



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
UNIVERSITY OF CRETE

T.Θ. 1393, Ηράκλειο Κρήτη

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
FACULTY OF MEDICINE

P.O.Box 1393, Heraklion Crete, Greece



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

ΙΩΑΝΝΗΣ Δ. ΛΥΡΩΝΗΣ
ΙΑΤΡΟΣ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΠΤΩΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΙΟΥ
ΘΗΛΩΜΑΤΩΝ (HPV) ΚΑΙ ΤΟΥ ΙΟΥ ΕΡΣΤΕΙΝ-BARR (EBV), ΚΑΙ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ KRAS, NRAS,
BRAF, ΣΕ ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΟΙΣΟΦΑΓΟΥ (ESCC).

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007

Στους γονείς μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ	3
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ		8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ		13
ABSTRACT		15
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ		17

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο	ΣΕΛΙΔΑ	
Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ		
1.1 Γενικά		19
1.2 Νεοπλάσματα		19
1.3 Ιδιότητες των κακοήθων κυττάρων		21
1.4 Βιολογική συμπεριφορά του καρκίνου		22
1.5. Η γενετική προέλευση του καρκίνου		23
1.6. Κυτταρικά ογκογονίδια		25
1.7. Ογκογονίδια σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα οισοφάγου.		28
1.8. Ογκο-κατασταλτικά γονίδια		31
1.9 Ογκο-κατασταλτικά γονίδια σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα οισοφάγου.		34
1.10. Μεταλλακτικά γονίδια		38
1.11. Η πολυσταδιακή φύση του καρκίνου		39
1.12. Ογκογόνοι ιοί		40
1.13. Χημικά και φυσικά καρκινογόνα		43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο		
ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΟΙΣΟΦΑΓΟΥ.		
2.1. Εισαγωγή.		45
2.2. Αιτιολογικοί παράγοντες.		47
2.2.1. Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα (ESCC).		47
2.2.2. Αδενοκαρκίνωμα.		54
2.3. Κλινική εικόνα.		57
2.4. Διαγνωστικοί μέθοδοι		58
2.5. Σταδιοποίηση.		59

2.6. Θεραπεία.	62
2.7. Πρόγνωση.	64
2.8. Πρόληψη.	64

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο

ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ RAS

3.1. Γενικά	66
3.2. Δομή των γονιδίων ras	67
3.3. Ρύθμιση των γονιδίων ras	69
3.4. Η πρωτεΐνη p21	70
3.5. Ογκοκατασταλτική και προ-αποπτοτική δράση των γονιδίων ras.	72
3.6. Ενεργοποίηση των γονιδίων ras	74
3.6.1. Μεταλλάξεις των ras.	75
3.6.2. Υπερέκφραση των ras	78
3.7. Ρόλος των γονιδίων ras στην ανάπτυξη νεοπλασμάτων οισοφάγου.	80
3.8. Θεραπευτικές προσεγγίσεις στοχεύοντας το K-ras.	81

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο

ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΟ BRAF

4.1. Εισαγωγή.	83
4.2. Πρωτεΐνες Raf και νεοπλασματικές νόσοι.	83
4.2.1. Πρωτεΐνες Raf ως επιτελείς των ογκογονιδίων Ras σε ανθρώπινες νεοπλασίες.	83
4.2.2. B-Raf μεταλλαγές σε ανθρώπινα νεοπλάσματα.	85
4.3. Έκφραση των πρωτεϊνών Raf.	86
4.4. Δομή των πρωτεϊνών Raf.	87
4.5. Ρύθμιση της Raf δραστηριότητας κινάσης.	89
4.5.1. Σύνδεση Ras	89
4.5.2. Φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση.	90
4.5.3. Οι πρωτεΐνες Raf ως συστατικά σύμπλοκων μοριακών μονοπατιών.	91
4.6. Ενεργοποίηση των MEK/ERK από την πρωτεΐνη Raf.	91
4.7. Αντικαρκινική θεραπεία στοχεύοντας τις πρωτεΐνες Raf.	93

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο

ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΟ P53

5.1 Εισαγωγή	94
5.2 Δομή και οργάνωση του γονιδίου p53	96
5.3 Δομικοί πολυμορφισμοί στο αμινοξύ 72 της ανθρώπινης p53	98
5.4 Ρόλος του πολυμορφισμού της p53 στην ανάπτυξη HPV σχετιζόμενων ακανθοκυτταρικών καρκίνων οισοφάγου.	100

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο

Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ (HPV)

6.1. Γενικά	102
6.2 Δομή των ιικών σωματιδίων και ταξινόμηση	104
6.2.1 Ιικά σωματίδια	104
6.2.2 Δομή και ρύθμιση του ιικού γενώματος	105
6.3 Ονοματολογία και ταξινόμηση	106
6.4 Λειτουργίες των ιικών πρωτεϊνών E6 και E7	108
6.4.1 E6 πρωτεΐνη	109
6.4.2 E7 πρωτεΐνη	110
6.5 Λειτουργίες των ιικών πρωτεϊνών E1, E2, E4 και E5	111
6.6. Διάγνωση των HPV λοιμώξεων.	112
6.6.1. Ενδείξεις συμμετοχής του HPV.	112
6.6.2. Ανίχνευση του HPV-DNA και αναγνώριση των HPV γονότυπων.	113
6.6.2.1. Μέθοδοι ενίσχυσης σήματος (Signal amplification systems).	113
6.6.2.2. Μέθοδοι ενίσχυσης στόχου (Target amplification systems).	114
6.6.3. Κλινική χρησιμότητα της μοριακής διάγνωσης του HPV.	116
6.7. Μετάδοση και φυσική ιστορία των μολύνσεων από ιούς του θηλώματος	116
6.8. Κακοήθεις και μη κακοήθεις καταστάσεις που σχετίζονται με μολύνσεις από τον ιό του θηλώματος.	117
6.9. Οι ιοί του θηλώματος στον ακανθοκυτταρικό καρκίνο του οισοφάγου.	118
6.10. Εμβόλιο του ανθρώπινου ιού θηλωμάτων (HPV).	119

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο

ΙΟΣ EPSTEIN-BARR (EBV)

7.1. Ερπητοϊοί	121
----------------	-----

7.2. Ο ιός Epstein-Barr (EBV)	124
7.2.1. Γενικά	124
7.2.2. Κλινική εικόνα	126
7.2.3. Διάγνωση και θεραπεία	127
7.3. Κακοήθεις καταστάσεις που σχετίζονται με μολύνσεις με ερπητοϊούς.	128
7.4. Οι ερπητοϊοί σε ακανθοκυτταρικό καρκίνο του οισοφάγου.	129

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΟΓΔΩΟ

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

8.1. Γενικά. Προέλευση των δειγμάτων.	130
8.2. Εκχύλιση DNA από ιστούς παραφίνης	132
8.2.1. Τεχνική εκχύλισης με φαινόλη-χλωροφόρμιο	132
8.3. Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR)	133
8.3.1. Αρχές της μεθόδου	133
8.3.2. Ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR	134
8.3.3. Ρυθμιστικά διαλύματα της PCR	135
8.3.4. Σχεδιασμός εκκινητών και συνθήκες των αντιδράσεων PCR	135
8.4. Μέθοδοι προσδιορισμού μεταλλάξεων	138
8.4.1. Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)	138
8.4.2. Άμεση ανάλυση αλληλουχίας των PCR προϊόντων (Sequencing)	143
8.5. Ηλεκτροφόρηση DNA	144
8.6. Χρώση νουκλεϊκών οξέων με βρωμιούχο εθίδιο	144
8.7. Στατιστική ανάλυση - Ηλεκτρονική επεξεργασία εικόνας	145
8.8. Εταιρείες προέλευσης των υλικών	145

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΝΑΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9.1. Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν και ιστοπαθολογική εξέταση	147
9.2. Ανίχνευση και τυποποίηση των ιών HPV σε ακανθοκυτταρικά νεοπλασμάτα οισοφάγου.	148
9.3. Ανίχνευση και τυποποίηση των ιών EBV σε ακανθοκυτταρικά νεοπλασμάτα οισοφάγου.	150
9.4. Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων ras σε ακανθοκυτταρικά νεοπλασμάτα οισοφάγου.	153

9.5. Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων του γονιδίου B-raf σε ακανθοκυτταρικά νεοπλάσματα οισοφάγου.	157
9.6. Επίδραση της αλληλεπίδρασης γονιδίου - περιβάλλοντος στην ανάπτυξη ESCC.	158
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΚΑΤΟ	
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
10.1 Εισαγωγή	165
10.2 Ανίχνευση των ιών HPV και EBV σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα οισοφάγου.	165
10.3 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων ras και B-raf σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα οισοφάγου.	167
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	170
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνομα:	Ιωάννης
Επώνυμο:	Λυρώνης
Όνοματεπώνυμο πατέρα:	Δημήτριος Λυρώνης
Όνοματεπώνυμο μητέρα:	Μαρία Μιχαλάκη
Ημερομηνία Γέννησης:	15/07\1972
Τόπος γέννησης:	Βερολίνο Γερμανίας.
Οικογενειακή Κατάσταση	Έγγαμος.
Όνοματεπώνυμο συζύγου:	Φραγκιαδουλάκη Κλεάνθη
Διεύθυνση:	Λεβίνου 56 Ηράκλειο Κρ. TK71304
Τηλέφωνο:	2810323581,6937484736
E-mail:	Lyronis@med.uoc.gr

ΣΠΟΥΔΕΣ :

- 1990-1991: Πτυχιούχος του τμήματος εκμάθησης Ρουμάνικης Γλώσσας, Φιλοσοφική σχολή, Πανεπιστήμιο Τιμισοάρα Ρουμανίας.
- 1991-1997: Πτυχιούχος της Ιατρικής σχολής, Πανεπιστήμιο Τιμισοάρα Ρουμανίας.
- 2002-2006: Πτυχιούχος Ειδικότητας Γενικής Ιατρικής ΠΑ.Γ.Ν.Η.
- 2005-2006: Πτυχιούχος τμήματος Επείγουσας Προνοσοκομειακής Ιατρικής, ΕΚΑΒ Ηρακλείου.
- 2003-2007: Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Επιβλέπων Καθηγητής Δ.Α. Σπαντίδος με θέμα: «Ο ρόλος του ιού θηλώματος του Ανθρώπου (HPV) σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του οισοφάγου (ESCC)».

ΕΠΙΜΟΡΦΩΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ:

1. Πρόγραμμα Μαθημάτων Εφαρμοσμένης Ιατρικής Στατιστικής Ανάλυσης υπό τον κ.Γ.Ηλιόπουλο καθ. Αιματολογίας ΠΑΓΝΗ στις 07/01/2003-29/04/2003.
2. Certification of attendance as provider the Advanced Paediatric Life Support Course (APLS) in Heraklion 23-25 January 2004.

3. Certification of attendance as provider the Basic Life Support Course (BLS) in Heraklion (Σχολή ΕΚΑΒ) 16/03/2004.
4. Certification of attendance as provider the Basic Life Support Course (BLS) in Heraklion (Ιατρική Σχολή). 12/02/2005.
5. Certification of attendance as instructor the Basic Life Support Course (BLS) in Heraklion (Ιατρική Σχολή). 4^η Ομάδα, 20/11/2005.
6. Συμμετοχή ως instructor the Basic Life Support Course (BLS) in Heraklion (Ιατρική Σχολή). Ιατρική Σχολή 4/12/05.
7. Επείγουσα Προνοσοκομειακή Ιατρική. Ετήσιο μετεκπαιδευτικό πρόγραμμα ΕΚΑΒ Ηρακλείου. 11/09/2006.
8. Certification of attendance as provider the Advanced Life Support (ALS) Course. Ιατρική Σχολή Ηρακλείου 3-4 Μαρτίου 2007.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

- 2000-2001: Υπόχρεος θητείας Αγροτικού Ιατρείου Γωνιών Κ.Υ. Ανωγείων.
- 2001-2002: Άσκηση επαγγέλματος ιδιωτικού δικαίου, σε συνεργασία με την εταιρία " Ιατρική φροντίδα Κρήτης".
- 2002-2006 : Ειδικευόμενος Γενικής Ιατρικής ΠΑ.Γ.Ν.Η.
- 2006- : Άσκηση επαγγέλματος ιδιωτικού δικαίου, σε συνεργασία με την εταιρία " Ιατρική φροντίδα Κρήτης".

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ :

- Αγγλική: Standard of Palso Examinations.
- Ρουμάνικη: University of Timisoara Romania, Philosophy School, Romanian language department.

ΓΝΩΣΗ Η/Υ:

- Πιστοποιητικό παρακολούθησης CORE LEVEL με αντικείμενο την εκμάθηση των Microsoft Windows 98, Word, Excel, και PowerPoint.
- Πιστοποιητικό παρακολούθησης CORE LEVEL με αντικείμενο την εκμάθηση των Microsoft Access 2000.
- Πιστοποιητικό παρακολούθησης CORE LEVEL με αντικείμενο τον σχεδιασμό και παρουσίαση ηλεκτρονικών παρουσιάσεων με χρήση Η/Υ και αντικείμενο το Microsoft PowerPoint.

ΜΕΛΟΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΟΡΓΑΝΩΣΕΙΣ:

1. Ιατρικός Σύλλογος Ηρακλείου.
2. Ελληνική Εταιρεία Γενικής Ιατρικής (ΕΛΕΓΕΙΑ).
3. Ελληνική Ένωση Γενικής Ιατρικής.
4. European Association for Cancer Research (EACR) 07/05/2004.
5. European Tissue Culture Society (ETCS) 24/03/ 2005.
6. European Society for Clinical Virology (ESCV) 24/03/ 2005.

ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

1. 9th World Congress on Advances in Oncology, Hersonissos, 14-16 October 2004.
2. 7th International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, 14-16 October 2004.
3. 10th World Congress on Advances in Oncology, Hersonissos, 13-15 October 2005.
4. 8th International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, 13-15 October 2005.
5. 11th World Congress on Advances in Oncology, Hersonissos, 12-14 October 2006.
6. 9th International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, 12-14 October 2006.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ:

1.I.D. Lyronis, S. Baritaki, I. Bizakis, M. Tsardi, D.A. Spandidos. Evaluation of the prevalence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus in esophageal squamous cell carcinomas Int J Biol Markers 2005; 20: 5 – 10.

2.Emmanouil K Symvoulakis, Konstantin Krasagakis, Ioannis D Komninos, Ioannis Kastrinakis, Ioannis Lyronis, Anastasios Philalithis and Androniki D Tosca.Primary care and pattern of skin diseases in a mediterranean island. BMC Family Practice 2006, 7:6

3.K-ras codon 12 mutation, HPV infection and smoking or alcohol abuse positively correlate with esophageal squamous cell carcinoma; new insight on the role of gene-environment interplay in ESCC development . I.D.

Lyronis, S. Baritaki, I. Bizakis, E. Krambovitis, D.A. Spandidos. (Submitted to Oral Oncology).

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

1. Antonakis N, Bathianaki M, BatikasA, Lyronis J, Lianos V, Lionis C: The prevalence of known DM in three rural areas in Crete-Greece. Some results from a primary care study. Conference of the European Society of General Practice – Family Medicine. WONCA Region Europe 3- 7/07/01 Finland.

2. Ioannis Lyronis, Stauroula Baritaki, Ioannis Bizakis, Maria Tsardi, Demetrios Spandidos: Evaluation of human papiloma and Epstein-Barr viruses incidence in esophageal squamous cell carcinomas. 9th World Congress on Advances in Oncology and 7th International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, 14-16 October 2004.

3. E. Velivassakis, K. Mathianaki, A. Dimitriadis, I. Lyronis, M. Kaligiannaki. THE EFFECT OF MANUAL LABOR IN CHILDHOOD AS A TRIGGERING FACTOR FOR IDIOPATHIC SCOLIOSIS. 11th Conference of the European Society of General Practice/ Family Medicine. Kos island, Greece, September 3-7, 2005.

4. E.K. Symvoulakis, K. Krasagakis, I.D. Komninos, I. Kastrinakis, I. Lyronis, A. Philalithis, A.D. Tosca. PATTERN OF SKIN DISEASES AND PRIMARY CARE IN A MEDITERRANEAN ISLAND. 11th Conference of the European Society of General Practice/ Family Medicine. Kos island, Greece, September 3-7, 2005.

5. I.D. Lyronis, I. Komninos, M. Andreadakis, M. Mihalakis, N. Plumis, I.G. Vlahakis, G. Charissis. AETIOLOGY AND CLINICAL EFFECTIVENESS IN BOYS WITH ACUTE SCROTUM. 11th Conference of the European Society of General Practice/ Family Medicine. Kos island, Greece, September 3-7, 2005.

6. ID. Lyronis, I. Komninos, M. Kondylakis, M. Mihalakis, N. Plumis, IG. Vlahakis, G. Charissis. CLINICAL AND ESR EFFECTIVENESS IN CHILDREN WITH ACUTE RIGHT ILIAC PAIN. 11th Conference of the European Society of General Practice/ Family Medicine. Kos island, Greece, September 3-7, 2005.

7. Ioannis Lyronis, Stauroula Baritaki, Ioannis Bizakis, Maria Tsardi, Demetrios Spandidos. EVALUATION OF BRAF GENE MUTATION IN ESOPHAGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMAS. 10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, 13-15 October 2005.

Με εκτίμηση

Ι.Δ.Λυρώνης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πολυσταδιακή και πολυπαραγοντική φύση της καρκινογένεσης έχει οδηγήσει σε σημαντικές εντατικές μελέτες που εστιάζονται στον ερευνητικό τομέα των ογκογονιδίων, των ογκοκατασταλτικών γονιδίων καθώς και την συμμετοχή ιών στην ανάπτυξη συγκεκριμένων μορφών καρκίνου. Επίσης η καρκινογένεση είναι μια πολυδιάστατη διαδικασία για την έναρξη της οποίας έχει ενοχοποιηθεί η έκθεση σε περιβαλλοντικούς τοξικούς παράγοντες. Η συμμετοχή συγκεκριμένων κυτταρικών και ιϊκών γονιδίων στον οισοφαγικό καρκίνο ιδιαίτερα, καθώς και η προσπάθεια αναζήτησης του επακριβούς ρόλου τους, αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της υψηλής συχνότητας εμφάνισης των μορφών αυτών νεοπλασίας.

Ο καρκίνος του οισοφάγου είναι η ένατη πιο κοινή νεοπλασία και αντιπροσωπεύει την έκτη συχνότερη αιτία του θανάτου από τον καρκίνο παγκοσμίως. Όταν εντοπίζεται το ESCC, η πλειοψηφία των νεοπλασμάτων είναι ήδη σε προχωρημένο στάδιο με παρουσία μεταστάσεων. Οι υψηλού κινδύνου χώρες περιλαμβάνουν την ανατολική Τουρκία, την πρώην Σοβιετική Ένωση, το Ιράκ, το Ιράν, τη δυτική και βόρεια Κίνα, το Χονγκ Κονγκ, και την Ιαπωνία, που χαρακτηριστικά ονομάζονται ως ασιατική οισοφαγική ζώνη καρκίνου. Οι παράγοντες κινδύνου για το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του οισοφάγου περιλαμβάνουν το κάπνισμα τσιγάρων, την κατάχρηση οινοπνεύματος, και διατροφή ανεπαρκή σε βιταμίνες και αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Επίσης μελέτες ως προς την ιογενή αιτιολογία του ESCC, αναφέρουν μία συνολική παγκόσμια επίπτωση 22% του HPV σε ESCC.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της συμμετοχής του ιού του θηλώματος του ανθρώπου (HPV) και του ιού Epstein-Barr (EBV) σε τριάντα δείγματα ακανθοκυτταρικού καρκίνου οισοφάγου, και αντιστοίχου αριθμού φυσιολογικών δειγμάτων οισοφαγικού ιστού, προερχόμενα από Ελληνικό πληθυσμό. Επίσης ανιχνεύθηκε η παρουσία ενεργοποίησης των γονιδίων B-raf V600E, K-ras, και N-ras codon 12 καθώς και η διερεύνηση συσχετίσεων μεταξύ των μεταλλάξεων αυτών και κλινικών ή ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών των όγκων.

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR) για την ενίσχυση των προς έλεγχο περιοχών, ακολουθούμενη από την τεχνική της ανάλυσης πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP) για την ανίχνευση των μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 για τα γονίδια K-ras, και N-ras, και αντίστοιχα στο νουκλεοτίδιο V600E του γονιδίου B-raf.

Τα αποτελέσματα της μελέτης στην διερεύνηση της ιογενούς αιτιολογίας του ESCC, ανέδειξε ότι δεκαεπτά από τα τριάντα ESCC δείγματα (56%) βρέθηκαν HPV θετικά, από τα οποία δεκαπέντε ανευρέθηκαν ως HPV-18 μολυθέντα. Έξι φυσιολογικά οισοφαγικά δείγματα (22,2%) ήταν HPV θετικά, πέντε από τα οποία ως HPV-18. Όλα τα δείγματα ήταν αρνητικά στην ανίχνευση γονιδιώματος EBV, όπως αξιολογούνται από τη PCR δοκιμή. Τελικά, τα συμπεράσματά μας δείχνουν μια στατιστικά σημαντική ($p < 0.001$) παρατήρηση μεταξύ της επίπτωσης ESCC και της μόλυνσης HPV, συνήθως σχετικών με την υπότυπο HPV-18, στον ελληνικό πληθυσμό.

Τα αποτελέσματα της μελέτης στην διερεύνηση της γονιδιακής αιτιολογίας του ESCC, ανέδειξε ότι μεταξύ των ελεγχέντων γονιδίων, μόνο η παρουσία ετερόγυζης K-ras μετάλλαξης ανιχνεύθηκε σε 5 από τα 30 δείγματα ESCC (16%), ενώ καμία αντίστοιχη μεταλλαγή δεν βρέθηκε στον φυσιολογικό οισοφαγικό ιστό ($p < 0,022$). Επίσης δεν βρέθηκε καμία μεταλλαγή στα γονίδια N-ras και B-raf. Αυξημένος σχετικός κίνδυνος οισοφαγικού καρκίνου παρατηρήθηκε στους χρήστες καπνών (OR=3.5, $p < 0.023$) και στους καταχραστές οινοπνεύματος (OR=7.22, $p < 0.001$), που συνοδεύονταν με υψηλή συχνότητα K-ras μετάλλαξης (22%, OR=1.77 και 21%, OR=1.52) αντίστοιχα. Μια παρόμοια θετική παρατήρηση αυξημένου σχετικού κινδύνου ESCC φάνηκε στους HPV -μολυσμένους ασθενείς (OR=5.66, $p < 0.003$). Εντούτοις, καμία σημαντική παρατήρηση δεν βρέθηκε μεταξύ του φύλου και του ESCC, δίνοντας έναν σχετικό κίνδυνο OR=1.82.

Τα γενικά συμπεράσματά μας καταδεικνύουν μία θετική συσχέτιση για τις αλληλεπιδράσεις γονιδίου - περιβάλλοντος, μεταξύ της μετάλλαξης του K-ras γονιδίου, της μόλυνσης HPV, της χρήσης προϊόντων καπνού ή της κατάχρησης οινοπνεύματος στην αιτιοπαθογένεια του ESCC, και που μπορούν να θεωρηθούν ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό ως παράγοντες υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη ESCC.

ABSTRACT

The multi-event nature of carcinogenesis has led to extensive studies focusing on the involvement of several cellular oncogenes, oncosuppressor genes, viral genes and their combined participation in the development of human cancers. Carcinogenesis is a multi-stage process and the exposure to environmental chemicals plays an important role in it. The collaboration of a variety of genetic factors, gene mutations and specific gene polymorphism in esophageal cancer lesions and their interactions and correlation with their host and the environment have also been extensively studied.

Esophageal cancer is the ninth most common malignancy, and represents the sixth most frequent cause of death from cancer worldwide. When the cancer ESCC is diagnosed, the majority of neoplasms are unresectable or with metastases. The high-risk countries include Eastern Turkey, Former Soviet Union, Iraq, Iran, Western and Northern China, Hong-Kong, Japan, termed as the Asian esophageal cancer belt. Also South Africa, Brazil, and France have been reported as high-risk areas. Risk factors for esophageal cancer include cigarette smoking, alcohol abuse, and diet deficient in vitamins and antioxidants. The detection rate of the human papilloma virus (HPV) have an overall incidence of 22%.

The purpose of the present study was to evaluate the incidence of HPV and EBV DNA genomes within esophageal SCC specimens derived from Greek population, in order to further investigate their putative contribution and association with ESCC malignancy. Also to determine the incidence and consequently the possible implication of B-raf, K-ras, and N-ras gene mutations in ESCC development. and the correlation with clinicopathological features of the patients including gender, HPV infection and habits such as tobacco or alcohol use.

For this purpose was used the polymerase chain reaction method (PCR) for the amplification of the target genes, followed by the intermittent restriction digestion (RFLP) for mutation detection of the K-ras, and N-ras codon 12, and BRAF V600E genes.

Our results in virus aetiology of ESCC, indicated that seventeen out of thirty ESCC specimens (56%) were found positive for HPV DNA, by which fifteen (88%) typed as HPV-18 infected, one (5.9%) as HPV-16 and one (5.9%) as type different from the studied 6, 11, 16, 18 and 33 HPV subtypes. Six out of twenty seven normal esophageal specimens (22.2%) were positive for HPV infection, five typed as HPV-18 (83.3%) and one as HPV-16 (16.7%). All samples were negative in EBV genome detection, as assessed by the PCR assay. In conclusion, our findings indicate a statistically significant ($p < 0.001$) overall association between ESCC incidence and HPV infection, mostly related to HPV-18 subtype, in the Greek population

Our results in genome aetiology of ESCC, indicated that Among the genes tested, only the heterozygous K-ras mutation was detected in 5 out of the 30 ESCC specimens (16%), whereas no mutation was found in the normal esophageal tissue ($p < 0.022$). The normal samples were screened negative for N-ras and V600E B-raf mutations. The increased risk of esophageal cancer was correlated with tobacco users (OR=3.5, $p < 0.023$) and alcohol abusers (OR=7.22, $p < 0.001$), accompanied with the high incidence of the k-ras codon 12 mutation (22%, OR=1.77 and 21%, OR=1.52), respectively. A similar positive association was seen in HPV-infected patients (OR=5.66. $p < 0.003$). Our overall findings demonstrate that the mutational activation of the K-ras gene, HPV infection and tobacco or alcohol abuse, can be considered independently or in combination as high risk factors for ESCC development.

Our overall findings demonstrate that the mutational activation of the K-ras gene, HPV infection and tobacco or alcohol abuse, can be considered independently or in combination as high risk factors for ESCC development.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή σχεδιάστηκε και εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας, του Τομέα Εργαστηριακής Ιατρικής, της Ιατρικής Σχολής, του Πανεπιστημίου Κρήτης, στο Ηράκλειο κατά το χρονικό διάστημα 2003-2007.

Ολοκληρώνοντας την επιστημονική αυτή προσπάθεια, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στον Επιβλέποντα Καθηγητή μου Δημήτριο Α. Σπαντίδο, για τις πολύτιμες συμβουλές του, τις επιστημονικές του γνώσεις, συμβουλές και ιδέες, για την πολύτιμη μεταφορά στοιχείων από την πλούσια εμπειρία του στον χώρο της Βασικής Έρευνας και των Βιοεπιστημών, στον οποίο με εισήγαγε, αλλά και για την αμέριστη ηθική και υλική συμπαράσταση που μου παρείχε καθώς και την φιλοξενία που μου πρόσφερε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής αυτής της διατριβής, διατριβής Αναπληρωτή Καθηγητή Γ. Βελεγράκη και Αναπληρωτή Καθηγητή Ι. Μπιζάκη, για τις πολύτιμες συμβουλές και προτροπές τους. Ευχαριστώ επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, Καθηγητές κ. Γ. Σαμώνη και κ.Ν. Καρκαβίτσα, και Επ. Καθηγητή κ. κ. Χ. Τσατσάνη, για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζω για τον Επίκ. Καθηγητή κ. Γεώργιο Σουρβίνο για την άμεση βοήθεια που παρείχε σε μένα, όποτε αυτό ήταν αναγκαίο, για την αμέριστη υπομονή του και την ιδιαίτερα μεγάλη συμβολή και καθοδήγησή του σε στάδια της διδακτορικής μου διατριβής.

Ίσως είναι δύσκολο με λίγες λέξεις να ευχαριστήσω την εκλεκτή φίλο και μεταδιδακτορική ερευνήτρια κ. Σταυρούλα Μπαριτάκη για την πολύτιμη βοήθειά της από την έναρξη της διατριβής και το σχεδιασμό της, έως σήμερα. Υπήρξε ο βασικότερος συνεργάτης από τον οποίο έλαβα πολύτιμες συμβουλές σε όλα τα βήματα της μελέτης.

Ευχαριστώ θερμώς την Επίκουρο Καθηγήτρια του Παθολόγο-ανατομικού εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου

Ηρακλείου κ.Μ. Τζαρδή, για την λήψη και παραχώρηση οισοφαγικών δειγμάτων, διαγνωσμένων ιστολογικά με ιδιαίτερη επιστημονική επιμέλεια.

Ευχαριστώ επίσης ιδιαίτερα τον συνάδελφο Γ. Φλουρή για την βοήθεια και την καθοδήγηση του, στην έναρξη της διδακτορικής μου διατριβής. Επίσης τον Επ. Καθηγητή Α. Ζαφειρόπουλο για τις σημαντικές του υποδείξεις, επίσης τον Ν. Σουλιτζή, και την Ι. Σούφλα, καθώς και όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του Εργαστηρίου Κλινικής Ιολογίας για την άψογη συνεργασία που είχα και την σημαντική βοήθεια τους.

Τέλος, δεν θα πρέπει να παραλείψω να ευχαριστήσω την σύζυγο μου Κλεάνθη Φραγκιαδουλάκη, καθώς και τους γονείς μου για την αμέριστη βοήθεια και κατανόηση τους.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

1.1. Γενικά

Το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από εκατομμύρια κύτταρα. Ο κύκλος των φυσιολογικών κυττάρων διέπεται από θεμελιώδεις κανόνες: κάθε κύτταρο προέρχεται από διαίρεση ενός προϋπάρχοντος (κυτταρικός πολλαπλασιασμός), ενώ όλα, σε άλλη στιγμή οδηγούνται το καθένα, σε απόπτωση. Επιπλέον, η μορφολογική και φυσιολογική προσαρμογή για την επιτέλεση συγκεκριμένων λειτουργιών (διαφοροποίηση) καταλήγει στην οργάνωση των κυττάρων σε ομάδες (ιστοί, όργανα).

Η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, των επιμέρους λειτουργιών και του θανάτου επιτελείται μέσω των γενετικών πληροφοριών που τα κύτταρα φέρουν στο γονιδίωμά (DNA) τους. Οι γενετικές πληροφορίες ρυθμίζουν επίσης τις δομικές και λειτουργικές σχέσεις των κυττάρων μέσα στα όργανα και τις αλληλεπιδράσεις των οργάνων μεταξύ τους. Το τελικό αποτέλεσμα των διεργασιών αυτών είναι η αρμονική συμβίωση και συνεργασία διαφορετικών οργανικών συστημάτων για την επιτέλεση των πολύπλοκων λειτουργιών κάθε οργανισμού.

1.2. Νεοπλάσματα

Νεόπλασμα ονομάζεται μια μάζα κυττάρων που προέρχονται από τον ανθρώπινο οργανισμό (ξενιστής), των οποίων όμως η ανάπτυξη δεν διέπεται από τους κανόνες που ισχύουν για τα φυσιολογικά κύτταρα και συνεπάγεται διαταραχές στη δομή και λειτουργία του ξενιστή. Νεοπλάσματα έχουν περιγραφεί σε όλους τους ιστούς του ανθρώπινου σώματος. Τα νεοπλασματικά κύτταρα ενδέχεται να προέρχονται από οποιαδήποτε από τις τρεις ανθρώπινες εμβρυολογικές βλαστικές στοιβάδες (ενδόδερμα, εξώδερμα, νευρόδερμα) ή και από συνδυασμό των ανωτέρω στοιβάδων (μικτοί όγκοι).

Τα νεοπλάσματα είναι δυνατόν να προκύψουν από φυσιολογικά κύτταρα οποιοδήποτε ιστού, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται μια μεγάλη ποικιλία όγκων που διαφέρουν ως προς την ιστολογική τους καταγωγή, την ανάπτυξή τους και την πρόγνωση.

Η πιο θεμελιώδης βιολογική διάκριση μεταξύ των όγκων είναι αυτή μεταξύ των καλοήθων και κακοήθων νεοπλασμάτων, με βάση συγκεκριμένα παθολογοανατομικά κριτήρια (αριθμός πυρηνοκινησιών, ατυπία κυττάρων κ.α.). Ένα κακόηθες νεόπλασμα ονομάζεται και καρκίνος. Και οι δυο κατηγορίες προκύπτουν ως συνέπεια ανώμαλης κυτταρικής αναπαραγωγής, αλλά διαφέρουν ως προς την ικανότητά τους να διεισδύουν στους γειτονικούς ιστούς.

Τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων είναι ότι δεν υπόκεινται σε κυτταρικό έλεγχο, διπλασιάζονται ανεξάρτητα, εισβάλουν σε γειτονικούς ιστούς διασπώντας την βασική μεμβράνη και αποκτούν έτσι προσπέλαση προς τα λεμφικά και αιμοφόρα αγγεία, αυξάνοντας την πιθανότητα μετάστασης σε απομακρυσμένα όργανα. Η κυτταρική αναπαραγωγή των καρκινικών κυττάρων που δεν συνοδεύεται από ωρίμανση και διαφοροποίηση αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό του καρκίνου (Танноκ, 1992). Ο ακατάσχετος ρυθμός πολλαπλασιασμού και ο σχηματισμός νεόπλαστων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση) έχουν σαν αποτέλεσμα την προοδευτική εισβολή του όγκου σε παρακείμενους ιστούς. Οι ιδιότητες αυτές των καρκινικών κυττάρων (αυξημένος ρυθμός πολλαπλασιασμού, αγγειογένεση) μπορεί να εκφράζονται και σε ορισμένες φυσιολογικές καταστάσεις, όπως είναι η επούλωση τραυμάτων. Όμως τον καρκίνο χαρακτηρίζουν η έκταση του φαινομένου και το απρόσφορο της εμφάνισής του.

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από διακόσια είδη καρκίνων του ανθρώπου και έχουν ταξινομηθεί ιστολογικά ανάλογα με την προέλευσή τους. Τα περισσότερα νεοπλάσματα κατατάσσονται σε τρεις βασικές κατηγορίες: καρκινώματα, σαρκώματα και λευχαιμίες/λεμφώματα. Τα καρκινώματα που αποτελούν σχεδόν το 90% των καρκίνων του ανθρώπου, προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα εξωδερμικής ή ενδοδερμικής προέλευσης. Συχνότερες θέσεις ανάπτυξης καρκίνου αποτελούν ο πνεύμονας, το παχύ έντερο, ο προστάτης (άνδρες) και ο μαστός (γυναίκες). Τα σαρκώματα, οι λευχαιμίες και τα λεμφώματα προέρχονται από κύτταρα

μεσοδερμικής προέλευσης (κύτταρα μυών και οστών, ινοβλάστες και κυκλοφορούντα κύτταρα του αιμοποιητικού και λεμφικού συστήματος). Οι όγκοι διακρίνονται επίσης αναλόγως του οργάνου προέλευσης και του ιστολογικού τύπου.

1.3. Ιδιότητες των κακοήθων κυττάρων

Κάθε νεόπλασμα αποτελείται από δυο ειδών κύτταρα: τα καθ' εαυτόν κύτταρα του όγκου (παρέγχυμα) και κύτταρα του στρώματος (συνδετικός ιστός και αιμοφόρα αγγεία) που έχουν σαν αποστολή τους την δομική και τροφική υποστήριξη του όγκου. Τα παρεγχυματικά κύτταρα παρουσιάζουν χαρακτηριστικές φαινοτυπικές ανωμαλίες: ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, έλλειψη διαφοροποίησης, τάση διήθησης των γύρω ιστών και ανάπτυξη σε απομακρυσμένες θέσεις (μετάσταση), καθώς και μειωμένη ευαισθησία στα κυτταροτοξικά φάρμακα. (Kastan, 1997).

Η κυτταρική αναπαραγωγή που δε συνοδεύεται από ωρίμανση και διαφοροποίηση (αναπλασία) αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό του καρκίνου (Tannock, 1992). Ο ακατάσχετος ρυθμός πολλαπλασιασμού και ο σχηματισμός νεόπλαστων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση) έχουν σαν αποτέλεσμα προοδευτική εισβολή του όγκου στους παρακείμενους ιστούς. Η διήθηση αυτή δεν υπακούει σε ανατομικούς κανόνες και συνεπάγεται καταστροφή των γειτονικών δομών. Επιπλέον, οι διηθήσεις αιμοφόρων αγγείων, λεμφαγγείων και ανατομικών κοιλοτήτων καταλήγουν σε καρκινικές εμφυτεύσεις σε απομακρυσμένες θέσεις. Η αυτονομία και η συνεχής αναπαραγωγή των καρκινικών κυττάρων επιτρέπουν την ανάπτυξη νέων όγκων στις μεταστατικές εστίες. Οι μεταστάσεις ενδέχεται να υπερβούν σε μέγεθος τον πρωτοπαθή όγκο, ενώ συχνά δεν εμφανίζουν την ίδια συμπεριφορά στη θεραπεία με αυτόν (Hart & Saini, 1992).

Οι ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων (αυξημένος ρυθμός πολλαπλασιασμού, αγγειογένεση) ενδέχεται να εκφράζονται εν μέρει σε ορισμένα φυσιολογικά κύτταρα (εμβρυογένεση, επούλωση τραυμάτων). Η έκταση όμως του φαινομένου και η ακαταλληλότητα -περιστάσεων και χώρου- της εμφάνισής του χαρακτηρίζουν ένα φαινόμενο όπως τον καρκίνο.

1.4. Βιολογική συμπεριφορά του καρκίνου

Η βιολογική συμπεριφορά ενός νεοπλασματος, κατ' επέκταση η φυσική πορεία της νόσου που αυτό προκαλεί, καθορίζεται από το βαθμό στον οποίο τα νεοπλασματικά κύτταρα εμφανίζουν τις παραπάνω ανωμαλίες. Υπεισέρχονται, επιπλέον, παράγοντες που σχετίζονται με τον ξενιστή. Ο καρκίνος, επομένως, ως νόσος χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια, εάν επιπλέον ληφθεί υπόψη και το πολυδύναμο της πιθανής προέλευσης των παρεγχυματικών κυττάρων. Η ταχύτητα τοπικής εξάπλωσης και το χρονικό σημείο εμφάνισης των μεταστάσεων μπορεί να ποικίλουν σημαντικά ακόμη και ανάμεσα σε περιπτώσεις του ίδιου τύπου καρκίνου. Παρόλ' αυτά, δεν απαντώνται σε καλοήθεις όγκους, οι οποίοι εμφανίζουν τάση αυτοπεριορισμού. Αντιθέτως, η αυτόνομη και αδιάκοπη ανάπτυξη του καρκίνου συνεπάγεται, επί αποτυχίας θεραπευτικής αναχαίτισης, το θάνατο του ξενιστή. Αυτός επέρχεται είτε σαν αποτέλεσμα ανεπαρκούς κάλυψης των ενεργειακών αναγκών (καχεξία), είτε από αδυναμία υποστήριξης ζωτικών λειτουργιών λόγω διήθησης των οργάνων που τις επιτελούν, είτε τέλος σαν απότοκος επιπλοκών -κυρίως ενδοκρινολογικών και νευρολογικών που συνοδεύουν σαν επιφαινόμενα την ανάπτυξη του καρκίνου (παρανεοπλασματικά σύνδρομα).

Αν και ο καρκίνος μπορεί να θεωρηθεί ως ένα σύνολο διαφορετικών νόσων, υπάρχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά στην ανάπτυξη διαφορετικών τύπων όγκων. Οι περισσότεροι όγκοι παρουσιάζουν κλωνική προέλευση, ξεκινούν δηλαδή από ένα κύτταρο. Η κλωνική προέλευση δεν σημαίνει ότι ένας κακοήθης όγκος αναπτύσσεται εξαιτίας ενός μόνο εξαλλακτικού γεγονότος (transforming event). Αντίθετα, η ανάπτυξη ενός όγκου είναι μια πολύπλοκη και πολυσταδιακή διαδικασία, κατά την οποία ένα κύτταρο αποκτά πλήρως εξαλλαγμένο φαινότυπο μέσα από μια σειρά διαδοχικών γενετικών αλλοιώσεων. Μια ένδειξη για αυτό είναι ότι η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου αυξάνει σε αναλογία με την ηλικία.

Η πολυσταδιακή φύση του καρκίνου μπορεί επίσης να δειχθεί με την ταυτοποίηση προ-νεοπλασματικών αλλοιώσεων, οι οποίες στη συνέχεια εξελίσσονται σε κακοήθη νεοπλασματα. Για παράδειγμα, ένα πρώιμο προ-νεοπλασματικό στάδιο των καρκινωμάτων μπορεί να αναγνωρισθεί ως *επιθηλιακή δυσπλασία*. Αυτές οι αλλοιώσεις μπορεί να αντιστοιχούν στην έναρξη της νεοπλασματικής, αντανακλώντας το αποτέλεσμα μιας γενετικής

αλλοίωσης που οδηγεί ένα κύτταρο σε ανώμαλο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ένα επόμενο στάδιο είναι το *in situ* καρκίνωμα, που αντιστοιχεί σε μικρούς όγκους που δεν έχουν διηθήσει γειτονικούς ιστούς.

Αυτοί οι όγκοι προέρχονται μάλλον από τα προ-νεοπλασματικά κύτταρα και η εξέλιξη έρχεται ως αποτέλεσμα νέων μεταλλάξεων, οι οποίες οδηγούν σε πιο επιθετικές μορφές όγκων. Τέλος, περαιτέρω μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για την εξέλιξη του όγκου σε κακόηθες καρκίνωμα, που έχει δυνατότητα διήθησης και μετάστασης. Η παθογένεια των νεοπλασμάτων εξετάζεται λοιπόν σαν εξέλιξη κυτταρικών πληθυσμών με αυξανόμενη κακοήθεια σαν αποτέλεσμα μιας σειράς μεταλλάξεων που συμβαίνουν στους απογόνους ενός μοναδικού αρχικά μετασχηματισμένου κυττάρου. Η κατανόηση επομένως σε μοριακό επίπεδο της ανάπτυξης του καρκίνου, απαιτεί την ταυτοποίηση των διαδοχικών αλλοιώσεων που οδηγούν αθροιστικά στην κακοήθεια.

1.5. Η γενετική προέλευση του καρκίνου

Ο καρκίνος είναι μια νοσολογική οντότητα κατά την οποία οι κανόνες της φυσιολογικής συμπεριφοράς παύουν να ισχύουν, ή ισχύουν μερικώς. Ως νόσος περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Ιπποκράτη και από την εποχή εκείνη ως σήμερα αποτελεί ένα από τα βασικότερα αντικείμενα της ιατρικής έρευνας. Από τις αρχές του 20ου αιώνα φάνηκε με το μικροσκόπιο, ότι τα χρωματοσώματα των καρκινικών κυττάρων είχαν συχνά ανώμαλο μέγεθος και σχήμα, συγκρινόμενα με αυτά των φυσιολογικών κυττάρων. Όμως η ιδέα ότι ο καρκίνος μπορεί να οφείλεται σε βλάβη του γενετικού υλικού εμφανίστηκε νωρίτερα, στις αρχές περίπου του 19ου αιώνα, όταν παρατήρησαν ότι μερικές οικογένειες εμφάνιζαν προδιάθεση για ανάπτυξη καρκίνου (Bishop 1995).

Σημαντική ώθηση στην διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών της καρκινογένεσης προσέδωσε η μελέτη της βιολογίας του κυττάρου σε επίπεδο βασικής έρευνας. Χαρακτηριστικά αναφέρει ο J.D.Watson, ερευνητής που πρώτος ανακάλυψε την δομή του DNA, το καρκινικό κύτταρο αποτελεί για την σύγχρονη βιολογία το βασικό σύστημα-μοντέλο έρευνας, σε αντιδιαστολή με το βακτηρίδιο *E. Coli* που κατείχε τον ρόλο αυτό παλαιότερα. Η έρευνα για την κατανόηση των μηχανισμών προέλευσης και ανάπτυξης του καρκίνου οριοθετήθηκε σε κάθε χρονική περίοδο από την διαθέσιμη τεχνολογία. Αρχικά

η μελέτη του καρκίνου εστιάσθηκε σε επίπεδο πάσχοντος συστήματος, κατόπιν σε επίπεδο πάσχοντος ιστού και οργάνου και μόνο τα τελευταία χρόνια με την ραγδαία ανάπτυξη της τεχνολογίας σε κυτταρικό, βιοχημικό και μοριακό επίπεδο. Η συλλογή επιστημονικών πληροφοριών από την προαναφερόμενη ερευνητική δραστηριότητα, οδήγησε στη διατύπωση της άποψης ότι ο καρκίνος είναι μια γενετική νόσος, αφού για την ανάπτυξη του ευθύνονται αλλοιώσεις του κυτταρικού DNA, δηλαδή του γενετικού κώδικα που φέρει το κύτταρο. Οι αλλοιώσεις αυτές των γενετικών πληροφοριών σε κυτταρικό επίπεδο, διαταράσσουν την ισορροπία των διαφόρων ρυθμιστικών μηχανισμών, που ευθύνονται για τον φυσιολογικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση, προκαλώντας ανεξέλεγκτη ανάπτυξη κάποιων κυτταρικών πληθυσμών σε βάρος των υπολοίπων. Η γενετική προέλευση των νεοπλασμάτων δεν αφορά μόνο τις κληρονομικές τους μορφές, που οι αλλοιώσεις του DNA εντοπίζονται στα κύτταρα της γενετικής σειράς και συνεπώς κληρονομούνται, αλλά και τις σποραδικές μορφές της νόσου, όπου οι αλλοιώσεις του γενετικού κώδικα αφορούν, κύρια, τα σωματικά κύτταρα. Την άποψη αυτή ενισχύει σημαντικά η παρατήρηση ότι τα διάφορα κληρονομικά σύνδρομα καρκίνου, πλήττουν περισσότερα του ενός όργανα πρωτοπαθώς, χωρίς να πρόκειται για εντοπίσεις μεταστάσεων (δευτεροπαθείς εντοπίσεις) ενός πρωτοπαθούς νεοπλασματος (Σπαντίδος ΔΑ, 1992).

Πειραματικά δεδομένα (Σπαντίδος ΔΑ, 1977), τεκμηρίωσαν την μοριακή βάση του καρκίνου, ως ενός φαινότυπου που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένα χρωμοσώματα και μπορεί να μεταβιβασθεί με την μεταφορά των χρωμοσωμάτων αυτών. Στο πλαίσιο αυτό αναπτύχθηκε η τεχνολογία της μεταφοράς χρωμοσωμάτων με προεκτάσεις στην γενετική έρευνα γενικότερα. Τέλος, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η καρκινογένεση παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες σε μοριακό επίπεδο, στους διάφορους ανθρώπινους ιστούς, παρατήρηση που συμβαδίζει με την ενεργοποίηση, των εμπλεκόμενων στην διαδικασία αυτή, γονιδίων στους αντίστοιχους ιστούς. Η διελεύκανση του ρόλου των εμπλεκόμενων στην καρκινογένεση γονιδίων αποτελεί κομβικό σημείο για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την δημιουργία και ανάπτυξη των νεοπλασμάτων.

1.6. Κυτταρικά ογκογονίδια

Τα γονίδια που εμπλέκονται στην διαδικασία της καρκινογένεσης, μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κύριες ομάδες, ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους: α) τα ογκογονίδια, β) τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και γ) τα γονίδια που σχετίζονται με την επιδιόρθωση βλαβών του κυτταρικού DNA.(Spandidos 1986).

Ογκογονίδια είναι τα γονίδια των οποίων η δράση συνεισφέρει απευθείας στον καρκινικό φαινότυπο. Προέρχονται από φυσιολογικά κυτταρικά ή ιικά γονίδια (πρωτο-ογκογονίδια). Όταν κάποιο πρωτο-ογκογονίδιο εξαλλαγεί μετατρέπεται σε ενεργοποιημένο ογκογονίδιο. Τα ογκογονίδια δρουν κατά τρόπο επικρατή, δηλαδή η ενεργοποίηση ενός αλληλομόρφου αρκεί για τη φαινοτυπική έκφραση της κακοήθειας. Ενεργοποιούνται, ως επί το πλείστον, στα σωματικά κύτταρα των νοσούντων, η ενεργοποίησή τους επομένως αποτελεί επίκτητο εξαλλακτικό συμβάν (Spandidos, 1986). Ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων μπορεί να γίνει μετά από σημειακή μετάλλαξη (point mutation), μετάθεση χρωμοσωμικού τμήματος (chromosomal translocation), γονιδιακή επέκταση (gene amplification) ή αύξηση της μεταγραφικής έκφρασης του γονιδίου. Οι δυο πρώτοι μηχανισμοί οδηγούν σε απευθείας αλλοίωση του γονιδιακού προϊόντος, ενώ οι υπόλοιποι συνεπάγονται ενεργοποίηση μέσω παραγωγής του φυσιολογικού προϊόντος σε υπερβολικές ποσότητες. Έχει δειχθεί η συνεργασία μεταξύ διαφορετικών ογκογονιδίων. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι το ίδιο ογκογονίδιο μπορεί να εμπλέκεται σε διαφορετικά στάδια της διαδικασίας της καρκινογένεσης (Spandidos,1987).

Το γεγονός ότι αντίστοιχες αλληλουχίες πρωτο-ογκογονιδίων έχουν βρεθεί σε όλους τους πολυκυττάριους οργανισμούς που έχουν ελεγχθεί μέχρι τώρα, δείχνει ότι οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν παίζουν βασικό ρόλο στη λειτουργία των κυττάρων. Υπάρχουν τρεις βασικοί βιοχημικοί οδοί με τους οποίους δρουν τα πρωτο-ογκογονίδια.

Ο πρώτος μηχανισμός αφορά την φωσφορυλίωση πρωτεϊνών σε περιοχές (residues) σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης (Hunter et al 1985). Οι πρωτεΐνες αυτής της τάξεως μεταφέρουν φωσφορικές ομάδες από το ATP στην πλάγια αλυσίδα των περιοχών αυτών. Η φωσφορυλίωση εξυπηρετεί δύο βασικούς μηχανισμούς στη μετάδοση σήματος. Πρώτον, σε αρκετές

περιπτώσεις αλλάζει τη διαμόρφωση ενεργοποιώντας την δράση κινάσης της πρωτεΐνης. Δεύτερον, η φωσφορυλίωση της τυροσίνης δημιουργεί κενές θέσεις πρόσδεσης που κινητοποιούν πρωτεΐνες στόχους, τις οποίες η ενεργοποιημένη κινάση μπορεί να φωσφορυλιώσει. Ως εκ τούτου η φωσφορυλίωση ενδυναμώνει τη μετάβαση σημάτων, μέσα από τη δημιουργία συμπλεγμάτων μορίων που μεταφέρουν μηνύματα μέσα στο κύτταρο στις θέσεις που πρέπει να δράσουν.

Ο δεύτερος μηχανισμός με τον οποίο ενεργούν τα πρωτο-ογκογονίδια για να μεταφέρουν μηνύματα, σχετίζεται με τις GTPάσες (Bourne 1987, Bourne et al 1990). Τέτοια συμπεριφορά έχουν οι πρωτεΐνες που παράγονται από τα γονίδια της οικογένειας *ras*. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας *ras* λειτουργούν σαν μοριακοί διακόπτες που ανοίγουν και κλείνουν μέσω ενός ρυθμισμένου κύκλου GDP/GTP. Οι πρωτεΐνες *ras* έχουν παρομοιασθεί σαν ενδιάμεσα κλειδιά σε οδούς μεταγωγής σήματος, από τις κινάσες τυροσίνης, προς τις κινάσες σερίνης και θρεονίνης.

Ο τρίτος μηχανισμός με τον οποίο δρουν τα πρωτο-ογκογονίδια αναφέρεται σε πρωτεΐνες που εντοπίζονται στον πυρήνα (μεταγραφικοί παράγοντες). Ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την έκφραση των γονιδίων, κωδικοποιούνται από πρωτο-ογκογονίδια, μερικά από τα οποία μπορεί να εμπλέκονται και στον αναδιπλασιασμό του DNA (Ariga et al 1989, Wasylyk et al 1990). Ως εκ τούτου η απαγκίστρωση των απαιτήσεων μετασχηματισμένων κυττάρων για αυξητικούς παράγοντες, μπορεί να αντικατασταθεί από ένα ενεργοποιημένο ογκογονίδιο, σε πολλαπλά επίπεδα στα μονοπάτια μετάδοσης σημάτων.

Τα ογκογονίδια ταυτοποιήθηκαν αργότερα, μεταφέροντας DNA από κυτταρικούς κλώνους που προέρχονταν από όγκους (Spandidos et al 1977, Spandidos et al 1978). Έως σήμερα έχουν αναγνωριστεί περίπου 200 ογκογονίδια. Τα πρωτεϊνικά προϊόντα των πρωτο-ογκογονιδίων ασκούν δράσεις που γενικά προάγουν την κυτταρική ανάπτυξη, παρεμβαίνοντας στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της σταθερότητας του DNA και της διαφοροποίησης. Όσον αφορά την κυτταρική εντόπιση και το βιοχημικό ρόλο των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα ογκογονίδια, μπορούν να καταταχθούν στις εξής κατηγορίες:

α. Αυξητικοί παράγοντες, όπως: το sis ογκογονίδιο, (που ταυτοποιήθηκε αρχικά ως ένα ογκογονίδιο του ιού που προκαλεί σάρκωμα σε πιθήκους και απομονώθηκε από ένα ινοσάρκωμα το 1971), το οποίο κωδικοποιεί την παραγωγή ενός τύπου του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF, Platelet Derived Growth Factor), του EGF (Endothelial Growth Factor), του TGF-α (Transforming Growth Factor), κ.α, και προκαλεί εξαλλαγή κυτταρικών σειρών που διαθέτουν τον αντίστοιχο υποδοχέα. Τα πρωτο-ογκογονίδια int-2 και hst/K-FGF είναι μέλη της γονιδιακής οικογένειας αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών. Η υπερέκφραση των ογκογονιδίων αυτών είναι συνέπεια της μεταγραφικής τους απορρύθμιση, με αποτέλεσμα την υπερέκφραση των φυσιολογικών πρωτεϊνών τους.

β. Διαμεμβρανικοί υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης, όπως οι: erbB-1, erbB-2 και fms, καθώς και ενδοκυτταρικοί υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης, όπως το erbA.

γ. Κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης, όπως οι: scr, abl, yes, οι οποίες φαίνεται να συμμετέχουν στη μετάδοση των σημάτων που δέχεται το κύτταρο μέσω των υποδοχέων του.

δ. Κυτταροπλασματικές κινάσες σερίνης-θρεονίνης, όπως οι: raf και mos.

ε. Κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που δεσμεύουν νουκλεοτίδια γουανίνης, όπως οι ras.

στ. Πυρηνικά ογκογονίδια, όπως τα: myc, jun, fos, myb, ski. Η κυτταρική τους εντόπιση δεικνύει ότι θα πρέπει να εμπλέκονται στην αντιγραφή ή τη μεταγραφή του DNA ή ακόμα και στη διατήρηση της κυτταρικής δομής. Διαταραχές της έκφρασης των γονιδίων αυτών οδηγούν επαγωγικά στην κακοήγη εξαλλαγή των κυττάρων, μέσω της αλλοίωσης της έκφρασης των γονιδίων που ελέγχουν.

Πίνακας 1.1: Πρωτο-ογκογονίδια, μηχανισμός αλλοίωσης τους και συμμετοχή τους σε ανθρώπινα νεοπλάσματα.

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

1.7. Ογκογονίδια σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα οισοφάγου.

1.7.1. Αυξητικοί Παράγοντες.

Οι αυξητικοί παράγοντες αναγκάζουν τα κύτταρα σε φάσης ηρεμίας (G0), να εισέλθουν και να προχωρήσουν στο κυτταρικό κύκλο. Ο epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF) και οι *a*, *c-sis* έχουν καταδειχθεί να λειτουργούν ως αυτοκρινείς παράγοντες αύξησης για το ESCC σε οισοφαγικές κυτταρικές σειρές. Επίσης, η ενίσχυση των *hst-1* και *int-2* έχει περιγραφεί σε ESCC (περίπου 30–50%) και συνδέθηκε με επιθετική συμπεριφορά. Στη συνέχεια, το γονίδιο *cyclin D1* (μια πυρηνική ρυθμιστική πρωτεΐνη) βρέθηκε να συνενισχύεται με την ενίσχυση των *hst-1* και *int-2*. Το γονίδιο *EXP-1* έχει αναφερθεί επίσης σε αυτήν την περιοχή. Μεταξύ όλων αυτών των γονιδίων, μόνο το *cyclin D1* βρέθηκε με υπέρεκφράση, και το

οποίο εμφανίζεται να είναι το σημαντικότερο γονίδιο σε αυτήν την περιοχή του χρωμοσώματος. Δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία ότι οι αυξητικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε ESCC. (K.Y.Lam 2000)

1.7.2. Υποδοχείς αυξητικών παραγόντων.

Η οικογένεια των υποδοχέων epidermal growth factor, μεταφράζει τις πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης που ενεργούν ως υποδοχείς και έχουν ενδοκυττάρια δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης, και εξωκυττάρια δεσμευτική περιοχή. Υπάρχουν τέσσερα μέλη αυτής της οικογένειας *erbB-1*, *erbB-2*, *erbB-3* και *erbB-4*. Σε ESCC, μόνο οι ρόλοι των *erbB-1*, *erbB-2* έχουν ερευνηθεί. Η ενίσχυση DNA ή η υπερπαραγωγή mRNA που οδηγούν στην υπερέκφραση της πρωτεΐνης είναι οι κοινοί τρόποι της ενεργοποίησης γονιδίων σε αυτήν την ομάδα γονιδίων. (K.Y.Lam 2000)

1.7.2.1. erb-B1.

Πολλές κυτταρικές σειρές ακανθοκυτταρικών καρκινικών κυττάρων παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης *erbB-1*. Η υπερέκφραση *erbB-1* βρέθηκε σε ένα σημαντικό ποσοστό ESCC νεοπλασιών (29–92%), με χαρακτηριστικό την χειρότερη πρόγνωση, συμπεράσματα που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να καθοδηγήσουν την εφαρμογή λιγότερης επεμβατικής χειρουργικής αντιμετώπισης (transhiatal esophagectomy) στους ασθενείς με ESCC, και σε καλύτερη αντάποκριση στη χημειοθεραπεία. Κατά συνέπεια, τα στοιχεία μέχρι σήμερα υποστηρίζουν ότι η έκφραση *erbB-1* αποτελεί στοιχείο φτωχής πρόγνωσης σε ESCC. (K.Y.Lam 2000)

1.7.2.2. erb B2.

Η υπερπαραγωγή του *erb B2* σημειώνεται συνήθως στο αδενοκαρκίνωμα αλλά σπάνια στο ακανθοκυτταρικό κυτταρικό καρκίνωμα. Το ποσοστό *erbB-2* ενεργοποίησης σε ESCC κυμάνθηκε από 0–38%. Εντούτοις, δεν χαρακτηρίζεται ως προγνωστικός δείκτης σε ESCC. (K.Y.Lam 2000)

1.7.3. Signal transducers

Τα μέλη της οικογένειας γονιδίων *ras* κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη 21kDa γνωστή ως *ras p21*. Η *p21* μοιάζουν με τις πρωτεΐνες G που ενεργούν στη μεταφορά σημάτων από τους υποδοχείς κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου, ρυθμίζοντας την κυτταρική αύξηση και τη διαφοροποίηση. Αφ' ετέρου, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης *ras p21* σε ESCC

βρέθηκε σε τρεις μελέτες. Επίσης, οι Casson et al. διαπίστωσαν ότι τα προϊόντα δύο *ras*-ρυθμιζόμενων γονιδίων, η osteopontin και η cathepsin L, ήταν σε υπερέκφραση σε 6 δείγματα ESCC ενώ δεν βρήκαν καμία μεταλλαγή στο γονίδιο *ras*. Τα γενικά συμπεράσματα προτείνουν ότι η *ras* μεταλλαγή δεν έχει ιδιαίτερο σημαντικό ρόλο στην παθογένεση ESCC. (K.Y.Lam 2000)

1.7.4. Πυρηνικοί Παράγοντες

1.7.4.1. *myc*.

Το ογκογονίδιο *myc* κωδικοποιεί μία phosphoprotein, την p62, η οποία δεσμεύει το DNA με την πρωτεΐνη Max, και απαιτείται για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (την είσοδο στην G1 από την G0), τη διαφοροποίηση και ενδεχομένως την αντιγραφή DNA. Η ενίσχυση του *Myc* έχει ανιχνευθεί σε κυτταρικές σειρές και σε δείγματα όγκων ESCC σε μερικές μελέτες. Οι Miyazaki et al. διαπίστωσαν ότι η πρωτεΐνη *myc* βρέθηκε ως κυτταροπλασματική αλλά και ως πυρηνική πρωτεΐνη σε μελέτες ανοσοιστοχημείας σε προχωρημένο ESCC. Από τα περιορισμένα στοιχεία στη βιβλιογραφία, το γονίδιο δεν φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε ESCC. (K.Y.Lam 2000)

1.7.4.2. Cyclin D1.

Το προϊόν του γονιδίου *cyclin D1* διαμορφώνει μία ένωση με την κυκλίνη-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση, που κατευθύνει μια βασική μετάβαση στον κυτταρικό κύκλο. Η ενίσχυση και η υπερέκφραση του γονιδίου καταδείχθηκαν σε κυτταρικές σειρές ESCC, αλλά και σε δείγματα όγκων ESCC, σε 22–73% των περιπτώσεων. Η ενίσχυση και η υπερέκφραση του γονιδίου *cyclin D1* βρέθηκε να είναι δείκτης πτωχής πρόγνωσης, και συνδέεται με την αυξανόμενη παρουσία λεμφαδένικών μεταστάσεων, υψηλής πολλαπλασιαστικής δραστηριότητας, υψηλής σταδιοποίησης όγκων, φτωχής απάντησης στη χημειοθεραπεία και πτωχής επιβίωσης ασθενών. Τα αποτελέσματα όλων των ερευνών το θεώρησαν σημαντική παράμετρο, που προβλέπει μια δυσμενή γενική επιβίωση στους ασθενείς με ESCC. (K.Y.Lam 2000)

1.7.4.3. *mdm2*.

Το προϊόν του γονιδίου *mdm 2* είναι ένας ισχυρός ανασταλτικός παράγοντας της πρωτεΐνης p53, και μπορεί να λειτουργήσει για να προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά και να ενισχύσει την επιβίωση. Οι Zhu

et al. στην Κίνα απέτυχαν να βρουν ενίσχυση *mdm2* σε ESCC, και οι Shibagaki et al. στην Ιαπωνία ανέφεραν ενίσχυση *mdm2* σε 18% από 72 ESCC. Η ενίσχυση *mdm2* δεν αφορούσε τη μεταλλαγή p53. Τα συμπεράσματα από αυτές τις δύο μελέτες πρέπει να επιβεβαιωθούν από περισσότερες έρευνες από άλλες πηγές. (K.Y.Lam 2000)

1.8. Ογκο-κατασταλτικά γονίδια

Τα ογκο-κατασταλτικά γονίδια προέρχονται (όπως και τα ογκογονίδια) από φυσιολογικά γονίδια. Κωδικοποιούν την φυσιολογική παραγωγή προϊόντων που ασκούν ανασταλτική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η δραστηριότητα των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων στον καρκινικό φαινότυπο συμπεριφέρεται συνεπώς με τρόπο υπολειπόμενο, με αποτέλεσμα να χαρακτηρισθούν από ορισμένους ερευνητές και ως υπολειπόμενα γονίδια, χωρίς όμως ο όρος να επικρατήσει στη διεθνή βιβλιογραφία. Για την αλλαγή της κυτταρικής συμπεριφοράς, επομένως, απαιτείται η λειτουργική απενεργοποίηση και των δύο αλληλομόρφων ενός ογκο-κατασταλτικού γονιδίου (Knudson, 1986).

Αν και τα ογκογονίδια ανακαλύφθηκαν με άμεσες τεχνικές εξαιτίας της επικρατητικής τους ικανότητας να μεταλλάσσουν το φαινότυπο φυσιολογικών κυττάρων, η ανίχνευση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων ήταν πιο κοπιώδης λόγω του υπολειπόμενου χαρακτήρα τους. Η ιδέα ύπαρξης γονιδίων που καταστέλλουν την ογκογένεση ξεκίνησε από την παρατήρηση ότι σε μελέτες υβριδισμού μεταλλαγμένων με φυσιολογικά κύτταρα οι επίγονοι εμφάνιζαν μεταλλαγμένο φαινότυπο μόνον όταν συγκεκριμένα χρωμοσωμικά τμήματα απουσίαζαν από το υβριδικό γονιδίωμα. Σύντηξη κακοήθων κυττάρων με κύτταρα που δεν έφεραν ορισμένες καρκινικές ιδιότητες είχε σαν αποτέλεσμα καταστολή των ιδιοτήτων αυτών και επαναφορά στο μη καρκινικό φαινότυπο. Η απώλεια του ογκογόνου δυναμικού με την επανεμφάνιση των χρωμοσωμικών τμημάτων απεδείκνυε ότι τα γονίδια που σχετίζονταν με τις συγκεκριμένες περιοχές εκφράζονταν κατά τρόπο υπολειπόμενο.

Πίνακας 1.2: Ογκοκατασταλτικά γονίδια και συσχετιζόμενα σύνδρομα και καρκίνοι.

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

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

Γονίδιο	Σύνδρομο	Συχνότερο νεόπλασμα
DPC4		Παγκρέατος, παχέος εντέρου και άλλοι
E-καντερίνη		Στομάχου, μαστού, ενδομητρίου, ωθηκών
α-κατενίνη		Προστάτη, πνεύμονα
DCC		Παχέος εντέρου, εγκεφάλου, νευροβλάστωμα
PTEN	Σύνδρομο Cowden	Πολλαπλά αμαρτώματα, καρκίνος μαστού, θυρεοειδούς
TGF-II R		Παχέος εντέρου

1.8.1. Δράση των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων

Οι λειτουργίες των προϊόντων των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων είναι ποικίλες και ετερογενείς. Ασκούνται σε διάφορα στάδια της κυτταρικής λειτουργίας, όπως οι τέσσερις φάσεις της διαίρεσης, η κυτταρική προσκόληση (cell adhesion) και η ρύθμιση της μεταγραφής. Επιπλέον τα ογκο-κατασταλτικά γονίδια εμπλέκονται στη ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), με τρόπο ώστε να την επιβραδύνουν ή αναστέλλουν.

Οι κυριότεροι ρυθμιστές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι οι κινάσες που εξαρτώνται από κυκλίνες (Cyclin Dependent Kinases -CDKs). Πρόκειται για ενζυματικά σύμπλοκα -συχνά προϊόντα πρωτο-ογκογονιδίων- που επάγουν τον κυτταρικό κύκλο ή εισάγουν το κύτταρο σε αυτόν, κατόπιν ενεργοποίησης από αυξητικούς παράγοντες (Harper, 1997). Τα φυσιολογικά προϊόντα ογκο-κατασταλτικών γονιδίων (π.χ. *ink4*, του γονιδίου *p16*) συνδεόμενα με τις CDKs προκαλούν διακοπή του κυτταρικού κύκλου και αναστολή της φωσφορυλίωσης άλλων προϊόντων ογκο-κατασταλτικών γονιδίων (*Rb*), ισοδύναμη με κυτταρική "ανάπαυση" στη μεσόφαση (Pavletich, 1999).

Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από τα ογκο-κατασταλτικά γονίδια επιτελείται σε συγκεκριμένα σημεία ελέγχου (checkpoints) όταν συσσωρευμένες γενετικές βλάβες ή περιβαλλοντικές επιδράσεις καθιστούν επισφαλή την περαιτέρω κυτταρική διαίρεση. Τότε αναλαμβάνουν συγκεκριμένα προϊόντα γονιδίων (π.χ. *p53*) να αναστείλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επηρεάζοντας τη λειτουργία άλλων ογκο-κατασταλτικών γονιδίων-στόχων (π.χ. *p21*) (El-Deiry, 1993) ή αλληλεπιδρώντας με ογκογονίδια (π.χ. *ras*, *myc*) (Mac Cormack, 1998).

1.9 Ογκο-κατασταλτικά γονίδια σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα οισοφάγου.

1.9.1. *p53*

Η μεταλλαγή *p53* είναι η πιο κοινή γενετική αλλαγή στους ανθρώπινους καρκίνους και η πολύ συχνά μελετημένη γενετική αλλαγή σε ESCC, οι οποίοι κυμαίνονται από 10–85%. Σε πολλές από τις αυτές τις δημοσιευμένες σειρές, η επίπτωση της μεταλλαγής *p53* σε ESCC είναι περίπου 50%. Η συχνότητα

των μεταλλαγών εμφανίζεται να είναι υψηλότερη στις υψηλές περιοχές επίπτωσης. Η πλειοψηφία των μεταλλαγών p53 σε ESCC είναι εντοπισμένη μέσα σε τέσσερις εξελικτικές συντηρημένες περιοχές του γονιδίου, τα εξόνια 5 μέχρι 8. Πολλές από τις μεταλλαγές p53 που βρίσκονται είναι σημειακές μεταλλαγές. Οι μεταλλαγές p53 με G.T transversions έχουν συνδεθεί με τις χημικές καρκινογόνες ουσίες που βρίσκονται στο περιβάλλον, τον καπνό τσιγάρων, και την αφλατοξίνη. Υπάρχει μια αντίθετη σχέση μεταξύ μεταλλαγής p53 και HPV που τεκμηριώνονται στον καρκίνο τραχήλου μήτρας. Αυτή η αντίθετη σχέση τίθεται από τη σύνδεση των HPV πρωτεϊνών E6 με την p53, με συνέπεια την απώλεια της κατασταλτικής δραστηριότητας της. Εντούτοις, μελέτες αποκάλυψαν ότι η παρουσία του HPV DNA και p53 συνυπάρχουν σε κάποια ESCC. (K.Y.Lam 2000)

Οι μεταλλαγές p53 θα μπορούσαν να καθοριστούν με ανοσοιστοχημεία, με μοριακές μεθόδους, και πρόσφατα στον ορό. Η μέθοδος ανοσοιστοχημείας όπως συγκρίνεται με μοριακές μεθόδους για την ανίχνευση μεταλλαγών p53, έχει και πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα. Οι μεταλλαγές p53 όπως ανιχνεύονται από τη μοριακή ανάλυση δεν είναι συνώνυμη με την p53 υπερέκφραση από ανοσοιστοχημεία. Εντούτοις, η ανάλυση p53 με ανοσοιστοχημεία είναι σχετικά γρήγορη, απλή, φτηνή, τεχνική με λιγότερο εντατική εργασία, και επιτρέπει στον καλύτερο συσχετισμό με τις ιστολογικές παραμέτρους και το μεγάλο αριθμό περιπτώσεων για να αναλυθεί. Μ' αυτό τον τρόπο, η υπερέκφραση p53 βρέθηκε να βρίσκεται σε λιγότερο διαφοροποιημένα κύτταρα στην περιφέρεια των κυττάρικών όγκων, στοιχείο που μπορεί να υποστηρίξει ότι οι μεταλλαγές p53 μπορούν να εμφανιστούν σε αρχικά στάδια της καρκινογένεσης οισοφάγου. Επίσης τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ασθενείς με μεταλλαγές p53 είναι πιθανό να έχουν μια πιο σύντομη επιβίωση. (K.Y.Lam 2000)

1.9.2. p21

Το γονίδιο p21 θεωρείται ότι διαδραματίζει έναν κεντρικό ρόλο στην καταστολή όγκων. Η μεταγραφή του ρυθμίζεται από το ογκογονίδιο wild-type p53. Σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα οισοφάγου, η έκφραση p21 έχει ερευνηθεί μόνο σε επτά σειρές με την μέθοδο της ανοσοιστοχημείας. Η επίπτωση παρουσίας της p21 σε ESCC κυμάνθηκε από 27 - 85%. Η παρουσία της p21 έκφρασης αναδείχθηκε σε καλά και μέτρια

διαφοροποιημένα ESCC, κυρίως σε περιοχές με κερατινοποίηση. Δεν υπήρξε κανένας σημαντικός συσχετισμός μεταξύ της έκφρασης p21 και της ανώμαλης συσσώρευσης p53 σε ESCC. Επιπλέον, τα ποσοστά επιβίωσης ασθενών με ESCC ήταν χειρότερα εάν είχαν την έκφραση και p21 και p53. Κατά συνέπεια, και η p21 και η p53 έχουν έναν ρόλο στην παθογένεση ESCC. (K.Y.Lam 2000)

1.9.3. p16 and p15

Τα p16 και p15 είναι ογκοκατασταλτικά γονίδια που χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα 9p21–22. Έχουν ισοδύναμες ικανότητες να δεσμεύσουν CDK4 και CDK6 και να εμποδίσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με την παρεμπόδιση της εισόδου στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Μεταλλαγές p15 περιγράφηκαν συχνότερα σε αιματοποιητικές νεοπλασίες και σε γλιώματα ενώ οι μεταλλαγές p16 παρατηρήθηκαν σε επιθηλιακούς όγκους. Η επίπτωση των μεταλλαγών p16 σε ESCC αναφέρεται ότι ποικίλει από 0-86%. Αντίθετα οι μεταλλαγές p15 είναι λιγότερο συχνές. Έχουν ερευνηθεί σε δύο δείγματα νεοπλασιών ESCC με θετικά ανιχνευμένη p15 σε 3-45%. Από τα περιορισμένα αυτά στοιχεία, φαίνεται ότι η απώλεια της έκφρασης p16 έχει έναν προγνωστικό ρόλο σε ESCC. Επιπλέον, ο ρόλος p15 σε ESCC θα πρέπει να διευκρινιστεί με περισσότερες έρευνες. (K.Y.Lam 2000)

1.9.4. p27

Η p27, ένας από τους κυκλίνη-εξαρτώμενους ανασταλτικούς παράγοντες κινάσεων, αποτελεί φραγμό από την φάση G1 στη S του κυτταρικού κύκλου, με τη δέσμευση της κυκλίνης D1-CD4 και ή της E-CDK2, και την παρεμπόδιση της δραστηριότητάς τους. Οι Shamma et al. διαπίστωσαν ότι η έκφραση p27 είχε απωλεσθεί σε 41% από 66 ασθενείς με ESCC. Επίσης, οι Anayama et al. ανέφεραν ότι 27% από 77 ασθενείς με ESCC υπερέκφραζαν τη p27, και ότι η υπερέκφραση της p27 σε ESCC συνδέθηκε με το προχωρημένο κλινικό στάδιο και τη φτωχή επιβίωση. (K.Y.Lam 2000)

1.9.5. Retinoblastoma (Rb)

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο Rb είναι είναι πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που συμμετέχει στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Όταν η Rb πρωτεΐνη είναι φωσφορυλιωμένη (από CDK:cyclin D1 complex), ή η μη-φωσφορυλιωμένη μορφή αδρανοποιείται, ο περιορισμός στην αύξηση των

κυττάρων απελευθερώνεται. Σε ESCC, οι μεταλλαγές Rb βρέθηκαν από 0% - 100% των ασθενών. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι μεταλλαγές Rb (είτε από ανάλυση με ανοσοιστοχημεία είτε με LOH) ανιχνεύθηκαν στο ένα τρίτο έως το ένα δεύτερο των περιπτώσεων με ESCC. Από αυτά τα συμπεράσματα, φαίνεται ότι οι μεταλλαγές Rb έχουν ρόλο σε ESCC, και ότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τον καθορισμό ενός προγνωστικού ρόλου. (K.Y.Lam 2000)

1.9.6. Άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Μερικά ογκοκατασταλτικά γονίδια που συσχετίζονται συνήθως με άλλους καρκίνους έχουν ερευνηθεί σε ESCC. Αυτά περιλαμβάνουν τα *MCC*, *APC*, *DCC* που συνδέονται με καρκίνους παχέος εντέρου, και το *BRAC 1* σχετίζεται με καρκίνους μαστού, ωθηκών. Η απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH) σε αυτά τα γονίδια έχει ανιχνευθεί σε κάποια δείγματα ESCC. Οι Miyake et al. βρήκαν μεταλλαγές *DCC* σε 23% ESCC, κυρίως σε χαμηλής και μετρίου διαφοροποίησης ESCC, και σχετίζονταν με το βαθμό λεμφαδένικών μεταστάσεων. Σε μια μελέτη, οι Mori et al αποκάλυψαν τη συχνή απώλεια της ετεροζυγωτίας στην περιοχή του χρωμοσώματος που περιέχει το γονίδιο *BRAC 1*, σε 62% από τα ESCC. Συνολικά, δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία ότι οι μεταλλαγές σε αυτά τα γονίδια είναι σημαντικές στην παθογένεση ESCC. (K.Y.Lam 2000)

Πίνακας 1.5: Συνδυασμοί ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων που εμφανίζονται σε ορισμένα νεοπλάσματα του ανθρώπου

Όγκοι	Γονίδια
Καρκίνος τραχήλου	HRAS, MYC, MYCN, p53, RB1
Καρκίνος παχέος εντέρου	APC, MCC, DCC, KRAS2, p53, TGFBR2
Καρκίνος μαστού	MYB, MYC, cyclin D3, EGFR, HER2, HRAS, p53, RB1, BRCA1, HSTF1, INT2, YES1
Καρκίνος προστάτη	MET, HER2, p53, RB1
Καρκίνος νεφρού	VHL, EGFR, HER2, MET
Καρκίνος πνεύμονα	MYC, MYCN, MYCL, HRAS2, RB1, p53, RAF1, JUN
Λέμφωμα	Cyclin D1, BCL2, BCL3, HER2, REL, NFkB2, NPM, ALK, KRAS2, NRAS, YES1
Καρκίνος στομάχου	HER2, MET, K-SAM, BCL2, APC, P-cadherin, p53, KRAS, RB1
Χρόνια μυελογενής λευχαιμία	ABL, BCR, MYC, NRAS, RB1, p53, ERG, TLS/FUS, HOXA9, NUP98, AML1, EAP, EVI1, MN1, TEL1, MDS1

Πίνακας 1.6: Ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια που έχουν μελετηθεί σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του οισοφάγου. (K.Y.Lam 2000, A.-M. Mandard 2000)

Γονίδιο	Χρωμόσωμα	Άλλη ονομασία
Αυξητικοί Παράγοντες		
hst-1		
int-2	11q13	HSTF1, Fibroblast growth factor gene
EXP1	11q13	Heparin-binding growth factor gene
	11q13	-
Υποδοχείς αυξ. παραγόντων		
c-erbB1	7p12-13	HER-1, Epidermal growth factor receptor (EGFR)
c-erbB2	17q21	HER-2, NGL, neu
Πυρηνικοί παράγοντες		
myc	8q24	-
Cyclin D1	11q13	bcl-1, PRAD1, EXP2, CCND1
Mdm2	12q13-14	murine double minute 2
Αντιογκογονίδια		
p53	17p13	-
p21	6p21	WAF1, CIP1, CAP20, PIC1, SDI1
p16	9p21	MTS1, CDK4I, INK4a, CDKN2, CDKN2A
p15	9p21	MTS2, INK4b, CDKN2B
p27	12p13	KIP1
Rb	13q14	Retinoblatoma
DCC	18q21	Deleted in colorectal cancer gene
MCC	5q21	Mutated in colorectal cancer gene
APC	5q21	FAP (familial adenomatous polyposis coli) gene
BRCA1	17q21	-
Γονίδια μετάστασης		
nm23	17q21	NME1, NME2
Γονίδια απόπτωσης		
bcl-2	18q21	bcl-2 -associated X
bax	19q13	

1.10. Μεταλλακτικά γονίδια

Λάθη που προκύπτουν κατά τον αναδιπλασιασμό του DNA και δεν διορθώνονται από την επιδιορθωτική (proofreading) ικανότητα της DNA πολυμεράσης, μπορούν να διορθωθούν από ένα μηχανισμό που λέγεται

μηχανισμός επιδιόρθωσης των κακοζευγαρωμένων βάσεων (mismatch repair process). Αυτός ο μηχανισμός αφορά την αναγνώριση αταίριαστων βάσεων, ή απαλείψεων, ή παρεμβολών (insertions) στη νεοσυσταθείσα έλικα του DNA και την διόρθωση των λαθών. Τα γονίδια που εμπλέκονται σε αυτό το μηχανισμό ονομάζονται μεταλλακτικά γονίδια.

Τα μεταλλακτικά γονίδια (ή γονίδια επιδιόρθωσης του DNA) βρέθηκαν για πρώτη φορά στο κολοβακτηρίδιο (*E.coli*) και ονομάστηκαν *mutH*, *mutL* και *mutS*. Μετάλλαξη σε οποιοδήποτε από αυτά τα γονίδια δημιουργούσε ένα τροποποιημένο φαινότυπο του κυττάρου, επειδή συχνά ακολουθούσαν και άλλες μεταλλάξεις σε πολλές θέσεις στο γονιδίωμα του κυττάρου (Kolodner 1996).

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

Βλάβες των μεταλλακτικών γονιδίων προδιαθέτουν στην άθροιση μεταλλάξεων σε άλλα γονίδια και αυτό αντανακλάται στην αστάθεια μήκους του μικροδορυφορικού DNA. Το μικροδορυφορικό DNA αφορά επαναλήψεις 10 έως 50 φορές μικρών αλληλουχιών του DNA (μέχρι 6 βάσεων) κληρονομείται με Μεντελικό τρόπο και παρουσιάζει πολυμορφισμό μεταξύ ανθρώπων. Η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA (microsatellite instability, MIN) αποτελεί ένα έμμεσο δείκτη ανίχνευσης βλαβών στο μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA.

1.11. Η πολυσταδιακή φύση του καρκίνου

Οι πρώτες παρατηρήσεις που οδήγησαν στην υπόθεση των «πολλαπλών χτυπημάτων» προήλθαν από το προοδευτικά υψηλότερο ποσοστό κρουσμάτων καρκίνου προϊούσης της ηλικίας. Η συσχέτιση των κρουσμάτων καρκίνου με την πάροδο της ηλικίας ακολουθεί εκθετικό μοντέλο. Αν και υπήρξαν πολλές θεωρητικές εξηγήσεις για την εκθετική αυτή σχέση, εντούτοις με βάση τις πειραματικές παρατηρήσεις που ακολούθησαν, η

επικρατέστερη προς το παρόν εξήγηση είναι ότι απαιτούνται περίπου 12 “χτυπήματα” για τη γένεση ενός συγκεκριμένου όγκου (Πίνακας 4). Αυτά τα χτυπήματα θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν προσβολές σε ξεχωριστά κύτταρα, όμως επειδή ο κάθε όγκος προκύπτει από ένα προγονικό κύτταρο (κλωνική αύξηση), είναι πιο πιθανό να αντιπροσωπεύουν διαδοχικές μεταλλαγές σε γονίδια ενός και μόνο κυττάρου και των κυτταρικών απογόνων αυτού (Spandidos 1985, Spandidos 1986, Fearon et al 1990, Σπαντίδος 1992, Vogelstein et al 1993, Evans 1993).

Σύμφωνα με αυτή την άποψη, οι όγκοι αναπτύσσονται με μια κλωνική εξελικτική διαδικασία κατευθυνόμενη από μεταλλαγές. Η πρώτη μεταλλαγή έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμένο πολλαπλασιασμό των κυτταρικών απογόνων ενός και μόνο κυττάρου. Στη συνέχεια ένα από τα κύτταρα αυτά αποκτά μια δεύτερη μεταλλαγή, επιτρέποντας πιθανόν την ανάπτυξη ενός μικρού καλοήθους όγκου. Κάποιο από τα κύτταρα του καλοήθους όγκου μπορεί να υποστεί και μια τρίτη μεταλλαγή, να πολλαπλασιαστεί έναντι των άλλων κυττάρων του όγκου και να σχηματίσει μια πιο εξελιγμένη μορφή του όγκου. Ο όγκος αυτός θα αποτελείται από κύτταρα που έχουν υποστεί και τις τρεις μεταλλαγές. Τελικά, κάποια κλωνικά κύτταρα θα συσσωρεύσουν ένα ικανοποιητικό αριθμό γενετικών αλλοιώσεων που επιτρέπει την διήθηση στους γύρω ιστούς και την πρόκληση μετάστασης σε άλλα όργανα (Spandidos 1985, Spandidos 1986, Fearon et al 1990, Σπαντίδος 1992, Vogelstein et al 1993, Evans 1993).

Στη διατύπωση αυτής της υπόθεσης οδήγησαν και άλλες επιδημιολογικές και κλινικές παρατηρήσεις. Για παράδειγμα ασθενείς που έχουν εκτεθεί σε ακτινοβολία (ραδιενέργεια ή ακτίνες Χ) αναπτύσσουν όγκους που εμφανίζονται μετά από δεκαετίες. Το ερώτημα που είχε τεθεί από την αρχή ήταν, ποιά η αιτία της τόσο μεγάλης χρονικής υστέρησης στην εμφάνιση της νόσου. Μια πιθανή εξήγηση ήταν ότι η ακτινοβολία προκαλεί μεταλλαγές σε κάποια κύτταρα, όμως απαιτούνται πρόσθετες μεταλλαγές στους κλώνους αυτών των κυττάρων για την ανάπτυξη του όγκου (Vogelstein et al 1993, Evans 1993).

1.12. Ογκογόνοι ιοί

Οι πρώτες ενδείξεις περί της συμμετοχής ιών στην ογκογενετική διαδικασία προήλθαν πριν από σχεδόν έναν αιώνα και η αξία της πληροφορίας αυτής αναγνωρίστηκε με την απονομή του βραβείου Nobel το 1968 στον Rous που ήταν ο εμπνευστής της ιδέας. Το 1944 ο Avery έδειξε σε βακτηρίδια ότι η γενετική πληροφορία περιέχεται στο DNA, κάτι που οδήγησε στην ιδέα ότι οι καρκίνοι μπορεί να προέρχονται από μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό των κυττάρων. Το 1963, οι Vogt και Dulbecco καλλιέργησαν φυσιολογικά κύτταρα *in vitro* τα οποία μετά από μόλυνση με τον πολυόμα ιό απέκτησαν πολλά από τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Το γεγονός αυτό, γνωστό ως μεταμόρφωση, αποτέλεσε κλειδί στην μελέτη του προκαλούμενου από ιούς καρκίνου. Σήμερα υπάρχει αποδεδειγμένη συμμετοχή ιογενών λοιμώξεων στην αιτιολογία ενός στους επτά καρκίνους που συμβαίνουν παγκοσμίως (Zur Hausen, 1999), με τον ιό του θηλώματος του ανθρώπου (HPV) και τους ηπατοτρόπους ιούς (HBV, HCV) να ευθύνονται για πάνω από 80% των περιπτώσεων αυτών. Τόσο DNA, όσο και RNA ιοί μπορούν με τη δράση τους να συμβάλλουν στη δημιουργία όγκων στον άνθρωπο.

1.12.1. DNA ογκογόνοι ιοί

Οι DNA ογκογόνοι ιοί (π.χ. HPV, HBV) έχουν την ικανότητα να ενσωματώνουν περιοχές του γονιδιώματός τους στο γενετικό υλικό των ξενιστών. Αν και σε ορισμένες περιπτώσεις ολόκληρο το γένωμα του ιού είναι ενσωματωμένο στο χρωμόσωμα του κυττάρου του ξενιστή, εν τούτοις στις περισσότερες περιπτώσεις παρευρίσκεται μόνο ένα μικρό τμήμα του DNA του ιού. Οι ιικές πρωτεΐνες εκφράζονται στα προσβεβλημένα κύτταρα, τροποποιώντας τη συμπεριφορά γονιδίων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση. Με τέτοιο μηχανισμό προκύπτει απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, μετά από ενσωμάτωση του γονιδίου ORF X του ιού της Ηπατίτιδος Β στα ηπατοκύτταρα πασχόντων από τη νόσο. Στο 70% περίπου των περιπτώσεων τραχήλου της μήτρας ανευρίσκονται τα στελέχη HPV16 και HPV17. Ενσωμάτωση των ιικών γονιδίων E6 και E7 στα καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε απώλεια δράσης των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων p53 και Rb (Münger1989, Scheffner 1990).

Οι DNA ογκογόνοι ιοί του ανθρώπου περιλαμβάνουν τους ηπατοτρόπους ιούς (HBV,HCV), τον Epstein-Barr (EBV), τον ιό του απλού έρπητα και τους ιούς του ανθρώπινου θηλώματος (HPV). Επίσης σε αυτήν την κατηγορία περιλαμβάνονται οι αδενοϊοί και οι πολυόμα ιοί οι οποίοι είναι ογκογόνοι in vitro και in vivo αλλά δεν έχουν συνδεθεί με όγκους που απαντούν στη φύση. Οι HBV και HCV προκαλούν πρωτοπαθή ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Αυτός ο καρκίνος είναι κοινός στην Αφρική και την Άπω Ανατολή. Οι περιοχές υψηλής συχνότητας συμπίπτουν με εκείνες στις οποίες υπάρχει υψηλή στάθμη των φορέων του ιού. Τα καρκινικά κύτταρα του ήπατος περιέχουν ενσωματωμένα στα χρωμοσώματά τους DNA της ηπατίτιδας. Ο ιός EBV ευθύνεται για το λέμφωμα Burkitt και το ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα. Ο ιός του απλού έρπητα ενέχεται στην παθογένεια του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας ενώ οι HPV ευθύνονται για μια πληθώρα καρκίνων μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας, ο δερματικός καρκίνος κ.ά. Οι ανωτέρω ιοί αναπτύσσονται διεξοδικά στα ακόλουθα κεφάλαια.

1.12.2. Ρετροϊοί

Τα περισσότερα είδη ζώων καθώς και ο άνθρωπος είναι φυσικοί ξενιστές των αντίστοιχων για κάθε είδος ρετροϊών. Η μετάδοση συμβαίνει με τρεις τρόπους: οριζόντια, συγγενώς και γενετικώς. Στον οριζόντιο τρόπο μετάδοσης, ο ιός διαδίδεται με άμεση επαφή ή διαμέσου της αναπνευστικής οδού μεταξύ μολυσμένων και ευαίσθητων ζώων. Η συγγενής μετάδοση είναι κάθετος τρόπος μετάδοσης κατά τον οποίο ο ιός μεταδίδεται από την μητέρα στον απόγονο είτε με ενδομήτρια μόλυνση είτε μέσω του μητρικού γάλακτος. Τέλος, η γενετική μετάδοση αποτελεί επίσης κάθετο τρόπο μετάδοσης όπου ο ιός κληρονομείται στους απογόνους ως αντίγραφο του DNA του ιού (προϊός) το οποίο είναι ενσωματωμένο στο χρωμόσωμα των κυττάρων του σπέρματος του πατρικού ζώου (Σπαντίδος,1989).

Το γένωμα του ρετροϊού περιέχει βασικά 4 γονίδια:

1. Το γονίδιο gag κωδικοποιεί για τα πρωτεϊνικά αντιγόνα του εσωτερικού περιβλήματος του ιού.
2. Το γονίδιο pol κωδικοποιεί την αντίστροφη μεταγραφάση.
3. Το γονίδιο env κωδικοποιεί για την γλυκοπρωτεΐνη του ελύτρου του ιού.

4. Το γονίδιο *onc* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που ευθύνεται για την εξαλλαγή των κυττάρων.

Οι RNA ογκογόνοι ιοί (ρετροϊοί) κατατάσσονται σε δυο κατηγορίες, ανάλογα με το ογκογενετικό τους δυναμικό. Ορισμένοι επάγουν αμέσως και ταχέως καρκινικό φαινότυπο σε όλα τα κύτταρα τα οποία μολύνουν. Αυτοί οι ταχέως εξαλάσσοντες ιοί (transducing viruses) ενσωματώνουν στο γονιδίωμά τους φυσιολογικά κυτταρικά γονίδια (πρωτο-ογκογονίδια) και μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας τα μετατρέπουν σε ενεργοποιημένα ογκογονίδια μέσα στο προσβεβλημένο κύτταρο. Η μετατροπή (transduction) γίνεται με απάλειψη ρυθμιστικών περιοχών του πρωτο-ογκογονιδίου, ή με αύξηση της μεταγραφικής του δραστηριότητας (Herman and Coffin, 1987). Οι βραδέως εξαλάσσοντες (slowly transforming) ρετροϊοί προκαλούν καρκινική εξαλλαγή πολύ αργότερα από τη λοίμωξη και μετά από μεσολάβηση επιπρόσθετων αλλοιώσεων του DNA του ξενιστή. Στην περίπτωση αυτή, το RNA του ιού ενσωματώνεται κοντά σε κυτταρικά πρωτο-ογκογονίδια, προκαλώντας αλλοιώσεις του γονιδιακού υποκινητή (promotor) ή ενισχυτή (enhancer) που καταλήγουν σε αυξημένη μεταγραφή του εν λόγω γονιδίου (Hayward, 1981).

Οι ρετροϊοί που προκαλούν όγκους στα ζώα διακρίνονται σε ιούς που προκαλούν σάρκωμα και σε αυτούς που προκαλούν λευχαιμία. Όσον αφορά στον άνθρωπο, έχουν περιγραφεί τέσσερις τύποι ρετροϊών και όλοι τους μολύνουν κατά προτίμηση τα Τ-λεμφοκύτταρα. Οι ιοί αυτοί είναι οι HTLV-I, HTLV-II και HIV-I, HIV-II. Οι ιοί HTLV-I και HTLV-II έχουν απομονωθεί από λεμφικές κακοήθειες. Ο συχνότερος είναι ο HTLV-I ο οποίος προκαλεί λεμφώματα των Τ-κυττάρων κυρίως στην νότια Ιαπωνία και την Καραϊβική. Οι ιοί HIV-I και HIV-II πρωτοεμφανίστηκαν στην κεντρική Αφρική και προκαλούν το σύνδρομο της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS). Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από αναστροφή των σχέσεων T4/T8 των Τ-λεμφοκυττάρων, σάρκωμα Kaposi και ευκαιριακές μολύνσεις με συνηθέστερη την πνευμονία από *pneumocystis carinii*. Άλλες μολύνσεις περιλαμβάνουν λοιμώξεις από έρπητα, κυτταρομεγαλοϊό, τοξόπλασμα, κρυπτοσπορίδια και μυκοβακτηρίδια.

1.13. Χημικά και φυσικά καρκινογόνα

Παρότι οι περισσότερες χημικές ουσίες δεν είναι καρκινογόνες, εντούτοις χημικά καρκινογόνα ενέχονται στην ογκογένεση των περισσότερων μορφών καρκίνου στον άνθρωπο. Οι ουσίες αυτές συνήθως μετατρέπονται από συγκεκριμένα ενζυμικά συστήματα του κυττάρου (π.χ. κυτόχρωμα P-450) σε ενεργούς μεταβολίτες που δρουν άμεσα στο κυτταρικό DNA, προκαλώντας από σημειακές μεταλλάξεις έως απαλείψεις γονιδιακών τμημάτων και μείζονες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις (Essigmann & Wood, 1993).

Φυσικά καρκινογόνα αποτελούν κυρίως η ιονίζουσα και η υπεριώδης ακτινοβολία. Χαρακτηριστικότερα παραδείγματα αποτελούν η μεταγενέστερη έξαρση των νεοπλασιών στους πληθυσμούς που υπέστησαν την Ατομική επίθεση το 1945 και η τεκμηριωμένη σχέση κακοήθους μελανώματος και υπεριώδους ακτινοβολίας. Η ακτινοβολία φαίνεται ότι είναι ικανή να προκαλεί άμεσα γενετικές βλάβες, όπως απαλείψεις και μεταθέσεις χρωμοσωμικών τμημάτων και σπανιότερα σημειακές μεταλλάξεις (Hall & Hei, 1986). Η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί, επιπλέον, αλλοιώσεις στη δομή και λειτουργία γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη διόρθωση βλαβών που φυσιολογικά συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA. Ο μηχανισμός αυτός συμβάλλει στη δημιουργία κακοήθων δερματικών όγκων στους πάσχοντες από το σύνδρομο μελαγχρωστικής ξηροδερμίας (Xeroderma Pigmentosum) (Hashem, 1980).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΟΙΣΟΦΑΓΟΥ.

2.1. Εισαγωγή – Επίπτωση.

Ο οισοφαγικός καρκίνος είναι ένας από τους λιγότερο μελετημένους, με μεγάλη θνησιμότητα καρκίνος παγκοσμίως, και αντιπροσωπεύει την ένατη πιο κοινή νεοπλασία, και την έκτη συχνότερη αιτία του θανάτου από τον καρκίνο παγκοσμίως. Ο οισοφαγικός καρκίνος είναι σχετικά σπάνιος στις Ηνωμένες Πολιτείες, καταλαμβάνοντας την 19^η θέση στη ταξινόμηση επίπτωσης των καρκίνων συνολικά, με 13.900 νέα περιστατικά ετησίως. Η γενική επίπτωση του οισοφαγικού καρκίνου στις ΗΠΑ είναι 4,8 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους, με σχετικό ποσοστό θνησιμότητας 4,4 θάνατοι ανά 100.000 κατοίκους. Αποτελεί επίσης το 7% όλων των γαστροεντερικών καρκίνων και είναι ένας από τους πιο θανατηφόρους όλων των καρκίνων. Ο χρονικός κίνδυνος ζωής (life time risk) για τον οισοφαγικό καρκίνο είναι 0,8 για τους άνδρες, και 0,3 για τις γυναίκες. (Peter C. Enzinger 2000).

Περίπου 15% των οισοφαγικών καρκίνων εμφανίζονται στο ανώτερο ένα τρίτο του οισοφάγου (αυχενικός οισοφάγος), 45% στο μέσο τρίτο, και 40% στο κατώτερο τρίτο. Το 1975, 75% περίπου των οισοφαγικών καρκίνων που εντοπίστηκαν στις ΗΠΑ ήταν ESCC και το υπόλοιπο 25% ADCC. (Peter C. Enzinger 2000). Το ακανθοκυτταρικό καρκινώμα (SCC) και το αδενοκαρκίνωμα αποτελούν περισσότερο από 95% των όγκων του οισοφάγου. Το κυρίαρχο ιστολογικό είδος οισοφαγικού καρκίνου είναι ακανθοκυτταρικό καρκινώμα (ESCC) που ακολουθείται από το αδενοκαρκίνωμα, το μελάνωμα, το λειομυοσάρκωμα, το καρκινοειδές, και το λέμφωμα. Οι κακοήθεις όγκοι του οισοφάγου περιλαμβάνουν το μικτό καρκίνωμα κυττάρων, το βλενοεπιδερμοειδές καρκίνωμα, το αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα, και το καρκινισάρκωμα, καθώς επίσης και άλλα σαρκώματα, καρκινοειδείς όγκους, λεμφώματα, και μεταστάσεις από άλλες αρχικές περιοχές. (Eric Elton 2005)

Η κύρια πρόδρομος βλάβη του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος είναι η επιθηλιακή δυσπλασία. Μικροσκοπικά, αυτή η βλάβη αντιπροσωπεύει μια συσσώρευση των άτυπων κυττάρων με πυρηνική υπέρχρωση, ανώμαλα συγκεντρωμένη χρωματίνη, και απώλεια πολικότητας. Αυτοί οι όγκοι παρουσιάζονται συχνά ως ανθοκραμβοειδής βλάβες, ελκώδεις, ή διηθητικές βλάβες στο οισοφαγικό επιθήλιο. Οι ιστοπαθολογικές αλλαγές που περιλαμβάνονται σε ESSC περιλαμβάνουν την οισοφαγίτις, ατροφία, ήπια προς βαριά δυσπλασία, το καρκίνωμα *in situ*, και τον διηθητικό καρκίνο. Κατά την διάρκεια της διάγνωσης, περισσότερο από 50% των ασθενών έχουν είτε ανεγχείρητους όγκους είτε ακτινολογικά ορατές μεταστάσεις. (Peter C. Enzinger 2000)

Ο αποκαλούμενος "πρόωρος καρκίνος" του οισοφάγου είναι μια κλινική έννοια που, από την άποψη της παθολογίας, αντιστοιχεί στο διηθητικό καρκίνωμα που περιορίζεται αυστηρά στο βλεννογόνο ή υποβλεννογόνο, με ή χωρίς διήθηση λεμφαδένα. Στην πιο πρόσφατη έκδοση των "Guidelines for the Clinical and Pathologic Studies on Carcinoma of the Esophagus", ο ορισμός του πρόωρου καρκινώματος έχει αλλάξει. Το πρόωρο καρκίνωμα ορίζεται τώρα ως ένα ενδοβλεννογόνο καρκίνωμα χωρίς παρουσία μετάστασης. Το επιφανειακό καρκίνωμα ορίζεται ως το καρκίνωμα *in situ*, ή το καρκίνωμα βλεννογόνου ή υποβλεννογόνου, ανεξάρτητα από την παρουσία μετάστασης λεμφαδένων.

Οι μορφολογικοί τύποι ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τις "Guidelines for the Clinical and Pathologic Studies on Carcinoma of the Esophagus". Εν περίληψη, οι επιφανειακοί τύποι καρκινώματων ταξινομήθηκαν μακροσκοπικά σε τρεις τύπους: 0-I, επιφανειακός και προεξέχων τύπος 0-II, επιφανειακός και επίπεδος τύπος 0-III, επιφανειακός και ευδιάκριτα πεπλατυσμένος τύπος. Τα προχωρημένης νόσου καρκινώματα ταξινομήθηκαν σε πέντε τύπους όπως την ταξινόμηση Borrmann του γαστρικού καρκινώματος: Τύπος 1, προεξέχων τύπος Τύπος 2, ελκώδης και εντοπισμένος τύπος Τύπος 3, ελκώδης και διηθητικός τύπος Τύπος 4, διάχυτα διηθητικός τύπος και τύπος 5, ποικίλος τύπος. Με δεδομένα τα JSED στοιχεία, οι επιφανειακοί και επίπεδοι τύποι είναι οι πιο κοινοί τύποι σε επιφανειακούς τύπους καρκινώματων. Οι δύο συχνότεροι τύποι προχωρημένης νόσου καρκινωμάτων είναι οι τύποι 2 και 3.

Στο δυτικό κόσμο, η επίπτωση του οισοφάγου καρκίνου έχει αλλάξει εντυπωσιακά. Μέχρι τη δεκαετία του '70, πάνω από το 90% των οισοφαγικών καρκίνων ήταν ακανθοκυτταρικά καρκινώματα, με τα αδενοκαρκινώματα του οισοφάγου να είναι σχετικά σπάνια. Εντούτοις, η επίπτωση του αδενοκαρκινώματος έχει αυξηθεί γρήγορα, με τη σημαντικότερη αύξηση στους λευκούς άρρενες, όπου τα αδενοκαρκινώματα υπερισχύουν (αύξηση 7,8% ετησίως από τη δεκαετία του '70). Συγχρόνως, η επίπτωση του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος έχει μειωθεί, με τη σημαντικότερη μείωση στους νέγρους άρρενες, όπου τα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα υπερισχύουν (μείωση 8,5% ετησίως από την αρχή της δεκαετίας του '90). (Eric Elton 2005)

2.2. Αιτιολογικοί παράγοντες.

2.2.1. Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα.

Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα οισοφάγου είναι ο πιο κοινός κακοήθης όγκος του οισοφάγου στην Ιαπωνία. Στις ΗΠΑ, το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα οισοφάγου αποτελεί το $1.5\pm 2\%$ όλων των καρκίνων και περίπου το $5\pm 7\%$ όλων των γαστροεντερικών νεοπλασιών. Η γενική ετήσια επίπτωση SCC είναι περίπου 3 ± 4 ανά 100.000 στις ΗΠΑ. Το ESCC χαρακτηρίζεται από μια εντυπωσιακή παραλλαγή στη γεωγραφική κατανομή και ένα υψηλό ποσοστό θνησιμότητας. Δεν υπάρχει κανένας άλλος καρκίνος, ο οποίος η επίπτωση του ποικίλλει τόσο πολύ ανάμεσα σε χώρες. Στις περισσότερες χώρες η επίπτωση ESCC μεταξύ του πληθυσμού είναι 1.5-2.5 και 2.55/100.000 για τις γυναίκες και τους άνδρες αντίστοιχα, ενώ στις υψηλού κινδύνου χώρες όπως η βόρεια Κίνα (επαρχία Fanxian, Linxian, Henan) ή στη Νότια Αφρική έχει μια επίπτωση μέχρι 246/100.000. Οι υψηλού κινδύνου περιοχές περιλαμβάνουν την αποκαλούμενη Ασιατική οισοφαγική ζώνη καρκίνου από τη νότια ακτή της Κασπίας θάλασσας, την ανατολική Τουρκία, μέσω της νότιας Σοβιετικής Ένωσης (Καζακστάν, Τουρκμενιστάν, Ουζμπεκιστάν, Tadjikistan), Ιράκ, Ιράν στη δυτική και βόρεια Κίνα, Χογκ Κονγκ, Ιαπωνία, νοτιοανατολική Αφρική, Γαλλία και περιοχές Νότιας Αμερικής (Βραζιλία, Βερμούδες). (Alfred King Y. Lam 2000).

Δημογραφικοί παράγοντες

Η ευρεία διαφορά στην επίπτωση ESCC στις διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, χαρακτηρίζει την ποικίλη σημασία των ειδικών παραγόντων κινδύνου που συνδέονται με την ασθένεια.

Στις περιοχές με υψηλή επίπτωση ESCC, όπως η Κίνα, το Ιράν και η Αφρική, η ασθένεια δεν έχει καμία ιδιαιτερότητα σχετικά με το φύλο και η επίπτωση SCC στους άνδρες και τις γυναίκες είναι σχεδόν παρόμοια. Αντίθετα, το ESCC είναι πιο κοινό σε άνδρες στις περιοχές με χαμηλή επίπτωση όπως η Ευρώπη και οι ΗΠΑ, με μία αναλογία μεταξύ των ανδρών και των γυναικών από 17,1 έως 1,0 στη Βρετανία και 1,4 έως 1,0 στη βόρεια Κίνα. Μόνο στις περιοχές με μια επίπτωση υψηλού κινδύνου όπως το Ιράν, είναι πιο κοινό στις γυναίκες από τους άνδρες. Ο κίνδυνος αυξάνει με την ηλικία, με μια μέση ηλικία διάγνωσης τα 67 έτη. (G.P. Staphoroulos 2003)

Η συχνότητα είναι υψηλότερη στις αστικές περιοχές (έναντι των αγροτικών περιοχών) των Ηνωμένων Πολιτειών. Η εμφάνιση του ακανθοκυτταρικού οισοφαγικού καρκίνου είναι πέντε φορές υψηλότερη μεταξύ των αμερικανικών νέγων ατόμων (16,8 ανά 100,000) απ' ό,τι μεταξύ των αμερικανικών λευκών ατόμων (3,0 ανά 100,000) και με ποσοστό θανάτου να είναι τρεις φορές υψηλότερα έναντι των Καυκάσιων. (Linda Morris Brown 2001) Η χαμηλή κοινωνικοοικονομική θέση συνδέθηκε με ακανθοκυτταρικό οισοφαγικό καρκίνο.

Κάπνισμα και Αλκοόλ.

Στις Ηνωμένες Πολιτείες και τη δυτική Ευρώπη, το κάπνισμα τσιγάρων και η κατανάλωση οινοπνεύματος είναι οι κύριοι σημαντικοί παράγοντες για ESCC, που είναι υπεύθυνο μέχρι και για το 90% των καρκινωμάτων αυτών.

Παγκοσμίως, υπάρχουν κατ' εκτίμηση πάνω από 1 δισεκατομμύριο καπνιστές, και 3 εκατομμύρια θάνατοι ετησίως υπολογίζονται ότι αποδίδονται στο κάπνισμα. Εκτιμήσεις αναφέρουν ότι από τους σημερινούς καπνιστές, οι μισοί από αυτούς θα πεθάνουν με σχετικές με κάπνισμα νόσους. Το κάπνισμα είναι ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου που συνδέεται με τις καρδιακές παθήσεις, οι οποίες είναι η αρχική αιτία του θανάτου στις αναπτυσσόμενες χώρες, και το κάπνισμα είναι η συντριπτική αιτία του καρκίνου πνευμόνων, η

οποία είναι η κύρια αιτία των θανάτων από καρκίνο παγκοσμίως. Αυτήν την περίοδο, το κάπνισμα συνδέεται με το 90% των περιπτώσεων καρκίνου πνευμόνων, με συνέπεια 1,2 εκατομμύριο θανάτους ετησίως, και αποτελεί το 30% όλων των περιπτώσεων καρκίνου στις αναπτυγμένες χώρες. Πρόσφατα, η International Agency for Research on Cancer προσδιόρισε το κάπνισμα ως την αιτία καρκίνου σε περισσότερα συστήματα – όργανα ανθρώπινου σώματος από οποιαδήποτε άλλη ανθρώπινη καρκινογόνο ουσία. Αυτοί περιλαμβάνουν τους καρκίνους του πνεύμονα, της στοματικής κοιλότητας, του ρινο-ορο-υποφάρυγγα, της ρινικής κοιλότητας και των παραρινίων κόλπων, του λάρυγγα, του οισοφάγου, του στομαχού, του πάγκρεατος, του ήπατος, του νεφρού, του ουρητήρα, της ουροδόχου κύστης, του τραχήλου μήτρας, και του μυελού των οστών (μυελοειδής λευχαιμία). Ο καπνός τσιγάρου αποτελεί το πιο ακραίο παράδειγμα ενός συστηματικού ανθρώπινου μεταλλαξιογόνου. Οι μηχανισμοί από τους οποίους ο καπνός τσιγάρου προκαλεί αυτούς τους καρκίνους, έχουν μελετηθεί εντατικά τα τελευταία 20 χρόνια και περιλαμβάνουν τη μεταλλακτική ικανότητα του καπνού των τσιγάρων, η οποία έχει καταδειχθεί σαφώς. Επίσης πρόσφατες μελέτες αναφέρονται για τη δυνατότητα του καπνού να σχηματίζει DNA -πρόσθετα και πρωτεϊνικά πρόσθετα στους ανθρώπινους κυτταρικούς ιστούς. Η περιεχόμενη πίσσα και ο καπνός των τσιγάρων περιέχουν διάφορες χημικές καρκινογόνες ουσίες, όπως οι αρωματικές αμίνες, ι λακτόνες, αλοεθέρες, ν-νιτρωδο ενώσεις, και πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες.

Ο κίνδυνος του οισοφαγικού καρκίνου συσχετίζεται έντονα με την κατανάλωση καπνών και οισοπνεύματος, με τους σχετικούς κινδύνους (RR) άνω των 100 στους βαριούς καπνιστές και τους βαριούς πότες. Ο κίνδυνος του οισοφαγικού καρκίνου παραμένει υψηλός αρκετά έτη (τουλάχιστον 10) μετά από τη διακοπή του καπνίσματος, για να μειωθεί κατά περίπου 40% έκτοτε. Περαιτέρω, μετά από 10 έτη από τη διακοπή του καπνίσματος, οι πρώην-καπνιστές έχουν ακόμα έναν διπλό αυξανόμενο κίνδυνο σε σύγκριση με τους μη καπνιστές. Τελικά, η διακοπή του καπνίσματος θα μπορούσε να ασκήσει αξιόλογη επίδραση στη μείωση του οισοφαγικού καρκίνου, και να αντιπροσωπεύσει μια προφανή προτεραιότητα για λόγους πρόληψης και δημόσιος-υγείας.

Η International Agency Research of Cancer (IARC) επίσης προσδιόρισε τα οιοπνευματώδη ποτά, όπως και τον καπνό τσιγάρου ως ανθρώπινες καρκινογόνες ουσίες. Ο τύπος και η ποσότητα οιοπνευματωδών ποτών που καταναλώνονται μπορούν να έχουν επιπτώσεις στον κίνδυνο esophageal SCC. Τα σκληρά δυνατά ποτά μπορεί να έχουν έναν υψηλότερο κίνδυνο από το κρασί ή την μπύρα εντούτοις, το ποσό οιοπνεύματος παρά τον τύπο είναι πιθανώς σημαντικότερο.

Διαιτητικοί παράγοντες

Διάφορες διατροφικές συνήθειες που σχετίζονται με ESCC έχουν αποκαλυφθεί στην Ασία. Τρόφιμα που περιέχουν ν-νιτρώδης ενώσεις έχουν ενοχοποιηθεί από καιρό. Αυτές οι ενώσεις είναι γνωστές ως ουσίες που μπορούν να ασκήσουν τη μεταλλακτική δυνατότητά τους προκαλώντας αλκυλικά πρόσθετα DNA. Ορισμένοι τύποι παστών λαχανικών και άλλων τρόφιμων-προϊόντων που καταναλώνονται στις υψηλού κινδύνου ενδημικές περιοχές είναι πλούσια σε ν-νιτρωδο ενώσεις. Τα παστά λαχανικά είναι γνωστά ότι περιέχουν επίσης μια υψηλή συγκέντρωση των ν-νιτρωδο ενώσεων. Τα υψηλά επίπεδα νιτρωζαμινών έχουν βρεθεί επίσης στο καπνιστό μπέικον, το παστό ή καπνισμένο ζαμπόν, το ψάρι, τις κόκκινες καυτερές σάλτσες (τσίλι) και το κέικ καρυκευμάτων. Τέλος, τα αποξηραμένα στον ήλιο ακατέργαστα τρόφιμα, σε συνθήκες υψηλής υγρασίας παράγουν υψηλή συγκέντρωση των νιτρωδών ενώσεων.

Σε άλλες ενδημικές περιοχές, όπως το Ιράν, η Ρωσία, και η Νότια Αφρική, η κατάποση των πολύ καυτών τροφίμων και των ποτών (όπως το τσάι) έχει συνδεθεί με ESCC. Αυτή η συνήθεια μπορεί εν μέρει, να αποτελεί τον λόγο της υψηλής επικράτησης διάχυτης οισοφαγίτιδος που παρατηρείται σε αυτές τις υψηλού κινδύνου περιοχές.

Οι διαιτητικές ανεπάρκειες όπως της βιταμίνης A, B2 και C, του ψευδάργυρου και του μαγνησίου μπορούν να είναι παράγοντες. Η χορήγηση μεγάλης δόσης βιταμίνης A στη διατροφή των πειραματόζων εμπόδισε την ανάπτυξη οισοφαγικού καρκίνου μετά από την εισαγωγή των καρκινογόνων ουσιών. Η έλλειψη φολικού οξέος, το σελήνιο και το μολυβδαίνιο έχουν εμπλεχτεί επίσης στην ανάπτυξη του esophageal καρκίνου. Η κατανάλωση πράσινου τσαγιού που περιέχει φαινόλες, και φλαβονοειδή διαδραματίζει έναν προστατευτικό ρόλο, και έχει συνδεθεί με μια μείωση στην εμφάνιση του

ακανθοκυτταρικού καρκίνου στη Σαγγάη. Η επαγγελματική έκθεση στη σκόνη μετάλλων, ειδικά βηρύλλιο, αρσενικό, χρώμιο και νικέλιο παρουσιάζει έναν υψηλό κίνδυνο. (G.P. Staphoroulos 2003)

Υποκείμενες νόσοι οισοφάγου.

Αχαλασία.

Η χρόνια νόσος αχαλασία είναι ένας γνωστός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη SCC. Ο επιπλοσμός που αναφέρθηκε σε κλινικές μελέτες ασθενών στους οποίους το ESCC ανιχνεύθηκε κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης κυμάνθηκε από 0 ως 8,6%. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου κυμαίνεται από 7-33 φορές. Τα συμπτώματα της αχαλασίας είναι παρόντα κατά έναν μέσο όρο 15 ± 20 ετών προτού να εντοπιστεί το ESCC, ανεξαρτήτου εάν υπάρχει θεραπεία για την αχαλασία.

Συμμετοχή με άλλα νεοπλάσματα κεφαλής τραχήλου.

Ασθενείς με ακανθοκυτταρικά νεοπλάσματα κεφαλής τραχήλου, βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης οισοφαγικού καρκίνου, που απαντάται σε ποσοστό $3 \pm 7\%$. Σε μία μελέτη το 40% των ασθενών με προηγούμενη νεοπλασματική νόσο στοματικής κοιλότητας, φάρυγγος, και λάρυγγος που συνέχιζαν να καπνίζουν παρουσίασαν δευτερογενή νεοπλασματική νόσο, ενώ μόνο το 6% από τους ασθενείς που σταμάτησαν το κάπνισμα εμφάνισαν δευτερογενή νεοπλασματική νόσο.

Συνυπάρχουσες νόσοι.

Plummer±Vinson syndrome

Το σύνδρομο Plummer±Vinson (Paterson±Kelly syndrome) συνδυάζεται με έλλειψη σιδήρου, γλωσσίτιδα, και δυσφαγία (σιδηροπενική δυσφαγία). Το 10% των ασθενών αυτών, κυρίως γυναίκες μεταξύ 15-30 ετών, αναπτύσσουν οισοφαγικό ή φάρυγγικό καρκίνο.

Κοιλιοκάκη

Ασθενείς με κοιλιοκάκη έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης νεοπλασιών, όπως λεμφώματα, και καρκίνο οισοφάγου. Ο χρόνος παρουσίασης των νόσων αυτών κυμαίνεται από τα 15-30 χρόνια. Η μέση ηλικία των ασθενών, κυρίως άνδρες, είναι τα 50 έτη, και τα νεοπλάσματα βρίσκονται συνήθως στο μεσαίο τριτημόριο του οισοφάγου.

Σύνδρομο τύλωσης

Η Τύλωση αποτελεί ένα σπάνιο αυτόσωμο επικρατούν νόσημα (17q25), το οποίο χαρακτηρίζεται από υπέρκεράτωση παλαμών, πελμάτων, και συνδυάζεται με πολλαπλά οισοφαγικά θηλώματα, και στοματοφαρυγγική λευκοπλακία. Περίπου το 50% θα αναπτύξει ESCC μέχρι την ηλικία των 45 ετών, και το 95% έως τα 65 έτη. Δύο τύποι έχουν αναγνωρισθεί: ο αργός τύπος (type A) τύλωσης, αναφέρεται ότι συνδυάζεται με τον οισοφαγικό καρκίνο, ενώ ο πρώιμος τύπος (type B) τύλωσης έχει καλοήγη πορεία.

Σκληροδερμία

Η συμμετοχή του οισοφάγου σε ασθενείς με σκληρόδερμα αναφέρεται στο 70% αυτών. Η χρονική περίοδος του σκληροδέρματος προτού την διάγνωση οισοφαγικού καρκίνου είναι τα 10 χρόνια.

Εκκολπώματα οισοφάγου.

Τα καρκινώματα σε εκκολπώματα οισοφάγου είναι σπάνια νόσος, κυρίως παρατηρούνται ακανθοκυτταρικά νεοπλασμάτα σε εκκολπώματα τύπου Zenker.

Λοιμώδης Παράγοντες

Οι μολυσματικοί μικροοργανισμοί όπως οι ιοί και οι μύκητες μπορούν να συνδεθούν με την παρουσία οισοφαγίτιδας, ειδικά σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Μερικοί από τους ιούς είναι ογκογόνοι DNA ιοί, με έναν τροπισμό για τα ακανθοκυτταρικά επιθήλια. Αυτοί περιλαμβάνουν τον ανθρώπινο ιό των θηλωμάτων (HPV) και τον ιό Epstein-Barr (EBV).

Ανθρώπινος ιός των θηλωμάτων (HPV)

Οι μελέτες μέχρι τώρα έχουν παρουσιάσει συγκρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά τη σχέση του ανθρώπινου ιού papilloma (HPV) σε ESCC. Οι διαφορές δυνατό να οφείλονται στις περιβαλλοντικές, γεωγραφικές ή γενετικές διαφορές στην μόλυνση του οισοφάγου με τον HPV σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Επίσης, οι διαφορές μπορούν να αποδοθούν στις ποικίλη ευαισθησία των τεχνικών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του ιού, και της μεθοδολογίας που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των καρκινικών ιστών (φορμόλη- έναντι φρέσκου παγωμένου ιστού). Ο HPV συνήθως δεν ανιχνεύθηκε ή ανιχνεύθηκε σε χαμηλή συχνότητα σε περιοχές με χαμηλή επίπτωση ESCC όπως οι ευρωπαϊκές χώρες και οι Ηνωμένες Πολιτείες. Στην Ευρώπη, η υψηλή συχνότητα HPV σε ESCC παρουσιάστηκε στη Γαλλία και στην Πορτογαλία. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, τα

στοιχεία από τη βιβλιογραφία παρουσιάζουν επίπτωση του HPV σε 3% των ESCC. Αντίθετα, ο HPV ανιχνεύθηκε συχνότερα σε ESCC από την Ασία (Ιαπωνία, Κίνα, Χονγκ Κονγκ, Ινδία, Πακιστάν και Κορέα), τη Νότια Αφρική, την Αλάσκα και την Αυστραλία. Τα στοιχεία αυτών των υψηλού κινδύνου περιοχών έδειξαν ότι η επίπτωση HPV σε ESCC κυμάνθηκε από 13 ως 63%, και ότι η γενική επίπτωση ήταν 22 %.

Ο HPV είναι μέλος της οικογένειας papovaviridae, μια οικογένεια με κλειστό κυκλικό διπλής έλικας DNA, με μήκος 7.9kb. Αυτή τη στιγμή, 118 γενότυποι HPV έχουν ταξινομηθεί σύμφωνα με τη βιολογική, την ογκογονική και την φυλογενετική θέση τους. Ο κυρίαρχος τύπος που ανιχνεύεται σε ESCC είναι ο HPV – 16,- 18, και περιστασιακά σε ESCC ανευρίσκονται και οι γενότυποι HPV-6, -11. Είναι σαφές ότι η παρουσία του HPV είναι σημαντική στην παθογένεση του ESCC στις περιοχές υψηλής επίπτωσης. Αφ' ετέρου, η γενική χαμηλή επικράτηση (22%) προτείνει επίσης ότι και άλλοι παράγοντες κινδύνου (με συνεργιστικές ενέργειες με τον HPV) μπορεί να είναι σημαντικοί στην παθογένεση του ESCC. (Alfred King Y. Lam 2000)

Ιός Epstein–Barr (EBV).

Η στενή εγγύτητα του οισοφάγου με τον ρινοφάρυγγα, χαρακτηρίζει την πιθανότητα ότι ο ιός Epstein Barr (EBV) μπορεί να περιληφθεί στην καρκινογένεση του ακανθοκυτταρικού οισοφαγικού καρκινώματος. Επίσης, αναφέρεται ότι η παρουσία του EBV που ανιχνεύεται σε ESCC μπορεί να προέρχεται από τα στρωματικά λεμφοκύτταρα που υπάρχουν στη περιοχή. Εντούτοις, οι Lam et al, σε 74 ESCC από το Χονγκ Κονγκ με in-situ hybridization (ISH), και οι Mizobuchi et al. σε 41 ESCC από την Ιαπωνία, δεν αναγνώρισαν την παρουσία του ιού EBV. Οι S. Awerkiew et al., σε 23 δείγματα ESCC από την Γερμανία αναφέρουν την παρουσία EBV στο 35% των δειγμάτων με την μέθοδο της PCR. (S. Awerkiew 2005) Τα συμπεράσματα μέχρι σήμερα δεν υποστηρίζουν επαρκώς ότι η παρουσία EBV είναι σημαντική στην παθογένεση ESCC. (Alfred King Y. Lam 2000)

Μύκητες

Οι μύκητες έχουν επίσης ενοχοποιηθεί ως αιτιολογικοί παράγοντες σε οισοφαγικούς καρκίνους. Διάφορα είδη όπως Fusarium, Alternaria, Geotrichum, Aspergillus, Cladosporium και Penicillium, έχουν αναγνωρισθεί

ως αιτιολογικοί παράγοντες. Οι μύκητες μπορούν να αυξήσουν τα τοπικά επίπεδα νιτρικών και αμίνων, προκαλώντας την παραγωγή νιτροσαμίνων.

Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού

Η λοίμωξη με το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού ειδικά ο υπότυπος Cag A- θετικός, δυνάται να αυξήσει τον κίνδυνο του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος οισοφάγου προκαλώντας την παραγωγή νιτροσαμίνων. Εντούτοις μόνο μία μελέτη από την Κίνα, ανέδειξε μία οριακή στατιστικά σημαντική συμμετοχή του ελικοβακτηριδίου πυλωρού Cag A- θετικού, σε ακανθοκυτταρικό καρκινώμα οισοφάγου.

Άλλα

Χρόνιες ουλώδης στενώσεις

Τα εγκαύματα του οισοφάγου προκαλούν ουλώδης στενώσεις, οι οποίες είναι συνδυασμένες με αυξημένο κίνδυνο νεοπλασιών. Η μέση ηλικία για την ανάπτυξη καρκίνου μετά από την ουλώδη στένωση της καυστικής κατάποσης είναι περίπου 40 έτη, και ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου είναι 1000 φορές υψηλότερος από αυτός που φαίνεται στους ελέγχους. Οι ουλώδης στενώσεις βρίσκονται συνήθως στο επίπεδο της τρίτης της τραχείας, και τα νεοπλάσματα αναπτύσσονται συνήθως εντός αυτών των στενώσεων σε αυτό το σημείο

Ακτινοθεραπεία

Μετά από την ακτινοβολία για καρκίνο ή λέμφωμα μαστού, ένας αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου οισοφάγου έχει περιγραφεί. Αυτό μπορεί να είναι μια συνέπεια μίας άμεσου ογκογόνου δράσης της ακτινοθεραπείας.

2.2.2. Αδενοκαρκίνωμα.

Για τον μεγαλύτερο μέρος του εικοστού αιώνα, τα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα αποτελούσαν την πλειοψηφία των νεοπλασμάτων του οισοφάγου. Η επίπτωση του αδενοκαρκινώματος του οισοφάγου, όπως το αδενοκαρκίνωμα της γάστρο-οισοφαγικής συμβολής, αυξάνεται γρήγορα, και θεωρείται τώρα ως το 20%–50% όλων των οισοφαγικών καρκίνων. Οι λευκοί επηρεάζονται πέντε φορές συχνότερα από τους Νέγρους, και οι άνδρες οκτώ φορές συχνότερα από τις γυναίκες, με πιο σημαντική αύξηση στην επίπτωση ηλικίας μεταξύ των ασθενών 45 έως 65 χρονών.

Τα αδενοκαρκινώματα του οισοφάγου αρχικά είναι συχνά συγκεχυμένα με τους γαστρο-οισοφαγικούς καρκίνους. Μια πρόσφατη ταξινόμηση πρότεινε έναν ορισμό κατηγοριοποίηση, βασισμένο στο μέγεθος των όγκων σχετικά με την ανατομική σχέση με την γαστρο-οισοφαγική γωνία(EGJ). Τα αδενοκαρκινώματα του οισοφάγου ορίστηκαν ως οι όγκοι που οριοθετούνται 1-5cm επάνω από το EGJ, τα καρκινώματα γαστρο-οισοφαγική γωνίας μεταξύ 1 cm άνωθεν και 2cm κάτωθεν από το EGJ, και υπο-γαστροοισοφαγική γωνίας που οριοθετούνται 2- 5cm κάτω από το EGJ.

Αιτιολογικοί παράγοντες διαφορετικοί από το ESCC

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου για το αδενοκαρκίνωμα οισοφάγου είναι η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση (GERD), όπως και η επιπλοκή της ο οισοφάγος Barrett. Η αυξανόμενη επίπτωση GERD μπορεί να αποδοθεί στις αλλαγές στον τρόπο ζωής, τις διαιτητικές συνήθειες, και το σωματότυπο. Η Brazilian Consensus on Gastroesophageal Reflux Disease θεωρεί την γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση ως ασθένεια με μια χρόνια παλίνδρομη ροή του γαστροδωδεκαδακτυλικού περιεχομένου στον οισοφάγο, με ή χωρίς ζημία ιστού. Από αυτά τα στάδια της ασθένειας είναι δυνατό να εξελιχθεί στο αδενοκαρκίνωμα.

Ο επιπλωασμός του οισοφάγου Barrett είναι συνολικά 7% (ή περίπου 20 εκατομμύρια άνθρωποι στις Η.Π.Α.). (Eric Elton 2005) Στον οισοφάγο Barrett, το ακανθοκυτταρικό επιθήλιο επηρεασμένο από την γαστροοισοφαγικής παλινδρόμηση οισοφαγίτιδα, αντικαθίσταται από ένα μεταπλαστικό επιθήλιο εντερικού τύπου, σε 2-3cm του κατώτερου οισοφάγου με νεοπλασματική προδιαθεση. Στα πλαίσια της συνεχούς οισοφαγίτιδος από GERD, ο μεταπλαστικός βλεννογόνος Barrett προκαλεί το αδενοκαρκίνωμα οισοφάγου. Οι ασθενείς με οισοφάγο Barrett έχουν αυξημένη παλινδρόμηση γαστρικού υγρού στον οισοφάγο, και έχουν βρεθεί να έχουν έναν αυξημένο κίνδυνο 30-40-φορές, έναντι των ασθενών με χωρίς οισοφάγο Barrett. Αν και η συχνότητα της ανάπτυξης αδενοκαρκινώματος με οισοφάγο Barrett θεωρούνταν αρκετά υψηλή, ο κίνδυνος είναι περίπου 0,5% ετησίως.

Το αδενοκαρκίνωμα του οισοφάγου αποτελεί νόσο κυρίως των Καυκάσιων και των ανδρών σε αντιστοιχία άνδρες γυναίκες 6:1.

Το αλκοόλ είναι πιθανό σημαντικός αιτιολογικός παράγων, αν και η κατανάλωση κρασιού ίσως προλαμβάνει την νόσο (odds ratio 0.6).

Το κάπνισμα αυξάνει πιθανώς τον κίνδυνο αδenoκαρκινώματος του οισοφάγου ιδιαίτερα σε ασθενείς με οισοφάγο Barrett. Ο κίνδυνος για αδenoκαρκίνωμα του οισοφάγου ήταν 2,4 φορές μεγαλύτερος στους καπνιστές από μια ομάδα ελέγχου, και αποτέλεσε 40 τοις εκατό των περιπτώσεων του αδenoκαρκινώματος οισοφάγου. Ο κίνδυνος αυξήθηκε με την αύξηση και τη διάρκεια του καπνίσματος, και παρέμεινε υψηλότερος στους καπνιστές από ότι στους μη καπνίζοντες για 30 έτη μετά από τη διακοπή καπνίσματος.

Κατά τρόπο ενδιαφέροντα, η μόλυνση από *Helicobacter pylori* εμφανίζεται να παρέχει μια προστατευτική επίδραση. Σε μία μελέτη η μόλυνση *Helicobacter pylori* συνδέθηκε με έναν σχετικό κίνδυνο esophageal αδenoκαρκινώματος 0,3. (Eric Elton 2005).

Αύξηση της όξινης έκθεσης του οισοφάγου, από παθήσεις όπως το Zollinger-Ellison syndrome ή άλλες καταστάσεις όπως η χειρουργική μωστομή ή το σκληρόδερμα, αποτελούν καταστάσεις αυξημένου κινδύνου.

Η παχυσαρκία σε ασθενείς με BMI >30 kg/m², έναντι ασθενών με BMI >22 kg/m² παρουσίασαν 16 φορές αυξημένο κίνδυνο αδenoκαρκινώματος του οισοφάγου.

Χρήση φαρμακευτικών ουσιών που μειώνουν τον τόνο του κατώτερου οισοφαγικού σφιγκτήρα, όπως οι νιτρογλυκερίνη, τα αντιχολινεργικά, οι βήτα αδρενεργικοί αγωνιστές, και οι βενζοδιαζεπίνες, έχουν συσχετισθεί με αύξηση του κινδύνου αδenoκαρκινώματος του οισοφάγου (Odds ratio 3.8 για χρήση > 5 χρόνια).

Η χολοκυστεκτομή λόγω της τοξικής δράσης των παλινδρομούντων δωδεκαδακτυλικών υγρών που περιέχουν χολικά υγρά έχουν ενοχοποιηθεί για αύξηση του κινδύνου αδenoκαρκινώματος του οισοφάγου.

Πιθανή προστατευτική δράση από την λήψη «υψηλών» ποσοτήτων φυτικών ινών (14.7 g/ημέρα από ολικής αλέσεως άσπρο σίτο, βρώμη, άλλα όσπρια, και ρύζι) έναντι «χαμηλών» ποσοτήτων φυτικών ινών, (odds ratio 0.3). Πιθανόν η προστατευτική δράση να οφείλεται στο ότι οι φυτικές ίνες εξουδετερώνουν την παραγωγή ογκογόνων ουσιών, των νιτροσαμίνων.

2.3. Κλινική εικόνα.

Σε μια μελέτη ανασκόπηση με περισσότερους των 5000 ασθενών, τα πιο κοινά συμπτώματα παρουσίασης του οισοφαγικού καρκίνου ήταν η δυσφαγία (74%), η οδυνοφαγία (17%), η απώλεια βάρους (57,3%), η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση (20,5%), και η δύσπνοια (12,1%). Η δυσφαγία αρχίζει με τις στερεές τροφές και μπορεί να προχωρήσει έως και η κατάποση υγρών ή ακόμα και της σιέλου να είναι επίσης δύσκολη. Η δυσφαγία εμφανίζεται έως ότου το εύρος του οισοφαγικού αυλού μειωθεί σημαντικά σε λιγότερο από 13 χιλ., σημείο ενδεικτικό της παρουσίας ενός σχετικά μεγάλου όγκου. Πρόσθετα σημεία και συμπτώματα συμπεριλαμβάνουν την σιδηροπενική αναιμία με προφανή αιτία την γαστροεντερική αιμορραγία (μέλαινες κενώσεις), ενώ η οξεία γαστροεντερική αιμορραγία είναι σπάνια και είναι ένα αποτέλεσμα της διήθησης των όγκων στην αορτή ή τις πνευμονικές ή βρογχικές αρτηρίες. Επίσης την ασαφή οπισθοστερνική ενόχληση ή μια αίσθηση καψίματος, τη βραχνάδα στην ομιλία λόγω συμμετοχής του παραπληρωματικού λαρυγγικού νεύρου, και το βήχα από εισρόφηση ή από τραχειοοισοφαγικό συρίγγιο λόγω άμεσης διήθησης του οισοφαγικού τοιχώματος σε έναν από τους κύριους βρόγχους. Τέτοιοι ασθενείς συχνά παρουσιάζονται με συνεχή βήχα, και συχνές πνευμονίες.

Η φυσική κλινική εξέταση του ασθενούς δεν αναγνωρίζει παθολογικά στοιχεία στην πρώιμη μορφή της νόσου. Η παρουσία διηθημένων υπερκλειδίων (Virchow) ή μασχαλιαίων λεμφαδένων δύναται μερικές φορές να βρεθούν στην προχωρημένη ασθένεια, και οι εκτενείς μεταστάσεις ήπατος μπορούν να οδηγήσουν σε ηπατομεγαλία. Η απώλεια βάρους οφείλεται στη δυσφαγία, αλλαγή διατροφικών συνήθειων, και την ανορεξία λόγω νεοπλασίας.

Περιστασιακά μία παρουσία μετάστασης ανευρίσκεται πρώτη, οδηγώντας στην ανακάλυψη ενός οισοφαγικού πρωτοπαθούς όγκου. Δυστυχώς, η παρουσία συμπτωμάτων χαρακτηρίζουν γενικά τη σχετικά προχωρημένη ασθένεια, ενώ οι πρόωροι καρκίνοι είναι συχνά ασυμπτωματικοί που συνήθως ανευρίσκονται ως τυχαία ευρήματα στην ενδοσκόπηση ή κατά την διάρκεια ελέγχου διαλογής (screening) του οισοφάγου Barrett.

2.4. Διαγνωστικοί μέθοδοι.

Οι κλασσικές ακτινογραφίες αντίθεσης (μελέτες βάριου) είναι αποτελεσματικές στο να προσδιορίζουν τις μεγάλες βλάβες του οισοφάγου που είναι ικανές να προκαλούν συμπτωματολογία στον ασθενή. Σε αντίθεση με τα οισοφαγικά λειομύματα, που προκαλούν οισοφαγική στένωση με ομαλό βλενογονικό περίγραμμα, τα καρκινώματα του οισοφάγου προκαλούν χαρακτηριστικά άναρχες ελκώδης βλάβες του βλενογόνου, σε συνδυασμό με τη διήθηση του τοιχώματος, παράγοντας μια εικόνα που μοιάζει με την αχαλασία. Το διπλής αντιθέσεως βαριούχο οισοφαγογράφημα είναι μια εναλλακτική λύση, ιδιαίτερα για τους ασθενείς που έχουν δυσφαγία εξίσου για τα στερεά και τα υγρά, στους οποίους χρειάζεται να εκτιμηθεί η διαταραχή της κινητικότητας. (Eric Elton 2005)

Αν και οι μελέτες βάριου μπορούν να υποδείξουν την παρουσία οισοφαγικού καρκίνου, η διάγνωση καθιερώνεται συνήθως από την ενδοσκόπηση. Ο πρώιμος οισοφαγικός καρκίνος μπορεί να εμφανιστεί ως επιφανειακή πλάκα ή έλκος. Της περισσότερου προχωρημένης νόσου βλάβες να εμφανιστούν ως στένωση, ελκώδης προβάλλουσα μάζα, κυκλοτερής διηθητική μάζα, ή ένα μεγάλο έλκος.

Η ενδοσκοπική εμφάνιση μιας μεγάλης βλενογονικής μάζας είναι συχνά διαγνωστική του οισοφαγικού καρκίνου. Οι βιοψίες επιβεβαιώνουν τη διάγνωση σε περισσότερα από 90% των περιπτώσεων. Οι πρώτες μελέτες διαπίστωσαν ότι όσο μεγαλύτερος ο αριθμός βιοψιών που λαμβάνονται (μέχρι επτά), τόσο υψηλότερη η ακρίβεια. Για παράδειγμα, σε μία σειρά 202 ασθενών, οι 47 είχαν γαστρικό ή οισοφαγικό καρκίνωμα, το ποσοστό των σωστών διαγνώσεων του οισοφαγικού καρκινώματος ήταν ως εξής:

- Πρώτη βιοψία – 93%
- Τέσσερις βιοψίες – 95%
- Επτά βιοψίες – 98%

Η προσθήκη των δειγμάτων κυτταρολογίας (brush cytology specimens) σε επτά βιοψίες αύξησε την ακρίβεια σε 100 τοις εκατό. Δεκαεπτά τοις εκατό (17%) των ενδοσκοπικά πιθανών καλοηθών βλαβών αποδείχθηκαν στη συνέχεια κακοήγη.

Η χρώση του οισοφαγικού βλενογόνου κατά την διάρκεια της ενδοσκοπησης (In vivo staining, chromoendoscopy) μπορεί να βοηθήσει στο να κατευθύνει την περιοχή της βιοψίας και να καθορίσει την έκταση της ασθένειας. Το ιώδιο του Lugol αντιδρά με τις περιεχόμενες ποσότητες γλυκογόνου του φυσιολογικού ακανθοκυτταρικού επιθηλίου για να παραγάγει ένα πρασινωπό καφετί χρώμα, ενώ ο νεοπλασματικός ιστός λόγω μείωσης του γλυκογόνου παραμένει χωρίς χρωστική. Ο ρόλος του στο οισοφαγικό καρκίνο ως προς την διάγνωση και ως μέθοδος διαλογής (screening) δεν έχει καθιερωθεί, αν και τα περιορισμένα στοιχεία προτείνουν ότι μπορεί να είναι χρήσιμο σε μερικές υψηλού κινδύνου τοποθετήσεις. Η χρωστική του οισοφαγικού ιστού με ιωδιούχο Lugol κατά τη διάρκεια της ενδοσκοπησης (chromoendoscopy) μπορεί να διευκολύνει τη ανεύρεση των πρώιμων βλαβών, αν και η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται σπάνια στην κλινική πράξη. Η χρωστική Lugol είναι μια σύνθετη χρωστική ιωδίου που δύναται να χρώσει το φυσιολογικό ακανθοκυτταρικό επιθήλιο που περιέχει το γλυκογόνο. Τα κακοήγη ακανθοκυτταρικά κύτταρα δεν χρώζονται δεδομένου ότι είναι συνήθως απαλλαγμένα του γλυκογόνου.

Η αξονική τομογραφία απαιτείται για την σταδιοποίηση της νόσου. Από όλους τους ασθενείς με οισοφαγικό καρκίνο, οι 60-75% αυτών διαγιγνώσκονται στα προχωρημένα στάδια της ασθένειας. Τα τελευταία χρόνια, νεώτερα απεικονιστικά μέσα για μια καλύτερη και ακριβέστερη διάγνωση του οισοφαγικού καρκίνου έχουν διατεθεί: ο ενδοσκοπικός υπέρηχος και η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) θεωρούνται οι αποτελεσματικότερες μέθοδοι για την αρχική σταδιοποίηση. (G.P. Stathopoulos 2000)

2.5.Σταδιοποίηση.

Η πρόγνωση του οισοφαγικού καρκίνου είναι στενά συνδεδεμένη με το στάδιο της νόσου. Ως αποτέλεσμα, η σαφής κλινική σταδιοποίηση είναι ουσιώδης για τον καθορισμό των θεραπευτικών επιλογών. Η σταδιοποίηση συνήθως ξεκινάει με την αξονική τομογραφία (CT scan) του θώρακος, της κοιλίας και της πυέλου για την αναγνώριση παρουσίας μεταστάσεων. Οι ασθενείς χωρίς ενδείξεις μεταστάσεων με την CT scan υποβάλλονται σε ενδοσκοπική υπερηχογραφία (EUS), με υψηλής συχνότητας υπέρηχους,

που προσδίδουν αναλυτικές εικόνες των οισοφαγικών μαζών και της σχέσης αυτών με το οισοφαγικό τοίχωμα. Η EUS είναι μία ακριβής μέθοδος στην σταδιοποίηση της νόσου, ειδικά για τα στάδια T και N, με 85% και 80% ευαισθησία αντίστοιχα.

Η προσθήκη της βιοψίας με λεπτή βελόνη (fine-needle aspiration, FNA) των ύποπτων λεμφαδένων αυξάνει την ακρίβεια του σταδίου N σε 93%. Ως προς σύγκριση, η CT scan έχει 50% ακρίβεια στην αναγνώριση των σταδίων T-N. Η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (Positron emission tomography –PET) είναι επίσης χρήσιμη στην περαιτέρω σταδιοποίηση του νεοπλασματος.

Η ταξινόμηση κατά TNM από τους οργανισμούς American Joint Committee on Cancer (AJCC) και International Union Against Cancer (UICC) για τον οισοφαγικό καρκίνο είναι αυτή που χρησιμοποιείται συνήθως παγκοσμίως. Η σημασία της σταδιοποίησης αντανακλάται στην πρόγνωση. Μεταξύ των ασθενών που υποβάλλονται σε εγχειρητική θεραπεία, το 13-20% έχει στάδιο I, το 14-27% στάδιο IIA, το 7-16% στάδιο IIB, και το 40-54% στάδιο III disease. (Peter C. Enzinger 2000)

Πίνακας 2.1: Σταδιοποίηδη κατά TNM για το καρκίνωμα οισοφάγου.

T: Primary Tumor	N: Regional Lymph Nodes	M: Distant Metastasis	Stage Groupings
TX: Primary tumor cannot be assessed	NX: Regional lymph nodes cannot be assessed	MX: Presence of distant metastasis cannot be assessed	Stage 0: T0 N0 Tis N0 M0
T0: No evidence of a primary tumor	N0: No regional lymph node metastasis	M0: No distant metastasis	Stage I: T1 N0 M0
Tis: Carcinoma in situ	N1: Regional lymph node metastasis	Tumors of the lower thoracic esophagus: M1a: Metastasis in celiac lymph nodes M1b: Other distant metastasis	Stage IIA: T2 N0 M0 T3 N0 M0
T1: Tumor invades the lamina propria or submucosa		Tumors of the midthoracic esophagus: M1a: Not applicable M1b: Nonregional lymph nodes and/or other distant metastasis	Stage IIB: T1 N1 M0 T1 N1 M0
T2: Tumor invades muscularis propria		Tumors of the upper thoracic esophagus: M1a: Metastasis in cervical nodes M1b: Other distant metastasis	Stage III: T3 N1 M0 T4, any N, M0
T3: Tumor invades adventitia			Stage IVA:0 Any T, any N,
T4: Tumor invades adjacent structures			Stage IVB: Any T, any N, M1b

T1 νεοπλάσματα οισοφάγου – Ο πρώιμος οισοφαγικός καρκίνος συνήθως αναγνωρίζεται ενδοσκοπικά, με την παρουσία μικρών ελκών βλεννογόνου ή οζιδίων. Τα T1 νεοπλάσματα εντοπίζονται συνήθως T1 στο βλεννογόνο ή στον υποβλεννογόνο χιτώνα, χωρίς να διηθείται ο μυϊκός χιτώνας, και αναγνωρίζονται ακριβέστερα με τη μέθοδο EUS.

T2, T3, και T4 νεοπλάσματα οισοφάγου – Τα T2, T3, και T4 νεοπλάσματα οισοφάγου συνήθως αναγνωρίζονται στην ενδοσκόπηση ως στένωση, έλκος, ή εξωφυτική βλάβη. Τα T2 νεοπλάσματα ορίζονται αυτά που προσβάλουν τον μυϊκό χιτώνα, (ενδοοισοφαγική νόσος). Τα T3, και T4 νεοπλάσματα είναι εξωοισοφαγικά νεοπλάσματα. Τα T3 νεοπλάσματα προσβάλουν έως τον ορογόνο, ενώ τα T4 νεοπλάσματα προσβάλουν το όργανα στο μεσοθωράκιο όπως το περικάρδιο, η αορτή, τους βρόγχους, και τον πνευμονικό υπεζωκότα.

Περιοχικοί λεμφαδένες.

Η μέθοδος EUS δύναται να χρησιμοποιηθεί στη σταδιοποίηση κατά N, μέσω της αναγνώρισης των προβάλλουσων διηθημένων λεμφαδένων ή μέσω την καθοδήγηση βιοψίας μέσω βελόνης. Οι νεοπλασματικοί λεμφαδένες έχουν αυξημένες διαστάσεις (>1 cm), ωοειδής, υποηχογενή χαρακτηριστικά με σαφές όριο μεταξύ των λεμφαδένων και του οισοφαγικού τοιχώματος. Η μέθοδος EUS έχει ακρίβεια άνω των 80% στην αναγνώριση μεταστατικών λεμφαδένων, κυρίως στους περιοισοφαγικούς λεμφαδένες, ενώ η ακρίβεια ελαττώνεται σε πιο απομακρυσμένους λεμφαδένες.

Η πιο σημαντική λεμφαδενική ομάδα κατά τον έλεγχο N είναι της κοιλιακής χώρας. Η ανεύρεση μεταστατικού λεμφαδένα στην όπισθογαστρική περιοχή εκτός της πρωτοπαθούς νόσου, είναι σημείο ενδεικτικό ανεγχείρητου νεοπλάσματος ή παρουσίας απομακρυσμένων μεταστάσεων. Οι επεμβατικές μέθοδοι της θωρακοσκόπησης και της λαπαροσκόπησης χαρακτηρίζονται από μεγάλη ακρίβεια στην σταδιοποίηση των θωρακικών και κοιλιακών λεμφαδένων. Η ανοσοιστοχημική ανάλυση των λεμφαδένων αποτελεί εναλλακτική μέθοδο, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της ακρίβειας στην σταδιοποίηση.

Απομακρυσμένοι λεμφαδένες.

Απομακρυσμένες μεταστάσεις στο ήπαρ, τα οστά, και τους πνεύμονες, ανευρίσκονται σε ποσοστό 30% των ασθενών. Επίσης νεοπλασματική προσβολή του μυελού των οστών έχει αναγνωρισθεί σε 40% των ασθενών. Η μέθοδος CT scanning χρησιμοποιείται για τον καθορισμό τοπικής μεταστατικής νόσου κυρίως στην περιτοναϊκή κοιλότητα, όπως και η μέθοδος Positron emission tomography (PET scans), μεγαλύτερης ακρίβειας από την CT scanning για τον εντοπισμό απομακρυσμένων μεταστάσεων. Επίσης η προεγχειρητική βρογχοσκόπηση με βιοψία και κυτταρολογική εξέταση (biopsy and brush cytology) έχει συστηθεί σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο κυρίως του άνω τρίτου του οισοφάγου.

2.6. Θεραπεία.

Για την αντιμετώπιση των αδενοκαρκινωμάτων και των ακανθοκυτταρικών νεοπλασμάτων του οισοφάγου έχουν χρησιμοποιηθεί ίδιες θεραπευτικές τακτικές. Παρόλο αυτά αναφέρεται καλύτερη πρόγνωση για το αδενοκαρκίνωμα σε σχέση με το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του οισοφάγου. (Eric Elton 2005) Κατά τη χρονική στιγμή της αναγνώρισης της νόσου, άνω του 50% των ασθενών στις ΗΠΑ ταξινομούνται στο στάδιο IV κατά TNM, και δεν τηρούν τα κριτήρια για εγχειρητική θεραπεία

Η ολική εγχειρητική αφαίρεση του νεοπλάσματος είναι δυνατή μόνο στο 40% των ασθενών, με σύνηθες εύρημα την παραμονή νεοπλασματικών κυττάρων στο όρια της εγχειρητικής τομής. Τα κριτήρια αφαίρεσης του νεοπλάσματος αναφέρουν ως γενικό κανόνα ότι το νεόπλασμα T4 ή νόσος σταδίου IV αποτελούν μη εγχειρήσιμα νεοπλάσματα. Κατά το παρελθόν τέτοιες επεμβάσεις οισοφαγεκτομής συνοδεύονταν με μετεγχειρητική θνητότητα της τάξης του 20%, λόγω αναστομωτικών συριγγίων, υποδιαφραγματικών αποστημάτων, και αναπνευστικών επιπλοκών. Αναφέρεται ότι λιγότερο από το 20% των ασθενών με ολική οισοφαγεκτομή αναμένεται να έχει 5ετή επιβίωση, με σύνηθες μέσο χρονικό διάστημα των 15-18 μηνών.

Η χρήση της ακτινοθεραπείας (5500 to 6000 cGy) ως αρχική θεραπεία, έχει λιγότερο σημαντικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση των αποφρακτικών συμπτωμάτων σε σύγκριση με την εγχειρητική θεραπεία. Η χρήση των

χημειοθεραπευτικών παραγόντων χαρακτηρίζεται από σημαντική μείωση του μεγέθους των νεοπλασμάτων σε ποσοστό 15-25% των ασθενών υπό αγωγή με μονοθεραπεία, και 30-60% των ασθενών με συνδυασμό φαρμάκων όπου περιλαμβάνεται η cisplatin. Ο συνδυασμός χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας ως αρχική θεραπευτική επιλογή, σε συνδυασμό με την επακόλουθη εγχειρητική αφαίρεση του νεοπλασματος, επιτυγχάνουν την αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής του ασθενούς με την ύφεση των αποφρακτικών συμπτωμάτων.

Σε ασθενείς με ανεγχείρητα νεοπλάσματα, η δυσφαγία, η καχεξία, και τα τραχειοοισοφαγικά συρίγγια αποτελούν τα κύρια αντικείμενα της παρηγορητικής θεραπείας. Μέθοδοι όπως οι επαναλαμβανόμενες ενδοσκοπικές διαστολές, με ή χωρίς την τοποθέτηση μεταλλικών συρμάτων οδηγών (stent) προς παράκαμψη του νεοπλασματος, και η χειρουργική τοποθέτηση γαστροστομίας ή νησιδοστομίας για την ενυδάτωση και την σίτιση, αποτελούν τις κύριες μεθόδους της παρηγορητικής θεραπείας. Η ενδοσκοπική χρήση των συσκευών laser για κατάλυση του αποφρακτικού νεοπλασματος, αποτελεί την περισσότερο υποσχόμενη παρηγορητική μέθοδο.

2.7. Πρόγνωση.

Παρόλο τις προόδους στην διαχείριση και θεραπεία σε αρκετούς τύπους νεοπλασμάτων, η πρόγνωση σε ασθενείς με οισοφαγικό καρκίνο παραμένει πτωχή. Ένα μικρό ποσοστό ασθενών σε πρώιμα στάδια της νόσου, δύναται να έχει μακρά επιβίωση και καλή ποιότητα ζωής. Η πρόγνωση σε ασθενείς με ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του οισοφάγου είναι πτωχή με λιγότερο από το 5% να παραμένουν εν ζωή 5 χρόνια μετά την διάγνωση της νόσου, οδηγώντας συνήθως τις θεραπευτικές προσπάθειες στην συμπτωματική αντιμετώπιση και βελτίωση των συνθηκών ζωής του ασθενούς.

Η επιβίωση είναι στενά συνδεδεμένη με το στάδιο της νόσου, και η κατά προσέγγιση 5ετής επιβίωση είναι 40-85% για το στάδιο I, 22-65% για το στάδιο IIa, 29-45% για το στάδιο IIb, 10-25% για το στάδιο III, και 3-10% για το στάδιο IV.

2.8. Πρόληψη.

Όπως για κάθε νεόπλασμα, η τροποποίηση των παραγόντων κινδύνου, αποτελεί την κύρια στρατηγική για την πρόληψη του οισοφαγικού καρκίνου. Η αποφυγή του καπνίσματος αποτελεί την πιο σημαντική παρέμβαση και για τους δυο τύπους του οισοφαγικού καρκινώματος των ακανθοκυτταρικών νεοπλασμάτων και του αδενοκαρκινώματος. Η αποφυγή του αλκοόλ αποτελεί επίσης σημαντικό προληπτικό μέτρο έναντι του ακανθοκυτταρικού νεοπλασματος. Έχουν ανακοινωθεί μελέτες που υποστηρίζουν την προστατευτική δράση των μη στεροειδών αντιφλεγμονώδων φαρμάκων (NSAIDs), στο ESCC, με σχετικό κίνδυνο σε συχνούς χρήστες αυτής της κατηγορίας φαρμάκων της τάξεως του $OR=0.54$, έναντι σε ασθενείς με ελάχιστη χρήση αυτών $OR=0,82$. Ο κίνδυνος του ESCC μειώνεται σημαντικά μία δεκαετία μετά την διακοπή του καπνίσματος, σε αντίθεση με το αδενοκαρκίνωμα του οποίου ο κίνδυνος δεν μειώνεται μετά και από 30 χρόνια διακοπής του καπνίσματος. Αντικαθιστώντας τις παστές, καπνιστές, και κονσερβοποιημένες τροφές με φρέσκα φρούτα και λαχανικά, αναφέρεται πιθανή μείωση κατά το ήμισυ της συχνότητας του ESCC.

Οι πρόσφατες οδηγίες της Αμερικανικής Εταιρείας Γαστροεντερολογίας (American College of Gastroenterology - ACG) συστήνουν σε ασθενείς με χρόνια γάστρο-οισοφαγική παλινδρόμηση (ΓΟΠ) την ενδοσκόπηση του ανώτερου πεπτικού. Σε ασθενείς που θα αναγνωρισθεί οισοφάγος Barrett, συστήνεται επανάληψη της γαστροσκοπήσεως σε 3 χρόνια. Εάν αναγνωρισθούν ήπιες αλλοιώσεις δυσπλασίας, η ενδοσκόπηση πρέπει να επαναλαμβάνεται σε 1 χρόνο, ενώ σε υψηλού βαθμού μικρής έκτασης δυσπλαστικές αλλοιώσεις σε 3 μήνες. Αντίθετα σε παρουσία υψηλού βαθμού δυσπλασίας σε μεγάλη έκταση ή σε πολλά σημεία συγχρόνως, συστήνεται προληπτική οισοφαγεκτομή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ RAS

3.1. Γενικά

Τα ογκογονίδια της οικογένειας *ras* ανακαλύφθηκαν σε ιούς που εμφάνιζαν τη δυνατότητα εξαλλαγής κυττάρων και πρόκλησης σαρκώματος σε αρουραίους (Willumsen, 1980). Υπάρχουν τρεις μορφές γονιδίων *ras*: το K-*ras* (ογκογονίδιο του Kirsten murine ιού σαρκώματος, Ki-MuSV), το H-*ras* (ογκογονίδιο του Harvey murine ιού σαρκώματος, Ha-MuSV) και του N-*ras* (ανιχνεύεται σε όγκους αλλά δεν ανιχνεύεται σε ρετροϊούς) (Πίνακας 3.1). Τα γονίδια Ha-MuSV και KiMuSV απομονώθηκαν από αρουραίους με τους αντίστοιχους ιούς λευχαιμίας (Mo-MuLV και KiMuLV). Τα ανθρώπινα ομόλογα γονίδια είναι τα KRAS2, HRAS1 και NRAS. Τα γονίδια HRAS2 και KRAS1 αποτελούν ανενεργά ψευδογονίδια.

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

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

Τα γονίδια *ras* έχουν εντοπιστεί σε πολλά είδη ευκαρυωτικών οργανισμών. Τα γονίδια *ras* ανήκουν στα λεγόμενα βασικά κυτταρικά γονίδια

(Housekeeping genes). Με αυτόν τον όρο ονομάζονται γονίδια τα οποία είναι κατά μεγάλο τμήμα τους συντηρημένα κατά την εξελικτική διαδικασία, καθώς κρίνονται απαραίτητα για την κυτταρική επιβίωση. Πέραν του υψηλού εξαλλακτικού δυναμικού τους, τα γονίδια *ras* είναι πολύ σημαντικά και για το γεγονός ότι το φυσιολογικό τους προϊόν εμπλέκεται ουσιαστικά στη ρύθμιση των βασικών κυτταρικών λειτουργιών, δηλαδή της ανάπτυξης, πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα *ras* είναι απαραίτητοι μεταφορείς διαφόρων φυσιολογικών μηνυμάτων, ενώ οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες συνεισφέρουν στο νεοπλασματικό φαινότυπο. (Barbacid 1987, Spandidos et al 1989, Valencia et al 1991, Σπαντίδος 1992, Lowy et al 1993).

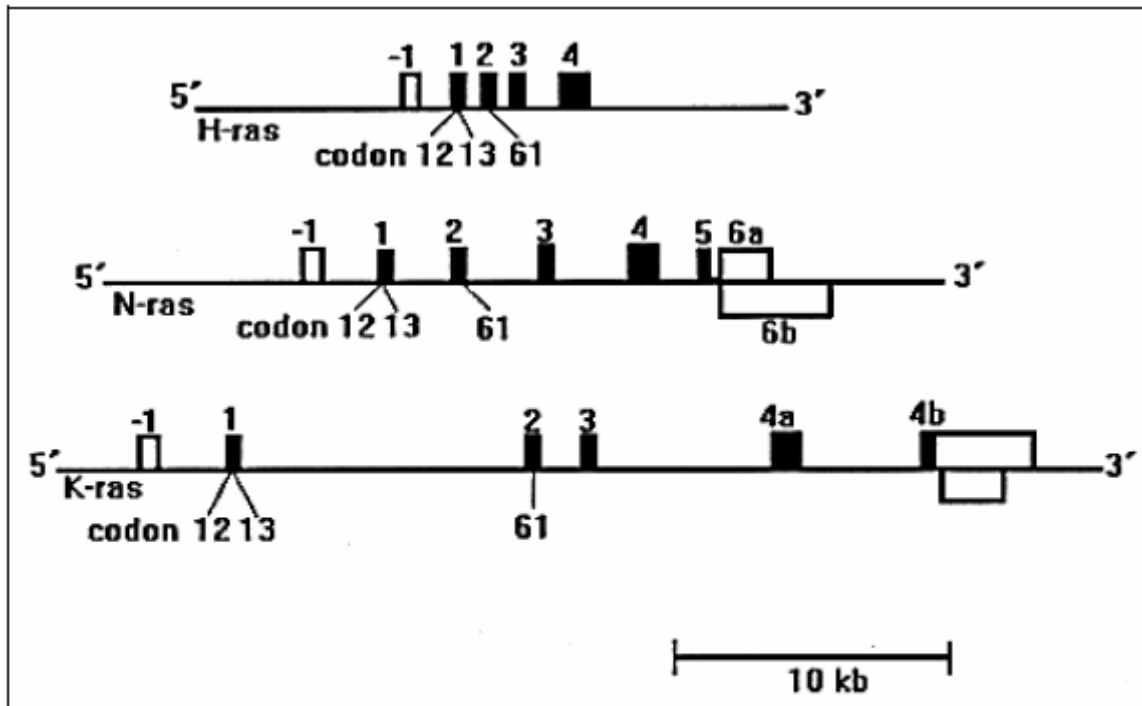
Πίνακας 3.1: Τα ογκογονίδια RAS.

	NRAS/Nras	HRAS1/Hras	KRAS2/K-ras2
Νουκλεοτίδια (Kb)	32	4.5	50
Χρωμόσωμα	1p13	11p15.5	12p12.1
Μάζα (kDa)	21	21	21
Κυτταρική θέση	Στην έσω επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης		

3.2 Δομή των γονιδίων *ras*

Τα γονίδια *ras* απαντώνται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και των μυκήτων και παρουσιάζουν σημαντική δομική ομολογία (Lowy & Willumsen, 1993, Koffa, 1994). Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί τρία γονίδια *ras*: το K-*ras* στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 12 (12p12.1-pter), το H-*ras* στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 11 (11p15.1-p15.5) και το N-*ras* στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 1 (1p22-p32). Έχουν επίσης ταυτοποιηθεί και δυο ψευδογονίδια, τα H-*ras* -2 και K-*ras* -1, τα οποία όμως δεν είναι λειτουργικά. Η δομή και των τριών γονιδίων είναι παρόμοια, έχοντας ένα 5' μη κωδικοποιό εξώνιο (εξώνιο -1), τέσσερα κωδικοποιά εξώνια (πρωτεΐνη p21) και μια περιοχή πολλαπλών διαδοχικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (VTR)

στο μη μεταγραφόμενο 3' άκρο του γονιδίου (Σχήμα 3.1) (Ishii, 1985, Koffa, 1994).



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

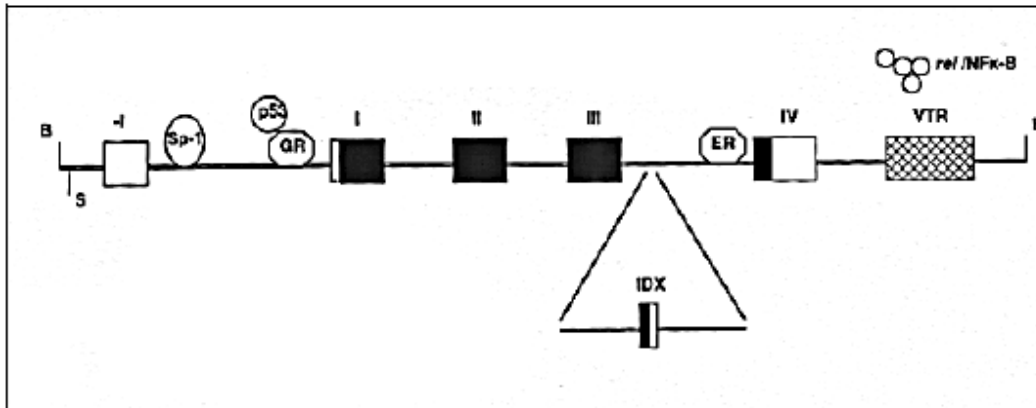
Το γονίδιο *K-ras* διαθέτει δύο εναλλακτικά εξώνια, IVa και IVb (McGrath et al 1983, Shimizu et al 1983). Το αποτέλεσμα αυτού είναι ότι το γονίδιο μπορεί να κωδικοποιήσει δύο ισομορφικές μορφές της πρωτεΐνης p21. Τα επίπεδα παραγωγής της *K-ras* A είναι αμελητέα (20 φορές χαμηλότερα) σε σύγκριση με της *K-ras* B σε φυσιολογικά κύτταρα. Η πρωτεΐνη p21 και των τριών γονιδίων αποτελείται από 189 αμινοξέα, εκτός από την *K-ras* B που αποτελείται από 188 αμινοξέα, επειδή το εξώνιο IVb έχει ένα λιγότερο κωδικόνιο (McGrath et al 1983, Shimizu et al 1983, Spandidos et al 1989, Lowy et al 1993). Η υψηλή ομολογία που υπάρχει ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας των *ras* οφείλεται στη συντηρητικότητα που υπάρχει ανάμεσα στις κωδικές περιοχές. (Barbacid 1987, Valencia et al 1991, Lowy et al 1993). Οι μη κωδικές και οι γειτονικές περιοχές των εξωνίων παρουσιάζουν πολυμορφισμό μήκους, με αποτέλεσμα το συνολικό μέγεθος του γονιδίου να διαφέρει σημαντικά. Έτσι το *H-ras* εκτείνεται σε μια γενομική περιοχή περίπου

4.5 kb, το N-ras σε 7 kb περίπου, ενώ το K-ras καταλαμβάνει περίπου 40 kb (Spandidos et al 1989, Σπαντίδος 1992, Lowy et al 1993).

Τα τρία γονίδια ras φέρουν υποκινητές οι οποίοι είναι πλούσιοι σε GC ενώ δε διαθέτουν αλληλουχίες TATA ή CAT, χαρακτηριστικά που απαντώνται σε πολλά ακόμη ογκογονίδια. Ο υποκινητής του ανθρώπινου N-ras περιέχει συντηρημένες περιοχές πρόσδεσης για τα CREB/ATF, AP1, AP2, MYB, E4TF1, SP1 και MLTF/MYC.

3.3 Ρύθμιση των γονιδίων ras

Η ύπαρξη μεταγραφικού ελέγχου των γονιδίων ras προκύπτει από τη διαφορετική έκφραση τους σε διάφορους ιστούς. Τα ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων ras έχουν μελετηθεί εκτενώς. Φαίνεται να υπάρχουν αρκετές θέσεις έναρξης της μεταγραφής εντοπισμένες σε μια περιοχή 40bp μέσα στο εσόνιο - 1. Στην ρύθμιση της έκφρασης των ras εμπλέκονται ρυθμιστικές περιοχές (Σχήμα 3.2) που έχουν τη δυνατότητα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (Ishii, 1986, Spandidos, 1988, Lowndes, 1989). Τέτοια ρυθμιστικά στοιχεία έχουν αναγνωρισθεί στην περιοχή του υποκινητή και στο πρώτο εσόνιο του H-ras. Τα στοιχεία του πρώτου εσονίου τροποποιούν την έκφραση του γονιδίου σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, με θετικό και αρνητικό τρόπο (Hattore, 1992). Στο ίδιο εσόνιο έχουν αναγνωρισθεί δύο ακόμη θέσεις με λειτουργική σημασία για τη μεταγραφή, μια με ειδικότητα σύνδεσης της πρωτεΐνης p53 (Zachos & Spandidos, 1998) και η δεύτερη με ενεργότητα πρόσδεσης υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid response element-GRE). Παρόμοια περιοχή υπάρχει για οιστρογονικούς υποδοχείς (ERE) στο τέταρτο εσόνιο του H-ras (Zachos, 1996).



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

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

3.4 Η πρωτεΐνη p21

Όπως αναφέρθηκε τα γονίδια *ras* των θηλαστικών κωδικοποιούν πρωτεΐνες με μοριακό βάρος 21 kDa. Η p21 αποτελείται από 189 αμινοξέα και εμφανίζει τις εξής τρεις περιοχές: α) την καταλυτική περιοχή (αμινοξέα 1-164)

που παρουσιάζει μεγάλη ομολογία μεταξύ των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα τρία ανθρώπινα γονίδια *ras*, β) την ετερογενή περιοχή (αμινοξέα 165-186) που διαφέρει μεταξύ των τριών πρωτεϊνών p21 εκτός από την Cys186 και γ) την περιοχή πρόσδεσης στη μεμβράνη (αμινοξέα 186-189) (Barbacid 1987, Grand et al 1991, Lowy et al 1993). Σύγκριση των ισομόρφων της p21 και των τριών ανθρώπινων γονιδίων *ras*, δείχνει ότι υπάρχει υψηλή ομολογία στα πρώτα 164 αμινοξέα (τα 86 αμινοτελικά αμινοξέα είναι απόλυτα όμοια, ενώ τα επόμενα 78 αμινοξέα παρουσιάζουν κατά 79% ομολογία) (Valencia et al 1991, Lowy et al 1993). Τα τελευταία 25 καρβοξυτελικά αμινοξέα αποκλίνουν σημαντικά, εκτός από την Cys στη θέση 186. Αυτό υποδηλώνει ότι η ετερογενής περιοχή μεταξύ των διαφόρων ομολόγων πρωτεϊνών p21 πιθανόν σχετίζεται με διακριτές λειτουργίες.

Η πρωτεΐνη p21 *ras* συντίθεται στο κυτταρόπλασμα σε ελεύθερα ριβοσωμάτια ως προ-p21 και έχει χρόνο ημίσειας ζωής τουλάχιστον 24 ώρες (Grand et al 1991). Η προ-p21 υπόκειται σε μια σειρά μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στο καρβοξυ-τελικό άκρο της, οι οποίες αυξάνουν την υδροφοβικότητα της πρωτεΐνης, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την πρόσδεση της στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.

Οι πρωτεΐνες *ras* είναι GTPάσες προσδεσμένες στην μεμβράνη του κυτάρου. Η φυσιολογική p21 *ras* (RAS) υδρολύει GTP σε συγκρίσιμα επίπεδα με αυτά των καθαρών G πρωτεϊνών και εμφανίζεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργής μορφής (GTP-RAS) και μιας ανενεργής (GDP-RAS). Τα επίπεδα της απελευθέρωσης GDP και της υδρόλυσης GTP αυξάνονται από την επιρροή τριών κατηγοριών ρυθμιστικών πρωτεϊνών: τις GAP (GTP-ase activating proteins) που αυξάνουν τα επίπεδα υδρόλυσης του GTP, τις GNRP (guanine nucleotide exchange factors) που καταλύουν την απελευθέρωση του δεσμευμένου GDP των GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitors) που αναστέλλουν την αντικατάσταση του GDP από το GTP και μπορούν επίσης να αναστέλλουν την δράση των GAP πρωτεϊνών. (Boguski 1993, Bourne 1990, Downward 1992, Santos 1989)

Οι φυσιολογικές πρωτεΐνες RAS εμπλέκονται στον έλεγχο την κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης αλλά ακόμα και μια μεταλλαγή σε ένα αμινοξύ μπορεί να δημιουργήσει μια ογκογόνα πρωτεΐνη. Η δράση μιας ποικιλίας αυξητικών παραγόντων αυξάνει την συγκέντρωση των GTP-RAS σε

φυσιολογικά κύτταρα και η χωροταξική αλλαγή που επάγεται από την πρόσδεση του GTP ενεργοποιεί τις RAS, που μπορεί πλέον να ενωθεί με πρωτεΐνες-κυτταρικούς στόχους. Στα κύτταρα των θηλαστικών οι RAS ενεργοποιούν μια σειρά πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης που περιλαμβάνει τις RAF1, MAPKK (mitogen-activated protein kinase kinase) και τις κινάσες ERK ή MAP (de Vries-Smits 1992, Cook 1993). Το μονοπάτι RAS-RAF ενεργοποιείται επίσης από την πρωτεΐνη HBx του ιού της ηπατίτιδας Β (Doria, 1995). Οι MAPK φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τα ELK1 και JUN και την CREB κινάση/RSK2 που αποτελεί μέλος της pp 90RSK οικογένειας (Xing 1996). Η ογκογόνος RAS ενεργοποιεί την λειτουργία της πρωτεϊνικής κινάσης C και της αντλίας Na⁺/H⁺, τον μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων και σε διάφορους τύπους κυττάρων έχει αναφερθεί να ενεργοποιεί την μεταγραφή πολλών γονιδίων όπως τα ODC1, FOS, JUN, JUNB, MDR1, MYC, p9Ka/42A, TGFα, και TGFβ. Οι RAS καταστέλλουν την μεταγραφή των γονιδίων MYOD1, MYOH, Myf5, MRF4, μυογενίνης, PDGF υποδοχέα και της φιμπρονεκτίνης (Sistonen 1989).

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

3.5. Ογκοκατασταλτική και προ-αποπτωτική δράση γονιδίων ras.

3.5.1. Ογκοκατασταλτική δράση των γονιδίων wild-type ras.

Πρόσφατες μελέτες παρείχαν στοιχεία που δείχνουν ότι η έκφραση των φυσιολογικών (wild-type) γονιδίων *ras* κατέχει αντι-ογκογονικές ιδιότητες. Οι πρωτεΐνες Ras είναι μικρές δεσμευτικές πρωτεΐνες GTP, και είναι μεταξύ των πρώτων μορίων που αναγνωρίστηκαν για τη συμμετοχή τους στο κυτταρικό μετασχηματισμό και ογκογένεση. Τα γονίδια *Ras* συμβάλλουν στην ογκογένεση μέσω της συνάρθρωσης των μεταλλαγών που καθιστούν την

πρωτεΐνη *ras* ιδιαίτερα ενεργή. Κατά συνέπεια, τα γονίδια wild-type *ras* κατέχουν μια αδύναμη δραστηριότητα GTPάσης, ενώ τα αντίστοιχα μεταλλαγμένα γονίδια αναπτύσσουν πολλαπλά ισχυρή καταλυτική δραστηριότητα. (D.A. Spandidos 2002)

Σε μελέτες κυτταροκαλιεργειών αποδείχθηκε ότι η έκφραση των γονιδίων *ras* όχι μόνο συμβάλλει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετασχηματισμό, αλλά υπό ορισμένες συνθήκες, οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση. Η έκφραση των ογκογονιδίων *ras* μπορεί να προκαλέσει το κυτταρικό μετασχηματισμό μόνο σε συνεργασία με ένα άλλο ογκογονίδιο όπως το *myc*, E1A, SV40, ή όταν ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο όπως το p53 ή p16 καθίσταται σε αδρανεία. Όταν η μετάλλαξη *ras* εκφράζεται σε μη-διαφοροποιημένους ινοβλάστες, τότε οδηγείτε σε αύξηση των επιπέδων p53, p16 ή p21 και σε κυτταρική απόπτωση. Ομοίως, η έκφραση της κινάσης *raf*, του κύριου σήματος στόχου των *ras*, οδηγεί τους ινοβλάστες σε απόπτωση, υποδεικνύοντας ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού *ras/raf* προάγει την κυτταρική απόπτωση, στοιχείο το οποίο δίνει έμφαση σε έναν άλλο κυτταρικό μηχανισμό που προλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που έχουν αποκτήσει μεταλλάξεις στα γονίδια *ras*. Η συνακόλουθη αδρανοποίηση των p53 ή p16 καταστέλλει αυτόν τον μηχανισμό. (D.A. Spandidos 2002)

3.5.2. Συμμετοχή των γονιδίων *ras* στην απόπτωση.

Μεγάλο πλήθος μελετών έχει συσχετίσει την οικογένεια των γονιδίων *ras*, με ογκοκατασταλτικές και αποπτωτικές δράσεις. Η ενεργής προαγωγή του κυτταρικού θανάτου από τα γονίδια *ras*, διενεργείται κυρίως μέσω της απόπτωσης, αν και υπάρχουν αναφορές αποδουκνύοντας τον «τύπου 2 φυσιοκογικό κυτταρικό θάνατο». Η *ras* εξαρτώμενη επαγωγή της απόπτωσης σε ινοβλάστες, έχει αποδειχθεί ως απάντηση σε πλήθος εξωτερικών εναυσμάτων, όπως η απώλεια προσκόλησης με την θεμέλιο ουσία, τη θεραπεία με ταμοξιφένη, και τον παράγων νέκρωσης όγκων. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η *ras* εξαρτώμενη παραγωγή των υπεροξειδίων ανιόντων, καθορίζει την ευαισθησία της ενδοκυτταρικής επαγωγής της απόπτωσης των ινοβλάστων. (D.A. Spandidos 2002)

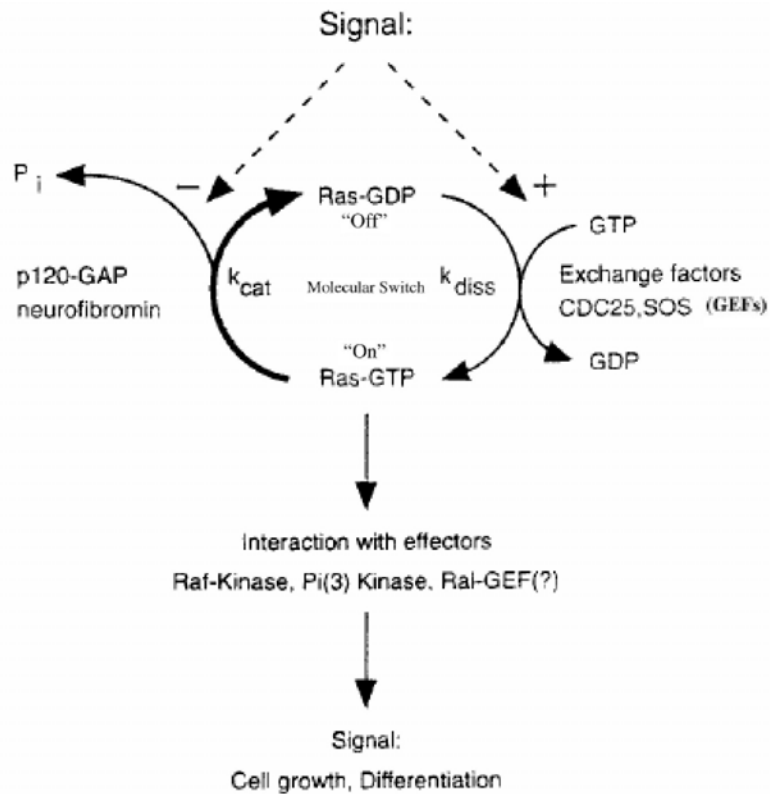
3.6. Ενεργοποίηση των γονιδίων *ras*

Υπερέκφραση των γονιδίων ή μεταλλάξεις κωδικοποιών αλληλουχιών τους συνεπάγονται αντίστοιχα παραγωγή της πρωτεΐνης p21 σε υπερβολικές

ποσότητες ή δομικές αλλοιώσεις που σταθεροποιούν την p21-GTP μορφή. Αμφότεροι οι μηχανισμοί σημαίνουν τη μετατροπή των *ras* πρωτοογκογονιδίων σε ενεργοποιημένα ογκογονίδια. Αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των *ras* είναι η προαγωγή της αντιγραφής και μεταγραφής του DNA, συνέπεια της έκφρασης πολλών γονιδίων. Τα γεγονότα αυτά συνεισφέρουν στη γενετική αποδιοργάνωση των κυττάρων και ανάπτυξη του καρκινικού φαινότυπου. Τα ενεργοποιημένα *ras* παρουσιάζουν υψηλότατο εξαλλακτικό δυναμικό *in vitro* (Spandidos & Wilkie, 1984). Αλλά και *in vivo*, στον καρκίνο του παγκρέατος όπου οι μεταλλάξεις των *ras* αποτελούν σταθερό εύρημα, συμβαίνουν σε πρώιμα στάδια ή ακόμη και σε αλλοιώσεις του οργάνου που προηγούνται και σχετίζονται παθογενετικά με την ανάπτυξη της νεοπλασίας (Yanagisawa, 1993).

Τα Ras είναι μια δυαδική μετάβαση GDP/GTP στην εσωτερική επιφάνεια των κυτταρικής μεμβράνης αναμεταδίδοντας σημάτα από τους μεμβρανικούς υποδοχείς στο κυτταρόπλασμα. Οι πρωτεΐνες Ras λαμβάνουν τα farnesyl μόρια που προσδένονται στη μεμβράνη, και σηματοδοτούν την ενεργοποίηση της raf κινάσης και το μονοπάτι MAPK μέσω των ERK1/ERK2. (Σχήμα 3.3) Η ενεργοποίηση του καταρράκτη MAPK είναι ζωτικής σημασίας για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και η ενισχυμένη ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού συμβάλλει στην ανάπτυξη του μεταλλαγμένου φαινότυπου. (D.A. Spandidos 2002)

Σχήμα 3.3: Σχηματική παράσταση του διακόπτη λειτουργίας του *ras* μεταξύ της GDP-συνδεδεμένης-ανενεργούς θέσης (off) και της GTP-συνδεδεμένης-ενεργούς θέσης (on). Η ενεργοποίηση ενισχύεται από την δράση του GEF, που είναι ειδικός παράγων ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης και αυξάνει τον ρυθμό αποσύνδεσης του *ras* από το GDP, ή αναστέλλει την GAP. Η πρωτεΐνη *ras* δύναται να επιδράσει σε άλλες πρωτεΐνες για μεταγωγή μηνυμάτων όταν βρίσκεται στην ενεργή μορφή και είναι συνδεδεμένη με GTP. GEF= παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (Wittinghofer 1998).



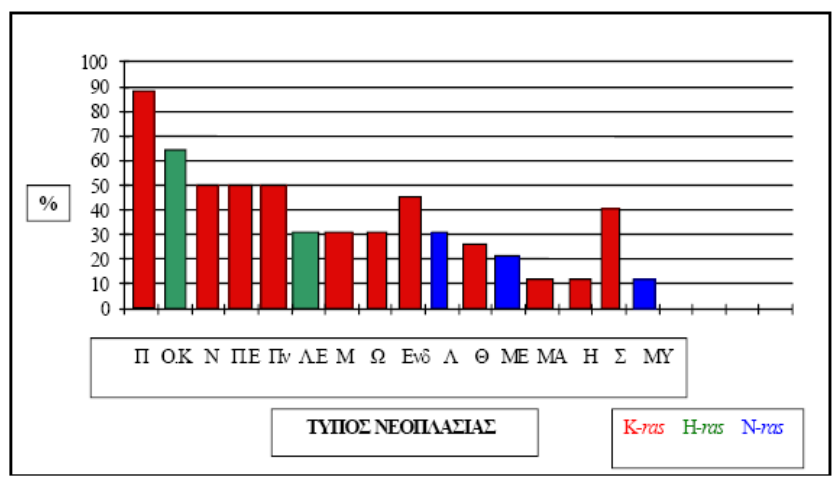
3.6.1. Μεταλλάξεις των ras

Οι μεταλλάξεις των γονιδίων *ras* απαντώνται συνηθέστερα σε ορισμένα κωδικόνια, τα 12, 13 και 61, με αποτέλεσμα τη συνεχή υποκίνηση του κυταρρικού πολλαπλασιασμού, ή την ενίσχυση δράσης κατά 5-50 φορές του wild-type γονιδίου. (Kiaris & Spandidos, 1995) (D.A. SPANDIDOS). Πιθανή εξήγηση γι' αυτό είναι ότι τα κύτταρα που υφίστανται τις συγκεκριμένες αλλοιώσεις πολλαπλασιάζονται επιλεγόμενα έναντι άλλων που πιθανά φέρουν μεταλλάξεις σε διαφορετικές θέσεις (Barbacid, 1987). Οι μεταλλαγμένες p21 -δηλαδή οι ογκοπρωτεΐνες Ras- είτε στερούνται δράσης GTPάσης, είτε σε αυτές η αποδέσμευση του GTP από την p21 καθίσταται δυσχερής. Η αντικατάσταση π.χ. Γλυκίνης από Βαλίνη στο κωδικόνιο 12 του K-ras, που αποτελεί τη συχνότερη μετάλλαξη στα *ras*, προκαλεί δεκαπλάσια ελάττωση του ρυθμού υδρόλυσης GTP και ως εκ τούτου συσσώρευση των συμπλεγμάτων p21-GTP (Sato, 1992). Μεταλλάξεις είναι δυνατόν να συμβούν και σε άλλες θέσεις των γονιδίων *ras*, οι προαναφερόμενες είναι όμως αυτές που επιλέγονται, δίνοντας γένεση σε κλώνους κυττάρων με πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού, τα οποία φέρουν και τον ίδιο γονότυπο, λόγω της κλωνικής ανάπτυξης του όγκου. Πρόκειται για τις λεγόμενες «θερμές

θέσεις» (hot spots) που αποτελούν τον στόχο μεταλλάξεων που σχετίζονται με την καρκινογένεση. Το κωδικόνιο 12 φαίνεται ότι εμφανίζει την μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεων.

Οι μεταλλάξεις των γονιδίων *ras* ανιχνεύονται είτε με τη βοήθεια πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP), είτε με συνδυασμό ανάλυσης πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονής έλικας (SSCP) και ανάλυσης ετεροδίκλωνου DNA (heteroduplex), ακολουθούμενων από ανάλυση αλληλουχίας DNA (sequencing). Με τις τεχνικές αυτές, μεταλλάξεις των τριών γονιδίων έχουν περιγραφεί στους περισσότερους τύπους ανθρώπινου καρκίνου (Σχήμα 3.4, Πίνακας 3.2). Η διεθνής βιβλιογραφία έχει κυριολεκτικά κατακλυστεί από μελέτες που αφορούν την ανίχνευση μεταλλάξεων των γονιδίων *ras* στους περισσότερους καρκίνους του ανθρώπινου σώματος. Η συχνότητα των μεταλλάξεων κυμαίνεται μεταξύ 5-95% ανάλογα με την θέση ανάπτυξης του όγκου. Η ανεύρεση σημειακών μεταλλάξεων του κωδικονίου 12 του K-*ras* στο 90% των αδενοκαρκινωμάτων παγκρέατος αποτελεί μία από τις ισχυρότερες συσχετίσεις γονιδιακής συμμετοχής στον ανθρώπινο καρκίνο. Οι μεταλλάξεις των K-*ras* και H-*ras* αφορούν περισσότερο συμπαγείς όγκους, κυρίως αδενοκαρκινώματα και επιθηλιακά νεοπλασμάτα αντίστοιχα, ενώ αυτές του N-*ras* απαντώνται ως επί το πλείστον σε αιματολογικές κακοήθειες. Συχνά ανευρίσκονται στον ίδιο τύπο καρκίνου μεταλλάξεις σε περισσότερα από ένα γονίδια της οικογένειας (π.χ. μεταλλάξεις των H-*ras* και K-*ras* σε καρκινώματα ήπατος και νεφρού, καθώς και των H-*ras* και N-*ras* σε καρκινώματα θυρεοειδούς αδένος). Μεταλλάξεις παρατηρούνται συχνότερα στο K-*ras* από ότι στα υπόλοιπα γονίδια της οικογένειας. Η ερμηνεία πηγάζει από τη θεώρηση του καρκίνου σαν υπερμεταλλακτικού φαινοτύπου, αποτελέσματος πολλαπλών μη ειδικών μεταλλάξεων, διάσπαρτων στο γονιδίωμα. Στατιστικά, επομένως, το πολύ μεγαλύτερο K-*ras* υφίσταται συχνότερα μεταλλαξογένεση.

Σχήμα3.4: Μεταλλάξεις των γονιδίων ras σε καρκίνους διάφορων οργάνων του ανθρώπου.



Πίνακας 3.2: Συχνότητα ενεργοποίησης των γονιδίων ras σε καρκίνους διάφορων οργάνων του ανθρώπου.

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

Στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα οι μεταλλάξεις του K-ras δημιουργούνται σε πρώιμα στάδια, υπό την επίδραση των καρκινογόνων του τσιγάρου και σχετίζονται με πτωχή πρόγνωση (Rodenhuis & Slebos, 1992). Μεταλλάξεις υποκατάστασης του συντηρητικού αμινοξέος κυστεΐνη στη θέση 186 του καρβοξυ-τελικού άκρου της p21 συνεπάγονται αδυναμία μετασχηματισμού κυττάρων, αφού δεν επιτρέπουν στην πρωτεΐνη να λάβει τη λειτουργική της θέση. Η παρατήρηση αυτή απετέλεσε το έναυσμα προσπάθειας αξιοποίησης των γονιδίων ras για γονιδιακή θεραπεία, μέσω αναστολής της μετα-μεταγραφικής φαρνεσυλίωσης (Manne, 1995). Οι μεταλλάξεις του K-ras στο παχύ έντερο συμβαίνουν αρκετά νωρίς κατά τη διαδικασία εξέλιξης του όγκου από αδένωμα σε καρκίνωμα (Vogelstein, 1988), προσφέροντας έτσι ένα διαγνωστικό μέσο πρώιμης ανίχνευσης της νόσου στα κόπρανα ασθενών (Sidransky, 1992).

3.6.2. Υπερέκφραση των ras

Ενεργοποίηση των ογκογονιδίων ras μέσω υπερέκφρασης έχει τεκμηριωθεί στις περισσότερες μορφές καρκίνου στον άνθρωπο (Πίνακας 3.3). Η αυξημένη έκφραση προκύπτει έπειτα από γονιδιακή επέκταση και παραγωγή πολλών αντιγράφων του γονιδίου στο κύτταρο ή από αλλοιώσεις ρυθμιστικών αλληλουχιών που καταλήγουν σε απώλεια της μεταγραφικής ρύθμισης. Στη δεύτερη περίπτωση συγκαταλέγονται μετατοπίσεις περιοχών λόγω εναλλακτικού ματίσματος, ενσωμάτωση ιικών αλληλουχιών στις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου ή αυξημένη πρόσδεση στις τελευταίες μεταλλαγμένου ή υπερπαραγώμενου μεταγραφικού παράγοντα. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η απρόσφορη παραγωγή φυσιολογικής δομικά πρωτεΐνης p21. Το φαινόμενο ανιχνεύεται είτε σε επίπεδο mRNA, με υβριδισμό κατά Northern ή συνδυασμό αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (RT-PCR), είτε σε επίπεδο πρωτεΐνης με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους ή υβριδισμό κατά Western.

Πίνακας 3.3: Υπερέκφραση των γονιδίων *ras* σε καρκίνους διαφόρων οργάνων του ανθρώπου.

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

Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στον καρκίνο του πνεύμονα τα ογκογονίδια *ras* ενεργοποιούνται μέσω υπερέκφρασης σε διαφορετικό ιστολογικό τύπο απ' ότι με μεταλλάξεις (Kurczrock, 1986). Η υπερέκφραση του *ras* στον πνεύμονα αποτελεί όψιμο γεγονός, σε αντίθεση με άλλες θέσεις εντόπισης καρκίνου όπου συμβαίνει πρώιμα (κεφαλή και τράχηλος, ουροδόχος κύστη). Η αυξημένη έκφραση του γονιδίου H-*ras* συσχετίζεται με τα επίπεδα πρόσδεσης στους αντίστοιχους υποδοχείς. Αυτό συμβαίνει με τα ρυθμιστικά στοιχεία της p53 και τους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών και οιστρογόνων σε γυναικολογικούς καρκίνους (Zachos, 1996). Η σύνδεση της p53 με το ρυθμιστικό της στοιχείο συνεπάγεται αυξημένη έκφραση τόσο της p21, όσο και της ίδιας της φυσιολογικής p53 (Zachos & Spandidos, 1998). Στον καρκίνο του μαστού η υπερέκφραση των γονιδίων *ras* αποτελεί πρώιμο ογκογενετικό γεγονός (Miyakis, 1998) και η ανοσοϊστοχημική έκφραση της p21 σχετίζεται με δυσμενή πορεία νόσου

(Watson, 1991), εν αντιθέσει με τη συσχέτιση του φαινομένου με ευνοϊκή πρόγνωση σε περιπτώσεις νευροβλαστώματος (Tanaka, 1991).

Συμπερασματικώς τα ογκογονίδια *ras* εμπλέκονται ενεργά στην ογκογενετική διαδικασία ανάπτυξης των νεοπλασιών, αποκτώντας εξαλλακτικό δυναμικό μέσω αλλοιώσεων της δομής και της έκφρασής τους. Η συμμετοχή τους τόσο στην έναρξη, όσο και στην πορεία της καρκινογένεσης τα καθιστά νευραλγικούς στόχους για γονιδιακή παρέμβαση, με σκοπό την ανακοπή της προϊούσας εξέλιξης και επέκτασης της νεοπλασματικής νόσου προς δυσμενέστερες, προγνωστικά μορφές.

3.7. Ρόλος των γονιδίων *ras* στην ανάπτυξη νεοπλασμάτων οισοφάγου.

Η ανάμιξη των γονιδίων *ras* έχει αναφερθεί σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων νεοπλασμάτων. Η παρουσία μετάλαξης του γονιδίου *K-ras* έχει αναφερθεί συχνά στη βιβλιογραφία, σε διαφορετικά οισοφαγικά νεοπλάσματα.

Οι Sommerer et al, αναγνώρισαν την ύπαρξη *K-ras* μεταλλαγών σε 4 από 19 (21%) δείγματα οισοφάγου Barrett, όπως επίσης και οι Meltzer et al με αντίστοιχο αριθμό δειγμάτων. Αντίστοιχα οι Trautmann B et al., διέκριναν την παρουσία μεταλλαγής *K-ras/codon 12* σε 9 από 412 βιοψίες με οισοφάγο Barrett. (Sommerer 2004)

Υπερέκφραση του γονιδίου *K-ras* σε αδενοκαρκινώματα του οισοφάγου βρέθηκε σε δύο μελέτες σε 40% αντίστοιχα των νεοπλασμάτων. (Bret B. Friday, Galiana C). Η παρουσία μετάλαξης *K-ras* σε δείγματα με οισοφαγικό αδενοκαρκίνωμα, αναφέρεται από τον Arber et al, σε 1 από τα 21 δείγματα (5%), και από τον Lord RV et al σε 30.4% (7 σε 23 δείγματα).

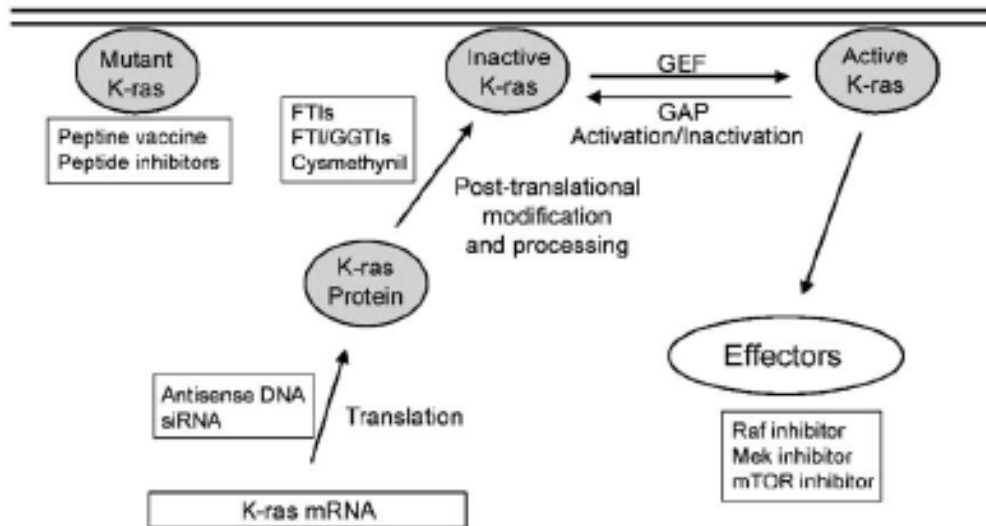
Σε δείγματα ακανθοκυτταρικού νεοπλάσματος κεφαλής τραχήλου (HNSCC), σε δύο μελέτες αναφέρεται η παρουσία μετάλαξης του γονιδίου *K-ras codon 12* σε ποσοστό 6% (5 σε 89 δείγματα), και σε ποσοστό 7.6% (2 σε 26 δείγματα) αντίστοιχα. (Weber 2003, Scully 2000)

Αντίθετα σε μελέτες με ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα οισοφάγου, δεν έχει αναγνωρισθεί η παρουσία μετάλαξης του γονιδίου *K-ras*. Οι Arber et al σε 27, οι Victor et al με επίσης 27 ESCC δείγματα, και οι Hollstein et al με 41 δείγματα, δεν αναγνώρισαν την παρουσία *K-ras* μετάλαξης. (Arber 2000)

3.8. Θεραπευτικές προσεγγίσεις στοχεύοντας το K-ras.

Από τις πρωτεΐνες Ras, η K-ras είναι πιο συνήθης μεταλλαγμένη, και είναι επομένως ένας ελκυστικός στόχος για τη θεραπεία καρκίνου. Η λογική που υποστηρίζει το K-ras, ως στόχο για τη θεραπεία καρκίνου είναι βασισμένη σε διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβάνοντας, τη λειτουργία των κανονικών πρωτεϊνών Ras, τη σημασία των Ras στην ογκογένεση, τις επιπλοκές της αναστολής των Ras στις νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές, και την επικράτηση των μεταλλαγών Ras στους ανθρώπινους όγκους. (Bret B. Friday 2005)

Δεδομένου ότι το μονοπάτι Ras είναι σύνθετο, υπάρχουν πολλά σημεία στα οποία μπορεί να στοχεύσει η θεραπεία με σκοπό να παρεμποδίσει τη σηματοδότηση Ras. Εντούτοις, καμία δοκιμή μέχρι σήμερα δεν έχει παρουσιάσει κάποια αποτελεσματική δραστηριότητα κατά του όγκου χρησιμοποιώντας έναν παράγοντα που στοχεύει συγκεκριμένα το K-ras. Ενώ οι Farnesyltransferase inhibitors, Raf kinase inhibitors, MEKinhibitors και οι mTOR inhibitors όλα παρουσιάζουν ελπιδοφόρο δραστηριότητα κατά του όγκου, καμία από αυτές τις ενώσεις δεν εμποδίζει συγκεκριμένα το K-ras. Ενώ τα antisense oligonucleotides και τα siRNAs μπορούν συγκεκριμένα να εμποδίσουν το K-ras in vitro, η επίδειξη της σημαντικής συγκεκριμένης παρεμπόδισης K-ras στους ανθρώπινους όγκους δεν έχει επιτευχθεί. Ενώ η ανοσολογική προσέγγιση είναι σε θέση να παραγάγει τις συγκεκριμένες άνοσες απαντήσεις στους ασθενείς, δεν έχει υπάρξει κανένας άμεσος συσχετισμός με μια κλινική απάντηση. Τα Peptidomimetics που συσχετίζονται με τα πεπτίδια που περιγράφηκαν από τον Pincus θα μπορούσαν επίσης συγκεκριμένα να εμποδίσουν την ογκογονική σηματοδότηση. (Bret B. Friday 2005)



Σχήμα3.5. Στρατηγικές στοχεύοντας το K-ras για τη θεραπεία καρκίνου. Το K-ras μονοπάτι μπορεί να αποκοπεί σε αρκετά επίπεδα συμπεριλαμβανομένης της μεταφραστικής πρωτεϊνικής έκφρασης, της τροποποίησης και της επεξεργασίας posttranslational, της ενεργοποίησης/της αδρανοποίησης και με την παρεμπόδιση των downstream effectors. FTIs, farnesyltransferase ανασταλτικοί παράγοντες FTIs/GGTIs, συνδυασμός FTIs και geranylgeranyltransferase ανασταλτικοί παράγοντες.

Η εκτενής γνώση που αποκτήθηκε τα τελευταία 20 χρόνια σχετικά με τα μοριακά μοναπάτια των Ras, θα βοηθήσει επίσης να προσδιορίσει τους ασθενείς που είναι πλέον πιθανοί να ωφεληθούν από την κατευθυνόμενη K-ras θεραπεία. Η ανάλυση της ενεργοποίησης και της μεταλλαγής των Ras σε ασθενείς που συμμετέχουν στις κλινικές δοκιμές που εξετάζουν τους ανασταλτικούς παράγοντες Ras, μπορεί να προσδιορίσουν τις ομάδες που είναι πιθανό να αποκριθούν στην Kras κατευθυνόμενη θεραπεία. Οι πρόσθετες πληροφορίες μπορούν να προέλθουν από τις επιδημιολογικές μελέτες που εξετάζουν το ρόλο των Ras στην πρόγνωση, για να προσδιορίσουν τις ομάδες ασθενών των οποίων οι όγκοι εξαρτώνται από το μοριακό μονοπάτι Ras για την επιβίωση και την αύξηση. (Bret B. Friday 2005)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΟ BRAF

4.1. Εισαγωγή.

Τα γονίδια Raf προσδιορίστηκαν αρχικά ως ογκογονίδια σε ρετροϊούς που είναι αιτιολογικοί παράγοντες νεοπλασιών σε ποντίκια και κοτόπουλα. Οι προσπάθειες να προσδιοριστούν οι ενεργοποιημένες μορφές των γονιδίων raf σε ανθρώπινους καρκίνους, δεν παρουσίασαν κανέναν σημαντικό συσχετισμό. Εντούτοις, το κίνητρο για τη μελέτη των πρωτεϊνών raf σε ανθρώπινες νεοπλασίες, ήταν η ανακάλυψη ότι είναι σημαντικοί επιτελείς των πρωτεϊνών Ras, οι ογκογονικές μεταλλάξεις των οποίων ανιχνεύονται σε ένα μεγάλο ποσοστό ανθρώπινων καρκίνων.

Το γονίδιο BRAF (v-raf, murine sarcoma viral oncogene homolog B1, Location 7q34) αποτελεί ένα πρώτο-ογκογονίδιο, μία serine/threonine κινάση που ανήκει στο μοριακό μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK, και το οποίο συμμετέχει στη μεταφορά μιτογόνων σημάτων από την κυτταρική μεμβράνη στον πυρήνα. Οι πρωτεΐνες Raf διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στο μοριακό μονοπάτι Ras/Raf/ MEK/ERK, αναμεταδίδοντας σήματα από τις ενεργοποιημένες πρωτεΐνες Ras μέσω των κινάσεων MAPK/ERK 1/2 (MEK1/2), στις κινάσεις p42/p44 MAP ή ERK1/2, τα βασικά στελέχη αυτού του μοριακού μονοπατιού. Στο μονοπάτι αυτό αναφέρεται μια υπερδραστικότητα στο 30% των νεοπλασιών, με τις μεταλλάξεις του RAS να επισυμβαίνουν στο 15%–30%. Νεότερα δεδομένα αναφέρουν την παρουσία μεταλλάξεων του B-RAF στο 7% των νεοπλασιών, αναγνωρίζοντας το ως ένα ακόμα σημαντικό ογκογονίδιο του μονοπατιού αυτού. Μια πρόσφατη αναφορά έχει καταδείξει τώρα τη παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο BRAF σε 70% των ανθρώπινων κακοήθων μελανωμάτων και σε 15% των ανθρώπινων καρκίνων παχέος εντέρου. (Mercer KE 2003)

4.2. Πρωτεΐνες Raf και νεοπλασματικές νόσοι.

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

Περίπου το 30% των ανθρώπινων νεοπλασιών, περιέχουν μεταλλαγές σε ένα από τα τρία γονίδια Ras τα KRAS, NRAS, και HRAS. Το γονίδιο KRAS αποτελεί το περισσότερο συχνά μεταλλαγμένο μέλος αυτής της οικογένειας, και οι μεταλλαγές του KRAS, αναφέρονται σε 70–90% των αδενοκαρκινωμάτων του πάγκρεατος, περίπου σε 50% των καρκινωμάτων παχέος εντέρου, και σε 25–50% των αδενοκαρκινωμάτων πνευμόνων. Οι συνήθεις μεταλλαγές του γονιδίου KRAS αναφέρονται στα κωδικοδόνια 12, 13, και 61 και όλες αυτές οι μεταλλαγές συνδέονται με αυξημένα επίπεδα Ras. GTP και τη ακόλουθη ενεργοποίηση των επιτελών μοριακών σημάτων. (Mercer KE 2003)

Τα ενεργοποιημένα αλληλόμορφα γονίδια RAS είναι γνωστό ότι δύναται να ενεργοποιήσουν αρκετά μοριακά μονοπάτια, αλλά το περισσότερο αναφερόμενο μέχρι σήμερα είναι το μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK. Το μονοπάτι είναι οργανωμένο ως καταρράκτης στον οποίο οι πρωτεΐνες raf ενεργοποιούνται κατά τρόπο Ras-εξαρτώμενο. Μόλις ενεργοποιηθούν, είναι ικανά να φωσφορυλιώσουν και να ενεργοποιήσουν τις MEK1/2, οι οποίες στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις ERK1/2 (p44/p42 MAPKs). Οι ERKs κατέχουν πολλά υποστρώματα σε διάφορες θέσεις εντός του κυττάρου συμπεριλαμβανομένων παραγόντων μεταγραφής, ριβοσωματικών πρωτεϊνών, ενζύμων και κυτοσκελετικών πρωτεϊνών που μπορούν να επηρεάσουν τη πρόγνωση των κυττάρων. Μια ευρεία σειρά παρεγχυματικών όγκων όπως του πάγκρεατος, του παχέος εντέρου, και του πνεύμονα που περιέχουν ενεργοποιημένες μορφές των αλληλόμορφων γονιδίων RAS, είναι γνωστό ότι εκφράζουν σημαντικά επίπεδα του φωσφορυλιωμένων ERK. Οι πρωτεΐνες Raf βρίσκονται σε ενεργοποιημένη μορφή επίσης σε κύτταρα όγκων που περιέχουν μοριακά μονοπάτια με ενεργούς παράγοντες αύξησης όπως οι καρκίνοι του μαστού. (Mercer KE 2003)

Μια σημαντική διαφορά στη δυνατότητα των τριών διαφορετικών πρωτεϊνών raf να φωσφορυλιώσουν και να ενεργοποιήσουν τις MEK1/2 αναφέρθηκε, δεδομένου ότι το B-Raf αναπτύσσει την υψηλότερη

δραστηριότητα, η οποία είναι 10 φορές υψηλότερη από Raf-1 και 500 φορές υψηλότερη από το A-Raf.

4.2.2. B-Raf μεταλλαγές σε ανθρώπινα νεοπλάσματα.

Μετά από την ανακάλυψη των raf γονιδίων ως ογκογονίδια σε ποντίκια και όρνιθες, πολλές προσπάθειες έγιναν να συνδέσουν τις ενεργές αυτές μεταλλαγές σε ανθρώπινους καρκίνους.

Η υψηλότερη συχνότητα των B-RAF μεταλλαγών είναι στο κακοήθες μελάνωμα (27%–70%), τον θηλώδες καρκίνο θυροειδή (36%–53%), τον καρκίνο παχέος εντέρου (5%–22%), και το ορώδες καρκίνωμα των ωοθηκών (30%), αλλά εμφανίζονται επίσης σε χαμηλή συχνότητα (1%–3%) σε ένα ευρύ φάσμα άλλων καρκίνων όπως γλιώματα, σαρκώματα, καρκίνος πνευμόνων, ωοθηκών, μαστού, στομάχου, ήπατος, κεφαλής και τραχήλου, και καλοήθων μελανοκυτταρικών σπύλων. (Mercer KE 2003)

Η συνηθέστερη μετάλλαξη (80-92%) είναι η μετάθεση T-A στο νουκλεοτίδιο 1799, (val→glu) στη θέση V600E του ενεργού τμήματος (activation segment- exon15) του γονιδίου. Η μετάλλαξη αυτή ονομαζόταν παλαιότερα T1796A, βασιζόμενη στο NCBI GenBank nucleotide sequence NM 004333, το οποίο είχε παραλείψει ένα κωδικοδόνιο (τρία νουκλεοτίδια) στο εξώνιο 1 του γονιδίου. Με την νέα έκδοση NCBI GenBank nucleotide sequence NT 007914 αναγνωρίστηκε η μετάλλαξη στο V600E (T1799A). Η μεταλλαγμένη μορφή V600E έχει 12,5 φορές μεγαλύτερη δραστικότητα κινάσης. Το υπόλοιπο 20% των μεταλλάξεων, αφορά ένα ευρύ πεδίο μεταλλαγών, πάνω από 40 ειδών διαφορετικές μεταλλάξεις, στο εξώνιο 11 (glycines of the G-loop), και στο activation segment in exon 15 (V599D, L596V, L596R). (Davies2002)

Λιγότερο από το 1% των δειγμάτων καρκίνου με μεταλλαγές BRAF έχουν και ταυτόχρονη RAS μεταλλαγή, και από αυτούς τους 1% με μεταλλαγές και στα δύο γονίδια, οι μεταλλαγές BRAF είναι σχεδόν εξ ολοκλήρου μη- V600E. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, προτάθηκε ότι τα γονίδια BRAF και KRAS είναι ισοδύναμα ως προς τις ογκογονικές δράσεις τους. (Mercer KE 2003)

Ως προς την συμμετοχή των BRAF μεταλλάξεων σε ακανθοκυτταρικό νεόπλασμα οισοφάγου (ESCC) δεν υπάρχουν έως σήμερα αναφορές που να υποδηλώνουν την όποια συμμετοχή τους. Σε άλλα οισοφαγικά νεοπλάσματα

όπως τον οισοφάγο Barrett, Οι Sommerer et al, αναγνώρισαν την παρουσία BRAF μεταλλαγών σε 2 από 19 (11%) Barrett νεοπλασμάτα οισοφάγου, και σε 1 από 27 (4%) ενδοεπιθηλιακά υψηλού βαθμού νεοπλασμάτα οισοφάγου (HGIN). Οι Lee et al, ανίχνευσε BRAF μεταλλαγές σε επτά νεοπλασμάτα στομάχου (2.2%), και αντίστοιχα οι Ming Wu et al. ανίχνευσαν BRAF μεταλλαγές σε ένα νεόπλασμα στομάχου (1,6%). Αντίθετα οι Tsuneo Ikenoue et al, και οι Wei. ZHAO et al, δεν αναγνώρισαν καμία μετάλλαξη BRAF σε γαστρικά αδενοκαρκινώματα. Επίσης οι Weber et al, αναγνώρισε BRAF μεταλλαγές σε 3 από 89 (3%) ακανθοκυτταρικά νεοπλασμάτα κεφαλής τραχήλου (HNSCC), και οι Cohen et al, σε 6 από 77 (4.8%) HNSCC.

4.3. Έκφραση των πρωτεϊνών Raf.

Η πρωτεΐνη Raf-1 εκφράζεται συνήθως σε υψηλά επίπεδα στους περισσότερους τύπους ιστών και κυττάρων. Η πρωτεΐνη A-Raf εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε ιστούς που περιλαμβάνουν το ουρογεννητικό σύστημα αλλά επίσης είναι ανιχνεύσιμη και σε πολλούς άλλους ιστούς και κυτταρικές σειρές. Σε αντίθεση, η πρωτεΐνη B-Raf εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο νευρωνικό ιστό, και για αυτόν τον λόγο, οι περισσότερες μελέτες B-Raf έχουν εστιάσει σε κυτταρικές σειρές νευρωνικής προέλευσης. Επιπλέον, η πρωτεΐνη B-Raf είναι επίσης ανιχνεύσιμη στους όρχεις και την σπλήνα. (Mercer KE 2003)

Ενώ η πρωτεΐνη B-Raf είναι μόλις ανιχνεύσιμη σε πολλούς ιστούς, τα αντίγραφα mRNA είναι σαφώς παρόντα. Εντούτοις, η εμπειρία έως τώρα έχει δείξει ότι ακόμα κι αν η πρωτεΐνη εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα, μπορεί να αναπτύξει σημαντική MEK κινάσεων δραστηριότητα. Η συγκεκριμένη περίπτωση αναφέρεται σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικών (MEFs). Η πρωτεΐνη B-Raf είναι μόλις ανιχνεύσιμη σε αυτά τα κύτταρα, ενώ η Raf-1 και η A-Raf εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα. Παρά αυτό, η B-Raf έχει ένα αρκετά υψηλότερο επίπεδο βιοχημικής δραστηριότητας από τις άλλες δύο πρωτεΐνες Raf, και εμφανίζεται να είναι ο σημαντικότερος παράγοντας ενεργοποίησης των MEK/ERK, ακολουθώντας την υποκίνηση ενεργοποίησης των παράγοντων αύξησης. Όσον αφορά τα μελανοκύτταρα και το κακοήθες μελάνωμα, δεν είναι πλήρως γνωστό εάν η B-Raf εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε αυτά τα κύτταρα ή όχι και δεν είναι επίσης γνωστό ποιο

συγκεκριμένη ισομορφή της B-Raf εκφράζεται. Είναι γνωστό ότι η B-Raf αναπτύσσει δραστηριότητα σε μελανοκύτταρα και είναι σημαντικός ενεργοποιητής MEK/ERK σε αυτά τα κύτταρα. (Mercer KE 2003)

4.4. Δομή των πρωτεϊνών Raf.

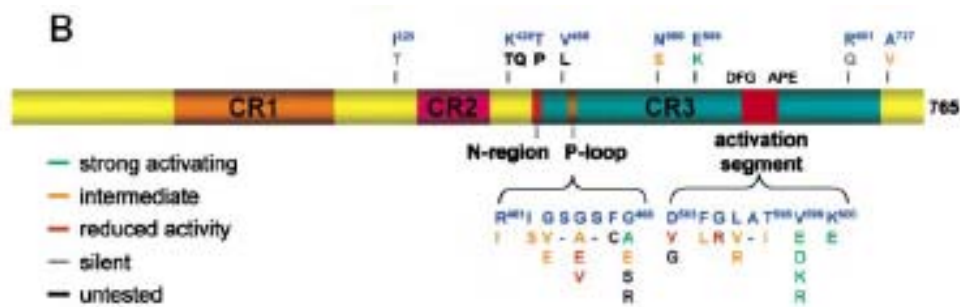
Και οι τρεις πρωτεΐνες raf μοιράζονται τρεις συντηρημένες περιοχές (CR1, CR2 και CR3), που ενσωματώνονται, με τις μεταβλητές αλληλουχίες που διαφέρουν πολύ μεταξύ των τριών raf πρωτεϊνών. Στη πρωτεΐνη Raf-1, η περιοχή CR1 καλύπτει τα τμήματα 61–194 και περιέχει δύο περιοχές που δεσμεύουν σε Ras-GTP, η δεσμευτική περιοχή Ras (Ras binding domain, RBD) που εκτείνεται στα τμήματα 51–131 της Raf-1 και η cysteine-rich domain (CRD) που εκτείνεται στα τμήματα 139–184 της Raf-1. Η CR2 καλύπτει τα τμήματα 254–269 της Raf-1 και είναι πλούσια σε υπολείμματα σερίνης και θρεονίνης, μερικά από τα οποία είναι ρυθμιστικές περιοχές φωσφορυλίωσης. Η CR3 καλύπτει τα τμήματα 335–627 της Raf-1 και περιέχει την περιοχή κινάσεων που είναι η πιο ομόλογη περιοχή μεταξύ των πρωτεϊνών raf. (Mercer KE 2003)

Οι περιοχές των κινάσεων είναι χωρισμένες στα N-terminal και C-terminal άκρα και η περιοχή συνδέσεων ATP βρίσκεται στο μεσοδιάστημα των δύο άκρων. Το N-terminal άκρο περιέχει την αγκύλη γλυκίνης που είναι σημαντική για τον εντοπισμό των φωσφορικών σημείων του ATP, ενώ το C-terminal άκρο περιέχει την αλληλουχία αναγνώρισης των υποστρωμάτων. Ένα βασικό στοιχείο μέσα σε αυτόν το άκρο είναι το τμήμα ενεργοποίησης (activation segment), τη περιοχή που εκτείνεται τις συντηρημένες αλληλουχίες DFG και APE, το οποίο συμμετέχει στη δέσμευση ενός χηλικού ATP παράγοντα, όπου η φωσφορυλίωση της θρεονίνης 598 και της σερίνης 601 μέσα σε αυτό το τμήμα έχει αποδειχθεί ότι δύναται να διαδραματίσει έναν βασικό ρόλο στην ενεργοποίηση B-Raf.

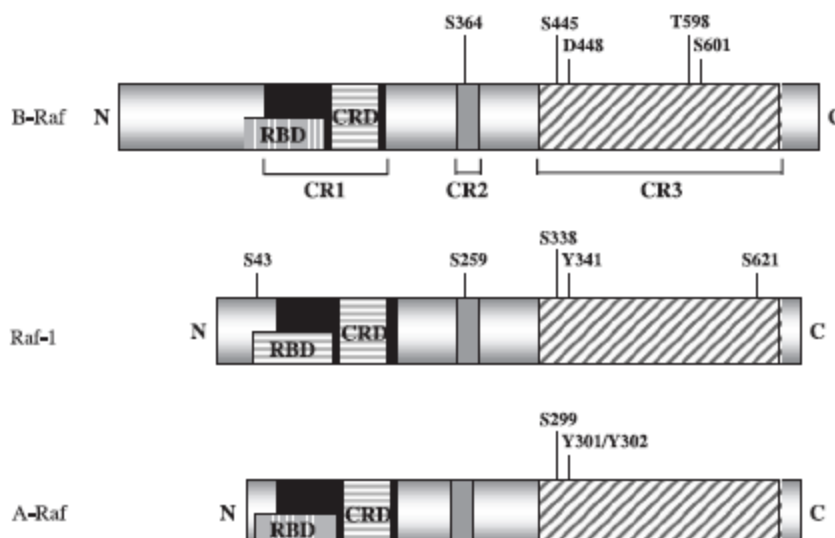
Η πρωτεΐνη B-Raf (Αμινοξέα: 766. Μοριακό βάρος: 84436 Daltons) έχει ορισμένες δομικές διαφορές από τις άλλες δύο Raf πρωτεΐνες. Στις συντηρημένες περιοχές, το B-Raf έχει μερικές διαφορές αμινοξέος. Επιπλέον, όπως αναφέρεται ανωτέρω, η μεταβλητή περιοχή μεταξύ CR2 και CR3 υποβάλλεται σε εναλλακτικό μάτισμα από τα εξόνια 8b και 10a. Αυτό το διαφορετικό μάτισμα, δύναται να έχει επιπτώσεις στη δυνατότητα του B-

Raf να ενεργοποιήσει τις MEK, δεδομένου ότι έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία του εξονίου 10a στο B-Raf αυξάνει τη συγγένεια και τη βασική δραστηριότητα κινάσης προς τις MEK, ενώ η παρουσία εξονίου 8b έχει την αντίθετη επίδραση. Τα εξόνια 1 και 2 είναι παρόντα στις πρωτεΐνες B-Raf με το μακρύ N-τελικό άκρο, αλλά όχι και στις πρωτεΐνες με κοντό N-τελικό άκρο. Αυτά τα εξόνια κωδικοποιούν 115 υπολείμματα αμινοξέος πλούσια σε γλυκίνη, οι λειτουργίες των οποίων δεν είναι προς το παρόν γνωστές, και δεν έχουν καμία ομολογία στις ακολουθίες στο A-Raf ή Raf-1.

Σχήμα 4.1: Δομή της περιοχής κινάσης του WT_B-RAF. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του B-RAF, που παρουσιάζει τις λειτουργικές περιοχές, και τη θέση των 32 μεταλλάξεων παρατηρηθεισών σε νεοπλάσματα. Οι αντικαταστάσεις αμινοξέος υποδηλώνεται με διαφορετικό χρώμα σύμφωνα με την κατηγορία δραστηριότητάς τους. (P. T.C. Wan 2006)

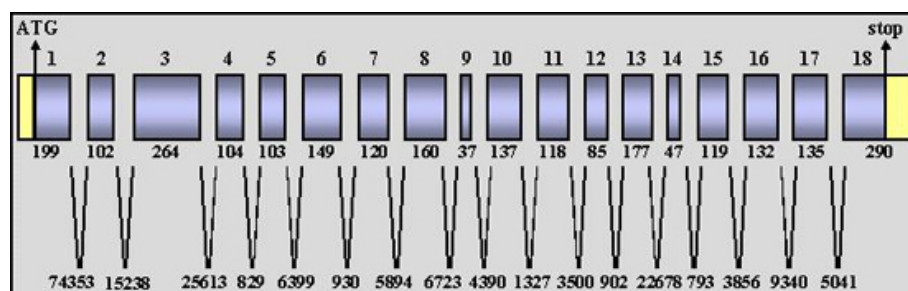


Σχήμα 4.2: Δομές περιοχών των τριών μελών της οικογένειας raf, που δείχνουν τις θέσεις των σημαντικών περιοχών φωσφορυλίωσης που συμμετέχουν στον μηχανισμό της ενεργοποίησης. RBD (Ras binding domain), CRD (Cysteine-rich domain), KD (Kinase domain). (Mercer KE 2003)



Σχήμα 4.3: Διάγραμμα του BRAF γονιδίου.

Τα εξόνια αντιπροσωπεύονται από κουτιά, με τους αριθμούς εξονίων στην κορυφή και τον αριθμό ζευγαριών βάσεων στο κατώτατο σημείο. Τα ιντρόνια αντιπροσωπεύονται από τις μαύρες κολώνες και τον αριθμό ζευγαριών βάσεων που υποδεικνύονται. Τα βέλη παρουσιάζουν το ATG και το κωδικοδόνιο stop αντίστοιχα. Το γονίδιο BRAF αποτελείται από 18 εξόνια που εκτείνονται σε μια περιοχή 190284 bp. Το μεταγραφόμενο mRNA έχει 2478 bp. (Domingo E)



4.5. Ρύθμιση της Raf δραστηριότητας κινάσης.

4.5.1. Σύνδεση Ras

Το Ras αλληλεπιδρά συγκεκριμένα με δύο περιοχές στην αμινο τελική περιοχή της Raf-1; η δεσμευτική περιοχή Ras (RBD; αμινοξέα 51–131) και η πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή (CRD; αμινοξέα 139–184) που διαμορφώνουν μια δομή δαχτυλίου από ψευδάργυρου. Η ισχυρότερη αλληλεπίδραση είναι μεταξύ Ras-GTP και του RBD της Raf-1 και βρέθηκε να είναι σημαντική για την ενεργοποίηση της Raf-1. Οι τέσσερις ισομορφές του Ras, οι H-Ras, N-Ras, K-Ras 4A και K-Ras 4B είναι όλες ικανές να αλληλεπιδράσουν με τις πρωτεΐνες Raf, αν και η K-Ras εμφανίζεται να είναι αποτελεσματικότερη στη σύνδεση Raf-1 από την N-Ras, η οποία είναι αποτελεσματικότερη από την Ha-Ras. Οι πρωτεΐνες Ras βρίσκονται στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης όπου χρησιμεύουν ως οι δυαδικοί μοριακοί διακόπτες. Η αλληλεπίδραση Ras με Raf-1 μέσω της RBD είναι ανεπαρκής να υποκινήσει Raf-1 δραστηριότητα κινάσης αλλά χρησιμεύει να μεταφέρει τη Raf-1 στη κυτταροπλασματική μεμβράνη όπου ενεργοποιείται με την φωσφορυλίωση (Mercer KE 2003)

Η ρύθμιση της B-Raf από τις Ras έχει μελετηθεί λιγότερο έναντι του Raf-1. Τα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν στη διεπαφή Ras/ Raf είναι ίδια για

τη B-Raf και Raf-1. Επίσης έχει αναφερθεί ότι η ένωση Ras με τη B-Raf οδηγεί στη δυνατότητα διακίνησης της B-Raf στη κυτταροπλασματική μεμβράνη, που οδηγεί στην ενεργοποίηση B-Raf. (Mercer KE 2003)

4.5.2. Φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση.

Άμφω η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση ως γεγονότα απαιτούνται για την ενεργοποίηση της Raf. Ένα πρότυπο για την Raf-1 ενεργοποίηση έχει προταθεί πρόσφατα από Dhillon et al. Σε μη διεγερμένα κύτταρα, η Raf-1 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, και φωσφορυλίωεται σε δύο υπολείμματα σερίνης, τη σερίνη 259 και σερίνη 621 που δεσμεύουν τις πρωτεΐνες 14-3-3 που διατηρούν τη Raf-1 σε μια ανενεργό διαμόρφωση. Σε διεγερμένα, υποκινημένα κύτταρα, η Ras.GTP μετατοπίζει τις πρωτεΐνες 14-3-3 από τη σερίνη 259, και η Raf-1 μεταφέρεται στη κυτταροπλασματική μεμβράνη όπου αποφωσφορυλίωεται στη σερίνη 259 από τις φωσφατάσες όπως την PP2A. (Mercer KE 2003)

Δεν είναι δυνατό να επεκταθεί αυτό το πρότυπο πλήρως στη B-Raf, διότι στις βασικές διαφορές είναι τα πρότυπα φωσφορυλίωσης. Στην ισοδύναμη θέση τυροσίνης 340 και 341 της Raf-1, υπάρχουν υπολείμματα ασπαρτικού οξέος στις θέσεις αμινιξέων 447 και 448 στη B-Raf. Η θρεονίνη 598 και η σερίνη 601, που βρίσκονται μέσα στο τμήμα ενεργοποίησης, έχουν προσδιοριστεί ως πρόσθετες σημαντικές περιοχές φωσφορυλίωσης της B-Raf στη κυτταρική μεμβράνη σε απάντηση του ογκογονιδίου Ras. Η αρμόδια κινάση για αυτά τα γεγονότα φωσφορυλίωσης δεν έχει προσδιοριστεί.

4.5.3. Οι πρωτεΐνες Raf ως συστατικά σύμπλοκων μοριακών μονοπατιών.

Υπάρχουν αρκετά στοιχεία ότι τα συστατικά του μοριακού μονοπατιού Raf/ MEK/ERK, οργανώνονται ως σύμπλοκα πολυπρωτεϊνικά μονοπάτια με τις δομικές πρωτεΐνες (scaffolding proteins). Διάφορες δομικές πρωτεΐνες έχουν προσδιοριστεί για αυτό το μονοπάτι, καλύτερα αναγνωρισμένες είναι οι 14-3-3, MP1 (MEK-1 Partner 1), RKIP (Raf-1 kinase Inhibitory Protein) και η KSR (Kinase suppressor of Ras). Ο ρόλος των πρωτεϊνών 14-3-3 στην ενεργοποίηση των Raf αναφέρεται ανωτέρω. Οι MP-1 επιλεκτικά αλληλεπιδρούν με τις ERK-1 και MEK-1, αλλά όχι με τις Raf-1, στην κυτταροπλασματική επιφάνεια των ενδοσωμάτων και των λυσοσωμάτων. Η RKIP δεσμεύει τις Raf-1 και MEK. Διάφορες προηγούμενες μελέτες έχουν

δείξει ότι η KSR αλληλεπιδρά με MEK, ERK και raf. Δεν είναι προς το παρόν γνωστό εάν η B-Raf αποτελεί ομοίως μέρος των σύμπλοκων πολυπρωτεϊνικών μονοπατιών με οποιαδήποτε από τα ανωτέρω μόρια.

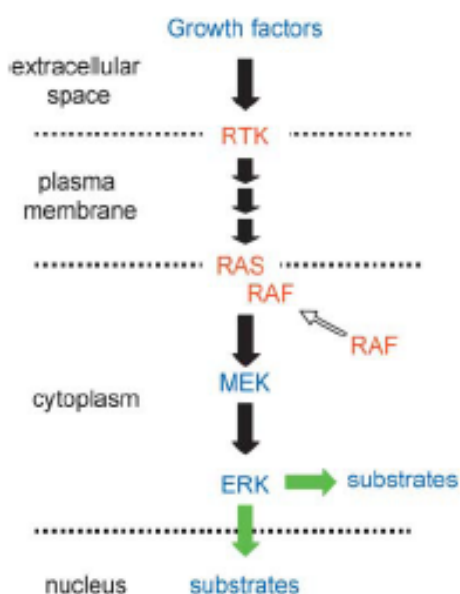
4.6. Ενεργοποίηση των MEK/ERK από την πρωτεΐνη Raf.

Οι MEK1/2 αποτελούν τα μοναδικά αποδεκτά υποστρώματα για την ενεργοποίηση των τριών πρωτεϊνών Raf. Οι ERK1/2 ενεργοποιούνται μέσω φωσφορυλίωσης από υπολείματα τυροσίνης και θρονίνης στο σημείο TEY του τμήματος ενεργοποίησης, οι οποίες καταλύονται από τις MEK1/2. Οι Raf proteins χαρακτηρίζονται ως οι καλύτεροι MEK1/2 ενεργοποιητές, επίσης και οι τρεις ισομορφές Raf δύναται να φωσφορυλιώσουν και να ενεργοποιήσουν MEK1 (44 kDa) και MEK2 (45 kDa) in vitro. Η ενεργοποίηση της MEK1 γίνεται με φωσφορυλίωση δύο υπολειμάτων σερίνης στα σημεία 218 και 222 του τμήματος ενεργοποίησης. Τα σημεία S218 and S222 επίσης αναφέρονται ως μείζονα σημεία φωσφορυλίωσης των MEK1 από τις B-Raf. (Mercer KE 2003)

Ένα σημαντικό στοιχείο στις μελέτες της ενεργοποίησης των MEK/ERK από τις πρωτεΐνες Raf, είναι ότι η B-Raf έχει μεγαλύτερη δυνατότητα ενεργοποίησης αυτών των επιτελών κινασών, από τις άλλες δύο πρωτεΐνες Raf. Αυτό επισυμβαίνει σε πολλούς τύπους ιστών όπως οι ινοβλάστες, ο νευρικός ιστός, και τα λεμφοκύτταρα. Όταν υπερεκφράζονται σε κυτταρικές ιστοκαλιέργειες, και οι τρεις πρωτεΐνες Raf δύναται να φωσφορυλιώσουν και να ενεργοποιήσουν τις MEK, αλλά η B-Raf έχει 50 φορές περισσότερη δυνατότητα φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης έναντι της Raf-1. Η μεταλλαγμένη μορφή της B-Raf V600E, έχει 12,5 φορές υψηλότερη δραστηριότητα κινάσης έναντι του φυσιολογικού γονιδίου wild-type Braf. Η μεταλλαγμένη μορφή της B-Raf V600E επίσης διεγείρει την φωσφορυλίωση ενδογενών ERK, και εισάγει σε διαφοροποίηση τη κυτταροκαλιέργεια NIH3T3. (Mercer KE 2003)

Σχήμα 4.4: Το μοριακό μονοπάτι RAS-ERK.

Αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν τους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (RTKs) οι οποίοι προκαλούν την ενεργοποίηση του RAS . Το RAS είναι αδρανής συνδεδεμένο με το GDP, αλλά όταν συνδεθεί με το GTP μετατρέπεται σε ενεργό μορφή που προκαλεί φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του BRAF και κατόπιν ενεργοποίηση του ανωτέρου μοριακού μονοπατιού, με φωσφορυλίωση των MEK , και μετέπειτα των ERK . Οι ERK εισέρχονται στον πυρήνα και φωσφορυλίωσαν μεταγραφικούς παράγοντες. Οι RTKs, RAS, και RAF είναι χρωματισμένες με κόκκινο για να δείχθει η συμμετοχή τους σε καρκίνο. (Mathew J. Garnett)



4.7. Αντικαρκινική θεραπεία στοχεύοντας τις πρωτεΐνες Raf.

Η πρωτεΐνη B-Raf αποτελεί ιδανικό στόχο ανάπτυξης νέων θεραπειών, καθώς η μεταλλαγμένη μορφή του γονίδιου B-Raf βρίσκεται σε υψηλό ποσοστό ανθρώπινων νεοπλασιών. Νεότερα δεδομένα αναφέρουν την παρουσία μεταλλάξεων του B-RAF στο 7% των νεοπλασιών.

Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει στο παρελθόν για να αναπτύξουν αντινεοπλασματικούς παράγοντες που στοχεύουν τις πρωτεΐνες Raf. Εντούτοις, οι περισσότεροι από αυτούς τους παράγοντες έχουν αναπτυχθεί ενάντια στη raf-1, παρά στη β-Raf. Τα φάρμακα που στοχεύουν τη raf-1 περιλαμβάνουν τις αντιαγγελιοφόρες ενώσεις (antisense compounds), τους ανασταλτικούς παράγοντες κινάσεων και τα επικρατούντα DNA συμπλέγματα

(DNA dominant interfering DNA constructs). Μερικές από αυτές τις ενώσεις έχουν εισαχθεί σε κλινικές δοκιμές. Όπως για παράδειγμα ο ανασταλτικός παράγοντας κινάσης raf-1 που αναπτύσσεται από τις Bayer και Onyx, Bay 439006, και το 20 βάσεων φωσφορικών ολογονουκλεοτίδιων συγγενές του raf-1 mRNA, ISIS 5132, είναι και τα δύο αυτήν την περίοδο στη φάση I κλινικών δοκιμών κατά του μεταστατικού καρκίνου, έχοντας αποδείξει αποτελεσματικότητα σε κυτταρικές και ζωικές δοκιμές. Οι Hood et al. πρόσφατα περιέγραψαν μια συναρπαστική νέα μέθοδο για να στοχοποιούν συγκεκριμένα τα καρκινικά κύτταρα με τα γονίδια αντι-raf. Ένα κατιονικό λιπίδιο νανοσωματίδιο, που συνδέθηκε με ένα σύνδεσμο ιντεγκρίνης ανη3, αποδείχθηκε ότι δύναται να μεταφέρει και να παραδώσει τα γονίδια σε καρκινικά νεοαγγεία ποντικών που προήλθαν μετά την έγχυση σε αυτά κύτταρα κακοήθους μελανώματος, επάγωντας την απόπτωση και την συρίκνωση του όγκου. Επίσης αναφέρεται ότι είναι δυνατό ότι όλοι οι άλλοι αντικαρκινικοί παράγοντες που αναπτύχθηκαν ενάντια στη raf-1 ενεργούν με παρόμοιο τρόπο. (Kathryn E. Mercer 2003)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ

ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ P53

5.1 Εισαγωγή

Το γονίδιο της p53 αποτελεί ένα από τα πιο συχνά επηρεασμένα γονίδια στην καρκινογένεση του ανθρώπου (Levine, 1991). Ανακαλύφθηκε επειδή κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που συμπλέκεται με την μεγάλη T πρωτεΐνη εξαλλαγής του ογκογόνου ιού SV40. Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη p53 συνδέεται και με τις πρωτεΐνες εξαλλαγής άλλων DNA ογκογόνων ιών, την E1B του αδενοϊού και την E6 του HPV-16 και 18 (Sarnow, 1982). Ο σχηματισμός συμπλέγματος με το μεγάλο T αντιγόνο του SV40 σταθεροποιεί της p53 αυξάνοντας το χρόνο ημιζωής της από 6-20 λεπτά σε αρκετές ώρες (Oren, 1981). Αυτή η σταθεροποίηση είναι χαρακτηριστική της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53 στα κύτταρα των όγκων (Reich, 1983).

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

θα μπορούσε να καταστείλει την εξαλλαγή όπως π.χ σε πειράματα συνεργασίας ογκογονιδίων όπως του *ras* και του φυσιολογικού *p53*. Διάφοροι όγκοι του ανθρώπου έχει δείχθει ότι περιέχουν μεταλλαγμένες πρωτείνες *p53* αναλύοντας τις αλληλουχίες των βάσεων του cDNA και χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανοσοκυτταροχημείας.

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

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

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

5.2 Δομή και οργάνωση του γονιδίου *p53*

Το γονίδιο p53 του ανθρώπου εντοπίζεται στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 17, στη θέση 17p13.1 (Benchimol, 1985). Το γονίδιο της p53 έχει βρεθεί ότι περιορίζεται στα σπονδυλωτά. Η οργάνωση του γονιδιώματος των γονιδίων p53 διαφορετικών ειδών δείχνει μια σημαντική ομοιότητα μεταξύ τους. Τα γονίδια περιέχουν 11 εξώνια στα οποία παρεμβάλλονται 10 εσώνια. Σε όλες τις περιπτώσεις το εξώνιο 1 του γονιδίου p53 είναι ένα εξώνιο που δεν μεταφράζεται. Τα εξώνια 2,4,5,7 και 8 κωδικοποιούν για 5 ομάδες αμινοξικών αλληλουχιών που είναι ιδιαίτερα συντηρητικές εξελικτικά (Σχήμα 5.1).

Σχήμα 5.1: Γονιδιακή οργάνωση του γονιδίου p53. Τα σύμβολα I μέχρι V αντιστοιχούν στις εξελικτικές συντηρημένες περιοχές του γονιδίου που εντοπίζονται στα διάφορα εξώνια.



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

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

Η έκφραση του γονιδίου της p53 του ανθρώπου ελέγχεται από δυο υποκινητές. Ο ένας, που ονομάζεται P1, εντοπίζεται 100-250 ζευγάρια βάσεων πριν από το πρώτο εξώνιο που δεν μεταφράζεται και δεν φέρει καμιά από τις αλληλουχίες που βρίσκονται στους περισσότερους από τους υποκινητές των ευκαρυωτικών οργανισμών όπως το CAAT box, το TATA BOX και αλληλουχίες πλούσιες σε G/C. Ένας δεύτερος υποκινητής, P2,

εντοπίζεται μέσα στο πρώτο εσώνιο (Reisman, 1988). Έχει δειχθεί ότι μια διαφορική ρύθμιση των δυο υποκινητών φαίνεται ότι είναι σημαντική για την έκφραση του mRNA του p53 κατά τη διάρκεια της τελικής διαφοροποίησης (Reisman, 1989).

Σε μια προσπάθεια να αναγνωριστούν λειτουργικά σημαντικά στοιχεία του γονιδίου p53 που παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική του ρύθμιση βρέθηκε ότι ο υποκινητής περιέχει μια θέση πρόσδεσης του πυρηνικού παράγοντα 1 (NF1) και μια δεύτερη θέση πρόσδεσης ενός παράγοντα που επάγεται από τον ορό ο οποίος σχετίζεται με τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1 (Ginsberg, 1990). Πάντως για την έκφραση των φυσιολογικών επιπέδων του mRNA του p53 δεν απαιτείται μόνο η ακριβής ισορροπία μεταξύ των δυο υποκινητών του γονιδίου. Τα εσώνια του γονιδίου p53 είναι απολύτως απαραίτητα για τα φυσιολογικά επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου p53. Η παρουσία του τέταρτου εσωνίου έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνει την αποδοτικότητα της έκφρασης του γονιδίου p53 συγκριτικά με ένα χωρίς εσώνια cDNA p53 γονίδιο. Όπως έχει δειχθεί σε διαγονιδιακά ποντίκια αυτή η δραστηριότητα ενισχυτή του τέταρτου εσωνίου φαίνεται ότι έχει ειδίκευση ανάλογα με τον ιστό (Lozano, 1991). Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι μόνο αυτά τα γονίδια p53 που έχουν το τέταρτο εσώνιο στη σωστή του θέση οδηγούν σε αυξημένη έκφραση του γονιδίου δείχνοντας ότι το αποτέλεσμα του τέταρτου εσωνίου εξαρτάται από τη θέση του. Πολύ πρόσφατα βρέθηκε ότι σε ένα τμήμα του τέταρτου εσωνίου δεσμεύονται με μεγάλη εξειδίκευση πρωτεΐνες και αυτή η δέσμευση φαίνεται ότι έχει λειτουργική σημασία (Beenken, 1991).

Ανάλυση με Northern blot έδειξε ότι το mRNA του γονιδίου p53 διαφορετικών ειδών είναι περίπου 2-3 kb. Η 3' μη μεταφραζόμενη ακολουθία αυτών των mRNA κυμαίνεται από 800bp για το p53 του ποντικού μέχρι 1800bp για τον *X.laenvis*. Η ακολουθία ATTTA, πλούσια σε A/T που βρίσκεται στην 3' μη κωδικοποιούσα περιοχή πολλών γονιδίων και παίζει σημαντικό ρόλο στην σταθερότητα των mRNA έχει βρεθεί στο mRNA του p53 του αρουραίου, του ποντικίου και του *X.laenvis*, αλλά στην περίπτωση των mRNA των γονιδίων p53 δεν έχει βρεθεί ότι παίζει ρόλο στην σταθερότητα αυτών των mRNA. Επιπρόσθετα πρέπει να αναφερθεί ότι το mRNA του γονιδίου p53 του ανθρώπου φέρει στο 3' άκρο του μια αλληλουχία Alu. Δεν έχουν ανακοινωθεί πολλές μελέτες πάνω στην σταθερότητα των mRNA των

γονιδίων p53. Έχει όμως δειχθεί ότι τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου p53 είναι αυξημένα σε μερικούς όγκους, σε μη διαφοροποιημένα αρχέγονα κύτταρα και σε ερυθρολευχαιμικά κύτταρα, κατά τη διάρκεια της οργανογένεσης του ποντικού καθώς και στην ανάπτυξη του εμβρύου της όρνιθας. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν μια συσχέτιση ανάμεσα των υψηλών επιπέδων της έκφρασης του γονιδίου p53 και του μη διαφοροποιημένου σταδίου του κυττάρου.

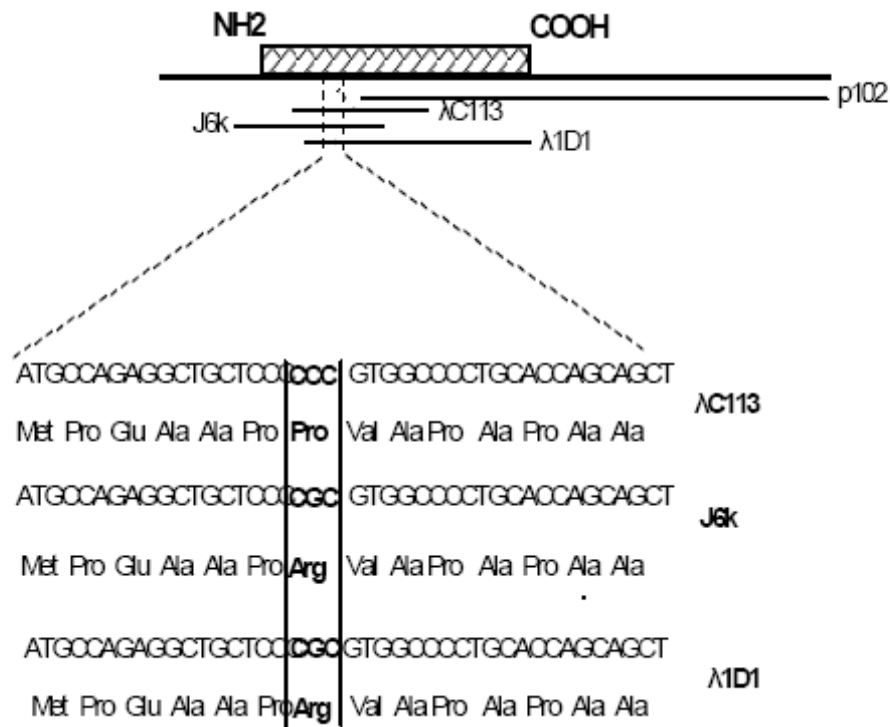
Η έκφραση του γονιδίου p53 φαίνεται ότι ρυθμίζεται στο μεταγραφικό ή μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Σε μη μετασχηματισμένα κύτταρα που έχει ανασταλεί η ανάπτυξη τους τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου p53 είναι πολύ χαμηλά, ενώ διέγερση τέτοιων κυττάρων με ορό οδηγεί σε σημαντική αύξηση του mRNA του p53 (Reich, 1984). Σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται συνεχώς τα επίπεδα του mRNA του p53 δεν διαφέρουν σημαντικά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Coulter, 1985), ενώ σε έναν αριθμό κυττάρων που διαφοροποιούνται τα επίπεδα του mRNA του p53 μειώνονται (Reich, 1983). Αυτή η μείωση των επιπέδων του mRNA του γονιδίου p53 μπορεί, τουλάχιστον εν μέρει, να οφείλεται σε μετα-μεταφραστική ρύθμιση (Dony, 1985). Αλληλουχίες DNA που βρίσκονται πριν την 5' επικαλυπτόμενη περιοχή του mRNA έχουν δραστηριότητα υποκινητή σε δοκιμή CAT. Η δραστηριότητα αυτή εξαφανίζεται όταν ενσωματωθούν πριν από το γονίδιο CAT αλληλουχίες που βρίσκονται πολύ πριν από αυτόν τον υποκινητή του γονιδίου p53. Το γεγονός αυτό δείχνει έναν πολύ πιο περίπλοκο έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου p53 (Bienz-Tadmor, 1985).

5.3 Δομικοί πολυμορφισμοί στο αμινοξύ 72 της ανθρώπινης p53

Στην πορεία της μελέτης της πρωταρχικής δομής για την ανθρώπινη p53 έγιναν πειράματα κλωνοποίησης mRNA σε cDNA της p53 από διαφορετικά είδη οργανισμών. Τα διαφορετικά είδη cDNA της p53 μελετήθηκαν με ανάλυση αλληλουχίας και πειράματα έκφρασης. Στην διάρκεια αυτών των πειραμάτων βρέθηκε μια διαφοροποίηση μιας μονάχα βάσης σε μια περιοχή της p53 σε αυτούς τους κλώνους που δεν ήταν συντηρημένη. Η αλλαγή αυτή αφορούσε ένα αμινοξύ αργινίνης σε μια μορφή p53 σε φυσιολογικούς ινοβλάστες ανθρώπων. Στο αμινοξύ αυτό εμφανιζόταν αντικατάσταση του από προλίνη σε κύτταρα ανθρώπινων ινοβλαστών που

έχουν μετασχηματιστεί με SV40 (SV80). Ο πρώτος ανθρώπινος cDNA κλώνος της p53 που απομονώθηκε (p102) προερχόταν από ανθρώπινους ινοβλάστες που έχουν μετασχηματιστεί με SV40 (GM637 κύτταρα) και δεν διέθετε τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (Matlashewski, 1984). Μετά από αρκετές σειρές πειραμάτων (Harlow 1985, Lamb 1986, Zakut-Houri 1985) βρέθηκε ότι στο πλαίσιο ανάγνωσης του αμινοξέος 72 η βάση G του νουκλεοτιδίου 347 οδηγούσε στην σύνθεση ενός κωδικονίου αργινίνης (CGC) (Σχήμα 5.2).

Μελέτες σε cDNA κλώνους της p53 από την κυτταρική σειρά GM637 μετασχηματισμένων ανθρώπινων ινοβλαστών (Zakut-Houri, 1985) και από την κυτταρική σειρά A431 από καρκίνωμα αιδοίου (Harlow, 1985) ανέφεραν την ύπαρξη ενός κωδικονίου προλίνης (CCC) για το αμινοξύ 72. Υπάρχει συνεπώς μια σημαντική ετερογένεια στο κωδικόνιο που είναι υπεύθυνο για το αμινοξύ 72 και μάλιστα δεν υπάρχει άλλο κωδικόνιο με παρόμοια χαρακτηριστικά ετερογένειας. Σε πηκτώματα η p53 με την μορφή της Arg-72 διαχωριζόταν πιο γρήγορα από αυτή με την μορφή της Pro-72 ενώ ένα μίγμα των δυο μορφών εμφανίζεται ως διπλέτα ζωνών. Με τη βοήθεια άλλων πειραματικών προσεγγίσεων (Banks 1986, Okayama 1985) οδηγούμαστε στην παρατήρηση ότι η p53 με την Pro-72 είναι δομικά διαφορετική από την p53 με την Arg-72 και αυτό αποτυπώνεται ξεκάθαρα στο διαφοροποιημένο ηλεκτροφορητικό κινητικό πρότυπο. Μετά από αναλύσεις γενωμικών κλώνων που προέρχονται από DNA φυσιολογικού εμβρυϊκού ήπατος, βρέθηκε ότι η διαφοροποίηση στην θέση 72 της p53 οφείλεται σε πολυμορφισμό και όχι σε μεταλλαγή στην θέση αυτή. Τα φυσιολογικά DNA μπορεί στη θέση αυτή να περιέχουν αργινίνη, προλίνη και κυστεΐνη ενώ μπορεί να υπάρχουν και επιπλέον αλλήλια.



Σχήμα 5.2: Σχηματικό διάγραμμα των cDNA ανθρωπίνων p53. Οι σκούρες γραμμές αντιπροσωπεύουν τους διαφορετικούς κλώνους cDNA της p53. Η p102 προκύπτει από μια cDNA βιβλιοθήκη που δημιουργήθηκε από την κυτταρική σειρά GM637 ανθρωπίνων ινοβλαστών που έχουν μετασχηματιστεί με τον SV40. Η λC113 προκύπτει από την κυτταρική σειρά GM637 ανθρωπίνων ινοβλαστών που έχουν μετασχηματιστεί με τον SV80. Η p53J6K προκύπτει από την κυτταρική σειρά J6 ανθρωπίνων T-κυττάρων και η λ1D1 προκύπτει από φυσιολογικούς ανθρώπινους ινοβλάστες δέρματος. Στο σχήμα φαίνεται η ανάλυση των κλώνων cDNA στην περιοχή που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 66 ως 79.

5.4 Ρόλος του πολυμορφισμού της p53 στην ανάπτυξη HPV σχετιζόμενων ακανθοκυτταρικών καρκίνων οισοφάγου.

Η ανάπτυξη του ακανθοκυτταρικού καρκίνου οισοφάγου σχετίζεται με την παρουσία συγκεκριμένων τύπων ιών θηλώματος, όπως ο HPV-16 και ο HPV-18. Η E7 πρωτεΐνη των τύπων αυτών δένεται και απενεργοποιεί την κυτταρική ογκο-κατασταλτική πρωτεΐνη Rb, ενώ η E6 πρωτεΐνη δένεται στην κυτταρική ογκο-κατασταλτική πρωτεΐνη p53 και κατευθύνει την αποικοδόμηση της μέσω του μονοπατιού της ουμπικουΐνης.

Η μεταλλαγή p53 είναι η πιό κοινή γενετική αλλαγή σε ανθρώπινους καρκίνους, και είναι περισσότερο συχνά μελετημένη γενετική αλλαγή σε ESCC, οι οποίοι κυμαίνεται από 10–85%. Σε πολλές από τις αυτές τις δημοσιευμένες σειρές, η επίπτωση της μεταλλαγής p53 σε ESCC είναι περίπου 50%. Η συχνότητα των μεταλλαγών εμφανίζεται να είναι υψηλότερη στις υψηλές περιοχές επίπτωσης. Η πλειοψηφία των μεταλλαγών p53 σε ESCC είναι εντοπισμένη μέσα σε τέσσερις εξελικτικές συντηρημένες περιοχές του γονιδίου, τα εξόνια 5 μέχρι 8. Πολλές από τις μεταλλαγές p53 που βρίσκονται είναι σημειακές μεταλλαγές. Οι μεταλλαγές p53 με G.T transversions έχουν συνδεθεί με τις χημικές καρκινογόνες ουσίες που βρίσκονται στο περιβάλλον, τον καπνό τσιγάρων, και τις αφλατοξίνες. Επίσης οι Galiana et al. αναφέρουν ότι βρήκαν μεταλλάξεις του γονιδίου p53 σε έξι από τα οκτώ δείγματα αδενοκαρκινώματος οισοφάγου, ενώ οι Sorsdahl et al. αναφέρουν την παρουσία υπερέκφρασης της p53 σε 7 στα 10 αδενοκαρκινώματα οισοφάγου, και σε έξι δείγματα οισοφάγου Barrett. (K.Y.Lam 2000).

Με δεδομένο τον σημειακό πολυμορφισμό στο αμινοξύ 72 της p53 που βρίσκεται στον γενικό πληθυσμό είναι δυνατή η συνάντηση στη θέση αυτή μιας αργινίνης ή μιας προλίνης. Η διαφοροποίηση αυτή επηρεάζει τον διαχωρισμό της πρωτεΐνης σε SDS-PAGE (Matlashewski, 1987). Σε πειράματα in vitro οι δυο μορφές της πρωτεΐνης εμφανίζουν ελάχιστες διαφοροποιήσεις στην αποικοδόμηση τους που μεσολαβείται από την E6. Αντίθετα σε πειράματα in vivo η μορφή με την αργινίνη στη θέση 72 είναι πιο επιρρεπής στην αποικοδόμηση από αυτή με την προλίνη στην αντίστοιχη θέση (Storey, 1998). Οι Storey et al (1999) στην μελέτη τους δήλωσαν ότι η p53 προλίνη ακόμα και σε ετερόζυγη κατάσταση είναι πιο ανθεκτική από την p53 αργινίνη στην αποικοδόμηση που μεσολαβείται από την E6. Συμπερασματικά η ίδια μελέτη αναφέρει ότι σε μοντέλα ογκογένεσης που εμπλέκεται ο ιός HPV, ο πολυμορφισμός του αμινοξέος στην θέση 72 μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό προδιαθεσικό παράγοντα. Ο πολυμορφισμός αυτός, που ποικίλλει ανάλογα με την εθνολογική ομάδα, εστιάζεται στην περιοχή της p53 που σχετίζεται με την διαδικασία επαγωγής της απόπτωσης (Sakamuro 1997), η οποία ομοιάζει με μια περιοχή SH3

(SRC-ομολογία-3) περιοχή πρόσδεσης. Στην περιοχή αυτή δημιουργούνται πέντε RxxP μοτίφ, από τα οποία χάνεται ένα λόγω την αντικατάστασης της προλίνης με την αργινίνη.

Οι εναλλαγές p53 θα μπορούσαν να καθοριστούν με ανοσοιστοχημεία, με μοριακές μεθόδους, και πρόσφατα στον ορό. Η μέθοδος της ανοσοιστοχημείας όπως συγκρίνεται με μοριακές μεθόδους για την ανίχνευση μεταλλαγών p53, έχει και πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα. Εντούτοις, η ανάλυση p53 με ανοσοιστοχημεία είναι σχετικά γρήγορη, απλή, φτηνή, τεχνική με λιγότερο εντατική εργασία, και επιτρέπει στον καλύτερο συσχετισμό με τις ιστολογικές παραμέτρους και το μεγάλο αριθμό περιπτώσεων για να αναλυθεί. Μ' αυτό τον τρόπο, η υπερέκφραση p53 βρέθηκε να βρίσκεται σε λιγότερο διαφοροποιημένα κύτταρα στην περιφέρεια των κυττάρικων όγκων, στοιχείο που μπορεί να υποστηρίξει ότι οι μεταλλαγές p53 μπορούν να εμφανιστούν σε αρχικά στάδια της καρκινογένεσης οισοφάγου. Επίσης τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ασθενείς με μεταλλαγές p53 είναι πιθανό να έχουν μια πιο σύντομη επιβίωση. Οι Hamada et al. χρησιμοποίησαν την μέθοδο της ανοσοιστοχημείας με το μονοκλωνικό αντίσωμα PAb1801 σε 46 δείγματα ESCC, και διαπίστωσαν ανυπαρξία αποπτωτικών κυττάρων στις περιοχές με συσσώρευση της πρωτεΐνης p53. (K.Y.Lam 2000).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ

Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ (HPV)

6.1. Γενικά

Η μολυσματική φύση των ανθρώπινων αλλά και των ζωϊκών περιοχών με μυρμηγκιές (warts) δείχθηκε στις αρχές του 20ου αιώνα (zur Hausen, 1996). Τα πρώτα πειράματα που προσπάθησαν να συσχετίσουν τις μολύνσεις αυτές με την ανάπτυξη καρκινικών γεγονότων και να μελετήσουν την αλληλεπίδραση με άλλους καρκινογενετικούς παράγοντες πραγματοποιήθηκε από τον Rous και τους συνεργάτες του κατά το 1930 και τις επόμενες δυο δεκαετίες (Rous 1934, Rous 1935, Rous 1938, Rous 1944). Η πρώτη οπτικοποίηση σωματιδίων ιών θηλώματος σε ανθρώπινες μυρμηγκιές με μεθόδους ηλεκτρομικροσκοπίας αναφέρθηκε το 1949 (Strauss, 1949). Η δομή του γονιδιώματος των ιών του θηλώματος αναπτύχθηκε από τους Crawford και Crawford το 1963 (Crawford, 1963). Η μη διαθεσιμότητα συστημάτων κυτταροκαλλιέργειών, παρ' όλ' αυτά, και η προφανής καλοήθης φύση των ανθρώπινων μυρμηγκιών δεν οδήγησε σε αρκετά πειράματα τα επόμενα χρόνια. Το 1959 αναφέρθηκε η επαγωγή όγκων της ουροδόχου κύστεως στα βοοειδή από ένα ιό θηλώματος των βοοειδών που βρισκόταν σε ινωθλώματα του δέρματος. Οι ιοί αυτοί εμφανίζουν ογκογόνο δυναμικό σε χάμστερ ποντίκια (Friedmann 1963, Boiron 1964) και σε μετασχηματισμένα κύτταρα από μοσχάρι και ποντίκια σε κυτταροκαλιέργειες (Black 1963, Thomas 1963).

Μελέτες που ξεκινούν από το 1922 (Lewandowsky, 1922) περιγράφουν μια σπάνια και προφανώς κληρονομική γενικευμένη θηλωμάτωση στους ανθρώπους με καρκίνωμα του δέρματος που αναπτύσσεται σε περιοχές εκτεθειμένες στον ήλιο. Το σύνδρομο αυτό ονομάστηκε Epidermodysplasia verruciformis και δεν ήταν γνωστή τότε η πιθανώς μολυσματική προέλευση των θηλωματικών πλακών και macules που κάλυπταν το προσβεβλημένο δέρμα. Στους ανθρώπους, οι ιοί του θηλώματος προκαλούν ποικίλες καλοήθεις παθήσεις: μυρμηγκιές, επιθηλιακές κύστεις, ενδοεπιθηλιακές

νεοπλασίες, θηλώματα της γεννητικής οδού, του λάρυγγα και του φάρυγγα, κερατοακανθώματα και άλλες υπερκερατώσεις.

Σταδιακά η ανάπτυξη του ενδιαφέροντος για του ιούς του θηλώματος αναπτύχθηκε στο δεύτερο μισό της δεκαετίας του 1970, εξαιτίας της υπόθεσης ότι οι ιοί του θηλώματος μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (zur Hausen, 1974, zur Hausen 1976). Επιπλέον, οι Meisels και Fortin (Meisels, 1976) πρότειναν την ιική προέλευση του θηλώματος της κοιλοκυτταρικής ατυπίας, που την διαχώρισε από τις "πραγματικές" νεοπλαστικές βλάβες. Η έρευνα στον τομέα των ιών του θηλώματος ενισχύθηκε από την αναγνώριση καινούργιων τύπων HPV σε βλάβες ασθενών με Epidermodysplasia verruciformis (EV), και ιδιαίτερα σε κακοήθεις όγκους τέτοιων ασθενών (Orth 1977, Orth 1979).

Στην δεκαετία του 1980 απομονώθηκαν νέοι τύποι όπως ο HPV 6 και 11 από γεννητικές βλάβες (Gissmann 1980, Gissmann 1982) ενώ άμεσα από βιοψίες καρκίνου τραχήλου μήτρας απομονώθηκαν οι τύποι HPV 16 και 18 (Durst 1983, Boshart 1984). Σήμερα, το ενδιαφέρον εστιάζεται στη διερεύνηση των μηχανισμών καρκινογένεσης από τους ιούς του θηλώματος. Οι ιοί του θηλώματος προκύπτουν ως οι πιο συχνοί ιοί καρκινώματος (zur Hausen, 1989) και εμφανίζονται να διαδραματίζουν ένα "μυστικό" ρόλο ως κύρια καρκινικά παθογόνα (zur Hausen, 1983).

6.2 Δομή των ιικών σωματιδίων και ταξινόμηση

6.2.1 Ιικά σωματίδια

Οι ιοί του θηλώματος του ανθρώπου (HPV) ανήκουν στην οικογένεια Papovaviridae και είναι μη ελυτροφόροι ιοί με εικοσαεδρική συμμετρία. Η διάμετρος των ιών του θηλώματος (HPV) είναι περίπου 55nm. Τα πλήρη σωματίδια περιέχουν του διπλής αλυσίδας κλειστό κυκλικό DNA γονιδίωμα. Το ιικό DNA σχετίζεται με πρωτεΐνες παρόμοιες με ιστόνες (Favre 1977, Pfister 1978) και περιβάλλεται από καψίδιο που αποτελείται από 72 καψομερή (Finch, 1965). Η κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου κωδικοποιείται από L1 ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης και αντιπροσωπεύει το 80% του συνόλου των ιικών πρωτεϊνών και έχει μέγεθος 54-58 kD. Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης L2 κωδικοποιεί για ένα πρόσθετο δομικό συστατικό του ιικού καψιδίου. Η πρωτεΐνη L1 έχει μοριακό βάρος περίπου 55000 και έχει υψηλό βαθμό

συντήρησης στους διαφορετικούς ιούς θηλώματος. Η δεύτερη δομική πρωτεΐνη, η L2, είναι λιγότερο συντηρημένη και το μοριακό βάρος της είναι περίπου 75000, με μέγεθος 63-78 kD [Σπαντίδος 1998]. Η μη εισαγωγή τους σε φάκελο τους καθιστά ανθεκτικούς στην θερμότητα και στους οργανικούς διαλύτες (Bonpez, 1993).

6.2.2 Δομή και ρύθμιση του ιικού γενώματος

Ο HPV δεν περιβάλλεται από φάκελο και το γονιδίωμα αποτελείται από 7200-8000 ζεύγη βάσεων από κλειστό-κυκλικό δίκλωνο DNA που έχει περίπου 20 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frame, ORF) και μια περιοχή που δεν κωδικοποιεί για πρωτεΐνες (non-coding region, NCR), γνωστή και σαν ανώτερη περιοχή ελέγχου (upper regulatory region, URR) ή μακρά περιοχή ελέγχου (LCR) (long control region, LCR), με μέγεθος περίπου 1 kb [Sherman *et al.* 1992]. Η δομή των ιικών γονιδιωμάτων αποκαλύπτει σημαντικές ομοιότητες μεταξύ των διαφορετικών μελών αυτής της ιικής ομάδας. Γενικά, μονάχα η μια αλυσίδα είναι μεταφραφικά ενεργή, γιαυτό η μεταγραφή γίνεται μονάχα προς την μια κατεύθυνση, και η θέση των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης αποκαλύπτει σημαντικό βαθμό ανταπόκρισης (Chen 1982, Danos 1982). Τα γενώματα των ιών του θηλώματος μπορούν να χωριστούν σε τρεις περιοχές: την μακρά περιοχή ελέγχου (LCR) που αποτελεί το 10% του γενώματος, και την πρώιμη (E) και όψιμη (L) περιοχή. Τα γονίδια L κωδικοποιούν για δομικές πρωτεΐνες, η περιοχή E κυρίως για ρυθμιστικές λειτουργίες που σχετίζονται με την παρουσία του γονιδιώματος, την αντιγραφή του DNA, και την ενεργοποίηση του λυτικού κύκλου. (Anco Molijn)

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του ιού είναι πολύπλοκη και ελέγχεται από κυτταρικούς και ιικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Η περιοχή LCR των ιών HPV του γεννητικού συστήματος ποικίλει σε μέγεθος από 800-900 bp, ενώ σε άλλους ιούς θηλώματος είναι μικρότερη. Στην περιοχή LCR εδράζουν στοιχεία cis-active που ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων E6/E7, τα οποία αντιπροσωπεύουν τα γονίδια μετασχηματισμού και ευθύνονται για την αθανатоποίηση και τη διατήρηση του κακοήθους φαινοτύπου στα HPV-θετικά κύτταρα καρκίνου τραχήλου μήτρας (Munger 1989, Munger 1993, von Knebel Doeberitz 1992).

Έχουν αναγνωρισθεί αρκετοί κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται στην περιοχή LCR του ιού HPV18. Τέτοιοι είναι οι παράγοντες

NF-1, AP1, KRF-1, Oct-1, SP-1, YY-1 και ο υποδοχέας των γλυκοκτικοειδών (Chan 1989, Gloss 1989, Offord 1990, Mack 1991, Thierry 1992, Bauknecht 1992). Η δυσλειτουργία κάποιων από αυτούς εμφανίζεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση που σχετίζεται με ιούς θηλώματος (zur Hausen, 1994). Οι περισσότεροι παράγοντες προσδένονται στην κεντρική περιοχή του LCR, που αντιπροσωπεύει περιοχή-ενισχυτή και ρυθμίζουν την μεταγραφή του υποκινητή των γονιδίων E6/E7 που εδράζει στο 3'- άκρο του LCR. Παρόλο, που αρκετοί από αυτούς τους παράγοντες διεγείρουν τον υποκινητή, κάποια από αυτούς (ειδικά οι YY-1) έχουν διπλό ρόλο δηλαδή συνάμα διεγείρουν και καταστέλλουν τον ιικό υποκινητή (Bauknecht 1992, May 1994, Bauknecht 1995).

Εκτός από την κυτταρική ρύθμιση, η ενδογονιδιακή ρύθμιση της γονιδιακής λειτουργίας των E6/E7 από την E2 πρωτεΐνη του ιού παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση ή την καταστολή αυτών των ογκογονιδίων. Η περιοχή LCR του ιού HPV 16 περιέχει τέσσερις περιοχές πρόσδεσης της E2. Η μια βρίσκεται στην 5' περιοχή του LCR, οι δυο εκατέρωθεν του κεντρικού τμήματος και η μια στο 3' άκρο. Το εγγύς τμήμα της περιοχής του υποκινητή, στο 5' σταματά στην E2 και στο 3' από το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης του E6 γονιδίου. Δυο επιπλέον περιοχές πρόσδεσης της E2 βρίσκονται μέσα στα εγγύς 90 ζεύγη βάσεων που αλληλοεπικαλύπτουν ένα TATA κουτί. Η πρόσδεση του E2 σε αυτές τις περιοχές τροποποιεί την λειτουργία του υποκινητή μεταθέτωντας το βασικό μεταγραφικό σύμπλοκο (Tan 1994)

6.3 Ονοματολογία και ταξινόμηση

Η γενετική ετερογένεια των ανθρωπίνων ιών του θηλώματος έγινε περισσότερο εμφανής από το 1976 (Gissmann, 1976). Για την τυποποίηση των ιών του θηλώματος χρησιμοποιήθηκαν ως κριτήριο οι διαφορές στο DNA και συγκεκριμένα στα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης E6, E7 και L1 (de Villiers, 1989). Για να οριστούν νέοι τύποι πρέπει να υπάρχουν σε αυτά τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης διαφορές μεγαλύτερες του 10%. Από το 1995 και έπειτα χρησιμοποιήθηκαν οι διαφορές μονάχα στο L1 ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης για τον καθορισμό νέων τύπων όταν αυτές υπερβαίνουν το 10%.

Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευθεί περισσότεροι από 118 διακριτοί γονότυποι HPV σε διάφορες βλάβες και οι αλληλουχίες του γονιδιώματος των περισσότερων από αυτούς έχουν περιγραφεί πλήρως (de Villiers 1994, Delius 1994, de Villiers et al.2004). Περισσότερες από 40 γονότυποι HPV περιλαμβάνονται στις μολύνσεις τραχήλου μήτρας και ειδικά ο HPV - 16 αποτελεί περισσότερο από το 50% όλων των αυχενικών νεοπλασιών παγκοσμίως.

Βασιζόμενοι στην σύνθεση του νουκλειικού οξέος των ιών HPV μπορούμε να διακρίνουμε επιμέρους ομάδες ιών θηλώματος (Bernard, 1994). Μια από τις μεγαλύτερες υποομάδες αντιπροσωπεύεται από τύπους που προσβάλλουν κυρίως βλεννώδεις επιφάνειες, ιδιαίτερα της γεννητικής οδού. Περισσότεροι από 40 τύποι που έχουν αναγνωριστεί να ανοίκουν σε αυτή την ομάδα. Ο κυριότερος εκπρόσωπος της ομάδας αυτής είναι ο HPV 16. Μια άλλη ομάδα αντιπροσωπεύεται από ιούς που εμφανίζονται σε βλάβες με *Epidermodysplasia verruciformis*, με τον HPV 5 ως κυριότερο αντιπρόσωπο. Οι ιοί αυτοί βρίσκονται επίσης σε βλάβες ασθενών που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή. Μια τρίτη υπομονάδα περιέχει κάποιους ιούς που βρίσκονται κατά προτίμηση σε δερματικές βλάβες. Το πρωτότυπο της υποομάδας αυτής είναι ο HPV4. Μια τέταρτη υπομονάδα, που από μόνη της είναι ετερογενής, περιέχει μακρινά σχετιζόμενους τύπους όπως HPV1, HPV63, και HPV41. Η ετερογένεια των ιών του θηλώματος δεν περιορίζεται μόνο στους ανθρώπους. Έχουν επίσης απομονωθεί 8 τύποι από βοοειδή και 4 έχουν κλωνοποιηθεί από πιθήκους. Ένας αριθμός από ιούς θηλώματος ζώων σχετίζονται με συγκεκριμένα μέλη μεμονωμένων ανθρωπίνων υποομάδων από κάποια μέλη των ομάδων μεταξύ τους.

Μία άλλη διάκριση των HPV είναι ο διαχωρισμός τους σε τύπους υψηλού κινδύνου και τύπους χαμηλού κινδύνου, μια που οι διάφοροι τύποι ιών διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά στο ογκογενετικό τους δυναμικό. Οι υψηλού κινδύνου ιοί μπορούν να προκαλέσουν αθανатоποίηση ανθρωπίνων κερατινοκυττάρων (Durst,1987). Η πρόκληση χρωμοσωμικών απωλειών ως συνέπεια των ογκοπρωτεϊνών των υψηλού κινδύνου ιών, οι οποίες υπερπηδούν τους κυτταρικούς μηχανισμούς ρύθμισης, αναδεικνύεται ως η λειτουργικά κύρια διάκριση μεταξύ χαμηλού και υψηλού κινδύνου τύπων (Demers,1994). Χάρη σε αυτές τους τις ιδιότητες, οι υψηλού κινδύνου HPV

μπορούν να δράσουν από μόνοι τους ως καρκινογόνα (zur Hausen, 1991). Τα καρκινικά κύτταρα που περιέχουν γονιδίωμα HPV χαμηλού κινδύνου παρουσιάζουν συχνά τροποποιήσεις στο κυτταρικό γονίδιο p53 και εντοπίζονται σε περιοχές εκτεθειμένες σε χημικούς ή φυσικούς καρκινογόνους παράγοντες. Η μη ικανότητα αυτών των ιών να κωδικοποιούν μεταλλαξιγόνες ογκοπρωτεΐνες, φαίνεται να είναι η κύρια αιτία της αποτυχίας τους να δράσουν από μόνοι τους ως καρκινογόνα. Έτσι, στηρίζονται στην αλληλεπίδρασή τους με άλλους μεταλλαξιγόνους παράγοντες, προκειμένου να προκαλέσουν κακοήγη ανάπτυξη.

Πίνακας 6.1: Ταξινόμηση των γονότυπων HPV. (Munoz et al, 2003)

Ταξινόμηση κινδύνου	HPV υπότυποι
Υψηλού κινδύνου	16, 18, 31, 33, 35 39, 45, 51, 52, 56 58, 59, 68, 73, 82
Πιθανά Υψηλού κινδύνου	26, 53, 66
Χαμηλού κινδύνου	6, 11, 40, 42, 43, 44 54, 61, 70, 72, 81, CP6108
Ακαθόριστου κινδύνου	34, 57, 83

6.4 Λειτουργίες των ιικών πρωτεϊνών E6 και E7

Οι E6 και E7 πρωτεΐνες εκφράζονται στα HPV-θετικά καρκινικά κύτταρα. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να προκαλούν αθανатоποίηση ανθρωπίνων κερατινοκυττάρων και ενός αριθμού άλλων κυτταρικών τύπων. Οι τύποι HPV που κωδικοποιούν για τα γονίδια E6 και E7 λαμβάνουν μέρος στην αθανатоποίηση κυττάρων κυτταροκαλλιιεργειών και βρίσκονται συχνά σε κακοήθεις όγκους, θεωρούνται τύποι υψηλού κινδύνου σε αντίθεση με του χαμηλού κινδύνου που έχουν χαμηλό ογκογόνο δυναμικό (zur Hausen 1986). Τα γονίδια E6 και E7 κωδικοποιούν πρωτεΐνες που διεγείρουν την αύξηση, ειδικότερα οι πρωτεΐνες E6 και E7 κάποιων τύπων σχετίζονται με την εξέλιξη σε κακοήγη αύξηση (Mansur, 1993). Και οι δυο πρωτεΐνες των τύπων HPV

υψηλού κινδύνου συνεργάζονται στην αθανатоποίηση και τον μετασχηματισμό κυττάρων (Munger, 1989).

6.4.1 E6 πρωτεΐνη

Η πρωτεΐνη E6 του ιού HPV 16 περιέχει 151 αμινοξέα και εμφανίζει τέσσερα μοτίβα Cys-X-X-Cys μεσολαβώντας σε πρόσδεση με ψευδάργυρο που καταλήγει στον σχηματισμό δυο δομών "δακτύλων ψευδαργύρου" (Barbosa 1989, Grossman 1989, Kanda 1991). Η E6 συνεργάζεται με την E7 πρωτεΐνη στην αθανатоποίηση ανθρωπίνων κυττάρων (Munger 1989). Η εισαγωγή του σε κάποια ανθρώπινα κύτταρα θηλαστικών μπορεί να οδηγήσει στην αθανатоποίηση τους ακόμα και σε απουσία του E7 (Band, 1990). Η E6 των τύπων αυτών συνεργάζεται με τα ογκογονίδια *ras* στην αθανатоποίηση αρχέγονων κυττάρων τρωκτικών (Storey, 1993) και επάγει αύξηση που είναι ανεξάρτητη της πρόσδεσης σε κύτταρα NIH 3T3 και ενεργοποιεί ετερόπλευρα τον υποκινητή του αδενιοίου E2 κατά την μεταγραφή (Sedman 1991).

Μια σημαντική παρατήρηση που σχετίζεται με τη λειτουργία της E6 πρωτεΐνης αποκάλυψε την πρόσδεση της στην κυτταρική p53 (Werness, 1990). Η πρόσδεση αυτή επάγει την αποικοδόμηση της p53 (Scheffner, 1990) μέσω του κυτταρικού πρωτεολυτικού συστήματος με ουμπικουΐνη (Scheffner, 1991). Η p53 δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής με την πρόσδεση της σε ειδικές αλληλουχίες DNA. (Kern, 1991) και είναι απαραίτητη για την παύση της αύξησης που ακολουθεί την καταστροφή του κυτταρικού DNA (Kuerbitz, 1992). Τα κύτταρα που δεν διαθέτουν λειτουργική p53 δεν σταματούν όπως θα έπρεπε στην φάση G1 και εμφανίζουν ανισοροπία γονιδιώματος (Livingstone, 1992). Η μεταγραφική ενεργοποίηση από την E6 που επάγεται μετά από την καταστροφή του DNA αναστέλλεται από την E6 του HPV 18 (Gu, 1994).

Η αλληλεπίδραση της E6 με την p53 είναι εμφανώς ο πρωταρχικός λόγος πρόκλησης χρωμοσωμικής ανισοροπίας σε κύτταρα που μολύνονται από κάποιον HPV υψηλού κινδύνου (White, 1994). Ευαισθητοποιεί τα ανθρώπινα μαζικά επιθηλιακά κύτταρα ως προς την απόπτωση που επάγεται από την καταστροφή του DNA (Xu, 1995). Η απώλεια της λειτουργίας της p53 μετά από επιμόλυνση με το γονίδιο της E6 ενισχύει την ανθεκτικότητα ανθρωπίνων διπλοειδών ινοβλαστών σε ιονίζουσα ακτινοβολία (Tsang, 1995).

Η αποικοδόμηση της p53 δεν είναι επαρκής για την ενεργοποίηση της αύξησης της E6 που παρατηρείται σε ανθρώπινους εμβρυϊκούς ινοβλάστες (Ishiwatari, 1994). Επιπρόσθετα, η E6 εκτός την πρόσδεση με την p53 και την κυτταρική ουμπικουΐνη E6-AP, η E6 με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες (Keen, 1994) και με μια πρωτεΐνη που δεσμεύει ασβέστιο.

6.4.2 E7 πρωτεΐνη

Η E7 πρωτεΐνη του HPV 16 αντιπροσωπεύει μια φωσφοπρωτεΐνη προσδεδόμενη με ψευδάργυρο σε δυο περιοχές Cys-X-X-Cys που αποτελείται από 98 αμινοξέα. Παρουσιάζει δομικές ομοιότητες με την E6 πρωτεΐνη στοιχειοθετώντας μια πιθανή εξελικτική συσχέτιση των δυο πρωτεϊνών. Το αμινοτελικό ακραίο τμήμα της E7 πρωτεΐνης περιέχει δυο περιοχές που ανταποκρίνονται μερικώς στην συντηρημένη περιοχή (CR-1) και καθολικά στη συντηρημένη περιοχή 2 (CR-2) των E1A πρωτεϊνών του αδενοϊού και με μια ανάλογη περιοχή του T αντιγόνου του SV40 (145). Οι περιοχές αυτές του E7(cd-1, cd-2) συνεισφέρουν στο δυναμικό αθανατοποίησης του E7 (Phelps, 1989). Όπως ακριβώς το E1A έτσι και το μεγάλο T αντιγόνο του SV40, η πρωτεΐνη E7 των ιών HPV υψηλού κινδύνου σχηματίζουν σύμπλοκα με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος pRB (Whyte 1988, DeCarrio 1988, Dyson 1989). Η ικανότητα πρόσδεσης της E7 των ιών HPV υψηλού κινδύνου στην pRB είναι περίπου 10 φορές μεγαλύτερη από αυτή των χαμηλού κινδύνου (Huibregste, 1994). Η διαφορά αυτή προκύπτει πιθανώς από μια τροποποίηση ενός μόνο αμινοξέος στην θέση 21 (Heck, 1992) που επηρεάζει την ικανότητα της E7 να συνεργάζεται με ενεργοποιημένα γονίδια ras κατά τον μετασχηματισμό νεφρικών κυττάρων αρουραίων (Banks, 1990). Η πρόσδεση στην pRB δεν αποτελεί γενική προδιάθεση σε αθανατοποίηση (Jewers, 1992), συνηγορώντας σε επιπρόσθετες λειτουργίες της πρωτεΐνης E7. Τα σύμπλοκα E7/pRB απελευθερώνουν το μεταγραφικό παράγοντα E2F από τα σύμπλοκα με pRB, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή γονιδίων που ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση (Bagchi 1990, Bandara 1991).

Η E7 πρωτεΐνη των ιών υψηλού κινδύνου ενώνεται με σχετιζόμενες πρωτεΐνες, όπως η p107 και η p130, και με την πρωτεϊνική κινάση p33cdk2 και με την κυκλίνη A (Dyson 1992, Tommasimo 1993). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση της E7 οδηγεί σε συνεχή έκφραση των γονιδίων της κυκλίνης E και A σε απουσία εξωτερικών αυξητικών παραγόντων (Zerfass

1995). Η E7 ενεργοποιεί τον υποκινητή της κυκλίνης A μέσω της θέσης πρόσδεσης του E2F. Η κυκλίνη D1 δεν επηρεάζεται από την E7. Η ικανότητα της E7 για μετασχηματισμό σχετίζεται με την ενεργοποίηση των κυκλινών E και A (Zerfass, 1995).

Η E7 πρωτεΐνη του HPV16 μπορεί να συμπληρώνει λειτουργίες του E1A που απαιτούνται για την διέγερση των πρώιμων υποκινητών του αδενοϊού τύπου 5 (Wong, 1996). Με αυτό τον τρόπο σταθεροποιείται η συσχέτιση πρωτεϊνικών συμπλόκων που περιέχουν το c-jun ,με πλευρές ATF. Με τη χρήση ενός πρωτεϊνικού συστήματος συγχώνευσης γλουταθιόνης-S-τρανσφεράσης, η E7 με τα μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου κάνει σύμπλοκα με τους μεταγραφικούς παράγοντες AP-1 καθώς και με τα c-jun, jun-B, jun-D και c-fos.

6.5. Λειτουργίες των ιικών πρωτεϊνών E1,E2,E4 και E5

Η πρωτεΐνη E1 κωδικοποιεί για ένα πολυκιστρονικό RNA, συνδέει και υδρολύει το ATP (Seo,1993), και διαθέτει ATP-εξαρτώμενη δραστηριότητα ελικάσης (Yang,1993). Η E1 είναι σημαντική για την αντιγραφή των ιών του θηλώματος (Ustav,1991). Μαζί με την περιοχή L1, το E1 ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης αντιπροσωπεύουν τις πλέον συντηρημένες περιοχές μεταξύ των διαφόρων τύπων HPV.

Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης E2 κωδικοποιεί για δύο και πιθανώς τρεις πρωτεΐνες, οι οποίες δρουν όλες ως μεταγραφικοί παράγοντες (Bouvard,1994). Η καθεμιά από αυτές επιδρά διαφορετικά στην ιική γονιδιακή έκφραση και αντιπροσωπεύουν σημαντικούς ενδογονιδιακούς ρυθμιστές. Διαγραφή του E2 ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης παρατηρείται συχνά σε κύτταρα καρκίνου τραχήλου μήτρας (Schwarz,1985), οδηγώντας στην υπόθεση ότι αυτή η διαγραφή διευκολύνει την μεταμόρφωση ανθρώπινων κυττάρων και την μετάβασή τους σε κακοήθη κατάσταση. Επίσης, οι πρωτεΐνες E2 αλληλεπιδρώντας με την E1 διεγείρουν την αντιγραφή του ιικού DNA (Chiang 1992, Sverdrup 1994).

Η πρωτεΐνη E4 εντοπίζεται αποκλειστικά εντός της διαφοροποιημένης στοιβάδας του προσβεβλημένου επιθηλίου (Doorbar 1986, Palevsky 1991). Εικάζεται ότι αυτή η πρωτεΐνη ενέχεται στην παραγωγική λοίμωξη, πιθανώς μέσω παρεμπόδισης της φυσιολογικής διαφοροποίησης, δημιουργώντας έτσι

τις ιδανικές συνθήκες για την ωρίμανση του ιού. Η αλληλεπίδραση της E4 με κυτταροκερατίνες πιθανώς ενέχεται στον καθορισμό της ιστοειδικότητας των διαφόρων τύπων του HPV (Doorbar 1991, Roberts 1993).

Η πρωτεΐνη E5 είναι υδρόφοβη και εντοπίζεται κυρίως εντός της συσκευής του Golgi, ενώ εν μέρει βρίσκεται και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Burkhardt, 1989). Στις HPV λοιμώξεις η E5 παρουσιάζει μικρή μόνο ικανότητα μεταμόρφωσης (Leptak 1991, Pim 1992). Θεωρείται ότι παίζει ρόλο στα αρχικά στάδια της HPV λοίμωξης, αλλά είναι προφανώς απαραίτητη για την διατήρηση της κακοήθους εξαλλαγής. Αλληλεπιδρά επίσης με τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF) και την ATPάση (Hwang 1995, Conrad 1993).

6.6. Διάγνωση των HPV λοιμώξεων.

6.6.1. Ενδείξεις συμμετοχής του HPV.

Το 1982, οι Syrjänen et al., μελέτησαν μία σειρά από 60 ESCC, όπου αναγνώρισαν βλενογονικές αλλαγές οι οποίες τηρούσαν αμφότερα τα κριτήρια των εξωφυτικών και των επιπέδων βλαβών του HPV σε 24 από τους 60 ασθενείς. Για πρώτη φορά, διαπιστώθηκε η δυνατότητα ότι ο HPV θα μπορούσε να είναι υπεύθυνος παράγοντας για την ανάπτυξη του οισοφαγικού SCC. (K J Syrjänen 2002)

Ο HPV δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε συμβατικές κυτταροκαλλιέργειες, και οι ορολογικές δοκιμές έχουν περιορισμένη ακρίβεια (Dillner, 1999). Τα Virus-like particles (VLPs) έχουν χρησιμοποιηθεί για να ανιχνεύσουν τα αντισώματα IgG του HPV -16 σε ορούς ασθενών με ESCC, στις περιοχές υψηλού κινδύνου για την ασθένεια. Καθώς η HPV λοίμωξη ακολουθείται από μια ανοσολογική απάντηση έναντι στη κυριότερη καψική πρωτεΐνη (Dillner, 1999), και τα αντισώματα παραμένουν ανιχνεύσιμα για πολλά χρόνια, η ορολογική μέθοδος αποδείχθηκε μη κατάλληλη για τις παρούσες και προηγούμενες μολύνσεις. Συνεπώς, η ακριβής διάγνωση της λοίμωξης HPV στηρίζεται στην ανίχνευση ιικού πυρηνικού οξέος. (K J Syrjänen 2002)

Το 1986 οι Hille et al., ήταν οι πρωτοπόροι που ανάδειξαν την έκφραση των δομικών πρωτεϊνών του HPV, με τη χρησιμοποίησής μεθόδου της ανοσοϊστοχημείας (IHC). Συγκεκριμένα αναφέρουν ότι βρήκαν έκφραση αντιγόνων HPV σε επτά από 70 ασθενείς τους με ESCC. Η

μέθοδος της ανοσοιστοχημείας (IHC) αντικαταστάθηκε σύντομα με τις διαφορετικές μεθόδους υβριδοποίησης DNA, και ο αριθμός καθαρά μελετών IHC παρέμεινε περιορισμένος. Σε σύνολο, 182 περιπτώσεων που αναλύθηκαν με IHC, η έκφραση αντιγόνων HPV παρουσιάστηκε σε 23 περιπτώσεις (12,6%). (K J Syrjänen 2002)

6.6.2. Ανίχνευση του HPV-DNA και αναγνώριση των HPV γονότυπων.

6.6.2.1. Μέθοδοι ενίσχυσης σήματος (Signal amplification systems).

Η ανίχνευση του DNA του HPV και η τυποποίηση του ιού με μοριακές τεχνικές, μπορεί να γίνει:

Με ανάλυση κατά Southern (SB), μία τεχνική αρκετά ευαίσθητη (ανιχνεύει 0.1-1 αντίγραφο HPV/κύτταρο) και ειδική. Όμως, είναι αρκετά επίπονη και απαιτεί μεγάλες ποσότητες DNA.

Με ανάλυση dot blot/ViraPap, χρησιμοποιώντας είτε DNA (dot blot) είτε RNA ανιχνευτές (ViraPap). Η μέθοδος αυτή διαθέτει μικρότερη ευαισθησία (1-10 αντίγραφα/κύτταρο). Υπάρχουν μόνο δύο μελέτες που χρησιμοποιούν την τεχνική DBH με διαφορετικά αποτελέσματα. Στη πρώτη αναφέρεται ότι δεν ανιχνεύθηκε κανένα DNA HPV σε 37 περιπτώσεις από το Χογκ Κογκ, ενώ στη δεύτερη το 42% των περιπτώσεων είχαν θετικά αποτελέσματα σε μια σειρά που συλλέχθηκε από κινεζούς και Γάλλους ασθενείς. (K J Syrjänen 2002)

Με in situ υβριδισμό (ISH), με τον οποίο διατηρείται η μορφολογία του δείγματος και επιτρέπεται η εντόπιση του HPV μέσα στο κύτταρο. Διαθέτει όμως σχετικά χαμηλή ευαισθησία (20-50 αντίγραφα/κύτταρο). Μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευθεί 13 μελέτες με θέμα την ανίχνευση HPV σε καρκινώματα του οισοφάγου με την χρησιμοποίηση ISH. Σε σύνολο, η μέθοδος ISH έχει χρησιμοποιηθεί στη μελέτη 1485 δειγμάτων ESCC, με το DNA HPV να έχει βρεθεί σε 22,9% (34/1485) αυτών των ασθενών. Ο HPV-16 ήταν ο συχνότερος τύπος HPV που ανιχνεύθηκε. (K J Syrjänen 2002)

Με in situ υβριδισμό σε φίλτρο (Filter in situ hybridisation - FISH), μία τεχνική που υστερεί σε ευαισθησία (10-100 αντίγραφα/κύτταρο), αλλά αντίθετα είναι όμως ταχεία. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '80 η μέθοδος in situ υβριδισμό σε φίλτρο- FISH, χρησιμοποιήθηκε ευρέως για να ανιχνεύσει το DNA HPV σε διάφορα δείγματα βλεννογόνων, ιδιαίτερα εκείνου του γεννητικού συστήματος. Σε σύνολο, η αυτή τεχνική χρησιμοποιήθηκε για να

αναλύσει 129 καρκινώματα, και ανέδειξε την παρουσία του DNA HPV σε 67 περιπτώσεις (51,9%), το οποίο είναι αρκετά υψηλότερο από το μέσο όρο των οποιαδήποτε άλλων τεχνικών ανίχνευσης (ως αποτέλεσμα του υψηλού ψεύτικου θετικού ποσοστού). (K J Syrjänen 2002)

6.6.2.2. Μέθοδοι ενίσχυσης στόχου (Target amplification systems).

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR), διαθέτει την μεγαλύτερη ευαισθησία (1 αντίγραφο/δείγμα) και ταχύτητα, ενώ ταυτόχρονα δύναται να γίνει και τυποποίηση του ιού. Η μέθοδος PCR αποτελεί μία ευρύτατη χρησιμοποιούμενη μέθοδο ενίσχυσης στόχων, η οποία χρησιμοποιεί μια θερμοκυκλική διαδικασία χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές, που πλαισιώνουν την ενδιαφερόμενη περιοχή για να πολλαπλασιάσουν το DNA παρουσία μιας θερμοανθεκτικής πολυμεράσης DNA. Η ανίχνευση HPV ποικίλει από 0% έως 60–70%. Τα ποσοστά ανίχνευσης του DNA HPV στα καρκινώματα του οισοφάγου που προέρχονται από τις περιοχές υψηλού κινδύνου (όπως η Κίνα, η Νότια Αφρική, η Ιαπωνία, και η Αλάσκα) είναι σημαντικά υψηλότερα. Το γενικό ποσοστό ανίχνευσης του HPV DNA (15,2% 308/2020 δείγματα) είναι λιγότερο από αυτό που βρίσκεται με τη μέθοδο ISH (22,9%), και σημαντικά λιγότερο από αυτό που αναφέρεται με τη μέθοδο SB (40–50%) και τη μέθοδο FISH (51,9%). Εντούτοις, η PCR πρέπει να θεωρείται ως η πιό ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης του HPV, και το υψηλότερο ποσοστό ανίχνευσης του HPV με τις μεθόδους υβριδοποίησης ίσως να οφείλεται σε μια διασταυρούμενη υβριδοποίηση των δοκιμασιών HPV με το ανθρώπινο DNA ή το DNA από άλλους μικροοργανισμούς. (K J Syrjänen 2002)

Οι συγκεκριμένοι εκκινητές γονότυπων που έχουν σκοπό να ενισχύσουν αποκλειστικά έναν γενότυπο HPV μπορούν να χρησιμοποιηθούν, για την αναζήτηση της HPV λοίμωξης. Εναλλακτικά, οι γενικοί εκκινητές PCR μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ενισχύσουν ένα ευρύ φάσμα γενότυπων HPV. Οι συγκεκριμένοι εκκινητές στοχεύουν σε μια συντηρημένη περιοχή στους διαφορετικούς γενοτύπους του HPV. Δεδομένου ότι η L1 περιοχή αποτελεί το περισσότερο οι διάφοροι γενικοί εκκινητές PCR διάφορα στοχεύουν σε αυτήν την περιοχή (Hildesheim et Al, 1994). Τρία διαφορετικά σχέδια των γενικών PCR εκκινητών μπορούν να επιτύχουν την ανίχνευση του ευρέος-φάσματος DNA HPV. Ο πρώτος ενσωματώνει έναν πρόσθιο

κίνησης και έναν οπίσθια κίνησης εκκινητή που στοχεύει σε μια συντηρημένη περιοχή. Το σύστημα GP5+/6+ pcr είναι ένα παράδειγμα αυτής της προσέγγισης (de Roda Husman et Al, 1995; Jacobs et Al, 1997). Η δεύτερη κατηγορία γενικών PCR εκκινητών περιλαμβάνει προσθίους και οπίσθιους εκκινητές, οι οποίοι περιέχουν ένα ή περισσότερα σημεία εκφύλισης για να αντισταθμίσουν τη μεταβολή των αλληλουχιών σε διάφορους υπότυπους. Το MY09/11 είναι ένα παράδειγμα αυτού του είδους PCR εκκινητών (Hildesheim et Al, 1994). Η τρίτη επιλογή είναι ο συνδυασμός διάφορων πρόσθιων και οπίσθιων εκκινητών, που στοχεύουν στην ίδια θέση του ιικού γονιδιωματός. Τα παραδείγματα τέτοιων γενικών εκκινητών εγχυτήρων είναι οι εκκινητές PGMY (Gravitt et Al, 2000) και οι εκκινητές SPF10 (Kleter et Al, 1998)

Η σε πραγματικό χρόνο PCR (Real-time PCR) μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να ανιχνεύσει το HPV-DNA, που οι συγκεκριμένοι τύπου HPV PCR εκκινητές, μπορούν να συνδυαστούν με τους φθορίζουσες τεχνικές για την σε πραγματικό χρόνο ανίχνευση. (Josefsson et Al, 2000; Tucker et Al, 2001 Ylitalo et Al, 2000) Εντούτοις ο πολλαπλασιασμός αρκετών υπότυπων με συγκεκριμένους εκκινητές μέσα σε μια αντίδραση μπορεί να είναι τεχνικά δύσκολος.

Τα προϊόντα PCR μπορούν να ανιχνευθούν εύκολα από την τυποποιημένη ηλεκτροφόρηση πήκτωμάτων αγαρόζης. Εντούτοις, η ακόλουθη συγκεκριμένη ανάλυση των αλληλουχιών αυξάνει αρκετά την ευαισθησία της δοκιμής. Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για αυτόν το λόγο.

Μετά τον πολλαπλασιασμό, η σύνθεση αλληλουχίας ενός PCR προϊόντος μπορεί να μελετηθεί με τα ένζυμα περιορισμού (restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP). Η πέψη των προϊόντων PCR με τις ενδονουκλεάσεις περιορισμού παράγει διάφορα τεμάχια, τα οποία μπορούν να διαχωρισθούν με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, που παράγει ένα σειριακό ταινιωτό ενζυμικό σύστημα. Η μέθοδος εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των ενζύμων περιορισμού ικανών για τις συγκεκριμένες μεταλλαγές. Συνεπώς, η ανίχνευση πολλαπλών HPV γενοτύπων, παρόντων σε διαφορετικές ποσότητες σε ένα δείγμα ιστού, με τη μέθοδο PCR-RFLP, είναι συνήθως σύνθετη και με περιορισμένη ευαισθησία ανίχνευσης των γενότυπων σε μειωμένο ποσοστό. (Grce et Al, 2000).

Η μέθοδος της άμεσης ανάλυσης αλληλουχίας των PCR προϊόντων (Rapid direct sequencing analysis), είναι επίσης τώρα διαθέσιμη για την υψηλή απόδοση σε ρυθμό και ευαισθησία, επιτρέποντας κατά συνέπεια την εφαρμογή σε τακτική κλινική πράξη (Arens, 2001). Εντούτοις, ο προσδιορισμός ακολουθίας δεν είναι κατάλληλος όταν περιέχει ένα ιστικό δείγμα πολλαπλούς γενοτύπους HPV.

6.6.3. Κλινική χρησιμότητα της μοριακής διάγνωσης του HPV.

Η ακριβής τυποποίηση των HPV γονότυπων είναι ουσιαστική για την επαρκή ταξινόμηση των ασθενών στις χαμηλού κινδύνου ή υψηλού κινδύνου ομάδες, που προσδιορίζουν τις γυναίκες σε κίνδυνο για τον καρκίνο τραχήλου μήτρας, είτε για τα προγράμματα διαλογής (screening programs) σε κοινοτικό ή σε κλινικό επίπεδο. Επιπλέον, τα πρώτα επιδημιολογικά στοιχεία αναφέρουν ότι η παρουσία πολλαπλών γενοτύπων HPV σε ένα δείγμα ιστού μπορεί να απεικονίζει την επαναλαμβανόμενη έκθεση στον ιό, αλλά και μπορεί να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ασθενειών (Bachtiary et al, 2002 van der Graaf et al, 2002).

6.7. Μετάδοση και φυσική ιστορία των μολύνσεων από ιούς του θηλώματος

Η μετάδοση των ιών του θηλώματος διευκολύνεται από την ύπαρξη αμιχών ή πληγών στο επιθήλιο (Oriel, 1971). Οι μολύνσεις του γεννητικού συστήματος μεταδίδονται κυρίως με τη σεξουαλική επαφή. Ο αριθμός των σεξουαλικών συντρόφων σχετίζεται με την παρουσία μόλυνσης. Επίσης μπορεί να υπάρξει μετάδοση με φομίτες, με ιατρικά εργαλεία και με σωλήνες λείζερ (Garden 1988, Ferenczy 1990). Η πλειοψηφία των μολύνσεων δεν οδηγεί σε ορατές βλάβες και στην πραγματικότητα μπορεί να αποβάλλονται ή να καταπολεμούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα σε μικρό χρονικό διάστημα. Για τις HPV μολύνσεις του γεννητικού συστήματος παρουσιάζεται μια σχηματική απεικόνιση της προόδου των βλαβών (Σχήμα 5.2). Η παρουσία του HPV έχει δειχθεί και σε επιδερμικές και βλεννώδεις περιοχές του τραχήλου της μήτρας, το δέρμα και τον λάρυγγα που δεν εμφάνιζαν συμπτώματα (Steinberg, 1983). Οι εκτιμήσεις της επίπτωσης της μόλυνσης HPV μεταξύ πληθυσμών των γυναικών σε όλο τον κόσμο κυμαίνονται από 2-44%. (Bosch and de Sanjose, 2003).

6.8. Κακοήθεις και μη κακοήθεις καταστάσεις που σχετίζονται με μολύνσεις από τον ιό του θηλώματος.

Σε καλοήγη θηλώματα οισοφάγου (benign oesophageal papillomas) έχουν ανιχνευθεί σε 51 περιπτώσεις (21,3%) η παρουσία λοίμωξης με τον ιό HPV (K J Syrjänen 2002). Η νεανική λαρυγγική θηλωμάτωση (Juvenile laryngeal papillomatosis) εμφανίζεται σε παιδιά, τα περισσότερα πριν από την ηλικία των 4 έτων, και χαρακτηρίζονται από επαναλαμβανόμενους καλοήθεις όγκους που μπορούν να οδηγήσουν σε αναπνευστική δυσχέρεια και μπορούν να μεταπλαστούν σε καρκίνωμα, τα οποία πολύ συχνά συνδεόνται με τους HPV τύπους 6 και 11.

Οι ιοί του θηλώματος προκαλούν ένα εύρος βλαβών (δερματικές, βλεννώδεις και βλεννοδερματικές). Συγκεκριμένοι τύποι ιών σχετίζονται με βλάβες Bowen και άλλες ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες (Moy, 1989). Η έκθεση σε ήλιο περιοχών με μόλυνση μπορεί να δράσει ως συνκαρκινογόνο ακόμα και σε μολύνσεις με τύπους χαμηλού κινδύνου (Shamanin, 1996). Οι τύποι του γεννητικού συστήματος εντοπίζονται σε δερματικές ή βλεννώδεις περιοχές.

Οι τύποι 6 και 11 που προκαλούν την πλειοψηφία των γεννητικών θηλωμάτων εδράζουν σε βλεννοδερματικές περιοχές όπως στα condylomata accuminata των εξωτερικών γεννητικών περιοχών. Οι τύποι αυτοί σπάνια βρίσκονται σε βλάβες τραχήλου της μήτρας. Κάποιοι τύποι προκαλούν βλάβες Bowen σε εξωτερικές γεννητικές και περιπρωκτικές περιοχές. Η πλειοψηφία των μολύνσεων με HPV πιστεύεται ότι παραμένει κλινικά ασυμπτωματική ή δημιουργεί μη εμφανής μικροβλάβες.

Η λοίμωξη με τον ιό HPV αποτελεί την πιο κοινή σεξουαλικών μεταδιδόμενων νοσημάτων ασθένεια στον κόσμο , και αποτελεί κατ' εκτίμηση το 11% της ολικής εμφάνισης καρκίνου στις γυναίκες. Ο HPV-16 είναι ο πιο συνήθης τύπος που ανιχνεύεται στον καρκίνο τραχήλου μήτρας, και μαζί με τους τύπους 18,31,33, και 45 έχουν ταξινομηθεί ως class I carcinogen – υψηλού κινδύνου. (G Sanclimente). Συνολικά, ο καρκίνος τραχήλου μήτρας είναι η δεύτερη πιο κοινή αιτία του θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες, με κατ' εκτίμηση ετήσια συχνότητα 510.000 διαγνώσεις καρκίνου τραχήλου μήτρας

και 288.000 θανάτους. Περίπου το 70% των αυχενικών καρκίνων προκαλούνται από τους τύπους HPV 16 ή 18.

Ο καρκίνος πρωκτού - ορθού εντοπίζεται σε περίπου 4.000 ανθρώπους ετησίως (620 θάνατοι) στις Ηνωμένες Πολιτείες, και περίπου 80%-90% των καρκίνων πρωκτού - ορθού προκαλούνται από τους ιούς HPV 16 και HPV 18, (Debbie Saslow 2007). Επίσης πάνω από 500.000 νέες περιπτώσεις των πρωκτογεννητικών ακροχορδώνων (anogenital warts) αναγνωρίζονται ετησίως στις Ηνωμένες Πολιτείες, και περίπου το 90% προκαλούνται από τους τύπους HPV 6 ή 11.

Ο καρκίνος του γυναικείου κόλπου-αιδοίου αριθμεί 3.870 περιπτώσεις ετησίως (870 θάνατοι), και τουλάχιστον το 40% αυτών σχετίζονται με τον HPV. (Debbie Saslow 2007) Επίσης αναφέρονται διάφορα ποσοστά λοίμωξης του HPV, σε πεικό καρκίνο, του γυναικείου κόλπου, και της της ουρήθρας.

Τελικά, η πραγματική συνεισφορά των μολύνσεων από ιούς θηλώματος στους ανώπινους καρκίνους μπορεί να ανέρχεται σε ποσοστό 10%. Το γεγονός αυτό κατατάσει συγκεκριμένα τουλάχιστον μέλη της ηλικιακής ομάδας ως τους πιο σημαντικούς παράγοντες προδιάθεσης για την ανάπτυξη καρκίνων στον άνθρωπο.

6.9. Οι ιοί του θηλώματος στον ακανθοκυτταρικό καρκίνο του οισοφάγου.

Το ποσοστό ανίχνευσης του HPV σε ESCC στις διάφορες μελέτες χαρακτηρίζεται από μια ευρεία παραλλαγή, η οποία οφείλεται πιθανώς στις γεωγραφικές, περιβαλλοντικές, και γενετικές διαφορές της μόλυνσης του οισοφάγου με τον HPV. Οι μελέτες μέχρι τώρα μας έχουν παρουσιάσει διχογνωμούμενα αποτελέσματα όσον αφορά την σχέση του ανθρώπινου ιού θηλωμάτων (HPV) σε ESCC. Επίσης, οι διαφορές μπορούν να αποδοθούν στις παραλλαγές στην ευαισθησία των τεχνικών που χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση του ιού και της μεθοδολογίας που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία των δειγμάτων ιστού (καθαρισμός με φορμόλη έναντι του φρέσκου παγωμένου ιστού).

Στην Ευρώπη (εκτός από τη Γαλλία, την Πορτογαλία, και την Ιταλία) και τις Ηνωμένες Πολιτείες υπάρχει χαμηλή συχνότητα της μόλυνσης HPV. Στις

υψηλού κινδύνου περιοχές όπως η Ιαπωνία, η Κίνα, το Χογκ Κονγκ, η Ινδία, το Πακιστάν, η Κορέα, η Νότια Αφρική, η Αλάσκα και η Αυστραλία, το ποσοστό επίπτωσης λοίμωξης είναι άνω το 63%, με μία μέση παγκόσμια επίπτωση του 22%. Ο HPV συνήθως δεν ανιχνεύθηκε ή ανιχνεύθηκε σε χαμηλή συχνότητα στις περιοχές με χαμηλή επίπτωση ESCC όπως οι ευρωπαϊκές χώρες, οι Ηνωμένες Πολιτείες. (Lambot MA) (Alfred King Y. Lam 2000) Από τα 1485 καρκινώματα ESCC που αναλύθηκαν με *in situ hybridisation*, το 22,9% ήταν θετικά για το DNA HPV, όπως ήταν το 15,2% των 2020 περιπτώσεων που εξετάστηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσεων (PCR. (T.Matsha, zur Hausen) Οι συχνότεροι γενότυποι HPV που περιλαμβάνονται σε ESCC είναι Οι HPV -16, 18, 6, και 11, και σε μερικές σειρές οι τύποι 30, 73, 13, 25, 33, 38, 53, και 54. (Szentirmay Z)

Όπως στο καρκίνο τραχήλου μήτρας έτσι και στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα οισοφάγου η πιθανή εμπλοκή των ιών του θηλώματος στην καρκινογένεση έχει δειχθεί με τη βοήθεια πειραματικών ευρημάτων όπως τα κάτωθι:

- α. Η κανονική έκφραση των γονιδίων E/E7 του HPV στα καρκινικά κύτταρα
- β. Η απουσία ανιχνεύσιμης κυτταρικής ρύθμισης των γονιδίων E6/E7 στα καρκινικά κύτταρα.
- γ. Η αθανατοποίηση ανθρωπίνων κυττάρων από την έκφραση τέτοιων γονιδίων
- δ. Η επαγωγή της πρωτεΐνης E6/E7 στην πρόοδο της αύξησης και στην χρωμοσωμική ανισορροπία
- ε. Η παύση της κυτταρικής αύξησης και η αναστροφή του κακοήθους φαινοτύπου σε κύτταρα από κυτταρικές σειρές καρκίνου του τραχήλου μετά από επιλεκτικό φραγμό της γονιδιακής λειτουργίας του E6/E7.

6.10. Εμβόλιο του ανθρώπινου ιού θηλωμάτων (HPV).

Σήμερα υπάρχουν δύο εμβόλια ενάντια στους πύο κοινούς καρκινογόνους τύπους HPV έχουν αναπτυχθεί και έχουν εξεταστεί στις κλινικές δοκιμές. Και τα δύο εμβόλια είναι βασισμένα στην ανασυνδυαζόμενη έκφραση της σημαντικότερης καψικής πρωτεΐνης, της L1 capsid protein, των μοριών virus-like particles (VLPs), που μοιάζουν με το εξωτερικό καψίδιο ολόκληρου του ιού. Ένα από τα εμβόλια, το Gardasil (Merck & Co., A.E.),

προστατεύει από τους τύπους HPV 6, 11,16, και 18 (τετρασθενής), και το άλλο, το Cervarix (GlaxoSmithKline), προστατεύει από τους τύπους 16 και 18 (δισθενής). Και τα δύο εμβόλια στοχεύουν τους HPV16 και HPV18, τα οποία αποτελούν περίπου 70% του καρκίνου τραχήλου μήτρας. Το εμβόλιο της Merck (Gardasil) στοχεύει επίσης τους τύπους HPV6 και HPV11, οι οποίοι αποτελούν περίπου το 90% των εξωτερικών γεννητικών ακροχορδώνων. Ο στόχος του προφυλακτικού εμβολιασμού είναι να μειωθεί η επίπτωση της σχετικής με τον HPV γεννητικής ασθένειας, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου τραχήλου μήτρας, πεικού, κολπικού-αιδοϊκού, και πρωκτικού καρκίνου, και των προκαρκινικών βλαβών. (Debbie Saslow 2007)

Τον Ιούνιο του 2006, η διοίκηση τροφίμων και φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) έγκρινε ένα εμβόλιο για τους τύπους HPV 6, 11, 16, 18 (Gardasil, Merck& Co., INC.) για κλινική χρήση, και η έγκριση για ένα εμβόλιο HPV 16,18, (Cervarix, GlaxoSmithKline) αναμένεται μέσα στο επόμενο έτος. Τα στοιχεία των κλινικών δοκιμών έχουν καταδείξει ότι και τα δύο εμβόλια είναι ασφαλή και ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην παρεμπόδιση των προκαρκινικών αυχενικών βλαβών που προκαλούνται από τους τύπους HPV 16 και 18. Αυτά τα εμβόλια θα μπορούσαν να προλάβουν 70% του καρκίνου τραχήλου μήτρας στις γυναίκες, καθώς επίσης και τους καρκίνους αιδοίου, κόλπου και του πρωκτού- ορθού, οι οποίοι είναι λιγότερο κοινοί, αλλά επίσης με μεγάλη θνησιμότητα. Το εμβόλιο HPV 6 ,11,16,18 θα μπορούσε επίσης να αποτρέψει πάνω από το 90% των γεννητικών ακροχορδώνων και των αναπνευστικών θηλωμάτων, οι οποίοι προκαλούνται σχεδόν αποκλειστικά από τους τύπους HPV 6 και 11. Μετά από την έγκριση του FDA για το Gardsil, η Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) και η American Cancer Society (ACS) Guideline for the Early Detection of Cervical Cancer σύστησε τον καθολικό εμβολιασμό στα 11-12 έτη των κορίτσιων, και προληπτικής ανοσοποίησης στα 13-26 έτος κοριτσιών ή γυναικών ανεξάρτητα από τη σεξουαλική εμπειρία. (Jessica A. Kahn 2007, Karen Honey 2006)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΒΔΟΜΟ

ΙΟΣ EPSTEIN-BARR (EBV)

7.1 Ερπητοϊοί

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

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

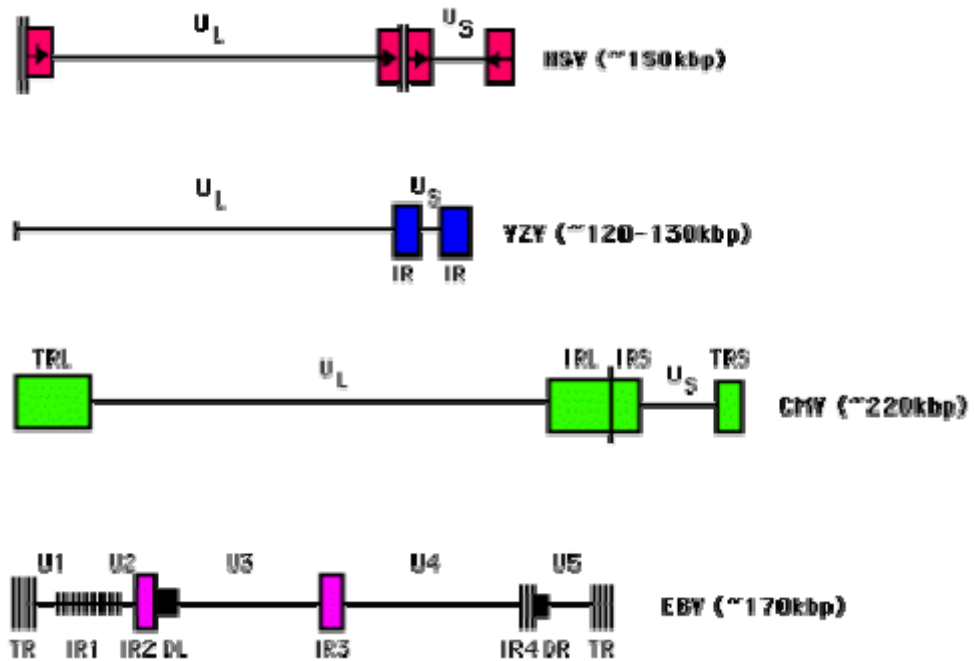
Η μορφολογία όλων των ερπητοϊών είναι παρόμοια και χαρακτηριστική. Αν και έχουν αρκετά κοινά αντιγόνα, μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ τους λόγω διαφορών στο γονιδίωμά τους, καθώς και με ορολογικές δοκιμασίες. Η διάμετρος των σωματιδίων των ερπητοϊών είναι 180-200 nm. Σε ένα πληθυσμό βιρίων, πολλά σωματίδια δεν έχουν έλυτρο και πολλά είναι άδεια καψίδια. Τα συστατικά του βιρίου διατάσσονται ως εξής: 1. DNA με ένα εσωτερικό κέλυφος διαμέτρου 75 nm, 2. ένα εικοσαεδρικό καψίδιο διαμέτρου 95-105 nm το οποίο αποτελείται από 162 εξαγωνικά καψομερίδια, 3. μία

περιβάλλουσα κοκκιώδη ζώνη (tegument) αποτελούμενη από σφαιρικές πρωτεΐνες και 4. ένα περιβάλλον έλυτρο το οποίο περιέχει γλυκοπρωτεΐνες. Όπως και οι άλλοι ιοί με έλυτρο, οι ερπητοϊοί είναι ασταθείς σε θερμοκρασία δωματίου και απενεργοποιούνται εύκολα από λιπιδικούς διαλύτες.

Το DNA είναι ένα μεγάλο γραμμικό δίκλωνο μόριο (double-stranded DNA), βάρους 130-230 kbp. Το γονιδίωμά τους φέρει μοναδικές μεγάλες (UL) και μοναδικές μικρές (US) κωδικοποιούσες περιοχές, οι οποίες περιβάλλονται από τελικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (IR). Οι επαναλαμβανόμενες αυτές αλληλουχίες αναστρέφονται επιτρέποντας την αναδιάταξη των περιοχών UL και US. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να υπάρχει το γονιδίωμα των ερπητοϊών σε τέσσερις ισομερείς μορφές (εικ.7.1). Επίσης η ύπαρξη αυτών των αλληλουχιών επιτρέπει την κυκλοποίηση του DNA, που απαιτείται κατά την διάρκεια του διπλασιασμού.

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

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



Εικόνα 7.1: Η δομή του γονιδιώματος των ερπητοϊών.

Ενδοκύττωση δεν είναι απαραίτητη, αλλά μπορεί να συμβεί (εναλλακτικός τρόπος διείσδυσης). Η σύντηξη εναποθέτει το καψίδιο μέσα στο κυτταρόπλασμα, και στη συνέχεια το καψίδιο μεταναστεύει στον πυρήνα. Το εσωτερικό κέλυφος του ιού εισέρχεται μέσω μίας πυρηνικής οπής και ακολούθως το DNA του ιού κυκλοποιείται. Από την RNA polymerase II του κυτάρου-ξενιστή παράγονται περίπου 50 αγγελιοφόρα RNAs (mRNAs). Διακρίνονται 3 ξεχωριστές κατηγορίες παραγόμενων mRNAs: τα α-mRNAs (ή άμεσα πρώιμα) είναι οι πρωτεΐνες που συντίθενται πρώτες και επιτρέπουν την μεταγραφή του mRNA για την επόμενη ομάδα πρωτεϊνών (β ή πρώιμες). Τα β-mRNAs επιτρέπουν την συνέχιση της μεταγραφής του DNA, η οποία ακολουθείται από την εμφάνιση των τελευταίων πρωτεϊνών (γ-mRNAs ή όψιμων).

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

ανεξάρτητα από την αντιγραφή του DNA ενώ άλλες παράγονται μόνο μετά την αντιγραφή.

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

7.2. Ο ιός Epstein-Barr (EBV)

7.2.1 Γενικά

Ο ιός EBV ή ερπητοϊός του ανθρώπου τύπου 4 ανήκει στους γ ερπητοϊούς. Είναι ευρέως διαδεδομένος παγκοσμίως και άνω του 90% του ανθρώπινου πληθυσμού έχει έρθει σε επαφή με τον ιό. Δεν υπάρχει ζώο που να λειτουργεί ως ξενιστής, αλλά οι ιδιότητές του έχουν μελετηθεί εκτενώς σε σειρές μεταμορφωμένων ανθρώπινων κυττάρων. Παρουσιάζει διπλό κυτταρικό τροπισμό: για τα ανθρώπινα Β-λεμφοκύτταρα (μη παραγωγική λοίμωξη) και για τα επιθηλιακά κύτταρα (παραγωγική λοίμωξη). Βάσει του πολυμορφισμού του EBNA-2 γονιδίου του διακρίνεται σε δύο τύπους: τον τύπο 1 (ή τύπο A) και τον τύπο 2 (ή τύπο B). Έχει αναφερθεί ότι ο τύπος 2 συνδέεται συχνά με Τ-λεμφώματα, ακόμα και σε περιοχές όπου ο τύπος 1 παρουσιάζει μεγαλύτερη επίπτωση (Miyashita, 1991).

Η πρωτοπαθής λοίμωξη από τον EBV αρχίζει στο επιθήλιο του στοματοφάρυγγα, όπου τα βίρια του ιού αντιγράφονται και στην συνέχεια απελευθερώνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα μέσα στη σίελο (Cohen, 1997). Ακολούθως, τα βίρια εισχωρούν στα Β-λεμφοκύτταρα τα οποία φέρουν υποδοχείς για τον ιό κοινούς με συστατικά του συμπληρώματος, και

παραμένουν εντός του πυρήνα σε επισωματική μορφή. Αν και τα κύρια κύτταρα-στόχοι του ιού είναι τα ανθρώπινα Β-λεμφοκύτταρα, προσβάλλει επίσης τα επιθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα των πόρων των σιελογόνων αδένων, τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα ΝΚ κύτταρα, τα μακροφάγα, τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών και τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Iwatsuki,2000).

Τα προσβεβλημένα από τον ιό Β-κύτταρα εκφράζουν ποικίλα EBV αντιγόνα τα οποία δρουν ως μόρια-στόχοι που αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, μόνο ένα μικρό ποσοστό των προσβεβλημένων Β-κυττάρων παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση χάρη στον ανοσοποιητικό μηχανισμό, ο οποίος δρα μέσω του συστήματος MHC-I παράγοντας ειδικά για τα αντιγόνα του EBV κυτταροτοξικά Τ-κύτταρα. Όταν εξασθενήσει η ανοσοποιητική άμυνα του οργανισμού, επανενεργοποιούνται τα προσβεβλημένα Β-κύτταρα με επακόλουθο πολυκλωνικό πολλαπλασιασμό και εξάπλωση του EBV σε άλλους ιστούς.

Η λανθάνουσα EBV λοίμωξη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή του κακοήθους φαινοτύπου και την μεταμόρφωση των μολυσμένων κυττάρων (Shimizu,1994). Κάποια παράγωγα ιικών γονιδίων τα οποία συνδέονται με την λανθάνουσα μόλυνση, χαρακτηρίζονται από βιολογικές ιδιότητες που ενέχονται στην κυτταρική αθανατοποίηση (Komano,1997). Θεωρείται ότι πολλοί ιοί χρησιμοποιούν μία πλειάδα μηχανισμών που τους επιτρέπει να διαφεύγουν από τους ανοσοποιητικούς μηχανισμούς του ξενιστή και να εγκαταστήσουν λανθάνουσα λοίμωξη. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η αναστολή της έκφρασης των ιικών αντιγόνων, η απάλειψη των ειδικών για τον ιό Τ-κυττάρων, η δημιουργία μεταλλαγμένων ιών που παράγουν μη-αντιγονικούς επίτοπους, η παρέμβασή τους στην αντιγονική διαδικασία και η ανοσολογική ανοχή λόγω λοίμωξης σε νεαρή ηλικία (McMichael,1998).

Στην λανθάνουσα λοίμωξη, τα EBV πυρηνικά αντιγόνα (EBNA) αποτελούνται από τα EBNA-1, 2, 3A, 3B, 3C. Μετά την έκφραση των EBNA, έπεται η έκφραση των λανθανόντων μεμβρανικών πρωτεϊνών (LMPs), συμπεριλαμβανομένων των LMP-1, 2A και 2B. Όλα τα EBNAs και LMPs, εκτός από το EBNA-1, είναι μόρια-στόχοι για τα ειδικά για τον EBV κυτταροτοξικά Τ-κύτταρα (Cohen,1997).

Το LMP-1 έχει ογκογενετική δράση προκαλώντας αυξημένη έκφραση κυτταρικών γονιδίων και αναστέλλοντας την απόπτωση με την επαγωγή του

bcl-2 (Henderson,1991). Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι το LMP-1 είναι ένα ιικό ανάλογο της οικογένειας των υποδοχέων του TNF και είναι σημαντικό για την μεταμόρφωση των Β-κυττάρων (Liebowitz,1998).

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

Βασιζόμενοι στα διάφορα πρότυπα έκφρασης των EBV προϊόντων της λανθάνουσας φάσης, διακρίνουμε 3 ξεχωριστούς τύπους λανθάνουσας λοίμωξης in vivo (Rowe,1992). Στον τύπο I εκφράζεται μόνο το EBNA-1. Με αυτόν τον τρόπο, ο ιός παραμένει αόρατος για το ανοσοποιητικό σύστημα γιατί η κυτταρική ανοσία κατευθύνεται έναντι άγνωστων πρωτεϊνών και δεν είναι προγραμματισμένη να αναγνωρίζει το ξένο νουκλεϊκό οξύ. Ο τύπος I ισχύει στα νεοπλασματικά κύτταρα ασθενών με λέμφωμα Burkitt. Στον τύπο II, εκφράζονται το EBNA-1 και τα LMPs. Η αναστολή της έκφρασης των υπόλοιπων γονιδίων επιτρέπει στα μολυσμένα κύτταρα να διαφεύγουν από την ανοσοποιητική επιτήρηση, όπως συμβαίνει στα κύτταρα ασθενών με καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα και Τ-λεμφώματα. Τέλος, σε ασθενείς με AIDS και Β-λεμφώματα καθώς και σε ανοσοκατεσταλμένους εκφράζονται όλα τα αντιγόνα (τύπος III) αλλά είναι εξασθενημένη η ανοσολογική απάντηση του ξενιστή (Iwatsuki,2000).

7.2.2 Κλινική εικόνα

Η πρωτοπαθής λοίμωξη συνήθως προκαλεί μία ήπια, αυτοπεριοριζόμενη ασθένεια και συμβαίνει κυρίως στην αρχή της παιδικής ηλικίας. Στα νεαρά άτομα η οξεία λοίμωξη προκαλεί λοιμώδη μονοπυρήνωση, ενώ σπανιότερο είναι το σύνδρομο Gianotti-Crosti (Strauss,1993). Επειδή η EBV λοίμωξη στην Ασία και την Αφρική λαμβάνει χώρα κατά την παιδική ηλικία, η συμπτωματική λοιμώδης μονοπυρήνωση είναι λιγότερο συχνή σε αυτές τις χώρες από ότι στις δυτικές χώρες και τις ΗΠΑ, όπου η πρωτοπαθής EBV λοίμωξη συμβαίνει στην εφηβεία.

Κατά την οξεία EBV λοίμωξη, η έντονη ανοσοποιητική αντίδραση από τα ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα έναντι των προσβεβλημένων Β-κυττάρων, προκαλεί χαρακτηριστική κλινική εικόνα με εμπύρετο, κυνάγχη, λεμφαδενοπάθεια και λεμφοκυττάρωση. Στο ήμισυ των περιπτώσεων συνυπάρχει σπληνομεγαλία. Περιστασιακά εμφανίζεται κηλιδοβλατιδώδες ή

πετεχειώδες εξάνθημα. Συνήθης εκδήλωση της λοιμώδους μονοπυρήνωσης είναι η ηπατίτιδα με ηπατομεγαλία και ίκτερο. Σπανιότερα υπάρχει προσβολή του ΚΝΣ με κεφαλαλγία και επώδυνη νευρίτιδα.

Σε ανοσοκατεσταλμένους ή ανοσοανεπαρκείς ασθενείς (ασθενείς με AIDS ή με μεταμόσχευση νεφρού) προκαλείται μία πλειάδα νόσων που σχετίζονται με τον λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό (Liloglou,1994). Η λανθάνουσα λοίμωξη από τον EBV έχει συνδεθεί με διάφορες κακοήθειες καταστάσεις σε μη ανοσοκατεσταλμένα άτομα, στις οποίες περιλαμβάνονται το αφρικανικό λέμφωμα Burkitt, το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα, περιφερικά λεμφώματα T-κυττάρων, ο γαστρικός καρκίνος κ.ά. (Jones 1988,Harabuchi 1996).

7.2.3 Διάγνωση και θεραπεία

Στις περιπτώσεις πρωτοπαθούς λοίμωξης, ανιχνεύονται υψηλοί τίτλοι ειδικών για τον ιό IgM και IgG αντισωμάτων κατά των αντιγόνων της κάψας του ιού (Virus Capsid Antigen,VCA). Τα IgG αντισώματα ανιχνεύονται εφ'όρου ζωής. Αύξηση των τίτλων των IgG αντισωμάτων υποδηλώνει ενεργοποίηση του EBV. Σε περιπτώσεις χρόνιας λοίμωξης, ανιχνεύονται υψηλοί τίτλοι IgG αντισωμάτων. Τα IgA αντισώματα αυξάνονται σε ασθενείς με καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα. Στις περισσότερες περιπτώσεις EBV λεμφοπολλαπλασιαστικών διαταραχών δεν παρατηρείται σημαντική αύξηση των τίτλων των αντισωμάτων (Strauss,1993). Η ανίχνευση των EBV αντισωμάτων γίνεται με την δοκιμασία Paul Bunnell (δοκιμασία συγκόλλησης ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου) και με τεχνικές ανοσοφθορισμού. Η εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) επιτρέπει την ανίχνευση του DNA του ιού ακόμα κι όταν αυτό υπάρχει σε μικρές ποσότητες. Λόγω της υψηλής της ευαισθησίας, τα αποτελέσματα της PCR θα πρέπει να ερμηνεύονται προσεκτικά διότι δείγματα επιμολυσμένα με EBV ή η παρουσία παρακείμενων EBV μολυσμένων κυττάρων μπορούν να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Khanim,1996).

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

Ως προς τα λεμφώματα που οφείλονται σε EBV, χορηγούνται διάφορα χημειοθεραπευτικά σχήματα που περιλαμβάνουν δοξορουμπικίνη, πρεδνιζόνη και κυκλοφωσφαμίδη. Εν τούτοις, τα επιθετικά EBV λεμφώματα παρουσιάζουν αντίσταση στη συμβατική χημειοθεραπεία. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο σύνδρομο συστηματικής αιμοφαγοκυττάρωσης και σε έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με ανθεκτικότητα σε πολλαπλά φάρμακα (Su,1995). Προς το παρόν για αυτές τις περιπτώσεις δεν υπάρχει καθιερωμένο θεραπευτικό πρωτόκολλο. Σε επίπεδο κλινικών δοκιμών χρησιμοποιούνται αντί-CD19 μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία σταματούν τον κυτταρικό κύκλο σε κυτταρικές σειρές λεμφώματος Burkitt in vitro.

7.3. Κακοήθεις καταστάσεις που σχετίζονται με μολύνσεις με έρπητοιούς.

Η οικογένεια των ανθρώπινων έρπητοιών έχει ενοχοποιηθεί ως αιτιολογικοί παράγοντες σε διάφορους ανθρώπινους καρκίνους. Ο ιός Epstein-Barr (EBV) αναφέρεται ότι εμπλέκεται στο καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα και στο αφρικανικού λέμφωμα Burkitt. Ο απλός έρπης τύπου 2 (herpes simplex virus type 2 HSV-2) από ορολογικές και μοριακές μελέτες αναφέρεται ότι συνδέεται με τον καρκίνο τραχήλου μήτρας. Ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (HCMV) αναφέρεται ότι συνδέεται με το καρκίνο τραχήλου μήτρας, τα αδενοκαρκινώματα του προστάτη και του παχέος εντέρου, και το σάρκωμα (KS) Kaposi. Ο ανθρώπινος έρπητοιός 6 (HHV-6) συνδέεται με λεμφοδυσπλαστικά σύνδρομα, και ο Kaposi's sarcoma-associated herpes virus (KSHV), επίσης γνωστό ως human herpes virus 8(HHV-8) συνδέεται με Kaposi's sarcoma (KS). (A. Zafiropoulos)

7.4. Οι έρπητοιοί σε ακανθοκυτταρικό καρκίνο του οισοφάγου.

Η πιθανότητα της συμμετοχής EBV στην καρκινογένεση του ESCC ενισχύεται λόγω της ανατομικής στενότητας του ρινοφάρυγγα και του οισοφάγου. (Jenkins TD 1996) Σε διάφορες μελέτες, Η παρουσία του ιού EBV ανιχνεύθηκε σε ποσοστό μέχρι και 35,5 % ακανθοκυτταρικών νεοπλασμάτων του οισοφάγου από Κινέζους και Γερμανούς ασθενείς. (S. Awerkiew 2005, Wang LS 1999). Από 77 δείγματα ασθενών με οισοφαγικό καρκίνο, σε 3 περιπτώσεις βρέθηκαν λοίμωξη με τον ιό Epstein-Barr χρησιμοποιώντας την

αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσεων. (Hong T) και σε 5/60 δείγματα ESCC. (Jenkins TD)

Εντούτοις, ο Alfred King Y. Lam δεν ανίχνευσε καμία λοίμωξη EBV σε 74 ESCC από Κινέζους ασθενείς στο Χογκ Κονγκ, με την μέθοδο in situ hybridisation (ISH) . Πρόσφατα, το ίδιο αρνητικό αποτέλεσμα αναφέρθηκε σε ESCC από 41 ιαπωνικούς ασθενείς από τους Mizobuchi et al and Chang F 2000.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΎΓΔΩΟ.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

8.1. Γενικά. Προέλευση των δειγμάτων.

Το υλικό από τους ασθενείς προήλθε από το Παθολογοανατομικό Τμήμα του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΕ.ΠΑ.Γ.ΝΗ), και αφορούσαν το χρονικό διάστημα 1989-2004. Επιλέχθησαν και ανασύρθηκαν 30 παρασκευάσματα παραφίνης ακανθοκυτταρικού νεοπλασματος οισοφάγου, από 30 ασθενείς, και 31 παρασκευάσματα φυσιολογικού οισοφαγικού ιστού από 31 ασθενείς. Όλοι οι ασθενείς ήταν έλληνες υπήκοοι.

Όλα τα δείγματα ESCC προήλθαν από το ανώτερο και το μέσο τριτημόριο του οισοφάγου. Το στάδιο διαφοροποίησης των δειγμάτων ESCC καθορίστηκε σύμφωνα με τις ιστοπαθολογικές αξιολογήσεις ως καλής, μέτριας, και πτωχής διαφοροποίησης, ενώ αντίστοιχα το στάδιο της νεοπλασίας με τα κριτήρια ταξινόμησης TNM [The 2002 American Joint Committee on Cancer Tumor-Node-Metastasis (TNM) classification system], αντίστοιχα (πίνακας 1).

Πίνακας 8.1: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ESCC ασθενών.

Χαρακτηριστικά	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό %
Διαφοροποίηση		
<i>καλή</i>	5	16,6
<i>μέτρια</i>	15	50
<i>πτωχή</i>	10	33,3
Στάδιο νόσου *		
<i>I</i>	0	0
<i>II</i>	2	6,6
<i>III</i>	19	63,3
<i>IV</i>	9	30
Φύλο		
<i>Άρρεν</i>	26	86,6
<i>Θήλυ</i>	4	13,3
Ηλικιακή ομάδα		
<i>40-60</i>	7	23,3
<i>61-75</i>	14	46,6
<i>76-100</i>	9	30
Χρήση καπνού		
<i>Καπνιστές</i>	22	73,3
<i>Μη καπνιστές</i>	8	26,6
Χρήση αλκοόλ		
<i>Χρήστες</i>	23	76,6
<i>Μη χρήστες</i>	7	23,3

Η ομάδα των ασθενών αποτελούταν από 26 άνδρες και 4 γυναίκες, μεταξύ 46 και 100 ετών (μέση ηλικία 67 έτη). Τα φυσιολογικά δείγματα μάρτυρες επιλέχτηκαν έτσι ώστε η ηλικία και το φύλο να αντιστοιχούν σύμφωνα με τις περιπτώσεις δειγμάτων των ασθενών ESCC που υποδείχθηκαν ανωτέρω. Άλλες κλινικές παράμετροι οι οποίοι αξιολογήθηκαν είναι η χρήση καπνών, η χρήσης οινόπνεύματος, και η μόλυνση με τον HPV, οι οποίοι και συσχετίστηκαν επίσης με την ανάπτυξη ESCC (πίνακας 8.1).

Η επιλογή των προς μελέτη παρασκευασμάτων παραφίνης, όσον αφορά τα ακανθοκυτταρικά νεοπλάσματα, έγινε με τη βοήθεια της παθολογοανατόμου, έτσι ώστε να υπάρχει όσο το δυνατό μεγαλύτερη ποσότητα καρκινικού ιστού (λιγότερος συνδετικός ή παρακείμενος

φυσιολογικός ιστός, αιμοφόρα αγγεία). Αυτό αποσκοπούσε στο να υπάρχει η μεγαλύτερη δυνατή κυτταρική ομοιογένεια στο τμήμα του ιστού που θα ελεγχόταν. Με αντίστοιχο τρόπο επιλέχθηκαν τα παρασκευάσματα φυσιολογικού οισοφαγικού ιστού. Όλα τα παρασκευάσματα φυσιολογικού οισοφαγικού ιστού είχαν εξαιρεθεί ενδοσκοπικά, ενώ μέρος από τα ακανθοκυτταρικά νεοπλάσματα είχαν εξαιρεθεί ενδοσκοπικά και τα υπόλοιπα χειρουργικά και αφορούσαν τη χρονική περίοδο 1989-2004.

Με τη χρήση μικροτόμου κόπηκαν 5-10 τομές από κάθε δείγμα, πάχους 5-10μm έκαστη. Η λεπίδα του μικροτόμου πλενόταν με ξυλένιο κάθε φορά που θα κοβόταν ένα νέο παρασκεύασμα, έτσι ώστε να αποφευχθεί η επιμόλυνση του DNA μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων. Οι τομές από κάθε παρασκεύασμα μεταφέρθηκαν σε σωλήνα erpendorf 1.5ml.

8.2. Εκχύλιση DNA από ιστούς παραφίνης

Στις τομές προστίθεται 1ml ξυλόλης για την αποπαραφίνωση τους. Ακολουθεί προσθήκη 1ml αιθανανόλης για την απομάκρυνση της ξυλόλης. Στην συνέχεια ο ιστός τεμαχίζεται και ομογενοποιείται σε διάλυμα λύσης. Το διάλυμα λύσης αποτελείται από 10 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, και 0.5% SDS. Ο ομογενοποιημένος ιστός επωάζεται σε θερμοκρασία 60°C για διάστημα 36-48 ωρών, προσθέτοντας ανά 12ωρο πρωτεϊνάση K σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml. Ακολουθεί εκχύλιση των νουκλεϊνικών οξέων (DNA και RNA) με φαινόλη-χλωροφόρμιο, που συντελεί ταυτόχρονα στην απενεργοποίηση της πρωτεϊνάσης K. Στην υδατική φάση που παραμένει προστίθεται 1/20 του όγκου 5M NaCl και 2.5 όγκοι ψυχρής (-20°C) απόλυτης αιθανόλης για την κατακρήμνιση του DNA. Το DNA επανακτάται σαν ίζημα με φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 15 min στους 4°C, πλένεται με ψυχρή αιθανόλη 70% για απομάκρυνση των αλάτων και αφήνεται μετά να στεγνώσει. Επαναδιαλύεται με 30-50ml δισαπυεσταγμένου-αποστειρωμένου ύδατος και διατηρείται σε θερμοκρασία 4°C, ή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στους -20°C. Η ποσότητα και καθαρότητα του DNA μπορεί να υπολογιστεί με φωτομέτρηση στα 260nm και στα 280nm ((UV/VIS spectrophotometer A_{260}/A_{280} , Sambrook et al 1989), ή αδρά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη (όσον αφορά μόνο την ποσότητα του DNA).

8.2.1. Τεχνική εκχύλισης με φαινόλη-χλωροφόρμιο

Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από υδατικά διαλύματα DNA. Το υδατικό διάλυμα αναμιγνύεται με ίσο όγκο φαινόλης, φυγοκεντρείται στις 13.000 στροφές για 1 min που το διαχωρίζει σε υδατική και οργανική φάση. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε καινούργιο erpendorf και επανεκχυλίζεται με ίσο όγκο φαινόλης/χλωροφορμίου 1:1. Η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται και η υδατική φάση επανεκχυλίζεται με ίσο όγκο χλωροφορμίου. Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη και NaCl, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο (Sambrook et al 1989).

8.3. Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR)

8.3.1 Αρχές της μεθόδου

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

Το υπόστρωμα DNA επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση προερχόμενη από θερμόφιλα βακτήρια (*Thermus aquaticus*- Taq, *Thermus thermophilus*- Tth), μίγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων και το ζεύγος των εκκινητών (primers). Οι τελευταίοι είναι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες που παρουσιάζουν ομολογία ως προς δύο θέσεις εκατέρωθεν της DNA αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί, οπότε και προσδένονται σε αυτές. Αρχικά γίνεται θερμική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 95°C για 5 min, ώστε να διαχωριστούν οι αλυσίδες και να μπορέσει να γίνει ο υβριδισμός, ο οποίος - με τη σειρά του- σηματοδοτεί την έναρξη της προσθήκης, από την DNA πολυμεράση, δεσοξυριβονουκλεοτιδίων ομολόγων προς τις αντίστοιχες θέσεις της μητρικής

αλυσίδας. Ακολουθούν 30-35 κύκλοι, καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει τρία βήματα: 94°C (αποδιάταξη), 55-60°C (υβριδισμός των εκκινητών) και 72°C (πολυμερισμός), διάρκειας περίπου 30-40 sec το κάθε βήμα. Τελικό αποτέλεσμα είναι η εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του DNA σύμφωνα με την εξίσωση $N = \eta(1 + e)^c$, όπου $N =$ η τελική ποσότητα του προϊόντος, $\eta =$ η αρχική ποσότητα του υποστρώματος, $e =$ η απόδοση της αντίδρασης, και $c =$ ο αριθμός των κύκλων της PCR (Mullis & Faloona, 1987).

8.3.2 Ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR

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

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

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

3. κατάλληλες συγκεντρώσεις δεσοξυροβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και ιόντων Mg: Τα ιόντα Mg είναι απαραίτητος συμπαραγόντας για τη δράση της πολυμεράσης και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην ποσότητα τους. Μεγάλες

συγκεντρώσεις $MgCl_2$ αυξάνουν την ενεργότητα της πολυμεράσης, μειώνοντας όμως ταυτόχρονα την πιστότητα της. Το αντίθετο ισχύει για μικρότερες συγκεντρώσεις. Οι συνήθεις ιδανικές συγκεντρώσεις ιόντων Mg κυμαίνονται περί των 25mM/αντίδραση (Myers & Gelfand, 1991). Με δεδομένο ζεύγος εκκινητών, η ομαλοποίηση των συνθηκών σε μια αντίδραση PCR περιλαμβάνει πειράματα όπου σταδιακά μεταβάλλονται, ανεξάρτητα μεταξύ τους, η θερμοκρασία υβριδισμού και η συγκέντρωση ιόντων Mg. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR απαραίτητη προϋπόθεση είναι να τερματισθεί η αντίδραση όσο ακόμη βρίσκεται στην εκθετική της φάση. Μόνο τότε μπορεί να γίνει γραμμική αντιστοίχιση της τελικής ποσότητας προϊόντος στην αρχική ποσότητα υποστρώματος. Η ανωτέρω προϋπόθεση διασφαλίζεται με την επιτέλεση προκαταρκτικών πειραμάτων, όπου του υπόστρωμα υφίσταται διαδοχικές αραιώσεις (δημιουργία πρότυπης καμπύλης) έως ότου πάψει να διατηρείται η γραμμική αυτή σχέση.

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

8.3.3. Ρυθμιστικά διαλύματα της PCR

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

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

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

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

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

8.3.4. Σχεδιασμός εκκινητών και συνθήκες των αντιδράσεων PCR

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

1μl από το εκχυλισμένο DNA κάθε δείγματος υφίστανται ενζυμική ενίσχυση σε τελικό όγκο 50 μl. Η αντίδραση περιλαμβάνει 5μl ρυθμιστικού διαλύματος, 200μM από το κάθε dNTP, 0.5μM από κάθε εκκινητή και 1.25 U Taq πολυμεράση. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται δυο δείγματα με όλα τα υλικά της PCR εκτός του εκχυλισμένου DNA ως ελεγκτικά στοιχεία για πιθανή επιμόλυνση στην αντίδραση. Το μίγμα προεπωάζεται για 1min στους 95°C και ακολουθούν 35 κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:

α. β-σφαιρίνη: Για τον έλεγχο της ποσότητας του DNA που εκχυλίζεται από ιστούς από παραφίνη ως προς την ικανότητα τους να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα από την Taq πολυμεράση, τα δείγματα ελέγχονται με ενίσχυση μιας περιοχής 110bp του γονιδίου της β-σφαιρίνης, το οποίο χρησιμοποιείται ως γονίδιο μάρτυρας. Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 56°C για 40sec και 72°C για 40 sec, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο.

β. K-ras: Για την εύρεση μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου K-ras ενισχύεται πρώτα η αντίστοιχη περιοχή που περιέχει το κωδικόνιο 12 με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές K5' και K3' (Jiang, 1989). Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 58°C για 45sec και 72°C για 40 sec, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο. Μέρος των προϊόντων PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 157bp.

γ. H-ras: Για την εύρεση μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου H-ras ενισχύεται πρώτα η αντίστοιχη περιοχή που περιέχει το κωδικόνιο 12 με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους εκκινητές (Jiang, 1989). Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 62°C για 45sec και 72°C για 50 sec, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1

sec ανά κύκλο. Μέρος των προϊόντων PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 312 bp.

δ. N-ras: Για την εύρεση μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου N-ras ενισχύεται πρώτα η αντίστοιχη περιοχή που περιέχει το κωδικόνιο 12 με την τεχνική της PCR. Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 54°C για 45sec και 72°C για 40 sec, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο. Μέρος των προϊόντων PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 83bp.

ε. BRAF: Για την εύρεση μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 15 στη θέση V600E του γονιδίου BRAF ενισχύεται πρώτα η αντίστοιχη περιοχή που περιέχει το κωδικόνιο 15 με την τεχνική της PCR. Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 94°C για 30 sec, 54°C για 30 sec και 72°C για 30 sec, επί 39 κύκλους σύνολο. Μέρος των προϊόντων PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 225bp.

ζ. HPV: Για την ανίχνευση του ιού χρησιμοποιήθηκαν οι " γενικοί" εκκινητές GP5 και GP6 (Snijders et al, 1990), οι οποίοι παρουσιάζουν ομολογία με μια συντηρητική περιοχή του L1 ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) των εξής τύπων του ιού HPV: 6,11,16,18,31 και 33 , ενώ με αρκετές διαφορές στην συμπληρωματικότητα των εκκινητών μπορούν να ενισχυθούν και οι τύποι: 1, 2, 5 και 8, οι οποίοι όμως δεν απαντώνται συχνά στο γυναικολογικό σύστημα. Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης χρησιμοποιώντας τους γενικούς εκκινητές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 52°C για 45 sec και 72°C για 40 sec, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο. Μέρος των προϊόντων PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 150bp. Η διάκριση του τύπου των παραπάνω ιών γίνεται στην συνέχεια με πέψη των προϊόντων PCR με την περιοριστική ενδονουκλεάση Rsa I. Επίσης η ανίχνευση των τύπων 11, 16, 18 και 33 του ιού, οι οποίοι απαντώνται συχνότερα σε αλλοιώσεις του γεννητικού συστήματος, γίνεται και με ένα "ταυτόχρονο" (multiplex) PCR στο οποίο συνυπάρχουν "ειδικοί" εκκινητές για τον κάθε τύπο ιού, ενισχύοντας τμήματα DNA διαφορετικού

μήκους. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζουν πλήρη ομολογία με την αντίστοιχη νουκλεοτιδική αλληλουχία του E6 πρώιμου γονιδίου του κάθε τύπου ιού (Arends, 1991). Οι συνθήκες ενίσχυσης χρησιμοποιώντας τους "ειδικούς" εκκινητές είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 56°C για 45sec και 72°C για 50 sec, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο. Μέρος των προϊόντων PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 143bp για τον HPV18, 171bp για τον HPV33, 211bp για τον HPV11 και 315bp για τον HPV16. Για την ταυτοποίηση της ειδικότητας της αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες τα πλασμίδια που φέρουν το DNA των HPV τύπων 11, 16, 18, 33. Για τη γενική διαλογή (screening) του HPV DNA, τα κύτταρα HeLa με τις συντηρημένες L1 ακολουθίες των τμημάτων HPV χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός έλεγχος.

η. HPV18: Για την ανίχνευση του ιού HPV18 χρησιμοποιήθηκαν επιπρόσθετα κάποιοι "ειδικοί" εκκινητές (HPV 18-1 και 18-2) για τον ιό. Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 61°C για 45sec και 72°C για 40 sec, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο. Μέρος των προϊόντων PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 200bp.

θ. EBV: Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές EBV-1 και EBV-2 (Rogers, 1990). Οι συνθήκες της ενζυμικής ενίσχυσης είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 72°C για 30 sec και 72°C για 30 sec, αυξάνοντας τον χρόνο επέκτασης 1 sec ανά κύκλο. Το προϊόν της PCR αντίδρασης έχει μήκος περίπου 375 bp και ακολουθεί ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Για την ταυτοποίηση της ειδικότητας της αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες το EBV DNA από τη κυτταρική σειρά marmoset β19 (ATCC).

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις αντιδράσεις PCR, καθώς επίσης και τα αναμενόμενα PCR μεγέθη τεμαχίων συνοψίζονται στον πίνακα I. Όλες οι αντιδράσεις PCR εκτελέσθηκαν σε συνολικό όγκο 25μl περιέχοντας 5μM 10X PCR buffer (200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl), 1.5mM MgCl₂, 0.2mM από κάθε deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), 0.6 μονάδες recombinant Taq DNA polymerase

(Invitrogen Ltd., UK) και 100ng of genomic DNA. 10μl κάθε μίγματος αντίδρασης υποβάλλονταν σε ηλεκτοφόρηση πηκτώματος αγαρόζης 2%, και ακολούθως γίνονταν ανέλυση αυτού για την επιβεβαίωση της παρουσίας του σωστού DNA amplimere.

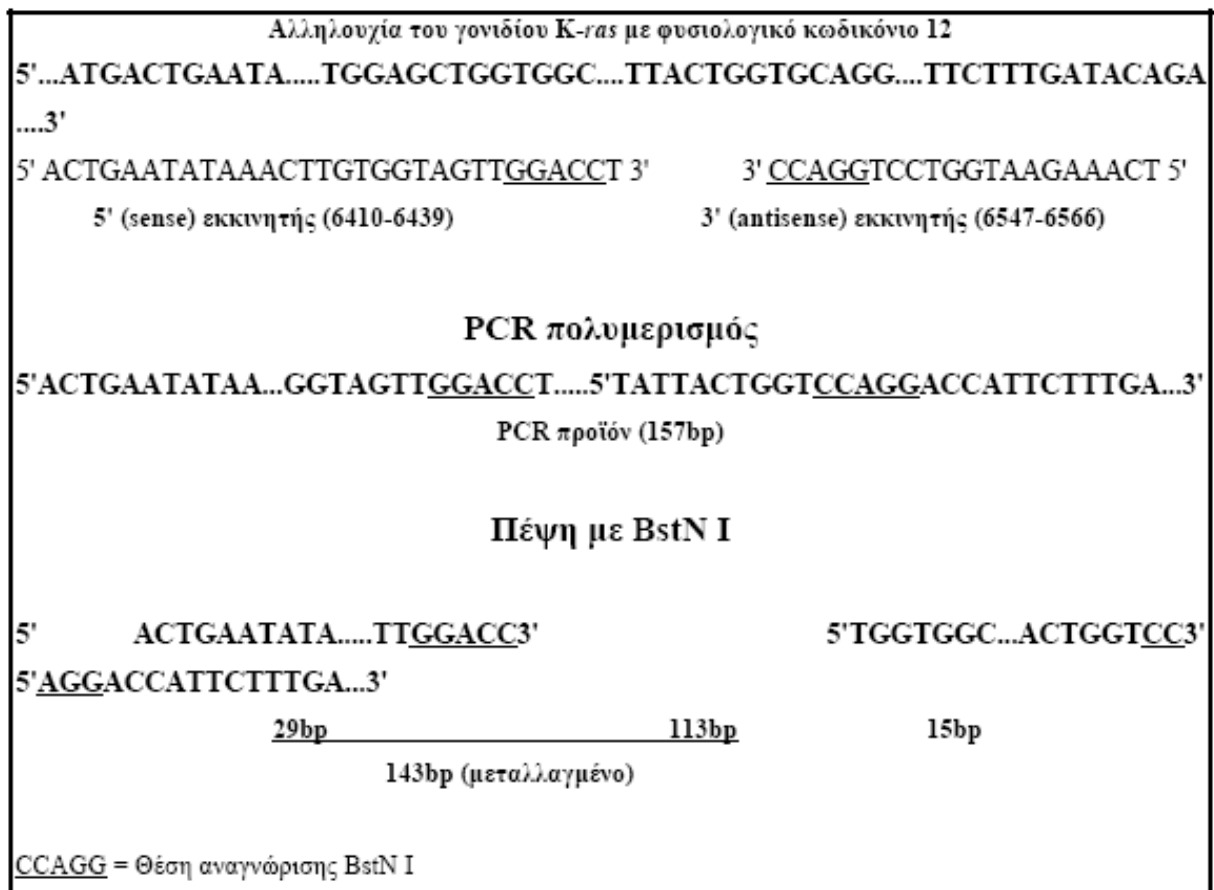
8.4 Μέθοδοι προσδιορισμού μεταλλάξεων

8.4.1. Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 των τριών γονιδίων της οικογένειας ras και στηρίχθηκε στην πέψη των PCR προϊόντων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

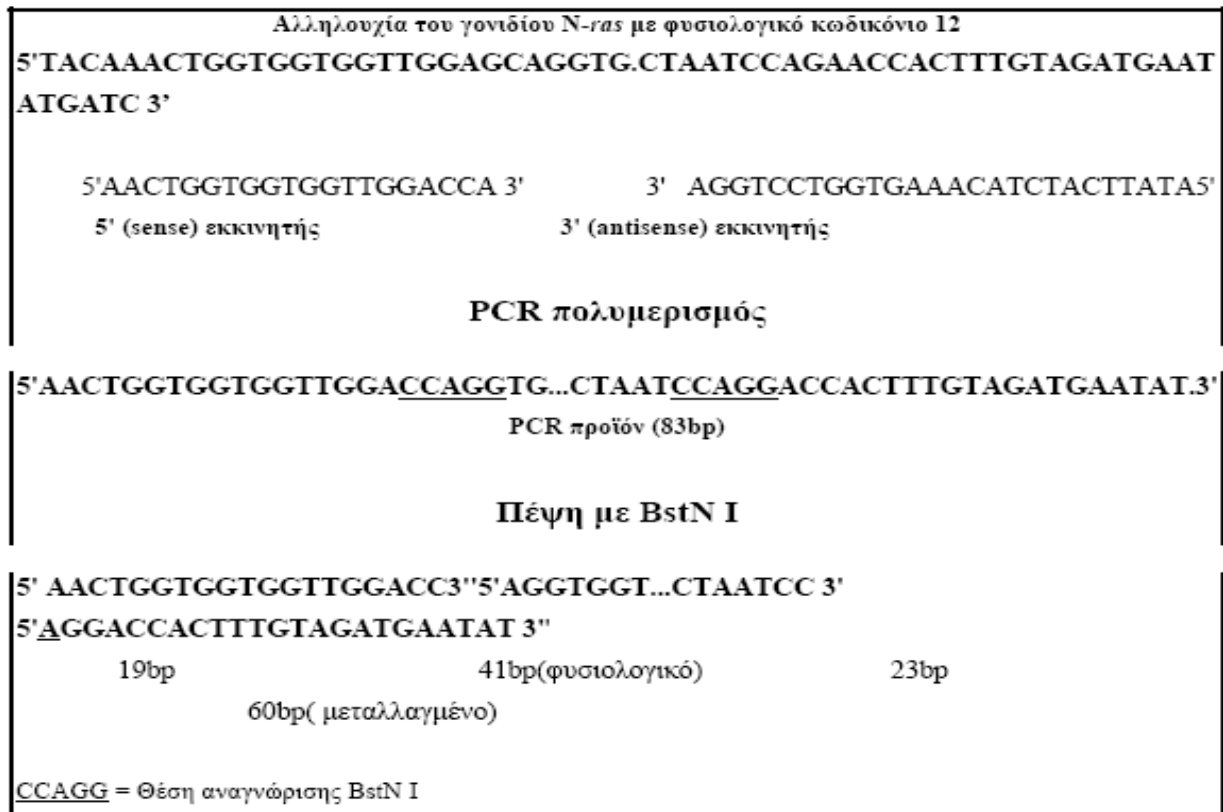
K-ras : Η ανάδειξη σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου K-ras καθίσταται δυνατή με την εισαγωγή μιας μη ομόλογης (mismatch) βάσης στον κάθε εκκινητή. Δημιουργούνται έτσι δύο θέσεις αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BstNI/MvaI, από τις οποίες η μία περιλαμβάνει το κωδικόνιο 12 και η άλλη χρησιμεύει ως "μάρτυρας" ελέγχου πιστότητας της πέψης (Σχήμα 8.1). Η έλλειψη ενδογενών θέσεων αναγνώρισης από άλλες ενδονουκλεάσες στο κωδικόνιο 12 του K-ras αποκλείει την ψευδώς θετική ανεύρεση μεταλλάξεων. Όπως φαίνεται στο σχήμα 8.1, ο εκκινητής του 5' άκρου έχει ενσωματωμένο ένα κατάλοιπο κυτοσίνης αντί γουανίνη στην πρώτη θέση του κωδικονίου 11. Δημιουργείται έτσι μία θέση αναγνώρισης για το BstNI/MvaI (CCTGG), η οποία περιλαμβάνει τα δύο πρώτα νουκλεοτίδια του κωδικονίου 12 (GGT). Σημειακή μετάλλαξη ενός από τα δύο νουκλεοτίδια αυτά προκαλεί καταστροφή της θέσης αναγνώρισης, οπότε και το ένζυμο δεν τεμαχίζει σε θραύσματα 113bp και 29bp, όπως στο φυσιολογικό PCR προϊόν, αλλά παράγεται ένα θραύσμα μεγέθους 143bp. Σημειακή μετάλλαξη στο τρίτο νουκλεοτίδιο (θυμίνη) του κωδικονίου 12 δεν ελέγχεται με τον τρόπο αυτό, αλλά και δεν μας ενδιαφέρει, καθώς όλα τα κωδικόνια που ενδέχεται να προκύψουν κωδικοποιούν το αμινοξύ (γλυκίνη) του αμετάλλακτου κωδικονίου (μεταλλάξεις χωρίς νόημα- non sense). Μέρος των προϊόντων της PCR αντίδρασης (30 μl) υφίστανται πέψη με 20U της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BstNI/MvaI στους 60oC για 4 ώρες. Η κυτταρική σειρά SW480 που χαρακτηρίζεται από ομόζυγη μεταλλαγή στο κωδικονίο 12, χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα ελέγχου για

την ανίχνευση παρουσίας των K-ras μεταλλαγών. Τα προϊόντα της πέψης αναλύονται εν συνεχεία σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 8% (ή σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία), όπου παρατηρούνται τα θραύσματα DNA διαφορετικού μήκους για το φυσιολογικό και μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, κατόπιν χρώσης με νιτρικό άργυρο.



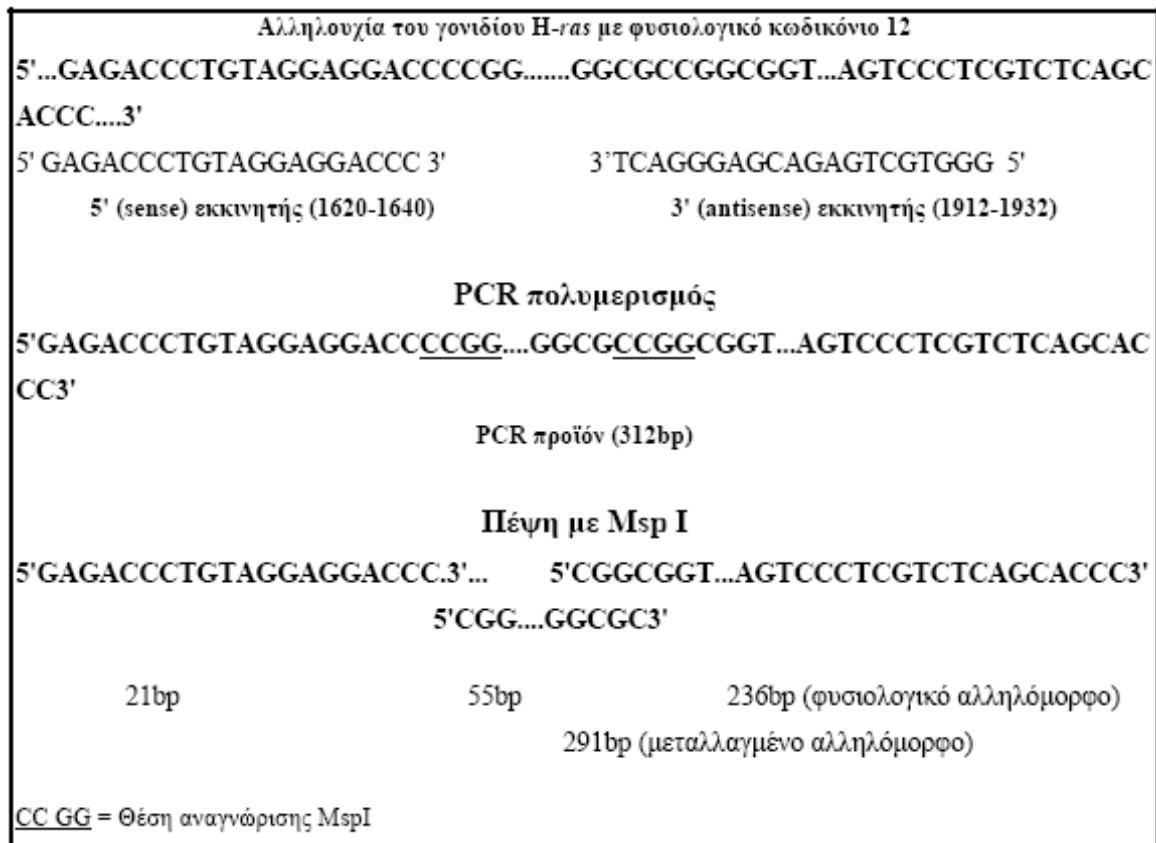
Σχήμα 8.1. Απεικόνιση της αρχής λειτουργίας της PCR-RFLP μεθόδου για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου K-ras.

N-ras : Η μεθοδολογία που περιγράφηκε στην περίπτωση του K-ras διέπει και την ανίχνευση μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του N-ras . 30 μl από κάθε προϊόν PCR αντίδρασης (περιοχή 83bp που περιέχει το κωδικόνιο 12) πέπτεται με 20U BstNI/MnA1 στους 60oC για 4 ώρες. Τα προϊόντα της πέψης αναλύονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% ή σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Πέραν ενός κοινού θραύσματος 23bp, το φυσιολογικό N-ras διασπάται σε θραύσματα 41bp και 19bp, ενώ το μεταλλαγμένο αναλύεται σε ένα θραύσμα μήκους 60bp.



Σχήμα 8.2. Απεικόνιση της αρχής λειτουργίας της PCR-RFLP μεθόδου για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *N-ras*.

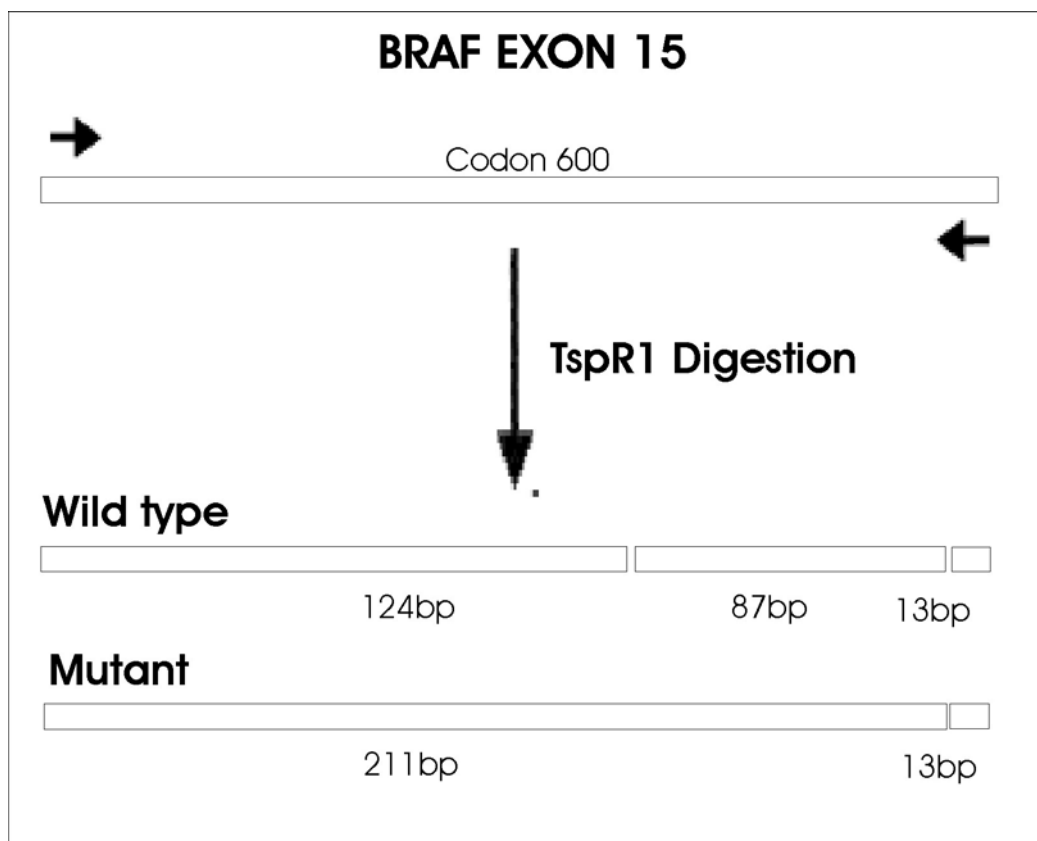
H-ras : Το γονίδιο αυτό φέρει ενδογενώς δυο θέσεις αναγνώρισης (CCGG) για την περιοριστική ενδονουκλεάση *Msp I*. Και οι δύο βρίσκονται στο προϊόν PCR, με τη χρήση των εκκινητών που επιλέγησαν. Η πρώτη βρίσκεται στον εκκινητή του 5' άκρου, στο εσόνιο πριν το πρώτο κωδικοποιό εξόνιο, χρησιμεύοντας ως θέση ελέγχου της πέψης. Η δεύτερη θέση είναι πολυμορφική για μεταλλάξεις σε ένα από τα δύο πρώτα νουκλεοτίδια του κωδικονίου 12 του *H-ras* . 30 μl από κάθε προϊόν PCR υφίσταται πέψη με 20U της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Msp I* στους 37oC για 16 ώρες. Τα προϊόντα της πέψης αναλύονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 6%. Το ένζυμο διασπά το φυσιολογικό *H-ras* σε δύο θραύσματα 236bp και 55bp, αντί ενός θραύσματος μεγέθους 291bp σε περίπτωση μετάλλαξης στο κωδικόνιο 12.



Σχήμα 8.3. Απεικόνιση της αρχής λειτουργίας της PCR-RFLP μεθόδου για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου H-ras.

BRAF: Για την εύρεση μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 15 στη θέση V600E του γονιδίου BRAF ενισχύεται πρώτα η αντίστοιχη περιοχή που περιέχει το κωδικόνιο 15 με την τεχνική της PCR. Μέρος των προϊόντων PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η επιθυμητή ενίσχυση των 225bp. Η διαδικασία της πέψης περιορισμού πραγματοποιήθηκε με 4 U TspRI για 8 ώρες σε 65°C, σε 5 μl PCR προϊόντων, όπου παράγονται τρεις σημαντικές ζώνες των 124bp, 87bp, και 13bp στο φυσιολογικό wild-type γονίδιο. Στην αλλοιωμένη μεταλλαγμένη ακολουθία, μια tspR1 περιοχή χάνεται, και η πέψη παράγει δύο σημαντικές ζώνες των 211bp και 13bp.

Σχήμα 8.4. Απεικόνιση της αρχής λειτουργίας της PCR-RFLP μεθόδου για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 15 του γονιδίου BRAF.



HPV: Για την εύρεση του τύπου HPV χρησιμοποιώντας τους "γενικούς" εκκινητές, μέρος των προϊόντων (30 μl από κάθε προϊόν PCR) υφίσταται πέψη με 40U της περιοριστικής ενδονουκλεάσης RsaI. Τα προϊόντα της πέψης αναλύονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 8%. Μετά την περιοριστική πέψη προκύπτουν θραύσματα 39bp και 109bp για τον HPV11, 30bp, 42bp και 70bp για τον HPV16, 30bp, 38bp και 77bp για τον HPV18 και 30bp, 39bp και 70bp για τον HPV33.

8.4.2. Άμεση ανάλυση αλληλουχίας των PCR προϊόντων (Sequencing)

Η μέθοδος της άμεσης ανάλυσης αλληλουχίας (Rapid direct sequencing analysis) σε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα PCR προϊόντων για το εξώνιο 15 BRAF, βασίστηκε σε χρήση του συνόλου καθαρισμού των πυρηνικών οξέων της QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA),

και χρησιμοποιώντας την τεχνολογία ανάλυσης της BigDye™ Terminator Kit, and the Abi Prism 3100 Analyzer (Applied Biosystems).

8.5. Ηλεκτροφόρηση DNA

Το DNA ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμιδίου. Η επιλογή του συγκεκριμένου πηκτώματος εξαρτάται αφενός από το μέγεθος του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί και αφετέρου από την διακριτική ικανότητα που προσδοκείται να επιτευχθεί. Το πήκτωμα αγαρόζης (συνήθης συγκέντρωση 1 έως 2%) είναι καταλληλότερο για την ηλεκτροφόρηση μεγάλων DNA τμημάτων καθώς και για μεγάλες διαφορές μεγέθους τμημάτων που πρόκειται να διαχωρισθούν. Αντίθετα, το πήκτωμα ακρυλαμιδίου (19:1 μίγμα ακρυλαμιδίου/bis-ακρυλαμιδίου) επιλέγεται για μικρότερα τμήματα DNA και για μικρές διαφορές μεγέθους ανάμεσά τους.

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

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

8.6. Χρώση νουκλεϊκών οξέων με βρωμιούχο εθίδιο

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

Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου, μετά την ηλεκτροφόρηση, εμβαπτίζονται σε υδατικό διάλυμα βρωμιούχου εθιδίου συγκέντρωσης 0.5 μg/ml. Αφήνονται για 20 min στο διάλυμα χρώσης και εκπλένονται με ίσο όγκο H₂O για άλλα 20 min. Οι ηλεκτροφορητικές ζώνες του DNA είναι ορατές με UV.

8.7 Στατιστική ανάλυση - Ηλεκτρονική επεξεργασία εικόνας

Η στατιστική επεξεργασία των εργαστηριακών ευρημάτων και των κλινικοπαθολογικών δεδομένων έγινε με τη χρήση της δοκιμασίας SPSS 10.0 for Windows και ως στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι συσχετίσεις με μονοδύναμο επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$. Όλα τα παραπάνω έγιναν σε Ηλεκτρονικό Υπολογιστή, με τη βοήθεια του προγράμματος

8.8. Εταιρείες προέλευσης των υλικών

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

Αγαρ-Difco

Αγαρόζη - Gibco BRL

Αιθανόλη - Merck

Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ - BDH

Ακρυλαμίδιο - Gibco BRL

Ανθρακικό νάτριο - Sigma

Βορικό οξύ - BDH

Βρωμιούχο εθίδιο - Sigma

Γλυκερόλη - Gibco BRL

Διαίθυλ-πυροκαρβονικό οξύ - BDH

Διθειοθρεϊτόλη - Sigma

Διμεθυλσουλφοξείδιο - BDH

Δεσοξυριβονουκλεοτίδια - Gibco BRL

Ενζυμα περιορισμού - New England Biolabs/ Gibco BRL

Θειϊκό αμμώνιο - BDH

Ισοπροπανόλη - Merck

Κιτρικό νάτριο - BDH

Κυανό της βρωμοφαινόλης - Sigma

Λυσοζύμη - Sigma

Μεθανόλη - Merck

Μεμβράνες διαπίδυσης πόρων διαμέτρου 10 mm - Sigma

MOPS - Sigma

Νιτρικός άργυρος - Sigma

Οξεικό αμμώνιο - Sigma

Οξικό κάλιο - Sigma
Οξικό νάτριο - Sigma
Οξικό οξύ - BDH
Πρωτεΐνάση K - Gibco BRL
Ριβονουκλεάση A - Gibco BRL
SDS - Sigma
Ταq πολυμεράση - Gibco BRL
TEMED - Sigma
Tris base - BDH
Triton-X-100 - Sigma
Trizol - Gibco BRL
Tween-20 - Sigma
Υδροξείδιο του νατρίου - Sigma
Υδροχλωρικό οξύ - BDH
Υπερθειικό αμμώνιο - Gibco BRL
Υπεροξείδιο του υδρογόνου - BDH
Φαινόλη - Gibco BRL
Φορμαλδεΰδη - BDH
Φορμαμίδιο - Gibco BRL
Χλωριούχο καίσιο - Sigma
Χλωριούχο κάλιο - Sigma
Χλωριούχο λίθιο - Sigma
Χλωριούχο μαγγάνιο - Sigma
Χλωριούχο μαγνήσιο - Sigma
Χλωριούχο νάτριο - Sigma
Χλωροφόρμιο - Fluka

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΝΑΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9.1. Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν και ιστοπαθολογική εξέταση

Το υλικό από τους ασθενείς προήλθε από το Παθολογοανατομικό Τμήμα του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΕ.ΠΑ.Γ.ΝΗ). Επιλέχθηκαν και ανασύρθηκαν 30 παρασκευάσματα παραφίνης ακανθοκυτταρικού νεοπλάσματος οισοφάγου, από 30 ασθενείς, και 31 παρασκευάσματα φυσιολογικού οισοφαγικού ιστού από 31 ασθενείς. Όλα τα δείγματα ESCC προήλθαν από το ανώτερο και το μέσο τριτημόριο του οισοφάγου. Το στάδιο διαφοροποίησης των δειγμάτων ESCC καθορίστηκε σύμφωνα με τις ιστοπαθολογικές αξιολογήσεις ως καλής, μέτριας, και πτωχής διαφοροποίησης, ενώ αντίστοιχα το στάδιο της νεοπλασίας με τα κριτήρια ταξινόμησης TNM [The 2002 American Joint Committee on Cancer Tumor-Node-Metastasis (TNM) classification system], αντίστοιχα (πίνακας 9.1).

Η ομάδα των ασθενών αποτελούταν από 26 άνδρες (86,6%) και 4 γυναίκες (13,3%), μεταξύ 46 και 100 ετών (μέση ηλικία 67 έτη). Άλλες κλινικές παράμετροι οι οποίοι αξιολογήθηκαν είναι η χρήση καπνών (73,3%), και η χρήση οινόπνεύματος (76,6%), οι οποίοι και συσχετίστηκαν επίσης με την ανάπτυξη ESCC (πίνακας 9.1). Επίσης ελέχθηκαν η διαφοροποίηση του νεοπλάσματος, όπου η πλειοψηφία ήταν μέτριας (50%) και πτωχής (33,3%) διαφοροποίησης, όπως και το στάδιο της νόσου κατά TNM, με την πλειοψηφία των ασθενών να βρίσκονται σε στάδιο III (63,3%), και σε στάδιο IV (30%). Τα φυσιολογικά δείγματα μάρτυρες επιλέχθηκαν έτσι ώστε η ηλικία και το φύλο να αντιστοιχούν σύμφωνα με τις περιπτώσεις δειγμάτων των ασθενών ESCC που υποδείχθηκαν ανωτέρω.

Πίνακας 9.1: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ESCC ασθενών.

Χαρακτηριστικά	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό %
Διαφοροποίηση		
<i>καλή</i>	5	16,6
<i>μέτρια</i>	15	50
<i>πτωχή</i>	10	33,3
Στάδιο νόσου *		
<i>I</i>	0	0
<i>II</i>	2	6,6
<i>III</i>	19	63,3
<i>IV</i>	9	30
Φύλο		
<i>Άρρεν</i>	26	86,6
<i>Θήλυ</i>	4	13,3
Ηλικιακή ομάδα		
<i>40-60</i>	7	23,3
<i>61-75</i>	14	46,6
<i>76-100</i>	9	30
Χρήση καπνού		
<i>Καπνιστές</i>	22	73,3
<i>Μη καπνιστές</i>	8	26,6
Χρήση αλκοόλ		
<i>Χρήστες</i>	23	76,6
<i>Μη χρήστες</i>	7	23,3

9.2. Ανίχνευση και τυποποίηση των ιών HPV σε ακανθοκυτταρικά νεοπλασμάτα οισοφάγου και σε φυσιολογικό οισοφαγικό ιστό.

Τριάντα δείγματα ακανθοκυτταρικού καρκινώματος οισοφάγου και είκοσι επτά δείγματα φυσιολογικού οισοφαγικού ιστού, είναι το σύνολο των δειγμάτων που έγινε αναζήτηση λοίμωξης με DNA HPV με την μέθοδο της PCR. Σε όποιο δείγμα αναγνωρίστηκε παρουσία του DNA HPV με χρήση των γενικών εκκινητών, τα δείγματα αυτά υποβλήθηκαν σε περαιτέρω τυποποίηση της λοίμωξης με χρήση των ειδικών εκκινητών για τους υπότυπους HPV-6, 11, 16, 18 και 33.

Από τους 30 ασθενείς ESCC βρέθηκαν 17 θετικοί για τον ιό HPV (ποσοστό 56%) και έξι δείγματα φυσιολογικού οισοφαγικού ιστού βρέθηκαν

επίσης με HPV λοίμωξη (22,2%) υποδεικνύοντας μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($\chi^2=24.29$, $df=1$, $p<0.001$) μεταξύ της HPV λοίμωξης και του ESCC. (Εικόνα 9.1A). Από την τυποποίηση του ιού χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές, ο HPV-18 ανιχνεύεται στο υψηλότερο ποσοστό σε σχέση με τους υπόλοιπους υπότυπους HPV και στις δύο ομάδες δειγμάτων. Συγκεκριμένα δεκαπέντε από τα δεκαεπτά HPV θετικά ESCC δείγματα (88%), και πέντε από τα έξι HPV θετικά φυσιολογικά δείγματα (83%), τυποποιήθηκαν ως HPV-18. Αντίστοιχα και η παρουσία λοίμωξης ειδικά με τον υπότυπο HPV-18, ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ των δύο ομάδων δειγμάτων ($\chi^2=17.01$, $df=1$, $p<0.001$). Επιπλέον σε ένα δείγμα ESCC (1/17, 5.9%), και σε ένα φυσιολογικό οισοφαγικό δείγμα (1/6, 16,6%), ανιχνεύθηκε η παρουσία λοίμωξης με τον υπότυπο HPV-16 . Αντίθετα δεν βρέθηκε καμία λοίμωξη με τους υπότυπους HPV-6, -11, -33, και στις δύο ομάδες δειγμάτων. Σε ένα μόνο δείγμα ESCC (5.9%) βρέθηκε λοίμωξη με την χρήση των γενικών εκκινητών, χωρίς να οφείλεται στους υπότυπους HPV-6, 11, 16, 18 και 33 που ελέχθησαν. (Εικόνα 9.1A, Πίνακας 9.2)

Το γεγονός ότι ο ιός HPV σχετίζεται σημαντικά με τις κεφαλής τραχήλου, και οισοφάγου, ενώ συγχρόνως παρατηρούνται και σε προκαρκινικές αλλοιώσεις υποδηλώνει την πιθανή συμμετοχή των παραπάνω ιών σε πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος οισοφάγου.

Πίνακας 9.2: Επίπτωση της HPV λοίμωξης, σε συνδυασμό με κλινικο-παθολογικούς παράμετρους μεταξύ της ομάδας ασθενών με ESCC.

Παράμετρος	Παρουσία HPV λοίμωξης				Αριθμός μη-λοιμώξεων (%)
	Αριθμός λοιμώξεων (%)			Σύνολο	
	16	18	Άλλος τύπος		
Διαφοροποίηση					
καλή		1 (20)		1 (20)	4 (80)
μέτρια	1 (6.6)	9 (60)		10 (66.6)	5 (33.3)
πτωχή		5 (50)	1 (10)	6 (60)	4 (40)
Στάσιο νόσου*					
0					
I					
II		1 (50)		1 (50)	1 (50)
III		10 (52.6)		10 (52.6)	9 (47.4)
IV	1 (11.1)	4 (44.4)	1 (11.1)	6 (66.6)	3 (33.3)
Φύλο					
Άρρεν		14 (53.8)	1 (3.8)	15 (57.7)	11 (42.3)
Θήλυ	1 (25)	19 (25)		2 (50)	2 (50)
Ηλικία					
40-60		3 (42.8)		3 (42.8)	4 (57.14)
61-75	1 (7)	7 (50)		8 (57)	6 (43)
76-100		5 (55)	1 (11)	6 (66)	3 (34)
Χρήση καπνού					
Καπνιστές	1 (4.5)	12 (54.5)	1 (4.5)	14 (63.6)	8 (36.4)
Μηκαπνιστές		3 (37.5)		3 (37.5)	5 (62.5)
Χρήση αλκοόλ [#]					
Πότες	1 (4.3)	11 (47.8)	1 (4.3)	13 (56.5)	10 (43.5)
Μη πότες		4 (57)		4 (57)	3 (43)

9.3. Ανίχνευση και τυποποίηση των ιών EBV σε ακανθοκυτταρικά νεοπλασμάτα οισοφάγου και σε φυσιολογικό οισοφαγικό ιστό.

Τα ίδια τριάντα δείγματα ακανθοκυτταρικού καρκινώματος οισοφάγου και τα είκοσι επτά δείγματα φυσιολογικού οισοφαγικού ιστού, που έγινε

αναζήτηση λοίμωξης με DNA HPV, χρησιμοποιήθηκαν και στην αναζήτηση λοίμωξης με DNA EBV με την μέθοδο της PCR.

Ένας σημαντικός ρόλος του ιού Epstein-Barr στην καρκινογένεση του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος οισοφάγου θα μπορούσε να αποδοθεί λόγω της εγγύτητας του ρινοφάρυγγα με τον οισοφάγο. Παρόλα αυτά στη δική μας μελέτη, δεν έγινε ανίχνευση λοίμωξης του EBV ούτε στην ομάδα ESCC δειγμάτων αλλά ούτε και στην ομάδα με τα φυσιολογικά δείγματα οισοφαγικού ιστού. (Εικόνα 9.1B)

Τα στοιχεία που αφορούν την ανίχνευση λοίμωξης με DNA EBV με την μέθοδο της PCR, από ασθενείς με αλλοιώσεις ακανθοκυτταρικού καρκινώματος οισοφάγου περιγράφονται λεπτομερώς στον Πίνακα 9.3 και 9.4.

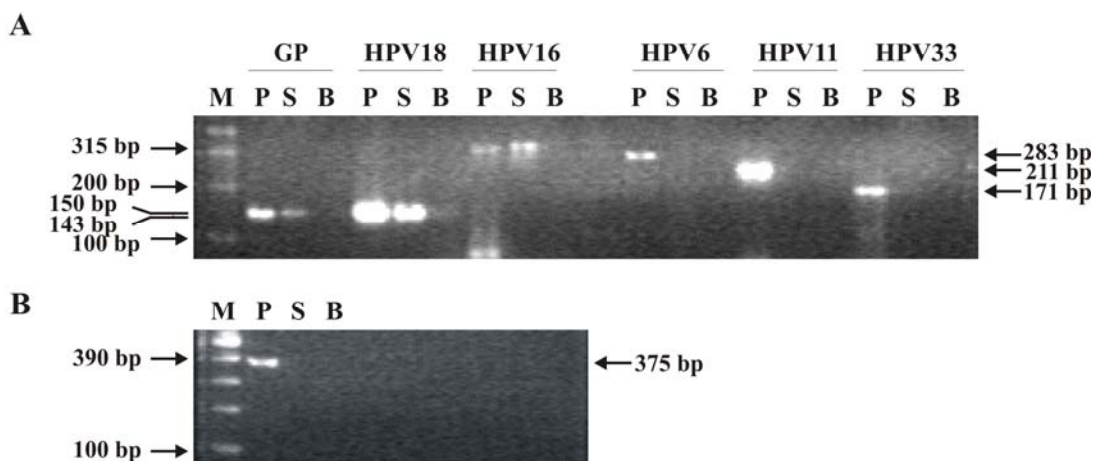


Figure 1

Εικόνα 9.1: Καθορισμός της HPV και EBV DNA λοίμωξης σε δείγματα ESCC και φυσιολογικού οισοφαγικού ιστού, με την μέθοδο της PCR.

Εικόνα A: Καθορισμός HPV DNA λοίμωξης. Κάθε υπότυπος HPV συμπεριλαμβάνει ένα θετικό control (P), ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα (S) και ένα αρνητικό PCR control δείγμα. Δεν βρέθηκαν θετικά δείγματα λοίμωξης για τους υπότυπους HPV-6, 11 και 33. GP: Αναζήτηση HPV λοίμωξης χρησιμοποιώντας γενικούς εκκινητές. M: 100 bp ladder.

Εικόνα Β: Καθορισμός EBV λοίμωξης.: EBV detection. M: 2 log bp ladder, P: θετικό control EBV, S: αντιπροσωπευτικό δείγμα , B: αρνητικό PCR control δείγμα.

Πίνακας 9.3 - Αλληλουχία PCR εκκινήτων.

PCR method	Name	Sequence	Primer (μM)	Cycling conditions	PCR product size (bp)		
β2-micro-globulin PCR	β2-mF	TCCAACATCAACATCTTGGT	0.4	56°C, 36 cycles	123		
	β2-mR	TCCCCCAAATTCTAAGCAGA	0.4				
Multiplex type-specific PCR	HPV-16F	CTGCAAGCAACAGTTACTGCGACG	0.5		315		
	HPV-16R	CATACATCGACCGGTCCACC	0.5				
	HPV-33F	AACAGTTAAAAAACCTTTAAA	0.5		171		
	HPV-33R	AGTTTCTCTACGTCGGGACCTC	0.5				
Type-specific PCR	HPV-18F	AAACTAACTAACACTGGGTTATACA	1		143		
	HPV-18R	ATGGCACTGGCCTCTATAGT	1				
	HPV-11F	TGTGTGGCGAGACAACTTTCCCTT	1		211		
	HPV-11R	TGGTTATTTAGTTTTATGAAGCGTGC CTTTCCC	1				
	HPV-6F	TCTATCTATGCATACGTTGC	1			58°C, 36 cycles	283
	HPV-6R	TGGTTAGTATATGTTTTACC	1				
HPV General type PCR	HPV-GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	1.2	43°C, 10 cycles	150		
	HPV-GP6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	1.2	40°C, 30 cycles			
EBV specific PCR	EBVF	GTGTGCGTCGTGCCGGGGCAGCCAC	0.4	72°C, 35 cycles	375		
	EBVR	ACCTGGGAGGGCCATCGCAAGCTCC	0.4				

Πίνακας 9.4 - Συχνότητα (%) HPV και EBV λοιμώξεων μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών.

Type	ESCC (n=30)		Normal (n=27)		Significance *	df #
	Number of infected (n)	%	Number of infected (n)	%		
HPVGP	17	56	6	22.2	p<0.001	1
6	0	0	0	0		
11	0	0	0	0		
16	1	3	1	3.7	p=0.7	1
18	15	50	5	18.5	p<0.001	1
33	0	0	0	0		
Other type	1	3	0	0	p=0.2	1
EBV	0	0	0	0		

*: Pearson χ^2 test.

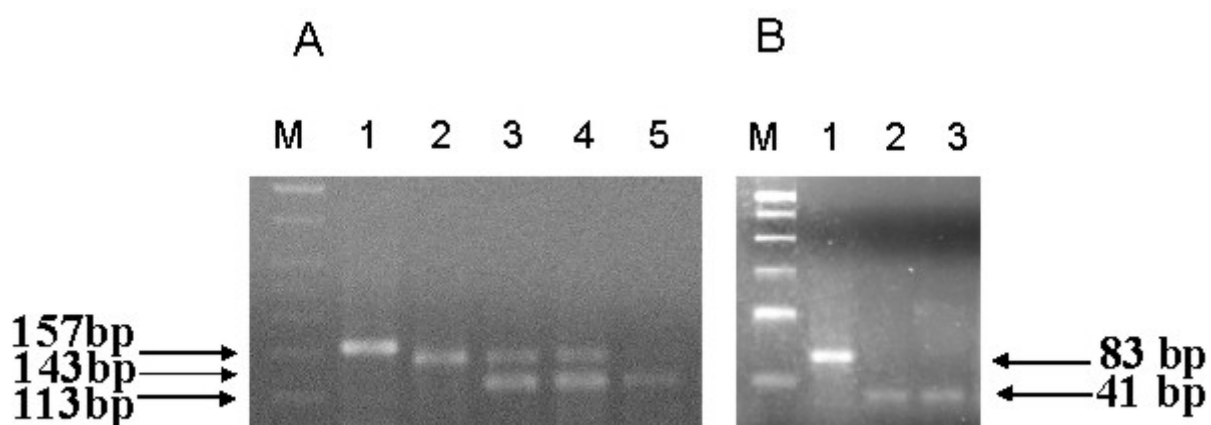
#: Degrees of freedom.

9.4. Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων ras σε ακανθοκυτταρικά νεοπλάσματα οισοφάγου και σε φυσιολογικό οισοφαγικό ιστό.

Στα πλαίσια της μελέτης της ενεργοποίησης των γονιδίων ras σε ακανθοκυτταρικά νεοπλάσματα οισοφάγου έγινε αναζήτηση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 των γονιδίων K-ras και N-ras. Το κωδικόνιο 12 είναι αυτό στο οποίο ανευρίσκονται συχνότερα μεταλλάξεις που ενεργοποιούν τα γονίδια ras (Kiaris & Spandidos, 1995). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει αρχικά ενίσχυση του DNA της περιοχής του κωδικονίου με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR). Στη συνέχεια πέπτονται με περιοριστικές ενδονουκλεάσες τα προϊόντα της αντίδρασης και αναλύονται οι πολυμορφισμοί μήκους των περιοριστικών θραυσμάτων που προκύπτουν (RFLP). Χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά SW480 η οποία φέρει συγκεκριμένη σημειακή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου K-ras ως μάρτυρα, μελετήθηκαν οι καλλύτερες συνθήκες για την PCR-RFLP ανάλυση. Η μελέτη εντοπίσθηκε μόνο στο κωδικόνιο 12 των γονιδίων ras

εξαιτίας της συχνότερης εμφάνισης μεταλλάξεων στο κωδικόνιο αυτό σε καρκίνους του ανθρώπου (Yanez, 1987).

Αυτή η μελέτη ανέλυσε τη συχνότητα των μεταλλαγών γονιδίων K-ras, και N-ras, σε μια ομάδα 62 ατόμων συμπεριλαμβανομένων 30 δειγμάτων ESCC, και 32 φυσιολογικών δειγμάτων. Ο Πίνακας 9.5 συνοψίζει την επίπτωση μεταλλαγής για όλα τα γονίδια που μελετώνται ανάμεσα στα δείγματα φυσιολογικού οισοφαγικού ιστού και τις ομάδες ESCC, καθώς επίσης και τις διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που λήφθηκαν υπόψη σε αυτήν την μελέτη. Η ετεροζυγική μεταλλαγή K-ras codon 12 ανευρέθηκε σε 5 από τα 30 δείγματα ESCC (16%), ενώ καμία μεταλλαγή δεν ανιχνεύθηκε στα δείγματα φυσιολογικού οισοφαγικού ιστού ($p < 0.022$) (Εικόνα 9.2A). Η μεταλλαγή K-ras ανευρέθηκε περισσότερο μεταξύ των άρρενων ασθενών, των χρηστών καπνών, και των καταχραστών οινοπνεύματος. Επιπλέον, καμία N-ras codon 12 μετάλλαξη δεν ανιχνεύθηκε (Εικόνα 9.2B).



Εικόνα 9.2: Καθορισμός των (A) K-ras και (B) N-ras codon 12 μεταλλάξεων σε δείγματα ESCC χρησιμοποιώντας την μέθοδο PCR – RFLP. (A) Γραμμή M: 50 bp ladder. Γραμμή 1: άπειπτο PCR προϊόν. Γραμμή 2: Κυτταρική σειρά SW480 θετικό control της K-ras codon 12 ομόζυγης μετάλλαξης. Γραμμές 3, 4: Δείγματα ετερόζυγης μετάλλαξης. Γραμμή 5: Φυσιολογικό γονίδιο (Wild type). (B) Γραμμή M: 100 bp ladder. Γραμμή 1: άπειπτο PCR προϊόν Γραμμές 2, 3: Φυσιολογικό γονίδιο (Wild type).

Πίνακας 9.5: – Συχνότητα των K-ras, N-ras, και B-raf μεταλλάξεων σε συνδυασμό με τις κλινικοπαθολογικούς παραμέτρους, στην ομάδα ασθενών με ESCC.

	Αριθμός δειγμάτων (N ^ο)	N ^ο K-ras mutation (%)	N ^ο N-ras, or B-raf mutation (%)
Διαφοροποίηση			
<i>καλή</i>	5	-	-
<i>μέτρια</i>	15	3 (60%)	0 (0%)
<i>πτωχή</i>	10	2 (40%)	0 (0%)
Στάδιο νόσου*			
<i>I</i>	-	-	-
<i>II</i>	2	-	-
<i>III</i>	19	3 (60%)	0 (0%)
<i>IV</i>	9	2 (40%)	0 (0%)
Φύλο			
<i>Άρρεν</i>	26	5 (100%)	0 (0%)
<i>Θήλυ</i>	4	0 (0%)	0 (0%)
Ηλικία			
<i>40-60</i>	7	1 (20%)	0 (0%)
<i>61-75</i>	14	2 (40%)	0 (0%)
<i>76-100</i>	9	2 (40%)	0 (0%)
Χρήση καπνού			
<i>Καπνιστές</i>	22	4 (80%)	0 (0%)
<i>Μη Καπνιστές</i>	8	1 (20%)	0 (0%)
Χρήση αλκοόλ[#]			
<i>Πότες</i>	23	4 (80%)	0 (0%)
<i>Μη πότες</i>	7	1 (20%)	0 (0%)
HPV λοίμωξη			
<i>Με λοίμωξη</i>	17	3 (60%)	0 (0%)
<i>Χωρίς λοίμωξη</i>	13	2 (40%)	0 (0%)

*: The 2002 American Joint Committee on Cancer tumor-node-metastasis (TNM) classification system.

[#]: More than 1 glass of beer per day.

Πίνακας 9.6 – Αλληλουχία PCR εκκινητών.

Name	Sequence (5'-3')	Primer (μ M)	Cycling conditions	PCR product size (bp)	RFLP products (bp)
β 2- micro- globulin	β 2-mF TCCAACATCA ACATCTTGGT β 2-mR TCCCCCAAAT TCTAAGCAGA	0.4	56°C, 36 cycles	123	-
B-raf	B-raf R GGCCAAAATT TAATCAGTGGA B-raf F TCATAATGCTT GCTCTGATAGGA	1	55°C, 39 cycles	224	Mut:211/13 WT:124/87/13
K-ras	K-ras R TCAAAGAATG GTCCTGGACC K-ras F ACTGAATATAAA CTTGTGGTAGTTGGACCT	1	58°C, 39 cycles	157	Mut:142/15 WT:113/29/15
N-ras	N-ras A ATATTCATCTTA CAAAGTGGTCCTGGA N-ras S AACTGGTGG TGGTTGGACCA	0.5	60°C, 39 cycles	83	Mut: 60/23 WT: 41/23/19

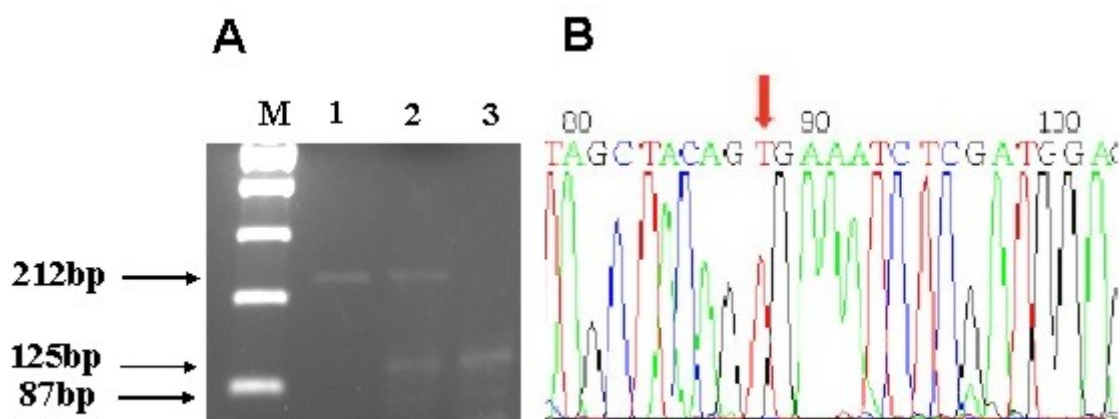
Τα στοιχεία που αφορούν την κατανομή των *ras* μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12, την ανίχνευση και την τυποποίηση των HPV ιών και τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους δειγμάτων καρκινικού και φυσιολογικού οισοφαγικού ιστού, από ασθενείς με αλλοιώσεις ακανθοκυτταρικού καρκινώματος οισοφάγου περιγράφονται λεπτομερώς στον Πίνακα 9.6.

9.5. Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων του γονιδίου B-raf σε ακανθοκυτταρικά νεοπλάσματα οισοφάγου και σε φυσιολογικό οισοφαγικό ιστό.

Στα πλαίσια της μελέτης της ενεργοποίησης του γονιδίου B-raf σε ακανθοκυτταρικά νεοπλάσματα οισοφάγου έγινε αναζήτηση σημειακών μεταλλάξεων στο εξόνιο 15 στο κωδικιδόνιο 600 (V600E) στο οποίο ανευρίσκονται συχνότερα μεταλλάξεις που ενεργοποιούν το γονίδιο B-raf. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει αρχικά ενίσχυση του DNA της περιοχής του κωδικονίου με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR). Στη συνέχεια πέπτονται με περιοριστικές

ενδονουκλεάσες τα προϊόντα της αντίδρασης και αναλύονται οι πολυμορφισμοί μήκους των περιοριστικών θραυσμάτων που προκύπτουν (RFLP).

Αυτή η μελέτη ανέλυσε τη συχνότητα του γονιδίου B-raf, σε μια ομάδα 62 ατόμων συμπεριλαμβανομένων 30 δειγμάτων ESCC, και 32 φυσιολογικών δειγμάτων. Ο Πίνακας 9.5 συνοψίζει την επίπτωση μεταλλαγής για όλα τα γονίδια όπως και του γονιδίου B-raf, που μελετώνται ανάμεσα στα δείγματα φυσιολογικού οισοφαγικού ιστού και τις ομάδες ESCC, καθώς επίσης και τις διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που λήφθηκαν υπόψη σε αυτήν την μελέτη. Αν και αναφέρεται μία επίπτωση μετάλλαξης του γονιδίου B-raf, σε ένα ποσοστό 7% του συνόλου των νεοπλασματικών νόσων, εντούτοις στην δική μας μελέτη, καμία B-raf V600E μετάλλαξη δεν ανιχνεύθηκε (Εικόνα 9.3).



Εικόνα 9.3:

(A) Καθορισμός των B-raf V600E πολυμορφισμών σε δείγματα ESCC χρησιμοποιώντας την μέθοδο PCR – RFLP. Γραμμή M: 100 bp ladder. Γραμμή 1: άπεπτο PCR προϊόν. Γραμμές 2, 3: Φυσιολογικό Wild type γονίδιο. (B) Ανάλυση αλληλουχίας του φυσιολογικού γονιδίου BRAF exon 15, κωδικιδόνιο 600 (GTG), με το βέλος να δείχνει το wild type 1799T πυρηνικό υπόλειπο του κωδικιδόνιου 600 σε ένα αντοπροσωπευτικό δείγμα.

Τα στοιχεία που αφορούν την κατανομή των γονιδιακών μεταλλάξεων, την ανίχνευση και την τυποποίηση των HPV ιών και τις κλινικοπαθολογικές

παραμέτρους δειγμάτων καρκινικού και φυσιολογικού οισοφαγικού ιστού, από ασθενείς με αλλοιώσεις ακανθοκυτταρικού καρκινώματος οισοφάγου περιγράφονται λεπτομερώς στον Πίνακα 9.6.

9.6. Επίδραση της αλληλεπίδρασης γονιδίου - περιβάλλοντος στην ανάπτυξη ESCC.

Τα συνδυασμένα αποτελέσματα του φύλου, του καπνίσματος, της κατάχρησης οινοπνεύματος, και της μόλυνσης HPV, στις εκτιμήσεις του κινδύνου οισοφαγικού καρκίνου παρουσιάζονται στον πίνακα 9.7. Αυξημένος κίνδυνος με στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε στην ομάδα χρηστών καπνών (OR=3.5, $p<0.023$) και καταχραστών οινοπνεύματος αντίστοιχα (OR=7.22, $p<0.001$). Ένας παρόμοιος θετικός συνδυασμός παρατηρήθηκε στους HPV-μολυσμένους ασθενείς (OR=5.66, $p<0.003$). Εντούτοις, κανένας συσχετισμός δεν καθιερώθηκε μεταξύ του φύλου και ESCC, δίνοντας έναν οριακά αυξημένο σχετικό κίνδυνο OR=1.82.

Πίνακας 9.7 – Εκτίμηση κινδύνου σε αμφότερες τις ομάδες δειγμάτων.

	Cases ^a (n=30)	Control ^b (n=32)	M-H (χ^2) [#]	df	P Value	OR* (95% CI)
Φύλο						
Άρρεν	26	25	0.76	1	0.51	1.82 (0.47-6.98)
Θήλυ	4	7				
Χρήση καπνού						
Καπνιστές	22	14	5.47	1	0.023	3.53 (1.21-10.29)
Μη Καπνιστές	8	18				
Χρήση αλκοόλ [#]						
Πότες	23	10	12.62	1	0.001	7.22 (2.33-22.35)
Μη πότες	7	22				
HPV λοίμωξη						
Με λοίμωξη	17	6	9.38	1	0.003	5.66 (1.80-17.79)
Χωρίς λοίμωξη	13	26				

[#]:M-H χ^2 :Mantel-Haenszel Chi-square

*OR:Odds Ratio

^a Cases include ESCC samples

^b Controls include normal samples

Επιπλέον, οι ομάδες χρηστών καπνού και οιοπνεύματος ταξινομήθηκαν έπειτα ανά ομάδα, και ο φυσιολογικός πληθυσμός ταξινομήθηκε ως μάρτυρας προκειμένου να αξιολογηθεί ο συσσωρευτικός κίνδυνος όλων αυτών των συνθηκών από κοινού. Όταν ο σχετικός κίνδυνος καπνιστών ασθενών ESCC μελετήθηκε ενάντι στον φυσιολογικό πληθυσμό καπνιστών, (πίνακας 9.8A), αποδείχθηκε ότι μόνο η παρουσία μόλυνσης HPV ήταν στατιστική σημαντική ($p < 0.019$). Επιπλέον, υπήρξε ένας αυξανόμενος κίνδυνος στους ασθενείς με τη μόλυνση HPV (OR=6.41), τους καταχραστές οιοπνεύματος (OR=3.51), και έναν ελαφρώς αυξημένος κίνδυνος στους ασθενείς με την παρουσία της μεταλλαγής K-ras (22%, OR=1.77), αντίστοιχα. Ομοίως, στην περίπτωση του μη καπνιστών πληθυσμού (πίνακας 9.8B), ο κίνδυνος οισοφαγικού καρκίνου αυξήθηκε στους καταχραστές οιοπνεύματος (OR=2.0), και σε παρουσία της μόλυνσης HPV (OR=3.0).

Πίνακας 9.8A – Εκτίμηση κινδύνου στις αμφοτέρους ομάδες καπνιστών.

	Cases ^a (n=22)	Control ^b (n=14)	M-H (χ^2) [#]	df	P value	OR* (95% CI)
Χρήση αλκοόλ [#]						
Πότες	19	9	2.34	1	0.21	3.51 (0.68-18.07)
Μη πότες	3	5				
HPV λοίμωξη						
Με λοίμωξη	14	3	5.94	1	0.019	6.41(1.37-30.05)
Χωρίς λοίμωξη	8	11				
K-ras Μεταλλαγή						
Με Μεταλλαγή	4	0	2.78	1	0.14	1.77(1.31-2.41)
Χωρίς Μεταλλαγή	18	14				

[#]:M-H χ^2 :Mantel-Haenszel Chi-square;

*OR:Odds Ratio;

^a Cases include ESCC smokers population samples.

^b Controls include normal smokers population samples.

Πίνακας 9.8B – Εκτίμηση κινδύνου στις αμφοτέρους ομάδες μη - καπνιστών.

	Cases ^a (n=8)	Control ^b (n=18)	M-H (χ^2) [#]	df	P value	OR* (95% CI)
Χρήση αλκοόλ [#]						
Πότες	4	6	0.62	1	0.66	2.0 (0.33-10.91)
Μη πότες	4	12				
HPV λοίμωξη						
Μελοίμωξη	3	3	1.30	1	0.33	3.0 (0.45-19.92)
Χωρίς λοίμωξη	3	15				
K-ras Μεταλλαγή						
Με Μεταλλαγή	1	0	2.25	1	0.30	0.87 (0.67-1.13)
Χωρίς Μεταλλαγή	7	18				

[#]:M-H χ^2 :Mantel-Haenszel Chi-square

*OR:Odds Ratio

^a Cases include ESCC non-smokers population samples

^b Controls include normal non-smokers population samples

Στην περίπτωση της ομάδας καταχραστών οιοπνεύματος ESCC (πίνακας 9.9A), τα συμπεράσματά μας δείχνουν ότι η μόλυνση HPV συνδέει σημαντικά με έναν αυξημένο κίνδυνο ESCC, σε αντίθεση με τον κανονικό πληθυσμό (OR=5.2), ενώ ένας οριακός σχετικός κίνδυνος ESCC παρατηρήθηκε στους ασθενείς που φέρνουν τη μεταλλαγή K-ras (21%, OR=1.52). Ομοίως, στην περίπτωση της ομάδας μη-καταχραστών οιοπνεύματος ESCC, ενάντι στον φυσιολογικό πληθυσμό μη-καταχραστών οιοπνεύματος (πίνακας 9.9B), μια θετική συσχέτιση βρέθηκε στους HPV-μολυσμένους ασθενείς (OR=8.3, $p < 0.001$), και στους ασθενείς που φέρνουν τη μεταλλαγή K-ras (OR=4.6).

Πίνακας 9.9A – Εκτίμηση κινδύνου στις αμφότερες ομάδες καταναλωτών αλκοόλ.

	Cases ^a (n=23)	Control ^b (n=10)	M-H (χ^2) [#]	df	P value	OR* (95% CI)
Χρήση καπνού						
<i>Καπνιστές</i>	19	9	0.28	1	0.9	0.52 (0.05-5.42)
<i>Μη Καπνιστές</i>	4	1				
HPV λοίμωξη						
<i>Μελοίμωξη</i>	13	2	3.63	1	0.07	5.2 (0.89-30.07)
<i>Χωρίς λοίμωξη</i>	10	8				
K-ras Μεταλλαγή						
<i>Με Μεταλλαγή</i>	4	0	1.91	1	0.28	1.52(1.17-1.98)
<i>Χωρίς Μεταλλαγή</i>	19	10				

[#]:M-H χ^2 :Mantel-Haenszel Chi-square

*OR:Odds Ratio

^a Cases include ESCC alcohol users population samples.

^b Controls include normal alcohol users population samples.

Πίνακας 9.9B – Εκτίμηση κινδύνου στις αμφότερες ομάδες μη- καταναλωτών αλκοόλ.

	Cases ^a (n=7)	Control ^b (n=22)	M-H (χ^2) [#]	df	P value	OR* (95% CI)
Χρήση καπνού						
<i>Καπνιστές</i>	3	10	0.01	1	0.9	0.9 (0.16-5.00)
<i>Μη Καπνιστές</i>	4	12				
HPV λοίμωξη						
<i>Μελοίμωξη</i>	4	0	14.08	1	0.001	8.3(2.8-24.09)
<i>Χωρίς λοίμωξη</i>	3	22				
K-ras Μεταλλαγή						
<i>Με Μεταλλαγή</i>	1	0	3.14	1	0.241	4.6(2.29-9.48)
<i>Χωρίς Μεταλλαγή</i>	6	22				

[#]:M-H χ^2 :Mantel-Haenszel Chi-square

*: OR:Odds Ratio

^a Cases include ESCC non- alcohol users population samples

^b Controls include normal non- alcohol users population samples

Ο πίνακας 9.10 παρουσιάζει τον σχετικό κίνδυνο (OR) για την σχέση μεταξύ του φύλου και των συνηθειών, στην περίπτωση των ασθενών ESCC με την παρουσία μεταλλαγής γονιδίων K-ras, σε αντίθεση με τους ασθενείς ESCC χωρίς παρουσία μεταλλαγής γονιδίων K-ras. Ένας σχετικός

κίνδυνος της ύπαρξης μεταλλαγής του γονιδίου K-ras, συνδέθηκε με τη χρήση καπνών (OR=1.55), την κατάχρηση οινόπνεύματος (OR=1.26), και τη μόλυνση HPV (OR=1.17) σε αυτήν την ομάδα ασθενών. Επιπλέον, τα συμπεράσματά μας υποδεικνύουν σε μια θετική συσχέτιση στον κίνδυνο οισοφαγικού καρκίνου, μεταξύ των μολυσμένων HPV ασθενών ESCC και της χρήσης καπνών (OR=2.91), ενάντι στους μη-μολυσμένους ασθενείς ESCC HPV (πίνακας 9.11).

Πίνακας 9.10 – Εκτίμηση κινδύνου στην ομάδα ασθενών με K-ras μετάλλαξη.

	Cases ^a (n=5)	Control ^b (n=25)	M-H (χ^2) [#]	df	P value	OR* (95% CI)
Χρήση καπνού						
Καπνιστές	4	18	0.13	1	0.9	1.55(0.14-16.4)
Μη Καπνιστές	1	7				
Χρήση αλκοόλ [#]						
Πότες	4	19	0.03	1	0.9	1.26(0.17-13.5)
Μη πότες	1	6				
HPV λοίμωξη						
Μελοίμωξη	3	14	0.02	1	0.9	1.17(0.16-8.33)
Χωρίςλοίμωξη	2	11				

[#]M-H χ^2 :Mantel-Haenszel Chi-square;

*OR: Odds Ratio

^a Cases include ESCC K-ras mutation presence samples.

^b Controls include ESCC samples with absence K-ras mutation.

Πίνακας 9.11 – Εκτίμηση κινδύνου στην ομάδα ασθενών με HPV λοίμωξη.

	Cases ^a (n=17)	Control ^b (n=13)	M-H (χ^2) [#]	df	P value	OR* (95% CI)
Χρήση καπνού						
Καπνιστές	14	8	1.57	1	0.24	2.91 (0.54-15.56)
Μη Καπνιστές	3	5				
Χρήση αλκοόλ [#]						
Πότες	13	10	0.01	1	0.9	0.97 (0.17-5.39)
Μη πότες	4	3				
K-ras Μεταλλαγή						
Με Μεταλλαγή	3	2	0.02	1	0.63	1.17 (0.16-8.33)
Χωρίς Μεταλλαγή	14	11				

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΚΑΤΟ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

10.1 Εισαγωγή

Η πολυσταδιακή φύση της καρκινογένεσης έχει οδηγήσει στη μελέτη διαφόρων ογκογονιδίων, ογκοκατασταλτικών γονιδίων καθώς και ποικίλλων ιϊκών παραγόντων που έχουν βρεθεί να σχετίζονται με την δημιουργία όγκων στον ανθρώπινο οργανισμό. Η συνεργασία μεταξύ των ογκογονιδίων *ras*, η απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου της *p53* και τα ιϊκά γονίδια *E6/E7* του HPV έχουν αναφερθεί να εμπλέκονται στον κακοήγη μετασχηματισμό κυττάρων του οισοφάγου, παρόλο που ο ακριβής ρόλος των παραγόντων αυτών στην καρκινογένεση του ανθρώπου δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί.

10.2 Ανίχνευση των ιών HPV και EBV σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα οισοφάγου.

Η ανάπτυξη καρκίνων που σχετίζεται με τους ιούς της ομάδας HPV είναι γνωστό να αποτελεί μια πολυσταδιακή διαδικασία. Οι τύποι 16 και 18 του ιού είναι ικανοί να αθανατοποιούν πρώιμα κερατινοκύτταρα, που όμως από μόνο του δεν είναι επαρκές, εκτός από σπάνιες περιπτώσεις, να επάγει μια πλήρη ογκολογική μετατροπή (Hurlin, 1991), γεγονός που υποδηλώνει την συνεργασία τους με κυτταρικά ογκογονίδια για την πρόοδο μορφών όπως ο καρκίνος του οισοφάγου.

Ο ανθρώπινος ιός των θηλωμάτων αποτελεί τον πιο κοινό σεξουαλικά μεταδιδόμενο ιό παγκοσμίως. Περισσότερες από 40 υπότυποι HPV εμπλέκονται στις μολύνσεις γεννητικού συστήματος με τον HPV-16, ο οποίος είναι ο συχνότερος γενότυπος μεταξύ όλων των καρκίνων τραχήλου μήτρας (επίπτωση μέχρι 50%). Ο HPV εμπλέκεται επίσης στην λοίμωξη φυσιολογικού δέρματος και στην ογκογένεση ιστών από άλλα ανατομικά συστήματα και όργανα. Αμερικανικές μελέτες για τον καρκίνο κεφαλής τραχήλου αναφέρουν μια επίπτωση του HPV DNA στο 46,9%, και ότι ο HPV-16 είναι ο συχνότερος γενότυπος που συμμετέχει στο 60% των περιπτώσεων λοιμώξεων. Άλλες

ανατομικές περιοχές όπου οι ιοί HPV έχουν ανιχνευθεί και έχουν εμπλακεί στην ανάπτυξη νεοπλασματος, είναι η ρινική περιοχή με τα ιγμόρεια, οι πνεύμονες, (βρογχικό καρκίνωμα), το δέρμα, (verruciformis epidermodysplasia, καρκίνοι δερμάτων μη-μελανώματος) και η πρωκτογεννητική περιοχή. Διάφορες μελέτες στην Ελλάδα, σε μια προσπάθεια να ανιχνευθεί η επίπτωση της μόλυνσης HPV στο καρκίνο τραχήλου μήτρας, έχουν καταδείξει τον υπότυπο HPV-18 ως τον πιο κοινό γενότυπο στην Ελλάδα.

Η επίπτωση του HPV στον ακανθοκυτταρικό καρκίνο οισοφάγου φαίνεται να χαρακτηρίζεται από μια εντυπωσιακή γεωγραφική διανομή, σύμφωνα με τα πρόσφατα βιβλιογραφικά στοιχεία. Στην δική μας μελέτη η θετική ανίχνευση του HPV DNA μεταξύ 30 νεοπλασματικών οισοφαγικών δειγμάτων ήταν 17 δείγματα (56%), τα οποία υποδηλώνουν ενδεχομένως το σημαντικό ρόλο της HPV λοίμωξης στη ογκογένεση του οισοφάγου. Παρόμοιες μελέτες οι οποίες προέρχονται από τη Γερμανία, το Βέλγιο και την Ολλανδία, δεν μπόρεσαν να καταδείξουν καμία επίπτωση HPV σε νεοπλασματα οισοφάγου, αν και μελέτες από Ιταλία και Πορτογαλία, παρουσίασαν σημαντικά ποσοστά HPV-λοίμωξης σε δείγματα ESCC. Αυτά τα στοιχεία σε συνδυασμό με τα παρόντα συμπεράσματά μας δείχνουν ενδεχομένως μια ισχυρή σχέση μεταξύ της παρουσίας λοίμωξης HPV και της επίπτωσης ESCC στη περιοχή της Μεσογείου. Συγκεκριμένα, ο υπότυπος HPV-18, ο πιο κοινός υπότυπος HPV που έχει ανιχνευθεί σε αυτή τη περιοχή της Ευρώπης, και που σχετίζεται με διάφορους τύπους ανωμαλιών συμπεριλαμβανομένων των προκαρκινικών βλαβών ή των νεοπλασμάτων τραχήλου μήτρας, παρουσίασε επίσης στη δική μας μελέτη υψηλή συμβολή στην καρκινογένεση του οισοφάγου, έναντι των άλλων υπότυπων του HPV.

Επιπλέον, στις υψηλού κινδύνου περιοχές του οισοφαγικού καρκίνου όπως η ασιατική ζώνη και η Αλάσκα, η ανίχνευση του HPV DNA αναφέρεται έως και 63%. Οι Miller *et al*, αναφέρουν μια επικράτηση του HPV σε 45% των περιπτώσεων ESCC σε μελέτης από την Αλάσκα, με τον HPV-16 τον πιο συχνό ανιχνευόμενο γενότυπο (70%). Στο Χογκ Κογκ ο έλεγχος για τη HPV λοίμωξη ήταν θετικός σε 24,3% του συνόλου των δειγμάτων ESCC, και ο HPV-16 ήταν παρόν στο 84% των περιπτώσεων λοιμώξεων. Η επικράτηση του HPV-16 ως πιο κοινό υπότυπο που εμπλέκεται σε ESCC, ενισχύεται

επίσης από συμπεράσματα άλλων σχετικών μελετών που διεξάγονται σε άλλες ασιατικές χώρες. Εντούτοις, η ανωτέρω ένδειξη δεν είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, αποδεικνύοντας τον εντυπωσιακό ρόλο της γεωγραφικής κατανομής των ογκογονικών υπότυπων του ιού, σε συνδυασμό με την λοίμωξη από τον ιό και την ανάπτυξη νεοπλασίας.

Ένας σημαντικός ρόλος του ιού Epstein-Barr στην καρκινογένεση του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του οισοφάγου θα μπορούσε επίσης να αποδοθεί λόγω της εγγύτητας του ρινοφάρυγγα με τον οισοφάγο. (Jenkins TD 1996) Σε διάφορες μελέτες, η παρουσία του ιού EBV ανιχνεύθηκε σε ποσοστό μέχρι και 35,5 % ακανθοκυτταρικών νεοπλασμάτων του οισοφάγου από Κινέζους και Γερμανούς ασθενείς. (S. Awerkiew 2005, Wang LS 1999). Από 77 δείγματα ασθενών με οισοφαγικό καρκίνο, σε 3 περιπτώσεις βρέθηκαν λοίμωξη με τον ιό Epstein-Barr χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσεων. (Hong T) και σε 5/60 δείγματα ESCC. (Jenkins TD) Εντούτοις, ο Alfred King Y. Lam δεν ανίχνευσε καμία λοίμωξη EBV σε 74 ESCC από Κινέζους ασθενείς στο Χογκ Κονγκ, με την μέθοδο *in situ* hybridisation (ISH). Πρόσφατα, το ίδιο αρνητικό αποτέλεσμα αναφέρθηκε σε ESCC από 41 ιαπωνικούς ασθενείς από τους Mizobuchi και Chang F et al. Επίσης στη δική μας μελέτη, δεν έγινε ανίχνευση λοίμωξης του EBV ούτε στην ομάδα ESCC δειγμάτων αλλά ούτε και στην ομάδα με τα φυσιολογικά δείγματα οισοφαγικού ιστού.

10.3 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων ras και B-raf σε ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα οισοφάγου.

Ο ακανθοκυτταρικός καρκίνος του οισοφάγου είναι ένα σοβαρό πρόβλημα υγείας στις ασιατικές χώρες, συνεπεία της μακράς χρονικής χρήσης καπνών και οιοπνεύματος. Ο σημαντικότερος λόγος για τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας είναι η καθυστερημένη διάγνωση με μεγάλες και βαθεία διηθητικές και συχνά μεταστατικές στους περιφερειακούς λεμφαδένες. Η ογκογένεση προκύπτει εξ αιτίας της συσσώρευσης μεταλλαγών σε κρίσιμα γονίδια, τα οποία αλλάζουν το φυσιολογικό πρόγραμμα του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης των κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε τα γονίδια B-raf, K-ras, και N-ras για πιθανή

παρουσία μεταλλαγών σε ένα σύνολο δειγμάτων από οισοφαγικό καρκίνο που προέρχεται από έναν πληθυσμό της νότιας Ελλάδος, τη νήσο Κρήτη.

Τα γονίδια Ras συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα των ανθρώπινων όγκων. Οι μεταλλαγές K-ras έχουν αναφερθεί συχνά στη βιβλιογραφία για διαφορετικούς τύπους οισοφαγικών νεοπλασμάτων. Οι Sommerer et al, προσδιόρισαν τη μεταλλαγή K-ras σε 4 από 19 (21%) νεοπλάσματα Barrett οισοφάγου, και επίσης οι Lord et al, ανίχνευσαν μεταλλαγή K-ras σε 7 από 23 (30%) αδενοκαρκινώματα οισοφάγου. Οι Arber et al, διεξήγαγαν μια μελέτη για να προσδιορίσουν τη παρουσία μεταλλαγής K-ras σε ανθρώπινους γαστροεντερικούς όγκους, χωρίς όμως την ανίχνευση της μεταλλαγής σε 27 δείγματα ESCC. Σε δύο άλλες μελέτες που αξιολογούν δείγματα ακανθοκυτταρικού καρκίνου κεφαλής τραχήλου (HNSCC), η μεταλλαγή K-ras ανιχνεύθηκε σε 5 από 89 δείγματα (6%), και σε 2 από 26 (7.6%) δείγματα. Η δική μας μελέτη ανέδειξε την παρουσία K-ras codon 12 μεταλλαγής σε 5 από τα 30 (16%) δείγματα ESCC, ενώ καμία μεταλλαγή δεν ανιχνεύθηκε στα φυσιολογικά δείγματα οισοφάγου ($p < 0.022$). Η αναφορά μας αποτελεί την πρώτη διαπίστωση της σχέσης της K-ras μεταλλαγής σε ακανθοκυτταρικό καρκίνο του οισοφάγου, και υποδεικνύει έναν πιθανό ρόλο και συμμετοχή της K-ras μεταλλαγής στον ακανθοκυτταρικό καρκίνο του οισοφάγου.

Περαιτέρω προσπαθήσαμε να συσχετίσουμε την εισαγωγή της ανωτέρω γενετικής αλλαγής σε συνδυασμό με τη λοίμωξη HPV στην ανάπτυξη ESCC. Προηγούμενες μελέτες από τους Dokianakis et al, και Prokora et al, έχουν καταδείξει ότι η ενεργοποίηση του K-ras που συνδυάζεται με τη μόλυνση HPV μπορεί να είναι ένα σημαντικό βήμα στην καρκινογένεση ενός ουσιαστικού αριθμού νεοπλασμάτων τραχήλου της μήτρας. Επιπλέον οι Rodrigo et al, ανέδειξαν την λοίμωξη HPV σε έξι από 21 (29%) αναλυθείσες περιπτώσεις ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων υποφάρυγγα, που συνδέθηκαν με την ενίσχυση των ογκογονιδίων MYC και ERBB1, και την απώλεια ετεροζυγωτίας του p53. Ομοίως, τα συμπεράσματά μας προτείνουν σε μια θετική σχέση μεταξύ της μεταλλαγής γονιδίων K-ras και της λοίμωξης HPV, με έναν οριακά αυξημένο σχετικό κίνδυνο ($OR = 1.17$) οισοφαγικού καρκίνου.

Οι μεταλλαγές των γονιδίων N-ras αναφέρονται κυρίως σε νεοπλασίες εγκεφάλου, τη λευχαιμία, το σύνδρομο μυελοδυσπλασίας, το ήπαρ, το δέρμα,

και τους όγκους θυροειδή. Σε συμφωνία με σχετικές προηγουμένως μελέτες από τη βιβλιογραφία, δεν βρήκαμε καμία μεταλλαγή του κωδικιδόνιου 12 γονιδίου N-ras στα δείγματα ESCC και τους φυσιολογικούς οισοφαγικούς ιστούς.

Το γονίδιο B-raf αναφέρεται πρόσφατα ότι δύναται να υποστεί μετάλλαξη σε ποικίλα νεοπλάσματα. Οι Sommerer et al, προσδιόρισαν τη μεταλλαγή B-raf σε 2 από 19 νεοπλάσματα Barrett οισοφάγου (11%), και επίσης οι Lee et al, ανέδειξαν μεταλλαγές B-raf σε επτά καρκινώματα στομάχου (2,2%). Σε δύο άλλες μελέτες που διεξήχθησαν για να διευκρινίσουν μια πιθανή συμμετοχή του B-raf στα ακανθοκυτταρικά νεοπλάσματα κεφαλής τραχήλου (HNSCC), οι Weber et al, προσδιόρισαν ενεργοποιώντας μεταλλαγές B-raf σε 3 από 89 HNSCC (3%), και αντίστοιχα οι Cohen et al, προσδιόρισαν μια μεταλλαγή B-raf σε έξι (4.8%) από 128 νεοπλάσματα κεφαλής τραχήλου (6 από 77 ακανθοκυτταρικά νεοπλάσματα κεφαλής τραχήλου). Παρόλα αυτά, στη μελέτη μας δεν προσδιορίστηκε καμία μεταλλαγή B-raf στον πληθυσμό της μελέτης μας. Αυτή η μελέτη αποτελεί την πρώτη μελέτη ελέγχου για την πιθανή παρουσία της μεταλλαγής T1799A B-raf V600E σε δείγματα ESCC, που υποδικνείουν την πιθανή έλλειψη σχέσης μεταξύ της μεταλλαγής B-raf και της ανάπτυξης ESCC.

Η μελέτη μας ερεύνησε επίσης τις πιθανές αλληλεπιδράσεις γονιδίου-περιβάλλοντος. Το κάπνισμα τσιγάρων και η κατανάλωση οινοπνεύματος συνδέονται με την παραγωγή των μεσαζόντων καρκινογόνων ουσιών που δύναται να προκαλέσουν βλάβες στο πυρήνα των κυττάρων. Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει μια σειρά ισχυρών καρκινογόνων ουσιών συμπεριλαμβανομένων των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, των αρωματικών αμινών και των νιτροζαμινών καπνού, οι οποίες προκαλούν βλάβες στα συμπλέγματα DNA. Ο κίνδυνος οισοφαγικού καρκίνου συσχετίζεται ισχυρά με την κατανάλωση καπνών και οινοπνεύματος, με σχετικό κίνδυνο (RR) άνω των 100 στους βαριούς καπνιστές και τους βαριούς πότες. Η μελέτη μας ήταν σε θέση να παρουσιάσει στοιχεία για τις αλληλεπιδράσεις γονίδιο-περιβάλλοντος στην ανάπτυξη ESCC, με έναν τριπλάσιο αυξημένο κίνδυνο για τους καπνιστές, επταπλάσιο για τους πότες οινοπνεύματος, και πενταπλάσιο για τα HPV-μολυσμένα άτομα, αντίστοιχα.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματά μας παρουσιάζουν μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της επίπτωσης της λοίμωξης HPV σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα οισοφάγου και των φυσιολογικών δειγμάτων, που αποδίδονται συνήθως στον υπότυπο HPV-18. Μια πιθανή εξήγηση για αυτήν την υψηλή συχνότητα HPV-18 στα ελληνικά δείγματα θα μπορούσε μόνο να αποδοθεί στις εθνικές παραλλαγές της κατανομής HPV υπότυπων. Επομένως καταδεικνύετε σαφώς μια στενή σχέση μεταξύ της λοίμωξης HPV και της ογκογένεσης ESCC με μια ισχυρή συμμετοχή του υπότυπου HPV-18. Επιπλέον, αυτή η παρατήρηση δείχνει την επίπτωση της λοίμωξης HPV στην ανάπτυξη των οισοφαγικών καρκινωμάτων, τα οποία θα μπορούσαν να θεωρηθούν ενδεχομένως ως παράγοντας κινδύνου για τα οισοφαγικά νεοπλασμάτα. Εντούτοις, περαιτέρω προσπάθεια στην έρευνα των ιών απαιτείται για την επέκταση της γνώσης μας σχετικά με την επίπτωση των ιών σε ESCC καθώς επίσης και σε άλλο τύπο νεοπλασμάτων.

Τα συμπεράσματά μας υποδυκνύουν μια θετική σχέση μεταξύ της HPV-λοίμωξης, του καπνίσματος και της κατάχρησης οινόπνευματος σε ασθενείς που φέρουν τη μεταλλαγή K-ras, και που χαρακτηρίζονται από έναν αυξημένο σχετικό κίνδυνο για τον οισοφαγικό καρκίνο. Εντούτοις, μεγαλύτερες ομάδες ελέγχου απαιτούνται για να καταλάβουμε καλύτερα τη συμβολή των γενετικών αλλαγών όπως η μεταλλαγή K-ras, το κάπνισμα, το οινόπνευμα, και τη λοίμωξη HPV στον οισοφαγικό καρκίνο. Επιπλέον, η ανάγκη της έγκαιρης ανίχνευσης, και πρόληψης με τον προσδιορισμό των ομάδων υψηλού κινδύνου μέσω των βελτιωμένων επεμβάσεων διαλογής είναι ουσιαστική για την καλύτερη διαχείριση του ESCC.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Arber N, Shapira I, Ratan J, et al. Activation of c-K-ras mutations in human gastrointestinal tumors. *Gastroenterology* 2000;118(6):1045-1050.

Astori G, Merluzzi S, Arzese A, et al. Detection of human papillomavirus DNA and p53 gene mutations in esophageal cancer samples and adjacent normal mucosa *Digestion* 2001; 64: 9-14.

Ayiomatitis A. The epidemiology of cancer of the uterine cervix in Canada: 1931 to 1984, *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156:1075

Awerkiew S, Bollschweiler E, Metzger R, Schneider PM, Holscher AH, Pfister H. Esophageal cancer in Germany is associated with Epstein-Barr-virus but not with papillomaviruses. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2003; 192: 137-40.

Band V, Zajchowski D, Kulesa V, Sager R. Human papilloma virus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Jan;87(1):463-7

Bandara LR, Adamczewski JP, Hunt T, La Thangue NB. Cyclin A and the retinoblastoma gene product complex with a common transcription factor. *Nature* 1991 Jul 18;352(6332):249-51

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

Banks L, Edmonds C, Vousden KH. Ability of the HPV16 E7 protein to bind RB and induce DNA synthesis is not sufficient for efficient transforming activity in NIH3T3 cells. *Oncogene* 1990 Sep;5(9):1383-9

Barbacid M: ras genes. *Annu Rev Biochem* 56: 779-827, 1987.

Barbosa MS, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol* 1989 Mar;63(3):1404-7

Bauknecht T, Angel P, Royer HD, zur Hausen H. Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J* 1992 Dec;11(12):4607-17

Bauknecht T, Jundt F, Herr I, Oehler T, Delius H, Shi Y, Angel P, Zur Hausen H. A switch region determines the cell type-specific positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promoter. *J Virol* 1995 Jan;69(1):1-12

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

Berchuck A. Biomarkers in the ovary. *J Cell Biochem Suppl* 1995;23:223-6 Bernard HU, Chan SY, Delius H. Evolution of papillomaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;186:33-54

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

Bienz-Tadmor B, Zakut-Houri R, Libresco S, Givol D, Oren M. The 5' region of the p53 gene: evolutionary conservation and evidence for a negative regulatory element. *EMBO J* 1985 Dec 1;4(12):3209-13

Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993 Dec 16;366(6456):643-54

Boiron M, Levy JP, Thomas M, Friedmann JC, Bernard J (1964). *Nature* 201: 423-424

Bonnez W, Da Rin C, Rose RC, Tying SK, Reichman RC. Evolution of the antibody response to human papillomavirus type 11 (HPV-11) in patients with condyloma acuminatum according to treatment *J Med Virol* 1993 Apr;39(4):340-4

Bosetti C, Gallus S, Garavello W, La Vecchia C. Smoking cessation and the risk of oesophageal cancer: An overview of published studies. *Oral Oncol* 2006;42(10):957-964.

Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 1984 May;3(5):1151-7

Bourne HR, Sanders DA and McCormick F: The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348: 125-132, 1990.

Bourne HR, Wrischnik L, Kenyon C. Ras proteins. Some signal developments. *Nature* 1990 Dec 20-27;348(6303):678-9

Celicia M, Preiser F. *Gastrointestinal Pathology. An atlas and text*, Lippincott-Raven. Second edition 1999; 102-3.

Chan WK, Klock G, Bernard HU. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J Virol* 1989 Aug;63(8):3261-9

Chang F, Syrjanen S, Shen Q, et al. Human papillomavirus involvement in esophageal carcinogenesis in the high-incidence area of China: A study of 700 cases by screening and type-specific in situ hybridisation. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 123-30.

Chang F, Syrjanen S, Shen Q, et al. Evaluation of HPV, CMV, HSV and EBV in esophageal squamous cell carcinomas from a high-incidence area of China. *Anticancer Res* 2000; 20: 3935-40.

Chen EY, Howley PM, Levinson AD, Seeburg PH. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* 1982 Oct 7;299(5883):529-34

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

Cohen JI. Epstein-Barr virus and the immune system: hide and seek. *J Am Med Assoc* 278: 510-513,1997.

Cohen Y, Xing M, Mambo E, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(8):625-627.

Coleman DV, Morse AR, Beckwith P, Anderson MC, Gardner SD, Knowles WA, Skinner GRB. Prognostic significance of herpes simplex virus antibody status in women with cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Br. J. Obstet and Gynaec* 1983; 90:421

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

Coulier F, Imbert J, Albert J, Jeunet E, Lawrence JJ, Crawford L, Birg F. Permanent expression of p53 in FR 3T3 rat cells but cell cycle-dependent

association with large-T antigen in simian virus 40 transformants. *EMBO J* 1985 Dec 16;4(13A):3413-8

Crook T, Wrede D, Tidy J, Scholefield J, Crawford L, Vousden KH. Status of c-myc, p53 and retinoblastoma genes in human papillomavirus positive and negative squamous cell carcinomas of the anus. *Oncogene* 1991 Jul;6(7):1251-7

Danos O, Katinka M, Yaniv M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J* 1982;1(2):231-6

Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949-954.

de Villiers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 1989 Nov;63(11):4898-903

de Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;186:1-12

Delius H, Hofmann B. Primer-directed sequencing of human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;186:13-31

DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, Marsilio E, Paucha E, Livingston DM. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 1988 Jul 15;54(2):275-83

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

de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995; 76 (Pt 4): 1057-62.

Debbie Saslow, Philip E. Castle, J. Thomas Cox, Diane D. Davey, Mark H. Einstein, Daron G. Ferris, Sue J. Goldie, Diane M. Harper, Walter Kinney, Anna-Barbara Moscicki, Kenneth L. Noller, Cosette M. Wheeler, Terri Ades, Kimberly S. Andrews, Mary K. Doroshenk, Kelly Green Kahn, Christy Schmidt, Omar Shafey, Robert A. Smith, Edward E. American Cancer Society

Guideline for Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Use to Prevent Cervical Cancer and Its Precursors *CA Cancer J Clin* 2007;57:7–28

Dokianakis DN, Papaefthimiou M, Tsiveleka A, Spandidos DA. High prevalence of HPV18 in correlation with ras gene mutations and clinicopathological parameters in cervical cancer studied from stained cytological smears. *Oncol Rep* 1999;6(6):1327-1331

Dokianakis DN, Sourvinos G, Sakkas S, Athanasiadou E, Spandidos DA. Detection of HPV and ras gene mutations in cervical smears from female genital lesions. *Oncol Rep* 1998; 5: 1195-8.

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

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

Dostatni N, Lambert PF, Sousa R, Ham J, Howley PM, Yaniv M. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev* 1991 Sep;5(9):1657-71

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

Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983 Jun;80(12):3812-5

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989 Feb 17;243(4893):934-7

Dyson N, Guida P, Munger K, Harlow E. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins . *J Virol* 1992 Dec;66(12):6893-902

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

Ellis A, Field JK, Field EA, et al. Tylosis associated with carcinoma of the oesophagus and oral leukoplakia in a large Liverpool family--a review of six generations. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994;30B(2):102-112.

Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 2241-52.

Evans HJ: Molecular genetic aspects of human cancers: the 1993 Frank Rose Lecture. *Br J Cancer* 68: 1051-1060, 1993.

Essigmann JM, Wood ML . The relationship between the chemical structures and mutagenic specificities of the DNA lesions formed by chemical and physical mutagens. *Toxicol Lett* 1993 Apr;67(1-3):29-39

Favre M, Orth G, Croissant O, Yaniv M Human papillomavirus DNA: physical mapping of the cleavage sites of *Bacillus amyloliquefaciens* (BamI) and *Haemophilus parainfluenzae* (HpaII) endonucleases and evidence for partial heterogeneity. *J Virol* 1977 Mar;21(3):1210-4

Ferenczy A, Bergeron C, Richart RM. Carbon dioxide laser energy disperses human papillomavirus deoxyribonucleic acid onto treatment fields. *Am J Obstet Gynecol* 1990 Oct;163(4 Pt 1):1271-4

Field JK, Spandidos DA. The role of ras and myc oncogenes in human solid tumours and their relevance in diagnosis and prognosis (review). *Anticancer Res* 1990 Jan-Feb;10(1):1-22

Finch JT, Klug A. The structure of viruses of the papilloma-polyoma type 3. Structure of rabbit papilloma virus, with an appendix on the topography of contrast in negative-staining for electron-microscopy. *J Mol Biol* 1965 Aug;13(1):1-12

Fransen K, Klintenas M, Osterstrom A, Dimberg J, Monstein HJ, Soderkvist P. Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2004;25(4):527-533.

Friedmann JC, Levy JP, Lasnaret J, Thomas M, Boiron M, Bernard J (1963). *Compt Rend Acad Sci (Paris)* 257: 2155-2158

Garden JM, O'Banion MK, Shelnitz LS, Pinski KS, Bakus AD, Reichmann ME, Sundberg JP. Papillomavirus in the vapor of carbon dioxide laser-treated verrucae. *JAMA* 1988 Feb 26;259(8):1199-202

Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004;6(4):313-319.

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

Gloss B, Yeo-Gloss M, Meisterenst M, Rogge L, Winnacker EL, Bernard HU. Clusters of nuclear factor I binding sites identify enhancers of several papillomaviruses but alone are not sufficient for enhancer function *Nucleic Acids Res* 1989 May 11;17(9):3519-33

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

Gissmann L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*). *Int J Cancer* 1980 May 15;25(5):605-9

Gissmann L, Diehl V, Schultz-Coulon HJ, zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J Virol* 1982 Oct;44(1):393-400

Gissmann L, Hausen HZ. Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976 Apr;73(4):1310-3

Grossman SR, Laimins LA. E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene* 1989 Sep;4(9):1089-93

Gu Z, Pim D, Labrecque S, Banks L, Matlashewski G. DNA damage induced p53 mediated transcription is inhibited by human papillomavirus type 18 E6. *Oncogene* 1994 Feb;9(2):629-33

Hall EJ, Hei TK . Oncogenic transformation of cells in culture: pragmatic comparisons of oncogenicity, cellular and molecular mechanisms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986 Nov;12(11):1909-21

Harabuchi Y, Imai S and Wakashima J. Nasal T-cell lymphoma causally associated with Epstein-Barr virus. Clinicopathologic, phenotypic and genotypic studies. *Cancer* 77: 2137-2149,1996.

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

Harper JW. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv* 1997;29:91-107,

Hart IR, Saini A. Biology of tumour metastasis. *Lancet* 1992 Jun 13;339(8807):1453-7

Hashem N, Bootsma D, Keijzer W, Greene A, Coriell L, Thomas G, Cleaver JE . Clinical characteristics, DNA repair, and complementation groups in xeroderma pigmentosum patients from Egypt. *Cancer Res* 1980 Jan;40(1):13-8

He D, Zhang DK, Lam KY, et al. Prevalence of HPV infection in esophageal squamous cell carcinoma in Chinese patients and its relationship to the p53 gene mutation. *Int J Cancer* 1997; 72: 959-64.

Heck DV, Yee CL, Howley PM, Munger K. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 May 15;89(10):4442-6

Henderson S, Huen D, Rowe M, Dawson C, Johnson G and Rickinson A: Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8479-8483, 1993.

Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res* 2002; 89: 229-40.

Hunter T and Cooper JA: Protein-tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 54: 897-930, 1985.

Hunter T: Braking the cycle. *Cell* 75: 839-841, 1993.

IARC Monograph on evaluation of carcinogenic risks of humans. (1995). Human Papillomaviruses. IARC Lyon, vol 64.

Ishiwatari H, Hayasaka N, Inoue H, Yutsudo M, Hakura A. Degradation of p53 only is not sufficient for the growth stimulatory effect of human papillomavirus 16 E6 oncoprotein in human embryonic fibroblasts. *J Med Virol* 1994 Nov;44(3):243-9

Iwatsuki K, Xu Z, Ohtsuka M and Kaneko F. Cutaneous lymphoproliferative disorders associated with Epstein-Barr virus infection: a clinical overview. *J Derm Sci* 22: 181-195, 2000.

Jiang M, Shao ZM, Wu J, Lu JS, Yu LM, Yuan JD, Han QX, Shen ZZ, Fontana JA . p21/waf1/cip1 and mdm-2 expression in breast carcinoma patients as related to prognosis. *Int J Cancer* 1997 Oct 21;74(5):529-34

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

Jenkins TD, Nakagawa H, Rustgi AK. The association of Epstein-Barr virus DNA with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene* 1996; 13: 1809-13.

Jewers RJ, Hildebrandt P, Ludlow JW, Kell B, McCance DJ. Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes.. *J Virol* 1992 Mar;66(3):1329-35

Jiang W, Kahn SM, Guillem JG, Lu SH, Weinstein IB. Rapid detection of ras oncogenes in human tumors: applications to colon, esophageal, and gastric cancer. *Oncogene* 1989 Jul;4(7):923-8

Kanda T, Watanabe S, Zanma S, Sato H, Furuno A, Yoshiike K. Human papillomavirus type 16 E6 proteins with glycine substitution for cysteine in the metal-binding motif. *Virology* 1991 Dec;185(2):536-43

Kastan MB. Checkpoint controls and cancer. Introduction. *Cancer Surv* 1997;29:1.

Keen N, Elston R, Crawford L. Interaction of the E6 protein of human papillomavirus with cellular proteins. *Oncogene* 1994 May;9(5):1493-9

Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 1991 Jun 21;252(5013):1708-11

Khanim F, Tao QY and Niedobitek G. Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphism in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic locations. *Blood* 88: 3491-3501,1996.

Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, Howley PM . Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Apr 30;93(9):4350-4

Kiaris H, Spandidos DA. Mutations of ras genes in human tumours. *Int J Oncol* 1995 7:413-422

Kim IJ, Park JH, Kang HC, et al. Mutational analysis of BRAF and K-ras in gastric cancers: absence of BRAF mutations in gastric cancers. *Hum Genet* 2003;114(1):118-120.

Knudson AG Jr. Genetics of human cancer. *Annu Rev Genet* 1986;20:231-51

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

Koffa M, Simiakaki H, Ergazaki M, Papaefthimiou M, Karakatsani K, Diakomanolis E, Spandidos DA. HPV detection in stained cytological cervical specimens and correlation with cytology and histology. *Onc Rep* 1995 2:1085-1088

Kojima A, Maeda H, Kurahashi N, et al. Human papillomaviruses in the normal oral cavity of children in Japan. *Oral Oncol* 2003; 39: 821-8.

Kok TC, Nooter K, Tjong AHSP, Smits HL, Ter Schegget JT. No evidence of known types of human papillomavirus in squamous cell cancer of the oesophagus in a low-risk area: Rotterdam Oesophageal Tumour Study Group. *Eur J Cancer* 1997; 33: 1865-8.

Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Aug 15;89(16):7491-5

Lane DP: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16, 1992.

Lam AK. Molecular biology of esophageal squamous cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 33: 71-90.

Lamb P, Crawford L. Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* 1986 May;6(5):1379-85
Lewandowsky F, Lutz W. *Arch Dermatol Syph* (Berlin). 141:193-203

Lambot MA, Haot J, Peny MO, Fayt I, Noel JC. Evaluation of the role of human papillomavirus in oesophageal squamous cell carcinoma in Belgium. *Acta Gastroenterol Belg* 2000; 63: 154-6.

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

Lee SH, Lee JW, Soung YH, et al. BRAF and KRAS mutations in stomach cancer. *Oncogene* 2003;22(44):6942-6945.

Liebowitz D. Epstein-Barr virus and a cellular signaling pathway in lymphomas from immunosuppressed patients. *New Engl J Med* 338:1413-1421,1998.

Liloglou T, Giannoudis A, Ergazaki M, Koffa M and Spandidos DA. Detection of the Epstein-Barr virus by the polymerase chain reaction in immunosuppressed and immunocompromised patients. *Oncol Reports* 1: 809-811,1994.

Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 1992 Sep 18;70(6):923-35

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

Lord RV, O'Grady R, Sheehan C, Field AF, Ward RL. K-ras codon 12 mutations in Barrett's oesophagus and adenocarcinomas of the oesophagus and oesophagogastric junction. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(7):730-736.

Lowy DR and Willumsen BM: Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 62: 851-891, 1993.

Lyrionis ID, Baritaki S, Bizakis I, Tsardi M, Spandidos DA. Evaluation of the prevalence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus in esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Biol Markers* 2005;20(1):5-10.

Mack DH, Laimins LA. A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP-1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Oct 15;88(20):9102-6

Mandard AM, Hainaut P, Hollstein M. Genetic steps in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Mutat Res* 2000; 462: 335-42.

Mansur CP, Androphy EJ. Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1993 Dec 23;1155(3):323-45

Marston NJ, Crook T, Vousden KH. Interaction of p53 with MDM2 is independent of E6 and does not mediate wild type transformation suppressor function.. *Oncogene* 1994 Sep;9(9):2707-16

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

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

Medcalf EA, Milner J. Targeting and degradation of p53 by E6 of human papillomavirus type 16 is preferential for the 1620+ p53 conformation. *Oncogene* 1993 Oct;8(10):2847-51

Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol* 1976 Nov-Dec;20(6):505-9

Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* 2003;1653(1):25-40.

Miller BA, Davidson M, Myerson D, et al, Human papillomavirus type 16 DNA in esophageal carcinomas from Alaska natives. *Int J Cancer* 1997; 7: 1218-22.

Mok SC, Bell DA, Knapp RC, Fishbaugh PM, Welch WR, Muto MG, Berkowitz RS, Tsao SW. Mutation of K-ras protooncogene in human ovarian epithelial tumors of borderline malignancy. *Cancer Res* 1993 Apr 1;53(7):1489-92

Moy RL, Eliezri YD, Nuovo GJ, Zitelli JA, Bennett RG, Silverstein S. Human papillomavirus type 16 DNA in periungual squamous cell carcinomas. *JAMA* 1989 May 12;261(18):2669-73

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

Munirajan AK, Mohanprasad BK, Shanmugam G, Tsuchida N. Detection of a rare point mutation at codon 59 and relatively high incidence of H-ras mutation in Indian oral cancer. *Int J Oncol* 1998 Nov;13(5):971-4

Munger K. The role of human papillomaviruses in human cancers. *Front Biosci* 2002; 7: d641-9.

Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 1989 Dec 20;8(13):4099-105

Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and

sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 1989 Oct;63(10):4417-21

Munger K, Phelps WC. The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. *Biochim Biophys Acta* 1993 May 25;1155(1):111-23

Offord EA, Beard P. A member of the activator protein 1 family found in keratinocytes but not in fibroblasts required for transcription from a human papillomavirus type 18 promoter. *J Virol* 1990 Oct;64(10):4792-8

Oriel JD. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis* 1971 Feb;47(1):1-13
Orth G, Favre M, Croissant O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol* 1977 Oct;24(1):108-20

Orth G, Jablonska S, Jarzabek-Chorzelska M, Obalek S, Rzeska G, Favre M, Croissant O. Characteristics of the lesions and risk of malignant conversion associated with the type of human papillomavirus involved in epidermodysplasia verruciformis. *Cancer Res* 1979 Mar;39(3):1074-82

Pavletich NP. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 1999 Apr 16;287(5):821-8

Papanicolaou GN. Atlas of Exfoliative cytology. Harvard Univ. Press. Cambridge, Mass, 1956

Phelps WC, Yee CL, Munger K, Howley PM. Functional and sequence similarities between HPV16 E7 and adenovirus E1A. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989;144:153-66

Phelps WC, Munger K, Yee CL, Barnes JA, Howley PM. Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol* 1992 Apr;66(4):2418-27

Pfister H, zur Hausen H. Characterization of proteins of human papilloma viruses (HPV) and antibody response to HPV 1. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1978 Nov 17;166(1-4):13-9

Poulsen HE, Taylor CW, Sobin LH. Histological typing of female genital tract tumors. International histological classification of tumours. No 13. World Health Organization, Geneva, p64, 1975

Prokopakis P, Sourvinos G, Koumantaki Y, Koumantakis E, Spandidos DA. K-ras mutations and HPV infection in cervicitis and intraepithelial neoplasias of the cervix. *Oncol Rep* 2002;9(1):129-133.

Ramachandran S, Ramadas K, Hariharan R, Rejnish Kumar R, Radhakrishna Pillai M. Single nucleotide polymorphisms of DNA repair genes XRC1 and XPD and its molecular mapping in Indian oral cancer. *Oral Oncol* 2006;42(4):350-362.

Reich NC, Levine AJ. Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* 1984 Mar 8-14;308(5955):199-201
Reid BL. The causation of cervical cancer. *Clinics OB-Gyn.* 1985; 12:1.

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

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

Rodrigo JP, Gonzalez MV, Lazo PS, et al. Genetic alterations in squamous cell carcinomas of the hypopharynx with correlations to clinicopathological features. *Oral Oncol* 2002;38(4):357-363.

Rous P, Beard JW. (1934). *Proc Soc Exp Biol Med.* 32:578-580

Rous P, Beard JW. (1935). *J Exp Med.* 62:523-548

Rous P, Kidd JG. (1938). *J Exp Med.* 67:399-422

Rous P, Friedewald WF (1944). *J Exp Med.* 79:511-537

Rusell JM, Blair V, Hunter RD. Cervical carcinoma, *Br Med J* 1987; 295:300

Sancllemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2002; 16: 231-40.

Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998 Dec;153(6):1741-8

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

Scheffner M, Munger K, Byrne JC, Howley PM. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Jul 1;88(13):5523-7

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

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol* 2000;36(4):311-327.

Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, Hubbert NL, Haas JA, Lowy DR, Schiller JT. The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol* 1991 Sep;65(9):4860-6

Shamanin V, zur Hausen H, Lavergne D, Proby CM, Leigh IM, Neumann C, Hamm H, Goos M, Haustein UF, Jung EG, et al. Human papillomavirus infections in nonmelanoma skin cancers from renal transplant recipients and nonimmunosuppressed patients.. *J Natl Cancer Inst* 1996 Jun 19;88(12):802-11

Shen ZY, Hu SP, Lu LC, et al. Detection of human papillomavirus in esophageal carcinoma. *J Med Virol* 2002; 68: 412-6.

Shimizu K, Birnbaum D, Ruley MA, Fasano O, Suard Y, Edlund L, Taparowsky E, Goldfarb M and Wigler M: Structure of the Ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. *Nature* 304: 497-500, 1983.

Shimizu N, Tanabe-Tochikura A, Kuroiwa Y and Takada K. Isolation of Epstein-Barr (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma (BL) line Akata: malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV. *J Virol* 68: 6069-6073,1994.

Si HX, Tsao SW, Poon CS, Wang LD, Wong YC, Cheung AL. Viral load of HPV in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 103: 496-500.

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

Sisk EA, Soltys SG, Zhu S, Fisher SG, Carey TE, Bradford CR. Human papillomavirus and p53 mutational status as prognostic factors in head and neck carcinoma. *Head Neck* 2002; 2: 4841-9.

Sistonen L, Holttä E, Makela TP, Keski-Oja J, Alitalo K. The cellular response to induction of the p21 c-Ha-ras oncoprotein includes stimulation of jun gene expression. *EMBO J* 1989 Mar;8(3):815-22

Snijders PJ, Schulten EA, Mullink H, ten Kate RW, Jiwa M, van der Waal I, Meijer CJ, Walboomers JM. Detection of human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA sequences in oral mucosa of HIV-infected patients by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1990 Sep;137(3):659-66

Sommerer F, Vieth M, Markwarth A, et al. Mutations of BRAF and KRAS2 in the development of Barrett's adenocarcinoma. *Oncogene* 2004;23(2):554-558.

Δ.Α Σπαντίδος. Κλινική Ιολογία. Αρχές-Κλινικά και Μοριακά Στοιχεία..Λυχνία. Ηράκλειο1998.

Δ.Α Σπαντίδος. Μοριακή Ογκολογία. Αρχές-Μοριακά και Κλινικά Στοιχεία..Λυχνία. Ηράκλειο 2000.

Spandidos DA and Anderson MLM. A study of mechanisms of carcinogenesis by gene transfer of oncogenes into mammalian cells. *Mutations Res* 185: 271-291,1987.

Spandidos DA and Lang JC: In vitro cell transformation by ras oncogenes. *Crit Rev Oncog* 1: 195-209, 1989.

Spandidos DA: Mechanism of carcinogenesis: the role of oncogenes, transcriptional enhancers and growth factors. *Anticancer Res* 5: 485-498, 1985.

Spandidos DA and Siminovitch L: The relationship between transformation and somatic mutation in human and Chinese hamster cells. *Cell* 13: 651-662, 1978.

Spandidos DA and Siminovitch L: Transfer of anchorage independence by isolated metaphase chromosomes in hamster cells. *Cell* 12: 675-682, 1977.

Spandidos DA, Sourvinos G, Tsatsanis C, Zafiropoulos A. Normal ras genes: their onco-suppressor and pro-apoptotic functions (review). *Int J Oncol* 2002;21(2):237-241.

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

Spandidos DA. A unified theory for the development of cancer. *Biosci Rep* 1986 Aug;6(8):691-708

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

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

Sommerer F, Vieth M, Markwarth A, et al. Mutations of BRAF and KRAS2 in the development of Barrett's adenocarcinoma. *Oncogene* 2004;23(2):554-558.

Steinberg BM, Topp WC, Schneider PS, Abramson AL. Laryngeal papillomavirus infection during clinical remission. *N Engl J Med* 1983 May 26;308(21):1261-4

Storey A, Banks L. Human papillomavirus type 16 E6 gene cooperates with EJ-ras to immortalize primary mouse cells. *Oncogene* 1993 Apr;8(4):919-24

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

Strauss MJ, Shaw EW, Bunting H, Melnick JL (1949) *Proc Soc Exp Biol Med.* 72:46-50

Strauss SE, Cohen JI, Tosato G and Meier J. Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis and management. *Ann Intern Med* 118: 45-58,1993.

Syrjanen KJ. HPV infections in benign and malignant sinonasal lesions. *J Clin Pathol* 2003; 56: 174-81.

Syrjanen KJ. HPV infections and lung cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 885-91.

Syrjanen KJ. HPV infections and oesophageal cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 721-8.

Su IJ, Wang CH, Cheng AL and Chen RL. Hemophagocytic syndrome in Epstein-Barr virus-associated T-lymphoproliferative disorders: disease spectrum, pathogenesis, and management. *Leuk Lymphoma* 19: 401-406,1995.

Talamini G, Capelli P, Zamboni G, et al. Alcohol, smoking and papillomavirus infection as risk factors for esophageal squamous-cell papilloma and esophageal squamous-cell carcinoma in Italy. *Int J Cancer* 2000; 86: 874-8.

Tan SH, Leong LE, Walker PA, Bernard HU. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J Virol* 1994 Oct;68(10):6411-20

Tavani A, Bertuzzi M, Talamini R, et al. Coffee and tea intake and risk of oral, pharyngeal and esophageal cancer. *Oral Oncol* 2003;39(7):695-700.

Thomas M, Levy JP, Tanzer J, Boiron M, Bernard J (1963). *Compt Rend Acad Sci (Paris)* 257: 2155-2158

Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, Howley P. Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J Virol* 1992 Jun;66(6):3740-8

Thomas M, Massimi P, Jenkins J, Banks L. HPV-18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation. *Oncogene* 1995 Jan 19;10(2):261-8

Tommasino M, Adamczewski JP, Carlotti F, Barth CF, Manetti R, Contorni M, Cavalieri F, Hunt T, Crawford L. HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene* 1993 Jan;8(1):195-202

Tsang NM, Nagasawa H, Li C, Little JB . Abrogation of p53 function by transfection of HPV16 E6 gene enhances the resistance of human diploid fibroblasts to ionizing radiation. *Oncogene* 1995 Jun 15;10(12):2403-8

Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992 Aug 21;70(4):523-6

von Knebel Doeberitz M, Rittmuller C, zur Hausen H, Durst M . Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA. *Int J Cancer* 1992 Jul 9;51(5):831-4

Wang LS, Chow KC, Wu YC, Li WY, Huang MH. Detection of Epstein-Barr virus in esophageal squamous cell carcinoma in Taiwan. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2834-9.

Wang W KP, Schwartz M, Malon G, Haworth A, Kumar S. PCR amplification of 40 year-old paraffin-embedded tumour tissues: Comparison of four different DNA extraction and purification methods. *Int J Onc* 1994;5:0-4.

Wang W, Kumar P, Schwartz M, Malon G, Haworth A, Kumar S. PCR amplification of 40 year-old paraffin-embedded tumour tissues: Comparison of four different DNA extraction and purification methods. *Int J Onc* 1994; 5: 0-4.

Weber A, Langhanki L, Sommerer F, Markwarth A, Wittekind C, Tannapfel A. Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncogene* 2003;22(30):4757-4759.

Werness BA, Levine AJ, Howley PM . Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990 Apr 6;248(4951):76-9

White AE, Livanos EM, Tlsty TD . Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev* 1994 Mar 15;8(6):666-77

Wong HK, Ziff EB. The human papillomavirus type 16 E7 protein complements adenovirus type 5 E1A amino-terminus-dependent transactivation of adenovirus type 5 early genes and increases ATF and Oct-1 DNA binding activity. *J Virol* 1996 Jan;70(1):332-40

Wu M, Semba S, Oue N, Ikehara N, Yasui W, Yokozaki H. BRAF/K-ras mutation, microsatellite instability, and promoter hypermethylation of hMLH1/MGMT in human gastric carcinomas. *Gastric Cancer* 2004;7(4):246-253.

Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2005;12:245-262.

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

Xu C, Meikrantz W, Schlegel R, Sager R. The human papilloma virus 16E6 gene sensitizes human mammary epithelial cells to apoptosis induced by DNA damage.. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Aug 15;92(17):7829-33

Yanez L, Groffen J, Valenzuela DM. c-K-ras mutations in human carcinomas occur preferentially in codon 12. *Oncogene* 1987;1(3):315-8

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

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

Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Durr P. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol* 1995 Oct;69(10):6389-99

Zhou XB, Guo M, Quan LP, et al. Detection of human papillomavirus in Chinese esophageal squamous cell carcinoma and its adjacent normal epithelium. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1170-3.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342-50.

zur Hausen H . Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin Cancer Biol* 1999 Dec;9(6):405-11

zur Hausen H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996;122(1):3-13

zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 1976 Feb;36(2 pt 2):794

Hausen H zur, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 1974 May 15;13(5):650-6

zur Hausen H. Disrupted dichotomous intracellular control of human papillomavirus infection in cancer of the cervix. *Lancet* 1994 Apr 16;343(8903):955-7

zur Hausen H . Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 1991 Sep;184(1):9-13

zur Hausen H. (1989). Papillomaviruses as carcinomaviruses. *Advances in Viral Oncology*, Vol 8, (Klein G, ed), pp 1-26, Raven Press, New York.

zur Hausen H (1983). *Robert Koch Found. Bull. Commun.* 6:9-17

zur Hausen H (1986). Genital papillomaviruses infections. *Viruses and cancer* (Rigby PWJ and Wilkie NM, eds). Cambridge University Press, pp 83-90.