

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

ΔΕΣΠΟΙΝΑ Ν. ΔΟΚΙΑΝΑΚΗ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ *RAS*, ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ
ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ *P53* ΚΑΙ ΤΩΝ ΙΩΝ ΤΟΥ
ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ (HPV) ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ
ΑΠΟ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΟΥΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥΣ ΚΑΙ ΠΡΟΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ
ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2001

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	
ABSTRACT	
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

	ΣΕΛΙΔΑ
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο	
Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	
1.1 Γενικά	1
1.2 Νεοπλάσματα	1
1.3 Ιδιότητες των κακοήθων κυττάρων	2
1.4 Βιολογική συμπεριφορά του καρκίνου	3
1.5 Κυτταρικά ογκογονίδια	3
1.6 Ογκογονίδια σε γυναικολογικούς καρκίνους	5
1.7 Ογκοκαταστακτικά γονίδια	7
1.7.1 Δράση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων	7
1.8 Ογκοκατασταλτικά γονίδια στον γυναικολογικό καρκίνο	8
1.9 Ογκογόνοι ιοί	10
1.9.1 DNA Ογκογόνοι ιοί	10
1.9.2 Ρετροϊοί	11
1.10 Χημικά και φυσικά καρκινογόνα	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο	
ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	
2.1 Κάρκινος τραχήλου της μήτρας	13
2.1.1 Εισαγωγή	13
2.1.2 Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου (CIN).	14
2.1.3 Κολποτραχηλικά επιχρίσματα	15
2.1.4 Διηθητικό καρκίνωμα	15
2.1.5 Αδενοκαρκίνωμα	16
2.2 Καρκίνος ωοθηκών	16
Πίνακας 2.1 Ιστολογική ταξινόμηση των ωοθηκικών όγκων	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο	
ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ RAS	
3.1. Γενικά	19
Πίνακας 3.1.	20

3.2 Δομή των γονιδίων <i>ras</i>	21
Σχήμα 3.1.	21
3.3 Ρύθμιση των γονιδίων <i>ras</i>	22
Σχήμα 3.2	23
3.4 Η πρωτεΐνη p21	23
3.5 Ενεργοποίηση των γονιδίων <i>ras</i>	25
3.5.1. Μεταλλάξεις των <i>ras</i>	25
Πίνακας 3.2	27
Σχήμα 3.3.	28
3.5.2. Υπερέκφραση των <i>ras</i>	29
Πίνακας 3.3	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο	
ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΟ P53	
4.1 Εισαγωγή	31
4.2 Δομή και οργάνωση του γονιδίου <i>p53</i>	32
Σχήμα 4.1	33
4.3 Δομικοί πολυμορφισμοί στο αμινοξύ 72 της ανθρώπινης <i>p53</i> .	35
Σχήμα 4.2	37
4.4 Ρόλος του πολυμορφισμού της <i>p53</i> στην ανάπτυξη HPV σχετιζόμενων καρκίνων τραχήλου της μήτρας.	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο	
Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ HPV	
5.1. Γενικά	40
5.2 Δομή των ικών σωματιδίων και ταξινόμηση	41
5.2.1 Ιικά σωματίδια	41
5.2.2 Δομή και ρύθμιση του ιικού γενώματος	42
5.3 Ονοματολογία και ταξινόμηση	43
5.4 Λειτουργίες των ικών πρωτεϊνών E6 και E7	44
5.4.1 E6 πρωτεΐνη	44
5.4.2 E7 πρωτεΐνη	45
5.5 Μετάδοση και φυσική ιστορία των μολύνσεων από ιούς του θηλώματος	47
5.6 Μη κακοήθεις καταστάσεις που σχετίζονται με μολύνσεις με ιούς θηλώματος	47
5.7 Οι ιοί του θηλώματος στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας	48
5.8 Ο παγκόσμιος ρόλος των HPV -σχετιζόμενων καρκίνων και συμπεράσματα	49

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

6.1 Προέλευση των δειγμάτων	50
6.2 Εκχύλιση DNA	50
6.2.1 Εκχύλιση DNA από κυτταρολογικό υλικό	50
6.2.2 Εκχύλιση DNA από περιτοναϊκά εκπλύματα και ασκίτικα υγρά	51
6.2.3 Εκχύλιση DNA από κυτταρικές σειρές	52
6.2.4 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από περιφερικό αίμα.	52
6.3. Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR)	53
6.3.1 Αρχές της μεθόδου	53
6.3.2 Ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR	54
6.3.3. Ρυθμιστικά διαλύματα της PCR	55
6.3.4. Σχεδιασμός εκκινητών και συνθήκες των αντιδράσεων PCR	56
Πίνακας 6.1.	59
6.4 Μέθοδοι προσδιορισμού μεταλλάξεων	60
6.4.1. Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)	60
Σχήμα 6.1.	61
Σχήμα 6.2.	62
Σχήμα 6.3	63
6.5. Ηλεκτροφόρηση DNA	64
6.6. Χρώση νουκλεϊκών οξέων	
65	
6.6.1. Χρώση με βρωμιούχο εθίδιο	65
6.6.2. Χρώση με νιτρικό άργυρο	65
6.7 Στατιστική ανάλυση - Ηλεκτρονική επεξεργασία εικόνας	65
6.8. Εταιρείες προέλευσης των υλικών	66

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδια <i>ras</i> καθώς και των ιών HPV, σε αλλοιώσεις του γυναικείου γεννητικού συστήματος.	68
7.1.1. Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδια <i>ras</i> και των ιών HPV σε χρωσμένο κυτταρολογικό υλικό δειγμάτων με προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνο τραχήλου μήτρας.	68

7.1.1.1 Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν και κυτταρολογική εξέταση	68
7.1.1.2 Ενεργοποίηση των ογκογονιδίων <i>ras</i> σε χρωσμένο κυτταρολογικό υλικό κατά Παπανικολάου.	69
Εικόνα 7.1 .	70
Εικόνα 7.2 .	70
Πίνακας 7.1.	71
7.1.1.3 Ανίχνευση και τυποποίηση των ιών HPV σε χρωσμένο κυτταρολογικό υλικό δείγματος με προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνο τραχήλου μήτρας.	71
Πίνακας 7.2	72
Πίνακας 7.3	73
Πίνακας 7.4	74
Εικόνα 7.3	75
Εικόνα 7.4	75
7.2. Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδια <i>ras</i> σε χρωσμένα με τεχνική Παπανικολάου ασκίτικα υγρά και περιτοναϊκά εκπλύματα από δείγματα καρκίνου των ωοθηκών	76
7.2.1 Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν από ασκίτικα υγρά και περιτοναϊκά εκπλύματα και ιστολογική διάγνωση.	76
7.2.2 Ενεργοποίηση των ογκογονιδίων <i>ras</i> σε χρωσμένα ασκίτικα υγρά και περιτοναϊκές εκπλύσεις δειγμάτων με καρκίνο ωοθηκών.	77
7.2.3 Ενεργοποίηση των ογκογονιδίων <i>ras</i> σε χρωσμένα ασκίτικα υγρά και περιτοναϊκές εκπλύσεις σε δείγματα με κυσταδένωμα.	78
Πίνακας 7.5	79
Πίνακας 7.6	80
Πίνακας 7.7.	81
Εικόνα 7.5.	81
7.3 Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στο γονίδιο p53 σε HPV θετικές αλλοιώσεις του γυναικείου γεννητικού συστήματος.	82
7.3.1 Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν και κυτταρολογική εξέταση	82
7.3.2 Τυποποίηση των ιών HPV σε χρωσμένο κυτταρολογικό υλικό δειγμάτων με προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνο τραχήλου μήτρας.	82
Πίνακας 7.8.	83
Πίνακας 7.9	83
7.3.3 Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στο γονίδιο p53 σε HPV θετικές αλλοιώσεις του γυναικείου γεννητικού συστήματος καθώς και σε δείγματα ελέγχου.	84
Πίνακας 7.10	85
Εικόνα 7.6.	86
Εικόνα 7.7.	86

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8ο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8.1 Εισαγωγή	87
8.2 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων <i>ras</i> σε χρωσμένο κυτταρολογικό υλικό δειγμάτων με προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνο τραχήλου μήτρας.	87
8.2.1 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων <i>ras</i> σε αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας.	87
8.2.2 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων <i>ras</i> χρωσμένα ασκίτικα υγρά και περιτοναϊκές εκπλύσεις δειγμάτων με καρκίνο ωοθηκών.	89
8.3 Ανίχνευση του ιού HPV σε χρωσμένο κυτταρολογικό υλικό δειγμάτων με προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνο τραχήλου μήτρας.	91
8.4 Συσχέτιση της ανίχνευσης του ιού HPV σε χρωσμένα κολποτραχηλικά επιχρίσματα με την κυτταρολογική και ιστολογική διάγνωση	93
8.5 Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στο γονίδιο p53 σε HPV θετικές αλλοιώσεις του γυναικείου γεννητικού συστήματος.	93
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	95
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Ατομικά και οικογενειακά στοιχεία.

Όνομα :

Επίθετο:

Όνοματεπώνυμο πατέρα:

Όνοματεπώνυμο μητέρας:

Ημερομηνία γέννησης:

Τόπος γέννησης:

Οικογενειακή κατάσταση:

Διεύθυνση:

Τηλέφωνο:

Εθνικότητα:

Δέσποινα

Δοκιανάκη

Νικόλαος Δοκιανάκης

Ασημίνα Λυγερού-Δοκιανάκη

13/12/73

Ηράκλειο Κρήτης

Άγαμη

Φιλικής Εταιρείας 12Α,

Ηράκλειο Κρήτης

(081) 241664

Ελληνική

Εκπαίδευση.

Μέση Εκπαίδευση

Ανώτερη Εκπαίδευση

4ο Λύκειο Ηρακλείου,

Βαθμός:18.6/11(άριστα)

1993-1997. Πτυχίο τμήματος Βιολογίας,

Σχολής Θετικών Επιστημών,

Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Σειρά επιτυχίας εισόδου:5η.

Βαθμός πτυχίου: 7.83

(Λίαν Καλώς).

Ερευνητική εμπειρία

1996-1997.Διπλωματική εργασία.

Εργαστήριο Οικονομικής Εντομολογίας,

(Καθ. Α.Π.Οικονομόπουλος) ,

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο

Κρήτης.

Διδακτορική διατριβή

1997- Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής

στα εργαστήρια Ιολογίας του

Ιατρικού τμήματος του

Πανεπιστημίου Κρήτης

(Καθ.Δ.Α.Σπαντίδος) και του

Παν/μιακού Νοσοκομείου

Ηρακλείου.

Ξενογλώσσες δημοσιεύσεις

1. **Dokianakis DN**, Sourvinos G, Sakkas S, Athanasiadou E and Spandidos DA. Detection of HPV and *ras* gene mutations in cervical smears from female genital lesions. *Oncol Rep* 5:1198-1199, 1998 .
2. **Dokianakis DN**, Varras MN, Papaefthimiou M, Apostolopoulou J, Simiakaki H, Diakomanolis E and Spandidos DA. Ras gene activation in malignant cell of human ovarian carcinoma peritoneal fluids. *Clin Exp Metastas*. 7: 93-297, 1999.
3. **Dokianakis DN**, Papaefthimiou M, Tsiveleka A and Spandidos DA. High prevalence of HPV 18 in correlation with *ras* gene mutations and clinicopathological parameters in cervical cancer studied from stained cytological smears. *Oncol. Rep* 6: 1327-1331, 1999
4. . **Dokianakis DN** and Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of HPV- associated cervical cancer. *Mol Cell Bol Res Comm* 3: 111-114, 2000
5. . **Dokianakis DN**, Koumantaki E, Billiri K and Spandidos DA. P53 codon 72 as a risk factor in the development of HPV-associated non-melanoma skin cancers in immunocompetent hosts. *Int J Mol Med* 5: 405-409, 2000.
6. Spandidos DA, **Dokianakis DN**, Kallergi G and Aggelakis E. Molecular Basis of Gynecological Cancer. Review. *Ann New York Acad Scien*. 900:56-64, 2000.
7. Billiri K, Koumantaki E **Dokianakis DN**, Sourvinos G and Spandidos DA. Human papillomavirus infection of non melanoma skin cancers in immunocompetent hosts. *Canc Let*. 161(1): 83-88, 2000.
8. Papadakis EN, **Dokianakis DN** and Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. *Mol Cell Bol Res Comm*. 3:389-392, 2000.

Ανακοινώσεις:

1. **Dokianakis DN**, Sourvinos G, Sakkas S, Barbanou E, Xiou P, Athanasiadou E and Spandidos DA. Detection of HPV and *K-ras* mutations in cervical smears from female genital lesions. 4th Panhellenic Congress of Cytology. Athens, Greece, 1998.
2. Papaefthimiou M, Varras MN, **Dokianakis DN**, Tsiveleka A, Mixalakis S, Simiakaki H and Spandidos DA. Detection of HPV and *K-ras* mutations by the Polymerase Chain Reaction in malignant cervical smears. 4th Panhellenic Congress of Cytology. Athens, Greece, 1998.
3. **Dokianakis DN**, Sourvinos G, Sakkas S, Athanasiadou E and Spandidos DA. Detection of HPV and *ras* gene mutations in cervical smears from female genital lesions. 49th Meeting of the Hellenic Biochemical and Biophysical Society, Heraklion Crete, Greece, 1998.
4. **Dokianakis DN**. The role of human papilloma viruses in gynecological malignancies. Seminar on cancer research, Balkan School of Oncology, Athens Greece, 1998. (Invited speaker)

5. **Dokianakis DN**, Varras MN, Papaefthimiou M, Apostolopoulou J, Simiakaki H, Diakomanolis E and Spandidos DA. Ras gene activation in malignant cell of human ovarian carcinoma peritoneal fluids. . 3rd Panhellenic Congress of Female Oncology. Athens, Greece, 1998.

6. **Dokianakis DN**, Varras MN and Spandidos. Ras gene activation in malignant cells of human ovarian carcinoma peritoneal fluids. 3rd World Congress on Advances in Oncology and . 1st International Symposium on Molecular Medicine. October 15-17 -, 1999. Heraclion, Crete, Greece.

7. **Dokianakis DN**, Papaefthimiou M, Tsiveleka A and Spandidos DA Correlation of HPV and ras gene mutations with clinicopathological parameters in gynecological malignancies studied from stained cytological smears. 4th World Congress on Advances in Oncology and . 2nd International Symposium on Molecular Medicine. October 7-9 -, 1999. Athens, Greece.

8. Papadakis EN, **Dokianakis DN** and Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. .5th World Congress on Advances in Oncology and .3rd International Symposium on Molecular Medicine. October 19-21 ,2000. Athens, Greece.

Ελληνικές δημοσιεύσεις

1. **Δ.Ν.Δοκιανάκη**, Γ.Καλλέργη, Δ.Α.Σπαντίδος. Γονιδιακή θεραπεία. Ιατρική Επικαιρότητα. 7:260-265, 1998.

2. . Δ.Α Σπαντίδος, Μ.Μανωλαράκη, **Δ.Ν Δοκιανάκη** και Γ.Σουρβίνος. Ογκογονίδια και ογκο-κατασταλτικά γονίδια στον γυναικολογικό καρκίνο. Εφηβική Γυναικολογία, Αναπαραγωγή και Εμμηνόπαυση. Υπό έκδοση.

Ξένες γλώσσες

α)Αγγλικά

First certificate in English.

University of Cambridge(Lower).

β)Γερμανικά

Zertificat Deutsch als Fremdsprache,
Goethe-Institut.

γ)Γαλλικά

Cours accelere I,

Institut Francais d'Athenes.

Εμπειρία σε Η/Υ

Λειτουργικά συστήματα:

MS-DOS,UNIX,MS-Windows.

Γλώσσα προγραμματισμού:Pascal.

Μηχανοργάνωση:MS-Word for
Windows.

Εμπειρία σε σύστημα Macintosh.

Επιμορφωτικά Σεμινάρια

- A) "Σύσταση τροφίμων και ανάλυση". (Καθ. Αντώνης Καφάτος, M.D). 1-5 Αυγούστου 1994.
 Ιατρική σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- B) 2nd World Congress on Advances in Oncology. October 16-18, 1997.
 Vouliagmeni, Athenes, Greece. Organized by the International Journal of Oncology and Oncology Reports.
- Γ) 4^o Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρολογίας. 26-28 Μαρτίου, 1998. Αθήνα.
- Δ) 9th p53 Workshop. 9-13 May, 1998. Elounda, Crete, Greece
- Ε) 49th Meeting of the Hellenic Biochemical and Biophysical Society Heraclion Crete, Greece, 1998.
- ΣΤ) 3rd World Congress on Advances in Oncology. October -, 1998. Heraclion, Crete, Greece. Organized by the International Journal of Oncology and Oncology Reports.
- Η) 4th World Congress on Advances in Oncology and 2nd International Symposium on Molecular Medicine.. October 7-9 -, 1999 Athens, Greece.
 Organized by the International Journal of Oncology and Oncology Reports.
- Θ) 5th World Congress on Advances in Oncology and 3rd International Symposium on Molecular Medicine. Heraclion, Crete, Greece.
 Organized by the International Journal of Oncology and Oncology Reports.
- Ι) 6th Postgraduate Seminar Course in Liver Neoplasias-Therapeutic Options. October 1-3, 1999. Heraclion, Crete, Greece.
- Κ) 9^o Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο. Νοέμβριος 12-15, 1998. Ηράκλειο, Κρήτης.

Επιστημονική εμπειρία

- A. Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα " Ιολογικές εξετάσεις με την μέθοδο του PCR σε ιδιώτες (ΚΑ 847)" υπό τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Μάρτιος 1998- Φεβρουάριος 1999.
- B. Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα " Φωτοδιάγνωση και φωτοδυναμική θεραπεία HPV λοιμώξεων δέρματος και δερματοβλεννογονίων περιοχών (ΚΑ 1208)" υπό τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Ιούλιος '99-Σεπτέμβριος '99, Φεβρουάριος '00-Απρίλιος'00, Οκτώβριος'00-Δεκέμβριος'00.

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 η συμμετοχή ιών στην ανάπτυξη συγκεκριμένων μορφών καρκίνου. Η συμμετοχή συγκεκριμένων κυτταρικών και ιϊκών γονιδίων στο γυναικολογικό καρκίνο ιδιαίτερα καθώς και η προσπάθεια αναζήτησης του επακριβούς ρόλου τους, αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της υψηλής συχνότητας εμφάνισης των μορφών αυτών νεοπλασίας. Η συνεργασία πολλών γενετικών παραγόντων και γενετικών μεταλλάξεων καθώς και γενετικών πολυμορφισμών για την δημιουργία της καρκινογένεσης του γεννητικού συστήματος, οδηγεί στην μελέτη των αλληλεπιδράσεων των γενετικών αυτών φαινομένων, της συσχέτισης ιών και ξενιστή και των περιβαλλοντικών παραγόντων στην προσπάθεια ερμηνείας της καρκινογένεσης.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια ανίχνευσης ενεργοποιημένων ογκογονιδίων *ras* σε προκαρκινικές και νεοπλαστικές αλλοιώσεις χρωσμένων κυτταρολογικών παρασκευάσματος από δείγματα τραχήλου του γυναικείου γεννητικού συστήματος. Συγχρόνως, η ενεργοποίηση των γονιδίων *ras* ανιχνεύθηκε και σε χρωσμένα παρασκευάσματα ασκικικών υγρών και περιτοναϊκών εκπλυμάτων από ασθενείς με καρκίνο ωθηκών. Ανιχνεύθηκε επίσης, η συμμετοχή του ιού του θηλώματος του ανθρώπου (HPV) και η τυχούσα αλληλεπίδραση μεταξύ της ιϊκής μόλυνσης και της ενεργοποίησης των ογκογονιδίων *ras* στα δείγματα που μελετήθηκαν. Ταυτόχρονα έγινε προσπάθεια ανίχνευσης των συσχετίσεων μεταξύ των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων των ασθενών και της ενεργοποίησης των ογκογονιδίων *ras* και της ιϊκής μόλυνσης. Στα δείγματα που βρέθηκαν να φέρουν ιϊκή μόλυνση με ιό HPV υψηλής επικινδυνότητας έγινε προσδιορισμός της γενετικής σύστασης γενετικών τόπων του γονιδίου της p53 με σκοπό την πιθανή συσχέτιση συγκεκριμένων πολυμορφισμών με μεγαλύτερη προδιάθεση για την καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας ενώ όλα τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στατιστικά για πιθανές συσχετίσεις μεταξύ τους.

Από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι το ογκογονίδιο *K-ras* απαντάται συχνότερα ενεργοποιημένο σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας *ras* στις αλλοιώσεις που μελετήθηκαν, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται η συμμετοχή ιδιαίτερα του γονιδίου *H-ras* αλλά και του *N-ras*. Η υψηλότερη συχνότητα ενεργοποίησης του ογκογονιδίου *K-ras* παρατηρείται στους καρκίνους ωοθηκών αλλά και τραχήλου της μήτρας (47% και 30% αντίστοιχα). Η ενεργοποίηση φαίνεται να συμβαίνει τόσο σε πρώιμα, όσο και σε όψιμα στάδια οπότε τα ενεργοποιημένα ογκογονίδια *ras* μπορούν να αποτελέσουν προγνωστικούς δείκτες για μετάπτωση σε αλλοίωση υψηλού βαθμού, είτε εναλλακτικούς μηχανισμούς καρκινογένεσης ενώ δεν αποκλείεται η χρήση τους ως δείκτες κινδύνου αυξημένης πιθανότητας μετάστασης.

Όσον αφορά τις ιϊκές λοιμώξεις η ανίχνευση των ιών HPV φαίνεται να παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση με την καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας και ιδιαίτερα εμπλέκονται τύποι υψηλού κινδύνου του ιού. Βασισμένοι στα ερευνητικά ευρήματα της μελέτης αυτής η ομοζυγωτία της αργινίνης στο κωδικόνιο 72 του γονιδίου της *p53* εμφανίζεται, σε δείγματα που φέρουν ιό HPV υψηλού κινδύνου, να αποτελεί πιθανό παράγοντα ανίχνευσης της προδιάθεσης των ασθενών για ανάπτυξη καρκίνου στον τράχηλο της μήτρας.

Η ταυτόχρονη ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στα ογκογονίδια *ras* και της μόλυνσης με κάποιο τύπο HPV ιδιαίτερα αν αυτός ανοίκει στην ομάδα υψηλού κινδύνου, αποτελεί πιθανώς ένα σημαντικό βήμα για τη δημιουργία μέρους των καρκίνων αυτών, ενώ δεν αποκλείεται η αλληλεπίδραση και η συνεργιστική δράση με άλλους παράγοντες.

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. The collaboration of a variety of genetic factors, gene mutations and specific gene polymorphism in female genital cancer lesions and their interactions and correlation with their host and the environment have also been extensively studied.

In the present study, the pattern of point mutations at codon 12 of the K-ras, H-ras and N-ras genes was investigated, using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis, in human cytological specimens from female genital malignant and premalignant lesions. In parallel, the pattern of point mutations at codon 12 of the K-ras, H-ras and N-ras genes was studied in malignant cytological specimens of ovarian adenocarcinoma peritoneal and ascitic fluids. The purpose of this study was also to detect and identify the human papillomaviruses in stained cervical smears and to correlate them with the other parameters studied and with the clinicopathological parameters of the patients. Regarding the association between p53 polymorphisms and risk for HPV-associated cervical cancer. It has been reported that patients with the arginine form have a higher risk of developing cervical cancer than those with the proline form.

In the lesions examined, K-ras gene activation by codon 12 point mutations, was the most frequent alteration observed, mutations of H-ras and N-ras were also found although at lower rates. The highest incidence of K-ras mutations was found in ovarian cancer, followed by in cervical cancer (47% and 30% respectively). Activation occurs in early as well as in late stages. It is suggested that activated *ras* genes could serve as genetic indicators for progression of a lesion to a higher grade, or even as indicators for metastasis. HPV viruses were found to be strongly implicated in the development of cervical lesions, the high risk HPV types were overrepresented. Based on the findings of this study, it is suggested that p53 Arg homozygosity at codon 72 could represent a potential risk factor for the tumorigenesis of high risk HPV-associated cervical cancer.

In conclusion, *ras* activation combined with HPV infection particularly by a high risk type of the virus may be an important step in the development of a substantial

numbers of cervical carcinomas, while their interactions with other genes or events may also be involved.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιολογίας του Τμήματος Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, κατά το χρονικό διάστημα 1997-2000.

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

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη του εργαστηρίου Ιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης και ιδιαίτερα τους: Γ. Γλαράκη, Γ. Σουρβίνο, Μ. Τσοπανομίχαλου, Σ. Μυγιάκη, Κ. Μπιλίρη, Ζ. Σαριδάκη, Μ. Μανωλαράκη, Σ. Δετοράκη, Δ. Αρβανίτη, Ι. Διαλυνά, Ν. Σουλιτζή Α.Ζαφειρόπουλο και Ε. Στεφανάκη. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ.Ο.Ζώρα για τη σημαντική βοήθεια του.

Τέλος, δεν θα πρέπει να παραλείψω να ευχαριστήσω τον άνδρα μου κ. Ε. Παπαδάκη καθώς και τους γονείς μου για την αμέριστη βοήθεια και κατανόηση τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

1.1. Γενικά

Το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από εκατομμύρια κύτταρα. Η ζωή κάθε ανθρώπινου κυττάρου διέπεται από θεμελιώδεις κανόνες: κάθε κύτταρο προέρχεται από διαίρεση ενός προϋπάρχοντος (κυτταρικός πολλαπλασιασμός), ενώ όλα, σε άλλη στιγμή το καθένα, θα πεθάνουν. 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 γονιδίωμα (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 περισσότερες στοιβάδες (μικτοί όγκοι). Τα νεοπλάσματα διαίρονται σε καλοήθη και κακοήθη, με βάση συγκεκριμένα

παθολογοανατομικά κριτήρια. Ένα κακόηθες νεόπλασμα ονομάζεται και καρκίνος. Συχνότερες θέσεις ανάπτυξης καρκίνου αποτελούν ο πνεύμονας, το παχύ έντερο, ο προστάτης (άνδρες) και ο μαστός (γυναίκες).

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 νεοπλάσματος, 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).

1.5 Κυτταρικά ογκογονίδια

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.

Έως σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 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 κωδικοποιεί για μια μορφή του αυξητικού παράγοντα παράγοντα που παράγεται από αιμοπετάλια (*PDGF*), ο *EGF*, ο *TGF-α* κ.α. 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.

1.6 Ογκογονίδια σε γυναικολογικούς καρκίνους

Τραχήλος Μήτρας

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί το τρίτο πιο συχνό καρκινικό φαινόμενο στις γυναίκες παγκοσμίως και η συχνότητα του είναι αυξημένη στις λιγότερο αναπτυγμένες χώρες.

Ένας αριθμός προγνωστικών παραγόντων έχουν σχετιστεί με την πρόοδο του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, συμπεριλαμβανομένου του βάθους της προσβολής του στρώματος, το βάθος της βλάβης και την ύπαρξη λεμφαδένων. Σύγχρονες μελέτες εμπλέκουν την οικογένεια των γονιδίων *ras* στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας παρόλο που οι μεταλλάξεις σε αυτή την οικογένεια γονιδίων αναφέρονται λιγότερο συχνά σε κακοήθεις γυναικολογικές καταστάσεις. Οι μεταλλάξεις αυτές συμβαίνουν κυρίως στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *K-ras*. Επιπρόσθετα σε μελέτες σε γυναίκες στον Ελλαδικό χώρο, βρέθηκε ότι η συχνότητα των μεταλλαγών στο *K-ras* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 30% και στο *H-ras* σε ποσοστό 10% (Dokianakis, 1999). Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *ras* ανιχνεύθηκαν επίσης σε μη κακοήθεις βλάβες, γεγονός που συνηγορεί ότι τα γονίδια *ras* παίζουν σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης του τραχήλου της μήτρας. (Dokianakis, 1998)

Με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης RAS p21 σε κακοήθεις βλάβες σε αντίθεση με καλοήθεις βλάβες και προκαρκινικές καταστάσεις. Στον μικρο-κυτταρικό τύπο καρκίνου πλακωδών κυττάρων, οι όγκοι που εμφάνιζαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης RAS p21 εμφάνιζαν καλύτερη πρόγνωση από τους όγκους με αρνητική έκφραση. Η έκφραση της πρωτεΐνης RAS p21 σε συσχέτιση με τον ιστολογικό τύπο της βλάβης μπορεί συνεπώς να συναποτελέσουν προγνωστικούς παράγοντες σε ειδικούς ιστολογικούς τύπους καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. (Field , 1990). Μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *H-ras*, έχουν επίσης βρεθεί σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και έχουν συσχετιστεί με κακή πρόγνωση (Field , 1990).

Η υπερέκφραση του γονιδίου *myc* έχει δειχθεί να αποτελεί συχνό γεγονός σε όγκους τραχήλου μήτρας που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο. Σε κάποιες μελέτες η υπερέκφραση ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 35% στις συνολικές περιπτώσεις. Η υπερέκφραση του ογκογονιδίου αυτού δεν αποτελεί συνέπεια της γονιδιακής επέκτασης που παρατηρήθηκε στο 8% των περιπτώσεων. Η έκφραση αυτή συσχετίζεται με την εμφάνιση βεβαρημένων μορφών σε ενδοεπιθηλιακά καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας (τύποι

CIN II και III). Παρ' όλ' αυτά, οι ασθενείς με υπερέκφραση του γονιδίου *myc* εμφάνισαν μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής, ενώ η παράμετρος αυτή μπορούσε να θεωρηθεί ως σημαντικότερος προγνωστικός παράγοντας για την συγκεκριμένη μορφή καρκίνου ακόμα και συγκρινόμενη με τα επίπεδα λεμφαδένων (Field, 1990).

Ενδομήτριο

Οι καρκίνοι στο ενδομήτριο μπορούν να διακριθούν σε αδενοκαρκινώματα του ενδομητρίου, που αποτελούν και την πλειονότητα των καρκίνων του ενδομητρίου και απεικονίζονται με την ανάπτυξη από ατυπική υπερπλασία του ενδομητρίου σε περιβάλλοντα με αυξημένο ερεθισμό από οιστρογόνα. Σε αντίθεση, τα ορώδη καρκινώματα είναι αντιπροσωπευτικό είδος στις μεγαλύτερες γυναίκες που εμφανίζουν ατροφία του ενδομητρίου και δεν διαθέτουν τους τυπικούς προδιαθεσικούς παράγοντες για καρκίνο του ενδομητρίου. (Sherman, 1995)

Η υπερέκφραση του γονιδίου *HER-2/NEU* συναντάται στο 10% των αδενοκαρκινωμάτων του ενδομητρίου και σχετίζεται με την ενδοπεριτοναϊκή εξάπλωση της ασθένειας και με κακή πρόγνωση. Το γονίδιο *myc* εμφανίζει γονιδιακή επέκταση στο 10% των περιπτώσεων. Έχουν επίσης περιγραφεί σημειακές μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *K-ras* σε περιπτώσεις υπερπλασίας του ενδομητρίου, που μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα πρώιμο γεγονός στην ανάπτυξη καρκίνου στο ενδομήτριο. Η υπερέκφραση του γονιδίου *c-erbB-2* παρατηρείται συχνά σε ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο της νόσου και βαθιά προσβολή του μυομητρίου. Η υπερέκφραση του *c-fms* στον καρκίνο του ενδομητρίου καθώς και η παρουσία του πρωτο-ογκογονιδίου *tht* που κωδικοποιεί τον υποδοχέα του CSF-1 (Colony Stimulating Factor), μπορούν να σκιαγραφήσουν μια ομάδα με όγκους υψηλού κινδύνου (Spandidos, 2000).

Ωοθήκες

Στα καρκινώματα των ωοθηκών, οι μεταλλάξεις του γονιδίου *K-ras* δεν δείχνουν να εμπλέκονται ως κύριοι παράγοντες στην παθογένεση του διηθητικού καρκίνου, πιθανολογείται όμως να έχουν σημαντικό ρόλο στους οριακούς καρκίνους των ωοθηκών (borderline) που εμφανίζουν χαμηλό κακοήθες δυναμικό (Mok, 1993). Η υπερέκφραση του ογκογονιδίου *HER-2/NEU* συναντάται σε ποσοστό 30% σε καρκίνους των ωοθηκών και η αυξημένη έκφραση σχετίζεται με μικρή επιβίωση (Berchuck, 1995).

Η γονιδιακή επέκταση του γονιδίου *akt2* έχει ανιχνευθεί σε ποσοστό 12.1% από δείγματα καρκίνου των ωοθηκών. Η υπερέκφραση του γονιδίου *akt2* μπορεί επίσης να εμφανιστεί σε καρκινώματα ωοθηκών που δεν έχουν γονιδιακή επέκταση για το *akt2*. Οι αλλαγές στο *akt2* μπορεί συνεπώς να παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση των ωοθηκών και να σχετίζονται με κακή πρόγνωση για τις ασθενείς.

1.7 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. Τα ογκο-κατασταλτικά γονίδια συνεισφέρουν στον καρκινικό φαινότυπο κατά τρόπο υπολειπόμενο. Για την αλλαγή της κυτταρικής συμπεριφοράς, επομένως, απαιτείται η λειτουργική απενεργοποίηση και των δύο αλληλομόρφων ενός ογκο-κατασταλτικού γονιδίου (Knudson, 1986).

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.

1.7.1. 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 προσκόλληση (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*) συνδεδεμένα 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 αναστείλουν 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).

1.8 Ογκο-κατασταλτικά γονίδια σε γυναικολογικούς καρκίνους

Τράχηλος μήτρας

Η *p53* αποτελεί ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο και σχετίζεται με μια πλειάδα όγκων. Η *p53* προσδένεται στο DNA και επάγει την μεταγραφή άλλων ρυθμιστικών γονιδίων, των οποίων τα προϊόντα προσδένονται στα σύμπλοκα της G1 κυκλίνης με την πρωτεΐνη Cdk2. Το σύμπλοκο αυτό βοηθά τα κύτταρα να περάσουν το σημείο ελέγχου της φάσης G1. Η *p53* μπλοκάρει την δραστηριότητα κινάσης και εμποδίζει τα κύτταρα να προχωρήσουν στην φάση S και να αντιγράψουν το DNA τους. Συνεπώς η φυσιολογική λειτουργία της *p53* είναι η διασφάλιση του σωστού διπλασιασμού των κυττάρων μετά από βλάβη του DNA. Η *p53* λειτουργεί ως ελεγκτικό μέσο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε στρεσογόνες καταστάσεις. Μεταλλαγές της απαντώνται σε ποσοστά μεγαλύτερα του 50% σε όλες τις μορφές καρκίνου. Τα εξώνια 5-8 που διαθέτουν υψηλό βαθμό συντήρησης αποτελούν τις πιο συχνά μεταλλαγμένες περιοχές της *p53*. Μεταλλαγές της *p53* έχουν βρεθεί σε δείγματα με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Οι μεταλλαγές αυτές σχετίζονται συνήθως με ταυτόχρονη μόλυνση με τους ιούς HPV.

Το γονίδιο *p16* αποτελεί ένα άλλο ογκο-κατασταλτικό γονίδιο. Η λειτουργία αυτού του γονιδίου είναι να εμποδίζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου επιδρώντας άμεσα στην ενεργοποίηση μιας κυκλίνης/ κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης (CDK) (Kim, 1998). Το γονίδιο της *p21* εδράζει στην χρωμοσωμική περιοχή 9q21. Η σπουδαιότητα των γονιδίων αυτών είναι ότι αποτελούν δυνητικούς αναστολείς του συμπλόκου κυκλίνης D/ κινάσης 4. Το γονίδιο αυτό εμπλέκεται σε ποικίλα είδη γυναικολογικών καρκίνων (Khleif, 1996, Hirama 1996). Σε πρόσφατες μελέτες το γονίδιο αυτό εμφανίζει χαμηλά επίπεδα έκφρασης σε ασθενείς με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Οι γυναίκες αυτές εμφανίζουν συχνά μεταλλάξεις στην ακολουθία του DNA στο γονίδιο *p16* (Sano 1998, Kim 1998).

Ενδομήτριο

Σε περιπτώσεις καρκίνου του ενδομητρίου εμφανίζονται συχνά μεταλλάξεις ή ελλείμματα στο γονίδιο της *p53*. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποτελέσει προγνωστικό παράγοντα για αυτή την κατηγορία όγκων (Blom 1998).

Το ογκογονίδιο *PTEN* εμπλέκεται πιθανότατα σε διάφορα είδη καρκίνου. Σε αρκετούς όγκους είχαν βρεθεί ελλείμματα στο χρωμόσωμα 10q23 και αυτό το γεγονός οδήγησε στην ανακάλυψη του γονιδίου *PTEN*. Η πρωτεΐνη του έχει δράση κινάσης τυροσίνης και τενσίνης. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *PTEN* έχουν αναφερθεί σε γλοιοβλαστώματα, σε όγκους μαστού, θυρεοειδούς αδένα, νεφρών και σε γυναικολογικούς καρκίνους. Σε αρκετές περιπτώσεις καρκίνου του ενδομητρίου έχουν βρεθεί μεταλλάξεις και ελλείμματα στο γονίδιο *PTEN*. Επίσης, νέα στοιχεία εμπλέκουν τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *p16* στο καρκινικό μετασχηματισμό κυττάρων του ενδομητρίου (Lu 1998, Munirajan 1998).

Ωοθήκες

Η απώλεια στη λειτουργία και οι μεταλλάξεις της *p53* θεωρούνται ότι εμπλέκονται στον καρκίνο των ωοθηκών. Οι αλλαγές αυτές θεωρείται πιθανό να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί παράγοντες σε αυτή την γυναικολογική κακοήθεια (Zachos 1998, Jiang 1997, Marchetti 1997). Το γονίδιο *PTEN* δε φαίνεται να εμπλέκεται σε σημαντικό βαθμό στην καρκινογενετική πορεία των ωοθηκών.

Το γονίδιο *BRCAl* είναι ένα ογκο-κατασταλτικό γονίδιο που χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 17q-23q. Το γονίδιο αυτό εμπλέκεται πιθανώς στην επιδιόρθωση κατεστραμένου DNA στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, και στην διαφοροποίηση των κυττάρων (Radice 1997, Somasundaram 1997). Η λειτουργία του γονιδίου έγινε γνωστή μετά την κλωνοποίηση του το 1994. Οι γυναίκες με μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα για καρκίνο ωοθηκών και μαστού. Οι ασθενείς με κληρονομικό καρκίνο ωοθηκών και μαστού εμφάνισαν ίδιες αντικαταστάσεις πέντε νουκλεοτιδίων στο εξόνιο 5 (Presneau 1998).

Οι μεταλλάξεις και τα ελλείμματα του γονιδίου *p16* σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με τον καρκίνο των ωοθηκών. Τα γονίδια *nm23-H1* και *nm23H2* εμπλέκονται γενικά στους γυναικολογικούς καρκίνους. Πιθανότατα τα γονίδια αυτά αποτελούν ρυθμιστές της μεταγραφής ενώ σχετίζονται με την εξέλιξη μεταστάσεων σε καρκίνους ωοθηκών.

1.9. Ογκογόνοι ιοί

Οι πρώτες ενδείξεις περί της συμμετοχής ιών στην ογκογενετική διαδικασία προήλθαν πριν από σχεδόν έναν αιώνα και η αξία της πληροφορίας αυτής αναγνωρίστηκε με την απονομή του βραβείου Nobel το 1968 στον Rous που ήταν ο εμπνευστής της ιδέας. Σήμερα υπάρχει αποδεδειγμένη συμμετοχή ιογενών λοιμώξεων στην αιτιολογία ενός στους επτά καρκίνους που συμβαίνουν παγκοσμίως (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.

1.9.1. DNA ογκογόνοι ιοί

Οι DNA ογκογόνοι ιοί (π.χ. HPV, HBV) έχουν την ικανότητα να ενσωματώνουν περιοχές του γονιδιώματός τους στο γενετικό υλικό των ξενιστών. Οι ιικές πρωτεΐνες εκφράζονται στα προσβεβλημένα κύτταρα, τροποποιώντας τη συμπεριφορά γονιδίων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση. Με τέτοιο μηχανισμό προκύπτει απενεργοποίηση του ογκο-κατασταλτικού γονιδίου *p53* στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, μετά από ενσωμάτωση του γονιδίου *ORF X* του ιού της Ηπατίτιδος Β στα ηπατοκύτταρα

πασχόντων από τη νόσο. Στο 70% περίπου των περιπτώσεων τραχήλου της μήτρας ανευρίσκονται τα στελέχη HPV₁₆ και HPV₁₇. Ενσωμάτωση των ιικών γονιδίων *E6* και *E7* στα καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε απώλεια δράσης των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων *p53* και *Rb* (Münger 1989, Scheffner 1990).

1.9.2. Ρετροϊοί

Οι RNA ογκογόνοι ιοί (ρετροϊοί) κατατάσσονται σε δυο κατηγορίες, ανάλογα με το ογκογενετικό τους δυναμικό. Ορισμένοι επάγουν αμέσως και ταχέως καρκινικό φαινότυπο σε όλα τα κύτταρα τα οποία μολύνουν. Αυτοί οι ταχέως εξαλάσσοντες ιοί (transducing viruses) ενσωματώνουν στο γονιδιώμά τους φυσιολογικά κυτταρικά γονίδια (πρωτο-ογκογονίδια) και μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας τα μετατρέπουν σε ενεργοποιημένα ογκογονίδια μέσα στο προσβεβλημένο κύτταρο. Η μετατροπή (transduction) γίνεται με απάλειψη ρυθμιστικών περιοχών του πρωτο-ογκογονιδίου, ή με αύξηση της μεταγραφικής του δραστηριότητας (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 γονδιακού υποκινητή (promotor) ή ενισχυτή (enhancer) που καταλήγουν σε αυξημένη μεταγραφή του εν λόγω γονιδίου (Hayward, 1981).

1.10. 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 γονδιακών 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 κακοηθών δερματικών όγκων στους πάσχοντες από το σύνδρομο μελαγχρωστικής ξηροδερμίας (Xeroderma Pigmentosum) (Hashem, 1980).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

2.1 Καρκίνος τραχήλου της μήτρας

2.1.1 Εισαγωγή

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι, με τα σημερινά δεδομένα, η τρίτη σε συχνότητα κακοήθεια στις γυναίκες μετά τον καρκίνο του μαστού και του ενδομητρίου, ενώ τα προηγούμενα χρόνια κατείχε την δεύτερη θέση (Chapman, 1988, Ayiomatitis, 1987). Έχει υπολογιστεί ότι περίπου το 2% των γυναικών άνω των 40 ετών έχουν αυξημένη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Η μέση ηλικία των γυναικών που προσβάλλονται από διηθητικό καρκίνο είναι τα 45 έτη, ενώ η μέση ηλικία προσβολής από προδιηθητικό καρκίνο είναι σημαντικά μικρότερη. Η αύξηση της συχνότητας των ενδοεπιθηλιακών νεοπλασιών οφείλεται αφενός στο συστηματικό έλεγχο των γυναικών, αφετέρου στη σεξουαλική απελευθέρωση που είχε ως αποτέλεσμα τη μόλυνση μεγάλου αριθμού ατόμων με τις σεξουαλικά μεταδιδόμενες ασθένειες.

Στο μεγαλύτερο ποσοστό (90%) ο καρκίνος του τραχήλου προέρχεται από το πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο της έξω επιφάνειας της ενδοκολπικής μοίρας (επιθηλίωμα), σε 7% των περιπτώσεων είναι αδενοκαρκίνωμα και προέρχεται από το μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο του αυλού και τους αδένες του, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό καλύπτεται από μικτές μορφές ή αδιαφοροποίητες.

Η αιτία του τραχηλικού καρκίνου δεν είναι γνωστή, αλλά έχουν επισημανθεί αρκετοί προδιαθεσικοί παράγοντες. Η σεξουαλική δραστηριότητα φαίνεται να σχετίζεται με τη νόσο. Η έναρξη της συνουσίας σε νεαρή ηλικία καθώς και ο αριθμός των συντρόφων είναι σημαντικοί παράγοντες. Επίσης, η χρόνια τραχηλίτιδα πιστεύεται, ότι προδιαθέτει για την ανάπτυξη καρκίνου. Μερικοί ερευνητές υποστηρίζουν την ενοχοποίηση ιού, όταν διαπιστώθηκε κάποια σχέση ανάμεσα στις φλεγμονές στον τράχηλο από τον ιό του έρπητα τύπου II και στον καρκίνο του τραχήλου (Coleman,

1983). Επίσης ενοχοποιούνται ως καρκινογόνοι άλλοι μικροοργανισμοί, όπως τα χλαμύδια του τραχώματος και ιδιαίτερα οι ιοί του παπλώματος (HPV).

2.1.2 Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου (CIN).

Ο όρος CIN συμπεριλαμβάνει όλες τις διαταραχές με τους όρους δυσπλασία και καρκίνωμα *in situ*. Η καθιέρωση του όρου CIN έγινε γιατί παρατηρήθηκε ότι υπάρχει μια εξελικτική πορεία των δυσπλαστικών αλλοιώσεων προς καρκίνωμα *in situ*. Υπάρχουν τρεις τύποι CIN, που περιγράφονται ως εξής:

CIN I: Τα άνω 2/3 του πλακώδους επιθηλίου συνήθως παρουσιάζουν καλή διαφοροποίηση των κυττάρων. Οι ανωμαλίες των πυρήνων είναι ελαφράς μορφής και εντοπίζονται στα κύτταρα του ανώτερου 1/3 του επιθηλίου. Υπάρχουν μιτωτικές εικόνες, αλλά είναι λίγες και εντοπίζονται στο κάτω 1/3 του επιθηλίου.

CIN II: Το άνω 1/2 του επιθηλίου είναι ώριμο και καλώς διαφοροποιημένο, αλλά με μερική ατυπία στους πυρήνες των κυττάρων. Οι παθολογικοί πυρήνες είναι πιο εκσημασμένοι και βρίσκονται πιο επιπολής. Παθολογικές μιτωτικές εικόνες παρατηρούνται στα κατώτερα 2/3 του επιθηλίου.

CIN III. Η ύπαρξη ωριμότητας στα κύτταρα, εντοπίζονται στο πάνω επιπολής 1/3 του επιθηλίου ή λείπει τελείως. Υπάρχουν σε όλο το πάχος ανωμαλίες των πυρήνων. Επίσης σε όλο το πάχος ανευρίσκονται και μιτωτικές εικόνες.

Στην περίπτωση του καρκινώματος *in situ* πέραν της προσβολής ολόκληρου του επιθηλίου από τα δυσπλαστικά κύτταρα, υπάρχει και αλλοίωση στην πόλωση των κυττάρων, ενώ παρατηρούνται αυξημένες μιτωτικές εικόνες και πολυμορφισμός. Οι πιο πολλές ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες αναπτύσσονται στη ζώνη μετατροπής ή μετάπτωσης του τραχηλικού επιθηλίου.

2.1.3 Κολποτραχηλικά επιχρίσματα

Η λήψη επιχρισμάτων με την μέθοδο Παπανικολάου και η χρησιμότητα τους έχει από καιρό αναγνωρισθεί και αξιολογηθεί (Papanikolaou, 1956). Ο κίνδυνος για ανάπτυξη διηθητικού καρκίνου, είναι 10 φορές μεγαλύτερος στις γυναίκες που δεν έχουν ελεγχθεί με τεστ Παρ. Οι αλλοιώσεις στο τεστ Παρ μπορεί να είναι καλοήθεις, φλεγμονώδεις ή δυσκαρυωτικές. Κάποια προβλήματα δημιουργούνται από την μη καλή λήψη του υλικού, από τη μη καλή μονιμοποίηση του, από την μη καλή αξιολόγηση των κυττάρων, από την μη επαρκή περιγραφή ευρημάτων με τους κατάλληλους όρους και τέλος από την μη επίδοση του αποτελέσματος στις γυναίκες. Όσον αφορά τα χρονικά διαστήματα λήψεως του τεστ Παρ, πιστεύεται ότι πρέπει να αρχίζει η λήψη αμέσως μετά την πρώτη σεξουαλική επαφή της γυναίκας και να γίνεται λήψη κάθε έτος έως την ηλικία των 35 ετών. Από εκεί και πέρα κάθε 2 έτη, έως την ηλικία των 65 ετών, οπότε και μπορεί να σταματήσει η προληπτική λήψη του τεστ.

Το τεστ Παρ είναι μια σπουδαία εξέταση ελέγχου, που όμως δεν είναι διαγνωστική. Αυτό σημαίνει ότι η παρουσία ενός παθολογικού τεστ θέλει παραπέρα διερεύνηση με επιπλέον διαγνωστικές μεθόδους.

2.1.4 Διηθητικό καρκίνωμα

Το διηθητικό καρκίνωμα από το πλακώδες επιθήλιο αναπτύσσεται, όταν διηθηθεί το τραχηλικό στρώμα μετά από διάσπαση της βασικής μεμβράνης (Reid,1985, Rusell, 1987). Από το σημείο αυτό το καρκίνωμα του τραχήλου επεκτείνεται με άμεση διήθηση των ιστών και με λεμφογενείς και αιματογενείς μεταστάσεις. Με τη λεμφική οδό τα νεοπλασματικά κύτταρα μεταφέρονται στους επιχώριους λεμφαδένες (παραμήτριους, υπογαστρικούς, έξω λαγόνιους, ιερούς) και συνήθως όσο πιο προχωρημένη είναι η τοπική αλλοίωση, τόσο περισσότερο δημιουργούνται απομακρυσμένες μεταστάσεις. Το ήπαρ είναι η πιο συνηθισμένη εντόπιση αιματογενούς διασποράς, αλλά το νεόπλασμα μπορεί ακόμη να προσβάλλει τους πνεύμονες, τον εγκέφαλο, τα οστά, τα επινεφρίδια, το σπλήνα ή το πάγκρεας (Matsuyama, 1989).

2.1.5 Αδενοκαρκίνωμα

Δε διαφέρει στην εντόπιση, στη μακροσκοπική εμφάνιση, στη διασπορά και στην ευαισθησία στην ακτινοβολία, από το καρκίνωμα με πλακώδη επιθήλια. Εξορμάται από το κυλινδρικό επιθήλιο του τραχήλου και αποτελείται από υψηλά κυλινδρικά κύτταρα, εκκριτικά, συγκεντρωμένα σε αδενωματώδεις σχηματισμούς με λίγο στρώμα. Ταξινομείται σε καλής, μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης (Buntine, 1979).

2.2 Καρκίνος ωοθηκών

Αποτελεί το 24% των κακοηθών όγκων του γεννητικού συστήματος της γυναίκας, ενώ είναι υπεύθυνος για το 47% των θανάτων από κακοήθεια του συστήματος αυτού. Εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στην ηλικία των 40-65 χρόνων.

Στον όρο καρκίνος των ωοθηκών περιλαμβάνονται όλες οι κακοήθεις νεοπλασίες, που προέρχονται από τις ωοθήκες, άσχετα με την ιστολογική τους υφή, είναι δηλαδή είτε επιθηλιακής, στρωματικής ή από τα αρχέγονα κύτταρα προέλευσης, ακόμη μπορεί να είναι και οι μεταστατικοί (Webb, 1980). Οι όγκοι αυτοί στην πλειονότητα τους (85-90%) είναι επιθηλιακά καρκινώματα.

Η ταξινόμηση των όγκων της ωοθήκης σε κατηγορίες είναι δύσκολη, γι' αυτό κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφορες κατατάξεις (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1 Ιστολογική ταξινόμηση των ωοθηκικών όγκων

1. Κοινοί επιθηλιακοί όγκοι (καλοήθεις- κακοήθεις ή οριακής κακοήθειας)

α. Ορώδη κυσταδενώματα

1. Καλοήθη
2. Με δραστηριότητα πολ/σμου των επιθηλιακών κυττάρων και πυρηνικές ανωμαλίες, χωρίς διηθητική ανάπτυξη
3. Κυσταδενοκαρκινώματα

β. Βλενώδη κυσταδενώματα

1. Καλοήθη
2. Με δραστηριότητα πολ/σμου των επιθηλιακών κυττάρων και πυρηνικές ανωμαλίες, χωρίς διηθητική ανάπτυξη
3. Κυσταδενοκαρκινώματα

γ. Ενδομητριοειδείς όγκοι

1. Καλοήθη
2. Με δραστηριότητα πολ/σμου των επιθηλιακών κυττάρων και πυρηνικές ανωμαλίες, χωρίς διηθητική ανάπτυξη
3. Αδενοκαρκινώματα

δ. Μεσονεφροειδείς όγκοι

1. Καλοήθη
2. Με δραστηριότητα πολ/σμου των επιθηλιακών κυττάρων και πυρηνικές ανωμαλίες, χωρίς διηθητική ανάπτυξη
3. Κυσταδενοκαρκινώματα

ε. Όγκοι του Brenner

στ. Μικτοί επιθηλιακοί όγκοι

ζ. Αδιαφοροποίητα καρκινώματα

η. Αταξινόμητοι επιθηλιακοί όγκοι

2. Όγκοι του στρώματος της γεννητικής ταινίας

- α. Κοκκιο-στρωματικοί όγκοι
- β. Ανδροβλάστωμα
- γ. Γυνανδροβλάστωμα
- δ. Αταξινόμητοι

3. Όγκοι από τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα

- α. Δυσγερμίνωμα
- β. Λεκιθικού ασκού
- γ. Εμβρυϊκοί
- δ. Πολυεμβρύωμα
- ε. Χοριοκαρκίνωμα
- στ. Τεράτωμα
- ζ. Μεικτού τύπου

4. Γοναδοβλάστωμα

5. Μη ειδικοί όγκοι των ωθηκών από τους μαλακούς ιστούς

6. Αταξινόμητοι

7. Μεταστατικοί

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.

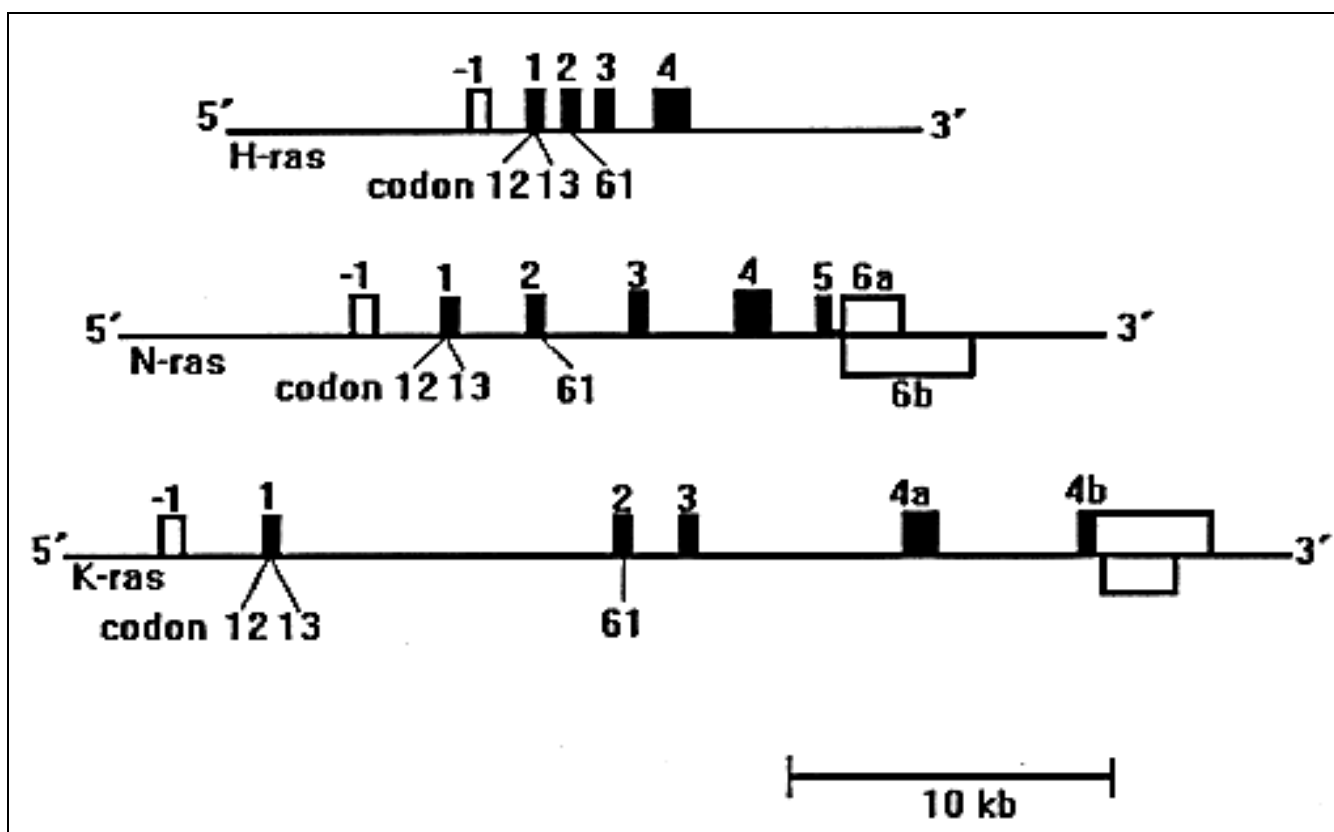
Πίνακας 3.1. Τα ογκογονίδια *ras*

	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		

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 ουσιαδώς στη ρύθμιση των βασικών κυτταρικών λειτουργιών, δηλαδή της ανάπτυξης, πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης.

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 τριων γονιδίων είναι παρόμοια, έχοντας ένα 5' μη κωδικοποιό εξώνιο (εξώνιο -1), τέσσερα κωδικοποιά εξώνια και μια περιοχή πολλαπλών διαδοχικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (VTR) στο μη μεταγραφόμενο 3' άκρο του γονιδίου (Εικόνα 3.1) (Ishii, 1985, Koffa, 1994).



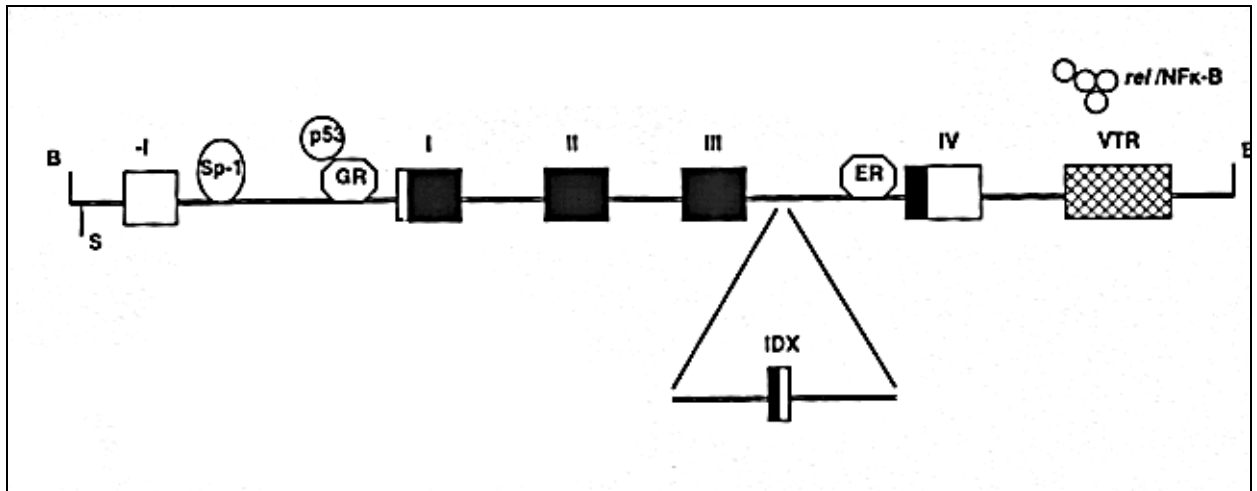
Σχήμα 3.1. Δομή των γονιδίων *H-ras*, *N-ras* και *K-ras*. Τα μαύρα κουτιά αναπαριστούν τα κωδικοποιά και τα λευκά κουτιά τα μη κωδικοποιά εξόνια, αντίστοιχα. Σημειώνονται επίσης τα κωδικόνια με αυξημένη συχνότητα μεταλλαξογένεσης.

Τα μήκη των αντίστοιχων είναι παρόμοια, ενώ τα μήκη των εσώνιων διαφέρουν αρκετά, με αποτέλεσμα τα συνολικά μήκη των τριών γονιδίων να είναι διαφορετικά: το *K-ras* έχει μήκος περίπου 50 Kb, το *H-ras* 4.5 Kb και το *N-ras* περίπου 10Kb. Το *K-ras* φέρει δυο εναλλακτικά τέταρτα εξόνια, το 4A και 4B,. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα *K-ras* A, *H-ras* και *N-ras* αποτελούνται από 189 αμινοξέα, ενώ του *K-ras* B αποτελείται από 188 αμινοξέα, διότι το 4B εξόνιο έχει ένα κωδικόνιο λιγότερο. Τα τρία γονίδια *ras* φέρουν υποκινητές οι οποίοι είναι πλούσιοι σε GC ενώ 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*, *API*, *AP2*, *MYB*, *E4TF1*, *SP1* και *MLTF/MYC*.

3.3 Ρύθμιση των γονιδίων *ras*

Η ύπαρξη μεταγραφικού ελέγχου των γονιδίων *ras* προκύπτει από τη διαφορετική 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 αναγνωριστεί 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 αναγνωριστεί δύο ακόμη θέσεις με λειτουργική σημασία για τη μεταγραφή, μια με ειδικότητα σύνδεσης της πρωτεΐνης p53 (Zachos & Spandidos, 1998) και η δεύτερη με ενεργότητα πρόσδεσης υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid response element-GRE). Παρόμοια περιοχή υπάρχει για οιστρογονικούς υποδοχείς (ERE) στο τέταρτο εσόνιο του *H-ras* (Zachos, 1996).

Στο μηχανισμό έκφρασης των γονιδίων *ras* εμπλέκονται επίσης ρυθμιστικές θέσεις της 3' περιοχής τους. Πρόκειται για επαναλαμβανόμενες μινιδουροφορικές 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 4^{ου} εσονίου και της 3' VTR περιοχής του *H-ras* (Hwang & Cohen, 1997).



Σχήμα 3.2. Απεικόνιση των κυριότερων θέσεων ρύθμισης της μεταγραφής του γονιδίου *H-ras*. Μεταξύ των κωδικοποιών και μη 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 προσδέονται η πρωτεΐνη p53, υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (GR) και οιστρογονικοί υποδοχείς (ER). Στην περιοχή μιτιδορυφορικού DNA (VTR) προσδέεται 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.

3.4 Η πρωτεΐνη p21

Οι πρωτεΐνες *ras* είναι GTPάσες προσδεδεμένες στην μεμβράνη του κυττάρου. Η φυσιολογική p21^{ras} (RAS) υδρολύει GTP σε συγκρίσιμα επίπεδα με αυτά των καθαρών G πρωτεΐνων 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 HB χ του ιού της ηπατίτιδας B (Doria, 1995). Οι MAPK φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τα ELK1 και JUN και την CREB κινάση/RSK2 που αποτελεί μέλος της pp 90RSK οικογένειας (Xing 1996). Η ογκογόνος RAS ενεργοποιεί τη 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, TGF α , και TGF β . Οι RAS καταστέλλουν την μεταγραφή των γονιδίων MYOD1, MYOH, Myf5, MRF4, μυογενίνης, PDGF υποδοχέα και της φμπρονεκτίνης (Sistonen 1989).

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

3.5 Ενεργοποίηση των γονιδίων *ras*

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

3.5.1. Μεταλλάξεις των *ras*

Οι μεταλλάξεις των γονιδίων *ras* απαντώνται σε ορισμένα κωδικόνια, τα 12, 13 και 61 (Kiaris & Spandidos, 1995). 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).

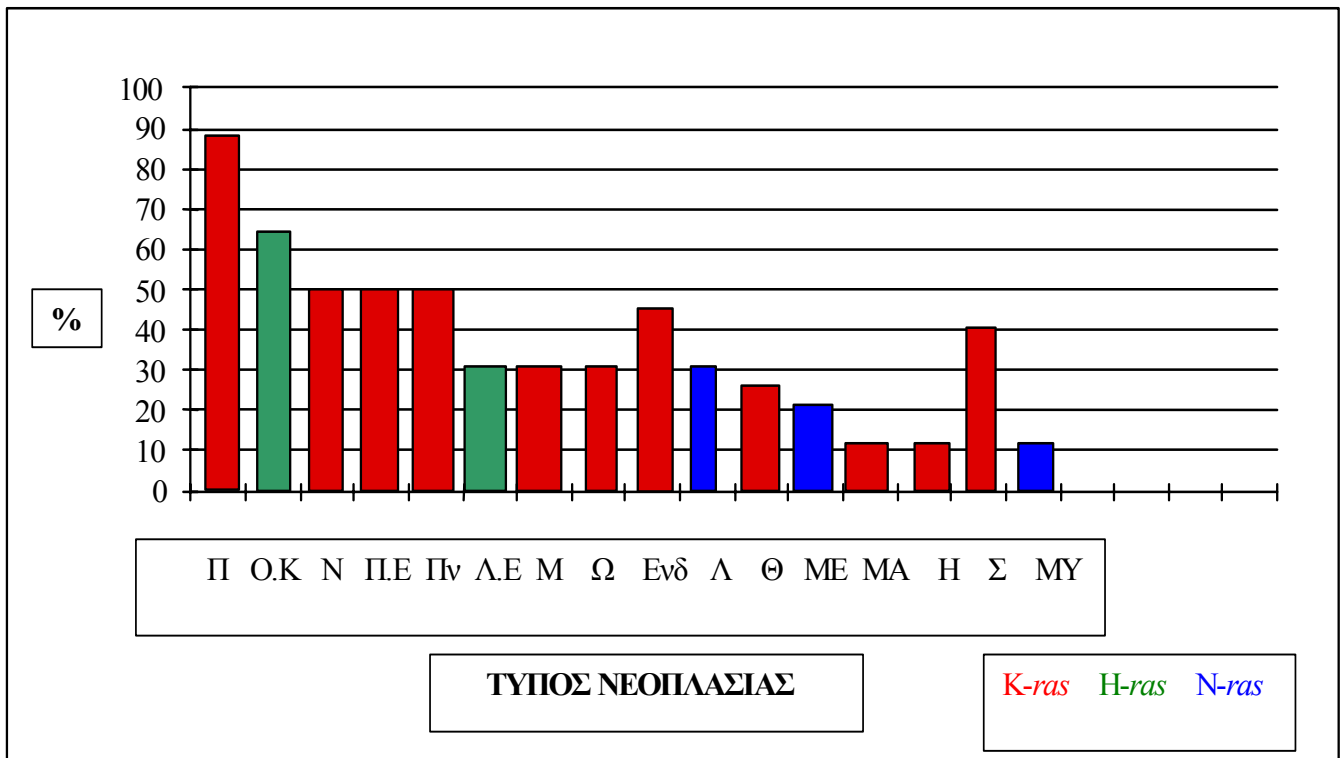
Οι μεταλλάξεις των γονιδίων *ras* ανιχνεύονται είτε με τη βοήθεια πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP), είτε με συνδυασμό ανάλυσης πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονής έλικας (SSCP) και ανάλυσης ετεροδίκλωνου DNA (heteroduplex), ακολουθούμενων από ανάλυση αλληλουχίας DNA (sequencing). Με τις τεχνικές αυτές, μεταλλάξεις των τριών γονιδίων έχουν περιγραφεί στους περισσότερους

τύπους ανθρώπινου καρκίνου (Σχήμα 3.3, Πίνακας 3.2). Η ανεύρεση σημειακών μεταλλάξεων του κωδικονίου 12 του *K-ras* στο 90% των αδενοκαρκινωμάτων παγκρέατος αποτελεί μία από τις ισχυρότερες συσχετίσεις γονιδιακής συμμετοχής στον ανθρώπινο καρκίνο. Οι μεταλλάξεις των *K-ras* και *H-ras* αφορούν περισσότερο συμπαγείς όγκους, κυρίως αδενοκαρκινώματα και επιθηλιακά νεοπλάσματα αντίστοιχα, ενώ αυτές του *N-ras* απαντώνται ως επί το πλείστον σε αιματολογικές κακοήθειες. Συχνά ανευρίσκονται στον ίδιο τύπο καρκίνου μεταλλάξεις σε περισσότερα από ένα γονίδια της οικογένειας (π.χ. μεταλλάξεις των *H-ras* και *K-ras* σε καρκινώματα ήπατος και νεφρού, καθώς και των *H-ras* και *N-ras* σε καρκινώματα θυρεοειδούς αδένου). Μεταλλάξεις παρατηρούνται συχνότερα στο *K-ras* από ότι στα υπόλοιπα γονίδια της οικογένειας. Η ερμηνεία πηγάζει από τη θεώρηση του καρκίνου σαν υπερμεταλλακτικού φαινοτύπου, αποτελέσματος πολλαπλών μη ειδικών μεταλλάξεων, διάσπαρτων στο γονιδίωμα. Στατιστικά, επομένως, το πολύ μεγαλύτερο *K-ras* υφίσταται συχνότερα μεταλλαξογένεση.

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

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

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



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).

3.5.2. 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.

Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στον καρκίνο του πνεύμονα τα ογκογονίδια *ras* ενεργοποιούνται μέσω υπερέκφρασης σε διαφορετικό ιστολογικό τύπο απ' ότι με μεταλλάξεις (Kurzrock, 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).

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

RHA = ανάλυση υβριδισμού RNA

WB =υβριδισμός κατά Western

NB =υβριδισμός κατά Northern

RT-PCR = Αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση

*Οι ανοσοϊστοχημικές μελέτες και ο υβριδισμός κατά Western γίνονται στο επίπεδο της πρωτεΐνης p21 και δεν επιτρέπουν την ανάλυση της διαφορικής έκφρασης των τριών γονιδίων *ras*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ P53

4.1 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 πρωτεΐνες 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).

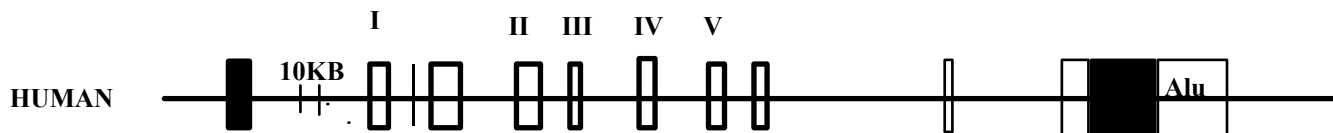
Ορισμένα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα δεν έχουν μόνο χάσει την ογκοκατασταλτική δράση αλλά επίσης δύνανται να δρουν ως επικρατή συνεργαζόμενα ογκογονίδια στην εξαλλαγή των πρωτογενών κυττάρων με τη *ras* p21. Αυτή η ιδιότητα δεν έχει σχέση με την ικανότητα να σχηματίζει σύμπλεγμα με το φυσιολογικό p53 επειδή 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 .

4.2 Δομή και οργάνωση του γονιδίου p53

Το γονίδιο p53 του ανθρώπου εντοπίζεται στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 17, στη θέση 17p13.1 (Benchimol, 1985). Το γονίδιο της p53 έχει βρεθεί ότι περιορίζεται στα σπονδυλωτά. Η οργάνωση του γονιδιώματος των γονιδίων p53 διαφορετικών ειδών δείχνει

μια σημαντική ομοιότητα μεταξύ τους. Τα γονίδια περιέχουν 11 εξώνια στα οποία παρεμβάλλονται 10 εσώνια. Σε όλες τις περιπτώσεις το εξώνιο 1 του γονιδίου p53 είναι ένα εξώνιο που δεν μεταφράζεται. Τα εξώνια 2,4,5,7 και 8 κωδικοποιούν για 5 ομάδες αμινοξικών αλληλουχιών που είναι ιδιαίτερα συντηρητικές εξελικτικά (Σχήμα 4.1).



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

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

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

Η έκφραση του γονιδίου της *p53* του ανθρώπου ελέγχεται από δυο υποκινητές. Ο ένας, που ονομάζεται P1, εντοπίζεται 100-250 ζευγάρια βάσεων πριν από το πρώτο εξώνιο που δεν μεταφράζεται και δεν φέρει καμιά από τις αλληλουχίες που βρίσκονται στους περισσότερους από τους υποκινητές των ευκαρυωτικών οργανισμών όπως το CAAT box, το TATA BOX και αλληλουχίες πλούσιες σε G/C. Ένας δεύτερος υποκινητής, P2, εντοπίζεται μέσα στο πρώτο εσώνιο (Reisman, 1988). Έχει δειχθεί ότι μια διαφορεική ρύθμιση των δυο υποκινητών φαίνεται ότι είναι σημαντική για την έκφραση του mRNA του *p53* κατά τη διάρκεια της τελικής διαφοροποίησης (Reisman, 1989).

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

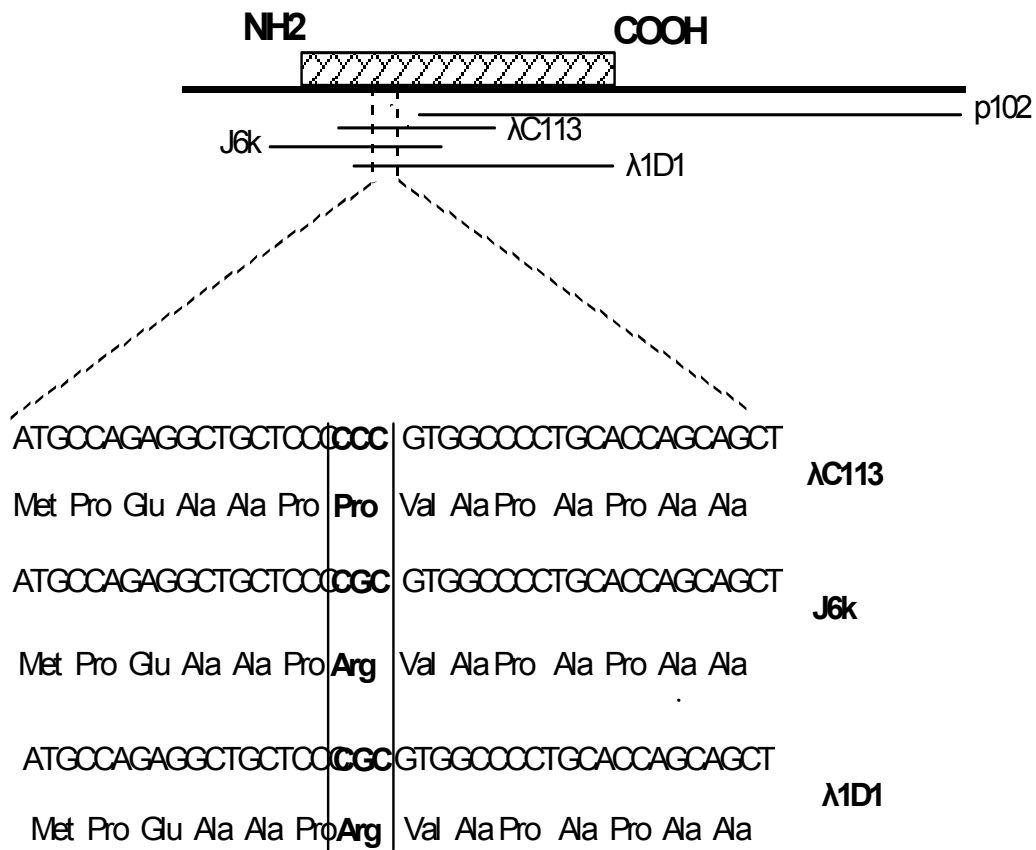
Ανάλυση με Northern blot έδειξε ότι το mRNA του γονιδίου *p53* διαφορετικών ειδών είναι περίπου 2-3 kb. Η 3' μη μεταφραζόμενη ακολουθία αυτών των mRNA κυμαίνεται από 800bp για το *p53* του ποντικού μέχρι 1800bp για τον *X.laervis*. Η ακολουθία ATTTA, πλούσια σε A/T που βρίσκεται στην 3' μη κωδικοποιούσα περιοχή πολλών γονιδίων και παίζει σημαντικό ρόλο στην σταθερότητα των mRNA έχει βρεθεί στο mRNA του *p53* του αρουραίου, του ποντικίου και του *X.laervis*, 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 όμωςδειχθεί ότι τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου *p53* είναι αυξημένα σε μερικούς όγκους, σε μη διαφοροποιημένα αρχέγονα κύτταρα και σε ερυθρολευχαιμικά κύτταρα, κατά τη διάρκεια της οργανογένεσης του ποντικού καθώς και στην ανάπτυξη του εμβρύου της όρνιθας. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν μια συσχέτιση 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 (Coulier, 1985), ενώ σε έναν αριθμό κυττάρων που διαφοροποιούνται τα επίπεδα του mRNA του *p53* μειώνονται (Reich, 1983). Αυτή η μείωση των επιπέδων του mRNA του γονιδίου *p53* μπορεί, τουλάχιστον εν μέρει, να οφείλεται σε μετα-μεταφραστική ρύθμιση (Dony, 1985). Αλληλουχίες DNA που βρίσκονται πριν την 5' επικαλυπτόμενη περιοχή του mRNA έχουν 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).

4.3 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 4.2).

Μελέτες σε cDNA κλώνους της p53 από την κυτταρική σειρά GM637 μετασχηματισμένων ανθρώπινων ινοβλαστών (Zakut-Hougi, 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 αλληλίες.



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

4.4 Ρόλος του πολυμορφισμού της p53 στην ανάπτυξη HPV σχετιζόμενων καρκίνων τραχήλου της μήτρας.

Η ανάπτυξη του καρκίνου τραχήλου της μήτρας σχετίζεται άμεσα 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 ουμπικουϊτίνης. Παρόλο που η απενεργοποίηση των δυο αυτών ογκο-κατασταλτικών πρωτεϊνών από τον HPV είναι πιθανώς σημαντική, δεν έχουν αναφερθεί κάποιοι γενετικοί παράγοντες που να προδιαθέτουν ένα άτομο που έχει μολυνθεί από τον ιό στην ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Η πρωτεΐνη p53 είναι μεταλλαγμένη σε αρκετούς ανθρώπινους όγκους αλλά συνήθως αυτό δεν υφίσταται σε πρώιμους καρκίνους τραχήλου μήτρας. (Crook 1991, Scheffner 1991, Vogelstein 1992) δεικνύοντας ότι η απενεργοποίηση της p53 από την E6 είναι ανάλογη σε μια απενεργοποιούσα μεταλλαγή. Πολλές μεταλλαγμένες p53 πρωτεΐνες δεν υπόκεινται στην αποικοδόμηση που διαμεσολαβεί από την E6 (Medcalf 1993, Marston 1994, Thomas 1995), υποδηλώνοντας ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο πρωτεϊνών μπορεί εύκολα να διαταραχθεί.

Με δεδομένο το 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 τη διαδικασία

επαγωγής της απόπτωσης (Sakamuro 1997), η οποία ομοιάζει με μια περιοχή SH3 (SRC-ομολογία-3) περιοχή πρόσδεσης. Στην περιοχή αυτή δημιουργούνται πέντε PxxP μοτίφ, από τα οποία χάνεται ένα λόγω την αντικατάστασης της προλίνης με την αργινίνη. Σε μελέτες όγκων καρκίνου τραχήλου της μήτρας που σχετίζονται με την παρουσία του ιού HPV έχειδειχθεί ότι άτομα ομόζυγα για την *p53* αργινίνη εμφανίζουν επτά φορές μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης τέτοιων βλαβών σε σχέση με άτομα ομόζυγα ή ετερόζυγα για την *p53* προλίνη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ

Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ (HPV)

5.1. Γενικά

Η μολυσματική φύση των ανθρώπινων αλλά και των ζωικών 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 ινωθήλωματα του δέρματος. Οι ιοί αυτοί εμφανίζουν ογκογόνο δυναμικό σε χάμστερ ποντίκια (Friedmann 1963, Boiron 1964) και σε μετασχηματισμένα κύτταρα από μοσχάρι και ποντίκια σε κυτταροκαλλιέργειες (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.

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 ική προέλευση του θηλώματος της κοίλοκυτταρικής 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).

5.2 Δομή των ιικών σωματιδίων και ταξινόμηση

5.2.1 Ιικά σωματίδια

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. 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 διαφορετικού ιούς θηλώματος. Η δεύτερη δομική πρωτεΐνη, η L2, είναι λιγότερο συντηρημένη και το μοριακό βάρος της είναι περίπου 75000. Η μη εισαγωγή τους σε φάκελο τους καθιστά ανθεκτικούς στην θερμότητα και στους οργανικούς διαλύτες (Bonpez, 1993).

5.2.2 Δομή και ρύθμιση του ιικού γενώματος

Το γονιδίωμα αποτελείται από 7200-8000 ζεύγη βάσεων από κλειστό-κυκλικό δίκλωνο DNA που έχει περίπου 20 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (Σχήμα 5.1, σελ.58). Η δομή των ιικών γονιδιωμάτων αποκαλύπτει σημαντικές ομοιότητες μεταξύ των διαφορετικών μελών αυτής της ιικής ομάδας. Γενικά, μονάχα η μια αλυσίδα είναι μεταφραφικά ενεργή, γι'αυτό 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.

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 αλληλεπικαλύπτουν ένα TATA κουτί. Η πρόσδεση του E2 σε αυτές τις περιοχές τροποποιεί την λειτουργία του υποκινητή μεταθέτοντας το βασικό μεταγραφικό σύμπλοκο (Tan 1994)

5.3 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 77 διακριτοί γονότυποι HPV και οι αλληλουχίες του γονιδιώματος των περισσότερων από αυτούς έχουν περιγραφεί πλήρως (de Villiers 1994, Delius 1994). Περίπου 30 επιπρόσθετες τμηματικές αλληλουχίες έχουν απομονωθεί από πιθανούς καινούργιους τύπους, υπονοώντας ότι ο συνολικός αριθμός των υπαρκτών τύπων HPV θα υπερβαίνει τους εκατό.

Βασιζόμενοι στην σύνθεση του νουκλεϊκού οξέος των ιών HPV μπορούμε να διακρίνουμε επιμέρους ομάδες ιών θηλώματος (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

ανήκουν σε αυτή την ομάδα. Ο κυριότερος εκπρόσωπος της ομάδας αυτής είναι ο HPV 16. Μια άλλη ομάδα αντιπροσωπεύεται από ιούς που εμφανίζονται σε βλάβες με *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.

5.4 Λειτουργίες των ιικών πρωτεϊνών E6 και E7

Οι E6 και E7 πρωτεΐνες εκφράζονται στα HPV-θετικά καρκινικά κύτταρα . Οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να προκαλούν αθανатоποίηση ανθρωπίνων κερατινοκυττάρων και ενός αριθμού άλλων κυτταρικών τύπων. Οι τύποι HPV που κωδικοποιούν για τα γονίδια E6 και E7 λαμβάνουν μέρος στην αθανатоποίηση κυττάρων 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 κακοήθη αύξηση (Mansur, 1993). Και οι δυο πρωτεΐνες των τύπων HPV υψηλού κινδύνου συνεργάζονται στην αθανатоποίηση και τον μετασχηματισμό κυττάρων (Munger, 1989)

5.4.1 E6 πρωτεΐνη

Η πρωτεΐνη E6 του ιού HPV 16 περιέχει 151 αμινοξέα και εμφανίζει τέσσερα μοτίβα Cys-X-X-Cys μεσολαβώντας σε πρόσδεση με ψευδάργυρο που καταλήγει στον σχηματισμό δυο δομών "δακτύλων ψευδαργύρου" (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 αδενιοού 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 ουμπικουϊνίνη (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 ανισορροπία 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 ανισορροπίας 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 ανθρώπινων 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 ουμπικουϊνίνη E6-AP, η E6 με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες (Keen, 1994) και με μια πρωτεΐνη που δεσμεύει ασβέστιο.

5.4.2 E7 πρωτεΐνη

Η E7 πρωτεΐνη του HPV 16 αντιπροσωπεύει μια φωσφοπρωτεΐνη προσδεδεμένη με ψευδάργυρο σε δυο περιοχές Cys-X-X-Cys που αποτελείται από 98 αμινοξέα. Παρουσιάζει δομικές ομοιότητες με την E6 πρωτεΐνη στοιχειοθετώντας μια πιθανή εξελικτική συσχέτιση των δυο πρωτεϊνών. Το αμινοτελικό ακραίο τμήμα της E7 πρωτεΐνης περιέχει δυο περιοχές

που ανταποκρίνονται μερικώς στην συντηρημένη περιοχή (CR-1) και καθολικά στη συντηρημένη περιοχή 2 (CR-2) των E1A πρωτεϊνών του αδενοϊού και με μια ανάλογη περιοχή του T αντιγόνου του SV40 (145). Οι περιοχές αυτές του E7(cd-1, cd-2) συνεισφέρουν στο δυναμικό αθανатоποίησης του E7 (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, DeCaprio 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 αθανатоποίηση (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*.

5.5 Μετάδοση και φυσική ιστορία των μολύνσεων από ιούς του θηλώματος

Η μετάδοση των ιών του θηλώματος διευκολύνεται από την ύπαρξη αμιγών 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 λέιζερ (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 βλενώδεις περιοχές του τραχήλου της μήτρας, το δέρμα και τον λάρυγγα που δεν εμφάνιζαν συμπτώματα (Steinberg, 1983).

5.6 Μη κακοήθεις καταστάσεις που σχετίζονται με μολύνσεις με ιούς θηλώματος

Οι ιοί του θηλώματος προκαλούν ένα εύρος βλαβών (δερματικές, βλενώδεις 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 βλενώδεις 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.

5.7 Οι ιοί του θηλώματος στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας

Οι τύποι HPV 16 και 18 και ένας αριθμός άλλων τύπων έχουν βρεθεί σε περίπου 95% των βιοψιών που προέρχονται από καρκίνους τραχήλου της μήτρας παγκοσμίως. Ο τύπος 16 είναι ο πιο συχνός και απαντά στο 50-60% των περιπτώσεων ενώ ο τύπος 18 απαντά στο 10-20%. Η πιθανή εμπλοκή των ιών του θηλώματος στην καρκινογένεση του τραχήλου της μήτρας 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 αθανатоποίηση 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.

Τα δεδομένα αυτά δεικνύουν ότι οι E6/E7 ογκοπρωτεΐνες αποτελούν τους κύριους καθοριστές του κακοήθους φαινοτύπου σε αυτές τις κυτταρικές σειρές καρκίνου του τραχήλου που μέχρι τώρα έχουν δοκιμαστεί. Ο κίνδυνος προσβολής με ιούς HPV σχετίζεται άμεσα με τη σεξουαλική συμπεριφορά. Σε ομάδες ατόμων με HPV, η χρήση και η χρονική διάρκεια χρήσης αντισυλληπτικών από το στόμα αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Bosch, 1992). Η συνύπαρξη των τύπων 16 και 18 του ιού με υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες του τραχήλου μπορεί να αποτελέσει παράγοντα ανάπτυξης των βλαβών αυτών (IARC, 1995). Η απουσία άλλων γνωστών προδιαθεσικών παραγόντων υποστηρίζει την πιθανότητα οι τύποι HPV υψηλού κινδύνου να δρουν ως μοναδικά καρκινογόνα (zur Hausen, 1991). Το υπόλοιπο 5% καρκίνων τραχήλου που δεν εμφανίζουν κάποιον τύπο ιού αποτελεί θέμα διερεύνησης για την πιθανή πρόκληση του από άλλους παράγοντες ή αν περιέχουν τύπους ιών HPV που ακόμα δεν έχουν ταυτοποιηθεί.

5.8 Ο παγκόσμιος ρόλος των HPV -σχετιζόμενων καρκίνων και συμπεράσματα

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί το δεύτερο σε συχνότητα κακοήγη όγκο παγκοσμίως με περίπου 440000 νέες περιπτώσεις κάθε έτος, αντιπροσωπεύοντας το 5.8% της παγκόσμιας συχνότητας. Περίπου το 10% των καρκίνων παγκοσμίως μπορεί να οφείλονται στον ιό HPV αν λάβουμε υπόψη μας ότι το 50% των καρκίνων του αιδοίου, του πέους και του πρωκτού και επίσης περίπου το 20% των καρκίνων του λάρυγγα, της μύτης και του στόματος σχετίζονται με τους τύπους HPV του γεννητικού συστήματος.

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

A. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

6.1 Προέλευση των δειγμάτων

Για την παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν κολποτραχηλικά επιχρίσματα επιστρωμένα σε αντικειμενοφόρους και χρωσμένα για κυτταρολογική εξέταση PAP, τα οποία προήλθαν από το Κυτταρολογικό Τμήμα του Π.Γ.Ν "Αλεξάνδρα", από το Κυτταρολογικό Τμήμα του Γ.Ν "Άγιος Παντελεήμονας" και από το Κυτταρολογικό Τμήμα του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου, και αφορούσαν το χρονικό διάστημα 1989-1999. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν περιτοναϊκά εκπλύματα και ασκίτικα υγρά επιστρωμένα σε αντικειμενοφόρους και χρωσμένα για κυτταρολογική εξέταση με χρώση PAP, τα οποία προήλθαν από το Κυτταρολογικό Τμήμα του Π.Γ.Ν "Αλεξάνδρα".

6.2 Εκχύλιση DNA

6.2.1 Εκχύλιση DNA από κυτταρολογικό υλικό

Πρωτόκολλο I

Χρησιμοποιήθηκαν κολποτραχηλικά επιχρίσματα επιστρωμένα σε αντικειμενοφόρους και χρωσμένα για κυτταρολογική εξέταση PAP. Για την απομάκρυνση της καλυπτρίδας οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίζονται σε διάλυμα ξυλόλης από δυο ως πέντε ημέρες, ενώ στη συνέχεια εμβαπτίζονται σε αιθανόλη για την απομάκρυνση της ξυλόλης και τα κυττάρια που αποσβέστηκαν μεταφέρονται σε σωλήνα 1.5ml. Ακολουθεί προσθήκη 400μl διαλύματος λύσης (10mM EDTA, 10mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 0.5% SDS).με πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml. Ακολουθεί εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) με φαινόλη/ χλωροφόρμιο και αποδόμηση του RNA με RNAάση

(100μg/ml) για 1h σε θερμοκρασία 37°C. Το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη 1/20 όγκου χλωριούχου νατρίου 5M και 2.5 όγκων απόλυτης αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 4 ° C σε 13.000 rpm και έκπλυση του κατακρημνισμένου DNA σε 70% αιθανόλη. Αφού απομακρυνθεί η αιθανόλη, το DNA επαναιωρείται σε ddH₂O και διατηρείται σε θερμοκρασία -20° C. Η ποσότητα του DNA καθώς και η καθαρότητα του υπολογίζεται έπειτα από φωτομέτρηση στα 260nm και στα 280 nm.

Πρωτόκολλο II

Ο ιστός ομογενοποιείται σε λυτικό διάλυμα που περιέχει 400mM Tris pH 8.0, 60 mM EDTA, 150mM NaCl και 1% SDS. Ακολουθεί επώαση του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου για 1h και προσθήκη 1/4 όγκου υπερχλωρικού νατρίου 5M. Το διάλυμα επωάζεται σε θερμοκρασία 65° C για 40 min και ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου που φυλάσσεται σε θερμοκρασία -20° C . Με φυγοκέντρηση συλλέγεται η υδατική φάση και ακολουθεί η διαδικασία κατακρήμνισης του DNA με αιθανόλη, κατά το πρωτόκολλο I.

6.2.2 Εκχύλιση DNA από περιτοναϊκά εκπλύματα και ασκίτικα υγρά

Χρησιμοποιήθηκαν περιτοναϊκά εκπλύματα και ασκίτικα υγρά από καρκινώματα ωοθηκών επιστρωμένα σε αντικειμενοφόρους και χρωσμένα για κυτταρολογική εξέταση PAP. Για την απομάκρυνση της καλυπτρίδας οι αντικειμενοφόροι εμβαπτίζονται σε διάλυμα ξυλόλης από δυο ως πέντε ημέρες, ενώ στη συνέχεια εμβαπτίζονται σε αιθανόλη για την απομάκρυνση της ξυλόλης και τα κυττάρια που αποσβέστηκαν μεταφέρονται σε σωλήνα 1.5ml. Ακολουθεί προσθήκη 400μl διαλύματος λύσης (10mM EDTA, 10mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 0.5% SDS).με πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml. Ακολουθεί εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) με φαινόλη/ χλωροφόρμιο και αποδόμηση του RNA με RNAάση (100μg/ml) για 1h σε θερμοκρασία 37°C. Το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη 1/20 όγκου χλωριούχου νατρίου 5M και 2.5 όγκων απόλυτης αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 4 ° C σε 13.000 rpm και έκπλυση του κατακρημνισμένου DNA σε 70% αιθανόλη. Αφού απομακρυνθεί η αιθανόλη, το DNA επαναιωρείται σε ddH₂O και διατηρείται σε θερμοκρασία -20° C. Η ποσότητα του DNA καθώς και η καθαρότητα του υπολογίζεται έπειτα από φωτομέτρηση στα 260nm και στα 280 nm.

6.2.3 Εκχύλιση DNA από κυτταρικές σειρές

Για την εκχύλιση χρωμοσωμικού DNA από τις κυτταρικές σειρές SW 480 και EJ (καρκινικά κύτταρα αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου και καρκίνου ουροδόχου κύστεως, αντίστοιχα, που φέρουν ομόζυγη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *Kirsten-ras* και *Harvey-ras*, αντίστοιχα) τα κύτταρα συλλέγονται με θρυψινοποίηση, δηλαδή με επεξεργασία με διάλυμα 0.1% θρυψίνης σε PE. Ακολουθεί έκπλυση με PBS (0.8% NaCl, 0.02% KCL, 0.14% Na₂HPO₄, 0.02% KH₂PO₄, σε pH 7.4) και κατεργασία O/N με διάλυμα λύσης και πρωτεϊνάση K. Ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο, προσθήκη στο υπερκείμενο RNάσης 100μg/ml και επώαση σε θερμοκρασία 37^o C για 4 ώρες υπό ανακίνηση, αφού ενδιάμεσα (στις 2 ώρες) επαναπροστεθούν 100μg/ml πρωτεϊνάσης K. Έπειτα από φυγοκέντρηση σε 12000rpm για 5 min, η υδατική φάση εκχυλίζεται με φαινόλη/χλωροφόρμιο και το DNA κατακρημνίζεται με αιθανόλη και φωτομετράται στα 260nm, γνωρίζοντας ότι το DNA με συγκέντρωση 50μg/ml παρουσιάζει απορρόφηση (O.D.260)=1.

6.2.4 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από περιφερικό αίμα.

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

6.3. Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR)

6.3.1 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 θερμοφιλα 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, η =η αρχική ποσότητα του υποστρώματος, e = η απόδοση της αντίδρασης, και c = ο αριθμός των κύκλων της PCR (Mullis & Faloona, 1987).

6.3.2 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 ομολογία 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 υποστρώμα 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.

6.3.3. Ρυθμιστικά διαλύματα της PCR

Για την PCR χρησιμοποιούνται διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα που αφενός ρυθμίζουν την τιμή του pH και αφετέρου προμηθεύουν τους απαραίτητους συμπαράγοντες και 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 μM 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.

6.3.4. 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 κολποτραχηλικά επιχρίσματα με χρώση PAP, καθώς και τα δείγματα από ασκίτικα υγρά και περιτοναϊκές εκπλύσεις 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. **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: 1α, 5 και 8, οι οποίοι όμως δεν απαντώνται συχνά στο γυναικολογικό σύστημα. Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 52°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 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 3% 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.

ζ. **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.

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

Για την εύρεση πολυμορφισμού στο κωδικόνιο 72 του γονιδίου p53 για την κωδικοποίηση του αμινοξέος προλίνη ενισχύεται η αντίστοιχη περιοχή που περιέχει το κωδικόνιο 72 με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές p53Pro+/p53- (Storey, 1998) Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 54°C για 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 177bp.

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

Για την εύρεση πολυμορφισμού στο κωδικόνιο 72 του γονιδίου p53 για την κωδικοποίηση του αμινοξέος αργινίνη ενισχύεται η αντίστοιχη περιοχή που περιέχει το κωδικόνιο 72 με την τεχνική της PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές p53+/Arg- (Storey, 1998) Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: 94°C για 50 sec, 60°C για 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 141bp.

Οι εκκινητές που επιλέγησαν παρατίθενται στον Πίνακα 6.1.

Πίνακας 6.1. Εκκινητές, συνθήκες PCR αντιδράσεων και προϊόντα PCR και RFLP για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 και τη μελέτη της έκφρασης του mRNA των ογκογονιδίων H-ras , K-ras and N-ras .

Γονίδιο	Εκκινητές	Συνθήκες PCR	PCR προϊόν (bp)	RFLP προϊόντα (bp)
HPV (DNA)	5-TTTGTTACT GTGGTAGATAC-3 (GP5) 5-GAAAAATAAA CTGTAAATCA-3 (GP6)	94° for 50s (αποδιάταξη) 52° for 45s (υβριδισμός) 72° for 40s (πολυμερισμός)	150	
HPV MULTI PLEX (DNA)	5--3 (S) 5--3 (A)	94° for 50s (αποδιάταξη) 56° for 45s (υβριδισμός) 72° for 50s (πολυμερισμός)	HPV11 211bp HPV16 315bp HPV18 143 bp HPV33 171 bp	
HPV18 (DNA)	5TGCAACCGAAATAGGTTG GGC-3 (S) 5- GCACAGATCAGGTAGCTT GTA-3 (A)	94° for 50s (αποδιάταξη) 61° for 45s (υβριδισμός) 72° for 40s (πολυμερισμός)	200	
H-ras (DNA)	5-GAGACCCTGTAGG AGGACCC-3 (S) 5-GGGTGCTGAGACG AGGGA-3 (A)	94° for 50s (αποδιάταξη) 62° for 45s (υβριδισμός) 72° for 50s (πολυμερισμός)	312	236/55/21 (wt) 291 (mut)
K-ras (DNA)	5-ACTGAATATAAACTT GTGGTAGTTGGACCT-3 (S) 5-TCAAAGAATGGTCCT GGACC-3 (A)	94° for 50s (αποδιάταξη) 58° for 45s (υβριδισμός) 72° for 40s (πολυμερισμός)	157	113/29 (wt) 142 (mut)
N-ras (DNA)	5-AACTGGTGGTGG TTGGACCA-3 (S) 5-ATATTCATCTACA AAGTGGTCCTGGA-3 (A)	94° for 50s (αποδιάταξη) 54° for 45s (υβριδισμός) 72° for 40s (πολυμερισμός)	83	41 /23/19(wt) 60 (mut)
p53 Pro (DNA)	5--3 (S) 5--3 (A)	94° for 50s (αποδιάταξη) 54° for 45s (υβριδισμός) 72° for 40s (πολυμερισμός)	177	
p53 Arg(DNA)	5-3 (S) 5--3 (A)	94° for 50s (αποδιάταξη) 60° for 45s (υβριδισμός) 72° for 40s (πολυμερισμός)	141	

S = Sense primer, A = Antisense primer

wt = φυσιολογικό κωδικόνιο 12, mut = μεταλλαγμένο κωδικόνιο 12

6.4 Μέθοδοι προσδιορισμού μεταλλάξεων

6.4.1. Ανάλυση πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (RFLP)

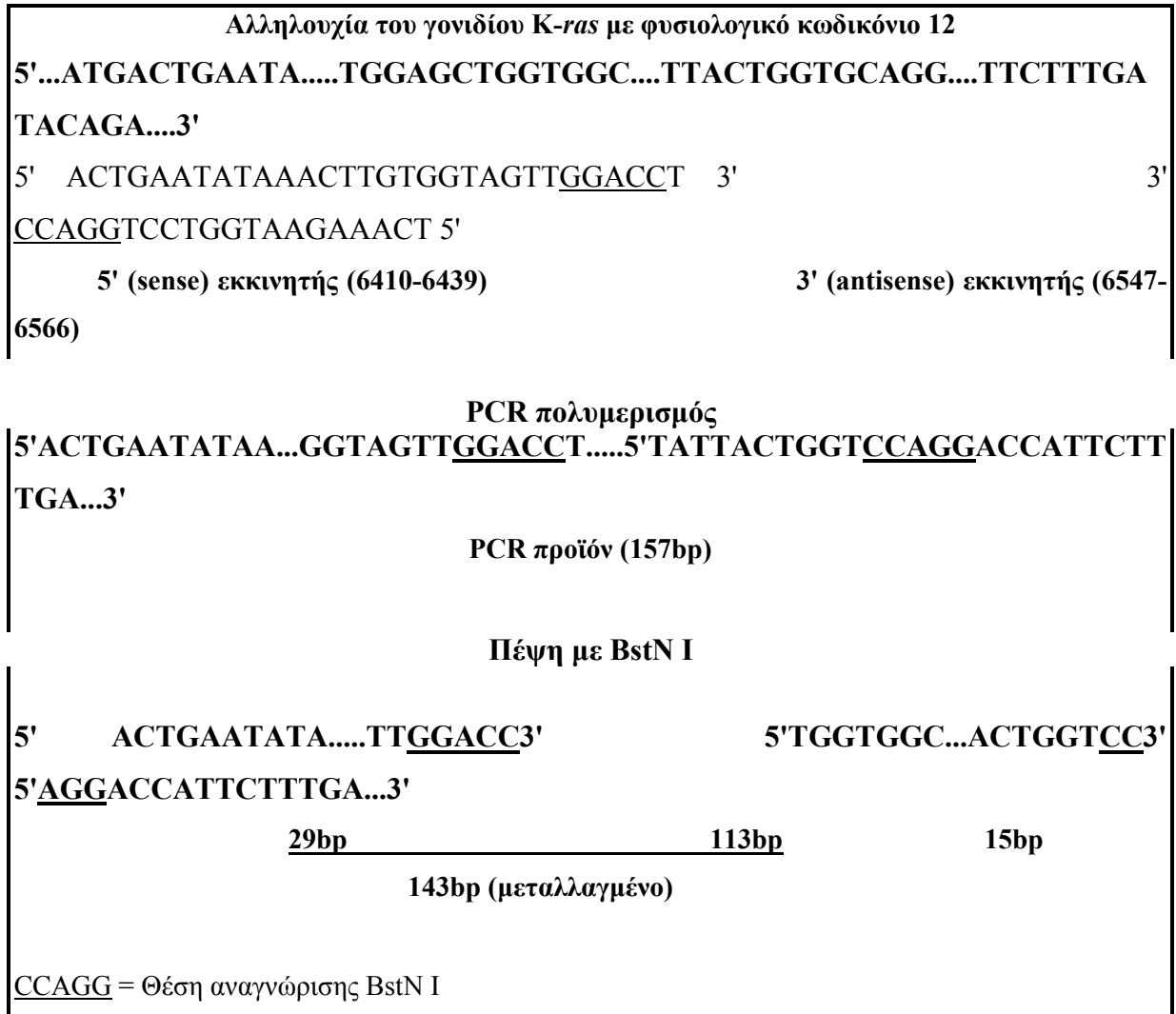
Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 των τριών γονιδίων της οικογένειας *ras* και στηρίχθηκε στην πέψη των PCR προϊόντων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

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 BstN I, από τις οποίες η μία περιλαμβάνει το κωδικόνιο 12 και η άλλη χρησιμεύει ως "μάρτυρας" ελέγχου πιστότητας της πέψης (Σχήμα 6.1). Η έλλειψη ενδογενών θέσεων αναγνώρισης από άλλες ενδονουκλεάσες στο κωδικόνιο 12 του *K-ras* αποκλείει την ψευδώς θετική ανεύρεση μεταλλάξεων.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 6.1, 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 BstN I (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 μ l) υφίστανται πέψη με 20U της περιοριστικής ενδονουκλεάσης BstN I στους 60°C για 4 ώρες. Τα προϊόντα της πέψης αναλύονται εν συνεχεία σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 8%, όπου παρατηρούνται τα

θραύσματα DNA διαφορετικού μήκους για το φυσιολογικό και μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, κατόπιν χρώσης με νιτρικό άργυρο.



Σχήμα 6.1. 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 BstN I στους 60°C για 4 ώρες. Τα προϊόντα της πέψης αναλύονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10%. Πέραν ενός κοινού θραύσματος 23bp, το φυσιολογικό N-ras διασπάται σε θραύσματα 41bp και 19bp, ενώ το μεταλλαγμένο αναλύεται σε ένα θραύσμα μήκους 60bp.

6.5. 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 προσδοκάται 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.

6.6. Χρώση νουκλεϊκών οξέων

6.6.1. Χρώση 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 πήκτωμα 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.

6.6.2. Χρώση με νιτρικό άργυρο

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

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

6.7 Στατιστική ανάλυση - Ηλεκτρονική επεξεργασία εικόνας

Η στατιστική επεξεργασία των εργαστηριακών ευρημάτων και των κλινικοπαθολογικών δεδομένων έγινε με τη χρήση της δοκιμασίας SPSS 6.0 for Windows και ως στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι συσχετίσεις με μονοδύναμο επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$. Όλα τα παραπάνω έγιναν σε Ηλεκτρονικό Υπολογιστή, με τη βοήθεια του προγράμματος

6.8. 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
Υπερθεϊτικό 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 ΕΒΔΟΜΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδια *ras* καθώς και των ιών HPV, σε αλλοιώσεις του γυναικείου γεννητικού συστήματος.

7.1.1. Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδια *ras* και των ιών HPV σε χρωσμένο κυτταρολογικό υλικό δειγμάτων με προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνο τραχήλου μήτρας.

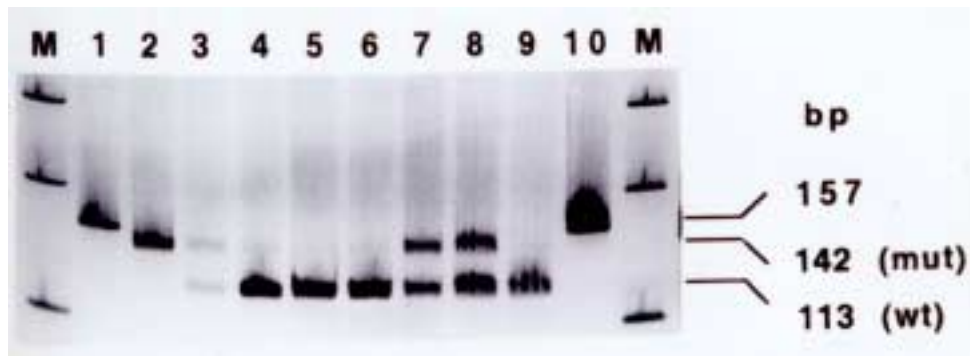
7.1.1.1 Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν και κυτταρολογική εξέταση

Από την κυτταρολογική εξέταση 123 δειγμάτων με προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνο τραχήλου μήτρας σε χρωσμένου κυτταρολογικού υλικού κατά Παπανικολάου σύμφωνα με την Ιστολογική Τυποποίηση των Όγκων της Γυναικείας Γεννητικής Οδού από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Poulsen, 1975) προκύπτουν τα εξής: 16 περιπτώσεις με χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή δυσπλασία του τραχήλου της μήτρας (CIN I-II), 18 περιπτώσεις με υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή δυσπλασία του τραχήλου της μήτρας (CIN III), 89 περιπτώσεις με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας [85 πλακώδη καρκινώματα (SCC), 2 αδenoκαρκινώματα (AC) και 2 αδenoκαρκινώματα πλακωδών κυττάρων]. Σύμφωνα με τον στάδιο διαφοροποίησης (GRADE) (Burke, 1993) των 44 από τις 123 περιπτώσεων με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας το 19% είναι βαθμού I, το 67% (n=29) είναι βαθμού II και το 14% είναι βαθμού III. Σύμφωνα με την σταδιοποίηση κατά FIGO (FIGO stages revision, 1989) το 18% (n=8) είναι σταδίου I, το 48% (n=21) είναι κλινικού σταδίου II, το 27% (n=12) είναι κλινικού σταδίου III και το 7% (n=3) είναι σταδίου IV. Το 45.5% (n=20) των γυναικών αυτών ζει ως σήμερα, το 52% (n=23) πέθαινε ενώ μια γυναίκα πέθανε από αίτια που δεν σχετίζονταν με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

7.1.1.2 Ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *ras* σε χρωσμένο κυτταρολογικό υλικό κατά Παπανικολάου.

Στα πλαίσια της μελέτης της ενεργοποίησης των γονιδίων *ras* σε προκαρκινικές αλλοιώσεις και στον καρκίνο τραχήλου της μήτρας έγινε αναζήτηση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 των γονιδίων *H-ras*, *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 τις κυτταρικές σειρές SW480 και EJ οι οποίες φέρουν συγκεκριμένη σημειακή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 των γονιδίων *K-ras* και *H-ras* αντίστοιχα ως μάρτυρες, μελετήθηκαν οι καλλίτερες 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).

Μελετήθηκαν συνολικά 123 δείγματα καρκινικού ιστού και προκαρκινικών αλλοιώσεων, από ασθενείς με αλλοιώσεις τραχήλου της μήτρας, με την ανάλυση αυτή. Μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *K-ras* ανευρέθησαν σε 32 περιπτώσεις (ποσοστό 26%) (Εικόνα 7.1). Μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *K-ras* ανευρέθησαν σε 3 περιπτώσεις με προκαρκινικές αλλοιώσεις (CIN I, II= 3, CIN III= 2), σε 24 περιπτώσεις με SCC και σε 2 περιπτώσεις με AC. Μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *H-ras* ανευρέθησαν σε 12 περιπτώσεις με προκαρκινικές αλλοιώσεις (CIN I, II= 2, CIN III=) και σε 7 περιπτώσεις με SCC (Εικόνα 7.2). Τα στοιχεία που αφορούν την ιστολογία καθώς και την κατανομή των *ras* μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12, δειγμάτων καρκινικού ιστού και προκαρκινικών αλλοιώσεων, από ασθενείς με αλλοιώσεις τραχήλου της μήτρας περιγράφονται λεπτομερώς στον Πίνακα I. Δεν ανευρέθησαν μεταλλάξεις στο εν λόγω κωδικόνιο στο γονίδιο *N-ras*.



Εικόνα 7.1 . Μεταλλάξεις του κωδικονίου 12 του γονιδίου *K-ras*, με τη μέθοδο PCR-RFLP. Οι ηλεκτροφορητικές στήλες 3, 7 και 8 αντιστοιχούν σε μεταλλαγμένα δείγματα, ενώ οι 4, 5, 6 και 9 σε φυσιολογικό γονίδιο. Στη στήλη 2 ηλεκτροφορείται ο θετικός μάρτυρας για μετάλλαξη (SW 480 κυτταρική σειρά). Οι στήλες 1 και 10 περιέχει άπειπτο PCR προϊόν.



Εικόνα 7.2 . Μεταλλάξεις του κωδικονίου 12 του γονιδίου *H-ras*, με τη μέθοδο PCR-RFLP. Οι ηλεκτροφορητικές στήλες 2 και 9 αντιστοιχούν σε μεταλλαγμένα δείγματα, ενώ οι 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 και 11 σε φυσιολογικό γονίδιο. Στη στήλη 12 ηλεκτροφορείται ο θετικός μάρτυρας για μετάλλαξη (EJ κυτταρική σειρά). Η στήλη 1 περιέχει άπειπτο PCR προϊόν.

Πίνακας 7.1. Ιστολογία και κατανομή των ras μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12, δειγμάτων καρκινικού ιστού και προκαρκινικών αλλοιώσεων, από ασθενείς με αλλοιώσεις τραχήλου της μήτρας.

Ιστολογική διάγνωση	Αριθμός ασθενών	Μεταλλαγές στο κωδικόνιο 12 (%)		
		K-ras	H-ras	N-ras
<i>Τράχηλος Μήτρας</i>				
CIN I,II	16	3	--	--
CIN III	18	3	5	--
Αδενοκαρκίνωμα πλακωδών	2	--	--	--
Αδενοκαρκίνωμα Καρκίνωμα Πλακωδών κυττάρων	2	2	--	--
Καρκίνωμα Πλακωδών κυττάρων	85	24	7	--
Total	123	32 (26)	13(10.5)	--

7.1.1.3 Ανίχνευση και τυποποίηση των ιών HPV σε χρωσμένο κυτταρολογικό υλικό δειγμάτων με προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνο τραχήλου μήτρας.

Εξετάστηκε η παρουσία των ιών HPV, στις ίδιες περιπτώσεις γυναικολογικών αλλοιώσεων τραχήλου μήτρας στις οποίες έγινε και ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων των ογκογονιδίων *ras*.

Από τους 123 ασθενείς βρέθηκαν 84 θετικοί για τον ιό HPV (ποσοστό 68%) (Εικόνα 7.3). Η μόλυνση με τον ιό HPV ανευρέθηκε σε περιπτώσεις με 20 προκαρκινικές αλλοιώσεις (CIN I, II= 13, CIN III= 7), σε 53 περιπτώσεις με SCC και σε 2 περιπτώσεις με AC. Από την τυποποίηση του ιού χρησιμοποιώντας τους

ειδικούς εκκινητές, ο HPV-18 ανιχνεύεται σε ποσοστό 59.5%, ο ιός HPV-16 ανιχνεύεται σε ποσοστό 8% και ο HPV-33 ανιχνεύεται σε ποσοστό 5%.

(Εικόνα 7.4) Ο HPV-11 δεν ανιχνεύθηκε σε καμία περίπτωση ενώ 13% των δειγμάτων φέρουν κάποιον τύπο εκτός των HPV18,16,11,33.

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

Τα στοιχεία που αφορούν την ανίχνευση καθώς και την τυποποίηση των HPV ιών δειγμάτων καρκινικού ιστού και προκαρκινικών αλλοιώσεων, από ασθενείς με αλλοιώσεις τραχήλου της μήτρας περιγράφονται λεπτομερώς στον Πίνακα 7.2 και 7.3.

Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση των μεταλλάξεων στο γονίδιο *K-ras* με την σταδιοποίηση κατά FIGO ($p=0.039$). Επίσης, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της σταδιοποίησης κατά FIGO και της επιβίωσης των ασθενών ($p=0.049$). Παρατηρήθηκε στατιστική συσχέτιση μεταξύ των τυπών του ιού HPV με την επιβίωση των ασθενών ($p=0.107$) καθώς και της παρουσίας των μεταλλαγών στο *K-ras* και στην κλινική έκβαση των ασθενών ($p=0.182$).

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 ιστού και προκαρκινικών αλλοιώσεων, από ασθενείς με αλλοιώσεις τραχήλου της μήτρας περιγράφονται λεπτομερώς στον Πίνακα 7.4.

Πίνακας 7.2. Ανίχνευση του HPV ιού σε δειγμάτα καρκινικού ιστού και προκαρκινικών αλλοιώσεων, από ασθενείς με αλλοιώσεις τραχήλου της μήτρας.

Ιστολογική διάγνωση	Αριθμός ασθενών	HPV θετικά(%)
<i>Τράχηλος Μήτρας</i>		
CIN I,II	16	13
CIN III	18	16
Αδενοκαρκίνωμα πλακωδών	2	1
Αδενοκαρκίνωμα Καρκίνωμα Πλακωδών κυττάρων	2	1
Καρκίνωμα Πλακωδών κυττάρων	85	55
Total	123	86(70)

Πίνακας 7.3. Τυποποίηση του HPV ιού σε δειγμάτα καρκινικού ιστού και προκαρκινικών αλλοιώσεων, από ασθενείς με αλλοιώσεις τραχήλου της μήτρας.

Ιστολογική Διάγνωση	HPV-18	HPV-16	HPV-33	HPV-11	Other types
<i>Τράχηλος Μήτρας</i>	7	1	--	--	6
CIN I,II					
CIN III	8	2	--	--	--
Αδενικαρκίνωμα πλακωδών	--	--	--	--	1
Καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων	28	2	3	--	11

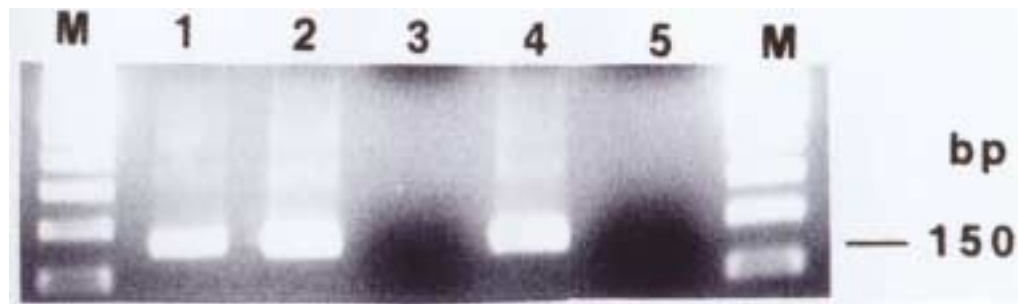
Total (%)	43 (62.5)	5 (7)	3 (4.5)	--	18 (26)
-----------	--------------	-------	---------	----	---------

Πίνακας 7.4. Κατανομή των ras μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12, την ανίχνευση και την τυποποίηση των HPV ιών και τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους δειγμάτων καρκινικού ιστού και προκαρκινικών αλλοιώσεων, από ασθενείς με αλλοιώσεις τραχήλου της μήτρας

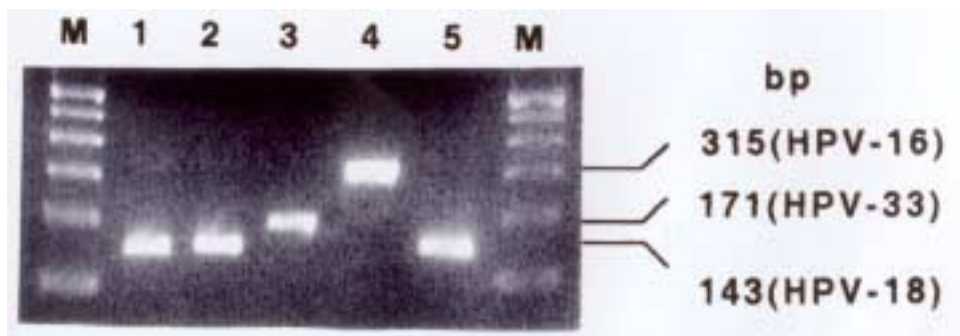
Κλινικο παθολογικές παραμέτροι	Ασθενεί ς	K-ras	H-ras	HPV τύπος		
				HPV18	HPV33	Άλλος
Στάδιο όγκου						
1(G1)	8	4	3	–	1	1
2(G2)	29	12	4	9	–	4
3(G3)	7	1	–	1	–	1
Κλινικο παθολογικές παραμέτροι						
Σταδιοποίηση κατά FIGO	Ασθενεί ς	K-ras	H-ras	HPV τύπος		
				HPV18	HPV33	Άλλος
I	8	2	–	2	–	2
II	21	2	3	1	1	3
III	12	–	2	9	1	3
IV	3	–	–	1	–	–
Κλινικοπαθολογικές παραμέτροι						
Επιβίωση Ζουν	Ασθενεί ς	K-ras	H-ras	HPV τύπος		
				HPV18	HPV33	Άλλος
Ζουν	20	4	2	3	2	6

Πέθαναν	23	2	1	11	1	3
Πέθαναν*	1	1	—	1	—	—

Πέθαναν*= πέθαναν από μη σχετιζόμενη αιτία



Εικόνα 7.3. Ανίχνευση του ιού HPV. Οι ηλεκτροφορητικές στήλες 1, 2 και 4 αντιστοιχούν σε δείγματα που εμφανίζουν τον ιό HPV ενώ οι στήλες 3 και 5 είναι για δείγματα που δεν εμφανίζουν τον ιό. Οι στήλες M αντιστοιχούν σε δείκτη μοριακών βαρών 100bp DNA ladder



Εικόνα 7.4 Τυποποίηση των ιών HPV Οι ηλεκτροφορητικές στήλες 1, 2 και 5 αντιστοιχούν σε δείγματα που εμφανίζουν τον τύπο HPV18, η στήλη 3 αντιστοιχεί σε δείγματα που εμφανίζουν τον τύπο HPV33 και η στήλη 4 αντιστοιχεί σε δείγματα που εμφανίζουν τον τύπο HPV16.

Οι στήλες M αντιστοιχούν σε δείκτη μοριακών βαρών 100bp DNA ladder

7.2. Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδια *ras* σε χρωσμένα με τεχνική Παπανικολάου ασκίτικά υγρά και περιτοναϊκά εκπλύματα από δείγματα καρκίνου των ωοθηκών

7.2.1 Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν από ασκίτικά υγρά και περιτοναϊκά εκπλύματα και ιστολογική διάγνωση.

Μελετήθηκαν 47 δείγματα ασκίτικών υγρών και περιτοναϊκών εκπλυμάτων από καρκίνο ωοθηκών χρωσμένου υλικού με την μέθοδο Παπανικολάου (24 δείγματα προερχόταν από ασκίτικά υγρά και τα 23 από περιτοναϊκά εκπλύματα). Από την ιστολογική εξέταση των 24 ασκίτικών υγρών από ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών προκύπτουν τα εξής: 12 περιπτώσεις με θηλώδες αδenoκαρκίνωμα, 4 με ορώδες θηλώδες αδenoκαρκίνωμα, 3 με κοκκιοκυτταρικό, 4 αδenoκαρκινώματα και 1 clear cell αδenoκαρκίνωμα. Από την ιστολογική εξέταση των 23 περιτοναϊκών εκπλυμάτων από ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών προκύπτουν τα εξής: 1 περίπτωση με ορώδες αδenoκαρκίνωμα, 9 με ορώδες θηλώδες αδenoκαρκίνωμα, 2 με βλενώδες αδenoκαρκινώματα, 10 αδenoκαρκινώματα και 10 με θηλώδες αδenoκαρκίνωμα.

Σύμφωνα με τον βαθμό διαφοροποίησης (GRADE) των 24 ασκίτικών υγρών από ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών προκύπτουν τα εξής: 9 περιπτώσεις (37.5%) είναι βαθμού II, 16 περιπτώσεις (62.5%) είναι βαθμού III. Σύμφωνα με τον βαθμό διαφοροποίησης των 23 περιτοναϊκών εκπλυμάτων από ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών προκύπτουν τα εξής: 17 περιπτώσεις (74%) είναι βαθμού II, 6 περιπτώσεις (26 %) είναι βαθμού III.

Σύμφωνα με τον βαθμό διαφοροποίησης των 24 ασκίτικών υγρών από ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών κατά FIGO προκύπτουν τα εξής: 7 περιπτώσεις

(29%) είναι σταδίου II, 7 περιπτώσεις (29%) είναι βαθμού III και 10 περιπτώσεις (42%) είναι σταδίου IV. Σύμφωνα με τον βαθμό διαφοροποίησης των 23 περιτοναϊκών εκπλυμάτων από ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών κατά FIGO προκύπτουν τα εξής: 6 περιπτώσεις (26%) είναι σταδίου I, 1 περίπτωση (4%) είναι βαθμού II, 16 περιπτώσεις (66%) είναι σταδίου III, 1 περίπτωση (4%) είναι σταδίου IV.

Τα στοιχεία που αφορούν την ιστολογία των κακοηθών κυτταρολογικών δειγμάτων σε ασκίτικά υγρά και περιτοναϊκές εκπλύσεις ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών περιγράφονται λεπτομερώς στον Πίνακα 7.5.

Επίσης, μελετήθηκαν 21 δείγματα ασκίτικών υγρών και περιτοναϊκών εκπλυμάτων από κυσταδενώματα υλικού χρωσμένου με την μέθοδο Παπανικολάου (8 δείγματα προερχόταν από ασκίτικά υγρά και τα 13 από περιτοναϊκά εκπλύματα).

7.2.2 Ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *ras* σε χρωσμένα ασκίτικά υγρά και περιτοναϊκές εκπλύσεις δειγμάτων με καρκίνο ωοθηκών.

Στα πλαίσια της μελέτης της ενεργοποίησης των γονιδίων *ras* στα ασκίτικά υγρά και τα περιτοναϊκά εκπλύματα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών έγινε αναζήτηση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 των γονιδίων *H-ras*, *K-ras* και *N-ras*. 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 τις κυτταρικές σειρές SW480 και EJ οι οποίες φέρουν συγκεκριμένη σημειακή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 των γονιδίων *K-ras* και *H-ras* αντίστοιχα ως μάρτυρες, μελετήθηκαν οι καλύτερες συνθήκες για την PCR-RFLP ανάλυση.

Μελετήθηκαν συνολικά 47 δείγματα με την ανάλυση αυτή. Μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *K-ras* ανευρέθησαν σε 22 περιπτώσεις (ποσοστό 47%).

Μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *H-ras* ανευρέθησαν σε 3 περιπτώσεις (ποσοστό 6%) και στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *N-ras* ανευρέθησαν σε 3 περιπτώσεις (ποσοστό 6%) (Εικόνα 7.5). Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση των μεταλλάξεων στο γονίδιο *K-ras* και στην σταδιοποίηση των δειγμάτων κατά FIGO ($p=0.024$). Παρόλο που οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *K-ras* δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη χειρουργική σταδιοποίηση του όγκου ($p=0.1$), το στάδιο II εμφανίζεται να μην φέρει μεταλλάξεις ενώ αντίθετα το στάδιο III εμφανίζεται να φέρει.

Τα στοιχεία που αφορούν την κατανομή των *ras* μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 σε κυτταρολογικά δείγματα από ασκίτικά υγρά και περιτοναϊκές εκπλύσεις ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών περιγράφονται λεπτομερώς στον Πίνακα 7.6.

7.2.3 Ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *ras* σε χρωσμένα ασκίτικά υγρά και περιτοναϊκές εκπλύσεις σε δείγματα με κυσταδένωμα.

Στα πλαίσια της σύγκρισης της ενεργοποίησης των γονιδίων *ras* στα ασκίτικά υγρά και τα περιτοναϊκά εκπλύματα ασθενών με καρκίνο ωοθηκών, έγινε αναζήτηση σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 των γονιδίων *H-ras*, *K-ras* και *N-ras*. σε ασκίτικά υγρά και τα περιτοναϊκά εκπλύματα ασθενών με κυσταδενώματα. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει επίσης 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 τις κυτταρικές σειρές SW480 και EJ οι οποίες φέρουν συγκεκριμένη σημειακή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 των γονιδίων *K-ras* και *H-ras* αντίστοιχα ως μάρτυρες, μελετήθηκαν οι καλύτερες συνθήκες για την PCR-RFLP ανάλυση.

Μελετήθηκαν συνολικά 21 δείγματα με την ανάλυση αυτή. Μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *K-ras* ανευρέθησαν σε 6 περιπτώσεις (ποσοστό 14%). Δεν ανευρέθησαν μεταλλάξεις στο εν λόγω κωδικόνιο στα γονίδια *H-ras* και *N-ras*. Τα στοιχεία που αφορούν την κατανομή των *ras* μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12

κυτταρολογικών δειγμάτων από ασκίτικά υγρά και περιτοναϊκές εκπλύσεις ασθενών με κυσταδένωμα περιγράφονται λεπτομερώς στον Πίνακα 7.7.

Πίνακας 7.5. Ιστολογία των κακοηθών κυτταρολογικών δειγμάτων σε ασκίτικά υγρά και περιτοναϊκές εκπλύσεις ασθενών με καρκίνο των ωθηκών

Ιστολογική διάγνωση	Αριθμός ασθενών	Διαφοροποίηση			Σταδιοποίηση κατά			
		I	II	III	I	II	III	IV
<i>Ασκίτες</i>								
Θηλώδες AC*	12	-	1	11	-	4	2	6
Ορώδες θηλώδες /	4	-	2	2	-	2	2	-
Κοκκιοκυτταρικοί	3	-	2	2	-	-	-	3
Clear cell AC	1	-	1	-	-	-	1	-
AC	4	-	3	1	-	1	2	1
<i>Περιτοναϊκές εκπλύσεις</i>								
AC	10	-	8	2	1	1	8	-
Ορώδες AC	1	-	-	1	-	-	-	1
Ορώδες θηλώδες AC	9	-	6	3	-	3	6	-
Βλεννώδες AC	2	-	2	-	-	-	2	-
Θηλώδες AC	1	-	1	-	-	-	1	-

*AC = Αδενοκαρκίνωμα

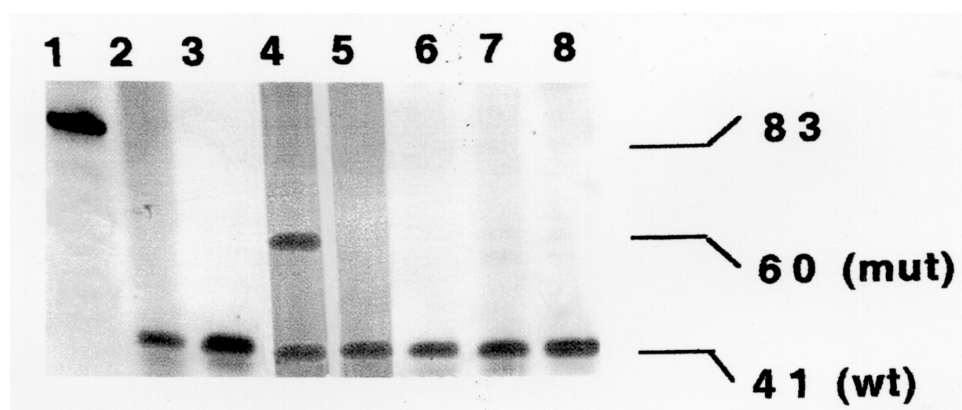
Πίνακας 7.6. Κατανομή των μεταλλάξεων ras στο κωδικόνιο 12 σε κακοήθη κυτταρολογικά δείγματα ασκτικών υγρών και περιτοναϊκών εκπλυμάτων.

Ιστολογική διάγνωση	Αριθμός ασθενών	Μεταλλαγές στο κωδικόνιο 12 (%)		
		K-ras	H-ras	N-ras
<i>Ασκίτες</i>				
Θηλώδες AC*	12	5(22)	1(33)	-
Ορώδες θηλώδες AC	4	1(4)	-	-
Κοκκιοκυτταρικοί	3	3(17)	1(33)	-
Clear cell AC	1	1(4)	-	-
AC	4	2(6)	-	1(33)
<i>Περιτοναϊκές εκπλύσεις</i>				
AC	10	5(22)	-	-
Ορώδες AC	1	1(4)	-	-
Ορώδες θηλώδες AC	9	3(17)	1(33)	1(33)
Βλενώδες AC	2	-	-	-
Θηλώδες AC	1	1(4)	-	1(33)
Σύνολο	47	22(47)	3(6)	3(6)

*AC = Αδενοκαρκίνωμα

Πίνακας 7.7. Ιστολογία των δειγμάτων και κατανομή των μεταλλάξεων ras στο κωδικόνιο 12 σε κυτταρολογικά δείγματα ασκίτικών υγρών και περιτοναϊκών εκπλυμάτων από κυσταδενώματα.

Ιστολογική διάγνωση	Αριθμός ασθενών	Μεταλλαγές στο κωδικόνιο 12 (%)		
		K-ras	H-ras	N-ras
<i>Ασκίτες</i>	8	–	–	–
<i>Περιτοναϊκά υγρά</i>	13	3(23)	–	–
Σύνολο	21	3(14)	–	–



Εικόνα 7.5 . Μεταλλάξεις του κωδικονίου 12 του γονιδίου N-ras, με τη μέθοδο PCR-RFLP. Οι ηλεκτροφορητική στήλη 4 αντιστοιχεί σε μεταλλαγμένο δείγμα, ενώ οι 2, 3, 5, 6, 7 και 8 στο φυσιολογικό γονίδιο. Η στήλη 1 περιέχει άπεπτο PCR προϊόν.

7.3 Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στο γονίδιο p53 σε HPV θετικές αλλοιώσεις του γυναικείου γεννητικού συστήματος.

7.3.1 Αλλοιώσεις που μελετήθηκαν και κυτταρολογική εξέταση

Από την κυτταρολογική εξέταση 60 χρωσμένων κυτταρολογικών δειγμάτων κατά Παπανικολάου με προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνο τραχήλου μήτρας, που παράλληλα έφεραν κάποιο τύπο ιού HPV υψηλού κινδύνου (HPV-18, HPV-16 και HPV-33), σύμφωνα με την Ιστολογική Τυποποίηση των Όγκων της Γυναικείας Γεννητικής Οδού από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Poulson HE et al, 1975) προκύπτουν τα εξής: 8 περιπτώσεις με χαμηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή δυσπλασία του τραχήλου της μήτρας (CIN I-II), 14 περιπτώσεις με υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακή δυσπλασία του τραχήλου της μήτρας (CIN III) και 85 πλακώδη καρκινώματα (SCC).

Επίσης, μελετήθηκαν 74 χρωσμένα κυτταρολογικά δειγμάτα κατά Παπανικολάου από φυσιολογικές γυναίκες ηλικίας άνω των 55 ετών που δεν έφεραν τον ιό HPV καθώς και 61 δείγματα αίματος από γυναίκες φυσιολογικής ηλικίας άνω των 55 ετών με αρνητικό ιστορικό για προκαρκινικές αλλοιώσεις και γυναικολογικό καρκίνο.

7.3.2 Τυποποίηση των ιών HPV σε χρωσμένο κυτταρολογικό υλικό δειγμάτων με προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνο τραχήλου μήτρας.

Από την τυποποίηση του ιού χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές, ο HPV-18 ανιχνεύεται σε ποσοστό 81.5%, ο ιός HPV-16 ανιχνεύεται σε ποσοστό 11.5% και ο HPV-33 ανιχνεύεται σε ποσοστό 7%. Τα 74 χρωσμένα κυτταρολογικά δειγμάτα κατά Παπανικολάου από φυσιολογικές γυναίκες ηλικίας άνω των 55 ετών που δεν έφεραν τον ιό HPV στοιχεία που αφορούν την ιστολογία καθώς και την τυποποίηση των HPV ιών δειγμάτων καρκινικού ιστού και προκαρκινικών αλλοιώσεων, από ασθενείς με αλλοιώσεις τραχήλου της μήτρας περιγράφονται λεπτομερώς στον Πίνακα 7.8 και 7.9 αντίστοιχα. η απουσία του ιού HPV

επιβεβαιώθηκε για τα 74 χρωσμένα κυτταρολογικά δείγματα κατά Παπανικολάου από φυσιολογικές γυναίκες ηλικίας άνω των 55 ετών.

Πίνακας 7.8. Ιστολογική εκτίμηση δειγμάτων καρκινικού ιστού και προκαρκινικών αλλοιώσεων που φέρουν ιούς HPV υψηλού κινδύνου, από ασθενείς με αλλοιώσεις τραχήλου της μήτρας

Ιστολογική διάγνωση	Αριθμός ασθενών
<i>Τράχηλος Μήτρας</i>	
CIN I,II	8
CIN III	14
Καρκίνωμα κυττάρων	Πλακωδών 38
Total	60
<i>Τράχηλος Μήτρας</i>	
Φυσιολογικά δείγματα	74
HPV αρνητικά	

Πίνακας 7.9. Τυποποίηση του HPV ιού σε δείγματα καρκινικού ιστού και προκαρκινικών αλλοιώσεων, από ασθενείς με αλλοιώσεις τραχήλου της μήτρας.

Ιστολογική Διάγνωση	HPV-18	HPV-16	HPV-33
<i>Τράχηλος Μήτρας</i>			
CIN I,II	7	1	--
CIN III	11	2	1
Καρκίνωμα κυττάρων	πλακωδών 31	4	3
Total (%)	49(81.5)	7 (11.5)	4 (7)

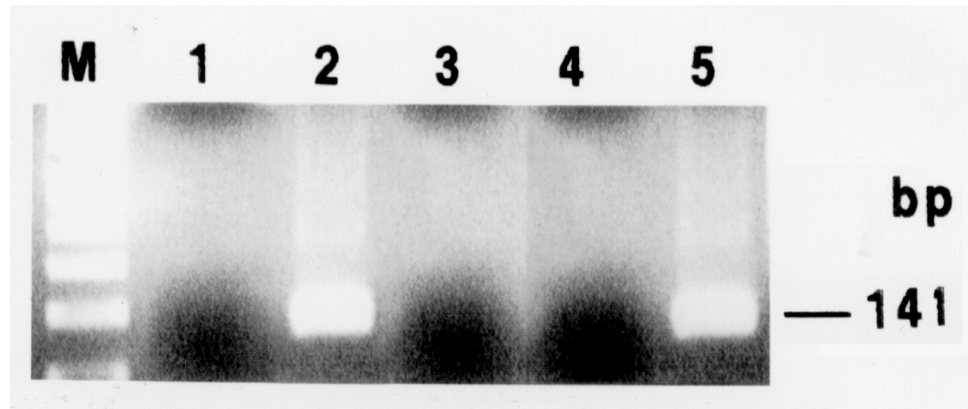
7.3.3 Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στο γονίδιο *p53* σε HPV θετικές αλλοιώσεις του γυναικείου γεννητικού συστήματος καθώς και σε δείγματα ελέγχου.

Στα πλαίσια της μελέτης της ανίχνευσης των σημειακών πολυμορφισμών του γονιδίου *p53* σε προκαρκινικές αλλοιώσεις και στον καρκίνο τραχήλου της μήτρας χρησιμοποιήθηκε μέθοδος περιλαμβάνει ενίσχυση του DNA της περιοχής του κωδικονίου με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR). Το ζευγάρι εκκινητών *p53+/Arg-* δίνει PCR προϊόν 141 βάσεων για το αλληλίο της Αργινίνης (Εικόνα 7.6) ενώ το ζευγάρι εκκινητών *Pro+/p53-* δίνει PCR προϊόν 177 βάσεων για το αλληλίο της Προλίνης (Εικόνα 7.7).

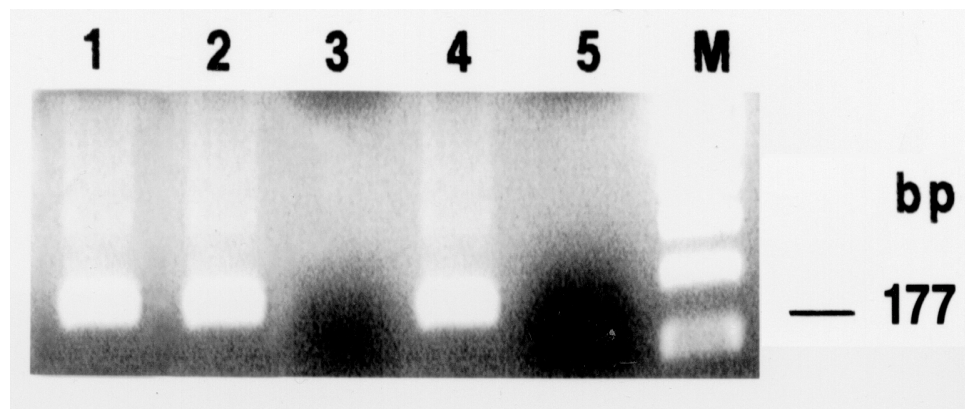
Τα αποτελέσματα της κατανομής των πολυμορφισμών της *p53* για τα 60 δείγματα από βλάβες του γυναικείου γεννητικού συστήματος που φέρουν ιούς HPV υψηλού κινδύνου καθώς και για τα 74 φυσιολογικά δείγματα από τράχηλο γυναικών που δεν φέρουν βλάβες από HPV και των 61 φυσιολογικών δειγμάτων αίματος από γυναίκες φυσιολογικής ηλικίας άνω των 55 ετών με αρνητικό ιστορικό για προκαρκινικές αλλοιώσεις και γυναικολογικό καρκίνο συνοψίζονται στον Πίνακα 7.10. Υπήρχε διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων της *p53* ανάμεσα στα HPV θετικά-δείγματα τραχήλου και στους δυο τύπους φυσιολογικών δειγμάτων. Η αλληλική συχνότητα της *p53 Arg/Arg* ήταν αρκετά υψηλότερη (46.5%) σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα (20.5% στα δείγματα τραχήλου και 20% στα δείγματα αίματος). Τα ποσοστά της ετεροζυγωτίας *Arg/Pro* ήταν 43% στα HPV θετικά-δείγματα τραχήλου σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα (62% στα δείγματα τραχήλου και 67% στα δείγματα αίματος). Η αλληλική συχνότητα της *p53 Pro/Pro* ήταν χαμηλή (8%) στα HPV θετικά-δείγματα τραχήλου και στα φυσιολογικά δείγματα (16% στα δείγματα τραχήλου και 10% στα δείγματα αίματος).

Πίνακας 7.10. Συχνότητες των πολυμορφισμών στο κωδικόνιο για το αμινοξύ 72 της p53

Ιστολογική διάγνωση	Αριθμός δειγμάτων	Αργινίνη	Αργινίνη / Προλίνη	Προλίνη	Άλλα
<i>Δείγματα αίματος</i>					
Σύνολο (%)	61	12(20)	41(67)	6(10)	2(3)
<i>Τράχηλος</i>					
<i>Μήτρας</i>					
Φυσιολογικά δείγματα	74	15(20.5)	46(62)	12(16)	1(1.5)
Σύνολο (%)					
<i>Τράχηλος</i>					
<i>Μήτρας</i>					
CIN I,II	8	2	4	2	--
CIN III	14	5	8	1	--
Καρκίνωμα πλακωδών	38	21	14	2	1
Σύνολο(%)	60	28(46.5)	26(43)	5(8)	1(2.5)



Εικόνα 7.6. Προϊόντα ενίσχυσης του αλληλίου της p53-72 Arg (141bp) με τη χρήση PCR. Τα προϊόντα του PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε 2% γέλη αγαρόζης. Οι στήλες 2,5 αντιπροσωπεύουν θετικά δείγματα , οι στήλες 1,3,4 αντιπροσωπεύουν αρνητικά δείγματα και η στήλη M τον 100bp δείκτη μοριακών βαρών.



Εικόνα 7.7. Προϊόντα ενίσχυσης του αλληλίου της p53-72 Pro (177bp) με τη χρήση PCR. Τα προϊόντα του PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε 2% γέλη αγαρόζης. Οι στήλες 1,2,4 αντιπροσωπεύουν θετικά δείγματα , οι στήλες 3,5 αντιπροσωπεύουν αρνητικά δείγματα και η στήλη M τον 100bp δείκτη μοριακών βαρών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΟΓΔΩΟ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8.1 Εισαγωγή

Η πολυσταδιακή φύση της καρκινογένεσης έχει οδηγήσει στη μελέτη διαφόρων ογκογονιδίων, ογκοκατασταλτικών γονιδίων καθώς και ποικίλων 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 τραχήλου της μήτρας, παρόλο που ο ακριβής ρόλος των παραγόντων αυτών στην καρκινογένεση του ανθρώπου δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί (DiPaolo 1989, Durst 1989).

8.2 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων *ras* σε χρωσμένο κυτταρολογικό υλικό δειγμάτων με προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνο τραχήλου μήτρας.

8.2.1 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων *ras* σε αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας.

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε η εύρεση μεταλλαγών στο κωδικόνιο 12 των γονιδίων *ras*. Οι μεταλλαγές των γονιδίων *ras* που εστιάζονται κυρίως σε μεταλλαγές στο γονίδιο *K-ras* συναντώνται σε προκαρκινικές και καρκινικές αλλοιώσεις σε συνολικό ποσοστό 26%. Οι μεταλλαγές στο γονίδιο *K-ras* εμφανίζονται με σχετικά μικρή συχνότητα σε δείγματα με προκαρκινικές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας (19% σε δείγματα με CIN I,II και 17% σε δείγματα με CIN III). Στις κακοήθεις αλλοιώσεις τραχήλου μήτρας τα ποσοστά ήταν υψηλότερα και

μεταλλάξεις τέτοιου είδους εμφανίζονταν τόσο σε δείγματα από καρκίνο πλακωδών κυττάρων τραχήλου μήτρας (28%) όσο και σε αδερκινώματα (100%).

Η παρουσία μεταλλαγών στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *K-ras* ακόμα και σε δείγματα προκαρκινικών αλλοιώσεων συνηγορεί στην ενεργοποίηση του γονιδίου αυτού μέσω σημειακών μεταλλαγών στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης του τραχήλου της μήτρας, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται η πιθανότητα εμφάνισης των μεταλλαγών αργότερα στην εξέλιξη του όγκου (Duggan, 1994).

Επιπρόσθετα, με τη βοήθεια στατιστικής ανάλυσης βρέθηκε στην παρούσα μελέτη σημαντικού βαθμού στατιστική συσχέτιση μεταξύ των μεταλλαγών αυτών και του σταδίου FIGO των δειγμάτων αυτών ($p=0.039$). Επίσης, κάποιου βαθμού συσχέτιση βρέθηκε ανάμεσα στην παρουσία των μεταλλαγών στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *K-ras* και της συνολικής επιβίωσης των συγκεκριμένων ασθενών ($p=0.049$) (Dokianakis, 1999).

Επίσης εκτιμήθηκε η ύπαρξη σημειακών μεταλλαγών στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *H-ras*. Οι μεταλλαγές αυτές εμφανίζονται σε συνολικό ποσοστό 10.5%. Οι μεταλλαγές στο γονίδιο *H-ras* εμφανίζονται με μικρή συχνότητα σε δείγματα με προκαρκινικές αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας (28% σε δείγματα με CIN III). Στις κακοήθεις αλλοιώσεις τραχήλου μήτρας τα ποσοστά ήταν επίσης χαμηλά και εμφανίζονταν μονάχα σε δείγματα από καρκίνο πλακωδών κυττάρων τραχήλου μήτρας (28%). Η παρουσία μεταλλαγών στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *H-ras* σε δείγματα προκαρκινικών αλλοιώσεων μπορεί επίσης να συνηγορήσει στην ενεργοποίηση του γονιδίου αυτού μέσω σημειακών μεταλλαγών στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης του τραχήλου της μήτρας. Στα υπό μελέτη δείγματα τόσο αυτά που έφεραν προκαρκινικές όσο και αυτά με καρκινικές αλλοιώσεις δεν εμφάνισαν μεταλλαγές στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *N-ras*, συνεπώς το γονίδιο αυτό δεν φαίνεται να παίζει κάποιο σημαντικό ρόλο στην πρόκληση και πορεία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Τα γονίδια *K-ras* και *H-ras* μέσω της ενεργοποίησής τους με σημειακή μεταλλαγή είναι πιθανό να συμμετέχουν στην ανάπτυξη και την πρόοδο μιας υποομάδας καρκινωμάτων του γυναικείου γεννητικού συστήματος. Τα πειράματα αυτά ενισχύουν τη θεωρία της πολυσταδιακής διαδικασίας της εξαλαγής του κυττάρου, μια και στις περιπτώσεις καρκίνων που δεν περιέχουν μεταλλαγμένα γονίδια *ras*, προτείνονται εναλλακτικοί μηχανισμοί καρκινογένεσης με μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια.

8.2.2 Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων *ras* χρωσμένα ασκίτικα υγρά και περιτοναϊκές εκπλύσεις δειγμάτων με καρκίνο ωοθηκών.

Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι μια ασθένεια που κυρίως επεκτείνεται ενδπεριτοναϊκά από κύτταρα που κινούνται ελεύθερα και διασπείρονται από τον πρωταρχικό όγκο. Τα κύτταρα αυτά είναι ικανά να επικαθήσουν σε κάθε περιτοναϊκή επιφάνεια (DiSaia, 1997). Η σπουδαιότητα της κυτταρολογικής εξέτασης των περιτοναϊκών υγρών στον καρκίνο των ωοθηκών είναι ευρύτερα αναγνωρισμένη και αποτελεί τμήμα της διαδικασίας σταδιοποίησης στον ακρκίνο των ωοθηκών (Petterson, 1991).

Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε η εύρεση μεταλλαγών στο κωδικόνιο 12 των γονιδίων *ras* σε δείγματα από ανθρώπινα περιτοναϊκά και ασκίτικα υγρά από καρκινώματα ωοθηκών. Από τα γονίδια *ras* το πρωτο-ογκογονίδιο *K-ras* ήταν αυτό που κυρίως έφερε γενετικές αλλοιώσεις. Οι μεταλλαγές στο γονίδιο *K-ras* συναντώνται σε υψηλό ποσοστό που ανέρχεται σε 47% ενώ τα γονίδια *H-ras* και *N-ras* εμφάνισαν μικρότερα ποσοστά που ανέρχονται σε 6% αντίστοιχα. Στην μελέτη αυτή εξετάστηκαν επίσης και χρωσμένα πλακάκια με δείγματα από κυσταδενώματα που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου για τα κακοήθη περιτοναϊκά υγρά. Στα δείγματα περιτοναϊκών υγρών από κυσταδενώματα βρέθηκαν μεταλλαγές στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου *K-ras* σε μικρό ποσοστό (14%), που συγκριτικά είναι αρκετά μικρότερο από το αντίστοιχο των κακοήθων δειγμάτων. Στα ίδια δείγματα δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλαγές στα γονίδια *H-ras* και *N-ras*. Οι μεταλλαγές στο γονίδιο *K-ras* φαίνεται να ανιχνεύονται ακόμα και σε μη κακοήθη δείγματα (κυσταδενώματα) δεικνύοντας την πιθανότητα οι μεταλλαγές αυτές να αποτελούν κάποιο από τα αρχικά γεγονότα στην πορεία καρκινογένεσης των ωοθηκών. Στην μελέτη αυτή παρατηρήθηκε σημαντική στατιστική συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία των μεταλλαγών *K-ras* και στην σταδιοποίηση των δειγμάτων κατά FIGO ($p=0.024$) καθώς και με το χειρουργικό κλινικό στάδιο των δειγμάτων (Dokianakis, 1999). Η υψηλή συχνότητα στα ποσοστά μεταλλαγών του γονιδίου *K-ras* που παρατηρήθηκε κατά την μελέτη των κακοηθών περιτοναϊκών εκπλυμάτων και ασκικών (47%) σε σύγκριση με τα αποτελέσματα άλλων μελετών μπορούν να εξηγηθούν βασισμένα

στους περιορισμούς που μπορεί να βασίζονται στην μέθοδο που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των μεταλλαγών ή δευτερογενώς να στηρίζεται στους διαφορετικούς αιτιολογικούς παράγοντες διαφορετικών πληθυσμιακών ομάδων.

Τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα της κυτταρολογικής εξέτασης των περιτοναϊκών διαλυμάτων σε δείγματα καρκίνου των ωοθηκών μπορεί να ανέρχεται ως και στο 20% των συνολικών περιπτώσεων (Zuna, 1989). Σε κάποιες μελέτες έγινε σύγκριση της ανίχνευσης κυττάρων με κακοήθεια με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής σε σχέση με την κλασσική κυτταρολογική εξέταση σε ασθενείς με καρκινώματα ωοθηκών (Jones 1991, Kehoe 1995). Παρ'όλ'αυτά, το κύριο πρόβλημα για την ευρεία εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής παραμένει το γεγονός ότι στα καρκινώματα των ωοθηκών περιέχονται μονάχα διπλοειδή κύτταρα (Barnebei, 1990) και επιπρόσθετα η ανευπλοειδία δεν αποτελεί συνώνυμο γεγονός με την κακοήθεια (Kehoe, 1995). Η χρήση του PCR και της μεθόδου του RFLP για την ανίχνευση σημειακών μεταλλαγών *K-ras* και άλλων γενετικών αλλοιώσεων μπορεί να εξασφαλίσει σε μεγάλο βαθμό την διαγνωστική ακρίβεια των περιτοναϊκών διαλυμάτων στον καρκίνο των ωοθηκών.

Η αναρρόφηση με τη μέθοδο *cul-de-sac* για την κυτταρολογική αξιολόγηση του περιτόναιου έχει χρησιμοποιηθεί για την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών (DiSaia, 1997) όμως, η αναρρόφηση δεν κατάφερε να παίξει σημαντικό ρόλο στην πρώιμη διάγνωση εξαιτίας της δυσκολίας στην πραγματοποίηση της και επιπρόσθετα στην χαμηλή διακριτική ικανότητα της (Gershenson, 1996). Η παρουσία μεταλλαγών στο γονίδιο *K-ras* στα κακοήγη περιτοναϊκά εκπλύματα μπορεί να αποτελέσει πιθανή διαγνωστική παράμετρο στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών.

Συνεπώς, οι μεταλλαγές στα ογκογονίδια *ras* στο κυτταρικό επίπεδο εμφανίζουν εμπλοκή στην καρκινογένεση των ωοθηκών, ενώ οι μεταλλαγές στο γονίδιο *K-ras* μπορούν να χαρακτηριστούν ως πρώιμο γεγονός κατά την ενδοπεριτοναϊκή εξάπλωση του καρκίνου των ωοθηκών και επίσης η αξιολόγηση τους θα μπορούσε να επιτελέσει ένα επιπρόσθετο βοηθητικό εργαλείο στην επίτευξη διαγνωστικής ακρίβειας με την βοήθεια των περιτοναϊκών εκπλύσεων και των ασκτικών υγρών που συλλέγονται τη χρονική στιγμή της λαπαροσκοπικής εξέτασης. Η ανίχνευση των μεταλλαγών αυτών θα μπορούσε να επιτελέσει πιθανώς

σημαντικό εργαλείο για την γρήγορη και έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών και να βοηθήσει έμμεσα στην καταπολέμηση του.

8.3 Ανίχνευση του ιού HPV σε χρωσμένο κυτταρολογικό υλικό δειγμάτων με προκαρκινικές αλλοιώσεις και καρκίνο τραχήλου μήτρας.

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 (Hurfin, 1991), γεγονός που υποδηλώνει την συνεργασία τους με κυτταρικά ογκογονίδια για την πρόοδο μορφών όπως ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας.

Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται στην συχνότητα ανίχνευσης των διαφόρων τύπων του ιού HPV σε αλλοιώσεις του τραχήλου της μήτρας έχουν βρεθεί και η ποικιλία αυτή έχει αποδοθεί σε διαφορές στην γεωγραφική κατανομή των υπό εξέταση δειγμάτων, στην εστιακή ετερογένεια της αντιγραφής του ίδιου του ιού HPV, στην ίδια τη φύση της αλλοίωσης που είναι υπό μελέτη καθώς και στις διαφορές στην ευαισθησία των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του ιού στις συγκριμένες βλάβες (Arends, 1991). Σε περιοχές με υψηλή συχνότητα εμφάνισης καρκίνου τραχήλου μήτρας φαίνεται να υπάρχει μικρή διαφορά στο ποσοστό ανίχνευσης των ιών HPV-16 και HPV-18 (Schmauz, 1989). Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι η μόλυνση με κάποιο ιό από την ομάδα των ιών του θηλώματος (HPV) σχετίζεται με την παρουσία διηθητικού καρκίνου της μήτρας (65%), εμφανίζεται επίσης και σε αδενοκαρκινώματα τραχήλου μήτρας σε ποσοστό 50%, ενώ ο ιός ανιχνεύεται ακόμα και σε προκαρκινικές αλλοιώσεις σε σημαντικά ποσοστά (81% σε δείγματα με βλάβες CIN I,II και 89% σε δείγματα με τραχηλικές βλάβες CIN III). Η συνολική ανίχνευση του ιού HPV στα δείγματα που προέρχονται από προκαρκινικές και καρκινικές βλάβες τραχήλου της μήτρας ανέρχεται σε ποσοστό 70%.

Σε κάποιες γεωγραφικές περιοχές του κόσμου ο τύπος HPV-16 έχει βρεθεί να εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα από τον τύπο HPV-18 καθώς και από τους άλλους τύπους (Schmauz 1989, Anderson-Ellstrom 1996). Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ο HPV-18 να εμφανίζεται σε μεγαλύτερα ποσοστά σε σχέση με τον τύπο 16

του ιού καθώς και με όλους τους άλλους υπό μελέτη τύπους (78%) (Dokianakis 1999, Dokianakis 1998).

Επίσης, άλλες μελέτες που έχουν γίνει στον Ελληνικό χώρο συμφωνούν με τα συγκεκριμένα ευρήματα (Koffa, 1994). Οι άλλοι υπό μελέτη τύποι του ιού συναντώνται σε μικρότερα ποσοστά όπως ο HPV-16 (6%) και ο τύπος HPV-33 (3.5%) ενώ 21% των υπό εξέταση δειγμάτων έφεραν κάποιον άλλο τύπο. Στην παρούσα μελέτη έχει βρεθεί σημαντική στατιστική συσχέτιση μεταξύ συγκεκριμένων τύπων HPV και της κλινικής επιβίωσης των ασθενών που τους φέρουν. Μια πιθανή εξήγηση για αυτή την αυξημένη εμφάνιση του τύπου 18 στον Ελλαδικό χώρο μπορεί να αποδοθεί στις εθνολογικές διαφοροποιήσεις των τύπων του ιού HPV. Μελέτες από ερευνητές που εστιάστηκαν στην μοριακή προέλευση του τύπου HPV-18 έδειξαν ότι ο τύπος 18 διαθέτει μια αρχαία φυλογενετική ρίζα στην Αφρική (Ong, 1993), που γειτνιάζει με τον Ελλαδικό χώρο. Ο τύπος 18 του ιού εμφανίζει πιο επιθετική συμπεριφορά σε σχέση με τους άλλους τύπους και γενικά χειρότερη πρόγνωση (Kurman, 1988). Ο τύπος HPV -18 σχετίζεται στα δείγματα που υπάρχει με πορεία της νόσου που καταλήγει συχνότερα σε αδενοκαρκινώματα και αδenoπλακώδη καρκινώματα ενώ σε αντίθεση ο HPV-16 σχετίζεται με ανάπτυξη καρκίνου πλακωδών κυττάρων που έχει γενικότερα καλύτερη πρόγνωση. Επιπρόσθετα, *in vivo* και *in vitro* μελέτες δεικνύουν ότι ο HPV-18 είναι πιο αποτελεσματικός σε πειράματα αθανατοποίησης και μετασχηματισμού σε σχέση με τους άλλους τύπους (Romanczuk, 1991).

Ο σημαντικός ρόλος του ιού HPV στην ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας θεωρείται πλέον δεδομένος, ωστόσο έχει προταθεί ότι η συνύπαρξη πολλαπλών μολύνσεων μπορεί να αποτελεί ένα επιπρόσθετο παράγοντα κινδύνου για τον καρκίνο αυτό (zur Hausen, 1991), υπόθεση η οποία έχει επιβεβαιωθεί από ορισμένες επιδημιολογικές μελέτες (Hildesheim 1991, Dillner 1994, Jha 1989). Ο αυξημένος αριθμός μολύνσεων μπορεί να θεωρηθεί ως δείκτης σεξουαλικής δραστηριότητας, με αποτέλεσμα να αυξάνεται και η πιθανότητα μόλυνσης με τον ιό HPV. Επίσης, θεωρείται πιθανό οι συνεπιμολύνσεις που επιμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα, να προάγουν της εξαλλαγή μέσω της χρόνιας φλεγμονής ή της εξασθένησης του ανοσολογικού ελέγχου μιας HPV μόλυνσης.

8.4 Συσχέτιση της ανίχνευσης του ιού HPV σε χρωσμένα κολποτραχηλικά επιχρίσματα με την κυτταρολογική και ιστολογική διάγνωση

Σε αρκετές μελέτες έχει προταθεί να χρησιμοποιείται η ανίχνευση του ιού HPV ως μέσο ποιοτικού ελέγχου στην κυτταροπαθολογία για την εντόπιση ασθενών με αλλοιώσεις μετρίου βαθμού που χρειάζονται πιθανώς περαιτέρω θεραπεία, ενώ η ανίχνευση των HPV υψηλού κινδύνου, φαίνεται να έχει ακόμα πιο μεγάλη κλινική σημασία (Melkert, 1993). Η ανίχνευση αυτών των τύπων του ιού σε μια ασθενή με χαμηλού βαθμού δυσπλασία πιθανώς να είναι ενδεικτική της εξέλιξης της σε υψηλότερου βαθμού (Cox, 1995).

Με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης μπορούν πλέον να ανιχνευθούν χρωσμένα κολποτραχηλικά επιχρίσματα τα οποία έχουν μονιμοποιηθεί και χρωματιστεί κατά PAP. Το κυτταρολογικό αυτό υλικό παρέχει τη δυνατότητα αναδρομικών μελετών, ενώ ταυτόχρονα είναι γνωστή και η εξέλιξη της αλλοίωσης. Συγχρόνως, είναι δυνατή η σύγκριση της PCR με την κυτταρολογική ανάλυση χρησιμοποιώντας το ίδιο δείγμα, ενώ η ταυτόχρονη τυποποίηση του ιού μπορεί να βοηθήσει στην επιλογή της θεραπείας των ασθενών.

Η χρησιμοποίηση παλαιών τραχηλικών επιχρισμάτων μπορεί να προσφέρει υλικό για την μελέτη της νεοπλασίας του τραχήλου, αλλά ακόμη και για την ιατροδικαστική ιατρική. Το μόνο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι ουσιαστικά καταστρέφεται το κυτταρολογικό δείγμα.

8.5 Ανίχνευση σημειακών πολυμορφισμών στο γονίδιο p53 σε HPV θετικές αλλοιώσεις του γυναικείου γεννητικού συστήματος.

Η μόλυνση με ιούς HPV και η φορεία τους στον τράχηλο της μήτρας διαφόρων γυναικών είναι σημαντικός παράγοντας στην εξέλιξη και την διατήρηση μιας γυναικολογικής κακοήθειας (zur Hausen, 1994). Τα ειδικά ιϊκά ογκογονίδια E6 και E7 των ιών HPV υψηλού κινδύνου (όπως οι τύποι 16,18, 33 και άλλοι) μπορούν να δράσουν ως ογκογονίδια. Η ογκοπρωτεΐνη E6 του ιού έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά με την κυτταρική p53 (Dyson, 1989) και μετά από αυτή την αλληλεπίδραση η p53 έχει βρεθεί να αποικοδομείται (Scheffner, 1990). Το γονίδιο

p53 είναι πολυμορφικό στο αμινοξύ 72 της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί, όπου μπορεί να περιέχει μια προλίνη ή μια αργινίνη σε αυτή τη θέση.

Οι Storey et al (1998) διατύπωσαν ότι σε ασθενείς που πάσχουν με καρκίνο τραχήλου της μήτρας και φέρουν κάποιο ιό HPV υψηλού κινδύνου, αν η P53 τους στην θέση 72 έχει δυο αντίγραφα του αμινοξέος αργινίνη, οι ασθενείς αυτοί έχουν επτά φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου τραχήλου της μήτρας σε σχέση με αυτούς που είναι ομόζυγοι για τη μορφή με την προλίνη. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής επιβεβαιώνουν τη διαφοροποίηση των γονοτύπων ασθενών που φέρουν κάποια βλάβη στον τράχηλο της μήτρας που ανιχνεύεται ο ιός HPV. Ο ομόζυγος γονότυπος της αργινίνης ανέρχεται σε συνολικό ποσοστό 46.5% ενώ σε δείγματα φυσιολογικά που χρησιμοποιήθηκαν ως μέσο ελέγχου ήταν 20.5% σε χρωσμένα κολποτραχηλικά δείγματα που δεν φέρουν τον ιό και 20% σε δείγματα αίματος. Αντίστοιχα, στην ομάδα ελέγχου τα ποσοστά των ετερόζυγων ατόμων για τον πολυμορφισμό αυτό ήταν 62% στα χρωσμένα κολποτραχηλικά δείγματα που δεν φέρουν τον ιό και 67% στα δείγματα αίματος. Για την ομάδα ελέγχου τα ποσοστά των ομόζυγων ατόμων για την προλίνη ήταν 16% στα χρωσμένα κολποτραχηλικά δείγματα που δεν φέρουν τον ιό και 10% στα δείγματα αίματος. Οι διαφοροποιήσεις στην συχνότητα των γονοτύπων για το κωδικόνιο 72 της p53 μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με την εθνολογική ομάδα. Η συχνότητα των ομόζυγων για την αργινίνη στην ομάδα ελέγχου της παρούσας μελέτης είναι μικρότερη από αντίστοιχες στην Ιαπωνία (Minaguchi, 1998) και στην Νορβηγία (Helland, 1998).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεικνύουν την πιθανότητα η ομοζυγωτία της αργινίνης της πρωτεΐνης P53 να αντιπροσωπεύει ένα πιθανό προδιαθεσικό παράγοντα για την ανάπτυξη καρκίνου τραχήλου της μήτρας σε δείγματα που φέρουν κάποιον τύπο HPV ιού υψηλού κινδύνου. Στα συγκεκριμένα δείγματα εμφανιζόταν σε μεγαλύτερο ποσοστό η ομοζυγωτία της αργινίνης σε σχέση με την κατάσταση ετεροζυγωτίας ή και ομοζυγωτίας της προλίνης. Ένας μικρός αριθμός δειγμάτων από καρκίνους τραχήλου μήτρας που έφεραν κάποιον HPV ιό υψηλού κινδύνου δεν έφεραν κανένα από τα προαναφερθέντα αμινοξέα στην θέση αυτή. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε πιθανό έλλειμμα της περιοχής αυτής από την p53 ή σε ύπαρξη περισσότερων αλληλλίων που να δίνουν για παράδειγμα το αμινοξύ κυστεΐνη (Matlashewski, 1987). Η ύπαρξη της αργινίνης σε

ομοζυγωτία σε δείγματα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας που φέρουν HPV ιό υψηλού κινδύνου θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πιθανό προδιαθεσικό παράγοντα στο μοντέλο καρκινογένεσης του τραχήλου της μήτρας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

Bagchi S, Raychaudhuri P, Nevins JR, Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell* 1990 Aug 24;62(4):659-69v

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

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

Black PH, Hartley JW, Rowe WP, Huebner RJ (1963). *Nature* 199:1016-1018

Blom R, Guerrieri C, Stal O, Malmstrom H, Simonsen E. Leiomyosarcoma of the uterus: A clinicopathologic, DNA flow cytometric, p53, and mdm-2 analysis of 49 cases. *Gynecol Oncol* 1998 Jan;68(1):54-61

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

Bosch FX, Munoz N, de Sanjose S, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, Tormo MJ, Moreo P, Ascunze N, Gonzalez LC, et al. Risk factors for

cervical cancer in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992 Nov 11;52(5):750-8

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

Buntine DW. Adenocarcinoma of the uterine cervix of probable Wolffian origin. *Pathology* 1979; 11:713

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

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

Chapman GW, Abreo F, Thompson HE. Carcinoma of the cervix in young females (35 years, and younger), *Gynecol Oncol* 1988; 31:430

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

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

Crawford LV, Crawford EM. *Virology* 1963 21:258-263

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

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, Leegers SJ, Marshall CJ, Bos JL. Involvement of p21ras in activation of extracellular signal-regulated kinase 2. *Nature* 1992 Jun 18;357(6379):602-4

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

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

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

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, Wasyluk 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

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,

Harris AN, Perlman M, Schiller SL, Romero R, Mitchell MD . Characterization of prostaglandin production in amnion-derived WISH cells. *Am J Obstet Gynecol* 1988 Dec;159(6):1385-9

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

Hayward WS, Neel BG. Retroviral gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 1981;91:217-76

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

Herman SA, Coffin JM. Efficient packaging of readthrough RNA in ALV: implications for oncogene transduction. *Science* 1987 May 15;236(4803):845-8

Hirama T, Miller CW, Wilczynski SP, Koeffler HP. p16 (CDKN2/cyclin-dependent kinase-4 inhibitor/multiple tumor suppressor-1) gene is not altered in uterine cervical carcinomas or cell lines. *Mod Pathol* 1996 Jan;9(1):26-31

Huibregste JM, Scheffner M. *Seminars Virol*, 5:357-367

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

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

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

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

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 YT, Cho NH, Park SW, Kim JW. Underexpression of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998 Oct;71(1):38-45

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

Koss LG. The Papanicolaou test for cervical cancer dedection. A triumph and a tragedy. *AJ*

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

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

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

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

Lu X, Toki T, Konishi I, Nikaido T, Fujii S. Expression of p21WAF1/CIP1 in adenocarcinoma of the uterine cervix: a possible immunohistochemical marker of a favorable prognosis. *Cancer* 1998 Jun 15;82(12):2409-17

MacCormack CP. Health and the social power of women. *Soc Sci Med* 1988;26(7):677-83

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

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

Marchetti A, Buttitta F, Pellegrini S, Bertacca G, Chella A, Carnicelli V, Tognoni V, Filardo A, Angeletti CA, Bevilacqua G. Alterations of P16 (MTS1) in node-positive non-small cell lung carcinomas. *J Pathol* 1997 Feb;181(2):178-82

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

Matsuyama T, Tsukamoto N, Imachi M, Nakano H. Bone metastasis from cervix cancer, *Gynecol Oncol* 1989; 32:72

May M, Dong XP, Beyer-Finkler E, Stubenrauch F, Fuchs PG, Pfister H. The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target

sequences for YY1.

EMBO J 1994 Mar 15;13(6):1460-6

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

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, 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

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

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

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

Olson C, Pamakcu AM, Brobst DF, Kowalczyk T, Satter EJ, Price JM. *Cancer Res* 1959 19:779-782

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

Presneau N, Laplace-Marieze V, Sylvain V, Lortholary A, Hardouin A, Bernard-Gallon D, Bignon YJ . New mechanism of BRCA-1 mutation by deletion/insertion at the same nucleotide position in three unrelated French breast/ovarian cancer families. *Hum Genet* 1998 Sep;103(3):334-9

Radice P, Pierotti MA, Q . Molecular genetics of breast cancer. *J Nucl Med* 1997 Sep;41(3):189-99

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

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

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

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

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985 Dec 20;230(4732):1350-4

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

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

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

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

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

Sherman ME, Sturgeon S, Brinton L, Kurman RJ. Endometrial cancer chemoprevention: implications of diverse pathways of carcinogenesis. *J Cell Biochem Suppl* 1995;23:160-4

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

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

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

Somasundaram K, Zhang H, Zeng YX, Houvras Y, Peng Y, Zhang H, Wu GS, Licht JD, Weber BL, El-Deiry WS . Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/CiP1. *Nature* 1997 Sep 11;389(6647):187-90

Δ.Α Σπαντίδος. Κλινική Ιολογία. Αρχές-Κλινικά και Μοριακά Στοιχεία..Λυχνία. Ηράκλειο 1998.

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

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

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

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

Tannock IF, Cummings BJ. Neoadjuvant chemotherapy in head and neck cancer: no way to preserve a larynx. *J Clin Oncol* 1992 Feb;10(2):343-5

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

Webb J, Maurice MP, Symmonds E, Richard MD. Site of recurrence of cervical cancer after radical hysterectomy. *Am J Obstet Gynecol.* 1980; 138:813

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

Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA, Harlow E. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988 Jul 14;334(6178):124-9

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

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

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