7 που εδράζει στο 3'-άκρο του LCR. Παρόλο, που αρκετοί από αυτούς τους παράγοντες διεγείρουν τον υποκινητή, κάποιοι από αυτούς (ειδικά οι YY-1) έχουν διπλό ρόλο δηλαδή συνάμα διεγείρουν και καταστέλλουν τον ιικό υποκινητή ^{31, 239, 240}.

Εκτός από την κυτταρική ρύθμιση, η ενδογονιδιακή ρύθμιση της γονιδιακής λειτουργίας των E6/E7 από την E2 πρωτεΐνη του ιού παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση ή την καταστολή αυτών των ογκογονιδίων. Η περιοχή LCR του ιού HPV-

16 περιέχει τέσσερις περιοχές πρόσδεσης της E2. Η μια βρίσκεται στην 5' περιοχή του LCR, οι δυο εκατέρωθεν του κεντρικού τμήματος και η μια στο 3' άκρο. Το εγγύς τμήμα της περιοχής του υποκινητή, στο 5' σταματά στην E2 και στο 3' από το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης του E6 γονιδίου. Δυο επιπλέον περιοχές πρόσδεσης της E2 βρίσκονται μέσα στα εγγύς 90 ζεύγη βάσεων που αλληλεπικαλύπτουν ένα TATA κουτί. Η πρόσδεση του E2 σε αυτές τις περιοχές τροποποιεί την λειτουργία του υποκινητή μεταθέτοντας το βασικό μεταγραφικό σύμπλοκο ²⁴¹.

5.3. Ονοματολογία και ταξινόμηση

Η γενετική ετερογένεια των ανθρωπίνων ιών του θηλώματος έγινε περισσότερο εμφανής από το 1976 ³¹. Για την τυποποίηση των ιών του θηλώματος χρησιμοποιήθηκαν ως κριτήριο οι διαφορές στο DNA και συγκεκριμένα στα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης E6, E7 και L1 ²⁴². Για να οριστούν νέοι τύποι πρέπει να υπάρχουν σε αυτά τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης διαφορές μεγαλύτερες του 10%. Από το 1995 και έπειτα χρησιμοποιήθηκαν οι διαφορές μονάχα στο L1 ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης για τον καθορισμό νέων τύπων όταν αυτές υπερβαίνουν το 10%. Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευθεί 77 διακριτοί γονότυποι HPV και οι αλληλουχίες του γονιδιώματος των περισσότερων από αυτούς έχουν περιγραφεί πλήρως ^{243, 244}. Περίπου 30 επιπρόσθετες τμηματικές αλληλουχίες έχουν απομονωθεί από πιθανούς καινούργιους τύπους, υπονοώντας ότι ο συνολικός αριθμός των υπαρκτών τύπων HPV θα υπερβαίνει τους εκατό.

Βασιζόμενοι στην σύνθεση του νουκλεϊκού οξέος των ιών HPV μπορούμε να διακρίνουμε επιμέρους ομάδες ιών θηλώματος ²⁴⁵. Μια από τις μεγαλύτερες υποομάδες αντιπροσωπεύεται από τύπους που προσβάλλουν κυρίως βλεννώδεις επιφάνειες, ιδιαίτερα της γεννητικής οδού. Περισσότεροι από 40 τύποι που έχουν αναγνωριστεί να ανήκουν σε αυτή την ομάδα. Ο κυριότερος εκπρόσωπος της ομάδας αυτής είναι ο HPV-16. Μια άλλη ομάδα αντιπροσωπεύεται από ιούς που εμφανίζονται σε βλάβες με Erythrodermia verruciformis, με τον HPV-5 ως κυριότερο αντιπρόσωπο. Οι ιοί αυτοί βρίσκονται επίσης σε βλάβες ασθενών που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή. Μια τρίτη υπομονάδα περιέχει κάποιους ιούς που βρίσκονται κατά προτίμηση σε δερματικές βλάβες. Το πρωτότυπο της υποομάδας αυτής είναι ο HPV-4. Μια τέταρτη υπομονάδα, που από μόνη της είναι ετερογενής, περιέχει μακρινά σχετιζόμενους τύπους όπως HPV-1, HPV-63, και HPV-41.

Η ετερογένεια των ιών του θηλώματος δεν περιορίζεται μόνο στους ανθρώπους. Έχουν επίσης απομονωθεί 8 τύποι από βοοειδή και 4 έχουν κλωνοποιηθεί από πιθήκους. Ένας αριθμός από ιούς θηλώματος ζώων σχετίζονται με συγκεκριμένα μέλη μεμονωμένων ανθρωπίνων υποομάδων από κάποια μέλη των ομάδων μεταξύ τους.

5.4. Λειτουργίες των ιικών πρωτεϊνών E6 και E7

Οι E6 και E7 πρωτεΐνες εκφράζονται στα HPV-θετικά καρκινικά κύτταρα . Οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να προκαλούν αθανатоποίηση ανθρωπίνων κερατινοκυττάρων και ενός αριθμού άλλων κυτταρικών τύπων. Οι τύποι HPV που κωδικοποιούν για τα γονίδια E6 και E7 λαμβάνουν μέρος στην αθανатоποίηση κυττάρων κυτταροκαλλιέργειών και βρίσκονται συχνά σε κακοήθεις όγκους, θεωρούνται τύποι υψηλού κινδύνου σε αντίθεση με του χαμηλού κινδύνου που έχουν χαμηλό ογκογόνο δυναμικό ³¹. Τα γονίδια E6 και E7 κωδικοποιούν πρωτεΐνες που διεγείρουν την αύξηση, ειδικότερα οι πρωτεΐνες E6 και E7 κάποιων τύπων σχετίζονται με την εξέλιξη σε κακοήθη αύξηση ²⁴⁶. Και οι δυο πρωτεΐνες των τύπων HPV υψηλού κινδύνου συνεργάζονται στην αθανатоποίηση και τον μετασχηματισμό κυττάρων ³².

5.4.1. E6 πρωτεΐνη

Η πρωτεΐνη E6 του ιού HPV-16 περιέχει 151 αμινοξέα και εμφανίζει τέσσερα μοτίβα Cys-X-X-Cys μεσολαβώντας σε πρόσδεση με ψευδάργυρο που καταλήγει στον σχηματισμό δυο δομών «δακτύλων ψευδαργύρου» ^{247, 248}. Η E6 συνεργάζεται με την E7 πρωτεΐνη στην αθανатоποίηση ανθρωπίνων κυττάρων ³². Η εισαγωγή του σε κάποια ανθρώπινα κύτταρα θηλαστικών μπορεί να οδηγήσει στην αθανатоποίηση τους ακόμα και σε απουσία του E7 ²⁴⁹. Η E6 των τύπων αυτών συνεργάζεται με τα ογκογονίδια ras στην αθανатоποίηση αρχέγονων κυττάρων τρωκτικών ²⁵⁰ και επάγει αύξηση που είναι ανεξάρτητη της πρόσδεσης σε κύτταρα NIH3T3 και ενεργοποιεί ετερόπλευρα τον υποκινητή του αδενοϊού E2 κατά την μεταγραφή ²⁵¹.

Μια σημαντική παρατήρηση που σχετίζεται με τη λειτουργία της E6 πρωτεΐνης αποκάλυψε την πρόσδεση της στην κυτταρική p53 ²⁵². Η πρόσδεση αυτή επάγει την αποικοδόμηση της p53 ³³ μέσω του κυτταρικού πρωτεολυτικού συστήματος με ουβικουϊτίνη ²⁵³. Η p53 δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής με την πρόσδεση της σε ειδικές αλληλουχίες DNA και είναι απαραίτητη για την παύση της αύξησης που ακολουθεί την καταστροφή του κυτταρικού DNA ²⁵⁴. Τα κύτταρα που δεν διαθέτουν

λειτουργική p53 δεν σταματούν όπως θα έπρεπε στην φάση G1, και εμφανίζουν ανισορροπία γονιδιώματος ²⁵⁵. Η μεταγραφική ενεργοποίηση που επάγεται μετά από την καταστροφή του DNA αναστέλλεται από την E6 του HPV-18 ²⁵⁶. Η αλληλεπίδραση της E6 με την p53 είναι εμφανώς ο πρωταρχικός λόγος πρόκλησης χρωμοσωμικής ανισορροπίας σε κύτταρα που μολύνονται από κάποιον HPV υψηλού κινδύνου ²⁵⁷. Ευαισθητοποιεί τα ανθρώπινα μαζικά επιθηλιακά κύτταρα ως προς την απόπτωση που επάγεται από την καταστροφή του DNA ²⁵⁸. Η απώλεια της λειτουργίας της p53 μετά από επιμόλυνση με το γονίδιο της E6 ενισχύει την ανθεκτικότητα ανθρώπινων διπλοειδών ινοβλαστών σε ιονίζουσα ακτινοβολία.

Η αποικοδόμηση της p53 δεν είναι επαρκής για την ενεργοποίηση της αύξησης της E6 που παρατηρείται σε ανθρώπινους εμβρυϊκούς ινοβλάστες. Επιπρόσθετα, η E6 εκτός την πρόσδεση με την p53 και την κυτταρική ουβικουΐτινη E6-AP, δεσμεύεται και με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες ²⁵⁹ και με μια πρωτεΐνη που δεσμεύει ασβέστιο.

5.4.2. E7 πρωτεΐνη

Η E7 πρωτεΐνη του HPV-16 αντιπροσωπεύει μια φωσφοπρωτεΐνη προσδεδόμενη με ψευδάργυρο σε δυο περιοχές Cys-X-X-Cys που αποτελείται από 98 αμινοξέα. Παρουσιάζει δομικές ομοιότητες με την E6 πρωτεΐνη στοιχειοθετώντας μια πιθανή εξελικτική συσχέτιση των δυο πρωτεϊνών. Το αμινοτελικό ακραίο τμήμα της E7 πρωτεΐνης περιέχει δυο περιοχές που ανταποκρίνονται μερικώς στην συντηρημένη περιοχή (CR-1) και καθολικά στη συντηρημένη περιοχή 2 (CR-2) των E1A πρωτεϊνών του αδενοϊού και με μια ανάλογη περιοχή του T αντιγόνου του SV40 (145). Οι περιοχές αυτές του E7 (cd-1, cd-2) συνεισφέρουν στο δυναμικό αθανатоποίησης του E7 ³². Όπως ακριβώς το E1A έτσι και το μεγάλο T αντιγόνο του SV40, η πρωτεΐνη E7 των ιών HPV υψηλού κινδύνου σχηματίζουν σύμπλοκα με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος pRB ²⁶⁰. Η ικανότητα πρόσδεσης της E7 των ιών HPV υψηλού κινδύνου στην pRB είναι περίπου 10 φορές μεγαλύτερη από αυτή των χαμηλού κινδύνου. Η διαφορά αυτή προκύπτει πιθανώς από μια τροποποίηση ενός μόνο αμινοξέως στην θέση 21 ²⁶¹ που επηρεάζει την ικανότητα της E7 να συνεργάζεται με ενεργοποιημένα γονίδια ras κατά τον μετασχηματισμό νεφρικών κυττάρων αρουραίων ¹⁰⁶. Η πρόσδεση στην pRB δεν αποτελεί γενική προδιάθεση σε αθανатоποίηση ²⁶², συνηγορώντας σε επιπρόσθετες λειτουργίες της πρωτεΐνης E7. Τα σύμπλοκα E7/pRB απελευθερώνουν τον μεταγραφικό παράγοντα E2F από τα σύμπλοκα με pRB, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή γονιδίων που ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση ²⁶³. Η E7 πρωτεΐνη των ιών υψηλού κινδύνου

ενώνεται με σχετιζόμενες πρωτεΐνες, όπως η p107 και η p130, και με την πρωτεϊνική κινάση p33cdk2 και με την κυκλίνη A²⁶⁴. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση της E7 οδηγεί σε συνεχή έκφραση των γονιδίων της κυκλίνης E και A σε απουσία εξωτερικών αυξητικών παραγόντων⁹⁶. Η E7 ενεργοποιεί τον υποκινητή της κυκλίνης A μέσω της θέσης πρόσδεσης του E2F. Η κυκλίνη D1 δεν επηρεάζεται από την E7. Η ικανότητα της E7 για μετασχηματισμό σχετίζεται με την ενεργοποίηση των κυκλινών E και A. Η E7 πρωτεΐνη του HPV-16 μπορεί να συμπληρώνει λειτουργίες του E1A που απαιτούνται για την διέγερση των πρώιμων υποκινητών του αδενοϊού τύπου 5²⁶⁵. Με αυτό τον τρόπο σταθεροποιείται η συσχέτιση πρωτεϊνικών συμπλόκων που περιέχουν το c-jun, με πλευρές ATF. Με τη χρήση ενός πρωτεϊνικού συστήματος συγχώνευσης γλουταθιόνης-S-τρανσφεράσης, η E7 με τα μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου κάνει σύμπλοκα με τους μεταγραφικούς παράγοντες AP-1 καθώς και με τα c-jun, jun-B, jun-D και c-fos.

5.5. Λειτουργίες των ιϊκών πρωτεϊνών E1, E2, E4 και E5

Η πρωτεΐνη E1 κωδικοποιεί για ένα πολυκυστρονικό RNA, συνδέει και υδρολύει το ATP⁹², και διαθέτει ATP-εξαρτώμενη δραστηριότητα ελικάσης. Η E1 είναι σημαντική για την αντιγραφή των ιών του θηλώματος²⁶⁶. Μαζί με την περιοχή L1, το E1 ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης αντιπροσωπεύουν τις πλέον συντηρημένες περιοχές μεταξύ των διαφόρων τύπων HPV.

Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης E2 κωδικοποιεί για δυο και πιθανώς τρεις πρωτεΐνες, οι οποίες δρουν όλες ως μεταγραφικοί παράγοντες²⁶⁷. Η καθεμιά από αυτές επιδρά διαφορετικά στην ιϊκή γονιδιακή έκφραση και αντιπροσωπεύουν σημαντικούς ενδογονιδιακούς ρυθμιστές. Διαγραφή του E2 ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης παρατηρείται συχνά σε κύτταρα καρκίνου τραχήλου μήτρας³¹, οδηγώντας στην υπόθεση ότι αυτή η διαγραφή διευκολύνει την μεταμόρφωση ανθρώπινων κυττάρων και την μετάβασή τους σε κακοήθη κατάσταση. Επίσης, οι πρωτεΐνες E2 αλληλεπιδρώντας με την E1, διεγείρουν την αντιγραφή του ιϊκού DNA²⁶⁸.

Η πρωτεΐνη E4 εντοπίζεται αποκλειστικά εντός της διαφοροποιημένης στοιβάδας του προσβεβλημένου επιθηλίου⁵⁵. Εικάζεται ότι αυτή η πρωτεΐνη ενέχεται στην παραγωγική λοίμωξη, πιθανώς μέσω παρεμπόδισης της φυσιολογικής διαφοροποίησης, δημιουργώντας έτσι τις ιδανικές συνθήκες για την ωρίμανση του ιού. Η αλληλεπίδραση της E4 με κυτταροκερατίνες πιθανώς ενέχεται στον καθορισμό της ιστοειδικότητας των διαφόρων τύπων του HPV²⁶⁹.

Η πρωτεΐνη E5 είναι υδρόφοβη και εντοπίζεται κυρίως εντός της συσκευής του Golgi, ενώ εν μέρει βρίσκεται και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ²⁷⁰. Στις HPV λοιμώξεις η E5 παρουσιάζει μόνο μικρή ικανότητα μεταμόρφωσης ²⁷¹. Θεωρείται ότι παίζει ρόλο στα αρχικά στάδια της HPV λοίμωξης, αλλά είναι προφανώς απαραίτητη για την διατήρηση της κακοήθους εξαλλαγής. Αλληλεπιδρά επίσης με τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF) και την ΑΤΡάση ²⁷².

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Ερπητοϊοί

6.1. Εισαγωγή

Οι ερπητοϊοί οφείλουν το όνομά τους στην ελληνική λέξη «έρπω», λόγω των λανθανουσών, χρόνιων και υποτροπιαζόντων λοιμώξεων που προκαλούν. Η οικογένεια Herpesviridae περιλαμβάνει περίπου 100 ιούς. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 8 από αυτούς ως υπεύθυνοι για λοιμώξεις στον άνθρωπο. Υπάρχουν 3 υποοικογένειες: η υποοικογένεια **Alphaherpesvirinae** περιλαμβάνει το ιό του απλού έρπητα τύπου 1 (HSV-1), τον ιό του απλού έρπητα τύπου 2 (HSV-2) και τον ερπητοϊό του ανθρώπου τύπου 3 ή Varicella-Zoster (VZV). Η υποοικογένεια **Betaherpesvirinae** περιλαμβάνει τον ερπητοϊό του ανθρώπου τύπου 5 ή κυτταρομεγαλοϊό (CMV), τον ερπητοϊό του ανθρώπου τύπου 6 (HHV-6) και τον ερπητοϊό του ανθρώπου τύπου 7 (HHV-7). Η υποοικογένεια **Gammaherpesvirinae** περιλαμβάνει τον ερπητοϊό του ανθρώπου τύπου 4, γνωστό και ως ιό Epstein-Barr (EBV) και τον ερπητοϊό του ανθρώπου τύπου 8 (HHV-8).

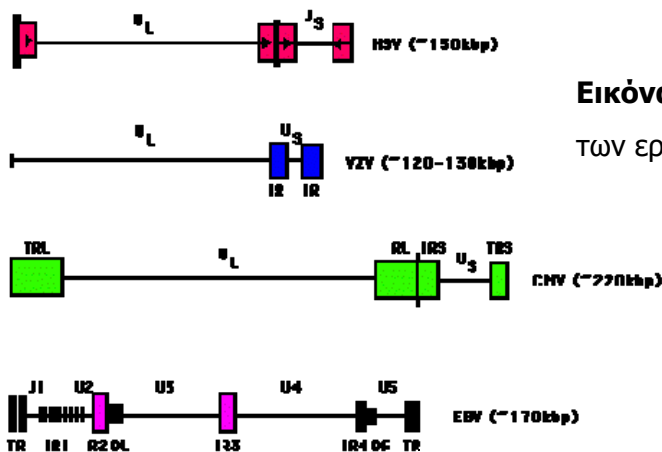
Για πολλά χρόνια η επιδημιολογία των κοινών λοιμώξεων από ερπητοϊούς ήταν ασαφής. Το 1950, οι Burnet και Buddingh έδειξαν ότι ο ιός του απλού έρπητα μετά την πρωτοπαθή λοίμωξη, μπορούσε να μεταπέσει σε λανθάνουσα κατάσταση και να επανενεργοποιηθεί αργότερα μετά από κάποιο εκλυτικό αίτιο. Το 1954 ο Weller απομόνωσε τον ιό του έρπητα ζωστήρα και από την ανεμοβλογιά και από τον έρπητα ζωστήρα, δείχνοντας ότι και για τις δύο νόσους υπεύθυνος είναι ο ίδιος ιός.

Η μορφολογία όλων των ερπητοϊών είναι παρόμοια και χαρακτηριστική. Αν και έχουν αρκετά κοινά αντιγόνα, μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ τους λόγω διαφορών στο γονιδίωμα τους, καθώς και με ορολογικές δοκιμασίες. Η διάμετρος των σωματιδίων των ερπητοϊών είναι 180-200 nm. Σε ένα πληθυσμό βιρίων, πολλά σωματίδια δεν έχουν έλυτρο και πολλά είναι άδεια καψίδια. Τα συστατικά του βιρίου διατάσσονται ως εξής: 1) DNA με ένα εσωτερικό κέλυφος διαμέτρου 75 nm, 2) ένα εικοσαεδρικό καψίδιο διαμέτρου 95-105 nm το οποίο αποτελείται από 162 εξαγωνικά καψομερίδια, 3) μια περιβάλλουσα κοκκιώδη ζώνη (tegument) αποτελούμενη από σφαιρικές πρωτεΐνες και 4) ένα περιβάλλον έλυτρο το οποίο περιέχει γλυκοπρωτεΐνες. Όπως και οι άλλοι ιοί με έλυτρο, οι ερπητοϊοί είναι ασταθείς σε θερμοκρασία δωματίου και απενεργοποιούνται εύκολα από λιπιδικούς διαλύτες.

Το DNA είναι ένα μεγάλο γραμμικό δίκλωνο μόριο, βάρους 130-230 kbp. Το γονιδίωμα τους φέρει μοναδικές μεγάλες (UL) και μοναδικές μικρές (US) κωδικοποιούσες περιοχές, οι οποίες περιβάλλονται από τελικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (IR). Οι επαναλαμβανόμενες αυτές αλληλουχίες αναστρέφονται επιτρέποντας την αναδιάταξη των περιοχών UL και US. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να υπάρχει το γονιδίωμα των ερπητοϊών σε τέσσερις ισομερείς μορφές (**Εικόνα 6.1**). Επίσης η ύπαρξη αυτών των αλληλουχιών επιτρέπει την κυκλοποίηση του DNA, που απαιτείται κατά τη διάρκεια του διπλασιασμού.

Το μεγάλο γονιδίωμα των ερπητοϊών κωδικοποιεί για 100 περίπου πεπτίδια. Από αυτά πολλά είναι ένζυμα που ενέχονται στην σύνθεση του DNA, όπως η DNA πολυμεράση, ενώ άλλα εμπλέκονται στη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης, όπως είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες.

Το έλυτρο των ερπητοϊών περιέχει γλυκοπρωτεΐνες, οι περισσότερες από τις οποίες φαίνεται να είναι απαραίτητες για να εκδηλωθεί η μολυσματική δράση του ιού. Η αλληλεπίδραση αυτών των γλυκοπρωτεϊνών με κυτταρικούς υποδοχείς του ξενιστή οδηγεί στην άμεση σύντηξη του ελύτρου με την κυτταρική μεμβράνη.



Εικόνα 6.1. Η δομή του γονιδιώματος των ερπητοϊών HSV, VZV, CMV και EBV.

Ενδοκύττωση δεν είναι απαραίτητη, αλλά μπορεί να συμβεί (εναλλακτικός τρόπος διείσδυσης). Η σύντηξη εναποθέτει το καψίδιο μέσα στο κυτταρόπλασμα, και στη συνέχεια το καψίδιο μεταναστεύει στον πυρήνα. Το εσωτερικό κέλυφος του ιού εισέρχεται μέσω μιας πυρηνικής οπής και ακολούθως το DNA του ιού κυκλοποιείται. Από την RNA πολυμεράση II του κυττάρου ξενιστή, παράγονται περίπου 50 αγγελιοφόρα RNAs (mRNAs). Διακρίνονται 3 ξεχωριστές κατηγορίες παραγόμενων RNAs: τα α-mRNAs (ή άμεσα πρώιμα) είναι οι πρωτεΐνες που συντίθενται πρώτες και

επιτρέπουν τη μεταγραφή του mRNA για την επόμενη ομάδα πρωτεϊνών (β ή πρώιμες). Τα β mRNAs επιτρέπουν τη συνέχιση της μεταγραφής του DNA, η οποία ακολουθείται από την εμφάνιση των τελευταίων πρωτεϊνών (γ-mRNAs ή όψιμων).

Η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται ως εξής: εάν η μετάφραση διακοπεί νωρίς μετά την λοίμωξη, τα α-mRNAs συσσωρεύονται στον πυρήνα, και δεν μεταγράφονται άλλα ιϊκά mRNAs. Η σύνθεση των πρώιμων γονιδιακών προϊόντων απενεργοποιεί τα α-mRNAs και αποτελεί την έναρξη για την αντιγραφή του DNA. Κάποιες από τις όψιμες πρωτεΐνες παράγονται ανεξάρτητα από την αντιγραφή του DNA, ενώ άλλες παράγονται μόνο μετά την αντιγραφή.

Τόσο οι α όσο και οι β πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για τον γονιδιακό διπλασιασμό. Στην αντιγραφή εμπλέκονται μια εξαρτώμενη από το DNA του ιού DNA πολυμεράση και μια πρωτεΐνη συνδέουσα το DNA, σε συνδιασμό με μια πλειάδα ενζύμων όπως είναι η κινάση της θυμιδίνης, τα οποία τροποποιούν την κυτταρική βιοχημεία του ξενιστή. Επιπλέον, για την αντιγραφή του ιϊκού γενώματος απαιτούνται και κυτταρικές πρωτεΐνες, και γι'αυτό το λόγο η αντιγραφή του HSV λαμβάνει χώρα στον πυρήνα. Τελικώς, μόνο το 25% του ιϊκού DNA/παραγόμενη πρωτεΐνη ενσωματώνεται σε βίρια. Τα υπόλοιπα συσσωρεύονται μέσα στο κύτταρο του ξενιστή, το οποίο τελικά πεθαίνει. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η παραγωγή χαρακτηριστικών σωματιδίων με πυρηνικά έγκλειστα. Η αντιγραφή του ιϊκού DNA αποτελεί το στόχο αρκετών επιτυχών αντιϊκών φαρμάκων, όπως η ακυκλοβίρη.

6.2. Οι ιοί του απλού έρπητα HSV-1 και HSV-2

Οι ιοί του απλού έρπητα 1 και 2 αποτελούν τους πλέον σημαντικούς παθογόνους για τον άνθρωπο εκπροσώπους της οικογένειας των ερπητοϊών. Ο τύπος HSV-1 συνδέεται με λοιμώξεις του προσώπου και εγκεφαλίτιδα, ενώ ο τύπος HSV-2 προκαλεί λοιμώξεις στα γεννητικά όργανα και μπορεί να μεταδοθεί από τη μητέρα στο έμβρυο. Και οι δυο ιοί καταλείπουν λανθάνουσες λοιμώξεις στους αισθητικούς νευρώνες, και κατά την επανενεργοποίησή τους προκαλούν εστίες κοντά στα σημεία εισόδου τους στο σώμα.

Οι HSV-1 και HSV-2 έχουν διαφορετικούς τρόπους μετάδοσης, η επίπτωσή τους είναι παγκόσμια και ανεξάρτητη από τις εποχιακές συνθήκες, και μολύνουν μόνο ανθρώπους. Οι περισσότεροι άνθρωποι έχουν έρθει κάποια στιγμή στη ζωή τους σε επαφή με τον ιό και σε αυτούς ο ιός παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση και μπορεί να επανενεργοποιηθεί. Η ορομετατροπή μετά από μόλυνση με HSV-1 σε λιγότερο

ανεπτυγμένες χώρες λαμβάνει χώρα σε ασθενείς νεαρότερης ηλικίας (30% των παιδιών κάτω των 5 ετών και 70-80% των εφήβων). Η λοίμωξη με HSV-2 είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενη. 20-30% των εφήβων είναι οροθετικοί για τον HSV-2 και το ποσοστό αυτό αυξάνει στο 35-60% για ασθενείς ηλικίας 60 ετών. Παράγοντες που σχετίζονται με τη λοίμωξη από HSV-2 περιλαμβάνουν το φύλο (συχνότερα σε γυναίκες), τη φυλή (συχνότερα σε Αφρο-Αμερικανούς), την οικογενειακή κατάσταση και τον αριθμό των σεξουαλικών συντρόφων ²⁷³.

Οι βιολογικές ιδιότητες του HSV που καθορίζουν την πορεία της λοίμωξης από αυτόν, είναι η ικανότητά του να εισδύει στα νευρικά κύτταρα, η νευροτοξικότητα και η ικανότητα παραμονής του σε λανθάνουσα κατάσταση στα ραχιαία γάγγλια και σε άλλες θέσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος. Για την έναρξη της λοίμωξης, ο ιός πρέπει να έρθει σε επαφή με τους βλεννογόνους ή με δέρμα που να παρουσιάζει λύση της συνέχειάς του. Ο τύπος της λοίμωξης που θα επακολουθήσει είναι συνάρτηση της κατάστασης του ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι, ασθενείς που δεν έχουν έρθει ποτέ σε επαφή με τον ιό (είναι δηλ. οροαρνητικοί), μετά την πρώτη τους έκθεση σε αυτόν θα αναπτύξουν «πρωτοπαθή» λοίμωξη. Η «αρχική» λοίμωξη λαμβάνει χώρα όταν ένας ασθενής που έχει αντισώματα είτε για τον HSV-1 είτε για τον HSV-2, μολυνθεί για πρώτη φορά με τον άλλο τύπο του ιού ²⁷⁴.

Ακολούθως, ο ιός από την αρχική θέση προσβολής μεταναστεύει εντός 48 ωρών στους αισθητικούς νευρώνες, όπου παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση. Αυτό πρακτικά φανερώνει την αδυναμία των διαφόρων αντιερπητικών φαρμάκων και εμβολίων να προστατεύσουν ή να προλάβουν τη λανθάνουσα κατάσταση του ιού. Η εγκατάσταση του ιού στα γάγγλια γίνεται προφανώς για να προφυλαχθεί ο ιός από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Κατά τη λανθάνουσα φάση, το DNA του ιού βρίσκεται σε επισωματική μορφή εντός των νευρώνων και εκφράζονται από τον ιό μόνο περιορισμένες πρωτεΐνες που απαιτούνται για την διατήρηση αυτής της λανθάνουσας φάσης.

Παράγοντες που επανενεργοποιούν τον ιό ώστε να επανέλθει στην περιφέρεια και να εκδηλώσει την λοιμογόνο δράση του (υποτροπή της νόσου) περιλαμβάνουν κόπωση, ανοσοκαταστολή, εξασθένηση, stress, υπερϊώδης ακτινοβολία και ιστική καταστροφή. Για την ενεργοποίηση του ιού συμμετέχει ενεργά το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ICPO, οπότε ο ιός μεταπίπτει στην ενεργό (λυτική) φάση. Άλλες πρωτεΐνες που ενέχονται στην ενεργοποίηση του ιού είναι οι VP16, ICP4 και ICP27 ²⁷⁵.

6.2.1. Κλινική εικόνα

Οι πρωτοπαθείς, οι αρχικές και οι υποτροπιάζουσες ερπητικές λοιμώξεις μπορεί να είναι ασυμπτωματικές. Η συμπτωματική πρωτοπαθής λοίμωξη από τον HSV-1 χαρακτηρίζεται από εστίες στον βλεννογόνο του στόματος και των ούλων (διάρκειας 2-3 εβδομάδων) και εμπύρετο (38.3-40°C) το οποίο υποχωρεί εντός 3-5 ημερών. Οι φυσαλίδες εμφανίζονται σαν λευκωπές πλάκες στη γλώσσα, την υπερώα και τον φάρυγγα, οι οποίες στη συνέχεια εξελκώνονται και εκλύπτονται από ψευδομεμβράνες. Συνυπάρχει λεμφαδενοπάθεια. Εξελκωμένες εστίες εντός της στοματικής κοιλότητας είναι ενδεικτικές πρωτολοίμωξης, ενώ εστίες στην περιοχή των χειλέων υποδηλώνουν υποτροπιάζουσα λοίμωξη.

Οι υποτροπιάζουσες λοιμώξεις από τον HSV-1 χαρακτηρίζονται από άλγος, καύσο και κνησμό, τα οποία προηγούνται της εμφάνισης των εστιών κατά λίγες ώρες. Ακολούθως εμφανίζονται οι φυσαλίδες με συνηθέστερες θέσεις εντόπισής τους τα χείλη, τα ρουθούνια, τις παρειές και τα βλέφαρα. Το υγρό των φυσαλίδων αρχικά είναι διαυγές και αργότερα γίνεται οροπυώδες. Στη συνέχεια οι φυσαλίδες σπάνε, σχηματίζονται εφελκίδες και οι βλάβες επουλώνονται μέσα σε 8-10 ημέρες ²⁷⁶.

Η πρωτοπαθής λοίμωξη των οφθαλμών από τον HSV-1 προκαλεί ερπητική κερατοεπιπεφυκίτιδα που χαρακτηρίζεται από έντονη πυώδη επιπεφυκίτιδα με θολερότητες και εξελκώσεις του κερατοειδούς (γεωγραφικά έλκη). Οι πρωταίοι λεμφαδένες είναι διογκωμένοι και οι υποτροπές συχνές.

Η ερπητική εγκεφαλίτιδα χαρακτηρίζεται από εμπύρετο, παραισθήσεις και παραλύσεις. Ο HSV μπορεί να προσβάλλει όλες τις περιοχές του νευρικού συστήματος προκαλώντας μηνιγγίτιδα και μυελίτιδα. Η νόσος είναι συχνά θανατηφόρος.

Οι πρωτοπαθείς γεννητικές λοιμώξεις από τον HSV-2 εμφανίζονται σαν κυστίδια τα οποία στη συνέχεια διαπυούνται και εξελκώνονται. Συνυπάρχει καυσαλία και λεμφαδενοπάθεια. Στον άνδρα εντοπίζονται στη βάλανο, στην ακροποσθία ή στο σώμα του πέους. Στη γυναίκα οι βλάβες βρίσκονται στα έξω γεννητικά όργανα, στον κόλπο και στον τράχηλο της μήτρας ²⁷⁷. Οι μη-πρωτοπαθείς αρχικές γεννητικές λοιμώξεις προκαλούν ηπιότερα συμπτώματα από τις πρωτοπαθείς, διότι τα αντισώματα έναντι στον HSV-1 ελαττώνουν τη βαρύτητα της νόσου από τον HSV-2.

Οι υποτροπιάζουσες γεννητικές ερπητικές λοιμώξεις στους άνδρες παρουσιάζονται ως 3-5 φυσαλίδες στο σώμα του πέους. Στις γυναίκες εμφανίζονται ως κυστικές και ελκωτικές βλάβες στην περιοχή των γεννητικών οργάνων. Η διάρκεια της

νόσου είναι 8-10 ημέρες και το 1/3 των ασθενών θα παρουσιάσει πάνω από 6 επεισόδια υποτροπών ετησίως.

Η νεογνική ερπητική λοίμωξη συνήθως συμβαίνει κατά τη διέλευση του νεογνού από τον γεννητικό σωλήνα, όταν υπάρχουν ερπητικές βλάβες στα γεννητικά όργανα της μητέρας. Σπανιότερα δύναται να μεταδοθεί από την μητέρα το έμβρυο κατά την κύηση ή στην περίοδο που ακολουθεί τον τοκετό ²⁷⁸. Η κλινική εικόνα είναι δραματική και χαρακτηρίζεται από υψηλό πυρετό, ίκτερο, δερματικές ερπητικές βλάβες, εγκεφαλίτιδα, εκτεταμένες σπλαχνικές νεκρώσεις, αιμορραγία και θάνατο.

6.2.2. Διάγνωση και θεραπεία

Η διάγνωση τίθεται με απομόνωση του ιού σε κυτταρικές καλλιέργειες ή με ανίχνευση του ιϊκού DNA με PCR. Οι κυτταροκαλλιέργειες είναι φθινοότερες από την PCR. Οι ορολογικές μέθοδοι διάγνωσης χρησιμεύουν μόνο για να καθορίσουν την προηγούμενη έκθεση στον ιό και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σχεδιασμό της θεραπείας. Για την διάγνωση των ερπητικών λοιμώξεων του νευρικού συστήματος, η μέθοδος εκλογής είναι η ανάλυση με PCR του εγκεφαλονωτιαίου υγρού.

Η κλασική θεραπεία για την ερπητική λοίμωξη είναι η ακυκλοβίρη, ένα συνθετικό ανάλογο πουρίνης, το οποίο δρα στο επίπεδο της αντιγραφής του ιϊκού DNA. Απαραίτητη για την ενεργοποίηση της ακυκλοβίρης είναι η κινάση της θυμιδίνης, ένα ένζυμο φωσφορυλίωσης που κωδικοποιείται από τους HSV. Οι HSV μπορούν να αναπτύξουν αντοχή στην ακυκλοβίρη μέσω μεταλλάξεων στο ιϊκό γονίδιο που κωδικοποιεί την κινάση της θυμιδίνης, δημιουργώντας στελέχη είτε με έλλειψη του ενζύμου, είτε στελέχη στα οποία το ένζυμο δεν μπορεί να φωσφορυλιώσει την ακυκλοβίρη ¹³⁴. Φάρμακα ανάλογα της ακυκλοβίρης είναι η βαλακυκλοβίρη και η φαμκυκλοβίρη ²⁷⁹.

Η ακυκλοβίρη μπορεί να χορηγηθεί τοπικά, από το στόμα ή ενδοφλεβίως. Η χορήγησή της δεν ελαττώνει την συχνότητα των υποτροπών. Χρησιμοποιείται προφυλακτικά σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς στους οποίους ελαττώνει το ποσοστό των συμπτωματικών HSV λοιμώξεων από 70% σε 5-20% ²⁸⁰. Η ενδοφλέβια χορήγηση ακυκλοβίρης ελαττώνει το ποσοστό των θανάτων από ερπητική εγκεφαλίτιδα και 38% αυτών των ασθενών επανακτούν φυσιολογική νευρολογική λειτουργία ²⁸¹. Η ερπητική επιπεφυκίτιδα αντιμετωπίζεται με χορήγηση ακυκλοβίρης ή τριφλουριδίνης. Παρενέργειες έχουν περιγραφεί μόνο από την ενδοφλέβια χορήγηση ακυκλοβίρης και

συνίστανται σε νεφροτοξικότητα και διαταραχές του ΚΝΣ (διέγερση, παραισθήσεις, αποπροσανατολισμός και τρόμος).

Έχουν γίνει προσπάθειες για τη δημιουργία εμβολίων έναντι του HSV αλλά η ιδιότητά του να υποτροπιάζει μέσω των κυτταρικών μηχανισμών ανοσίας, τα καθιστά δυσχερή ως θεραπευτική επιλογή. Οι έρευνες στρέφονται τώρα στη γονιδιακή θεραπεία, με στόχο τη δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών HSV τα οποία χαρακτηρίζονται ως αλλοιώσεις σημαντικών γονιδίων τους και θα χρησιμεύσουν ως φορείς αυτών των μεταλλάξεων στα κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος ²⁸².

6.3. Ο ιός Epstein-Barr (EBV)

6.3.1. Γενικά

Ο ιός EBV ή ερπητοϊός του ανθρώπου τύπου 4 ανήκει στους γ ερπητοϊούς. Είναι ευρέως διαδεδομένος παγκοσμίως και άνω του 90% του ανθρώπινου πληθυσμού έχει έρθει σε επαφή με τον ιό. Δεν υπάρχει ζώο που να λειτουργεί ως ξενιστής, αλλά οι ιδιότητες του έχουν μελετηθεί εκτενώς σε σειρές μεταμορφωμένων ανθρώπινων κυττάρων. Παρουσιάζει διπλό κυτταρικό τροπισμό: για τα ανθρώπινα Β-λεμφοκύτταρα (μη-παραγωγική λοίμωξη) και για τα επιθηλιακά κύτταρα (παραγωγική λοίμωξη). Βάσει του πολυμορφισμού του EBNA-2 γονιδίου του διακρίνεται σε δύο τύπους: τον τύπο 1 (ή τύπο Α) και τον τύπο 2 (ή τύπο Β). Έχει αναφερθεί ότι ο τύπος 2 συνδέεται συχνά με Τ-λεμφώματα, ακόμα και σε περιοχές όπου ο τύπος 1 παρουσιάζει μεγαλύτερη επίπτωση ²⁸³.

Η πρωτοπαθής λοίμωξη από τον EBV αρχίζει στο επιθήλιο του στοματοφάρυγγα, όπου τα βίρια του ιού αντιγράφονται και στη συνέχεια απελευθερώνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα μέσα στη σίελο ²⁸⁴. Ακολούθως, τα βίρια εισχωρούν στα Β-λεμφοκύτταρα, τα οποία φέρουν υποδοχείς για τον ιό, κοινούς με συστατικά του συμπληρώματος, και παραμένουν εντός του πυρήνα σε επισωματική μορφή. Αν και τα κύρια κύτταρα-στόχοι του ιού είναι τα ανθρώπινα Β-λεμφοκύτταρα, προσβάλλει επίσης τα επιθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα των πόρων των σιελογόνων αδένων, τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα ΝΚ κύτταρα, τα μακροφάγα, τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών και τα ενδοθηλιακά κύτταρα ²⁸⁵.

Τα προσβεβλημένα από τον ιό Β-κύτταρα εκφράζουν ποικίλα EBV αντιγόνα τα οποία δρουν ως μόρια-στόχοι που αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, μόνο ένα μικρό ποσοστό των προσβεβλημένων Β-κυττάρων παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση χάρη στον ανοσοποιητικό μηχανισμό,

ο οποίος δρα μέσω του συστήματος MHC-I, παράγοντας ειδικά για τα αντιγόνα του EBV κυτταροτοξικά T-κύτταρα. Όταν εξασθενήσει η ανοσοποιητική άμυνα του οργανισμού, επανενεργοποιούνται τα προσβεβλημένα B-κύτταρα με επακόλουθο πολυκλωνικό πολλαπλασιασμό και εξάπλωση του EBV σε άλλους ιστούς.

Η λανθάνουσα EBV λοίμωξη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή του κακοήθους φαινοτύπου και την μεταμόρφωση των μολυσμένων κυττάρων²⁸⁶. Κάποια παράγωγα ιϊκών γονιδίων τα οποία συνδέονται με τη λανθάνουσα μόλυνση, χαρακτηρίζονται από βιολογικές ιδιότητες που ενέχονται στην κυτταρική αθανатоποίηση. Θεωρείται ότι πολλοί ιοί χρησιμοποιούν μια πλειάδα μηχανισμών που τους επιτρέπει να διαφεύγουν από τους ανοσοποιητικούς μηχανισμούς του ξενιστή και να εγκαταστήσουν λανθάνουσα λοίμωξη. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η αναστολή της έκφρασης των ιϊκών αντιγόνων, η επάλειψη των ειδικών για τον ιό T-κυττάρων, η δημιουργία μεταλλαγμένων ιών που παράγουν μη-αντιγονικούς επιτόπους, η παρέμβασή τους στην αντιγονική διαδικασία και η ανοσολογική ανοχή λόγω λοίμωξης σε νεαρή ηλικία²⁸⁷.

Στη λανθάνουσα λοίμωξη, τα EBV πυρηνικά αντιγόνα (EBNA) αποτελούνται από τα EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C. Μετά την έκφραση των EBNA, έπεται η έκφραση των λανθανόντων μεμβρανικών πρωτεϊνών (LMPs), συμπεριλαμβανομένων των LMP-1, -2A και -2B. Όλα τα EBNAs και LMPs, εκτός από το EBNA-1, είναι μόρια-στόχοι για τα ειδικά για τον EBV κυτταροτοξικά T-κύτταρα²⁸⁴.

Το LMP-1 έχει ογκογενετική δράση προκαλώντας αυξημένη έκφραση κυτταρικών γονιδίων και αναστέλλοντας την απόπτωση με την επαγωγή του bcl-2²⁸⁸. Πρόσφατα διατυπώθηκε ότι το LMP-1 είναι ένα ιϊκό ανάλογο της οικογένειας των υποδοχέων του TNF και είναι σημαντικό για τη μεταμόρφωση των B-κυττάρων²⁸⁹.

Το EBNA-1 είναι σημαντικό για την αντιγραφή των επισωματικών μορφών του EBV κατά τη λανθάνουσα φάση. Το EBNA-2 μπορεί να επάγει τη μεταμόρφωση των B-κυττάρων αυξάνοντας την έκφραση των LMPs.

Βασιζόμενοι στα διάφορα πρότυπα έκφρασης των EBV προϊόντων της λανθάνουσας φάσης, διακρίνουμε 3 ξεχωριστούς τύπους λανθάνουσας λοίμωξης *in vivo*¹⁰⁰. Στον τύπο I εκφράζεται μόνο το EBNA-1. Με αυτό τον τρόπο, ο ιός παραμένει αόρατος για το ανοσοποιητικό σύστημα, γιατί η κυτταρική ανοσία κατευθύνεται έναντι άγνωστων πρωτεϊνών και δεν είναι προγραμματισμένη να αναγνωρίζει το ξένο νουκλεϊκό οξύ. Ο τύπος I ισχύει στα νεοπλασματικά κύτταρα ασθενών με λέμφωμα Burkitt. Στον τύπο II, εκφράζονται το EBNA-1 και τα LMPs. Η αναστολή της έκφρασης των υπόλοιπων γονιδίων επιτρέπει στα μολυσμένα κύτταρα να διαφεύγουν από την

ανοσοποιητική επιτήρηση, όπως συμβαίνει στα κύτταρα ασθενών με καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα και T-λεμφώματα. Τέλος, σε ασθενείς με AIDS και B-λεμφώματα καθώς και σε ανοσοκατεσταλμένους εκφράζονται όλα τα αντιγόνα (τύπος III) αλλά είναι εξασθενημένη η ανοσολογική απάντηση του ξενιστή²⁸⁵.

6.3.2. Κλινική εικόνα

Η πρωτοπαθής λοίμωξη συνήθως προκαλεί μια ήπια, αυτοπεριοριζόμενη ασθένεια και συμβαίνει κυρίως στην αρχή της παιδικής ηλικίας. Στα νεαρά άτομα η οξεία λοίμωξη προκαλεί λοιμώδη μονοκυρήνωση, ενώ σπανιότερο είναι το σύνδρομο Gianotti-Crosti. Επειδή η EBV λοίμωξη στη Ασία και την Αφρική λαμβάνει χώρα κατά την παιδική ηλικία, η συμπτωματική λοιμώδης μονοκυρήνωση είναι λιγότερο συχνή σε αυτές τις χώρες από ότι στις δυτικές χώρες και τις ΗΠΑ, όπου η πρωτοπαθής EBV λοίμωξη συμβαίνει στην εφηβεία.

Κατά την οξεία EBV λοίμωξη, η έντονη ανοσοποιητική αντίδραση από τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα έναντι των προσβεβλημένων B-κυττάρων, προκαλεί χαρακτηριστική κλινική εικόνα με εμπύρετο, κυνάγχη, λεμφαδενοπάθεια και λεμφοκυττάρωση. Στο ήμισυ των περιπτώσεων συνυπάρχει σπληνομεγαλία. Περιστασιακά εμφανίζεται κηλιδοβλατιδώδες ή πετεχειώδες εξάνθημα. Συνήθης εκδήλωση της λοιμώδους μονοκυρήνωσης είναι η ηπατίτιδα με ηπατομεγαλία και ίκτερο. Σπανιότερα υπάρχει προσβολή του ΚΝΣ με κεφαλαλγία και επώδυνη νευριτίδα.

Σε ανοσοκατεσταλμένους ή ανοσοεπαρκείς ασθενείς (ασθενείς με AIDS ή με μεταμόσχευση νεφρού), προκαλείται μια πλειάδα νόσων που σχετίζονται με τον λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η λανθάνουσα λοίμωξη από τον EBV έχει συνδεθεί με διάφορες κακοήθειες καταστάσεις σε μη ανοσοκατεσταλμένα άτομα, στις οποίες περιλαμβάνονται το αφρικανικό λέμφωμα Burkitt, το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα, περιφερικά κύτταρα T-κυττάρων, ο γαστρικός καρκίνος κ.ά.^{290, 291}.

6.3.3. Διάγνωση και θεραπεία

Στις περιπτώσεις πρωτοπαθούς λοίμωξης, ανιχνεύονται υψηλοί τίτλοι ειδικών για τον ιό IgM και IgG αντισωμάτων κατά των αντιγόνων της κάψας του ιού (Virus Capsid Antigen, VCA). Τα IgG αντισώματα ανιχνεύονται εφόρου ζωής. Αύξηση των τίτλων των IgG αντισωμάτων υποδηλώνει ενεργοποίηση του EBV. Σε περιπτώσεις χρόνιας λοίμωξης, ανιχνεύονται υψηλοί τίτλοι IgG αντισωμάτων. Τα IgA αντισώματα

αυξάνονται σε ασθενείς με καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα. Στις περισσότερες περιπτώσεις των EBV λεμφοπλασσιαστικών διαταραχών δεν παρατηρείται σημαντική αύξηση των τίτλων των αντισωμάτων. Η ανίχνευση των EBV αντισωμάτων γίνεται με τη δοκιμασία Paul Bunnell (δοκιμασία συγκόλλησης ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου) και με τεχνικές ανοσοφθορισμού.

Η εφαρμογή της PCR επιτρέπει την ανίχνευση του DNA του ιού ακόμα και όταν αυτό υπάρχει σε μικρές ποσότητες. Λόγω της υψηλής της ευαισθησίας, τα αποτελέσματα της PCR θα πρέπει να ερμηνεύονται προσεκτικά διότι δείγματα επιμολυσμένα με EBV ή η παρουσία παρακείμενων EBV μολυσμένων κυττάρων, μπορούν να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα ²⁹².

Θεραπευτικά, όσον αφορά την οξεία EBV λοίμωξη, δεν υπάρχει ειδική θεραπεία. Χρησιμοποιούνται συμπτωματικά μέτρα και χορηγούνται μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, ενώ σε βαριά πάσχοντες μπορεί να είναι αποτελεσματικά και τα κορτικοστεροειδή. Οι επιπλοκές (ηπατίτιδα, μυοκαρδίτιδα, εγκεφαλίτιδα) αντιμετωπίζονται συμπτωματικά.

Ως προς τα λεμφώματα που οφείλονται σε EBV, χορηγούνται διάφορα χημειοθεραπευτικά σχήματα που περιλαμβάνουν δοξορουμπικίνη, πρεδνιζόνη και κυκλοφωσφαμίδη. Εν τούτοις, τα επιθετικά EBV λεμφώματα παρουσιάζουν αντίσταση στη συμβατική χημειοθεραπεία. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο σύνδρομο συστηματικής αιμοφαγοκυττάρωσης, και σε έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με ανθεκτικότητα σε πολλαπλά φάρμακα ²⁹³. Προς το παρόν, για αυτές τις περιπτώσεις δεν υπάρχει καθιερωμένο θεραπευτικό πρωτόκολλο. Σε επίπεδο κλινικών δοκιμών χρησιμοποιούνται αντι-CD19 μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία σταματούν τον κυτταρικό κύκλο σε κυτταρικές σειρές λεμφώματος Burkitt in vitro.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Ρινικοί πολύποδες

7.1. Εισαγωγή

Οι ρινικοί πολύποδες έχουν ιστορία σχεδόν 5000 χρόνια, όπου και πρωτοαναφέρθηκαν στην αρχαία Αίγυπτο. Η επικράτηση τους αναφέρεται στο 1-2% του ενήλικου πληθυσμού της Ευρώπης ²⁹⁴. Η επικράτηση των ρινικών πολυπόδων στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες, είναι 2-4:1. Αρκετές καταστάσεις και συμπτώματα συσχετίζονται με την εμφάνιση των ρινικών πολυπόδων. Στους ασθματικούς ασθενείς τα ποσοστά εμφάνισης που έχουν αναφερθεί, ποικίλλουν από 7% έως 42% ²⁹⁵. Οι ρινικοί πολύποδες είναι κοινοί στους ασθενείς με δυσανεξία στο ακετυλοσαλικυλικό οξύ [acetylsalicylic acid (ASA) intolerance], με συχνότητα εμφάνισης μεταξύ 40% και 60% σε αυτούς τους ασθενείς. Μια σχετιζόμενη ασθένεια με τη ρινική πολυποδίαση, είναι η κυστική ίνωση (CF), η οποία είναι μια από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες κληρονομικές ασθένειες που συναντάται στους Καυκάσιους. Οι πολύποδες συναντώνται σε ενήλικες ασθενείς με CF σε ποσοστό 20-48% ²⁹⁶. Οι ρινικοί πολύποδες συσχετίζονται επίσης σε μεγάλο βαθμό με τη χρόνια παραρρινοκολπίτιδα διαφορετικής προελεύσεως. Οι ρινικοί πολύποδες συνήθως είναι αμφοτερόπλευροι, πολλαπλοί, και ελεύθερα μετακινούμενοι μαλακοί όγκοι. Τα κλινικά συμπτώματα είναι η φραγή της κυκλοφορίας του αέρα διαμέσου της ρινός, συχνά η υποσμμία ή ανοσμία, η καταρροή προς τον φάρυγγα καθώς επίσης και η ρινική έκκριση. Τα συστηματικά ή τα ενδορινικά στεροειδή χρησιμοποιούνται συνήθως για την θεραπεία τους, όμως σε περιπτώσεις σοβαρής απόφραξης ή μολυσματικών επιπλοκών, συνιστάται επίσης χειρουργική επέμβαση. Η επανεμφάνιση των ρινικών πολυπόδων αποτελεί ένα σοβαρό κλινικό πρόβλημα. Τα ποσοστά επανεμφάνισης που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία κυμαίνονται μεταξύ 29-53% ^{297, 298}. Η ρινική πολυποδίαση μπορεί να αποτελέσει μια δύσκολη ασθένεια για τον ασθενή καθώς επίσης και για τον θεράποντα ιατρό. Η αιτιολογία και παθοφυσιολογία της ρινικής πολυποδίασης είναι ακόμα κυρίως άγνωστες, αν και τα τελευταία χρόνια έχουν αποκτηθεί σημαντικές γνώσεις σχετικά με τη φυσιολογία της ρινός και των πολυπόδων, με επιστημονικές προόδους στους τομείς της βιοχημείας, της μικροβιολογίας και της ανοσολογίας. Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες έχουν τραβήξει την προσοχή π.χ. αυξητικοί παράγοντες στους ρινικούς πολύποδες. Για να επιτευχθεί όμως αποτελεσματική πρόληψη και θεραπεία στην

ασθένεια αυτή, είναι αναγκαία η απόκτηση περισσότερης γνώσης πάνω στη ρινική πολυποδίαση.

7.2. Ιστορία των ρινικών πολυπόδων

Οι ρινικοί πολύποδες πρωτοαναφέρθηκαν πριν από 4000 χρόνια, στην αρχαία Αίγυπτο. Σημαντική πρόοδος στην αντιμετώπιση τους σημειώθηκε στην αρχαία Ελλάδα και κατά την εποχή της Αναγέννησης στην Ευρώπη. Ο πρώτος γνωστός θεράπων ιατρός ήταν ένας Αιγύπτιος ριнологος, εν ονόματι Ni-Ankh Sekhmet, ο οποίος ήταν ο προσωπικός ιατρός του βασιλιά Sahura. Η ζωγραφιά αυτού και της γυναίκας του, ανακαλύφθηκαν σε μια πλάκα στον τάφο του βασιλέως, συνοδευόμενη από την μαρτυρία βασιλικής ευγνωμοσύνης «ίασε τα ρουθούνια του βασιλέως». Έχει αποδειχτεί πως οι αρχαίοι Αιγύπτιοι ήταν οικείοι με τους ρινικούς πολύποδες, τους οποίους περιέγραφαν ως «σταφύλια που εξέρχονται από τη μύτη». Η αντιμετώπιση τους περιελάμβανε γιατρικά που περιείχαν αλκοόλ και είναι πιθανό να είχαν χρησιμοποιηθεί ακόμα και χειρουργικά εργαλεία για την αφαίρεσή τους. Ο Ιπποκράτης (460-370 π.Χ.), ο «πατέρας της Ιατρικής», πίστευε πως οι ρινικοί πολύποδες οφείλονται στην διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ 4 υγρών του σώματος. Όταν τα υγρά ήταν πολύ πυκνά, μπορούσαν να εμφανιστούν ρινικοί πολύποδες. Ο Ιπποκράτης ανέπτυξε μια τεχνική για την αφαίρεση των ρινικών πολυπόδων, η οποία συμπεριλήφθηκε στα μετέπειτα χειρόγραφα, έως και αυτά του Voltolini το 1888 ²⁹⁹. Η μέθοδος της αφαίρεσης τους ήταν η λεγόμενη «μέθοδος του σπόγγου». Η πολυποδεκτομή ακολουθούταν από την τοπική εφαρμογή καυστικής σκόνης, λαδιού και μελιού. Ο Παύλος ο Αιγινίτης (625-690 μ.Χ.), ιατρός μεγάλης φήμης στην Αλεξάνδρεια, πίστευε πως τα ηθμοειδή κύτταρα ήταν η προέλευση των ρινικών πολυπόδων κι επινόησε μια μάλλον βάρβαρη μέθοδο για την απομάκρυνση των πολυπόδων, χρησιμοποιώντας μια χοντρή κλωστή. Στην εποχή της Αραβικής Ιατρικής, ο Avicenna (980-1037 μ.Χ.) περιέγραψε τους ρινικούς πολύποδες ως «αιμορροΐδες της μύτης». Ο Abulcasis (1013-1106 μ.Χ.), ο μεγαλύτερος των αράβων χειρουργών, χρησιμοποιούσε καυτηριασμό και τραβούσε τον ρινικό πολύποδα προς τα έξω με ένα άγκιστρο, τον έκοβε στον μίσχο με ένα ψαλίδι, και έπειτα έπλενε τη ρινική κοιλότητα με ξίδι. Κατά το μεσαίωνα όπου άκμαζε η Σχολή του Σαλέρνο, μεταφράστηκαν ελληνικά και αραβικά ιατρικά βιβλία στα λατινικά. Αφότου τύλιγαν σκόρδο με ύφασμα, το εισήγαγαν μέσα στη ρινική κοιλότητα, για να προκληθεί η εξαγωγή των πολυπόδων με φτέρνισμα. Οι πολύποδες αφαιρούνταν με μαχαίρια, καυτές βέργες και λαβίδες. Στην Αναγέννηση ο Forestus (1522-1597 μ.Χ.)

κατέγραψε ένα περιστατικό που έδειχνε ότι η θεωρία των «4 υγρών» δεν είχε ακόμα ξεπεραστεί. Ο Fallorius (1523-1562 μ.Χ.) χρησιμοποίησε επιδέσμους, αφήνοντας τους γύρω από τους πρόσθιους πολύποδες για δυο ή τρεις ημέρες, όπου και μετέπειτα αυτοί αποκόβονταν. Για την αντιμετώπιση των οπίσθιων πολυπόδων, οι οποίοι θεωρούνταν ως αιμορροΐδες, σχεδίασε μια ειδική θηλιά. Οι επεμβάσεις αυτές δεν ήταν καθόλου ικανοποιητικές επειδή ήταν πάντοτε επώδυνες, και πιθανώς επικίνδυνες επειδή ο χειρουργός σχεδόν ποτέ δεν είχε τον απόλυτο οπτικό έλεγχο. Η ρινική πολυποδεκτομή δεν έγινε επέμβαση ρουτίνας παρά μόνο στα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Σχετικά πρόσφατα, το 1901, ο Hirschman χρησιμοποίησε κυστεοσκόπιο 4 mm για καλύτερη όψη του εσωτερικού των ρινικών κοιλοτήτων και του ρινοφάρυγγα και στα τέλη της δεκαετίας του '60 και αρχές '70, ο Messerklinger από το από το Graz της Αυστρίας, ανέπτυξε μια τεχνική για συστηματική ενδοσκοπική εξέταση. Στις ημέρες μας, έχουμε στη διάθεση μας ενδοσκόπια, ξυραφάκια, βέργες νιτρικού αργύρου, ηλεκτροκαυτηριασμό και μια ποικιλία από ρινικά αποσυμφορητικά και στεροειδή φάρμακα για την αντιμετώπισή τους.

7.2.1. Επιδημιολογία - Η επικράτηση των ρινικών πολυπόδων

Η επικράτηση των ρινικών πολυπόδων αναφέρεται στο 1-2% του ενήλικου πληθυσμού της Ευρώπης²⁹⁴. Στις Η.Π.Α. η επικράτηση τους εκτιμάται στο 4% ασθενών που συσχετίζονται με αλλεργικές κλινικές, αλλά έχει αναφερθεί και σε πολύ μεγαλύτερα ποσοστά σε συγκεκριμένους πληθυσμούς²⁹⁵. Σε μια μελέτη των Larsen και Tos πάνω σε πτώματα, το 42% αυτών έπασχε από ρινικούς πολύποδες. Η εμφάνιση των ρινικών πολυπόδων είναι πιο επικρατής στους άνδρες από ότι στις γυναίκες, σε αναλογία 2-4:1. Η εκδήλωση των ρινικών πολυπόδων γίνεται συνήθως μετά την ηλικία των 20 χρόνων. Η αρχική παρουσίαση συμβαίνει το ίδιο σε κάθε δεκαετία έως και τα 60 χρόνια, αλλά μετά από αυτή την ηλικία συναντώνται πιο σπάνια. Επίσης, θεωρούνται λιγότερο ενοχλητικοί καθώς ο ασθενής γηράσκει³⁰⁰. Οι ρινικοί πολύποδες είναι πολύ σπάνιοι στα παιδιά – το ποσοστό αναφοράς τους είναι 0,1%²⁹⁵. Επίσης είναι σπάνιοι στα ζώα και ο χιμπατζής είναι το μόνο γνωστό ζώο που πάσχει από ρινική πολυποδίαση, σχετική με αυτή των ανθρώπων.

7.2.2. Ρινικοί πολύποδες, άσθμα και δυσανεξία στην ασπιρίνη

Αν και η ρινική πολυποδίαση φαίνεται να συσχετίζεται εν μέρει με την παρουσία μόλυνσης (χαρακτηριζόμενης από φλεγμονή με λεμφοκυττάρωση), κυρίως συσχετίζεται με τον μηχανισμό της ηωσινοφιλικής φλεγμονής, όπως στην δυσανεξία στην ασπιρίνη (ASA intolerance) ή το άσθμα^{301, 302}. Το άσθμα εντοπίζεται περίπου στο ένα τρίτο των ενήλικων με πολύποδες³⁰³ ενώ ποσοστό ~7% των ασθενών με άσθμα έχουν ρινικούς πολύποδες²⁹⁵. Περίπου 15-36% των ασθενών με ρινικούς πολύποδες πάσχουν από δυσανεξία στην ασπιρίνη³⁰⁴ και έως και ποσοστό 60% των ασθενών με δυσανεξία στην ασπιρίνη, έχουν ρινικούς πολύποδες. Η τριάδα: ρινικοί πολύποδες, δυσανεξία στην ασπιρίνη και άσθμα αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Widal, Abrami και Lermoyez, το 1922. Μεγαλύτερη έμφαση στη συσχέτιση αυτή δόθηκε από τον Samter³⁰⁵. Η κλασική τριάδα συμβαίνει σε περίπου 8-39% όλων των περιπτώσεων ρινικών πολυπόδων. Σε πληθυσμούς της βόρειας Ευρώπης, η επικράτηση της ρινικής πολυποδίασης είναι 16.5% σε ασθενείς με άσθμα, και η επικράτηση της τριάδας: ρινικοί πολύποδες, δυσανεξία στην ασπιρίνη και άσθμα, είναι 4.3% σε ασθενείς με άσθμα³⁰⁶. Οι Settiperane et al θεώρησαν πως κάποιος κληρονομικός παράγοντας πρέπει να σχετίζεται με την ανάπτυξη των ρινικών πολυπόδων^{307, 308}.

7.3. Κλινική εικόνα και διάγνωση

7.3.1. Κλινικά συμπτώματα και επιπλοκές

Οι ρινικοί πολύποδες συνήθως είναι αμφοτερόπλευρες, πολλαπλές και ευκίνητες διογκώσεις οίδηματώδους βλεννώδους μεμβράνης. Πολύποδες μπορούν να αναπτυχθούν και σε καλοήγη και σε κακοήγη κατάσταση. Είναι γκρίζοι/λευκοί και συχνά φαίνονται ημιδιαφανείς. Οι πολύποδες βρίσκονται κυρίως στο μέσο ρινικό πόρο και οι περισσότεροι προέρχονται από το βλεννογόνο των οπών, τις πρόσθιες και οπίσθιες σχισμές των ηθμοειδών και τις σφηνοηθμοειδείς κόγχες, καθώς επίσης και από τη μέση ρινική κόγχη και το ρινικό διάφραγμα³⁰⁹. Οι πολύποδες επίσης, μπορούν να εμφανιστούν σε όλους τους παραρρινίους κόλπους. Οι πολύποδες του μέσου ρινικού πόρου (**Εικόνα 7.1**) συνήθως έχουν προέλευση από το βλεννογόνο των οπών, των πρόσθιων ηθμοειδών σχισμών ή το μετωπιαίο κόλπωμα, αλλά οι πολύποδες που εντοπίζονται μεταξύ του ρινικού διαφράγματος και της μέσης ή άνω ρινικής κόγχης, προέρχονται είτε από την οσφρητική ακρολοφία, τις οπίσθιες ηθμοειδείς σχισμές ή το σφηνοηθμοειδές κόλπωμα^{309, 310}.



Εικόνα 7.1. Οι ρινικοί πολύποδες είναι καλοήθειες βλάβες της μύτης ή των παραρρινίων κόλπων που οδηγούν σε ρινική απόφραξη. Τυπική ενδοσκοπική εμφάνιση ρινικών πολυπόδων, όπου φαίνονται καλοσχηματισμένοι πολύποδες του μέσου ρινικού πόρου.

Οι αντροχωανικοί πολύποδες προέρχονται από το γναθικό άντρο και προβάλλουν μέσω του ανοίγματος του άντρου μέσα στον μέσο ρινικό πόρο. Εντοπίζονται μέσα στη μύτη ή σε περίπτωση που είναι μεγαλύτεροι, στις οπίσθιες χοάνες. Πιο συχνά οι ρινικοί πολύποδες βρίσκονται στην κοίλη πλευρά του αποκλίνοντος διαφράγματος. Κλινικά, η ρινική πολυποδίαση χαρακτηρίζεται από οιδηματώδεις μάζες μέσα στις ρινικές και τις παραρρινίες κοιλότητες, οδηγώντας σε ρινική απόφραξη, διατήρηση των εκκρίσεων της ρινός και του ιγμόριου άντρου, έλλειψη της αίσθησης της οσμής, πονοκεφάλους, και γενικά, μειωμένη ευεξία ³¹¹. Μόλις η ρινική απόφραξη γίνει γενική, οι ασθενείς πάσχουν από δευτερογενή φλεγμονή του ρινικού κόλπου, ακόμα και από ανατομικές αλλαγές, όπου μπορεί να παρατηρηθεί ακόμα και πλάτυνση της ρινικής γέφυρας. Πάνω από το 80% των ασθενών έχουν δευτερογενή παραρρινοκολπίτιδα, η οποία συνοδεύεται από βήχα και ξεσπάσματα οξείας παραρρινοκολπίτιδας. Η σχέση μεταξύ πολυπόδων και παραρρινοκολπίτιδας είναι πάρα πολύ μεγάλη, και η παρουσία της φλεγμονής μπορεί να αποτελέσει ένα πολύ ισχυρό ερέθισμα για τον σχηματισμό των πολυπόδων. Οι ρινικοί πολύποδες μπορούν να παράγουν ένα ευρύ φάσμα αλλαγών. Η πιο κοινή, είναι η γενικευμένη αμφοτερόπλευρη έλλειψη διαύγειας σε όλους τους παραρρινίους κόλπους, αλλά επιπροσθέτως, ένα ποσοστό 20% των ασθενών εμφανίζουν στοιχεία ηθμοειδούς διαστολής, φαινόμενο γνωστό και ως «αναδιαμόρφωση» (remodeling). Στις περιπτώσεις της επιθετικής πολυποδίασης των παραρρινίων κόλπων και της ρινός, μπορούν να συμβούν ένα πλήθος γεγονότων, όπως διάβρωση των ηθμοειδών οστών, των τοιχωμάτων των σφηνοειδών κόλπων, του κάτω τοιχώματος της πρόσθιας κраниακής κοιλότητας και άλλων κοιλικών τοιχωμάτων, που μπορούν να οδηγήσουν σε οφθαλμολογικές και νευρολογικές διαταραχές, ακόμα και στην τύφλωση ³¹²⁻³¹⁴. Έχει προταθεί πως πιθανώς η απόφραξη των πόρων μέσω του εκφυλισμού των πολυπόδων, μπορεί επίσης να οδηγήσει σε βλεννοκήλη ³¹⁵, η οποία είναι μια εγκαψυλιωμένη βλεννώδης μάζα, με χαμηλό κιονοειδές ή κυβικό επιθήλιο, που εμπεριέχει σποραδικά καλυκοειδή κύτταρα. Το βλεννοπεριοστεϊκό τοίχωμα του ιγμόριου άντρου

διαπλατύνεται, με πυκνό συνδετικό ιστό ποικίλης πυκνότητας να υποστηρίζει το επιθηλιακό τοίχωμα³¹⁶.

7.3.2. Επανεμφάνιση των ρινικών πολυπόδων

Λίγες είναι οι μελέτες σχετικά με την κλινική πορεία και την επανεμφάνιση των ρινικών πολυπόδων. Στην εργασία των Blumstein et al²⁹⁷, αναφέρεται επανεμφάνιση των ρινικών πολυπόδων έπειτα από πολυποδεκτομή και αντιμετώπιση αλλεργίας, σε 53% των περιπτώσεων κατά τη διάρκεια ενός follow-up 4.3 ετών. Ορισμένοι από αυτούς τους ασθενείς με υποτροπιάζοντες πολύποδες παρακολούθηθηκαν για διάστημα 5 έως 7 ετών. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι οι ασθενείς με τη μεγαλύτερη τάση επανεμφάνισης πολυπόδων, είχαν υψηλή τάση εμφάνισης άσθματος και καμία συγκεκριμένη αιτιολογία με αρνητικές αντιδράσεις του δέρματος, ενώ οι ασθενείς με αναγνωρίσιμες και αντιμετωπίσιμες αλλεργικές εκδηλώσεις, είχαν τα χαμηλότερα ποσοστά επανεμφάνισης των ρινικών πολυπόδων. Οι Larsen και Tos²⁹⁸ περιέγραψαν την κλινική παρακολούθηση της πρωτογενούς ρινικής πολυποδίασης, με ένα follow-up των ασθενών από 1 έως 8 χρόνια (διάμεσος 57 μήνες). Βρήκαν πως οι ασθενείς με άσθμα, οξεία υποτροπιάζουσα ή χρόνια παραρρινοκολπίτιδα, δυσανεξία στην ασπιρίνη ή ατοπική αλλεργία, απαιτούσαν περισσότερες πολυποδεκτομές και περισσότερη αγωγή τοπικών κορτικοστεροειδών, από ότι οι ασθενείς δίχως αυτά τα συμπτώματα. Σε μια άλλη μελέτη ασθενών που έπασχαν από ρινικούς πολύποδες και υπόκειντο υπό παρακολούθηση για περίπου 8 χρόνια (38-145 μήνες), έπειτα από απλές πολυποδεκτομές, οι Larsen και Tos³¹⁷ βρήκαν ότι οι ασθενείς με δυσανεξία στην ασπιρίνη είχαν τον υψηλότερο αριθμό πολυποδεκτομών, και ότι οι ασθενείς με άσθμα είχαν περισσότερες πολυποδεκτομές από ότι αυτοί που δεν είχαν άσθμα. Οι Jäntti-Alanko et al περιέγραψαν μια τετράχρονη follow-up μελέτη ασθενών με ρινικούς πολύποδες, και η συχνότητα των επαναληπτικών επεμβάσεων ήταν σημαντικά υψηλότερη, καθώς επίσης η αγωγή με τοπικά κορτικοστεροειδή ήταν πιο συχνή στους ασθενείς με δυσανεξία στην ασπιρίνη, από ότι στους ασθενείς χωρίς δυσανεξία σε αυτή. Πιστεύεται ότι η υποτροπίαση/επανεμφάνιση και η ενεργοποίηση της ρινικής πολυποδίασης, ελαττώνονται με την πάροδο του χρόνου. Παρόλα αυτά, δεν έχουν δημοσιευτεί ακόμα μελέτες με αρκετά μεγάλα διαστήματα παρακολούθησης για να μπορέσει να επιβεβαιωθεί αυτό.

7.3.3. Απώλεια της όσφρησης

Η μειωμένη οσφρητική λειτουργία αποτελεί κοινό παράπονο μεταξύ των ασθενών με ρινικούς πολύποδες. Οι οσφρητικές διαταραχές έχουν περιγραφεί ως επαγωγικές ή νευροαισθητήριες ³¹⁸. Η μειωμένη αίσθηση της όσφρησης που συσχετίζεται με τη χρόνια παραρρινοκολπίτιδα με ή χωρίς ρινική πολυποδίαση, πιστεύεται πως είναι κυρίως επαγωγική, ως αποτέλεσμα της βλενωδους απόφραξης της ροής του αέρα μέσω του ανώτερου ρινικού πόρου. Έχει αποδειχτεί ότι η αύξηση του μεγέθους των τμημάτων της ρινικής κοιλότητας γύρω από την οσφρητική σχισμή γενικά αυξάνει την ικανότητα της όσφρησης ³¹⁹. Επίσης, πολύ συχνά στη βιβλιογραφία έχει παρατηρηθεί συσχέτιση ανάμεσα στην αλλεργία και την μείωση ή την έλλειψη της οσμής ³²⁰. Τα όρια της ικανότητας της όσφρησης είναι γνωστό πως συσχετίζονται με την ηλικία, όπου εμφανίζονται σημαντικά υψηλότερα στα ηλικιωμένα άτομα ^{321, 322}. Αυτό πρέπει να ληφθεί υπόψη όταν μελετάται η αίσθηση της όσφρησης ανάμεσα σε ηλικιωμένους ασθενείς. Έχει αποδειχτεί ότι το παρελθόν των επεμβάσεων υποτροπιαζόντων πολυπόδων εμφανίζει συσχέτιση με φτωχότερα αποτελέσματα της δοκιμασίας οσμής (smell test) σε ασθενείς με χρόνια παραρρινοκολπίτιδα ³²². Οι Hosemann et al βρήκαν ότι το 87% των ασθενών από τους οποίους η ηθμοειδής χειρουργική επέμβαση δεν βελτίωσε την υποσμία ή την ανοσμία, είχαν ήδη υποστεί στο παρελθόν προηγούμενες χειρουργικές επεμβάσεις στους παραρρινίους κόλπους τους. Οσφρητικές διαταραχές συμβαίνουν επίσης στις ρινικές μολύνσεις, ενώ μερικές φορές μπορεί να ακολουθήσει ακόμα και αμετάκλητη ανοσμία. Σε μια μελέτη έχει δείχτεί ότι η χρόνια ρινική μόλυνση είναι ικανή να προκαλέσει ζημιά σε περιοχές του οσφρητικού οργάνου και αυτή θα αντικατασταθεί με το αναπνευστικό επιθήλιο ³²³. Σε μια μελέτη του Kern ³²⁴ 30 ασθενείς υποβλήθηκαν σε βιοψία του οσφρητικού οργάνου κατά τη διάρκεια της επέμβασης με την εκτίμηση ενός παθολόγου. Δεκαεννέα από αυτούς τους ασθενείς είχαν οσφρητικό βλεννογόνο στα δείγματα της βιοψίας, ενώ οι υπόλοιποι είχαν μόνο αναπνευστικό ή απροσδιόριστο βλεννογόνο. Δέκα ασθενείς είχαν παθολογικές αλλαγές στον οσφρητικό βλεννογόνο με μια συρροή από λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, και ηωσινόφιλα, και 7 από αυτούς τους δέκα είχαν οσφρητικές βλάβες όπως καθορίστηκε από τη δοκιμασία αναγνώρισης της οσμής του Πανεπιστημίου της Πενσυλβάνια (University of Pennsylvania Smell Identification Test). Εννέα ασθενείς είχαν φυσιολογικό οσφρητικό βλεννογόνο και φυσιολογική όσφρηση. Οι μολύνσεις είναι συνήθεις επιπλοκές στη χρόνια πολυποδίαση, και κάποιες επιπτώσεις πάνω στην όσφρηση μπορεί επίσης να οφείλονται σε αυτού του είδους τους νευροαισθητήριους

μηχανισμούς. Παρόλα αυτά, οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την αναγνώριση της οσμής για τη μέτρηση του κατώτατου ορίου όσφρησης, δεν διακρίνονται σε νευροαισθητήρια και επαγωγίμη μέθοδο.

7.3.4. Η διάγνωση των ρινικών πολυπόδων

7.3.4.1. Κλινική εξέταση

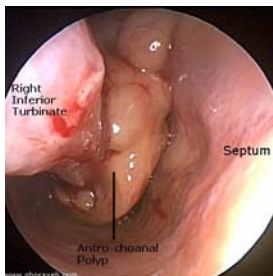
Η διάγνωση των μεγάλων ενδορινικών πολυπόδων που συσχετίζονται με ρινική συμφόρηση, δεν είναι δύσκολη (**Εικόνα 7.2**). Με απλή πρόσθια ρινοσκόπηση μπορούν εύκολα να εντοπιστούν. Οι αντροχοανικοί πολύποδες μπορούν επίσης να εντοπιστούν με οπίσθια ρινοσκόπηση (**Εικόνα 7.3**).



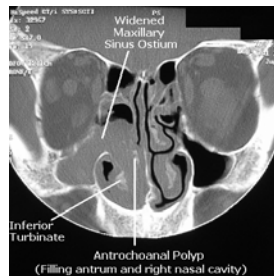
Εικόνα 7.2. Διάγνωση πολλαπλών ρινικών πολυπόδων που εκβάλλουν στο αριστερό ρουθούνι.

Πιο δύσκολος είναι ο εντοπισμός των μικρότερων πολυπόδων που περιορίζονται στον μέσο ρινικό πόρο, την ηθμοειδή κυψέλη, την μετωπιαία αύλακα και την αγκυστροειδή απόφυση, όπου ο εντοπισμός του γίνεται κυρίως ενδοσκοπικά .

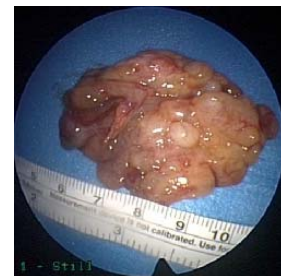
A.



B.



Γ.



Εικόνα 7.3. A. Ενδοσκοπική φωτογραφία της δεξιάς ρινικής κοιλότητας όπου φαίνεται ένας αντροχοανικός πολύποδας που εκβάλλει από το μέσο ρινικό πόρο και αποφράσσει την δεξιά οπίσθια χοάνη. **B.** Υπολογιστική τομογραφία (CT) όπου φαίνεται ο παραπάνω

αντροχοανικός πολύποδας να προέρχεται από το δεξί γναθιαίο ιγμόρειο άντρο και να προεκτείνεται μέσα στην δεξιά ρινική κοιλότητα μέσω της πεπλατυσμένης φυσιολογικής οπής του κόλπου. **Γ. Φωτογραφία του απομακρυσμένου αντροχοανικού πολύποδα.**

7.3.4.2. Απεικονιστικές μέθοδοι

Οι πολυποδεϊδείς μάζες των παραρρίνιων κόλπων μπορούν να διαγνωστούν με ακτίνες Χ, υπολογιστική τομογραφία (CT), μαγνητική τομογραφία (MRI) ή υπερηχογράφημα (US). Η πιο κοινή διαπίστωση με τις ακτίνες Χ είναι η γενικευμένη αμφοτερόπλευρη απώλεια της διαύγειας σε όλους του κόλπους.

7.3.5. Ιστολογικά ευρήματα

Οι ρινικοί πολύποδες χαρακτηρίζονται από ψευδοπολύστοιβο βλεφαριδωτό κυλινδρικό επιθήλιο, πάχυνση της επιθηλιακής βασικής μεμβράνης, λίγα αιμοφόρα αγγεία και λίγες νευρικές απολήξεις. Γενικά, το στρώμα των ρινικών πολυπόδων είναι ηδηματώδες, πιθανώς ως αποτέλεσμα της διαφυγής πλάσματος μέσω των ανοιχτών ενδοθηλιακών συνδέσεων στα αιμοφόρα αγγεία ³²⁵. Το στρώμα συνήθως περιέχει ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, κύτταρα του πλάσματος, ιστιοκύτταρα και μακροφάγα. Η αγγείωση είναι φτωχή και δεν χαρακτηρίζεται από αγγειοσυσταλτική νεύρωση, με εξαίρεση τις νευρικές απολήξεις στον ποδίσκο του πολύποδα. Τα ιστιοκύτταρα εντοπίζονται δύο φορές περισσότερο στους ρινικούς πολύποδες από ότι στο φυσιολογικό αναπνευστικό βλεννογόνο. Τα κοκκίδια των ιστιοκυττάρων στους πολύποδες είναι σχετικά μικρά, και είτε δεν έχουν εξωτερική βασική μεμβράνη, είτε είναι σε μεγάλο βαθμό αποκοκκιωμένα ³²⁵. Η μεγάλη συγκέντρωση ηωσινόφιλων (ηωσινοφιλία) είναι ένα γενικό χαρακτηριστικό των ρινικών πολυπόδων και εντοπίζεται σε ποσοστό 80-90% όλων των περιπτώσεων ³⁰². Στους αντροχοανικούς πολύποδες η ηωσινοφιλία μπορεί να εντοπιστεί σε 20-65% των περιπτώσεων ³²⁶. Οι βλεννογόνοι αδένες σχεδόν ποτέ δεν ευρίσκονται στους αντροχοανικούς πολύποδες, αλλά συχνότερα στους ρινικούς πολύποδες. Ένας τρόπος ταξινόμησης των ρινικών πολυπόδων, είναι η υποδιαίρεσή τους σε 4 διαφορετικούς ιστολογικούς τύπους σύμφωνα με τον Hellquist, η οποία μπορεί να είναι απαραίτητη λόγω της διαφορικής διάγνωσης ³²⁷.

7.3.5.1. Οιδηματώδεις ηωσινοφιλικόι πολύποδες

Το κυρίαρχο ιστολογικό εύρημα των πολυπόδων είναι η οιδηματώδης, ηωσινοφιλικού τύπου φλεγμονή, με ποσοστό εμφάνισης 86% των ρινοκολπικών πολυπόδων ³²⁸. Σε αυτούς τους πολύποδες τα κύρια ιστολογικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν το οιδηματώδες στρώμα, συχνά υπερπλασία των οροβλεννογόνων αδένων, μεγάλος αριθμός ηωσινόφιλων και ιστιοκυττάρων, καθώς επίσης και εκπάχυνση της βασικής μεμβράνης ³²⁷.

7.3.5.2. Άλλοι τύποι πολυπόδων

Τα πιο αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά των χρόνιων φλεγμονοδών πολυπόδων, είναι η έλλειψη οιδήματος στο συνδετικό ιστό (stroma) και η υπερπλασία των καλυκοειδών κυττάρων. Στο επιθήλιο, τα καλυκοειδή κύτταρα είναι παρόντα, αλλά στερείται της υπερπλασίας τους. Συχνά, το επιθήλιο εμφανίζει πλακώδη και κυβοειδή υπερπλασία ³²⁷. Αυτός ο ινο-φλεγμονώδης τύπος, αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 10% των ρινοκολπικών πολυπόδων ³²⁸. Ο ιστολογικός αυτός τύπος συχνά ευρίσκεται στην κυστική ίνωση (CF), το σύνδρομο της πρωτογενούς δυσκινησίας των βλεφαρίδων [primary ciliary dyskinesia (PCD) syndrome] ή το σύνδρομο του Young ³⁰². Το τρίτο είδος πολύποδα, είναι πολύποδας με υπερπλασία των οροβλεννογόνων αδένων ³²⁷. Αυτός ο πολύποδας μπορεί να διαγνωστεί λανθασμένα ως αδένωμα. Αυτός ο τύπος είναι σπάνιος και αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 5% των ρινοκολπικών πολυπόδων ³²⁸. Ο τέταρτος τύπος πολύποδα με ατυπία στρώματος (stromal atypia) είναι πολύ σπάνιος κι έχει διακριτά ιστολογικά χαρακτηριστικά. Το κύριο χαρακτηριστικό που διαχωρίζει έναν πολύποδα με ατυπία στρώματος από ένα νεόπλασμα, είναι η έλλειψη μιτώσεων ³²⁷.

7.3.6. Αιτιολογία των ρινικών πολυπόδων

Η αιτιολογία των ρινικών πολυπόδων είναι κυρίως άγνωστη, αν και έχει συσχετιστεί με αρκετές καταστάσεις ασθενειών. Ως παράγοντες με προδιάθεση να οδηγήσουν στην παραρρινοκολπίτιδα, έχουν αναφερθεί διάφοροι φλεγμονώδεις παράγοντες, π.χ. ιϊκές μολύνσεις του άνω αναπνευστικού, αλλεργική ρινίτιδα και διάφορες λειτουργικές διαταραχές της βλεννογόνου μεμβράνης ³²⁹.

7.3.6.1. Αλλεργία

Εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης των ηωσινοφίλων στους πολύποδες, κατά τη δεκαετία του 1930 επικρατούσε η άποψη ότι όλοι οι ρινικοί πολύποδες συσχετιζόνταν με αλλεργίες. Έγιναν πολλές προσπάθειες για να συσχετιστούν οι ρινικοί πολύποδες με διάφορα αλλεργιογόνα, όμως αυτή η αντίληψη απορρίφθηκε από τους περισσότερους ιατρούς κατά τις δεκαετίες 1970s και 1980, όπου οι ερευνητές δεν κατάφεραν να αποδείξουν μια σύνδεση με την αλλεργία. Ένα πλήθος εργασιών έχει αποδείξει ότι το ποσοστό της εμφάνισης αλλεργιών δεν είναι μεγαλύτερο σε ασθενείς με ρινική πολυποδίαση, καθώς επίσης δεν έχουν παρατηρηθεί αυξημένα ποσοστά θετικών δοκιμασιών δέρματος για αλλεργίες στους ίδιους ασθενείς^{295, 330}. Παρόλα αυτά, ακόμα και σχετικά πρόσφατα, έχουν αναφερθεί αυξημένα ποσοστά περίπτωσης αλλεργιών και έχει προταθεί ένας μηχανισμός που μεσολαβείται από τις ανοσοσφαιρίνες E (IgE), για μια μικρή υποομάδα ασθενών με ρινικούς πολύποδες³³¹.

7.3.6.2. Μολύνσεις

Πολλοί ασθενείς με ρινικούς πολύποδες έχουν δευτερογενή χρόνια παραρρινοκολπίτιδα. Η απόφραξη των κολπικών πόρων φαίνεται πως προκαλεί την έναρξη μιας σειράς από γεγονότα που οδηγούν στην χρόνια παραρρινοκολπίτιδα³³².

A) Ίϊκή μόλυνση: Ο Weille το 1966 πρότεινε πως οι πολύποδες προκαλούνται από ιϊκή μόλυνση. Οι Kozak et al.³³³ είχαν μια υπόθεση για την ιϊκή αιτιολογία των ρινικών πολυπόδων, συμπεριλαμβάνοντας τα εξής βήματα: ιϊκή μόλυνση, φλεγμονώδης απάντηση, εμμονή του ιού, επίμονη αντιγονική διέγερση, ρινική πολυποδίαση. Η ομάδα τους μελέτησε το ρόλο των ιών, πραγματοποιώντας τεστ υβριδοποίησης για το DNA κάποιων μολυσματικών στους ρινικούς πολύποδες παραγόντων, αλλά τα τεστ ήταν αρνητικά. Υποστήριξαν ότι η απουσία ιού στον ιστό, υποστήριζε την υπόθεσή τους ότι η ιϊκή εμπλοκή στους ρινικούς πολύποδες, αποτελεί ένα πρώιμο γεγονός.

B) Βακτηριακή μόλυνση: Η χρόνια παραρρινοκολπίτιδα είναι μια κοινή πάθηση σε ασθενείς με ρινική πολυποδίαση, και συνεπώς η πυώδης μόλυνση ίσως να αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα στην αιτιολογία των ρινικών πολυπόδων. Σε κουνέλια, έχει αποδειχτεί ότι οι πολύποδες αναπτύσσονται στο βλεννογόνο του άντρου μέσα σε διάστημα 3 εβδομάδων από τη μόλυνση τους με πνευμονιόκοκκο. Δεν αναπτύχθηκαν

πολύποδες στο ετερόπλευρο, μη-μολυσμένο γναθικό κόλπο των ζώων αυτών³³⁴. Συνεπώς, οι πολύποδες μπορεί να έχουν μια φλεγμονώδη προέλευση με κυρίαρχο τύπο κυττάρων, τα λεμφοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα. Οι αντροχοανικοί πολύποδες έχουν συσχετιστεί με φλεγμονή³³⁵. Πολλά είδη ασθενειών μπορούν επίσης να συνεισφέρουν σε αυτή την κατάσταση. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι διαγνώσεις που λαμβάνονται υπόψιν είναι η CF και το σύνδρομο PCD. Παρ'όλα, αυτές οι ασθένειες δεν είναι κυρίως μολυσματικές. Η μόλυνση σε αυτές τις καταστάσεις προκύπτει δευτερογενώς στην άμυνα του βλεννογόνου.

Γ) Μυκητιασική μόλυνση: Η αλλεργική μυκητιασική μόλυνση [allergic fungal sinusitis (AFS)] είναι μια σχετικά καινούρια διάγνωση. Το 1971, οι McCarthy και Pepys παρατήρησαν ότι το 10% των ασθενών με αλλεργική βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση (bronchopulmonary aspergillosis) παραπονέθηκαν για την παραγωγή ρινικών επιπομάτων, παρόμοιων με αυτά που προέρχονταν από τους βρόγχους. Σε εκείνη την μελέτη, το 41.4% (46/111) έπασχε από γναθιαία παραρρινοκολπίτιδα όπως ακεικονίστηκε με ακτίνες Χ. Ο μύκητας *Aspergillus fumigatus* μεγάλωσε σε καλλιέργειες κυττάρων από τις ρινικές μάζες και τις εκπλύσεις των κόλπων. Οι Katzenstein et al.³³⁶ περιέγραψαν τα περιστατικά επτά διαφορετικών υγιών ασθενών με άσθμα, ρινική πολυποδίαση, παραρρινοκολπίτιδα και με μια μοναδική «αλλεργική βλεννίνη» μέσα στους κόλπους. Η αλλεργική αυτή βλεννίνη, περιείχε ελασματοειδή βλέννα, ηωσινόφιλα, κρυστάλλους Charcot-Leyden και είχε μυκητώδη υφή. Η κατάσταση αυτή ονομάστηκε «αλλεργική παραρρινοκολπίτιδα *aspergillus*». Πρόσφατα, και έχοντας υψηλή την συναίσθηση της ασθένειας, έχουν δημοσιευτεί πολλές αναφορές. Τα κοινά διαγνωστικά κριτήρια για την αλλεργική μυκητιασική παραρρινοκολπίτιδα είναι (1) η χρόνια παραρρινοκολπίτιδα, (2) η παρουσία της αλλεργικής βλεννίνης (ηωσινόφιλα και τα παραπροϊόντα τους, όπως οι κρύσταλλοι Charcot-Leyden και η κύρια βασική πρωτεΐνη [major basic protein (MBP)], και (3) η παρουσία μυκήτων μέσα σε αυτή τη βλεννίνη, που επιβεβαιώνεται τόσο ιστολογικά όσο και με καλλιέργεια³³⁷. Σε μια μελέτη 210 ασθενών με διαρκή χρόνια παραρρινοκολπίτιδα, με ή χωρίς πολύποδες, οι καλλιέργειες μυκήτων από τις ρινικές εκκρίσεις ήταν θετικές σε 202 ασθενείς (96%) και στο 100% (14/14) των control ασθενών³³⁸. Σε αυτή την μελέτη, κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας των ρινικών εκκρίσεων, οι μύκητες έπρεπε να αφαιρεθούν από την βλέννα προτού τοποθετηθούν στο θρεπτικό υλικό. Ο ελάχιστος χρόνος της επώασης για την πλήρη ανάκαμψη ήταν 30 ημέρες. Ο όρος που προτάθηκε ήταν ηωσινοφιλική μυκητιασική παραρρινοκολπίτιδα, αντί του AFS, επειδή η επαγόμενη από τα IgE

υπερευαισθησία στα μυκητιασικά αλλεργιογόνα, δεν ήταν ευδιάκριτη στην πλειοψηφία των ασθενών με AFS.

7.3.7. Ασθένειες που συσχετίζονται με τη ρινική πολυποδίαση

A) Τριάδα του Samter: Η τριάδα του Samter ή τριάδα ASA, είναι το σύνδρομο της ρινικής πολυποδίασης, του άσθματος και της δυσανεξίας στην ασπιρίνη, που περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Widal. Οι Samter και Beers³⁰⁵ διευκρίνησαν τη σχέση αυτή αργότερα. Ο πιο εύλογος βασικός μηχανισμός που υπογραμμίζει την ευαισθησία στην ασπιρίνη είναι ότι η αναστολή της κυκλοοξυγενάσης από την ασπιρίνη και άλλους αναστολείς της κυκλοοξυγενάσης, θα μπορούσε να εκτρέψει τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέως από το μονοπάτι των κυκλοοξυγενασών στο μονοπάτι της λιποοξυγενάσης, αυξάνοντας έτσι την παραγωγή των λευκοτριαινίων (LTs) αφαιρώντας την προσταγλανδίνη E2 (PGE2), ένα κυρίαρχο προϊόν της κυκλοοξυγενάσης στους αεροφόρους αγωγούς, που έχει ανασταλτική επίδραση στα φλεγμονώδη κύτταρα και τα μονοπάτια³³⁹. Οι ασθενείς τείνουν να εκδηλώνουν «παμβλεννογονική» αντιδραστικότητα με ενεργό βλεννογόνο καθ'όλο το μήκος των αεραγωγών, συμπεριλαμβανομένου του τραχεοβρογχικού δέντρου και των παραρρινίων κόλπων. Η παραρρινοκολπίτιδα είναι συχνά εκτεταμένη, όμως μπορεί να αντιμετωπιστεί με επιθετική θεραπευτική αγωγή και χειρουργική επέμβαση. Η τριάδα εντοπίστηκε σε ποσοστό 8-39% των ασθενών με ρινικούς πολύποδες³⁴⁰.

B) Κυστική ίνωση (CF): Η κυστική ίνωση είναι μια από τις πιο συνήθεις κληρονομήσιμες ασθένειες ανάμεσα στους Καυκάσιους και προκαλείται από μια αυτοσωμικά-υπολειπόμενη μεταλλαγή του γονιδίου CFTR, στο χρωμόσωμα 7 (το γονίδιο CFTR κωδικοποιεί το κανάλι των ιόντων χλωρίου κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης)³⁴¹. Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί περίπου 900 μεταλλαγές που προκαλούν CF (The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, CFGAC: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). Η πιο κοινή μεταλλαγή είναι η F508³⁴², όμως η συχνότητα των μεταλλαγών ποικίλλει κατά πολύ ανάμεσα σε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες. Η συχνότητα της μεταλλαγής F508 είναι 65-80% σε ασθενείς από τη βόρειο Αμερική, τη Βρετανία, την Ελβετία και τη Δανία, αλλά μόνο 51-58% σε πληθυσμούς από την Ισπανία και την Ιταλία, και 37% ανάμεσα σε Αφρο-αμερικανούς ασθενείς. Τα τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με CF είναι η ασυνήθιστα υψηλή συγκέντρωση χλωριούχων ιόντων στον ιδρώτα, διάφορες μολύνσεις στους

πνεύμονες και τους παραρρινίους κόλπους, ρινική πολυποδίαση, παγκρεατική ανεπάρκεια, ανδρική στειρότητα και μειωμένη γυναικεία γονιμότητα ²⁹⁶. Παρόλα αυτά, η κλινική έκφραση των καταστάσεων που συσχετίζονται με αυτές τις μεταλλαγές, είναι ποικίλη. Ένα ποσοστό 10% των παιδιών που πάσχουν από CF, έχουν επίσης και ρινική πολυποδίαση. Οι ενήλικες ασθενείς με CF έχουν υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης ρινικών πολυπόδων, τα οποία κυμαίνονται μεταξύ 20-48% ²⁹⁶. Έχουν υπάρξει ορισμένες αναφορές, στις οποίες τα ποσοστά εμφάνισης της κυστικής ίνωσης είναι μεγαλύτερα στους μολυσματικούς ασθενείς, από ότι στον μέσο πληθυσμό. Στην χρόνια βρογχική υπερέκκριση, βρέθηκε μια ανώμαλη κατανομή ετεροζυγωτών πασχόντων από CF ³⁴³. Οι Wang et al. ³⁴⁴ βρήκαν μεγαλύτερη συχνότητα ατόμων που έφεραν μεταλλαγές στο γονίδιο CFTR, ανάμεσα σε ασθενείς με χρόνια παραρρινοκολπίτιδα, από ότι σε μια φυσιολογική ομάδα ατόμων. Μια πρόσφατη μελέτη, έδειξε ότι σε άτομα που έπασχαν από μη-αλκοολική παγκρεατίτιδα, οι μεταλλαγές στο γονίδιο CFTR είναι πιο κοινές από ότι στον μέσο πληθυσμό ³⁴⁵. Παρόλα αυτά, υπάρχουν και εργασίες σύμφωνα με τις οποίες η συχνότητα μεταλλαγών στο γονίδιο CFTR δεν είναι αυξημένη. Η μεταλλαγή F508 έχει μελετηθεί σε 17 άτομα που έπασχαν από παν-βρογχιολίτιδα, ωστόσο δεν ευρέθηκε κανένα είδος μεταλλαγής μεταξύ τους ³⁴⁶. Επίσης, σε μια μελέτη ατόμων που έπασχαν από σοβαρού τύπου ρινική πολυποδίαση, οι μεταλλαγές που εντοπίστηκαν στο γονίδιο CFTR, δεν φάνηκε να έχουν κάποια ανασταλτική επίδραση στην πρωτεΐνη που κωδικοποιούσε το γονίδιο ³⁴⁷. Η συχνότητα των μεταλλαγών βρέθηκε να είναι αυξημένη σε ασθενείς που έπασχαν από χρόνια βρογχιολίτιδα ³⁴⁸.

Γ) Σύνδρομο της πρωτογενούς βλεφαριδωτής δυσκινησίας (PCD syndrome):

Η συχνότητα της εμφάνισης του συνδρόμου της πρωτογενούς βλεφαριδωτής δυσκινησίας, μιας αυτοσωμικής υπολειπόμενης ασθένειας, εκτιμάται πως είναι περίπου 1 στα 15000 με 30000 άτομα ³⁴⁹. Οι ασθενείς που πάσχουν από αυτό το σύνδρομο, υποφέρουν από ρινικές εκκρίσεις και αυτό οδηγεί σε μολύνσεις της άνω αναπνευστικής οδού με χρόνια παραρρινοκολπίτιδα και στην εμφάνιση ρινικών πολυπόδων, σε ποσοστό 40% των περιπτώσεων. Χρόνια και υποτροπιάζοντα προβλήματα στα ώτα, εντοπίζονται σε ποσοστό 100% των παιδιών που πάσχουν από το σύνδρομο PCD ³⁵⁰. Τα προβλήματα αυτά οφείλονται στη δυσλειτουργία των βλεφαρίδων (cilia), η οποία οφείλεται στην έλλειψη των πρωτεϊνών της δυνεΐνης και των μικροσωληνίσκων, ακόμα και στο 100% των βλεφαρίδων ³⁵¹. Η μέγιστη εκδήλωση της ασθένειας, γνωστή και ως το σύνδρομο του Kartagener, χαρακτηρίζεται από χρόνια παραρρινοκολπίτιδα, χρόνια

βρογχίτιδα και situs inversus, ³⁵⁰. Η ανδρική υπογονιμότητα είναι τυπικό χαρακτηριστικό, αλλά όχι σε ποσοστό 100% ³⁵².

Δ) Σύνδρομο του Churg-Strauss: Το σύνδρομο του Churg-Strauss ταξινομείται ως κοκκιωματώδης αγγειοπάθεια (granulomatous vasculitis). Χαρακτηρίζεται από ιστορικό ατοπίας, την παρουσία άσθματος και ηωσινοφιλίας σε συνδιασμό με μια συστηματική αγγειοπάθεια ³⁵³. Σε μια μελέτη των Olsen et al. ³⁵⁴, το 69% (22/32) των ασθενών που έπασχαν από το σύνδρομο του Churg-Strauss, εμφάνισαν ρινικά συμπτώματα. Επίσης βρέθηκαν πολύποδες σε 11 από τους 32 ασθενείς (34%). Ιστοπαθολογικά, οι πολύποδες που αφαιρέθηκαν έδειξαν νέκρωση, σε συνδυασμό με έκκριση ηωσινόφιλων, σοβαρή ινωδοειδή αλλαγή του κολλαγόνου, και σχηματισμό κοκκιώματος με συσσώρευση επιθηλιοειδών και γιγαντιαίων κυττάρων, μεταβολής γνωστής και ως αλλεργικό κοκκίωμα.

Ε) Σύνδρομο του Young: Το σύνδρομο του Young χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζουσες αναπνευστικές ασθένειες, από αζωοσπερμία και ρινική πολυποδίαση. Πρωτοπεριγράφηκε από τον Young το 1970 ³⁵⁵. Η αναπνευστική ασθένεια αποτελείται από σοβαρή χρόνια παραρρινοκολπίτιδα, η οποία μπορεί να συσχετίζεται με βρογχιέκταση. Η CF μπορεί να αποκλειστεί, επειδή ο ασθενείς εμφανίζουν φυσιολογικές τιμές στις δοκιμασίες χλωριούχων ιόντων στον ιδρώτα και φυσιολογική λειτουργία του παγκρέατος. Η δομή των βλεφαρίδων τους είναι φυσιολογική. Η αζωοσπερμία στο σύνδρομο του Young, οφείλεται σε μια απόφραξη στην επιδιδυμίδα, η οποία είναι ευδιάκριτη από την ανεπάρκεια του σπερματικού, η οποία συσχετίζεται με την CF. Οι ασθενείς έχουν φυσιολογική σπερματογένεση. Η επικράτηση του συνδρόμου του Young, είναι σημαντικά υψηλότερη από το ποσοστό της CF ή του συνδρόμου του Kartagener. Λίγες μόνο είναι οι περιπτώσεις του συνδρόμου του Young που έχουν αναφερθεί στις Η.Π.Α. ³⁵⁶, ωστόσο το ποσοστό εμφάνισης είναι σημαντικά υψηλότερο στην Αγγλία ³⁵⁷. Τέλος, το σύνδρομο του Young ευθύνεται για το 7.4% των περιπτώσεων ανδρικής υπογονιμότητας ³⁰².

ΣΤ: Μη αλλεργική ρινίτιδα με σύνδρομο της ηωσινοφιλίας (NARES): Το σύνδρομο NARES περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1979 από τους Jacobs et al. Αναλύθηκε το 1980 από τον Mullarkey, και το 1981 από τον Jacobs ^{358, 359}. Οι ασθενείς με NARES έχουν σε μεγάλο βαθμό ρινική ηωσινοφιλία, αλλά καμία ένδειξη αλλεργίας. Το σύνδρομο αυτό έχει ιδιαίτερη συνάφεια, λόγω της φλεγμονώδους δράσης των

ηωσινόφιλων, της συχνότητας εμφάνισης των ρινικών πολυπόδων, πιθανώς ως πρόδρομης κατάστασης της «τριάδας» της ρινικής πολυποδίασης, του μη-αλλεργικού άσθματος και της δυσανεξίας στην ασπιρίνη³⁶⁰. Οι Monoret-Vautrin et al.³⁶¹ εντόπισαν ότι ένα ποσοστό 29% των ασθενών που έπασχαν από το σύνδρομο NARES, είχαν και ρινικούς πολύποδες.

7.3.8. Παθογένεση των ρινικών πολυπόδων

Η παθογένεση των ρινικών πολυπόδων δεν είναι σαφής. Πολλές είναι οι θεωρίες που έχουν προταθεί. Οι Bernstein et al. βρήκαν αλλαγές στο βιοηλεκτρικό φορτίο των καναλιών του ιόντων χλωρίου και νατρίου στο ρινικό βλεννογόνο^{362, 363}. Μελέτησαν το βλεννογόνο από ρινικούς πολύποδες και ρινικές κόγχες, με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους. Τα δείγματα μεταχειρίστηκαν με πρωτεάση για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των επιθηλιακών κυττάρων. Έγινε καλλιέργεια των κυττάρων αυτών, και κατά τη μέγιστη διεπιθηλιακή διαφορά του δυναμικού, τα επιθηλιακά κύτταρα μεγάλωσαν παρουσία αναστολέων του καναλιού των ιόντων νατρίου (amiloride hydrochloride), και επιλεγμένων αγωνιστών (agonists) του καναλιού των ιόντων χλωρίου (isoproterenol bitartrate και adenosine triphosphate). Τα επιθηλιακά κύτταρα που απομονώθηκαν από τους πολύποδες, εμφάνισαν μεγαλύτερες διαφορές στο δια-επιθηλιακό τους δυναμικό, και ισοδύναμα ρεύματα μικρής κυκλοφορίας (short-circuit currents), από τις καλλιέργειες των ρινικών κογχών. Οι αντίδραση στα amiloride, isoproterenol και adenosine triphosphate, ήταν επίσης μεγαλύτερη για τις καλλιέργειες από κύτταρα πολύποδα, απ'ότι από τα κύτταρα των ρινικών κογχών. Προτάθηκε η ακόλουθη θεωρία. Η τοπική απελευθέρωση των μεταβιβαστών της φλεγμονής, θα μπορούσε να προκαλέσει μεγαλύτερη απορρόφηση των ιόντων νατρίου και διαπερατότητα των ιόντων χλωρίου στους πολύποδες, απ'ότι στα επιθηλιακά κύτταρα των ρινικών κογχών. Η αυξημένη απορρόφηση των ιόντων νατρίου μπορεί να οδηγήσει στην αυξημένη κίνηση ύδατος μέσα στο κύτταρο, και στο ενδιάμεσο υγρό. Το οίδημα που δημιουργείται μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη και την διόγκωση του πολύποδα³⁶³. Άλλες θεωρίες περιλαμβάνουν την αγγειοκινητική ανισορροπία (vasomotor imbalance) ή τη ρήξη του επιθηλίου. Η θεωρία της αγγειοκινητικής ανισορροπίας υποστηρίζει πως η αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και η ελαττωμένη αγγειακή ρύθμιση, προκαλούν αποτοξίνωση των προϊόντων των ιστοκυττάρων (πχ, ισταμίνη). Η παρατεταμένη επίδραση αυτών των επιδράσεων μέσα στο στρώμα του πολύποδα, καταλήγει σε αυξημένο οίδημα (ιδιαίτερα στον ποδίσκο του πολύποδα), το οποίο χειροτερεύει από

την απόφραξη των φλεβικών παροχετεύσεων. Η θεωρία αυτή βασίζεται στο φτωχό από κύτταρα στρώμα των πολυπόδων, το οποίο αγγειώνεται φτωχά και έχει έλλειψη σε αγγειοσυσταλτική νεύρωση. Η θεωρία της επιθηλιακής ρήξης³⁶⁴, προτείνει πως η ρήξη του επιθηλίου του ρινικού βλεννογόνου προκαλείται από αυξημένη ιστική σπαργή ή ασθένεια (πχ. αλλεργίες, μολύνσεις). Η ρήξη αυτή οδηγεί σε πτώση του βλεννογόνου της lamina propria, σχηματίζοντας πολύποδες. Οι ανωμαλίες πιθανώς μεγενθύνονται λόγω βαρύτητας ή απόφραξης των φλεβικών παροχετεύσεων, οδηγώντας στον σχηματισμό των πολυπόδων. Αν και παρόμοια με τη θεωρία του Bernstein, η θεωρία αυτή παρέχει μια λιγότερη πειστική εξήγηση για την μεγέθυνση του πολύποδα, απ'ότι η θεωρία της εισροής ιόντων νατρίου που προτάθηκε από τον Bernstein. Ωστόσο, καμία θεωρία δεν καθορίζει πλήρως το έναυσμα της φλεγμονής.

7.3.9. Χημικοί μεταβιβαστές

Πολλοί χημικοί μεταβιβαστές έχουν βρεθεί στους ρινικούς πολύποδες. Οι κυτοκίνες, τα μόρια προσκόλλησης και οι αυξητικοί παράγοντες, αποτελούν το κύριο ενδιαφέρον της έρευνας. Η ισταμίνη, η σεροτονίνη, τα λευκοτριαινία (LTs), η νορεπινεφρίνη, οι κινίνες, η εστεράση και ίσως ο PGD2 ανευρίσκονται μέσα στο στρώμα των πολυπόδων, καθώς επίσης εντοπίζονται αυξημένα επίπεδα IgA και IgE σε αυτούς³⁶⁵. Οι Rasp et al.³⁶⁶ βρήκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα IgE στις ρινικές εκκρίσεις μη-αλλεργικών ασθενών που έπασχαν από ρινική πολυποδίαση, σε σχέση με τους φυσιολογικούς ασθενείς. Τα επίπεδα αυτά ήταν εξίσου υψηλά με τα επίπεδα IgE στις ρινικές εκκρίσεις των αλλεργικών ασθενών χωρίς πολύποδες. Η συγκέντρωση της ισταμίνης στους ρινικούς πολύποδες, σε αντίθεση με τα επίπεδα της στον ορό, είναι από 100 έως 1000 φορές υψηλότερη. Η επαγώγιμη έκφραση της συνθάσης του νιτρίου οξέως, είναι αυξημένη στην ρινική πολυποδίαση και η επαγώγιμη σύνθεση του νιτρικού οξέως εντοπίζεται στην επιθηλιακή στοιβάδα του πολύποδα³⁶⁷.

7.3.10. Αντιμετώπιση των ρινικών πολυπόδων

Η φαρμακοθεραπευτική προσέγγιση των ρινικών πολυπόδων περιλαμβάνει τη χρησιμοποίηση αντιβιοτικών, συστηματικών και τοπικών ενδορρινικών κορτικοστεροειδών, πιθανών αντιμυκητιασικών, την εφαρμογή νέων αντιφλεγμονωδών θεραπειών, όπως η χορήγηση αντισωμάτων που δρουν εναντίον φλεγμονωδών κυτταροκινών, των αντιλευκοτριαινικών φαρμάκων και ίσως η χορήγηση σε μικρές

δόσεις κάποιας μακρολίδης. Στις περιπτώσεις μαζικής ρινικής πολυποδίασης, θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με σύγχρονες χειρουργικές επεμβάσεις, προτού χρησιμοποιηθούν οι παραπάνω θεραπευτικές δυνατότητες. Τέλος έχει μελετηθεί η χρησιμοποίηση τοπικών ενδορρινικών διουρητικών, όπως η αμιλορίδη και η φουροσεμίδη με ενθαρρυντικά αποτελέσματα ³⁶⁸.

7.3.10.1. Φαρμακευτική αντιμετώπιση

Η συστηματική χορήγηση κορτικοστεροειδών από το στόμα μπορεί να προκαλέσει τη λεγόμενη φαρμακευτική πολυπεκτομή, διότι τα κορτικοειδή ασκούν λυτική δράση επί των πολυπόδων. Υπάρχουν περιπτώσεις, ιδίως όταν ακόμη οι πολύποδες είναι μικροί, που μετά από μια συνεδρία κορτικοστεροειδών, 10-14 ημερών οι πολύποδες εξαφανίζονται και επανεμφανίζονται μετά από 5-6 μήνες ³⁶⁹. Τα κορτικοστεροειδή δεν πρέπει να χορηγούνται πέραν των 10-14 ημερών λόγω του κινδύνου πρόκλησης των γνωστών παρενεργειών τους. Τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν τις προ- και αντιφλεγμονώδεις οδούς των ρινικών πολυπόδων. Ο περιορισμός των λευκοκυττάρων στους ρινικούς πολύποδες μετά από χορήγηση γλυκοκορτικοειδούς εξαρτάται από διάφορους μηχανισμούς, όπως π.χ. η τροποποίηση της ισορροπίας μεταξύ δύο ισομορφών των ανθρωπίνων υποδοχέων γλυκοκορτικοειδούς, τον GRalpha και GRbeta. Ένας άλλος μηχανισμός που μπορεί να λειτουργεί, είναι η αναστολή των κυττάρων CD4+ T από τα CD8+ T κύτταρα. Σ' αυτό το μηχανισμό μπορεί να συμμετέχει η αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη TGFβ. Οι Benson et al εφάρμοσαν μικροσυστοιχίες DNA (DNA microarrays) για να εξετάσουν την έκφραση 22.000 περίπου γονιδίων. Η έρευνα τους έδειξε αυξημένη έκφραση των διαφόρων αντιφλεγμονωδών γονιδίων στους ρινικούς πολύποδες μετά από θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή. Το αντιφλεγμονώδες γονίδιο που αυξήθηκε περισσότερο ήταν το uteroglobin, που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη Clara cell protein 16. Η πρωτεΐνη αυτή είναι εκφρασμένη με αφθονία στις εκκρίσεις των αεραγωγών και ως εκ τούτου πρέπει να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονής ³⁷⁰.

Τα τοπικά ενδορρινικά κορτικοστεροειδή μπορεί να εξαφανίσουν πολύποδες μικρού μεγέθους, εφόσον ο ασθενής τα εφαρμόζει συνεχώς με την κατάλληλη δόση επί δυο εβδομάδες, παρατείνοντας την αγωγή επί ένα μήνα. Μερικοί συνεχίζουν την εφαρμογή του τοπικού κορτικοστεροειδούς επί 2-3 μήνες και άλλοι επί 1 έτος ³⁷¹. Υπάρχουν ασθενείς με ρινικούς πολύποδες που αντιμετωπίζονται με συστηματικά από το στόμα χορηγούμενα κορτικοστεροειδή και ταυτόχρονα εφαρμόζουν ρινικούς

ψεκασμούς τοπικών κορτικοστεροειδών ή εφαρμόζουν σταγόνες τοπικών κορτικοστεροειδών, τοποθετώντας την κεφαλή σε χαμηλότερο επίπεδο. Βρέθηκε ότι τα τοπικά κορτικοστεροειδή δρουν ταχύτερα, όταν καθαρίζονται πρώτα οι ρινικές κοιλότητες με υπέρτονο διάλυμα φυσιολογικού ορού με ουδέτερο pH (Osmoclean hypertonic spray). Αυτός ο καθαρισμός των ρινικών κοιλοτήτων πρέπει να γίνεται πολύ συχνά για δύο λόγους: α) Τα ενδορρινικά κορτικοστεροειδή μπορεί να δράσουν ταχύτερα και πιο άμεσα, όταν ψεκάζονται σε καθαρισμένες από εκκρίσεις επιφάνειες του ρινικού βλεννογόνου. β) Καθαρίζοντας συχνά τις ρινικές κοιλότητες και τους πολύποδες από τις εκκρίσεις απομακρύνονται οι κυτταροκίνες και άλλοι ισχυροί χημικοί μεσολαβητές της φλεγμονής που προάγουν την ανάπτυξη των ρινικών πολυπόδων. Οι ψεκασμοί των ρινικών κοιλοτήτων με το υπέρτονο διάλυμα φυσιολογικού ορού ουδέτερου pH (Osmoclean hypertonic nasal spray) πρέπει να γίνονται πολλές φορές την ημέρα. Μετά την εφαρμογή τριών ψεκασμών σε κάθε ρουθούνη συνιστάται στον ασθενή να θέτει την κεφαλή του σε χαμηλότερο επίπεδο από το υπόλοιπό σώμα για 2-3 λεπτά, και στη συνέχεια να σηκώνεται και να καθαρίζει τις εκκρίσεις του. Αν η μύτη δεν καθαρίσει με το απλό συνηθισμένο φύσημα, τότε συνιστάται στον ασθενή να χρησιμοποιεί ατομική ηλεκτρική αναρρόφηση.

Εδώ και 8 έτη έχει επιδειχτεί η συμμετοχή των λευκοτριενίων στην πρόκληση βρογχοσπασμού και των φλεγμονωδών αλλαγών των βρόγχων των πασχόντων από άσθμα. Έχει επίσης επιδειχτεί ότι είναι ανεβασμένα τα επίπεδα των λευκοτριενίων του ρινικού βλεννογόνου των ασθενών με ρινοκολπική πολυποδίαση και ρινοκολπίτιδα ³⁷². Η γνώση αυτή οδήγησε στην επινοήση των αντιλευκοτριαινικών φαρμάκων, όπως η μοντελουκάστη (montelukast). Η τελευταία είναι ανταγωνιστής των υποδοχέων των λευκοτριενίων και προκαλεί υποκειμενική και αντικειμενική βελτίωση, όταν χορηγείται σε ασθενείς με ήπιο προς μέτριας βαρύτητας άσθμα ³⁷².

Ο Parnes και Chuma αναφέρουν ότι παρατήρησαν ανακούφιση ή τουλάχιστον σταθεροποίηση της ρινοκολπικής πολυποδίασης στο 50% των ασθενών μετά την λήψη, είτε ενός αναστολέα της σύνθεσης λευκοτριενίων, όπως το Zileuton ή ένα ανταγωνιστή των υποδοχέων λευκοτριενίων, το Zafirlukast ³⁷³. Επίσης ο Kütting et al ³⁷⁴ αντιμετώπισαν σειρά ασθενών με ρινικούς πολύποδες χορηγώντας αρχικά συστηματικά κορτικοστεροειδές από το στόμα και ταυτόχρονα χορηγώντας μοντελουκάστη 10 mg ημερησίως, χωρίς διακοπή, σημειώνοντας ότι η μοντελουκάστη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προληπτικό φάρμακο κατά της επανεμφάνισης των ρινικών πολυπόδων, αφού μπορεί να λαμβάνεται συνεχώς, χωρίς παρενέργειες.

7.3.10.2. Χειρουργική αντιμετώπιση

Η υποτροπή των ρινικών πολυπόδων είναι κατά κανόνα βεβαία μετά από λίγους ή περισσότερους μήνες, είτε μετά από μια μερική πολυπεκτομή ή ακόμη και μετά από ριζική πολυπεκτομή που επιτυγχάνεται με τη λειτουργική ενδοσκοπική χειρουργική παρά την προηγηθείσα ριζική πολυπεκτομή, και την εφαρμογή της ρινικής καθαριότητας με υπέρτονο διάλυμα φυσιολογικού ορού, τη σύντομη λήψη κορτικοστεροειδών από το στόμα και τη μακρόχρονη εφαρμογή ψεκασμών τοπικού κορτικοστεροειδούς. Αυτή η απογοήτευση των ΩΡΛ και των ασθενών αποτρέπει την εφαρμογή μιας δεύτερης ριζικής επέμβασης και πολλοί ΩΡΛ αρκούνται στην κλασική μερική πολυπεκτομή, η οποία ακολουθείται από τη συντηρητική αγωγή που περιγράφηκε. Η παραπάνω κατάσταση αδυναμίας εξαφάνισης των ρινικών πολυπόδων, εξανάγκασε τους ερευνητές να εφαρμόσουν νέες θεραπευτικές ουσίες που μπορούν να επηρεάσουν την εξέλιξη της φλεγμονής του ρινοκολπικού βλεννογόνου. Την τελευταία εικοσαετία οι ρινικοί πολύποδες αφαιρούνται με τη βοήθεια της λειτουργικής μικροσκοπικής ενδοσκοπικής χειρουργικής (ΛΜΕΧ, FESS), χωρίς όμως να έχει εγκαταλειφθεί η κλασική πολυπεκτομή. Η τεχνική ΛΜΕΧ έχει βελτιωθεί σημαντικά και καθημερινά αυξάνει ο αριθμός των ΩΡΛ που εκπαιδεύονται σ' αυτήν. Έτσι λοιπόν, σήμερα γίνονται επιτυχές ηθμοειδεκτομές και λειτουργικές ενδοσκοπικές ρινοκολπικές επεμβάσεις. Τα θεραπευτικά αποτελέσματα στην ολική πολυπεκτομή με ΛΜΕΧ, (FESS) ποικίλουν και είναι καλύτερα, όσο πιο εκπαιδευμένος είναι ο ΩΡΛ σ' αυτή τη χειρουργική τεχνική. Επίσης οι επιπλοκές, που δεν είναι σπάνιες περιορίζονται σημαντικά, όσο πιο καλά είναι εκπαιδευμένος ο χειρουργός. Παρά τούτο η διάχυτη πολυποδίαση του ρινοκολπικού βλεννογόνου αποτελούσε και αποτελεί πρόκληση για τους ΩΡΛ. Γιαυτό ο Jankowski R, et al ³⁷⁵ επέλεξε για τη θεραπεία των ρινικών πολυπόδων την πλήρη ηθμοειδεκτομή, διότι αποδίδει καλύτερα και πιο μακρόχρονα αποτελέσματα από την ατελή ηθμοειδεκτομή.

Η καθημερινή εμπειρία έδειξε ότι ακόμη και οι πιο προσεκτικά επιτελούμενες χειρουργικές επεμβάσεις ριζικής πολυπεκτομής, όταν εφαρμόζονται ως μονοθεραπεία είναι ανεπαρκείς να θεραπεύσουν ή να εξαλείψουν την υποκείμενη φλεγμονή του βλεννογόνου που καλύπτει τις κοιλότητες του σπλαγχνικού κρανίου. Η υποτροπή των ρινικών πολυπόδων αποτρέπεται μόνον αν εφαρμόζεται συμπληρωματικά και φαρμακευτική αγωγή. Έτσι οι Zheng C, et al (2000) ³⁷⁶ συστήνουν μετά την ενδοσκοπική χειρουργική την ενδορινική εφαρμογή καψαϊκίνης (capsaicin) , η οποία περιορίζει την υποτροπή των πολυπόδων και της ρινικής απόφραξης.

Όσον αφορά τους χρονοπολυπόδες, οι οποίοι εξορμούν από το σύστοιχο ιγμόρειο άντρο, αυτοί μπορεί να εμφανιστούν τόσο σε ενήλικες, όσο και σε παιδιά. Τόσο στους ενήλικες, όσο και στα παιδιά ένας χρονοπολυπόδας μπορεί να αντιμετωπιστεί επιτυχώς, με την ενδοσκοπική χειρουργική αφαίρεση, με μεγάλη πιθανότητα να μην ξαναεμφανιστεί. Η έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία των χρονοπολυπόδων είναι σημαντική, διότι μια δευτεροπαθής ρινοκολπίτιδα μπορεί να επιπλέξει την κατάσταση και να καταστήσει δύσκολη τη χειρουργική επέμβαση³⁷⁷.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση της συχνότητας των μεταλλάξεων των γονιδίων *ras* στον ελληνικό πληθυσμό με ρινική πολυποδίαση, η απόκτηση του προτύπου έκφρασης τους, και η προσπάθεια ανεύρεσης σχέσεων με διάφορες ιστοπαθολογικές και κλινικές παραμέτρους. Για τον εντοπισμό σημειακών μεταλλαγών στα κωδικόνια 12 και 13 των γονιδίων K-, H- και N-*ras*, χρησιμοποιήθηκε μια ευαίσθητη ανάλυση PCR-RFLP, σε συνδυασμό με την άμεση αλληλούχιση του PCR προϊόντος, σε 23 δείγματα ανθρώπινων ρινικών πολυπόδων (NP), τις παρακείμενες σε αυτούς κάτω και μέσες ρινικές κόγχες (AIT και AMT), καθώς επίσης και σε βλεννογόνο από τις κάτω και μέσες ρινικές κόγχες δεκατριών φυσιολογικών ατόμων (CIT και CMT).

Ο σκοπός του δεύτερου τμήματος αυτής της μελέτης, ήταν η ανίχνευση μεταλλάξεων στα εξόνια 11, 14 και 15 του γονιδίου BRAF, σε ρινικούς πολύποδες του ανθρώπου. Επίσης, στους σκοπούς της μελέτης περιλαμβάνονταν και η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων BRAF και RKIP στους πολύποδες, τον βλεννογόνο από τις μέσες και κάτω ρινικές κόγχες των ιδίων ασθενών, καθώς επίσης και στον βλεννογόνο από τις μέσες και κάτω ρινικές κόγχες φυσιολογικών ασθενών, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε πλαστική χειρουργική επέμβαση της ρινός.

Όσο αναφορά το τρίτο τμήμα της μελέτης, σκοπός ήταν η ανίχνευση DNA των ιών HPV, EBV και HSV, εφαρμόζοντας PCR με ειδικούς εκκινητές, και η συσχέτιση της παρουσίας του με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

Μέθοδοι και Υλικά

9.1. Ασθενείς και φυσιολογικά άτομα

Πάρθηκαν βιοψίες από τους NPs και το βλεννογόνο των παρακείμενων σε αυτούς ρινικών κογχών (ΑΙΤ και ΑΜΤ), από 24 ασθενείς με συμπτώματα χρόνιας παραρρινολπίτιδας/ρινική πολυποδίασης (CRS/NP) (17 άνδρες και 7 γυναίκες; μέσος όρος ηλικίας, 46 χρόνια; εύρος, 21-65 χρόνια). Όλοι οι πολύποδες προέρχονταν από την μέση ρινική κόγχη, το μέσο ρινικό πόρο και τους ηθμοειδείς κόλπους, και ήταν πολλαπλοί και αμφοτερόπλευροι. Από τους ασθενείς 1-4 δεν ελήφθησε βλεννογόνο από την μέση ρινική κόγχη. Έπειτα από την ιστολογική εξέταση των δειγμάτων, το σύστημα σταδιοποίησης που χρησιμοποιήσαμε για τους ρινικούς πολύποδες της κάθε ρινικής κοιλότητας ήταν: grade I για τους πολύποδες που δεν εκτείνονται πέρα της μέσης ρινικής κόγχης και μπορεί να χρειάζεται ενδοσκόπιο για να γίνουν ορατοί, grade II για τους πολύποδες που εκτείνονταν πέρα από τη μέση ρινική κόγχη και είναι ορατοί με ρινικό διαστολέα, και grade III για τους μεγάλους πολύποδες που αποφράζουν ολόκληρη τη ρινική κοιλότητα ³⁷⁸ (**Πίνακας 9.1**). Επιπλέον, έγινε διάκριση σε ασθενείς με ανοχή στην ασπιρίνη (6 ασθενείς) και σε αυτούς με δυσανεξία στην ασπιρίνη (18 ασθενείς), με βάση το ιστορικό τους. Οι ασθενείς διακρίθηκαν επίσης σε δύο ομάδες, ανάλογα με το εάν υπέφεραν από αλλεργική ρινίτιδα (allergic rhinitis/AR) ή όχι. Η αλλεργική ρινίτιδα διαγνώστηκε με βάση αναγνωρισμένα κριτήρια ³⁷⁹.

Πίνακας 9.1. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών και των φυσιολογικών ατόμων.

	Ρινικοί πολύποδες και παρακείμενες ρινικές κόγχες	Φυσιολογικός βλεννογόνος
Άτομα (no)	24 ^α	14
Φύλο (Α/Θ)	17/7	10/4
Ηλικία (έτη)		
<i>Μέσος όρος</i>	46	39
<i>Εύρος</i>	21-65	12-25
Χρήση καπνού (ναι/όχι)	8/16	5/9
Χρήση αλκοόλ (ναι/όχι)	7/17	4/10
Αλλεργική ρινίτιδα (AR) (ναι/όχι)	15/9	0/14
AR ολικά IgE (mean±SD)^β	436.08±434.18	27.2±19.84
non-AR ολικά IgE (mean±SD)^β	89.46±63.26	
Δυσανεξία/ανοχή στην ασπιρίνη	6/18	14/0
Στάδιο ρινικού πολύποδα (grade)		
<i>I</i>	3	
<i>II</i>	9	
<i>III</i>	12	

^α 19 παρακείμενες μέσες ρινικές κόγχες

^β Φυσιολογικές τιμές ≤180 IU/mL

Συγκεκριμένες μετρήσεις IgE καθορίστηκαν για τα ακόλουθα αλλεργιογόνα: ακάρεα σκόνης (*Dermatophagoides pteronyssinus* και *Dermatophagoides farinae*), επιθήλια γάτας και σκύλου, λάδι, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternate*, *Parietaria judaica* και αγριόχορτα. Οι μετρήσεις των ανοσοσφαιρινών IgE, αποκτήθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο C.A.R.L.A. (Capture Assay Radim Liquid Allergen; RADIM SpA, Rome, Italy) RAST, και θεωρήθηκαν ανεβασμένες όταν ήταν ≥ 0.5 IU/ml (τάξης 1 ή μεγαλύτερης). Όλοι οι ασθενείς υπέφεραν από φτέρνισμα, ρινόρροια, πονοκεφάλους, ρινική απόφραξη και υποσμία ή ανοσμία. Επίσης είχαν υποβληθεί σε ρινική πολυποδεκτομή τουλάχιστον μια φορά στο παρελθόν. Οι ασθενείς δεν είχαν λάβει κανένα φάρμακο (τοπική ή συστηματική χορήγηση κορτικοστεροειδών), για τουλάχιστον ένα μήνα πριν τη χειρουργική επέμβαση.

Ως ομάδα ελέγχου (control group) χρησιμοποιήθηκαν δεκατέσσερα άτομα με σχολίωση ρινικού διαφράγματος (Σ.Π.Δ.) που υπεβλήθησαν σε διορθωτική χειρουργική επέμβαση και δεν είχαν ιστορικό ρινικών ή αλλεργικών συμπτωμάτων οποιασδήποτε φύσεως [αρνητικές τιμές IgE (class 0) για τα προαναφερθέντα αλλεργιογόνα]. Κατά τη διάρκεια αυτών των επεμβάσεων αποκτήθηκε μια βιοψία από τον βλεννογόνο των C1T και CMT του κάθε ασθενούς. Κανένας ασθενής αυτής της ομάδας δεν είχε λάβει κορτικοστεροειδή για τουλάχιστον ένα μήνα πριν από την χειρουργική επέμβαση. Κλινικές παράμετροι όπως η ηλικία, το φύλλο, η χρήση καπνού και αλκοόλ ήταν διαθέσιμες για όλους τους ασθενείς και τα φυσιολογικά άτομα (**Πίνακας 9.1**).

Η Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης ενέκρινε την παρούσα μελέτη, και όλοι οι συμμετέχοντες (ασθενείς και φυσιολογικά άτομα) είχαν ενημερωθεί για το σκοπό της μελέτης και έδωσαν την γραπτή τους συγκατάθεση. Όλα τα δείγματα επώαστηκαν αμέσως μετά τη χειρουργική αφαίρεση σε διάλυμα RNA*later* (Qiagen) πριν από την περαιτέρω επεξεργασία τους.

9.2. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από συμπαγείς ιστούς

Το DNA απομονώθηκε σύμφωνα με γνωστά πρωτόκολλα απομόνωσης DNA από συμπαγείς ιστούς. Ο ιστός τεμαχίστηκε και ομογενοποιήθηκε σε διάλυμα λύσης (10mM EDTA, 10mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 0.5% SDS). Στη συνέχεια, ο ομογενοποιημένος ιστός μετά την προσθήκη πρωτεϊνάσης K σε τελική συγκέντρωση που φτάνει τα 100μg/ml, επώαζεται σε θερμοκρασία 60°C. Ακολουθεί η εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) με φαινόλη/χλωροφόρμιο και η αποδόμηση του RNA με RNάση (100μg/ml) για 1 ώρα στους 37°C. Το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη μισού όγκου

οξικού αμμωνίου (ή 1/20 όγκου NaCl 5M) και 2.5 όγκων απόλυτης αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C σε 13.000rpm και «ξέπλυμα» του κατακρημνισμένου DNA με 70% αιθανόλη. Αφού απομακρυνθεί η αιθανόλη το DNA επαναιωρείται σε ddH₂O και διατηρείται σε θερμοκρασία 4°C. Η ποσότητα του DNA καθώς και η καθαρότητά του υπολογίζεται μετά από φωτομέτρηση στα 260nm και στα 280nm.

9.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Το 1985 ο Mullis και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μια τεχνική *in vitro* πολλαπλασιασμού του DNA ³⁸⁰. Η μέθοδος αυτή που είναι γνωστή ως αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) επιτρέπει την επιλεκτική παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA που υπάρχει σε ένα σύνθετο μείγμα νουκλεϊκών οξέων, κατά τη διάρκεια μίας απλής ενζυμικής αντίδρασης.

Στην ουσία η τεχνική αυτή εκμεταλλεύεται τον ημισυντηρητικό τρόπο διπλασιασμού του DNA. Σε συνδυασμό με την ανακάλυψη θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών επιτρέπει την εύκολη και γρήγορη παραγωγή αμιγών τμημάτων DNA σε μεγάλες ποσότητες με ελάχιστο κόστος και χρόνο. Τα βασικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα της PCR αντίδρασης είναι: ευαισθησία, επιλεκτικότητα και ταχύτητα ³⁸¹⁻³⁸³.

Στα παραπάνω θα πρέπει να προστεθεί το γεγονός ότι η PCR απαιτεί ελάχιστη ποσότητα αρχικού υλικού, η οποία δυνητικά μπορεί να φτάσει στο επίπεδο του ενός μορίου. Το αρχικό υλικό DNA δεν είναι απαραίτητο να έχει την υψηλή καθαρότητα και ακεραιότητα που απαιτούνται για άλλες τεχνικές, ενώ οι πηγές προέλευσης του δύνανται να ποικίλουν (νωπός ιστός, σωματικά υγρά, μονιμοποιημένοι ιστοί και άλλα) ³⁸². Μοναδική προϋπόθεση είναι να υπάρχει τουλάχιστον ένα ακέραιο τμήμα DNA, το οποίο να εμπεριέχει την περιοχή που αναζητείται για ενίσχυση.

9.3.1. Η βασική αρχή λειτουργίας του PCR

Στη βασική της μορφή η αντίδραση PCR είναι μια χημική παρά βιολογική μέθοδος για την δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε σχέση με άλλες αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων, οι οποίες υπάρχουν στο μείγμα της αντίδρασης ^{380, 383}. Για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA, ή cDNA μετά από αντίστροφη μεταγραφή μίας αλληλουχίας RNA, απαιτείται η γνώση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε μικρή έκταση γύρω από το τμήμα που αποτελεί τον στόχο για

ενίσχυση. Η γνώση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων στην περιοχή στόχο, αποτελεί την βάση για τον σχεδιασμό και κατασκευή δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών αλυσίδων, οι οποίες χρησιμεύουν ως εκκινητές (primers) στην αντίδραση πολυμερισμού. Το μήκος (συνήθως 20-30 βάσεις) και η αλληλουχία των εκκινητών εξασφαλίζει στατιστικά ότι οι εκκινητές έχουν ελάχιστη πιθανότητα υβριδισμού με άλλες περιοχές του γονιδιώματος, εκτός από εκείνες που έχουν καθοριστεί γύρω από το επιλεγμένο τμήμα DNA.

Η αντίδραση PCR εκτελείται με την επανάληψη θερμικών κύκλων που αποτελούνται από αυστηρά επιλεγμένα και καθορισμένα στάδια. Ο κάθε κύκλος αρχίζει με ισχυρή θερμική αποδιάταξη (95°C), η οποία καθιστά το δίκλωνο DNA μονόκλωνο. Στη συνέχεια ακολουθεί ένα στάδιο με χαμηλότερη θερμοκρασία (50-65°C), κατά το οποίο οι εκκινητές υβριδοποιούνται με τις συμπληρωματικές τους περιοχές στους αντίστοιχους μονούς κλώνους DNA. Κάθε εκκινητής υβριδοποιείται με τον συμπληρωματικό του κλώνο αντίστοιχα, έχοντας το 3'-OH άκρο του στραμμένο το ένα προς το άλλο. Τελικά κάθε εκκινητής επεκτείνεται με πολυμερισμό κατά μήκος του τμήματος DNA από μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση σε τελική θερμοκρασία 72°C. Οι κύκλοι των τριών φάσεων επαναλαμβάνονται αρκετές φορές μέχρι να συσσωρευτεί ικανοποιητική ποσότητα προϊόντων PCR. Το προϊόν PCR που παράγεται από μία επιτυχημένη αντίδραση, αποτελείται εξ' ολοκλήρου από μόρια τμημάτων DNA με μήκος ίσο με το άθροισμα του μήκους των δύο ολιγονουκλεοτιδίων και το μήκος του DNA τμήματος το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των θέσεων των δύο εκκινητών.

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

1. Επιλογή κατάλληλων εκκινητών: Η ειδικότητα της PCR αντίδρασης ως προς την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί εξαρτάται από τους εκκινητές. Ο καλός σχεδιασμός για την επιλογή εκκινητών αποτελεί σημαντικότερο παράγοντα για την επιτυχία της PCR. Στατιστικά, έχει βρεθεί ότι όταν μία αλληλουχία DNA έχει μήκος τουλάχιστον 20 bp, τότε είναι μοναδική στο γονιδίωμα και κατά συνέπεια, για να επιτευχθεί ειδική ενίσχυση αλληλουχιών πρέπει οι εκκινητές να είναι τουλάχιστον 20-μερή. Προτιμούνται εκκινητές που α) έχουν περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη παρόμοια με το τμήμα DNA που θα ενισχυθεί, β) δεν έχουν σημαντική δευτεροταγή δομή ούτε αλληλεπικάλυψη ειδικά στο 3' άκρο, γ) δεν έχουν εκτάσεις από πολυπουρίνες ή πολυπυριμιδίνες και δ) το ζεύγος των εκκινητών δεν εμφανίζει

συμπληρωματικότητα και δεν σχηματίζει διμερή (primer dimers) με αποτέλεσμα την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων.

2. Επιλογή θερμοκρασίας υβριδοποίησης εκκινητών (annealing temperature): Η θερμοκρασία υβριδισμού ποικίλλει ανάλογα με το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις GC, και το είδος του υποστρώματος DNA. Ως ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού Τα θεωρείται αυτή που το 50% των μορίων είναι αποδιατεταγμένο. Υψηλές θερμοκρασίες επιτυγχάνουν περισσότερο εξειδικευμένο υβριδισμό, χαμηλής όμως απόδοσης. Η επιλογή χαμηλότερης θερμοκρασίας αυξάνει την απόδοση σε βάρος της ειδικότητας, με αποτέλεσμα τον κίνδυνο δημιουργίας παραπροϊόντων της PCR.

3. Επιλογή συγκέντρωσης δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και ιόντων Mg^{2+} : Τα ιόντα Mg^{2+} είναι μεταλλικός συμπράγοντας της Taq πολυμεράσης και η μεν περίσσεια τους μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του μη ειδικού προϊόντος λόγω αύξησης της ενεργότητας της πολυμεράσης, η δε έλλειψή της οδηγεί σε μειωμένη απόδοση προϊόντος. Με δεδομένο ζεύγος εκκινητών, συνήθως η κανονικοποίηση των συνθηκών σε μία αντίδραση PCR, περιλαμβάνει πειράματα όπου σταδιακά μεταβάλλονται ανεξάρτητα μεταξύ τους η θερμοκρασία αναδιάταξης και η συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} .

4. Αριθμός κύκλων: Συνήθως ο βέλτιστος αριθμός κύκλων είναι 25-30 και προσδιορίζεται πειραματικά με βάση την καλύτερη δυνατή απόδοση προϊόντος με το λιγότερο μη ειδικό προϊόν. Μετά από έναν αριθμό κύκλων η αντίδραση φτάνει σε μια στατική φάση (plateau), κατά την οποία νέα αύξηση του αριθμού των κύκλων δεν οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης. Για ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR απαραίτητη προϋπόθεση είναι να τερματίσει η αντίδραση, ενώ ακόμα βρίσκεται στην εκθετική της φάση. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει γραμμική αντιστοίχιση της τελικής ποσότητας προϊόντος στην αρχική ποσότητα υποστρώματος. Συνήθως επιτελούνται προκαταρκτικά πειράματα με διαδοχικές αραιώσεις αρχικού υποστρώματος (δημιουργία πρότυπης καμπύλης), ώστε να βρεθούν οι συνθήκες εκείνες όπου 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-στόχου³⁸⁴. Με τον τρόπο αυτό επιτελείται συναγωνισμός ανάμεσα στις δύο αλληλουχίες που συνενισχύονται, οπότε η αφθονία των αρχικών αντιγραφών της αλληλουχίας στόχου

εκφράζεται σαν ο λόγος της ως προς την ένταση της ζώνης που αντιστοιχεί στον συναγωνιστή.

5. Παρουσία ενισχυτών και αναστολέων: Αναστολείς μπορεί να υπάρχουν είτε στα βιολογικά δείγματα είτε στα χημικά αντιδραστήρια. Παράδειγμα αναστολέων είναι ιοντικά επιφανειοδραστικά όπως το SDS. Ουσίες-ενισχυτές της αντίδρασης αποτελούν το φορμαμίδιο (5%), πολυαιθανογλυκόλη (PEG) (5-15%) κ.α.

Η μέση απόδοση μιας σειράς κύκλων PCR δύναται να περιγραφεί με την ακόλουθη εξίσωση: $N=n(1+e)^c$, όπου N συμβολίζει την τελική ποσότητα του προϊόντος, n συμβολίζει την αρχική ποσότητα του υποστρώματος, e συμβολίζει την απόδοση της αντίδρασης και c συμβολίζει τον αριθμό των κύκλων PCR. Επειδή τα προϊόντα κάθε κύκλου προστίθενται σαν υπόστρωμα για τον επόμενο κύκλο, η συσσώρευση του προϊόντος PCR γίνεται με εκθετικό τρόπο, οπότε μπορεί να εκτιμηθεί και η απόδοση της ενίσχυσης. Όταν όμως η συγκέντρωση προϊόντος προσεγγίσει την 10^{-7} M, τότε παύει πλέον η παραγωγή και η αντίδραση μπαίνει σε φάση κορεσμού^{380, 383}. Η χρήση θερμοανθεκτικών πολυμερασών και η κατασκευή θερμικών κυκλοποιητών, έδωσε την δυνατότητα αυτοματοποίησης και ταυτόχρονης ανάπτυξης πολλαπλών δειγμάτων σε σύντομο χρόνο και με ελάχιστο κόστος.

9.3.2. Συνθήκες αντιδράσεων PCR και εκκινητές

Μισό έως 2 μ g του εκχυλίσματος DNA από κάθε δείγμα υφίσταται ενζυμική ενίσχυση σε τελικό όγκο 50 μ l. Η αντίδραση περιλαμβάνει 5 μ l ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης, 150 μ M από κάθε dNTP, 0.5 μ M από κάθε εκκινητή, Mg^{2+} σε τελική συγκέντρωση 2-3 mM και 1.25 U πολυμεράσης. Το μίγμα αρχικά επωάζεται για 1 min στους 95°C και ακολουθούν 35 κύκλοι ενίσχυσης οι οποίοι περιλάμβαναν αποδιάταξη στους 95°C για 30 sec, υβριδισμό για 30 sec στην κατάλληλη για κάθε ζεύγος εκκινητών θερμοκρασία, και επιμήκυνση στους 72°C για 30 sec. (**Πίνακες 9.2-9.5**). Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων της PCR χρησιμοποιείται πήκτωμα αγαρόζης 2%.

Πίνακας 9.2. Αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γενωμικού DNA, θερμοκρασία υβριδισμού του κάθε ζεύγους, μέγεθος του PCR προϊόντος και των προϊόντων πέψης.

Γονίδιο	Εκκινήτες (5' – 3')	Θερμοκρασία υβριδισμού- Ta (°C)	PCR προϊόν (bp)	RFLP προϊόντα (bp)
<i>K-ras</i>	ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT TCAAAGAATGGTCCTGGACC	58	157	113/29 (wt) 142 (mut)
<i>H-ras</i>	GAGACCCTGTAGGAGGACCC GGGTGCTGAGACGAGGGACT	62	312	236/55/21 (wt) 291 (mut)
<i>N-ras</i>	AACTGGTGGTGGTTGGACCA ATATTCATCTACAAAGTGGTCCTGGA	57	83	41/23/19 (wt) 60 (mut)
BRAF exon11	TCTCTTCCTGTATCCCTCTC ACTTGT CACAATGTCACCAC	55	257	
BRAF exon14	CCCAAGTATGTTCTGTAGAT AACTGTTTTTACATAATGTG	52	210	
BRAF exon15	ATCTACTGTTTTCTTTACTT TAGTAACTCAGCAGCATCT	51	216	
β 2m	TCCAACATCAACATCTTGGA TCCCCCAAATCTAAGCAGA	56	122	

Πίνακας 9.3. Συνθήκες αντιδράσεων PCR και εκκινητές αλληλούχισης των εξονίων 11, 14 και 15 του γονιδίου BRAF. Η αλληλούχιση των κωδικονίων 11, 12 και 13 των γονιδίων *ras*, έγινε με τη χρήση των ιδίων εκκινητών (Sense και Antisense) που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR. Όλοι οι εκκινητές βρίσκονταν στα -γειτονικά των κωδικών εξονίων- ιντρόνια του γονιδίου BRAF, με σκοπό να συμπεριληφθούν στα ενισχυμένα προϊόντα, οι αλληλουχίες από τα όρια των ιντρονίων/εξονίων, καθώς επίσης και τα τελικά ίχνη της αλληλούχισης. Η PCR της αλληλούχισης είχε 25 κύκλους επανάληψης και το θερμικό προφίλ είναι το ίδιο και για τα 3 ζεύγη των εκκινητών .

Γονίδιο	Εκκινητές (5' – 3')	PCR προφίλ
BRAF exon11 (seqDNA)	TGTTTGGCTTGACTTGAC	96°C για 30 sec (αποδιάταξη)
BRAF exon14 (seqDNA)	AGATTTTCGAGGCCAGAGTCC	54°C για 10 sec (υβριδοποίηση)
BRAF exon15 (seqDNA)	CCCTGAGATGCTGCTGAGTT	60C για 4 min (επέκταση)

Πίνακας 9.4. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του συμπληρωματικού DNA (cDNA), θερμοκρασία υβριδισμού του κάθε ζεύγους και μέγεθος του PCR προϊόντος,

Γονίδιο	Εκκινητές (5' – 3')	Θερμοκρασία υβριδισμού-Τα (°C)	PCR προϊόν (bp)
<i>K-ras</i>	GGGGAGGGCTTTCTTTGTGTA GTCCTGAGCCTGTTTTGTGTC	55	174
<i>H-ras</i>	GGGGCAGTCGCGCCTGTGAA CCGGCGCCACCACCACCA	65	110
<i>N-ras</i>	CTTCCTCTGTGTATTTGCCATCA GCACCATAGGTACATCATCCGA	55	107
GAPDH	GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA GTCATTGATGGCAACAATATCCACT	60	101
BRAF	AGAAAGCACTGATGATGAGAGG GGAAATATCAGTGTCCCAACCA	53	101
RKIP	AGACCCACCAGCATTTTCGTG GCTGATGTCATTGCCCTTCA	55	150

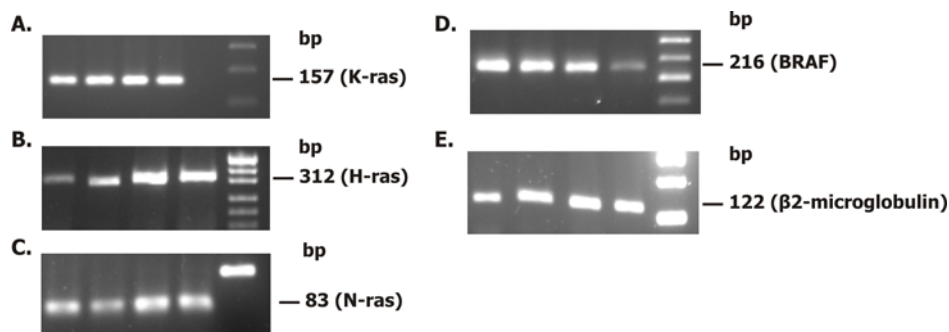
Πίνακας 9.5. Αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του DNA των ιών HPV, EBV και HSV, θερμοκρασία υβριδισμού του κάθε ζεύγους και μέγεθος του PCR προϊόντος.

Γονίδιο	Εκκινήτες (5' – 3')	Θερμοκρασία υβριδισμού- Ta (°C)	PCR προϊόν (bp)
HPV-	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	43, 10 κύκλοι	150
GP5+/6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	40, 30 κύκλοι	
HPV-11	TGTGTGGCGAGACAACCTTTCCCTT TGGTTATTTAGTTTTATGAAGCGTGCCTTTCCC	56	236
HPV-16	CTGCAAGCAACAGTTACTGCCACG CATACATCGACCGGTCCACC	56	315
HPV-18	AAACTAACTAACACTGGGTATATACA ATGGCACTGGCCTCTATAGT	56	143
HPV-33	AACAGTTAAAAAACCTTTAAA AGTTTCTCTACGTCGGGACCTC	56	171
EBV	GTGTGCGTCGTGCCGGGGCAGCCAC ACCTGGGAGGGCCATCGCAAGCTCC	72	375
HSV	CAGTACGGCCCCGAGTTCGTGA GTAGATGGTGCGGGTGATGTT	64	478

9.4. Ηλεκτροφόρηση του DNA και των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Η τελική συγκέντρωση αγαρόζης στο πήκτωμα αποφασίζεται ανάλογα με την ζητούμενη διακριτική ικανότητα του συγκεκριμένου πηκτώματος. Η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης διαλύεται σε διάλυμα 0.5xTBE και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για 5 min περίπου. Αφήνεται να κρυώσει έως τους 60°C, οπότε προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε τελική συγκέντρωση 0.5 µg/ml. Αφού στερεοποιηθεί το πήκτωμα αφαιρείται η «κτένα» που δημιουργεί τα «πηγάδια» για το φόρτωμα των προϊόντων PCR, ή του DNA, και το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 0.5xTBE. Τα δείγματα φορτώνονται στα πηγάδια αφού αναμιχθούν με 1/10 του όγκου διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) και εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές αν εκτεθεί το πήκτωμα σε υπεριώδη ακτινοβολία (**Εικόνα 9.1**).

Εικόνα 9.1. Ενδεικτικά προϊόντα της αντίδρασης PCR για τα γονίδια *ras* (**A**, **B**, **C**), *BRAF* (**D**) και β 2-μικροσφαιρίνης (**E**).



9.5. Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)

Η τεχνική της ανάλυσης πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (restriction fragment length polymorphism ή RFLP) στηρίζεται στην χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών. Αυτές είναι ένζυμα που το κάθε ένα αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων στο DNA και με επώαση σε κατάλληλη θερμοκρασία κόβει το DNA σε συγκεκριμένη θέση. Στην χρήση αυτής της μεθόδου στηρίζεται η ανίχνευση των σημειακών μεταλλάξεων. Τα ένζυμα και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ανάλογα με το γονίδιο που επρόκειτο να ενισχυθεί έχουν ως εξής:

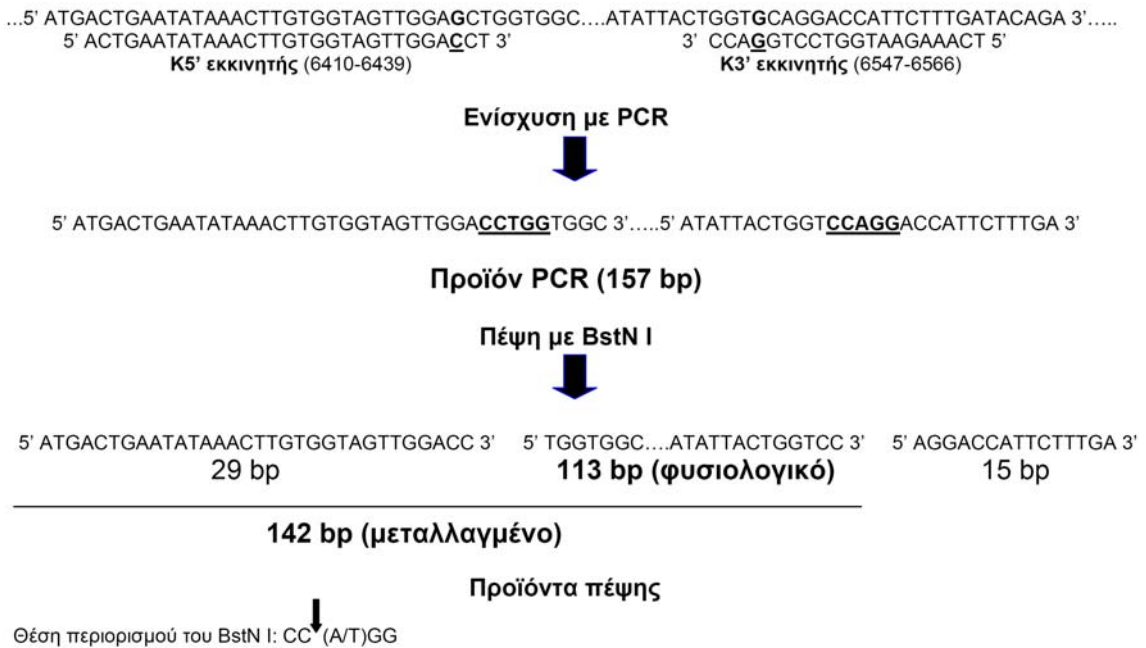
K-ras: για την εύρεση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του *K-ras* έγινε εισαγωγή μίας μη ομόλογης βάσης (mismatch) στους εκκινητές με αποτέλεσμα την

δημιουργία δύο θέσεων αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *BstNI*, από τις οποίες η μία περιλαμβάνει το κωδικόνιο 12, ενώ η άλλη λειτουργεί ως «μάρτυρας» (**Εικόνα 9.2**). Με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η λανθασμένη εκτίμηση μίας ατελούς πέψεως και η εύρεση ψευδών μεταλλάξεων. Αυτό έγινε γιατί δεν υπάρχουν ενδογενώς θέσεις αναγνώρισης από άλλες ενδονουκλεάσες που να περιλαμβάνουν το κωδικόνιο 12, με αποτέλεσμα να πρέπει να δημιουργηθούν τεχνητά. Ο εκκινητής που βρίσκεται στο 5' άκρο (K5') έχει ενσωματωμένο ένα κατάλοιπο C αντί για G στην πρώτη θέση του κωδικονίου 11, δημιουργώντας έτσι μια θέση αναγνώρισης για το *BstNI* (CCTGG), η οποία περιλαμβάνει τα δύο πρώτα νουκλεοτίδια του κωδικονίου 12 (GGT). Σημειακή μετάλλαξη σε μία από τις δύο αυτές θέσεις καταστρέφει την θέση αναγνώρισης του *BstNI*, ενώ σημειακή μετάλλαξη στο τρίτο νουκλεοτίδιο, το οποίο δεν ελέγχεται με το συγκεκριμένο ένζυμο, είναι «παρανοηματική» μετάλλαξη (non sense mutation). Αυτό συμβαίνει γιατί τα κωδικόνια: GGA, GGC, GGT και GGG κωδικοποιούν όλα για το αμινοξύ γλυκίνη (Gly). Μέρος των προϊόντων PCR (10-40 μl) υφίσταται πέψη με 30 U *BstNI* στους 60°C για 16 ώρες, οπότε προκύπτουν διαφορετικού μήκους τμήματα του DNA για το φυσιολογικό και το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο. Τα προϊόντα της πέψης αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.

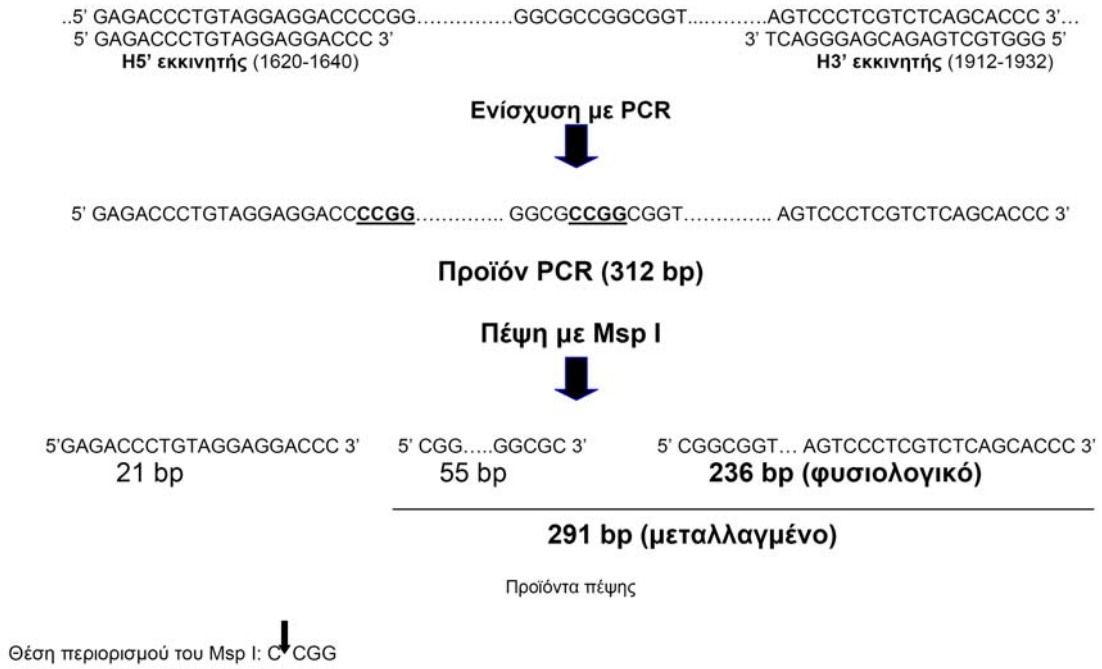
H-ras: για την εύρεση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του *H-ras* δεν χρειάζεται εισαγωγή μη ομολόγων βάσεων (mismatch) στους εκκινητές, αφού υπάρχουν ενδογενώς δύο θέσεις αναγνώρισης (CCGG) για την περιοριστική ενδονουκλεάση *Msp I* στο προϊόν του PCR που παράγεται με τους συγκεκριμένους εκκινητές (**Εικόνα 9.3**). Η πρώτη θέση που εντοπίζεται στο τέλος του εκκινητή που βρίσκεται στο 5' άκρο (H5'), βρίσκεται στο εσώνιο μεταξύ των εξωνίων Φ και 1 και χρησιμεύει σαν θέση ελέγχου της πέψης με την *Msp I*. Η δεύτερη θέση που περιέχει τα δύο πρώτα νουκλεοτίδια του κωδικονίου 12 είναι πολυμορφική για μεταλλάξεις του *H-ras* για μία από τις δύο πρώτες θέσεις του κωδικονίου 12. Ένα μέρος των προϊόντων PCR (10-40 μl) υφίσταται πέψη με 30 U της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Msp I* στους 37°C για 16 ώρες. Τα προϊόντα της πέψεως αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.

N-ras: για την εύρεση σημειακών μεταλλάξεων για το *N-ras* η διαδικασία είναι αντίστοιχη αυτής του *K-ras*. Στην περίπτωση του *N-ras* και οι δύο εκκινητές περιέχουν μία μη ομόλογη βάση (mismatch) (**Εικόνα 9.4**). Για τον εκκινητή N12s αυτή είναι το τρίτο νουκλεοτίδιο από το 3' άκρο (C αντί για G) που δημιουργεί την πρώτη θέση αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *BstNI* (CC(T/A)GG). Οι δύο τελευταίες θέσεις αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης αποτελούνται από τα δύο πρώτα νουκλεοτίδια του κωδικονίου 12 (GG), που μετάλλαξη τους αποτελεί «hot spot»

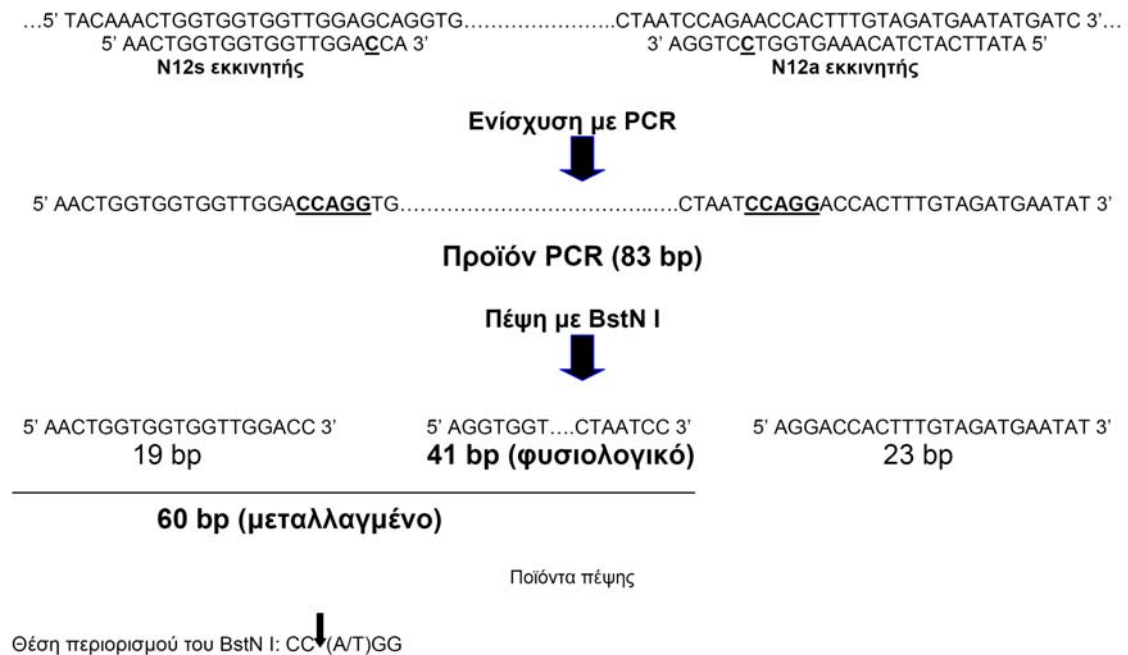
και που ελέγχονται με το *BstN I*, ενώ η τρίτη θέση του κωδικονίου που δεν μπορεί να ελεγχθεί με το *BstN I* είναι non sense μετάλλαξη, αντίστοιχα με το *K-ras*. Η δεύτερη θέση μη ομόλογης βάσης είναι το έκτο νουκλεοτίδιο από το 3' άκρο του N12a εκκινητή (C αντί για T) και αυτό αποτελεί μέρος της θέσεως μάρτυρα για την *BstN I*, αφού ολόκληρη η θέση αναγνώρισης βρίσκεται μέσα στον εκκινητή N12a. Έτσι μέρος (10-40 μl) του προϊόντος PCR υφίστανται πέψη με 30 U της *BstN I* στους 60°C για 16 ώρες. Η ανάλυση των προϊόντων RFLP έγινε σε 3% γέλη αραρόζης και φωτογραφήθηκε υπό ακτινοβολία UV. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν DNA από την κυτταρική σειρά SW480 που φέρει μια ομόζυγη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του *K-ras*, και DNA από την κυτταρική σειρά EJ, η οποία είναι μεταλλαγμένη στο ίδιο κωδικόνιο του γονιδίου *H-ras*.



Εικόνα 9.2. Αλληλουχία γονιδίου *K-ras* που περιέχει το φυσιολογικό κωδικόνιο 12.



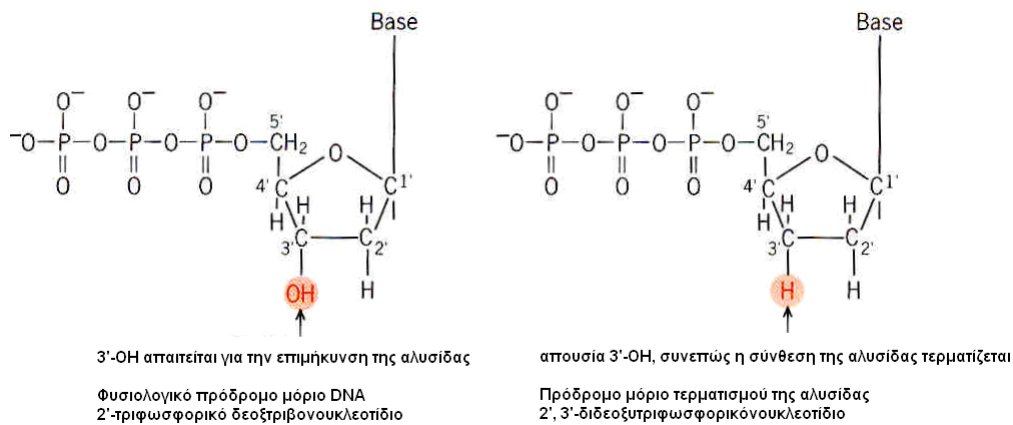
Εικόνα 9.3. Αλληλουχία γονιδίου H-ras που περιέχει το φυσιολογικό κωδικόνιο 12.



Εικόνα 9.4. Αλληλουχία γονιδίου N-ras που περιέχει το φυσιολογικό κωδικόνιο 12.

9.6. Άμεση αλληλούχιση DNA

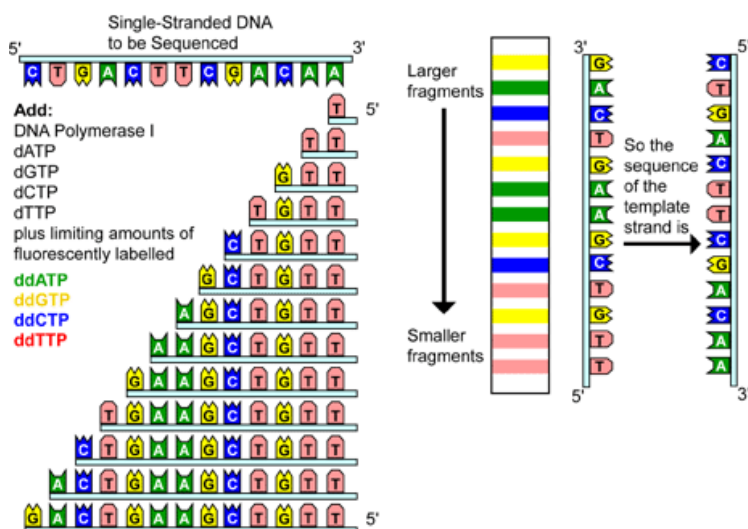
Η άμεση αλληλούχιση έγινε με την μέθοδο των διδεοξυ-τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (ddNTPs), τα οποία έχουν ένα Η στον 3' άνθρακα του σακχάρου ριβόζης, αντί για την φυσιολογική ομάδα OH που εντοπίζεται στα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) (Μέθοδος του Sanger). Τα διδεοξυνουκλεοτίδια είναι τερματιστές (terminators) της PCR αντίδρασης. Σε μια αντίδραση, εάν προστεθεί ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο, αντί για το κανονικό δεοξυνουκλεοτίδιο, η σύνθεση της αλυσίδας σταματάει σε εκείνο το σημείο, επειδή η απαραίτητη για την πρόσθεση του επόμενου νουκλεοτιδίου ομάδα OH, είναι απύσχα (**Εικόνα 9.5**).



Εικόνα 9.5. Η διαφορά ανάμεσα σε ένα δεοξυνουκλεοτίδιο (dNTP) κι ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο (ddNTP) έγκειται στον 3' άνθρακα του σακχάρου της ριβόζης. Τα ddNTPs έχουν ένα Η αντί για την φυσιολογική ομάδα OH που έχουν τα dNTPs, στη θέση αυτή.

Στην άμεση αλληλούχιση και οι 4 διδεοξυ αντιδράσεις επιτελούνται στο ίδιο σωληνάκι. Αυτό επιτελείται λόγω του ότι κάθε ddNTP είναι σεσημασμένο με μια διαφορετική φθορίζουσα χρωστική. Συνεπώς, η χρωστική μέσα σε κάθε νεοσυντιθέμενο τμήμα, αντιστοιχεί στη χρωστική που είναι προσδεσμένη στο διδεοξυνουκλεοτίδιο που προστέθηκε για να τερματίσει την σύνθεση εκείνου του τμήματος. Μια ρομποτική συσκευή μετακινεί το sample tray, έτσι ώστε κάθε ένα από τα 16 πηγαδάκια να είναι σε επαφή με ένα δεύτερο τριχοειδές σωληνάκι γεμάτο με ένα πολυμερές. Το πολυμερές αντικαθιστά ένα διάδρομο της γέλης ηλεκτροφόρησης. Το

σεσημασμένο DNA από αυτό το πηγαδάκι μετακινείται μέσα σε αυτό το τριχοειδές σωληνάκι, όπου τα μικρότερου μεγέθους σημασμένα τμήματα μετακινούνται γρηγορότερα από τα μεγαλύτερα. Ένας μετρητής χρωστικής (fluorometer) κι ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής, εντοπίζουν και καταγράφουν την χρωστική που είναι προσδεμένη στα τμήματα τα οποία διατρέχουν το gel. Η αλληλουχία καθορίζεται από την σειρά με την οποία καταγράφονται οι χρωστικές από τη γέλη (**Εικόνα 9.6**).



Εικόνα 9.6. Σχηματική μέθοδος της άμεσης αλληλούχησης χρησιμοποιώντας τα διδεοξυ νουκλεοτίδια (Μέθοδος του Sanger).

Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν με το Qiaquick PCR purification kit (Qiagen Inc) και ακολούθησε δεύτερη αντίδραση PCR με το ένα εκκινητή, έτσι ώστε να επιτευχθεί η ενίσχυση μονόκλωνου PCR προϊόντος. Η αντίδραση έγινε στον θερμικό κυκλοποιητή GeneAmp 9600 χρησιμοποιώντας το ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems). Έπειτα από κατακρήμνιση του PCR προϊόντος με EDTA 125 mM, προστέθηκε σε αυτό 100% αιθανόλη, αναμίχθηκε και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, αφού φυγοκεντρήθηκε και «ξεπλύθηκε» με αιθανόλη 70%, επαναδιαλύθηκε σε φορμαμίδη (βεβαιώνει ότι το DNA παραμένει γραμμικό), οι κλώνοι αποδιατάχθηκαν για 5 min στους 95°C, και τα PCR προϊόντα φορτώθηκαν στον γενετικό αναλυτή ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Tokyo, Japan), όπου και έγινε η ανάλυση του καθορισμού των αλληλουχιών ras και BRAF. Οι αλληλουχίες ελέγχθηκαν διπλά κάνοντας χρήση

ξεχωριστά τους πρόσθιους και οπίσθιους εκκινητές κάθε φορά. Τα δεδομένα της αλληλούχισης αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας κατάλληλο λογισμικό ανάλυσης αλληλουχιών (Sequence Analysis 3.7; Applied Biosystems).

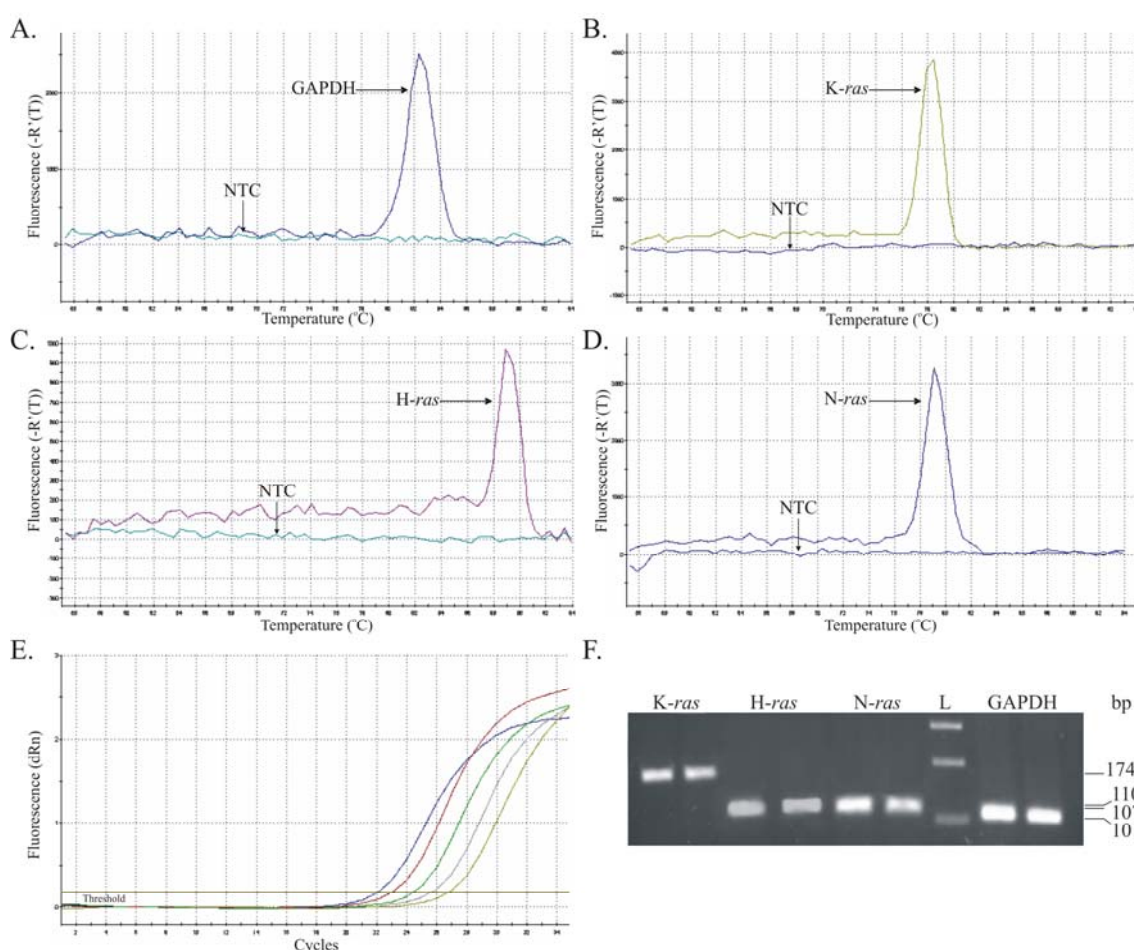
9.7. Απομόνωση RNA και αντίστροφη μεταγραφή

Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν με το αντιδραστήριο TRIzol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA) χρησιμοποιώντας ομογενοποιητή, και ακολούθησε πρόσθεση χλωροφορμίου και φυγοκέντρηση. Το ολικό RNA κατακρημνίστηκε από το υπερκείμενο με ισοπροπανόλη, πλύθηκε με 75% αιθανόλη και επαναδιαλύθηκε σε 50 μl νερό- DEPC. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του RNA υπολογίστηκαν έπειτα από τη μέτρηση της απορρόφησης στα 260-nm και του λόγου της απορρόφησης στα 260/280-nm, χρησιμοποιώντας ένα σπεκτροφωτόμετρο UV (Hitachi U-2001). Το συμπληρωματικό DNA (cDNA) συντέθηκε με αντίστροφη μεταγραφή [reverse transcription (RT)], χρησιμοποιώντας το StrataScript[®] First-Strand Synthesis System. Περιληπτικά, first strand buffer (10x), 2 μg ολικού RNA, 0.3 μg τυχαίοι εκκινητές, 25mM dNTPs και νερό RNase-free, συνολικού όγκου 19 μl, θερμάνθηκαν στους 65°C για 5 min, για να απομακρυνθούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA. Στη συνέχεια, η αντίδραση αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για να μπορέσουν οι εκκινητές να υβριδιστούν στο RNA, και σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν τα ένζυμα αντίστροφη μεταγραφάση (50 U StrataScript RT) και 20 U of RNase Block. Το τελικό μείγμα (όγκος 20 μl) επωάστηκαν για 10 min στους 25°C για να επεκταθούν οι εκκινητές, και η σύνθεση του cDNA έγινε στους 42°C για 60 min. Η αντίδραση τερματίστηκε στους 72°C για 15 min.

9.8. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR)

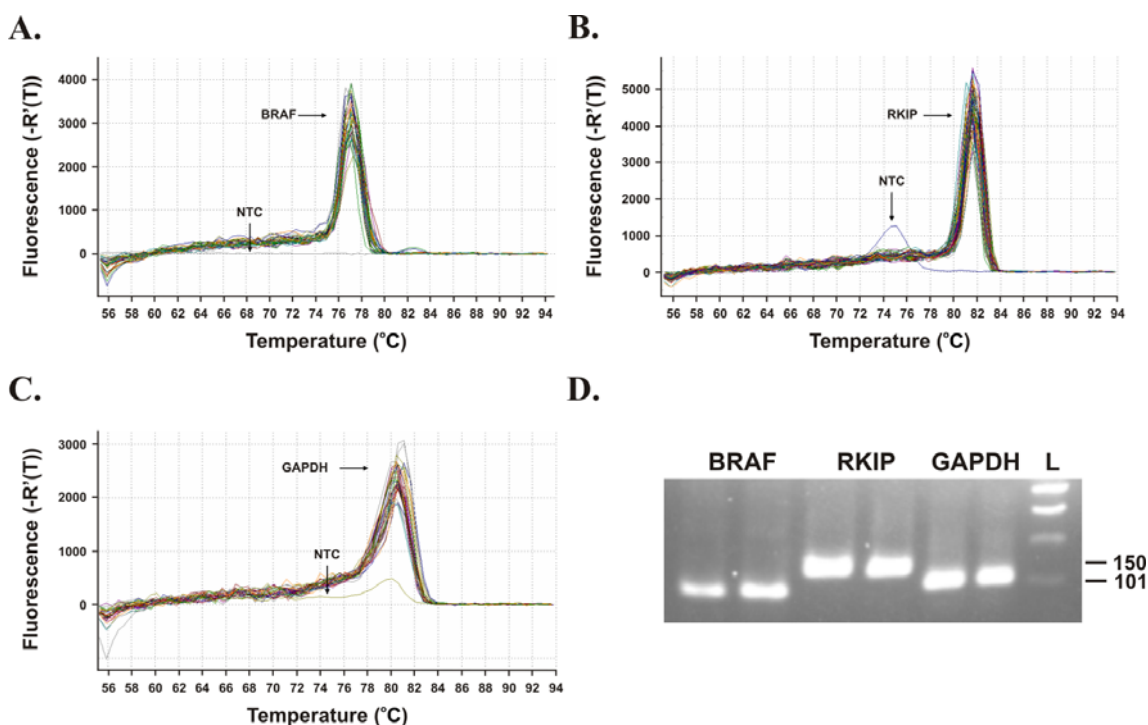
Τα διαφορεικά επίπεδα της mRNA έκφρασης των τριών *ras* γονιδίων μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας την αντίστροφη μεταγραφή - αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time RT-PCR), με τη χρωστική SYBR-Green I. Όλα τα ζεύγη των εκκινητών σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να έχουν απόσταση τουλάχιστον ενός ιντρονίου, για να αποφευχθεί ο πολλαπλασιασμός γενωμικού DNA, πέρα του cDNA. Το γονίδιο της γλυκεραλδεϋδικής-3-φωσφορικής αφυδρογονάσης (GAPDH) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας για να κανονικοποιηθούν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά την αντίδραση της real-time PCR, πολλαπλασιάστηκε 1μl cDNA από τα δείγματα NP, AMT, AIT, CMT ή CIT, σε μια αντίδραση PCR που περιείχε 2x Brilliant SYBR-Green I QPCR Master Mix, 300 nM από κάθε εκκινητή και 30 μM ROX παθητική χρωστική αναφοράς, σε τελικό όγκο 20 μl. Το μίγμα αρχικά επωάζεται για 5 min στους 95°C και ακολουθούν 40 κύκλοι ενίσχυσης οι οποίοι περιλάμβαναν αποδιάταξη στους 95°C για 30 sec, υβριδισμό για 30 sec στην κατάλληλη για κάθε ζεύγος εκκινητών θερμοκρασία, και επιμήκυνση στους 72°C για 30 sec. Οι αλληλουχίες των RNA εκκινητών, η θερμοκρασία υβριδοποίησης του κάθε ζεύγους εκκινητών και το μέγεθος των προϊόντων PCR των γονιδίων, αναγράφονται στον **πίνακα 9.4**. Έπειτα από το τελικό στάδιο επέκτασης ακολούθησε ανάλυση καμπύλης αποδιάταξης (melt curve analysis), κατά την οποία η θερμοκρασία αυξανόταν από τους 55°C στους 95°C με γραμμικό ρυθμό 0.2°C/sec (**Εικόνες 9.7** και **9.8**).



Εικόνα 9.7. Ενδεικτικές καμπύλες αποδιάταξης για τα γονίδια GAPDH (**A**), K-ras (**B**), H-ras (**C**) και N-ras (**D**). Οι μονές κορυφές των καμπυλών για όλα τα γονίδια και η

απουσία κορυφών για τους αρνητικούς μάρτυρες [Non-Template Controls (NTC)] αποδεικνύουν τον αποκλεισμό γενωμικού DNA. **(E)** Καμπύλη ενίσχυσης (Amplification plot) για τα standard δείγματα (standard samples = 2-fold αραιώσεις από ένα μείγμα cDNA), με τα οποία κατασκευάστηκε μια καμπύλη αναφοράς. Η απόδοση της Standard Curve αντίδρασης ήταν 100%, η κλίση της καμπύλης ισούταν με -3.325 και το $R^2 = 1$. Η ανάλυση των γονιδίων *ras* και GAPDH (γονίδιο κανονικοποίησης), απεικονίζεται σε γέλη αгарόζης 2% **(F)**. L, 100bp DNA Ladder.



Εικόνα 9.8. Ανάλυση των καμπύλων αποδιάταξης για τα γονίδια BRAF **(A)**, RKIP **(B)** και GAPDH **(C)**. Οι απλές κορυφές για όλα τα γονίδια και η απουσία κορυφών για τους αρνητικούς μάρτυρες (non-template controls/NTC) αποδεικνύει τον αποκλεισμό οποιασδήποτε επιμόλυνσης από γενωμικό DNA καθώς επίσης και την εξειδίκευση των PCR προϊόντων. **(D)** Πιστοποίηση του μεγέθους και της εξειδίκευσης των προϊόντων, με ανάλυση σε γέλη αгарόζης 2%. L, 100bp DNA Ladder.

Η συλλογή των δεδομένων έγινε τόσο κατά την υβριδοποίηση των εκκινητών, όσο και κατά την φάση της επέκτασης, με δύο μετρήσεις σε κάθε βήμα και σε κάθε στιγμή της melt-curve ανάλυσης. Όλα τα πειράματα PCR έγιναν σε ένα θερμικό

κυκλοποιητή Mx3000P real-time PCR, χρησιμοποιώντας το software version 2.00 (Stratagene, La Jolla, CA). Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της melt-curve ανάλυσης, τα προϊόντα PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2%, έπειτα από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, και φωτογραφήθηκαν στο UV light transilluminator. Σε κάθε αντίδραση PCR συμπεριελήφθησαν δύο NTC μάρτυρες. Όλες οι αντιδράσεις έγιναν σε τριπλέτες και τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων που μελετήθηκαν, υπολογίστηκαν και κανονικοποιήθηκαν ως προς mRNA του house-keeping γονιδίου (GAPDH) του κάθε δείγματος, καθώς επίσης και ως προς τα κατάλληλα δείγματα κανονικοποίησης (calibrators). Η σχετική ποσοτικοποίηση αναλύθηκε χρησιμοποιώντας την μέθοδο της $\Delta\Delta Ct$. Μετά από τον πολλαπλασιασμό, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς από δείγματα που προέρχονταν από 6-7 διαδοχικές αραιώσεις ενός μείγματος cDNA, τόσο για τα γονίδια όσο και για τον εσωτερικό μάρτυρα (GAPDH). Οι αποδόσεις πολλαπλασιασμού των γονιδίων και της GAPDH ήταν οι ίδιες, σχεδόν 100%. Τα δεδομένα της αντίδρασης για τα δείγματα των πολυπόδων, των παρακείμενων και των φυσιολογικών ρινικών κογχών, κανονικοποιήθηκαν αρχικά απέναντι στην ποικιλία, στην ποιότητα και την ποσότητα του κάθε δείγματος. Οι κανονικοποιημένες ως προς το GAPDH τιμές, ΔCt s, αρχικά υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση: $\Delta Ct_{\text{δείγματος}} = Ct_{\text{GOI}} - Ct_{\text{GAPDH}}$ (όπου GOI = Gene Of Interest). Ακολούθως, υπολογίστηκε η διαφορά $\Delta\Delta Ct$, χρησιμοποιώντας τον τύπο: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{ρινικού πολύποδα}} - \Delta Ct_{\text{ρινικής κόγχης}}$, και η έκφραση των κανονικοποιημένων (με το γονίδιο GAPDH) γονιδίων στον ρινικό πολύποδα, σε σχέση με την αντίστοιχη ρινική κόγχη που χρησιμοποιήθηκε ως calibrator, ισούται με $(1 + \text{Efficiency})^{-\Delta\Delta Ct}$. Η διπλάσια αύξηση ή μείωση της τιμής θεωρήθηκε υπερ-έκφραση ή υπο-έκφραση του mRNA, αντίστοιχα, στο συγκεκριμένο κάθε φορά δείγμα ρινικού πολύποδα.

9.9. Εντοπισμός της μεταλλαγής BRAF V600E

Στις περισσότερες μελέτες, συνηθιζόταν η ενίσχυση ενός τμήματος του γονιδίου BRAF και αναλυόταν με SSCP (ανάλυση πολυμορφισμού στερεοδιαμόρφωσης μονήρων αλυσίδων)³⁸⁵, με τη μέθοδο ανάλυσης ετεροδιμερών βασιζόμενων σε τριχοειδή (capillary-based heteroduplex method)¹¹⁷, με άμεση αλληλούχιση (direct sequencing)³⁸⁶, ή μέσω της ενίσχυσης με PCR και ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικού τμήματος (RFLP)³⁸⁷. Η ανάλυση με PCR-RFLP περιλαμβάνει ενζυμική περιοριστική πέψη και ανάλυση με ηλεκτροφόρηση. Η περιοριστική ενδονουκλεάση *TspRI*

(NNCAC/GTGNN) χρησιμοποιείται επειδή η μεταλλαγή T1799A καταργεί αυτό το σημείο περιορισμού, που είναι παρόν στην αγρίου τύπου αλληλουχία. Αυτές οι πρακτικές είναι χρονοβόρες και όχι πάντοτε αρκετά ευαίσθητες για να εντοπίσουν ένα μικρό ποσοστό κυττάρων που περιέχουν τη μετάλλαξη. Η ενζυμική πέψη αυξάνει το χρόνο επεξεργασίας μετά την PCR και όλες αυτές οι τεχνικές απαιτούν επιπλέον επεξεργασία των ήδη ενισχυμένων τμημάτων DNA, πράγμα που συχνά αποτελεί πηγή επιμόλυνσης. Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε μια τεχνική βασιζόμενη στην αλληλο-ειδική ενίσχυση σε πραγματικό χρόνο (real-time allele-specific amplification), στα δείγματα των ρινικών πολυπόδων.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο πρόσθιοι εκκινητές με διαφορετικά νουκλεοτίδια στο 3' άκρο τους, έτσι ώστε ο καθένας να είναι ειδικός για την αγρίου τύπου (V; AGGTGATTTTGGTCTAGCTACAG T) ή τη μεταλλαγμένη αλληλουχία (E; AGGTGATTTTGGTCTAGCTACAG A), και ένας οπίσθιος εκκινητής (AS; TAGTAACTCAGCAGCATCTCAGGGC). Οι συνθήκες ενίσχυσης βελτιστοποιήθηκαν για εφαρμογή στον θερμικό κυκλοποιητή Mx3000P instrument (Stratagene). Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε 2x Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (περιείχε 2.5 mM MgCl₂), 0.3 μl από την παθητική χρωστική αναφοράς ROX σε αραιώση 1/500, 0.8 μl από κάθε εκκινητή (0.4 μM έκαστος) και νερό DEPC σε τελικό όγκο 19 μl. Ένα μl του εκμαγείου DNA (10-200 ng γενωμικού DNA) προστέθηκε στο μείγμα και ξεκίνησε η αντίδραση. Οι συνθήκες της κυκλοποίησης ήταν ως εξής: αποδιάταξη για 5 min στους 95°C; πολλαπλασιασμός για 45 κύκλους, με αποδιάταξη για 30 sec στους 95°C, υβριδισμός για 1 min στους 66°C και επέκταση για 30 sec στους 72°C. Μετά την ολοκλήρωση της κυκλοποίησης, τα δείγματα τέθηκαν σε μια διαβάθμιση θερμοκρασίας από τους 55°C στους 95°C, με συνεχή παρακολούθηση του φθορισμού για την ανάλυση της καμπύλης τήξεως. Για κάθε ενίσχυση, το αποτέλεσμα ήταν μια μόνο απότομη κορυφή στην αναμενόμενη θερμοκρασία τήξης (78°C), που υποδεικνύει την ειδική, δίχως παραπροϊόντα ενίσχυση.

9.10. Στατιστική ανάλυση

Τα επίπεδα του mRNA αρχικά εκτιμήθηκαν με το τεστ Kolmogorov-Smirnov, για να καθοριστεί εάν ακολουθούν κανονική κατανομή. Ανάλογα με τα αποτελέσματα, χρησιμοποιήθηκε το τεστ συσχέτισης κατά Pearson ή το μη-παραμετρικό τεστ συσχέτισης κατά Spearman, για να εξετασθεί η συσχέτισή τους ανα-ζεύγη και η συσχέτισή τους με συνεχείς μεταβλητές (ηλικία, στάδιο πολύποδα). Τα μη-παραμετρικά

τεστ Mann-Whitney U και Kruskal-Wallis H, χρησιμοποιήθηκαν για να εξεταστεί η συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση των γονιδίων και τις διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους. Οι διαφορές στην εμφάνιση των μεταλλαγών *ras* ανάμεσα στους ιστούς και το στάδιο του πολύποδα, υπολογίστηκαν με τη δοκιμασία χ^2 . Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS 11.5 (SPSS, Chicago, IL). Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε στο επίπεδο 95% (P -value < 0.05).

9.11. Διαλύματα

9.11.1. Διαλύματα απομόνωσης DNA και RNA

Φαινολικό διάλυμα απομόνωσης RNA Trizol–Invitrogen.

Ισοπροπανόλη 100% (Merck).

EtOH 70% και 100% (Merck).

dH₂O κατεργασμένο με DEPC (Invitrogen).

Reagent B: Tris-base (400mM), NaCl (150mM), EDTA (60mM), SDS (1w/v).

Ρύθμιση pH=8.0 χρησιμοποιώντας HCl 37%. Το SDS προστίθεται μετά την αποστείρωση του διαλύματος.

9.11.2. Ηλεκτροφορητικά διαλύματα

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (0.5x TBE): 0.09 TrisHCl, 0.09M Βορικό οξύ, 2.5mM EDTA, pH 8.3.

Διάλυμα φόρτωσης DNA: 0.25% κυανού της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανού του ξυλενίου και 40% γλυκερόλη.

9.12. Ένζυμα

Go Taq Flexi DNA πολυμεράση (Promega).

StrataScript αντίστροφη μεταγραφάση (Stratagene).

RNase Block Inhibitor (Stratagene).

Πρωτεΐνάση K (Promega).

*Bst*NI περιοριστικό ένζυμο (New England Biolabs).

*Msp*I περιοριστικό ένζυμο (New England Biolabs).

9.13. Υλικά και εταιρείες προέλευσης

Υλικό	Εταιρία	Υλικό	Εταιρία
Αγαρόζη	Invitrogen	Μεθανόλη	Fluka
Αιθανόλη	Merck	SDS	BDH
Ανθρακικό νάτριο	Sigma	TEMED	Sigma
Βορικό οξύ	BDH	Tris base	BDH
Bromophenol blue	Sigma	Υδροξείδιο του Νατρίου	Sigma
Βρωμιούχο αιθίδιο	BDH	Υδροχλωρικό οξύ	BDH
Γλυκερόλη	Invitrogen	Φαινόλη	BDH
Διθειοθρεϊτόλη	Sigma	Φορμαλδεύδη	BDH
dNTPS	Promega	Χλωριούχο νάτριο	Sigma
EDTA	BDH	Χλωροφόρμιο	Fluka
Ισοπροπανόλη	BDH		

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

Αποτελέσματα

10.1. Μεταλλαγές και επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ras*

Η μελέτη αυτή έγινε με σκοπό να καθοριστούν οι σημειακές μεταλλαγές στο *ras* κωδικόνιο 12 και τα μεταγραφικά επίπεδα mRNA των γονιδίων *ras*, στους ρινικούς πολύποδες. Για το πρώτο τμήμα της μελέτης, χρησιμοποιήθηκε μια ευαίσθητη τεχνική PCR-RFLP σε συνδυασμό με άμεση αλληλούχιση του PCR προϊόντος. Αναφορικά με την ανάλυση της έκφρασης, αρχικά υπολογίσαμε τις κανονικοποιημένες -ως προς το γονίδιο GAPDH- τιμές όλων των γονιδίων-στόχων, για όλους τους ιστούς (NPs, AITs, AMTs, CITs, και CMTs) και συγκρίναμε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ras* ανάμεσα στους NP και τα δύο διαφορετικά είδη των ιστών-βαθμονομητών (calibrators): α) τις παρακείμενες του πολύποδα κάτω και μέσες ρινικές κόγχες, και β) τις φυσιολογικές κάτω και μέσες ρινικές κόγχες (**Εικόνα 10.1**).

10.1.1. Ανάλυση των *ras* μεταλλαγών

Η ανάλυση μεταλλαγών στα κωδικόνια 12 των γονιδίων K-, H- και N-*ras*, πραγματοποιήθηκε σε 23 ασθενείς. Προς έκπληξή μας, εκτός από τις μεταλλαγές GGT→GTT στο κωδικόνιο 12 (Gly12Val) του K-*ras*, η αλληλούχιση του προϊόντος έδειξε πως υπήρχαν επίσης και μεταλλαγές GCT→CCT στο κωδικόνιο 11 (Ala11Pro) (**Εικόνα 10.2**). Οι μεταλλαγές στο κωδικόνιο 11 του K-*ras* εντοπίστηκαν σε ποσοστό 4/23 (17%) των NPs, 5/23 (22%) των AITs και 3/19 (16%) των AMTs, και όλες τους ήταν ετερόζυγες. Οι μεταλλαγές στο κωδικόνιο 12 του K-*ras* εντοπίστηκαν σε 8/23 πολύποδες (35%), 5/23 AITs (22%) και 5/19 (26%) AMTs. Καμία σημειακή μεταλλαγή δεν εντοπίστηκε σε καμία από τις φυσιολογικές ρινικές κόγχες. Δύο από τις οκτώ (25%), 3/5 (60%) και 2/5 (40%) από τις μεταλλαγές στο κωδικόνιο 12 του K-*ras* ήταν ομόζυγες στους ιστούς NP, AIT και AMT, αντίστοιχα, ενώ 6/8 (75%), 2/5 (40%) και 3/5 (60%) αυτών, ήταν ετερόζυγες για τους αντίστοιχους ιστούς. Δεν εντοπίστηκε καμία μεταλλαγή στο κωδικόνιο 13 του K-*ras* με άμεση αλληλούχιση, σε κανένα από τους ιστούς της μελέτης. Οι μεταλλαγές στα κωδικόνια 11 και 12 του K-*ras* ήταν σημαντικά πιο συχνές στα πιο προχωρημένα στάδια του πολύποδα (grade II και grade III), σε αντίθεση με τους grade I πολύποδες. Συγκεκριμένα, οι μεταλλαγές στο κωδικόνιο 11

του *K-ras* εντοπίστηκαν στα 3/4 (75%) των πολυπόδων grade II και στο 1/4 (25%) των πολυπόδων grade III. Οι μεταλλαγές στο κωδικόνιο 12 του *K-ras*, εντοπίστηκαν σε 5/8 (62.5%) grade II πολύποδες και σε 3/8 (37.5%) grade III πολύποδες. Κανένας ρινικός πολύποδας grade I δεν έφερε μεταλλαγές στα κωδικόνια 11 και 12 του *K-ras*.

Παρατηρήθηκε μια ομόζυγη μεταλλαγή στο κωδικόνιο 12 του *H-ras* ανάμεσα σε 23 πολύποδες (4%), η οποία ήταν σε πολύποδα grade III (**Εικόνα 10.3**), ενώ καμία μεταλλαγή στο κωδικόνιο 11 ή 13 του *H-ras* δεν εντοπίστηκε σε καμία από τις υπόλοιπες ρινικές κόγχες. Τέλος, η ανάλυση μεταλλαγών στα κωδικόνια 11, 12 και 13 του γονιδίου *N-ras* ήταν αρνητική, για όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν (**Εικόνα 10.4**).

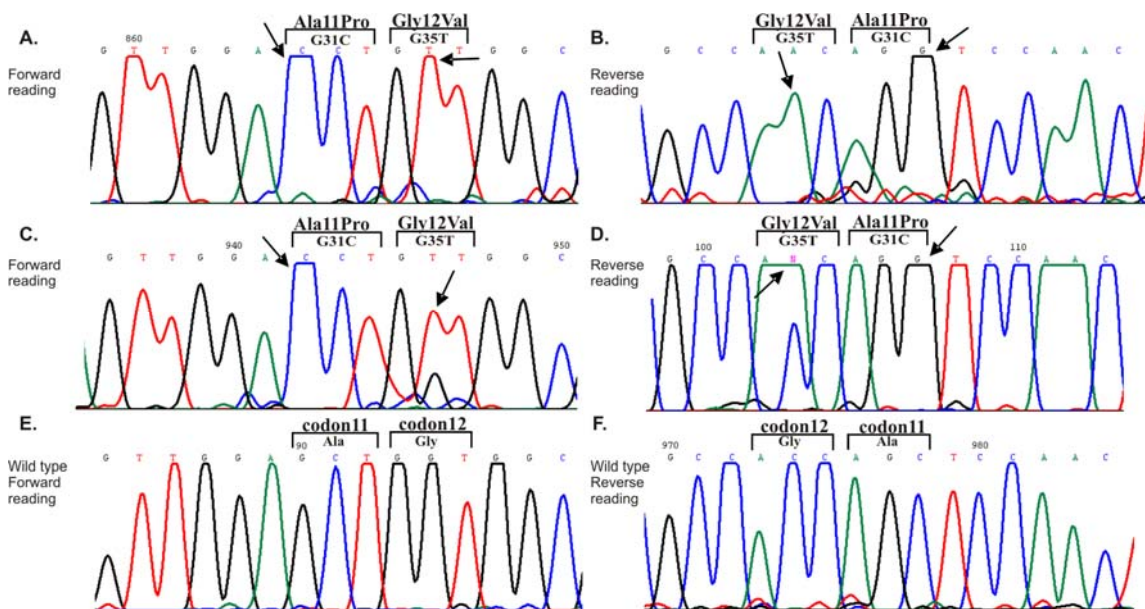
A.

patient no	nasal polyp stage (grade)	K-ras mutation analysis					
		codon 11 (GCT→CCT)			codon 12 (GGT→GTT)		
		NP	AIT	AMT	NP	AIT	AMT
1	II	hom	hom	N/A	het	wt	N/A
2	II	hom	wt	N/A	het	wt	N/A
3	II	wt	hom	N/A	hom	hom	N/A
4	III	wt	wt	N/A	hom	hom	N/A
5	II	wt	hom	hom	het	hom	hom
6	III	wt	wt	wt	wt	wt	het
7	I	wt	wt	wt	wt	wt	wt
8	II	wt	hom	wt	het	wt	wt
9	III	hom	wt	wt	wt	het	wt
10	III	wt	hom	hom	het	het	hom
11	II	wt	wt	wt	wt	wt	het
12	III	wt	wt	wt	wt	wt	wt
13	III	wt	wt	wt	het	wt	wt
14	II	hom	wt	hom	wt	wt	wt
15	III	wt	wt	wt	wt	wt	wt
16	III	wt	wt	wt	wt	wt	wt
17	II	wt	wt	wt	wt	wt	wt
18	III	wt	wt	wt	wt	wt	wt
19	I	wt	wt	wt	wt	wt	wt
20	I	wt	wt	wt	wt	wt	wt
21	III	wt	wt	wt	wt	wt	het
22	III	wt	wt	wt	wt	wt	wt
23	II	wt	wt	wt	wt	wt	wt

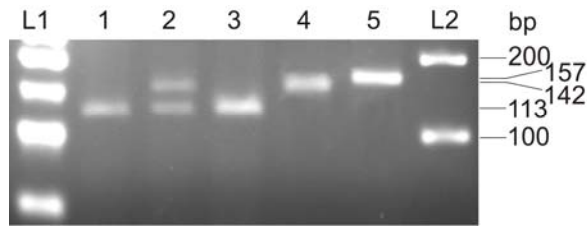
B.

patient no	x-fold expression											
	K-ras				H-ras				N-ras			
	NP/AIT	NP/AMT	NP/CIT	NP/CMT	NP/AIT	NP/AMT	NP/CIT	NP/CMT	NP/AIT	NP/AMT	NP/CIT	NP/CMT
1	0.10	0.06	0.18	0.20	0.38	0.09	0.14	0.13	no expression	no expression	no expression	no expression
2	0.64	0.98	2.95	3.24	13.05	0.20	0.29	0.28	no expression	no expression	no expression	no expression
3	0.83	1.09	3.27	3.58	1.00	2.99	4.32	4.27	0.38	0.29	0.14	0.13
4	0.51	1.13	3.41	3.74	0.11	0.41	0.60	0.59	2.16	0.20	0.10	0.09
5	0.16	0.12	0.36	0.39	0.75	7.02	4.16	4.11	no expression	no expression	no expression	no expression
6	3.25	3.87	6.58	7.21	11.08	8.96	4.64	4.95	no expression	no expression	no expression	no expression
7	4.15	0.53	1.59	1.74	0.03	1.43	2.07	2.05	1.04	1.70	0.82	0.80
8	1.28	10.81	1.95	2.14	0.50	1.19	1.27	1.26	0.92	0.12	0.11	0.11
9	0.71	0.55	3.85	4.22	0.14	0.34	0.28	0.28	no expression	no expression	no expression	no expression
10	1.01	2.53	4.87	5.34	0.19	0.11	0.43	0.42	0.72	0.81	0.04	0.04
11	0.58	0.66	1.93	2.12	0.61	0.54	0.92	0.91	0.96	1.06	0.06	0.06
12	1.06	0.94	4.42	4.85	1.69	1.95	1.03	1.02	0.88	1.06	0.05	0.05
13	1.98	2.39	3.76	4.12	5.61	4.47	6.47	6.40	0.75	0.03	0.04	0.04
14	0.92	1.06	3.19	3.49	1.40	1.77	2.57	2.54	1.06	0.13	0.06	0.06
15	1.71	0.83	2.19	2.39	0.36	0.35	0.68	0.67	1.68	7.11	0.78	0.76
16	1.93	1.81	4.02	4.40	5.31	17.97	6.45	6.37	6.30	1.86	0.36	0.35
17	2.23	1.17	1.89	2.07	0.58	2.65	1.26	1.24	0.08	0.14	0.09	0.09
18	1.87	0.38	1.30	1.42	5.02	2.23	3.54	3.50	no expression	no expression	no expression	no expression
19	0.61	0.45	1.51	1.66	1.95	3.22	4.09	4.04	no expression	no expression	no expression	no expression
20	0.37	0.17	1.10	1.21	0.19	0.19	0.19	0.19	3.50	6.64	1.61	1.56
21	0.10	1.22	1.23	1.35	2.94	1.91	2.38	2.35	no expression	no expression	no expression	no expression
22	0.45	0.37	0.41	0.45	0.92	0.70	0.53	0.53	0.80	0.52	0.92	0.89
23	4.45	1.66	10.47	11.47	0.18	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.08	0.08

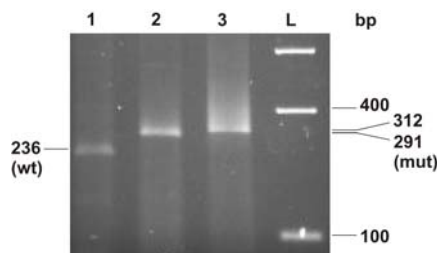
Εικόνα 10.1. Α. Ανάλυση των μεταλλαγών για το *K-ras* σε NP, ΑΙΤ, ΑΜΤ σε συσχέτιση με το στάδιο του ρινικού πολύποδα. Hom, ομόζυγη μεταλλαγή; het, ετερόζυγη μεταλλαγή; wt, αγρίου τύπου δείγμα; N/A, μη-διαθέσιμο δείγμα; **Β.** Ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων *ras* στον NP σε σχέση με τις κόγχες ΑΙΤ, ΑΜΤ, CΙΤ και CΜΤ. Η διπλάσια (two-fold) αύξηση (>2) ή μείωση (<0.5) της τιμής, εκτιμήθηκε ως υπερ-έκφραση ή υπο-έκφραση του mRNA, αντίστοιχα, στο συγκεκριμένο δείγμα NP. Με κόκκινο χρώμα υποδεικνύεται η υπερ-έκφραση, με πράσινο τα ίδια επίπεδα έκφρασης και με μπλε η υπο-έκφραση των γονιδίων. NP, ρινικός πολύποδας (nasal polyp); ΑΙΤ, παρακείμενη κάτω ρινική κόγχη (adjacent inferior turbinate); ΑΜΤ, παρακείμενη μέση ρινική κόγχη (adjacent middle turbinate); CΙΤ, φυσιολογική κάτω ρινική κόγχη (control inferior turbinate); CΜΤ, φυσιολογική μέση ρινική κόγχη (control middle turbinate).



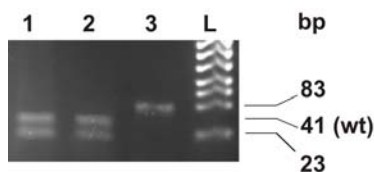
Εικόνα 10.2. Ηλεκτρογραφήματα αλληλούχισης των ιδίων ασθενών που απεικονίζουν εμπρόσθιο (Forward) (A, C και E) και αντίθετο (Reverse) διάβασμα (B, D και F). **Α.** και **Β.** Τα βέλη υποδεικνύουν τις ομόζυγες μεταλλαγές στο κωδικόνιο 11 (GCT→CCT; Ala11Pro) και στο κωδικόνιο 12 (GGT→GTT; Gly12Val) του γονιδίου *K-ras*. **Γ.** και **Δ.** Τα βέλη υποδεικνύουν τις ομόζυγες μεταλλαγές στο κωδικόνιο 11 (GCT→CCT; Ala11Pro) και τις ετερόζυγες μεταλλαγές στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *K-ras* (GGT→GTT; Gly12Val). **Ε.** και **Φ.** Απεικονίζονται οι αγρίου τύπου αλληλουχίες στα κωδικόνια 11 και 12 του *K-ras*.



Εικόνα 10.3. Τα *K-ras* προϊόντα της PCR (157 bp) κόπηκαν με το περιοριστικό ένζυμο *BstNI* και ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 3%. L1, 50bp DNA ladder; πηγαδάκια 1, 3, δείγματα αγρίου τύπου (*wt*); πηγαδάκι 2, ετερόζυγο *mut* δείγμα; πηγαδάκι 4, ετερόζυγο *mut* – θετικός μάρτυρας από την κυτταρική σειρά SW480; πηγαδάκι 5, άπεπτο PCR προϊόν *K-ras*; L2, 100 bp DNA ladder.



Εικόνα 10.4. Τα *H-ras* προϊόντα της PCR (312 bp) κόπηκαν με το περιοριστικό ένζυμο *MspI* και ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 3%. Πηγαδάκι 1, δείγμα αγρίου τύπου (*wt*); πηγαδάκι 2, μεταλλαγμένο δείγμα (ομόζυγο); πηγαδάκι 3, άπεπτο *H-ras* PCR προϊόν, L, DNA ladder.



Εικόνα 10.5. Τα *N-ras* προϊόντα της PCR (83 bp) κόπηκαν με το περιοριστικό ένζυμο *BstNI* και ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 3%. Πηγαδάκια 1 και 2, δείγματα αγρίου τύπου (*wt*); πηγαδάκι 3, άπεπτο *N-ras* PCR προϊόν, L, DNA ladder.

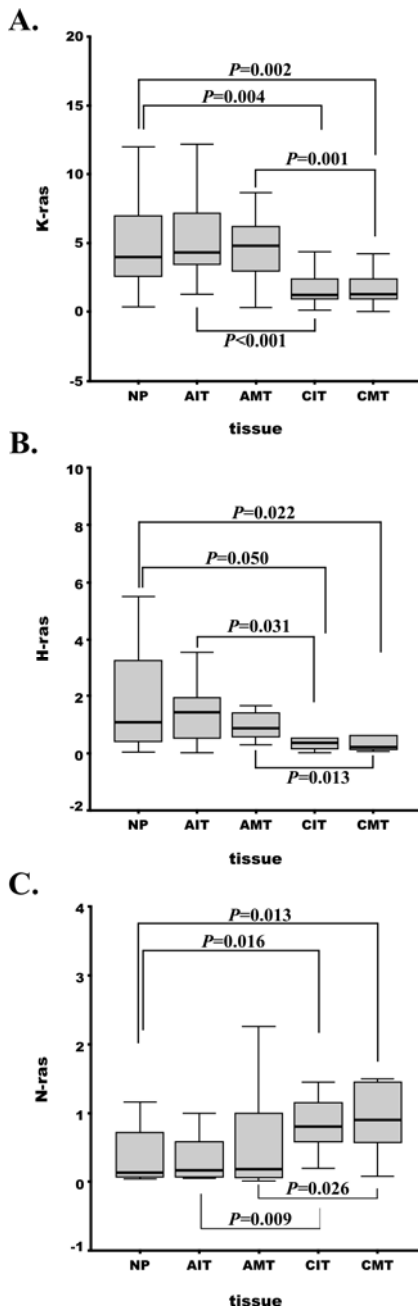
10.1.2. Επίπεδα έκφρασης

Αναφορικά με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ras* στους υπό μελέτη ιστούς, τα *K-* και *H-ras* εκφράζονταν σε όλους τους πολύποδες και τις ρινικές κόγχες, ενώ το *N-ras* εκφραζόταν σε 15/23 (65%) NPs, 20/23 (87%) AITs, 17/18 (94%) AMTs, 11/13 (85%) CITs και 12/13 (92%) CMTs. Όλα τα κανονικοποιημένα επίπεδα mRNA των *ras*

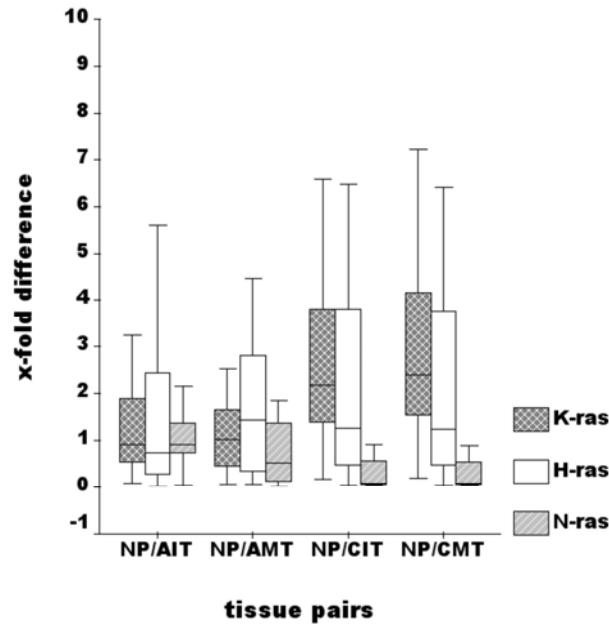
ήταν σημαντικά διαφορετικά ανάμεσα στους υπό μελέτη ιστούς (NPs, AITs, AMTs, CITs, και CMTs) (*K-ras*, $P < 0.001$; *H-ras*, $P = 0.017$; *N-ras*, $P = 0.007$; Kruskal-Wallis test) (**Εικόνα 10.6**).

Συγκεκριμένα, τα μεταγραφικά επίπεδα του *K-ras* ήταν υψηλότερα στους NP σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα των CIT και CMT ($P = 0.004$ και $P = 0.002$, αντίστοιχα). Επίσης, τα επίπεδα έκφρασης του *K-ras* ήταν αυξημένα στις παρακείμενες κόγχες AIT και AMT, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες φυσιολογικές (AIT-CIT, $P < 0.001$ και AMT-CMT, $P = 0.001$). Παρόμοια, τα επίπεδα mRNA του *H-ras* ήταν αυξημένα στους πολύποδες εν συγκρίσει με τις φυσιολογικές κόγχες (NP-CIT, $P = 0.05$ και NP-CMT, $P = 0.022$). Παρόμοια, το γονίδιο *H-ras* εκφραζόταν σε υψηλότερα επίπεδα στις παρακείμενες ρινικές κόγχες, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες φυσιολογικές (AIT-CIT, $P = 0.031$ και AMT-CMT, $P = 0.013$). Σε αντίθεση με τα *K-* και *H-ras*, τα επίπεδα έκφρασης του *N-ras* ήταν χαμηλότερα στους NP και τις παρακείμενες ρινικές κόγχες, σε σύγκριση με τις φυσιολογικές κόγχες (NP-CIT, $P = 0.016$; NP-CMT, $P = 0.013$; AIT-CIT, $P = 0.009$; AMT-CMT, $P = 0.026$).

Η πολλαπλάσια διαφορά (x -fold difference) των επιπέδων έκφρασης ανάμεσα στους ρινικούς πολύποδες και τα δύο είδη των calibrators που χρησιμοποιήσαμε [παρακείμενες και φυσιολογικές (κάτω και μέσες) ρινικές κόγχες], φαίνεται στην **εικόνα 10.7**. Το *K-ras* εμφάνισε σταθερά επίπεδα έκφρασης ανάμεσα στους NP και τις παρακείμενες σε αυτούς ρινικές κόγχες (η μέση πολλαπλάσια αλλαγή ανάμεσα στα ζεύγη NP-AIT και NP-AMT ήταν 1.34 και 1.76, αντίστοιχα). Ενδιαφέρον ήταν το γεγονός, ότι η πολλαπλάσια αλλαγή στην έκφραση του *K-ras* ανάμεσα στους NP και τις φυσιολογικές ρινικές κόγχες (κάτω και μέσες) ήταν > 2 (2.89 και 3.17, αντίστοιχα). Το *H-ras* υπερ-εκφραζόταν σταθερά (μέση τιμή 2.29-fold \pm 0.12) στους NP σε σύγκριση με όλες τις ρινικές κόγχες (παρακείμενες και φυσιολογικές), ενώ το *N-ras* υπο-εκφραζόταν στους NP σε σύγκριση με τις φυσιολογικές ρινικές κόγχες (< 0.5 fold) και εκφραζόταν σταθερά ανάμεσα στους NP και τις παρακείμενες ρινικές κόγχες (μέση πολλαπλάσια διαφορά, 1.42 και 1.45, αντίστοιχα).



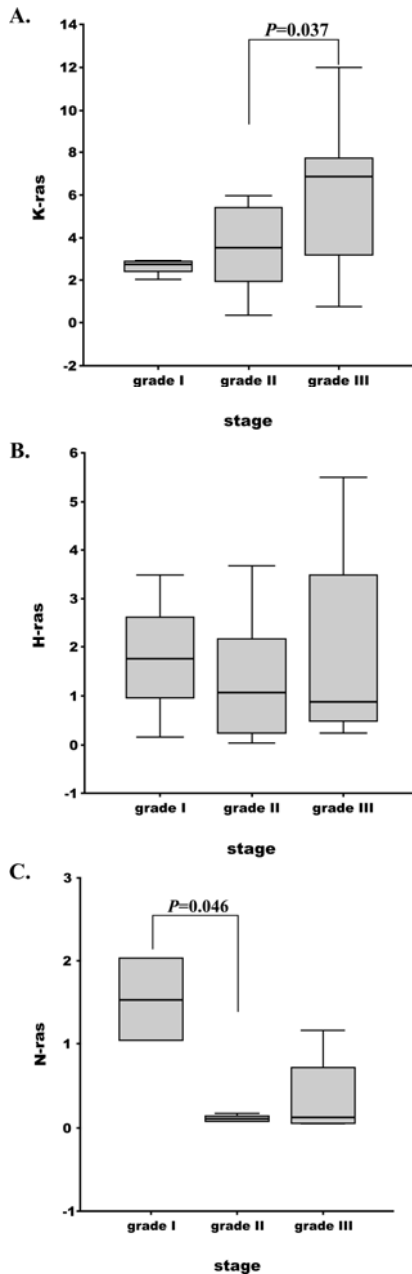
Εικόνα 10.6. Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *K-ras* (**A**), *H-ras* (**B**) και *N-ras* (**C**) σε NP, AIT, AMT, CIT και CMT. Όλα τα κανονικοποιημένα επίπεδα mRNA των γονιδίων *ras* ήταν σημαντικά διαφορετικά ανάμεσα στους ιστούς που μελετήθηκαν (*K-ras*, $P < 0.001$; *H-ras*, $P = 0.017$; *N-ras*, $P = 0.007$; Kruskal-Wallis test). Τα μεταγραφικά επίπεδα *K-ras* και *H-ras* ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ιστούς NP, AIT και AMT σε σύγκριση με τις CIT και CMT, ενώ το *N-ras* παρουσίασε ακριβώς την αντίθετη εικόνα. Στην εικόνα φαίνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ras* ανά ζεύγη ιστών (Mann-Whitney U test). Τα boxplots δείχνουν τις τιμές στο 25^ο, 50^ο (διάμεσος), και 75^ο εκατοστημόριο. Τα whiskers δείχνουν τις ελάχιστες και μέγιστες τιμές. NP, ρινικοί πολύποδες (nasal polyps); AIT, παρακείμενη κάτω ρινική κόγχη (adjacent inferior turbinate); AMT, παρακείμενη μέση ρινική κόγχη (adjacent middle turbinate); CIT, φυσιολογική κάτω ρινική κόγχη (control inferior turbinate); CMT, φυσιολογική μέση ρινική κόγχη (control middle turbinate).



Εικόνα 10.7. Πολλαπλάσια (x-fold) διαφορά στα επίπεδα έκφρασης ανάμεσα σε NP και τα δύο είδη των calibrators που χρησιμοποιήθηκαν (παρακείμενες και φυσιολογικές ρινικές κόγχες). Το *K-ras* υπερ-εκφραζόταν στους NP σε σύγκριση με τις CIT και CMT, ενώ εκφραζόταν το ίδιο ανάμεσα σε NP και AIT-AMT. Το *H-ras* υπερ-εκφράζεται με παρόμοιο τρόπο (μέσος όρος $2.29\text{-fold} \pm 0.12$) στους NP σε σύγκριση με όλες τις ρινικές κόγχες (παρακείμενες και φυσιολογικές), ενώ το *N-ras* παρουσιάζει υπο-έκφραση στους NP σε σύγκριση με τις φυσιολογικές κόγχες (<0.5 fold) και εκφράζεται σταθερά ανάμεσα σε NP και τις παρακείμενες ρινικές κόγχες. Η διπλάσια αύξηση (τιμή ≥ 2) ή μείωση (τιμή ≤ 0.5) της τιμής, θεωρήθηκε ως υπερ-έκφραση ή υπο-έκφραση του mRNA αντίστοιχα, στον πολύποδα ως προς την αντίστοιχη ρινική κόγχη. Τα boxplots δείχνουν τις τιμές στο 25^ο, 50^ο (διάμεσος), και 75^ο εκατοστημόριο. Τα whiskers δείχνουν τις ελάχιστες και μέγιστες τιμές. NP, ρινικοί πολύποδες (nasal polyps); AIT, παρακείμενη κάτω ρινική κόγχη (adjacent inferior turbinate); AMT, παρακείμενη μέση ρινική κόγχη (adjacent middle turbinate); CIT, φυσιολογική κάτω ρινική κόγχη (control inferior turbinate); CMT, φυσιολογική μέση ρινική κόγχη (control middle turbinate).

10.2. Τα επίπεδα της έκφρασης των γονιδίων *ras* σε σύγκριση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά

Τα επίπεδα mRNA του *K-ras* ήταν διαφορετικά, ανάλογα με το στάδιο του ρινικού πολύποδα (οριακό $P=0.067$, Kruskal-Wallis) (**Εικόνα 10.8**). Τα μεταγραφικά επίπεδα *K-ras* ήταν υψηλότερα στους grade III πολύποδες, σε σύγκριση με τους grade II ($P=0.037$, Mann-Whitney) και τους grade I ρινικούς πολύποδες. Αντιθέτως, τα επίπεδα έκφρασης του *N-ras* ήταν υψηλότερα στους grade I, σε σύγκριση με τους grade II ($P=0.046$, Mann-Whitney) και grade III ρινικούς πολύποδες. Τα μεταγραφικά επίπεδα του *H-ras* δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές αναφορικά με το στάδιο των ρινικών πολυπόδων. Όλα τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ras* ήταν υψηλότερα στους ασθενείς οι οποίοι είχαν δυσανεξία στην ασπιρίνη, σε σχέση με τους ανεκτικούς σε αυτή ($P=0.016$, χ^2). Επιπλέον, τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *ras*, δεν παρουσίασαν στατιστική συσχέτιση με την ύπαρξη σημειακών μεταλλαγών στον συγκεκριμένο ιστό. Τέλος, το ποσοστό εμφάνισης ρινικών πολυπόδων ήταν πιο μεγάλο στους άνδρες από ότι στις γυναίκες ($P=0.003$; χ^2) και οι ασθενείς με ηλικία μεγαλύτερη των 40 ετών, ήταν πιο επιρρεπείς στην εμφάνιση της ασθένειας ($P=0.022$, χ^2). Καμία άλλη στατιστικά σημαντική συσχέτιση δεν εντοπίστηκε ανάμεσα στα mRNA επίπεδα των *ras* και το φύλο, την ηλικία, και τη χρήση καπνού ή αλκοόλ.



Εικόνα 10.8. Τα επίπεδα mRNA του *K-ras* ήταν διαφορετικά ανάλογα με το στάδιο του ρινικού πολύποδα (οριακό $P=0.067$, Kruskal-Wallis).

A. Τα μεταγραφικά επίπεδα του *K-ras* ήταν υψηλότερα στους grade III πολύποδες, σε σύγκριση με τους grade II ($P=0.037$, Mann-Whitney) και grade I ρινικούς πολύποδες.

B. Τα επίπεδα mRNA του *H-ras* ήταν παρόμοια ανάμεσα στους διαφορετικούς βαθμούς των πολυπόδων;

C. Τα επίπεδα της έκφρασης του *N-ras* ήταν υψηλότερα στους grade I πολύποδες, σε σχέση με τους grade II ($P=0.046$, Mann-Whitney) και grade III ρινικούς πολύποδες.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με τη διάμεσο και τα 25^ο-75^ο εκατοστημόρια. Τα whiskers δείχνουν τις ελάχιστες και μέγιστες τιμές.

10.3. Ανάλυση της mRNA έκφρασης των γονιδίων *ras* ανά ζεύγη

Χρησιμοποιήθηκε το Spearman test για τον εντοπισμό πιθανών συσχετίσεων για την εκτίμηση των προτύπων συν-έκφρασης των *ras*, ομάδες των NP, AIT, AMT, CIT και CMT. Σημαντικές αρνητικές συσχετίσεις ανέκυψαν ανάμεσα στα γονίδια *K-ras* και *N-ras* στους πολύποδες και τις AIT ($P=0.009$ και $P=0.003$, αντίστοιχα), ενώ καμία συσχέτιση δεν εμφανίστηκε στις παρακείμενες μέσες και φυσιολογικές ρινικές κόγχες.

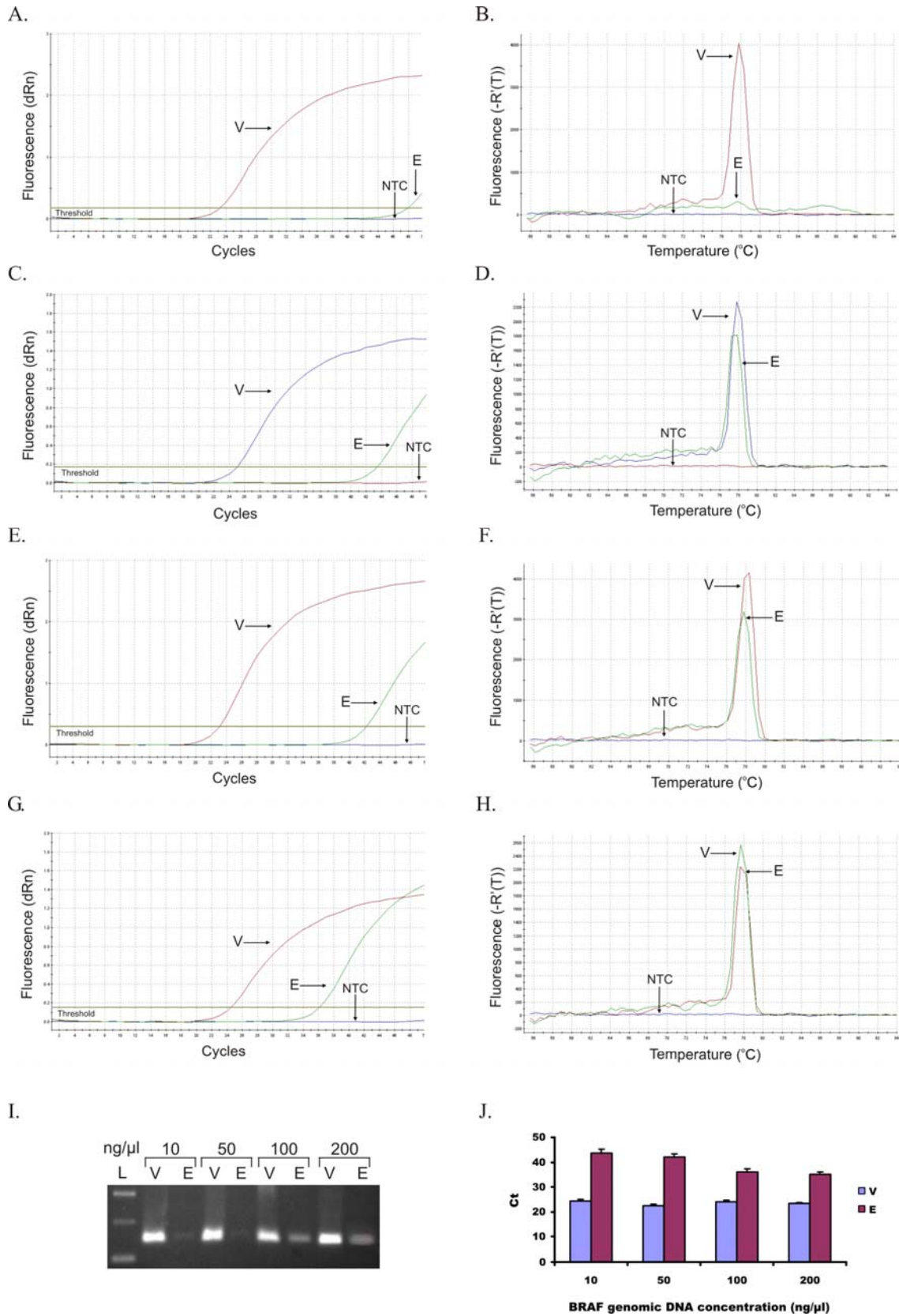
10.4. Μεταλλαγές και επίπεδα έκφρασης του γονιδίου BRAF

Η μελέτη αυτή έγινε με σκοπό να διερευνηθεί η ύπαρξη μεταλλαγών στο γονίδιο BRAF, καθώς επίσης και για να αποκτηθούν τα επίπεδα mRNA για τα γονίδια BRAF και RKIP στους NPs, σε σύγκριση με το βλεννογόνο των παρακείμενων και των φυσιολογικών ρινικών κογχών. Για το πρώτο μέρος της μελέτης, εκτελέστηκε μια ευαίσθητη real-time allele-specific PCR, παράλληλα με την άμεση αλληλούχιση των προϊόντων PCR του γονιδίου BRAF. Όσο αναφορά την ανάλυση της έκφρασης, αρχικά υπολογίσαμε τις κανονικοποιημένες -ως προς το γονίδιο GAPDH- τιμές και των δύο γονιδίων-στόχων, για όλους τους ιστούς (NPs, AITs, AMTs, CITs και CMTs) και συγκρίναμε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ανάμεσα στους ρινικούς πολύποδες και τα δύο είδη των φυσιολογικών ιστών (calibrators): i) τις αντίστοιχες AIT και AMT, και ii) τις CIT και CMT.

10.4.1. Ανάλυση μεταλλαγών στο γονίδιο BRAF

Το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε στο εξόνιο 15. Αυτή η "hot spot" περιοχή επιλέχθηκε επειδή οι είδη αναφερόμενες ενεργοποιούσες μεταλλαγές του γονιδίου BRAF, συμβαίνουν σχεδόν αποκλειστικά σε αυτή τη θέση. Όλες οι περιπτώσεις των ρινικών πολυπόδων, και των βλεννογόνων από τις παρακείμενες και τις φυσιολογικές (κάτω και μέσες) ρινικές κόγχες που μελετήθηκαν, ήταν αρνητικές ως προς την ύπαρξη μεταλλαγών στα εξόνια 14 και 15. Παρόλα αυτά, η άμεση αλληλούχιση του PCR προϊόντος από ένα δείγμα ρινικού πολύποδα (15P) παρουσίασε μια μικρή δεύτερη κορυφή στο νουκλεοτίδιο T1799 (1/23, 4%), ομοιάζουσα με το background της αντίδρασης. Αρκετό ενδιαφέρον είχε το γεγονός ότι η εφαρμογή της real-time allele-specific PCR ανάλυσης για αυτό το δείγμα του ρινικού πολύποδα, παρουσίασε μια καμπύλη για το μείγμα των εκκινητών E (εκτός από την καμπύλη «V»). Για αυτό το δείγμα, θελήσαμε επίσης να καθορίσουμε την ευαισθησία των αντιδράσεων, ετοιμάζοντας διαδοχικές αραιώσεις του DNA, με εύρος συγκέντρωσης από 10 έως 200 ng/μl. Το αποτέλεσμα ήταν να αποκτήσουμε Cts τα οποία ήταν αντιστρόφως ανάλογα με το ποσό του γενωμικού DNA που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, είχε το γεγονός ότι η καμπύλη «E» αποκτήθηκε ακόμα και σε συγκέντρωση DNA της τάξεως των 10 ng/μl, παρέχοντας πίστωση για την ευαισθησία της αντίδρασης (**Εικόνα 10.9**). Επίσης, εντοπίσαμε άλλη μια νουκλεοτιδική αλλαγή (A1801G) στο ίδιο δείγμα ρινικού πολύποδα, η οποία οδηγούσε σε μια K601E

μεταλλαγή. Ωστόσο, όπως και στην περίπτωση της μεταλλαγής V600E, η κορυφή στο ηλεκτροφοροεγράφημα δεν ήταν αρκετά υψηλή όσο και στα υπόλοιπα νουκλεοτίδια, πράγμα που μας προτρέπει να μιλάμε για χαμηλό αριθμό αντιγράφων των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων. Επίσης, παρατηρήσαμε μια σιωπηλή μετάλλαξη στο εξόνιο 11 του γονιδίου BRAF (A1380G, G460G), ενώ οι υπόλοιποι ιστοί ρινικών πολυπόδων και ρινικών βλεννογόνων ήταν αγρίου τύπου για οποιαδήποτε μεταλλαγή στο G-loop (εξόνιο 11) (**Εικόνα 10.10**).

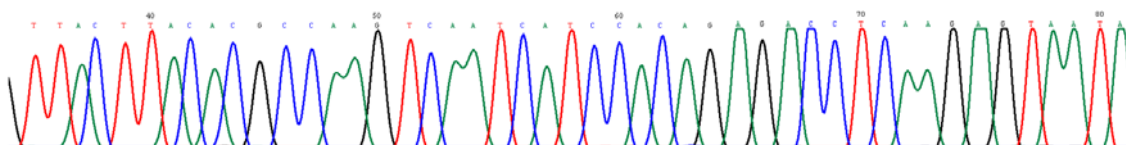


Εικόνα 10.9. Εξειδίκευση (specificity) και ευαισθησία (sensitivity) της real-time μεθόδου εντοπισμού της μεταλλαγής BRAF V600E, στο δείγμα του ρινικού πολύποδα

15P. Γενωμικό DNA (10-200 ng) που απομονώθηκε από ρινικούς πολυπόδες του ανθρώπου ενισχύθηκε όπως αναφέρεται στο κείμενο, με το μείγμα εκκινητών V (εντοπισμός του *wt* BRAF) και το μείγμα εκκινητών E (εντοπισμός της μεταλλαγής V600E). Η μέτρηση του φθορισμού που παρήχθηκε γινόταν στο τέλος του κάθε κύκλου. (A) και (B), καμπύλες ενίσχυσης και αποδιάταξης για ένα δείγμα αρνητικό ως προς τη μεταλλαγή V600E. Διαδοχικές αραιώσεις για το δείγμα 15P [50 ng/μl (C) και (D), 100 ng/μl (E) και (F), 200 ng/μl (G) και (H)] έδωσαν καμπύλες ενίσχυσης και αποδιάταξης με το ζεύγος εκκινητών V. Για κάθε ενίσχυση, καθορίστηκε ως κύκλος-κατώφλι (Ct), ο κύκλος που αντιστοιχούσε σε κανονικοποιημένο φθορισμό τιμής 0.1. Το δείγμα αναλύθηκε σε τριπλέτα. (I) και (J), Τα Cts της αντίδρασης ήταν αντιστρόφως ανάλογα της συγκέντρωσης του DNA που απομονώθηκε, και αυτό αποτυπώθηκε με μπάντες μεγαλύτερης έντασης για τις συγκεντρώσεις DNA 100 ng/μl και 200 ng/μl, σε σύγκριση με αυτές των 10 ng/μl και 50 ng/μl, όπως αποδείχτηκε σε γέλη αγαρόζης 2%. NTC, αρνητικός μάρτυρας (non-template control).

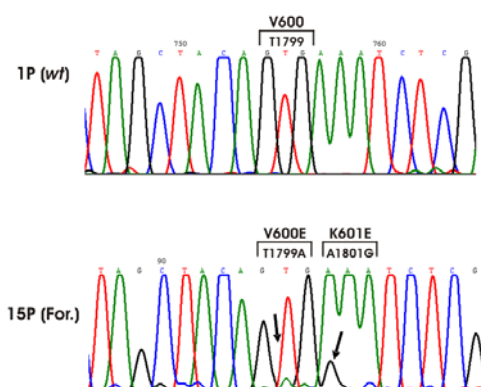
A.

BRAF exon 14
(*wf*)



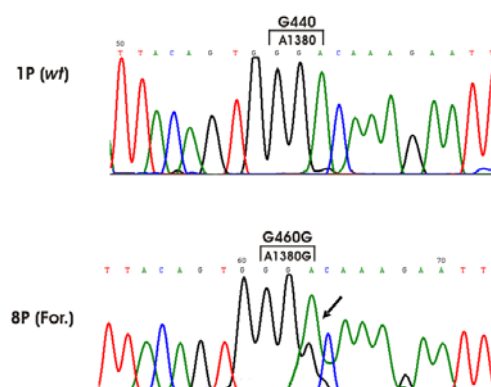
B.

BRAF exon 15



C.

BRAF exon 11



Εικόνα 10.10. A. Η άμεση αλληλούχιση των PCR προϊόντων επιβεβαίωσε την απουσία μεταλλαγών στο εξόνιο 14, στα δείγματα των ρινικών πολυπόδων. **B.** Η άμεση αλληλούχιση για το DNA του δείγματος 15P (κάτω εικόνα) έδειξε δύο μεταλλαγές: μια υποκατάσταση T→A στο νουκλεοτίδιο 1799 (V600E), η οποία επιβεβαιώθηκε και από

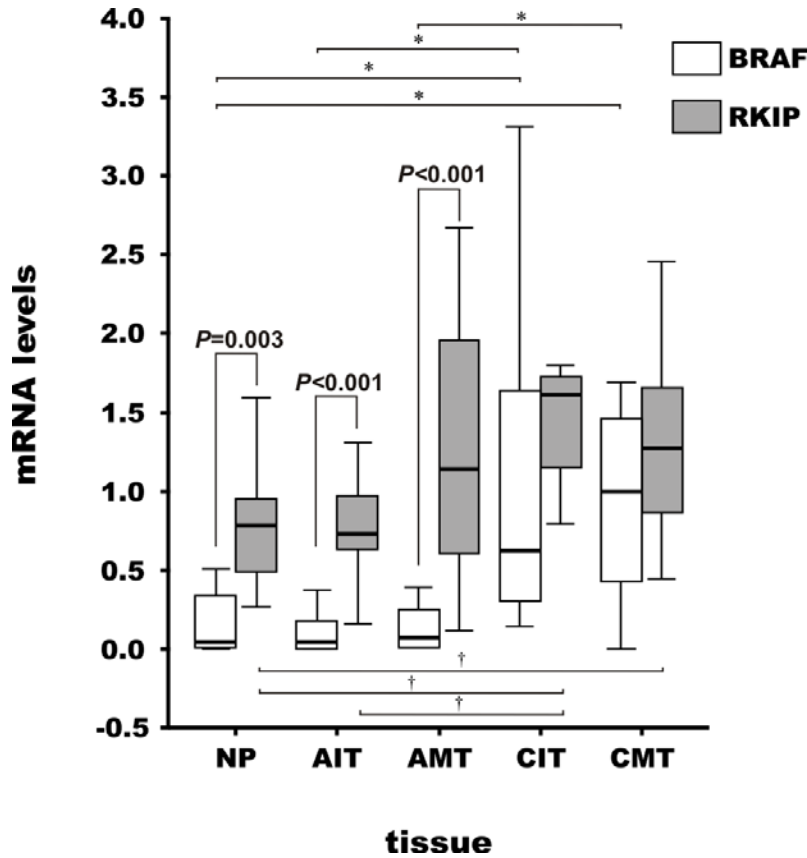
την allele-specific real-time PCR, και μια υποκατάσταση A→G στο νουκλεοτίδιο 1801 (K601E). Η άνω εικόνα δείχνει την *wt* αλληλουχία του BRAF εξονίου 15. **C.** Η άμεση αλληλούχιση για το δείγμα 8P έδωσε μια υποκατάσταση A→G, η οποία ήταν μια σιωπηλή μετάλλαξη στο νουκλεοτίδιο 1380 (G460G). Η άνω εικόνα απεικονίζει την *wt* αλληλουχία του BRAF εξονίου 11.

10.4.2. Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων BRAF και RKIP

Τα mRNA επίπεδα των γονιδίων BRAF και RKIP παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους 4 τύπους ιστών (BRAF, $P < 0.001$; RKIP, $P = 0.004$; Kruskal-Wallis) (**Εικόνα 10.11**). Συγκεκριμένα, οι βλεννογόνοι των φυσιολογικών ρινικών κογχών παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα mRNA, σε σύγκριση τόσο με τους ρινικούς πολύποδες όσο και με το βλεννογόνο των παρακείμενων στους πολύποδες ρινικών κογχών (AIT και AMT), και για τα δύο γονίδια (για το BRAF, NP-CIT, $P = 0.008$; NP-CMT, $P = 0.012$; AIT-CIT, $P < 0.001$; AMT-CMT, $P = 0.001$; και για το RKIP, NP-CIT, $P = 0.001$; NP-CMT, $P = 0.017$; AIT-CIT, $P < 0.001$; Mann-Whitney U test). Επίσης, αναφορικά με τις διαφορές ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων μέσα στους ίδιους ιστούς, στους πολύποδες και το βλεννογόνο των παρακείμενων ρινικών κογχών, το γονίδιο RKIP εξέφρασε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης από το BRAF, και η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική (στους NP, $P = 0.003$; στις AIT και στις AMT, $P < 0.001$). Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων σε συνάρτηση με το στάδιο των ρινικών πολυπόδων, παρατηρήσαμε μια αναλογική αύξηση ανάμεσα στις δύο μεταβλητές, και τόσο για το γονίδιο BRAF όσο και για το RKIP. Παρά ταύτα, ο μικρός αριθμός των grade I πολυπόδων ($n = 3$) δεν μας επέτρεψε να συμπεράνουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα τρία στάδια πολυπόδων, και ίσως να υπονοείται κάποια επίδραση του σταδίου του πολυπόδα στην έκφραση των δύο γονιδίων.

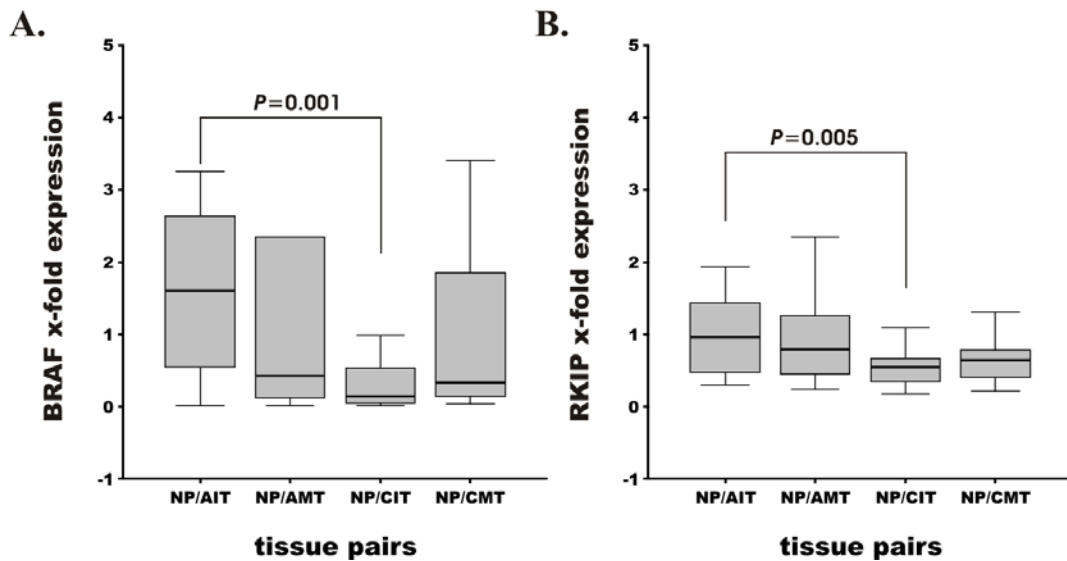
Μετρώντας την πολλαπλάσια διαφορά (*x*-fold difference) ανάμεσα στους 4 διαφορετικούς συνδυασμούς ζευγών των ιστών, παρατηρήσαμε ότι η πολλαπλάσια έκφραση ήταν στατιστικά υψηλότερη ανάμεσα στα ζεύγη NP/AIT (1.80 ± 2.04 , mean \pm SD) και NP/CIT (0.43 ± 0.75 , mean \pm SD) για το γονίδιο BRAF ($P = 0.001$, Mann-Whitney); και ανάμεσα στα ζεύγη NP/AIT (1.14 ± 0.88 , mean \pm SD) και NP/CIT (0.55 ± 0.29 , mean \pm SD) για το RKIP ($P = 0.005$, Mann-Whitney). Τα ζεύγη NP/AMT και NP/CMT, δεν παρουσίασαν καμία στατιστικά σημαντική διαφορά για τα γονίδια BRAF

(1.65 ± 2.72 και 1.49 ± 2.61 , αντίστοιχα), ή RKIP (1.07 ± 0.91 και 0.66 ± 0.35 , αντίστοιχα) (Εικόνα 10.12).



Εικόνα 10.11. Οι βλεννογόνοι των φυσιολογικών ρινικών κογχών παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα mRNA σε σύγκριση με τους ρινικούς πολύποδες (NP) και τις παρακείμενες σε αυτούς ρινικές κόγχες (AIT και AMT), για το κάθε γονίδιο (για το BRAF *, $P < 0.05$ και για το RKIP †, $P < 0.05$; Mann-Whitney U test). Επίσης, όσον αφορά τις διαφορές ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων μέσα στους ίδιους ιστούς, στους πολύποδες και τις παρακείμενες σε αυτούς ρινικές κόγχες, το γονίδιο RKIP παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα mRNA από τα αντίστοιχα επίπεδα του BRAF (στους NP, $P < 0.03$; στις AIT, $P < 0.001$ και στις AMT, $P < 0.001$, αντίστοιχα; Mann-Whitney U test), ενώ οι φυσιολογικές ρινικές κόγχες δεν παρουσίασαν καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα μεταγραφικά επίπεδα των δύο γονιδίων.

Τέλος, χρησιμοποιώντας το τεστ συσχέτισεων του Spearman, εξετάσαμε τον τρόπο της συν-έκφρασης των δύο γονιδίων, ανά ζεύγη στους ρινικούς πολύποδες, τις παρακείμενες και τις φυσιολογικές ρινικές κόγχες. Με αυτό τον τρόπο εξετάσαμε εάν τα δύο γονίδια υπερ-εκφράζονται ή υπο-εκφράζονται ταυτόχρονα (θετική συσχέτιση), ή εάν το ένα γονίδιο παρουσιάζει μειωμένη έκφραση όταν το άλλο υπερ-εκφράζεται (αρνητική συσχέτιση). Στους NP, τις AIT και τις CMT, τα γονίδια BRAF και RKIP συν-εκφράζονται θετικά ($P=0.012$, $P=0.017$ και $P=0.019$, αντίστοιχα).

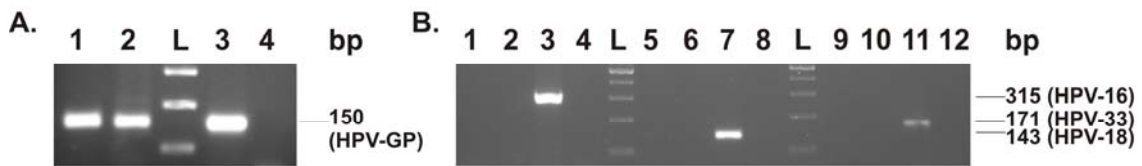


Εικόνα 10.12. Πολλαπλάσια έκφραση (x-fold expression) ανάμεσα στους τέσσερις διαφορετικούς συνδυασμούς ζευγών των ιστών (NP/AIT, NP/AMT, NP/CIT και NP/CMT). Η πολλαπλάσια έκφραση ήταν στατιστικά υψηλότερη ανάμεσα στα ζεύγη NP/AIT και NP/CIT για τα γονίδια BRAF και RKIP ($P=0.001$ και $P=0.005$, αντίστοιχα; Mann-Whitney U Test).

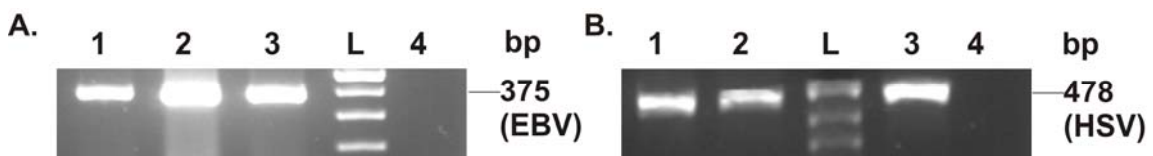
10.5. Ανίχνευση των ιών HPV, EBV και HSV σε ρινικούς πολύποδες

Αναφορικά με τη μελέτη της ύπαρξης ιών, αρχικά ενισχύθηκε το γονίδιο της β2-μικροσφαιρίνης σε όλα τα δείγματα των ρινικών πολυπόδων και των παρακείμενων αλλά και φυσιολογικών βλεννογόνων, επιβεβαιώνοντας έτσι την παρουσία DNA ικανού να ενισχυθεί, στα εκχυλίσματα των ιστών. Εντοπίσαμε τρία δείγματα ρινικών πολυπόδων (3/23, 13%), και ένα δείγμα για κάθε παρακείμενη ρινική κόγχη [AIT, 1/23

(4%); AMT, 1/12 (4%)], θετικά για τον ιό HPV. Κατά την τυποποίηση τα δείγματα αυτά δεν βρέθηκαν να είναι θετικά για τα ογκογόνα στελέχη του ιού, HPV-11, -16, -18 ή -33 (**Εικόνα 10.13**). Οκτώ δείγματα ρινικών πολυπόδων (8/23, 35%) ήταν θετικά για τον ιό EBV, και δύο δείγματα (2/23, 8%) ήταν θετικά για τον ιό HSV, αντίστοιχα, ενώ καμία παρακείμενη ρινική κόγχη δεν ήταν θετική για την ύπαρξη κανενός από τους δύο τύπους ιών (**Εικόνα 10.14**). Όλες οι φυσιολογικές ρινικές κόγχες ήταν επίσης αρνητικές για την ύπαρξη των ιών HPV, EBV και HSV.



Εικόνα 10.13. A. Η ενίσχυση με τους γενικούς εκκινητές HPV-GP5⁺/6⁺, έδωσε τρία δείγματα θετικά για τον ιό. Πηγαδάκια 1 και 2, δείγματα θετικά για τον ιό HPV; πηγαδάκι 3, θετικός μάρτυρας HPV; πηγαδάκι 4, αρνητικός μάρτυρας; L, 100bp DNA ladder. **B.** Η τυποποίηση των HPV-θετικών δειγμάτων, με εκκινητές ειδικούς για τους υπότυπους HPV-11, -16,-18 και -33, δεν έδωσε κανένα θετικό αποτέλεσμα. Πηγαδάκια 1, 2, 5, 6, 9 και 10, δείγματα αρνητικά για τους ογκογόνους υπότυπους; πηγαδάκια 3, 7 και 11, θετικοί μάρτυρες για τους ογκογόνους υπότυπους HPV-16, -18 και -33, αντίστοιχα; πηγαδάκια 4, 8 και 12, αρνητικοί μάρτυρες για τους ογκογόνους υπότυπους HPV-16, -18 και -33; L, 100bp DNA ladder.



Εικόνα 10.14. A. Πηγαδάκια 1 και 2, δείγματα θετικά για τον ιό EBV; πηγαδάκι 3, θετικός μάρτυρας EBV; πηγαδάκι 4, αρνητικός μάρτυρας; L, 100bp DNA ladder. **B.** Πηγαδάκια 1, και 2, δείγματα θετικά για τον ιό HSV; πηγαδάκι 3, θετικός μάρτυρας HSV; πηγαδάκι 4, αρνητικός μάρτυρας; L, Puc/*Msp* I DNA ladder.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

Συζήτηση-Συμπεράσματα

11.1. Εισαγωγή

Το γονίδιο *K-ras* συχνά ανευρίσκεται μεταλλαγμένο στο κωδικόνιο 12, αλλάζοντας την ικανότητα πρόσδεσης GTP της πρωτεΐνης, και καθιστώντας το ένα ογκογονίδιο με ισχυρή ικανότητα μετασχηματισμού³⁸⁸. Έχουν εντοπιστεί μεταλλαγές στο *K-ras* σε περισσότερους από 80% των όγκων του παγκρέατος στον άνθρωπο³⁸⁹, σε 38% των καρκίνων του παχέως εντέρου³⁹⁰, σε 31% των καρκίνων του λεπτού εντέρου, σε 26% των πρωτογενών ηπατικών κακοήθων όγκων³⁹¹, σε ποσοστό 10-40% των ενδομήτριων καρκινωμάτων^{392, 393} και στο 6.5-12% των όγκων του μαστού⁸⁵. Οι μεταλλαγές στο γονίδιο *K-ras* είναι επίσης συχνές στον καρκίνο του πνεύμονα, όπου 30% των αδenoκαρκινωμάτων⁷⁸ και 21% των ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων³⁹⁴ *K-ras* μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12.

11.2. *Ras* μεταλλαγές στους ρινικούς πολύποδες

Στην παρούσα μελέτη, εκτιμήσαμε για πρώτη φορά την εμφάνιση *K-ras* μεταλλαγών στα κωδικόνια 11 και 12, στους ρινικούς πολύποδες. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι ένα σημαντικό ποσοστό πολυπόδων έφεραν μεταλλαγές στα κωδικόνια 11 και 12 του γονιδίου *K-ras*: 17% και 35%, αντίστοιχα. Το εύρημά μας ότι και οι παρακείμενες ρινικές κόγχες φέρουν επίσης ένα παρόμοιο ποσοστό *K-ras* μεταλλαγών (κωδικόνιο 11: ΑΙΤ, 22%; ΑΜΤ, 16%; κωδικόνιο 12: ΑΙΤ, 22%; ΑΜΤ, 26%), σε αντίθεση με τις φυσιολογικές ρινικές κόγχες όπου οι *K-ras* μεταλλαγές ήταν εντελώς απύσες, προτείνει ότι η ενεργοποίηση μέσω μεταλλαγής του γονιδίου *K-ras* αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό στη διαδικασία της δημιουργίας του ρινικού πολύποδα. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι ρινικοί πολύποδες έχουν προέλευση συνήθως από τον μέσο ρινικό πόρο, υποθέτουμε ότι οι *K-ras* μεταλλαγές ίσως να είναι ένα πρώιμο γεγονός στην διαδικασία των καλοήθων αυτών όγκων. Η εύρεση *K-ras* μεταλλαγών στους ρινικούς πολύποδες, συμφωνεί με την αντίληψη ότι η εξαρτώμενη από το *K-ras* ανάπτυξη ενός όγκου, οδηγεί στον σχηματισμό λιγότερο επιθετικών νεοπλασιών. Ενισχύοντας την αντίληψη αυτή, μεταλλαγές στο *K-ras* έχουν επίσης βρεθεί σε μεγάλη συχνότητα (47%) σε υπερπλαστικούς πολύποδες του παχέως εντέρου^{390, 395}, οι οποίοι

δεν θεωρούνται προ-καρκινωμάτωσης βλάβες. Οι μεταλλαγές στο *H-ras* εντοπίστηκαν μόνο στο 4% των ρινικών πολύποδων (1/23), ενώ δεν εντοπίστηκε καμία *N-ras* μεταλλαγή.

Όσο αναφορά μια άλλη αδενωματώδη ασθένεια, την Οικογενή Αδενωματώδη Πολυποδίαση [Familial Adenomatous Polyposis (FAP)], στην οποία οι ασθενείς τυπικά εμφανίζουν πολλαπλούς (εκατοντάδες έως χιλιάδες) όγκους στο παχύ έντερο (γνωστούς και ως αδενώματα ή αδενωματώδεις πολύποδες), υπεύθυνο για την έναρξη της ασθένειας έχει χαρακτηριστεί ένα μόνο γονίδιο, το *APC*. Θεωρείται πως το *APC* δρα ως «φύλακας» του πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων του παχέως εντέρου, και ότι οι μεταλλαγές αυτού του «φύλακα» προκαλούν την έναρξη της νεοπλασίας, ενώ η πρόοδος του όγκου προκαλείται από μεταλλαγές σε άλλα γονίδια όπως τα *K-ras* και *p53*³⁹⁰. Στην μελέτη αυτή, οι *K-ras* μεταλλαγές στα κωδικόνια 11 και 12 ήταν πιο συχνές στους πολύποδες grade II και grade III, από ότι στους πολύποδες grade I. Η παρατήρηση αυτή, θα μπορούσε να μας οδηγήσει στην υπόθεση ότι οι *ras* μεταλλαγές συμβαίνουν καθώς οι πολύποδες αυξάνονται σε μέγεθος. Ωστόσο, ο μικρός αριθμός των grade I πολύποδων (n=3), δεν υποστηρίζει σθεναρά αυτή την ιδέα. Αντιθέτως, το γεγονός ότι εντοπίσαμε *ras* μεταλλαγές στις παρακείμενες και όχι στις φυσιολογικές ρινικές κόγχες, μας οδηγεί στην πρόταση ότι οι *K-ras* μεταλλαγές αποτελούν ένα μάλλον πρόωρο γεγονός στον σχηματισμό αυτών των καλοήθων όγκων. Συνεπώς, θα μπορούσαμε να προτείνουμε ένα πιθανό μοντέλο, όπου το ίδιο το *K-ras*, προσομοιάζοντας τη λειτουργία του *APC* στην FAP, ή σε συνδιασμό με άλλες γενετικές αλλαγές, (π.χ. απενεργοποίηση των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων *p53* ή *p16*), θα μπορούσε να δρα ως παρόμοιος «φύλακας» οδηγώντας στον σχηματισμό καλοήθων όγκων αδενωματώδους τύπου, όπως είναι οι ρινικοί πολύποδες και οι πολύποδες του παχέως εντέρου. Στην παρούσα μελέτη, η παρατήρηση ότι οι *K-ras* μεταλλαγές εντοπίστηκαν όχι μόνο στους ρινικούς πολύποδες, αλλά και στις παρακείμενες ρινικές κόγχες, η πλειοψηφία των οποίων χαρακτηριζόταν από αυξημένα επίπεδα υπερπλασίας, ενισχύει την προαναφερθείσα πρόταση μας. Αυτά τα υπερπλαστικά κύτταρα που περιέχουν το μεταλλαγμένο γονίδιο *K-ras*, έχουν πιθανώς μικρό ή και καθόλου δυναμικό για να σχηματίσουν κλινικά κακοήθεις όγκους. Αντιθέτως, φαίνεται να έχουν δυναμικό σχηματισμού ρινικών πολύποδων.

11.3. Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ras*

Έντεκα πολύποδες (48%) εμφάνισαν αυξημένη έκφραση σε τουλάχιστον ένα από τα γονίδια της οικογένειας *ras*, σε σύγκριση με τις παρακείμενες κάτω και μέσες ρινικές κόγχες, ενώ 17 (74%) και 20 (87%) ασθενείς παρουσίασαν αυξημένη έκφραση σε τουλάχιστον ένα από τα γονίδια της οικογένειας *ras*, σε σύγκριση με τις φυσιολογικές κάτω και μέσες ρινικές κόγχες, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η υπερ-έκφραση είναι ένας επίσης σημαντικός μηχανισμός της ενεργοποίησης των γονιδίων *ras* στην ρινική πολυποδίαση.

Το *K-ras* παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στους ρινικούς πολύποδες σε σχέση με τις φυσιολογικές κόγχες, το *H-ras* υπερ-εκφραζόταν σταθερά στους ρινικούς πολύποδες σε σχέση με όλες τις παρακείμενες και φυσιολογικές ρινικές κόγχες, ενώ το *N-ras* παρουσίασε χαμηλότερα μεταγραφικά επίπεδα στους ρινικούς πολύποδες σε σχέση με τις φυσιολογικές ρινικές κόγχες.

Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η αυξημένη παραγωγή της πρωτεΐνης p21^{ras} δεν οφείλεται στην ενεργοποίηση ενός μόνο μέλους της οικογένειας *ras*, αλλά και τα δύο γονίδια *K-* και *H-ras* είναι ενεργοποιημένα στην ρινική πολυποδίαση. Επιπροσθέτως, η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι η αυξημένη παραγωγή της πρωτεΐνης p21^{ras} στους ρινικούς πολύποδες, ανεξάρτητα από το ποίο γονίδιο ευθύνεται για την υπερ-έκφραση της, πιθανόν απαιτείται για την ανάπτυξη ενός ογκογόνου δυναμικού στον ρινικό βλεννογόνο. Από την άλλη, αξίζει να τονίσουμε το γεγονός ότι οι παρακείμενες ρινικές κόγχες εμφανίζουν επίσης υψηλότερα επίπεδα mRNA για τα γονίδια *K-ras* και *H-ras* σε σύγκριση με τις φυσιολογικές ρινικές κόγχες. Αυτό υπονοεί ότι η αυξημένη παραγωγή της p21^{ras} θα μπορούσε επίσης να είναι σημαντική για την υπερτροφία που χαρακτηρίζει την πλειοψηφία των παρακείμενων ρινικών κογχών. Το εύρημά μας ότι το *N-ras* παρουσίαζε χαμηλότερα μεταγραφικά επίπεδα στους ρινικούς πολύποδες σε σύγκριση τόσο με τις παρακείμενες, όσο και με τις φυσιολογικές ρινικές κόγχες, μας οδηγεί στην υπόθεση ότι είτε το *N-ras* έχει μικρότερο ογκογονικό δυναμικό σε σχέση με τα *K-ras* και *H-ras*, είτε ότι η μείωση της έκφρασης του *N-ras* αποτελεί ένα εναλλακτικό σημαντικό χαρακτηριστικό του σχηματισμού του ρινικού πολύποδα, το οποίου δρα με έναν, προς το παρόν, άγνωστο τρόπο. Εξάλλου, έχει αποδειχτεί ότι τα γονίδια *ras* κατέχουν διπλό ρόλο, δρώντας τόσο ως ογκογονίδια όσο και ως ογκο-κατασταλτικά γονίδια, ανάλογα με την ασθένεια ³⁹⁶. Βασιζόμενοι στα αποτελέσματά μας, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι το αγρίου τύπου *N-ras* στην πραγματικότητα, θα μπορούσε να δρα ως ογκο-κατασταλτικό γονίδιο, το οποίο ανταγωνίζεται τις

ογκογονικές ιδιότητες των K- και H-*ras* στον σχηματισμό των ρινικών πολυπόδων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, είχε το γεγονός ότι τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου N-*ras* συσχετίζονται αρνητικά με τα αντίστοιχα K-*ras* επίπεδα στους ρινικούς πολύποδες και τις παρακείμενες κάτω ρινικές κόγχες, αλλά όχι και στον βλεννογόνο των φυσιολογικών ρινικών κογχών, σύμφωνα με τα δεδομένα μας. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για να αποκαλυφθεί ο ουσιαστικός ρόλος των γονιδίων *ras* στον σχηματισμό των ρινικών πολυπόδων.

Οι ρινικοί πολύποδες που παρουσίασαν υπερ-έκφραση των K-*ras* και H-*ras* σε σύγκριση με τις φυσιολογικές ρινικές κόγχες (κάτω και/ή μέσες ρινικές κόγχες), ήταν προχωρημένου σταδίου. Αναφορικά με το K-*ras*, 7/15 πολύποδες (46.6%) που παρουσίασαν υπερ-έκφραση σε σύγκριση με τις CIT και/ή CMT, ήταν πολύποδες grade II και 8/15 (53.3%) ήταν πολύποδες grade III. Όσο αναφορά το H-*ras*, 3/10 (30%) ήταν πολύποδες grade II και 5/10 (50%) ήταν πολύποδες grade III, αντίστοιχα. Παρομοίως, στον καρκίνο του πνεύμονα, του στομάχου, του ενδομητρίου και των ωοθηκών, η υπερ-έκφραση των *ras* βρέθηκε ότι παρουσιάζεται σε ένα προχωρημένο στάδιο της ογκογένεσης⁸⁴. Μπορούμε μόνο να υποθέσουμε ότι η ενεργοποίηση των γονιδίων *ras* στην ρινική πολυποδίαση αρχικά βασίζεται σε ενεργοποιούσες μεταλλάξεις, οι οποίες συμβαίνουν μάλλον νωρίς κατά τη διαδικασία, και ότι αυτή η ενεργοποίηση ενισχύεται και επαυξάνεται από την υπερ-έκφραση των *ras*, ως χαρακτηριστικό της προχωρημένης σταδιοποίησης των ρινικών πολυπόδων.

11.4. Συμπεράσματα – Ras

Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που κάνει λόγο για μεταλλάξεις καθώς επίσης και για τα mRNA επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ras*, στους ρινικούς πολύποδες του ανθρώπου. Εν περιλήψει, τα ευρήματά μας δείχνουν την παρουσία K-*ras* και H-*ras* μεταλλαγών στους ρινικούς πολύποδες και τις παρακείμενες σε αυτούς ρινικές κόγχες, σε αντίθεση με τον φυσιολογικό ρινικό βλεννογόνο. Συγκεκριμένα, το μεταλλαγμένο K-*ras* θα μπορούσε να παίξει ένα σημαντικό ρόλο στην έναρξη της ασθένειας, δρώντας ως «γονίδιο φύλακας», με τρόπο παρόμοιο αυτού του APC στην FAP. Επιπλέον, παρέχουμε αποδείξεις ότι τα K-*ras* και H-*ras* είναι μεταγραφικά ενεργοποιημένα στους ρινικούς πολύποδες και τις παρακείμενες ρινικές κόγχες, δείχνοντας ότι η υπερ-παραγωγή της πρωτεΐνης p21^{ras}, πιθανώς χρειάζεται στην πολυσταδιακή διαδικασία της ασθένειας, και δικαιολογώντας την προέλευση των ρινικών πολυπόδων από τη μέση ρινική κόγχη και τον μέσο ρινικό πόρο. Τα επίπεδα

έκφρασης των γονιδίων *ras* δεν παρουσίασαν συσχέτιση με την εμφάνιση σημειακών μεταλλαγών, δείχνοντας ότι αυτές οι δυο διαφορετικές γενετικές τροποποιήσεις, δεν είναι αμοιβαία εξαρτημένες. Πιθανώς, η εμφάνιση ταυτόχρονα της υπερ-έκφρασης των *ras* και των σημειακών μεταλλαγών στα κωδικόνια 11 και/ή 12, να παρέχουν τις απαραίτητες γενετικές μεταβολές για τον σχηματισμό του ρινικού πολύποδα. Επιπλέον, μεταλλαγές στους υποκινητές των γονιδίων *ras*, σε συνδιασμό με την mRNA υπερ-έκφραση, θα μπορούσαν πιθανώς να εξηγήσουν την ενεργοποίηση των γονιδίων *ras*, στην ρινική πολυποδίαση, χωρίς να αποκλείουμε άλλους πιθανούς μηχανισμούς που θα μπορούσαν να δράσουν συνεργικά, όπως είναι η γονιδιακή ανισορροπία (έχοντας ως αποτέλεσμα την γονιδιακή επέκταση)

Περισσότερες εις βάθος μελέτες απαιτούνται, καθώς επίσης και ένας μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων, για να διασαφηνιστεί ο ακριβής ρόλος των μεταλλαγών και των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ras* στην ρινική πολυποδίαση.

11.5. Εισαγωγή - BRAF και RKIP

Τα επίπεδα mRNA και για τα δύο γονίδια (BRAF και RKIP), ήταν υψηλότερα στους πολύποδες grade II και III, παρά στους μικρότερους, αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική, προφανώς λόγω του μικρού αριθμού των grade I πολυπόδων (n=3), είτε επειδή αυτό οφειλόταν μάλλον σε τυχαία μεταβλητότητα και όχι σε κάποια επίδραση του σταδίου του πολύποδα.

Το μονοπάτι των MAP κινασών είναι ένα σημαντικό σηματοδοτικό μονοπάτι-κλειδί στην ρύθμιση των κυτταρικών διαδικασιών. Η απορύθμιση αυτού του μονοπατιού μέσω μεταλλαγών, απαντάται συχνά σε πολλούς καρκίνους³⁹⁷. Σωματικές ενεργοποιούσες μεταλλαγές στην κινάση σερίνης/θρεονίνης BRAF, έχουν αναφερθεί στο παρελθόν στο μελάνωμα (>60%) και άλλους καρκίνους, με δεσπόζουσα μεταλλαγή, την υποκατάσταση V600E (νουκλεοτιδική αλλαγή T1799A) στο εξόνιο 15³⁹⁸. Η μεταλλαγή σε αυτό το σημείο είναι αποτέλεσμα της ένθεσης ενός αρνητικά φορτισμένου αμινοξέως, δίπλα στην ρυθμιστική θέση φωσφορυλίωσης στο T598, το οποίο μπορεί να μιμείται την ρυθμιστική φωσφορυλίωση και να οδηγεί στην ιδιοσουστατική ενεργοποίηση της πρωτεΐνης BRAF, ανεξάρτητα από την Ras.

11.6. BRAF μεταλλάξεις στους ρινικούς πολύποδες

Στη μελέτη αυτή, περιγράφουμε την πρώτη έρευνα αυτής της μεταλλαγής στην ανθρώπινη ρινική πολυποδίαση, καθώς επίσης και στο βλεννογόνο των κάτω και μέσω παρακείμενων στον πολύποδα, ρινικών κογχών. Ένα δείγμα ρινικού πολύποδα φάνηκε να φέρει την μεταλλαγή V600E, και το αποτέλεσμα πιστοποιήθηκε χρησιμοποιώντας real-time allele-specific PCR. Επίσης, το ίδιο δείγμα έφερε άλλη μια παρακείμενη νουκλεοτιδική αλλαγή (A1801G). Η διαφορετική επικράτηση των μεταστροφών BRAF T1799A που παρατηρείται στην βιβλιογραφία, μπορεί να αντανάκλα την ετερογένεια των δειγμάτων που αναλύονται, ή μπορεί να οφείλεται στην εφαρμογή των ποικίλων μεθόδων που διαφέρουν ως προς την ευαισθησία του εντοπισμού της μετάλλαξης.

Ένα επιπλέον φάσμα μεταλλαγών μέσα στα εξόνια 11 και 15, εντοπίστηκε στο κακοήθες μελάνωμα και σε άλλους τύπους καρκίνου, οδηγώντας στη μόνιμη ενεργοποίηση του BRAF^{118, 119, 398-400}. Συνεπώς, αναλύσαμε την κωδική περιοχή των εξονίων 11 και 15, συμπεριλαμβανομένων και των σημείων συνάντησης ιντρονίων/εξονίων, στους ρινικούς πολύποδες του ανθρώπου. Η συχνότητα μεταλλαγών μέσα στο τμήμα ενεργοποίησης (activation segment- exon 15) ήταν πολύ χαμηλή (μόνο δυο παρακείμενες μεταλλαγές, μια V600E και μια K601E, σε ένα δείγμα ρινικού πολύποδα, σε ποσοστό 4% η κάθε μια), καθώς επίσης και στο G-loop (exon 11) όπου παρατηρήθηκε μια σιωπηλή μεταλλαγή (A1380G), επίσης σε ποσοστό 4%, οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι οι πιο συχνές μεταλλαγές του γονιδίου BRAF που έχουν περιγραφεί σε αρκετούς τύπους καρκίνων, δεν φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην παρουσία των ρινικών πολυπόδων. Η μελέτη αυτή εξερεύνησε επίσης ολόκληρο το εξόνιο 14 της περιοχής κινάσης του γονιδίου BRAF, αλλά δεν εντοπίστηκαν μεταλλαγές. Αυτό έρχεται σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα εκτενών αναλύσεων αλληλούχισης ολόκληρης της κωδικής περιοχής του BRAF, που απέτυχαν να εντοπίσουν μεταλλαγές έξω από τα εξόνια 11 και 15^{116, 117, 398}. Δεν πιστεύουμε πως οι μεταλλαγές στο γονίδιο BRAF αποτελούν ένα συχνό γεγονός στην ρινική πολυποδίαση του ανθρώπου. Αντιθέτως, ένα σημαντικό ποσοστό ρινικών πολυπόδων και παρακείμενων σε αυτούς ρινικών κογχών, φέρουν μεταλλαγές στο *K-ras*, ένα πολύ σημαντικό συμπληρωματικό γονίδιο-ενεργοποιητή του μονοπατιού των MAP κινασών, στα κωδικόνια 11 και 12 (17 και 35%, αντίστοιχα)⁴⁰¹. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι η έλλειψη BRAF μεταλλάξεων στους ρινικούς πολύποδες και τις παρακείμενες σε αυτούς ρινικές κόγχες, σε συνδιασμό με την εμφάνιση *K-ras* μεταλλαγών στους ίδιους ιστούς, είναι σύμφωνη με την ιδέα ότι οι BRAF και *K-ras* μεταλλαγές, αποτελούν αμοιβαία

αποκλειόμενα γεγονότα, προτείνοντας μια γραμμική λειτουργική σχέση για αυτά τα δύο μόρια στα πολύπλοκα σηματοδοτικά μονοπάτια ^{398, 401, 402}.

11.7. Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων BRAF και RKIP

Πρόσφατα, η πρωτεΐνη αναστολέας της RAF κινάσης [RAF kinase inhibitor protein (RKIP)], εκτός από την RAF-1, δείχθηκε ότι προσδένεται και εμποδίζει την BRAF, με αποτέλεσμα τον αποκλεισμό της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην RAF και το υπόστρωμά της, την MEK. Συνεπώς, η BRAF αναστέλλεται από το να φωσφορυλιώσει την MEK ⁴⁰³. Εκτός από το μονοπάτι MEK, η RKIP μπλοκάρει την ενεργοποίηση αρκετών σηματοδοτικών μονοπατιών, G-πρωτεϊνών και του NFκappaB ⁴⁰⁴. Βρήκαμε ότι στους ρινικούς πολύποδες και τον βλεννογόνο των παρακείμενων σε αυτούς ρινικών κογχών, το RKIP εμφάνιζε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης από το BRAF, και η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική. Αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται να εκφράζουν συμφωνία, κι επίσης μπορούν να δικαιολογηθούν από τα αποτελέσματα των Park et al., ότι η RKIP προσδένεται και εμποδίζει την BRAF, επίσης. Πρόσφατα καθιερώθηκε ένας σύνδεσμος ανάμεσα στο RKIP και τον καρκίνο, όταν καθορίστηκε ότι μια μεταστατική καρκινική σειρά του προστάτη (C42-B) εξέφραζε χαμηλότερα επίπεδα RKIP, απότι η μη-μεταστατική κυτταρική σειρά από την οποία προερχόταν (LnCaP) ⁴⁰⁵. Χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημεία για να αποκτηθούν τα επίπεδα έκφρασης του RKIP στον προστάτη, ευρέθηκε ότι ο καλοήθης ιστός εξέφραζε τα υψηλότερα επίπεδα του RKIP, ο καρκινικός ιστός εξέφραζε σημαντικά λιγότερα, και ότι η έκφραση του RKIP ήταν χαμηλότερη στον μεταστατικό ιστό ¹⁹⁷. Αυτή η υπο-έκφραση του RKIP στους μεταστατικούς καρκίνους του προστάτη και η απώλεια των επιπέδων έκφρασης του RKIP, προτείνουν μια προαγωγή του μεταστατικού δυναμικού των καρκινικών κυττάρων του προστάτη ¹⁹⁷. Οι ρινικοί πολύποδες είναι καλοήθεις όγκοι που φτάνουν μέχρι τη ρινική κοιλότητα, και δεν συσχετίζονται ούτε με κακοήγη μετασχηματισμό, ούτε με μετάσταση. Παρόλα αυτά, στην παρούσα μελέτη αναφέrouμε χαμηλά mRNA επίπεδα του RKIP στους ρινικούς πολύποδες, καθώς επίσης και στον βλεννογόνο των παρακείμενων ρινικών κογχών (κάτω και μέσων), σε σύγκριση με τον βλεννογόνο από φυσιολογικά άτομα. Τα αποτελέσματά μας, σε συνδυασμό με αυτά των Fu et al ¹⁹⁷, προτείνουν ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου RKIP, φαίνεται να ακολουθούν μια κλιμακωτή σειρά, φθίνοντας από τον φυσιολογικό ιστό, προς τον καλοήγη όγκο, τον καρκίνο και τέλος, τον μεταστατικό καρκίνο.

Ωστόσο πρέπει να ειπωθεί, ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου BRAF ήταν επίσης χαμηλότερα στους ιστούς των ασθενών που έπασχαν από ρινικούς πολύποδες, σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Όμως, όταν συγκρίναμε τα επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων που μελετήσαμε, στον ίδιο ιστό, παρατηρήσαμε ότι το γονίδιο RKIP παρουσίαζε υψηλότερα επίπεδα mRNA από ότι το BRAF στους παθολογικούς ιστούς, δηλ. τους ρινικούς πολύποδες και τον βλεννογόνο των παρακείμενων σε αυτούς ρινικών κογχών. Αυτό δείχνει την ύπαρξη μιας δυνατής συσχέτισης ανάμεσα στα δυο μόρια, και προφανώς την αρνητική επίδραση που έχει το RKIP πάνω στην έκφραση του BRAF στους ρινικούς πολύποδες, καθώς επίσης και στον βλεννογόνο των παρακείμενων στους πολύποδες, ρινικών κογχών, οι οποίοι συνήθως χαρακτηρίζονται από υπερτροφία. Αν και τα αποτελέσματα αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά, η συσχέτιση ανάμεσα στις δυο πρωτεΐνες ακόμα δεν είναι απόλυτα διασαφηνισμένη, και αναμένεται να γίνουν επιπλέον μελέτες με Western blotting που να επιβεβαιώνουν και να ενισχύουν τα αποτελέσματα.

11.8. Συμπεράσματα - BRAF και RKIP

Εν περιλήψει, η παρούσα περιεκτική μελέτη αποδεικνύει ότι οι πιο συχνές μεταλλαγές στο γονίδιο BRAF εντοπίζονται σε ένα ασήμαντο ποσοστό και δεν φαίνεται να παίζουν κάποιο σημαντικό ρόλο στην παρουσία της ρινικής πολυποδίασης του ανθρώπου.

Επίσης, αυτή είναι η πρώτη αναφορά στα χαμηλά mRNA επίπεδα των γονιδίων BRAF και RKIP στους ρινικούς πολύποδες, καθώς επίσης και στον βλεννογόνο των παρακείμενων σε αυτούς (κάτω και μέσων) ρινικών κογχών, σε σύγκριση με τον βλεννογόνο των ρινικών κογχών από φυσιολογικά άτομα. Παρόλα αυτά, το γονίδιο RKIP παρουσίαζε υψηλότερα επίπεδα mRNA από ότι το BRAF στους παθολογικούς ιστούς, υπονοώντας ότι το RKIP θα μπορούσε να παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην μείωση της έκφρασης του αγρίου τύπου BRAF, ενεργώντας έτσι ως ενδογενής αναστολέας του μονοπατιού MAPK στους ρινικούς πολύποδες και τον βλεννογόνο των παρακείμενων σε αυτούς, ρινικών κογχών.

11.9. Ανίχνευση των ιών HPV, EBV και HSV σε ρινικούς πολύποδες

Παρόλο που η ρινική πολυποδίαση έχει ερευνηθεί αρκετά, με ποσοστά εμφάνισης που φτάνουν και το 4.3% σε πληθυσμιακές μελέτες των Η.Π.Α και της

Ευρώπης, η αιτιολογία τους είναι ακόμα άγνωστη. Πολλοί παράγοντες (εξωγενείς και ενδογενείς) έχουν προταθεί ότι προκαλούν την ανάπτυξή τους. Αυτοί περιλαμβάνουν επίσης μόλυνση με βακτήρια ή ιούς. Για τα βακτήρια, οι Stierna et al ⁴⁰⁶ έδειξαν πειραματικά την επαγωγή ρινικών πολυπόδων στους γναθιαίους παραρρίνιους κόλπους σε κουνέλια, με το να τα μολύνουν με διάφορα βακτήρια και να εμποδίζουν τον εξαερισμό των κόλπων. Μόλις προκλήθηκε ο σχηματισμός του πολύποδα, η παρουσία των βακτηρίων δεν ήταν πλέον χρήσιμη για να διατηρηθούν οι βλάβες. Ωστόσο, για τους ιούς δεν μπόρεσε να καθιερωθεί μια παρόμοια συσχέτιση, ούτε και μπόρεσε να αποδειχτεί η παρουσία ιικού DNA στους πολύποδες. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν την απουσία σημαντικής παρουσίας των ιών HPV στους ρινικούς πολύποδες, και επιβεβαιώνουν τα δεδομένα των Hoffmann M et al ⁴⁰⁷, οι οποίοι κάνουν αναφορά για απουσία συσχέτισης ανάμεσα στην HPV μόλυνση και την δημιουργία ρινικών πολυπόδων, χρησιμοποιώντας PCR και επακόλουθη Southern Blot υβριδοποίηση. Επίσης, οι Becker et al ⁴⁰⁸, παρουσίασαν 20 HPV-αρνητικά περιστατικά ρινικών πολυπόδων, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές MY09 και MY11, σε αντίθεση με τους εκκινητές GP5⁺/6⁺ που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Επίσης, αντιφατικά φαίνεται να είναι τα αποτελέσματα των Zhou Y et al ⁴⁰⁹, οι οποίοι κάνουν λόγο για ποσοστό εμφάνισης του HPV DNA με PCR, που αγγίζει το 92.3% (12/13 περιστατικά) στην πρώτη χειρουργική επέμβαση, και το 38.5% (5/13 περιστατικά) στην δεύτερη χειρουργική επέμβαση. Όπως και στην παρούσα μελέτη, οι Zhou Y et al δεν εντόπισαν ογκογόνα στελέχη του HPV, και αναφέρουν ως πιο επικρατή τύπο τον HPV-6, καταλήγοντας ότι ο HPV φαίνεται να παίζει αιτιολογικό ρόλο στην ανάπτυξη των ρινικών πολυπόδων.

Το πολύ χαμηλό ποσοστό εμφάνισης HPV DNA που αναφέρουμε εμείς, σε συνδιασμό και με την αναφορά των Becker et al για παρουσία HPV DNA σε ανάστροφο θήλωμα και ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (SCC) της ρινικής κοιλότητας, με ποσοστά εμφάνισης 50% ^{410, 411} και με την φαινομενική απουσία του στους ρινικούς πολύποδες ^{407, 408}, υποστηρίζουν την υπόθεση ότι διαφορετικά παθολογικά μονοπάτια οδηγούν σε νεοπλαστικές και μη-νεοπλαστικές βλάβες του βλεννογόνου. Οι μη-νεοπλαστικές βλάβες του βλεννογόνου, όπως τα οίδημα που προκαλούνται από φλεγμονή στους ρινικούς πολύποδες, αποτελούνται ιστοπαθολογικά από εκπάχυνση της βασικής μεμβράνης, σχηματισμό ανώμαλων αδένων, υπερπλασία των καλυκοειδών κυττάρων, διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων και υποεπιθηλιακό οίδημα. Ωστόσο, το επιθήλιο του οιδηματώδους βλεννογόνου είναι φυσιολογικό ^{327, 406}. Σε αντίθεση, τα ρινοκολπικά ανάστροφα θηλώματα, ιστολογικά δείχνουν μια υπερπλασία του ιδίου του επιθηλίου,

μερικές φορές ακόμα και με ποικίλο βαθμό δυσπλασίας. Επιπλέον, συγκρίνοντας τους ρινικούς πολύποδες με το ανάστροφο θήλωμα, οι Guichard et al ⁴¹² έδειξαν πως υπάρχει σημαντικά υψηλότερος ρυθμός πολλαπλασιασμού και απόπτωσης στο δεύτερο. Αναφορικά με τα ανάστροφα θηλώματα, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ήταν επίσης σημαντικά υψηλότερος από την απόπτωση, χαρακτηριστικό της νεοπλαστικής δομής τους.

Η κυρίαρχη υπόθεση σχετικά με την ικανότητα του HPV να επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε διάφορες βλάβες του βλεννογόνου, βασίζεται στο γεγονός ότι ο ιός βασίζεται στο σύστημα αντιγραφής του κυττάρου-ξενιστή, εφόσον ο ίδιος ο ιός δεν κωδικοποιεί για τα ένζυμα αντιγραφής. Ωστόσο, το κύτταρο ξενιστή, κυρίως το στρώμα των βασικών κυττάρων του ακανθοκυτταρικού επιθηλίου, παύει την αντιγραφή για να διαφοροποιηθεί διαμέσου του επιθηλίου. Για να αποφύγουν αυτή την παύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διατηρώντας έτσι -ακόμα και επαυξάνοντας- τον ρυθμό του πολλαπλασιασμού του κυττάρου ξενιστή, οι ιικές ογκογόνες πρωτεΐνες E6 και E7, αλληλεπιδρούν με ρυθμιστές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού όπως είναι ο p53 και η pRB, αντίστοιχα ⁴¹³. Αυτή η υπόθεση της ιικής επαγωγής των βλεννογόνων βλαβών, είναι σύμφωνη με την απουσία HPV DNA μόλυνσης στις μη-νεοπλαστικές βλάβες, όπως είναι οι ρινικοί πολύποδες.

Τα δεδομένα αυτής της μελέτης για την ύπαρξη ιών σε ρινικούς πολύποδες, επιβεβαιώνουν την υπόθεση ότι ο ιός HPV συσχετίζεται σε μικρότερο βαθμό με μολυσματικές βλάβες του βλεννογόνου, παρά με πολλαπλασιαστικές βλάβες.

Αναφορικά με τον ιό EBV, οκτώ δείγματα ρινικών πολυπόδων (8/23, 35%) ήταν θετικά. Οι Tao et al ⁴¹⁴, έδειξαν παρουσία EBV μόλυνσης σε ρινικούς πολύποδες ασθενών από το Hong Kong της Κίνας, σε ακόμα μεγαλύτερο ποσοστό, με διάφορες τεχνικές (15% με Southern Blot, 69% με PCR και 85% με ISH). Αντίθετα, οι Kozak et al ³³³, δεν μπόρεσαν να εντοπίσουν τον EBV σε ρινικούς πολύποδες Καναδών ασθενών, χρησιμοποιώντας ISH, για το DNA του EBV.

Τα αποτελέσματά μας, σε συνδιασμό και με αυτά των Tao et al, δείχνουν πως μπορεί να επισυμβαίνει στο ρινικό βλεννογόνο ένα χαμηλό επίπεδο επίμονης λυτικής μόλυνσης από τον EBV. Καθώς και άλλα λεμφοκύτταρα μπορούν να μολυνθούν από ιό απελευθερωμένο από μια λυτική EBV μόλυνση σε αυτό το σημείο, τα EBV⁺ κύτταρα μπορούν να εμμένουν μέσα από αυτό τον μηχανισμό και να συμβάλλουν επιπλέον στην επιμονή του EBV. Ωστόσο, το εάν αυτό συμβάλλει στον σχηματισμό των ρινικών πολυπόδων, είναι αρκετά υποθετικό. Καθώς ο ιός EBV έχει εντοπιστεί στο 88% του φυσιολογικού ρινοφαρυγγικού βλεννογόνου ⁴¹⁴, ενώ οι ρινικοί πολύποδες είναι πολύ πιο

σπάνιοι, οι Tao et al θεώρησαν μάλλον απίθανο ότι ο EBV συμβάλλει στην αιτιολογία των ρινικών πολυπόδων.

Ο ιός EBV έχει βρεθεί σε φυσιολογικό ρινοφαρυγγικό βλεννογόνο και σε τρεις διαφορετικές ρινικές βλάβες: σε ρινικό λέμφωμα, σε ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα (NPC) και σε ρινικούς πολύποδες. Ο αριθμός των κυττάρων που περιέχουν τον EBV στους ρινικούς πολύποδες ή τον φυσιολογικό ρινοφαρυγγικό βλεννογόνο ^{415, 416}, είναι σημαντικά χαμηλότερος από τον αντίστοιχο αριθμό στα ρινικά λεμφώματα ⁴¹⁷ και το NPC ⁴¹⁸, παρά την παραγωγική EBV μόλυνση στους ρινικούς πολύποδες ή τον φυσιολογικό ρινοφαρυγγικό βλεννογόνο. Αυτή η διαφορά στο ιικό φορτίο, μπορεί να οφείλεται στην ανοσολογική εποπτεία του υγιούς ξενιστού στον μη-νεοπλαστικό ρινικό και ρινοφαρυγγικό βλεννογόνο, ο οποίος συνεχώς καταστρέφει τα κύτταρα που φέρουν τον EBV. Ο χαμηλός αριθμός των κυττάρων που φέρουν τον EBV στον μη νεοπλαστικό ρινικό και ρινοφαρυγγικό βλεννογόνο, μπορεί επίσης να αντανακλά αυτή την πίεση της ανοσολογικής εποπτείας του ξενιστού. Παρόλα αυτά, ο συχνός εντοπισμός χαμηλών επιπέδων EBV μόλυνσης στον ρινικό βλεννογόνο, τουλάχιστον στα πλαίσια μιας φλεγμονώδους βλάβης, υποστηρίζει την άποψη ότι η μύτη είναι από τα σημεία επιμονής του ιού EBV, και μπορεί να ευθύνεται για την εμφάνιση όγκων που συσχετίζονται με ιούς, στο σημείο αυτό.

Σχετικά με τον ιό HSV, βρήκαμε δύο θετικά δείγματα (2/23, 8%), χρησιμοποιώντας PCR. Οι Kozak et al ³³³, δεν μπόρεσαν να εντοπίσουν τον HSV σε ρινικούς πολύποδες Καναδών ασθενών, χρησιμοποιώντας ISH. Γενικά, δεν υπάρχουν δημοσιευμένες μελέτες που να κάνουν λόγο για εμπλοκή του ανθρώπινου ερπητοϊού στον σχηματισμό των ρινικών πολυπόδων και το χαμηλό ποσοστό εμφάνισής του στην παρούσα εργασία, θεωρείται μάλλον τυχαίο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bishop JM. Cancer: the rise of the genetic paradigm. *Genes Dev* 1995;9(11):1309-15.
2. Nair S, Babu JS, Dunham RG, Kanda P, Burke RL, Rouse BT. Induction of primary, antiviral cytotoxic, and proliferative responses with antigens administered via dendritic cells. *J Virol* 1993;67(7):4062-9.
3. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 1976;260(5547):170-3.
4. Spector DH, Varmus HE, Bishop JM. Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in DNA of uninfected vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75(9):4102-6.
5. Spandidos DA. Mechanism of carcinogenesis: the role of oncogenes, transcriptional enhancers and growth factors. *Anticancer Res* 1985;5(5):485-98.
6. Hunter T. Braking the cycle. *Cell* 1993;75(5):839-41.
7. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 1990;348(6297):125-32.
8. Bourne HR. Discovery of a new oncogene in pituitary tumours? *Nature* 1987;330(6148):517-8.
9. Ariga H, Imamura Y, Iguchi-Arigo SM. DNA replication origin and transcriptional enhancer in c-myc gene share the c-myc protein binding sequences. *Embo J* 1989;8(13):4273-9.
10. Wasylyk C, Schneikert J, Wasylyk B. Oncogene v-jun modulates DNA replication. *Oncogene* 1990;5(7):1055-8.
11. Murray AW. Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* 1992;359(6396):599-604.
12. Kimchi A, Wang XF, Weinberg RA, Cheifetz S, Massague J. Absence of TGF-beta receptors and growth inhibitory responses in retinoblastoma cells. *Science* 1988;240(4849):196-9.
13. Motokura T, Arnold A. Cyclin D and oncogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3(1):5-10.
14. Zhou RP, Oskarsson M, Paules RS, Schulz N, Cleveland D, Vande Woude GF. Ability of the c-mos product to associate with and phosphorylate tubulin. *Science* 1991;251(4994):671-5.
15. Evans HJ. Molecular genetic aspects of human cancers: the 1993 Frank Rose Lecture. *Br J Cancer* 1993;68(6):1051-60.
16. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358(6381):15-6.
17. Vaux DL, Weissman IL, Kim SK. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 1992;258(5090):1955-7.
18. Henderson S, Huen D, Rowe M, Dawson C, Johnson G, Rickinson A. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(18):8479-83.
19. Ephrussi B, Davidson RL, Weiss MC, Harris H, Klein G. Malignancy of somatic cell hybrids. *Nature* 1969;224(5226):1314-6.
20. Harris H. The analysis of malignancy by cell fusion: the position in 1988. *Cancer Res* 1988;48(12):3302-6.
21. Weissman BE, Saxon PJ, Pasquale SR, Jones GR, Geiser AG, Stanbridge EJ. Introduction of a normal human chromosome 11 into a Wilms' tumor cell line controls its tumorigenic expression. *Science* 1987;236(4798):175-80.
22. Trent JM, Stanbridge EJ, McBride HL, et al. Tumorigenicity in human melanoma cell lines controlled by introduction of human chromosome 6. *Science* 1990;247(4942):568-71.
23. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68(4):820-3.
24. Francke U. Retinoblastoma and chromosome 13. *Cytogenet Cell Genet* 1976;16(1-5):131-4.
25. Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandberg AA. Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet* 1986;25(3):473-6.
26. Sparkes RS, Murphree AL, Lingua RW, et al. Gene for hereditary retinoblastoma assigned to human chromosome 13 by linkage to esterase D. *Science* 1983;219(4587):971-3.
27. Kolodner R. Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev* 1996;10(12):1433-42.
28. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61(5):759-67.
29. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993;9(4):138-41.
30. Shibata D, Schaeffer J, Li ZH, Capella G, Perucho M. Genetic heterogeneity of the c-K-ras locus in colorectal adenomas but not in adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(13):1058-63.
31. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;314(6006):111-4.
32. Phelps WC, Yee CL, Munger K, Howley PM. Functional and sequence similarities between HPV16 E7 and adenovirus E1A. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989;144:153-66.
33. 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;63(6):1129-36.

34. Herman SA, Coffin JM. Efficient packaging of readthrough RNA in ALV: implications for oncogene transduction. *Science* 1987;236(4803):845-8.
35. Hayward WS, Neel BG. Retroviral gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 1981;91:217-76.
36. Essigmann JM, Wood ML. The relationship between the chemical structures and mutagenic specificities of the DNA lesions formed by chemical and physical mutagens. *Toxicol Lett* 1993;67(1-3):29-39.
37. Hall EJ, Hei TK. Oncogenic transformation of cells in culture: pragmatic comparisons of oncogenicity, cellular and molecular mechanisms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986;12(11):1909-21.
38. Hashem N, Bootsma D, Keijzer W, et al. Clinical characteristics, DNA repair, and complementation groups in xeroderma pigmentosum patients from Egypt. *Cancer Res* 1980;40(1):13-8.
39. Barbacid M. ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987;56:779-827.
40. Valencia A, Chardin P, Wittinghofer A, Sander C. The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* 1991;30(19):4637-48.
41. Lowy DR, Willumsen BM. Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 1993;62:851-91.
42. Spandidos DA, Lang JC. In vitro cell transformation by ras oncogenes. *Crit Rev Oncog* 1989;1(2):195-209.
43. McGrath JP, Capon DJ, Smith DH, et al. Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 1983;304(5926):501-6.
44. Shimizu K, Birnbaum D, Ruley MA, et al. Structure of the Ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. *Nature* 1983;304(5926):497-500.
45. Spandidos DA, Riggio M. Promotor and enhancer like activity at the 5'-end of normal and T24 Ha-ras1 genes. *FEBS Lett* 1986;203(2):169-74.
46. Nagase T, Ueno Y, Ishii S. Transcriptional control of the human Harvey ras proto-oncogene: role of multiple elements in the promoter region. *Gene* 1990;94(2):249-53.
47. Spandidos DA, Anderson ML. Oncogenes and onco-suppressor genes: their involvement in cancer. *J Pathol* 1989;157(1):1-10.
48. Honkawa H, Masahashi W, Hashimoto S, Hashimoto-Gotoh T. Identification of the principal promoter sequence of the c-H-ras transforming oncogene: deletion analysis of the 5'-flanking region by focus formation assay. *Mol Cell Biol* 1987;7(8):2933-40.
49. 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;8(5A):851-9.
50. Spandidos DA, Nichols RA, Wilkie NM, Pintzas A. Phorbol ester-responsive H-ras1 gene promoter contains multiple TPA-inducible/AP-1-binding consensus sequence elements. *FEBS Lett* 1988;240(1-2):191-5.
51. Capon DJ, Seeburg PH, McGrath JP, et al. Activation of Ki-ras2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature* 1983;304(5926):507-13.
52. 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;218(1):41-6.
53. 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.
54. Cohen JB, Broz SD, Levinson AD. Expression of the H-ras proto-oncogene is controlled by alternative splicing. *Cell* 1989;58(3):461-72.
55. Doorbar J, Campbell D, Grand RJ, Gallimore PH. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *Embo J* 1986;5(2):355-62.
56. Furth ME, Aldrich TH, Cordon-Cardo C. Expression of ras proto-oncogene proteins in normal human tissues. *Oncogene* 1987;1(1):47-58.
57. Leon J, Guerrero I, Pellicer A. Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol Cell Biol* 1987;7(4):1535-40.
58. Ullsh LS, Shih TY. Metabolic turnover of human c-rasH p21 protein of EJ bladder carcinoma and its normal cellular and viral homologs. *Mol Cell Biol* 1984;4(8):1647-52.
59. Bollag G, McCormick F. Regulators and effectors of ras proteins. *Annu Rev Cell Biol* 1991;7:601-32.
60. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993;366(6456):643-54.
61. 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;2(1):36-44.
62. Wittinghofer A. Signal transduction via Ras. *Biol Chem* 1998;379(8-9):933-7.
63. Seeburg PH, Colby WW, Capon DJ, Goeddel DV, Levinson AD. Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12. *Nature* 1984;312(5989):71-5.
64. Der CJ, Finkel T, Cooper GM. Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61. *Cell* 1986;44(1):167-76.
65. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49(17):4682-9.
66. Spandidos DA, Anderson ML. A role of ras oncogenes in carcinogenesis and differentiation. *Adv Exp Med Biol* 1990;265:127-31.

67. Zachos G, Spandidos DA. Expression of ras proto-oncogenes: regulation and implications in the development of human tumors. *Crit Rev Oncol Hematol* 1997;26(2):65-75.
68. Spandidos DA, Frame M, Wilkie NM. Expression of the normal H-ras1 gene can suppress the transformed and tumorigenic phenotypes induced by mutant ras genes. *Anticancer Res* 1990;10(6):1543-54.
69. Spandidos A, Wilkie NM. The normal human H-ras1 gene can act as an onco-suppressor. *Br J Cancer Suppl* 1988;9:67-71.
70. Zhang Z, Wang Y, Vikis HG, et al. Wildtype Kras2 can inhibit lung carcinogenesis in mice. *Nat Genet* 2001;29(1):25-33.
71. Pfeifer GP. A new verdict for an old convict. *Nat Genet* 2001;29(1):3-4.
72. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997;88(5):593-602.
73. Ferbeyre G, de Stanchina E, Lin AW, et al. Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol* 2002;22(10):3497-508.
74. Zhu YS, Jones SB, Burke RE, Franklin SO, Inturrisi CE. Quantitation of the levels of tyrosine hydroxylase and preproenkephalin mRNAs in nigrostriatal sites after 6-hydroxydopamine lesions. *Life Sci* 1993;52(19):1577-84.
75. Wyllie AH, Rose KA, Morris RG, Steel CM, Foster E, Spandidos DA. Rodent fibroblast tumours expressing human myc and ras genes: growth, metastasis and endogenous oncogene expression. *Br J Cancer* 1987;56(3):251-9.
76. Yanagisawa A, Ohtake K, Ohashi K, et al. Frequent c-Ki-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* 1993;53(5):953-6.
77. Satoh T, Nakafuku M, Kaziro Y. Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. *J Biol Chem* 1992;267(34):24149-52.
78. Rodenhuis S, Slebos RJ. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 1992;52(9 Suppl):2665s-9s.
79. Manne V, Yan N, Carboni JM, et al. Bisubstrate inhibitors of farnesyltransferase: a novel class of specific inhibitors of ras transformed cells. *Oncogene* 1995;10(9):1763-79.
80. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319(9):525-32.
81. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, et al. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992;256(5053):102-5.
82. Kurzrock R, Gallick GE, Gutterman JU. Differential expression of p21ras gene products among histological subtypes of fresh primary human lung tumors. *Cancer Res* 1986;46(3):1530-4.
83. Zachos G, Varras M, Koffa M, Ergazaki M, Spandidos DA. Glucocorticoid and estrogen receptors have elevated activity in human endometrial and ovarian tumors as compared to the adjacent normal tissues and recognize sequence elements of the H-ras proto-oncogene. *Jpn J Cancer Res* 1996;87(9):916-22.
84. 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;16(23):3013-7.
85. Miyakis S, Sourvinos G, Spandidos DA. Differential expression and mutation of the ras family genes in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251(2):609-12.
86. Watson DM, Elton RA, Jack WJ, Dixon JM, Chetty U, Miller WR. The H-ras oncogene product p21 and prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1991;17(3):161-9.
87. Tanaka M, Omura K, Watanabe Y, Oda Y, Nakanishi I. Prognostic factors of colorectal cancer: K-ras mutation, overexpression of the p53 protein, and cell proliferative activity. *J Surg Oncol* 1994;57(1):57-64.
88. Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71(4):1286-90.
89. Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG. What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol* 1995;7(6):835-42.
90. Ewen ME. Relationship between Ras pathways and cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 2000;4:1-17.
91. Marshall CJ. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4(1):82-9.
92. Seo YS, Muller F, Lusky M, et al. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(7):2865-9.
93. Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996;85(1):27-37.
94. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995;83(6):993-1000.
95. Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, et al. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80(14):4218-22.

96. Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Durr P. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol* 1995;69(10):6389-99.
97. Suttrave P, Bonner TI, Rapp UR, Jansen HW, Patschinsky T, Bister K. Nucleotide sequence of avian retroviral oncogene v-mil: homologue of murine retroviral oncogene v-raf. *Nature* 1984;309(5963):85-8.
98. Avruch J, Zhang XF, Kyriakis JM. Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci* 1994;19(7):279-83.
99. Marais R, Marshall CJ. Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv* 1996;27:101-25.
100. Rowe M, Lear AL, Croom-Carter D, Davies AH, Rickinson AB. Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes. *J Virol* 1992;66(1):122-31.
101. Wojnowski L, Stancato LF, Lerner AC, Rapp UR, Zimmer A. Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 2000;91(1-2):97-104.
102. Mikula M, Schreiber M, Husak Z, et al. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *Embo J* 2001;20(8):1952-62.
103. Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *Embo J* 1999;18(8):2137-48.
104. Zhang BH, Guan KL. Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *Embo J* 2000;19(20):5429-39.
105. Balmain A, Pragnell IB. Mouse skin carcinomas induced in vivo by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene. *Nature* 1983;303(5912):72-4.
106. Banks L, Edmonds C, Vousden KH. Ability of the HPV16 E7 protein to bind RB and induce DNA synthesis is not sufficient for efficient transforming activity in NIH3T3 cells. *Oncogene* 1990;5(9):1383-9.
107. Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, et al. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* 2001;410(6832):1111-6.
108. Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 1999;19(4):2435-44.
109. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001;22(2):153-83.
110. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
111. Shimizu NS, Shimizu NG, Takeuchi Y, Hoshino H. Isolation and characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants infectious to brain-derived cells: detection of common point mutations in the V3 region of the env gene of the variants. *J Virol* 1994;68(9):6130-5.
112. Berger DH, Jardines LA, Chang H, Ruggeri B. Activation of Raf-1 in human pancreatic adenocarcinoma. *J Surg Res* 1997;69(1):199-204.
113. Callans LS, Naama H, Khandelwal M, Plotkin R, Jardines L. Raf-1 protein expression in human breast cancer cells. *Ann Surg Oncol* 1995;2(1):38-42.
114. Storm SM, Brennscheidt U, Sithanandam G, Rapp UR. raf oncogenes in carcinogenesis. *Crit Rev Oncog* 1990;2(1):1-8.
115. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003;33(1):19-20.
116. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418(6901):934.
117. Yuen ST, Davies H, Chan TL, et al. Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res* 2002;62(22):6451-5.
118. Brose MS, Volpe P, Feldman M, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002;62(23):6997-7000.
119. Naoki K, Chen TH, Richards WG, Sugarbaker DJ, Meyerson M. Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2002;62(23):7001-3.
120. Lockett JC, Huser MB, Giagtzoglou N, Brown JE, Pritchard CA. Expression of the A-raf proto-oncogene in the normal adult and embryonic mouse. *Cell Growth Differ* 2000;11(3):163-71.
121. Barnier JV, Papin C, Eychene A, Lecoq O, Calothy G. The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. *J Biol Chem* 1995;270(40):23381-9.
122. Huser M, Lockett J, Chiloeches A, et al. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *Embo J* 2001;20(8):1940-51.
123. Busca R, Abbe P, Mantoux F, et al. Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *Embo J* 2000;19(12):2900-10.
124. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004;116(6):855-67.
125. Scheffler JE, Waugh DS, Bekesi E, et al. Characterization of a 78-residue fragment of c-Raf-1 that comprises a minimal binding domain for the interaction with Ras-GTP. *J Biol Chem* 1994;269(35):22340-6.

126. Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 1993;74(1):205-14.
127. Mott HR, Carpenter JW, Zhong S, Ghosh S, Bell RM, Campbell SL. The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel ras and phospholipid binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(16):8312-7.
128. Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, Troppmair J, Rapp UR. The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* 1994;19(11):474-80.
129. Morrison DK, Cutler RE. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9(2):174-9.
130. Johnson LN, Lowe ED, Noble ME, Owen DJ. The Eleventh Datta Lecture. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Lett* 1998;430(1-2):1-11.
131. Papin C, Denouel-Galy A, Laugier D, Calothy G, Eychene A. Modulation of kinase activity and oncogenic properties by alternative splicing reveals a novel regulatory mechanism for B-Raf. *J Biol Chem* 1998;273(38):24939-47.
132. Stephens RM, Sithanandam G, Copeland TD, Kaplan DR, Rapp UR, Morrison DK. 95-kilodalton B-Raf serine/threonine kinase: identification of the protein and its major autophosphorylation site. *Mol Cell Biol* 1992;12(9):3733-42.
133. Hemmer W, McGlone M, Tsigelny I, Taylor SS. Role of the glycine triad in the ATP-binding site of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272(27):16946-54.
134. Erlich KS, Mills J, Chatis P, et al. Acyclovir-resistant herpes simplex virus infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1989;320(5):293-6.
135. Guan KL, Figueroa C, Brtva TR, et al. Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *J Biol Chem* 2000;275(35):27354-9.
136. Kolch W, Heidecker G, Lloyd P, Rapp UR. Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells. *Nature* 1991;349(6308):426-8.
137. Koide H, Satoh T, Nakafuku M, Kaziro Y. GTP-dependent association of Raf-1 with Ha-Ras: identification of Raf as a target downstream of Ras in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(18):8683-6.
138. Van Aelst L, Barr M, Marcus S, Polverino A, Wigler M. Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(13):6213-7.
139. Warne PH, Viciano PR, Downward J. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* 1993;364(6435):352-5.
140. Brtva TR, Drugan JK, Ghosh S, et al. Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras. *J Biol Chem* 1995;270(17):9809-12.
141. Chuang E, Barnard D, Hettich L, Zhang XF, Avruch J, Marshall MS. Critical binding and regulatory interactions between Ras and Raf occur through a small, stable N-terminal domain of Raf and specific Ras effector residues. *Mol Cell Biol* 1994;14(8):5318-25.
142. Voice JK, Klemke RL, Le A, Jackson JH. Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J Biol Chem* 1999;274(24):17164-70.
143. Leever SJ, Paterson HF, Marshall CJ. Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* 1994;369(6479):411-4.
144. Stokoe D, Macdonald SG, Cadwallader K, Symons M, Hancock JF. Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* 1994;264(5164):1463-7.
145. Ghosh S, Bell RM. Identification of discrete segments of human Raf-1 kinase critical for high affinity binding to Ha-Ras. *J Biol Chem* 1994;269(49):30785-8.
146. Shinkai M, Masuda T, Kariya K, et al. Difference in the mechanism of interaction of Raf-1 and B-Raf with H-Ras. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;223(3):729-34.
147. Okada T, Hu CD, Jin TG, Kariya K, Yamawaki-Kataoka Y, Kataoka T. The strength of interaction at the Raf cysteine-rich domain is a critical determinant of response of Raf to Ras family small GTPases. *Mol Cell Biol* 1999;19(9):6057-64.
148. Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1997;272(7):4378-83.
149. Yamamori B, Kuroda S, Shimizu K, Fukui K, Ohtsuka T, Takai Y. Purification of a Ras-dependent mitogen-activated protein kinase kinase kinase from bovine brain cytosol and its identification as a complex of B-Raf and 14-3-3 proteins. *J Biol Chem* 1995;270(20):11723-6.
150. Hamilton M, Wolfman A. Ha-ras and N-ras regulate MAPK activity by distinct mechanisms in vivo. *Oncogene* 1998;16(11):1417-28.
151. Hamilton M, Liao J, Cathcart MK, Wolfman A. Constitutive association of c-N-Ras with c-Raf-1 and protein kinase C epsilon in latent signaling modules. *J Biol Chem* 2001;276(31):29079-90.
152. Weber CK, Slupsky JR, Kalmes HA, Rapp UR. Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf. *Cancer Res* 2001;61(9):3595-8.
153. Mizutani S, Inouye K, Koide H, Kaziro Y. Involvement of B-Raf in Ras-induced Raf-1 activation. *FEBS Lett* 2001;507(3):295-8.
154. Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS, Stork PJ. cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* 1997;89(1):73-82.

155. York RD, Yao H, Dillon T, et al. Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 1998;392(6676):622-6.
156. Bos JL, de Rooij J, Reedquist KA. Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(5):369-77.
157. Rosario M, Paterson HF, Marshall CJ. Activation of the Raf/MAP kinase cascade by the Ras-related protein TC21 is required for the TC21-mediated transformation of NIH 3T3 cells. *Embo J* 1999;18(5):1270-9.
158. Dhillon AS, Meikle S, Yazici Z, Eulitz M, Kolch W. Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *Embo J* 2002;21(1-2):64-71.
159. King AJ, Sun H, Diaz B, et al. The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* 1998;396(6707):180-3.
160. Bagrodia S, Cerione RA. Pak to the future. *Trends Cell Biol* 1999;9(9):350-5.
161. Daniels RH, Bokoch GM. p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling? *Trends Biochem Sci* 1999;24(9):350-5.
162. Sun H, King AJ, Diaz HB, Marshall MS. Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42/Rac and Pak. *Curr Biol* 2000;10(5):281-4.
163. Chioecheas A, Mason CS, Marais R. S338 phosphorylation of Raf-1 is independent of phosphatidylinositol 3-kinase and Pak3. *Mol Cell Biol* 2001;21(7):2423-34.
164. Zhang BH, Tang ED, Zhu T, Greenberg ME, Vojtek AB, Guan KL. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK phosphorylates and negatively regulates B-Raf. *J Biol Chem* 2001;276(34):31620-6.
165. Schaeffer HJ, Catling AD, Eblen ST, Collier LS, Krauss A, Weber MJ. MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* 1998;281(5383):1668-71.
166. Cacace AM, Michaud NR, Therrien M, et al. Identification of constitutive and ras-inducible phosphorylation sites of KSR: implications for 14-3-3 binding, mitogen-activated protein kinase binding, and KSR overexpression. *Mol Cell Biol* 1999;19(1):229-40.
167. Denouel-Galy A, Douville EM, Warne PH, et al. Murine Ksr interacts with MEK and inhibits Ras-induced transformation. *Curr Biol* 1998;8(1):46-55.
168. Yu W, Fantl WJ, Harrowe G, Williams LT. Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. *Curr Biol* 1998;8(1):56-64.
169. Nguyen A, Burack WR, Stock JL, et al. Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo. *Mol Cell Biol* 2002;22(9):3035-45.
170. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000;351 Pt 2:289-305.
171. Catling AD, Reuter CW, Cox ME, Parsons SJ, Weber MJ. Partial purification of a mitogen-activated protein kinase kinase activator from bovine brain. Identification as B-Raf or a B-Raf-associated activity. *J Biol Chem* 1994;269(47):30014-21.
172. Dent P, Haser W, Haystead TA, Vincent LA, Roberts TM, Sturgill TW. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science* 1992;257(5075):1404-7.
173. Howe LR, Leever SJ, Gomez N, Nakielny S, Cohen P, Marshall CJ. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 1992;71(2):335-42.
174. Yan M, Templeton DJ. Identification of 2 serine residues of MEK-1 that are differentially phosphorylated during activation by raf and MEK kinase. *J Biol Chem* 1994;269(29):19067-73.
175. Catling AD, Schaeffer HJ, Reuter CW, Reddy GR, Weber MJ. A proline-rich sequence unique to MEK1 and MEK2 is required for raf binding and regulates MEK function. *Mol Cell Biol* 1995;15(10):5214-25.
176. Papin C, Eychene A, Brunet A, et al. B-Raf protein isoforms interact with and phosphorylate Mek-1 on serine residues 218 and 222. *Oncogene* 1995;10(8):1647-51.
177. Jaiswal RK, Moodie SA, Wolfman A, Landreth GE. The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21ras. *Mol Cell Biol* 1994;14(10):6944-53.
178. Eychene A, Dusanter-Fourt I, Barnier JV, et al. Expression and activation of B-Raf kinase isoforms in human and murine leukemia cell lines. *Oncogene* 1995;10(6):1159-65.
179. Gomez E, Pritchard C, Herbert TP. cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺ influx through L-type voltage-gated calcium channels mediate Raf-independent activation of extracellular regulated kinase in response to glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 2002;277(50):48146-51.
180. Herrera R, Sebolt-Leopold JS. Unraveling the complexities of the Raf/MAP kinase pathway for pharmacological intervention. *Trends Mol Med* 2002;8(4 Suppl):S27-31.
181. Kolch W. Ras/Raf signalling and emerging pharmacotherapeutic targets. *Expert Opin Pharmacother* 2002;3(6):709-18.
182. Lackey K, Cory M, Davis R, et al. The discovery of potent cRaf1 kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2000;10(3):223-6.
183. Rudin CM, Holmlund J, Fleming GF, et al. Phase I Trial of ISIS 5132, an antisense oligonucleotide inhibitor of c-raf-1, administered by 24-hour weekly infusion to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7(5):1214-20.

184. English JM, Cobb MH. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23(1):40-5.
185. Hood JD, Bednarski M, Frausto R, et al. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science* 2002;296(5577):2404-7.
186. Sebolt-Leopold JS. Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway. *Oncogene* 2000;19(56):6594-9.
187. Banfield MJ, Barker JJ, Perry AC, Brady RL. Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction. *Structure* 1998;6(10):1245-54.
188. Yeung K, Seitz T, Li S, et al. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 1999;401(6749):173-7.
189. Simister PC, Banfield MJ, Brady RL. The crystal structure of PEBP-2, a homologue of the PEBP/RKIP family. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2002;58(Pt 6 Pt 2):1077-80.
190. Mitake S, Ojika K, Katada E, Otsuka Y, Matsukawa N, Fujimori O. Accumulation of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP)-related components in Hirano bodies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1995;21(1):35-40.
191. Mitake S, Katada E, Otsuka Y, et al. Possible implication of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP)-related components in Hirano body formation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1996;22(5):440-5.
192. Tsugu Y, Ojika K, Matsukawa N, et al. High levels of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) in the CSF of some patients with Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 1998;5(6):561-9.
193. Katada E, Mitake S, Matsukawa N, et al. Distribution of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP)-like immunoreactivity in organs and tissues of young Wistar rats. *Histochem Cell Biol* 1996;105(1):43-51.
194. Katada E, Ojika K, Mitake S, Ueda R. Neuronal distribution and subcellular localization of HCNP-like immunoreactivity in rat small intestine. *J Neurocytol* 2000;29(3):199-207.
195. Moore C, Perry AC, Love S, Hall L. Sequence analysis and immunolocalisation of phosphatidylethanolamine binding protein (PBP) in human brain tissue. *Brain Res Mol Brain Res* 1996;37(1-2):74-8.
196. Frayne J, McMillen A, Love S, Hall L. Expression of phosphatidylethanolamine-binding protein in the male reproductive tract: immunolocalisation and expression in prepubertal and adult rat testes and epididymides. *Mol Reprod Dev* 1998;49(4):454-60.
197. Fu Z, Smith PC, Zhang L, et al. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(12):878-89.
198. Schoentgen F, Jolles P. From structure to function: possible biological roles of a new widespread protein family binding hydrophobic ligands and displaying a nucleotide binding site. *FEBS Lett* 1995;369(1):22-6.
199. Ojika K, Katada E, Tohdoh N, et al. Demonstration of deacetylated hippocampal cholinergic neurostimulating peptide and its precursor protein in rat tissues. *Brain Res* 1995;701(1-2):19-27.
200. Taiji M, Tohdoh N, Ojika K. Neuronal expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP)-precursor mRNA in rat brain. *J Neurosci Res* 1996;45(3):202-15.
201. Tohdoh N, Tojo S, Kimura M, Ishii T, Ojika K. Mechanism of expression of the rat HCNP precursor protein gene. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;45(1):24-32.
202. Jones R, Hall L. A 23 kDa protein from rat sperm plasma membranes shows sequence similarity and phospholipid binding properties to a bovine brain cytosolic protein. *Biochim Biophys Acta* 1991;1080(1):78-82.
203. Perry AC, Hall L, Bell AE, Jones R. Sequence analysis of a mammalian phospholipid-binding protein from testis and epididymis and its distribution between spermatozoa and extracellular secretions. *Biochem J* 1994;301 (Pt 1):235-42.
204. Saunders PT, McKinnell C, Millar MR, et al. Phosphatidylethanolamine binding protein is an abundant secretory product of haploid testicular germ cells in the rat. *Mol Cell Endocrinol* 1995;107(2):221-30.
205. Yeung K, Janosch P, McFerran B, et al. Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol Cell Biol* 2000;20(9):3079-85.
206. Bucquoy S, Jolles P, Schoentgen F. Relationships between molecular interactions (nucleotides, lipids and proteins) and structural features of the bovine brain 21-kDa protein. *Eur J Biochem* 1994;225(3):1203-10.
207. Grandy DK, Hanneman E, Bunzow J, et al. Purification, cloning, and tissue distribution of a 23-kDa rat protein isolated by morphine affinity chromatography. *Mol Endocrinol* 1990;4(9):1370-6.
208. Krosiak T, Koch T, Kahl E, Holtt V. Human phosphatidylethanolamine-binding protein facilitates heterotrimeric G protein-dependent signaling. *J Biol Chem* 2001;276(43):39772-8.
209. Corbit KC, Trakul N, Eves EM, Diaz B, Marshall M, Rosner MR. Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J Biol Chem* 2003;278(15):13061-8.

210. Bazzi MD, Youakim MA, Nelsestuen GL. Importance of phosphatidylethanolamine for association of protein kinase C and other cytoplasmic proteins with membranes. *Biochemistry* 1992;31(4):1125-34.
211. Lorenz K, Lohse MJ, Quitterer U. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature* 2003;426(6966):574-9.
212. Yoshida BA, Sokoloff MM, Welch DR, Rinker-Schaeffer CW. Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(21):1717-30.
213. Welch DR, Rinker-Schaeffer CW. What defines a useful marker of metastasis in human cancer? *J Natl Cancer Inst* 1999;91(16):1351-3.
214. Dong JT, Suzuki H, Pin SS, et al. Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss. *Cancer Res* 1996;56(19):4387-90.
215. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988;80(3):200-4.
216. Yang X, Welch DR, Phillips KK, Weissman BE, Wei LL. KAI1, a putative marker for metastatic potential in human breast cancer. *Cancer Lett* 1997;119(2):149-55.
217. Fu Z, Dozmorov IM, Keller ET. Osteoblasts produce soluble factors that induce a gene expression pattern in non-metastatic prostate cancer cells, similar to that found in bone metastatic prostate cancer cells. *Prostate* 2002;51(1):10-20.
218. Chatterjee D, Bai Y, Wang Z, et al. RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279(17):17515-23.
219. Strauss MJ, Shaw EW, et al. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med* 1949;72(1):46-50.
220. Crawford LV, Crawford EM. A Comparative Study of Polyoma and Papilloma Viruses. *Virology* 1963;21:258-63.
221. Friedmann JC, Levy JP, Lasneret J, Thomas M, Boiron M, Bernard J. [Induction of Subcutaneous Fibromas in the Golden Hamster by Inoculation of Bovine Papilloma Acellular Extracts.]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1963;257:2328-31.
222. Black PH, Hartley JW, Rowe WP, Huebner RJ. Transformation of Bovine Tissue Culture Cells by Bovine Papilloma Virus. *Nature* 1963;199:1016-8.
223. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol* 1976;20(6):505-9.
224. Orth G, Favre M, Croissant O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol* 1977;24(1):108-20.
225. Orth G, Jablonska S, Jarzabek-Chorzelska M, et al. Characteristics of the lesions and risk of malignant conversion associated with the type of human papillomavirus involved in epidermodysplasia verruciformis. *Cancer Res* 1979;39(3):1074-82.
226. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80(12):3812-5.
227. Favre M, Orth G, Croissant O, Yaniv M. Human papillomavirus DNA: physical mapping of the cleavage sites of *Bacillus amyloliquefaciens* (BamI) and *Haemophilus parainfluenzae* (HpaII) endonucleases and evidence for partial heterogeneity. *J Virol* 1977;21(3):1210-4.
228. Pfister H, zur Hausen H. Characterization of proteins of human papilloma viruses (HPV) and antibody response to HPV 1. *Med Microbiol Immunol* 1978;166(1-4):13-9.
229. Finch JT, Klug A. The structure of viruses of the papilloma-polyoma type 3. Structure of rabbit papilloma virus, with an appendix on the topography of contrast in negative-staining for electron-microscopy. *J Mol Biol* 1965;13(1):1-12.
230. Bonnez W, Da Rin C, Rose RC, Tyring SK, Reichman RC. Evolution of the antibody response to human papillomavirus type 11 (HPV-11) in patients with condyloma acuminatum according to treatment response. *J Med Virol* 1993;39(4):340-4.
231. Chen EY, Howley PM, Levinson AD, Seeburg PH. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* 1982;299(5883):529-34.
232. Danos O, Katinka M, Yaniv M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *Embo J* 1982;1(2):231-6.
233. Munger K, Phelps WC. The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. *Biochim Biophys Acta* 1993;1155(1):111-23.
234. von Knebel Doeberitz M, Rittmuller C, zur Hausen H, Durst M. Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA. *Int J Cancer* 1992;51(5):831-4.
235. Chan WK, Klock G, Bernard HU. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J Virol* 1989;63(8):3261-9.
236. Alvarado CS, Findley HW, Chan WC, et al. Natural killer cells in children with malignant solid tumors. Effect of recombinant interferon-alpha and interleukin-2 on natural killer cell function against tumor cell lines. *Cancer* 1989;63(1):83-9.

237. Gloss B, Yeo-Gloss M, Meisterenst M, Rogge L, Winnacker EL, Bernard HU. Clusters of nuclear factor I binding sites identify enhancers of several papillomaviruses but alone are not sufficient for enhancer function. *Nucleic Acids Res* 1989;17(9):3519-33.
238. Offord EA, Beard P. A member of the activator protein 1 family found in keratinocytes but not in fibroblasts required for transcription from a human papillomavirus type 18 promoter. *J Virol* 1990;64(10):4792-8.
239. Bauknecht T, Angel P, Royer HD, zur Hausen H. Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *Embo J* 1992;11(12):4607-17.
240. Bauknecht T, Jundt F, Herr I, et al. A switch region determines the cell type-specific positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promoter. *J Virol* 1995;69(1):1-12.
241. Tan SH, Leong LE, Walker PA, Bernard HU. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J Virol* 1994;68(10):6411-20.
242. de Villiers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 1989;63(11):4898-903.
243. de Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;186:1-12.
244. Delius H, Hofmann B. Primer-directed sequencing of human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;186:13-31.
245. Bernard HU, Chan SY, Delius H. Evolution of papillomaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;186:33-54.
246. Mansur CP, Androphy EJ. Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1993;1155(3):323-45.
247. Barbosa MS, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol* 1989;63(3):1404-7.
248. Grossman SR, Laimins LA. E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene* 1989;4(9):1089-93.
249. Gubits RM, Burke RE, Casey-McIntosh G, Bandele A, Munell F. Immediate early gene induction after neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 1993;18(3):228-38.
250. Storey A, Banks L. Human papillomavirus type 16 E6 gene cooperates with EJ-ras to immortalize primary mouse cells. *Oncogene* 1993;8(4):919-24.
251. Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, et al. The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol* 1991;65(9):4860-6.
252. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248(4951):76-9.
253. Scheffner M, Munger K, Byrne JC, Howley PM. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(13):5523-7.
254. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(16):7491-5.
255. Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 1992;70(6):923-35.
256. Gu Z, Pim D, Labrecque S, Banks L, Matlashewski G. DNA damage induced p53 mediated transcription is inhibited by human papillomavirus type 18 E6. *Oncogene* 1994;9(2):629-33.
257. Bingham BJ, Drake-Lee A, Chevretton E, White A. Pitfalls in the assessment of dysphagia by fiberoptic oesophagogastrosocopy. *Ann R Coll Surg Engl* 1987;69(1):22-3.
258. Xu C, Meikrantz W, Schlegel R, Sager R. The human papilloma virus 16E6 gene sensitizes human mammary epithelial cells to apoptosis induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(17):7829-33.
259. Keen N, Elston R, Crawford L. Interaction of the E6 protein of human papillomavirus with cellular proteins. *Oncogene* 1994;9(5):1493-9.
260. Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, et al. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988;334(6178):124-9.
261. Heck DV, Yee CL, Howley PM, Munger K. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(10):4442-6.
262. Jewers RJ, Hildebrandt P, Ludlow JW, Kell B, McCance DJ. Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *J Virol* 1992;66(3):1329-35.
263. Bagchi S, Raychaudhuri P, Nevins JR. Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell* 1990;62(4):659-69.

264. Dyson N, Guida P, Munger K, Harlow E. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol* 1992;66(12):6893-902.
265. Wong HK, Ziff EB. The human papillomavirus type 16 E7 protein complements adenovirus type 5 E1A amino-terminus-dependent transactivation of adenovirus type 5 early genes and increases ATF and Oct-1 DNA binding activity. *J Virol* 1996;70(1):332-40.
266. Ustav M, Stenlund A. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *Embo J* 1991;10(2):449-57.
267. Bouvard V, Storey A, Pim D, Banks L. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *Embo J* 1994;13(22):5451-9.
268. Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(13):5799-803.
269. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991;352(6338):824-7.
270. Burkhardt A, Willingham M, Gay C, Jeang KT, Schlegel R. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology* 1989;170(1):334-9.
271. Leptak C, Ramon y Cajal S, Kulke R, et al. Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 genes of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. *J Virol* 1991;65(12):7078-83.
272. Hwang ES, Nottoli T, Dimaio D. The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology* 1995;211(1):227-33.
273. Nahmias AJ, Lee FK, Beckman-Nahmias S. Sero-epidemiological and -sociological patterns of herpes simplex virus infection in the world. *Scand J Infect Dis Suppl* 1990;69:19-36.
274. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet* 2001;357(9267):1513-8.
275. Ward PL, Roizman B. Herpes simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen. *Trends Genet* 1994;10(8):267-74.
276. Spruance SL, Overall JC, Jr., Kern ER, Krueger GG, Pliam V, Miller W. The natural history of recurrent herpes simplex labialis: implications for antiviral therapy. *N Engl J Med* 1977;297(2):69-75.
277. Corey L, Adams HG, Brown ZA, Holmes KK. Genital herpes simplex virus infections: clinical manifestations, course, and complications. *Ann Intern Med* 1983;98(6):958-72.
278. Brown ZA, Benedetti JK, Watts DH, et al. A comparison between detailed and simple histories in the diagnosis of genital herpes complicating pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172(4 Pt 1):1299-303.
279. Balfour HH, Jr. Antiviral drugs. *N Engl J Med* 1999;340(16):1255-68.
280. Saral R, Burns WH, Laskin OL, Santos GW, Lietman PS. Acyclovir prophylaxis of herpes-simplex-virus infections. *N Engl J Med* 1981;305(2):63-7.
281. Whitley RJ, Alford CA, Hirsch MS, et al. Vidarabine versus acyclovir therapy in herpes simplex encephalitis. *N Engl J Med* 1986;314(3):144-9.
282. Markert JM, Gillespie GY, Weichselbaum RR, Roizman B, Whitley RJ. Genetically engineered HSV in the treatment of glioma: a review. *Rev Med Virol* 2000;10(1):17-30.
283. Miyashita T, Kawaguchi H, Asada M, Mizutani S, Ibuka T. Epstein-Barr virus type B in patient with T-cell lymphoma. *Lancet* 1991;337(8748):1045-6.
284. Cohen JI. Epstein-Barr virus and the immune system. Hide and seek. *Jama* 1997;278(6):510-3.
285. Iwatsuki K, Xu Z, Ohtsuka M, Kaneko F. Cutaneous lymphoproliferative disorders associated with Epstein-Barr virus infection: a clinical overview. *J Dermatol Sci* 2000;22(3):181-95.
286. Shimizu N, Tanabe-Tochikura A, Kuroiwa Y, Takada K. Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma (BL) line Akata: malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV. *J Virol* 1994;68(9):6069-73.
287. McMichael A. T cell responses and viral escape. *Cell* 1998;93(5):673-6.
288. Henderson S, Rowe M, Gregory C, et al. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 1991;65(7):1107-15.
289. Liebowitz D. Epstein-Barr virus and a cellular signaling pathway in lymphomas from immunosuppressed patients. *N Engl J Med* 1998;338(20):1413-21.
290. Jones JF, Shurin S, Abramowsky C, et al. T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med* 1988;318(12):733-41.
291. Harabuchi Y, Imai S, Wakashima J, et al. Nasal T-cell lymphoma causally associated with Epstein-Barr virus: clinicopathologic, phenotypic, and genotypic studies. *Cancer* 1996;77(10):2137-49.
292. Khanim F, Yao QY, Niedobitek G, Sihota S, Rickinson AB, Young LS. Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphisms in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic locations. *Blood* 1996;88(9):3491-501.

293. Su IJ, Wang CH, Cheng AL, Chen RL. Hemophagocytic syndrome in Epstein-Barr virus-associated T-lymphoproliferative disorders: disease spectrum, pathogenesis, and management. *Leuk Lymphoma* 1995;19(5-6):401-6.
294. Hosemann W, Gode U, Wagner W. Epidemiology, pathophysiology of nasal polyposis, and spectrum of endonasal sinus surgery. *Am J Otolaryngol* 1994;15(2):85-98.
295. Settipane GA, Chafee FH. Nasal polyps in asthma and rhinitis. A review of 6,037 patients. *J Allergy Clin Immunol* 1977;59(1):17-21.
296. Aitken ML, Fiel SB. Cystic fibrosis. *Dis Mon* 1993;39(1):1-52.
297. Blumstein GI, Tuft L. Allergy treatment in recurrent nasal polyposis: its importance and value. *Am J Med Sci* 1957;234(3):269-80.
298. Larsen K, Tos M. Clinical course of patients with primary nasal polyps. *Acta Otolaryngol* 1994;114(5):556-9.
299. Vancil ME. A historical survey of treatments for nasal polyposis. *Laryngoscope* 1969;79(3):435-45.
300. Drake-Lee AB. Medical treatment of nasal polyps. *Rhinology* 1994;32(1):1-4.
301. Holopainen E, Makinen J, Paavolainen M, Palva T, Salo OP. Nasal polyposis. Relationships to allergy and acetylsalicylic acid intolerance. *Acta Otolaryngol* 1979;87(3-4):330-4.
302. Settipane GA. Epidemiology of nasal polyps. *Allergy Asthma Proc* 1996;17(5):231-6.
303. Drake-Lee AB, Lowe D, Swanston A, Grace A. Clinical profile and recurrence of nasal polyps. *J Laryngol Otol* 1984;98(8):783-93.
304. Schapowal AG, Simon HU, Schmitz-Schumann M. Phenomenology, pathogenesis, diagnosis and treatment of aspirin-sensitive rhinosinusitis. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1995;49(3):235-50.
305. Samter M, Beers RF, Jr. Concerning the nature of intolerance to aspirin. *J Allergy* 1967;40(5):281-93.
306. Hedman J, Kaprio J, Poussa T, Nieminen MM. Prevalence of asthma, aspirin intolerance, nasal polyposis and chronic obstructive pulmonary disease in a population-based study. *Int J Epidemiol* 1999;28(4):717-22.
307. Settipane GA, Pudupakkam RK. Aspirin intolerance. III. Subtypes, familial occurrence, and cross-reactivity with tartrazine. *J Allergy Clin Immunol* 1975;56(3):215-21.
308. Greisner WA, 3rd, Settipane GA. Hereditary factor for nasal polyps. *Allergy Asthma Proc* 1996;17(5):283-6.
309. Larsen PL, Tos M. Origin of nasal polyps. *Laryngoscope* 1991;101(3):305-12.
310. Pawankar R. Nasal polyposis: an update: editorial review. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3(1):1-6.
311. Bachert C, Wagenmann M, Rudack C, et al. The role of cytokines in infectious sinusitis and nasal polyposis. *Allergy* 1998;53(1):2-13.
312. Winestock DP, Bartlett PC, Sondheimer FK. Benign nasal polyps causing bone destruction in the nasal cavity and paranasal sinuses. *Laryngoscope* 1978;88(4):675-9.
313. Rejowski JE, Caldarelli DD, Campanella RS, Penn RD. Nasal polyps causing bone destruction and blindness. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1982;90(4):505-6.
314. Som PM, Lawson W, Lidov MW. Simulated aggressive skull base erosion in response to benign sinonasal disease. *Radiology* 1991;180(3):755-9.
315. Finn DG, Hudson WR, Baylin G. Unilateral polyposis and mucoceles in children. *Laryngoscope* 1981;91(9 Pt 1):1444-9.
316. Schuknecht HF, Lindsay JR. Benign cysts of the paranasal sinuses. *Arch Otolaryngol* 1949;49(6):609-30.
317. Larsen K, Tos M. A long-term follow-up study of nasal polyp patients after simple polypectomies. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1997;254 Suppl 1:S85-8.
318. Ophir D, Gross-Isseroff R, Lancet D, Marshak G. Changes in olfactory acuity induced by total inferior turbinectomy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1986;112(2):195-7.
319. Hornung DE, Leopold DA. Relationship between uninasal anatomy and uninasal olfactory ability. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;125(1):53-8.
320. Fein BT, Kamin PB, Fein NN. The loss of sense of smell in nasal allergy. *Ann Allergy* 1966;24(6):278-83.
321. Doty RL, Shaman P, Applebaum SL, Giberson R, Siksorski L, Rosenberg L. Smell identification ability: changes with age. *Science* 1984;226(4681):1441-3.
322. Simola M, Malmberg H. Sense of smell in allergic and nonallergic rhinitis. *Allergy* 1998;53(2):190-4.
323. Douek E, Bannister LH, Dodson HC. Recent advances in the pathology of olfaction. *Proc R Soc Med* 1975;68(8):467-70.
324. Kern RC. Chronic sinusitis and anosmia: pathologic changes in the olfactory mucosa. *Laryngoscope* 2000;110(7):1071-7.
325. Cauna N, Manzetti GW, Hinderer KH, Swanson EW. Fine structure of nasal polyps. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1972;81(1):41-58.
326. Heck WE, Hallberg OE, Williams HL. Antrochoanal polyp. *AMA Arch Otolaryngol* 1950;52(4):538-48.
327. Hellquist HB. Nasal polyps update. *Histopathology. Allergy Asthma Proc* 1996;17(5):237-42.

328. Davidsson A, Hellquist HB. The so-called 'allergic' nasal polyp. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1993;55(1):30-5.
329. Gungor A, Corey JP. Pediatric sinusitis: a literature review with emphasis on the role of allergy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;116(1):4-15.
330. Caplin I, Haynes JT, Spahn J. Are nasal polyps an allergic phenomenon? *Ann Allergy* 1971;29(12):631-4.
331. Sin A, Terzioglu E, Kokuludag A, et al. Allergy as an etiologic factor in nasal polyposis. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1997;7(4):234-7.
332. Gwaltney JM, Jr., Jones JG, Kennedy DW. Medical management of sinusitis: educational goals and management guidelines. The International Conference on sinus Disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1995;167:22-30.
333. Kozak FK, Mahony JB, Chernesky MA, et al. Nasal polyposis: in search of a viral etiology using DNA hybridization. *J Otolaryngol* 1991;20(6):404-7.
334. Norlander T, Fukami M, Westrin KM, Stierna P, Carlsoo B. Formation of mucosal polyps in the nasal and maxillary sinus cavities by infection. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;109(3 Pt 1):522-9.
335. Min YG, Chung JW, Shin JS, Chi JG. Histologic structure of antrochoanal polyps. *Acta Otolaryngol* 1995;115(4):543-7.
336. Katzenstein AL, Sale SR, Greenberger PA. Allergic Aspergillus sinusitis: a newly recognized form of sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1983;72(1):89-93.
337. Cody DT, 2nd, Neel HB, 3rd, Ferreiro JA, Roberts GD. Allergic fungal sinusitis: the Mayo Clinic experience. *Laryngoscope* 1994;104(9):1074-9.
338. Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, et al. The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clin Proc* 1999;74(9):877-84.
339. Szczeklik A. The cyclooxygenase theory of aspirin-induced asthma. *Eur Respir J* 1990;3(5):588-93.
340. Drake-Lee A. Rhinitis and asthma. *Practitioner* 1987;231(1435):1191-2, 5.
341. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989;245(4922):1073-80.
342. Estivill X, Bancells C, Ramos C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat* 1997;10(2):135-54.
343. Dumur V, Gervais R, Rigot JM, et al. Abnormal distribution of CF delta F508 allele in azoospermic men with congenital aplasia of epididymis and vas deferens. *Lancet* 1990;336(8713):512.
344. Wang F, Zeltwanger S, Yang IC, Nairn AC, Hwang TC. Actions of genistein on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel gating. Evidence for two binding sites with opposite effects. *J Gen Physiol* 1998;111(3):477-90.
345. Sharer N, Schwarz M, Malone G, et al. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998;339(10):645-52.
346. Akai S, Okayama H, Shimura S, Tanno Y, Sasaki H, Takishima T. Delta F508 mutation of cystic fibrosis gene is not found in chronic bronchitis with severe obstruction in Japan. *Am Rev Respir Dis* 1992;146(3):781-3.
347. Irving RM, McMahon R, Clark R, Jones NS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in severe nasal polyposis. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1997;22(6):519-21.
348. Artlich A, Boysen A, Bunge S, Entzian P, Schlaak M, Schwinger E. Common CFTR mutations are not likely to predispose to chronic bronchitis in northern Germany. *Hum Genet* 1995;95(2):226-8.
349. Rott HD. Genetics of Kartagener's syndrome. *Eur J Respir Dis Suppl* 1983;127:1-4.
350. Pedersen M, Mygind N. Rhinitis, sinusitis and otitis media in Kartagener's syndrome (primary ciliary dyskinesia). *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1982;7(6):373-80.
351. Chao J, Turner JA, Sturgess JM. Genetic heterogeneity of dynein-deficiency in cilia from patients with respiratory disease. *Am Rev Respir Dis* 1982;126(2):302-5.
352. Munro NC, Currie DC, Lindsay KS, et al. Fertility in men with primary ciliary dyskinesia presenting with respiratory infection. *Thorax* 1994;49(7):684-7.
353. Churg J, Strauss L. Allergic granulomatosis, allergic angiitis, and periarteritis nodosa. *Am J Pathol* 1951;27(2):277-301.
354. Olsen KD, Neel HB, 3rd, Dereme RA, Weiland LH. Nasal manifestations of allergic granulomatosis and angiitis (Churg-Strauss syndrome). *Otolaryngol Head Neck Surg* 1980;88(1):85-9.
355. Young D. Surgical treatment of male infertility. *J Reprod Fertil* 1970;23(3):541-2.
356. Schanker HM, Rajfer J, Saxon A. Recurrent respiratory disease, azoospermia, and nasal polyposis. A syndrome that mimics cystic fibrosis and immotile cilia syndrome. *Arch Intern Med* 1985;145(12):2201-3.
357. Hendry WF, A'Hern RP, Cole PJ. Was Young's syndrome caused by exposure to mercury in childhood? *Bmj* 1993;307(6919):1579-82.
358. Mullarkey MF, Hill JS, Webb DR. Allergic and nonallergic rhinitis: their characterization with attention to the meaning of nasal eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 1980;65(2):122-6.

359. Jacobs RL, Freedman PM, Boswell RN. Nonallergic rhinitis with eosinophilia (NARES syndrome). Clinical and immunologic presentation. *J Allergy Clin Immunol* 1981;67(4):253-62.
360. Samter M, Beers RF, Jr. Intolerance to aspirin. Clinical studies and consideration of its pathogenesis. *Ann Intern Med* 1968;68(5):975-83.
361. Moneret-Vautrin DA, Hsieh V, Wayoff M, Guyot JL, Mouton C, Maria Y. Nonallergic rhinitis with eosinophilia syndrome a precursor of the triad: nasal polyposis, intrinsic asthma, and intolerance to aspirin. *Ann Allergy* 1990;64(6):513-8.
362. Bernstein JM, Gorfien J, Noble B, Yankaskas JR. Nasal polyposis: immunohistochemistry and bioelectrical findings (a hypothesis for the development of nasal polyps). *J Allergy Clin Immunol* 1997;99(2):165-75.
363. Bernstein JM, Gorfien J, Noble B. Role of allergy in nasal polyposis: a review. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113(6):724-32.
364. Tos M, Mogensen C. Pathogenesis of nasal polyps. *Rhinology* 1977;15(2):87-95.
365. Chandra RK, Abrol BM. Immunopathology of nasal polypi. *J Laryngol Otol* 1974;88(10):1019-24.
366. Rasp G, Klimek L. [Short-term immunotherapy--a survey of current studies]. *Wien Med Wochenschr* 1999;149(14-15):403-9.
367. Watkins DN, Lewis RH, Basclain KA, et al. Expression and localization of the inducible isoform of nitric oxide synthase in nasal polyp epithelium. *Clin Exp Allergy* 1998;28(2):211-9.
368. Bernstein JM. Update on the molecular biology of nasal polyposis. *Otolaryngol Clin North Am* 2005;38(6):1243-55.
369. van Camp C, Clement PA. Results of oral steroid treatment in nasal polyposis. *Rhinology* 1994;32(1):5-9.
370. Benson M. Pathophysiological effects of glucocorticoids on nasal polyps: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5(1):31-5.
371. Bernstein JM, Kansal R. Superantigen hypothesis for the early development of chronic hyperplastic sinusitis with massive nasal polyposis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;13(1):39-44.
372. Reiss TF, Chervinsky P, Dockhorn RJ, Shingo S, Seidenberg B, Edwards TB. Montelukast, a once-daily leukotriene receptor antagonist, in the treatment of chronic asthma: a multicenter, randomized, double-blind trial. Montelukast Clinical Research Study Group. *Arch Intern Med* 1998;158(11):1213-20.
373. Parnes SM, Chuma AV. Acute effects of antileukotrienes on sinonasal polyposis and sinusitis. *Ear Nose Throat J* 2000;79(1):18-20, 4-5.
374. Kutting B, Nieschalk M, Brehler R. A new concept for treatment of sinonasal polyposis. *Allergy* 2000;55(11):1091-2.
375. Jankowski R, Pigret D, Decroocq F, Blum A, Gillet P. Comparison of radical (nasalisation) and functional ethmoidectomy in patients with severe sinonasal polyposis. A retrospective study. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 2006;127(3):131-40.
376. Zheng C, Wang Z, Lacroix JS. Effect of intranasal treatment with capsaicin on the recurrence of polyps after polypectomy and ethmoidectomy. *Acta Otolaryngol* 2000;120(1):62-6.
377. Lee TJ, Huang SF. Endoscopic sinus surgery for antrochoanal polyps in children. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;135(5):688-92.
378. Malm L. Assessment and staging of nasal polyposis. *Acta Otolaryngol* 1997;117(4):465-7.
379. Dykewicz MS, Fineman S, Skoner DP. Joint Task Force summary statements on Diagnosis and Management of Rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;81(5 Pt 2):474-7.
380. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230(4732):1350-4.
381. Kawasaki E, Erlich H. Polymerase chain reaction and analysis of cancer cell markers. *J Natl Cancer Inst* 1990;82(10):806-7.
382. Wright PA, Wynford-Thomas D. The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *J Pathol* 1990;162(2):99-117.
383. Arnheim N, Erlich H. Polymerase chain reaction strategy. *Annu Rev Biochem* 1992;61:131-56.
384. Siebert PD, Larrick JW. Competitive PCR. *Nature* 1992;359(6395):557-8.
385. Kumar R, Angelini S, Czene K, et al. BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2003;9(9):3362-8.
386. Gordon A, Osman I, Gai W, et al. Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. *Cancer Res* 2003;63(14):3955-7.
387. Cohen Y, Goldenberg-Cohen N, Parrella P, et al. Lack of BRAF mutation in primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(7):2876-8.
388. Kiaris H, Spandidos DA, Jones AS, Vaughan ED, Field JK. Mutations, expression and genomic instability of the H-ras proto-oncogene in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 1995;72(1):123-8.
389. Tada M, Omata M, Kawai S, et al. Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1993;53(11):2472-4.

390. Spandidos DA, Glarakis IS, Kotsinas A, Ergazaki M, Kiaris H. Ras oncogene activation in benign and malignant colorectal tumours. *Tumori* 1995;81(3 Suppl):7-11.
391. Tada M, Omata M, Ohto M. Analysis of ras gene mutations in human hepatic malignant tumors by polymerase chain reaction and direct sequencing. *Cancer Res* 1990;50(4):1121-4.
392. Ignar-Trowbridge D, Risinger JI, Dent GA, et al. Mutations of the Ki-ras oncogene in endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167(1):227-32.
393. Enomoto T, Inoue M, Perantoni AO, et al. K-ras activation in premalignant and malignant epithelial lesions of the human uterus. *Cancer Res* 1991;51(19):5308-14.
394. Rosell R, Li S, Skacel Z, et al. Prognostic impact of mutated K-ras gene in surgically resected non-small cell lung cancer patients. *Oncogene* 1993;8(9):2407-12.
395. Glarakis IS, Savva S, Spandidos DA. Activation of the ras genes in malignant and premalignant colorectal tumors. *Oncol Rep* 1998;5(6):1451-4.
396. Spandidos DA, Sourvinos G, Tsatsanis C, Zafiropoulos A. Normal ras genes: their onco-suppressor and pro-apoptotic functions (review). *Int J Oncol* 2002;21(2):237-41.
397. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002;298(5600):1911-2.
398. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949-54.
399. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2003;63(7):1454-7.
400. Nikiforova MN, Ciampi R, Salvatore G, et al. Low prevalence of BRAF mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas. *Cancer Lett* 2004;209(1):1-6.
401. Zaravinos A, Bizakis J, Soufla G, Sourvinos G, Spandidos DA. Mutations and differential expression of the ras family genes in human nasal polyposis. *Int J Oncol* 2007;31(5):1051-9.
402. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 2003;22(29):4578-80.
403. Park S, Yeung ML, Beach S, Shields JM, Yeung KC. RKIP downregulates B-Raf kinase activity in melanoma cancer cells. *Oncogene* 2005;24(21):3535-40.
404. Keller ET, Fu Z, Yeung K, Brennan M. Raf kinase inhibitor protein: a prostate cancer metastasis suppressor gene. *Cancer Lett* 2004;207(2):131-7.
405. Fu Z, Kitagawa Y, Shen R, et al. Metastasis suppressor gene Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a novel prognostic marker in prostate cancer. *Prostate* 2006;66(3):248-56.
406. Stierna P, Carlsoo B. Histopathological observations in chronic maxillary sinusitis. *Acta Otolaryngol* 1990;110(5-6):450-8.
407. Hoffmann M, Kahn T, Goeroegh T, et al. Tracing human papillomavirus DNA in nasal polyps by polymerase chain reaction. *Acta Otolaryngol* 2000;120(7):872-5.
408. Becker M, Forslund O, Hansson BG, Malm L. Search for the human papillomavirus in nasal polyps, using a polymerase chain reaction-method. *J Otolaryngol* 1994;23(5):344-6.
409. Zhou Y, Hu M, Liu C. [Human papillomavirus DNA test in nasal polyposis]. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2001;15(5):212-3.
410. Shen J, Tate JE, Crum CP, Goodman ML. Prevalence of human papillomaviruses (HPV) in benign and malignant tumors of the upper respiratory tract. *Mod Pathol* 1996;9(1):15-20.
411. Kashima HK, Kessis T, Hruban RH, Wu TC, Zinreich SJ, Shah KV. Human papillomavirus in sinonasal papillomas and squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 1992;102(9):973-6.
412. Guichard C, Gilain L, Abd-Al Samad I, et al. Epithelial cell proliferation, apoptosis, and apoptosis inhibition in inverted papillomas. *Laryngoscope* 1998;108(5):716-20.
413. Vousden K. Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *Faseb J* 1993;7(10):872-9.
414. Tao Q, Srivastava G, Dickens P, Ho FC. Detection of Epstein-Barr virus-infected mucosal lymphocytes in nasal polyps. *Am J Pathol* 1996;149(4):1111-8.
415. Tao Q, Srivastava G, Chan AC, Chung LP, Loke SL, Ho FC. Evidence for lytic infection by Epstein-Barr virus in mucosal lymphocytes instead of nasopharyngeal epithelial cells in normal individuals. *J Med Virol* 1995;45(1):71-7.
416. Tao Q, Srivastava G, Chan AC, Ho FC. Epstein-Barr-virus-infected nasopharyngeal intraepithelial lymphocytes. *Lancet* 1995;345(8960):1309-10.
417. Tao Q, Ho FC, Loke SL, Srivastava G. Epstein-Barr virus is localized in the tumour cells of nasal lymphomas of NK, T or B cell type. *Int J Cancer* 1995;60(3):315-20.
418. Wu TC, Mann RB, Epstein JI, et al. Abundant expression of EBER1 small nuclear RNA in nasopharyngeal carcinoma. A morphologically distinctive target for detection of Epstein-Barr virus in formalin-fixed paraffin-embedded carcinoma specimens. *Am J Pathol* 1991;138(6):1461-9.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Ακολουθεί αντίγραφο των δημοσιευμένων εργασιών στα περιοδικά Cancer Letters και International Journal of Oncology. Πρόκειται για διεθνή περιοδικά με σύστημα κριτών (cited journals) και οι εργασίες προέκυψαν από την παρούσα διατριβή.

Mutations and differential expression of the *ras* family genes in human nasal polyposis

APOSTOLOS ZARAVINOS¹, JOHN BIZAKIS², GIANNOULA SOUFLA¹,
GEORGE SOURVINOS¹ and DEMETRIOS A. SPANDIDOS¹

¹Laboratory of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion; ²Department of Otolaryngology, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece

Received August 20, 2007; Accepted September 18, 2007

Abstract. Although it is well established that *ras* genes contribute to tumorigenesis either through the accumulation of mutations or by aberrant expression in a wide range of human cancers, little is known regarding their involvement in human nasal polyps (NPs). In the present study, the occurrence of mutations in codons 11 and 12 of the *ras* family genes was examined by PCR/RFLP and direct sequencing in 23 human NPs and their adjacent turbinates, as well as in turbinates from 13 control subjects. Moreover, the expression pattern of *ras* mRNA levels was assessed in NP specimens and compared to adjacent and control tissues. K-*ras* codon 11 and 12 mutations were detected in 17 and 35% of NPs, respectively, and were found in the adjacent inferior turbinate (AIT) (22 and 16%, respectively) and adjacent middle turbinates (AMT) (16 and 26%, respectively). K- and H-*ras* expression levels were elevated, whereas N-*ras* mRNA levels were lower in NPs and adjacent turbinates as compared to the control tissues. K-*ras* mRNA levels were up-regulated in advanced-stage polyps (P=0.037), while N-*ras* levels were found elevated in small polyps (P=0.046). Statistically significant negative correlations between K- and N-*ras* expression profiles arose in NPs and AITs (P=0.009 and 0.003, respectively). This, to our knowledge, is the first report on *ras* mutations and expression analysis in NPs. Our findings suggest a potential key role for activated members of *ras* family genes in terms of their contribution to the development of NPs as well as to the hypertrophy of adjacent turbinates.

Introduction

Nasal polyps (NPs) are grapelike structures of unknown etiology which arise from the nasal and sinus mucosa. They

have a predilection for the middle turbinate, middle meatus and the ethmoids, while discrete polyps are rarely seen on the inferior turbinate or septum (1). Nasal polyposis occurs as frequently in patients with atopy as in the general population. Polyp tissue is characterised by the presence of chronic inflammation in which eosinophils are the most prevalent infiltrating inflammatory cell type (2). Additional features of NPs include varying degrees of thickening basement membrane and fibrosis in the stroma (3,4), similar to that recently described in asthma (5). The mechanism underlying these structural abnormalities is as yet unknown.

Members of the *ras* family genes (K-*ras*, H-*ras* and N-*ras*) encode for a 21 kDa protein (p21) located on the inner surface of the plasma membrane with a farnesyl molecule attached to its carboxy-terminus. Ras genes are involved in a wide range of human tumours. The most common mechanism for their activation involves point mutations which abolish the GTPase activity of p21 and thus remain constitutively activated (6). Representative tumours which harbour mutant K-*ras* alleles are those of the pancreas, lung and colon. K-*ras* mutations have also been detected in various other tumours including the cervix of the uterus (7), breast (8), kidney (9), stomach (10) and testis (11). Ras mutations are most often localised in codons 12, 13 and 61. Rare variants of point mutations at codons 11, 18 and 59 have been reported in a few human tumours (12-14).

In vitro experiments have shown that, apart from the mutant form, the overproduction of normal Ras protein is sufficient to confer a transforming potential to cultured cells (15). Furthermore, experiments on human tumour specimens have revealed that elevated levels of *ras*-encoded RNA and protein are a frequent feature in a wide range of human cancers (16). In addition, elevated levels of *ras* mRNA have been associated with particular clinicopathological parameters, such as a favourable prognosis in head and neck cancer (17), which suggests a protective role for *ras* gene overexpression in human tumours. Indeed, it has been proposed that *ras* genes play a dual role, acting as both oncogenes and onco-suppressors (18). Interestingly, in several cases overexpression was not accompanied by point mutations suggesting an alternative function of *ras* genes, apart from structural alterations, in carcinogenesis (19).

In the present study, a sensitive PCR-RFLP assay, in combination with direct sequencing of the PCR product, was

Correspondence to: Professor D.A. Spandidos, University of Crete, Laboratory of virology, Medical School, Heraklion 71100, Crete, Greece

E-mail: spandidos@spandidos.gr

Key words: *ras* genes, nasal polyps, mutations, gene expression, real-time RT-PCR

employed. The aim was to detect codon 11 and 12 point mutations in K-, H- and N-*ras* genes, their adjacent inferior turbinates (AITs) and adjacent middle turbinates (AMTs), taken from 23 human NP specimens. Control inferior turbinates (CITs) and control middle turbinates (CMTs) from 13 disease-free subjects were also examined. Moreover, the expression levels of tumour *ras* mRNA were compared to those of the corresponding AITs and AMTs, as well as to the control turbinates, using real-time RT-PCR. We detected K-*ras* codon 11 and 12 mutations in NPs at 17 and 35%, respectively. K-*ras* codon 11 and 12 mutations were also found in AITs (22 and 16%, respectively) and AMTs (16 and 26%, respectively), whereas all control tissues were found to be wild-type for each one of the *ras* genes. K- and H-*ras* expression levels were higher in the NPs and adjacent turbinates than in the control turbinates, while N-*ras* mRNA levels in the NPs and adjacent turbinates were under-expressed regarding the control tissues.

Patients and methods

Subjects. Biopsies of the NPs and mucosa from the AIT and AMT were obtained from a total of 23 patients with CRS/NP (17 men and 6 women; average age, 51; range, 21-73 years). All polyps arose from the middle turbinate, middle meatus or ethmoidal sinuses, and were multiple and bilateral. From patients 1-4, no middle turbinate was obtained. Following histopathological examination of the specimens, the NPs were classified into grades I, II and III according to their size (20) (Table I). All patients suffered from sneezing, rhinorrhea, headaches, nasal obstruction and hyposmia or anosmia, and had undergone a nasal polypectomy at least once in the past. NP patients had not taken any drug (topical or systemic corticosteroids) for at least one month prior to surgery.

Our control group was composed of 13 subjects, with no history of nasal or allergic symptoms of any kind, undergoing nasal corrective surgery for nasal septum deformity. During these operations, a biopsy from the mucosa of the CIT and CMT of each patient was acquired. No patients in the group had been administered corticosteroids for at least one month preceding surgery.

All study groups were submitted to a serum determination of total-IgE, specific-IgE (RAST) and to hypersensitivity skin tests for a number of allergens. Patients with allergies or asthma were excluded from the study. Clinical parameters, such as age, sex, smoking and alcohol habits, were available for all patients and control subjects.

The Ethics Committee of the University of Crete approved the study and all participants (patients and control subjects) were aware of the scope of the study and gave their informed written consent.

DNA extraction, oligonucleotide primers and PCR amplification. Genomic DNA was extracted using proteinase K followed by phenol extraction and ethanol precipitation according to standard procedures. All specimens were examined for the presence of amplifiable DNA using a set of primers for the β -globin gene. Primer pairs and amplification conditions for the PCR-RFLP were used as previously described (19).

Table I. Clinicopathological characteristics of patients and control subjects.

	Nasal polyps and adjacent turbinates	Control mucosae
Subjects (no.)	23 ^a	13
Sex (M/F)	17/6	10/3
Age (years)		
Mean	49.3	33.4
Range	21-73	12-68
Smoke (yes/no)	8/15	5/8
Alcohol (yes/no)	7/16	4/9
Aspirin (tolerance/intolerance)	6/17	13/0
NP stage (grade)		
I	3	
II	9	
III	11	

^a19 adjacent middle turbinates.

RFLP analysis and direct sequencing. K- and N-*ras*: 10-40 μ l aliquots of the amplification products were digested for 16 h with 30 U *Bst*NI. H-*ras*: 10-40 μ l aliquots of the amplification products were digested for 16 h with 30 U *Msp*I. RFLP products were analysed on 3% agarose gel and photographed on a UV light transilluminator. DNA, from the cell lines SW480 bearing a homozygous mutation in K-*ras* codon 12, and EJ, which is mutant at the same codon of the H-*ras* gene, were used as positive controls, respectively. PCR products were purified with the Qiaquick PCR purification kit (Qiagen Inc.) and a sequencing reaction was performed on a GeneAmp 9600 thermal cycler using the ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, Tokyo, Japan). Sequences were analysed using ABI PRISM 310 Genetic Analyser (PE Applied Biosystems) to determine sequence configuration at codons 11, 12 and 13. The sequences were double-checked by using the forward and reverse primers separately (Fig. 1).

RNA extraction and reverse transcription. Tissue specimens were homogenised in TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) using a power homogeniser followed by chloroform addition and centrifugation. Total-RNA was precipitated from the supernatant with isopropanol, washed with 75% ethanol and resuspended in 50 μ l DEPC-treated water. RNA concentration and purity was calculated after its 260 nm absorbance and 260/280 nm absorbance ratio, respectively, were measured on a UV spectrophotometer. cDNA was synthesised by reverse transcription (RT) with the StrataScript[®] First-Strand Synthesis System. In detail, first strand buffer

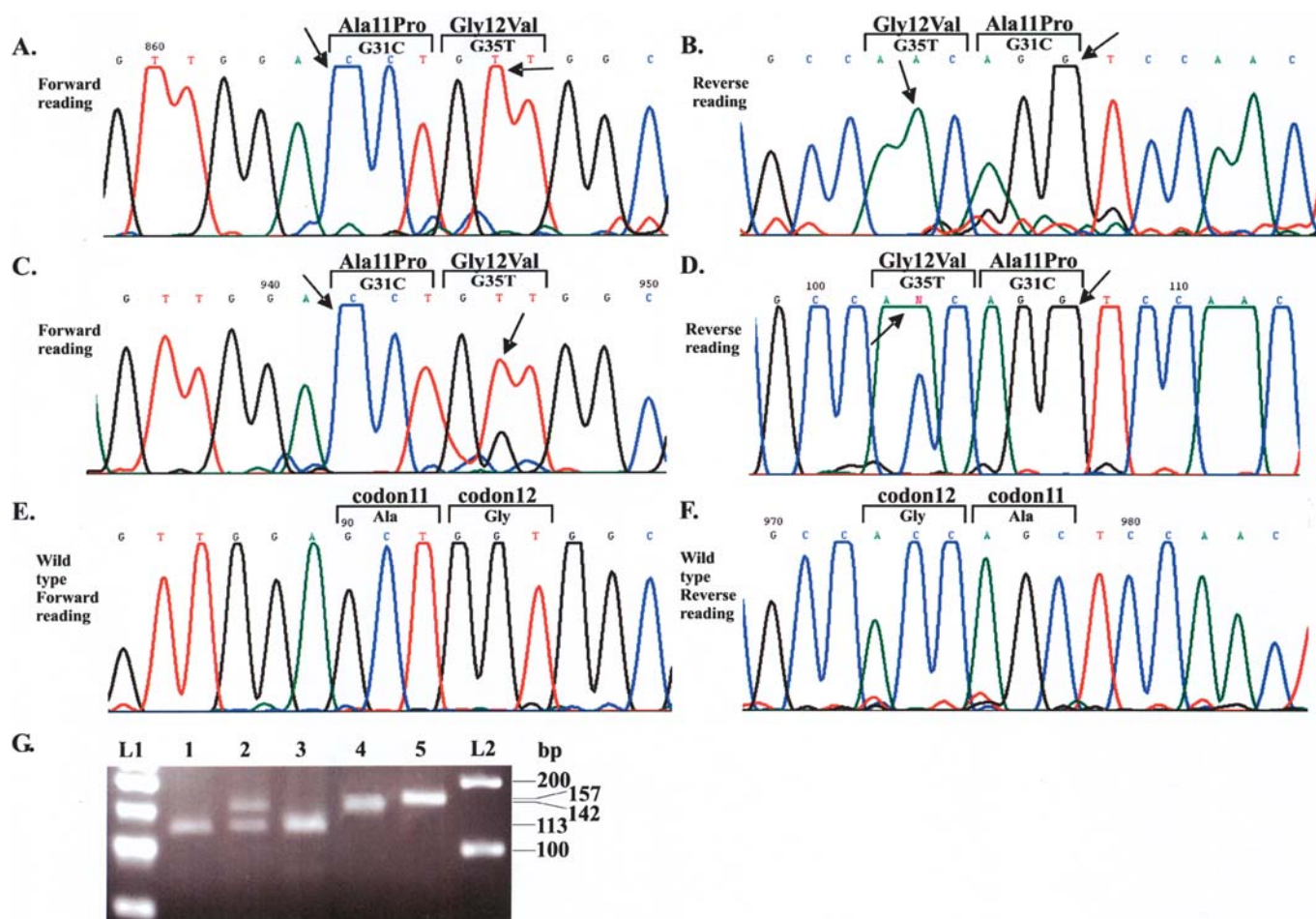


Figure 1. Sequencing electrophoretograms of the same patients depicting forward (A, C and E) and reverse (B, D and F) readings. (A and B) Arrows indicate homozygous *K-ras* codon 11 (GCT→CCT; Ala11Pro) and 12 (GGT→GTT; Gly12Val) mutations. (C and D) Arrows show homozygous *K-ras* codon 11 (GCT→CCT; Ala11Pro) and heterozygous codon 12 (GGT→GTT; Gly12Val) mutations. (E and F) Wild-type *K-ras* codon 11 and 12 sequences. (G) *K-ras* amplification products (157 bp) were digested with the restriction enzyme *Bst*NI and electrophoresed on 3% agarose gel. L1, 50 bp ladder; lanes 1 and 3, *wt* samples; lane 2, heterozygous *mut* sample; lane 4, homozygous *mut*-positive control from the SW480 cell line; lane 5, undigested *K-ras* PCR product; L2, 100 bp ladder.

(x10), 2 μ g of total-RNA, 0.3 μ g of random primers, 25 mM dNTPs and RNase-free water to a total volume of 19 μ l were heated at 65°C for 5 min in order to remove RNA secondary structures. Subsequently, each reaction was cooled at room temperature to allow the primers to anneal to the RNA, and 50 U of StrataScript RT (an RNase H-deficient MMLV RT) along with 20 U of RNase Block were added to each reaction. The final mix (volume 20 μ l) was incubated for 10 min at 25°C for primer extension, and cDNA synthesis was conducted at 42°C for 60 min. The reaction was terminated by heating at 72°C for 15 min.

Real-time PCR. Differential mRNA expression levels of the three *ras* genes were measured using a real-time RT-PCR assay with SYBR-Green I. All primer pairs were designed to span at least one intron in order to avoid the amplification of contaminating genomic DNA along with the cDNA. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the internal control in order to normalise *K-*, *H-* and *N-ras* expression levels.

RNA primer sequences and the size of the *ras* and GAPDH PCR products were as follows: i) *K-ras*: sense primer, 5'-GGGGAGGGCTTTCTTTGTGTA-3'; antisense primer, 5'-

GTCCTGAGCCTGTTTTGTGTC-3'; amplified sequence, 174 bp; ii) *H-ras*: sense primer, 5'-GGGGCAGTCGCGCCTGTGAA-3'; antisense primer, 5'-CCGGCGCCACCACCA CCAG-3'; amplified sequence, 110 bp; iii) *N-ras*: sense primer, 5'-CTTCCTCTGTGTATTTGCCATCA-3'; antisense primer, 5'-GCACCATAGGTACATCATCCGA-3'; amplified sequence, 107 bp; iv) GAPDH: sense primer, 5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3'; antisense primer, 5'-GTCATTGATGGCAACAATATCCACT-3'; amplified sequence, 101 bp.

Amplification parameters for the real-time PCR were as follows: i) *K-* and *N-ras* amplification: denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 55°C for 30 sec and extension at 72°C for 30 sec for 40 cycles; ii) *H-ras* amplification: denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 65°C for 30 sec and extension at 72°C for 30 sec for 40 cycles; iii) GAPDH amplification: denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 60°C for 30 sec and extension at 72°C for 30 sec for 40 cycles.

Regarding the specifics of the real-time PCR procedure, 1 μ l cDNA from NP, AMT, AIT, CMT or CIT samples was amplified in a PCR reaction containing 2X Brilliant SYBR-Green I QPCR Master Mix, 300 nM of each primer and 30 μ M ROX passive reference dye, for a final volume of 20 μ l. The final extension step was followed by a melt curve analysis, in

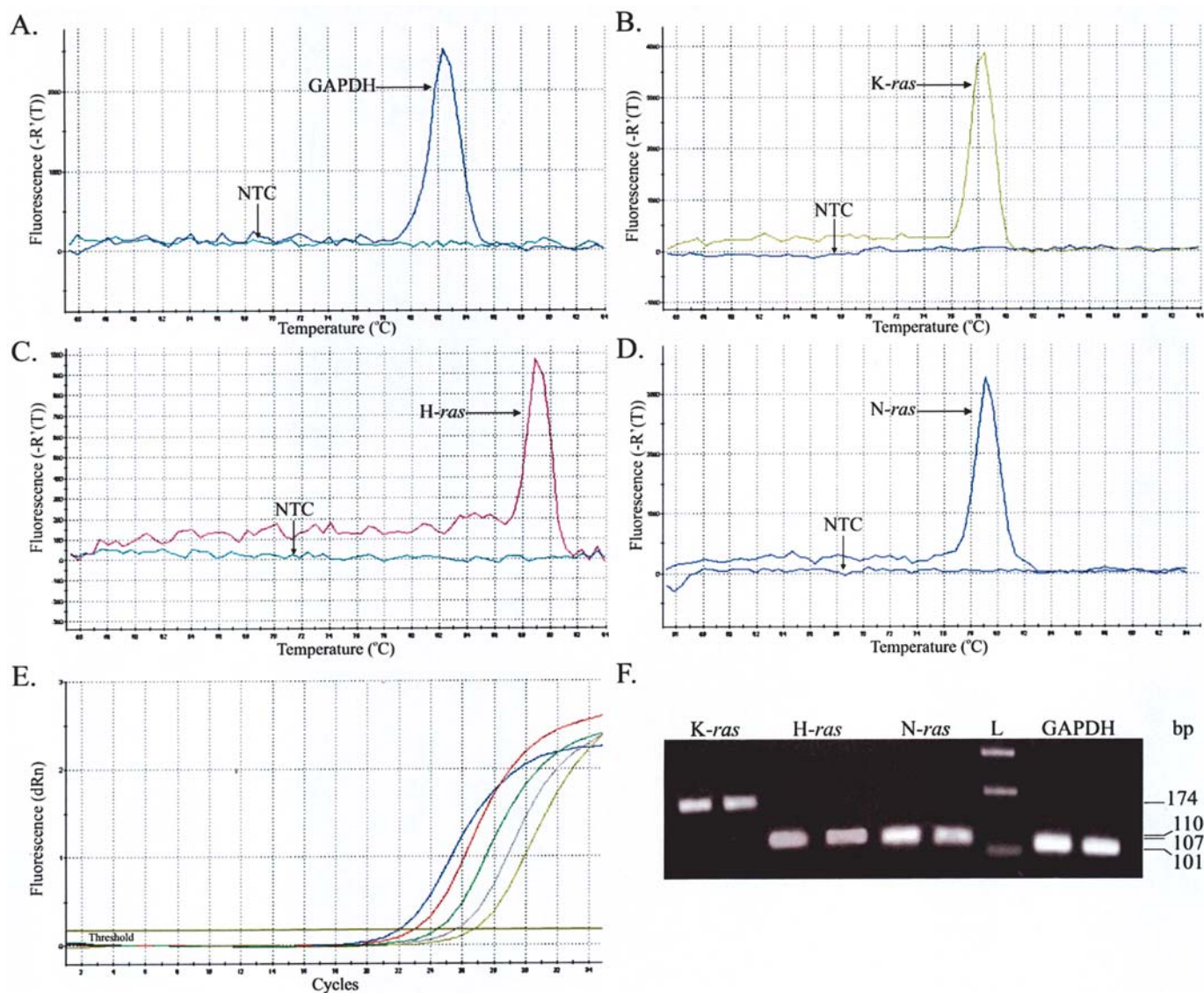


Figure 2. Indicative dissociation curves of (A) GAPDH, (B) *K-ras*, (C) *H-ras* and (D) *N-ras*. Single peaks for all genes and absence of peaks for the non-template controls demonstrates the exclusion of any genomic DNA contamination. (E) Amplification plot for the standard samples (2-fold dilutions of a cDNA pool), with which the standard curve was constructed. Standard curve reaction efficiency reached 100%, slope -3.325 and $R_{sq} \sim 1$. (F) Gel Analysis for the *ras* family genes, along with GAPDH (normaliser gene). L, DNA molecular ladder.

which the temperature was increased from 55 to 95°C at a linear rate of 0.2°C/sec (Fig. 2). Data collection was performed during both annealing and extension with two measurements at each step, and at all times during the melt-curve analysis. All PCR experiments were conducted on an Mx3000P real-time PCR thermal cycler using software version 2.0 (Stratagene, La Jolla, CA). In order to verify the results of the melt-curve analysis, PCR products were analysed by electrophoresis in 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and photographed on a UV light transilluminator. Two non-template controls were included in each PCR reaction. All reactions were run in triplicate, and *ras* transcript levels were calculated and normalised to each specimen's house-keeping gene mRNA (GAPDH) as well as to the appropriate calibrators. Relative quantification was analysed using the $\Delta\Delta Ct$ method. Specifically, after amplification standard curves for both the *ras* genes and the internal control (GAPDH) were constructed from samples used in a series of consecutive dilutions. Ras and

GAPDH amplification efficiencies were the same, reaching 100%. NP, adjacent and control turbinate data were first normalised against variation in sample quality and quantity. Normalised values to GAPDH, ΔCt s, were initially calculated using the following equation: $\Delta Ct_{sample} = Ct_{ras} - Ct_{GAPDH}$. $\Delta\Delta Ct$ was then determined using the formula $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{NP} - \Delta Ct_{turbinate}$. Expression of the normalised (to GAPDH) *ras* genes in NPs, compared to the corresponding turbinate used as a calibrator, equalled $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A 2-fold increased value (≥ 2) or decreased value (≤ 0.5) was considered to be mRNA overexpression or down-regulation, respectively, in that NP sample.

Statistical analysis. mRNA levels were first evaluated by the one-sample Kolmogorov-Smirnov goodness of fit test in order to determine whether they followed a normal distribution pattern. According to the results, Pearson's correlation or the non-parametric Spearman rank correlation were used to examine their pair-wise relation and their association with

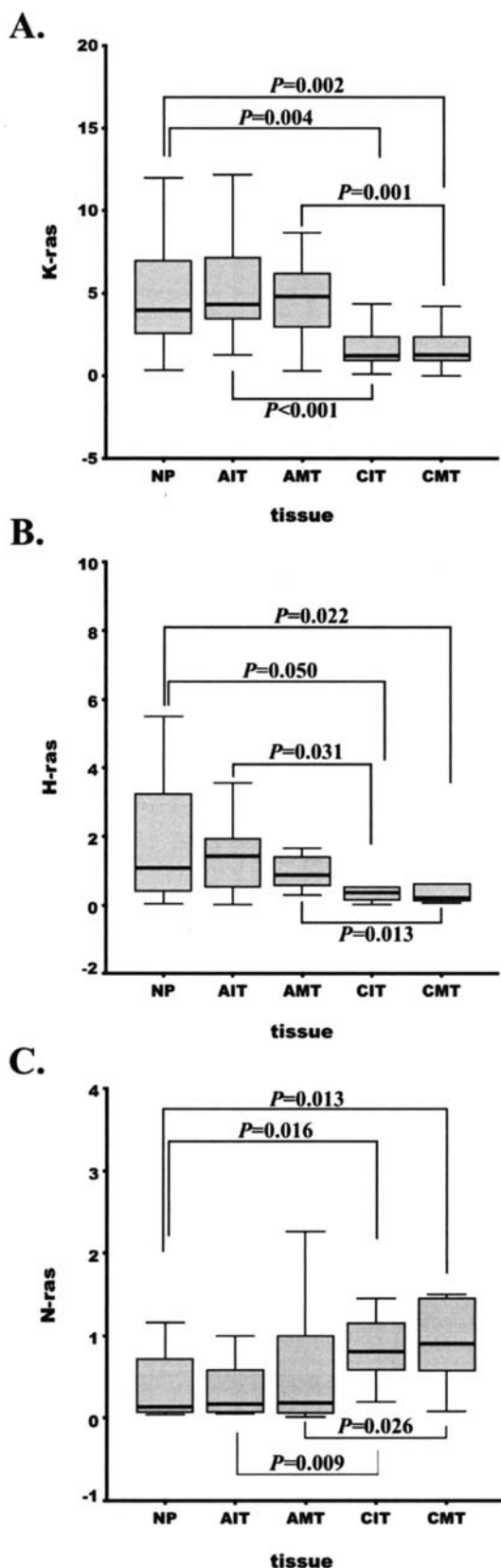


Figure 4. (A) *K-ras*, (B) *H-ras* and (C) *N-ras* expression levels in NPs, AITs, AMTs, CITs and CMTs. All *ras* normalised mRNA expression levels differed significantly among the tissues studied (*K-ras*, $P < 0.001$; *H-ras*, $P = 0.017$; *N-ras*, $P = 0.007$; Kruskal-Wallis test). *K-* and *H-ras* transcription levels were significantly higher in NPs, AITs and AMTs as compared to CITs and CMTs, whereas *N-ras* presented exactly the opposite characteristics. Statistically significant differences in the expression levels of the *ras* genes between two different tissues are depicted (Mann-Whitney U test). Box-plots show the 25th, 50th (median), and 75th percentile values. Whiskers show the minimum and maximum values.

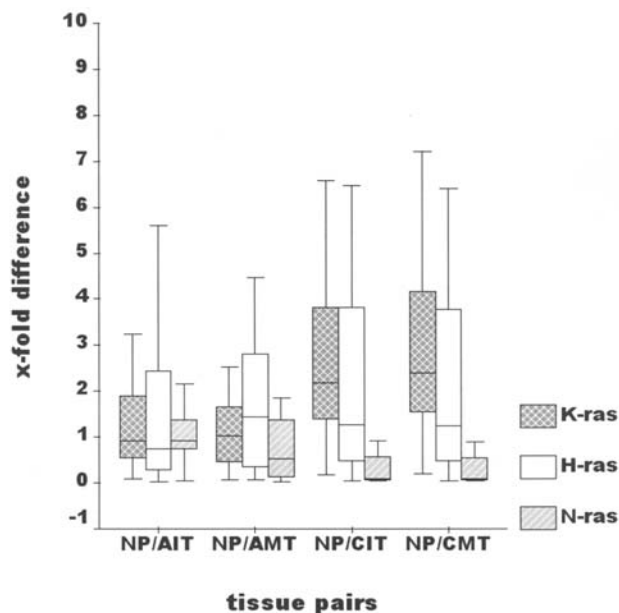


Figure 5. x-fold difference in expression levels between NPs and the two types of calibrators used (adjacent and control turbinates). *K-ras* was overexpressed in NPs as compared to CITs and CMTs and equally expressed in NPs and the AIT-AMTs. *H-ras* was stably overexpressed (mean $2.29\text{-fold} \pm 0.12$) in NPs relative to all turbinates (adjacent and control), whereas *N-ras* was under-expressed in NPs relative to the control turbinates ($< 0.5\text{-fold}$) and stably expressed between NPs and adjacent turbinates. A 2-fold increased value (≥ 2) or decreased value (≤ 0.5) was considered mRNA overexpression or down-regulation, respectively, in NP versus the corresponding turbinate. Box-plots show the 25th, 50th (median), and 75th percentile values. Whiskers show the minimum and maximum values.

grade I polyps. Specifically, 3/4 *K-ras* codon 11 mutations (75%) were detected in grade II polyps and 1/4 in grade III polyps (25%). *K-ras* codon 12 mutations were found in 5/8 grade II polyps (62.5%) and in 3/8 grade III polyps (37.5%). No grade I NP presented *K-ras* codon 11 or 12 mutations.

One *H-ras* codon 12 mutation, of grade III, was observed among the 23 polyps (4%), while no *H-ras* codon 11 or 13 mutations were found in any of the other turbinates. Mutation analysis of codons 11, 12 and 13 of the *N-ras* gene was negative in all tissue samples tested.

Expression levels. In the expression levels of the *ras* family genes of the tissues studied, *K-* and *H-ras* were expressed in all polyps and turbinates while *N-ras* was expressed in 15/23 NPs (65%), 20/23 AITs (87%), 17/18 AMTs (94%), 11/13 CITs (85%) and 12/13 CMTs (92%).

The *ras* normalised mRNA expression levels differed significantly among the tissues studied (NPs, AITs, AMTs, CITs and CMTs) (*K-ras*, $P < 0.001$; *H-ras*, $P = 0.017$; *N-ras*, $P = 0.007$; Kruskal-Wallis test) (Fig. 4). Specifically, *K-ras* transcript levels were higher in NPs compared to CITs and CMTs ($P = 0.004$ and 0.002 , respectively). Moreover, *K-ras* expression levels were elevated in the AITs and AMTs in comparison to the corresponding control turbinates (AIT-CIT, $P < 0.001$ and AMT-CMT, $P = 0.001$). Similarly, *H-ras* mRNA levels were up-regulated in NPs compared to the control turbinates (NP-CIT, $P = 0.05$; NP-CMT, $P = 0.022$). Likewise, *H-ras* was expressed at higher levels in the adjacent turbinates as compared to the corresponding control turbinates (AIT-CIT, $P = 0.031$; AMT-CMT, $P = 0.013$). In contrast to *K-* and *H-ras*,

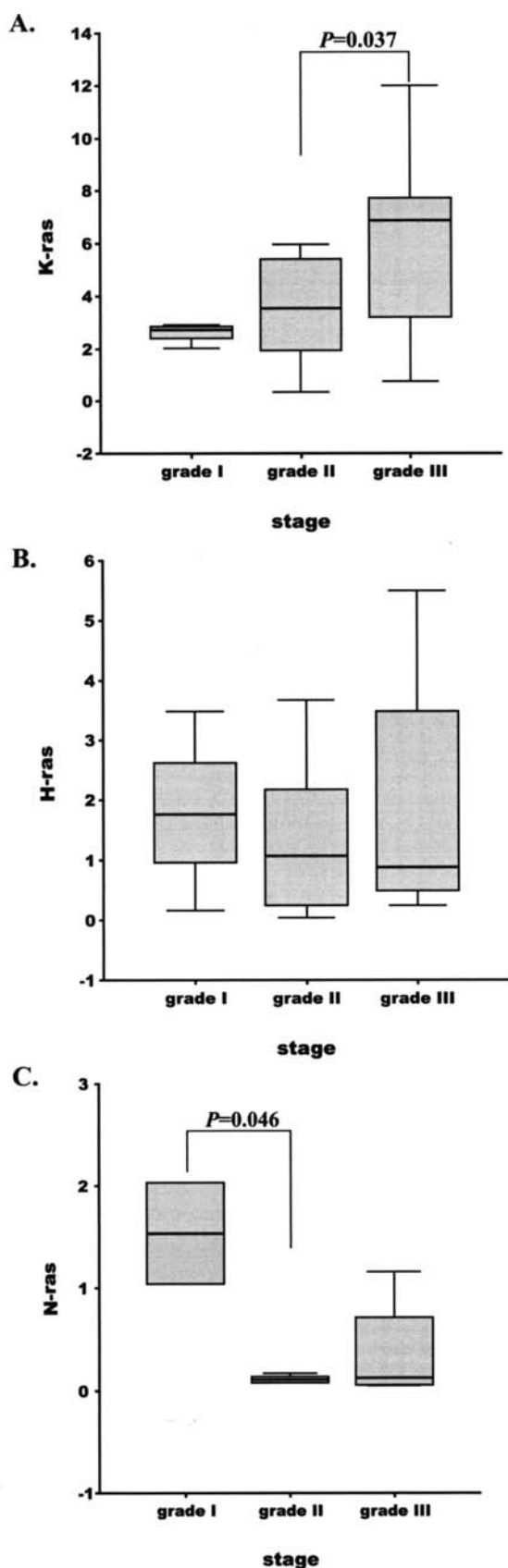


Figure 6. *K-ras* mRNA levels differed based on the stage of the NP (marginal $P=0.067$; Kruskal-Wallis). (A) *K-ras* transcript levels were higher in grade III compared to grade II ($P=0.037$, Mann-Whitney) and I NPs. (B) *H-ras* mRNA were similar in all stages of NPs. (C) *N-ras* expression levels were higher in grade I compared to grade II ($P=0.046$, Mann-Whitney) and III NPs. Results are expressed as median and 25th-75th percentile. Whiskers show the minimum and maximum values.

N-ras expression levels were lower in the NPs and adjacent turbinates than in the control turbinates (NP-CIT, $P=0.016$; NP-CMT, $P=0.013$; AIT-CIT, $P=0.009$; AMT-CMT, $P=0.026$).

Fold-difference in expression levels between NPs and the adjacent and control calibrators (inferior and middle turbinates) is depicted in Fig. 5. *K-ras* presented stable expression levels between NPs and their adjacent turbinates (mean fold-change between the tissue pairs NP-AIT and NP-AMT was 1.34 and 1.76, respectively). Interestingly, *K-ras* mean fold-change between NPs, CITs and CMTs was 2.89 and 3.17, respectively. *H-ras* was stably overexpressed (mean, 2.29-fold \pm 0.12) in NPs relative to all the turbinates (adjacent and controls), whereas *N-ras* was underexpressed in NPs relative to the control turbinates (<0.5-fold) and stably expressed between NPs and adjacent turbinates (mean fold-change, 1.42 and 1.45, respectively).

Ras expression levels compared to clinicopathological characteristics. *K-ras* mRNA levels differed according to the stage of the NP (marginal $P=0.067$; Kruskal-Wallis) (Fig. 6). *K-ras* transcript levels were higher in grade III compared to grade II ($P=0.037$; Mann-Whitney U) and I NPs. In contrast, *N-ras* expression levels were higher in grade I than in grade II ($P=0.046$; Mann-Whitney U) and III NPs. *H-ras* transcript levels did not present statistically significant differences in terms of the staging of the NPs. All *ras* expression levels were higher in aspirin intolerant versus tolerant patients ($P=0.016$; χ^2). Moreover, *ras* transcription levels did not present any significant correlation with the presence of a point mutation in the specific tissue. NP occurrence was more frequent in men than in women ($P=0.003$; χ^2) and patients over the age of 40 years were more prone to the disease ($P=0.022$; χ^2). No other statistically significant correlation was established between *ras* mRNA levels and sex, age, smoking or drinking habits.

mRNA pair-wise expression analysis. The Spearman test was run in order to detect possible correlations for the evaluation of *ras* co-expression patterns in the groups of NP, AIT, AMT, CIT and CMT. Significant negative correlations arose between *K-ras* and *N-ras* in the NPs and AITs ($P=0.009$ and 0.003, respectively), whereas no correlation was present between the AMTs and control turbinates.

Discussion

K-ras is frequently mutated in codon 12, altering the GTP-binding activity of the protein and rendering it a powerful transforming oncogene (21). Mutations of *K-ras* have been detected in more than 80% of human pancreatic tumours (22), in 38% of colon cancer specimens (23), in 31% of small intestine cancers (24), in 26% of primary hepatic malignant tumours (25), in 10-40% of endometrial carcinomas (26,27) and in 6.5-12% of breast tumours (19,28). Mutations of *K-ras* are also common in lung cancer, where 30% of adenocarcinomas (29) and 21% of squamous-cell carcinomas (30) harbour *K-ras* mutations in codon 12.

In the present study, we evaluated the incidence of *K-ras* codon 11 and 12 mutations in NPs for the first time. Our results demonstrate that a significant proportion of polyps

harbour *K-ras* codon 11 and 12 mutations (17 and 35%, respectively). Our finding, that the adjacent turbinates also harbour a similar percentage of *K-ras* mutations (codon 11: AIT, 22%; AMT, 16%; codon 12: AIT, 22%; AMT, 26%) as opposed to the control turbinates where *K-ras* mutations were totally absent, suggests that the mutational activation of the *K-ras* gene comprises a common feature of the NP formation procedure. Considering that NPs usually originate in the middle meatus, we hypothesise that *K-ras* mutations might be an early event in the formation of this benign tumour. Our discovery of *K-ras* mutations in NPs is in agreement with the concept that *K-ras*-dependent tumour development results in the formation of less aggressive neoplasms (28). Reinforcing the latter, *K-ras* mutations have also been found in hyperplastic polyps of the colon, which are not considered precancerous lesions, at a high frequency (47%) (23,31). *H-ras* mutations were found in only 4% of the NPs (1/23) and no *N-ras* mutation was detected.

In another adenomatous type disease, familial adenomatous polyposis (FAP), patients typically develop hundreds to thousands of colorectal tumours (adenomas or adenomatous polyps) due to a single gene, *APC*, which has been characterised as the disease initiator. It is believed that *APC* acts as a 'gatekeeper' against colonic epithelial cell proliferation. Consequently, mutations in this gatekeeper initiate the neoplastic process, while tumour progression results from mutations in other genes such as *K-ras* and *p53* (32). In our study, *K-ras* codon 11 and 12 mutations were more frequent in grade II and III than in grade I NPs. This observation could lead to the assumption that *ras* mutations occur as the polyps increase in size. However, the small number of grade I NPs (n=3) does not strongly support this concept. On the contrary, our discovery of *ras* mutations in the adjacent turbinates and not in the controls suggests that *K-ras* mutations comprise a rather early event in the formation of this benign tumour. We could therefore suggest a possible model where *K-ras* by itself (resembling the function of *APC* in FAP) or in combination with other genetic changes (e.g. tumour suppressor *p53* or *p16* inactivation) could act as a similar gatekeeper, leading to benign tumours of the adenoma type, such as nasal and colorectal polyps. In the present study, support is provided by the observation that *K-ras* mutations were present both in the NPs and in the adjacent turbinates, the majority of which were characterised by a considerable level of hyperplasia. These hyperplastic cells, containing the mutant *K-ras* gene, have possibly little or no potential to form clinically malignant tumours instead of NPs.

Expression levels. Eleven polyps (48%) exhibited elevated expression of at least one of the *ras* family genes compared to the AITs and AMTs, whereas 17 (74%) and 20 (87%) patients displayed elevated expression of at least one of the *ras* family genes compared to the CITs and CMTs, respectively. This suggests that overexpression is also an important mechanism of *ras* gene activation in nasal polyposis.

K-ras presented higher expression levels in the NPs than in the control turbinates, *H-ras* was stably overexpressed in the NPs compared to all adjacent and control turbinates and *N-ras* presented lower transcription levels in the NPs than in the control turbinates. These findings suggest that the over-

production of $p21^{ras}$ is due not to the activation of only one member of the *ras* family, but to both the *K-* and *H-ras* genes activation in nasal polyposis. The above observation indicates that the overproduction of $p21^{ras}$ in NPs, regardless of which gene is responsible for the overexpression, is probably required for the development of tumourigenic potential in nasal mucosa. On the other hand, it is worth underlining the fact that the adjacent turbinates also exhibit higher levels of *K-* and *H-ras* mRNA compared to the control turbinates, which suggests that $p21^{ras}$ overproduction could also be critical to the hypertrophy that distinguishes most of the adjacent turbinates. Our finding, that *N-ras* presents lower transcription levels in NPs as compared to both the adjacent and control turbinates, leads us to the hypothesis that either *N-ras* possesses a weaker tumourigenic potential as compared to *K-* and *H-ras*, or that the down-regulation of *N-ras* is an alternative important feature in NP formation, working in an as yet unknown way. In any case, *ras* genes have been shown to possess the dual role of oncogene or onco-suppressor depending on the disease context (18). Based on our results, we hypothesise that wild-type *N-ras* works as a tumour-suppressor gene, antagonising the oncogenic properties of *K-* and *H-ras* in the formation of NPs. According to our findings *N-ras* is negatively correlated with *K-ras* transcript levels in the NPs and the AITs, but not in the control mucosa. More studies are needed, however, to reveal the intrinsic role of the *ras* family genes in NP formation.

NPs that presented *K-* and *H-ras* overexpression compared to the control turbinates (either inferior and/or middle) were of advanced stage. In the case of *K-ras*, 7/15 polyps (46.6%) that presented overexpression compared to the CIT and/or CMT were of grade II and 8/15 (53.3%) of grade III. For *H-ras*, 3/10 (30%) were of grade II and 5/10 (50%) of grade III, respectively. Likewise, in lung, stomach, endometrial and ovarian lesions, *ras* overexpression appeared at a later stage of tumourigenesis (33). We can only speculate that *ras* genes activation in nasal polyposis is initially based on activating mutations that occur rather early in the process, and that this activation is reinforced and augmented by *ras* overexpression, a feature of advanced stage NPs.

To our knowledge, this is the first study to report on the incidence of mutations as well as on mRNA expression levels of the *ras* family genes in human NPs. In summary, our findings indicate that *K-* and *H-ras* mutations are present in NPs and their adjacent turbinates, in contrast to healthy control mucosa. We could therefore suggest a role for *K-ras* in the development in nasal polyps. Furthermore, we provide evidence that *K-* and *H-ras* are transcriptionally activated in NPs and their adjacent turbinates, indicating that the overproduction of $p21^{ras}$ is probably required in the multistage process of the disease, and corroborating that the origin of NPs is in the middle turbinate and middle meatus. The expression levels of *ras* family genes did not correlate to the occurrence of point mutations, indicating that the different genetic alterations are not mutually dependent. Probably, the occurrence of both *ras* overexpression and point mutations in codons 11 and/or 12 provide the necessary genetic changes for NP formation. Moreover, mutations within the promoters of the *ras* family genes, in combination with mRNA overexpression, could possibly explain the activation of *ras*

family genes in nasal polyposis without excluding other possible mechanisms, such as the imbalance of chromosomes (resulting in gene amplification), that could act synergistically.

More in-depth studies, utilising large numbers of samples, are required in order to clarify the precise role of the mutational and expressional aberrations of *ras* genes in nasal polyposis.

References

- Lund VJ: Diagnosis and treatment of nasal polyps. *BMJ* 311: 1411-1414, 1995.
- Connell JT: Nasal hypersensitivity. In: *Comprehensive Immunology*. Gupta S and Good RA (eds.) Plenum Publ. Corp., New York, pp6, 1979.
- Cauna N, Manzetti GW, Hinderer KH and Swanson EW: Fine structure of nasal polyps. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 81: 41-58, 1972.
- Kakoi H and Hiraide F: A histological study of formation and growth of nasal polyps. *Acta Otolaryngol* 103: 137-144, 1987.
- Roche WR, Williams JH, Beasley R and Holgate ST: Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1: 520-524, 1989.
- Pronk GJ and Bos JL: The role of p21 *ras* in receptor tyrosine kinase signalling. *Biochem Biophys Acta* 1198: 131-147, 1994.
- Dokianakis DN, Sourvinos G, Sakkas S, *et al*: Detection of HPV and *ras* gene mutations in cervical smears from female genital lesions. *Oncol Rep* 5: 1195-1198, 1998.
- Koffa M, Malamou-Mitsi V, Agnantis NJ and Spandidos DA: Mutational activation of K-*ras* oncogene in human breast tumours. *Int J Oncol* 4: 573-576, 1994.
- Roth S, Partanen T, Suijala T, Anttila S, Ojajarvi A, Hemminki K, Vainio H and Husgafvel-Pursiainen K: Molecular analysis of occupational cancer: infrequent p53 and *ras* mutations in renal-cell cancer in workers exposed to gasoline. *Int J Cancer* 14: 492-496, 1997.
- Kim TY, Bang YJ, Kim WS, *et al*: Mutation of *ras* oncogene in gastric adenocarcinoma: association with histological phenotype. *Anticancer Res* 17: 1335-1340, 1997.
- Mulder MP, Keijzer W, Boot AJM, *et al*: Activated *ras* genes in human seminomas: evidence for tumour heterogeneity. *Oncogene* 4: 1345-1351, 1989.
- Hongyo T, Buzard GS, Palli D, *et al*: Mutations of the K-*ras* and p53 genes in gastric adenocarcinomas from a high-incidence region around Florence, Italy. *Cancer Res* 55: 2665-2672, 1995.
- Suzuki Y, Orita M, Shiraishi M, Hayashi K and Sekiya T: Detection of *ras* gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene* 5: 1037-1043, 1990.
- Grimmond SM, Raghavan D and Russell PJ: Detection of rare point mutation in Ki-*ras* of a human bladder cancer xenograft by polymerase chain reaction and direct sequencing. *Urol Res* 20: 121-126, 1992.
- Spandidos DA and Wilkie NM: Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. *Nature* 310: 469-475, 1984.
- Field JK and Spandidos DA: The role of *ras* and *myc* oncogenes in human solid tumors and their relevance in diagnosis and prognosis. *Anticancer Res* 10: 1-22, 1990.
- Kiaris H, Spandidos DA, Jones AS, *et al*: Mutations, expression and genomic instability of the H-*ras* proto-oncogene in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 72: 123-129, 1995.
- Spandidos DA, Sourvinos G, Tsatsanis C and Zafiroopoulos A: Normal *ras* genes: Their onco-suppressor and pro-apoptotic functions (Review). *Int J Oncol* 21: 237-241, 2002.
- Miyakis S, Sourvinos G and Spandidos DA: Differential expression and mutation of the *ras* family genes in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 609-612, 1998.
- Malm L: Assessment and staging of nasal polyposis. *Acta Otolaryngol* 117: 465-467, 1997.
- Kiaris H and Spandidos DA: Mutations of *ras* genes in human tumors. *Int J Oncol* 7: 413-421, 1995.
- Tada M, Omata M, Kawai S, *et al*: Detection of *ras* gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 53: 2472-2474, 1993.
- Spandidos DA, Glarakis IS, Kotsinas A, Ergazaki M and Kiaris H: *Ras* oncogene activation in benign and malignant colorectal tumours. *Tumori* 81: 7-11, 1995.
- Spandidos DA, Liloglou T, Arvanitis D and Gourtsoyiannis NC: *Ras* gene activation in human small intestinal tumors. *Int J Oncol* 2: 513-518, 1993.
- Tada M, Omata M and Ohto M: Analysis of *ras* gene mutations in human hepatic malignant tumors by polymerase chain reaction and direct sequencing. *Cancer Res* 50: 1121-1124, 1990.
- Ignar-Trowbridge D, Risinger JI, Dent GA, *et al*: Mutations of the Ki-*ras* oncogene in endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 167: 227-232, 1992.
- Enomoto T, Inoue M, Perantoni AO, *et al*: K-*ras* activation in premalignant and malignant epithelial lesions of the human uterus. *Cancer Res* 51: 5308-5314, 1991.
- Koffa M, Malamou-Mitsi V, Agnantis NJ and Spandidos DA: Mutational activation of the K-*ras* oncogene in human breast tumors. *Int J Oncol* 4: 573-576, 1994.
- Rodenhuis S and Slebos RJ: Clinical significance of *ras* oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 52: S2665-S2669, 1992.
- Rosell R, Li S, Skacel Z, *et al*: Prognostic impact of mutated K-*ras* gene in surgically resected non-small cell lung cancer patients. *Oncogene* 8: 2407-2412, 1993.
- Glarakis IS, Savva S and Spandidos DA: Activation of the *ras* genes in malignant and premalignant colorectal tumors. *Oncol Rep* 5: 1451-1454, 1998.
- Kinzel KW and Vogelstein B: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170, 1996.
- Zachos G and Spandidos DA: Transcriptional regulation of the H-*ras1* proto-oncogene. *Gene Ther Mol Biol* 1: 629-639, 1998.

RKIP and BRAF aberrations in human nasal polyps and the adjacent turbinate mucosae

Apostolos Zaravinos^a, John Bizakis^b, Demetrios A. Spandidos^{a,*}

^a *Laboratory of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion 71100, Crete, Greece*

^b *Department of Otolaryngology, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece*

Received 16 November 2007; received in revised form 10 January 2008; accepted 28 January 2008

Abstract

Background: Little is known about the implication of BRAF and RKIP expression, or about the incidence of BRAF mutations in the formation of nasal polyposis.

Objectives: To determine the expression levels of the genes BRAF and RKIP, and to inspect the frequency of BRAF mutations in exons 11, 14 and 15 in human nasal polyps (NP).

Patients and methods: We analyzed 24 human NP specimens and their Adjacent Inferior and Middle Turbinates (AIT and AMT), as well as 14 control subjects [bearing 14 Control Inferior Turbinates (CIT) and 14 Control Middle Turbinates (CMT), in total]. The expression pattern of BRAF and RKIP was assessed with real-time RT-PCR. A real-time allele-specific PCR method, in combination with direct sequencing, was performed in order to inspect the frequency of the V600E mutation in exon 15, and to examine mutation status within exons 11 and 14.

Results: The control mucosae presented significantly higher mRNA levels for both genes, compared to the NP and the AIT–AMT. Moreover, in NP, AIT and AMT, RKIP was found to present higher mRNA levels, in relation to the equivalent values of the BRAF gene ($P = 0.003$ in NP; $P < 0.001$ both in AIT and AMT). No mutation was detected in exon 14, whereas a silent mutation (A1380G, G460G) was noted for one NP sample in exon 11. Another NP sample was found to carry two mutations, one T1799A (V600E) and one A1801G (K601E). A significant co-expression of the two genes was noted in NP ($P = 0.012$) and AIT ($P = 0.019$).

Conclusion: The results of the expression levels of RKIP and BRAF, reflect the strong connection between the two genes. RKIP could play an important role in the down-regulation of wild-type BRAF, serving thus as an endogenous inhibitor of the MAPK pathway in nasal polyps and their adjacent turbinate mucosa.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: BRAF; RKIP; Nasal polyps; Real-time PCR

1. Introduction

Nasal polyposis is a common chronic disease of the nasal and paranasal sinus mucosae, character-

ized by inflammatory cell infiltration and structural modifications of epithelium and lamina propria. Nasal polyps (NP) arise mainly from the ethmoid sinuses and then prolapse into the nasal cavity. They can cause disabling symptoms and require long-term treatment with corticosteroids or surgery [1]. Although the pathogenesis of this nasal disease

* Corresponding author. Tel.: +30 210 7227809; fax: +30 210 7252922.

E-mail address: spandidos@spandidos.gr (D.A. Spandidos).

has been studied, the etiology and pathogenesis of nasal polyps are controversial, and further investigation is needed [1–3].

The RAS–RAF–MEK–ERK pathway is an evolutionary conserved signaling module that regulates many fundamental cellular processes, such as differentiation, proliferation, survival, motility and transformation [4]. The RAF proteins are highly conserved serine/threonine protein kinases that activate mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), which in turn activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway [5]. Inappropriate and/or continuous activation of this pathway provides a potent promitogenic force resulting in abnormal proliferation and differentiation in many human cancers [6]. Davies et al. [7] reported that BRAF is frequently mutated in a variety of human tumors, especially in malignant melanoma and colon carcinoma. The most common reported mutation was a missense thymine (T) → adenine (A) transversion at nucleotide 1799 (T1799A; amino acid change in the BRAF protein = Val600 → Glu600) observed in 80% of the malignant melanoma tumors. Functional analysis revealed that this transversion was the only detected mutation that caused constitutive activation of BRAF kinase activity, independently of RAS activation, by converting BRAF into a dominant transforming protein [7].

RKIP, also known as phosphatidylethanolamine binding protein (PEBP), was shown to impede the activation of ERK and the transformation of cells triggered by activated RAS or RAF-1 [8]. Neutralization of RKIP by the expression of antisense RKIP RNA or microinjection of anti-RKIP antibodies induced the activation of MEK, ERK and AP-1-dependent transcription [8,9]. These results were of particular interest, because approximately 30% of all human tumors feature hyperactivation of the ERK pathway caused by mutations in RAS or BRAF [10,11]. Characterizing the molecular mechanism in detail revealed that RKIP disrupts the interaction between RAF-1 and its substrate MEK, thereby prohibiting RAF-1 from phosphorylating MEK [9]. Recently, RKIP was also shown to bind and inhibit BRAF as well as RAF-1 [12,13]. RKIP expression has been shown to be down-regulated in metastatic prostate cancers and it was suggested that the loss of RKIP levels promotes the metastatic potential of prostate cancer cells [14]. Furthermore, a recent study showed a decrease of RKIP expression in malignant melanoma and the absence of RKIP expression in melanoma metastases [15].

The aim of this study was to screen the BRAF gene in exons 11, 14 and 15 for the presence of mutations, in human NP. We also investigated the expression levels of BRAF and RKIP in the polyps, the inferior and middle turbinate mucosae from the same patients (AIT and AMT), as well as the inferior and middle turbinate mucosae from control patients undergoing nasal corrective surgery (CIT and CMT), using real-time RT-PCR.

2. Methods

2.1. Subjects

Biopsies of the NPs and mucosa from the AITs and AMTs were obtained from a total of 24 patients with CRS/NP (17 men and 7 women; average age, 46 years; range, 21–65 years). All polyps arose from the middle turbinate, middle meatus or ethmoidal sinuses and were multiple and bilateral. Following histopathological examination of the specimens, the staging system we used for treating the nasal polyps for each nasal cavity was grade I for polyps that do not prolapse beyond the middle turbinate and may require an endoscope for visualization, grade II for polyps that extended below the middle turbinate and are visible with a nasal speculum and grade III for polyps which are massive and occlude the entire nasal cavity [16] (Table 1). Moreover, there was a division into aspirin-tolerance (6 patients) and aspirin-intolerance (18 patients) on the basis of history. Patients were also divided into two groups, according to whether or not they suffered from allergic rhinitis (AR). AR was diagnosed according to standard criteria [17]. Specific IgE measurements, obtained using C.A.R.L.A. (Capture Assay Radim Liquid Allergen; RADIM SpA, Rome, Italy) RAST, were considered to be elevated when ≥ 0.5 IU/ml (class 1 or greater). Specific IgE measurements were determined for the following allergens: dust mites (*Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae*), cat and dog epithelia, olive, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternate*, *Parietaria judaica* and ragweed. All patients suffered from sneezing, rhinorrhea, headaches, nasal obstruction and hyposmia or anosmia, and had undergone nasal polypectomy, at least once, in the past. Nasal polyp patients had not taken any drug (topical or systemic corticosteroids) within 4 weeks of surgery.

Fourteen subjects with nasal septum deformity who were undergoing nasal corrective surgery and had no history of nasal or allergic symptoms of any nature [negative specific IgE measurements (class 0) for the aforementioned allergens], served as our control group (10 men and 4 women; average age, 39 years; range, 25–68 years). During these operations a biopsy from the mucosae of the CIT and CMT of each patient was acquired. No patient in this group had received corticosteroids for at least one

Table 1
Clinicopathological characteristics of the patients and control subjects

	Nasal polyps and adjacent turbinates	Control mucosae
Subjects (No.)	24 ^a	14
Sex (M/F)	17/7	10/4
Age (years)		
Mean	46	39
Range	21–65	12–25
Smoker (yes/no)	8/16	5/9
Alcohol use (yes/no)	7/17	4/10
Allergic rhinitis (AR) (yes/no)	15/9	0/14
AR mean total IgE (normal values \leq 180 IU/mL)	436.08 \pm 434.18	27.2 \pm 19.84
Non-AR mean total IgE (normal values \leq 180 IU/mL)	89.46 \pm 63.26	
Aspirin tolerance/intolerance	6/18	14/0
NP stage (grade)		
I	3	
II	9	
III	12	

^a Nineteen adjacent middle turbinates.

month before surgery. Clinical parameters such as age, sex, smoking and alcohol habits were available for all the patients and the control subjects.

The Ethical Committee of the University of Crete approved the present study, and all participants (patients and control subjects) were informed about the aim of the study and gave their written informed consent.

All samples were treated immediately with *RNAlater* (Qiagen) before further treatment.

2.2. RNA extraction and reverse transcription

Tissue specimens were homogenized in TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) using a power homogenizer followed by chloroform addition and centrifugation. Total-RNA was precipitated from the supernatant with isopropanol, washed with 75% ethanol and resuspended in 50 μ l DEPC-treated water. RNA concentration and purity were calculated after its 260 nm absorbance and 260/280 nm absorbance ratio were measured on a UV spectrophotometer. cDNA was synthesized by reverse transcription (RT) with the StrataScript[®] First-Strand Synthesis System. In detail, first strand buffer (10 \times), 2 μ g of total-RNA, 0.3 μ g of random primers, 25 mM dNTPs and RNase-free water to a total volume of 19 μ l were heated at 65 $^{\circ}$ C for 5 min in order to remove RNA secondary structures. Subsequently, each reaction was cooled at room temperature to allow the primers to anneal to the RNA, and 50 U of StrataScript RT (an

RNase H-deficient MMLV RT) along with 20 U of RNase Block were added to each reaction. The final mix (volume 20 μ l) was incubated for 10 min at 25 $^{\circ}$ C for primer extension, and cDNA synthesis was conducted at 42 $^{\circ}$ C for 60 min. The reaction was terminated by heating at 72 $^{\circ}$ C for 15 min.

2.3. BRAF V600E mutation

In most studies, a fragment of the BRAF gene was amplified and analyzed by single-strand conformation polymorphism [18], capillary-based heteroduplex method [19], direct sequencing [20], or PCR amplification followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis [21]. The PCR-RFLP mapping approach involves restriction enzymatic digestion and analysis by electrophoresis. The TspRI restriction endonuclease (NNCAC/GTGNN) is used because the T1799A mutation negates this restriction site which is present in the wild-type sequence. These assays are time consuming and not always sensitive enough to detect a low percentage of cells containing the mutation. The restriction enzyme digestion step increases the post-PCR processing time and all these techniques require further manipulation of the amplified DNA fragments which is always a source of contamination. Therefore, we performed an assay based on real-time allele-specific amplification and applied it to nasal polyps.

We used two forward primers with variations in their 3' nucleotides such that each was specific for the wild-type (V; AGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGT) or the mutated variant (E; AGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGA), and one reverse primer (AS; TAGTAACTCAGCAGCATCTCAGGGC). The amplification conditions were optimized for the Mx3000P instrument (Stratagene). The reaction mixture contained 2 \times Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (containing 2.5 Mm MgCl₂), 0.3 μ l of a 1/500 dilution of ROX passive reference dye, 0.8 μ l of each primer (0.4 μ M each) and DEPC water to a volume of 19 μ l. One microliter of the template DNA (10–200 ng genomic DNA) was added to the mix and the run was initiated. The cycling conditions were as follows: denaturation for 5 min at 95 $^{\circ}$ C; amplification for 50 cycles, with denaturation for 30 s at 95 $^{\circ}$ C, annealing for 1 min at 66 $^{\circ}$ C and extension for 30 s at 72 $^{\circ}$ C. After completion of the cycling process, the samples were subjected to a temperature ramp from 55 to 95 $^{\circ}$ C, with continuous fluorescence monitoring for melting curve analysis. For each amplification, a single narrow peak was obtained at the expected melting temperature (78 $^{\circ}$ C), indicating specific amplification without any by-products.

2.4. PCR and direct DNA sequencing

We amplified BRAF exons 11, 14 and 15 by polymerase chain reaction (PCR) using the following primers: BRAF exon 11 forward, 5'- TCTCTTCTGTATCCCTC

TC-3' and BRAF exon 11 reverse, 5'-ACTTGTCACAATGTCACCAC-3', (PCR product: 257-bp); BRAF exon 14 forward, 5'-CCCAAGTATGTTCTGTAGAT-3' and BRAF exon 14 reverse, 5'-AACTGTTTTTACATAATGTG-3', (PCR product: 210-bp); BRAF exon 15 forward, 5'-ATCTACTGTTTTCTTTACTT-3' and BRAF exon 15 reverse, 5'-TAGTAAGTCTCAGCAGCATCT-3', (PCR product: 216-bp). All primers were located in the introns flanking the coding exons of the gene to include sequences from the intron/exon boundaries in the amplified products and the final sequencing traces. PCR conditions were: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 37 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for exon 11, at 52 °C for exon 14 and at 51 °C for exon 15, for 40 s, and elongation at 72 °C for 30 s. The reaction ended with a final extension at 72 °C for 10 min.

Direct DNA sequencing was used to identify and/or verify mutations within exons 11, 14 and 15 of the BRAF gene. The primers used for the forward reading of the reactions, were as follows: BRAF exon 11, 5'-TGTTTGCTTGACTTGAC-3'; BRAF exon 14, 5'-AGATTTTCGAGGCCAGAGTCC-3'; and BRAF exon 15, 5'-CCCTGAGATGCTGCTGAGTT-3'. The sequencing reactions were carried out using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) in a 10- μ l volume containing purified PCR product and the sequencing primer. The temperature conditions set for the sequencing reactions were 96 °C for 2 min followed by 25 cycles at 96 °C for 30 s, 54 °C for 10 s and 60 °C for 4 min. The reaction products were precipitated with 2-propanol, washed with 75% ethanol, re-suspended in 25 μ l water and loaded onto ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Both, forward and reverse strands were sequenced separately. Sequencing data were analyzed using a sequence analysis software (Sequence Analysis 3.7; Applied Biosystems).

2.5. Quantitative real-time polymerase chain reaction (QRT-PCR) analysis

All samples were treated collectively from the mRNA extraction and its conversion to cDNA, to the qPCR analysis. Moreover, all the real-time PCR primer sets were optimized for their concentration and optimal annealing

temperature, so as to give the smallest C_t s with the highest DRns. Transcribed products were subjected to real-time PCR assay with SYBR Green I in a Mx3000P programmable thermal controller apparatus (Stratagene). For each target gene 1 μ l of cDNA was amplified in a total volume of 20 μ l containing 2 \times Brilliant SYBR Green I QPCR Master mix (supplemented with 2.5 mM MgCl₂), 30 mM ROX as passive reference dye, and the appropriate concentration of each primer set. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as internal control, in order to normalize target gene mRNA expression levels. All primer pairs were designed to span at least one intron in order to avoid amplification of contaminating genomic DNA along with cDNA. Primer sequences and their annealing conditions are listed in Table 2. All reactions were performed in triplicate. Nasal polyp samples were subjected to 40 cycles of amplification, comprised of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing for 30 s at the appropriate temperature for each primer set tested, and elongation at 72 °C for 30 s. After amplification, standard curves were constructed from samples used in a series of consecutive dilutions, for both the gene of interest (GOI) and the internal control (GAPDH). Dissociation curves were also performed for all tested genes to exclude the presence of by-products or primer-dimer formation. Data were collected during annealing and extension with two measurements at each step and at all times during melting curve analysis. The correct PCR products were further confirmed by analysis on 2% ethidium bromide-stained agarose gels (Fig. 1). The threshold was set exactly at the same point (0.027), at the beginning of the exponential phase of all the three qPCR reactions. The efficiencies of the three qPCR assays were almost identical (99.1% for RKIP, 99.4% for BRAF and 100% for GAPDH). Also, the slopes of the three reactions were as follows: -3352 for RKIP, -3336 for BRAF and -3323 for GAPDH. The R^2 for all three reactions was \sim 1. Finally, all three qPCR assays were run consecutively within the same day, so as to exclude any differences in the dynamic range among the three reactions. In this manner, taking into consideration the aforementioned precautions, the transcript levels of BRAF and RKIP, both normalized to GAPDH, were made comparable and could be treated as if they were within the same reaction. The gene transcription levels were calculated using the

Table 2
Primer sequences used for quantitative real-time RT-PCR

Primer pair	Sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Amplicon size (bp)
BRAF	AGAAAGCACTGATGATGAGAGG GGAAATATCAGTGTCCCAACCA	53	101
RKIP	AGACCCACCAGCATTTCGTG GCTGATGTCATTGCCCTTCA	55	150
GAPDH	GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA GTCATTGATGGCAACAATATCCACT	60	101

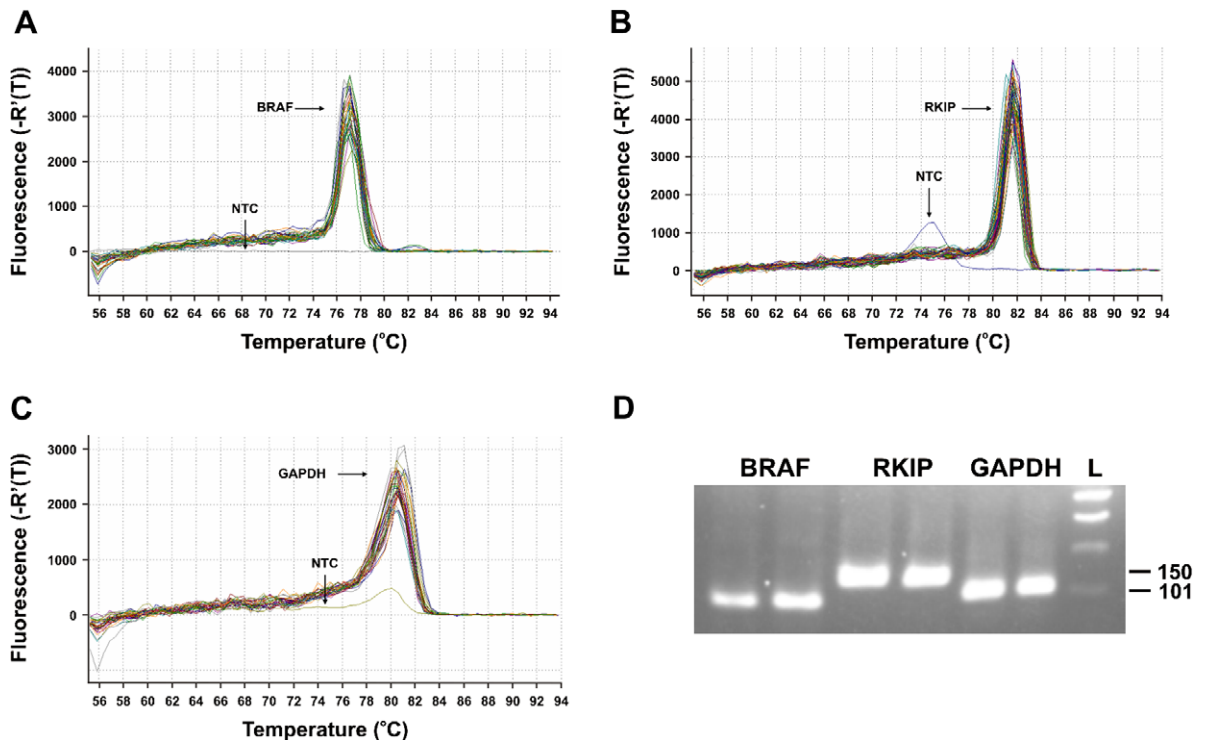


Fig. 1. Melt curve analysis for the genes BRAF (A), RKIP (B) and GAPDH (C). Single peaks for all genes and absence of peaks for the non-template controls (NTC) demonstrates the exclusion of any genomic DNA contamination and the specificity of the PCR products. (D) Verification of the product length and product specificity with a 2% agarose gel analysis. L, 100 bp ladder.

following formula: $\text{Normalized Sample/Control} = (1 + \text{Eff.}_{\text{GOI}})^{-\Delta C_t} \text{GOI} / (1 + \text{Eff.}_{\text{GAPDH}})^{-\Delta C_t} \text{GAPDH}$. Twofold increased or decreased expression was considered significant.

2.6. Statistical analysis

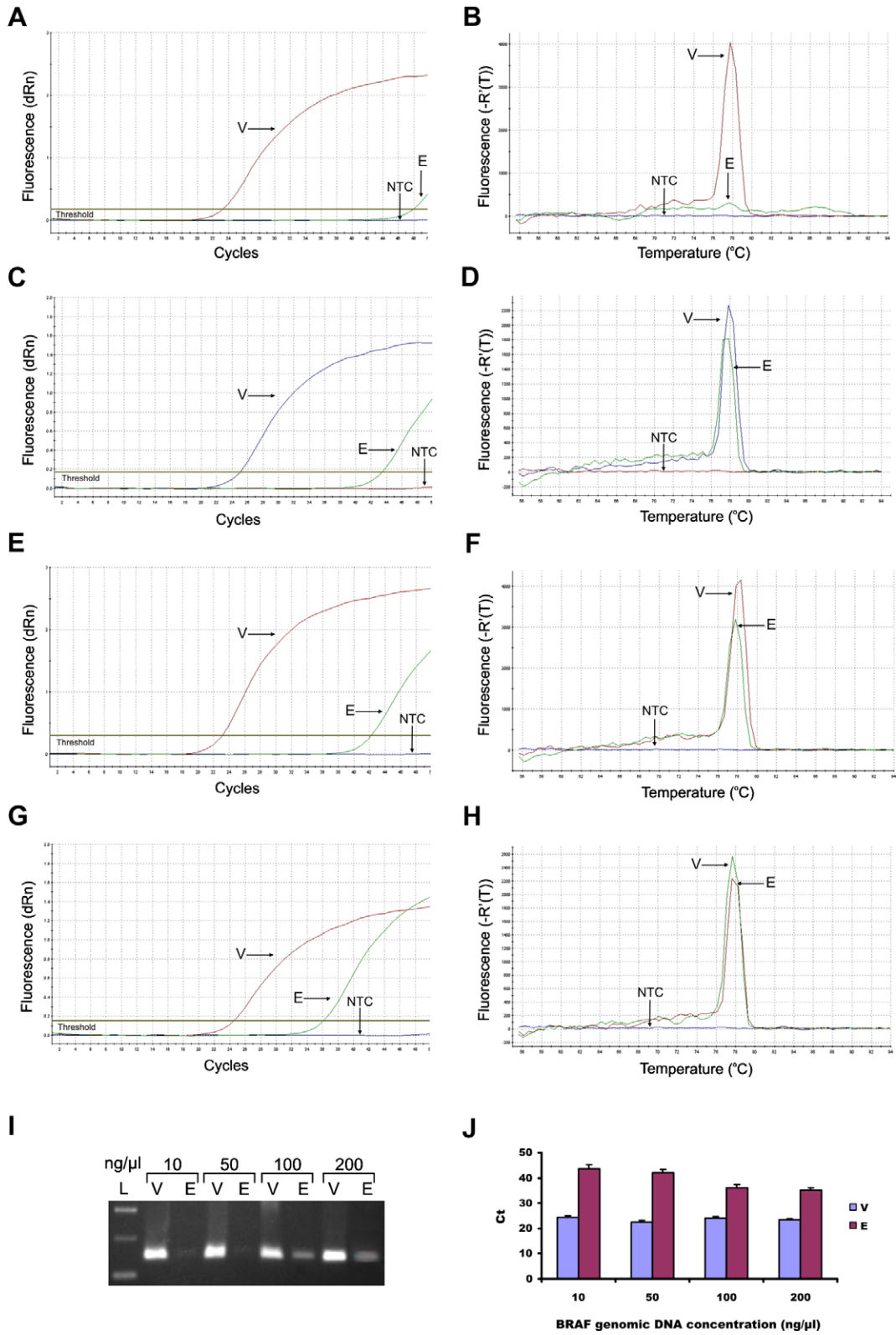
BRAF and RKIP mRNA levels were first evaluated by the one-sample Kolmogorov–Smirnov goodness of fit test, in order to determine whether they followed a normal distribution pattern. The non-parametric Spearman rank correlation was used to examine their relation pair-wise and their association with continuous variables (age, stage of NP, IgE levels). The Mann–Whitney *U* and Kruskal–Wallis *H* test, used when indicated by the analysis, were used to examine BRAF and RKIP expression status with

the various clinicopathological parameters after stratification. All statistical analyses were performed with SPSS 11.5 (SPSS, Chicago, IL). Statistical significance was set at the 95% level ($P < 0.05$).

3. Results

This study was conducted in order to investigate for BRAF mutations, as well as to assess mRNA levels for BRAF and RKIP in NPs, compared to both adjacent and control tissue mucosae. For the first part of our study, a sensitive real-time allele-specific PCR assay was carried out, along with direct sequencing of the BRAF PCR products. Regarding the expression analysis, we initially calculated the normalized values of both target genes to GAPDH for all tissues (NPs, AITs,

Fig. 2. Specificity and sensitivity of the BRAF V600E real-time detection assay in the sample 15P. Genomic DNA (10–200 ng) extracted from human nasal polyps was amplified as described in the text, with primer mix V (detection of *wt* BRAF) and mix E (detection of the V600E mutation). The fluorescence produced was measured at the end of each cycle. (A) and (B) Amplification and dissociation plots for a sample that was negative for the V600E mutation. Serial dilutions for sample 15P [50 ng/μl (C) and (D), 100 ng/μl (E) and (F), 200 ng/μl (G) and (H)] gave amplification and dissociation curves with the primer mix V. For each amplification, the cycle threshold value (C_t) corresponding to a normalized fluorescence of 0.1 was determined. The sample was analyzed in triplicate. (I) and (J), The C_t s of the reaction were inversely proportional to the concentration of the DNA extracted, so this was reflected as stronger bands for the DNA concentrations of 100 and 200 ng/μl, compared to those of 10 and 50 ng/μl, as depicted in a 2% agarose gel. NTC, non-template control.



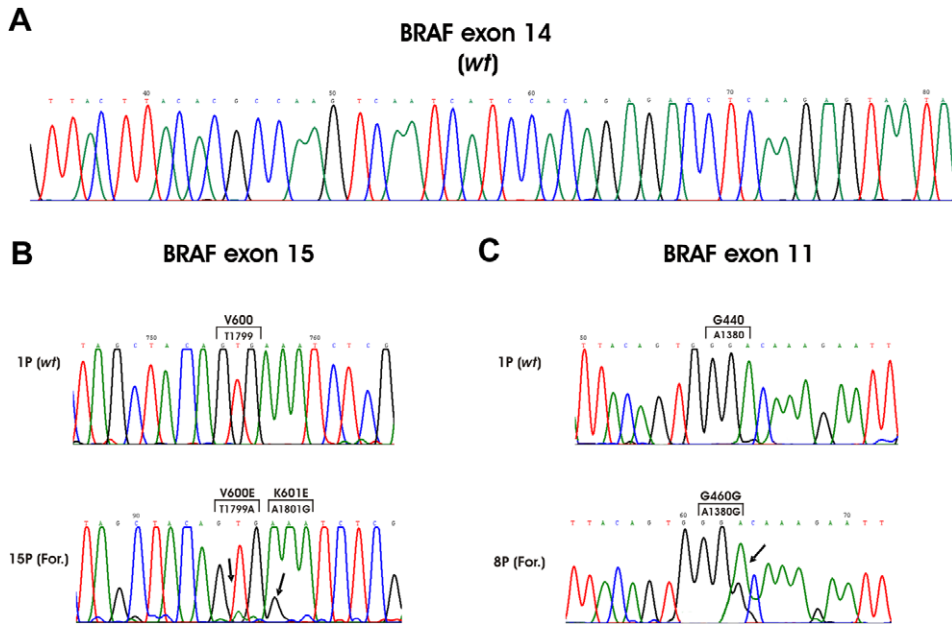


Fig. 3. (A) Direct sequencing of the PCR products verified the absence of mutation in exon 14, in the nasal polyp samples. (B) Direct sequencing for DNA sample 15P (lower panel) gave two mutations: a T→A substitution at nucleotide 1799 (V600E), which was later confirmed by the allele-specific real-time PCR, and a A→G substitution at nucleotide 1801 (K601E). Upper panel depicts the *wt* BRAF exon 15 sequence. (C) Direct sequencing for sample 8P gave a substitution of A→G, which was a silent mutation at nucleotide 1380 (G460G). Upper panel depicts the *wt* BRAF exon 11 sequence.

AMTs, CITs and CMTs) and compared the expression levels of the genes among NPs and the two types of calibrators: (i) the corresponding AIT and AMT and (ii) the CIT and CMT.

3.1. BRAF mutation analysis

Our interest was focused especially within exon 15. This hot spot was chosen because the reported BRAF activating mutations occur almost exclusively in this position. All cases of nasal polyp tissue, adjacent and control turbinate mucosae (inferior and middle) screened, were negative for mutations in exons 14 and 15. However, direct sequencing of the PCR product from one NP sample (15P) presented a slight secondary peak at nucleotide T1799 (1/23, 4%), resembling the background of the reaction. Quite interestingly, the application of real-time allele-specific PCR analysis for this NP sample, produced an amplification curve for primer mix E (apart from the “V curve”), at the later cycles of the reaction. For this sample, we also wanted to determine the sensitivity of the reactions, by preparing serial dilutions of DNA, with a range of concentration from 10 to 200 ng/μl. This resulted in acquiring C_s that were inversely proportional to the amount of genomic DNA used for the reaction. Of particular interest was the fact that, the “E curve” could be noticed even at a DNA concentration of 10 ng/μl, providing credit for the sensitivity of the reaction used (Fig. 2). Moreover, we detected another nucleotide change

(A1801G) in the same NP sample, leading to a K601E mutation. Still, as in the case of the V600E mutation, the electrophoregram’s peak was not as high as for the other nucleotides, suggesting a low copy number of mutated alleles. Moreover, we observed a silent mutation for BRAF exon 11 (A1380G, G460G), while the rest of the NP and mucosa tissues were wild-type for any mutations in the G-loop (exon 11) (Fig. 3).

3.2. Expression levels

Both BRAF and RKIP mRNA levels presented statistically significant differences among the four tissue types (BRAF, $P < 0.001$; RKIP, $P = 0.004$; Kruskal–Wallis) (Fig. 4). Specifically, the control turbinate mucosae presented higher mRNA levels compared to both the nasal polyps and their adjacent turbinate mucosae (AIT and AMT), for both genes (for BRAF, NP–CIT, $P = 0.008$; NP–CMT, $P = 0.012$; AIT–CIT, $P < 0.001$; AMT–CMT, $P = 0.001$; and for RKIP, NP–CIT, $P = 0.001$; NP–CMT, $P = 0.017$; AIT–CIT, $P < 0.001$; Mann–Whitney U test). Moreover, regarding the differences between the expression levels of the two genes within the same tissues, in the polyps and their adjacent turbinate mucosae, RKIP exhibited higher levels than BRAF, and the difference was statistically significant (in NP, $P = 0.003$; in AIT and in AMT, $P < 0.001$). As regards the expression levels of the two genes studied in correlation with the stage of the nasal polyps, we noted a proportional increase

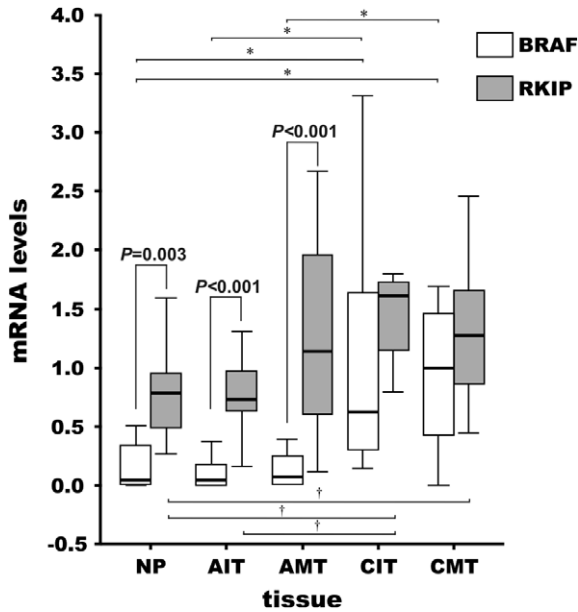


Fig. 4. The control turbinate mucosae presented higher mRNA levels compared to both the nasal polyps (NP) and their adjacent turbinate mucosae (AIT and AMT), for each gene (for BRAF $*P < 0.05$ and for RKIP $†P < 0.05$; Mann–Whitney *U* test). Moreover, regarding the differences between the expression levels of the two genes within the same tissues, in the polyps and their adjacent turbinate mucosae, RKIP exhibited higher mRNA levels than BRAF (in NP, $P < 0.03$; in AIT, $P < 0.001$ and in AMT, $P < 0.001$, respectively; Mann–Whitney *U* test), whereas the control turbinates did not present any statistically significant differences between the transcript levels of the two genes.

between these two variables, both for BRAF and RKIP. However, the small number of grade I polyps ($n = 3$)

did not allow us to conclude any statistically significant differences among the three polyp grades, and maybe suggests a stage effect in the expression of the two genes.

Measuring the *x*-fold difference among the four different tissue pair-combinations, we noted that the fold-expression was statistically higher between the tissue pairs NP/AIT (1.80 ± 2.04 , mean \pm SD) and NP/CIT (0.43 ± 0.75 , mean \pm SD) for BRAF ($P = 0.001$, Mann–Whitney); and between the pairs NP/AIT (1.14 ± 0.88 , mean \pm SD) and NP/CIT (0.55 ± 0.29 , mean \pm SD) for RKIP ($P = 0.005$, Mann–Whitney). The tissue pairs NP/AMT and NP/CMT, did not present any statistically significant differences either for BRAF (1.65 ± 2.72 and 1.49 ± 2.61 , respectively), or for RKIP (1.07 ± 0.91 and 0.66 ± 0.35 , respectively) (Fig. 5).

Finally, using the Spearman rank correlation, we tested the co-expression patterns of the two genes in a pair-wise manner in nasal polyp, adjacent and control turbinate tissue. This test examines whether the two genes are up-regulated or down-regulated together (positive correlation), or whether one gene has reduced expression when the other is over-expressed (negative correlation). In NP, AIT and CMT, the BRAF and RKIP genes are positively co-expressed together ($P = 0.012$, $P = 0.017$ and $P = 0.019$, respectively).

4. Discussion

The mRNA levels for both genes studied were higher in the grade II and III polyps, than in the smaller ones, but the difference was not statistically significant, probably due to the small number of grade I polyps ($n = 3$) or because the cause is rather random variation and not a stage effect.

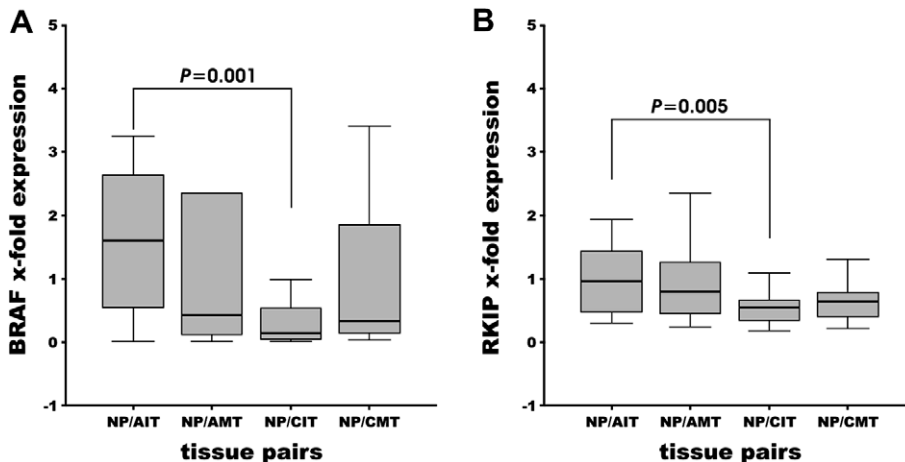


Fig. 5. *x*-fold expression among the four different tissue pair-combinations (NP/AIT, NP/AMT, NP/CIT and NP/CMT). The fold-expression was statistically higher between the tissue pairs NP/AIT and NP/CIT for BRAF and RKIP ($P = 0.001$ and $P = 0.005$, respectively; Mann–Whitney *U* Test).

The MAP kinase pathway is a major key signaling pathway in regulating cellular processes. Dysregulation of this pathway caused by mutations is frequently found in many cancers [22]. Previously, somatic activating mutations in the serine/threonine kinase BRAF were reported in melanomas (>60%) and other cancers, predominantly a V600E substitution (nucleotide change T1799A) in exon 15 [7]. A mutation in this site results from the insertion of a negatively charged residue adjacent to the regulatory phosphorylation site at T598, which may mimic regulatory phosphorylation and lead to constitutive activation of BRAF independent of RAS. Herein we describe the first investigation of this mutation in human nasal polyposis, as well as in inferior and middle turbinate mucosae adjacent to the polyp. One NP sample seemed to carry the V600E mutation, and the result was verified with a real-time allele-specific PCR method. Moreover, the same sample also carried an adjacent nucleotide change (A1801G). Different prevalences of BRAF T1799A transversions observed in the literature, might reflect the heterogeneity of the sample groups analyzed or might arise from the application of methods with different sensibilities.

An additional spectrum of mutations within exons 11 and 15 were found in malignant melanoma and other cancer types, resulting in the permanent activity of BRAF [7,23–27]. We therefore analyzed the coding region of exons 11 and 15, including the exon–intron junctions, in human nasal polyps. The mutation frequency within the activation segment (exon 15) was very low (only two adjacent mutations, a V600E and a K601E, within one NP sample, at a percentage of 4% each), as well as in the G-loop (exon 11) where a silent mutation (A1380G) was noted, also at 4%, leading us to the conclusion that the most frequent BRAF alterations described in several tumor types do not seem to play an important role in the presence of NP. This study investigated the whole BRAF exon 14 of the kinase domain as well, but no mutation was found. This corresponds with the results of comprehensive analyses that have sequenced the entire coding region of BRAF and failed to show mutations outside exons 11 and 15 [7,19,28]. We do not believe that BRAF alterations are a frequent event in human nasal polyposis. By contrast, a significant proportion of nasal polyps and their adjacent turbinates, harbor mutations of KRAS, an additional major activator of the MAP kinase pathway, in codons 11 and 12 (17 and 35%, respectively) [30]. Interestingly, the lack

of BRAF mutations in the NPs and their adjacent turbinate mucosae, in combination with the incidence of KRAS mutations within the same tissues, is consistent with the concept that BRAF and KRAS mutations are mutually exclusive events, suggesting a linear functional relationship for these components in the complex signaling pathways [7,29,30].

Recently, RAF kinase inhibitor protein (RKIP), apart from RAF-1, was shown to bind and inhibit BRAF, thus disrupting the interaction between RAF and its substrate MEK. Therefore, BRAF is prohibited from phosphorylating MEK [13]. Apart from the MEK cascade, RKIP blocks the activation of several signaling pathways G-proteins and NFkappaB [32]. We found that in the NPs and their adjacent turbinate mucosae, RKIP exhibited higher levels than BRAF, and the difference was statistically significant. These results seem to concur, and they can also be justified by the finding of Park et al., that RKIP binds and inhibits BRAF as well. A link between RKIP and cancer was supplied when it was determined that a metastatic prostate cancer cell line (C42-B) expressed lower RKIP levels than the non-metastatic cell line from which it was derived (LnCaP) [31]. Using immunocytochemistry to assess RKIP levels in prostate tissue, it was found that benign tissue expressed the highest levels of RKIP, cancerous tissue expressed significantly less, and that RKIP expression was lowest in metastatic tissue [14]. This down-regulation of the RKIP expression in metastatic prostate cancers and the loss of RKIP levels, suggest a promotion of the metastatic potential of prostate cancer cells [14]. Nasal polyps are benign growths that prolapse into the nasal cavity, and they are not associated either with malignant transformation, or metastasis. However, in the present study we reported low RKIP mRNA levels in NP, as well as in the adjacent turbinate mucosae (inferior and middle), compared to turbinate mucosae from healthy subjects. Our results, in combination with those of Fu et al. [14], suggest that RKIP expression levels seem to follow a scaled-order, decreasing from normal tissue, to benign tumor, to cancer and finally, metastasis.

It must be noted though, that the expression levels of the BRAF gene were also lower in the tissues of the patients suffering from NP, compared with the controls. However, when comparing the expression levels of the two genes studied, within the same tissue, we noted that RKIP exhibited higher mRNA levels than BRAF in the pathologic tissues, i.e. nasal

polyps and their adjacent turbinate mucosae. This indicates a strong connection between the two molecules, and probably the negative effect that RKIP exerts on the expression of BRAF in NP, as well as in the turbinate mucosa adjacent to the polyp, usually characterized by hypertrophy. Although these findings are of particular interest, yet the relationship between the two gene products is not absolutely elucidated, and further confirmatory studies by Western blotting remain to be done in order to strengthen the results.

In summary, the present comprehensive study demonstrates that the most frequent alterations in the BRAF gene are detected in a minor percentage and do not seem to play an important role in the presence of human nasal polyposis. Moreover, this is the first report of low BRAF and RKIP mRNA levels in NPs, as well as in the adjacent turbinate mucosae (inferior and middle), compared to turbinate mucosae from healthy subjects. Nonetheless, RKIP presented higher mRNA levels than BRAF in the pathologic tissues, suggesting that RKIP could play an important role in the down-regulation of wild-type BRAF, serving thus as an endogenous inhibitor of the MAPK pathway in nasal polyps and their adjacent turbinate mucosae.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.canlet.2008.01.046](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.01.046).

References

- [1] N.D. Bateman, C. Fahy, T.J. Woolford, Nasal polyps: still more questions than answers, *J. Laryngol. Otol.* 117 (2003) 1–9.
- [2] P.L. Larsen, M. Tos, W. Kuijpers, et al., The early stages of polyp formation, *Laryngoscope* 102 (1992) 670–677.
- [3] T. Norlander, K.M. Westrin, M. Fukami, et al., Experimentally induced polyps in the sinus mucosa: a structural analysis of the initial stages, *Laryngoscope* 106 (1996) 196–203.
- [4] E. O'Neill, W. Kolch, Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway, *Br. J. Cancer* 90 (2004) 283–288.
- [5] N.S. Duesbery, C.P. Webb, G.F. Vande Woude, MEK wars, a new front in the battle against cancer, *Nat. Med.* 5 (1999) 736–737.
- [6] J. Avruch, A. Khokhlatchev, J.M. Kyriakis, et al., Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade, *Recent Prog. Horm. Res.* 56 (2001) 127–155.
- [7] H. Davies, G.R. Bignell, C. Cox, et al., Mutations of the BRAF gene in human cancer, *Nature* 417 (2002) 949–954.
- [8] K. Yeung, T. Seitz, S. Li, et al., Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP, *Nature* 401 (1999) 173–177.
- [9] K. Yeung, P. Janosch, B. McFerran, et al., Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 3079–3085.
- [10] S. Boldt, W. Kolch, Targeting MAPK signalling: prometheus' fire or Pandora's box?, *Curr Pharm. Des.* 10 (2004) 1885–1905.
- [11] C. Wellbrock, L. Ogilvie, D. Hedley, et al., V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes, *Cancer Res.* 64 (2004) 2338–2342.
- [12] S. Park, O. Rath, S. Beach, et al., Regulation of RKIP binding to the N-region of the Raf-1 kinase, *FEBS Lett.* 580 (2006) 6405–6412.
- [13] S. Park, M.L. Yeung, S. Beach, et al., RKIP downregulates B-Raf kinase activity in melanoma cancer cells, *Oncogene* 24 (2005) 3535–3540.
- [14] Z. Fu, P.C. Smith, L. Zhang, et al., Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis, *J. Natl. Cancer Inst.* 95 (2003) 878–889.
- [15] M.M. Schuierer, F. Bataille, S. Hagan, et al., Reduction in Raf kinase inhibitor protein expression is associated with increased Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling in melanoma cell lines, *Cancer Res.* 64 (2004) 5186–5192.
- [16] L. Malm, Assessment and staging of nasal polyposis, *Acta Otolaryngol.* 117 (1997) 465–467.
- [17] M.S. Dykewicz, S. Fineman, D.P. Skoner, Joint Task Force summary statements on diagnosis and management of rhinitis, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 81 (1998) 474–477.
- [18] R. Kumar, S. Angelini, K. Czene, et al., BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 3362–3368.
- [19] S.T. Yuen, H. Davies, T.L. Chan, et al., Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia, *Cancer Res.* 62 (2002) 6451–6455.
- [20] A. Gorden, I. Osman, W. Gai, et al., Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues, *Cancer Res.* 63 (2003) 3955–3957.
- [21] Y. Cohen, N. Goldenberg-Cohen, P. Parrella, et al., Lack of BRAF mutation in primary uveal melanoma, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44 (2003) 2876–2878.
- [22] G.L. Johnson, R. Lapadat, Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases, *Science* 298 (2002) 1911–1912.
- [23] E.T. Kimura, M.N. Nikiforova, Z. Zhu, et al., High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma, *Cancer Res.* 63 (2003) 1454–1457.
- [24] K. Naoki, T.H. Chen, W.G. Richards, et al., Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma, *Cancer Res.* 62 (2002) 7001–7003.
- [25] M.S. Brose, P. Volpe, M. Feldman, et al., BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma, *Cancer Res.* 62 (2002) 6997–7000.
- [26] M.N. Nikiforova, R. Ciampi, G. Salvatore, et al., Low prevalence of BRAF mutations in radiation-induced thyroid

- tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas, *Cancer Lett.* 209 (2004) 1–6.
- [27] N. Ishimura, K. Yamasawa, M.A.K. Rumi, Y. Kadowaki, et al., BRAF and K-ras gene mutations in human pancreatic cancers, *Cancer Lett.* 199 (2003) 169–173.
- [28] H. Rajagopalan, A. Bardelli, C. Lengauer, et al., Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status, *Nature* 418 (2002) 934.
- [29] A. Zaravinos, J. Bizakis, G. Soufla, et al., Mutations and differential expression of the ras family genes in human nasal polyposis, *Int. J. Oncol.* 31 (2007) 1051–1059.
- [30] P. Soares, V. Trovisco, A.S. Rocha, et al., BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC, *Oncogene* 22 (2003) 4578–4580.
- [31] Z. Fu, Y. Kitagawa, R. Shen, et al., Metastasis suppressor gene Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a novel prognostic marker in prostate cancer, *Prostate* 66 (2006) 248–256.
- [32] E.T. Keller, Z. Fu, K. Yeung, M. Brennan, Raf kinase inhibitor protein: a prostate cancer metastasis suppressor gene, *Cancer Lett.* 207 (2004) 131–137.