



(: . .)

RAS BRAF

2011

μ μ
μ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΕΠΩΝΥΜΟ	Μπουλαλάς
ΟΝΟΜΑ	Ιωάννης
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ	Γεώργιος
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	12-2-1965
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	Ανεμοχώριο Ηλείας
ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΗ ΘΗΤΕΙΑ	Στρατός Ξηράς
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	Έγγαμος
ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ	Ελληνική
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ	Περικλέους 117, Τ.Κ. 15231 Κ. Χαλάνδρι-Αθήνα
ΤΗΛΕΦΩΝΟ	210 6777018, 6944260050
E-MAIL	i.boulalas@yahoo.gr

ΣΠΟΥΔΕΣ-ΕΡΓΑΣΙΑ

1982	Απολυτήριο από το 2 ^ο Λύκειο Αθηνών (<i>Άριστα: 18 και 7 /12</i>)
1998	Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών (<i>Λίαν καλώς: 7.13</i>)
1998	Άδεια άσκησης Ιατρικού επαγγέλματος
1999	Αγροτικός Ιατρός (Π.Ι.Ρουστίκων-Κ.Υ.Σπηλίου-Ν.Ρεθύμνου)
2000	Ειδικευόμενος ιατρός στη Χειρουργική Κλινική του Γενικού Νομαρχιακού Νοσοκομείου Ρεθύμνου.
2001-2005	Ειδικευόμενος ιατρός στην Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.
2005	Part I - European Board Examination in Urology.
2006	Τίτλος ειδικότητας Ουρολογίας.
2006-2007	Επικουρικός Επιμελητής Β' στην Ουρολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου "Ασκληπιείο" Βούλας.

2007-2011	Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με τίτλο «Μεταλλαγές και έκφραση των ογκογονιδίων RAS και BRAF στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης». Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας (Επιβλέπων Καθηγητής: Δ.Α. Σπαντίδος), Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
2007-2008	Επικουρικός Επιμελητής Β' στην Ουρολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Αγ. Νικολάου.
2009-2010	Επικουρικός Επιμελητής Β' στην Ουρολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Αγ. Νικολάου.
2010	Επιμελητής Β' στην Ουρολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Αγ. Νικολάου.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

Διδακτορική διατριβή (2007-2011)

«Μεταλλαγές και έκφραση των ογκογονιδίων RAS και BRAF στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης». Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας (Επιβλέπων Καθηγητής: Δ.Α. Σπαντίδος), Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Διακρίσεις-Βραβεία

I. Μπουλαλάς, Ν. Χόνδρος, Μ. Ραϊσιάκη, Σ. Γιαρμενίτης, Φ. Σοφράς: Ολοκληρωμένη απεικόνιση των νεφρών και της αποχετευτικής μοίρας με πολυτομική υπολογιστική τομογραφία (MSCT). Μια εκπαιδευτική παρουσίαση. **Α΄ βραβείο Αναρτημένης Ανακοίνωσης, 17^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 23-26/6/2004, Αλεξανδρούπολη.**

Πλήρεις επιστημονικές εργασίες σε Ξενόγλωσσα περιοδικά

- I. Boulalas**, A. Zaravinos, I. Karyotis, D. Delakas, D.A. Spandidos. Activation of the Ras family genes in urothelial carcinoma. J Urol 2009, 181 (5): 2312-9.
- I. Boulalas**, A. Zaravinos, D. Delakas, D.A. Spandidos. Mutational analysis of the BRAF gene in transitional cell carcinoma (TCC) of the bladder. Int J Biol Markers 2009, 24 (1): 17-21.
- A. Zaravinos, M. Chatziioannou, GI. Lambrou, **I. Boulalas**, D. Delakas, D.A. Spandidos. Implication of RAF and RKIP genes in urinary bladder cancer. Pathol Oncol Res. 2011, 17(2):181-90.
- A. Zaravinos, GI. Lambrou, **I. Boulalas**, D. Delakas, DA. Spandidos. Identification of common differentially expressed genes in urinary bladder cancer. PLoS One. 2011, 4;6(4):e18135.

Βιβλιογραφικές αναφορές (CITATIONS)

- Boulalas I. Int J Biol Markers 2009, 24(1): 17-21 της εργασίας **3.1**
- Gao J. Am J Transl Res 2009, 25;1(3): 312-325 της εργασίας **3.1**
- Ou L. Cancer Genet Cytogenet 2010, 15;200(2): 110-119 της εργασίας **3.1**

4. Pollard C. Expert Rev Mol Med 2010, 25;12: 1-20 της εργασίας **3.1**
5. Peuhu E. BMC Cancer 2010 3;10: 521 της εργασίας **3.1**
6. Zaravinos A. Pathol Oncol Res 2011, 17(2): 181-190 της εργασίας **3.1**
7. Cheng L. Human Pathology 2011, 42(4): 455-481 της εργασίας **3.1**
8. Radojicic J. Cell cycle 2011, 1;10(3): 507-517 της εργασίας **3.1**
9. Zaravinos A. PLoS ONE 2011, 5;6(4): e18255 της εργασίας **3.1**
10. Sjö Dahl G. PLoS One 2011, 14;6(4): e18583 της εργασίας **3.1**
11. Zaravinos A. Pathol Oncol Res 2011, 17(2): 181-190 της εργασίας **3.2**
12. Sjö Dahl G. PLoS One 2011, 14;6(4): e18583 της εργασίας **3.2**
13. Zaravinos A. PLoS ONE 2011, 5;6(4): e18255 της εργασίας **3.2**
14. Radojicic J. Cell cycle 2011, 1;10(3): 507-517 της εργασίας **3.3**
15. Zaravinos A. PLoS ONE 2011, 5;6(4): e18255 της εργασίας **3.3**
16. Zaravinos A. PLoS ONE 2011, 5;6(4): e18255 της εργασίας **3.4**

Περίληψεις (Abstracts) δημοσιευμένες σε ξενόγλωσσα περιοδικά

1. M.Nomikos, I. Heretis, **I. Boulalas**, E. Mauromanolakis, G. Aggelidakis, F. Sofras. First clinical experience with extracorporeal lithotripter Doli S-220F-XP for the treatment of urinary lithiasis. Urol Res 2005, 33(2): 145.
2. C. Konstantinidis, S. Andreadakis, **I. Boulalas**, P. Kartsaklis, G. Barbaras, I. Palaiodimos A.Gekas, D. Delakas. Is sildenafil effective in premature ejaculation? A prospective multicenter study. Eur Urol Suppl 2007, 6(2): 335.
3. D. Volanis, I. Karyotis, **I. Boulalas**, C. Konstantinidis, D. Delakas. Bleeding incidence following transrectal ultrasound guided prostate biopsy in patients taking low dose aspirin. Urology 2007, 70 (Supplement 3A):275.
4. D. Volanis, I. Karyotis, **I. Boulalas**, E. Serafetinidis, D. Delakas. Independent predictors of bladder outlet obstruction associated with benign prostatic hyperplasia. Urology 2007, 70(Supplement 3A):249.
5. I. Karyotis, **I. Boulalas**, D. Volanis, E. Serafetinidis, A. Ploumidis, D. Delakas. Predictors of prostate cancer on initial biopsy. European Urology Meetings 2007, 2(5):52.
6. **I. Boulalas**, A. Zaravinos, D. Volanis, E. Serafetinidis, D. Delakas, D.A. Spandidos. Activation of the ras family genes in transitional cell carcinoma (TCC). Int. J Mol Med 2008, Vol 22, Suppl 1: S84.
7. **I. Boulalas**, A. Zaravinos, D. Volanis, I. Kariotis, D. Delakas, D.A. Spandidos. Absence of B-RAF mutations in transitional cell carcinoma (TCC). Int J Mol Med 2008, Vol 22, Suppl 1: S84.
8. A. Ploumidis, **I. Boulalas**, A. Zaravinos, I. Karyotis, D. Delakas, D.A. Spandidos. Mutations and expression of the ras family genes in urothelial carcinoma. J Urol 2009 Vol.181, No. 4, Supplement: 344.
9. M. Chatziioannou, A. Zaravinos, **I. Boulalas**, D.A. Spandidos: RAF and RKIP implication in urinary bladder cancer. Int J Mol Med 2009, Vol 24, Suppl 1: S67.
10. A. Zaravinos, GI Lambrou, **I. Boulalas**, D. Delakas, DA. Spandidos: Expression profiling of bladder carcinoma. An investigation using cDNA microarrays and GEO computational analysis. Int. J. of Mol Med 2010, Vol 26, Suppl 1: S53.
11. A. Zaravinos, GI. Lambrou, **I. Boulalas**, D. Delakas, DA. Spandidos: Spotlight on differentially expressed genes in urinary bladder cancer vs. healthy tissue, as well as in invasive vs. superficial tumours. Int. J. of Mol Med 2010, Vol 26, Suppl 1: S54

Περίληψεις (Abstracts) δημοσιευμένες σε Ελληνικά περιοδικά

1. **I. Μπουλαλάς**, Α. Ζαραβίνος, Δ. Βολάνης, Ε. Σεραφετινίδης, Δ. Δελακάς, Δ.Α. Σπαντίδος. Επίπτωση των μεταλλάξεων των RAS ογκογονιδίων στο ουροθηλιακό καρκίνωμα. Ελληνική Ουρολογία 2008, 20 (4): 49–50.
2. **I. Μπουλαλάς**, Α. Ζαραβίνος, Δ. Βολάνης, Ι. Καρυώτης, Δ. Δελακάς, Δ.Α. Σπαντίδος. Μελέτη της συχνότητας των μεταλλάξεων του ογκογονιδίου BRAF (serine/threonine-kinase B-type Raf kinase), στο ουροθηλιακό καρκίνωμα. Ελληνική Ουρολογία 2008, 20 (4): 49–50.
3. Δ. Δελακάς, Ι. Καρυώτης, Α. Πλουμίδης, Ν. Τζανάκης, **I. Μπουλαλάς**, Ι. Καρδάκος. Αποκατάσταση κυστεοεντερικού συριγγίου μετά από ριζική κυστεοπροστατεκτομή. Ελληνική Ουρολογία 2008, 20 (4): 49–50.

Πλήρεις επιστημονικές εργασίες σε Ελληνικά περιοδικά

1. Μ. Νομικός, Γ. Δασκαλόπουλος, **I. Μπουλαλάς**, Φ. Σοφράς. Η σημασία του ουροδυναμικού ελέγχου στη θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας. Ελληνική Ουρολογία 2005, 17 : 85 – 90.
2. **I. Μπουλαλάς**: Βιοϊλικά και Ουρολογία. Σύγχρονη Ουρολογία, 2005, 4: 16-19 (εκδίδεται από την Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Κρήτης).
3. Δ. Βολάνης, Ι. Καρυώτης, **I. Μπουλαλάς**, Χ. Κωνσταντινίδης, Ε. Σεραφετινίδης, Δ. Δελακάς. Η χρήση της καθοδηγούμενης με υπερήχους διαδερμικής νεφροστομίας στην αντιμετώπιση των επειγουσών αποφράξεων του ανώτερου ουροποιητικού. Ελληνική Ουρολογία 2007, 19: 175–180.
4. Α. Πλουμίδης, **I. Μπουλαλάς**, Ν. Τζανάκης, Δ. Δελακάς. Σπάνια περίπτωση ουρητηρικής απόφραξης ως συνέπεια ουρητηροβουβνοκλήλης. Ελληνική Ουρολογία, 2009, 21: 64-67.
5. Δ. Βολάνης, Ι. Καρυώτης, **I. Μπουλαλάς**, Π. Φιλίππου, Ε. Σεραφετινίδης, Δ. Δελακάς. Ασφάλεια της καθοδηγούμενης με υπερήχους εκτεταμένης διορθικής βιοψίας του προστάτη σε ασθενείς που λαμβάνουν χαμηλή δόση ακετυλοσαλικυλικού οξέος. Ελληνική Ουρολογία 2009, 21: 288-295.

Ανακοινώσεις σε Διεθνή συνέδρια

1. M. Nomikos, G. Daskalopoulos, J. Karyotis, **I. Boulalas**, D. Delakas, F. Sofras. Predictions of proteinuria and / or chronic renal failure after radical nephrectomy. 8th Congress European Society for Urological Research 4-6/11/2004, Athens, Greece.
2. M. Nomikos, I. Heretis, **I. Boulalas**, E. Mauromanolakis, G. Aggelidakis, F. Sofras. First clinical experience with extracorporeal lithotripter Doli S -220F-XP for the treatment of urinary lithiasis. 4th eULIS Symposium 16-18/6/2005, Coburg, Germany.
3. I. Heretis, **I. Boulalas**, M. Nomikos, O. Delibaltidis, K. Eleftheriadis, A. Anifantakis, S. Sofras. Extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL) as treatment of lithiasis in horseshoe kidney. 9th Symposium of the Greek- German Urological Association 29/6-3/7/2005, Athens, Greece.
4. C. Konstantinidis, S. Andreadakis, **I. Boulalas**, P. Kartsaklis, G. Barbaras, I. Palaiodimos, A. Gekas, D. Delakas. Is sildenafil effective in premature ejaculation? A prospective multicenter study. 22th EAU Congress 21-24 March 2007, Berlin, Germany.
5. D. Volanis, I. Karyotis, **I. Boulalas**, C. Konstantinidis, D. Delakas. Bleeding incidence following transrectal ultrasound guided prostate biopsy in patients taking low dose aspirin. 29th Congress of the Société Internationale d'Urologie 2-6/9/2007, Paris, France.

6. D. Volanis, I. Karyotis, **I. Boulalas**, E. Serafetinidis, D. Delakas. Independent predictors of bladder outlet obstruction associated with benign prostatic hyperplasia. 29th Congress of the Société Internationale d' Urologie 2-6/9/2007, Paris, France.
7. I. Karyotis, **I. Boulalas**, D. Volanis, E. Serafetinidis, A. Ploumidis, D. Delakas. Predictors of prostate cancer on initial biopsy. EAU 3rd South Eastern European Meeting 5-6 October 2007, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.
8. **I. Boulalas**, A. Zaravinos, D.Volanis, E.Serafetinidis, D. Delakas, D.A. Spandidos. Activation of the ras family genes in transitional cell carcinoma (TCC). 13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine, 9-11 October 2008, Hersonissos, Crete, Greece.
9. **I. Boulalas**, A. Zaravinos, D. Volanis, I. Kariotis, D. Delakas, D.A. Spandidos. Absence of B-RAF mutations in transitional cell carcinoma (TCC). 13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine, 9-11 October 2008, Hersonissos, Grete, Greece.
10. A. Ploumidis, **I. Boulalas**, A. Zaravinos, I.Karyotis, D. Delakas, D.A. Spandidos. Mutations and expression of the ras family genes in urothelial carcinoma. AUA Annual Meeting 25-30 April 2009, Chicago, IL.
11. **I. Boulalas**, P. Filippou, K. Pagonidis, E. Serafetinidis, I. Karyotis, E. Lianos, D. Delakas. The role of ultrasonography for Mondor's disease of the penis. 16th European Symposium on Urogenital Radiology: Urogenital manifestations of systemic diseases 10-13 September 2009 Athens, Greece.
12. M. Chatziioannou, A. Zaravinos, **I. Boulalas**, D.A. Spandidos. RAF and RKIP implication in urinary bladder cancer. 14th World Congress on Advances in Oncology and 12th International Symposium on Molecular Medicine, 15-17 October 2009, Loutraki, Greece.
13. A. Zaravinos, GI. Lambrou, **I. Boulalas**, I. Karyotis, D. Delakas, DA. Spandidos. Gene expression profiling and classification of urinary bladder cancer. A computational study using microarrays. 3rd World Congress on Controversies in Urology 25-28 February 2010, Athens, Greece.
14. A. Zaravinos, GI Lambrou, **I. Boulalas**, D. Delakas, DA. Spandidos. Expression profiling of bladder carcinoma. An investigation using cDNA microarrays and GEO computational analysis. 15th World Congress on Advances in Oncology and 13th International Symposium on Molecular Medicine, 7-9 October 2010, Loutraki, Greece.
15. A. Zaravinos, GI. Lambrou, **I. Boulalas**, D. Delakas, DA. Spandidos. Spotlight on differentially expressed genes in urinary bladder cancer vs. healthy tissue, as well as in invasive vs. superficial tumours. 15th World Congress on Advances in Oncology and 13th International Symposium on Molecular Medicine, 7-9 October 2010, Loutraki, Greece.
16. A. Zaravinos, GI.Lambrou, **I. Boulalas**, D.Volanis, D.Delakas, DA.Spandidos. Expression profiling og urinary bladder carcinoma. Spotlight on differentially expressed genes in invasive vs. superficial tumors. Excellence-in-oncology November 18-20, Athens, Greece.
17. A. Zaravinos, GI.Lambrou, J. Radojicic, D. Volanis, **I. Boulalas**, D. Delakas, DA. Spandidos: Expression profile of oncomiRs and tumor-suppressor miRs in urothelial carcinoma of the bladder. 4rd World Congress on Controversies in Urology 27-30 January 2011, Paris. France.
18. A. Zaravinos, J.Radojicic, GI. Lambrou, D. Volanis, **I. Boulalas**, D. Delakas, D A. Spandidos: miR-21 can be used as independent prognostic factor for survival and metastasis in urinary bladder cancer. 4rd World Congress on Controversies in Urology 27-30 January 2011, Paris. France.
19. A. Zaravinos, D. Volanis, I. Karyotis, **I. Boulalas**, GI. Lambrou, V. Zoumpourlis, D. Delakas, DA. Spandidos: The tumour suppressor RhoB is an independent prognostic factor for metastasis in

urinary bladder cancer. 4th World Congress on Controversies in Urology 27-30 January 2011, Paris, France.

Ανακοινώσεις σε Πανελλήνια συνέδρια

1. Θ. Τριανταφύλλου, Ι. Καρυώτης, Ι. Μπουλαλάς, Ι. Χαιρέτης, Π. Ανεζίνης: Σοβαρές επιπλοκές μετά από ενδοκυστική χορήγηση BCG για τη θεραπεία επιφανειακών όγκων της ουροδόχου κύστης. 16^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 25-29/9/2002, Καλαμάτα.
2. Θ. Τριανταφύλλου, Ι. Χαιρέτης, Π. Τσέμπισσεφ, Ι. Μπουλαλάς, Ε. Μαυρομανωλάκης, Δ. Δελακάς: Ριζική κυστεκτομή και δημιουργία ορθότοπης εγκρατούς νεοειλεοκύστης κατά Hautmann σε γυναίκες με καρκίνο κύστης. 16^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 25-29/9/2002, Καλαμάτα.
3. Ι. Χαιρέτης, Θ. Τριανταφύλλου, Ι. Μπουλαλάς, Γ. Δασκαλόπουλος, Δ. Δελακάς: Αντιμετώπιση παιδιών και νεαρών ενηλίκων με καρκίνο της ουροδόχου κύστης από μεταβατικό επιθήλιο. 16^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 25-29/9/2002, Καλαμάτα.
4. Ι. Χαιρέτης, Ε. Μαυρομανωλάκης, Ι. Μπουλαλάς, Μ. Νομικός, Δ. Δελακάς: Χορήγηση Σιλδεναφίλης σε ασθενείς με πρωτοπαθή πρόωρη εκσπερμάτιση. 16^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 25-29/9/2002, Καλαμάτα.
5. Π. Τσέμπισσεφ, Ι. Τρίτου, Μ. Νομικός, Ι. Μπουλαλάς, Π. Ανεζίνης: Διαγνωστικά προβλήματα σε τυχαία ανευρισκόμενες μικρές νεφρικές μάζες, κυστικά μορφώματα με αιμορραγικά στοιχεία ή/και αποπιτανώσεις. 16^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 25-29/9/2002, Καλαμάτα.
6. Ε. Μαυρομανωλάκης, Κ. Ελευθεριάδης, Β. Αδαμόπουλος, Ι. Μπουλαλάς, Γ. Αγγελιδάκης, Γ. Δασκαλόπουλος: Πρόωρη εκσπερμάτιση: συγκριτική μελέτη αντιμετώπισης με χορήγηση μόνο σιλδεναφίλης ή συνδυασμού σιλδεναφίλης και τοπική χρήση κρέμας λιδοκαΐνης-πριλοκαΐνης (EMLA). 4^ο Ανδρολογικό Συνέδριο 23-24/1/2004, Πάτρα.
7. Ι. Μπουλαλάς, Ν. Χόνδρος, Μ. Ραϊσιάκη, Σ. Γιαρμενίτης, Φ. Σοφράς: Ολοκληρωμένη απεικόνιση των νεφρών και της αποχετευτικής μοίρας με πολυτομική υπολογιστική τομογραφία (MSCT). Μια εκπαιδευτική παρουσίαση. 17^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 23-26/6/2004, Αλεξανδρούπολη.
8. Ι. Χαιρέτης, Ι. Μπουλαλάς, Ε. Μαυρομανωλάκης, Κ. Ελευθεριάδης, Ο. Δελιμπαλιτίδης, Φ. Σοφράς: Η εξωσωματική λιθοτριψία (ESWL) σε λιθίαση πεταλοειδούς νεφρού. 17^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 23-26/6/2004, Αλεξανδρούπολη.
9. Ε. Κατσιπή, Ι. Χριστοδούλου, Κ. Παγωνίδης, Γ. Μενιουδάκης, Κ. Στυλιανού, Ι. Μανούσacas, Π. Ανεζίνης, Ι. Μπουλαλάς, Ε. Δαφνής: Σύνδρομο άλγους νεφρικής χώρας -αιματοουρίας σε νεαρή γυναίκα. 70^η Επιστημονική Συνάντηση Ελληνικής Νεφρολογικής Εταιρείας 17-18/11/2005, Θεσσαλονίκη.
10. Α. Πλουμίδης, Ι. Καρυώτης, Δ. Βολάνης, Ι. Μπουλαλάς, Π. Μελίδης, Δ. Δελακάς: Είναι δυνατή η συνύπαρξη ουρητήρα στο σάκο βουβωνοκήλης; 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικού Κολλεγίου Χειρουργών 17- 19/4/2008, Αθήνα.
11. Ι. Μπουλαλάς, Α. Ζαραβίνος, Δ. Βολάνης, Ε. Σεραφετινίδης, Δ. Δελακάς, Δ.Α. Σπαντίδος: Επίπτωση των μεταλλάξεων των RAS ογκογονιδίων στο ουροθηλιακό καρκίνωμα. 19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 1-5/10/2008, Χαλκιδική.
12. Ι. Μπουλαλάς, Α. Ζαραβίνος, Δ. Βολάνης, Ι. Καρυώτης, Δ. Δελακάς, Δ.Α. Σπαντίδος: Μελέτη της συχνότητας των μεταλλάξεων του ογκογονιδίου BRAF (serine/threonine-kinase B-type Raf kinase), στο ουροθηλιακό καρκίνωμα. 19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 1-5/10/2008, Χαλκιδική.
13. Δ. Δελακάς, Ι. Καρυώτης, Α. Πλουμίδης, Ν. Τζανάκης, Ι. Μπουλαλάς, Ι. Καρδάκος: Αποκατάσταση κυστεοεντερικού συριγγίου μετά από ριζική κυστεοπροστατεκτομή. 19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 1-5/10/2008, Χαλκιδική.

14. A. Ζαραβίνος, ΓΙ. Λάμπρου, Ι. Μπουλαλάς, Δ.Δελακάς, ΔΑ. Σπαντίδος: Καταγραφή του γονιδιακού προφίλ στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. 20^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 23-27 Οκτωβρίου 2010, Λεμεσός, Κύπρος.
15. A. Ζαραβίνος, Ι. Μπουλαλάς, Δ. Δελακάς, ΔΑ. Σπαντίδος: Μελέτη της έλλειψης στυπώματος (LOI), της γονιδιακής έκφρασης, και του μηχανισμού μεθυλίωσης των γονιδίων H19 και IGF2 στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. 20^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο. 23-27 Οκτωβρίου 2010, Λεμεσός, Κύπρος.
16. A. Ζαραβίνος, Ι. Μπουλαλάς, Δ. Βολάνης, Δ.Δελακάς, ΔΑ. Σπαντίδος: Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων RAF και RPB1/RKIP, στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. 20^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 23-27 Οκτωβρίου, Λεμεσός, Κύπρος.
17. A. Ζαραβίνος, ΓΙ. Λάμπρου, Ι. Μπουλαλάς, Δ. Βολάνης, Δ. Δελακάς, ΔΑ. Σπαντίδος: Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης με τη χρήση microarrays, ανάλυσης GEO, qPCR, και ανοσοϊστοχημείας. 20^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 23-27 Οκτωβρίου 2010, Λεμεσός, Κύπρος.
18. Ι. Μπουλαλάς, Α. Ζαραβίνος, Ι.Καρυώτης, Δ. Δελακάς, ΔΑ. Σπαντίδος: Ενεργοποίηση των ογκογονιδίων RAS στο ουροθηλιακό καρκίνωμα. 20^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 23-27 Οκτωβρίου 2010, Λεμεσός, Κύπρος.

Ανακοινώσεις σε Τοπικά συνέδρια

1. Ι. Μπουλαλάς, Γ. Δασκαλόπουλος, Π. Τσέμπισσεφ, Μ. Μεταξάρη, Ν. Χόνδρος: Εξωσωματική λιθοτριψία σε ακτινοδιαπερατούς λίθους του ουρητήρα. 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 1-3/11/2002, Χανιά.
2. Ε. Μαυρομανωλάκης, Ι. Μπουλαλάς, Ι. Καρυώτης, Ι. Χαιρέτης, Γ. Δασκαλόπουλος, Δ. Δελακάς: Πόσο επηρεάζεται η στυτική λειτουργία από τη φαρμακευτική αγωγή για την αντιμετώπιση της καλοήθους υπερτροφίας του προστάτη (ΚΥΠ). 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 1-3/11/2002, Χανιά.
3. Ι. Καρυώτης, Θ.Τριανταφύλλου, Π.Τσέμπισσεφ, Ι. Μπουλαλάς, Ι.Χαιρέτης, Π. Ανεζίνης: Σοβαρές επιπλοκές μετά από ενδοκυστικές εγχύσεις BCG για την αντιμετώπιση επιφανειακών όγκων της ουροδόχου κύστης. 11^οΠαγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 1-3/11/2002, Χανιά.
4. Π. Τσέμπισσεφ, Ι. Τρίτου, Μ. Νομικός, Ι. Μπουλαλάς, Ι. Χαιρέτης, Θ. Τριανταφύλλου, Π. Ανεζίνης: Διαφορική διάγνωση σε τυχαία ανευρισκόμενες μικρές νεφρικές μάζες, κυστικά μορφώματα με αιμορραγικά στοιχεία ή / και αποπιτανώσεις. 11^οΠαγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 1-3/11/2002, Χανιά.
5. Ε. Μαυρομανωλάκης, Ι. Μπουλαλάς, Ν. Χόνδρος, Μ. Νομικός, Φ.Σοφράς: Χειρουργικές κακώσεις ουροποιητικού συστήματος: η εμπειρία μιάς διετίας. 12^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 28-31/10/2004, Αγ. Νικόλαος.
6. Μ. Νομικός, Γ. Δασκαλόπουλος, Ν. Χόνδρος, Ε. Μαυρομανωλάκης, Ι. Χαιρέτης, Ι. Μπουλαλάς, Γ. Αγγελιδάκης, Φ. Σοφράς: Ριζική νεφρεκτομή: προγνωστικοί παράγοντεςστην εκδήλωση μετεγχειρητικής πρωτεϊνουρίας ή/και χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. 12^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 28-31/10/2004, Αγ. Νικόλαος.

Συγγραφικό έργο

Μετάφραση των **σύντομων κατευθυντήριων οδηγιών της EAU** για την **ανδρική στειρότητα, στυτική δυσλειτουργία και αντιμετώπιση των λοιμώξεων του ανδρικού**

ουροποιογεννητικού συστήματος τα έτη 2004 και 2005, οι οποίες εκδόθηκαν από την Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Μέλος Επιστημονικών εταιρειών

1. Τακτικό μέλος της Ελληνικής Ουρολογικής Εταιρείας από το 2005
2. Μέλος της European Association of Urology από το 2002
3. Μέλος της Endourological Society από το 2005

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

Ομιλίες

- Βιβλιογραφική ενημέρωση της επιστημονικής συνεδρίας με θέμα «**Θεωρίες Λιθογένεσης**» της **Ελληνικής Ουρολογικής Εταιρείας (17/3/2004)**.
- Μετεκπαιδευτικό μάθημα με θέμα «**Σύγχρονη αντιμετώπιση της νεφρολιθίασης**» της Ένωσης **Ουρολόγων Πειραιά (23/01/2007)**.

Συνέδρια- Σεμινάρια

- 1) 20^ε Αθηναϊκές Ουρολογικές Ημέρες 12-14 Μαΐου 2000, Αθήνα
- 2) 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 9-12 Νοεμβρίου 2000, Ρέθυμνο
- 3) 21^ε Αθηναϊκές Ουρολογικές Ημέρες 30 Μαρτίου-1 Απριλίου 2001, Αθήνα
- 4) XVIIth EAU Congress, February 23-26, 2002 NEC, Birmingham, United Kingdom
- 5) European School of Urology Course "Advanced course on prostate cancer-new perspectives" XVIIth. EAU Congress, Birmingham, United Kingdom 26 February 2002.
- 6) 22^ε Αθηναϊκές Ουρολογικές Ημέρες 29-31 Μαρτίου 2002, Αθήνα
- 7) Κλινικό φροντιστήριο Κέντρου Σεξουαλικής και Αναπαραγωγικής Υγείας Α.Π.Θ.: Ο ασθενής με στυτική δυσλειτουργία : στρατηγικές επικοινωνίας και θεραπείας 24-26 Μαΐου 2002, Ηράκλειο
- 8) Μεταπτυχιακό Σεμινάριο Ανδρολογίας "Andrology days in Chania 2002" 9 Ιουνίου 2002, Χανιά
- 9) 16^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 25-29 Σεπτεμβρίου 2002, Καλαμάτα
- 10) 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 1-3 Νοεμβρίου 2002, Χανιά
- 11) XVIIIth EAU Congress March 12-15, 2003 IFEMA, Madrid, Spain.
- 12) XVIIIth EAU Congress March 12-15, 2003 IFEMA, Madrid, Spain.
- 13) 23^ε Αθηναϊκές Ουρολογικές Ημέρες 29-30 Μαρτίου 2003, Αθήνα
- 14) Ιατρική Εταιρεία Χανίων: Οι εξελίξεις στην αντιμετώπιση της στυτικής δυσλειτουργίας 2 Ιουλίου 2003, Χανιά
- 15) 8th Mediterranean Congress of Urology September 11-14, 2003 Crete, Greece
- 16) International Continence Society 33RD Annual Meeting October 5-9 2003, Florence
- 17) 8th World Congress on Advances in Oncology and 6th International Symposium on Molecular Medicine October 16-18, 2003 Crete, Greece
- 18) 4^ο Ανδρολογικό Συνέδριο 24-24 Ιανουαρίου 2004, Πάτρα
- 19) 24^ε Αθηναϊκές Ουρολογικές Ημέρες 24-25 Απριλίου 2004, Αθήνα

- 20)** 17^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 23-26 Ιουνίου 2004, Αλεξανδρούπολη
- 21)** 12^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 28-31 Οκτωβρίου 2004, Αγ. Νικόλαος
- 22)** 18th Congress European Society for Urological Research November 4-6 2004, Athens, Greece
- 23)** 25^{εσ} Αθηναϊκές Ουρολογικές Ημέρες 8-10 Απριλίου 2005, Αθήνα
- 24)** 16th Video Urology World Congress June 23-25, 2005, Athens
- 25)** 9th Symposium Greek-German Association June 29-July 3, 2005, Athens
- 26)** 3rd Course European Urology Residents Education Programme September 5-10, 2005, Prague, Czech Republic
- 27)** Ουρολογικό Συμπόσιο Αιγαίου "Ακράτεια ούρων" 8-11 Σεπτεμβρίου 2005, Ηράκλειο
- 28)** 26^{εσ} Αθηναϊκές Ουρολογικές Ημέρες 5-7 Μαΐου 2006, Αθήνα
- 29)** 1st Athenian EuroAmerican Congress of Urology June 15-18, 2006, Athens
- 30)** Μετεκπαιδευτικό σεμινάριο τμήματος Ουροδυναμικής, Νευροουρολογίας, Γυναικολογικής Ουρολογίας (ΟΝΟΓΟ) της ΕΟΕ, 1^{ου} Αθηναϊκού Ευρω-Αμερικανικού Συνεδρίου Ουρολογίας, 15 Ιουνίου 2006, Αθήνα
- 31)** 18^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 27 Σεπτεμβρίου-1 Οκτωβρίου 2006, Ρόδος
- 32)** 11th World Congress on Advances in Oncology and 9th International Symposium on Molecular Medicine October 12-16, 2006 Crete, Greece
- 33)** 13^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 9-12 Νοεμβρίου 2006, Ηράκλειο
- 34)** Μετεκπαιδευτική επιστημονική ημερίδα, 401 Γενικό Στρατιωτικό Νοσοκομείο Αθηνών: «Καρκίνος όρχεως: Σύγχρονα δεδομένα στη διάγνωση και αντιμετώπιση», 27 Ιανουαρίου 2007, Αθήνα
- 35)** 1^ο Ουρολογικό Συμπόσιο Κεντρικής Ελλάδας 9-11 Φεβρουαρίου 2007, Λάρισα
- 36)** 22th EAU Congress 21-24 March 2007, Berlin, Germany
- 37)** European School of Urology Course " Testosterone deficiency and men' s health" 22th EAU Congress 21-24 March 2007, Berlin, Germany
- 38)** European School of Urology Course "Update in neurourology " 22th EAU Congress 21-24 March 2007, Berlin, Germany
- 39)** 27^{εσ} Αθηναϊκές Ουρολογικές Ημέρες 28-29 Απριλίου 2007, Αθήνα
- 40)** 33^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο 2-5 Μαΐου 2007, Αθήνα
- 41)** 2^η Πανελλήνια Επιστημονική Συνάντηση Τμήματος Ουρογεννητικής Ογκολογίας της ΕΟΕ 7-10 Ιουνίου 2007, Καλαμπάκα
- 42)** 2nd ESU Masterclass on Medical Oncology for Urologists 29June – 1July 2007, Barcelona, Spain
- 43)** Innovations & EBM in Urology 4-7 October 2007, Athens, Greece
- 44)** Hands on Training Workshop in 'Laparoscopy' during Innovations & EBM in Urology Congress 4-7 October 2007, Athens, Greece
- 45)** 12th World Congress on Advances in Oncology and 10th International Symposium on Molecular Medicine October 11-13, 2007 Crete, Greece
- 46)** 28^{εσ} Αθηναϊκές Ουρολογικές Ημέρες 10-11 Μαΐου 2008, Αθήνα
- 47)** 34^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο 20-24 Μαΐου 2008, Αθήνα
- 48)** Challenges in Laparoscopy & Robotics 5-7 June 2008, Rome, Italy
- 49)** 19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 1-5 Οκτωβρίου 2008, Χαλκιδική
- 50)** Επιστημονική Συνάντηση Τμήματος Ενδοουρολογίας-Λαπαροσκοπικής Χ/Ρ Ουρολογίας της Ε.Ο.Ε, 19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 1-5 Οκτωβρίου 2008, Χαλκιδική, Ελλάδα.
- 51)** Επιστημονική Συνάντηση Τμήματος Ανδρολογίας-Υπογονιμότητας της Ε.Ο.Ε, 19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 1-5 Οκτωβρίου 2008 Χαλκιδική, Ελλάδα.

- 52)** Επιστημονική Συνάντηση Τμήματος Ουρογεννητικής Ογκολογίας της Ε.Ο.Ε, 19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 1-5 Οκτωβρίου 2008, Χαλκιδική, Ελλάδα.
- 53)** Επιστημονική Συνάντηση Τμήματος Ουροδυναμικής-Νευροουρολογίας & Γυναικολογικής Ουρολογίας της Ε.Ο.Ε 19^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 1-5 Οκτωβρίου 2008, Χαλκιδική, Ελλάδα.
- 54)** European School of Urology Course "Laparoscopic radical prostatectomy and management of hypospadias and urethral strictures" 19th Hellenic Urological Association 1-5 October 2008, Chalkidiki, Greece.
- 55)** 13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine, 9-11 October 2008, Hersonissos, Crete, Greece.
- 56)** 14^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 26/10-1/11/2008, Γεωργιούπολη, Κρήτη.
- 57)** 2^η Πανελλήνια Επιστημονική Συνάντηση τμήματος Ανδρολογίας της ΕΟΕ 7 Φεβρουαρίου 2009, Καλάβρυτα.
- 58)** 2^η Διεθνής Ουρολογική Συνάντηση Κεντρικής Ελλάδας 14-15 Φεβρουαρίου 2009, Λάρισα.
- 59)** 29^{εσ} Αθηναϊκές Ουρολογικές Ημέρες 9-10 Μαΐου 2009, Αθήνα.
- 60)** 12th Symposium Greek-German Urological Association 24-28 June 2009, Kos, Greece.
- 61)** 16th European Symposium on Urogenital Radiology: Urogenital manifestations of systemic diseases 10-13 September 2009 Athens, Greece.
- 62)** 2^ο Ουρολογικό Συμπόσιο Αιγαίου 1-4/10/09 Ηράκλειο Κρήτης
- 63)** 3^η Επιστημονική Συνάντηση τμήματος Ουροδυναμικής, Νευροουρολογίας και Γυναικολογικής Ουρολογίας(ΟΝΟΓΟ) της ΕΟΕ 8-10 Οκτωβρίου 2009, Κυλλήνη.
- 64)** 14th World Congress on Advances in Oncology and 12th International Symposium on Molecular Medicine, 15-17 October 2009, Loutraki, Greece.
- 65)** 7^ο Μακεδονικό Ουρολογικό Συμπόσιο 5-8 Νοεμβρίου 2009, Θεσσαλονίκη
- 66)** 7^η Φθινοπωρινή Ουρολογική Συνάντηση 14-15 Νοεμβρίου 2009, Ιωάννινα
- 67)** 3rd World Congress on Controversies in Urology 25-28 February 2010, Athens, Greece
- 68)** 30^{εσ} Αθηναϊκές Ουρολογικές Ημέρες 8-9 Μαΐου 2010, Αθήνα.
- 69)** 15th World Congress on Advances in Oncology and 13th International Symposium on Molecular Medicine, 7-9 October 2010, Loutraki, Greece.
- 70)** 6th European Congress of Anrology 29/9-1/10 2010 Athens, Greece
- 71)** 9ο Πανελλήνιο Ανδρολογικό Συνέδριο 2 Οκτωβρίου 2010, Αθήνα.
- 72)** 20^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο 23-27 Οκτωβρίου 2010, Λεμεσός, Κύπρος.
- 73)** European School of Urology Course "Percutaneous nephrolithotripsy and partial nephrectomy", 20th Hellenic Urological Association 24 October 2010, Limassol, Cyprus.
- 74)** 15^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 29-31 Οκτωβρίου 2010, Χανιά.
- 75)** Excellence in Oncology 18-20 November 2010 Athens, Grece.
- 76)** 31^{εσ} Αθηναϊκές Ουρολογικές Ημέρες 6-8 Μαΐου 2011, Αθήνα.

Ξένες Γλώσσες

Ιταλικά, Αγγλικά.

Γνώσεις Υπολογιστών

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή σχεδιάστηκε και εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, κατά το χρονικό διάστημα 2007-2011.

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

Επίσης τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Φ. Σοφρά για την ενθάρρυνση, τις πολύτιμες συμβουλές και προτροπές του από τα χρόνια της ειδίκευσής μου καθώς και τον Επικ. Καθηγητή κ. Α. Ζαφειρόπουλο για την άριστη συνεργασία του.

Ακόμη, τον Αν. Καθηγητή, Δ/ντή της Ουρολογικής Κλινικής του Γ.Ν. "Ασκληπιείο" Βούλας κ. Δ. Δελακά για την εμπιστοσύνη, συμπαράσταση και υποστήριξη του από την αρχή της ειδικότητάς μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζω στον Αν. Καθηγητή κ. Γ. Σουρβίνο για το ενδιαφέρον του και τη βοήθεια που μου πρόσφερε, όποτε ήταν αναγκαίο καθώς και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής Καθηγητή κ. Γ. Σαμώνη, Αν. Καθηγητές κ.κ. Α. Τσατσάκη και Χ. Τσατσάνη για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Επίσης, στους Διδάκτορες κ. Α. Ζαραβίνο και κ. Π. Κανέλλου για την άριστη συνεργασία και φιλία τους καθώς και σε όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Κλινικής Ιολογίας.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την αμέριστη αγάπη και υποστήριξη σε κάθε μου προσπάθεια.

Ιωάννης Μπουλαλάς

Ηράκλειο 2011

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μεταλλάξεις στα μέλη της οικογένειας των γονιδίων RAS ανευρίσκονται σε μεγάλο αριθμό ανθρώπινων νεοπλασμάτων. Οι περισσότερες από αυτές αφορούν σημειακές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13 ή 61 που μετατρέπουν τα γονίδια RAS σε ογκογονίδια. Πρόσφατα ενεργείς μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF, ενός σημαντικού διαμεσολαβητή της οδού RAS/RAF/MEK/ERK, περιγράφηκαν σε διάφορους όγκους συμπεριλαμβανομένων κακοήθους μελανώματος, παχέος εντέρου και θηλώδους καρκίνου θυρεοειδούς. Η συχνότερη μετάλλαξη που αφορά το εξόνιο 15 (V600E) καθώς και διάφορες άλλες στα εξόνια 11 και 15 οδηγούν σε ιδιοσυστατική ενεργοποίηση της ογκοπρωτεΐνης BRAF.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η συχνότητα και η προγνωστική αξία των σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων της οικογένειας RAS σε άτομα με καρκίνο ουροδόχου κύστης. Δείγματα από ουροθηλιακό καρκίνο και φυσιολογικό ουροθήλιο 30 ασθενών μελετήθηκαν με τις μεθόδους PCR/RFLP (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης/ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων) και Direct Sequencing (άμεση αλληλούχιση) για την παρουσία μεταλλαγών των γονιδίων RAS στα κωδικόνια 12 και 13. Επιπλέον, με την τεχνική real time RT-PCR (αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο) μελετήθηκε το επίπεδο έκφρασης των ογκογονιδίων RAS στο επίπεδο του mRNA στον ουροθηλιακό καρκίνο και συγκρίθηκε με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης στο παρακείμενο φυσιολογικό ουροθήλιο. Στο δεύτερο σκέλος της παρούσας διατριβής διερευνήθηκε η συχνότητα των σημειακών μεταλλάξεων του γονιδίου BRAF στα δείγματα νεοπλασματικού και φυσιολογικού ουροθηλίου των παραπάνω ασθενών. Η μετάλλαξη V600E μελετήθηκε με τη μέθοδο PCR/RFLP και τα εξόνια 11, 14 και 15 συμπεριλαμβανομένων των σημείων συνάντησης ιντρονίων/εξονίων υποβλήθηκαν σε άμεση αλληλούχιση.

Μεταλλάξεις του ογκογονιδίου H-RAS ανευρέθηκαν σε 9 ασθενείς (30%). Δύο από τους 9 ασθενείς είχαν διηθητική νόσο (22%) και οι υπόλοιποι 7 (77%) επιφανειακή. Μία από τις μεταλλάξεις ήταν ομόζυγη (11%) και οι υπόλοιπες (89%) ετερόζυγες. Σε κανένα δείγμα δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις των ογκογονιδίων K και N-RAS (αγρίου τύπου). Υπερέκφραση σε ένα τουλάχιστον μέλος της οικογένειας RAS παρατηρήθηκε στο 77% των δειγμάτων με ουροθηλιακό καρκίνο σε σύγκριση με τα παρακείμενα φυσιολογικά δείγματα. Τα υψηλότερα

μεταγραφικά επίπεδα παρατηρήθηκαν στα K και N-RAS ογκογονίδια (50%) ενώ μόνο 27% των καρκινικών ιστών έδειξαν υπερέκφραση του γονιδίου H-RAS συγκρινόμενοι με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς. Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ μεταλλάξεων και υπερέκφρασης των ογκογονιδίων RAS και κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των όγκων. Δύο δείγματα έφεραν δύο διαφορετικές μεταλλάξεις στο εξόνιο 15 του γονιδίου BRAF. Ένα δείγμα έφερε την μετάλλαξη V600E (νουκλεοτιδική αλλαγή T1799A) και το άλλο τη μετάλλαξη V600L (νουκλεοτιδική αλλαγή G1798T). Το πρώτο δείγμα ήταν σταδίου pT1a και grade II ενώ το δεύτερο σταδίου pT2b και grade III. Καμία μεταλλαγή δεν ανευρέθηκε στα εξόνια 11, 14 και 15 καθώς και στα σημεία συνάντησης ιντρονίων/εξονίων των υπολοίπων δειγμάτων.

Τα αποτελέσματά μας υπογραμμίζουν την σημασία της ενεργοποίησης, διαμέσου μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12, του ογκογονιδίου H-RAS στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Επίσης, παρέχουν αποδείξεις ότι η υπερέκφραση και των τριών γονιδίων RAS είναι ένα κοινό γεγονός στο ουροθηλιακό καρκίνο που σχετίζεται με την ανάπτυξη της νόσου. Τέλος, αποδεικνύεται ότι η συμμετοχή των BRAF μεταλλαγών είναι ασυνήθης στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

ABSTRACT

Bladder cancer is the fifth most common malignancy in men in Western society. We determined *RAS* codon 12 and 13 point mutations and evaluated mRNA expression levels in transitional cell carcinoma cases. Mutational activation of the MAP kinase pathway is frequently found in many types of cancer. Recently, activating mutations in the *BRAF* gene, an important activator of this pathway, have been described in several tumor types including melanoma, colorectal and papillary thyroid cancer. The most frequent mutation in exon 15 (V600E) as well as several other mutations within exons 11 and 15 result in constitutive activation of the oncoprotein.

Samples from 30 human bladder cancers and 30 normal tissues were analyzed by polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism and direct sequencing to determine the occurrence of mutations in codons 12 and 13 of *RAS* family genes. Moreover, we used real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to evaluate the expression profile of *RAS* genes in bladder cancer specimens compared to that in adjacent normal tissues. Furthermore, we investigated *BRAF* mutations in 30 human bladder tumors and their adjacent normal tissues. The V600E mutation was screened by PCR/RFLP and exons 11, 14 and 15 of *BRAF* including intron-exon boundaries were sequenced.

Overall H-*RAS* mutations in codon 12 were observed in 9 tumor samples (30%). Two of the 9 patients (22%) had invasive bladder cancer and 7 (77%) had noninvasive bladder cancer. One H-*RAS* mutation (11%) was homozygous and the remaining 89% were heterozygous. All samples were WT for K and N-*RAS* oncogenes. Moreover, 23 of 30 samples (77%) showed over expression in at least 1 *RAS* family gene compared to adjacent normal tissue. K and N-*RAS* had the highest levels of over expression in bladder cancer specimens (50%), whereas 27% of transitional cell carcinomas demonstrated H-*RAS* over expression relative to paired normal tissues. We detected two tumor specimens bearing two different mutations, both of which were found in exon 15. One sample showed the T1799A (V600E) and the other the G1798T (V600L) mutation. The first specimen was stage pT1a and grade II, whereas the second was stage pT2b and grade III. No mutations within the coding region of exons 11, 14, 15 and the intron-exon junctions for the remaining samples were found.

Our results underline the importance of H-*RAS* activation in human bladder cancer by codon 12 mutations. Moreover, they provide evidence that increased expression of all 3 *RAS* genes is a common event in bladder cancer that is associated with disease development. Furthermore, our results suggest that involvement of *BRAF* mutations in the development of transitional cell carcinoma of the bladder is infrequent.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	i
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	xi
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	xii
ABSTRACT	xiv
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	xvi

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Σελίδα

Καρκίνος ουροδόχου κύστης

1.1 Εισαγωγή	1
1.2. Αιτιολογία	1
1.3. Μοριακή Βιολογία	2
1.3.1. Ενεργοποίηση ογκογονιδίων	3
1.3.2. Ενεργοποίηση ογκογονιδίου H-RAS	3
1.3.3. Ενεργοποίηση ογκογονιδίου FGFR3	5
1.3.4. Ενεργοποίηση ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53	5
1.3.5. Ενεργοποίηση ογκοκατασταλτικού γονιδίου RB	6
1.3.6. Λοιπές γενετικές αλλαγές	7
1.4. Παθολογική Ανατομική	8
1.4.1. Καρκίνος Μεταβατικού Επιθηλίου (TCC)	9
1.5. Σταδιοποίηση	11

1.6. Διάγνωση	12
1.6.1. Κλινική εικόνα	12
1.6.2. Εργαστηριακός έλεγχος	12
1.7. Κλινική πορεία-Προγνωστικοί παράγοντες	12
1.8. Θεραπεία	13

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Γονίδια RAS

2.1. Δομή γονιδίων RAS	14
2.2. Δομή πρωτεϊνών RAS	17
2.3. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών Ras	17
2.4. Βιοχημικές ιδιότητες πρωτεϊνών RAS	18
2.5. Εκφραση πρωτεϊνών RAS	20
2.6. Ενεργοποίηση γονιδίων RAS	21
2.6.1. Μεταλλάξεις γονιδίων RAS	21
2.6.2. Υπερέκφραση γονιδίων RAS	23
2.7. Οδοί μεταγωγής σήματος γονιδίων Ras	25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Γονίδιο BRAF

3.1. Δομή γονιδίου BRAF	27
3.2. Δομή πρωτεΐνης BRAF	28

3.3. Εκφραση πρωτεΐνης BRAF	29
3.4. Μεταλλάξεις γονιδίου BRAF	30
3.5. Ρύθμιση της ενεργότητας της RAF Κινάσης	34
3.5.1. Σύνδεση με την πρωτεΐνη Ras	34
3.5.2. Φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση	35
3.5.3. Ενεργοποίηση MEK1/2	36

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Σκοπός της μελέτης	38
--------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Υλικά και Μέθοδοι

5.1. Ασθενείς και μάρτυρες	39
5.2. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από συμπαγείς ιστούς	41
5.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	41
5.3.1. Βασική αρχή λειτουργίας της PCR	42
5.3.2. Συνθήκες αντιδράσεων PCR και εκκινήτες	45
5.4. Ηλεκτροφόρηση DNA και προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης	47
5.5. Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)	47
5.6. Άμεση αλληλούχιση DNA (sequencing)	49
5.7. Απομόνωση RNA και αντίστροφη μεταγραφή	51
5.8. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR)	51

5.8.1. Στατιστική ανάλυση	54
5.9. Διαλύματα	54
5.9.1. Διαλύματα απομόνωσης DNA και RNA	54
5.9.2. Ηλεκτροφορητικά διαλύματα	55
5.10. Ένζυμα	55
5.11. Υλικά και εταιρείες προέλευσης	55

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Αποτελέσματα

6.1. Ανάλυση μεταλλάξεων ογκογονιδίων RAS	56
6.2. Ανάλυση έκφρασης ογκογονιδίων RAS	58
6.3. Ανάλυση ογκογονιδίων RAS σε σχέση με τα κλινοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών	61
6.4. Ανάλυση mRNA έκφρασης ογκογονιδίων RAS ανά ζεύγη	62
6.5. Ανάλυση μεταλλάξεων ογκογονιδίου BRAF	62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Συζήτηση-Συμπεράσματα	64
------------------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Βιβλιογραφία	68
Παράρτημα	91
Δημοσιευμένες Εργασίες	92

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Καρκίνος ουροδόχου κύστης

1.1. Εισαγωγή

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι ο 4^{ος} πιο συχνός καρκίνος στους άνδρες (7%) και ο 11^{ος} στις γυναίκες (2.4%), αποτελώντας την 9^η αιτία θανάτου από καρκίνο (3%) στους άνδρες στις Η.Π.Α. Το 2010 εκτιμάται στις Η.Π.Α, ότι θα διαγνωσθούν 70.530 νέοι ασθενείς ενώ θα σημειωθούν 14.680 θάνατοι από τη νόσο αυτή (Jacobs, Lee et al. 2010; Jemal, Siegel et al. 2010). Απαντάται σε υψηλό ποσοστό στην Δ.Ευρώπη, Αίγυπτο και Β.Αμερική καθώς και σε διπλάσια συχνότητα στους άνδρες της λευκής φυλής απ' ότι της μαύρης (Parkin, Bray et al. 2005). Η αναλογία ανδρών/γυναικών μεταξύ των πασχόντων είναι 3/1. Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 72 έτη στους άνδρες και 74 στις γυναίκες, μπορεί όμως να παρουσιασθεί σε οποιαδήποτε ηλικία (Horner, Ries et al. 2009).

1.2. Αιτιολογία

Η ανάπτυξη του σχετίζεται με διάφορους παράγοντες κινδύνου, αν και πολλοί ασθενείς δεν έχουν εμφανή έκθεση σε καρκινογόνα (Golijanin, Kakiashvili et al. 2006). Οι δύο πλήρως επιβεβαιωμένοι παράγοντες είναι το κάπνισμα και η επαγγελματική έκθεση σε χημικά καρκινογόνα (McCahy, Harris et al. 1997; Brennan, Bogillot et al. 2000). Το κάπνισμα είναι ο ισχυρότερος παράγοντας και ευθύνεται για το 50% των ανδρών και 35% των γυναικών ασθενών (Colombel, Soloway et al. 2008; Zeegers, Tan et al. 2000). Οι καπνιστές διατρέχουν δύο έως τέσσερις φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος από τους μη καπνιστές (Kirkali, Chan et al. 2005), ο δε κίνδυνος αυξάνεται με την ένταση και τη διάρκεια του καπνίσματος (Silverman, Devesa et al. 2006). Μολονότι δεν έχει αναγνωρισθεί η υπεύθυνη για την ανάπτυξη του καρκίνου ουσία στους καπνιστές, εν τούτοις καρκινογενετική δράση φαίνεται ότι ασκούν κυρίως οι αρωματικές αμίνες (4-αμινοδιφαινύλη), οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και περισσότερες από 60 ουσίες που περιέχονται στον καπνό (Hirao, Kim et al. 2009; Leppert, Shvarts et al. 2006). Η επαγγελματική έκθεση σε αρωματικές αμίνες (2-ναφθυλαμίνη, 4-αμινοδιφαινύλη, βενζιδίνη) που ανευρίσκονται στις νωοστατικές

ανιλίνης και βιομηχανικά χημικά (Vineis and Pirastu 1997; Delclos and Lerner 2008) καθώς και σε αρωματικούς πολυκυκλικούς υδρογονάνθρακες (Boffetta, Jourenkova et al. 1997) είναι ο δεύτερος ισχυρότερος παράγοντας και ευθύνεται για το 5-20% των ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνο (Kogevinas, T' Mannetje et al. 2003). Αυξημένο κίνδυνο συνεπώς διατρέχουν οι εργάτες των βιομηχανιών πετρελαίου, ελαστικών, δέρματος, χημικών, βαφών, αλουμινίου και χάλυβα (Golka, Wiese et al. 2004). Άλλοι αιτιολογικοί παράγοντες περιλαμβάνουν τις χρόνιες ουρολοιμώξεις (*Schistosoma haematobium*, καθετήρες, λιθίαση ουροδόχου κύστης) (Kantor, Hartge et al. 1984; Shokeir 2004), την ακτινοβολία της πυέλου (Kaldor, Day et al. 1995; Boorjian, Cowan et al. 2007), την κατάχρηση αναλγητικών (φαινακετίνη) (Pasin, Josephson et al. 2008; Piper, Tonascia et al. 1985) τη χορήγηση κυκλοφωσφαμίδης (Cannon, Linke et al. 1995) και τα υψηλά επίπεδα αρσενικού στο πόσιμο νερό (Chiou Hy, Chiou St et al. 2001). Άτομα που προσλαμβάνουν με τις τροφές μικρές ποσότητες φρούτων, λαχανικών, βιταμινών (A, B₆, C και E) έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου (Steinmaus, Nuñez et al. 2000; Lamm, Riggs et al. 1994) ενώ η κατανάλωση καφέ και τεχνητών γλυκαντικών απαιτεί επιπλέον τεκμηρίωση του καρκινογενετικού τους ρόλου (Murta-Nascimento, Schmitz-Dräger et al. 2007). Επιπροσθέτως δεν υπάρχουν επιδημιολογικές αποδείξεις κληρονομικότητας της νόσου (Golijanin, Kakiashvili et al. 2006).

1.3. Μοριακή Βιολογία

Οι σύγχρονες θεωρίες της καρκινογένεσης υποστηρίζουν ότι ο καρκίνος αποτελεί κλωνική επέκταση ενός ή μερικών αρχέγονων καρκινικών κυττάρων στα προσβαλλόμενα όργανα (Jordan, Guzman et al. 2006; Davidson and Cheng 2006). Η δημιουργία ουροθηλιακού καρκίνου είναι μια πολυεπίπεδη διαδικασία που περιλαμβάνει γενετικές αλλαγές σε μοριακά μονοπάτια, υπεύθυνα για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης (Hanahan and Weinberg 2000). Οι κυριώτερες γενετικές αλλαγές αφορούν την ενεργοποίηση ογκογονιδίων και την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η επιφανειακή μορφή χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις των H-RAS και FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3) γονιδίων ενώ η διηθητική μορφή από απαιεψεις στα γονίδια p53 και RB. Η απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) στο χρωμόσωμα 9 ανευρίσκεται και στις δύο μορφές (Wu X-R 2005; Pollard, Smith et al. 2010).

1.3.1. Ενεργοποίηση ογκογονιδίων

Τα πρωτο-ογκογονίδια είναι φυσιολογικά γονίδια που κωδικοποιούν μια σειρά προϊόντων που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα της κυτταρικής δραστηριότητας. Στα προϊόντα αυτά περιλαμβάνονται αυξητικοί παράγοντες και υποδοχείς τους, πρωτεΐνες-διαβιβαστές εξωτερικών σημάτων, πυρηνικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή του DNA κ.λπ.. Η απορρύθμισή τους από διεργασίες, όπως σημειακή μεταλλάξη, γονιδιακή ενίσχυση, ανακατάταξη DNA, έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε ενεργά ογκογονίδια, τα οποία παρεμβαίνουν στους φυσιολογικούς μηχανισμούς ελέγχου της ανάπτυξης (Spandidos, Sourvinos et al. 2002; Spandidos 2007).

Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης έχει μελετηθεί η ενεργοποίηση διαφόρων ογκογονιδίων, όπως τα c-myc, c-erbB2, H-RAS κλπ. Το ογκογονίδιο c-myc (χρωμόσωμα 8q24) προάγει την κυτταρική διαίρεση αλλά αναστέλλει την κυτταρική διαφοροποίηση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεγάλου αριθμού αδιαφοροποίητων κυττάρων, ιδιαίτερα ευάλωτων στην επίδραση ογκογόνων παραγόντων (Evan and Littlewood 1993). Αυξημένη έκφραση του c-myc έχει συσχετιστεί με υψηλότερο στάδιο και βαθμό κακοήθειας καθώς και αυξημένη πιθανότητα υποτροπής και διηθητικής εξέλιξης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης (Masters, Vesey et al. 1988; Zaharieva, Simon et al. 2005).

Το ογκογονίδιο c-erbB2 (χρωμόσωμα 17q21) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με συμπεριφορά υποδοχέα μηνυμάτων αύξησης, που παρουσιάζει δομική ομοιότητα με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF-r) (Yamamoto Ikawa et al. 1986). Το c-erbB2 υπερεκφράζεται στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, πιθανώς χωρίς γονιδιακή ενίσχυση και σχετίζεται με νόσο υψηλού σταδίου και grade, μειωμένη επιβίωση ασθενών και παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων. Επιπλέον, αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα ειδικής για τη νόσο επιβίωσης. (Coogan, Estrada et al. 2004; Sato, Moriyama et al. 1992; Krüger, Weitsch et al. 2002).

1.3.2. Ενεργοποίηση ογκογονιδίου H-RAS

Η οικογένεια των ογκογονιδίων RAS (H-, K- και N-RAS) διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην εμφάνιση ουροθηλιακού καρκίνου. Και τα τρία μέλη της κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη (p21) με δραστηριότητα GTPάσης, που βρίσκεται στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και συμμετέχει στη μεταγωγή

σημάτων στον πυρήνα (Zachos and Spandidos 1997; Malumbres and Barbacid 2003). Η ενεργοποίηση του ογκογονιδίου H-RAS γίνεται κυρίως μέσω μεταλλάξεων, οι οποίες περιλαμβάνουν την αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου, συνήθως στα κωδικόνια 12 ή 61 (Barbacid 1987), οδηγώντας στη σύνθεση μιας ενεργοποιημένης p21 πρωτεΐνης και σε συνεχή μεταβίβαση μηνυμάτων για κυτταρική αύξηση.

Αν και το πρώτο παράδειγμα μεταλλαγμένου ογκογονιδίου RAS παρουσιάστηκε στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά της ουροδόχου κύστεως T24 (Reddy, Reynolds et al. 1982) έχοντας μια υποκατάσταση G σε T (Gly σε Val) στη δεύτερη θέση του κωδικονίου 12 του H-RAS (στο χρωμόσωμα 11p15.1), υπάρχουν αποκλίνουσες αναφορές όσον αφορά τη συχνότητα των μεταλλάξεων του H-RAS στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Συγκεκριμένα, υπάρχουν μελέτες όπου σημειώθηκαν 10% (Fujita, Yoshida et al. 1984), 17% (Visvanathan, Pocock et al. 1988), 36% (Czerniak, Deitch et al. 1990), 67% (Halliasos et al. 1992) ή 76% μεταλλάξεις (Burchill et al, 1991). Ωστόσο σε μια πολύ εκτεταμένη μελέτη 152 καρκινικών δειγμάτων οι Knowles και Williamson (Knowles and Williamson 1993) ανέφεραν ενεργοποιημένα H-RAS ογκογονίδια μόνο σε 6% των περιπτώσεων, όπου σε κανένα από αυτά δεν παρατηρήθηκε υποκατάσταση Gly σε Val στο κωδικόνιο 12. Επίσης υπάρχει αναφορά μη ανίχνευσης μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12, 13 ή 61 του H-RAS σε συνολικά 55 ασθενείς με ουροθηλιακούς όγκους (Olderøy, Daehlin et al. 1998; Oxford and Theodorescu 2003). Οι αποκλίσεις αυτές προφανώς οφείλονται στις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των H-RAS μεταλλάξεων.

Άλλος μηχανισμός ενεργοποίησης του H-RAS ογκογονιδίου αφορά τη μεταγραφική ενεργοποίησή του, που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα της p21 στο κυτταρόπλασμα. Οι Viola και συν. (Viola, Fromowitz et al. 1985) βρήκαν αυξημένη έκφραση της p21 στο καρκίνωμα in situ (CIS) και σε όγκους πτωχής διαφοροποίησης αλλά όχι στην υπερπλασία ή στους όγκους καλής διαφοροποίησης. Οι Miao και συν. (Miao, Wang et al. 1991) απέδειξαν ότι η p21 εκφράζεται μόνο σε καρκινικούς ιστούς και το ποσοστό έκφρασης της πρωτεΐνης σχετίζεται με παθολογικές παραμέτρους. Ειδικότερα υψηλά ποσοστά της παρατηρήθηκαν σε όγκους χαμηλού σταδίου και καλής διαφοροποίησης ενώ αντίθετα χαμηλά ποσοστά σημειώθηκαν σε όγκους υψηλού σταδίου και πτωχής διαφοροποίησης. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η θνητότητα εξαιτίας υποτροπής του καρκίνου σε p21 θετικούς ασθενείς ήταν μόλις 9% σε αντιδιαστολή με 67%

εκείνων που ήταν p21 αρνητικοί. Οι Vageli και συν. (Vageli, Kiaris et al. 1996) ακόμη ανέφεραν αύξηση ~40% στα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης της H-RAS πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα αυτά, αν και αντικρουόμενα, υπογραμμίζουν την σημασία των μεταλλάξεων / υπερέκφρασης του ογκογονιδίου H-RAS στην εμφάνιση ουροθηλιακού καρκίνου.

1.3.3. Ενεργοποίηση ογκογονιδίου FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3)

Ο FGFR3 (χρωμόσωμα 4p16.3) ανήκει σε μία τετραμελή ομάδα μεμβρανικών υποδοχέων τυροσίνης κινάσης. Μεταλλάξεις του ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 60-70% των ασθενών με χαμηλού grade θηλωματώδεις όγκους (Rieger-Christ, Mourtzinis et al. 2003; van Rhijn, Lurkin et al. 2001). Σε πρόσφατη προοπτική μελέτη 772 ασθενών με επιφανειακούς όγκους οι Hernández και συν. (Hernández, López-Knowles et al. 2006) ανέφεραν ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού σχετίζονται κυρίως με χαμηλού σταδίου-grade όγκους και λιγότερο με υψηλού grade T₁ όγκους. Οι Tomlinson και συν. (Tomlinson, Baldo et al. 2007) απέδειξαν ότι η αυξημένη έκφρασή του συνδυάζεται με τις μεταλλάξεις του, όπως ακόμη ότι είναι σημαντικά πιο συχνή στους χαμηλού grade μη διηθητικούς καρκίνους. Οι μεταλλάξεις του FGFR3 στα εξόνια 7, 10 και 15 προκαλούν ιδιοσυστατική ενεργοποίηση της δραστηριότητας κινάσης του υποδοχέα, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί το μονοπάτι των MAPK κινασών, ένα μονοπάτι που μοιράζεται με την οικογένεια των γονιδίων RAS (Knowles M 2007). Σε μελέτη 98 ουροθηλιακών καρκίνων και 31 καρκινικών κυτταρικών σειρών ουροδόχου κύστης οι Jebar και συν. (Jebar, Hurst et al. 2005) παρατήρησαν ότι οι μεταλλάξεις των FGFR3 και RAS γονιδίων αποκλείονται αμοιβαία, υποδεικνύοντας πιθανή βιολογική ισοδυναμία. Επίσης σε άλλη μελέτη 81 πρωτοεμφανιζόμενων ουροθηλιακών όγκων ανευρέθηκε ισχυρή σχέση ανάμεσα στις μεταλλάξεις του FGFR3 και τους χαμηλού σταδίου-grade όγκους ενώ οι μεταλλάξεις του p53 αφορούσαν αποκλειστικά υψηλού σταδίου-grade όγκους (Bakkar, Wallerand et al. 2003).

1.3.4. Ενεργοποίηση ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53

Το p53 ογκοκατασταλτικό γονίδιο (χρωμόσωμα 17p13.1) κωδικοποιεί μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, η οποία αποτελεί κεντρικό συστατικό μιας σειράς

κυτταρικών λειτουργιών όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση, η αγγειογένεση, η σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA (Vogelstein, Lane et al. 2000). Μεταλλάξεις του p53 σχετίζονται με γενετικές απαλειφές στο χρωμόσωμα 17p, έτσι ώστε νεοπλάσματα που έχουν χάσει ένα αλληλόμορφο εκφράζουν το μεταλλαγμένο p53-αλληλόμορφο και έχουν χάσει τον έλεγχο πολλαπλασιασμού τους (Cordon-Cardo, Dalbagni et al. 1994). Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης παρανοηματικές κυρίως μεταλλάξεις ανευρίσκονται σε ποσοστό >40% των διηθητικών όγκων και συνδυάζονται με εξέλιξη της νόσου και πτωχότερη επιβίωση ασθενών (Sidransky, Von Eschenbach et al. 1991; Fujimoto, Yamada et al. 1992; George, Datar et al. 2007). Οι μεταλλάξεις του p53 οδηγούν σε αύξηση του χρόνου ημιζωής της πρωτεΐνης, η οποία συσσωρεύεται στον πυρήνα και μπορεί να ανιχνευθεί ανοσοϊστοχημικά (Esrig, Spruck 3rd et al. 1993). Οι Goebell και συν. (Goebell, Groshen et al. 2010) ανέλυσαν 26 μελέτες από 38 κέντρα και βρήκαν ότι η αυξημένη έκφραση του p53 σχετίζεται στενά με όγκους υψηλού σταδίου και grade και με εξέλιξη της νόσου σε T1 και διηθητικούς όγκους.

1.3.5. Ενεργοποίηση ογκοκατασταλτικού γονιδίου Rb

Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13q14.2 και κωδικοποιεί μία πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη-ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου. Η πρωτεΐνη αυτή είναι συνδεδεμένη στο μεταγραφικό παράγοντα E₂F, ο οποίος αναστέλλει τη μεταγραφή του DNA, υφίσταται δε κυκλική αλλαγή στη φωσφορυλίωσή της ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου (αποφωσφορυλίωση στις φάσεις G₀ και G₁-φωσφορυλίωση στις φάσεις S και M) (Mitra, Birkhahn et al. 2007). Απαλειφές και μεταλλάξεις του γονιδίου Rb επιτρέπουν την ευκολότερη είσοδο του κυττάρου στη φάση S, επιτείνοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Cairns, Proctor et al. 1991). Μεταλλάξεις του παρατηρήθηκαν τόσο σε επιφανειακούς όσο και διηθητικούς όγκους ουροδόχου κύστης (Miyamoto, Shuin et al. 1995). Οι Cote et al. (Cote, Dunn et al. 1998) απέδειξαν με ανοσοϊστοχημική μέθοδο, ότι η υψηλή έκφραση του γονιδίου ή η απουσία αυτής σχετίζεται με διηθητικούς όγκους κακής πρόγνωσης. Η υψηλή έκφραση είναι αποτέλεσμα ιδιοσυστατικής υπερφωσφορυλίωσης της Rb πρωτεΐνης λόγω απώλειας έκφρασης του p16 ογκοκατασταλτικού γονιδίου και /ή υπερέκφρασης της κυκλίνης D1 (Chatterjee, George et al. 2004). Σε όγκους σταδίου T1 ανώμαλη έκφραση του p53 ή του γονιδίου RB ή και των δύο

συνδυάστηκε με αυξημένη πιθανότητα εξέλιξης της νόσου (Grossman, Liebert et al. 1998).

1.3.6. Λοιπές γενετικές αλλαγές

Η απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) τόσο στο βραχύ όσο και στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 9 αποτελεί την πιο κοινή γενετική αλλοίωση στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης και αφορά περισσότερο από 50% των νεοπλασμάτων ανεξαρτήτως σταδίου και βαθμού κακοήθειας (Tsai, Nichols et al. 1990; Cairns, Shaw et al. 1993). Η χαρτογράφηση του χρωμοσώματος 9 αποκάλυψε ότι οι περιοχές που παρουσιάζουν συχνά απαλοιφές περιλαμβάνουν τα p14, p15, p16 ογκοκατασταλτικά γονίδια (Orlow, Lacombe et al. 1995; Berggreen, Kumar et al. 2003), το γονίδιο του συνδρόμου Gorlin (Aboukassim, LaRue et al. 2003; McGarvey, Maruta et al. 1998), το DBC1 (Deleted in bladder cancer 1) γονίδιο (Habuchi, Luscombe et al. 1998) και το TSC1 (Tuberous sclerosis 1) γονίδιο (Pymar, Platt et al. 2008). Τα γονίδια p14 και p16 αποτελούν ελεγκτές - κλειδιά του κυτταρικού κύκλου, που ρυθμίζουν αρνητικά το πρώτο τη λειτουργία του p53 γονιδίου ενώ το δεύτερο του γονιδίου Rb (Mittra, Datar et al. 2006).

Άλλες γενετικές αλλαγές που αναγνωρίστηκαν ως σημαντικές στην ανάπτυξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστης είναι οι χρωμοσωμικές απαλειφές στις θέσεις 10q, 11p, 13q, 17p και 18q. Απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) στο χρωμόσωμα 11p ανευρέθηκε σε ~40% των ουροθηλιακών όγκων, όμως είναι πιο συχνή σε υψηλού σταδίου και grade όγκους (Shaw and Knowles 1995; Tsai, Nichols et al. 1990). Στο χρωμόσωμα 10q που περιλαμβάνει το PTEN γονίδιο, το οποίο ρυθμίζει το μονοπάτι της φωσφατιδυλινοσιτόλης 3 - κινάσης (PI3-Kinase), απώλεια ετεροζυγωτίας σημειώθηκε σε ποσοστό 24%-45% των διηθητικών όγκων (Cappellen, Gil Diez de Medina et al. 1997; Aveyard, Skilleter et al. 1999; Kagan, Liu et al. 1998). Απαλειφή στη χρωμοσωμική περιοχή 18q παρατηρήθηκε σε 35% των διηθητικών καρκίνων (Brewster, Gingell et al. 1994). Απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) στα χρωμοσώματα 17p και 13q όπου βρίσκονται τα γονίδια p53 και RB ανευρέθηκε σε ποσοστό 60% και 56% αντίστοιχα των υψηλού σταδίου και grade όγκων (Olumi, Tsai et al. 1990; Presti, Reuther et al. 1991; Cairns, Proctor et al. 1991).

Το μικροδορυφορικό DNA είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μίας έως πέντε βάσεων στο ανθρώπινο γονοδίωμα, οι οποίες διαφέρουν από άνθρωπο σε άνθρωπο, όμως επειδή κληρονομούνται είναι ίδιες σε όλα τα κύτταρα του ανθρώπου. Στα καρκινικά κύτταρα εμφανίζονται παραλλαγές σε πολλές από αυτές τις αλληλουχίες (αύξηση ή μείωση του αριθμού τους). Το φαινόμενο ονομάζεται αστάθεια μικροδορυφορικού DNA (Microsatellite Instability, MSI) και προκαλείται από την αδυναμία του επιδιορθωτικού μηχανισμού (βλάβη των μεταλλακτικών γονιδίων MHL1, MSH2, PMS1, PMS2 MSH3 και MSH6) να διορθώσει τα λάθη που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA. Μία ξεχωριστή μορφή αστάθειας εμφανίζεται σε επιλεγμένες τρινουκλεοτιδικές και τετρανουκλεοτιδικές επαναλήψεις και ονομάζεται EFAST (Elevated Microsatellite Instability at Selected Tetranucleotide Repeats) (Catto, Meuth et al. 2004).

Οι Gonzalez-Zulueta και συν. (Gonzalez-Zulueta, Ruppert et al. 1993) σε μελέτη τους στον ουροθηλιακό καρκίνο ανέφεραν αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA στο 3% των όγκων, οι οποίοι ήταν όλοι χαμηλού σταδίου. Οι Mao et al. (Mao, Lee et al. 1994) σημείωσαν ακόμη υψηλότερη συχνότητα, 28%. Οι Catto και συν. (Catto, Xinarianos et al. 2003) παρατήρησαν χαμηλό ποσοστό μικροδορυφορικής αστάθειας στις μονο-και δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις και υψηλό ποσοστό στις τετρανουκλεοτιδικές επαναλήψεις. Επίσης αντικρουόμενα είναι τα αποτελέσματα των μελετών που εξετάζουν τη συχνότητα της μικροδορυφορικής αστάθειας με τις παθολογικές παραμέτρους των όγκων (Catto, Meuth et al. 2004). Οι Ahrendt και συν. (Ahrendt, Decker et al. 2000) ανέφεραν συσχέτιση ανάμεσα στην EFAST και τις μεταλλάξεις του p53 γονιδίου. Τέλος η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA εκτιμήθηκε ως προγνωστικός δείκτης και ανευρέθηκε να σχετίζεται με όγκους υψηλού σταδίου και grade (Vaish, Mandhani et al. 2005).

1.4. Παθολογική ανατομική

Η πλειοψηφία των όγκων της ουροδόχου κύστης είναι μεταβατικού επιθηλίου (>90%) και ακολουθούν πλακώδους επιθηλίου (<5%), αδenoκαρκίνωμα (<1%) και μικροκυτταρικό καρκίνωμα (0.5%-0.7%). Σε αυτούς θα πρέπει να προστεθούν οι μικτές μορφές καθώς επίσης και μία σειρά σπάνιων όγκων επιθηλιακής (λαχνωτό αδένωμα, καρκινοειδείς όγκοι, μελάνωμα,

καρκινοσάρκωμα) και μη προέλευσης (φαιοχρωμοκύτωμα, πρωτοπαθές λέμφωμα, λειομυοσάρκωμα) (Amin MB 2009).

1.4.1. Καρκίνος μεταβατικού επιθηλίου (transitional cell carcinoma, TCC)

Ο καρκίνος μεταβατικού επιθηλίου της ουροδόχου κύστης αναπτύσσεται διαμέσου δύο ξεχωριστών αλλά εν μέρει αλληλοκαλυπτόμενων προτύπων ανάπτυξης, το θηλώδες και μη θηλώδες. Περίπου 80% των καρκινωμάτων αποτελούνται από επιφανειακές εξωφυτικές θηλωματώδεις εξεργασίες που προέρχονται από υπερπλασία του ουροθηλίου. Αυτοί οι χαμηλού grade όγκοι υποτροπιάζουν αλλά σπάνια διηθούν το τοίχωμα της ουροδόχου κύστης ή μεθίστανται. Οι υπόλοιποι 15-20% αντιπροσωπεύουν υψηλού grade, συμπαγή, μη θηλωματώδη καρκινώματα που εμφανίζονται σε ασθενείς χωρίς ιστορικό θηλωματώδους όγκου και προέρχονται από λανθάνουσα υψηλού grade ενδο-επιθηλιακή νεοπλασία. Οι όγκοι αυτοί επιθετικά διηθούν την ουροδόχο κύστη και έχουν μεγάλη τάση να δίνουν απομακρυσμένες μεταστάσεις. Η αλληλοκάλυψη των δύο προτύπων ανάπτυξης απεικονίζεται στην εξέλιξη των χαμηλού grade επιφανειακών όγκων σε υψηλού grade διηθητικούς καρκίνους. Της εξέλιξης αυτής, προηγείται η ανάπτυξη καρκινώματος *in situ* εντός της θηλωματώδους βλάβης ή σε παρακείμενη περιοχή και απαντάται σε 10-15% των ασθενών με ιστορικό χαμηλού grade επιφανειακό θηλωματώδη όγκο (Spiess and Czerniak 2006).

Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας (Grade) του TCC

Σύμφωνα με την 1973 WHO ταξινόμηση κατατάσσεται σε τρεις βαθμούς ιστολογικής κακοήθειας (grade) :α) καλής β) μέτριας και γ) πτωχής διαφοροποίησης. Το 2004 η WHO και η ISUP (International Society of Urological Pathology) δημοσίευσαν μια νέα ταξινόμηση που περιλαμβάνει ειδικά κυτταρολογικά και αρχιτεκτονικά κριτήρια. Η νέα ταξινόμηση περιλαμβάνει το θηλώδες ουροθηλιακό νεόπλασμα χαμηλής κακοήθειας (PUNLMP) και το χαμηλής και υψηλής κακοήθειας θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα (Epstein, Amin et al. 1998; Sauter, Algaba et al. 2004).

Ταξινόμηση WHO 1973 και 2004

1973 WHO grading

Ουροθηλιακό θήλωμα

Grade I: Καλώς διαφοροποιημένο

Grade II: Μετρίως διαφοροποιημένο

Grade III: Πτωχά διαφοροποιημένο

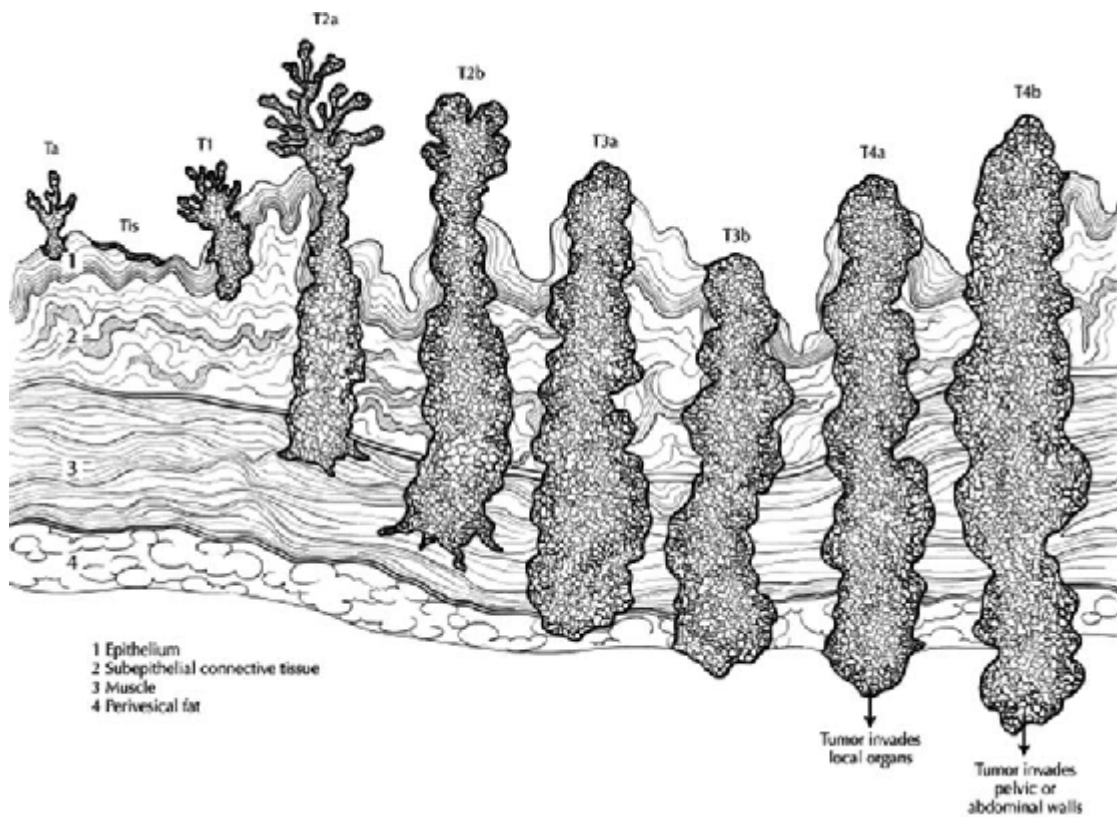
2004 WHO grading

Ουροθηλιακό θήλωμα

Θηλώδες ουροθηλιακό νεόπλασμα χαμηλής κακοήθειας (PUNLMP)

Χαμηλής κακοήθειας θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα

Υψηλής κακοήθειας θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα



Εικόνα 1.1. Σταδιοποίηση καρκίνου ουροδόχου κύστης

1.5. Σταδιοποίηση

Το TNM (Tumor-Nodes-Metastases) είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα. (Sobin and Wittekind 2002). Ο όρος επιφανειακός έχει αντικατασταθεί σήμερα από τον όρο *μη μυοδιηθητικός* και περιλαμβάνει : α) όγκους που δεν διηθούν πέραν του βλεννογόνου (T_a και CIS) β) όγκους που διηθούν το χόριο (T₁) **(Εικόνα 1.1)**.

Tx:	Ο όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
To:	Δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου
Ta:	Θηλώδες καρκίνωμα που δεν διηθεί πέραν του βλεννογόνου
Tis:	Καρκίνωμα in situ
T1:	Ο όγκος διηθεί το χόριο (lamina propria)
T1a:	Ο όγκος δεν διηθεί την υποβλεννογόνια μυική στιβάδα
T1b:	Ο όγκος διηθεί την υποβλεννογόνια μυική στιβάδα
T1c:	Ο όγκος διηθεί πέρα από την υποβλεννογόνια μυική στιβάδα
T2a:	Ο όγκος διηθεί τον επιπολής μυικό χιτώνα (έσω ήμισυ)
T2b:	Ο όγκος διηθεί τον εν τω βάθει μυικό χιτώνα (έξω ήμισυ)
T3:	Ο όγκος επεκτείνεται στο περικυστικό λίπος
T3a:	Μικροσκοπική διήθηση
T3β:	Μακροσκοπική διήθηση (εξωκυστική μάζα)
T4:	Ο όγκος διηθεί είτε κάποιο από τα παρακείμενα όργανα (T4a: προστάτη, μήτρα, κόλπο), είτε το πυελικό ή κοιλιακό τοίχωμα (T4b)
Nx:	Επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν
N0:	Δεν υπάρχει μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες
N1:	Μετάσταση σ' ένα λεμφαδένα μέγιστης διαμέτρου <2 cm
N2:	Μετάσταση σ' ένα λεμφαδένα μέγιστης διαμέτρου >2, αλλά <5 cm, ή μεταστάσεις σε πολλούς λεμφαδένες κανένας εκ των οποίων δεν έχει διάμετρο >5 cm
N3:	Μετάσταση σ' ένα λεμφαδένα μέγιστης διαμέτρου >5 cm
Mx:	Η ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων δεν μπορεί να εκτιμηθεί
M0:	Δεν υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις
M1:	Υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις

1.6. Διάγνωση

1.6.1. Κλινική εικόνα

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης διαγιγνώσκεται τυχαία ή εξαιτίας των συμπτωμάτων. Το συχνότερο σύμπτωμα με το οποίο εμφανίζεται είναι η ανώδυνη αιματουρία, η οποία μπορεί να είναι είτε μακροσκοπική είτε μικροσκοπική και παρατηρείται στο 85% των ασθενών. Συμπτώματα πλήρωσης (ερεθιστικά), όπως συχνουρία, νυκτουρία ή επιτακτική ούρηση είναι συχνότερα σε καρκίνωμα *in situ* ή διηθητικό όγκο. Σπανιότερες εκδηλώσεις περιλαμβάνουν συμπτώματα απόφραξης του ανώτερου ουροποιητικού, τα οποία σχετίζονται με προχωρημένο στάδιο της νόσου.

1.6.2. Εργαστηριακός έλεγχος

Η διερεύνησή του βασίζεται στον απεικονιστικό έλεγχο του ουροποιητικού συστήματος (υπερηχογράφημα, ενδοφλέβια ή αξονική ουρογραφία σε επιλεγμένους ασθενείς), την κυστεοσκόπηση (απλή-φωτοδυναμική), την κυτταρολογική εξέταση ούρων και τη λήψη βιοψιών ουροδόχου κύστης και προστατικής ουρήθρας (Babjuk, Oosterlinck et al. 2008).

1.7. Κλινική Πορεία-Προγνωστικοί παράγοντες

Οι πρωτοεμφανιζόμενοι όγκοι της ουροδόχου κύστης είναι επιφανειακοί (pT_a, pT₁, pT_{is}) σε ποσοστό 75-85%, όμως παρά την ενδοσκοπική αφαίρεση και ενδοκυστική αγωγή υποτροπιάζουν σε ποσοστό 30-80% ενώ σε ποσοστό 1-45% εξελίσσονται σε διηθητικούς εντός 5 ετών από τη διάγνωση (Babjuk, Oosterlinck et al. 2008; Sylvester, van der Meijden et al. 2006). 70% των επιφανειακών όγκων είναι σταδίου pT_a, 20% είναι pT₁ και 10% pT_{is} (Kirkali, Chan et al. 2005). Η πιθανότητα υποτροπής και εξέλιξης της νόσου μπορεί να υπολογιστεί από τους πίνακες της EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer), που στηρίζονται σε έξι κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους : πολλαπλότητα όγκου, μέγεθος, συχνότητα υποτροπής, στάδιο, ιστολογικός βαθμός κακοήθειας (grade) και συνύπαρξη CIS (Sylvester, van der Meijden et al. 2006).

1.8. Θεραπεία

Η διουρηθρική εκτομή (TURBT) αποτελεί την αρχική αντιμετώπιση οποιουδήποτε όγκου της ουροδόχου κύστης. Ασθενείς με επιφανειακό νεόπλασμα μετά τη διουρηθρική αφαίρεση του όγκου υποβάλλονται σε ενδοκυστική έγχυση ενός χημειοθεραπευτικού παράγοντα (Mitomycin, epirubicin, doxorubicin) και στη συνέχεια ανάλογα με τον κίνδυνο υποτροπής και εξέλιξης της νόσου, είτε εντάσσονται σε πρόγραμμα συστηματικής παρακολούθησης είτε υποβάλλονται σε επικουρική ενδοκυστική αγωγή. Παρακολούθηση ενδείκνυται σε όγκους στους οποίους ο κίνδυνος υποτροπής και διηθητικής εξέλιξης θεωρείται μικρός. Αντίθετα σε ασθενείς ενδιάμεσου κινδύνου χορηγείται επικουρική ενδοκυστική χημειοθεραπεία διάρκειας 6-12 μηνών ή ανοσοθεραπεία (BCG) το λιγότερο ενός έτους ενώ σε ασθενείς υψηλού κινδύνου χορηγείται επικουρική ενδοκυστική ανοσοθεραπεία (BCG) τουλάχιστον για ένα έτος. Ασθενείς με επιφανειακούς όγκους πολύ υψηλού κινδύνου εξέλιξης της νόσου μπορούν να υποβληθούν σε ριζική κυστεκτομή (Babjuk, Oosterlinck et al. 2008). Ασθενείς με διηθητικούς όγκους είναι υποψήφιοι για ριζική κυστεκτομή ή ακτινοθεραπεία. Επιλεγμένοι ασθενείς με διηθητική νόσο μπορούν να υποβληθούν σε συνδυασμένη θεραπεία διατήρησης της κύστης με χημειοθεραπεία, διουρηθρική εκτομή και ακτινοθεραπεία. Τοπικά εκτεταμένοι ή ανεγχείρητοι όγκοι μπορούν να αντιμετωπιστούν αρχικά με συστηματική χημειοθεραπεία σε μια προσπάθεια μείωσης της νεοπλασματικής μάζας και στη συνέχεια με ακτινοθεραπεία ή χειρουργική επέμβαση ανάλογα με την ανταπόκριση. Τέλος, ασθενείς με μεταστατική νόσο αντιμετωπίζονται με χημειοθεραπεία (Stenzl, Cowan et al. 2009).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

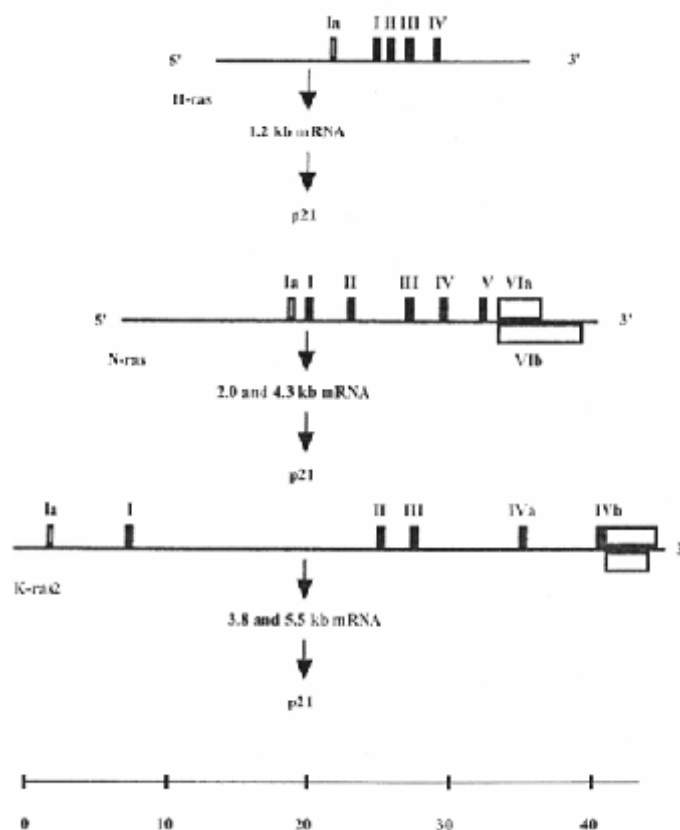
Γονίδια RAS

2.1. Δομή γονιδίων RAS

Στον άνθρωπο και τα τρωκτικά τα αντιπροσωπευτικά μέλη της οικογένειας RAS είναι: το c-H-RAS1 (11p15.1-p15.5), το c-K-RAS2 (12p12.1-pter) και το N-RAS (1p22-p32). Τα δύο πρώτα έχουν ανάλογα γονίδια σε ρετροϊούς (v-H-RAS και v-K-RAS) ενώ υπάρχουν και τα αντίστοιχα κυτταρικά ψευδογονίδια (H-RAS2 και K-RAS1) 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 (Barbacid 1987; Spandidos and Lang 1989; Lowy and Willumsen 1993). Το γονίδιο H-RAS αποτελείται από 5 εξόνια, το K-RAS από 6 ενώ το N-RAS από 7 εξόνια. Το πρώτο εξόνιο στο 5' άκρο (εξόνιο-1 ή Φ) και των τριών γονιδίων μεταγράφεται αλλά δεν μεταφράζεται. Τα επόμενα 4 κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη (p21) μοριακού βάρους 21 kDa. Κάθε εξόνιο και στα τρία γονίδια κωδικοποιεί το αντίστοιχο τμήμα της πρωτεΐνης. Το γονίδιο K-RAS διαθέτει δύο εναλλακτικά εξόνια, IVa και IVb, τα οποία κωδικοποιούν δύο ισομορφές της πρωτεΐνης p21 (McGrath, Caron et al. 1983; Shimizu, Birnbaum et al. 1983). Τα επίπεδα παραγωγής της K-RAS A είναι αμελητέα (20 φορές χαμηλότερα) σε σύγκριση με της K-RAS B στα 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 εξόνιο IVb έχει ένα λιγότερο κωδικόνιο (McGrath, Caron et al. 1983; Shimizu, Birnbaum et al. 1983; Spandidos and Lang 1989; Lowy and Willumsen 1993).

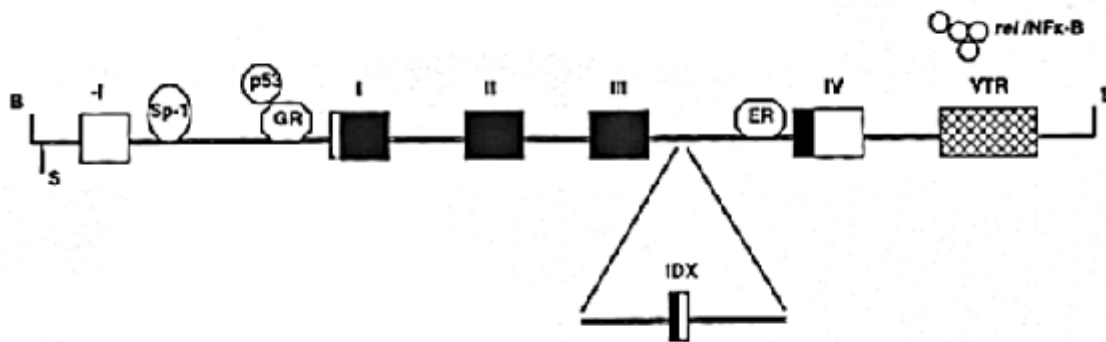
Η υψηλή ομολογία που υπάρχει ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας RAS οφείλεται στη συντηρητικότητα που χαρακτηρίζει τις κωδικές περιοχές (Barbacid 1987; Valencia, Chardin et al. 1991). Οι μη κωδικές και οι γειτονικές περιοχές των εξονίων παρουσιάζουν πολυμορφισμό μήκους, με αποτέλεσμα το συνολικό μέγεθος 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 (Spandidos and Lang 1989; Lowy and Willumsen 1993) (**Εικόνα 2.1**). Και τα τρία RAS γονίδια 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 εξονίου -1, αν και ο ακριβής αριθμός των θέσεων καθώς και τα σημεία έναρξης της μεταγραφής διαφέρουν από αναφορά σε αναφορά (Spandidos and Riggio 1986; Spandidos and Lang 1989; Nagase, Ueno et al. 1990; Lowy and Willumsen 1993). Το εξόνιο-1 αποτελείται από 125-150 bp. Ένα τμήμα 350 βάσεων, το οποίο περιλαμβάνει το εξόνιο-1, παρουσιάζει υψηλή ομολογία ανάμεσα στα γονίδια των τρωκτικών και του ανθρώπου. Αν το μήκος του εξονίου θεωρηθεί 150 bp, τότε η ομολογία εκτείνεται περίπου 175 bp προς το 5' άκρο του εξονίου και περίπου 25 bp προς το 3' άκρο του εξονίου-1.



Εικόνα 2.1. Δομή των γονιδίων H-RAS1, N-RAS και K-RAS2 του ανθρώπου (Spandidos and Anderson 1989).

Αλληλουχίες πέραν του 5' άκρου αυτής της ομόλογης περιοχής, δεν φαίνεται να συμμετέχουν στην ενεργότητα του υποκινητή (Nagase, Ueno et al. 1990; Honkawa, Masahashi et al. 1987; Hashimoto-Gotoh, Kikuno et al. 1988, Lowy and Willumsen 1993;). Στη συντηρητική περιοχή των 175 bp, στο 5' άκρο του εξονίου-1, αναγνωρίζονται επίσης χαρακτηριστικές αλληλουχίες GC οι οποίες είναι αναγκαίες για τη μεταγραφική έκφραση (Nagase, Ueno et al. 1990; Spandidos and Anderson 1989; Lowy and Willumsen 1993, Spandidos, Nichols et al. 1988) (**Εικόνα 2.2**). Υπάρχει ακόμη 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 φορές (Lowy and Willumsen 1993).



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 μικροδορυφορικού 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.

Ομοίως, στο 3' άκρο αναγνωρίζονται αλληλουχίες που συμβάλλουν στην έκφραση του γονιδίου H-ras. Μία από αυτές αποτελείται από επαναλαμβανόμενες διαδοχικές αλληλουχίες διαφορετικού μήκους (variable tandem repeats), εντοπίζεται περίπου 1000 bp μετά τη θέση πολυαδενυλίωσης και έχει δράση

ενισχυτή (Capon, Seeburg et al. 1983; Spandidos and Holmes 1987; Cohen, Walter et al. 1987). Η άλλη περιοχή αποτελείται από ένα συντηρημένο εναλλακτικό εξόνιο IDX, στο ιντρόνιο μεταξύ των εξονίων 3 και 4 (**Εικόνα 2.2**). Μεταλλαγές στη θέση συρραφής (splice donor site) αυτού του εξονίου έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση παραγωγής της πρωτεΐνης p21 κατά 10 φορές (Cohen, Broz et al. 1989).

2.2. Δομή 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 ακόλουθες 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) (Barbacid 1987; Grand and Owen 1991; Lowy and Willumsen 1993). 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) (Valencia, Chardin et al. 1991; Lowy and Willumsen 1993). 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 ενδεχομένως συμμετέχουν διαφορετικά στη διαδικασία πρόσδεσης της πρωτεΐνης στη κυτταρική μεμβράνη, καμιά λειτουργικότητα δεν έχει αναφερθεί για το αμινοτελικό άκρο αυτής της περιοχής. Έλλειψη των κωδικονίων 164-179 σε ενεργοποιημένα RAS γονίδια δεν έχει καμιά επίδραση στην ικανότητα μετασχηματισμού των κυττάρων από τα γονίδια αυτά (Grand and Owen 1991; Lowy and Willumsen 1993).

2.3. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών Ras

Η πρωτεΐνη ras συντίθεται στο κυτταρόπλασμα ως προ-p21 και έχει χρόνο

ημιζωής τουλάχιστον 24 ώρες (Grand and Owen 1991). Η προ-p21 υπόκειται σε μια σειρά μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που έχουν σαν αποτέλεσμα την πρόσδεση της στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Grand and Owen 1991; Ulsh and Shih 1984). Οι αλληλουχίες στο καρβοξυτελικό άκρο είναι αναγκαίες για τη δέσμευση στη κυτταρική μεμβράνη ενώ η συντηρημένη Cys186 απαιτείται για την έκφραση των μετα-μεταφραστικών διαδικασιών. 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 src (Lowy and Willumsen 1993). Βιοχημικές αναλύσεις έδειξαν ότι πρώτα τροποποιείται η Cys186 από το φαρνεσυλο-ισοπρενοειδές (προϊόν βιοσύνθεσης της χοληστερόλης), στη συνέχεια τα τρία καρβοξυτελικά αμινοξέα πέπτονται πρωτεολυτικά ενώ το καρβοξυτελικό άκρο της Cys186 μεθυλιώνεται και τελικά τα κυστεϊνικά κατάλοιπα αριστερά της φαρνεσυλιωμένης κυστεΐνης (αμινοξέα 180-185) παλμιτυλιώνονται (Grand and Owen 1991; Lowy and Willumsen 1993). Το προϊόν που προκύπτει παρουσιάζει αυξημένη υδροφοβικότητα και συγγένεια πρόσδεσης στη κυτταρική μεμβράνη καθώς και υψηλή βιολογική ενεργότητα (Downward 2003).

2.4. Βιοχημικές ιδιότητες πρωτεϊνών RAS

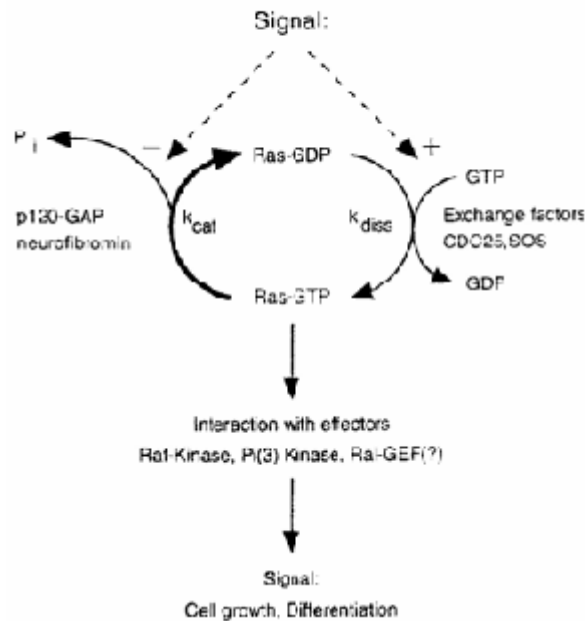
Οι πρωτεΐνες RAS έχουν δύο κύριες ιδιότητες: α) την πρόσδεση νουκλεοτιδίου γουανίνης (GTP/GDP) και β) την υδρόλυση του GTP (**Εικόνα 2.3.**) (Grand and Owen 1991; Bollag and McCormick 1991; Boguski and McCormick 1993; Schweins, Geyer et al. 1995). Οι πρωτεΐνες p21 προσδένουν νουκλεοτίδια γουανίνης GTP, 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) (Schweins, Geyer et al. 1995).

Η υδρόλυση της GTP-p21 δεν εξαρτάται μόνο από την καταλυτική ενεργότητα της πρωτεΐνης RAS αλλά ρυθμιστικό ρόλο διαδραματίζουν και ορισμένοι κυτταρικοί παράγοντες (Bollag and McCormick 1991; Boguski and McCormick 1993). Οι πιο γνωστοί 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 (Adjei 2001).

Αντικαταστάσεις αμινοξέων σημαντικών για την αλληλεπίδραση με τα νουκλεοτίδια γουανίνης, οδηγούν στη παραγωγή ενεργοποιημένων p21 πρωτεϊνών, ικανών για μετασχηματισμό (Seeburg, Colby et al. 1984; Der, Finkel et al. 1986; Spandidos and Lang 1989). 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 (Grand and Owen 1991; Schweins, Geyer et al. 1995). Τα ογκογονίδια RAS που απαντώνται συχνότερα στους όγκους, φέρουν συνήθως μια μετάλλαξη στα κωδικόνια 12, 13, ή 61 (Barbacid 1987; Spandidos and Lang 1989; Bos 1989; Grand and Owen 1991). 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 τη ρύθμιση της ανταλλαγής των νουκλεοτιδίων. Αυτές αποτελούνται από τις GRF, mSOS και GDS οικογένειες πρωτεϊνών. Ξεχωρίζουν με βάση την αμινοξική τους ομολογία, τη κατανομή στους διάφορους τύπους κυττάρων και την αλληλεπίδραση με τις διάφορες ισομορφές της πρωτεΐνης (Bollag and McCormick 1991; Boguski and McCormick 1993).

The switch function of Ras



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 το 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 = Guanine nucleotide exchange factor (Wittinghofer 1998; Shinohara and Koyanagi 2002).

2.5. Εκφραση πρωτεϊνών RAS

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου H-ras είναι υψηλά στην επιδερμίδα και στους σκελετικούς μύες 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 μύες ενώ τα επίπεδα του N-ras είναι υψηλά στους όρχεις και το θύμο αδένα και χαμηλά στο ήπαρ και τους νεφρούς (Furth, Aldrich et al. 1987; Leon, Guerrero et al. 1987). Τα πρότυπα έκφρασης αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα, ότι τουλάχιστον ένα από τα τρία μέλη της οικογένειας ras εκφράζεται σε κάθε κυτταρικό τύπο και ότι υπάρχει εξειδικευμένη συμμετοχή κάθε γονιδίου στη λειτουργία των διαφόρων τύπων κυττάρων (Barbacid 1987;

Furth, Aldrich et al. 1987; Leon, Guerrero et al. 1987; Spandidos and Anderson 1989).

2.6. Ενεργοποίηση γονιδίων RAS

Υπερέκφραση των γονιδίων RAS 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, τα οποία προάγουν την αντιγραφή και μεταγραφή του DNA και συνεπώς την έκφραση πολλών γονιδίων. Τα γεγονότα αυτά συνεισφέρουν στη γενετική αποδιοργάνωση των κυττάρων και στην ανάπτυξη του καρκινικού φαινότυπου. Τα ενεργοποιημένα RAS γονίδια παρουσιάζουν υψηλότατο εξαλλακτικό δυναμικό *in vitro* (Spandidos, Frame et al. 1990). Αλλά και *in vivo*, στον καρκίνο του παγκρέατος όπου οι μεταλλάξεις των RAS αποτελούν σταθερό εύρημα, συμβαίνουν σε πρώιμα στάδια ή ακόμη και σε αλλοιώσεις του οργάνου που προηγούνται και σχετίζονται παθογενετικά με την ανάπτυξη της νεοπλασίας (Yanagisawa, Ohtake et al. 1993).

2.6.1. Μεταλλάξεις γονιδίων 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 θέσεις (Barbacid 1987;). Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες 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-GTP (Sato, Nakafuku et al. 1992). 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

περιγράφηκαν στους περισσότερους όγκους του ανθρώπου (**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 αδενοκαρκινώματα και επιθηλιακά νεοπλάσματα αντίστοιχα ενώ αυτές του N-RAS απαντώνται σε αιματολογικές νόσους (Kiaris and Spandidos 1995). Συχνά ανευρίσκονται στον ίδιο τύπο καρκίνου μεταλλάξεις σε περισσότερα από ένα γονίδια της οικογένειας RAS (π.χ. ήπατος, 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 φαινότυπου, συνέπεια πολλαπλών μη ειδικών μεταλλάξεων διάσπαρτων στο γονιδίωμα. Στατιστικά επομένως, το πολύ μεγαλύτερο K-RAS υφίσταται συχνότερα μεταλλάξεις.

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 (Rodenhuis and Slebos 1992). Μεταλλάξεις υποκατάστασης του συντηρητικού αμινοξέος κυστεΐνη στη θέση 186 του καρβοξυ-τελικού άκρου της p21 συνεπάγονται αδυναμία μετασχηματισμού των 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 μετα-μεταγραφικής φαρνεσυλίωσης (Manne, Yan et al. 1995). Οι μεταλλάξεις του K-RAS στο παχύ έντερο συμβαίνουν αρκετά νωρίς κατά τη διαδικασία εξέλιξης του όγκου από αδένωμα σε καρκίνωμα (Vogelstein, Fearon et al. 1988), προσφέροντας έτσι ένα διαγνωστικό μέσο πρώιμης ανίχνευσης της νόσου στα κόπρανα των ασθενών (Sidransky, Tokino et al. 1992).

Τύπος Νεοπλασίας	Γονίδιο	Συχνότητα (%)
Παγκρέατος	<i>K-ras</i>	90
Ουροδόχου κύστεως	<i>H-ras</i>	66
Νεφρών	<i>K-ras</i>	50
Αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου	<i>K-ras</i>	50
Αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα	<i>K-ras</i>	50
Λεπτό έντερο	<i>H-ras</i>	31
Τράχηλος μήτρας	<i>K-ras, H-ras</i>	26, 10.5
Ωοθήκες	<i>K-ras</i>	30
Ενδομήτριο	<i>K-ras</i>	47
Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία	<i>N-ras</i>	30
Θυρεοειδής	<i>H-, K-, N-ras</i>	25
Μελάνωμα	<i>N-ras</i>	20
Μαστός	<i>K-ras</i>	12
Ηπατοκυτταρικό	<i>K-ras</i>	12
Στομάχου		0-40
Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο	<i>N-ras</i>	10

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

2.6.2. Υπερέκφραση γονιδίων 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 υπερπαραγόμενου μεταγραφικού παράγοντα. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η

απρόσφορη παραγωγή δομικά φυσιολογικής 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 (Kurzrock, Gallick et al. 1986). Η υπερέκφραση του RAS στον πνεύμονα αποτελεί όψιμο γεγονός, σε αντίθεση με άλλες θέσεις εντόπισης του καρκίνου όπου συμβαίνει πρώιμα (κεφαλή-τράχηλος, ουροδόχος κύστη). Η αυξημένη έκφραση του H-RAS σχετίζεται με τα μεταγραφικά επίπεδα των ρυθμιστικών αλληλουχιών του. Αυτό συμβαίνει με τη p53 και τους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών και οιστρογόνων σε όγκους ωοθηκών και ενδομητρίου (Zachos, Varras et al. 1996). Η σύνδεση της p53 με το ρυθμιστικό της στοιχείο στο γονίδιο H-RAS συνεπάγεται αυξημένη έκφραση τόσο της p21 όσο και της ίδιας της φυσιολογικής p53 (Zachos and Spondidos 1998). Στον καρκίνο του μαστού η υπερέκφραση των γονιδίων RAS αποτελεί πρώιμο ογκογενετικό γεγονός (Miyakis, Sourvinos et al. 1998) και η ανοσοϊστοχημική έκφραση της p21 σχετίζεται με δυσμενή πορεία της νόσου (Watson, Elton et al. 1991), σε αντίθεση με την ευνοϊκή πρόγνωση σε περιπτώσεις νευροβλαστώματος (Tanaka, Slamon et al. 1991).

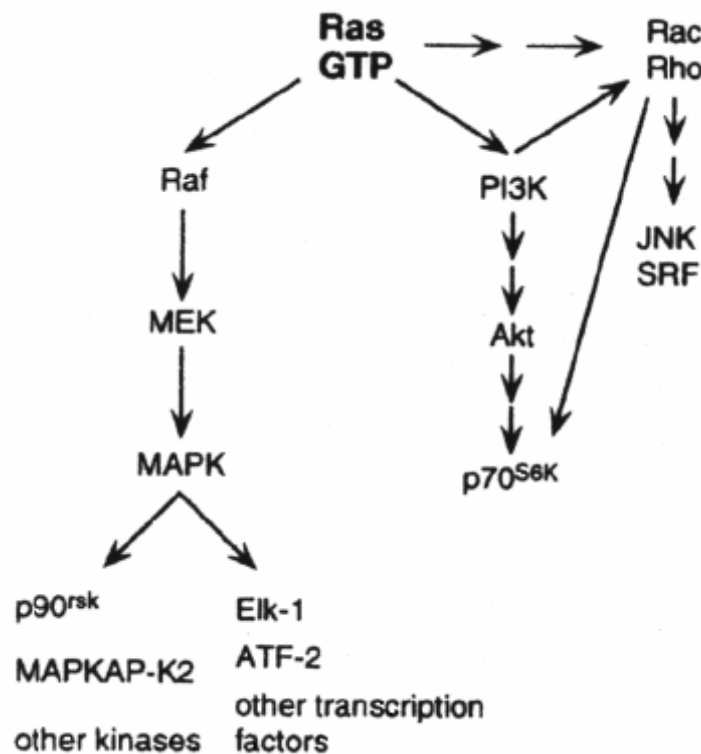
Τύπος Ογκου	Γονίδιο	Συχνότητα (%)
Λάρυγγας	H-ras , K-ras, N-ras	100
Ενδομήτριο	ras	92
Λεπτό έντερο	ras	85
Νευροβλάστωμα	ras	80
Ωοθήκες	ras	78
Λευχαιμίες	H-ras , K-ras, N-ras	77
Ουροδόχος κύστη	H-ras , K-ras, N-ras	73
Πνεύμονας	ras	72
Μαστός	H-ras , K-ras, N-ras	67
Ήπαρ	ras	60
Θυρεοειδής	ras	55
Κεφαλή-τράχηλος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

2.7. Οδοί μεταγωγής σήματος γονιδίων Ras

Η πιο εκτενώς μελετημένη οδός μεταγωγής σήματος από τα ras προς το εσωτερικό του κυττάρου, σχετίζεται με τη Raf-1, την κινάση της MAPK (mitogen activating protein kinase kinase, ή MAPKK, ή MEK1) και τις πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούν τη μίτωση (MAPKs) [ή αλλιώς εξωκυττάρειες κινάσες ρυθμιστών σήματος (extracellular signal-regulated kinases, ή ERKs)] (**Εικόνα 2.4**). Η Raf είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που αλληλεπιδρά ειδικά και ενεργοποιείται από τον σύνδεσμο p21-GTP. 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, που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει υπολείμματα τυροσίνης και θρεονίνης στην MAPK και την ενεργοποιεί (Marshall 1994). Περιφερικότερα της MAPK βρίσκεται η p90 ριβοσωμική S6 κινάση (p90s6k) και διάφοροι πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες (Elk-1, Ets1, κλπ.) (Zhang and Liu 2002). Μία άλλη οδός μεταγωγής σήματος των ras, εμπλέκει το RasGDS (ένα παράγοντα ανταλλαγής υπεύθυνο για την ενεργοποίηση των Ras

GTPασών), την φωσφατιδυλινοσιτόλη 3-κινάση (PI3K) και πιθανά την p120GAP (GTPase activating protein) (Ewen 2000). 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.



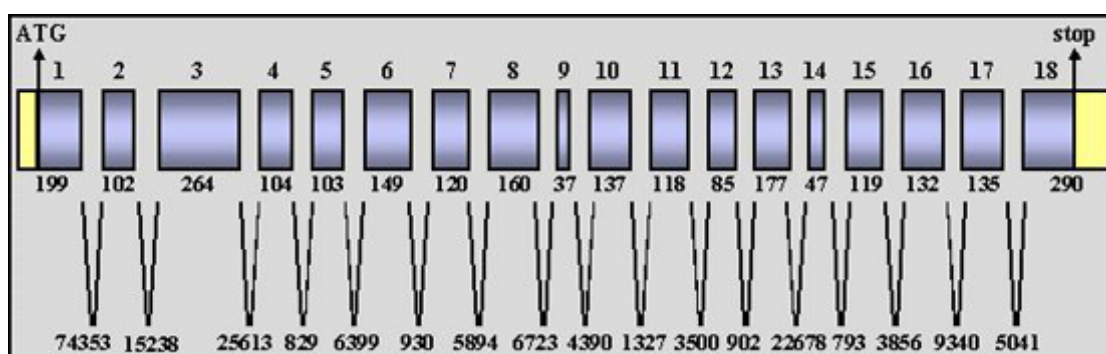
Εικόνα 2.4. Σχηματική αναπαράσταση μερικών οδών μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται από την πρωτεΐνη ras. Ο καταρράκτης Raf/MEK/MAPK κινάσης καταλήγει τελικά στη ρύθμιση της μεταγραφής, προκαλώντας τη φωσφορυλίωση και άλλων κινασών που εμπλέκονται στον έλεγχο της αύξησης. Οι οδοί διαμέσου του Rac και του Rho οδηγούν στην ενεργοποίηση του JNK και του αυξητικού παράγοντα του ορού (SRF). Η ενεργοποίηση της p70s6k είναι εξαρτώμενη από τη PI3K.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Γονίδιο BRAF

3.1. Δομή γονιδίου BRAF

Το γονίδιο BRAF (v-RAF, murine sarcoma viral oncogene homologue B1) αποτελεί ένα πρωτο-ογκογονίδιο με ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Μαζί με τα γονίδια A-RAF και RAF-1 (ή C-RAF) ανήκει στην οικογένεια των ογκογονιδίων RAF. Το γονίδιο BRAF βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 7q34 και αποτελείται από 18 εξόνια που εκτείνονται σε μια περιοχή 190284 bp. Το μεταγραφόμενο mRNA έχει μήκος 2513bp. (Mercer and Pritchard 2003) (**Εικόνα 3.1.**). 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 κινασών της MAPK/ERK1/2 (MEK1/2) στις MAP κινάσες p42/p44 ή ERK1/2, τα βασικά στελέχη αυτού του μοριακού μονοπατιού (Marshall 1994; Marais and Marshall 1996).



Εικόνα 3.1. Δομή 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.

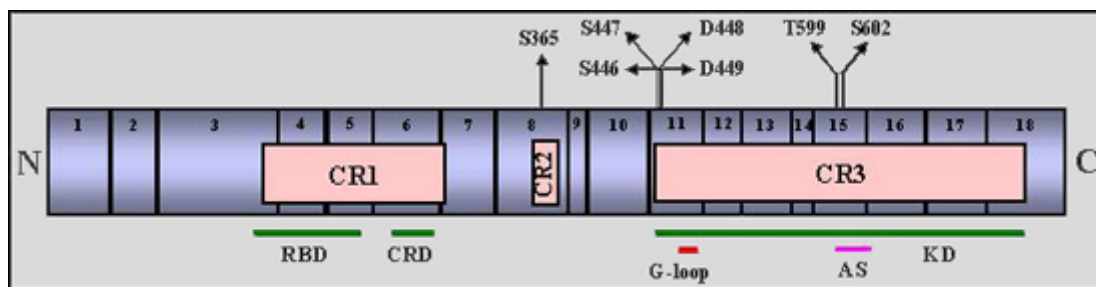
3.2. Δομή πρωτεΐνης BRAF

Και οι τρεις πρωτεΐνες RAF μοιράζονται τρεις υψηλά συντηρημένες περιοχές (CR1, CR2 και CR3), που εγκλείονται από διαφορετικές αλληλουχίες που ποικίλλουν κατά πολύ μεταξύ τους. Στη Raf-1, η CR1 καλύπτει τα αμινοξέα 61-194 και περιέχει δύο δομές που δεσμεύουν το Ras-GTP. Η Ras binding domain (RBD) περιλαμβάνει τα αμινοξέα 51-131 (Scheffler, Waugh et al. 1994; Vojtek, Hollenberg et al. 1993) ενώ η cysteine-rich domain (CRD) εκτείνεται στα αμινοξέα 139-184 (Mott, Carpenter et al. 1996). Η CR2 καταλαμβάνει τα αμινοξέα 254-269 της Raf-1 και είναι πλούσια σε αμινοξέα σερίνης και θρεονίνης, μερικά από τα οποία είναι ρυθμιστικές περιοχές φωσφορυλίωσης. Η CR3 καλύπτει τα αμινοξέα 335-627 της Raf-1 και περιέχει την περιοχή κινάσης που είναι η πιο ομόλογη δομή ανάμεσα στις πρωτεΐνες Raf (Daum, Eisenmann-Tappe et al. 1993; Morrison and Cutler 1997).

Οι περιοχές κινάσης χωρίζονται σε αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα και το τμήμα πρόσδεσης του ATP εντοπίζεται στο μεσοδιάστημα των δύο άκρων. Το N-terminal άκρο περιέχει την αγκύλη γλυκίνης που είναι σημαντική 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 τμήμα ενεργοποίησης, το οποίο συνδέει τις συντηρημένες αλληλουχίες DFG και APE και παίρνει μέρος στην πρόσδεση ενός ATP. Η φωσφορυλίωση της θρεονίνης 598 και της σερίνης 601 εντός αυτής της περιοχής παίζει ρόλο κλειδί στην ενεργοποίηση της B-Raf (Johnson, Lowe et al. 1998).

Παρ' όλα αυτά η BRAF έχει αρκετές δομικές διαφορές από τις άλλες δύο πρωτεΐνες RAF (**Εικόνα 3.2**). Στις συντηρημένες περιοχές έχει αρκετές διαφορές στα αμινοξέα. Επιπλέον, η μεταβλητή περιοχή ανάμεσα στα CR2 και CR3 υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα των εξονίων 8b και 10a (Barnier, Papin et al. 1995). Το εναλλακτικό αυτό μάτισμα μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα της BRAF να ενεργοποιεί την MEK, καθώς έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία του εξονίου 10a στο BRAF αυξάνει τη συγγένεια και τη βασική ενεργότητα κινάσης ως προς την MEK ενώ η παρουσία του εξονίου 8b έχει το αντίθετο αποτέλεσμα (Papin, Depouel-Galy et al. 1998). Τα δύο εξόνια εντοπίζονται στη συνδετική περιοχή ανάμεσα στην αμινοτελική ρυθμιστική περιοχή και τη καταλυτική περιοχή και μπορούν να δρουν ως καθοριστικοί παράγοντες στη μετάβαση από την ενεργή στην ανενεργή μορφή. Τα εξόνια 1 και 2 είναι παρόντα στις BRAF πρωτεΐνες με

το μεγάλο, αλλά όχι σε αυτές με το μικρό N terminal άκρο (Barnier, Papin et al. 1995). 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-1 (Stephens, Sithanandam et al. 1992).



Εικόνα 3.2. Διάγραμμα της πρωτεΐνης BRAF σε κλίμακα. Οι αριθμοί εντός των μπλε κουτιών υποδεικνύουν τα εξόνια από τα οποία μεταφράζεται κάθε μέρος της πρωτεΐνης. Τα τρία κουτιά στο εσωτερικό αντιπροσωπεύουν τις συντηρημένες περιοχές της πρωτεΐνης με τα γονίδια A-RAF και RAF-1 (CR1, CR2 και CR3). Με πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύονται τρεις διαφορετικές περιοχές: RBD (RAS binding domain), CRD (Cysteine-rich domain) και KD (Kinase domain). Με κόκκινη γραμμή υποδεικνύεται μια συντηρημένη περιοχή γλυκίνης [conserved glycine motif (G-loop)] στο εξόνιο 11 και με ροζ γραμμή υποδεικνύεται το τμήμα ενεργοποίησης [activation segment (AS)] εντός του εξονίου 15. Τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν τα κύρια σημεία φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης. C: καρβοξυτελικό άκρο; N: Αμινο-τελικό άκρο.

3.3. Εκφραση πρωτεΐνης BRAF

Η πρωτεΐνη BRAF εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο νευρικό ιστό και γι'αυτό το λόγο οι περισσότερες μελέτες της εστιάζονται σε κυτταρικές σειρές νευρικής προέλευσης. Επιπλέον, η πρωτεΐνη BRAF είναι ανιχνεύσιμη στους όρχεις και στο σπλήνα (Storm, Cleveland et al. 1990).

Παρά τα ποικίλα επίπεδα έκφρασης, το γονίδιο BRAF με διαφορετικό μάτισμα μπορεί να παράγει τουλάχιστον 10 διαφορετικές ισομορφές, οι οποίες εκφράζονται ποικιλοτρόπως σε διαφορετικούς ιστούς ενήλικων ποντικών (Barnier, Papin et al. 1995). Αυτές προκύπτουν μέσω διαφορετικού ματίσματος

των εξονίων 8b και 10a κι επίσης από την παρουσία δύο διαφορετικών N άκρων για την BRAF, οδηγώντας σε ισομορφές οι οποίες ποικίλλουν σε μέγεθος από 67 έως 99 kDa. 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 τη κωδική αλληλουχία του BRAF. Εκδοχές του BRAF cDNA που περιέχει αυτό το εξόνιο εντοπίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στη καρδιά, στις ωοθήκες, στους όρχεις και στο σπλήνα. Το εξόνιο 10a αντιπροσωπεύει 102 νουκλεοτίδια ανάμεσα στα εξόνια 9 και 10 και παρουσιάζει μια πιο αυστηρή έκφραση, η οποία είναι πιο υψηλή στο νευρικό ιστό. Οι εκδοχές της σύντομης μορφής της BRAF δεν συσχετίζονται ποτέ με την παρουσία του εξονίου 10a (Barnier, Papin et al. 1995).

Ενώ η πρωτεΐνη BRAF είναι μόλις ανιχνεύσιμη σε πολλούς ιστούς, τα μετάγραφα mRNA είναι σαφώς παρόντα (Barnier, Papin et al. 1995). 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 BRAF είναι μόλις ανιχνεύσιμη σε αυτά τα κύτταρα ενώ τόσο η RAF-1 όσο και η A-RAF εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα. Παρ' όλα αυτά, η BRAF 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 (Hüser, Luckett et al. 2001). Αναφορικά με τα μελανοκύτταρα και το κακόηθες μελάνωμα, δεν είναι γνωστό εάν η BRAF εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε αυτά τα κύτταρα ή όχι, και επίσης ποιά συγκεκριμένη ισομορφή της εκφράζεται. Είναι γνωστό όμως ότι η B-RAF είναι ενεργή στα μελανοκύτταρα και ότι είναι ένας σημαντικός ενεργοποιητής των MEK/ERK στα κύτταρα αυτά (Buscà, Abbe et al. 2000).

3.4. Μεταλλάξεις γονιδίου BRAF

Μετά την ανακάλυψη των γονιδίων RAF ως ογκογονιδίων στους ποντικούς και στα κοτόπουλα, έγιναν πολλές προσπάθειες για να συνδεθούν οι ενεργείες μεταλλάξεις στα γονίδια του ανθρώπου με την εμφάνιση νεοπλασμάτων (Storm, Brennscheidt et al. 1990). Οι προσπάθειες αυτές βασίστηκαν είτε σε Southern

blot ανάλυση για να εντοπίσουν ανακατατάξεις στο DNA των όγκων, ανάλυση χρωμοσωμικών αναδιατάξεων για τον εντοπισμό αλληλικών αλλαγών κοντά στο γονίδιο RAF-1 του ανθρώπινου χρωμοσώματος 3, είτε πειράματα μετασχηματισμού της σειράς NIH3T3 χρησιμοποιώντας ανθρώπινο ογκογόνο DNA για τον εντοπισμό ογκογόνων μορφών του RAF-1 στα δείγματα των εξεργασιών. Καμία από αυτές τις προσπάθειες δεν ανίχνευσε σταθερές αναδιατάξεις στο DNA στους ίδιους τύπους καρκίνων. Οι λόγοι γι' αυτό είναι γνωστοί και οφείλονται στο γεγονός ότι οι τεχνικές αυτές δεν ήταν αρκετά ευαίσθητες για να εντοπίσουν μία μόνο σημειακή μεταλλαγή καθώς επίσης ότι οι περισσότερες προσπάθειες κατευθύνονταν προς το γονίδιο RAF-1 παρά προς το πιο ογκογόνο γονίδιο BRAF. Όμως η πρόοδος τεχνικών όπως η αλληλούχιση (sequencing) προσέφερε ένα πολύ πιο δυναμικό τρόπο εντοπισμού μικρών αλλαγών στα δείγματα όγκων και αυτή η δουλειά αναγνώρισε ενεργείς σημειακές μεταλλάξεις BRAF στους ανθρώπινους όγκους (Rozyska, Collin et al. 2000).

Οι Davies et al. (Davies, Bignell et al. 2002) εφάρμοσαν sequencing για να σαρώσουν 923 όγκους και αναγνώρισαν παρανοηματικές μεταλλάξεις (missense mutations) στο γονίδιο BRAF σε περίπου 70% των ανθρώπινων κακοήθων μελανωμάτων και σε 15% των καρκίνων παχέος εντέρου. Η συναρπαστική αυτή πρόοδος αποτέλεσε την πρώτη φορά που οι πρωτεΐνες RAF ξεχώρισαν από τις RAS όσον αφορά την ανάπτυξη κακοήθων όγκων. Μεταλλάξεις εντοπίστηκαν επίσης σε χαμηλό ποσοστό σε γλοιώματα, σαρκώματα, καρκίνους πνεύμονα, ωοθηκών, μαστού και ήπατος.

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). 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 στη 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 δομής κινάσης, επηρεάζοντας τα αμινοξέα G463, G465 και G468 (**Εικόνα 3.3**). Άλλες

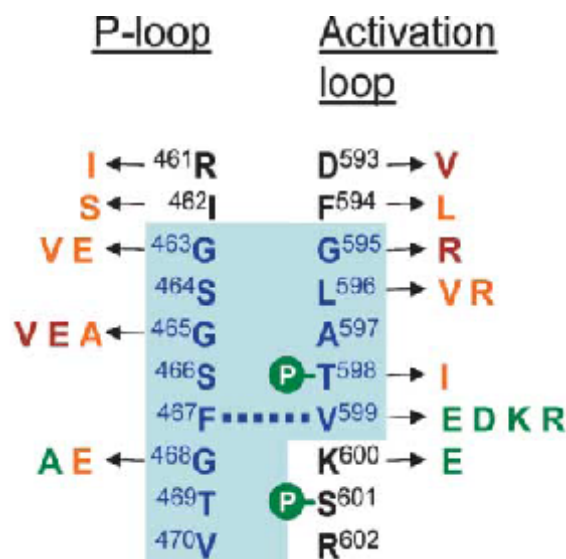
μεταλλαγές που αναγνωρίστηκαν έξω από αυτές τις περιοχές είναι οι: E585K, R681Q, I1325T και A727V.

Μία πρόσφατη μελέτη εκτίμησε το χρόνο εμφάνισης των BRAF μεταλλαγών στο κακόηθες μελάνωμα και έδειξε ότι οι V600E μεταλλαγές ανευρίσκονται στο 82% των πρωτοπαθών μελανωμάτων και στο 82% των σπύλων (Pollock, Harper et al. 2003). Σε μία άλλη μελέτη με όγκους παχέος εντέρου οι Rajagopalan et al. (Rajagopalan, Bardelli et al. 2002) 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 αφορούσαν 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. (Yuen, Davies et al. 2002) οι BRAF μεταλλαγές εντοπίστηκαν σε 16/389 (4%) δείγματα καρκίνου παχέος 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 μία μελέτη 179 μη-μικροκυτταρικών καρκίνων του πνεύμονα οι BRAF μεταλλάξεις εντοπίστηκαν σε 5 ασθενείς (3%), από τους οποίους μόνο ένας περιείχε την V600E μετάλλαξη (Brose, Volpe et al. 2002). Επίσης εντοπίστηκαν μια μεταλλαγή στο activation segment στο L596R και μια στο G loop στο G465V σε 2/127 (1.5%) αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα (Naoki, Chen et al. 2002). Καθώς η αλληλουχία του γονιδίου BRAF διαβάζεται σε όλο και περισσότερα δείγματα καρκίνου, είναι πιθανό να αναγνωριστούν στο μέλλον BRAF μεταλλάξεις σε ένα μεγαλύτερο αριθμό καρκίνων.

Λιγότερο από 1% των εξεργασιών 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 (Davies, Bignell et al. 2002; Rajagopalan, Bardelli et al. 2002; Yuen, Davies et al. 2002). Παρ' όλα αυτά, οι καρκινικοί τύποι με BRAF μεταλλάξεις είναι παρόμοιοι με αυτούς που φέρουν RAS μεταλλαγές και στους όγκους παχέος εντέρου, αμφότερα τα γονίδια είναι μεταλλαγμένα σε υψηλή συχνότητα στους ίδιους τύπους των προ-κακοήθων βλαβών με ανεπάρκεια στην επιδιόρθωση των λανθασμένων ζευγών βάσεων και στο ίδιο στάδιο της μετάβασης από αδένωμα σε καρκίνωμα (Rajagopalan, Bardelli et al. 2002; Yuen, Davies et al. 2002). Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, προτάθηκε ότι τα γονίδια BRAF και KRAS είναι ισοδύναμα ως προς τις ογκογονικές τους δράσεις (Davies, Bignell et al. 2002; Yuen, Davies et

al. 2002). Οι ογκογόνες RAS μεταλλάξεις και η BRAF V600E μεταλλαγή προκαλούν τη συνεχή ενεργοποίηση της ERK μόλις εκφραστούν σε ιστική κυτταροκαλλιέργεια cDNAs, τα οποία κωδικοποιούν τις μεταλλαγμένες εκδοχές. Αυτή η παρατήρηση αποτέλεσε στοιχείο ότι και τα δύο ογκογονίδια συνδέονται, μέσω απορύθμισης της ενεργότητας της ERK, με την ανάπτυξη ανθρώπινων όγκων (Mercer and Pritchard 2003).

Οι Wan et al. (Wan, Garnett et al. 2004) βρήκαν ότι σχεδόν όλες οι μεταλλαγμένες μορφές της BRAF (>80%) εντοπίζονται είτε εντός του P loop, είτε εντός του activation segment, μέσα στο μοτίβο DGF ή δίπλα σε αυτό (**Εικόνα 3.3**). Κατόπιν ταξινόμησαν τις μεταλλαγμένες μορφές της BRAF σε ομάδες υψηλής, ενδιάμεσης ή ελαττωμένης ενεργότητας, ανάλογα με την ικανότητα τους να διεγείρουν in vitro την ενεργότητα κινάσης της BRAF. Η ομάδα υψηλής ενεργότητας υπερέβαινε την ενεργότητα της wild type BRAF 100 έως 700 φορές, με την μεταλλαγή V600E να είναι ενεργοποιημένη κατά 460 φορές. Η ομάδα ενδιάμεσης ενεργότητας εμφάνιζε έως 10-πλάσια ενεργότητα ενώ η ομάδα ελαττωμένης ενεργότητας ήταν λιγότερο ενεργή από την BRAF.



Εικόνα 3.3. Ενεργοποίηση της B-Raf μέσω μετάλλαξης. 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 ενεργείς 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).

Το εκπληκτικό ήταν ότι αυτή η μεγάλη ποικιλία σε ενεργότητες μεταλλαγμένων μορφών BRAF κινάσης δεν μεταφραζόταν σε διαφορετικές ενεργότητες της ERK. Οι υψηλής και ενδιάμεσης ενεργότητας μεταλλαγμένες μορφές αύξαναν την ενεργότητα της ERK μόνο κατά 2 έως 4,6 φορές. Πώς όμως αυτό το μεγάλο εύρος των BRAF ενεργοτήτων ρυθμίζεται σε ένα τόσο μικρό εύρος ενεργοτήτων ERK; Προφανώς η εξήγηση βρίσκεται στην ύπαρξη ρυθμιστικών διόδων που ελέγχουν τη ροή του σήματος από την RAF προς τις MEK και ERK. Υποψήφιες πρωτεΐνες είναι οι KSR (Kinase suppressor of Ras) και RKIP (Raf-1 Kinase Inhibitory Protein). Το ενδιαφέρον ήταν ότι τρεις από τις τέσσερις ελαττωμένης ενεργότητας μεταλλαγμένες BRAF κινάσες μπορούσαν επίσης να επάγουν την ενεργοποίηση της ERK (**Εικόνα 3.3**). Οι Wan et al. (Wan, Garnett et al. 2004) έδειξαν ότι αυτό οφείλεται στην ενεργοποίηση της RAF-1 από τις σχετικές BRAF πρωτεΐνες. Οι υψηλής και ενδιάμεσης ενεργότητας μεταλλαγμένες μορφές BRAF ενεργοποιούσαν επίσης την RAF-1, αλλά σε αντίθεση με τις χαμηλής ενεργότητας μεταλλαγμένες BRAF δεν βασιζόνταν στην RAF-1 για τη διέγερση της ERK.

3.5. Ρύθμιση της ενεργότητας της RAF Κινάσης

3.5.1. Σύνδεση με την Ras

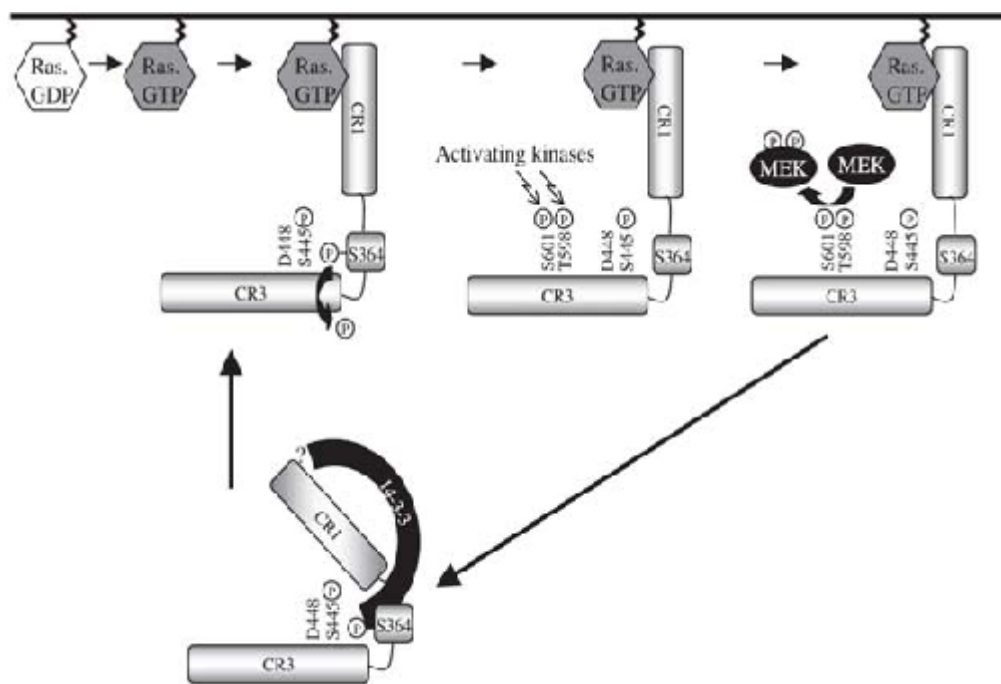
Η Ras αλληλεπιδρά με δύο περιοχές του αμινοτελικού άκρου της Raf-1: την RBD (Ras binding domain) και την CRD (cysteine-rich domain) (Brtva, Drugan et al. 1995). Η πιο ισχυρή αλληλεπίδραση είναι ανάμεσα στη Ras-GTP και την RBD η οποία αποδείχθηκε ότι δεν επαρκεί για να ενεργοποιήσει την Raf-1 κινάση αλλά δρα με το να επάγει την μεταφορά της στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, όπου ενεργοποιείται από φωσφορυλιώσεις (Chuang, Barnard et al. 1994; Stokoe, Macdonald et al. 1994;).

Η ρύθμιση της BRAF από την RAS έχει μελετηθεί λίγο σε σχέση με την RAF-1. Τα αλληλεπιδρώντα αμινοξέα στο μεσοδιάστημα των RAS/RAF είναι πανομοιότυπα για τις BRAF και RAF-1, οι οποίες προσδένονται εξίσου καλά με την Ha-RAS in vitro (Ghosh and Bell 1994; Okada, Hu et al. 1999). Το ελεύθερο κυτταροπλασματικής μεμβράνης σύμπλοκο των πρωτεϊνών BRAF και 14-3-3

μπορεί να ενεργοποιηθεί *in vitro* από την ανασυνδιασμένη RAS (Yamamori, Kuroda et al. 1995). Αυτό έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τις RAF-1 και A-RAF, οι οποίες για να ενεργοποιηθούν πλήρως απαιτούν φωσφορυλιώσεις σερίνης και τυροσίνης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και δεν μπορούν να ενεργοποιηθούν μόνο από την RAS *in vitro* (Marais, Light et al. 1997).

3.5.2. Φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση

Πρόσφατα προτάθηκε ένα μοντέλο για την ενεργοποίηση της Raf-1 από τους Dhillon et al. (Dhillon, Meikle et al. 2002) το οποίο όμως δεν μπορεί να εφαρμοστεί πλήρως στη B-Raf καθώς υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο τρόπο ρύθμισής τους. Στα 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 και δημιουργίας του Ras-GTP, η B-raf προσδένεται στην Ras και μετατοπίζεται στη κυτταροπλασματική μεμβράνη. Όπως και στη Raf-1, η φωσφατάση PP2A απομακρύνει τη φωσφορική ομάδα από τη S364. Στη συνέχεια ενεργείς κινάσες φωσφορυλιώνουν τα αμινοξέα S601 και T598 οδηγώντας σε πλήρη ενεργοποίηση της B-Raf. Η απενεργοποίηση των Raf-1 και B-Raf πραγματοποιείται μέσω φωσφορυλιώσεων και αποφωσφορυλιώσεων με επακόλουθη πρόσδεση της 14-3-3 (**Εικόνα 3.4**). Η σερίνη 445 είναι συνεχώς φωσφορυλιωμένη στη 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 υψηλότερη της Raf-1 (Mason, Springer et al. 1999).



Εικόνα 3.4. Μοντέλο για την ενεργοποίηση της B-Raf

3.5.3. Ενεργοποίηση MEK1/2

Οι MEK1/2 είναι τα μοναδικά αποδεκτά καθοδικά υποστρώματα των τριών πρωτεϊνών Raf (Kolch W 2000;). Οι ERK1/2 ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση μιας τυροσίνης και μιας θρεονίνης στο TEY μοτίβο του activation loop και αυτές οι φωσφορυλιώσεις καταλύονται από τις MEK1/2 (Dent, Hasser et al. 1992). Η MEK1 ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση δύο καταλοίπων σερίνης στις θέσεις 218 και 222 του activation loop (Howe, Leever et al. 1992; Yan and Templeton 1994; Papin, Eychene et al. 1995). Οι MEK1/2 περιέχουν μια αλληλουχία πλούσια σε προλίνες, η οποία θεωρείται απαραίτητη για την αναγνώριση και ενεργοποίηση από τις πρωτεΐνες Raf. Η αλληλουχία αυτή δεν συναντάται σε άλλες MAPKKs και συνεπώς αποτελεί μια ειδική βάση για την σηματοδότηση των MEK1/2 από τις πρωτεΐνες Raf (Catling, Schaeffer et al. 1995).

Ένα σημαντικό στοιχείο που προέκυψε από τις μελέτες ενεργοποίησης των MEK/ERK από τις πρωτεΐνες Raf, είναι ότι η B-Raf έχει μια πολύ μεγαλύτερη ικανότητα να ενεργοποιεί αυτές τις καθοδικές κινάσες από ότι οι άλλες δύο πρωτεΐνες Raf. Αυτό συμβαίνει σε πολλούς κυτταρικούς τύπους (ινοβλάστες, νευρικά κύτταρα λεμφοκύτταρα), ανεξάρτητα εάν η B-Raf εκφράζεται σε υψηλά

επίπεδα ή όχι (Jaiswal, Moodie et al. 1994; Eychene, Dusanter-Fourt et al. 1995). Επίσης η B-Raf έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το υπόστρωμά της από ότι οι άλλες δύο πρωτεΐνες Raf. Μόλις υπερεκφραστούν σε ιστική κυτταροκαλλιέργεια και ανοσοκατακρημνιστούν οι τρεις πρωτεΐνες Raf μπορούν να φωσφορυλιώσουν και να ενεργοποιήσουν την MEK, όμως η B-Raf έχει 50 φορές μεγαλύτερη ικανότητα έναντι της Raf-1 (Marais, Light et al. 1997).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση της συχνότητας και η προγνωστική αξία των σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων της οικογένειας RAS σε άτομα με καρκίνο ουροδόχου κύστης. Δείγματα από ουροθηλιακό καρκίνο και φυσιολογικό ουροθήλιο 30 ασθενών μελετήθηκαν με τις μεθόδους PCR/RFLP (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης / ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων) και DNA sequencing (αλληλούχιση DNA) για την παρουσία μεταλλάξεων των γονιδίων RAS στα κωδικόνια 12 και 13.

Επιπλέον, με την τεχνική real time RT-PCR (αντίστροφη μεταγραφή - αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο) μελετήθηκε το επίπεδο έκφρασης των ογκογονιδίων RAS στο επίπεδο του mRNA στον ουροθηλιακό καρκίνο και συγκρίθηκε με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης στο παρακείμενο φυσιολογικό ουροθήλιο.

Τέλος, διερευνήθηκε η συχνότητα των σημειακών μεταλλάξεων του γονιδίου BRAF στα δείγματα νεοπλασματικού και φυσιολογικού ουροθηλίου των παραπάνω ασθενών. Η μετάλλαξη V600E μελετήθηκε με τη μέθοδο PCR/RFLP και τα εξόνια 11, 14 και 15 συμπεριλαμβανομένων των σημείων συνάντησης ιντρονίων/εξονίων υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση DNA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Υλικά και Μέθοδοι

5.1. Ασθενείς και μάρτυρες

Ζεύγη δειγμάτων ουροθηλιακού καρκίνου και παρακείμενου φυσιολογικού ουροθηλίου από 30 ασθενείς με πρωτοεμφανιζόμενους όγκους ουροδόχου κύστης που υποβλήθηκαν σε διουρηθρική αφαίρεση στο Ουρολογικό τμήμα του Γ.Ν. «Ασκληπιείο» Βούλας, μελετήθηκαν προοπτικά για την παρουσία μεταλλάξεων των K-, H- και N-RAS ογκογονιδίων με τη χρήση των μοριακών τεχνικών PCR/RFLP και DNA sequencing. Όλοι οι ασθενείς ήταν προχωρημένης ηλικίας (μέση ηλικία \pm SD=72.2 \pm 10.6 έτη). Από τους 30 ασθενείς, οι 26 (87%) ήταν ενεργοί ή πρώην καπνιστές ενώ οι 19 (63%) είχαν κάποιο βαθμό επαγγελματικής έκθεσης σε παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την ανάπτυξη ουροθηλιακού καρκίνου (**Πίνακας 5.1**).

Όλοι οι όγκοι εξετάσθηκαν και ταξινομήθηκαν από τον ίδιο παθολογοανατόμο. Η ιστολογική βαθμολόγηση πραγματοποιήθηκε με τις 1973 WHO και 2004 WHO/ISUP (International Society of Urological Pathology) ταξινομήσεις (Lopez-Beltran and Montironi 2004). Το στάδιο του όγκου εκτιμήθηκε με το σύστημα της 2002 American Joint Committee on Cancer (Greene and Sobin 2008). Η Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης είχε εγκρίνει την παρούσα μελέτη και όλοι οι ασθενείς είχαν δώσει γραπτώς τη συγκατάθεσή τους. Κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη ήταν πρωτοεμφανιζόμενοι όγκοι ουροδόχου κύστης και η διαθεσιμότητα DNA από νεοπλασματικό και φυσιολογικό ιστό για μοριακή ανάλυση. Κριτήρια αποκλεισμού αποτέλεσαν ιστορικό προηγούμενου ουροθηλιακού όγκου και χημειοθεραπείας ή ακτινοθεραπείας πριν τη χειρουργική αφαίρεση.

Τα δείγματα όγκων λήφθηκαν κατά τη διάρκεια της χειρουργικής εξαίρεσης τους ενώ οι φυσιολογικοί ιστοί με ψυχρή βιοψία από 3 κυρίως θέσεις που περιλάμβαναν το οπίσθιο τοίχωμα, το τρίγωνο και την παρακείμενη του όγκου περιοχή. Τμήματα των εξαιρεθέντων φυσιολογικών ιστών στάλθηκαν για παθολογοανατομική εξέταση. Τα δείγματα στη συνέχεια καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την απομόνωση του DNA.

Πίνακας 5.1. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών.

	Αριθμός Ασθενών
Σύνολο [‡]	30
Φύλο	
Ανδρες	27
Γυναίκες	3
Μέση Ηλικία	72.2 (44-86)
Κάπνισμα	
Μη Καπνιστές	4
Πρώην Καπνιστές	8
Καπνιστές	18
Επαγγελματική έκθεση [*]	
Ναι	19
Όχι	11
Στάδιο	
pTa	1
pT1	12
pT1a	4
pT1b	1
pT2	2
pT2a	1
pT2b	5
pT2+in situ	3
pT3a	1
WHO 1973 grade	
I	0
II	10
III	20
WHO/ISUP 2004 grade	
Χαμηλό	8
Υψηλό	22

‡ Συνολικά 30 δείγματα καρκίνου ουροδόχου κύστης και 30 παρακείμενου φυσιολογικού ουροθηλίου. * Σε χημικές ουσίες, βαφές, πετρέλαιο, κλπ.

Οι ασθενείς με επιφανειακή νόσο υποβλήθηκαν σε περιοδική παρακολούθηση με κυστεοσκοπικό έλεγχο και ενδοκυστική θεραπεία. Οι ασθενείς με διηθητική νόσο σε ριζική κυστεοπροστατεκτομή με ή χωρίς επικουρική χημειοθεραπεία. Σε μέσο χρόνο παρακολούθησης 24±3 μήνες, 8 ασθενείς (26.6%) παρουσίασαν υποτροπή. Στους ασθενείς σταδίου Ta/T1 η συχνότητα

υποτροπής ήταν 29.4% (5 από τους 17) σε σχέση με 23% (3 στους 13) των ασθενών σταδίου T2-T3. Στους ασθενείς με επιφανειακή νόσο grade II και III η πιθανότητα προόδου ήταν 11.1% και 22.2% αντίστοιχα. Όλες οι υποτροπές επιβεβαιώθηκαν με βιοψία.

5.2. 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, επωάζεται 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 (Sambrook, Fritsch et al. 1989).

5.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Το 1985 ο Mullis και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μια τεχνική in vitro πολλαπλασιασμού του DNA (Saiki, Scharf et al. 1985). 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 (Kawasaki and Erlich 1990; Wright and Wynford-Thomas 1990; Arnheim and Erlich 1992; Larrick 1992).

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 προέλευσής του δύνανται να ποικίλουν (νωπός ιστός, σωματικά υγρά, μονιμοποιημένοι ιστοί κλπ.) (Wright and Wynford-Thomas 1990; Wang, Kumar et al. 1994). Μοναδική προϋπόθεση είναι να υπάρχει τουλάχιστον ένα ακέραιο τμήμα DNA, το οποίο να εμπεριέχει την περιοχή που αναζητείται για ενίσχυση.

5.3.1. Η βασική αρχή λειτουργίας της PCR

Στη βασική της μορφή η αντίδραση PCR είναι μια χημική παρά βιολογική μέθοδος για τη δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε σχέση με άλλες αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων, οι οποίες υπάρχουν στο μείγμα της αντίδρασης (Saiki, Scharf et al. 1985; Arnheim and Erlich 1992). 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 το στόχο για ενίσχυση. Η γνώση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων στην περιοχή στόχο αποτελεί τη βάση για το 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 τμήματος DNA το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των θέσεων των δύο εκκινητών. Η επιτυχία της PCR αντίδρασης εξαρτάται από τα ακόλουθα στοιχεία :

1. Σχεδιασμό κατάλληλων εκκινητών

Η ειδικότητα της PCR αντίδρασης ως προς την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί εξαρτάται από τους εκκινητές. 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 πολυουρίνες 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. Θερμοκρασία 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. Συγκέντρωση δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και ιόντων Mg⁺⁺

Τα ιόντα Mg⁺⁺ 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 τους 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^{++} .

4. Επιλογή αριθμού 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 μία στατική φάση (plateau), κατά την οποία νέα αύξηση του αριθμού των κύκλων δεν οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης. Για την 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 αυτές της αλληλουχίας-στόχου (Siebert and Larrick 1992). Με τον τρόπο αυτό επιτελείται συναγωνισμός ανάμεσα στις δύο αλληλουχίες που συνενισχύονται, οπότε η αφθονία των αρχικών αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου εκφράζεται σαν ο λόγος της ως προς την ένταση της ζώνης που αντιστοιχεί στο συναγωνιστή.

5. Παρουσία ενισχυτών και αναστολέων

Αναστολείς μπορεί να υπάρχουν είτε στα βιολογικά δείγματα είτε στα χημικά αντιδραστήρια. Παράδειγμα αναστολέων είναι τα 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 (Saiki, Scharf et al. 1985; Arnheim and Erlich 1992). Η χρήση θερμοανθεκτικών πολυμερασών και η κατασκευή θερμικών κυκλοποιητών έδωσε τη δυνατότητα αυτοματοποίησης και ταυτόχρονης ανάπτυξης πολλαπλών δειγμάτων σε σύντομο χρόνο και με ελάχιστο κόστος.

5.3.2. Συνθήκες αντιδράσεων PCR και εκκινητές

Μισό έως 2 μg του εκχυλίσματος DNA από κάθε δείγμα υποβλήθηκε σε ενζυμική ενίσχυση σε τελικό όγκο 50 μl . Η αντίδραση περιλάμβανε 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης, 150 μM από κάθε dNTP, 0.5 μM από κάθε εκκινητή, Mg^{++} σε τελική συγκέντρωση 2-3 mM και 1.25 U πολυμεράσης. Το μίγμα αρχικά επώαστηκε για 1 min στους 95°C και ακολούθησαν 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 5.2-5.3**). Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων της PCR χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

Πίνακας 5.2. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γενωμικού DNA, θερμοκρασία υβριδισμού του κάθε ζεύγους, μέγεθος του PCR προϊόντος και των προϊόντων πέψης.

Γονίδιο	Εκκινητές	Θερμοκρασία υβριδισμού- T _a (°C)	PCR προϊόν (bp)	RFLP προϊόντα (bp)			
K-RAS	5'- ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTT GGACCT-3' (S)	58	157	113/29/15 (wt)			
	5'-TCAAAGAATGGTCCTGGACC-3' (A)			142 (mut)			
	H-RAS			5'-GAGACCCTGTAGGAGGACCC-3' (S)	62	312	236/55/21 (wt)
				5'-GGGTGCTGAGACGAGGGACT- 3'(A)			291 (mut)
N-RAS	5'-AACTGGTGGTGGTTGGACCA-3' (S)	57	83	41/23/19 (wt)			
	5'- ATATTCATCTACAAAGTGGTCCTGG A-3' (A)			60 (mut)			
	BRAF exon15			5'-ATCTACTGTTTTCTTTACTT-3' (S)	51	216	
5'-TAGTAACTCAGCAGCATCT-3' (A)							
β2- microgl obulin	5'-TCCAACATCAACATCTTGGA-3' (S)	56	122				
	5'-TCCCCCAAATTCTAAGCAGA-3' (A)						

Πίνακας 5.3. Συνθήκες αντίδρασης PCR και εκκινητής αλληλούχισης του εξονίου 15 του γονιδίου BRAF. Ο εκκινητής βρισκόταν στο-γειτονικό του κωδικού εξονίου- ιντρόνιο του γονιδίου BRAF, με σκοπό να συμπεριληφθούν στο ενισχυμένο προϊόν οι αλληλουχίες από το όριο ιντρονίου/εξονίου καθώς επίσης και τα τελικά ίχνη της αλληλούχισης. Η PCR της αλληλούχισης είχε 25 κύκλους επανάληψης. Η αλληλούχιση των γονιδίων RAS έγινε με τη χρήση των ίδιων εκκινητών (Sense και Antisense) που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR.

Γονίδιο	Εκκινητής	PCR προφίλ
		96°C για 30 sec (αποδιάταξη)
BRAF exon15 (seqDNA)	5'-CCCTGAGATGCTGCTGAGTT-3'	54°C για 10 sec (υβριδοποίηση)
		60C για 4 min (επέκταση)

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

Η τελική συγκέντρωση αγαρόζης στο πήκτωμα αποφασίζεται ανάλογα με τη ζητούμενη διακριτική ικανότητα του συγκεκριμένου πήκτωματος (Sambrook 1989). 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 «πηγαδάκια» 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.

5.5. Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)

Η τεχνική της ανάλυσης πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (restriction fragment length polymorphism ή RFLP) στηρίζεται στη 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. Στη 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 τη δημιουργία δύο θέσεων αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Bst*NI, από τις οποίες η μία περιλαμβάνει το κωδικόνιο 12 ενώ η άλλη λειτουργεί ως «μάρτυρας». Με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η λανθασμένη εκτίμηση μίας ατελούς πέψης και η εύρεση ψευδών μεταλλάξεων. Αυτό έγινε γιατί δεν υπάρχουν ενδογενώς θέσεις αναγνώρισης από άλλες ενδονουκλεάσες που να περιλαμβάνουν το κωδικόνιο 12, με αποτέλεσμα να πρέπει να δημιουργηθούν τεχνητά. Ο εκκινητής που βρίσκεται στο 5' άκρο (K5') έχει ενσωματωμένο ένα κατάλοιπο C αντί για G στην πρώτη θέση του κωδικονίου 11, δημιουργώντας έτσι μια θέση αναγνώρισης για το *Bst*NI (CCTGG), η οποία περιλαμβάνει τα δύο πρώτα νουκλεοτίδια του κωδικονίου 12 (GGT). Σημειακή μετάλλαξη σε μία από τις δύο αυτές θέσεις καταστρέφει τη θέση αναγνώρισης του *Bst*NI 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 *Bst*NI στους 60°C για 16 ώρες, οπότε προκύπτουν διαφορετικού μήκους τμήματα DNA για το φυσιολογικό και το μεταλλαγμένο γονίδιο. 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 ομόλογων βάσεων (mismatch) στους εκκινητές, αφού υπάρχουν ενδογενώς δύο θέσεις αναγνώρισης (CCGG) για την περιοριστική ενδονουκλεάση *Msp*I στο προϊόν της PCR που παράγεται με τους συγκεκριμένους εκκινητές. Η πρώτη θέση που εντοπίζεται στο τέλος του εκκινητή στο 5' άκρο (H5'), βρίσκεται στο εσόνιο μεταξύ των εξονίων 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 πέψης 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). 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 *Bst*NI (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 *Bst*NI, ενώ η τρίτη θέση του κωδικονίου που δεν μπορεί να ελεγχθεί με το *Bst*NI 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 θέσης μάρτυρα για την *Bst*NI, αφού ολόκληρη η θέση αναγνώρισης βρίσκεται μέσα στον εκκινητή N12a. Έτσι μέρος (10-40 μl) του προϊόντος PCR υφίστανται πέψη με 30 U της *Bst*NI στους 60°C για 16 ώρες. Η ανάλυση των προϊόντων RFLP έγινε σε 3% γέλη αγαρόζης 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*.

B-RAF: 10 μl του προϊόντος ενίσχυσης υποβλήθηκε σε πέψη για 16 ώρες στους 65°C με 10 U του περιοριστικού ενζύμου *Tsp*RI σε 30μl όγκο αντίδρασης. Η περιοριστική ενδονουκλεάση *Tsp*RI (NNCAC/GTGNN) χρησιμοποιείται επειδή η μετάλλαξη T1799A καταργεί αυτό το σημείο περιορισμού, το οποίο είναι παρόν στην αγρίου τύπου αλληλουχία. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η ίδια αντίδραση αφού αντικαταστάθηκε το ένζυμο με απιονισμένο νερό. Τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 3% και φωτογραφήθηκαν υπό ακτινοβολία UV.

5.6. Άμεση αλληλούχιση DNA (direct sequencing)

Η άμεση αλληλούχιση έγινε με τη μέθοδο των διδεδοξυ-τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (ddNTPs), τα οποία έχουν ένα H στον 3' άνθρακα του σακχάρου

ριβόζης, αντί για τη φυσιολογική ομάδα OH που εντοπίζεται στα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) (Μέθοδος του Sanger). Τα διδεοξυνουκλεοτίδια διακόπτουν την PCR αντίδραση. Σε μία 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 απύσασα.

Στην άμεση αλληλούχιση και οι 4 διδεοξυ αντιδράσεις επιτελούνται στο ίδιο σωληνάκι. Αυτό γίνεται λόγω του ότι κάθε ddNTP είναι σεσημασμένο με μία διαφορετική φθορίζουσα χρωστική. Συνεπώς, η χρωστική μέσα σε κάθε νεοσυντιθέμενο τμήμα αντιστοιχεί στη χρωστική που είναι προσδεδεμένη στο διδεοξυνουκλεοτίδιο, που προστέθηκε για να τερματίσει τη σύνθεση εκείνου του τμήματος. Μία 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 σεσημασμένα τμήματα μετακινούνται γρηγορότερα από τα μεγαλύτερα. Ένας μετρητής χρωστικής κι ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής εντοπίζουν και καταγράφουν τη χρωστική που είναι προσδεδεμένη στα τμήματα τα οποία διατρέχουν τη γέλη. Η αλληλουχία καθορίζεται από τη σειρά με την οποία καταγράφονται οι χρωστικές από τη γέλη.

Τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν με το Qiaquick PCR purification kit (Qiagen Inc) και ακολούθησε δεύτερη αντίδραση PCR με τον 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 70% αιθανόλη, 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 έγινε η ανάλυση του καθορισμού των αλληλουχιών RAS και BRAF. Οι αλληλουχίες ελέγχθηκαν διπλά κάνοντας χρήση ξεχωριστά των πρόσθιων και οπίσθιων εκκινητών κάθε φορά. Τα δεδομένα της αλληλούχισης

αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας κατάλληλο λογισμικό ανάλυσης αλληλουχιών (Sequence Analysis 3.7; Applied Biosystems).

5.7. 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) επώαστηκε 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.

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

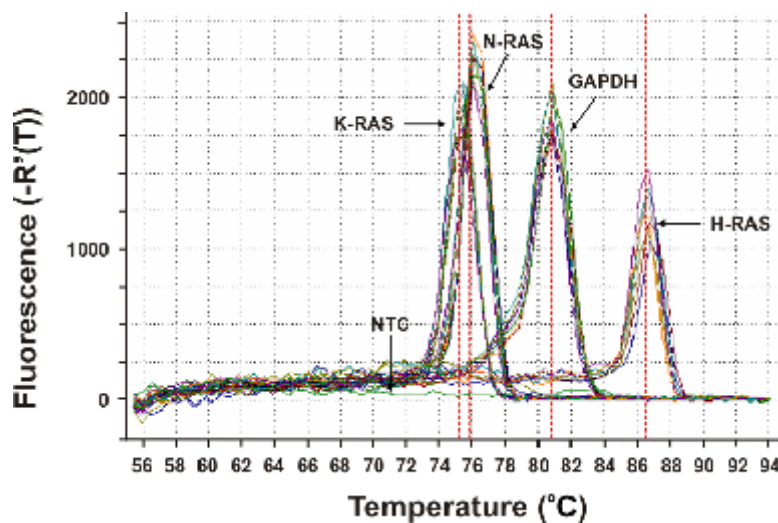
Τα διαφορετικά επίπεδα της mRNA έκφρασης των τριών γονιδίων RAS μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας την αντίστροφη μεταγραφή - αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time RT-PCR) με τη χρωστική SYBR-Green I. Όλα τα ζεύγη των εκκινητών σχεδιάστηκαν ώστε να έχουν απόσταση τουλάχιστον ενός ιντρονίου 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 των όγκων ουροδόχου κύστης και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού, 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 επώαστηκε για 5 min στους 95°C και ακολούθησαν 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 κάθε ζεύγους εκκινητών και το μέγεθος των προϊόντων PCR των γονιδίων αναγράφονται στον **Πίνακα 5.4**. 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 (**Εικόνα 5.1**).

Πίνακας 5.4. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του συμπληρωματικού DNA (cDNA), θερμοκρασία υβριδισμού του κάθε ζεύγους και μέγεθος του PCR προϊόντος.

Γονίδιο	Εκκινητές	Θερμοκρασία υβριδισμού- T _a (°C)	PCR προϊόν (bp)
K-RAS	5'-GGGGAGGGCTTTCTTTGTGTA-3' (S) 5'-GTCCTGAGCCTGTTTTGTGTC-3' (A)	55	174
H-RAS	5'-GGGGCAGTCGCGCCTGTGAA-3' (S) 5'-CCGGCGCCCACCACCACAG-3' (A)	65	110
N-RAS	5'-CTTCCTCTGTGTATTTGCCATCA-3' (S) 5'-GCACCATAGGTACATCATCCGA-3' (A)	55	107
GAPDH	5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3' (S) 5'-GTCATTGATGGCAACAATATCCACT-3' (A)	60	101



Εικόνα 5.1. Η ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης (melt curve analysis) για τα γονίδια K-, H-και N-RAS και του εσωτερικού μάρτυρα GAPDH αποκαλύπτει μονές κορυφές καμπυλών για όλα τα γονίδια (75.8°C για το K-RAS, 76°C για το N-RAS, 86.2°C για το H-RAS, 80.3°C για το GAPDH) και απουσία κορυφών για τους αρνητικούς μάρτυρες (Non-Template Controls/NTC), αποδεικνύοντας αποκλεισμό γενωμικού DNA και ειδικότητα του προϊόντος της PCR.

Η συλλογή των δεδομένων έγινε τόσο κατά την υβριδοποίηση των εκκινητών όσο και κατά τη 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 αгарόζης 2%, έπειτα από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογραφήθηκαν στο UV light transilluminator. Σε κάθε αντίδραση PCR συμπεριελήφθησαν δύο αρνητικοί 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 ΔΔCt. 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 όγκων και των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών κανονικοποιήθηκαν αρχικά απέναντι στην ποικιλία, στην ποιότητα και την ποσότητα του κάθε δείγματος. Οι κανονικοποιημένες ως προς τη 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: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{όγκου}} - \Delta Ct_{\text{φυσιολογικού ιστού}}$ και η έκφραση των κανονικοποιημένων (με το γονίδιο GAPDH) γονιδίων στον όγκο σε σχέση με τον αντίστοιχο φυσιολογικό ιστό που χρησιμοποιήθηκε ως calibrator, ισούται με $(1 + \text{Efficiency})^{-\Delta\Delta Ct}$. Η διπλάσια αύξηση ή μείωση της τιμής θεωρήθηκε υπερέκφραση ή υποέκφραση του mRNA αντίστοιχα στο συγκεκριμένο κάθε φορά δείγμα καρκίνου ουροδόχου κύστης.

5.8.1. 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 σχέση τους ανα-ζεύγη και η σχέση τους με συνεχείς μεταβλητές (ηλικία, κάπνισμα, stage/grade όγκου). Τα μη-παραμετρικά τεστ Mann-Whitney U και Kruskal-Wallis χρησιμοποιήθηκαν για να εξεταστεί η συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση των γονιδίων και τις διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους μετά από διαστρωμάτωση. Επίσης, εφαρμόστηκε η μέθοδος της πολ/πλής λογιστικής παλινδρόμησης. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS 11.5 (SPSS, Chicago, IL). Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε στο επίπεδο 95% (P-value < 0.05).

5.9. Διαλύματα

5.9.1. 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.

5.9.2. 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% κυανούν της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανούν του ξυλενίου και 40% γλυκερόλη.

5.10. Ένζυμα

Go Taq Flexi DNA πολυμεράση (Promega).

StrataScript αντίστροφη μεταγραφάση (Stratagene).

RNase Block Inhibitor (Stratagene).

Πρωτεϊνάση K (Promega).

BstN I περιοριστικό ένζυμο (New England Biolabs).

Msp I περιοριστικό ένζυμο (New England Biolabs).

TspR I περιοριστικό ένζυμο (New England Biolabs).

5.11. Υλικά και εταιρείες προέλευσης

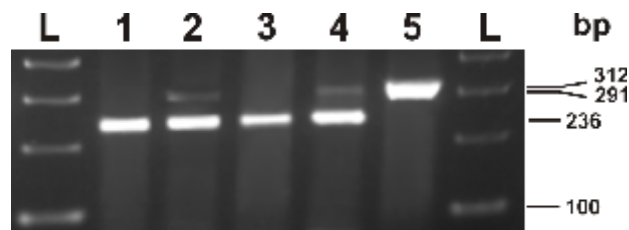
Υλικό	Εταιρία	Υλικό	Εταιρία
Αγαρόζη	Invitrogen	Μεθανόλη	Fluka
Αιθανόλη	Merck	SDS	BDH
Ανθρακικό νάτριο	Sigma	TEMED	Sigma
Βορικό οξύ	BDH	Tris base	BDH
Bromophenol blue	Sigma	Υδροξείδιο του Νατρίου	Sigma
Βρωμιούχο αιθίδιο	BDH	Υδροχλωρικό οξύ	BDH
Γλυκερόλη	Invitrogen	Φαινόλη	BDH
Διθειοθρεϊτόλη	Sigma	Φορμαλδεύδη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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

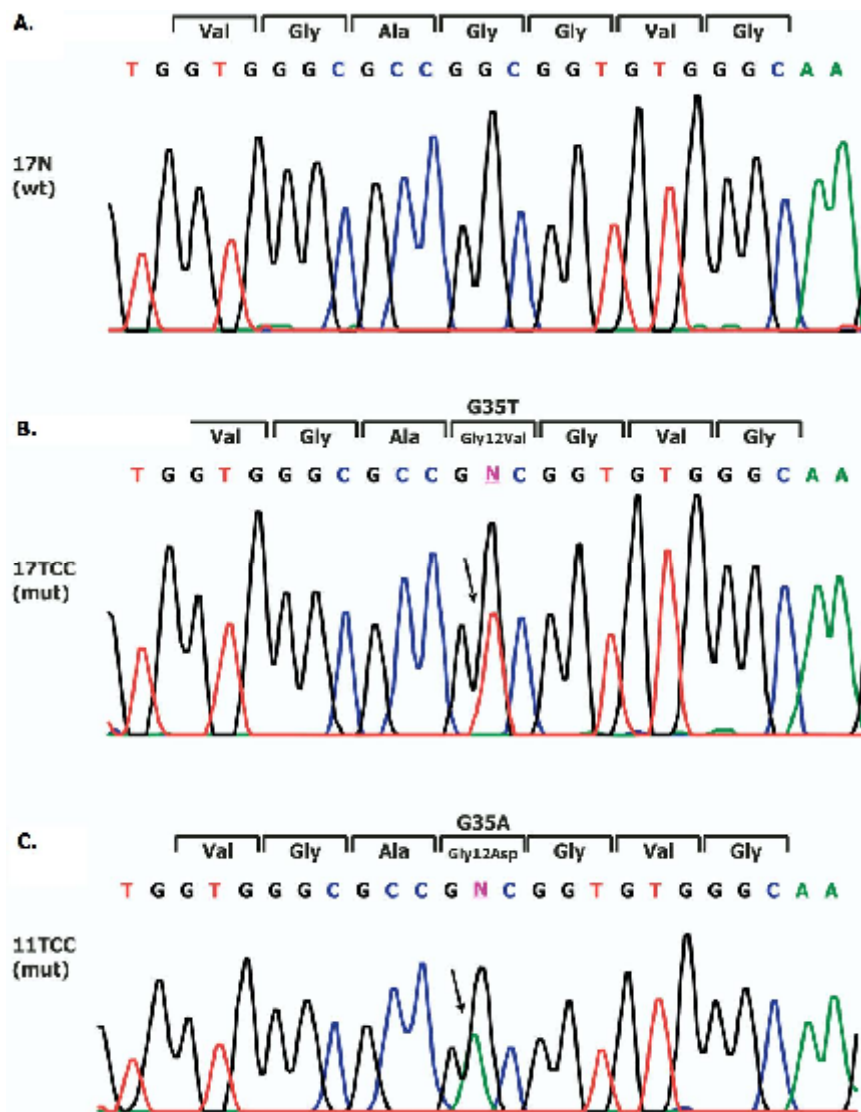
Αποτελέσματα

6.1. Ανάλυση μεταλλάξεων ογκογονιδίων RAS

Σε 30 ασθενείς πραγματοποιήθηκε ανάλυση μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12 και 13 των ογκογονιδίων K-, H- και N-RAS. Καμία μεταλλαγή δεν παρατηρήθηκε στα K και N-RAS γονίδια. Παρόλα αυτά, 9 δείγματα ουροθηλιακού καρκίνου έφεραν μεταλλαγές στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου H-RAS, με αντικαταστάσεις αμινοξέων που συνάγονταν από την άμεση αλληλούχιση (**Εικόνες 6.1-6.2**). Μία μετάλλαξη (2TCC) ήταν ομόζυγη (11%) και οι υπόλοιπες (89%) ετερόζυγες. Επτά από τα 9 δείγματα (78%) έφεραν GGC→GAC μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12, οδηγώντας σε αντικατάσταση στο σημείο αυτό της Gly→Asp. Τα υπόλοιπα δύο δείγματα έφεραν GGC→GTC μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 με αποτέλεσμα την αντικατάσταση της Gly→Val. Καμία μεταλλαγή των γονιδίων RAS δεν ανευρέθηκε στο κωδικόνιο 13. Να σημειωθεί ότι μόνο 2 από τους ασθενείς με μεταλλάξεις είχαν διηθητική νόσο σταδίου pT2-in situ και pT3a αντίστοιχα ενώ οι υπόλοιποι 7 (77%) είχαν επιφανειακή νόσο σταδίου pT1, pT1a και pT1b.



Εικόνα 6.1. Τα H-RAS προϊόντα της PCR (312 bp) κόπηκαν με το περιοριστικό ένζυμο Msp I και ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αгарόζης 3%. L, 100bp DNA ladder; πηγαδάκια 1, 3, δείγματα αγρίου τύπου (wt); πηγαδάκια 2, 4, ετερόζυγα mut δείγματα ; πηγαδάκι 5, άπεπτο PCR προϊόν H-RAS.

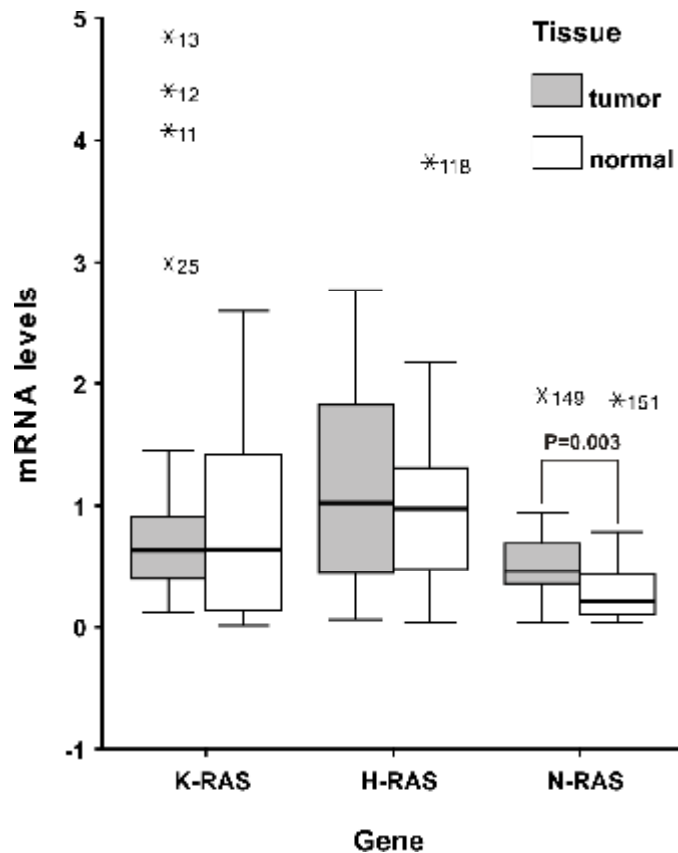


Εικόνα 6.2. Ηλεκτρογραφήματα αλληλούχισης των προϊόντων H-RAS της PCR που απεικονίζουν μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 σε ασθενείς με καρκίνο ουροδόχου κύστης. **A.** Αγρίου τύπου αλληλουχίες των κωδικονίων 9 έως 15 του γονιδίου H-RAS και αντίστοιχα κωδικοποιούμενα αμινοξέα σε δείγμα φυσιολογικού ιστού. **B.** Αλληλουχία δείγματος ουροθηλιακού καρκίνου που φέρει ετερόζυγη σημειακή μετάλλαξη (GGC→GTC; **Gly12Val**) στο κωδικόνιο 12. **C.** Αλληλουχία δείγματος ουροθηλιακού καρκίνου που φέρει άλλη ετερόζυγη σημειακή μετάλλαξη (GGC→GAC; **Gly12Asp**) στο κωδικόνιο 12.

6.2. Ανάλυση έκφρασης ογκογονιδίων RAS

Όλα τα γονίδια RAS εκφράζονταν στα δείγματα που μελετήθηκαν. Σύμφωνα με το λόγο έκφρασης κάθε γονιδίου RAS στον ουροθηλιακό καρκίνο σε σχέση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό, καθορίστηκαν 3 ομάδες έκφρασης που περιλάμβαναν <0.5- υποέκφραση, 0.5-2.0- ίση έκφραση και >2.0- υπερέκφραση (**Πίνακας 6.1**). Από τα δείγματα με εξεργασία 11 (37%) παρουσίαζαν υπερέκφραση ενός γονιδίου RAS, 7 (23%) δύο γονιδίων ενώ μόνο 4 υπερέκφραζαν και τα τρία γονίδια RAS.

Το υψηλότερο ποσοστό υπερέκφρασης παρατηρήθηκε στα K και N-RAS γονίδια (καθένα 50%) ενώ το γονίδιο H-RAS παρουσίαζε χαμηλότερο επίπεδο (27%). Είναι προφανές λοιπόν ότι τα ογκογονίδια RAS δεν έχουν ένα κοινό πρότυπο υπερέκφρασης στον ουροθηλιακό καρκίνο, οδηγώντας στην υπόθεση ότι η έκφρασή τους αυτή διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Η μέση τιμή \pm SD υποέκφρασης των γονιδίων RAS ήταν 0.27 ± 0.12 για τα K και H-RAS και 0.38 ± 0.04 για το N-RAS. Ο λόγος ίσης έκφρασης ήταν παρόμοιος για τα K, H και N-RAS (1.03 ± 0.44 , 1.20 ± 0.48 και 0.92 ± 0.45 αντίστοιχα). Παρατηρήθηκε όμως ένα ιδιαίτερο πρότυπο υπερέκφρασης και των τριών μελών της οικογένειας RAS, καθένα εκ των οποίων εμφάνισε ένα διαφορετικό πεδίο τιμών του λόγου καρκινικός ιστός/φυσιολογικός ιστός (**Πίνακας 6.1**). Ειδικότερα, ενώ η μέση τιμή πολλαπλάσιας αλλαγής των επιπέδων έκφρασης για το K-RAS ήταν 4.53 ± 2.52 , 4 δείγματα έδειξαν σημαντική αύξηση του μεταγραφικού επιπέδου mRNA K-RAS συγκρινόμενα με τα παρακείμενα φυσιολογικά τους (21.67 ± 1.14) (**Εικόνα 6.3**). Εξι δείγματα έδειξαν υπερέκφραση του mRNA H-RAS (μέση τιμή πολλαπλάσιας αλλαγής 2.64 ± 0.43) ενώ 2 ουροθηλιακοί όγκοι είχαν ιδιαίτερα αυξημένη τιμή (18.04 ± 8.24). Τέλος, η μέση πολλαπλάσια αλλαγή των μεταγραφικών επιπέδων για το N-RAS ήταν 3.83 ± 1.32 σε 11 δείγματα, όμως 4 δείγματα είχαν ακόμη πιο σημαντική υπερέκφραση του N-RAS σε σχέση με το φυσιολογικό ιστό (18.65 ± 5.80).



Εικόνα 6.3. Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων RAS σε δείγματα καρκίνου ουροδόχου κύστης και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού. Τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων K και N-RAS ήταν υψηλότερα στα δείγματα από ουροθηλιακό καρκίνο συγκριτικά με των φυσιολογικών ιστών (N-RAS, $P=0.003$; Mann-Whitney U test) ενώ τα επίπεδα mRNA H-RAS ήταν παρόμοια ανάμεσα στα δύο είδη ιστού.

Πίνακας 6.1. Μεταλλαγές και μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων RAS σε ασθενείς με καρκίνο ουροδόχου κύστης.

Αριθμός Ασθενών	Μεταλλαγές H-RAS *	Καρκίνος ουροδόχου κύστης/Φυσιολογικός ιστός (έκφραση)		
		K-RAS	H-RAS	N-RAS
1	Αγρίου τύπου	0.27 (υποέκφραση)	0.40 (υποέκφραση)	0.43 (υποέκφραση)
2	Μεταλλαγή	0.22 (υποέκφραση)	1.88 (ίση έκφραση)	20.50(υπερέκφραση)
3	Αγρίου τύπου	0.22 (υποέκφραση)	3.38 (υπερέκφραση)	3.13 (υπερέκφραση)
4	Μεταλλαγή	0.28 (υποέκφραση)	0.22 (υποέκφραση)	1.64 (ίση έκφραση)
5	Αγρίου τύπου	0.18 (υποέκφραση)	1.37 (ίση έκφραση)	13.89(υπερέκφραση)
6	Αγρίου τύπου	0.50 (ίση έκφραση)	0.75 (ίση έκφραση)	2.85 (υπερέκφραση)
7	Αγρίου τύπου	0.10 (υποέκφραση)	0.19 (υποέκφραση)	0.47 (ίση έκφραση)
8	Αγρίου τύπου	0.43 (υποέκφραση)	2.70 (υπερέκφραση)	0.52 (ίση έκφραση)
9	Μεταλλαγή	0.15 (υποέκφραση)	1.50 (ίση έκφραση)	6.08 (υπερέκφραση)
10	Μεταλλαγή	0.72 (ίση έκφραση)	0.95 (ίση έκφραση)	0.75 (ίση έκφραση)
11	Μεταλλαγή	21.95(υπερέκφραση)	1.46 (ίση έκφραση)	0.76 (ίση έκφραση)
12	Αγρίου τύπου	3.56 (υπερέκφραση)	0.12 (υποέκφραση)	0.58 (ίση έκφραση)
13	Αγρίου τύπου	3.00 (υπερέκφραση)	2.39 (υπερέκφραση)	2.28 (υπερέκφραση)
14	Αγρίου τύπου	1.64 (ίση έκφραση)	0.11 (υποέκφραση)	0.85 (ίση έκφραση)
15	Αγρίου τύπου	0.43 (υποέκφραση)	24.23(υπερέκφραση)	4.65 (υπερέκφραση)
16	Μεταλλαγή	3.35 (υπερέκφραση)	0.70 (ίση έκφραση)	2.37 (υπερέκφραση)
17	Μεταλλαγή	22.31(υπερέκφραση)	1.11 (ίση έκφραση)	0.36 (υποέκφραση)
18	Αγρίου τύπου	1.07 (ίση έκφραση)	0.35 (υποέκφραση)	5.77 (υπερέκφραση)
19	Αγρίου τύπου	22.41(υπερέκφραση)	2.83 (υπερέκφραση)	14.17(υπερέκφραση)
20	Αγρίου τύπου	9.10 (υπερέκφραση)	1.65 (ίση έκφραση)	4.34 (υπερέκφραση)
21	Αγρίου τύπου	19.99(υπερέκφραση)	0.19 (υποέκφραση)	0.35 (υποέκφραση)
22	Μεταλλαγή	2.24 (υπερέκφραση)	0.28 (υποέκφραση)	0.59 (ίση έκφραση)
23	Αγρίου τύπου	0.41 (υποέκφραση)	0.52 (ίση έκφραση)	1.21 (ίση έκφραση)
24	Αγρίου τύπου	8.73 (υπερέκφραση)	1.84 (ίση έκφραση)	26.05(υπερέκφραση)
25	Αγρίου τύπου	3.26 (υπερέκφραση)	0.43 (υποέκφραση)	1.89 (ίση έκφραση)
26	Μεταλλαγή	5.47 (υπερέκφραση)	2.29 (υπερέκφραση)	0.89 (ίση έκφραση)
27	Αγρίου τύπου	2.70 (υπερέκφραση)	12.57(υπερέκφραση)	4.05 (υπερέκφραση)
28	Αγρίου τύπου	6.31 (υπερέκφραση)	0.44 (υποέκφραση)	2.61 (υπερέκφραση)
29	Αγρίου τύπου	2.11 (υπερέκφραση)	2.25 (υπερέκφραση)	4.04 (υπερέκφραση)
30	Αγρίου τύπου	1.24 (ίση έκφραση)	0.71 (ίση έκφραση)	0.89 (ίση έκφραση)

* Τα γονίδια K και N-RAS σε όλους τους καρκινικούς ιστούς όπως επίσης και όλα τα γονίδια RAS στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς ήταν αγρίου τύπου.

6.3. Ανάλυση ογκογονιδίων RAS σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Από τους ασθενείς με ιστορικό επαγγελματικής έκθεσης σε παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ουροθηλιακού καρκίνου 6 (31.5%) έφεραν μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου H-RAS ενώ οι υπόλοιποι 13 ήταν αγρίου τύπου (wild type). Τρεις από τους ασθενείς με H-RAS μετάλλαξη δεν είχαν κανένα προηγούμενο ιστορικό επαγγελματικής έκθεσης. Σε 9 από τους 19 ασθενείς (47%) με ιστορικό επαγγελματικής έκθεσης ένα γονίδιο RAS υπερέκφραζόταν ενώ 4 και 2 ασθενείς παρουσίαζαν υπερέκφραση δύο και τριών γονιδίων αντίστοιχα. Επίσης 3 από τους ασθενείς αυτούς δεν παρουσίαζαν καμία υπερέκφραση. Αντιθέτως δεν ήταν δυνατό να ανακαλύψουμε κάποια διαφορά στον αριθμό των υπερέκφραζόμενων γονιδίων στους 11 ασθενείς χωρίς επαγγελματικό παράγοντα κινδύνου. Τρεις από αυτούς τους ασθενείς είχαν 1, 2 και κανένα υπερέκφραζόμενο γονίδιο αντίστοιχα ενώ σε δύο ασθενείς και τα 3 γονίδια RAS υπερέκφραζονταν.

Από τους 30 ασθενείς 26 (87%) ήταν ενεργοί ή πρώην καπνιστές, από τους οποίους 19% είχαν μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου H-RAS. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι 4 μη καπνιστές έφεραν H-RAS μεταλλάξεις. Εννέα από τους 26 ενεργείς/πρώην καπνιστές (34%) υπερέκφραζαν 1 γονίδιο RAS ενώ 27% και 15% των ασθενών αυτών αντίστοιχα δύο και τρία γονίδια. Εξι ενεργείς/πρώην καπνιστές δεν παρουσίαζαν καμία υπερέκφραση.

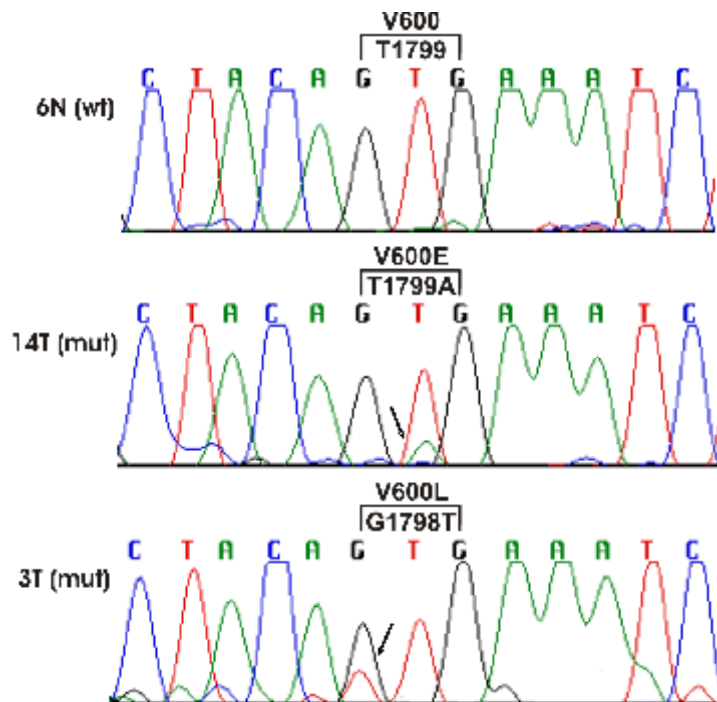
Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ μεταλλάξεων και υπερέκφρασης των γονιδίων RAS και κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των όγκων (στάδιο, βαθμός διαφοροποίησης). Επιπλέον, η πολλαπλή λογιστική παλινδρόμηση δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ μετάλλαξης/υπερέκφρασης και κλινικής πορείας της νόσου (πρόοδος και υποτροπή). Παρόλα αυτά, 78% των H-RAS μεταλλάξεων ανευρέθηκαν σε μη διηθητικούς ουροθηλιακούς όγκους. Επίσης, οι grade III όγκοι έδειξαν σημαντικά υψηλότερα μεταγραφικά επίπεδα του mRNA N-RAS σε σχέση με τους grade II με στατιστικά σημαντική διαφορά (Mann-Whitney U test $p=0.041$).

6.4. Ανάλυση mRNA έκφρασης ογκογονιδίων RAS ανά ζεύγη

Το Spearman test χρησιμοποιήθηκε για να προσδιορίσει πιθανή σχέση ταυτόχρονης έκφρασης των γονιδίων RAS σε παθολογικούς και φυσιολογικούς ιστούς. Μία σημαντική θετική συσχέτιση ανευρέθηκε μεταξύ H-RAS και N-RAS στα δείγματα ουροθηλιακών όγκων ($p=0.001$). Καμία άλλη συσχέτιση δεν ανευρέθηκε στα υπόλοιπα ζεύγη γονιδίων στους παθολογικούς ή φυσιολογικούς ιστούς.

6.5. Ανάλυση μεταλλάξεων ογκογονιδίου BRAF

Όλοι οι ουροθηλιακοί όγκοι μελετήθηκαν για την παρουσία B-RAF μεταλλαγών στα εξόνια 11, 14 και 15. Η άμεση αλληλούχιση αναγνώρισε τη μετάλλαξη V600E (νουκλεοτιδική αλλαγή T1799A στο εξόνιο 15) σε ένα δείγμα ενώ αποκάλυψε μία ακόμη μετάλλαξη V600L (νουκλεοτιδική αλλαγή G1798T στο εξόνιο 15) σε ένα δεύτερο δείγμα (**Εικόνα 6.4**). Το πρώτο δείγμα ήταν σταδίου pT1a και grade II ενώ το δεύτερο σταδίου pT2b and grade III. Καμία μεταλλαγή δεν ανευρέθηκε στα εξόνια 11, 14 και 15 καθώς και στα σημεία συνάντησης ιντρονίων/εξονίων των υπολοίπων δειγμάτων. Εφόσον μόνο 2 μεταλλάξεις ήταν παρούσες δεν ήταν δυνατή η επίτευξη στατιστικά σημαντικού αποτελέσματος.



Εικόνα 6.4. Καμία μετάλλαξη δεν ανευρέθηκε στα εξόνια 11, 14 και 15 καθώς και στα σημεία συνάντησης ιντρονίων/εξονίων. Παρ'όλα αυτά η αλληλούχιση DNA των δειγμάτων 14T και 3T (μέση και κάτω εικόνα αντίστοιχα) αποκάλυψε 2 διαφορετικές ετερόζυγες μεταλλάξεις: μία μετάθεση T→A στο νουκλεοτίδιο 1799 (V600E) και μία μετάθεση G→T στο νουκλεοτίδιο 1798 (V600L). Η άνω εικόνα δείχνει την αγρίου τύπου αλληλουχία του γονιδίου B-RAF στο εξόνιο 15 σ ένα δείγμα φυσιολογικού ιστού (6N).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η σχέση ανάμεσα στις μεταλλαγμένες μορφές γονιδίων της οικογένειας RAS (H-, K- και N-RAS) και του 30% των ανθρώπινων νεοπλασμάτων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, υποδηλώνει ότι η διαταραχή της λειτουργίας τους συνεισφέρει σημαντικά στην ανάπτυξη καρκίνου (Spandidos and Lang 1989; Field and Spandidos 1990). Συχνά σημεία μεταλλάξεων είναι η Gly→Val στο κωδικόνιο 12, η Gly→Cys στο κωδικόνιο 13 και Glu→Arg/Lys/Leu στο 61 (Bos 1989; Grand and Owen 1991; Levesque, Ramchurren et al. 1993; Bonner, Hemstreet 3rd et al. 1993;). Οι σημειακές μεταλλάξεις των γονιδίων RAS αποκλείουν την εγγενή δράση GTPάσης, εμποδίζοντας έτσι την ομαλή απενεργοποίηση των πρωτεϊνών RAS (Field and Spandidos 1990). Οι μεταλλάξεις των γονιδίων Ras ανακαλύφθηκαν πρώτα στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά ουροδόχου κύστης T24 (Caron, Chen et al. 1983) και στη συνέχεια διάφορες μελέτες απέδειξαν ότι οι μεταλλαγές του ογκογονιδίου H-RAS είναι συχνότερες στα νεοπλάσματα του ουροποιητικού απ' ό,τι των K ή N-RAS (Rabbani and Cordon-Cardo 2000). Παρότι οι αρχικές προσδοκίες ότι οι H-RAS μεταλλάξεις θα μπορούσαν να παίζουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης δεν επαληθεύτηκαν και θεωρούνταν παρούσες στο 10% των ασθενών (Saito, Hata et al. 1997), νεότερες έρευνες έδειξαν ακόμη υψηλότερη συχνότητά τους. Οι Fitzgerald και συν. ανέφεραν μεταλλαγές του γονιδίου H-RAS στο ίζημα ούρων σε 44% των ασθενών με ουροθηλιακούς όγκους (Fitzgerald, Ramchurren et al. 1995), οι Czerniak και συν. παρατήρησαν μεταλλάξεις του στο κωδικόνιο 12 σε 45% των όγκων (Czerniak, Cohen et al. 1992) ενώ οι Haliassos και συν. σημείωσαν ακόμη υψηλότερο ποσοστό, 66% (Haliassos, Liloglou et al. 1992). Επίσης η πιο πρόσφατη μελέτη από τους Przybojewska και συν. ανέφερε μεταλλάξεις του γονιδίου H-RAS σε 84% των ασθενών με καρκίνο ουροδόχου κύστης (Przybojewska, Jagiello et al. 2000). Όλες αυτές οι διαφορές οφείλονται στις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των RAS μεταλλάξεων.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε μία ευαίσθητη PCR/RFLP μέθοδο για να ελέγξουμε την παρουσία μεταλλάξεων των γονιδίων RAS σε ασθενείς με

ουροθλιακό καρκίνο. Απ' ότι γνωρίζουμε είναι η πρώτη φορά που αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με άμεση αλληλούχιση του παραγόμενου PCR προϊόντος, εξασφαλίζοντας αυξημένη ακρίβεια και ευαισθησία. Τα ευρήματά μας υποστηρίζουν τις αναφορές που δείχνουν σημαντικό ποσοστό μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου H-RAS σε ασθενείς με καρκίνο ουροδόχου κύστης. Σε 9 από τους 30 ασθενείς της μελέτης μας (30%) ανιχνεύσαμε μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου H-RAS (G→A και G→T), οι οποίες είναι οι πιο συχνά αναφερόμενες σημειακές μεταλλαγές (Williams and Stein 2004). Ιδιαίτερης σημασίας είναι το γεγονός ότι 78% αυτών των μεταλλάξεων ανευρέθηκαν σε επιφανειακούς όγκους και μόλις δύο σε διηθητικούς που περιλάμβαναν έναν ασθενή σταδίου pT3a και ένα pT2-in situ. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τα ευρήματα των Ooi και συν., που ανέφεραν ότι η αντικατάσταση G→T στο κωδικόνιο 12 σχετιζόταν τόσο με υποτροπιάζοντες όσο και μη υποτροπιάζοντες πρωτοπαθείς όγκους καθώς επίσης και με αρχικούς Ta/T1 όγκους σε ασθενείς με πρόοδο της νόσου (Ooi, Herz et al. 1994). Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν τη σχέση μεταξύ χαμηλού σταδίου, καλώς διαφοροποιημένων ουροθλιακών νεοπλασμάτων και H-RAS μεταλλαγών, οι οποίες φαίνεται ότι απουσιάζουν στα προχωρημένα στάδια της νόσου.

Μεταλλάξεις του γονιδίου K-RAS ανευρέθηκαν σε περισσότερο από 80% των όγκων του παγκρέατος στον άνθρωπο, 38% του παχέως εντέρου και 31% του λεπτού εντέρου. N-RAS μεταλλάξεις παρατηρήθηκαν στο κακόηθες μελάνωμα και σε νεοπλάσματα του αιμοποιητικού ιστού (Kiaris and Spandidos 1995). Τα ευρήματά μας που αφορούν την απουσία μεταλλαγών των γονιδίων K- και N-RAS στον ουροθλιακό καρκίνο συμφωνούν με αυτά των άλλων ομάδων, παρέχοντας επιπλέον αποδείξεις για την ειδικότητα του ιστού που ενεργοποιείται η οικογένεια RAS.

Αν και οι σημειακές μεταλλάξεις δρουν ως μηχανισμός ενεργοποίησης των ογκογονιδίων RAS, τα αυξημένα μεταγραφικά επίπεδά τους αυξάνουν επίσης τον κίνδυνο καρκινογένεσης, όπως έχει αναφερθεί για διάφορους όγκους, συμπεριλαμβανομένων μαστού, παχέως εντέρου, εγκεφάλου, κεφαλής-τραχήλου και πνεύμονα. Διάφορες μελέτες απέδειξαν ότι τα γονίδια RAS υπερεκφράζονταν τόσο σε προκαρκινωμάτωδεις όσο και σε καρκινωμάτωδεις καταστάσεις συγκριτικά με τους φυσιολογικούς ιστούς (Vageli, Kiaris et al. 1996). Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης οι Viola και συν. με ανοσοϊστοχημική μέθοδο ανακάλυψαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης RAS στο καρκίνωμα in

situ και στους όγκους υψηλού σταδίου αλλά όχι στους χαμηλού σταδίου ή στην υπερπλασία του ουροθηλίου (Viola, Fromowitz et al. 1985). Επίσης οι Vageli και συν. ανέφεραν τη συμμετοχή, διαμέσου υπερέκφρασης, των ογκογονιδίων RAS στον ουροθηλιακό καρκίνο (Vageli, Kiaris et al. 1996).

Παρόλα αυτά, καμία από τις μέχρι σήμερα μελέτες δεν χρησιμοποίησε προηγμένη τεχνολογία, όπως real time RT-PCR. Απ' ότι γνωρίζουμε η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που χρησιμοποίησε αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για να προσδιορίσει τα μεταγραφικά επίπεδα της mRNA έκφρασης των γονιδίων RAS σε δείγματα όγκων ουροδόχου κύστης και τα συνέκρινε με τα αντίστοιχα των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών. Από τα 30 καρκινικά δείγματα 23 υπερέκφραζαν τουλάχιστον ένα μέλος της οικογένειας RAS. Το υψηλότερο ποσοστό υπερέκφρασης παρατηρήθηκε στο K και N-RAS γονίδιο σε 50% των όγκων ενώ το H-RAS παρουσίασε χαμηλότερη τιμή (27%) σε σχέση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς. Τα ποσοστά αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών (Vageli, Kiaris et al. 1996) και δείχνουν ότι τα ογκογονίδια RAS δεν έχουν ένα πρότυπο υπερέκφρασης στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης όμοιο με αυτό των άλλων νεοπλασμάτων όπου ανευρίσκονται. Η θετική επίσης σχέση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων H- και N-RAS υπογραμμίζει την έννοια ότι τα γονίδια RAS θα μπορούσαν να δρουν συνεργικά στον ουροθηλιακό καρκίνο ($p=0.001$). Τέλος, σε αντίθεση με τη μελέτη του Viola και συν. (Viola, Fromowitz et al. 1985), δεν επιτεύχθηκε καμία στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στην υπερέκφραση και το στάδιο ή grade του όγκου. Τα ευρήματά μας αυτά είναι σε συμφωνία με τις μελέτες που υποστηρίζουν την απουσία σχέσης μεταξύ σταδίου ή grade όγκου και μεταγραφικών επιπέδων RAS mRNA έκφρασης. Όλα τα δείγματα νεοπλασματικών ιστών εξέφραζαν ένα τουλάχιστον μέλος της οικογένειας RAS, όμως 37% υπερέκφραζαν ένα μόνο γονίδιο, 23% δύο και 13% και τα τρία γονίδια RAS. Στα δείγματα που υπερέκφραζαν και τα τρία γονίδια RAS ο λόγος έκφρασης καρκινικού/ φυσιολογικού ιστού κάθε δείγματος δεν ήταν πάντα ίδιος.

Όσον αφορά το δεύτερο σκέλος της παρούσας διατριβής το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στο γονίδιο BRAF. Θεμελιώδεις κυτταρικές λειτουργίες όπως διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμός, επιβίωση, κινητικότητα, μετασχηματισμός ρυθμίζονται από την οδό RAS-RAF-MEK-ERK, ένα συντηρητικά εξελικτικό σηματοδοτικό μονοπάτι (O'Neill and Kolch 2004). Οι πρωτεΐνες RAF ανήκουν

στην κατηγορία πρωτεϊνικών κινασών σερίνης-θρεονίνης που ενεργοποιούν την κινάση της MAPK (mitogen activating proteine kinase Kinase ή MAPKK ή MEK) η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τις πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούν τη μίτωση (MAPKs ή ERKs) (Duesbery, Webb et al. 1999). Ακατάλληλη και/ή συνεχής διέγερση της οδού αυτής δημιουργεί ένα ισχυρό ερέθισμα που οδηγεί σε ανώμαλο πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση σε πολλούς ανθρώπινους καρκίνους (Avruch, Khokhlatchev et al. 2001). Ενεργείς σωματικές μεταλλάξεις στην κινάση σερίνης/θρεονίνης BRAF αναφέρθηκαν σε μεγάλο ποσοστό στο κακόηθες μελάνωμα και θηλώδη καρκίνο θυρεοειδούς καθώς και σε μικρότερο ποσοστό σε άλλους καρκίνους και καρκινικές σειρές, συμπεριλαμβανομένων του παχέος εντέρου, ωοθηκών, μη μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα και διαφόρων σαρκωμάτων (Brose, Volpe et al. 2002; Davies, Bignell et al. 2002; Naoki, Chen et al. 2002; Yuen, Davies et al. 2002; Kimura, Nikiforova et al. 2003). Αν και ενεργοποιούν την MAPK οδό, οι πρωτεΐνες RAF αποδείχθηκε ότι συμμετέχουν στη μεταφορά του ογκογόνου σήματος της πρωτεϊνικής κινάσης C epsilon (Perletti, Concari et al. 1998; Basu and Sivaprasad 2007). Συνεπώς περισσότερες από μία ογκογόνες οδοί μπορεί να ρυθμίζονται από την ενεργοποιημένη λόγω μετάλλαξης κινάση BRAF.

Οι Stoehr και συν. παλαιότερα μελέτησαν 121 εγκλεισμένους σε παραφίνη όγκους ουροδόχου κύστης και 27 όγκους ανώτερου ουροποιητικού χωρίς να ανιχνεύσουν καμία BRAF μετάλλαξη (Stoehr, Brinkmann et al. 2004). Η πλειοψηφία των ουροθηλιακών όγκων που εξετάστηκαν δεν αποκάλυψε κάποια μετάλλαξη, υποδηλώνοντας ότι οι συχνότερες μεταβολές του γονιδίου BRAF που περιγράφηκαν σε διάφορα νεοπλάσματα δεν φαίνεται να συμμετέχουν στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

Σε παρόμοιες μελέτες στο ουροποιητικό σύστημα οι Cho και συν. σημείωσαν μια συχνότητα 10.2% μεταλλαγών στο κωδικόνιο 600 του γονιδίου BRAF σε αδενοκαρκινώματα προστάτη (Cho, Choi et al. 2006). Τα αποτελέσματα αυτά δεν συμφωνούν με τους Burger και συν. (Burger, Denzinger et al. 2006) που ανέφεραν προηγουμένως απουσία BRAF μεταλλαγών σε 79 προστατικούς καρκίνους. Επιπλέον ενεργείς παρανοηματικές BRAF μεταλλάξεις ταυτοποιήθηκαν σε 9% των μη σεμινωματοδών όγκων όρχεως αλλά όχι στα σεμινώματα (Sommerer, Hengge et al. 2005). Θεωρήθηκε επίσης ότι οι BRAF μεταλλάξεις δεν συμμετέχουν στην ανάπτυξη νεφρικού καρκίνου (Nagy, Balint et al. 2003), όγκων γεννητικών κυττάρων όρχεως (McIntyre, Summersgill et al. 2005),

τραχήλου μήτρας, ενδομητρίου ή ωοθηκών (Ueda, Toji et al. 2008). Πρόσφατα οι de Jong και συν. σε μελέτη TCam-2 κυττάρων επιβεβαίωσε ότι πρόκειται για μια σειρά σεμινωματοδών κυττάρων που φέρουν την μετάλλαξη V600E (de Jong, Stoop et al. 2008).

Στη μελέτη μας ανακαλύψαμε δύο καρκινικά δείγματα που έφεραν δύο διαφορετικές μεταλλάξεις στο εξόνιο 15. Ένα δείγμα έφερε μία T1799A (V600E) μετάλλαξη και το άλλο μία G1798T (V600L) μεταλλαγή. Το πρώτο δείγμα ήταν σταδίου pT1a και grade II ενώ το δεύτερο σταδίου pT2b and grade III.

Οι περισσότερες μελέτες μέχρι τώρα επικεντρώθηκαν στη μετάλλαξη V600E, η οποία - αν και συχνότερα αναφερόμενη - εμφανίζεται μόνο σε μία περιορισμένη περιοχή του γονιδίου BRAF. Εχοντας στο μυαλό μας ότι και άλλες περιοχές του γονιδίου στον ουροθηλιακό καρκίνο μπορεί να κρύβουν μεταλλάξεις, μελετήσαμε τα εξόνια 11 και 14. Καμία μετάλλαξη δεν ανευρέθηκε, συμφωνώντας με τα αποτελέσματα μελετών που ανέλυσαν με αλληλούχιση ολόκληρη την κωδική περιοχή του γονιδίου BRAF χωρίς να εντοπίσουν μεταλλάξεις, εκτός των εξονίων 11 και 15 (Rajagopalan, Bardelli et al. 2002). Συνεπώς οι μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF είναι ασυνήθεις στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

Αντίθετα σημαντικό μέρος των ουροθηλιακών όγκων (10-30%) φέρουν μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του ογκογονιδίου H-RAS, ενός άλλου σημαντικού διαμεσολαβητή του μονοπατιού των MAP κινασών (Czerniak, Cohen et al. 1992; Saito, Hata et al. 1997; Boulalas, Zaravinos et al. 2009). Αυτό υποδηλώνει μία χαμηλή συχνότητα ενεργών μεταλλάξεων της MAPK οδού στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, η οποία συμφωνεί με την θέση ότι BRAF και RAS μεταλλάξεις είναι αμοιβαία αποκλειόμενα γεγονότα, υποστηρίζοντας μία άμεση λειτουργική τους σύνδεση στις σύνθετες σηματοδοτικές οδούς (Davies, Bignell et al. 2002; Soares, Trovisco et al. 2003).

Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη αποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση, διαμέσου σημειακής μετάλλαξης, του ογκογονιδίου H-RAS όπως και όλων των γονιδίων RAS (κυρίως K- και N-RAS) διαμέσου υπερέκφρασης είναι συχνά γεγονότα στο καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Αυξημένα επίπεδα της mRNA έκφρασής τους μπορεί να υποδηλώνουν νεοπλασματική ανάπτυξη όμως δεν φαίνεται να σχετίζονται με την πρόοδο της νόσου. Επίσης, η παρούσα μελέτη αποδεικνύει ότι η συμμετοχή των BRAF μεταλλαγών στην ανάπτυξη ουροθηλιακού καρκίνου είναι ασυνήθης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Βιβλιογραφία

1. Aboukassim TO, LaRue H, Lemieux P, Rousseau F, Fradet Y. Alteration of the PATCHED locus in superficial bladder cancer. *Oncogene* 2003;22(19):2967-71.
2. Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(14):1062-74.
3. Ahrendt SA, Decker PA, Doffek K, Wang B, Xu L, Demeure MJ, Jen J, Sidransky D. Microsatellite instability at selected tetranucleotide repeats is associated with p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000;60(9):2488-91.
4. Amin MB. Histological variants of urothelial carcinoma: diagnostic, therapeutic and prognostic implications. *Mod Pathol* 2009;22(Suppl 2):S96-S118.
5. Arnheim N, Erlich H. Polymerase chain reaction strategy. *Annu Rev Biochem* 1992;61:131-56.
6. Aveyard JS, Skilleter A, Habuchi T, Knowles MA. Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma. *Br J Cancer* 1999;80(5-6):904-8.
7. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 2001;56:127-55.
8. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J; European Association of Urology (EAU). EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 2008;54(2):303-14.
9. Barbacid M. ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987;56:779-827.
10. Bakkar AA, Wallerand H, Radvanyi F, Lahaye JB, Pissard S, Lecerf L, Kouyoumdjian JC, Abbou CC, Paireon JC, Jaurand MC, Thiery JP, Chopin DK, de Medina SG. FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 2003;63(23):8108-12.

11. Barnier JV, Papin C, Eychène 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.
12. Basu A, Sivaprasad U. Protein kinase Cepsilon makes the life and death decision. *Cell Signal* 2007;19(8):1633-42.
13. Berggren P, Kumar R, Sakano S, Hemminki L, Wada T, Steineck G, Adolfsson J, Larsson P, Norming U, Wijkström H, Hemminki K. Detecting homozygous deletions in the CDKN2A(p16(INK4a))/ARF(p14(ARF)) gene in urinary bladder cancer using real-time quantitative PCR. *Clin Cancer Res* 2003;9(1):235-42.
14. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993;366(6456):643-54.
15. Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control* 1997;8(3):444-72.
16. Bollag G, McCormick F. Regulators and effectors of ras proteins. *Annu Rev Cell Biol* 1991;7:601-32.
17. Bonner RB, Hemstreet GP 3rd, Fradet Y, Rao JY, Min KW, Hurst RE. Bladder cancer risk assessment with quantitative fluorescence image analysis of tumor markers in exfoliated bladder cells. *Cancer* 1993;72(8):2461-9.
18. Boorjian S, Cowan JE, Konety BR, DuChane J, Tewari A, Carroll PR, Kane CJ; Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor Investigators. Bladder cancer incidence and risk factors in men with prostate cancer: results from Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor. *J Urol* 2007;177(3):883-7.
19. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49(17):4682-9.
20. Boulalas I, Zaravinos A, Karyotis I, Delakas D, Spandidos DA. Activation of RAS family genes in urothelial carcinoma. *J Urol* 2009;181(5):2312-9.
21. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* 2000;86(2):289-94.

22. Brewster SF, Gingell JC, Browne S, Brown KW. Loss of heterozygosity on chromosome 18q is associated with muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 1994;70(4):697-700.
23. 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.
24. Brtva TR, Drugan JK, Ghosh S, Terrell RS, Campbell-Burk S, Bell RM, Der CJ. Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras. *J Biol Chem* 1995;270(17):9809-12.
25. Burger M, Denzinger S, Hammerschmied C, Tannapfel A, Maderstorfer A, Wieland WF, Hartmann A, Stoehr R. Mitogen-activated protein kinase signaling is activated in prostate tumors but not mediated by B-RAF mutations. *Eur Urol* 2006;50(5):1102-9.
26. Buscà R, Abbe P, Mantoux F, Aberdam E, Peyssonnaud C, Eychène A, Ortonne JP, Ballotti R. Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *EMBO J* 2000;19(12):2900-10.
27. Burchill SA, Lunec J, Mellon K, Neal DE. Analysis of Ha-ras mutations in primary bladder tumors. *Br J Cancer* 1991;63(suppl 3):62.
28. Cairns P., A.J. Proctor and M.A. Knowles. Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene* 1991;6(12):2305-9.
29. Cairns P, Shaw ME, Knowles MA. Initiation of bladder cancer may involve deletion of a tumour-suppressor gene on chromosome 9. *Oncogene* 1993;8(4):1083-5.
30. Cannon J, Linke CA, Cos LR. Cyclophosphamide-associated carcinoma of urothelium: modalities for prevention. *Urology* 1991;38(5):413-6.
31. Capon DJ, Chen EY, Levinson AD, Seeburg PH, Goeddel DV. Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* 1983;302(5903):33-7.
32. Capon DJ, Seeburg PH, McGrath JP, Hayflick JS, Edman U, Levinson AD, Goeddel DV. Activation of Ki-ras2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature* 1983;304(5926):507-13.

33. Cappellen D, Gil Diez de Medina S, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 10q in muscle-invasive transitional cell carcinomas of the bladder. *Oncogene* 1997;14(25):3059-66.
34. 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.
35. Catto JW, Xinarianos G, Burton JL, Meuth M, Hamdy FC. Differential expression of hMLH1 and hMSH2 is related to bladder cancer grade, stage and prognosis but not microsatellite instability. *Int J Cancer* 2003;105(4):484-90.
36. Catto, J.W.F., M. Meuth and F.C. Hamdy (2004). Genetic instability and transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int* 93(1):19-24.
37. Chatterjee SJ, George B, Goebell PJ, Alavi-Tafreshi M, Shi SR, Fung YK, Jones PA, Cordon-Cardo C, Datar RH, Cote RJ. Hyperphosphorylation of pRb: a mechanism for RB tumour suppressor pathway inactivation in bladder cancer. *J Pathol* 2004;203(3):762-70.
38. Chiou HY, Chiou ST, Hsu YH, Chou YL, Tseng CH, Wei ML, Chen CJ. Incidence of transitional cell carcinoma and arsenic in drinking water: a follow-up study of 8,102 residents in an arseniasis-endemic area in northeastern Taiwan. *Am J Epidemiol* 2001;153(5):411-8.
39. Cho NY, Choi M, Kim BH, Cho YM, Moon KC, Kang GH. BRAF and KRAS mutations in prostatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2006;119(8):1858-62.
40. 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.
41. Cohen JB, Walter MV, Levinson AD. A repetitive sequence element 3' of the human c-Ha-ras1 gene has enhancer activity. *J Cell Physiol* 1987;133(Suppl 5):75-81.
42. Cohen JB, Broz SD, Levinson AD. Expression of the H-ras proto-oncogene is controlled by alternative splicing. *Cell* 1989;58(3):461-72.

43. Colombel M, Soloway M, Akaza H, Böhle A, Palou J, Buckley R, Lamm D, Brausi M, Witjes JA, Persad R. Epidemiology, Staging, Grading, and Risk Stratification of Bladder Cancer. *Eur Urol Suppl* 2008;7(10):618–26.
44. Coogan CL, Estrada CR, Kapur S, Bloom KJ. HER-2/neu protein overexpression and gene amplification in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2004;63(4):786-90.
45. Cordon-Cardo C, Dalbagni G, Saez GT, Oliva MR, Zhang ZF, Rosai J, Reuter VE, Pellicer A. p53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer* 1994;56(3):347-53.
46. Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, Stein JP, Shi SR, Tran QC, Hu SX, Xu HJ, Groshen S, Taylor CR, Skinner DG, Benedict WF. Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. *Cancer Res* 1998;58(6):1090-4.
47. Czerniak B, Deitch D, Simmons H, Etkind P, Herz F, Koss LG. Ha-ras gene codon 12 mutation and DNA ploidy in urinary bladder carcinoma. *Br J Cancer* 1990;62(5):762-3.
48. 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.
49. Davidson DD, Cheng L. "Field cancerization" in the urothelium of the bladder. *Anal Quant Cytol Histol* 2006;28(6):337-8.
50. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949-54.
51. de Jong J, Stoop H, Gillis AJ, et al. Further characterization of the first seminoma cell line TCam-2. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47(3):185-96.
52. Delclos GL, Lerner SP. Occupational risk factors. *Scand J Urol Nephrol* 2008;42(Suppl 218):58-63.
53. 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.
54. Der CJ, Finkel T, Cooper GM. Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61. *Cell* 1986;44(1):167-76.

55. 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.
56. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3(1):11-22.
57. Duesbery NS, Webb CP, Vande Woude GF. MEK wars, a new front in the battle against cancer. *Nat Med* 1999;5(7):736-7.
58. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol* 1998;22(12):1435-48.
59. Esrig D, Spruck CH 3rd, Nichols PW, Chaiwun B, Steven K, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, Jones PA, Cote RJ. p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol* 1993;143(5):1389-97.
60. Evan GI, Littlewood TD. The role of c-myc in cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 1993 Feb;3(1):44-9.
61. Ewen ME. Relationship between Ras pathways and cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 2000;4:1-17.
62. Eychène A, Dusanter-Fourt I, Barnier JV, Papin C, Charon M, Gisselbrecht S, Calothy G. Expression and activation of B-Raf kinase isoforms in human and murine leukemia cell lines. *Oncogene* 1995;10(6):1159-65.
63. Field JK, Spandidos DA. The role of ras and myc oncogenes in human solid tumours and their relevance in diagnosis and prognosis (review). *Anticancer Res* 1990;10(1):1-22.
64. Fitzgerald JM, Ramchurren N, Rieger K, Levesque P, Silverman M, Libertino JA, Summerhayes IC. Identification of H-ras mutations in urine sediments complements cytology in the detection of bladder tumors. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(2):129-33.
65. Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E, Kakizoe T, Sasaki H, Sugimura T, Terada M. Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res* 1992;52(6):1393-8.

66. Fujita J, Yoshida O, Yuasa Y, Rhim JS, Hatanaka M, Aaronson SA. Ha-ras oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tract tumours. *Nature* 1984;309(5967):464-6.
67. Furth ME, Aldrich TH, Cordon-Cardo C. Expression of ras proto-oncogene proteins in normal human tissues. *Oncogene* 1987;1(1):47-58.
68. George B, Datar RH, Wu L, Cai J, Patten N, Beil SJ, Groshen S, Stein J, Skinner D, Jones PA, Cote RJ. p53 gene and protein status: the role of p53 alterations in predicting outcome in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(34):5352-8.
69. Ghosh, S. and R. M. Bell. 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.
70. Golijanin DJ, Kakiashvili D, Madeb RR, Messing EM, Lerner SP. Chemoprevention of bladder cancer. *World J Urol* 2006;24(5):445-72.
71. Golka K, Wiese A, Assennato G, Bolt HM. Occupational exposure and urological cancer. *World J Urol* 2004;21(6):382-91.
72. Goebell PJ, Groshen SG, Schmitz-Dräger BJ; International Study-Initiative on Bladder Cancer (ISBC). p53 immunohistochemistry in bladder cancer--a new approach to an old question. *Urol Oncol* 2010;28(4):377-88.
73. Gonzalez-Zulueta M, Ruppert JM, Tokino K, et al. Microsatellite instability in bladder cancer. *Cancer Res* 1993;53(23):5620-3.
74. Grand RJ, Owen D. The biochemistry of ras p21. *Biochem J* 1991;279(Pt 3):609-31.
75. Greene FL, Sobin LH. The staging of cancer: a retrospective and prospective appraisal. *CA Cancer J Clin* 2008;58(3):180-90.
76. Grossman HB, Liebert M, Antelo M, Dinney CP, Hu SX, Palmer JL, Benedict WF. p53 and RB expression predict progression in T1 bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4(4):829-34.
77. Habuchi T, Luscombe M, Elder PA, Knowles MA. Structure and methylation-based silencing of a gene (DBCCR1) within a candidate bladder cancer tumor suppressor region at 9q32-q33. *Genomics* 1998;48(3):277-88.

78. Haliassos A, Liloglou T, Likourinas M, Doumas C, Ricci N, Spandidos D. H-ras oncogene mutations in the urine of patients with bladder-tumors - description of a noninvasive method for the detection of neoplasia. *Int J Oncol* 1992;1(7):731-4.
79. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
80. 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.
81. Hernández S, López-Knowles E, Lloreta J, Kogevinas M, Amorós A, Tardón A, Carrato A, Serra C, Malats N, Real FX. Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas. *J Clin Oncol* 2006;24(22):3664-71.
82. 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.
83. Horner MJ, Ries LA, Krapcho M, et al, eds. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2009. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/.
84. Howe LR, Leever SJ, Gómez N, Nakielnny S, Cohen P, Marshall CJ. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 1992;71(2):335-42.
85. Hüser M, Luckett J, Chiloeches A, Mercer K, Iwobi M, Giblett S, Sun XM, Brown J, Marais R, Pritchard C. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *EMBO J* 2001;20(8):1940-51.
86. 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.
87. Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, Johnston C, Taylor CF, Knowles MA. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* 2005;24(33):5218-25.

88. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60(5):277-300.
89. Jacobs BL, Lee CT, Montie JE. Bladder cancer in 2010: how far have we come? *CA Cancer J Clin* 2010;60(4):244-72.
90. 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.
91. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med* 2006;355(12):1253-61.
92. Kagan J, Liu J, Stein JD, Wagner SS, Babkowsky R, Grossman BH, Katz RL. Cluster of allele losses within a 2.5 cM region of chromosome 10 in high-grade invasive bladder cancer. *Oncogene* 1998;16(7):909-13.
93. Kaldor JM, Day NE, Kittelmann B, et al. Bladder tumours following chemotherapy and radiotherapy for ovarian cancer: a case-control study. *Int J Cancer* 1995;63(1):1-6.
94. Kantor AF, Hartge P, Hoover RN, Narayana AS, Sullivan JW, Fraumeni JF Jr. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am J Epidemiol* 1984;119(4):510-5.
95. Kawasaki E, Erlich H. Polymerase chain reaction and analysis of cancer cell markers. *J Natl Cancer Inst* 1990;82(10):806-7.
96. Kiaris H, Spandidos D. Mutations of ras genes in human tumors (review). *Int J Oncol* 1995;7(3):413-21.
97. 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.
98. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemeny L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Weider J. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 2005;66(6 Suppl 1):4-34.
99. Knowles MA. Role of FGFR3 in urothelial cell carcinoma: biomarker and potential therapeutic target. *World J Urol* 2007;25(6):581-93.

100. Knowles MA, Williamson M. Mutation of H-ras is infrequent in bladder cancer: confirmation by single-strand conformation polymorphism analysis, designed restriction fragment length polymorphisms, and direct sequencing. *Cancer Res* 1993;53(1):133-9.
101. Kogevinas M, 't Mannetje A, Cordier S, et al. Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. *Cancer Causes Control* 2003;14(10):907-14.
102. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000;351(Pt 2):289-305.
103. Krüger S, Weitsch G, Büttner H, Matthiensen A, Böhmer T, Marquardt T, Sayk F, Feller AC, Böhle A. Overexpression of c-erbB-2 oncoprotein in muscle-invasive bladder carcinoma: relationship with gene amplification, clinicopathological parameters and prognostic outcome. *Int J Oncol* 2002;21(5):981-7.
104. 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.
105. Lamm DL, Riggs DR, Shriver JS, vanGilder PF, Rach JF, DeHaven JI. Megadose vitamins in bladder cancer: a double-blind clinical trial. *J Urol* 1994;151(1):21-6.
106. Larrick JW. Message amplification phenotyping (MAPPING)--principles, practice and potential. *Trends Biotechnol* 1992;10(5):146-52.
107. Leon J, Guerrero I, Pellicer A. Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol Cell Biol* 1987;7(4):1535-40.
108. Leppert JT, Shvarts O, Kawaoka K, Lieberman R, Beldegrun AS, Pantuck AJ. Prevention of bladder cancer: a review. *Eur Urol* 2006;49(2):226-34.
109. Levesque P, Ramchurren N, Saini K, Joyce A, Libertino J, Summerhayes IC. Screening of human bladder tumors and urine sediments for the presence of H-ras mutations. *Int J Cancer* 1993;55(5):785-90.
110. Lopez-Beltran A, Montironi R. Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification. *Eur Urol* 2004;46(2):170-6.
111. Lowy DR, Willumsen BM. Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 1993;62:851-91.

112. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003;3(6):459-65.
113. 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.
114. Mao L, Lee DJ, Tockman MS, Erozan YS, Askin F, Sidransky D. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(21):9871-5.
115. 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.
116. Marais R, Marshall CJ. Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv* 1996;27:101-25.
117. Marshall CJ. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4(1):82-9.
118. 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.
119. Masters JR, Vesey SG, Munn CF, Evan GI, Watson JV. c-myc oncoprotein levels in bladder cancer. *Urol Res* 1988;16(5):341-4.
120. McCahy PJ, Harris CA, Neal DE. The accuracy of recording of occupational history in patients with bladder cancer. *Br J Urol* 1997;79(1):91-3.
121. McGarvey TW, Maruta Y, Tomaszewski JE, Linnenbach AJ, Malkowicz SB. PTCH gene mutations in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncogene* 1998;17(9):1167-72.
122. McGrath JP, Capon DJ, Smith DH, Chen EY, Seeburg PH, Goeddel DV, Levinson AD. Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 1983;304(5926):501-6.
123. McIntyre A, Summersgill B, Spendlove HE, Huddart R, Houlston R, Shipley J. Activating mutations and/or expression levels of tyrosine kinase receptors GRB7, RAS, and BRAF in testicular germ cell tumors. *Neoplasia* 2005;7(12):1047-52.

124. Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* 2003;1653(1):25-40.
125. Miao TJ, Wang Z, Sang N. Correlation between the expression of the P21 ras oncogene product and the biological behavior of bladder tumors. *Eur Urol* 1991;20(4):307-10.
126. Mitra AP, Birkhahn M, Cote RJ. p53 and retinoblastoma pathways in bladder cancer. *World J Urol* 2007;25(6):563-71.
127. Mitra AP, Datar RH, Cote RJ. Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *J Clin Oncol* 2006;24(35):5552-64.
128. 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.
129. Miyamoto H, Shuin T, Torigoe S, Iwasaki Y, Kubota Y. Retinoblastoma gene mutations in primary human bladder cancer. *Br J Cancer* 1995;71(4):831-5.
130. Morrison DK, Cutler RE. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9(2):174-9.
131. 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 USA* 1996;93(16):8312-7.
132. Murta-Nascimento C, Schmitz-Dräger BJ, Zeegers MP, Steineck G, Kogevinas M, Real FX, Malats N. Epidemiology of urinary bladder cancer: from tumor development to patient's death. *World J Urol* 2007;25(3):285-95.
133. 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.
134. Nagy A, Balint I, Kovacs G. Frequent allelic changes at chromosome 7q34 but lack of mutation of the BRAF in papillary renal cell tumors. *Int J Cancer* 2003;106(6):980-1.
135. 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.

136. O'Neill E, Kolch W. Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br J Cancer* 2004;90(2):283-8.
137. 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.
138. Olderøy G, Daehlin L, Ogreid D. Low-frequency mutation of Ha-ras and Ki-ras oncogenes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Anticancer Res* 1998;18(4A):2675-8.
139. Olumi AF, Tsai YC, Nichols PW, Skinner DG, Cain DR, Bender LI, Jones PA. Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinomas of the bladder. *Cancer Res* 1990;50(21):7081-3.
140. Ooi A, Herz F, Ii S, Cordoncardo C, Fradet Y, Mayall B. Ha-ras codon 12 mutation in papillary tumors of the urinary-bladder - a retrospective study. *Int J Oncol* 1994;4(1):85-90.
141. Orlow I, Lacombe L, Hannon GJ, Serrano M, Pellicer I, Dalbagni G, Reuter VE, Zhang ZE, Beach D, Cordon-Cardo C. Deletion of the p16 and p15 genes in human bladder tumors. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(20):1524-9.
142. Oxford G, Theodorescu D. The role of Ras superfamily proteins in bladder cancer progression. *J Urol* 2003;170(5):1987-93.
143. Papin C, Denouel-Galy A, Laugier D, Calothy G, Eychène 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.
144. Papin C, Eychène A, Brunet A, Pagès G, Pouysségur J, Calothy G, Barnier JV. B-Raf protein isoforms interact with and phosphorylate Mek-1 on serine residues 218 and 222. *Oncogene* 1995;10(8):1647-51.
145. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55(2):74-108.
146. Pasin E, Josephson DY, Mitra AP, Cote RJ, Stein JP. Superficial bladder cancer: an update on etiology, molecular development, classification, and natural history. *Rev Urol* 2008;10(1):31-43.

147. Perletti GP, Concari P, Brusaferrri S, Marras E, Piccinini F, Tashjian AH Jr. Protein kinase Cepsilon is oncogenic in colon epithelial cells by interaction with the ras signal transduction pathway. *Oncogene* 1998;16(25):3345-8.
148. Piper JM, Tonascia J, Matanoski GM. Heavy phenacetin use and bladder cancer in women aged 20 to 49 years. *N Engl J Med* 1985;313(5):292-5.
149. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003;33(1):19-20.
150. Pollard C, Smith SC, Theodorescu D. Molecular genesis of non-muscle-invasive urothelial carcinoma (NMIUC). *Expert Rev Mol Med* 2010;12:e10.
151. Presti JC Jr, Reuter VE, Galan T, Fair WR, Cordon-Cardo C. Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Res* 1991;51(19):5405-9.
152. Przybojewska B, Jagiello A, Jalmuzna P. H-RAS, K-RAS, and N-RAS gene activation in human bladder cancers. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;121(1):73-7.
153. Pymar LS, Platt FM, Askham JM, Morrison EE, Knowles MA. Bladder tumour-derived somatic TSC1 missense mutations cause loss of function via distinct mechanisms. *Hum Mol Genet* 2008;17(13):2006-17.
154. Rabbani F, Cordon-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators and their impact on superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am.* 2000;27(1):83-102.
155. 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.
156. Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 1982;300(5888):149-52.
157. Rieger-Christ KM, Mourtzinis A, Lee PJ, Zaghera RM, Cain J, Silverman M, Libertino JA, Summerhayes IC. Identification of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in urine sediment DNA samples complements cytology in bladder tumor detection. *Cancer* 2003;98(4):737-44.
158. Rodenhuis S, Slebos RJ. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 1992;52(9 Suppl):2665s-2669s.

159. Rozycka M, Collin N, Stratton MR, Wooster R. Rapid detection of DNA sequence variants by conformation sensitive capillary electrophoresis. *Genomics* 2000;70(1):34–40.
160. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230(4732):1350-4.
161. Saito S, Hata M, Fukuyama R, Sakai K, Kudoh J, Tazaki H, Shimizu N. Screening of H-ras gene point mutations in 50 cases of bladder carcinoma. *Int J Urol* 1997;4(2):178-85.
162. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. New York, NY; Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
163. Sato K, Moriyama M, Mori S, et al. An immunohistologic evaluation of C-erbB-2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma. *Cancer* 1992;70(10):2493-8.
164. Satoh T, Nakafuku M, Kaziro Y. Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. *J Biol Chem* 1992;267(34):24149-52.
165. Sauter G, Algaba F, Amin M, et al. Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, editors. *WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs*. Lyon, France: IARC Press; 2004. p. 110-23.
166. 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.
167. Schweins, T., M. Geyer, 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.
168. 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.
169. Shaw ME, Knowles MA. Deletion mapping of chromosome 11 in carcinoma of the bladder. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;13(1):1-8.

170. Shimizu K, Birnbaum D, Ruley MA, Fasano O, Suard Y, Edlund L, Taparowsky E, Goldfarb M, Wigler M. Structure of the Ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. *Nature* 1983;304(5926):497-500.
171. Shinohara N, Koyanagi T. Ras signal transduction in carcinogenesis and progression of bladder cancer: molecular target for treatment? *Urol Res* 2002;30(5):273-81.
172. Shokeir AA. Squamous cell carcinoma of the bladder: pathology, diagnosis and treatment. *BJU Int* 2004;93(2):216-20.
173. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, Vogelstein B. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992;256(5053):102-5.
174. Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991;252(5006):706-9.
175. Siebert PD, Larrick JW. Competitive PCR. *Nature* 1992;359(6395):557-8.
176. Silverman DT, Devesa SS, Moore LE, Rothman N. Bladder cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni J, editors. *Cancer epidemiology and prevention*, 3rd ed. New York, NY: Oxford University Press; 2006. p. 1101-1127.
177. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, Máximo V, Botelho T, Secura R, Sobrinho-Simões M. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 2003;22(29):4578-80.
178. Sobin DH, Wittekind CH, editors. *TNM classification of malignant tumours*, 6th ed. New York, New York: Wiley-Liss; 2002. p. 199–202.
179. Sommerer F, Hengge UR, Markwarth A, Vomschloss S, Stolzenburg JU, Wittekind C, Tannapfel A. Mutations of BRAF and RAS are rare events in germ cell tumours. *Int J Cancer* 2005;113(2):329-35.
180. Spandidos DA. Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis. *J BUON* 2007;12(Suppl 1):S9-12.
181. 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.

182. 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.
183. Spandidos DA, Anderson ML. Oncogenes and onco-suppressor genes: their involvement in cancer. *J Pathol* 1989;157(1):1-10.
184. Spandidos DA, Lang JC. In vitro cell transformation by ras oncogenes. *Crit Rev Oncog* 1989;1(2):195-209.
185. 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.
186. 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.
187. 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.
188. Spiess PE, Czerniak B. Dual-track pathway of bladder carcinogenesis: practical implications. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130(6):844-52.
189. Steinmaus CM, Nuñez S, Smith AH. Diet and bladder cancer: a meta-analysis of six dietary variables. *Am J Epidemiol* 2000;151(7):693-702.
190. Stenzl A, Cowan NC, De Santis M, Jakse G, Kuczyk MA, Merseburger AS, Ribal MJ, Sherif A, Witjes JA. The updated EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer. *Eur Urol* 2009;55(4):815-25.
191. 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.
192. 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.
193. Stoehr R, Brinkmann A, Filbeck T, Gamper C, Wild P, Blaszyk H, Hofstaedter F, Knuechel R, Hartmann A. No evidence for mutation of B-RAF in urothelial carcinomas of the bladder and upper urinary tract. *Oncol Rep* 2004;11(1):137-41.

194. Storm SM, Brennscheidt U, Sithanandam G, Rapp UR. raf oncogenes in carcinogenesis. *Crit Rev Oncog* 1990;2(1):1-8.
195. Storm SM, Cleveland JL, Rapp UR. Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene* 1990;5(3):345-51.
196. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, Newling DW, Kurth K. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006;49(3):466-75.
197. Tanaka T, Slamon DJ, Shimada H, Shimoda H, Fujisawa T, Ida N, Seeger RC. A significant association of Ha-ras p21 in neuroblastoma cells with patient prognosis. A retrospective study of 103 cases. *Cancer* 1991;68(6):1296-302.
198. Tomlinson DC, Baldo O, Harnden P, Knowles MA. FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *J Pathol* 2007;213(1):91-8.
199. Tsai YC, Nichols PW, Hiti AL, Williams Z, Skinner DG, Jones PA. Allelic losses of chromosomes 9, 11, and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res* 1990;50(1):44-7.
200. Ueda M, Toji E, Nunobiki O, Izuma S, Okamoto Y, Torii K, Noda S. Mutational analysis of the BRAF gene in human tumor cells. *Hum Cell* 2008;21(2):13-7.
201. Ulsh 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.
202. Vageli D, Kiaris H, Delakas D, Anezinis P, Cranidis A, Spandidos DA. Transcriptional activation of H-ras, K-ras and N-ras proto-oncogenes in human bladder tumors. *Cancer Lett* 1996;107(2):241-7.
203. Vaish M, Mandhani A, Mittal RD, Mittal B. Microsatellite instability as prognostic marker in bladder tumors: a clinical significance. *BMC Urol* 2005;5:2.
204. 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.

205. van Rhijn BW, Lurkin I, Radvanyi F, Kirkels WJ, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate. *Cancer Res* 2001;61(4):1265-8.
206. Vineis P, Pirastu R. Aromatic amines and cancer. *Cancer Causes Control* 1997;8(3):346-55.
207. Viola MV, Fromowitz F, Oravez S, Deb S, Schlom J. ras Oncogene p21 expression is increased in premalignant lesions and high grade bladder carcinoma. *J Exp Med* 1985;161(5):1213-8.
208. Visvanathan KV, Pocock RD, Summerhayes IC. Preferential and novel activation of H-ras in human bladder carcinomas. *Oncogene Res* 1988;3(1):77-86.
209. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408(6810):307-10.
210. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319(9):525-32.
211. Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 1993;74(1):205-14.
212. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R; Cancer Genome Project. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004;116(6):855-67.
213. Wang W, Kumar P, Schwarz M, Malone G, Haworth A, Kumar S. PCR amplification of 40-year-old paraffin-embedded tumor-tissues - comparison of 4 different DNA extraction and purification methods. *Int J Oncol* 1994;5(3):453-7.
214. 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.
215. Williams SG, Stein JP. Molecular pathways in bladder cancer. *Urol Res* 2004;32(6):373-85.

216. Wittinghofer A. Signal transduction via Ras. *Biol Chem* 1998;379(8-9):933-7.
217. 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.
218. Wu XR. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer* 2005;5(9):713-25.
219. 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.
220. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 1986;319(6050):230-4.
221. Yanagisawa A, Ohtake K, Ohashi K, Hori M, Kitagawa T, Sugano H, Kato Y. Frequent c-Ki-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* 1993;53(5):953-6.
222. Hirao Y, Kim WJ, Fujimoto K. Environmental factors promoting bladder cancer. *Curr Opin Urol* 2009;19(5):494-9.
223. Yan, M. and D.J. Templeton. 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.
224. Yuen ST, Davies H, Chan TL, Ho JW, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Tsui WW, Chan AS, Futreal PA, Stratton MR, Wooster R, Leung SY. Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res* 2002;62(22):6451-5.
225. 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.
226. 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.

227. 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.
228. Zaharieva B, Simon R, Ruiz C, Oeggerli M, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G, Toncheva D. High-throughput tissue microarray analysis of CMYC amplification in urinary bladder cancer. *Int J Cancer* 2005;117(6):952-6.
229. Zeegers MP, Tan FE, Dorant E, van Den Brandt PA. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer* 2000;89(3):630-9.
230. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002;12(1):9-18.

Παράρτημα

Ακολουθεί αντίγραφο των δημοσιευμένων εργασιών στα περιοδικά J Urol και Int J Biol Markers. Πρόκειται για διεθνή περιοδικά με σύστημα κριτών (cited journals) και οι εργασίες προέκυψαν από την παρούσα διατριβή.

Activation of *RAS* Family Genes in Urothelial Carcinoma

I. Boulalas,* A. Zaravinos,* I. Karyotis, D. Delakas and D. A. Spandidos†

From the Department of Urology, "Asklipieio" General Hospital, Voula, Athens and Laboratory of Virology, Medical School, University of Crete (AZ, DAS), Heraklion, Crete, Greece

Abbreviations and Acronyms

BCa = bladder cancer

GTPase = guanosine triphosphatase

PCR = polymerase chain reaction

RFLP = restriction fragment length polymorphism

TCC = transitional cell carcinoma

Submitted for publication July 31, 2008.

Study received University of Crete ethics committee approval.

* Equal study contribution.

† Correspondence: Laboratory of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion 71100, Crete, Greece (telephone: +30 210 7227809; FAX: +30 210 7252922; e-mail: spandidos@spandidos.gr).

Purpose: Bladder cancer is the fifth most common malignancy in men in Western society. We determined *RAS* codon 12 and 13 point mutations and evaluated mRNA expression levels in transitional cell carcinoma cases.

Materials and Methods: Samples from 30 human bladder cancers and 30 normal tissues were analyzed by polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism and direct sequencing to determine the occurrence of mutations in codons 12 and 13 of *RAS* family genes. Moreover, we used real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to evaluate the expression profile of *RAS* genes in bladder cancer specimens compared to that in adjacent normal tissues.

Results: Overall H-*RAS* mutations in codon 12 were observed in 9 tumor samples (30%). Two of the 9 patients (22%) had invasive bladder cancer and 7 (77%) had noninvasive bladder cancer. One H-*RAS* mutation (11%) was homozygous and the remaining 89% were heterozygous. All samples were WT for K and N-*RAS* oncogenes. Moreover, 23 of 30 samples (77%) showed over expression in at least 1 *RAS* family gene compared to adjacent normal tissue. K and N-*RAS* had the highest levels of over expression in bladder cancer specimens (50%), whereas 27% of transitional cell carcinomas demonstrated H-*RAS* over expression relative to paired normal tissues.

Conclusions: Our results underline the importance of H-*RAS* activation in human bladder cancer by codon 12 mutations. Moreover, they provide evidence that increased expression of all 3 *RAS* genes is a common event in bladder cancer that is associated with disease development.

Key Words: urinary bladder; carcinoma, transitional cell; genes, ras; mutation; gene expression

BLADDER cancer is the fifth most common cancer in men in Western society with an annual incidence of approximately 18/100,000 population. The peak prevalence of the disease is in patients who are 60 to 70 years old. BCa is curable if diagnosed during the early stages of the disease. Tumors of the bladder develop via 2 distinct but somewhat overlapping pathways, including the papillary and the nonpapillary pathway. Approximately 80% of BCAs consist of superficial exophytic papillary lesions that originate from

urothelial hyperplasia. These typically low grade papillary tumors may recur but rarely invade the bladder wall or metastasize. The remaining 15% to 20% of tumors represent high grade, solid, nonpapillary BCAs that arise from high grade intra-urothelial neoplasia. These tumors aggressively invade the bladder wall and have a high propensity for distant metastasis.¹

The most frequently detected alterations in oncogenes in animal and tumor models of human cancer are mu-

tations in the *RAS* family of oncogenes.² The *RAS* gene family codes for 21 kDa (p21^{RAS}) proteins that are found in the cytoplasm and it is associated with the inner surface of the plasma membrane. The normal function of p21^{RAS} proteins is to interact with tyrosine kinase receptors to activate a signal transduction pathway. Therefore, all *RAS* gene products have GTPase activity and regulate cell growth and differentiation. Mutations in members of the *RAS* gene family are found in a wide variety of human cancers. Most of these mutations are point mutations in codons 12, 13 or 61 that convert the *RAS* gene into a transforming oncogene. Mutated p21^{RAS} has a structure that hinders its ability to bind to GTPase activating protein, thus keeping p21 in a guanosine triphosphate bound activated state. The activation of *RAS* oncogenes also occurs by quantitative changes, eg over expression.³ Spandidos and Lang reported that the over expression of even normal p21^{RAS} is carcinogenic.⁴ We determined *RAS* codon 12 and 13 point mutations status and evaluated mRNA expression levels in TCC.

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Clinicopathological Data

Paired tumor and normal tissue samples from a consecutive series of 30 patients with newly diagnosed BCa undergoing transurethral bladder tumor resection at the department of urology at "Asklipieio" General Hospital, Athens were prospectively evaluated for K, H and N-*RAS* gene mutations by RFLP analysis and direct sequencing. The patients studied were of advanced age (mean \pm SD 72.2 \pm 10.6 years). Of the 30 patients 26 (87%) were smokers or former smokers, whereas 19 (63%) were characterized by some level of occupational exposure to agents associated with BCa, such as paints, chemicals etc (table 1).

All tumor specimens were classified and graded by the same pathologist. Histological grading was performed using the 1973 WHO and the 2004 WHO/International Society of Urological Pathology classifications.⁵ Tumor stage was assessed according to the 2002 American Joint Committee on Cancer staging system.⁶ Written informed consent was obtained from all study patients.

The study protocol was approved by the University of Crete ethics committee. Eligibility criteria used were electively resected primary BCa and the availability of DNA from normal and tumor tissue for biomolecular analyses. Study exclusion criteria were a history of neoplasms and chemotherapy or radiation therapy before surgery.

Tissue samples were obtained at surgery from the tumor and using cold cup biopsies from 3 grossly normal selected sites, including the posterior wall, the trigone and the area adjacent to the tumor. Parts of resected normal samples were sent for histopathological analysis. Tumor and normal tissues were frozen immediately in liquid nitrogen, transported and stored at -80°C until DNA extraction.

Patients with nonmuscle invasive BCa were followed with periodic cystoscopic examinations and intravesical

Table 1. Patient clinicopathological characteristics

	No. Pts
Overall*	30
Sex:	
M	27
F	3
Mean age (range)	72.2 (44–86)
Smoking:	
Nonsmoker	4
Former smoker	8
Smoker	18
Occupational exposure:†	
Yes	19
No	11
Stage:	
pTa	1
pT1	12
pT1a	4
pT1b	1
pT2	2
pT2a	1
pT2b	5
pT2+in situ	3
pT3a	1
WHO 1973 grade:	
I	0
II	10
III	20
WHO/International Society of Urological Pathology 2004 grade:	
Low	8
High	22

* Total of 30 TCC and 30 adjacent normal tissue samples.

† To chemicals, paints, pesticides, petroleum, ink etc.

treatment as indicated. Patients with invasive BCa were offered radical cystectomy with or without systemic chemotherapy. At a mean followup of 24 \pm 3 months, 8 patients (26.6%) had recurrent tumors. In those with Ta/T1 vs T2-T3 tumors the frequency of recurrence was 29.4% (5 of 17) vs 23% (3 of 13). In patients with nonmuscle invasive BCa the progression rate was 11.1% and 22.2% for grades II and III disease, respectively. All recurrences were proved by biopsy.

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. *RAS* genes were amplified using the set of primers and PCR conditions reported by Zarrinos et al.⁷

RFLP Analysis and Direct Sequencing

We performed RFLP analysis and direct sequencing. For K-*RAS* and N-*RAS* 10 to 40 μl aliquots of amplification products were digested for 16 hours with 30 U *Bst*NI. For H-*RAS* 10 to 40 μl aliquots of amplification products were digested for 16 hours with 30 U *Msp*I. RFLP products were analyzed on 3% agarose gel and photographed on an ultraviolet light transilluminator (fig. 1). DNA from the SW480 cell line bearing a homozygous mutation in K-*RAS* codon 12 and EJ, which is mutant at the same codon of the H-*RAS* gene, served as positive controls, respectively.

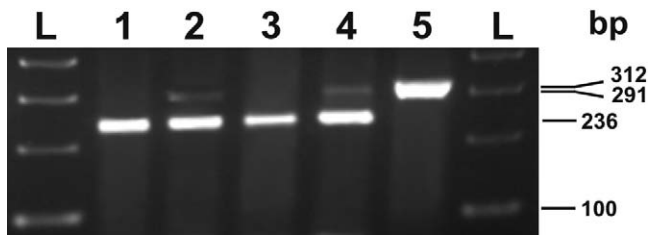


Figure 1. H-RAS 312 bp amplification products were digested with restriction enzyme *Msp* I and electrophoresed on 3% agarose gel. L, 100 bp DNA ladder. Lanes 1 and 3, WT samples. Lanes 2 and 4, heterozygous mutation samples. Lane 5, undigested H-RAS PCR product.

PCR products were purified with a QIAquick® PCR purification kit. The sequencing reaction was performed on a GeneAmp® 9600 thermal cycler using a Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, as previously described.⁷ Sequences were double-checked using forward and reverse primers separately (fig. 2).

RNA Extraction and Reverse Transcription

Tissue specimens were homogenized in TRIzol® reagent using a power homogenizer, followed by chloroform addition and centrifugation. Total RNA was precipitated from supernatant with isopropanol, washed with 75% ethanol and resuspended in 50 μ l DEPC treated water. cDNA was synthesized by reverse transcription with the StrataScript® First-Strand Synthesis System, as previously described.⁷

Real-Time PCR

Transcribed products were subjected to real-time PCR assay with SYBR® Green I in an Mx3000P® programmable thermal controller apparatus. All primer pair sequences, amplification conditions and calculation of gene transcription levels were used as previously described (fig. 3).⁷

Statistical Analysis

The nonparametric Spearman rank correlation was used to examine pairwise correlations between RAS mRNA levels and their association with continuous variables, including patient age, smoking, histological type and stage. The Mann-Whitney U test, applied when indicated by analysis, was used to examine the expression status of RAS genes with the various clinicopathological parameters after stratification. Multivariate analysis using a logistic regression model was also performed. All statistical analysis was performed with SPSS® 11.5 with statistical significance set at the 95% level ($p < 0.05$).

RESULTS

Mutation Analysis

Mutation analysis of the K, H and N-RAS genes in codons 12 and 13 was done in 30 patients. No K or N-RAS mutation was detected. However, 9 TCCs bearing mutations in codon 12 were found with amino acid substitutions that could be deduced by direct sequencing. One substitution (2TCC) was ho-

mozygous (11%), while the remainder were heterozygous (89%). Seven of 9 mutant samples (78%) bore a GGC \rightarrow GAC mutation at codon 12, leading to the amino acid substitution of Gly \rightarrow Asp at this site. The 2 remaining samples were GGC \rightarrow GTC codon 12 mutations, resulting in the substitution of Gly \rightarrow Val (fig. 2). No RAS mutation could be detected in codon 13 in any tissues studied. Notably only 2 of the patients bearing H-RAS mutations had invasive urothelial carcinoma, which was stage pT2 plus in situ in 1 and pT3a disease in 1, whereas 7 of 9 (77%) had noninvasive urinary BCa, including stages pT1, pT1a and pT1b.

Expression Analysis

RAS genes were expressed in all TCC and adjacent normal tissues studied. According to the ratio of the level of expression of each RAS gene in TCCs compared to that in adjacent normal tissue we defined 3 groups of expression, including less than 0.5—under expression, 0.5 to 2.0—equal expression and greater than 2.0—over expression (table 2). Of the TCCs 11 (37%) presented with over expression of 1 RAS gene, whereas 7 (23%) were characterized as having 2 over expressed RAS genes. Only 4 TCCs (13%) showed over expression of all 3 RAS genes.

The highest incidence of over expression was detected in K and N-RAS genes (50% each), whereas H-RAS showed a lower rate of over expression (27%). It is clear that RAS oncogenes did not have a similar pattern of over expression in urothelial carcinoma, which is in favor of the hypothesis that this expression has a role in the pathogenesis of bladder tumors. Mean \pm SD levels of under expression of RAS genes were 0.27 ± 0.12 for K and H-RAS, and 0.38 ± 0.04 for N-RAS. The rate of equal expression was similar for the K, H and N-RAS genes (1.03 ± 0.44 , 1.20 ± 0.48 and 0.92 ± 0.45 , respectively). We observed a unique pattern of over expression of all 3 members of the RAS family and each member showed a different TCC-to-normal ratio range (table 2). Specifically while the mean over expression rate of K-RAS was 4.53 ± 2.52 -fold, 4 TCCs showed a significantly increased K-RAS expression level compared to that in adjacent normal tissue (21.67 ± 1.14 -fold) (fig. 4). Six TCCs demonstrated H-RAS over expression (mean 2.64-fold \pm 0.43). However, 2 carcinoma samples were characterized by 18.04 ± 8.24 -fold increased H-RAS expression relative to adjacent normal tissue. N-RAS was found to be over expressed 3.83 ± 1.32 -fold in 11 TCCs. Of note 4 TCCs were characterized by an even more significantly increased level of N-RAS over expression relative to adjacent normal tissue (18.65 ± 5.80 -fold).

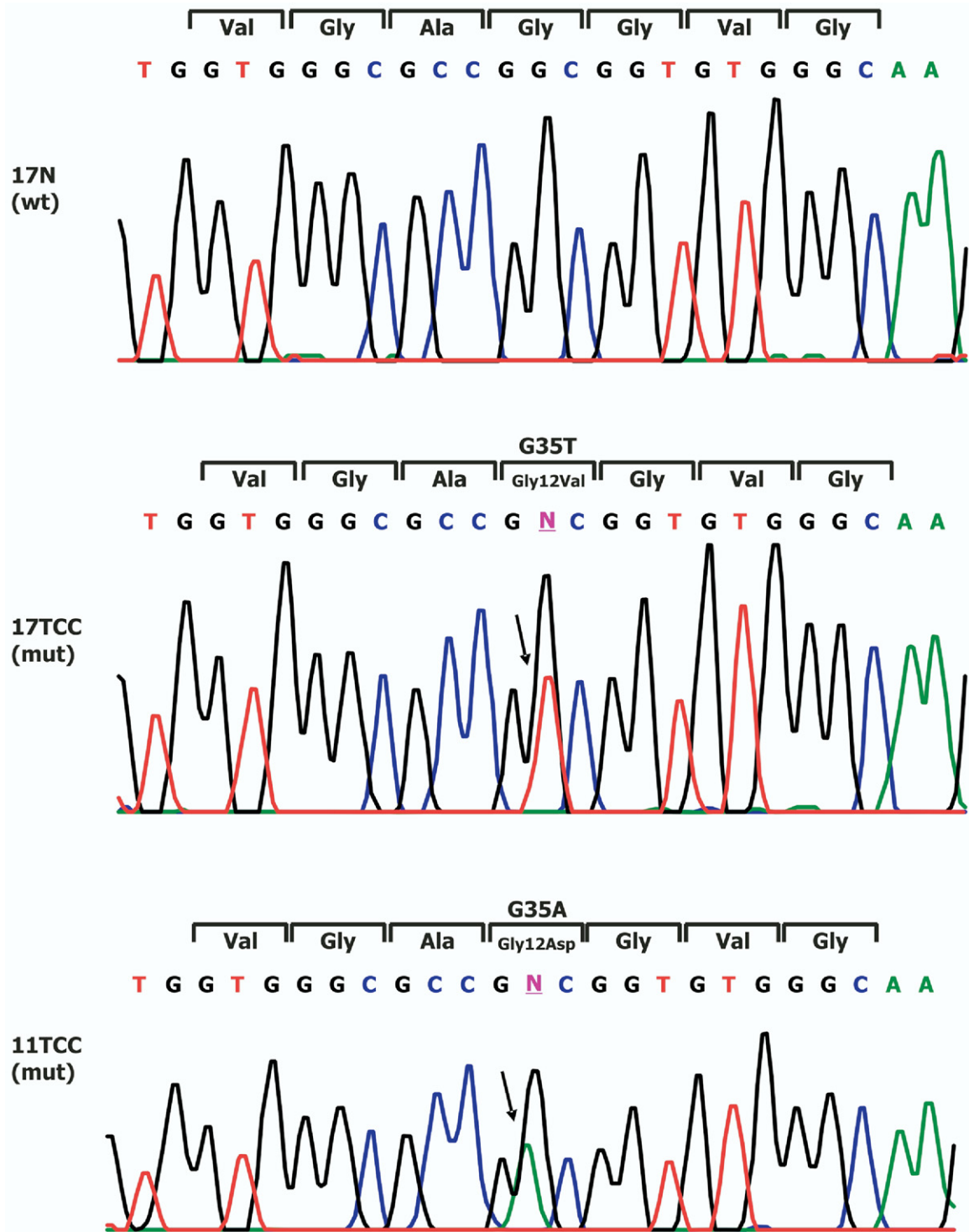


Figure 2. Direct sequencing of RAS PCR products verified mutation (*mut*) in codon 12 in 9 TCCs. A, WT H-RAS sequence of representative normal adjacent tissue from codon 9 to 15 and amino acids encoded by this sequence. B, sequence of representative TCCs bearing codon 12 heterozygous point mutation (GGC → GAC), which leads to Gly12Asp amino-acid change. C, sequence of representative TCCs bearing codon 12 heterozygous point mutation (GGC → GTC), which leads to Gly12Val amino acid.

RAS Analysis vs Clinicopathological Characteristics

Of the patients studied 6 (31.5%) carried a codon 12 H-RAS mutation, while the remaining 13 had tis-

sues that were *WT*. Three H-RAS mutant samples were found in patients who had no occupational exposure record. In 9 of the 19 patients (47%) with an occupational exposure record only 1 RAS gene

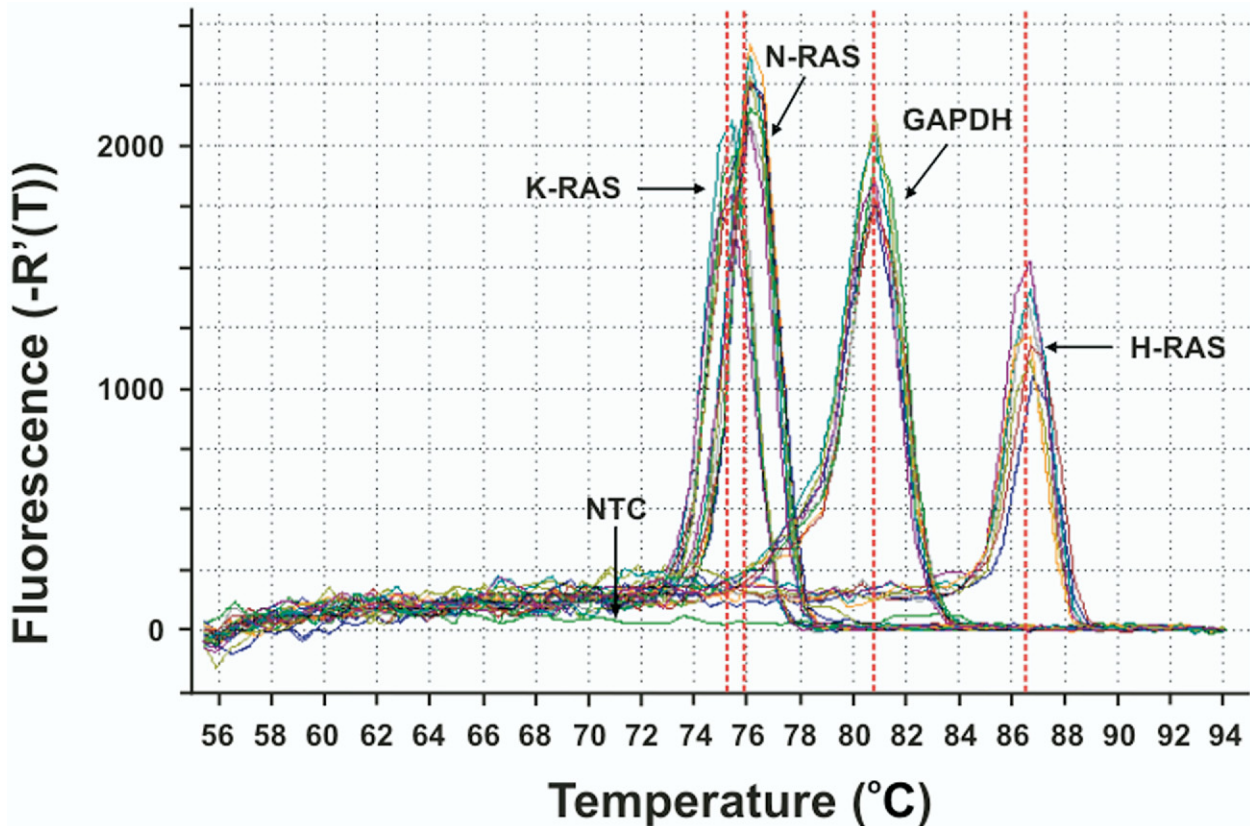


Figure 3. Melt curve analysis of RAS genes and normalizer gene GAPDH shows single peaks for all genes, including 75.8°C for K-RAS, 76°C for N-RAS, 86.2°C for H-RAS and 80.3°C for GAPDH, and absent peaks for nontemplate control (NTC), demonstrating exclusion of any genomic DNA contamination and PCR product specificity.

was over expressed, while 4 and 2 patients had 2 and 3 over expressed genes, respectively. Similarly 3 of these patients did not show any over expression. In contrast, it was not possible to detect any difference in the number of over expressed genes in the 11 patients with no history of occupational exposure. Three of these patients had 1, 2 and no over expressed genes, respectively, while in 2 all 3 RAS genes were over expressed.

Of the 30 patients 26 (87%) were smokers or former smokers, of whom 19% had an H-RAS codon 12 mutation. Interestingly all 4 nonsmokers had the H-RAS codon 12 mutation. Nine of the 26 smokers/former smokers (34%) had 1 RAS gene over expressed, while 27% and 15% had 2 and 3 genes over expressed, respectively. Six smokers/former smokers did not show any RAS gene over expression.

Statistical significance was not attained in the relationship between RAS mutations, expression status and tumor stage or grade. In addition, multivariate analysis using a logistic regression model demonstrated no association between mutation/expression status and clinical outcome (progression and recurrence). However, 78% of H-RAS codon 12 mutations were detected in noninvasive bladder

cancer cases. Moreover, grade III TCC cases showed significantly higher N-RAS mRNA levels than cases of grade II tumors with a statistically significant difference (Mann-Whitney U test $p = 0.041$).

mRNA Expression Pairwise Analysis

Spearman analysis was done to detect possible correlations between RAS co-expression patterns in TCC and adjacent normal tissues. A significant positive correlation was found between H-RAS and N-RAS in TCC samples ($p = 0.001$). No other correlation was present in the remaining gene pairs in the TCC or adjacent normal tissue.

DISCUSSION

The association between the mutated RAS gene family (H, K and N-RAS) and 30% of all human cancers, including bladder cancer, suggests that aberrant RAS function is an important contributor to cancer development.^{3,4} Frequently mutated hot spots are Gly \rightarrow Val in codon 12, Gly \rightarrow Cys at codon 13 and Glu \rightarrow Arg/Lys/Leu at codon 61.^{8,9} Point mutations in RAS genes block intrinsic GTPase activity, thus preventing the normal deactivation of RAS pro-

Table 2. RAS family gene mutation and expression status in patients with TCC

Pt No.	H-RAS Codon 12 Mutations*	TCC/Normal (expression)		
		K-RAS	H-RAS	N-RAS
1	WT	0.27 (under)	0.40 (under)	0.43 (under)
2	Mutation	0.22 (under)	1.88 (equal)	20.50 (over)
3	WT	0.22 (under)	3.38 (over)	3.13 (over)
4	Mutation	0.28 (under)	0.22 (under)	1.64 (equal)
5	WT	0.18 (under)	1.37 (equal)	13.89 (over)
6	WT	0.50 (equal)	0.75 (equal)	2.85 (over)
7	WT	0.10 (under)	0.19 (under)	0.47 (equal)
8	WT	0.43 (under)	2.70 (over)	0.52 (equal)
9	Mutation	0.15 (under)	1.50 (equal)	6.08 (over)
10	Mutation	0.72 (equal)	0.95 (equal)	0.75 (equal)
11	Mutation	21.95 (over)	1.46 (equal)	0.76 (equal)
12	WT	3.56 (over)	0.12 (under)	0.58 (equal)
13	WT	3.00 (over)	2.39 (over)	2.28 (over)
14	WT	1.64 (equal)	0.11 (under)	0.85 (equal)
15	WT	0.43 (under)	24.23 (over)	4.65 (over)
16	Mutation	3.35 (over)	0.70 (equal)	2.37 (over)
17	Mutation	22.31 (over)	1.11 (equal)	0.36 (under)
18	WT	1.07 (equal)	0.35 (under)	5.77 (over)
19	WT	22.41 (over)	2.83 (over)	14.17 (over)
20	WT	9.10 (over)	1.65 (equal)	4.34 (over)
21	WT	19.99 (over)	0.19 (under)	0.35 (under)
22	Mutation	2.24 (over)	0.28 (under)	0.59 (equal)
23	WT	0.41 (under)	0.52 (equal)	1.21 (equal)
24	WT	8.73 (over)	1.84 (equal)	26.05 (over)
25	WT	3.26 (over)	0.43 (under)	1.89 (equal)
26	Mutation	5.47 (over)	2.29 (over)	0.89 (equal)
27	WT	2.70 (over)	12.57 (over)	4.05 (over)
28	WT	6.31 (over)	0.44 (under)	2.61 (over)
29	WT	2.11 (over)	2.25 (over)	4.04 (over)
30	WT	1.24 (equal)	0.71 (equal)	0.89 (equal)

* In all patients K and N-RAS genes, and in all adjacent normal tissues RAS family genes were WT.

teins.³ H-RAS mutations were first detected in the human bladder cancer cell line T24¹⁰ with subsequent studies demonstrating that H-RAS mutations are more frequently detected in urinary tract tumors than K or N-RAS genes.¹¹ Although the initial expectation that H-RAS mutations would have an important role in bladder carcinogenesis has not been upheld and it is now believed that they have a role in only 10% of cases,¹² still more recent reports show a significantly higher frequency of H-RAS mutations in bladder tumors. Fitzgerald et al reported that mutations in H-RAS were detected in urine sediment in 44% of patients with bladder cancer,¹³ Czerniak et al observed H-RAS mutation at codon 12 in 45% of bladder cancers¹⁴ and Haliassos et al reported an even higher incidence of 66%.¹⁵ Furthermore, the most recent report by Przybojewska et al described H-RAS mutation in 84% of patients with bladder cancer.¹⁶ These discrepancies may be due to the methods used to detect RAS mutation.

In the current study we used a sensitive PCR/RFLP assay to test for the presence of RAS mutations in BCa cases. To our knowledge for the first

time results were confirmed by direct sequencing of the PCR product, providing increased accuracy and sensitivity. Our findings support reports indicating that a significant percent of H-RAS gene codon 12 mutations are present in urinary BCa cases. We detected 9 of 30 bladder TCCs (30%) bearing H-RAS mutations (G → A and G → T) in codon 12, which are the most commonly reported point mutations.¹⁷ Of particular note in our study is the fact that 78% of these mutations were found in noninvasive TCCs, whereas only 2 were detected in invasive cancers, including 1 pT3a and 1 pT2 plus in situ. This observation is in agreement with the findings of Ooi et al, who reported that the codon 12 G → T substitution was associated with nonrecurring and recurring primary tumors as well as with initial Ta/T1 lesions in patients with disease progression.¹⁸ Our results substantiate the concept that there is a relationship between H-RAS codon 12 mutations and low stage, well differentiated bladder neoplasms, whereas it seems that advanced TCC lacks such mutations.

Mutations in K-RAS have been detected in more than 80% of human pancreatic tumors, 38% of colon cancer specimens and 31% of small intestine can-

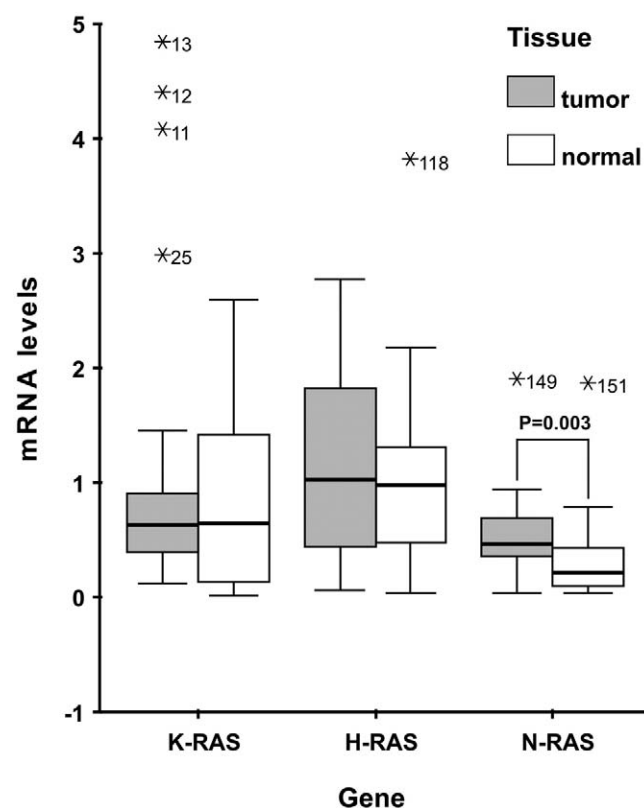


Figure 4. RAS family gene mRNA levels in TCC and adjacent normal tissues. K and N-RAS had higher expression in TCC samples than in normal tissue (N-RAS Mann-Whitney U test $p = 0.003$), whereas H-RAS was equally expressed in 2 tissue types.

cers. To date *N-RAS* gene mutations have been mainly associated with hematopoietic malignancies and melanoma. Our findings concerning the lack of K and *N-RAS* gene mutations in BCa are in accordance with those of other groups, providing further evidence for the tissue specificity of the activation of RAS family genes.

Although point mutations act as an activating mechanism of RAS oncogenes, over expression of RAS transcripts also increases the risk of carcinogenesis and it has been reported for several tumors, including those of the breast, colon, head and neck, and lung. These studies have proved that RAS oncogene expression is increased in premalignant and malignant tumors compared to normal tissues. In bladder cancer specifically Viola et al found increased expression of RAS protein in carcinoma in situ and high grade tumors but not in hyperplasia or low grade tumors on immunohistochemical analysis.¹⁹ Moreover, Vageli et al reported the possible involvement of RAS oncogenes in bladder cancer through over expression.²⁰

However, none of the studies done to date have used advanced technology, such as real-time reverse transcriptase-PCR. To our knowledge the current study is the first to do so using real-time reverse transcriptase-PCR to detect the mRNA levels of RAS genes in TCC and compare them to corresponding levels in adjacent normal tissue. Of 30 samples 23 were found to demonstrate over expression of at least 1 RAS family gene. The highest incidence of over expression was found for K and *N-RAS* genes, which were over expressed in half of TCC samples,

while *H-RAS* showed a lower rate of over expression (27%) compared to paired normal tissue. These rates are in agreement with the results of previous studies²⁰ and indicate that RAS oncogenes do not have a pattern of over expression in bladder cancer that is similar to their pattern in other cancers. The positive correlation detected between H and *N-RAS* expression levels underlines the concept that RAS genes could act synergistically in TCC cases ($p = 0.001$). Moreover, in contrast to the study by Viola et al,¹⁹ statistical significance was not attained between expression levels and tumor stage or grade. Our results are in accordance with studies supporting a lack of correlation between tumor stage or grade and RAS mRNA levels. All samples expressed at least 1 member of the RAS family but 37% of them had over expression of only 1 RAS gene, while 23% had over expression of 2 RAS genes and 13% over-expressed all 3 RAS genes. These results suggest a significant increase in p21^{RAS} in the corresponding tissues. In samples that over expressed all 3 RAS genes the TCC-to-normal ratio of each was not always similar.

CONCLUSIONS

The current study substantiates the concept that activation of the *H-RAS* oncogene by point mutation and the activation of all RAS genes (mainly K and *N-RAS*) by over expression are frequent events in BCa cases. Increased *RAS* mRNA levels may indicate BCa development but they do not appear to be responsible for its progression.

REFERENCES

- Spieß PE and Czerniak B: Dual-track pathway of bladder carcinogenesis: practical implications. *Arch Pathol Lab Med* 2006; **130**: 844.
- Krontiris TG, Devlin B, Karp DD, Robert NJ and Risch N: An association between the risk of cancer and mutations in the *HRAS1* minisatellite locus. *N Engl J Med* 1993; **329**: 517.
- Field JK and Spandidos DA: The role of ras and myc oncogenes in human solid tumours and their relevance in diagnosis and prognosis (review). *Anticancer Res* 1990; **10**: 1.
- Spandidos DA and Lang JC: In vitro cell transformation by ras oncogenes. *Crit Rev Oncog* 1989; **1**: 195.
- Lopez-Beltran A and Montironi R: Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification. *Eur Urol* 2004; **46**: 170.
- Greene FL and Sobin LH: The staging of cancer: a retrospective and prospective appraisal. *CA Cancer J Clin* 2008; **58**: 180.
- Zaravinos A, Bizakis J, Soufla G, Sourvinos G and Spandidos DA: Mutations and differential expression of the ras family genes in human nasal polyposis. *Int J Oncol* 2007; **31**: 1051.
- Levesque P, Ramchurren N, Saini K, Joyce A, Libertino J and Summerhayes IC: Screening of human bladder tumors and urine sediments for the presence of *H-RAS* mutations. *Int J Cancer* 1993; **55**: 785.
- Bonner RB, Hemstreet GP 3rd, Fradet Y, Rao JY, Min KW and Hurst RE: Bladder cancer risk assessment with quantitative fluorescence image analysis of tumor markers in exfoliated bladder cells. *Cancer* 1993; **72**: 2461.
- Capon DJ, Chen EY, Levinson AD, Seeburg PH and Goeddel DV: Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* 1983; **302**: 33.
- Rabbani F and Cordon-Cardo C: Mutation of cell cycle regulators and their impact on superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am* 2000; **27**: 83.
- Saito S, Hata M, Fukuyama R, Sakai K, Kudoh J, Tazaki H et al: Screening of *H-ras* gene point mutations in 50 cases of bladder carcinoma. *Int J Urol* 1997; **4**: 178.
- Fitzgerald JM, Ramchurren N, Rieger K, Levesque P, Silverman M, Libertino JA et al: Identification of *H-ras* mutations in urine sediments complements cytology in the detection of bladder tumors. *J Natl Cancer Inst* 1995; **87**: 129.
- Czerniak B, Cohen GL, Etkind P, Deitch D, Simmons H, Herz F et al: Concurrent mutations of coding and regulatory sequences of the *Ha-ras* gene in urinary bladder carcinomas. *Hum Pathol* 1992; **23**: 1199.
- Haliassos A, Liloglou T, Likourinas M, Dumas C, Ricci N and Spandidos DA: *H-ras* oncogene mutations in the urine of patients with bladder tumors: description of a non-invasive method for the detection of neoplasia. *Int J Oncol* 1992; **1**: 731.
- Przybojewska B, Jagiello A and Jalmuzna P: *H-RAS*, *K-RAS*, and *N-RAS* gene activation in hu-

- man bladder cancers. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; **121**: 73.
17. Williams SG and Stein JP: Molecular pathways in bladder cancer. *Urol Res* 2004; **32**: 373.
18. Ooi A, Herz, Fli S, Cordon-Cardo C, Fradet Y, Mayall BH and Marker N: H-RAS codon 12 mutation in papillary tumors of the urinary bladder, a retrospective study. *Int J Oncol* 1994; **4**: 85.
19. Viola MV, Fromowitz F, Oravez S, Deb S and Schlom J: ras Oncogene p21 expression is increased in premalignant lesions and high grade bladder carcinoma. *J Exp Med* 1985; **161**: 1213.
20. Vageli D, Kiaris H, Delakas D, Anezinis P, Cranidis A and Spandidos DA: Transcriptional activation of H-ras, K-ras and N-ras proto-oncogenes in human bladder tumors. *Cancer Lett* 1996; **107**: 241.

Mutational analysis of the *BRAF* gene in transitional cell carcinoma of the bladder

Ioannis Boulalas^{1,*}, Apostolos Zaravinos^{2,*}, Demetrios Delakas¹, Demetrios A. Spandidos²

¹Department of Urology, Asklepieio General Hospital, Voula, Athens

²Laboratory of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete - Greece

*Contributed equally to this work and should be considered as first authors

ABSTRACT: Purpose: Mutational activation of the MAP kinase pathway is frequently found in many types of cancer. Recently, activating mutations in the *BRAF* gene, an important activator of this pathway, have been described in several tumor types including melanoma, colorectal and papillary thyroid cancer. The most frequent mutation in exon 15 (V600E) as well as several other mutations within exons 11 and 15 result in constitutive activation of the oncoprotein.

Materials and methods: Our study aimed to investigate *BRAF* mutations in 30 human bladder tumors and their adjacent normal tissues. The V600E mutation was screened by PCR/RFLP and exons 11, 14 and 15 of *BRAF* including intron-exon boundaries were sequenced.

Results: We detected two tumor specimens bearing two different mutations, both of which were found in exon 15. One sample showed the T1799A (V600E) and the other the G1798T (V600L) mutation. The first specimen was stage pT1a and grade II, whereas the second was stage pT2b and grade III. No mutations within the coding region of exons 11, 14, 15 and the intron-exon junctions for the remaining samples were found.

Conclusions: Our results suggest that involvement of *BRAF* mutations in the development of transitional cell carcinoma of the bladder is infrequent. (Int J Biol Markers 2009; 24: 17-21)

Key words: *BRAF* mutations, Transitional cell carcinoma

INTRODUCTION

Bladder cancer (BCa) is the fourth most common malignancy in men (7%) and the twelfth most common in women (2.5%) and accounts for 3% of all deaths in men in the United States. In 2008, it is estimated that 68,810 new patients will be diagnosed with bladder cancer, with 14,100 of these patients succumbing to the disease (1). Transitional cell carcinomas (TCCs) of the bladder comprise nearly 90% of primary bladder tumors and develop via 2 distinct but somewhat overlapping pathways, the papillary and non-papillary. BCas (~80%) consist of superficial exophytic papillary lesions that originate from urothelial hyperplasia. These typically low-grade papillary tumors may recur, but they rarely invade the bladder wall or metastasize. The remaining 15-20% of tumors represent high-grade solid non-papillary BCas arising from high-grade intraurothelial neoplasia. These tumors aggressively invade the bladder wall and have a high propensity for distant metastasis (2).

The MAP kinase pathway is a significant signaling pathway that regulates cellular processes. Dysregulation of this pathway caused by mutations in different media-

tors is frequently found in many types of cancer (3). Somatic activating mutations of the *BRAF* gene have been reported in melanomas (>60%) and other cancer types, predominantly the V600E substitution in exon 15 (4). The most commonly reported mutation was a T→A transversion at nucleotide 1799 (V600E) observed in 80% of the malignant melanomas studied; this mutation was previously named T1796A (V599E) (4). Functional analysis revealed that the 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 (4). Additionally, *BRAF* mutations such as the V600E were described in *KRAS*-negative colon carcinomas, suggesting that *BRAF/KRAS*-activating mutations are alternative genetic events in colon cancer (5-7).

The incidence of *BRAF* mutations in TCC of the bladder is not well established. Davies et al screened the entire *BRAF* coding region in 10 bladder cancer cell lines, but no mutation was detected (4). Moreover, the number of published reports regarding the *BRAF* mutation status in TCCs is limited. Our study therefore aimed to screen *BRAF* exons 11, 14 and 15 for the presence of mutations in TCC of the bladder.

MATERIALS AND METHODS

Study design and clinicopathological data

Paired tumor and normal tissue samples from a consecutive series of 30 patients with newly diagnosed BCAs undergoing transurethral tumor resection at the Department of Urology of the Asklepieio General Hospital in Athens were prospectively studied for *BRAF* gene mutations by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and direct sequencing. The patients studied were of advanced age (mean age \pm SD of the patient population was 72.2 ± 10.6 years). The majority (26/30, 87%) were smokers or former smokers, while 19 (63%) were characterized by some level of occupational exposure to agents associated with BCa such as paints and chemicals (Tab. I).

Tumor specimens were classified and graded by the same pathologist. Histological grading was performed using both the 1973 World Health Organization (WHO) and the 2004 WHO/International Society of Urologic Pathology (ISUP) classifications (8).

Tumor stage was assessed according to the 2002 American Joint Committee on Cancer staging system (9). Written informed consent was obtained from the patients

included in this study. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Crete. Eligibility criteria included electively resected primary BCAs and the availability of DNA from normal and tumor tissue for biomolecular analyses. Exclusion criteria were a history of previous neoplasms and chemotherapy or radiation therapy prior to surgery.

Tissue samples were obtained at surgery from the tumor and the 3 selected grossly normal sites (cold cup biopsies) were posterior wall, trigone, and area adjacent to the tumor. Parts of the resected normal samples were sent for histopathological analysis. Tumor and normal tissues were frozen immediately in liquid nitrogen, transported, and stored at -80°C until DNA extraction.

Patients with non-muscle-invasive BCAs were followed-up with periodical cystoscopic examinations and intravesical treatment as indicated. Patients with invasive BCAs were offered radical cystectomy with or without systemic chemotherapy. After a mean follow-up of 24 ± 3 months, 8 (26.6%) patients had recurrent tumors. In Ta/T1 tumors the frequency of recurrence was 29.4% (5/17) compared with 23% (3/13) of T2-T3 tumors. In patients with non-muscle-invasive BCAs, the progression rate was 11.1% and 22.2% for grade II and III tumors, respectively. All recurrences were proven by biopsy.

TABLE I - CLINICOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE PATIENTS

Subjects (N)	30*
Sex	
Male	27
Female	3
Age (years)	
Mean	72.2
Range	44-86
Smoking [†]	
NS	4
FS	8
S	18
Occupational exposure [‡]	
Yes	19
No	11
Stage	
pTa	1
pT1	12
pT1a	4
pT1b	1
pT2	2
pT2a	1
pT2b	5
pT2+in situ	3
pT3a	1
Grade (WHO 1973)	
I	0
II	10
III	20
Grade (WHO/ISUP 2004)	
Low	8
High	22

* 30 TCCs and 30 adjacent normal tissue specimens

[†] NS, non-smoker; FS, former smoker; S, smoker

[‡] Exposure to chemicals, paints, pesticides, petroleum or ink

DNA extraction, oligonucleotide primers and PCR

Genomic DNA was extracted using proteinase K, followed by phenol extraction and ethanol precipitation according to standard procedures, as previously described (10). We amplified *BRAF* exons 11, 14 and 15 by polymerase chain reaction (PCR) using the primers and thermal conditions as referred to in Zaravinos et al (11). 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 products were purified with the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN Inc.) and stored at -20°C for further RFLP and sequencing analysis.

RFLP analysis

RFLP analysis involved 10- μL aliquots of the amplification products being digested for 16 hours at 65°C with 10 U of *TspR* I restriction enzyme (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) in a 30- μL reaction volume. After replacing the enzyme with deionized water, the same reaction was used as a negative control. RFLP products were analyzed on a 3% agarose gel and photographed on a UV light transilluminator.

Direct DNA sequencing

Direct DNA sequencing was used to identify and/or verify mutations within exons 11, 14 and 15 of the *BRAF*

gene. Exons 11 (G-loop) and 15 (activation segment) have been detected in malignant melanoma and other cancer types, resulting in the permanent activity of *BRAF* (4). Since exon 14 is adjacent to exon 15, thereby encoding an amino-acid sequence close to the protein's activation segment, we also included it in our study. The primers used for the forward reading of the reactions were: *BRAF* exon 11, 5'-TGTTTGGCTTGACTTGAC-3'; *BRAF* exon 14, 5'-AGATTTCCGAGGCCAGAGTCC-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 minutes followed by 25 cycles at 96°C for 30 seconds, 54°C for 10 seconds, and 60°C for 4 minutes. The reaction products were precipitated with 2-propanol, washed with 75% ethanol, re-suspended in 25 μ L water, and loaded onto an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequencing data were analyzed using sequence analysis software (Sequence Analysis 3.7; Applied Biosystems).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with SPSS 11.5 (SPSS, Chicago, IL, USA). Statistical significance was set at the 95% level ($p < 0.05$).

RESULTS

All 30 TCCs were successfully screened for the presence of *BRAF* mutations within exons 11, 14 and 15. The V600E mutation (nucleotide change T1799A in exon 15) was found in 1 TCC specimen, whereas sequencing analysis also detected a V600L (nucleotide change G1798T in exon 15) in another TCC sample (Fig. 1). The first specimen was stage pT1a and grade II, the second was stage pT2b and grade III. No mutations within the coding region of exons 11, 14, 15 and the intron-exon junctions for the remaining samples were found. As only 2 mutations were present, no statistically significant result could be attained.

DISCUSSION

Many fundamental cellular processes including differentiation, proliferation, survival, motility, and transformation are regulated by the RAS-RAF-MEK-ERK pathway, an evolutionary conserved signaling module (12). The RAF proteins are highly conserved serine/threonine protein kinases that activate mitogen-activated protein kinase (MEK), which in turn activates the mitogen-

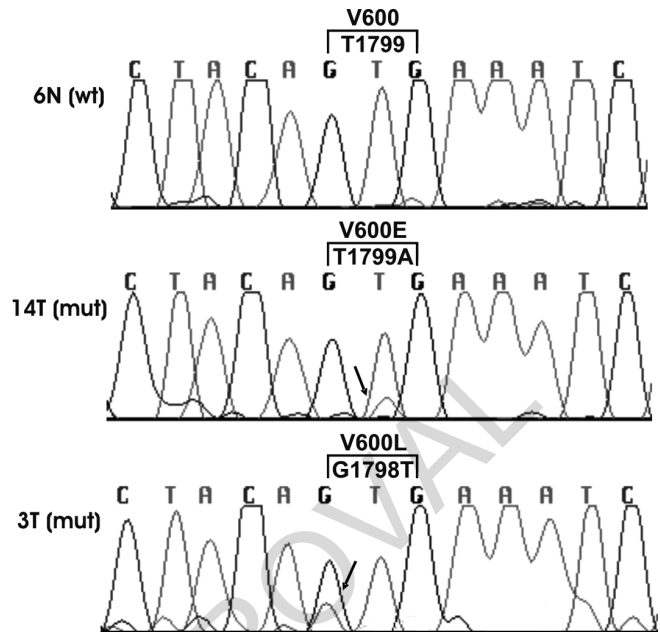


Fig. 1 - No mutations within exons 11, 14, 15 and the intron-exon junctions were detected. However, direct sequencing for DNA samples 14T and 3T (middle and lower panel, respectively) gave 2 different heterozygous mutations: a T→A substitution at nucleotide 1799 (V600E) and a G→T substitution at nucleotide 1798 (V600L). The upper panel shows the wt *BRAF* exon 15 sequence from a normal tissue sample (6N).

activated protein kinase (MAPK) pathway (13). Inappropriate and/or continuous activation of this pathway results in a potent promitogenic force with ensuing abnormal proliferation and differentiation in many human cancer types (14). Activating somatic mutations in the serine/threonine kinase *BRAF* were reported in a large proportion of malignant melanomas and papillary thyroid cancers, as well as in a small fraction of other cancers and cancer cell lines including colorectal carcinomas, ovarian neoplasms, non-small cell lung cancers and various sarcomas (4,15-18). Besides acting as an MAPK pathway activator, RAF was shown to be involved in the oncogenic signaling of protein kinase C epsilon (31, 32). Therefore, more than one oncogenic pathway might be coordinated by mutant, constitutively-activated *BRAF*.

Stoehr et al previously screened 121 paraffin-embedded urothelial carcinomas of the urinary bladder and 27 tumors from the upper urinary tract without detecting any *BRAF* mutations (19). The majority of TCCs studied did not reveal any mutations, indicating that the most frequent *BRAF* alterations described in several tumor types appear not to play an important role in urothelial carcinogenesis.

Regarding similar studies of the urinary tract, Cho et al reported an incidence of 10.2% of *BRAF* codon 600 mutations in prostate adenocarcinomas (20). Their results are not in accordance with those of Burger et al (21),

who had previously reported a lack of *BRAF* mutations in 79 prostatic adenocarcinomas. Moreover, activating *BRAF* missense mutations have been identified in 9% of non-seminomas but not in seminomas (22). It has been postulated that *BRAF* mutations do not play a role in the development of renal cell tumors (23), in testicular germ cell tumors (24), or in cervical, endometrial and ovarian carcinomas (25). Recently, de Jong et al, in a multidisciplinary approach to TCam-2 cells, confirmed that this is a seminoma cell line bearing the V600E *BRAF* mutation (26).

Interestingly, we detected 2 bladder cancer specimens bearing 2 different mutations, both within exon 15. One sample had a T1799A (V600E) and the other a G1798T (V600L) mutation. The first specimen was stage pT1a and grade II, the second was stage pT2b and grade III.

The majority of studies thus far have focused on the V600E mutation, which—although most frequently reported on—still appears only in a limited region of the *BRAF* gene. Bearing in mind therefore that other regions of the gene reveal a mutation spectrum in urothelial cancers, we also screened exons 11 and 14. However, no mutation was found, corresponding with the results of comprehensive analyses that have sequenced the entire *BRAF* coding region and failed to show mutations outside exons 11 and 15 (7). Thus, *BRAF* mutations appear to be infrequent in TCC.

In contrast, a significant proportion of TCCs (10-30%) harbor mutations of H-RAS, another significant ac-

tivator of the MAP kinase pathway, in codon 12 (27, 28, 30). This indicates a low frequency of mutational activation of the MAP kinase pathway in urothelial carcinogenesis, and appears to be consistent with the concept that *BRAF* and *RAS* mutations are mutually exclusive events, suggesting a linear functional relationship for these components in the complex signaling pathways (4, 29).

In summary, the present study demonstrates that involvement of *BRAF* mutations in the development of TTC of the urinary bladder is infrequent.

Abbreviations

TCC, transitional cell carcinoma
BCa, bladder cancer
PCR/RFLP, polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism

Conflict of interest: ????

Address for correspondence:
Professor D.A. Spandidos
Laboratory of Virology, Medical School
University of Crete
Heraklion 71100, Crete, Greece
e-mail: spandidos@spandidos.gr

REFERENCES

- Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96.
- Spiess PE, Czerniak B. Dual-track pathway of bladder carcinogenesis: practical implications. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 844-52.
- Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298: 1911-2.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-54.
- Helmke BM, Mollenhauer J, Herold-Mende C, et al. *BRAF* mutations distinguish anorectal from cutaneous melanoma at the molecular level. *Gastroenterology* 2004; 127: 1815-20.
- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of *BRAF* mutations in nevi. *Nat Genet* 2003; 33: 19-20.
- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: *RAF/RAS* oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002; 418: 934.
- Lopez-Beltran A, Montironi R. Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification. *Eur Urol* 2004; 46: 170-6.
- Greene FL, Sobin LH. The staging of cancer: a retrospective and prospective appraisal. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 180-90.
- Kanellou P, Zaravinos A, Zioga M, et al. 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; 264: 145-61.
- Zaravinos A, Bizakis J, Spandidos DA. *RKIP* and *BRAF* aberrations in human nasal polyps and the adjacent turbinate mucosae. *Cancer Lett* 2008; 264: 288-98.
- O'Neill E, Kolch W. Conferring specificity on the ubiquitous *Raf/MEK* signalling pathway. *Br J Cancer* 2004; 90: 283-8.
- Duesbery NS, Webb CP, Vande Woude GF. *MEK* wars, a new front in the battle against cancer. *Nat Med* 1999; 5: 736-7.
- Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, et al. Ras activation of the *Raf* kinase: tyrosine kinase recruitment of the *MAP* kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 2001; 56: 127-55.
- 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: 1454-7.
16. Naoki K, Chen TH, Richards WG, Sugarbaker DJ, Meyerson M. Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 7001-3.
 17. Brose MS, Volpe P, Feldman M, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002; 62: 6997-7000.
 18. 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: 6451-5.
 19. Stoehr R, Brinkmann A, Filbeck T, et al. No evidence for mutation of B-RAF in urothelial carcinomas of the bladder and upper urinary tract. *Oncol Rep* 2004; 11: 137-41.
 20. Cho NY, Choi M, Kim BH, Cho YM, Moon KC, Kang GH. BRAF and KRAS mutations in prostatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2006; 119: 1858-62.
 21. Burger M, Denzinger S, Hammerschmied C, et al. Mitogen-activated protein kinase signaling is activated in prostate tumors but not mediated by B-RAF mutations. *Eur Urol* 2006; 50: 1102-9.
 22. Sommerer F, Hengge UR, Markwarth AR, et al. Mutations of BRAF and RAS are rare events in germ cell tumours. *Int J Cancer* 2005; 113: 329-35.
 23. Nagy A, Balint I, Kovacs G. Frequent allelic changes at chromosome 7q34 but lack of mutation of the BRAF in papillary renal cell tumors. *Int J Cancer* 2003; 106: 980-1.
 24. McIntyre A, Summersgill B, Spendlove HE, Huddart R, Houlston R, Shipley J. Activating mutations and/or expression levels of tyrosine kinase receptors GRB7, RAS, and BRAF in testicular germ cell tumors. *Neoplasia* 2005; 7: 1047-52.
 25. Ueda M, Toji E, Nunobiki O, et al. Mutational analysis of the BRAF gene in human tumor cells. *Hum Cell* 2008; 21: 13-7.
 26. de Jong J, Stoop H, Gillis AJ, et al. Further characterization of the first seminoma cell line TCam-2. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47: 185-96.
 27. Cerniak B, Cohen GL, Etkind P, et al. Concurrent mutations of coding and regulatory sequences of the Ha-ras gene in urinary bladder carcinomas. *Hum Pathol* 1992; 23: 1199-204.
 28. Saito S, Hata M, Fukuyama R, et al. Screening of H-ras gene point mutations in 50 cases of bladder carcinoma. *Int J Urol* 1997; 4: 178-85.
 29. 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: 4578-80.
 30. Boulalas I, Zaravinos A, Karyotis I, Delakas D, Spandidos DA. Activation of the RAS family genes in urothelial carcinoma. *J Urol* 2009 (in press).
 31. Basu A, Sivaprasad U. Protein kinase Cepsilon makes the life and death decision. *Cell Signal* 2007; 19: 1633-42.
 32. Perletti GP, Concari P, Brusaferrri S, Marras E, Piccinini F, Tashjian AH Jr. Protein kinase Cepsilon is oncogenic in colon epithelial cells by interaction with the ras signal transduction pathway. *Oncogene* 1998; 16: 3345-8.

Received: December 1, 2008

Accepted: February 4, 2009