

ΓΑΚΗ Γ. ΒΑΣΙΛΙΚΗ
Χειρουργός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΡΟΔΟΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA
ΣΕ ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

ΓΑΚΗ Γ. ΒΑΣΙΛΙΚΗ
Χειρουργός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

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

ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δ. ΤΣΙΦΤΣΗΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ
- ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ
- ΠΕΡΙΛΗΨΗ
- ABSTRACT

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- **ΕΙΣΑΓΩΓΗ** 1
Τι Ονομάζουμε Καρκίνο. Το Μοντέλο Nowell
Ερευνώντας τη φύση του Καρκίνου. Γενετική και
Φαινοτυπική ανάλυση
- **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ**
 - 1.1 Ογκογονίδια 6
 - 1.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια (ΟΚΓ) 10
 - 1.2.1 Κυτταρογενετικές μελέτες Εντοπισμού ΟΚΓ 12
 - 1.2.2 Η λειτουργία των ΟΚΓ 16
 - 1.2.3 Υποψήφια ΟΚΓ 20
 - 1.2.4 Ογκογονίδια-Ογκοκατασταλτικά γονίδια και
κυτταρικός θάνατος 21
 - 1.3 Μεταλλακτικά Γονίδια 24
 - 1.3.1 Υπερμεταλλακτικός φαινότυπος 28
 - 1.3.2 Η μικροδορυφορική αστάθεια αποτελεί δείκτη
των όγκων με ελαττωματικό σύστημα επιδιόρθωσης 29
 - 1.3.3 Ελαττωματικό σύστημα επιδιόρθωσης επιταχύνει
το ρυθμό γονιδιακών μεταλλάξεων 32
- **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**
 - 2.1 Φυσιολογική ανάπτυξη του μαζικού αδένου 33
 - 2.2 Στεροειδικές ορμόνες στον καρκίνο του μαστού 35
 - 2.3 Πεπτιδικές Ορμόνες και αυξητικοί παράγοντες στον
καρκίνο του μαστού 41

•	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	
	3.1 Ογκοκατασταλτικά γονίδια στον καρκίνο του μαστού	48
	3.1.1 Ογκοκατασταλτικά γονίδια στην οικογενή νόσο	48
	3.1.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια στη σποραδική νόσο	54
	3.2 Απώλεια ετεροζυγωτίας στον καρκίνο του μαστού	59
•	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	
	4.1 Επιδημιολογία – Παράγοντες κινδύνου	62
	4.2 Παθολογική Ανατομική του καρκίνου του μαστού	65
	4.3 Σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού	67
	4.4 Τοπική υποτροπή	68
	 <i>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i>	
•	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	
	5.1 Σκοπός	70
	5.2 Υλικό από ασθενείς	71
	5.3 Υλικά και μέθοδος	75
	5.3.1 Εκχύλιση DNA	75
	5.3.2 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση	76
	5.3.3 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων	79
	5.3.4 Εκτίμηση απώλειας ετεροζυγωτίας (LOH)	82
	5.3.5 Ανάλυση LOH	83
	5.4 Αποτελέσματα	84
	5.5 Συζήτηση	95
	5.6 Συνοπτική περιγραφή συμπερασμάτων	102
•	ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ	103
•	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	109

Κατά την ολοκλήρωση της Διδακτορικής μου διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή Δημήτριο Σπαντίδο για τη πολύτιμη επιστημονική του συνεισφορά στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερως τον Καθηγητή Δημήτριο Τσιφτσή για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και μου δείχνει, καθώς και για τα πολύτιμα βήματα που μου δίδαξε στο δύσκολο δρόμο της Επιστήμης μου.

Ευχαριστώ επίσης το μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής Επ. Καθηγητή Οδυσσέα Ζώρα για τη βοήθεια του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συνεργάτες διδάκτορες Γεώργιο Σουρβίνο και Μαρία Τσοπανομίχαλου για την άφογη συνεργασία τους, καθώς και την Παθολογοανατόμο Καλλιόπη Στεφανάκη για την βοήθεια της στην επεξεργασία του υλικού.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, στον αδελφό μου, στον Κώστα Ζερβό, στον Σπύρο και την Ελση Ζερβού, στην Μίκα Ζερβού και στον Ανδρέα Καραχρήστο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τον συχνότερα εμφανιζόμενο καρκίνο στο γυναικείο πληθυσμό στις ανεπτυγμένες χώρες.

Η γενετική βάση του καρκίνου του μαστού έχει προκαλέσει το έντονο ενδιαφέρον των ερευνητών, ιδιαίτερα τη τελευταία δεκαετία. Έτσι, ενώ τα ογκογονίδια κατείχαν τη πρώτη θέση του ενδιαφέροντος, σήμερα τα ογκοκατασταλτικά γονίδια υπόσχονται να διδάξουν πολλά σε ότι αφορά τους μοριακούς μηχανισμούς της παθογένειας της νόσου. Η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται σήμερα για την εντόπιση περιοχών του γονιδιώματος με μεγάλη πιθανότητα ύπαρξης ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι η μελέτη της απώλειας της ετεροζυγωτίας (LOH), με τη χρήση δεικτών μικροδορυφορικού DNA.

Σκοπός της παρούσης μελέτης είναι η συσχέτιση της απώλειας ετεροζυγωτίας στο καρκίνο του μαστού με κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά. Απώτερος στόχος είναι η αξιολόγηση των παραπάνω σε μοριακό επίπεδο και ως εκ τούτου η πιθανή παρέμβαση τόσο σε επίπεδο πρόληψης όσο και σε επίπεδο θεραπείας.

Αναλυτικότερα, πενήντα ζεύγη δειγμάτων από ασθενείς με καρκίνο του μαστού (όγκος / περιφερικό αίμα) εξετάστηκαν καταρχήν για εμφάνιση απώλειας της ετεροζυγωτίας (LOH) σε διάφορες περιοχές του χρωμοσώματος 1, χρησιμοποιώντας 16 πολυμορφικούς δείκτες μικροδορυφορικού DNA. Στη συνέχεια εξετάστηκε το παραπάνω υλικό για ανίχνευση απώλειας της ετεροζυγωτίας στις χρωμοσωμικές θέσεις τις αντιστοιχούσες στα γονίδια του συστήματος επιδιόρθωσης κακοζευγαρωμένων βάσεων (mismatch repair genes) hMSH2, hMLH1 και hMSH3, χρησιμοποιώντας 10 πολυμορφικούς δείκτες. Τέλος έγινε συσχέτιση των παραπάνω αποτελεσμάτων με κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους όπως την ηλικία της

ασθενούς, το στάδιο της νόσου, το μέγεθος του όγκου, τη λεμφαδενική συμμετοχή, τον ιστολογικό τύπο, το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου και τέλος τη λεμφαγγειακή διήθηση.

Οι παρατηρούμενες συχνότητες LOH για κάθε πολυμορφικό δείκτη ξεχωριστά στο χρωμόσωμα 1, κυμαίνονται μεταξύ 5% και 20%. Καθώς μερικοί από τους δείκτες εντοπίζονται στην ίδια περιοχή του χρωμοσώματος, συσχετίστηκε το ποσοστό LOH στις περιοχές αυτές με κλινικο -παθολογοανατομικές παραμέτρους. Έτσι η περιοχή 1p36-36.2 εμφανίζει LOH σε ποσοστό 32% (16/50), η περιοχή 1p32 εμφανίζει LOH σε ποσοστό 22% (11/50), η περιοχή 1q21-23 εμφανίζει LOH σε ποσοστό 34% (17/50) και τέλος η περιοχή 1q42-43 εμφανίζει LOH σε ποσοστό 30% (15/50).

Από τη στατιστική ανάλυση φαίνεται πως η περιοχή 1q21-23 (LOH 34%) εμφανίζει θετική συσχέτιση με την ύπαρξη εκτεταμένου ενδοπορικού στοιχείου και λεμφαγγειακής διήθησης γύρω από τον όγκο ($p < 0,01$ και $p < 0,04$ αντίστοιχα).

Και τα δύο παραπάνω ιστολογικά χαρακτηριστικά αποτελούν σημαντικούς ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες τοπικής υποτροπής μετά από χειρουργική επέμβαση.

Τα ποσοστά LOH στις περιοχές τις αντιστοιχούσες στα γονίδια του συστήματος επιδιόρθωσης κακοζευγαρωμένων βάσεων κυμαίνονται από 8%-16% και δε παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση με κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent cancer in the female population and the involvement of chromosomal alterations is often implicated in the development of cancer. The aim of our study was to assess loss of heterozygosity (LOH) in relation to clinical and pathological parameters, such as age, stage of the disease, tumor size, tumor grade, lymph node involvement, extensive intraductal component (EIC) and peritumoral angiolymphatic invasion (PALI).

In detail, tumors, corresponding normal tissues and peripheral blood samples from 50 women with operable breast cancer, were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) at 16 polymorphic DNA markers, on both the long and short arm of chromosome 1. We also studied the involvement of DNA mismatch repair genes in sporadic breast cancer, matched normal and tumoral DNA samples of the same patients were analyzed for LOH with 10 microsatellites at or linked to hMSH2 (2p16), hMLH1 (3p21-23) and hMSH3 (5q11-q13).

There was a significant correlation between chromosomal region 1q21-23 (LOH 34%) and the presence of extensive intraductal component (EIC) and peritumoral angiolymphatic invasion (PALI) ($p < 0.01$, $p < 0.04$), both independent markers of local recurrence. The percentage of LOH 2p16, 3p21-23 and 5q11-13 regions was 12%, 16% and 8%. There was no statistical significant correlation with clinical and pathological parameters.

Allelic loss in region 1q21-23 may be a value prognostic biological marker for the detection of local relapse in breast cancer, in combination with other histological and clinical parameters.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τι ονομάζουμε Καρκίνο. Το μοντέλο του Nowell.

Τι ονομάζουμε καρκίνο; Ένα σημαντικό τμήμα της απάντησης στο παραπάνω ερώτημα, συνοψίζεται στο μοντέλο της κλωνικής (clonal) εξέλιξης της καρκινογένεσης που περιγράφεται από τον Peter Nowell το 1976 (Nowell PC, 1976). Με βάση το μοντέλο αυτό, ο καρκίνος αρχίζει όταν, μέσω συγκεκριμένης γενετικής μεταλλαγής, ένα μεμονωμένο κύτταρο αποκτά πλεονέκτημα ανάπτυξης σε σχέση με τα διπλανά του κύτταρα. Αυτό το κύτταρο τότε πολλαπλασιάζεται και δημιουργεί έναν ανώμαλο κλώνο. Η ανάπτυξη του όγκου εξασφαλίζεται με την επανάληψη αυτής της διαδικασίας, δημιουργώντας συνεχώς περισσότερο επιθετικούς υπο-κλώνους. Στη σύλληψη της, η θεωρία του Nowell αποτελείται από τρία βασικά στοιχεία: Ο καρκίνος είναι μια μικροεξελικτική διαδικασία, ο καρκίνος είναι κλωνικός και ο καρκίνος αποτελεί γενετική νόσο. Τα δύο τελευταία αποτέλεσαν οδηγό για την έρευνα τις τελευταίες δύο δεκαετίες, ενώ η θεωρία ότι ο καρκίνος αποτελεί εξελικτική διαδικασία παραγκωνίστηκε από την Επιστημονική Κοινότητα μέχρι προσφάτως που το ενδιαφέρον συγκεντρώθηκε στη γενετική αστάθεια (genetic instability).

Ερευνώντας τη φύση του Καρκίνου. Γενετική και φαινοτυπική ανάλυση.

Πολλές γενετικές μεταλλάξεις είναι ειδικές για συγκεκριμένο τύπο όγκων, αλλά είναι δυνατή η ταξινόμηση τους σε ομάδες, βοηθώντας έτσι στη κατανόηση των γενικών αρχών που διέπουν τη φύση του καρκίνου. Η παραπάνω προσέγγιση ονομάζεται «ανάστροφος γενετική» (reverse genetics). Αναγνωρίζεις τους «παίκτες», καταλαβαίνεις το ρόλο τους και προσδιορίζεις το λάθος. Μια άλλη προσέγγιση είναι να χρησιμοποιήσει κανείς

τη «κλασσική γενετική» (classical or forward genetics): Στην αρχή καθορίζεται ο φαινότυπος των καρκινικών κυττάρων, συμπαιρένοντας ποιες λειτουργίες δεν είναι φυσιολογικές και τελικά αναγνωρίζονται οι γενετικές μεταλλάξεις οι οποίες ευθύνονται. Στη πράξη χρησιμοποιείται συνδυασμός των δύο παραπάνω μεθόδων, καθώς συνήθως πολλαπλές μεταλλάξεις είναι παρούσες και είναι αδύνατο να αντιστοιχήσει κανείς μια συγκεκριμένη μετάλλαξη με το παρατηρούμενο φαινότυπο.

Οι πιο χαρακτηριστικές γενετικές ανωμαλίες των όγκων είναι οι εξής:

1. Τα καρκινικά κύτταρα διαφοροποιούνται πιο γρήγορα από τα φυσιολογικά, παραβλέποντας τους φυσιολογικούς μηχανισμούς ανάπτυξης. Αυτή ήταν πιθανότατα η πρώτη και θεμελιώδης φαινοτυπική ανωμαλία
2. Τα επίπεδα της απόπτωσης μειώνονται. Σε μερικούς όγκους, ο ρυθμός κυτταρικής διαφοροποίησης δεν βρέθηκε αυξημένος σε σχέση με αυτόν των φυσιολογικών κυττάρων. Έτσι τέθηκε η υπόθεση ότι θα πρέπει ο ρυθμός προγραμματισμένου θανάτου τους να είναι μειωμένος. Η ρύθμιση της απόπτωσης είναι πολύ δημοφιλής και αποτελεί μια από τις λειτουργίες των ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων.
3. Οι όγκοι είναι «αθανатоποιημένοι». Σημαντική είναι η λειτουργία της τελομεράσης σε αυτή τη διαδικασία, αν και αποτελεί ερωτηματικό το κατά πόσο η ενεργοποίηση της τελομεράσης παίζει σημαντικό ρόλο στη καρκινογένεση.
4. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να διηθούν και να μεθίστανται. Αυτό είναι λειτουργικά και το χαρακτηριστικό γνώρισμα της κακοήθειας και ένα από τα λιγότερο κατανοητά.

5. Η έναρξη της αγγειογένεσης, η οποία αποτελεί κύρια λειτουργία της νεοπλασίας. Είναι σήμερα κοινώς αποδεκτό ότι χωρίς την αγγειογένεση, οι όγκοι πολύ σύντομα θα εξαντλήσουν τις αιματικές «προμήθειες» και το πιθανότερο είναι ότι ποτέ δε θα γίνουν επικίνδυνοι για τη ζωή, δεδομένου ότι οι όγκοι χρειάζονται νέα αγγεία από μεγέθους 0.3cm. Η αγγειογένεση αποτελεί το νέο αστέρι που σύντομα μπορεί να επισκιάσει ακόμα και την απόπτωση.
6. Τα καρκινικά κύτταρα υποβάλλονται σε «από-διαφοροποίηση» (de-differentiation). Τα κύτταρα των όγκων συνήθως εμφανίζονται λιγότερο διαφοροποιημένα από τα φυσιολογικά ομολογά τους.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες η έρευνα για το καρκίνο κυριαρχείται από τη γενετική και την άποψη ότι ο καρκίνος είναι γενετική νόσος. Ο ενθουσιασμός για τη γενετική του καρκίνου έχει επισκιάσει τη κεντρική ιδέα του μοντέλου του Nowell, σύμφωνα με την οποία η καρκινογένεση αποτελεί μια εξελικτική διαδικασία. Η εξέλιξη είναι που οδηγεί τη καρκινογένεση και οι γενετικές αλλαγές αποτελούν μόνο ένα από τα συστατικά της εξέλιξης. Στην ουσία, η εξελικτική διαδικασία της καρκινογένεσης οδηγεί στη δημιουργία ενός νέου (παρασιτικού) οργανισμού. Ο καρκίνος μοιάζει με το έμβρυο, γιατί και οι δύο είναι οργανισμοί που αναπτύσσονται και καταφεύγουν στους ίδιους μηχανισμούς που επινοούνται από την εξέλιξη για να ξεπεράσουν παρόμοια προβλήματα. Η αγγειογένεση, για παράδειγμα, αποτελεί αντίδραση της εξέλιξης σε μειωμένη παροχή οξυγόνου και συστατικών διατροφής, και χρησιμοποιείται τόσο από το έμβρυο όσο και από το καρκίνο για να ξεπεράσουν αντίστοιχα προβλήματα. Για να μπορούν τα καρκινικά κύτταρα να διηθούν και να μεθίστανται, θα πρέπει να έχουν την ικανότητα να

μεταναστεύουν έξω από τον ιστό από τον οποίο έχουν προέλθει, να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος και να επιβιώσουν μέσα σε αυτήν και τέλος να εγκατασταθούν σε άλλα όργανα. Τα παραπάνω θυμίζουν τις αρχές της διαδικασίας της ανάπτυξης (Rubin H, 1985). Στη πραγματικότητα, η διήθηση και η μετάσταση συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ανάπτυξης του εμβρύου, αλλά σε αυτή τη περίπτωση δεν αναφέρονται με αυτή την ορολογία. Εάν θεωρήσουμε λοιπόν το καρκίνο σαν ένα οργανισμό που εξελίσσεται, είναι φυσικό να περιμένουμε να αποτελείται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Κάτω από αυτό το πρίσμα, η θεωρία του Judah Folkam ότι οι όγκοι είναι σύνθετοι ιστοί που αποτελούνται τόσο από φυσιολογικά όσο και από νεοπλασματικά μέρη, αποτελεί ίσως μία από τις σημαντικότερες προόδους στην έρευνα του καρκίνου. Παρόλ' αυτά δεν πρέπει να αγνοήσουμε καμία από τις θεωρίες που, κατά καιρούς, έχουν αναπτυχθεί. Μερικοί καρκίνοι μπορεί να αρχίζουν από κύτταρα με φυσιολογικό γονιδίωμα, όπως π.χ σε συγκεκριμένα σύνδρομα πολυποδίασης, στα οποία οι πρόδρομες επιθηλιακές καρκινικές εστίες προέρχονται από γενετικές μεταλλάξεις σε στρωματικά κύτταρα. Άλλοι καρκίνοι μπορεί να είναι κλωνικοί αλλά να αποτελούνται από διαφορετικούς τύπους νεοπλασματικών κυττάρων, που όλα μαζί συνεργάζονται για τη βελτίωση της τελικής «εικόνας» του οργανισμού –όγκου. Σε άλλες περιπτώσεις, τα νεοπλασματικά κύτταρα από τα οποία αποτελείται ο όγκος προέρχονται από διαφορετικούς κλώνους με διαφορετικά γονιδιώματα. Με βάση τα παραπάνω το μοντέλο του Nowell αλλάζει σημαντικά: Οι νεοπλασματικοί οργανισμοί αποτελούν το αποτέλεσμα μιας εξελικτικής διαδικασίας, που επαναπροσανατολίζει προγράμματα

ανάπτυξης, τα οποία όμως δεν είναι απαραίτητα να είναι κλωνικά (Costa LF, 2001).

Πριν μερικές δεκαετίες, μελέτες έδειξαν ότι η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό προϋποθέτει τουλάχιστον έξι μεταλλάξεις (Armitage and Doll, 1954). Λαμβάνοντας υπόψη τον ρυθμό μετάλλαξης (10^{-6} / γονίδιο / κύτταρο), η πιθανότητα καρκινικής μετάλλαξης καθενός από τα 10^{14} κύτταρα του οργανισμού είναι $1:10^{22}$. Η παραπάνω διεργασία γίνεται πιο πιθανή με το συνδυασμό δύο παραγόντων:

- A) Μερικές μεταλλάξεις ενισχύουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό δημιουργώντας έναν κυτταρικό πληθυσμό-στόχο για την επόμενη μετάλλαξη.
- B) Κάποιες μεταλλάξεις επηρεάζουν τη σταθερότητα ολόκληρου του γενώματος, αυξάνοντας έτσι το συνολικό ρυθμό μεταλλάξεων.

Σε πρόσφατες έρευνες αναγνωρίζονται τρεις κατηγορίες γονιδίων τα οποία μεταλλάσσονται στο καρκίνο:

Ογκογονίδια

Ογκοκατασταλτικά γονίδια και

Μεταλλακτικά γονίδια

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.

1.1 Ογκογονίδια

Καλούνται τα γονίδια που συνεισφέρουν στη κακοήθη εξαλλαγή του κυττάρου. Η ανακάλυψη τους γίνεται το 1911 όταν αναγνωρίστηκε ο ιός που προκαλεί το σάρκωμα Rous (vsre). Η ανακάλυψη ότι ρετροϊοί μεταφέρουν στο γένωμα τους γονίδια που προάγουν καρκίνο οδήγησε σε μια ραγδαία εξέλιξη στο τομέα αυτό. Αργότερα μελέτες έδειξαν ότι ογκογονίδια των ιών μπορεί να είναι μεταλλαγμένα αλληλόμορφα φυσιολογικών κυτταρικών γονιδίων, τα πρωτο-ογκογονίδια. Τα πρωτο-ογκογονίδια είναι "ανενεργές" μορφές φυσιολογικών γονιδίων, τα οποία συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, διαίρεση και διαφοροποίηση. Τα πρωτο-ογκογονίδια μπορούν να γίνουν ογκογονίδια με εισαγωγή ενός ογκογόνου ρετροϊού στο γενετικό υλικό ή συχνότερα με μετάλλαξη τους στο φυσικό τους χώρο που είναι το κυτταρικό DNA. Τα κυτταρικά ογκογονίδια ταυτοποιήθηκαν με πειραματική έρευνα για πρώτη φορά μεταφέροντας DNA από κυτταρικούς κλώνους προερχόμενους από όγκους από τους Σπαντίδο και Siminovitch (Spandidos 1997,1998). Τα ογκογονίδια λοιπόν αποτελούν μεταλλαγμένες εκδοχές γονιδίων που ελέγχουν πλήθος κυτταρικών λειτουργιών οι οποίες φαίνεται ότι είναι αυτές που διαταράσσονται στο καρκίνο. Οι λειτουργίες αυτές κατατάσσονται σε πέντε μεγάλες κατηγορίες:

- Εκκρινόμενοι αυξητικοί παράγοντες (PDGFB) (Doolittle at al, 1983).
- Υποδοχείς κυτταρικής μεμβράνης (ERBB, FMS).
- Στοιχεία ενδοκυττάρων συστημάτων μεταβίβασης σημάτων (RAS).
- Πυρηνικές πρωτείνες σύνδεσης DNA (MYC, JUN).

Πίνακας 1: Αντιπροσωπευτικά πρωτο-ογκογονίδια και συμμετοχή τους σε όγκους (Bishop 1991)

Πρωτο-Ογκογονίδιο	Νεοπλασμα(τα)	Γενετική αλλοίωση
Abl	Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (CML)	Μετατόπιση
erbβ-1	Καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων, αστροκύτωμα	γονιδιακή επέκταση
erbβ-2 (NEU)	ΑδenoCa Μαστού, ωθηκών και στομάχου	γονιδιακή επέκταση
gip	Καρκίνωμα ωθηκών και ενδοκρινών αδένων	σημειακές μεταλλαγές
gsp	Αδένωμα της υπόφυσης, καρκίνωμα θυρεοειδούς	σημειακές μεταλλαγές
myc	Λέμφωμα του Burkitt, καρκίνωμα πνευμονα, μαστού και τραχήλου	Μετατόπιση, γονιδιακή επέκταση
L-myc	Καρκίνωμα του πνευμονα	γονιδιακή επέκταση
N-myc	Νευροβλάστωμα, Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνευμονα	γονιδιακή επέκταση
H-ras	Καρκίνωμα ουροποιογεννητικού, θυρεοειδους και Μελάνωμα	σημειακές μεταλλαγές
K-ras	Καρκίνωμα Παχέος Εντέρου, πνευμονα παγκρέατος, μελάνωμα	σημειακές μεταλλαγές
N-ras	Οξεία μυελογενής και λεμφοβλαστική λευχαιμία. Ca θυρεοειδούς, μελάνωμα	σημειακές μεταλλαγές
ret	Καρκίνωμα θυρεοειδούς	ανασυνδυασμός
ros	αστροκύτωμα	?
K-sam	Καρκίνωμα στομάχου	γονιδιακή επέκταση
sis	αστροκύτωμα	?
srs	Καρκίνωμα παχέος Εντέρου	?
trk	Καρκίνωμα θυρεοειδούς	ανασυνδυασμός

- Συστατικά του δικτύου κυκλινών, κυκλινοεξαρτώμενων κινασών και αναστολέων των κινασών (CDK complexes), που αποτελούν το "εσωτερικό ρολόι" της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου (Kamb 1995; Muller 1995; Hartwell 1994).

Η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων μπορεί να συμβεί:

1. Με είσοδο σημειακών μεταλλάξεων (Tabin C et al, 1982).
2. Με παρεμβολή αλληλουχιών ρετροϊών στο γονίδιο χωρίς αλλαγή της αλληλουχίας του κώδικα (c-myc, c-erb, c-mos, c-H-ras etc).
3. Με μετατόπιση γενετικού υλικού σε άλλη χρωμοσωμική θέση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το χρωμόσωμα φιλαδέλφεια στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία (Rabbitts TH, 1994).
4. Με ενίσχυση. Κατά τη διαδικασία αυτή δημιουργούνται πολλά αντίγραφα του γονιδίου. Ενίοτε υποδηλώνει κακή πρόγνωση, όπως την ενίσχυση του c-myc στο καρκίνο του πνεύμονα και στο νευροβλάστωμα.

(ΠΙΝΑΚΑΣ 1)

1.1.1 Συνεργασία μεταξύ γονιδίων

Τα παράγωγα των πρωτο-ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων λειτουργούν παράλληλα. Η ενεργοποίηση ογκογονιδίων και η απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι απαραίτητες για τη δημιουργία ενός πλήρους νεοπλαστικού φαινοτύπου. Πολλά γεγονότα πρέπει να συμβούν για να ανασταλεί η φυσιολογική διαφοροποίηση και να οδηγηθεί το κύτταρο σε ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση.

Ογκογονίδια και κυτταρικός κύκλος:

Για να ολοκληρωθεί ο κυτταρικός κύκλος, είναι απαραίτητα πολλά σημεία ελέγχου, τα οποία, όπως είναι σήμερα γνωστό, αποτελούν στόχους των

ογκογονιδίων. Ο ευκαρυωτικός κυτταρικός κύκλος, πιστεύεται ότι ρυθμίζεται από δύο κύρια σημεία – ελέγχου: Το πρώτο βρίσκεται στη φάση G1, στη σύνθεση του DNA, και το δεύτερο μεταξύ της φάσης G2 και M (Murray AW, 1992).

Ιn vivo, πολλά κύτταρα βρίσκονται σε φάση ηρεμίας (G0). Ανασταλτικά σήματα ανάπτυξης προέρχονται από παράγοντες όπως τον TGFβ, ενώ σήματα που ευοδώνουν τον πολλαπλασιασμό προέρχονται από αυξητικούς παράγοντες. Η ισορροπία μεταξύ ανασταλτικών και διεγερτικών σημάτων είναι αυτή που οδηγεί το κύτταρο στη φάση G1 και την έναρξη της κυτταρικής διαίρεσης. Προς το τέλος της φάσης G1, υπάρχει ένα σημείο ελέγχου (σημείο περιορισμού), στο οποίο το κύτταρο αποφασίζει εάν τα σήματα που δέχτηκε είναι ικανά να το οδηγήσουν στη φάση S. Η μετάβαση μέσω του σημείου περιορισμού στο τέλος της φάσης G1, αποτελεί ένα καίριο σημείο κατά το οποίο το κύτταρο αποφασίζει εάν θα συνεχίσει τον πολλαπλασιασμό του ή θα ξεφύγει από τον κυτταρικό κύκλο. Είναι λοιπόν εμφανές ότι η απορρύθμιση αυτής της μετάβασης είναι σημαντική για τη νεοπλασματική ανάπτυξη. Τα καρκινικά κύτταρα διαφεύγουν της αναστολής της ανάπτυξης με πολλούς τρόπους. Ένας μηχανισμός περιλαμβάνει την ενεργοποίηση γονιδίων που προωθούν την ανάπτυξη, όπως αυξητικοί παράγοντες, υποδοχείς, γονίδια *ras* ή πυρηνικές ογκοπρωτεΐνες που επιτρέπουν στο κύτταρο να προαχθεί. Ένας δεύτερος μηχανισμός είναι αυτός της απώλειας των υποδοχέων για τα γονίδια τα ανασταλτικά της ανάπτυξης, όπως του TGFβ (Kimchi A, 1987). Η είσοδος στη φάση S εξαρτάται από το σύστημα κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cdks). Οι G1 κυκλίνες (τύπου D και E) ρυθμίζουν τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S ενώ οι μιτωτικές κυκλίνες (τύπου A και B) ρυθμίζουν τη μετάβαση από

τη φάση G2 στη φάση M. Η μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S ρυθμίζεται από τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου RB από τις κυκλino – D και E- εξαρτώμενες κινάσες. Το φωσφορυλιωμένο RB είναι ανίκανο να δημιουργήσει συμπλέγματα με τους τύπου E2F μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι έτσι είναι ελεύθεροι να προάγουν τη μεταγραφή ειδικών γονιδίων για την φάση S (Nevis JR, 1992).

Η παραπάνω διαδικασία ελέγχου είναι δυνατό να χαθεί με πολλούς μηχανισμούς. Ενας από αυτούς περιλαμβάνει την υπερέκφραση της κυκλίνης D. Άλλοι είναι, η απώλεια της λειτουργίας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου RB, έτσι ώστε δεν αλληλεπιδρά με τους E2F και η απώλεια λειτουργίας του αναστολέα της κυκλίνης D (p16 INK) (Hussussian CJ, 1994). Έτσι, η λειτουργική απενεργοποίηση του RB, που συμβαίνει μέσω της απορρυθμισμένης έκφρασης της κυκλίνης D1, της απενεργοποίησης του αναστολέα της κυκλίνης D1 ή τέλος μέσω μετάλλαξης του RB γονιδίου, οδηγεί σε απώλεια του σημείου- ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και θεωρείται απαραίτητο βήμα για τη διαδικασία της ογκογένεσης.

Το παράγωγο του c-mos, μια κινάση σερίνης- θρεονίνης, επίσης συμμετέχει στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Ενεργοποιεί τις κινάσες σερίνης της οικογένειας MAP κινασών και εμπλέκεται στην επανοργάνωση των μικροσωληνίσκων που οδηγεί στη δημιουργία της μειωτικής ατράκτου κατά τη διάρκεια της μείωσης στα ωοκύτταρα (Zhou R, 1991).

1.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια (OKΓ).

Σημαντικά στοιχεία για την ύπαρξη των OKΓ προήρθαν από πειράματα υβριδισμού σωματικών κυττάρων που έδειξαν ότι η σύντειξη καρκινικών κυττάρων με φυσιολογικά κύτταρα είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μη

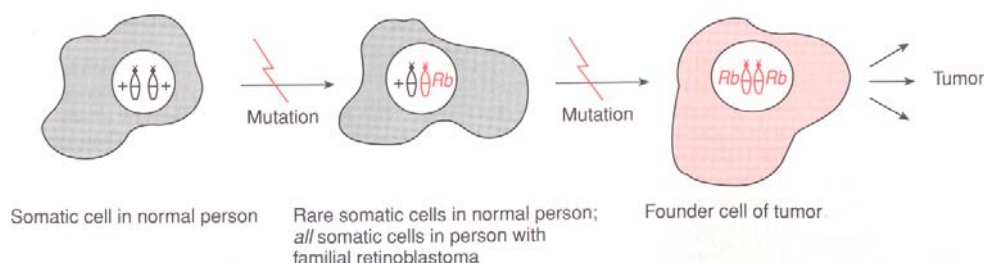
νεοπλασματικών υβριδίων (Sager et al 1985). Τα παραπάνω πειράματα έδειξαν ότι τα φυσιολογικά κύτταρα διαθέτουν γενετική πληροφορία ικανή να καταστείλει το νεοπλασματικό φαινότυπο των αντιστοίχων τους καρκινικών, τα οποία έχασαν τη δικιά τους κατά τη διαδικασία μετάπτωσης από φυσιολογικά σε καρκινικά.

Τα υβριδικά κύτταρα έχουν ασταθή καρυότυπο και συχνά αποβάλλουν χρωμοσώματα που προέρχονται από τον ένα ή τον άλλο γονέα. Όταν τα χρωμοσώματα από τον υγιή γονέα χάνονται, τα υβριδικά κύτταρα γυρνάνε σε νεοπλασματική κατάσταση. Η συσχέτιση αυτής της αναστροφής σε νεοπλασία με την απώλεια φυσιολογικών χρωμοσωμάτων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι αυτά τα χρωμοσώματα έχουν γονίδια που λείπουν από το γένωμα των καρκινικών κυττάρων, τα οποία θα μπορούσαν να αναστείλουν τη προγραμματισμένη ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (Stanbridge 1990).

Εν περιλήψει τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα κύτταρα, κατά τη μετάπτωση τους σε κακοήθη χάνουν σημαντικές πληροφορίες της ρύθμισης της ανάπτυξης τους.

Η πρώτη όμως ένδειξη της ύπαρξης των ΟΚΓ προέρχεται από τον Knudson, είκοσι χρόνια πριν, ο οποίος διαπίστωσε ότι δύο επιτυχημένες μεταλλάξεις (χτυπήματα) χρειάζονται για τη μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε νεοπλασματικό (Σχήμα 1). Μελετώντας την οικογενή μορφή (40%) ενός σπάνιου παιδικού όγκου του αμφιβληστροειδή, του ρετινοβλαστώματος, διαπίστωσε ότι η πρώτη μετάλλαξη προέρχεται από ένα γενετικά επηρεασμένο γονέα ή δημιουργείται κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης, ενώ η δεύτερη μετάλλαξη αποτελεί πλέον σωματικό γεγονός (Knudson, 1971). Η σημασία της υπόθεσης Knudson είναι διπλή. Πρώτον,

υποδεικνύει τους μηχανισμούς μέσα από τους οποίους κληρονομικές και σωματικές αλλαγές μπορούν να συνεργασθούν και να οδηγήσουν σε καρκίνο. Δεύτερον, συνέδεσε την απώλεια της λειτουργικότητας γονιδίων με υπολειπόμενη έκφραση με την ογκογενετική διαδικασία.



Σχήμα 1: Υπόθεση δύο κτυπημάτων του Knudson

Σειρά γενετικών αναλύσεων το 1983 οδήγησαν στη διαπίστωση ότι οι δύο γενετικοί στόχοι του Knudson από τα δύο αντίγραφα του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος (RB) το οποίο εντοπίζεται στη περιοχή 13q14 και ότι οι δύο μεταλλάξεις οδηγούν στην απενεργοποίηση των δύο λειτουργικών αλληλόμορφων του γονιδίου (Cavenee, 1983).

1.2.1 Κυτταρογενετικές μελέτες εντοπισμού ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Μεταξύ των μελετών για τον εντοπισμό ΟΚΣ γονιδίων είναι κυτταρογενετικές μελέτες που αναγνωρίζουν κατασκευαστικές χρωμοσωμικές μεταβολές σε ασθενείς με καρκίνο. Η μέθοδος της συνδυασμένης ανάλυσης του DNA και οι μελέτες απώλειας της ετεροζυγωτίας. Και οι δύο παραπάνω προσεγγίσεις χρειάζονται στρατηγικές γονιδιακού εντοπισμού για να αναγνωρίσουν και να απομονώσουν ΟΚΣ γονίδια από τη χρωμοσωμική περιοχή.

Πίνακας 2: Ογκο-κατασταλτικά γονίδια και υπομήτρια ογκο-κατασταλτικά γονίδια

Κληρονομικό Σύνδρομο	Γονίδια	Συχνότερος Καρκίνος
Ρετινοβλάστωμα	RB1	Ρετινοβλάστωμα, Οστεοσάρκωμα
Li-Fraumeni	p53	Σαρκώματα, όγκοι μαστού, εγκεφάλου
Ογκος Wilms	WT-1	Νεφροβλάστωμα
Νευρονομία τύπου 1	NF-1	Νευρινώματα, σαρκώματα, γλοιώματα
Νευρονομία τύπου 2	NF-2	Σβανώματα, Μηνιγγιώματα
von Hippel Lindau	VHL	Όγκοι νεφρού. Φαιοχρωμοκύττωμα. Αιμαγγειώματα
Κληρονομικό Μελάνωμα	p36	Μελάνωμα, Όγκοι Παγκρέατος
Κληρονομικός Καρκίνος Μαστού	BRCA1	Καρκίνος μαστού, ωθηκών
	BRCA2	Καρκίνος μαστού
Tuberous sclerosis	TSC2	Όγκοι Νεφρού, Εγκεφάλου
MEN-1	MEN-1	Όγκοι παραθυρεοειδών, υπόφυσης, καρκινοειδή, λιπώματα
Πιθανά Ογκοκατασταλτικά Γονίδια		
	DPC4	Όγκοι παγκρέατος και άλλοι
	E-καθεδρίνη	Όγκοι στομάχου, ενδομητρίου, ωθηκών και άλλοι
	α-κατενίνη	Όγκοι προστάτου, πνευμονα
	DCC	Καρκίνος Παχέος Εντέρου. Όγκοι εγκεφάλου, νευροβλάστωμα
	TCF-βIIIR	Καρκίνος Παχέος Εντέρου
Σύνδρομο Gorlin	(περιοχή 9q22-31)	Μη μελανωπικός καρκίνος του δέρματος, μελοβλαστώματα
Σύνδρομο Cowden	PTEN	Πολλαπλά αμαρτώματα, καρκίνος μαστού, καρκίνος θυρεοειδούς

1. Συνδυασμένη ανάλυση

Παρόλο που επαναλαμβανόμενες σταθερές αλλαγές συγκεκριμένων χρωμοσωμικών περιοχών σε ασθενείς με συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, αποτελούν ισχυρή απόδειξη της ύπαρξης ογκογονιδίου στη περιοχή, εν τούτοις πολλά περισσότερα στοιχεία χρειάζονται για τη τεκμηρίωση ότι το συγκεκριμένο γονίδιο είναι ογκοκατασταλτικό. Επιπλέον, η αναγνώριση ενός συγκεκριμένου ασθενή με σταθερή απώλεια μιας συγκεκριμένης χρωμοσωμικής περιοχής δεν αποτελεί απόδειξη ότι εκεί βρίσκεται ένα γονίδιο που ακολουθεί τους Μεντελιανούς κανόνες κληρονομικότητας και προδιαθέτει σε καρκίνο. Σε αυτές τις περιπτώσεις, συνδυασμένη ανάλυση πρέπει να χρησιμοποιηθεί για να αποδειχτεί ότι γενετικοί δείκτες από την συγκεκριμένη χρωμοσωμική περιοχή συνυπάρχουν με τη κληρονομικότητα του φαινοτύπου της νόσου σ' ένα μεγάλο αριθμό οικογενειών με συγκεκριμένα κληρονομούμενα σύνδρομα.

Για τον ακριβή εντοπισμό και αναγνώριση ενός ΟΚΣ γονιδίου χρειάζεται, εκτός από τη συνδυασμένη ανάλυση, στρατηγικές γονιδιακού εντοπισμού και λεπτομερείς αναλύσεις μεταλλάξεων. Σε πολλά καρκινικά σύνδρομα, όπως η οικογενής πολυποδίαση, το σύνδρομο von Hippel-Lindau και η νευροινωμάτωση τύπου 2, η ακριβής εντόπιση του ΟΚΣ γονιδίου βοηθήθηκε από το γεγονός ότι πολλοί ασθενείς εμφάνιζαν διάμεσες χρωμοσωμικές απαλείψεις, οι οποίες αν και μη εντοπιζόμενες από τις συνήθεις κυτταρογενετικές αναλύσεις, αναγνωρίζονταν με τεχνικές όπως η ηλεκτροφόρηση πηκτώματος. (Trafatter J et al 1993, Latif F et al 1993).

2. Μελέτες απώλειας της ετεροζυγωτίας (Loss of heterozygosity-LOH).

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος ανακάλυψης των ΟΚΓ αποτελεί η μελέτη της απώλειας της ετεροζυγωτίας (LOH). Συνήθως η πρώτη (κληρονομούμενη) μετάλλαξη είναι μία σημειακή μετάλλαξη ή μία άλλη μικρή αλλαγή που περιορίζεται στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Μεγάλες απαλείψεις θα ήταν καταστροφικές εάν μεταφέρονταν σε κάθε κύτταρο του σώματος. Συχνά όμως η δεύτερη, σε οικογενή ή σποραδική μορφή, περιλαμβάνει απώλεια τμήματος ή και ολόκληρου του χρωμοσώματος. Ο μηχανισμός μπορεί να είναι μη σύζευξη (που οδηγεί σε απώλεια όλου του χρωμοσώματος), μειωτικός ανασυνδυασμός (που οδηγεί σε απώλεια των τμημάτων του χρωμοσώματος περιφερικά της χιασματυπίας) ή μία νέα διάμεση απάλειψη. Σε κάθε μία από τις παραπάνω περιπτώσεις, το ένα αλληλόμορφο χάνει επίσης γενετικούς επίτοπους οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες κοντά στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Έτσι εάν ο ασθενής ήταν ετερόζυγος για τον συγκεκριμένο δείκτη, ο καρκινικός ιστός χάνει την ετεροζυγωτία του και γίνεται ομόζυγος ή ημίζυγος. Ομόζυγη διαγραφή των δεικτών (απώλεια και των δύο αλληλόμορφων) είναι σπάνια, ακόμα και στα καρκινικά κύτταρα.

Η απώλεια της ετεροζυγωτίας αποτελεί το κλειδί της ύπαρξης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Εξετάζοντας ζεύγη αίματος και δείγμα όγκου χρησιμοποιώντας δείκτες σε όλο το μήκος του γενώματος, μπορούμε να ανακαλύψουμε υποψήφιες περιοχές ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Μερικές από αυτές είναι ειδικές για συγκεκριμένους καρκίνους (LOH στη περιοχή 5q21 κοντά στο APC γονίδιο στον καρκίνο του παχέος εντέρου), ενώ άλλες είναι κοινές για πολλούς διαφορετικούς καρκίνους (LOH στο 17p κοντά στο TP53 γονίδιο). Βέβαια, εάν το DNA του αίματος είναι ομόζυγο για έναν συγκεκριμένο δείκτη, αυτός ο δείκτης δε δίνει καμία πληροφορία για την

απώλεια αλληλόμορφου στον όγκο. Χρησιμοποιώντας υψηλά πολυμορφικούς δείκτες ελαχιστοποιούμε την ύπαρξη τέτοιων μη ενημερωτικών δειγμάτων.

Οι κοινές LOH μελέτες εξετάζουν μεγάλες σειρές δεικτών και αναλύουν τις πληροφορίες, μετρώντας την ένταση της δέσμης. Τα περισσότερα δείγματα νεοπλασματικού όγκου αποτελούνται από ένα μείγμα νεοπλασματικού και φυσιολογικού ιστού, έτσι ώστε αυτό που τελικά φαίνεται είναι μείωση της έντασης και όχι πλήρης απώλεια της δέσμης του ενός αλληλόμορφου.

Οι παραπάνω δύο συμπληρωματικές προσεγγίσεις υποδηλώνουν την ύπαρξη εξαιρετικά μεγάλου αριθμού ογκοκατασταλτικών γονιδίων, τα περισσότερα από τα οποία δεν έχουν αναγνωρισθεί ακόμα.

1.2.2 Η λειτουργία των Ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Παρόλο που οι κυτταρικές λειτουργίες πολλών ΟΚΣ γονιδίων, όπως του p105-RB, p53, και p16 είναι ήδη γνωστές, πολλές παραμένουν απροσδιόριστες. Είναι πλέον φανερό ότι οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες συμμετέχουν σε πολλές λειτουργίες και σε διαφορετικές περιοχές του κυττάρου. Μερικές από αυτές φαίνεται ότι ανταγωνίζονται άμεσα ή έμμεσα τη λειτουργία των πρώτο-ογκογονιδίων στη ρύθμιση της ανάπτυξης. Για τη κατανόηση της σημασίας τους θα περιγραφούν εδώ δύο από τα πιο σημαντικά ΟΚΣ γονίδια, το RB και το TP53. Τα παράγωγα των δύο αυτών γονιδίων παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Ταυτόχρονη απενεργοποίηση και των δύο παραγώγων παρατηρείται συχνά στα καρκινικά κύτταρα και οι λειτουργίες τους συχνά αλληλοκαλύπτονται.

Λειτουργία της πρωτεΐνης του γονιδίου RB1.

Το γονίδιο RB εκφράζεται κωδικοποιώντας μία 110-kDa πυρηνική πρωτεΐνη (pRb), η οποία φαίνεται να παίζει ρόλο-κλειδί στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ένα μέρος του ρόλου της είναι να συνδέεται και να απενεργοποιεί μία ομάδα από παράγοντες μεταγραφής που ονομάζονται E2F, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Στα φυσιολογικά κύτταρα η pRb απενεργοποιείται με φωσφορυλίωση και ενεργοποιείται με αποφωσφορυλίωση. Δύο έως τέσσερις ώρες πριν το κύτταρα μπει στη φάση S του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η pRb φωσφορυλιώνεται. Η φωσφορυλίωση της pRb αποδεσμεύει την απενεργοποίηση της E2F και επιτρέπει στο κύτταρο να περάσει στη φάση S. Η φωσφορυλίωση ελέγχεται από σειρές κυκλικών, κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών και αναστολέων κυκλικών-κινασών (Kamb 1995, Weinberg 1995).

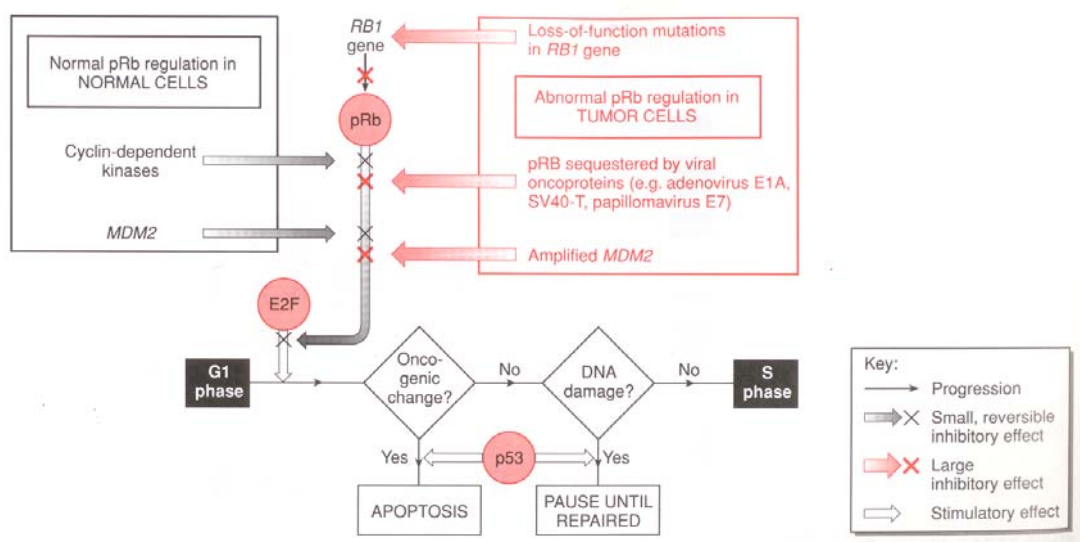
Το παράγωγο του MDM2 ογκογονιδίου (το οποίο ενισχύεται σε πολλά σαρκώματα), επίσης συνδέεται και αναστέλλει την pRb, ευνοώντας έτσι την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Πολλές ιικές ογκοπρωτεΐνες (αδενιοός E1A, T-αντιγόνοSV40, πρωτεΐνη ανθρώπινου θηλωματο-ιού E7) απομονώνουν το pRb ή μπορεί να απενεργοποιείται άμεσα λόγω μεταλλάξεων στο RB1. Δεν είναι ξεκάθαρο γιατί διάμεσες μεταλλάξεις ενός γονιδίου τόσο απαραίτητου στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου οδηγούν ειδικά σε ορισμένα είδη καρκίνων, όπως το ρετινοβλάστωμα και κάποιους μεσεγχυματικούς όγκους όπως τα οστεοσαρκώματα. Γεγονός είναι πάντως ότι αυτό το συναντάμε συχνά στη μοριακή παθολογία: μετάλλαξη ενός γονιδίου προκαλεί ένα φαινοτυπικό αποτέλεσμα σε ορισμένο αριθμό κυττάρων στα οποία το γονίδιο εκφράζεται και λειτουργεί.

P53 και απόπτωση.

Το p53 περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1979 σαν μια πρωτεΐνη που μπορεί να συνδέεται με το μεγάλο T-αντιγόνο που είναι υπεύθυνο για το μετασχηματισμό φυσιολογικών κυττάρων από τον ιό SV40. Αργότερα το γονίδιο TP53 το οποίο κωδικοποιεί το p53 εμφανίστηκε σαν κυρίαρχο γονίδιο μετασχηματισμού των 3T3 κυττάρων και έτσι ταξινομήθηκε ως ογκογονίδιο. Σύντομα ανακαλύφθηκε ότι ενώ για κάποια καρκινικά κύτταρα το p53 προωθούσε την ογκογένεση, για τα φυσιολογικά κύτταρα λειτουργούσε ως αναστολέας αυτής. Μελέτες απώλειας της ετεροζυγωτίας επιβεβαίωσαν ότι το TP53 ήταν OKΣ γονίδιο. Το TP53 βρίσκεται στη περιοχή 17p12 και αυτή αποτελεί τη συνηθέστερη περιοχή LOH σε μεγάλο αριθμό νεοπλασιών. Ογκοί που δεν έχουν χάσει το TP53, συχνά εμφανίζουν μεταλλαγμένες μορφές του. Για να ολοκληρωθεί η εικόνα του TP53 ως OKΣ γονιδίου, μεταλλάξεις του TP53 έχουν βρεθεί σε οικογένειες με το, κληρονομούμενο με επικρατή χαρακτήρα, σύνδρομο Li-Fraumeni (Malkin 1994). Τα νοσούντα μέλη της οικογένειας εμφανίζουν πολλούς πρωτογενείς όγκους όπως σαρκώματα μαλακών μορίων, όγκους του μαστού, του εγκεφάλου, των επινεφριδίων και λευχαιμία.

Απώλεια ή μετάλλαξη του TP53 είναι η συνηθέστερη γενετική αλλαγή στο καρκίνο. Εκτός από τη πλήρως αναγνωρίσιμη βιοχημική λειτουργία του p53 ως μεταγραφικού παράγοντα, το p53 φαίνεται πως έχει έναν ευρύτερο ρόλο μέσα στο κύτταρο, γι'αυτό και αναφέρεται σαν «φύλακας του γενώματος». Μία από τις σημαντικότερες λειτουργίες του είναι να εμποδίζει τα κύτταρα να ανανεώνουν το DNA που έχει υποστεί βλάβη (Σχήμα 2). Το p53 συμμετέχει σε ένα σημείο- ελέγχου στη φάση G1/S και στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου. Τα φυσιολογικά κύτταρα με καταστρεφόμενο DNA

«ξεκουράζονται» σ' αυτό το σημείο, μέχρι να αποκατασταθεί η ζημιά, ενώ τα κύτταρα που δεν έχουν το p53 ή έχουν μια μεταλλαγμένη μορφή του δεν «ξεκουράζονται» στη G1. Η ανανέωση του κατεστραμένου DNA εν τέλει οδηγεί σε μια σειρά γενετικών αλλαγών, μερικές από τις οποίες είναι ογκογενετικές. Συσχέτιση με τα παραπάνω αποτελεί ο ρόλος του p53 στον κυτταρικό θάνατο. Ανταποκρινόμενα σε καρκινικά ερεθίσματα, τα κύτταρα μέσω του p53 οδηγούνται σε απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος). Αυτό αποτελεί το σημαντικότερο επίπεδο ελέγχου το οποίο προστατεύει τον οργανισμό ενάντια στις επιδράσεις της φυσικής επιλογής μεταξύ των κυττάρων του. Ο μηχανισμός της απόπτωσης έχει παίξει βασικό ρόλο στη κατανόηση της ογκογενετικής διαδικασίας (Fisher 1994). Μία κοινή οδό προς τη καρκινογένεση αποτελεί η απώλεια αυτού του συστήματος ελέγχου και τα κύτταρα που δεν έχουν το p53 παραμένουν βιώσιμα παρά την ύπαρξη γενετικών βλαβών. Το p53 μπορεί να απενεργοποιηθεί από απάλειψη, μετάλλαξη, ή από την δράση κάποιου αναστολέα, όπως του παράγωγου του γονιδίου *mdm2* ή της E6 πρωτεΐνης του ιού του θηλώματος.



Σχήμα 2: Μέρος του μηχανισμού ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

1.2.3 Υποψήφια ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Σε όλα τα ΟΚΣ γονίδια τα οποία αναφέρθηκαν, μεταλλαγμένα αλληλόμορφα του γονιδίου είναι παρόντα σε άτομα με κληρονομική προδιάθεση στο καρκίνο. Αυτό το δεδομένο αποτελεί ισχυρή απόδειξη της σημασίας των γονιδίων στη καρκινογένεση. Το γεγονός, επίσης της απώλειας της ετεροζυγωτίας (LOH) του ενός αλληλόμορφου του ΟΚΣ γονιδίου και της σωματικής μετάλλαξης του απομείνοντος σε σποραδικές μορφές καρκίνου, ενισχύει ακόμα περισσότερο το ρόλο των γονιδίων αυτών.

Φαίνεται λογικό να πιστεύει κανείς ότι γενετικές μεταλλάξεις σε ΟΚΣ γονίδια είναι δυνατό να δώσουν γένεση σε αινιγματικά καρκινικά σύνδρομα ή μπορεί ακόμα και να αποτύχουν εντελώς να οδηγήσουν σε καρκινική προδιάθεση. Αυτά τα γονίδια μπορεί συχνά να αποτελούν στόχο για σωματικές μεταλλάξεις. Ένας τρόπος να ανακαλύψουμε ΟΚΣ γονίδια με τέτοιες ιδιότητες είναι να αναγνωρίσουμε χρωμοσωμικές περιοχές, στις οποίες απώλεια της ετεροζυγωτίας παρατηρείται με μεγάλη συχνότητα σε σποραδικούς καρκίνους διαφόρων τύπων. Για παράδειγμα, LOH στη περιοχή 18q παρατηρείται συχνά σε καρκίνο του παχέος εντέρου, παρόλο που δεν έχει αναγνωρισθεί ΟΚΣ γονίδιο στην αντίστοιχη περιοχή (Cho KR 1995). Είναι δύσκολο να χρησιμοποιήσει κανείς ανάλυση LOH για να εντοπίσει με ακρίβεια τη περιοχή, μέσα στη 18q που βρίσκεται το ΟΚΣ γονίδιο και αυτό γιατί συνήθως ολόκληρη η 18q περιοχή εμφανίζει απώλεια της ετεροζυγωτίας. Παρ' αυτά, ομόζυγες διαγραφές σε όγκους έχουν βοηθήσει στην αναγνώριση τριών υποψήφιων ΟΚΣ γονιδίων στη 18q περιοχή. Αυτά είναι το DCC (καρκίνος του παχέος εντέρου), DPC4 (καρκίνος του παγκρέατος) και JV18-1 ή MADR2 το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη σχετιζόμενη με το DPC4

(Hahn S.A 1996, Riggins GJ 1996, Eppert K 1996). Η παρουσία τουλάχιστον τριών διαφορετικών γονιδίων στη 18q περιοχή, τα οποία προσβάλλονται από σωματικές μεταλλάξεις, σε μια ομάδα νεοπλασιών, αντικατοπτρίζει τις δυσκολίες που παρουσιάζονται στην αναγνώριση γονιδίων μέσω της απώλειας της ετεροζυγωτίας.

Κατά καιρούς, μεγάλος αριθμός γονιδίων με μειωμένη έκφραση, έχουν ανακαλυφθεί. Αυτά τα γονίδια συχνά καλούνται ΟΚΣ. Παρομοίως πολλά γονίδια που ανταγωνίζονται την διαδικασία ανάπτυξης καρκινικών κυτταρικών σειρών *in vitro*, μπορεί να ονομαστούν ΟΚΣ. Παρόλο που κάποια από τα παραπάνω μπορεί να αποδειχτούν σημαντικά στη ρύθμιση της ανάπτυξης και πιθανοί στόχοι μεταλλάξεων «απώλειας λειτουργίας» στον ανθρώπινο καρκίνο, εν' τούτοις πρέπει να γνωρίζουμε ότι η αναστολή έκφρασης ορισμένων γονιδίων μπορεί απλά να αντανakλά τις εναλλακτικές προτεραιότητες ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Πολλά γονίδια επίσης, μπορεί να επηρεάζουν ανασταλτικά την ανάπτυξη στα καρκινικά κύτταρα, αλλά σπάνια έως ποτέ δεν μεταλλάσσονται στον ανθρώπινο καρκίνο.

1.2.4 Ογκογονίδια-Ογκοκατασταλτικά γονίδια και κυτταρικός θάνατος.

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (απόπτωση) αποτελεί μια απαραίτητη λειτουργία για την ανάπτυξη και την ιστική ομοιόσταση (Reed JC, 2000). Η απόπτωση αποτελεί τη φυσιολογική αντίδραση σε πολλά ερεθίσματα, περιλαμβάνοντας και την ανεμπανόρθωτη καταστροφή του DNA. Πολλές ασθένειες εμφανίζονται λόγω υπερενεργοποίησης (σύνδρομο ανοσοκαταστολής) ή καταστολής του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (αυτοάνοσες διαταραχές, καρκίνος) (Thompson CB, 1995).

Στο καρκίνο, η ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού και προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου διαταράσσεται και ελαττώματα στη φυσιολογική οδό της απόπτωσης επιτρέπουν σε κύτταρα με γενετικές ανωμαλίες να επιβιώνουν. Οι περισσότερες κυτταροτοξικές και ορμονικές θεραπείες, καθώς και η ακτινοβολία, ουσιαστικά εξουδετερώνουν τα καρκινικά κύτταρα δημιουργώντας κυτταρικές βλάβες που προκαλούν την απόπτωση. Εν τέλει, η αποτελεσματικότητα των αντινεοπλασματικών θεραπειών εξαρτάται όχι μόνο από το βαθμό της κυτταρικής καταστροφής που δημιουργούν αλλά και από την ικανότητα των κυττάρων να ανταποκριθούν σε αυτή τη καταστροφή ξεκινώντας τη διαδικασία της απόπτωσης. Σύμφωνα με τα παραπάνω, μεταλλάξεις της αποπτωτικής οδού μπορεί να οδηγήσει σε αντίσταση στα φάρμακα ή στην ακτινοβολία. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί να χρησιμοποιηθούν στη πρόβλεψη της αντίστασης σε συγκεκριμένες θεραπείες ή και ως νέοι θεραπευτικοί στόχοι.

Μιτοχόνδρια και κυτταρικοί υποδοχείς μεσολαβούν στις δύο κύριες οδούς της απόπτωσης (Reed JC, 2000). Η οδός των μιτοχονδρίων θεωρείται σημαντική για την ανταπόκριση στη θεραπεία και επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2. Η εκτέλεση τελικά του κυτταρικού θανάτου πραγματοποιείται από την αλυσιδωτή αντίδραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών που ονομάζονται κασπάσες, η οποία πυροδοτείται από την ελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια.

Τα πιο καλά μελετημένα γονίδια- ογκοκατασταλτικά γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση, είναι το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, το αντι-αποπτωτικό γονίδιο bcl-2 και το προ-αποπτωτικό γονίδιο bax. Το φυσιολογικό p53, μπορεί να σταματήσει το κυτταρικό πολλαπλασιασμό μετά τη βλάβη του

DNA, με δύο μηχανισμούς: διακόπτοντας το κυτταρικό κύκλο ή ενεργοποιώντας την απόπτωση. Αυτή του η δράση είναι που το κάνει σημαντικό στη πρόβλεψη της αντίστασης στα χημειοθεραπευτικά. Η κύρια συμμετοχή του στη χημειοευαισθησία φαίνεται και από το γεγονός ότι οι πιο καλά θεραπεύσιμοι καρκίνοι είναι αυτοί στους οποίους το p53 δεν φαίνεται να μεταλλάσσεται, όπως νεοπλασμάτα του αιμοποιητικού συστήματος.

Η υπερέκφραση του bcl-2 καταρχήν σχετίστηκε με Β-λεμφώματα. Θεωρητικά, η υπερέκφραση του bcl-2, μπορεί να αποτελεί πλεονέκτημα επιβίωσης για τα νεοπλασματικά κύτταρα, αλλά *in vivo*, η έκφραση του bcl-2 σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση σε πολλές κακοήθειες. Στο καρκίνο του μαστού, για παράδειγμα, όγκοι θετικοί για το bcl-2 συνήθως έχουν θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς και καλύτερη πρόγνωση.

Η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη bax αποτελεί ανταγωνιστή της δράσης της bcl-2 πρωτεΐνης. Η απώλεια της λειτουργίας της bax είναι ουσιαστική για τη παθογένεση του καρκίνου του παχέος εντέρου (Rampino N, 1997). Σε προκλινικές μελέτες η εισαγωγή της bax αναφέρεται ότι προκαλεί ευαισθησία στη προκαλούμενη από φάρμακα ή ακτινοβολία απόπτωση, ενώ η υπερέκφραση της αναστέλλει την απόπτωση.

Πολλές στρατηγικές έχουν προταθεί για να προαχθεί το πρόγραμμα της απόπτωσης. Η πρώτη προσέγγιση ήταν η κατευθυνόμενη γονιδιακή θεραπεία για τη δημιουργία του φυσιολογικού p53. Η πρώτη, φάσης I, φαρμακοκινητική μελέτη με ολιγονουκλεοτίδια bcl-2, έδειξε ότι η θεραπεία είναι καλώς ανεκτή αν και όχι τόσο αποτελεσματική (Waters JS, 2000). Αυτού του είδους οι θεραπείες ίσως να είναι πιο αποτελεσματικές αν συνδυαστούν με χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία που πυροδοτούν την απόπτωση. Ίσως θα ήταν

αποτελεσματικότερο στο μέλλον να συνδυαστούν προ-αποπτωτικές θεραπείες με θεραπείες αντι-αγγειογένεσης, καθώς η υποξία φαίνεται ότι προάγει την απόπτωση (Holmgren L, 1995).

1.3 Μεταλλακτικά γονίδια (mismatch repair genes).

Για να διατηρηθεί η ακεραιότητα του DNA, είναι απαραίτητο να υιοθετηθούν συγκεκριμένοι κανόνες. Λάθη που τυχόν εισχωρούν στο γένωμα, μπορεί να δημιουργήσουν μεταλλάξεις, οι οποίες με τη σειρά τους να οδηγήσουν σε κυτταρική δυσλειτουργία. Οι μεταλλάξεις των ογκογονιδίων και των ΟΚΣ γονιδίων μπορούν να δημιουργήσουν κλώνους κυττάρων που και αυτοί με τη σειρά τους θα αποτελέσουν στόχους για επακόλουθες μεταλλάξεις. Έτσι, ενώ τα ογκογονίδια και τα ΟΚΣ γονίδια συμμετέχουν άμεσα στη απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου που οδηγεί στο καρκίνο, η τρίτη κατηγορία γονιδίων που μεταλλάσσεται στο καρκίνο δεν αποτελεί μέρος αυτού του μηχανισμού. Αντιθέτως, έχει ένα γενικότερο ρόλο στη διασφάλιση της ακεραιότητας της γενετικής πληροφορίας. Αυτά τα γονίδια ονομάζονται μεταλλακτικά και συνιστούν το σύστημα επιδιόρθωσης των κακοζευγαρωμένων βάσεων (ΣΕΚΒ) (mismatch repair). Μεταλλάξεις σ' αυτά τα γονίδια, οδηγούν σε αναποτελεσματική αντιγραφή ή επιδιόρθωση του DNA.

Θεωρείται ότι το ελλατωματικό ΣΕΚΒ οδηγεί σ' έναν μεταλλακτικό φαινότυπο (Loeb LA 1991, Loeb LA 1994). Αυτός ο φαινότυπος είναι καλά μελετημένος σε προκαρυωτικούς οργανισμούς (Cox EC, 1976). Τα κύτταρα τα οποία δεν είναι ικανά να επιδιορθώσουν λάθη στο DNA τους, συσσωρεύουν σταδιακά ένα σημαντικό αριθμό μεταλλάξεων μέσα στο γενωμά τους. Θεωρείται ότι, στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, αυτός ο μεταλλακτικός

φαινότυπος εξασφαλίζει το κατάλληλο περιβάλλον για την συσσώρευση μεταλλάξεων σε γνωστά ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια, καθώς και σε άλλα γονίδια ουσιαστικά για την ογκογενετική διαδικασία.

Το σύστημα πρώτα αναγνωρίζει και διορθώνει ένα μεγάλο φάσμα από λάθη μέσα στη διπλή έλικα του DNA, τα οποία προέρχονται από το λανθασμένο ζευγάρωμα βάσεων μεταξύ των δύο συμπληρωματικών αντιτύπων της έλικας. Το σύστημα αναγνωρίζει και διορθώνει πρώτα τύπου «Ω» σχηματισμού έλικας που συμβαίνουν όταν μία από τις τέσσερις βάσεις ή προστίθεται ή απαλείφεται στο DNA αντίτυπο (Eshleman J, 1996). Και οι δύο παραπάνω κατηγορίες λαθών συμβαίνουν συνήθως κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA, σαν αποτέλεσμα λαθών της DNA πολυμεράσης. Για να διορθώσει τα λάθη, το ΣΕΚΒ (mismatch repair), κατευθύνεται στην αλληλουχία της νεοσυσταθείσας έλικας. Αυτό γίνεται, τέμνοντας την έλικα, αποβάλλοντας τις βάσεις της κακοζευγαρωμένης περιοχής και επανασυνθέτοντας με τη σωστή αλληλουχία αυτή τη φορά.

Στα βακτήρια, το ΣΕΚΒ ξεκινάει με μια πρωτεΐνη, τη MutS, η οποία αναγνωρίζει και συνδέεται με το DNA mismatch. Ακολούθως μια δεύτερη πρωτεΐνη, η MutL «στρατολογείται» για να συνδεθεί με το σύμπλεγμα της MutS (Modrich P, 1994). Στον άνθρωπο, τα γονίδια τα οποία δομικά σχετίζονται με τη MutS των βακτηρίων, είναι το hMsh2 (MutS homolog 2), το hMsh3 (MutS homolog 3) και το hMsh6 (MutS homolog 6) (πίνακας από άρθρο του clinical oncology). Αρχικά δεδομένα δείχνουν ότι, στον άνθρωπο, τη λειτουργία του βακτηριακού MutS την αναλαμβάνουν ετεροδιμερή συμπλέγματα του Msh2 με το Msh6 ή με το Msh3 και αυτά τα διαφορετικά διμερή αναγνωρίζουν διαφορετικούς τύπους mismatches (Risinger J1996,

Malkhosyan S 1996). Αντίστοιχα, στον άνθρωπο, τα γονίδια που σχετίζονται με το βακτηριακό MutL, είναι το hMlh1 (human MutL homolog 1), το hPms1 και το hPms2 (Paradopoulos N, 1994). Ετεροδιμερή του hMlh1 με το hPms2 λειτουργούν αντίστοιχα με το βακτηριακό MutL (Li G-M, 1995).

Μεταλλαγμένα γονίδια του συστήματος επιδιόρθωσης κακοζευγαρωμένων βάσεων προκαλούν HNPCC (hereditary non- polyposis colorectal cancer- κληρονομικός μη πολυποειδής καρκίνος του παχέος εντέρου):

Το HNPCC είναι ένα σύνδρομο οικογενούς καρκίνου που πρωτοπεριγράφηκε το 1913 από τον Aldred Warthin (Warthin A, 1913) και πιο πρόσφατα αποτέλεσε το αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης από τον Henry Lynch (Lynch H, 1991). Το σύνδρομο συχνά αναφέρεται ως σύνδρομο Lynch. Στο HNPCC η κληρονομικότητα έχει επικρατή αυτοσωμικό χαρακτήρα και αποδεικνύεται από την ανάπτυξη καρκίνων, ο συχνότερος από τους οποίους είναι αυτός του δεξιού κόλου. Για την αναγνώριση της οικογενούς προδιάθεσης του συνδρόμου έχουν θεσπιστεί ένα σύνολο κριτηρίων, γνωστά ως κριτήρια του Αμστερνταμ, τα οποία είναι τα εξής: Η παρουσία μέσα στην οικογένεια τριών ατόμων με καρκίνο του παχέος εντέρου, τα οποία αντιπροσωπεύουν δύο διαφορετικές γενεές, το ένα εκ των οποίων είναι συγγενής πρώτου βαθμού με τα υπόλοιπα και τέλος ένα μέλος από τα τρία πρέπει να έχει αναπτύξει το καρκίνο σε ηλικία μικρότερη των τριάντα ετών (Vasen H, 1991). Τα παραπάνω κριτήρια, παρόλο που έχουν αποδειχτεί πολύ χρήσιμα, εν τούτοις έχουν αποτύχει σε ορισμένες περιπτώσεις να αναγνωρίσουν οικογένειες με γενετική προδιάθεση του συνδρόμου. Παρά την ονομασία του συνδρόμου, νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι αδενωματώδεις

πολύποδες υπάρχουν ως προκαρκινωματώδεις βλάβες των καρκίνων του παχέος εντέρου στο συγκεκριμένο σύνδρομο (Aaltonen L, 1994). Φαίνεται ότι ο ρυθμός εξαλλαγής αυτών των πολυπόδων είναι πολύ γρηγορότερος απ' ότι αυτό των τυπικών σποραδικών πολυπόδων του παχέος εντέρου. Τα προσβεβλημένα άτομα έχουν επίσης αυξημένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του ενδομητρίου και του στομάχου, καθώς επίσης και εμφάνισης σπάνιων νεοπλασιών σμηγματογόνων αδένων (Muir-Torre syndrome). Έρευνα από τα εργαστήρια του Bert Vogelstein και Richard Kolodner έδειξε ότι γενετικές μεταλλάξεις στα hMsh2, hMlh1, hPMS1 και hPMS2 ευθύνονται για το 90% των περιπτώσεων HNPCC (Liu B 1996, Papadopoulos N 1994). Σε όλες τις περιπτώσεις, η κληρονομικότητα του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου συμβαδίζει με την κληρονομικότητα της ευαισθησίας στο καρκίνο. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων εμφανίζει μεταλλάξεις είτε στο hMlh1 (33%), είτε στο hMsh2 (31%). Μελέτες των καρκίνων που εμφανίζονται σ'αυτά τα άτομα, τυπικά αναδεικνύουν διατήρηση από τον όγκο του κληρονομούμενου μεταλλαγμένου αλληλόμορφου του hMlh1 ή του hMsh2, συνοδευόμενο από απώλεια ή μετάλλαξη του φυσιολογικού αλληλόμορφου. Όπως αναμενόταν τα καρκινικά κύτταρα από αυτούς τους όγκους εμφανίζουν απώλεια της ικανότητας επιδιόρθωσης των κακοζευγαρομένων βάσεων (mismatch repair function) (Parsons R, 1993). Με εξαίρεση ελάχιστων περιπτώσεων, η λειτουργία της επιδιόρθωσης παραμένει άθικτη στα λεμφοκύτταρα των ατόμων με HNPCC, παρά τη παρουσία μετάλλαξης στην οικογένεια των mismatch repair γονιδίων. Αυτά τα μεταλλαγμένα γονίδια έχουν συνήθως υπολλειπόμενο χαρακτήρα σε κυτταρικό επίπεδο και η κληρονομικότητα του φαινοτύπου της νόσου με τον επικρατή χαρακτήρα

αντανακλά το υψηλό ποσοστό δεύτερου- χτυπήματος (second-hit) γεγονότων κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ζωής του ατόμου.

1.3.1 Υπερμεταλλακτικός φαινότυπος.

Η διατύπωση της θεωρίας του υπερμεταλλακτικού φαινότυπου οφείλεται στον Loeb (Loeb, 1974). Η βασική ιδέα της θεωρίας αυτής είναι ότι η εξέλιξη των νεοπλασμάτων οδηγείται από γενετική αστάθεια στην οποία οφείλεται μεγάλος αριθμός τυχαίων μεταλλάξεων από όπου επιλέγονται κλώνοι που εμφανίζουν κακοήθεις ιδιότητες. Αυτή η υπόθεση δεν αποκλείει τη συμμετοχή και άλλων παθογενετικών διαδικασιών που οδηγούν στον αυξημένο αριθμό μεταλλάξεων που παρατηρούνται στα καρκινικά κύτταρα. Υποστηρίζεται ότι η μετάλλαξη σε ένα γονίδιο που είναι υπεύθυνο για τη σταθερότητα ολόκληρου του γονιδιώματος αποτελεί πρώιμο γεγονός στην εξέλιξη της καρκινογένεσης. Κατά συνέπεια ο μεταλλακτικός ρυθμός σε όλο το γονιδίωμα αυξάνεται και αυτό συνεισφέρει στην αυξημένη συχνότητα των μεταλλάξεων που παρατηρούνται όσο το νεόπλασμα προχωρά. Ανάμεσα στις τυχαίες μεταλλάξεις μπορεί να βλάπτονται και άλλα γονίδια που ενέχονται στη γενετική σταθερότητα του κυττάρου και με αυτόν τον τρόπο να δημιουργείται ένας μηχανισμός πολλαπλής μεταλλαξογένεσης. Αυτός ο μηχανισμός στην αρχή προτάθηκε μεταλλάξεις σε DNA πολυμεράσες. Έχει δειχθεί ότι ο τυχαίος αριθμός μεταλλάξεων που παρατηρείται σε *E. Coli* που περιέχουν γενετικά τροποποιημένες αντιμεταλλακτικές πολυμεράσες είναι δύο με τρεις φορές χαμηλότερος από κύτταρα με φυσιολογικές πολυμεράσες (Schaaper, 1993).

Είναι πιθανό ότι ένα μέρος από τις πολλαπλές μεταλλάξεις που βρίσκονται στα καρκινικά κύτταρα να μην προσθέτει στη δυνάμική της εξέλιξης

των καρκινικών κυττάρων, αλλά απλώς να αποτελεί ένα παράλληλο γεγονός. Η θεωρία του υπερμεταλλακτικού φαινότυπου δεν αντιδιαστέλλεται με τη πιθανότητα κάποιες από τις μεταλλάξεις να οδηγούν σε αυξητικό προβάδισμα κάποιων κυττάρων που με τη σειρά τους επιλέγονται και δημιουργούν νεοπλασματικό κλώνο. Είναι κατά συνέπεια πιθανό ο αριθμός των μεταλλάξεων στα καρκινικά κύτταρα να οφείλεται και σε υπερμεταλλακτική ικανότητα και σε κλωνική επιλογή.

Αν υποθέσουμε ότι η παρουσία μεταλλάξεων και γενικότερα γενετικών αλλοιώσεων αποτελεί κεντρικό σημείο στη παθογένεια κακοήθων εξεργασιών τότε είναι σημαντικό να κατανοήσουμε τη προέλευση αυτών των αλλαγών και να την αναστείλουμε. Η καθυστέρηση του ρυθμού συσσώρευσης μεταλλάξεων σε προδιηθητικά στάδια συνιστά μια νέα προσέγγιση στη πρόληψη του καρκίνου. Ο υπερμεταλλακτικός φαινότυπος προϋποθέτει μια μη αναστρέψιμη διαδικασία που χαρακτηρίζεται από προοδευτική συλλογή μεταλλάξεων κατά την εξέλιξη των όγκων. Είναι πιθανό όμως αυτός ο φαινότυπος να μπορεί να αναστραφεί, μειώνοντας το ρυθμό των μεταλλάξεων και κατά συνέπεια την εξέλιξη του όγκου.

1.3.2 Η μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability- MSI) αποτελεί δείκτη των όγκων με ελαττωματικό σύστημα επιδιόρθωσης κακοζευγαρωμένων βάσεων.

Η αναγνώριση του ρόλου του ελαττωματικού συστήματος επιδιόρθωσης στο καρκίνο διευκολύνθηκε πολύ από την παρατήρηση του γεγονότος ότι οι όγκοι με ελάττωμα στο σύστημα επιδιόρθωσης εμφανίζουν αστάθεια των αλληλουχιών του μικροδορυφορικού DNA (Aaltomen L, 1993). Το μικροδορυφορικό DNA περιλαμβάνει μικρές ομάδες επαναλαμβανόμενων

αλληλουχιών (συχνότερα 1-4 βάσεων) που συναντώνται σε όλο το γονιδίωμα. Από τις μονονουκλεοτιδικές επαναλήψεις, αλληλουχίες A ή T είναι πολύ συχνές και όλες μαζί συνιστούν το 0.3% του πυρηνικού γονιδιώματος. Αντίθετα αλληλουχίες G ή C είναι πολύ σπανιότερες. Στη περίπτωση των δινουκλεοτιδικών αλληλουχιών, ομάδες CA είναι πολύ συχνές συνιστώντας το 0-5% του γονιδιώματος και είναι σε υψηλό ποσοστό πολυμορφικές. Οι CT επαναλήψεις είναι επίσης αρκετά συχνές, ενώ οι CG είναι πολύ σπάνιες και αυτό συμβαίνει γιατί αυτές οι αλληλουχίες είναι επιρρεπείς σε μεθυλίωση. Τρινουκλεοτιδικές και τετρανουκλεοτιδικές αλληλουχίες είναι σχετικά σπάνιες αλλά επειδή είναι σε μεγάλο βαθμό πολυμορφικές, έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά για το σχεδιασμό πολυμορφικών δεικτών, χρήσιμων στη ταυτοποίηση νέων ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η σημασία του μικροδορυφορικού DNA είναι άγνωστη. Αν και το μικροδορυφορικό DNA έχει ανιχνευτεί κυρίως εξωγονιδιακά ή σε εσώνια γονιδίων, σπανίως έχει ανακαλυφθεί σε εξώνια. Το πρότυπο των αλληλουχιών είναι μοναδικό για κάθε άνθρωπο και σταθερό σε όλους τους ιστούς του και αυτή είναι η βάση της εκτεταμένης χρήσης τους σαν αποτυπώματα DNA στην Ιατροδικαστική.

Παρά την εκπληκτική σταθεροτητά τους παρατηρήθηκε ότι σε όγκους υπάρχει σημαντική ετερογένεια αυτών των πολλαπλά επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Ο Aaltonen πρώτος παρατήρησε ότι στον HNPCC τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αλλαγές σε αυτές τις αλληλουχίες σε σχέση με αυτές που βρίσκονται σε γειτονικά ή άλλα κύτταρα προερχόμενα από τον ίδιο άνθρωπο (Aaltonen L, 1993). Αυτή η παρατήρηση αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι οι DNA πολυμεράσες έχουν τη τάση να «γλιστρούν» κατά τη διάρκεια της αντιγραφής μακρών σειρών από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες

μικροδορυφορικού DNA και, στη περίπτωση απουσίας του συστήματος επιδιόρθωσης, τα λάθη που δημιουργούνται δεν ανιχνεύονται και άρα δεν επιδιορθώνονται (Modrich P, 1994).

Η μεγαλύτερη σημασία του ελαττωματικού συστήματος επιδιόρθωσης στην ανθρώπινη καρκινογένεση αποδεικνύεται από τη παρατήρηση στα εργαστήρια του Manuel Perucho και Stephen Thibodeau ότι σε μη επιλεγμένες σειρές ατόμων με σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου περίπου το 15% των περιπτώσεων εμφάνιζε MSI (Thibodeau S 1993, Ionon Y 1993). Αντίστοιχα με τους όγκους στο πλαίσιο του συνδρόμου HNPCC, τα σποραδικά καρκινώματα με MSI, εμφανίζονται κυρίως στο δεξιό κόλο. Σε σπάνιες περιπτώσεις, φάνηκε ότι η ανάπτυξη των παραπάνω καρκινωμάτων οφειλόταν σε μεμονωμένη σωματική μετάλλαξη σε αλληλόμορφο του Msh2 ή του Msh1 (Liu B, 1995). Ο συχνότερος μηχανισμός MSI στο σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου είναι η μεταγραφική σιγή του γονιδίου hMlh1 λόγω της μεθυλίωσης του εκκινήτη του συγκεκριμένου γονιδίου (Herman JG, 1998). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η χημειοθεραπευτική ουσία 5-αζακτιδίνη μπορεί να αναστρέψει τη μεθυλίωση και να επανενεργοποιήσει την έκφραση του γονιδίου hMlh1 στα σποραδικά καρκινώματα που εμφανίζουν MSI (Herman JG, 1998). Η δυνατότητα της φαρμακευτικής επανενεργοποίησης του γονιδίου hMlh1 κάνει το ενδεχόμενο της χημειοπροφύλαξης με σκοπό τη διακοπή της MSI αναπτυσσόμενης νεοπλασίας αρκετό πιθανό. Σποραδικός καρκίνος του παχέος εντέρου σε άτομα 35 ετών ή νεαρότερα έχει δείχτει σε 58% των περιπτώσεων ότι οφείλεται σε γενετικές μεταλλάξεις σε ένα μεταλλακτικό γονίδιο που είναι είτε

νέα μετάλλαξη ή κατά περίεργο τρόπο δεν είχε προκαλέσει καρκίνο σε άλλα μέλη της οικογένειας (Liu B, 1995).

1.3.3 Ελαττωματικό σύστημα επιδιόρθωσης επιταχύνει το ρυθμό των γονιδιακών μεταλλάξεων.

Μία εικόνα του μηχανισμού μέσω του οποίου το ελαττωματικό σύστημα επιδιόρθωσης κακοζευγαρωμένων βάσεων επιταχύνει την ανάπτυξη του καρκίνου, παίρνουμε από μελέτες που δείχνουν μέχρι και 1000 φορές αύξηση του ρυθμού των αυτόματων γονιδιακών μεταλλάξεων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές από MSI καρκίνους του παχέος εντέρου (Eshleman J, 1995). Επειδή ο καρκίνος είναι το αποτέλεσμα συσσωρευμένων μεταλλάξεων σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια, αυτή η αύξηση του ρυθμού των μεταλλάξεων μπορεί να μεταφραστεί σε υψηλή ευαισθησία σε πρόωρη ανάπτυξη καρκίνου (Loeb L, 1991). Η επόμενη ερώτηση που γεννάται από αυτές τις παρατηρήσεις είναι εάν τα γονίδια τα οποία γίνονται στόχος μεταλλάξεων σε MSI καρκίνους του παχέος εντέρου, είναι τα ίδια ή διαφορετικά από αυτά των οποίων οι μεταλλάξεις προκαλούν την ανάπτυξη σποραδικού καρκίνου του παχέος εντέρου. Αρχικές μελέτες έδειξαν ότι, όπως οι μη MSI καρκίνοι, έτσι και οι MSI καρκίνοι εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων στο γονίδιο APC (adenomatous polyposis coli gene) (Huang J, 1996). Μελέτες έδειξαν επίσης ότι οι MSI καρκίνοι εμφανίζουν μικρότερη συχνότητα μεταλλάξεων από ότι οι μη MSI καρκίνοι στο ογκογονίδιο K-ras και στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 (Ionov Y, 1993).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

2.1 Φυσιολογική ανάπτυξη του μαζικού αδένου.

Προκειμένου να γίνει κατανοητή η διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων από τα φυσιολογικά κύτταρα του μαζικού αδένου, είναι απαραίτητο να αναφερθεί πρωτίστως η βιολογία του φυσιολογικού μαστού. Αντιθέτως με άλλους ιστούς του ανθρωπίνου σώματος, οι οποίοι ολοκληρώνουν την αναπτυξή τους κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ή της ανήλικης φάσης, ο μαζικός αδένου εμφανίζει το μέγιστο του δυναμικού ανάπτυξης κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων κύκλων αναπαραγωγής στην ενήλικη ζωή. Ο μαζικός αδένου υπόκειται σε πολλαπλούς κύκλους διαφοροποίησης, παλλαπλασιασμού και υποστροφής κατά τη διάρκεια των περιόδων αναπαραγωγής και γαλουχίας (Dickson RB, 1998).

Στη γέννηση, ο μαστός αποτελείται από έναν κύριο πόρο και μερικούς μικρούς κλάδους του μέσα σε λιπώδες υπόστρωμα. Μεταξύ της γέννησης και της εφηβείας, ο μαστός υποβάλλεται σε ισομετρική, μη-ορμονοεξαρτώμενη ανάπτυξη, κυρίως με αύξηση του στρώματος. Με την έναρξη της ορμονικής δραστηριότητας, ο μαστός περνάει στη φάση της αλλομετρικής ανάπτυξης. Τα επιθηλιακά κύτταρα διαφοροποιούνται και παραμένουν σε G0, με αποτέλεσμα την επιμήκυνση και διακλάδωση των πόρων. Απαραίτητη γι' αυτή τη διαδικασία είναι η ορμονική επίδραση με οιστρογόνα, προλακτίνη και αυξητική ορμόνη (Korach KS, 1994).

Κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής ωριμότητας, η διαδικασία της ανάπτυξης των πόρων σταματάει, παρόλο που ο επιθηλιακός ιστός συνεχίζει να ανταποκρίνεται σε ορμονικά ερεθίσματα κατά τη διάρκεια του κύκλου με

επαναλαμβανόμενους κύκλους πολλαπλασιασμού και απόπτωσης. Η μεγαλύτερη αύξηση του μιτωτικού πηλίκου συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του κύκλου, ενισχύοντας έτσι το ρόλο της προγεστερόνης. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, υψηλά επίπεδα οιστρογόνων, προγεστερόνης και προλακτίνης προωθούν την ανάπτυξη του συστήματος των πόρων και τη δημιουργία λοβιο-κυψελιδικών δομών. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου, η προγεστερόνη αναστέλλει την έναρξη της λακτογένεσης. Καθώς η εγκυμοσύνη φτάνει στο τέλος της, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων επιβραδύνεται, και τα επιθηλιακά κύτταρα διαφοροποιούνται για τη γαλουχία.

Η μείωση των επιπέδων των ορμονών και η αύξηση της ενδομαζικής πίεσης στη περίοδο της γαλουχίας, έχει σαν αποτέλεσμα την έναρξη του involution. Κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών, η βασική μεμβράνη των κυψελίδων αρχίζει να καταστρέφεται και εκσεσημασμένος κυτταρικός θάνατος μέσω της απόπτωσης αρχίζει.

Η ανάπτυξη του μαζικού αδένου δεν επηρεάζεται μόνο από τις συνήθεις ορμόνες. Ένας μεγάλος αριθμός αυξητικών παραγόντων φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη και λειτουργία των κυττάρων του μαζικού αδένου. Για παράδειγμα, επιδερμοειδής αυξητικός παράγοντας (EGF), transforming growth factors- beta (TGF- betas), insulin- like growth factors (IGFs), fibroblast growth factors (FGFs) και σχετιζόμενα πεπτιδία έχουν βρεθεί να συμμετέχουν στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων του μαστού. Στη πραγματικότητα θεωρείται ότι κάποιες από τις επιδράσεις των οιστρογόνων στο επιθήλιο, οφείλονται στην ικανότητά τους να προάγουν την παρακρινική ή

αυτοκρινική δράση των αυξητικών παραγόντων μέσω ρύθμισης της εκκρίσής τους ή/και της εκφρασής τους (Nass S.J, 1999).

2.2 Στεροειδικές ορμόνες στο καρκίνο του μαστού.

Όπως προαναφέρθηκε, οι ωοθηκικές ορμόνες, οιστρογόνα και προγεστερόνη, είναι καθοριστικές για τη φυσιολογική ανάπτυξη του μαζικού αδένου. Και οι δύο αλληλεπιδρούν με πυρηνικούς υποδοχείς, οι οποίοι δρουν ως γονιδιακοί παράγοντες μεταγραφής. Δύο γονίδια οιστρογονικών υποδοχέων έχουν βρεθεί. Το πρώτο, ER άλφα, κλωνοποιήθηκε από κυτταρική σειρά ανθρώπινου καρκίνου του μαστού και εκφράζεται στο φυσιολογικό μαζικό αδένου. Πρόσφατα, ένα ομόλογο γονίδιο, το ER βήτα, κλωνοποιήθηκε από προστατικό ιστό (Kuiper GGJM, 1996). Παρόλο που υπάρχουν στοιχεία για τη έκφραση των ER beta σε χαμηλά επίπεδα σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα του μαστού (Vladusic E, 1998), η συνεισφορά αυτής της έκφρασης στην επιβίωση των παραπάνω κυττάρων δεν έχει ακόμα διαπιστωθεί. Γι' αυτό, όταν αναφερόμαστε σε ορμονικούς υποδοχείς (ER), θα αναφερόμαστε μόνο στους ER άλφα.

Όσο αφορά τη προγεστερόνη, έχει αναγνωρισθεί μόνο ένα γονίδιο υποδοχέα αυτής (PR), από το οποίο εκφράζονται δύο πρωτεΐνες.

Οιστρογόνα

Τα οιστρογόνα παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη, θεραπεία και πρόγνωση του καρκίνου του μαστού (Fischer B 1988, Pichon MF 1996). Τρεις παράγοντες κινδύνου (ηλικία εμμηναρχής, ηλικία εμμηνόπαυσης και ηλικία πρώτης εγκυμοσύνης), σχετίζονται με τις πιο δραματικές φυσιολογικές αλλαγές των επιπέδων οιστρογόνων στη ζωή της γυναίκας. Περίπου τα δύο τρίτα των καρκίνων του μαστού έχουν θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων (ER

+) . Οι όγκοι που εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων εμφανίζουν βραδύτερο ρυθμό ανάπτυξης, είναι καλά διαφοροποιημένοι και ανταποκρίνονται σε ενδοκρινική θεραπεία με αντιοιστρογόνα, όπως η ταμοξιφένη (Breast Cancer Trialists Collaborative Group 1998). Πρόωρα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ταμοξιφένη μπορεί να χρησιμοποιηθεί πιθανά και στη πρόληψη του καρκίνου του μαστού (Wickerham DL, 1998)

In vitro, τα οιστρογόνα διεγείρουν τη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου σε καρκινικά κύτταρα με ER +, αλλά αυτή η δράση περιορίζεται στη φάση G1, υπονοώντας ότι τα οιστρογόνα ρυθμίζουν την έκφραση ή τη δραστηριότητα των G1 ρυθμιστικών πρωτεϊνών (Sweeney KJE 1996). Τα αντιοιστρογόνα αναστέλλουν το πολλαπλασιασμό δρώντας στο ίδιο «παράθυρο» του κυτταρικού κύκλου, με μείωση της έκφρασης των G1 κυκλινών D1 και E, καθώς και με μείωση της φωσφορυλίωσης της Rb-1, που αποτελεί το κυριότερο στόχο των G1 κυκλινο-συσχετιζόμενων κινασών (Osborne CK 1983). Αυτές οι παρατηρήσεις, δείχνουν ότι η υπερέκφραση αυτών των κυκλινών, η οποία παρατηρείται συχνά σε δείγματα καρκίνου του μαστού (Sweeney KJE 1996), θα μπορούσε δυνητικά να σχετίζεται με την αποτελεσματικότητα της αντιοιστρογονικής θεραπείας. In vivo, τα αντιοιστρογόνα αναστέλλουν την ανάπτυξη του όγκου σε συσχέτιση με μείωση της φάσης S.

Σε αντίθεση με το ρόλο τους ως μιτογόνα, τα οιστρογόνα δρούν και ως παράγοντες επιβίωσης για τα ER+ καρκινικά κύτταρα, γιατί η υποστροφή των ER+ άλλομεταμοσχευτικών όγκων μετά από καταστολή οιστρογόνων, σχετίζεται με την έναρξη της διαδικασίας της απόπτωσης (Kyrianiou N 1991). Η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2, εκφράζεται συχνά σε όγκους μαστού και

αυτή η έκφραση σχετίζεται με ER+ όγκους (Reed JC 1996), και πιθανά τα οιστρογόνα μπορεί να επηρεάζουν την επιβίωση, ρυθμίζοντας την έκφραση της Bcl-2. Σε ER+ κυτταρικές σειρές *in vitro*, τα οιστρογόνα αυξάνουν τα επίπεδα της Bcl-2, χωρίς να επηρεάζουν την έκφραση της Bax, μιας προαποπτωτικής πρωτεΐνης (Teixeira C 1995). Επιπλέον, η αύξηση της Bcl-2 που οφείλεται στα οιστρογόνα, αναστέλλεται σημαντικά από τα αντιοιστρογόνα.

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τα οιστρογόνα προάγουν την ανάπτυξη και την επιβίωση τόσο των φυσιολογικών όσο και των ER+ καρκινικών κυττάρων, φαίνεται παράδοξο ότι οι ER- όγκοι έχουν χειρότερη πρόγνωση. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι ER- όγκοι είναι πιο επιθετικοί γιατί έχουν αποκτήσει την ικανότητα να παρακάμπτουν τους δρόμους της κυτταρικής ανάπτυξης και επιβίωσης που ελέγχονται από τα οιστρογόνα. Η επανέκφραση των ορμονικών υποδοχέων σε ER- όγκους μέσω επιμόλυνσης με ένα σύστημα έκφρασης υποδοχέων οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης και της ογκογένεσης (Zajchowski DA 1993).

Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι η απώλεια της έκφρασης ή της λειτουργίας των υποδοχέων οιστρογόνων μπορεί να αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην ανάπτυξη κάποιων όγκων του μαστού. Ο μοριακός μηχανισμός στον οποίο βασίζεται η απώλεια του γονιδίου της έκφρασης των οιστρογονικών υποδοχέων δεν έχει πλήρως κατανοηθεί, αλλά οι περισσότερες κυτταρικές σειρές και όγκοι που είναι ER-, δεν έχουν ER mRNA καθώς και πρωτεΐνη (Lapidus RG, 1998). Η απουσία της έκφρασης του ER mRNA σ' αυτούς τους όγκους δεν οφείλεται σε ανιχνεύσιμες μεταλλάξεις, διαγραφές ή άλλες μεγάλες δομικές μεταβολές στο ER γονίδιο, κάτι που

υποδηλώνει ότι η αναστολή της μεταγραφής του ER γονιδίου μπορεί να είναι ένα τυχαίο γεγονός. Η απώλεια της μεταγραφής του γονιδίου χωρίς παρουσία μεταλλάξεων μπορεί να εξηγηθεί από επιγενετικές τροποποιήσεις, οι οποίες δεν οδηγούν σε αλλαγή της πρωτογενούς αλληλουχίας του DNA. Ένας τέτοιος μηχανισμός που μπορεί να «μπλοκάρει» την μεταγραφεί ενός γονιδίου είναι η μεθυλίωση περιοχών πλούσιων σε κυτοσίνη και γουανίνη σε συνέχεια, ονομαζόμενες νησίδες CpG (CpG islands). Οι νησίδες CpG βρίσκονται συνήθως μόνο σε περιοχές εκκινητών και είναι μη-μεθυλιωμένες σε φυσιολογικούς ενήλικες ιστούς. Η μη μεθυλίωση των νησίδων CpG φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή, καθώς η μεθυλίωση μπορεί να σταματήσει τη μεταγραφή των κάτωθεν των νησίδων αλληλουχιών (Bird AP 1986, Cedar H 1988). Ανώμαλα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA είναι συχνά σε καρκινικά κύτταρα και πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι μια σειρά OKΣ γονιδίων είναι υπερμεθυλιωμένα και μεταγραφικά ανενεργή στο καρκίνο (Laird PW, 1996).

Το ER γονίδιο έχει ένα νησίδιο CpG στον εκκινητή και στο πρώτο εξόνιο, το οποίο είναι εκτεταμένα μεθυλιωμένο σε ER- όγκους μαστού, αλλά παραμένει μη μεθυλιωμένο στο φυσιολογικό μαζικό ιστό. Χρησιμοποιώντας μια πολύ ευαίσθητη για τη μεθυλίωση μέθοδο PCR, έχει βρεθεί μεθυλίωση του ER γονιδίου και σε μερικούς ER+ όγκους, απαντώντας έτσι εν μέρει στο γιατί η υποτροπή ER+ όγκων μπορεί να είναι όγκοι ER- (Lapidus RG, 1998). Δεν είναι ξεκάθαρο εάν η μεθυλίωση αποτελεί το πρώιμο γεγονός στην απενεργοποίηση του γονιδίου, αλλά επειδή η πρωτογενής αλληλουχία του DNA δεν αλλάζει με τη μεθυλίωση, είναι δυνατό η έκφραση του γονιδίου να επανενεργοποιείται αναστέλλοντας τη μεθυλίωση. Αντίθετα από τη μετάλλαξη,

η μεθυλίωση είναι γεγονός αναστρέψιμο. Έτσι, θεραπεία ER- κυττάρων με με κάποιο αναστολέα της μεθυλίωσης (5- αζαδιπιδίνη), οδηγεί σε απομεθυλίωση στη νησίδα CpG και αποκατάσταση της έκφρασης του ER γονιδίου (Ferguson AT, 1995).

Προγεστερόνη

Η παρουσία ή όχι της έκφρασης προγεστερονικών υποδοχέων αποτελεί μία σημαντική ένδειξη για την ανταπόκριση σε ενδοκρινική θεραπεία. Περίπου το 50% των ER+ όγκων, είναι επίσης και PR+. Αυτή η κατηγορία των καρκίνων εμφανίζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση στην ενδοκρινική θεραπεία, ενώ λιγότερο από το ένα τρίτο των ER+/PR- όγκων αρχικά ανταποκρίνονται σε ενδοκρινικό χειρισμό (McGuire WL, 1979). Αυτή η διαπίστωση αντανakλά το γεγονός ότι οι οιστρογονικοί υποδοχείς αποτελούν το μεταγραφικό παράγοντα-κλειδί για την έκφραση των προγεστερονικών υποδοχέων. Γι' αυτό και η απουσία έκφρασης υποδοχέων προγεστερόνης σε ER+ όγκους μπορεί να είναι ενδεικτικό μη λειτουργικών οιστρογονικών υποδοχέων που δεν ανταποκρίνονται σε θεραπεία με αντιοιστρογόνα. Με την ίδια λογική, δεν είναι τυχαίο το γεγονός ότι σχεδόν όλοι οι ER- όγκοι είναι και PR- και ανταποκρίνονται ελάχιστα ή και καθόλου στη ταμοξιφένη. Όπως η απώλεια έκφρασης των ER, έτσι και η απώλεια έκφρασης των PR σχετίζεται με υπερμεθυλίωση στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου, αλλά δεν είναι γνωστό εάν η μεθυλίωση προηγείται ή έπεται της μεταγραφικής απενεργοποίησης (Lapidus RG, 1996).

Στοχεύοντας στη δραστηριότητα των υποδοχέων της προγεστερόνης, μπορεί να ανασταθθεί η ανάπτυξη του όγκου. Τόσο η χορήγηση αντιπρογεστεροειδών, όσο και η χορήγηση αυξημένης δόσης προγεστερόνης

μπορεί να αναστείλει τη καρκινική ανάπτυξη. In vitro, οι προγεστίνες προκαλούν μια διφασική ανταπόκριση ανάπτυξης στους PR+ όγκους, με μια αρχική αύξηση της προόδου του κυτταρικού κύκλου που ακολουθείται από μία περίοδο πλήρους ανακοπής της ανάπτυξης (Sweeney KJE, 1996). Τα κύτταρα είναι ευαίσθητα στη δράση των προγεστινών μόνο στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και ανταποκρίνονται με αλλαγές στην έκφραση της κυκλίνης D1. Η αρχική ανάπτυξη συνοδεύεται από μία αύξηση της έκφρασης της κυκλίνης D1 και η αναστολή της ανάπτυξης σχετίζεται με μείωση της έκφρασης της D1, καθώς και με αναστολή της δραστηριότητας ειδικών G1 κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών και με μείωση της φωσφορυλίωσης στη Rb-1. Η έκθεση στην αντιπρογεστίνη RU486, η οποία μπορεί να μειώσει τη κυτταρική ανάπτυξη in vivo και in vitro, οδηγεί σε αποφωσφορυλίωση της Rb-1 και αναστολή της ανάπτυξης χωρίς όμως να στοχεύει στη κυκλίνη D1.

Τελευταία, ένας καινούργιος μηχανισμός έχει προταθεί για τη μειωτική δράση της προγεστερόνης στη ωχρινική φάση του κύκλου της αναπαραγωγής. Οι προγεστίνες προκαλούν τη παραγωγή αυξητικής ορμόνης (GH), σε εντοπισμένες περιοχές υπερπλαστικού επιθηλίου, με συνοδή αύξηση της GH στον ορό. Επιπλέον οι αντιπρογεστίνες «μπλοκάρουν» την εξαρτώμενη από τη προγεστερόνη έκφραση της GH. Παρόλο που θα πρέπει να αποδειχτεί κατά πόσο αυτή η τοπική σύνθεση της GH είναι υπεύθυνη για το πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μαστού, εν' τούτοις φαίνεται ότι τόσο η τοπική όσο και η συστηματική αύξηση των επιπέδων της GH έχει την ικανότητα να προωθούν την ανάπτυξη του μαζικού αδένου. Επειδή ο καρκίνος του μαστού έχει φανεί ότι εκφράζει GH, ίσως και αυτός ο μηχανισμός να παίζει

σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (Van Garderen E, 1997).

2.3 Πεπτιδικές ορμόνες και αυξητικοί παράγοντες στο καρκίνο του μαστού.

Η οικογένεια του επιφανειακού επιδερμικού παράγοντα (The epidermal growth factor family, EGFF).

Η EGFF περιλαμβάνει τέσσερις διαμεμβρανικούς υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης (HER-1 ή EGFR, HER-2, HER-3 και HER-4) και μερικούς αυξητικούς παράγοντες όπως EGF, TGF-alpha, amphiregulin και cripto-1.

Έχει βρεθεί ότι ο TGF-alpha και οι σχετιζόμενοι με αυτόν αυξητικοί παράγοντες μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση στρώματος- επιθηλίου για την έμμεση ανταπόκριση των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων του μαστού στα οιστρογόνα. In vitro, τα επιθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται υπό τα οιστρογόνα μόνο εάν καλλιεργηθούν μαζί με κύτταρα του στρώματος τα οποία εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες. Ο TGF-alpha αποτελεί γνωστό αυτοκρινικό παράγοντα ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων σε καλλιέργειες και τα οιστρογόνα αυξάνουν την έκφραση του σε κύτταρα με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς. Επιπλέον, αντισώματα εναντίον του TGF-alpha ή των υποδοχέων του μπορεί να αναστείλουν την προκαλούμενη από τα οιστρογόνα ανάπτυξη των κυττάρων (Dickson RB, 1995).

Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και τα σχετιζόμενα με αυτόν πεπτίδια δρουν ως παράγοντες επιβίωσης των επιθηλιακών κυττάρων καθώς και σαν μιτογόνα. Πειράματα in vitro έχουν αποδείξει ότι ο TGF-alpha και ο EGF ρυθμίζουν την απόπτωση αυξάνοντας τα επίπεδα της Bcl-xl (Nass SJ, 1996). Επιμόλυνση ER+ καρκινικών κυττάρων με τον υποδοχέα HER-2,

οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της Bcl-2 και της Bcl-xl και σχετίζεται με αυξημένη αντίσταση στην, από τη ταμοξιφένη προκαλούμενη, απόπτωση (Kumar R, 1996).

Πολλά πειράματα σε ποντίκια έδειξαν την ικανότητα του EGF και του TGF- α να προωθούν την ογκογένεση (Dickson RB, 1995) και πολλά μέλη της ίδιας οικογενείας συχνά υπερεκφράζονται στον καρκίνο του μαστού. Η υπερέκφραση αυτή συχνά σχετίζεται με ER- όγκους και κακή πρόγνωση (D Agnano I, 1996).

Η οικογένεια των insulin-like growth factor (IGF family).

Η οικογένεια IGF αποτελείται από δύο αυξητικούς παράγοντες (IGF1, IGF2), δύο διαμεμβρανικούς υποδοχείς τυροσινοκινάσης (IGFR1, M6P/IGFR2) και τουλάχιστον επτά πρωτεϊνών που δεσμεύουν τους IGF (IGFBP). Τόσο ο IGF1, όσο και ο IGF2 αλληλεπιδρούν με τον IGFR1 για να ενεργοποιήσουν τη δραστηριότητά του με απώτερο σκοπό την δραστηριοποίηση ενδοκυττάρων μηχανισμών που ρυθμίζουν τη κυτταρική ανάπτυξη, επιβίωση και πολλαπλασιασμό. Και οι δύο παράγοντες είναι δυνητικά μιτογόνοι για τα καρκινικά κύτταρα in vitro (Surmacz E, 1998). Η μιτογόνος δράση του IGF1 συνεργεί με τα οιστρογόνα, εν μέρει γιατί τα οιστρογόνα ευοδώνουν την έκφραση του IGFR1 και ο IGF1 δίνει σήμα για τη φωσφορυλίωση, άρα την αναστολή δραστηριότητας, των οιστρογονικών υποδοχέων. Πολλές σειρές καρκινικών κυττάρων εκφράζουν τον IGFR1 του οποίου η δραστηριότητα οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης. Ο παράγοντας υπερεκφράζεται συχνά σε επιθηλιακά κύτταρα όγκων του μαστού και οι συνδεσμοί του, IGF1 και IGF2, εκφράζονται από τα στρωματικά κύτταρα που περιβάλλουν τον όγκο (Rasmussen AA, 1998). Παρά της δυνητικά μιτογόνου

δράσης του συστήματος IGF, η αύξηση της έκφρασης του IGFR1 σχετίζεται με καλή πρόγνωση στον ανθρώπινο καρκίνο του μαστού (Lee AV, 1998).

Παρά την εμφανή ογκογόνο δράση του IGFR1, ο IGFR2 έχει ογκοκατασταλτική δράση, που σχετίζεται με την ικανότητα του να καταστέλλει τη δράση του IGF2 (Oates AJ, 1998). Στη πραγματικότητα, απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH) της γονιδιακής περιοχής του IGFR2 έχει βρεθεί σε 30% διηθητικών και μη διηθητικών καρκίνων του μαστού. Σε μερικές περιπτώσεις αυτή η απώλεια ετεροζυγωτίας συνοδεύεται από σωματικές μεταλλάξεις στο εναπομείνον αλληλόμορφο, κάτι που αποτελεί συχνό φαινόμενο στην απενεργοποίηση των OKΣ γονιδίων.

Τα τελικά μέλη αυτής της ομάδας, οι IGFBRs μεταφέρουν τους IGFs, παρατείνουν το χρόνο ημίσειας ζωής τους και επηρεάζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των IGFs και των υποδοχέων τους (Oh Y, 1998). Στο πρώιμο καρκίνο του μαστού υπάρχει μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ ER και έκφραση του IGFBP3. In vitro, τα οιστρογόνα αναστέλλουν τη παραγωγή του IGFBP3 από τα καρκινικά κύτταρα και η προσθήκη εξωγενούς IGFBP3 μπορεί να «μπλοκάρει» τον πολλαπλασιασμό που προκαλείται από τα οιστρογόνα.

Νεότερα δεδομένα, παρουσιάζουν και έναν άλλο μηχανισμό με τον οποίο οι IGFBPs, ειδικά οι IGFBP3 μπορούν να αναστείλλουν την ανάπτυξη, μέσω της αλληλεπίδρασης τους με πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφανείας. Με αυτό το μηχανισμό φαίνεται ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη, παράγοντες όπως ο TGF-beta και το ρετινοϊκό οξύ (OhY, 1998).

Η οικογένεια των ινοβλαστικών αυξητικών παραγόντων (The Fibroblast Growth Factor Family FGFF).

Η FGFF αποτελείται από τέσσερις γνωστούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης. Η έκφραση των υποδοχέων έχει παρατηρηθεί τόσο σε φυσιολογικό όσο και σε καρκινικό μαζικό ιστό, τα επίπεδα της έκφρασης όμως διαφέρουν πολύ και στις δύο περιπτώσεις και έτσι είναι δύσκολο να καθοριστεί ακριβώς ο ρόλος των παραγόντων αυτών στο καρκίνο του μαστού και το κατά πόσο αλλαγές στην έκφραση τους συνεισφέρουν στην ογκογένεση. Παρολ' αυτά επιμόλυνση ER+ καρκινικών κυττάρων με FGF-1 ή FGF-4 οδηγεί σε, ανεξάρτητη από τα οιστρογόνα, ανάπτυξη και αντίσταση στα αντι-οιστρογόνα, τόσο in vitro όσο και in vivo (Zhang L 1997, McLeskey SW 1998).

Αντίθετα με την εμφανή δράση του FGF1,3 και 4 ως υποκινητών της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, ο FGF2 φαίνεται ότι αναστέλλει την ανάπτυξη. Αυτή η αναστολή είναι αποτέλεσμα της διακοπής της προόδου του κυτταρικού κύκλου μέσω της αύξησης της έκφρασης του αναστολέα του συμπλόκου G1 cdk p21 και έναρξης της απόπτωσης λόγω αύξησης της έκφρασης της bax και μείωσης της bcl-2 (Wang H 1997, Wang Q 1998).

The transforming growth factor- beta family (TGF-beta family).

Οι TGF-betas (1-3) είναι αυξητικοί παράγοντες που αλληλεπιδρούν με δύο τύπους υποδοχέων κινάσης σερίνης- θρεονίνης. Αυτή η κατηγορία πεπτιδίων αναστέλλει την ανάπτυξη των περισσότερων επιθηλιακών κυττάρων και προάγει την ανάπτυξη των στρωματικών κυττάρων. Στον φυσιολογικό μαζικό ιστό, οι TGF-betas αποτελούν ουσιστικούς παρακρινικούς ρυθμιστές της κυτταρικής ανάπτυξης και υποστροφής. Αναστέλλουν πιθανά την επιμήκυνση των πόρων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του αδένου και προωθούν την απόπτωση κατά τη περίοδο υποστροφής μετά τη γαλουχία.

Παρόλο που οι TGF-beta αναστέλλουν την ανάπτυξη των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων, φαίνεται ότι τα επίπεδα τους είναι αυξημένα στα καρκινικά κύτταρα και σχετίζονται με τη πρόοδο της νόσου (Gorsch SM, 1992). Μπορεί να αποτελεί πλεονέκτημα για τον όγκο να παράγει μεγάλες ποσότητες TGF-beta λόγω του πιθανού ρόλου τους στην προώθηση της αγγειογένεσης και της καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος (Enestain J, 1992). Τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να μεγαλώνουν σε περιβάλλον με υψηλές συγκεντρώσεις των TGF-beta. Ένας πιθανός μηχανισμός αντίστασης είναι η μετάλλαξη του υποδοχέα ή η αλλαγή του τύπου του υποδοχέα. Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου τα καρκινικά κύτταρα γίνονται ανθεκτικά στους TGF-beta, αποτελεί σημαντικό θεραπευτικό στόχο, δεδομένου ότι μπορεί να σχετίζεται και με την ανθεκτικότητα σε θεραπεία με αντι-οιστρογόνα (Reiss M, 1997).

Αυξητική ορμόνη και Προλακτίνη (GH, PRL).

Η GH και η PRL είναι νευροενδοκρινικές ορμόνες, των οποίων οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς (GHR, PRLR), ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων κυτοσίνης. Η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη συνδέεται και ενεργοποιεί τόσο τους δικούς της υποδοχείς, όσο και τους υποδοχείς της προλακτίνης. Η αυξητική ορμόνη που εκκρίνεται από την υπόφυση παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων του IGF1 στον ορό, μέσω αύξησης της παραγωγής του από το ήπαρ. Ο IGF1 με τη σειρά του, συνεισφέρει στην έναρξη της δημιουργίας των πόρων του μαζικού αδένα. Πειράματα σε ζώα έδειξαν ότι ο άξονας GH/IGF1 παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη φυσιολογική ανάπτυξη του μαστού, όσο και στην ογκογενετική διαδικασία (Tornell J, 1991). Πρόσφατα, μία μελέτη που χρησιμοποίησε δείγματα αίματος

σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού έδειξε πιο άμεσα τη συσχέτιση μεταξύ του άξονα GH/IGF1 και του κινδύνου για καρκίνο του μαστού σε προεμμηνόπαυσιακές γυναίκες (Hankinson SE, 1998). Επειδή η παραγωγή της GH μειώνεται σταδιακά με την ηλικία, παραμένει ερωτηματικό σχετικά με το αν τα υψηλά επίπεδα IGF1 τη προεμμηνόπαυσιακή περίοδο μπορούν να επηρεάσουν το κίνδυνο για καρκίνο του μαστού και κατά την εμμηνόπαυση. Παρότι ο μηχανισμός παραμένει άγνωστος, η θεραπεία με ταμοξιφένη μειώνει την έκκριση της GH από την υπόφυση, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα του IGF1. Αυτή η παρατήρηση γεννάει το ερώτημα, κατά πόσο η προληπτική χορήγηση ταμοξιφένης θα είναι πιο αποτελεσματική σε γυναίκες με αυξημένα επίπεδα IGF (Pollak MN, 1998).

Εκτός από τον άξονα GH/IGF1, η αυξητική ορμόνη δρά και άμεσα στον μαζικό αδένα, γιατί η έκφραση της ίδιας και των υποδοχέων της έχει παρατηρηθεί σε φυσιολογικό μαζικό ιστό, σε καλοήθεις παθήσεις και σε καρκίνο (Mertani HC 1998, Van Garderen E 1997).

Η ενδοκρινική δράση της προλακτίνης στο μαζικό ιστό περιλαμβάνει τη ρύθμιση της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των πόρων και των λοβίων, καθώς και την έναρξη και διατήρηση της γαλουχίας. Η προλακτίνη είναι επίσης μιτογόνος παράγοντας για τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού σε καλλιέργειες, αλλά ο ρόλος της στην ογκογένεση in vivo δεν έχει ξεκαθαριστεί απόλυτα. Δεν έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της στο αίμα και της συχνότητας ή της εξέλιξης της νόσου. Επειδή όμως είναι γνωστό ότι η προλακτίνη παράγεται και στο μαστό, τότε είναι πιθανό να δρά ως αυτοκρινικός και παρακρινικός παράγοντας και ο ρόλος της στην ογκογένεση να είναι ανεξάρτητος από τα επίπεδα της στο αίμα (Ben-Jonathan M, 1996).

Τόσο η προλακτίνη όσο και οι υποδοχείς της εκφράζονται ευρέως σε φυσιολογικό ιστό και σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα. Ο Ormandy CJ το 1997 βρήκε θετική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων έκφρασης PRLR και ER- PR σε μεγάλο αριθμό καρκινικών κυτταρικών σειρών και όγκων (Ormandy CJ, 1997). Στην ίδια μελέτη, οι συγγραφείς αναφέρουν ότι σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, θεραπεία με προγεστίνες ή μακροχρόνια θεραπεία με οιστρογόνα, αυξάνει τους PRLR και η χορήγηση εξογενούς PRL αυξάνει την έκφραση των PR. Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ των υποδοχέων μπορεί να αποτελεί την εξήγηση για τη παρατηρούμενη συνέργεια μεταξύ οιστρογόνων, προγεστερόνης και προλακτίνης στη ρύθμιση της ανάπτυξης του φυσιολογικού και του καρκινικού μαζικού ιστού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.

3.1 Ογκοκατασταλτικά γονίδια στο καρκίνο του μαστού.

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία στη προσπάθεια της αναγνώρισης ογκοκατασταλτικών γονιδίων που μεταλλάσσονται στο σποραδικό καρκίνο του μαστού καθώς και αυτών που κληρονομούνται σε μεταλλαγμένη μορφή, δημιουργώντας έτσι την οικογενή προδιάθεση στο καρκίνο. Παρακάτω θα εστιάσουμε στα ΟΚΣ γονίδια που έχει αποδειχτεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στο καρκίνο του μαστού *in vivo*.

3.1.1 Ογκοκατασταλτικά γονίδια στην οικογενή νόσο.

Το οικογενειακό ιστορικό του καρκίνου του μαστού έχει αναγνωριστεί ως ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου. Η συστηματική μελέτη οικογενειών των οποίων τα μέλη εμφάνιζαν καρκίνο του μαστού και αργότερα καρκίνο του μαστού και των ωθηκών, οδήγησε στην αναγνώριση των γονιδίων BRCA1 και BRCA2, των οποίων γενετικές μεταλλάξεις σχετίζονται με αυξημένη κληρονομούμενη ευαισθησία για το καρκίνο των ωθηκών και του μαστού. Οι γενετικές μεταλλάξεις στο BRCA1 και BRCA2 μεταφέρονται με τον αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα, με τη πιθανότητα ο απόγονος του φορέα να έχει 50% πιθανότητα να κληρονομήσει τη μετάλλαξη. Σύμφωνα με το μοντέλο του Knudson, οι φορείς των μεταλλάξεων του BRCA1 ή BRCA2 αναμένεται να εμφανίσουν καρκίνο μαστού ή ωθηκών σε νεαρή ηλικία, αμφοτερόπλευρο καρκίνο μαστού ή σύγχρονο καρκίνο μαστού και ωθηκών (Ang P, 2001).

BRCA1

Η περιοχή του BRCA1 αναγνωρίστηκε με συνδυασμένη ανάλυση από οικογένειες με καρκίνο του μαστού, και είναι η 17q21 (Hall JM, 1990). Το

γονίδιο κλωνοποιήθηκε το 1994 (Miki Y, 1994). Αποτελείται από 24 εξόνια, με mRNA 7.8kb σε μήκος και 22 κωδικοποιούντα εξόνια, τα οποία μεταφράζονται σε πρωτεΐνη με 1863 αμινοξέα. Ολόκληρο το γονίδιο καλύπτει 100kb γενομικής αλληλουχίας. Η δομή του BRCA1 είναι ασυνήθιστη με τα περισσότερα εξόνια μεγέθους 100- 500 bp, αλλά το εξόνιο 11 (περίπου 3500 bp) να αποτελεί το 60% της κωδικοποιούμενης περιοχής του γονιδίου.

Μετά την ανακάλυψη του γονιδίου, πάνω από 300 παραλλαγές στην αλληλουχία του έχουν διαπιστωθεί. Αρχικές μελέτες ανέφεραν 8 μεταλλάξεις σε συσχέτιση με τη νόσο (Futreal AP, 1994), που αργότερα αυξάνονται συνεχώς σε αριθμό (Castilla LH, 1994). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι όλες οι μεταλλάξεις είναι γενετήσιες, καθώς οι μεταλλάξεις του γονιδίου είναι σπάνιες στο σποραδικό καρκίνο του μαστού ή των ωοθηκών (Takahashi H, 1995).

Οι δύο πιο συχνές μεταλλάξεις του γονιδίου είναι η απώλεια των βάσεων AG στο κωδικόνιο 185 (185delAG) και η προσθήκη της βάσεως C στο κωδικόνιο 5382 (5382insC), η καθεμία από τις οποίες να αντιπροσωπεύει το 10% του συνόλου των μεταλλάξεων (Couch FJ, 1996). Η μετάλλαξη 185delAG βρέθηκε ότι είναι πολύ συχνή στο πληθυσμό των Εβραίων Ashkenazi (Streuwing JP, 1995). Ανάλυση των γενετήσιων μεταλλάξεων του BRCA1 σε πληθυσμό Εβραίων και μη Εβραίων με πρώιμο καρκίνο του μαστού, δείχνει ότι περίπου το 21% των Εβραίων γυναικών που εμφανίζουν καρκίνο σε ηλικία μικρότερη των 40 ετών, είναι φορείς της μετάλλαξης 185delAG (Fitzgerald MG, 1996), σε αντίθεση με τον υπόλοιπο πληθυσμό, όπου μόνο το 10% των γυναικών με καρκίνο του μαστού στην ίδια ηλικία εμφανίζει γενετήσιες μεταλλάξεις (Langston AA, 1996).

Σήμερα είναι πλέον γνωστό ότι το BRCA1 είναι πολυλειτουργική πρωτεΐνη, η οποία συμμετέχει στη κυτταρική αντίδραση έναντι στη καταστροφή του DNA, στη ρύθμιση της μεταγραφής και στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Απόδειξη ότι η BRCA1 συμμετέχει στη κυτταρική αντίδραση ενάντια σε οποιαδήποτε καταστροφή του DNA, προέρχεται από την αλληλεπίδραση της με πρωτεΐνες που κατεχοχόν αναμειγνύονται σε αυτή την αντίδραση, καθώς και από αλλαγές στην εντόπιση και φωσφορυλίωση της σαν αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής (Deng CX 2000, Scully R 1997). Ο ρόλος του BRCA1 στην επιδιόρθωση του DNA αποδεικνύεται από τη πρόσφατη μελέτη του Zhong et al, όπου φαίνεται η συσχέτιση του BRCA1 με το σύμπλεγμα hRad50-hMre11-p95, μία ομάδα πρωτεϊνών που είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στον ομόλογο ανασυνδυασμό και στη διατήρηση της ακεραιότητας του γενώματος (Zhong Q, 1999).

Μία επιπλέον σημαντική λειτουργία του BRCA1 είναι ο ρόλος του ως ρυθμιστή της μεταγραφής. Οι Fan et al έδειξαν την ικανότητα του BRCA1 να μπλοκάρει την μεταγραφική λειτουργία των υπομονάδων σύνδεσης των alpha υποδοχέων οιστρογόνων (ERa) στο καρκίνο του προστάτη και του μαστού (Fan S, 1999). Η κατασταλτική επίδραση του BRCA1 στη μεταγραφή δεν παρουσιάζεται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές τραχήλου της μήτρας, γεγονός που δείχνει ότι υπάρχει ιστική ειδικότητα σε ότι αφορά το μεταγραφικό έλεγχο από το BRCA1. Τα παραπάνω, προτείνουν ένα μηχανισμό με τον οποίο το BRCA1 καταστέλλει τον ελεγχόμενο από τα οιστρογόνα δρόμο, προβάλλοντας έτσι ένα μηχανισμό μέσω του οποίου μεταλλάξεις του γονιδίου οδηγούν σε ογκογένεση σε ορμονοεξαρτώμενους ιστούς.

BRCA2

Το γονίδιο BRCA2 βρίσκεται στη περιοχή 13q12-13, και όπως το γονίδιο BRCA1 είναι ένα μεγάλο γονίδιο, το οποίο αποτελείται από 27 εξόνια που καταλαμβάνουν 70kb DNA και κωδικοποιούν πρωτεΐνη που αποτελείται από 3418 αμινοξέα (Wooster R, 1995). Παρόλο που και τα δύο γονίδια έχουν ένα μεγάλο εξόνιο 11 που φαίνεται ότι παίζει πρωτεύον ρόλο στη λειτουργία τους, εν τούτοις δεν υπάρχει ισχυρή ομολογία μεταξύ του BRCA1 και του BRCA2.

Παρά το γεγονός ότι πάνω από 100 μεταλλάξεις του BRCA2 έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα (Tavtigian SV, 1996), δεν έχουν διαπιστωθεί καίρια σημεία μεταλλάξεων κατά μήκος του γονιδίου. Το γεγονός αυτό συγχρόνως με το γεγονός ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις οφείλονται σε μικρές προσθήκες ή ελλείψεις, προσφέρει ελάχιστες πληροφορίες στην αναγνώριση συγκεκριμένων λειτουργικών περιοχών του γονιδίου. Μία ενδιαφέρουσα μετάλλαξη είναι μια έλλειψη 126bp στο εξόνιο 23, η οποία μπορεί να είναι σημαντική για τη λειτουργία του γονιδίου (Couch FJ, 1996). Μία μετάλλαξη που φαίνεται ότι εμφανίζεται με σχετικά μεγάλη συχνότητα σε Εβραίους Ashkenazi είναι η 6174delT (Neuhausen S, 1996). Τέλος ελάχιστες μεταλλάξεις του γονιδίου έχουν βρεθεί σε σποραδικό καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι μεταλλάξεις στο BRCA2 δεν ευθύνονται για τη παθογένεια της σποραδικής νόσου.

Η συμμετοχή του γονιδίου στη σταθερότητα του γονιδιώματος φαίνεται από την αλληλεπίδραση με τη πρωτεΐνη Rad1, η οποία συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA. Η Rad1, μετά την έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, αλληλεπιδρά με την BRCA2, σχηματίζοντας πυρηνικές εστίες. Σε κυτταρικές σειρές που δεν εκφράζεται η λειτουργική BRCA2, δεν δύναται η Rad1 να

σχηματίσει πυρηνικά συμπλέγματα μετά από έκθεση στην ιονίζουσα ακτινοβολία (Yan SS, 1999).

Η πιθανότητα να συμμετέχει η BRCA2 στη στη ρύθμιση μιτωτικών σημείων- ελέγχου, διαπιστώθηκε πρόσφατα, με την ανακάλυψη της συσχέτισης της με τη πρωτεΐνη hBUBR1, η οποία ενεργοποιείται από τη διάσπαση των μικροσωληνίσκων (Futamura M, 2000). Η hBUBR1 έχει την ικανότητα να φωσφορυλιώνει τη BRCA2 in vitro και να συνυπάρχει μ' αυτήν στο πυρήνα του κυττάρου. Η απουσία αυτής της αλληλεπίδρασης, πιθανότατα ευθύνεται για τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες που παρατηρούνται σε κύτταρα με έλλειψη του BRCA2 (Patel KJ, 1998).

Κλινική σημασία των μεταλλάξεων του BRCA1 και BRCA2

Ο κίνδυνος καρκίνου του μαστού ή των ωοθηκών για ένα φορέα της μετάλλαξης δεν είναι απόλυτος. Η διεισδυτικότητα (penetrance) περιγράφει το ποσοστό των φορέων που εκδηλώνει την ασθένεια. Για το BRCA1 και το BRCA2, όπως και για τα περισσότερα γονίδια με ευαισθησία στο καρκίνο, η διεισδυτικότητα είναι υψηλή αλλά όχι ολοκληρωτική. Συμβουλευοντας ασθενείς υψηλού κινδύνου για τις επιλογές σε ότι αφορά τις μεθόδους πρόληψης, πρέπει να δοθεί έμφαση στο γεγονός ότι ο κίνδυνος εκδήλωσης της νόσου είναι διαφορετικός ακόμα και μεταξύ φορέων των μεταλλάξεων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι φορείς μεταλλάξεων στο BRCA1 και BRCA2 εμφανίζουν μικρό κίνδυνο εμφάνισης και άλλων καρκίνων. Ο κίνδυνος για καρκίνο του προστάτη τριπλασιάζεται για τους φορείς μετάλλαξης στο BRCA1 (Ford D, 1994) και αυξάνεται κατά τρεις έως επτά φορές για τους φορείς του BRCA2. Άλλοι καρκίνοι που φαίνεται ότι εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα για τους φορείς του BRCA2 είναι ο καρκίνος του παγκρέατος, της

χοληδόχου κύστης, του στομάχου και το κακόηθες μελάνωμα (The Breast Cancer Linkage Consortium, 1999).

Τέλος, άλλα σύνδρομα που εμφανίζουν σχετικά αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου του μαστού παρουσιάζονται στο πίνακα 3.

Πίνακας 3 : Γενετικά σύνδρομα με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του Μαστού

Σύνδρομο	Κληρονομικό Μοντέλο	Γονίδιο	Σχετιζόμενοι Ογκοί			
Οικογενούς Καρκίνου Μαστού-Ωοθηκών	Αυτοσωμικό Επικρατές	BRCA1	Μαστού			
			Ωοθηκών			
			Προστάτη			
			Παχ. Εντέρου			
		BRCA2	Μαστού			
			Ωοθηκών			
			Προστάτη			
			Στομάχου Παγκρέατος			
Li-Fraumeni	Αυτοσωμικό Επικρατές	TP53	Μαστού			
			Σάρκωμα οστών-Μαλ.μορίων			
			Λευχαιμία			
			Ογκοί εγκεφάλου			
			Cowden	Αυτοσωμικό Επικρατές	PTEN	Μαστού
						Θυρεοειδούς
						Στοματικά θηλώματα
						Μαστού
Muir-Torre	Αυτοσωμικό Επικρατές	MSH2,MLH1	Γαστρεντερικού			
			Ουροποιογεννητικού			
			Μαστού			
			Αδενώματα σημηματογόνων αδένων			
Peutz-Jeghers	Αυτοσωμικό Επικρατές	STK11/LKB1	Μαστού			
			Πνευμονος			
			Γαστρεντερικού			
			Πολλαπλά αμαρτώματα πεπτικού			
Ataxia-Telangiectasia	Αυτοσωμικό Υπολειπόμενο	ATM	Λευχαιμία			
			Λέμφωμα			
			Μαστού			

3.1.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια στη σποραδική νόσο.

p53

Ο μεταγραφικός παράγοντας p53 είναι το περισσότερο μελετημένο ΟΚΓ σήμερα. Σε αντίθεση με τα περισσότερα άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια, των οποίων οι μεταλλάξεις είναι τροποποιητικές (missense), η μετάλλαξη του p53 οδηγεί σε παραγωγή πρωτεΐνης που σταθεροποιείται (Ozbun MA, 1995). Οι μεταλλάξεις αυτές συμβαίνουν στο ένα αλληλόμορφο, οδηγώντας έτσι στη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης p53 στο κύτταρο και ακολουθεί η απώλεια του άλλου αλληλόμορφου. Μια άλλη διαφορά από τα περισσότερα ΟΚΓ είναι το γεγονός ότι το μεταλλαγμένο p53 ενεργεί ως κυρίαρχο σε σχέση με το φυσιολογικό p53 (gain of function), γεγονός που επιβεβαιώνεται με τη παρατήρηση ότι ποντίκια με ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο p53 και δύο φυσιολογικά αλληλόμορφα, εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο, παρά τα δύο φυσιολογικά αλληλόμορφα (Dittmer D, 1993).

Η πρωτεΐνη αποτελείται από 392 αμινοξέα. Σε φυσιολογικές συνθήκες, διατηρείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο κύτταρο και σε ανενεργή μορφή. Ενεργοποιείται για να ρυθμίσει τη μεταγραφή. Καταστάσεις που ενεργοποιούν τη p53 είναι υποξία, ακτινοβολία, επίδραση χημικών παραγόντων ή υπερέκφραση παραγώγων ογκογονιδίων (Levine AJ, 1997). Η ενεργοποίηση της p53 επηρεάζει τη μεταγραφική δραστηριότητα πολλών γονιδίων όπως του p21, mdm2, GADD45, bax, IGFBP-3 (Oesterreich S, 1999). Η δραστηριότητα του p53 ρυθμίζεται από την αλληλεπίδρασή της με πολλές κυτταρικές και ιικές πρωτεΐνες (Ozbun MA, 1995).

Η ενεργοποίηση της p53 οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης είτε μέσω διακοπής του κυτταρικού κύκλου είτε μέσω έναρξης της απόπτωσης. Η αναστολή της ανάπτυξης, οφείλεται κυρίως σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 μέσω της μεταγραφικής ενεργοποίησης ή καταστολής των πιο πάνω αναφερόμενων γονιδίων. Το p53 εμπλέκεται επίσης στον έλεγχο των G2/M σημείων- ελέγχου (Fukasawa K, 1996). Τέλος υπάρχουν ενδείξεις για την ανεξάρτητη εμπλοκή του p53 στη καταστολή της φάσης G0 (De Sal G, 1995).

Παρόλο που δεν είναι ακόμα γνωστές οι λεπτομέρειες του μηχανισμού ρύθμισης της απόπτωσης από το p53, εν τούτοις είναι ξεκάθαρο ότι τόσο η μεταγραφική του δραστηριότητα, όσο και η μη μεταγραφική του παίζουν ρόλο στην απόπτωση. Η απόφαση για το αν το κύτταρο θα υποστεί καταστολή του κύκλου ή απόπτωση, βασίζεται στο βαθμό της καταστροφής και στη διαθεσιμότητα άλλων παραγόντων επιβίωσης (Levine AJ, 1997).

Το p53 εντοπίζεται στη περιοχή 17q13.1 (Miller C, 1986) και ο μέσος όρος LOH σ' αυτήν τη περιοχή για το καρκίνο του μαστού είναι 30-40%. Υπάρχουν επίσης καίρια σημεία μεταλλάξεων και στο άλλο αλληλόμορφο, κυρίως στη περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 130 και 290 (Ozbun MA, 1995). Πολλοί άλλοι μηχανισμοί εκτός από χρωμοσωμικές ελλείψεις και γονιδιακές μεταλλάξεις μπορεί να οδηγήσουν σε απενεργοποίηση του p53, όπως πυρηνικός αποκλεισμός και απενεργοποίηση μέσω σύνδεσης με ενισχυμένο mdm2 (Haupt Y, 1997). Είναι λοιπόν πολύ δύσκολο να μετρήσει κανείς με ακρίβεια τα επίπεδα του p53 στους ιστούς και θα ήταν προτιμότερο να σχεδιαστεί ένα λειτουργικό test για τη μέτρηση των λειτουργιών του p53.

Μελέτες έδειξαν ότι οι μεταλλάξεις του p53 μπορούν να οδηγήσουν σε αντοχή σε ορισμένα φάρμακα, όπως η αντοχή καρκινικών κυττάρων του μαστού στη δοξορουμπισίνη (Aas T, 1996). Αυτό είναι το αποτέλεσμα της αναστολής της φαρμακευτικά- εισαγόμενης απόπτωσης στα κύτταρα με ελαττωματικό p53, αφού η χημειοθεραπεία προκαλεί το θάνατο των κυττάρων μέσω καταστροφής του DNA και άρα ενεργοποιώντας την απόπτωση.

Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (RB).

Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος, όπως έχει προαναφερθεί, εντοπίζεται στη περιοχή 13q14. Δομικές ανωμαλίες, περιλαμβάνουσες χρωμοσωμική απώλεια και μετάλλαξη του γονιδίου RB, έχουν αναφερθεί στο 20-30% των καρκίνων του μαστού. Εκτός από χρωμοσωμική απώλεια και μετάλλαξη υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί απενεργοποίησης του γονιδίου. Για παράδειγμα, μελέτες έδειξαν ότι υπερμεθυλίωση του RB promoter οδηγεί σε σημαντική κατασταλτική ρύθμιση του παραγώγου του RB (Stirzaker C, 1997). Έχει φανεί επίσης, ότι το RB μπορεί να απενεργοποιηθεί σε όγκους από την απώλεια του ενός αλληλόμορφου και την υπερμεθυλίωση του άλλου. Σπουδαίο ρόλο στη καρκινογένεση του μαστού μπορεί να παίξει επίσης η οιστρογονική ρύθμιση του RB. Η οιστρογονική θεραπεία των καρκινικών κυττάρων του μαστού, οδηγεί σε φωσφορυλίωση του RB, η οποία μπορεί να αποτραπεί με αντιοιστρογόνα. Τόσο το RB mRNA, όσο και τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυξάνονται σαν αποτέλεσμα της έκθεσης σε οιστρογόνα των ορμονοεξαρτώμενων καρκινικών κυτταρικών σειρών του μαστού (Hurd C, 1997). Η απενεργοποίηση άλλων γονιδίων που βρίσκονται στη πορεία ελέγχου του RB, και όχι απαραίτητα το ίδιο το RB, μπορεί να είναι ικανή να προωθήσει την ανάπτυξη των κυττάρων. Αυτή περιλαμβάνει ενίσχυση της

κυκλίνης D και απενεργοποίηση των αναστολέων των cdk (κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών). Οι cdk αναστολείς χωρίζονται σε δύο υποομάδες: Την INK υποομάδα (p15, p16, p18, p19) και την CIP υποομάδα (p21, p27, p57) (Hengst L, 1998). Πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες έχουν μελετηθεί σαν πιθανά ΟΚΣ γονίδια. Στο καρκίνο του μαστού, οι περισσότερες μελέτες έχουν εστιάσει στον αναστολέα CDK4 και CDK6 (Serrano M, 1997). Το p16 βρίσκεται στη περιοχή 9p21, χρωμοσωμική περιοχή που συχνά λείπει στο καρκίνο του μαστού. Παρόλ' αυτά πολλές μελέτες δείχνουν ότι μεταλλάξεις στο p16 συμβαίνουν σπάνια. Το παράδοξο αυτό λύθηκε πρόσφατα, διαπιστώνοντας ότι γίνεται απενεργοποίηση του p16 λόγω υπερμεθυλίωσης (Foster SA, 1998).

Εν περιλήψει, είναι πιθανό η πλειοψηφία των όγκων να έχει κάποιο ελάττωμα σε τουλάχιστον ένα από τα μέλη του δρόμου-ελέγχου του RB. Το ελάττωμα αυτό όμως δεν είναι απαραίτητο να είναι μετάλλαξη.

Άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια με πιθανή συμμετοχή στο καρκίνο του μαστού.

A. Το γονίδιο του όγκου του Wilms (WT-1)

Ο όγκος του Wilms είναι καρκίνος του νεφρού που εμφανίζεται σε παιδιά, στον οποίο η ογκοκατασταλτική λειτουργία του WT-1 διαταράσσεται (Grundy P, 1997). Οι ασθενείς με όγκο του Wilms δεν εμφανίζουν προδιάθεση στην εμφάνιση άλλων καρκίνων. Παρόλ' αυτά, το εύρημα ότι το WT-1 εμπλέκεται αρνητικά στη ρύθμιση του IGF-IR, IGF-II και του TGF-β, οδήγησαν τους Silberstein et al να ερευνήσουν το WT-1 στο φυσιολογικό και στο καρκινικό μαζικό ιστό (Silberstein GB, 1997). Βρήκαν ότι ένα μεγάλο ποσοστό των καρκίνων δεν έχουν το WT-1 και ότι στα καρκινικά κύτταρα το WT-1 μεταφέρεται από το πυρήνα στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων.

Επιπλέον φαίνεται ότι η έλλειψη του WT-1 σχετίζεται με την έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων. Δυστυχώς, λίγες μελέτες υπάρχουν για το WT-1 στο καρκίνο του μαστού. Η χρωμοσωμική περιοχή στην οποία βρίσκεται (11p13), συμμετέχει στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού, αλλά περισσότερα στοιχεία χρειάζονται για να προσδιοριστεί με ακρίβεια ο ρόλος του.

B. Το γονίδιο APC

Η οικογενής αδενοματώδης πολυποδίαση (FAP), είναι μια διαταραχή κληρονομούμενη με τον επικρατή χαρακτήρα, χαρακτηριζόμενη από την εμφάνιση σε νεαρή ηλικία αδενωματωδών πολυπόδων του παχέος εντέρου με αυξημένη προδιάθεση για καρκίνο του κόλου. Οποιαδήποτε διαταραχή του γονιδίου APC μπορεί να ευθύνεται για την εμφάνιση της FAP και απώλεια της περιοχής του APC (5q21) έχει περιγραφεί και σε άλλους καρκίνους όπως σε καρκίνο του πνεύμονα και του στομάχου.

Υπάρχουν μερικές εργασίες που περιγράφουν LOH στη περιοχή του APC σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Τα ποσοστά κυμαίνονται από 11% έως 38%, με μία μόνο μελέτη που να αναφέρει μεταλλάξεις του γονιδίου APC σε παρασκευάσματα πρώιμου καρκίνου του μαστού (Kashiwaba M, 1994). Πολύ περισσότερες μελέτες χρειάζονται για να αποδειχθεί ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου συμμετέχει στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού.

Γ. Insulin- like growth factor receptor2 (IGFR-2)

Μέλη της οικογένειας των IGF και IGFR παίζουν, όπως έχει ήδη αναφερθεί, σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη και πρόοδο των καρκινωμάτων του μαστού. Το 1996 φάνηκε ότι η περιοχή του IGFR2 (6q26-27) εμφάνιζε LOH σε

πρώιμους όγκους του μαστού, πιθανολογώντας έτσι τη δράση του IGFR2 ως ΟΚΣ γονιδίου (Hankins GR, 1996)

3.2 Απώλεια της ετεροζυγωτίας και καρκίνος του μαστού.

Η απώλεια της ετεροζυγωτίας και η μικροδορυφορική αστάθεια έχουν πολύ συχνά αναφερθεί στο καρκίνο του μαστού και σπανίως σε καλοήθειες παθήσεις του μαστού (Kasami M, 1997). Οι μελέτες απώλειας της ετεροζυγωτίας, χρησιμοποιούνται εκτενώς για να αναγνωρίσουν χρωμοσωμικές περιοχές που πιθανό να περιλαμβάνουν ΟΚΣ γονίδια. Μια μελέτη από τους Sourvinos et al (Sourvinos G, 1997), αναλύει τη μικροδορυφορική αστάθεια (MI) και το LOH στα χρωμοσώματα 7q, 10q, 11p και 17q χρησιμοποιώντας επτά πολυμορφικούς μικροδορυφορικούς δείκτες. Σε 42 ζεύγη DNA όγκου- αίματος, 24 όγκοι μαστού (57%) εμφανίζουν γενετικές μεταβολές. Εικοσι- ένα από τα δείγματα εμφανίζουν LOH (50%), ενώ 11 δείγματα (26%) εμφανίζουν MI σε τουλάχιστον ένα μικροδορυφορικό δείκτη. Η μεγαλύτερη συχνότητα LOH αντιστοιχεί στο δείκτη THRA1, δείχνοντας ότι το THRA1 γονίδιο είναι υποψήφιο ΟΓΚ γονίδιο. Σημαντική συσχέτιση μεταξύ απουσίας υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης με εμφάνιση LOH στη περιοχή 17q21 είναι ενδεικτική σχέσης μεταξύ σημαντικών γενετικών μεταβολών στη περιοχή και ορμονικής απορρύθμισης.

Η απώλεια της ετεροζυγωτίας στο κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 8 (8p), είναι συχνή σε πολλά καρκινώματα, όπως αυτό του προστάτη και του παχέος εντέρου (Yaremko ML, 1995) και εντοπίζεται στη περιοχή 8p21 και 8p22. Αυτό είναι ενδεικτικό της παρουσίας τουλάχιστον δύο ΟΚΓ σ' αυτό το χρωμοσωμικό βραχίονα. Σε ότι αφορά το καρκίνο του μαστού, οι μοριακές

αναλύσεις του χρωμοσώματος 8 ποικίλουν. Οι Yaremko et al έδειξαν ότι LOH εμφανίζεται στο 55% των περιπτώσεων που εξετάστηκαν. Το LOH ήταν πιο συχνό για τους δείκτες του 8p22, D8S254 και D8S133 απ'ότι για το δείκτη NEFL στη περιοχή 8p21. Περιοχικές μεταστάσεις των όγκων έδειξαν μοριακό προφίλ όμοιο με αυτό των πρωτοπαθών όγκων. Μια μεταγενέστερη μελέτη έδειξε LOH στη περιοχή 8q11-12 και 8p12-11 (Dahiya R, 1998). Αυτές οι περιοχές LOH στο χρωμόσωμα 8 έχουν κατά καιρούς συσχετισθεί με διάφορες κλινικές παραμέτρους. Συμπερασματικά φαίνεται ότι η απώλεια της ετεροζυγωτίας στη περιοχή 8p12-11 και 8q11-12 είναι συχνή στο καρκίνο του μαστού και η απώλεια ενός ΟΓΚ γονιδίου στις περιοχές αυτές μπορεί να ποτελεί πρώιμο γεγονός στο καρκίνο του μαστού.

Οι Huang et al εξέτασαν τις μεταβολές των αλληλόμορφων στο χρωμόσωμα 18 (Huang TH, 1995). Απώλεια της ετεροζυγωτίας παρατηρήθηκε στο 62% των δειγμάτων σε ένα ή περισσότερους μικροδορυφορικούς δείκτες. Τα συμπεράσματα της μελέτης δείχνουν ότι η περιοχή 18q23 πιθανό να περιλαμβάνει ΟΚΓ συσχετιζόμενο με τη καρκινογένεση του μαστού.

Το 1998, οι Kazuhiro et al μελέτησαν 143 πρώιμους καρκίνους του μαστού, χρησιμοποιώντας 15 πολυμορφικούς μικροδορυφορικούς δείκτες στη περιοχή 1p. Η απώλεια της ετεροζυγωτίας στη περιοχή 1p34-p35 παρατηρήθηκε συχνότερα σε όγκους σωληνώδους και σκίρρου τύπου, ενώ η απώλεια της ετεροζυγωτίας στη περιοχή 1p22-p31 σχετίστηκε με λεμφαδενικές μεταστάσεις και όγκους διαμέτρου >2cm.

Πρόσφατα, οι Oesterreich et al έδειξαν ότι LOH σε ποσοστό 78.4% εμφανίζεται για το δείκτη D19S216, ο οποίος βρίσκεται στη περιοχή 19p13.2-

3. Στην ίδια περιοχή συνυπάρχει το γονίδιο SAFB, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που φαίνεται ότι είναι corepressor των οιστρογονικών υποδοχέων (Oesterreich S, 2001). Η πιθανότητα το SAFB να είναι ΟΚΣ γονίδιο, δηλώνει την πιθανή συμμετοχή του στην ογκογένεση του μαστού.

Η παραπάνω αναφορά στα ΟΚΣ γονίδια που συμμετέχουν στο καρκίνο του μαστού, δείχνει τη πολυπλοκότητα της έκφρασης και λειτουργίας τους στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Τα ΟΚΓ συμμετέχουν σε ποικιλία κυτταρικών διαδικασιών , όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η αντιγραφή, ο ανασυνδυασμός, η ανακατασκευή και η διαφοροποίηση. Η περαιτέρω αναγνώριση ανωμαλιών σε συγκεκριμένα γονίδια και στα παραγωγά τους στο καρκίνο του μαστού, θα βοηθήσει στο σχεδιασμό στρατηγικών θεραπείας που θα έχουν σαν στόχο σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα, χωρίς να επηρεάζουν τα φυσιολογικά κύτταρα του μαστού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.

4.1 Επιδημιολογία- Παράγοντες κινδύνου.

Παρακάτω θα αναφερθούν επιγραμματικά μερικά στοιχεία της επιδημιολογίας του μαστού, με σκοπό τη κατανόηση της έκτασης της νόσου και της αναγκαιότητας εύρεσης λύσεων τόσο στο τομέα της πρόληψης, όσο και στο τομέα της θεραπείας.

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το συχνότερο καρκίνο στο γυναικείο πληθυσμό και αποτελεί τη κυριότερη αιτία θανάτου μεταξύ των γυναικών ηλικίας 30-60 ετών στην Αμερική.

Το 1999, διαγνώστηκαν 769000 νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού και αναφέρθηκαν 314000 θάνατοι από τη νόσο, παγκοσμίως.

Στην Αμερική 1 στις 8 γυναίκες (12%) θα εμφανίσει καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής της. Το ποσοστό αυτό για τη Δυτική Ευρώπη είναι 1 στις 15.

Στις Ηνωμένες Πολιτείες αναφέρονται 183000 νέες περιπτώσεις ανά έτος. Η ACS (American Cancer Society) υπολόγισε περίπου 181600 νέες περιπτώσεις το 1997 και 175000 γυναικείους καρκίνους και 1300 καρκίνους μαστού σε άνδρες για το 1999. Στην Αγγλία υπολογίζονται περίπου 26000 νέοι καρκίνοι ανά έτος.

Η συχνότητα της νόσου στις Ηνωμένες Πολιτείες αυξάνεται σταθερά από το 1960 με ρυθμό 1-2% ανά έτος. Παρόλ' αυτά πρόσφατες στατιστικές δείχνουν ότι υπάρχει μείωση της θνητότητας από τη νόσο (2000-3000 λιγότεροι θάνατοι ανά έτος), τόσο στην Αμερική όσο και στην Ευρώπη

(Σουηδία, Αυστρία, Γερμανία, Ελλάδα, Αγγλία), Αυστραλία και Καναδά. Η μείωση αυτή, που σχετίζεται κυρίως με τη μείωση της θνητότητας των νέων γυναικών, οφείλεται τόσο στην εξάπλωση της μαστογραφίας ως μέθοδος screening, όσο και στις συμπληρωματικές (adjuvant) θεραπείες (μείωση θνητότητας κατά 20% από τον καθένα από τους παραπάνω παράγοντες).

(Landis SH, 1999)

(Hortobagyi GN, 1998)

(Mettlin C, 1999)

Ηλικία διάγνωσης

Δύο μεγάλες μελέτες συσχετίζουν τη πρόγνωση με την ηλικία. Νέες γυναίκες (< 35 ετών) έχουν χειρότερη πρόγνωση από μεγαλύτερες γυναίκες (Nixon AJ 1994, Albain KS 1994).

Παράγοντες κινδύνου

Πριν αναφερθούν οι παράγοντες κινδύνου θα πρέπει να επισημανθεί ότι το 66% των γυναικών με καρκίνο του μαστού δεν έχει γνωστούς παράγοντες κινδύνου (Harris JR, 1992).

Οι κυριότεροι παράγοντες που αυξάνουν το κίνδυνο για την εμφάνιση της νόσου είναι:

A. Το φύλο, με σχέση γυναίκες:άνδρες= 135:1

B. Η ηλικία. Η συχνότητα της νόσου εξαπλασιάζεται στην ηλικία των εξήντα ετών σε σχέση με την ηλικία των τριανταπέντε ετών. Στην ηλικία των εξήντα ετών, δεκαεπτά στις χίλιες γυναίκες αναμένεται να αναπτύξουν τη νόσο.

Γ. Ορμονικοί παράγοντες.

-Πρώιμη εμμηναρχή

-Καθυστερημένη εμμηνόπαυση. Στις γυναίκες που εμφανίζουν εμμηνόπαυση πριν την ηλικία των 45 ετών, μειώνεται ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου κατά το ήμισυ σε σχέση με τις γυναίκες που εμφανίζουν εμμηνόπαυση σε ηλικία άνω των 55 (Trichopoulos D, 1972).

-Ατεκνία. Αυξάνει το κίνδυνο κατά 30%.

-Χορήγηση ορμονικών σκευασμάτων. Παρόλο που τα αποτελέσματα των μελετών είναι αμφιλεγόμενα στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, φαίνεται ότι υπάρχει λίγο μεγαλύτερος κίνδυνος για τις νέες γυναίκες που παίρνουν αντισυλληπτικά χάπια, ιδιαίτερα πριν τη γέννηση του πρώτου παιδιού τους. Σε ότι αφορά την ορμονική θεραπεία υποκατάστασης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, φαίνεται ότι η χορηγησή της πάνω από 5 έτη αυξάνει σημαντικά το κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, ιδιαίτερα σε γυναίκες άνω των 60 ετών και η προσθήκη προγεστερόνης δεν μειώνει τον κίνδυνο (Colditz GA, 1995).

Δ. Ατυπη επιθηλιακή υπερπλασία

Μια γυναίκα με άτυπη επιθηλιακή υπερπλασία εμφανίζει τετραπλάσιο κίνδυνο να αναπτύξει καρκίνο του μαστού. Ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται 8-10 φορές του φυσιολογικού εάν η γυναίκα έχει οικογενειακό ιστορικό της νόσου και αφορά και τους δύο μαστούς (Dupont WD, 1993).

Ε. Προηγούμενο ιστορικό καρκίνου του μαστού.

ΣΤ.Ιονίζουσα ακτινοβολία. Ιδιαίτερα επικίνδυνη εάν η έκθεση έγινε στην ηλικία 15-18 ετών, ενώ δεν φαίνεται να αυξάνεται ο κίνδυνος εάν η έκθεση γίνει μετά την ηλικία των 40 ετών.

Ζ. Οικογενειακό-κληρονομικό ιστορικό καρκίνου του μαστού.

Αποτελεί το κυριότερο παράγοντα κινδύνου. Πέντε- 10% όλων των καρκίνων του μαστού έχουν κληρονομική βάση. Τα γονίδια που ευθύνονται για τη

γενετική προδιάθεση για τη νόσο και ο τρόπος δράσης τους θα αναλυθεί με λεπτομέρεια παρακάτω.

4.2 Παθολογική ανατομική του καρκίνου του μαστού.

Δύο συστήματα καθορισμού του βαθμού διαφοροποίησης (grade) έχουν προταθεί και χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα.

1. NSABP, Dr Fisher 's method (Fisher ER, 1980), η οποία συνδυάζει το πυρηνικό βαθμό διαφοροποίησης, τον ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης και τον αριθμό των μιτώσεων και
2. Η ταξινόμηση κατά Scarff- Bloom- Richardson (SBR), η οποία μετράει τον συνδυασμό των σωληνωδών σχηματισμών, τον πυρηνικό πολυμορφισμό και τον αριθμό μιτώσεων (Bloom HJG, 1957).

Ο ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης σχετίζεται με το ποσοστό του όγκου που μοιάζει με σωληνώδεις σχηματισμούς:

Grade I (καλής διαφοροποίησης): σωληνώδεις σχηματισμοί >75%

Grade II (μέσης διαφοροποίησης): σωληνώδεις σχηματισμοί 10-75%

Grade III (χαμηλής διαφοροποίησης): σωληνώδεις σχηματισμοί < 10%

Ο πυρηνικός βαθμός διαφοροποίησης εξαρτάται από το μέγεθος του πυρήνα, την πυκνότητα της χρώσης και άρα τη ποσότητα του DNA και τη διαφοροποίηση του σχήματος:

Grade I: καλή πρόγνωση

Grade II/III: χειρότερη πρόγνωση

4.2.1 Ιστολογικοί τύποι καρκινωμάτων μαστού.

1. Πορογενές μη διηθητικό καρκίνωμα μαστού (Ductal Carcinoma in situ- DCIS)

Ονομάζεται το καρκίνωμα στο οποίο τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται μέσα στο σύστημα των πόρων-λοβίων και δεν διηθούν τη βασική μεμβράνη. Αποτελεί πρόδρομη βλάβη του διηθητικού πορογενούς καρκινώματος και η εμφάνιση του σε μια γυναίκα αυξάνει τον κίνδυνο διηθητικού καρκίνου κατά 8-10 φορές. Ταξινομείται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: Το comedo DCIS, το οποίο είναι χαμηλής διαφοροποίησης, με παρουσία νεκρώσεων, πολλές μιτώσεις και υψηλά ποσοστά υποτροπής και το μη comedo DCIS, καλής διαφοροποίησης, με σπάνιες μιτώσεις και καλύτερη πρόγνωση (Morrow M, 2000)

2. Λοβιακό μη διηθητικό καρκίνωμα του μαστού (Lobular carcinoma in situ- LCIS)

Συνήθως είναι πολυκεντρικό και ο χαρακτηρισμός καρκίνωμα δεν προσδιορίζει με ακρίβεια την ιδιότητα του, αφού στη πραγματικότητα δεν αποτελεί καρκίνωμα αλλά δείκτη αυξημένου κινδύνου για την εμφάνιση διηθητικού καρκινώματος, τόσο πορογενούς όσο και λοβιακού (37% των ασθενών με LCIS θα εμφανίσουν μελλοντικά διηθητικό καρκίνο). Ο αυξημένος κίνδυνος αφορά και τους δύο μαστούς και όχι μόνο το μαστό στον οποίο έγινε η βιοψία και η τέθηκε η διάγνωση του LCIS.

3. Πορογενές διηθητικό καρκίνωμα μαστού (Invasive ductal carcinoma)

Αποτελεί το συχνότερο ιστολογικό τύπο καρκινώματος (75%). Αντίθετα με το DCIS, το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα δεν σέβεται την ανατομία των λοβίων-πόρων αλλά δημιουργεί δομές, όπως ζώνες επιθηλιακών κυττάρων και οζιδίων που επεκτείνονται στο στρώμα.

4. Λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα μαστού (Invasive lobular carcinoma)

Αποτελεί το 5-10% όλων των καρκινωμάτων του μαστού. Μικροσκοπικά χαρακτηρίζεται από μικρά κύτταρα in a linear arrangement 'Indian File' with tendency to grow around ducts and lobules. Εμφανίζεται συχνότερα πολυκεντρικό σε σχέση με το πορογενές διηθητικό

Άλλοι τύποι καρκινωμάτων του μαστού, λιγότερο συχνοί και με καλύτερη πρόγνωση απ'ότι το πορογενές καρκίνωμα είναι το σωληνώδες καρκίνωμα (5% όλων των καρκίνων), το μυελοειδές (5-7%), το βλενώδες (3%) και το θηλώδες (1-2%).

4.3 Σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού.

Η σταδιοποίηση γίνεται σύμφωνα με το σύστημα TNM (American Joint Committee on Cancer (AJCC), 1997)

T, το μέγεθος του όγκου: Tis in situ καρκίνωμα

T1 καρκίνωμα < 2cm

T2 καρκίνωμα > 2cm και < 5cm

T3 καρκίνωμα > 5cm και

T4 καρκίνωμα ανεξαρτήτου μεγέθους που έχει επεκταθεί στο θωρακικό τοίχωμα ή στο δέρμα.

N, οι επιχώριοι λεμφαδένες: No χωρίς διηθημένους λεμφαδένες,

N1 μασχαλιαίοι λεμφαδένες διηθημένοι αλλά κινητοί,

N2 μασχαλιαίοι λεμφαδένες διηθημένοι και σε στενή συνέχεια μεταξύ τους (μπλοκ).

N3 διηθημένοι έσω μαστικοί λεμφαδένες

M, η ύπαρξη μεταστάσεων: Mo χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις

M1 με απομακρυσμένες μεταστάσεις

Πίνακας4: Ταξινόμηση κατά TNM

ΣΤΑΔΙΟ	TNM
0	Tis N0M0
I	T1N0M0
IIA	T0N1M0
	T1N1M0
	T2N0M0
IIB	T2N1M0
	T3N0M0
IIIA	T0N2M0
	T1N2M0
	T2N2M0
	T3N1M0
	T3N2M0
IIIB	T4, κάθε N, M0
	κάθε T, N3M0
IV	κάθε T, κάθε N, M1

4.4 Τοπική υποτροπή μετά απο χειρουργική επέμβαση- Παράγοντες κινδύνου.

Η επέμβαση διατήρησης του μαστού (ΕΔΜ) και η ριζική τροποποιημένη μαστεκτομή (ΡΤΜ) για ασθενείς με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού έχουν συγκριθεί σε πολλές προοπτικές τυχαιοποιημένες μελέτες της δεκαετίας 1980-1990 (Veronesi U 1981, Fisher B 1985, Blichert-Toft M 1992). Μετά από 5-10 έτη παρακολούθησης, καμία από αυτές τις μελέτες δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντική διαφορά σε ότι αφορά την επιβίωση των γυναικών. Αυτά τα αποτελέσματα που επιβεβαιώθηκαν και σε μετα-ανάλυση του 1995 (Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group, 1995), εξηγούν γιατί η ΕΔΜ αποτελεί σήμερα επέμβαση ρουτίνας στη χειρουργική αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού. Όταν πρέπει ο ειδικός να αποφασίσει για το είδος της χειρουργικής θεραπείας που θα διαλέξει για την ασθενή του, η επιλογή θα

γίνει με βάση δύο κύριους παράγοντες: Το κοσμητικό αποτέλεσμα και τη πιθανότητα τοπικής υποτροπής. Οι κυριότεροι παράγοντες που σχετίζονται με τη τοπική υποτροπή μετά από ΕΔΜ, είναι η νεαρή ηλικία (<35 ετών), η παρουσία εκτεταμένου ενδοτορικού στοιχείου (ΕΕΣ), η αγγειακή διήθηση και η μικροσκοπική διήθηση των ορίων (Voogd AC 1999, Veronesi U 1995, Anscher MS 1993). Με την ίδια συχνότητα που εμφανίζεται η τοπική υποτροπή σε ΕΔΜ, εμφανίζεται και μετά από ΡΤΜ και πιθανότατα οι παράγοντες κινδύνου εν μέρει συμπίπτουν. Στη προσπάθεια να καθοριστούν με ακρίβεια κάποιες κατευθυντήριες γραμμές για το decision making, συγκεντρώθηκαν και αναλύθηκαν τα αποτελέσματα από δύο μεγάλες τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες, της European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC 10801) (van Dongen JA, 1992) και της Danish Breast Cancer Cooperative Group (DBCG – 82TM) (Blichert- Toft M, 1992). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ενώ η νεαρή ηλικία και το ΕΕΣ σχετίζονται με τη τοπική υποτροπή μετά από ΕΔΜ, η αγγειακή διήθηση αυξάνει το κίνδυνο τοπικής υποτροπής τόσο μετά από ΕΔΜ, όσο και μετά από ΡΤΜ (Voogd AC, 2001). Η αγγειακή διήθηση αποτελεί επίσης ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα απομακρυσμένων μεταστάσεων (Veronesi U, 1995). Η τοπική υποτροπή και οι απομακρυσμένες μεταστάσεις αποτελούν εν μέρει αναξάρτητα γεγονότα που συμβαίνουν σε διαφορετικές περιόδους. Το κατά πόσο, σε ορισμένες γυναίκες, η τοπική υποτροπή αποτελεί δείκτη ή την αιτία των απομακρυσμένων μεταστάσεων, είναι ένα ερώτημα που παραμένει αναπάντητο (Haffty BG, 1996).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1 Σκοπός.

Σκοπός της παρούσης μελέτης είναι η συσχέτιση μοριακών παραμέτρων στο καρκίνο του μαστού με κλινικά και παθολοανατομικά χαρακτηριστικά με απώτερο στόχο την αξιολόγηση των παραπάνω σε μοριακό επίπεδο και ως εκ τούτου τη πιθανή παρέμβαση τόσο σε επίπεδο πρόληψης όσο και σε επίπεδο θεραπείας.

Το πρώτο και μεγαλύτερο μέρος της μελέτης αποσκοπεί στη συσχέτιση της απώλειας ετεροζυγωτίας (LOH) και ως εκ τούτου την πιθανότητα ύπαρξης ογκοκατασταλτικών γονιδίων, στο χρωμόσωμα ένα (1) με κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους όπως την ηλικία της ασθενούς, το στάδιο της νόσου, το μέγεθος του όγκου, τη λεμφαδενική συμμετοχή, τον ιστολογικό τύπο, το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου και τέλος την ύπαρξη λεμφαγγειακής διήθησης πέριξ του όγκου.

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης έγινε προσπάθεια καταρχήν αξιολόγησης της απώλειας της ετεροζυγωτίας ως μοριακό συμβάν σε χρωμοσωμικές θέσεις αντιστοιχούσες σε γονίδια του συστήματος επιδιόρθωσης κακοζευγαρωμένων βάσεων και στη συνέχεια συσχέτιση με τις παραμέτρους που αναφέρθηκαν παραπάνω.

5.2 Υλικό από ασθενείς.

Για το σκοπό της συγκεκριμένης μελέτης εξετάσθηκε αίμα, φυσιολογικός μαζικός ιστός και καρκινικός ιστός από 50 γυναίκες με ιστολογική ταυτοποίηση αδενοκαρκινώματος μαστού. Όλες οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε επέμβαση στο Τμήμα της Χειρουργικής Ογκολογίας του Πανεπιστημίου Ηρακλείου τη χρονική περίοδο Νοέμβριος 1996 – Ιούνιος 1998. Ασθενείς με μη ψηλαφητό καρκίνωμα, καθώς και ασθενείς με μεταστατική νόσο εξαιρέθηκαν της μελέτης.

Όλες οι ασθενείς προέρχονταν από περιοχές της Κρήτης. Η μέση ηλικία (μέσος όρος +/- SD) ήταν 61 έτη (τυπική απόκλιση 11 χρόνια με εύρος από 36 ως 80 χρόνια). Έντεκα από τις ασθενείς ήταν προεμμηνοπαυσιακές και 39 μετεμμηνοπαυσιακές.

Σαράντα μία γυναίκες υποβλήθηκαν σε επέμβαση διατήρησης του μαστού, η οποία περιλαμβάνει ευρεία τοπική εκτομή και λεμφαδενικό καθαρισμό επιπέδου I και II (Van Dongen JA, 1992). Εννιά ασθενείς υποβλήθηκαν σε ριζική τροποποιημένη μαστεκτομή. Σε όλες τις γυναίκες με επέμβαση διατήρησης ακολούθησε τοπική ακτινοβολία (Veronesi U 1992, Veronesi U 1995). Τα ιστικά δείγματα και το αίμα αποθηκεύτηκαν στους -70o C και στους 4o C αντίστοιχα, μέχρι την εκχύλιση του DNA.

Ιστολογική : Όλα τα παρασκευάσματα μεταφέρθηκαν φρέσκα στο Παθολογοανατομικό εργαστήριο. Οι όγκοι μετρήθηκαν και κόπηκαν. Εάν το μέγεθος του όγκου θεωρείτο επαρκές για ιστολογική εξέταση, ένα πολύ μικρό τμήμα αφαιρέθηκε για μοριακή ανάλυση. Συγχρόνως, αφαιρέθηκε και ένα μικρό τμήμα φυσιολογικού ιστού σε επαρκή απόσταση από τον όγκο.

Κατόπιν ακολούθησε η επεξεργασία των ιστών με βάση συγκεκριμένο πρωτόκολλο (Sloane J 1995), και η χρώση των τομών παραφίνης με αιματοξυλίνη-ιωσίνη. Τα καρκινώματα ταξινομήθηκαν σε πορογενή και λοβιακά διηθητικά. Με βάση συγκεκριμένα κριτήρια (Consensus Conference on the classification of ductal carcinoma in situ, 1997), μελετήθηκε και καταγράφηκε η παρουσία, η έκταση και ο τύπος του συνυπάρχοντος μη διηθητικού πορογενούς καρκινώματος. Άλλοι ιστολογικοί τύποι καρκινώματος του μαστού ήταν σπάνιοι (π.χ. σωληνώδεις) και οι περισσότεροι από αυτούς πολύ μικρού μεγέθους, γεγονός που τους απέκλεισε από τη συγκεκριμένη μελέτη.

Ως όγκοι με εκτεταμένο ενδοτορικό στοιχείο (EIC+), καθορίστηκαν τα πορογενή καρκινώματα εκείνα τα οποία εμφάνιζαν τη σύγχρονη παρουσία ενδοτορικού καρκινώματος (DCIS) σε έκταση μεγαλύτερη από 25% της περιοχής του καρκινώματος που επεκτεινόταν και πέρα των ορίων του διηθητικού στοιχείου.

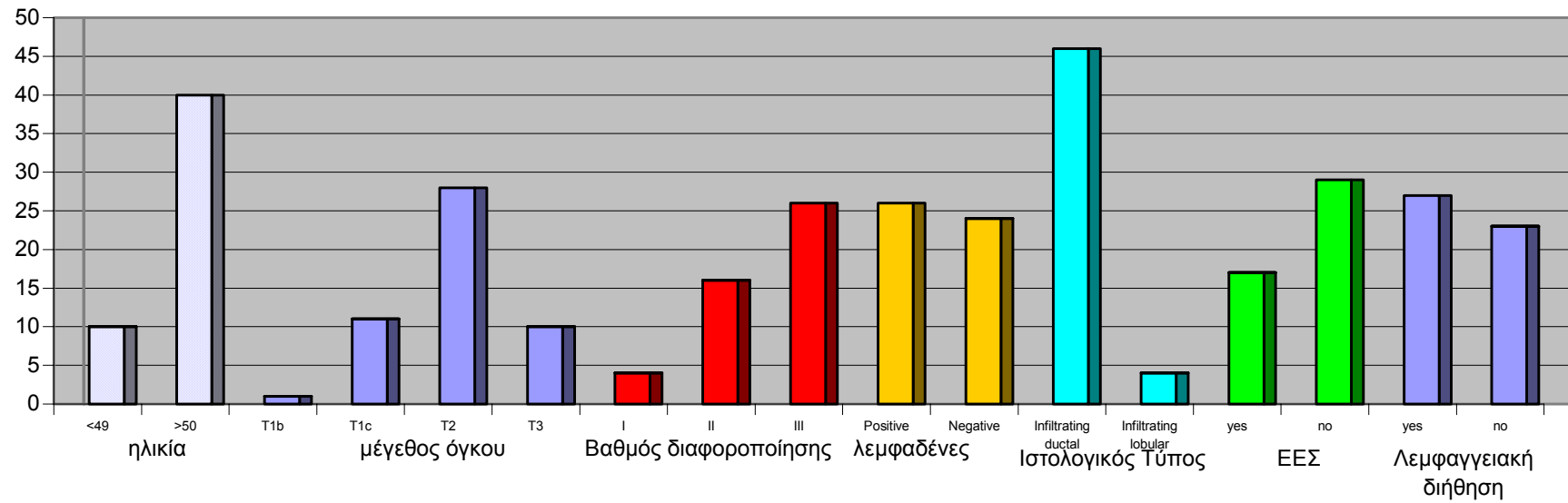
Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο που καταγράφηκε ήταν η ύπαρξη λεμφαγγειακής διήθησης (peritumoral angiolymphatic invasion), που ορίζεται ως η συμμετοχή-διήθηση των πέριξ του όγκου αγγειακών χώρων και δεν είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός μεταξύ λεμφαγγείων και αιμοφόρων αγγείων (Mathoulin-Portier M-P, 1999).

Τα κύρια χαρακτηριστικά του πληθυσμού που μελετήθηκε φαίνονται στο πίνακα 5 και στο σχήμα 3.

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά του υπο μελέτη πληθυσμού

Μεταβλητή	Κατηγορία	Νο(%)
Ηλικία	<49	10 (20)
	>50	40 (80)
Μέγεθος όγκου	T1b	1 (2)
	T1c	11 (22)
	T2	28 (56)
	T3	10 (20)
Λεμφαδένες	Θετικοί	26 (52)
	Αρνητικοί	24 (48)
Βαθμός διαφοροποίησης	I	4 (8.7)
	II	16 (34.7)
	III	26 (56.5)
Ιστολογικός τύπος	Πορογενές διηθητικό	46 (92)
	Λοβιακό διηθητικό	4 (8)
ΕΕΣ	Ναι	17 (37)
	Όχι	29 (63)
Λεμφαγγειακή διήθηση	Ναι	27 (54)
	Όχι	23 (46)

ΣΧΗΜΑ 3 : Χαρακτηριστικά του υπό Μελέτη Πληθυσμού



5.3 Υλικά και μέθοδοι.

5.3.1 Εκχύλιση του DNA.

Από τις πιο σημαντικές διαδικασίες στη μοριακή Βιολογία είναι αυτής της απομόνωσης-καθαρισμού των νουκλειικών οξέων. Καταρχήν γίνεται η απομάκρυνση του μεγαλύτερου τμήματος της πρωτεΐνης με τη διαδικασία της πέψης από πρωτεολυτικά ένζυμα τα οποία είναι δραστικά ενάντια σε ένα μεγάλο φάσμα φυσικών πρωτεϊνών προτού γίνει η απομάκρυνση με οργανικούς διαλύτες. Ο ιστός τεμαχίζεται και ομογενοποιείται σε διάλυμα λύσης (10mM EDTA, 10mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 0.5% SDS). Στη συνέχεια ο ομογενοποιημένος ιστός επωάζεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60°C, αφού προστεθεί πρωτεϊνάση K σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml. Ο συνήθης τρόπος της απομάκρυνσης των πρωτεϊνών από διαλύματα νουκλειικών οξέων είναι η εκχύλιση καταρχήν με φαινόλη:χλωροφόρμιο και κατόπιν μόνο με χλωροφόρμιο. Η διαδικασία αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι η αποπρωτείνωση είναι πιο αποτελεσματική όταν χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικοί διαλύτες αντί του ενός. Το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη μισού όγκου οξικού αμμωνίου (ή 1/20 όγκου NaCl 5M) και 2.5 όγκων απόλυτης αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 4°C σε 13000 rpm και πλύσιμο του κατακρημνισμένου DNA με 70% αιθανόλη. Αφού απομακρυνθεί η αιθανόλη, το DNA επαναιωρείται σε ddH₂O και διατηρείται σε θερμοκρασία 4°C.

5.3.2 Μέθοδοι αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR).

Το 1985 ο Mullis και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μια τεχνική πολλαπλασιασμού του DNA βασιζόμενοι σε *in vitro* και όχι σε *in vivo* διαδικασίες (Saiki 1985). Γνωστή ως αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR), η μέθοδος αυτή επιτρέπει την επιλεκτική παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA που υπάρχει σε ένα σύνθετο μείγμα νουκλεϊκών οξέων, κατά τη διάρκεια μιας 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 (Arnheim 1992, Kawasaki 1990)

Σε αυτά θα πρέπει να προστεθεί το γεγονός ότι η τεχνική απαιτεί ελάχιστη ποσότητα αρχικού υλικού, η οποία δύναται να φτάσει και στο επίπεδο του ενός μορίου. Το αρχικό υλικό DNA δεν είναι απαραίτητο να έχει τη καθαρότητα και ακεραιότητα που απαιτούνται για άλλες τεχνικές, ενώ οι πηγές απομόνωσης του δύναται να ποικίλλουν (νωπός ιστός, σωματικά υγρά, μονιμοποιημένοι ιστοί κ.τ.λ). Μοναδική προϋπόθεση είναι να υπάρχει τουλάχιστον ένα ακέραιο τμήμα DNA, το οποίο να εμπεριέχει τη περιοχή προς ενίσχυση.

Η βασική αρχή λειτουργίας: Στη βασική της μορφή η αντίδραση PCR είναι μια χημική παραβιολογική μέθοδος για τη δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε σχέση με άλλες αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων, οι οποίες υπάρχουν στο μείγμα της

αντίδρασης (Arnheim 1992). Για το πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA, μετά από αντίστροφη μεταγραφή μιας 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 στη περιοχή στόχο, αποτελεί τη βάση για το σχεδιασμό και τη κατασκευή δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών αλυσίδων, οι οποίες χρησιμεύουν ως εκκινητές (primers) στην αντίδραση πολυμερισμού. Το μήκος (συνήθως περισσότερες από 20 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 (90°C), η οποία καθιστά το δίκλωνο DNA μονόκλωνο. Στη συνέχεια ακολουθεί ένα στάδιο με χαμηλότερη θερμοκρασία ($37-70^{\circ}\text{C}$), κατά το οποίο οι εκκινητές υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές περιοχές στους αντίστοιχους μονούς κλώνους DNA. Κάθε εκκινητής υβριδίζεται με τον συμπληρωματικό του κλώνο αντίστοιχα, έχοντας το 3'-OH άκρο του στραμμένο το ένα προς το άλλο. Τέλος, κάθε εκκινητής επεκτείνεται με πολυμερισμό κατά μήκος του τμήματος του DNA στόχο 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 το οποίο παράγεται από μια επιτυχή αντίδραση, αποτελείται εξ' ολοκλήρου από μόρια τμημάτων DNA με μήκος ίσο με το άθροισμα του μήκους των δύο

ολιγονουκλεοτιδίων και το μήκος του DNA τμήματος το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των θέσεων των δύο εκκινητών.

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

1. τη σωστή επιλογή του τμήματος DNA στόχου (ιδανικά μεταξύ 100-1000 βάσεων σε μέγεθος).
2. Το σχεδιασμό και κατασκευή συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων έτσι ώστε να εξασφαλίσουν την εκλεκτική επιλογή και ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος DNA,
3. Τη κατάλληλη επιλογή μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης,
4. Τη συγκέντρωση νουκλεοτιδίων (dNTPs) που απαιτούνται κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, καθώς και τη συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου που απαιτούνται για τη δράση της πολυμεράσης,
5. Το σχεδιασμό του θερμικού προφίλ των κύκλων, το οποίο θα εξασφαλίσει τις συνθήκες για την επιλεκτικότητα των εκκινητών και την επιτυχή συσσώρευση του επιθυμητού προϊόντος της PCR.

Η μέση απόδοση μιας σειράς κύκλων PCR δύναται να περιγραφεί με την ακόλουθη εξίσωση: $N=n(1+e)^c$, όπου N = η τελική ποσότητα του προϊόντος, n =η αρχική ποσότητα του υποστρώματος, e =η απόδοση της αντίδρασης και c =ο αριθμός των κύκλων PCR. Επειδή τα προϊόντα κάθε κύκλου προστίθενται στο υπόστρωμα του επόμενου, η συσσώρευση του προϊόντος PCR γίνεται με εκθετικό τρόπο, οπότε μπορεί να εκτιμηθεί και η απόδοση της ενίσχυσης. Όταν όμως η συγκέντρωση του προϊόντος προσεγγίζει την 10εις την μείον 7 M, τότε σταματάει πλέον η παραγωγή και η αντίδραση μπαίνει σε φάση κορεσμού (Arnheim 1992).

Η χρήση θερμοανθεκτικών πολυμερασών και η κατασκευή θερμικών κυκλοποιητών έδωσε την ικανότητα αυτοματοποίησης και ταυτόχρονης ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων σε σύντομο χρόνο και με ελάχιστο κόστος. Ειδικότερα, μετά την εκχύλιση του DNA με βάση τη τεχνική που αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, παράχθηκε αντίδραση PCR 25μl, η οποία αποτελείται από 200ng DNA, 1μM από κάθε εκκινητή (<http://www.gdb.org/gdb/>), 250μM dNTPs, 2.5μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα (670mM Tris.HCl, pH 8.5; 166mM σουλφονικό αμμώνιο, 67mM χλωριούχο μαγνήσιο, 1.7mg/ml BSA; 100uM αιθανόλη και 1%(w/v) Triton X-100) και 1U από Taq DNA πολυμεράση (Detorakis ET, 1998). Οι αντιδράσεις παρέμειναν 4 λεπτά στους 94°C, το DNA ενισχύθηκε για 35 κύκλους στους 94°C, και μετά στους 45-55°C (ανάλογα με τη θερμοκρασία προσάρτησης του κάθε εκκινητή) και τέλος στους 72°C. Τα χαρακτηριστικά των δεικτών φαίνονται στο πίνακα 6 και 7.

5.3.3 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων

Ηλεκτροφόρηση DNA

Το DNA ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου. Η επιλογή του συγκεκριμένου πηκτώματος εξαρτάται αφενός από το μέγεθος του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί και αφετέρου από τη διακριτική ικανότητα που προσδοκείται να επιτευχθεί. Συνήθως, όσο μεγαλύτερα είναι τα τμήματα του DNA και όσο μεγαλύτερες είναι οι διαφορές μεγέθους των τμημάτων που πρόκειται να διαχωρισθούν, τόσο καταλληλότερο είναι το πήκτωμα αγαρόζης. Αντίθετα, για μικρά τμήματα DNA και για μικρές διαφορές μεγέθους ανάμεσα τους, επιλέγεται το πήκτωμα ακρυλαμιδίου (19:1 μείγμα ακρυλαμιδίου / bis-ακρυλαμιδίου). Και οι δύο τύποι πηκτωμάτων

σχηματίζονται σε υδατικό μέσο που περιέχει 1XTBE ρυθμιστικό διάλυμα (19.8g/l Tris pH 8.0, 0.002 EDTA). Η πήξη των πηκτωμάτων επιτυγχάνεται για τη μεν αγαρόζη με στερεοποίηση της με τη πτώση θερμοκρασίας (προηγείται τήξη της με βρασμό) ενώ για το ακρυλαμίδιο με τη προσθήκη 80μl TEMED και 160μl υπερθειικού αμμωνίου 25% για 65ml διαλύματος ακρυλαμιδίου.

Το δείγμα DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί, επαναιωρείται σε διάλυμα φόρτωσης που περιέχει 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλένιου και 25% φυκόλη.

Χρώση του DNA με νιτρικό άργυρο

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται όταν το DNA έχει ηλεκτροφορηθεί σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου και χαρακτηρίζεται για τη τεράστια ευαισθησία της η οποία την κάνει να επιλέγεται αντικαθιστώντας τη ραδιενέργεια. Στα μειονεκτηματά της ταξινομείται η μη ειδική χρώση του δίκλωνου DNA, δεδομένου ότι χρωματίζεται επίσης και το μονόκλωνο DNA, το RNA καθώς και πρωτεΐνες, θέτοντας σα προϋπόθεση για την εφαρμογή της την ύπαρξη ιδιαίτερα καθαρού και ειδικού DNA. Συνήθως εφαρμόζεται κατά την ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR.

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

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης/πολυακρυλαμιδίου

Διάλυμα TBE: 10.8 g/L Tris, 5.5g/L βορικό οξύ, 0.002M EDTA.

Διάλυμα φόρτωσης: 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλενίου, 25% φικόλη σε 1x TBE.

Διάλυμα πολυακρυλαμιδίου (20%): 19% (w/v) ακρυλαμίδιο, 1% Bis-ακρυλαμίδιο σε απεσταγμένο ύδωρ. Φιλτράρεται (0.45mm), απαερώνεται και αποθηκεύεται στο σκοτάδι.

Διάλυμα βρομιούχου εθιδίου: Στοκ 10mg/ml σε απεσταγμένο ύδωρ.

Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 0.5mg/ml.

Χρώση νιτρικού αργύρου.

Διάλυμα μονιμοποίησης: 10% (v/v) αιθανόλη, 0.5 (v/v) οξικό οξύ σε απιονισμένο ύδωρ.

Διάλυμα χρώσης: 0.1% (w/v) νιτρικού αργύρου σε απιονισμένο ύδωρ.

Διάλυμα εμφάνισης; 0.4M NaOH, 0.15% (v/v) φορμαλδεΰδη σε απιονισμένο ύδωρ.

Διάλυμα εξουδετέρωσης: 0.75% ανθρακικό νάτριο σε απιονισμένο ύδωρ.

Σε ότι αφορά το δικό μας υλικό, 10 μικρόλιτρα από το PCR παράγωγο ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε παραπάνω.

5.3.4 Εκτίμηση απώλειας της ετεροζυγωτίας (LOH).

Συνοπτικά η μέθοδος περιλαμβάνει την PCR ενίσχυση των πολυμορφικών περιοχών, την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 10% για 8 ώρες και τη χρώση με νιτρικό άργυρο. Λόγω της ιδιαίτερης φύσης των αλληλουχιών αυτών (επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και πολυμορφισμός δηλαδή ετεροζυγωτία), επισημαίνονται διάφοροι παράγοντες, η προσοχή των οποίων επιβάλλεται για την επιτυχία της μεθόδου. Αρχικά απαιτείται η διατήρηση της αντίδρασης στην εκθετική της φάση, δεδομένου ότι πρόκειται για ημιποσοτική μέθοδο προσδιορισμού της σχετικής έντασης των δύο αλληλόμορφων. Επίσης, κατά την ηλεκτροφόρηση πρέπει να επιτυγχάνεται η μέγιστη διακριτική ικανότητα αφού συχνά τα αλληλόμορφα διαφέρουν σε μέγεθος μόλις δύο ζεύγη βάσεων.

Η απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH) ορίστηκε ως η μείωση (τουλάχιστον 50%) της έντασης του ενός αλληλόμορφου σε σχέση με το άλλο κατά τη σύγκριση του παθολογικού με το φυσιολογικό DNA. Σε ορισμένες περιπτώσεις, παρόλο που το φαινόμενο της απώλειας της ετεροζυγωτίας ήταν παρών, PCR ενίσχυση των πολυμορφικών μικροδορυφορικών αλληλόμορφων είχε σαν αποτέλεσμα μια σχετική ανισορροπία μεταξύ των αλληλόμορφων λόγω της παρουσίας, σε μικρό ποσοστό, μολυσμένης μπάντας. Αυτή η μπάντα αντιστοιχούσε στο διαγραφέν αλληλόμορφο που παρουσιαζόταν στο φυσιολογικό ιστό. Γενικότερα αυτή η μόλυνση αποδίδεται στη παρουσία φυσιολογικού DNA που προέρχεται είτε από το περιφερικό αίμα, είτε από διπλανό φυσιολογικό ιστό.

Η ανάλυση των θετικών περιπτώσεων για απώλεια της ετεροζυγωτίας επαναλήφθηκε και τα αποτελέσματα ήταν αναπαραγώγιμα (Sourvinos G 1998, Spandidos DA 1997).

5.3.5 Ανάλυση LOH

Για την εκτίμηση της απώλειας της ετεροζυγωτίας στο χρωμόσωμα 1 χρησιμοποιήθηκαν 16 έντονα πολυμορφικοί μικροδορυφορικοί δείκτες (62-90% εμφάνιση ετεροζυγωτίας) κατά μήκος του βραχύ και του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 1.

Οι πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά των δεικτών καθώς και για την ακριβή εντόπισή τους στο χρωμόσωμα, αντλήθηκαν από τη διεύθυνση του διαδικτύου: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap>.

Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για το χρωμόσωμα 1, με τη σειρά κατανομής τους είναι : D1S165, FGR-1, CRTM, D1S186, MYCL1, CLN-1, D1S162, D1S116, D1S305, CRP, APOA2, D1S104, D1S416, ACTN2, ANGIOTEN, D1S180.

Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στο δεύτερο μέρος της μελέτης, για την ανίχνευση απώλειας της ετεροζυγωτίας στις περιοχές τις αντιστοιχούσες στα γονίδια του συστήματος επιδιόρθωσης (mismatch repair genes) hMSH2, hMLH1 και hMSH3 είναι: Στη χρωμοσωμική περιοχή 2p16 (hMSH2) οι δείκτες D2S288, D2S119, D2S2182 και D2S2291. Στη χρωμοσωμική περιοχή 3p21-p23 (hMLH1) οι δείκτες D3S1561, D3S1611, D3S1612 και D3S1260 και τέλος στη χρωμοσωμική περιοχή 5p11-q13 (hMSH3) οι δείκτες D5S427 και D5S647. Στους πίνακες 6 και 7 φαίνονται με λεπτομέρεια τα χαρακτηριστικά των πολυμορφικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν.

5.4 Αποτελέσματα

Πενήντα ζεύγη δειγμάτων από ασθενείς με καρκίνο του μαστού (όγκος/περιφερικό αίμα) εξετάσθηκαν για εμφάνιση απώλεια της ετεροζυγωτίας σε διάφορες περιοχές του χρωμοσώματος ένα (1), χρησιμοποιώντας 16 έντονα πολυμορφικούς δείκτες.

Καταρχήν μελετήθηκε η εμφάνιση LOH για κάθε ένα από τους πολυμορφικούς δείκτες χωριστά και έγινε στατιστική συσχέτιση με κάθε ένα από τους κλινικοπαθολοανατομικούς παράγοντες.

Στο πίνακα 6 φαίνεται το συνολικό ποσοστό LOH για κάθε πολυμορφικό δείκτη χωριστά, έχοντας αποκλείσει τις ομόζυγες περιπτώσεις ως μη φέρουσες αξιολογήσιμες πληροφορίες. Στο δείκτη D1S186 εμφανίζεται το μικρότερο ποσοστό εμφάνισης LOH (5%), ενώ η μεγαλύτερη συχνότητα LOH εμφανίζεται για το δείκτη D1S165 (20%).

Η συσχέτιση του φαινομένου LOH σε κάθε έναν από τους παραπάνω δείκτες με κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική σχέση πλην της θετικής συσχέτισης του LOH στο δείκτη D1S116 και της ύπαρξης διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων ($p=0.01$).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η συχνότητα εμφάνισης απώλειας της ετεροζυγωτίας σε συγκεκριμένες χρωμοσωμικές περιοχές, όπως αυτές ορίζονται από το σύνολο των πολυμορφικών δεικτών που εντοπίζονται σε αυτές. Η εκτίμηση του LOH σε κάθε μια από αυτές τις περιοχές αξιολογήθηκε με βάση τη συμπεριφορά του κάθε δείκτη. Η εμφάνιση LOH για ένα τουλάχιστο πολυμορφικό δείκτη αποτέλεσε ικανή και αναγκαία συνθήκη για να την ύπαρξη LOH στη συγκεκριμένη περιοχή.

Η περιοχή 1p36-36.2 εμφάνισε LOH σε 16 από τις 50 περιπτώσεις (32%), η περιοχή 1p32 ανέδειξε 11 LOH σε σύνολο 50 περιπτώσεων (22%), η περιοχή 1q21-23 εμφάνισε LOH σε 17 από 50 περιπτώσεις (34%) και τέλος η περιοχή 1q42-43 εμφάνισε 15 LOH σε σύνολο 50 περιπτώσεων (30%)

Τα παραπάνω αποτελέσματα συσχετίστηκαν με παθολογοανατομικές παραμέτρους, και συγκεκριμένα με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου, τη ύπαρξη διηθημένων επιχώριων λεμφαδένων, το μέγεθος του όγκου και την ύπαρξη δύο ιστολογικών παραμέτρων την ύπαρξη εκτεταμένου ενδοπορικού στοιχείου και την παρουσία λεμφαγγειακής διήθησης πέριξ του όγκου (πίνακας 8).

Για να διαπιστωθεί εάν η απώλεια της ετεροζυγωτίας στο χρωμόσωμα 1 σχετίζεται με κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους, χρησιμοποιήθηκε μονομεταβλητή καθώς και πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση. Στις μονομεταβλητές μεθόδους χρησιμοποιήθηκε το Fisher' s Exact test για να διαπιστωθεί εάν υπάρχει στατιστικώς σημαντική σχέση ανάμεσα στην απώλεια της ετεροζυγωτίας και τη κλινική ή ιστολογική παράμετρο (πίνακας 9), ενώ στη πολυμεταβλητή ανάλυση χρησιμοποιήθηκε λογιστική παλινδρόμηση για να ελέγξουμε αν οι χρωμοσωμικές περιοχές ταυτόχρονα επηρεάζουν τον εκάστοτε ιστολογικό ή κλινικό παράγοντα.

Μονομεταβλητή Στατιστική Ανάλυση:

Για να διαπιστωθεί αν ο βαθμός διαφοροποίησης (grade) έχει κάποια σχέση με την απώλεια της ετεροζυγωτίας, σχηματίσθηκαν πίνακες 2x2. Η κατηγορία των γυναικών με βαθμό διαφοροποίησης I συγχωνεύτηκε με την κατηγορία των γυναικών που με βαθμό διαφοροποίησης II καθώς παρατηρήθηκαν μόλις τέσσερις γυναίκες με όγκο βαθμού διαφοροποίησης I.

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά των δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν στο χρωμόσωμα 1

Δείκτης	Εντόπιση	Μέγεθος (bp)	Θερμοκρασία προσάρτησης (C ⁰)	LOH (%)
D1S165	1p36	156-177	50	20
FGR-1	1p36.1-36.2	135-143	55	14
CRTM	1p35	102-110	53	10
D1S186	1p	82-106	55	5
MYCL1	1p32	140-209	50	12
CLN-1	1p32	140-209	50	5
D1S162	1p32	134	53	12
D1S116	1p31.2	89-101	46	14
D1S305	1q21.1	156-176	55	19
CRP	1q21-q23	127-145	55	7
APOA2	1q21-q23	131-145	52	11
D1S104	1q21-q23	152-168	51	12
D1S416	1q	146-162	50	7
ACTN2	1q42-q43	91-107	52	11
ANGIOTEN	1q42-q43	113-133	50	11
D1S180	1q42	163-189	52	12

Παράλληλα, πολλές μελέτες στη βιβλιογραφία υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά, όσον αφορά στην επιβίωση, μεταξύ γυναικών με όγκο βαθμό διαφοροποίησης I και II. Έτσι, συγκρίθηκαν οι συχνότητες μεταξύ των γυναικών που είχαν όγκο grade I/II ή grade III και απώλεια ετεροζυγωτίας ή όχι στις διάφορες χρωμοσωμικές περιοχές. Συγκρίνοντας, λοιπόν, τις συχνότητες του βαθμού διαφοροποίησης στην χρωμοσωμική περιοχή 1p36-p36.2 βλέπουμε πως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις θεωρητικές και τις παρατηρούμενες συχνότητες. Με άλλα λόγια, η παρουσία ή όχι απώλειας της ετεροζυγωτίας στην χρωμοσωμική περιοχή 1p36-p36.2 δεν σχετίζεται στατιστικά με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου (p-value: >0.999). Ανάλογα είναι τα αποτελέσματα και για τις υπόλοιπες χρωμοσωμικές περιοχές, 1p32 (p-value: 0.118), 1q21-q23 (p-value: 0.303) και 1q42-43 (p-value: >0.999)

Τα αποτελέσματα της μονομεταβλητής ανάλυσης παρουσιάζονται στον πίνακα 9. Όσον αφορά το συσχετισμό του αριθμού των διηθημένων λεμφαδένων και της απώλειας της ετεροζυγωτίας δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική σχέση.

Στατιστικά σημαντική σχέση παρατηρείται ανάμεσα στην παρουσία εκτεταμένου ενδοπορικού στοιχείου (EIC) και την απώλεια της ετεροζυγωτίας στην χρωμοσωμική περιοχή 1q21-q23 (p-value: <0.001). Φαίνεται λοιπόν, πως οι όγκοι με LOH έχουν αυξημένη πιθανότητα να παρουσιάσουν εκτεταμένο ενδοπορικό στοιχείο. Επίσης, στατιστικά σημαντική σχέση παρατηρείται ανάμεσα στη λεμφαγειακή διήθηση και την χρωμοσωμική περιοχή 1q21-q23 (p-value: 0.033). Στις υπόλοιπες συγκρίσεις για το μέγεθος

του όγκου και τη διήθηση ή όχι των λεμφαδένων δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική σχέση.

Πολυμεταβλητή Στατιστική Ανάλυση:

Για να διαπιστωθεί αν ο συνδυασμός των δεδομένων από τις τέσσερις χρωμοσωμικές περιοχές ταυτόχρονα, μπορεί να δώσει κάποια επιπλέον πληροφορία για την πιθανότητα εμφάνισης μιας κλινικής ή ιστολογικής παραμέτρου, χρησιμοποιήθηκε λογιστική παλινδρόμηση.

Στην πρώτη περίπτωση, ως εξαρτημένη μεταβλητή θεωρήθηκε το βαθμός διαφοροποίησης και ως ανεξάρτητες (προγνωστικές) οι μεταβλητές 1p36-p36.2, 1p32, 1q21-q23 και 1q42-43. Αυτό που θέλαμε να ελέγξουμε είναι κατά πόσον ο συνδυασμός και η αλληλεπίδραση των πληροφοριών που έχουμε για τις τέσσερις αυτές χρωμοσωμικές περιοχές μπορούν να μας δώσουν στοιχεία για την πιθανότητα εμφάνισης μιας ιστολογικής παραμέτρου. Με άλλα λόγια, αν γνωρίζουμε ότι μια γυναίκα έχει LOH στις περιοχές 1p32, 1q21-q23, τότε μπορούμε να πούμε πως αυτή η γυναίκα έχει αυξημένη πιθανότητα να έχει όγκο μεγέθους T3;

Στο πρώτο λογιστικό μοντέλο, εξαρτημένη μεταβλητή ήταν ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου και ανεξάρτητες οι τέσσερις χρωμοσωμικές περιοχές για τις οποίες έχουμε δεδομένα. Όπως φαίνεται στον πίνακα 10, καμία από τις ανεξάρτητες μεταβλητές δεν είναι στατιστικά σημαντική. Με άλλα λόγια, δε μπορούμε να βγάλουμε κάποιο συμπέρασμα ή να κάνουμε μια πρόβλεψη για το βαθμό διαφοροποίησης ενός όγκου, αν γνωρίζουμε σε ποιες περιοχές υπάρχει απώλεια ετεροζυγωτίας.

Όσον αφορά το μέγεθος του όγκου και τη διήθηση των λεμφαδένων, όπως και προηγουμένως, δεν παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική

σχέση. Από την άλλη, υπάρχει και πάλι στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στο EIC και την περιοχή 1q21-q23. Στο συγκεκριμένο λογιστικό μοντέλο, το p-value είναι μικρότερο του 0.005 για την περιοχή αυτή, αλλά μεγαλύτερο του 0.005 για τις υπόλοιπες. Μπορούμε λοιπόν, όπως φάνηκε και από τη μονομεταβλητή στατιστική ανάλυση, να συσχετίσουμε την περιοχή αυτή με την αυξημένη πιθανότητα για την παρουσία εκτεταμένου ενδοπορικού στοιχείου, αλλά οι πληροφορίες που έχουμε για τις υπόλοιπες περιοχές δε φαίνεται να έχουν κάποια συμβολή για την αυξημένη αυτή πιθανότητα. Συνεπώς, μια γυναίκα με LOH στην περιοχή 1q21-q23 έχει 5.94 σχετικό κίνδυνο (Relative Risk) να παρουσιάσει εκτεταμένο ενδοπορικό στοιχείο σε σχέση με μια γυναίκα χωρίς LOH στην περιοχή αυτή.

Στο τελευταίο μοντέλο, αποδεικνύεται πως υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στη λεμφαγγειακή διήθηση και την απώλεια της ετεροζυγωτίας στην περιοχή 1q21-q23 (p-value: 0.004). Συνεπώς, μπορούμε να πούμε πως μια γυναίκα με απώλεια ετεροζυγωτίας στην περιοχή αυτή σχετικό κίνδυνο 2.44 να παρουσιάζει λεμφαγγειακή διήθηση σε σχέση με μια γυναίκα που δεν έχει LOH στην περιοχή αυτή.

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 10 πολυμορφικοί δείκτες για την μελέτη της απώλειας της ετεροζυγωτίας στις περιοχές 2p16, 3p21-p23 και 5q11-q13. Οι παραπάνω περιοχές αντιστοιχούν στις περιοχές εντόπισης των γονιδίων του συστήματος επιδιόρθωσης hMSH2, hMLH1 και hMSH3. Στο πίνακα 10 φαίνονται τα χαρακτηριστικά του κάθε δείκτη, καθώς και το ποσοστό LOH για κάθε έναν ξεχωριστά. Τα ποσοστά LOH για τις παραπάνω περιοχές είναι 12%, 16% και 8% αντίστοιχα. Η στατιστική ανάλυση μεταξύ του φαινομένου LOH στη περιοχή 2p16 και 3p21-p23 και

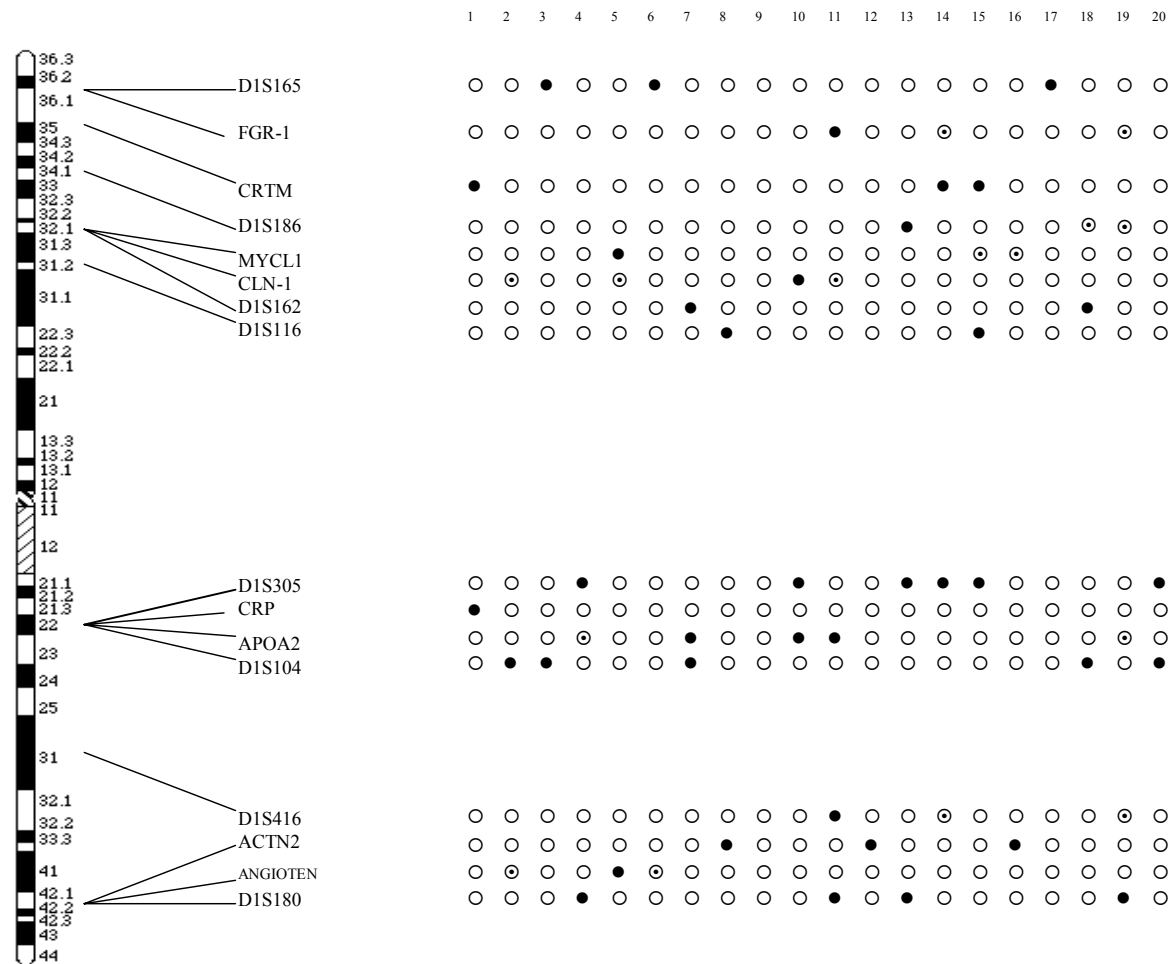
5q11-13 και των κλινικών και ιστολογικών χαρακτηριστικών που αναφέρθηκαν παραπάνω δεν ανέδειξε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

Πίνακας 8: Περιπτώσεις LOH προς το σύνολο των αξιολογησιμων περιπτώσεων

		1p36- p36.2	1p32	1q21-q23	1q42-43
Βαθμός	I-II	5/16	1/16	3/16	5/16
διαφοροποίησης	III	9/26	8/26	10/26	8/26
Διήθηση λεμφαδένων	+	7/24	6/24	10/24	5/24
	-	9/26	5/26	6/26	10/26
ΕΕΣ	-	11/29	6/29	2/29*	8/29
	+	4/17	4/17	12/17*	6/17
Μέγεθος Ογκου	T1-T2	13/40	10/40	13/40	13/40
	T3	3/10	1/10	4/10	2/10
Λεμφαγγειακή διήθηση	-	10/23	6/23	4/23*	7/23
	+	6/27	5/27	13/27*	8/27

Πίνακας 7: Χαρακτηριστικά των δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν στα χρωμοσώματα 2,3 και 5

Δείκτης	Εντόπιση	Μέγεθος (bp)	Θερμοκρασία	
			Προσάρτησης (C ⁰)	LOH (%)
D2S119	2p16	102	55	8
D2S288	2p16	105	55	8
D2S2182	2p16	130	55	6
D2S2291	2p16	140	55	8
D3S1561	3p21-23	141	55	6
D3S1611	3p21-23	160	55	9
D3S1612	3p21-23	100	52	4
D3S1260	3p21-23	185	52	14
D5S427	5q11-13	155	52	4
D5S647	5q11-13	141	52	6



Σχήμα 4: Εντόπιση συγκεκριμένων δεικτών στο χρωμόσωμα 1 και απώλεια ετεροζυγωτίας σε 20 χαρακτηριστικά καρκινώματα μαστού ● Απώλεια ετεροζυγωτίας ○ Ετεροζυγωτία ⊙ Μη αξιολογησιμες (non informative) περιπτώσεις

		1p36-p36.2		1p32		1q21-q23		1q42-43	
Βαθμός διαφ/ης		0	1	0	1	0	1	0	1
		p		p		p		p	
I- II III	I-	1	5	1	1	1	3	1	5
	II	1	1	5				1	5
	III	1	9	1	8	1	1	1	8
		7	0	8	8	6	0	8	8
		1.00		0.11		0.303		1.000	
Λεμφαδένες	-	1	7	1	6	1	1	1	5
	+	1	9	2	5	2	6	1	1
		7	6	1	8	0	0	6	0
		0.76		0.73		0.227		0.224	
ΕΕΣ	-	1	1	2	6	2	2	2	8
	+	1	4	1	4	5	1	1	6
		8	1	3	3	7		1	1
		0.35		1.00		<0.001		0.741	
		2	2	3	0	2	2	1	6
		3	2	3	0	2	2	1	6
		0.741		0		<0.001		0.741	
Μέγεθος Ογκου	T1	2	1	3	1	2	1	2	1
	-	7	3	0	0	7	3	7	3
	T2	7	3	9	1	6	4	8	2
	T3	7	3	9	1	6	4	8	2
		7	3	9	1	6	4	8	2
		1.00		0.42		0.717		0.702	
		0	0	3	3	4	4	2	2
Λεμφαγ/κη διήθηση	-	1	1	1	6	1	4	1	7
	+	3	0	7		9		6	
		2	6	2	5	1	1	1	8
		1	6	2	5	4	3	9	8
		0.13		0.73		0.0355		1.000	
		6	2	2	3	4	3	9	8

Πίνακας 9: Συχνότητες LOH περιπτώσεων ανά κλινική/ιστολογική παράμετρο και p-values του Fisher Exact Test

	p-value			
	1p36-p36.2	1p32	1q21-q23	1q42-43
Βαθμός διαφ/ης	0.248	0.103	0.858	0.610
Λεμφαδένες	0.464	0.149	0.981	0.302
ΕΕΣ	0.131	0.136	0.012	0.912
Μέγεθος όγκου	0.156	0.287	0.213	0.299
Λεμφαγ/κη διήθηση	0.556	0.487	0.004	0.158

Πίνακας 10: P-values των ανεξαρτήτων μεταβλητών λογιστικής παλινδρόμησης

5.5 Συζήτηση.

Η γενετική βάση του καρκίνου του μαστού έχει προκαλέσει το έντονο ενδιαφέρον των ερευνητών, ιδιαίτερα τη τελευταία δεκαετία. Έτσι, ενώ τα ογκογονίδια κατείχαν τη πρώτη θέση του ενδιαφέροντος στη προσπάθεια κατανόησης της μοριακής βάσης του καρκίνου, σήμερα τα ογκοκατασταλτικά γονίδια υπόσχονται να διδάξουν πολλά σε ότι αφορά τους μηχανισμούς της παθογένειας της νόσου. Η δυσκολία στη μελέτη τους υπόκεινται στο γεγονός ότι η απουσία τους από το κυτταρικό γονιδίωμα είναι αυτή που ευοδώνει τη καρκινογένεση.

Ένας ικανοποιητικός αριθμός δεδομένων αποδεικνύει ότι η κακοήθης εξαλλαγή απαιτεί τη διαδοχική συσσώρευση διαφόρων γενετικών αλλαγών. Ενεργοποίηση ογκογονιδίων και απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων μέσω μεταλλάξεων ή απώλεια τους καθώς και απώλεια της ικανότητας επιδιόρθωσης λαθών στο γενετικό υλικό, είναι μεταβολές ιδιαίτερα σημαντικές για την ογκογενετική διαδικασία.

Η μελέτη της απώλειας της ετεροζυγωτίας (LOH), αποτελεί τη κύρια μέθοδο ανίχνευσης της ύπαρξης ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε διάφορες θέσεις του γονιδιώματος. Σε ότι αφορά στο χρωμόσωμα 1, το οποίο μελετήσαμε διεξοδικά στη παρούσα μελέτη, φαίνεται ότι η απώλεια της ετεροζυγωτίας συμμετέχει στην ογκογενετική διαδικασία πολλών καρκίνων, όπως του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Praml S, 1995), του καρκίνου του στομάχου και του παχέος εντέρου (Ezaki T 1996, Kuroki T 1995), σε μεσοθηλίωμα (Taguchi T, 1993), νευροβλάστωμα (Maris JM, 1995) και μη- μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Gasparian AV, 1998).

Σε ότι αφορά στο καρκίνο του μαστού, έχει μελετηθεί η απώλεια της ετεροζυγωτίας σε διάφορες θέσεις του χρωμοσώματος 1 και έχει συσχετισθεί με κλινικά δεδομένα στη προσπάθεια εύρεσης προγνωστικών παραγόντων για καλύτερη θεραπευτική προσέγγιση των πασχόντων γυναικών.

Στη παρούσα μελέτη, για πρώτη φορά έγινε συσχέτιση της απώλειας της ετεροζυγωτίας στη χρωμοσωμική θέση 1q21-23 με δύο ανεξάρτητους ιστολογικούς παράγοντες τοπικής υποτροπής μετά από επέμβαση για καρκίνο του μαστού, το εκτεταμένο ενδοτορικό στοιχείο και την λεμφαγγειακή διήθηση πέριξ του όγκου.

Η τοπική υποτροπή, τόσο μετά από επέμβαση διατήρησης του μαστού, όσο και μετά από μαστεκτομή, αποτελεί ένα ιδιαίτερα τραυματικό γεγονός για την ασθενή, καθώς πολλές φορές αυξάνει και το κίνδυνο για μεταστατική νόσο. Η τοπική υποτροπή και η μεταστατική νόσος αποτελούν εν μέρει ανεξάρτητα μεταξύ τους γεγονότα, τόσο παθογενετικά, όσο και χρονικά. Κατά πόσο, σε κάποιες γυναίκες, η τοπική υποτροπή αποτελεί δείκτη ή την αιτία της μεταστατικής νόσου, παραμένει πρόβλημα στο οποίο δεν έχει δοθεί λύση (Veronesi U 1995, Voogd AC 1999),

Στη προσπάθεια να καθορισθούν ασφαλή κριτήρια για την επιλογή της κατάλληλης χειρουργικής προσέγγισης (μαστεκτομή/επέμβαση διατήρησης), έγινε συσχετισμός όλων των παραγόντων κινδύνου, τόσο για τοπική υποτροπή, όσο και για μεταστατική νόσο. Αναλύθηκαν τα αποτελέσματα δύο μεγάλων μελετών, της EORTC και DBCG, με συνολικό αριθμό 1772 ασθενών σταδίου I και II. Συμπερασματικά, φαίνεται πως η ηλικία κάτω των 35 ετών και το εκτεταμένο ενδοτορικό στοιχείο σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο τοπικής υποτροπής μετά από επέμβαση διατήρησης του μαστού, ενώ η λεμφαγγειακή

διήθηση πέριξ του όγκου αποτελεί παράγοντα κινδύνου, ανεξαρτήτου του τύπου της επέμβασης. Το μέγεθος του όγκου, η λεμφαδενική διήθηση, ο υψηλός βαθμός διαφοροποίησης και η λεμφαγγειακή διήθηση πέριξ του όγκου αποτελούν παράγοντες κινδύνου μεταστατικής νόσου, ανεξάρτητα από τη χειρουργική θεραπεία που επιλέχθηκε (DBCCGroup and EORTC, 2001)

Στη μελέτη μας έγινε συσχέτιση της απώλειας της ετεροζυγωτίας με κάθε ένα από τους παραπάνω παράγοντες, που ευθύνονται τόσο για τοπική υποτροπή, όσο και για μεταστατική νόσο. Δεν βρέθηκε καμιά στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με το μέγεθος του όγκου, το βαθμό διαφοροποίησης ή την ύπαρξη λεμφαδενικής διήθησης. Επίσης δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της απώλειας της ετεροζυγωτίας και της ηλικίας των ασθενών.

Σε ότι αφορά τα ποσοστά LOH στις υπόλοιπες περιοχές του χρωμοσώματος .ένα, είναι τέτοια που μας επιτρέπουν να συμπεράνουμε την ύπαρξη ογκοκατασταλτικών γονιδίων που σχετίζονται με το καρκίνο του μαστού.

Ο Tsukamoto και οι συνεργάτες του, έδειξαν ότι η απώλεια της ετεροζυγωτίας στη περιοχή 1p36 εμφανιζόταν συχνότερα σε επιθετικούς ιστολογικούς τύπους καρκινωμάτων μαστού (Tsukamoto K, 1998). Αργότερα η ίδια ομάδα συσχέτισε το υψηλό ποσοστό LOH στη περιοχή 1p36 (30%) με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και μείωση του ελευθέρου νόσου διαστήματος επιβίωσης (disease-free survival), σε ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες (Utada Y, 2000). Τα παραπάνω συμπεράσματα έγιναν με βάση τη παρακολούθηση των ασθενών μετεγχειρητικά και όχι μετά από συσχέτιση με επιμέρους ιστολογικούς παράγοντες.

Η συσχέτιση αυξημένου ποσοστού LOH στη περιοχή 1p με χαμηλής διαφοροποίησης ηπατοκυτταρικό καρκίνο (Kuroki T, 1995) καθώς και με κακοήθη εξαλλαγή μηνιγγιώματος (Ishino S, 1998) αποτελούν επιπλέον ενδείξεις για ύπαρξη ογκοκατασταλτικών γονιδίων, των οποίων η απώλεια ή απενεργοποίηση παίζει σπουδαίο ρόλο στη καρκινογένεση.

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε 8 πολυμορφικούς δείκτες για τις περιοχές 1p32 και 1p36-36.2. Τα ποσοστά LOH είναι 22% και 32% αντίστοιχα. Δεν ευρέθη καμία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με κλινικά ή ιστολογικά χαρακτηριστικά, αντίθετα με τις μελέτες που προαναφέρθηκαν. Το γεγονός αυτό πιθανό να οφείλεται στο διαφορετικό υλικό ασθενών, δεδομένου ότι στο δικό μας υλικό περιλαμβάνονται ασθενείς με πορογενή και λοβιακά καρκινώματα μαστού καθώς και ασθενείς με διηθημένους μασχαλαίους λεμφαδένες. Είναι λοιπόν πιθανό να θεωρήσουμε ότι η απώλεια ετεροζυγωτίας στη συγκεκριμένη περιοχή σχετίζεται με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που εμφανίζονται σε σπανιότερους ιστολογικούς τύπους καρκινωμάτων μαστού καθώς και σε πρωιμότερες μορφές της νόσου.

Αντίθετα με τον βραχίονα p του χρωμοσώματος 1, ο βραχίονας q δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, ιδιαίτερα σε ότι αφορά το καρκίνο του μαστού. Στη δική μας μελέτη χρησιμοποιήσαμε 7 πολυμορφικούς δείκτες για τον έλεγχο της απώλειας της ετεροζυγωτίας στη περιοχή 1q 21-23 και 1q 42-43. Και στις δύο παραπάνω χρωμοσωμικές περιοχές το ποσοστό LOH ήταν τέτοιο που να μας επιτρέπει να συμπεράνουμε την ύπαρξη ογκοκατασταλτικών γονιδίων στις περιοχές (34% και 30% αντίστοιχα). Στη περιοχή q42-43 δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των καρκίνων που μελετήθηκαν. Στη χρωμοσωμική περιοχή

1q 21-23 βρέθηκε πως οι όγκοι που εμφανίζουν συχνότερα απώλεια της ετεροζυγωτίας είναι αυτοί που εμφανίζουν δύο σημαντικές ιστολογικές παραμέτρους, το εκτεταμένο ενδοπορικό στοιχείο και τη λεμφαγγειακή διήθηση πέριξ του όγκου. Και τα δύο παραπάνω ιστολογικά χαρακτηριστικά αποτελούν ανεξάρτητους δείκτες τοπικής υποτροπής του όγκου, ενώ η λεμφαγγειακή διήθηση αποτελεί, όπως αναφέρθηκε παραπάνω και ανεξάρτητο δείκτη μεταστατικής νόσου. Άλλοι παράγοντες, που βιβλιογραφικά σχετίζονται με τη τοπική υποτροπή και τις απομακρυσμένες μεταστάσεις, είναι το μέγεθος του όγκου, ο βαθμός διαφοροποίησης, η διήθηση των μασχαλιαίων λεμφαδένων και η ηλικία της ασθενούς. Δεν βρέθηκε καμία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με κανένα από τους παραπάνω παράγοντες και την απώλεια ετεροζυγωτίας στη περιοχή 1q 21-23.

Πώς όμως μεταφράζεται η παραπάνω συσχέτιση και ποια είναι εν τέλει η σπουδαιότητά της;

Στη προσπάθεια εύρεσης νέων προγνωστικών δεικτών προκειμένου να καθορισθεί με επιτυχία ο θεραπευτικός χειρισμός που χρειάζεται η κάθε ασθενής, μειώνοντας στο ελάχιστο δυνατό τις επιπλοκές, η μοριακή βιολογία χρησιμοποιείται ευρέως τόσο στην επιλογή της κατάλληλης υπάρχουσας θεραπείας, όσο και στη είσοδο νέων θεραπευτικών πρωτοκόλλων για συγκεκριμένες ομάδες ασθενών. Η υπερέκφραση του γονιδίου HER-2/neu (human epidermal factor receptor-2) σε αναδρομικές κλινικές μελέτες φαίνεται πως σχετίζεται με ανθεκτικότητα στο χημειοθεραπευτικό σχήμα CMF και στη χορήγηση ταμοξιφένης (Stal O 1995, Borg A 1994). Σήμερα πλήθος τεχνικών βρίσκονται στη διάθεση μας για μέτρηση του HER2/neu, με σκοπό το καθορισμό του χημειοθεραπευτικού σχήματος. Επιπλέον, το μονοκλωνικό

αντίσωμα που στοχεύει στη πρωτεΐνη HER2, το trastuzumab (Herceptin) αποτελεί το πρώτο βιολογικό παράγοντα που χρησιμοποιείται σε μεταστατικό καρκίνο του μαστού με υπερέκφραση της HER2, με καλά αποτελέσματα (Cobleigh M, 1998).

Η παρατήρηση ότι η μεθυλίωση στις περιοχές εκκίνησης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων αποτελεί την απενεργοποίηση τους (Shahjehan A, 2001) οδήγησε την έρευνα στη προσπάθεια εύρεσης παραγόντων απομεθυλίωσης, όπως τα ρετινοειδή, τα οποία ήδη χρησιμοποιούνται σε πρωτόκολλα χημειοπροφύλαξης και θεραπείας πολλών καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού (Sporn MB, 2000).

Τα παραπάνω αποτελούν μερικές από τις εφαρμογές της μοριακής βιολογίας στη πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου. Η παρατήρηση ότι ογκοκατασταλτικά γονίδια σε συγκεκριμένες θέσεις του ανθρώπινου γενώματος σχετίζονται με συγκεκριμένους παράγοντες τοπικής υποτροπής του καρκίνου του μαστού ενδεχομένως να αποτελεί την αρχή για την εύρεση της ομάδας εκείνης των γυναικών στις οποίες η τοπική υποτροπή θα σχετίζεται αιτιολογικά με τη μεταστατική νόσο. Επιπλέον, θα είναι ίσως δυνατό να εξατομικευτεί το είδος της χειρουργικής επέμβασης, με σκοπό την αύξηση του διαστήματος επιβίωσης ελεύθερου νόσου (disease free survival).

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης μας, εστίασαμε το ενδιαφέρον μας στο φαινόμενο της απώλειας της ετεροζυγωτίας στα γονίδια του συστήματος επιδιόρθωσης κακοζευγαρωμένων βάσεων (mismatch repair genes). Τα γονίδια αυτά, έχουν ένα γενικότερο ρόλο στη διασφάλιση της ακεραιότητας της γενετικής πληροφορίας και η αναγνώριση του ρόλου τους στη καρκινογένεση διευκολύνθηκε πολύ από τη παρατήρηση του γεγονότος ότι οι

όγκοι με ελάττωμα στο σύστημα επιδιόρθωσης εμφανίζουν αστάθεια των αλληλουχιών του μικροδορυφορικού DNA (Aaltonen L, 1993). Επιπλέον, όπως και στα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα μεταλλαγμένα γονίδια του συστήματος επιδιόρθωσης έχουν συνήθως υπολειπόμενο χαρακτήρα και η κληρονομικότητα του φαινότυπου της νόσου με τον επικρατή χαρακτήρα, αντανακλά το υψηλό ποσοστό δεύτερου χτυπήματος (second-hit) γεγονότων κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ζωής του ατόμου.

Μελέτες μικροδορυφορικής αστάθειας σε σποραδικό καρκίνο του μαστού έδειξαν ότι ελαττωματικό σύστημα επιδιόρθωσης ενδεχομένως εμπλέκεται στη παθογένεια της νόσου (Yee CJ 1994, Paulson TJ 1996).

Ο Benachenhou και οι συνεργάτες του (Benachenhou N, 1999) μελετώντας 22 καρκινώματα μαστού για απώλεια της ετεροζυγωτίας στις περιοχές 3p21 και 5q11-q13 κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι παραπάνω περιοχές που αντιστοιχούν στα γονίδια επιδιόρθωσης hMLH1 και hMSH3 εμφανίζουν αυξημένο ποσοστό LOH (46% και 23% αντίστοιχα).

Στη δική μας μελέτη τα ποσοστά LOH για στις παραπάνω χρωμοσωμικές θέσεις είναι 16% και 8% αντίστοιχα. Η διαφορά αυτή πιθανό να οφείλεται στο διαφορετικό υλικό ασθενών, δεδομένου ότι στη πρώτη μελέτη το 50% των ασθενών είχαν μεταστατική νόσο και ως εκ τούτου το φαινόμενο της απώλειας της ετεροζυγωτίας στις περιοχές των γονιδίων του συστήματος επιδιόρθωσης να αποτελεί μοριακό γεγονός που συμμετέχει σε μηχανισμούς μεταστατικότητας του όγκου.

Συνοπτική περιγραφή συμπερασμάτων

Μελετήσαμε το φαινόμενο της απώλειας της ετεροζυγωτίας (LOH), σε πενήντα χειρουργήσιμους καρκίνους του μαστού. Στόχος μας η εύρεση χρωμοσωμικών θέσεων με πιθανή ύπαρξη ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Συνοπτικά τα συμπεράσματα μας είναι τα εξής :

1. Μελετήσαμε την εμφάνιση LOH στη χρωμοσωμική θέση 1p36-36.2, χρησιμοποιώντας 4 πολυμορφικούς δείκτες (D1S165, FGR-1, CRTM, D1S186). Το ποσοστό LOH είναι 32% (16/50).
2. Συσχετίστηκε το φαινόμενο της απώλειας της ετεροζυγωτίας με κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη καρκίνων και συγκεκριμένα με την ηλικία των ασθενών, το στάδιο της νόσου, το μέγεθος του όγκου, το βαθμό διαφοροποίησης, το εκτεταμένο ενδοτορικό στοιχείο και τη λεμφαγγειακή διήθηση περίξ του όγκου. Για τη περιοχή 1p36-36.2 δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση.
3. Η χρωμοσωμική θέση 1p32 εμφανίζει LOH σε 11 από τις 50 περιπτώσεις (22%), χρησιμοποιώντας τους δείκτες MYCL1, CLN-1, D1S162 και D1S116.
4. Δεν πιστοποιήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του φαινομένου LOH στη θέση 1p32 και κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά, πλην της θετικής συσχέτισης του δείκτη D1S116 και της ύπαρξης διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων ($p=0.01$).
5. Η περιοχή 1q21-23 ελέγχθηκε με τους πολυμορφικούς δείκτες D1S305, D1S305, CRP, APOA2 και D1S104 για εμφάνιση LOH. Το ποσοστό LOH είναι 34%(17/50).

6. Βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της απώλειας της ετεροζυγωτίας στη περιοχή 1p21-23 και δύο ιστολογικών παραμέτρων, του εκτεταμένου ενδοπορικού στοιχείου και της λεμφαγγειακής διήθησης πέριξ του όγκου ($p < 0.01$ και $p < 0.04$ αντίστοιχα). Και τα δύο ιστολογικά χαρακτηριστικά αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες τοπικής υποτροπής μετά από χειρουργική επέμβαση.
7. Η χρωμοσωμική περιοχή 1q42-43 εμφανίζει LOH σε ποσοστό 30%(15/50). Χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες D1S416, ACTN2, ANGIOTEN και D1S180.
8. Δεν παρατηρήθηκε στατιστική συσχέτιση της παραπάνω χρωμοσωμικής περιοχής με κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά.
9. Ελέγχθηκε το φαινόμενο της απώλεια στις ετεροζυγωτίας, ως μοριακό συμβάν στις θέσεις τις αντιστοιχούσες στα γονίδια του συστήματος επιδιόρθωσης (mismatch repair genes) hMSH2, hMLH1 και hMSH3. Η χρωμοσωμική θέση 2p16 (hMSH2), χρησιμοποιώντας τους δείκτες D2S288, D2S119, D2S2182 και D2S2291. Η περιοχή 3p21-23 (hMLH1) με τους δείκτες D3S1561, D3S1611, D3S1612 και D3S1260. Τέλος η περιοχή 5q11-13 με τους δείκτες D5S647 και D5S427. Τα ποσοστά εμφάνισης LOH στις παραπάνω περιοχές είναι 12%, 16% και 8% αντίστοιχα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aaltonen, L. A., P. Peltomaki, et al. (1993). "Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer." Science **260**(5109): 812-6.
2. Aaltonen, L. A., P. Peltomaki, et al. (1994). "Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients." Cancer Res **54**(7): 1645-8.
3. Aas, T., A. L. Borresen, et al. (1996). "Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients." Nat Med **2**(7): 811-4.
4. Albain, K. S., D. C. Allred, et al. (1994). "Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials?" J Natl Cancer Inst Monogr(16): 35-42.
5. Ang, P. and J. E. Garber (2001). "Genetic susceptibility for breast cancer--risk assessment and counseling." Semin Oncol **28**(4): 419-33.
6. Anscher, M. S., P. Jones, et al. (1993). "Local failure and margin status in early-stage breast carcinoma treated with conservation surgery and cancer." Br. J. Canc **79**(7/8): 1012-1017
7. Arnheim N., Erlich H. (1992). Polymerase chain reaction strategy. Annu. Rev. Biochem. **61**: 131-156
8. Ben-Jonathan, N., J. L. Mershon, et al. (1996). "Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects." Endocr Rev **17**(6): 639-69.
9. Benachenhou N, Guival S., et al. Frequent loss of heterozygosity at the DNA mismatch repair loci hMLH1 and hMSH3 in sporadic breast
10. Bird, A. P. (1986). "CpG-rich islands and the function of DNA methylation." Nature **321**(6067): 209-13.
11. Blichert-Toft, M., C. Rose, et al. (1992). "Danish randomized trial comparing breast conservation therapy with mastectomy: six years of life-table analysis. Danish Breast Cancer Cooperative Group." J Natl Cancer Inst Monogr(11): 19-25.
12. Borg A, Baldetorp B., et al (1994) erb-2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid receptor positive breast cancer. Cancer **31**: 127-144
13. Borg A, Zhang Q-X, et al (1992). Chromosome 1 alterations in breast cancer: Allelic Loss is related to lymphogenic metastases and poor prognosis. Genes Chromosom Cancer **5**: 311-320.
14. Castilla, L. H., F. J. Couch, et al. (1994). "Mutations in the BRCA1 gene in families with early-onset breast and ovarian cancer." Nat Genet **8**(4): 387-91.
15. Cavenee, W. K., T. P. Dryja, et al. (1983). "Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma." Nature **305**(5937): 779-84.

16. Cedar, H. (1988). "DNA methylation and gene activity." Cell **53**(1): 3-4.
17. Cobleigh M, Vogel C.L., et al (1998). Efficacy and safety of Herceptin as a single agent in 222 women with HER2 overexpression who relapsed following chemotherapy for metastatic breast cancer. "Proc. Am. Soc. Clin. Onc." **17**:376
18. Cho, K. R. and E. R. Fearon (1995). "DCC: linking tumour suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer?" Eur J Cancer **31A**(7-8): 1055-60.
19. Consensus Conference on the classification of ductal carcinoma in situ. (1997) Hum Pathol **28**: 1221-1224.
20. Couch, F. J. and B. L. Weber (1996). "Mutations and polymorphisms in the familial early-onset breast cancer (BRCA1) gene. Breast Cancer Information Core." Hum Mutat **8**(1): 8-18.
21. Couch, F. J., L. M. Farid, et al. (1996). "BRCA2 germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families." Nat Genet **13**(1): 123-5.
22. Cox, E. C. (1976). "Bacterial mutator genes and the control of spontaneous mutation." Annu Rev Genet **10**: 135-56.
23. da Costa, L. F. (2001). "Return of de-differentiation: why cancer is a developmental disease." Curr Opin Oncol **13**(1): 58-62.
24. d'Agnano, I., B. Bucci, et al. (1996). "DNA ploidy, cell kinetics, and epidermal growth factor receptor and HER2/neu oncoprotein expression in primary operable breast cancer." Ann N Y Acad Sci **784**: 472-81.
25. Dahiya, R., G. Perinchery, et al. (1998). "Multiple sites of loss of heterozygosity on chromosome 8 in human breast cancer has differential correlation with clinical parameters." Int J Oncol **12**(4): 811-6.
26. DBCC & EORTC (2001). Differences in risk factors for local and distant recurrence after breast conservation therapy or mastectomy for stage I and stage II breast cancer. Pooled results of two large European trials. "Jour. Clin. Onc." **19**(6): 1688-1697
27. Del Sal, G., E. M. Ruaro, et al. (1995). "Gas1-induced growth suppression requires a transactivation-independent p53 function." Mol Cell Biol **15**(12): 7152-60.
28. Deng, C. X. and F. Scott (2000). "Role of the tumor suppressor gene Brca1 in genetic stability and mammary gland tumor formation." Oncogene **19**(8): 1059-64.
29. Detorakis ET, Sourvinos G, et al (1998). "Evaluation of loss of heterozygosity and microsatellite instability in human pterygium: clinical correlations". Br J Ophthalmol **82**: 1324-28.
30. Devilee P, Cornelisse C.(1994) Somatic genetic changes in human breast cancer." Biochem Biophys Acta"**1198**: 113-130.
31. Dickson, R. B. and M. E. Lippman (1995). "Growth factors in breast cancer." Endocr Rev **16**(5): 559-89.
32. Dittmer, D., S. Pati, et al. (1993). "Gain of function mutations in p53." Nat Genet **4**(1): 42-6.

33. Doolittle, R. F., M. W. Hunkapiller, et al. (1983). "Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor." Science **221**(4607): 275-7.
34. Dupont, W. D., F. F. Parl, et al. (1993). "Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia." Cancer **71**(4): 1258-65.
35. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (1995). "Effects of radiotherapy and surgery in early breast cancer. An overview of the randomized trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group." N Engl J Med **333**(22): 1444-55.
36. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (1998). "Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group." Lancet **351**(9114): 1451-67.
37. Enenstein, J., N. S. Waleh, et al. (1992). "Basic FGF and TGF-beta differentially modulate integrin expression of human microvascular endothelial cells." Exp Cell Res **203**(2): 499-503.
38. Eppert, K., S. W. Scherer, et al. (1996). "MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma." Cell **86**(4): 543-52.
39. Eshleman, J. R. and S. D. Markowitz (1996). "Mismatch repair defects in human carcinogenesis." Hum Mol Genet **5 Spec No**: 1489-94.
40. Eshleman, J. R., E. Z. Lang, et al. (1995). "Increased mutation rate at the hprt locus accompanies microsatellite instability in colon cancer." Oncogene **10**(1): 33-7.
41. Ezaki T, Yanagisawa A, et al (1996). Deletion mapping on chromosome 1p in well-differentiated gastric cancer. "Br J Cancer" **73**: 424-8
42. Fan, S., J. Wang, et al. (1999). "BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells." Science **284**(5418): 1354-6.
43. Ferguson, A. T., R. G. Lapidus, et al. (1995). "Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells can reactivate estrogen receptor gene expression." Cancer Res **55**(11): 2279-83.
44. Field JK, Kiaris H et al (1995). "Allelotype of squamous cell carcinoma of head and neck: fractional allelic loss correlates with survival". Br J Cancer **72**: 1180-88.
45. Fisher, B., C. Redmond, et al. (1988). "Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06." J Clin Oncol **6**(7): 1076-87.
46. Fisher, B., J. P. Costantino, et al. (1998). "Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study." J Natl Cancer Inst **90**(18): 1371-88.
47. Fisher, B., M. Bauer, et al. (1985). "Five-year results of a randomized clinical trial comparing total mastectomy and segmental mastectomy with or without radiation in the treatment of breast cancer." N Engl J Med **312**(11): 665-73.
48. Fisher, D. E. (1994). "Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold." Cell **78**(4): 539-42.
49. Fisher, E. R., C. Redmond, et al. (1980). "Histologic grading of breast cancer." Pathol Annu **15**(Pt 1): 239-51.

50. FitzGerald, M. G., D. J. MacDonald, et al. (1996). "Germ-line BRCA1 mutations in Jewish and non-Jewish women with early-onset breast cancer." N Engl J Med **334**(3): 143-9.
51. Ford, D., D. F. Easton, et al. (1994). "Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium." Lancet **343**(8899): 692-5.
52. Foster, S. A., D. J. Wong, et al. (1998). "Inactivation of p16 in human mammary epithelial cells by CpG island methylation." Mol Cell Biol **18**(4): 1793-801.
53. Fukasawa, K., T. Choi, et al. (1996). "Abnormal centrosome amplification in the absence of p53." Science **271**(5256): 1744-7.
54. Futamura, M., H. Arakawa, et al. (2000). "Potential role of BRCA2 in a mitotic checkpoint after phosphorylation by hBUBR1." Cancer Res **60**(6): 1531-5.
55. Futreal, P. A., Q. Liu, et al. (1994). "BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas." Science **266**(5182): 120-2.
56. Gasparian AV, Laktionov KK, et al (1998). "Allelic imbalance and instability of microsatellite loci on chromosome 1p in human non-small-cell lung cancer". Br J Cancer **77**: 1604-11.
57. Gorsch, S. M., V. A. Memoli, et al. (1992). "Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer." Cancer Res **52**(24): 6949-52.
58. Grundy, P. (1997). "Molecular basis of Wilms' tumor." Cancer Treat Res **92**: 101-23.
59. Haffty, B. G., M. Reiss, et al. (1996). "Ipsilateral breast tumor recurrence as a predictor of distant disease: implications for systemic therapy at the time of local relapse." J Clin Oncol **14**(1): 52-7.
60. Hahn, S. A., M. Schutte, et al. (1996). "DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1." Science **271**(5247): 350-3.
61. Hall, J. M., M. K. Lee, et al. (1990). "Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21." Science **250**(4988): 1684-9.
62. Han, H. J., A. Yanagisawa, et al. (1993). "Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer." Cancer Res **53**(21): 5087-9.
63. Hankinson, S. E., W. C. Willett, et al. (1998). "Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer." Lancet **351**(9113): 1393-6.
64. Harris, J. R., M. E. Lippman, et al. (1992). "Breast cancer (1)." N Engl J Med **327**(5): 319-28.
65. Hartwell, L. H. and M. B. Kastan (1994). "Cell cycle control and cancer." Science **266**(5192): 1821-8.
66. Haupt, Y., R. Maya, et al. (1997). "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53." Nature **387**(6630): 296-9.
67. Hengst, L. and S. I. Reed (1998). "Inhibitors of the Cip/Kip family." Curr Top Microbiol Immunol **227**: 25-41.

68. Herman, J. G., A. Umar, et al. (1998). "Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 6870-5.
69. Holmgren, L., M. S. O'Reilly, et al. (1995). "Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression." Nat Med **1**(2): 149-53.
70. Hortobagyi, G. N. (1998). "Treatment of breast cancer." N Engl J Med **339**(14): 974-84.
71. Huang, J., N. Papadopoulos, et al. (1996). "APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(17): 9049-54.
72. Huang, T. H., P. L. Yeh, et al. (1995). "Genetic alterations of microsatellites on chromosome 18 in human breast carcinoma." Diagn Mol Pathol **4**(1): 66-72.
73. Hurd, C., N. Khattree, et al. (1997). "Regulation of tumor suppressor proteins, p53 and retinoblastoma, by estrogen and antiestrogens in breast cancer cells." Oncogene **15**(8): 991-5.
74. Hussussian, C. J., J. P. Struewing, et al. (1994). "Germline p16 mutations in familial melanoma." Nat Genet **8**(1): 15-21.
75. Ionov, Y., M. A. Peinado, et al. (1993). "Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis." Nature **363**(6429): 558-61
76. Ishino S., Hashimoto n. et al (1998). Loss of material from chromosome arm 1p during malignant progression of meningioma revealed by fluorescent in situ hybriditation. "Cancer" **83** : 360-366
77. Kamb, A. (1995). "Cell-cycle regulators and cancer." Trends Genet **11**(4): 136-40.
78. Kasami, M., C. L. Vnencak-Jones, et al. (1997). "Loss of heterozygosity and microsatellite instability in breast hyperplasia. No obligate correlation of these genetic alterations with subsequent malignancy." Am J Pathol **150**(6): 1925-32.
79. Kashiwaba, M., G. Tamura, et al. (1994). "Aberrations of the APC gene in primary breast carcinoma." J Cancer Res Clin Oncol **120**(12): 727-31.
80. Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-3.
81. Korach, K. S. (1994). "Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor." Science **266**(5190): 1524-7.
82. Kuiper, G. G., E. Enmark, et al. (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in Y rat prostate and ovary." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5925-30.
83. Kumar, R., M. Mandal, et al. (1996). "Overexpression of HER2 modulates bcl-2, bcl-XL, and tamoxifen-induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells." Clin Cancer Res **2**(7): 1215-9.
84. Kuroki T ,Fujicara Y et al (1995). Accumulation of genetic changes during devevelopment and progression of hepatocellular carcinoma loss of heterozygosity of chromosomal arm 1p occurs at an early stage of hepatocarcinogenesis. "Gen Chrom.Cancer" **13**: 163-167

85. Kuroki T, Fujiwara Y, et al. (1995) "Accumulations of genetic changes during development and progression of hepatocellular carcinoma: loss of heterozygosity of chromosome arm 1p occurs at an early stage of hepatocarcinogenesis?". Genes Chromosom Cancer **13**: 163-7.
86. Kyprianou, N., H. F. English, et al. (1991). "Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation." Cancer Res **51**(1): 162-6.
87. Laird, P. W. and R. Jaenisch (1996). "The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics." Annu Rev Genet **30**: 441-64.
88. Landis, S. H., T. Murray, et al. (1999). "Cancer statistics, 1999." CA Cancer J Clin **49**(1): 8-31, 1.
89. Langston, A. A., K. E. Malone, et al. (1996). "BRCA1 mutations in a population-based sample of young women with breast cancer." N Engl J Med **334**(3): 137-42.
90. Lapidus, R. G., A. T. Ferguson, et al. (1996). "Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors." Clin Cancer Res **2**(5): 805-10.
91. Lapidus, R. G., S. J. Nass, et al. (1998). "Mapping of ER gene CpG island methylation-specific polymerase chain reaction." Cancer Res **58**(12): 2515-9.
92. Lapidus, R. G., S. J. Nass, et al. (1998). "The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer." J Mammary Gland Biol Neoplasia **3**(1): 85-94.
93. Latif, F., K. Tory, et al. (1993). "Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene." Science **260**(5112): 1317-20.
94. Lee, A. V., S. G. Hilsenbeck, et al. (1998). "IGF system components as prognostic markers in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **47**(3): 295-302.
95. Levine, A. J. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." Cell **88**(3): 323-31.
96. Li, G. M. and P. Modrich (1995). "Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(6): 1950-4.
97. Liu, B., N. C. Nicolaidis, et al. (1995). "Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability." Nat Genet **9**(1): 48-55.
98. Liu, B., R. Parsons, et al. (1996). "Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients." Nat Med **2**(2): 169-74.
99. Loeb L , A. (1974). Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. "Canc. Res." **34**: 2311-21
100. Loeb, L. A. (1991). "Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis." Cancer Res **51**(12): 3075-9.
101. Loeb, L. A. (1994). "Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer." Cancer Res **54**(19): 5059-63.

102. Lynch, H. T., S. Lanspa, et al. (1991). "Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I & II). Genetics, pathology, natural history, and cancer control, Part I." Cancer Genet Cytogenet **53**(2): 143-60.
103. Malkhosyan, S., N. Rampino, et al. (1996). "Frameshift mutator mutations." Nature **382**(6591): 499-500.
104. Malkin, D. (1994). "Germline p53 mutations and heritable cancer." Annu Rev Genet **28**: 443-65.
105. Maris JM, White PS, et al (1995). "Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma". Cancer Res **55**: 4664-9.
106. Mathew S, Murty VVVS, et al (1994). "Loss of heterozygosity identifies multiple sites of allelic deletions on chromosome 1 in human male germ cell tumors". Cancer Res **54**: 6265-69.
107. Mathoulin-Portier M-P, Meynard P, C, et al (1999). "Peritumoral vascular invasion in women with node-negative breast cancer, receiving no adjuvant therapy". Anticancer Res **19**: 843-848.
108. McLeskey, S. W., L. Zhang, et al. (1998). "Tamoxifen-resistant fibroblast growth factor-transfected MCF-7 cells are cross-resistant in vivo to the antiestrogen ICI 182,780 and two aromatase inhibitors." Clin Cancer Res **4**(3): 697-711.
109. Mertani, H. C., T. Garcia-Caballero, et al. (1998). "Cellular expression of growth hormone and prolactin receptors in human breast disorders." Int J Cancer **79**(2): 202-11.
110. Mettlin, C. (1999). "Global breast cancer mortality statistics." CA Cancer J Clin **49**(3): 138-44.
111. Miki, Y., J. Swensen, et al. (1994). "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1." Science **266**(5182): 66-71.
112. Miller, C., T. Mohandas, et al. (1986). "Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17." Nature **319**(6056): 783-4.
113. Mitchell ELD,(1990). 1p13 is the most frequently involved band in structural chromosomal rearrangements in human breast cancer. "Genes Chromosom Cancer" **2**: 278-89
114. Modrich, P. (1994). "Mismatch repair, genetic stability, and cancer." Science **266**(5193): 1959-60.
115. Muller, R. (1995). "Transcriptional regulation during the mammalian cell cycle." Trends Genet **11**(5): 173-8.
116. Murray, A. W. (1992). "Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls." Nature **359**(6396): 599-604.
117. Nass, S. J. and N. E. Davidson (1999). "The biology of breast cancer." Hematol Oncol Clin North Am **13**(2): 311-32.
118. Nass, S. J., M. Li, et al. (1996). "Role for Bcl-xL in the regulation of apoptosis by EGF and TGF beta 1 in c-myc overexpressing mammary epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **227**(1): 248-56.
119. Neuhausen, S., T. Gilewski, et al. (1996). "Recurrent BRCA2 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish women affected by breast cancer." Nat Genet **13**(1): 126-8.

120. Nevins, J. R. (1992). "E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins." Science **258**(5081): 424-9.
121. Nixon, A. J., D. Neuberg, et al. (1994). "Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer." J Clin Oncol **12**(5): 888-94.
122. Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." Science **194**(4260): 23-8.
123. Oates, A. J., L. M. Schumaker, et al. (1998). "The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R), a putative breast tumor suppressor gene." Breast Cancer Res Treat **47**(3): 269-81.
124. Oesterreich, S. and S. A. Fuqua (1999). "Tumor suppressor genes in breast cancer." Endocr Relat Cancer **6**(3): 405-19.
125. Oesterreich, S., D. C. Allredl, et al. (2001). "High rates of loss of heterozygosity on chromosome 19p13 in human breast cancer." Br J Cancer **84**(4): 493-8.
126. Oh, Y. (1998). "IGF-independent regulation of breast cancer growth by IGF binding proteins." Breast Cancer Res Treat **47**(3): 283-93.
127. Ormandy, C. J., R. E. Hall, et al. (1997). "Coexpression and cross-regulation of the prolactin receptor and sex steroid hormone receptors in breast cancer." J Clin Endocrinol Metab **82**(11): 3692-9.
128. Osborne, C. K., D. H. Boldt, et al. (1983). "Effects of tamoxifen on human breast cancer cell cycle kinetics: accumulation of cells in early G1 phase." Cancer Res **43**(8): 3583-5.
129. Ozbun, M. A. and J. S. Butel (1995). "Tumor suppressor p53 mutations and breast cancer: a critical analysis." Adv Cancer Res **66**: 71-141.
130. Papadopoulos, N., N. C. Nicolaides, et al. (1994). "Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer." Science **263**(5153): 1625-9.
131. Parsons, R., G. M. Li, et al. (1993). "Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells." Cell **75**(6): 1227-36.
132. Paulson T. S. et al (1996). Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. "Cancer Res" **56** :4021-4026
133. Pichon, M. F., P. Broet, et al. (1996). "Prognostic value of steroid receptors after long-term follow-up of 2257 operable breast cancers." Br J Cancer **73**(12): 1545-51.
134. Pollak, M. N. (1998). "Endocrine effects of IGF-I on normal and transformed breast epithelial cells: potential relevance to strategies for breast cancer treatment and prevention." Breast Cancer Res Treat **47**(3): 209-17.
135. Praml S, Finke LH, et al (1995). "Deletion mapping defines different regions in 1p34.2 that may harbor genetic information related to human colorectal cancer." Oncogene **11**: 1357-62
136. Rabbitts, T. H. (1994). "Chromosomal translocations in human cancer." Nature **372**(6502): 143-9.

137. Rampino, N., H. Yamamoto, et al. (1997). "Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype." Science **275**(5302): 967-9.
138. Rasmussen, A. A. and K. J. Cullen (1998). "Paracrine/autocrine regulation of breast cancer by the insulin-like growth factors." Breast Cancer Res Treat **47**(3): 219-33.
139. Reed, J. C. (1996). "Balancing cell life and death: bax, apoptosis, and breast cancer." J Clin Invest **97**(11): 2403-4.
140. Reed, J. C. (2000). "Mechanisms of apoptosis." Am J Pathol **157**(5): 1415-30.
141. Reiss, M. (1997). "Transforming growth factor-beta and cancer: a love-hate relationship?" Oncol Res **9**(9): 447-57.
142. Riggins, G. J., S. Thiagalingam, et al. (1996). "Mad-related genes in the human." Nat Genet **13**(3): 347-9.
143. Risinger, J. I., A. Umar, et al. (1996). "Mutation of MSH3 in endometrial cancer and evidence for its functional role in heteroduplex repair." Nat Genet **14**(1): 102-5.
144. Risinger, J. I., J. C. Barrett, et al. (1996). "Molecular genetic evidence of the occurrence of breast cancer as an integral tumor in patients with the hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma syndrome." Cancer **77**(9): 1836-43.
145. Rubin, H. (1985). "Cancer as a dynamic developmental disorder." Cancer Res **45**(7): 2935-42.
146. Saiki R.K., Scharf S., et al (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genome sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. "Science" **12** : 1350-4
147. Sager, R. (1985). "Genetic suppression of tumor formation." Adv Cancer Res **44**: 43-68.
148. Schaaper R. M. (1993). The mutational specificity of two Escherichia coli dnaE antimutator alleles as determined from lacI mutation spectra. "Genetics" **134** : 1031-8
149. Scully, R., J. Chen, et al. (1997). "Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage." Cell **90**(3): 425-35.
150. Serrano, M. (1997). "The tumor suppressor protein p16INK4a." Exp Cell Res **237**(1): 7-13.
151. Shaw, J. A., T. Walsh, et al. (1996). "Microsatellite instability in early sporadic breast cancer." Br J Cancer **73**(11): 1393-7.
152. Silberstein, G. B., K. Van Horn, et al. (1997). "Altered expression of the WT1 wilms tumor suppressor gene in human breast cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(15): 8132-7.
153. Sloane J, Anderson TJ, et al (1995). "Guidelines for Breast Pathology Services", 2nd edn, Sheffield NHSBSP Publications
154. Sourvinos, G., H. Kiaris, et al. (1997). "Microsatellite instability and loss of heterozygosity in primary breast tumours." Tumour Biol **18**(3): 157-66.
155. Sourvinos G, Spandidos DA.(1998) "Decreased BRCA1 expression levels may arrest the cell cycle through activation of p53 checkpoint in human sporadic breast tumors". Bioch Bioph Res Commun **245**: 75-80

156. Spandidos D.A, Siminovitch L. (1977). Transfer of anchorage independence by isolated metaphase chromosomes in hamster cells. "Cell" **12** : 675-82
157. Spandidos DA., Siminovitch L., (1998) The relationship between transformation and somatic mutation in human and chinese hamster cells. "Cell" **13**: 651-62
158. Spandidos DA, Sourvinos G,et al (1997) "Microsatellite instability and loss of heterozygosity in human pterygium". Br J Ophthalmol **81**: 493-96
159. Stal O., Sullivan S., et al (1995). C-erb B-2 expression and benefit from adjuvant chemotherapy and radiotherapy of breast cancer. "Eur. J. Cancer" **31**: 2185-2190
160. Sporn MB.(2000). Retinoids and demethylating agents- Looking for patients. "JNCI" **192**(10) : 780-781
161. Stanbridge, E. J. (1990). "Human tumor suppressor genes." Annu Rev Genet **24**: 615-57.
162. Stahjehan A., Peter N., et al (2001). DNA methylation. An alternative pathway to cancer. "Ann. Surg" **234** : 10-20
163. Stirzaker, C., D. S. Millar, et al. (1997). "Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors." Cancer Res **57**(11): 2229-37.
164. Struewing, J. P., D. Abeliovich, et al. (1995). "The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals." Nat Genet **11**(2): 198-200.
165. Surmacz, E., M. A. Guvakova, et al. (1998). "Type I insulin-like growth factor receptor function in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **47**(3): 255-67.
166. Sweeney, K. J., E. A. Musgrove, et al. (1996). "Cyclins and breast cancer." Cancer Treat Res **83**: 141-70.
167. Tabin, C. J., S. M. Bradley, et al. (1982). "Mechanism of activation of a human oncogene." Nature **300**(5888): 143-9.
168. Taguchi T, Jhanwar S, et al (1993). "Recurrent deletions of specific chromosomal sites in 1p, 3p, 6q, and 9p in human malignant mesothelioma". Cancer Res **53**: 4349-55
169. Takahashi, H., K. Behbakht, et al. (1995). "Mutation analysis of the BRCA1 gene in ovarian cancers." Cancer Res **55**(14): 2998-3002.
170. Tavtigian, S. V., J. Simard, et al. (1996). "The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds." Nat Genet **12**(3): 333-7.
171. Teixeira, C., J. C. Reed, et al. (1995). "Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells." Cancer Res **55**(17): 3902-7.
172. Thibodeau, S. N., G. Bren, et al. (1993). "Microsatellite instability in cancer of the proximal colon." Science **260**(5109): 816-9.
173. Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **267**(5203): 1456-62.

174. Thompson F, Emerson J, et al. (1993) Clonal chromosome abnormalities in human breast carcinomas. I. Twenty-eight cases with primary disease. "Genes Chromosom Cancer" **7**: 185-93.
175. Tornell, J., L. Rymo, et al. (1991). "Induction of mammary adenocarcinomas in metallothionein promoter-human growth hormone transgenic mice." Int J Cancer **49**(1): 114-7.
176. Trichopoulos, D., B. MacMahon, et al. (1972). "Menopause and breast cancer risk." J Natl Cancer Inst **48**(3): 605-13.
177. Tsukamoto, K., N. Ito, et al. (1998). "Allelic loss on chromosome 1p is associated with progression and lymph node metastasis of primary breast carcinoma." Cancer **82**(2): 317-22.
178. Tsukamoto K. N., Ifo, et al (1998). Allelic loss on chromosome 1p is associated with progression and lymph node metastasis of primary breast carcinoma. "Cancer" **82**: 317-322
179. Tsukamoto K, Ito N, et al (1998). Allelic Loss on chromosome 1p is associated with progression and lymph node metastasis of primary breast carcinoma. "Cancer" **82**: 317-22.
180. Utado Y., Yoshimoto M. et al (2000). Allelic loss of 1p34-36 predicts poor prognosis in node negative breast cancer. "Clin. Can. Res." **6**:3193-98
181. van Dongen, J. A., H. Bartelink, et al. (1992). "Randomized clinical trial to assess the value of breast-conserving therapy in stage I and II breast cancer, EORTC 10801 trial." J Natl Cancer Inst Monogr(11): 15-8.
182. van Garderen, E., M. de Wit, et al. (1997). "Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors. Evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop." Am J Pathol **150**(3): 1037-47
183. Vasen, H. F., J. P. Mecklin, et al. (1991). "The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC)." Dis Colon Rectum **34**(5): 424-5.
184. Veronesi, U., R. Saccozzi, et al. (1981). "Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy in patients with small cancers of the breast." N Engl J Med **305**(1): 6-11.
185. Veronesi U, Luini A, et al (1992). "Radiotherapy after breast-preserving surgery in women with localized cancer of the breast". N Engl J Med **328**: 1587-91
186. Veronesi U.(1995) "Breast cancer Trials on conservative surgery". Eur J Surg Oncol **21**: 231-239.
187. Veronesi U, Marubini E, et al (1995). "Local recurrences and distant metastasis after conservative breast cancers treatments partly independent events". J Natl Cancer Inst **87**: 19-27.
188. Vladusic, E. A., A. E. Hornby, et al. (1998). "Expression of estrogen receptor beta messenger RNA variant in breast cancer." Cancer Res **58**(2): 210-4.
189. Voogd, A. C., G. van Tienhoven, et al. (1999). "Local recurrence after breast conservation therapy for early stage breast carcinoma: detection, treatment, and outcome in 266 patients. Dutch Study Group on Local Recurrence after Breast Conservation (BORST)." Cancer **85**(2): 437-46.

190. Voogd A. C., Peterse J. L. (1999). Histologic determinants for different types of local recurrence after breast conserving therapy of invasive breast cancer. "Eur. J. Cancer" **35**:1828-1837
191. Voogd, A. C., J. L. Peterse, et al. (1999). "Histological determinants for different types of local recurrence after breast-conserving therapy of invasive breast cancer. Dutch Study Group on local Recurrence after Breast Conservation (BORST)." Eur J Cancer **35**(13): 1828-37.
192. Voogd, A. C., M. Nielsen, et al. (2001). "Differences in risk factors for local and distant recurrence after breast-conserving therapy or mastectomy for stage I and II breast cancer: pooled results of two large European randomized trials." J Clin Oncol **19**(6): 1688-97.
193. Wang, H., M. Rubin, et al. (1997). "Basic fibroblast growth factor causes growth arrest in MCF-7 human breast cancer cells while inducing both mitogenic and inhibitory G1 events." Cancer Res **57**(9): 1750-7.
194. Wang, Q., P. Maloof, et al. (1998). "Basic fibroblast growth factor downregulates Bcl-2 and promotes apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells." Exp Cell Res **238**(1): 177-87.
195. Waters, J. S., A. Webb, et al. (2000). "Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma." J Clin Oncol **18**(9): 1812-23.
196. Weinberg, R. A. (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control." Cell **81**(3): 323-30.
197. Wooster, R., A. M. Cleton-Jansen, et al. (1994). "Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers." Nat Genet **6**(2): 152-6.
198. Wooster, R., G. Bignell, et al. (1995). "Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2." Nature **378**(6559): 789-92.
199. Yaremko, M. L., W. M. Recant, et al. (1995). "Loss of heterozygosity from the short arm of chromosome 8 is an early event in breast cancers." Genes Chromosomes Cancer **13**(3): 186-91.
200. Yee, C. J., N. Roodi, et al. (1994). "Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer." Cancer Res **54**(7): 1641-4.
201. Yeh SH, Chen PJ, (1994). "Frequent genetic alterations at the distal region of chromosome 1p in human hepatocellular carcinomas". Cancer Res; **54**: 4188-92
202. Yuan, S. S., S. Y. Lee, et al. (1999). "BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo." Cancer Res **59**(15): 3547-51.
203. Zajchowski, D. A., R. Sager, et al. (1993). "Estrogen inhibits the growth of estrogen receptor-negative, but not estrogen receptor-positive, human mammary epithelial cells expressing a recombinant estrogen receptor." Cancer Res **53**(20): 5004-11.
204. Zhang, L., S. Kharbanda, et al. (1997). "MCF-7 breast carcinoma cells overexpressing FGF-1 form vascularized, metastatic tumors in ovariectomized or tamoxifen-treated nude mice." Oncogene **15**(17): 2093-108.
205. Zhong, Q., C. F. Chen, et al. (1999). "Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response." Science **285**(5428): 747-50.