

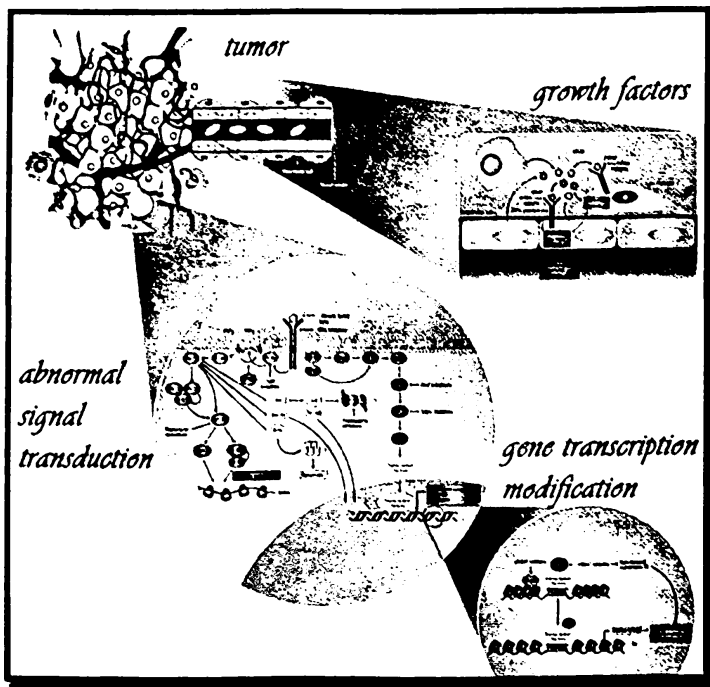


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ Α. ΠΑΥΛΙΔΗΣ

Μοριακή μελέτη των γονιδίων του αυξητικού επιδερμικού παράγοντα {Epidermal Growth Factor Receptor EGFR} και του C-KIT/CD117 σε Καρκινώματα Αγνώστου Πρωτοπαθούς Εστίας {ΚΑΠΕ}



ΛΕΥΚΟΘΕΑ Σ. ΝΤΟΒΑ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000336984





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ Α. ΠΑΥΛΙΔΗΣ

Μοριακή μελέτη των γονιδίων του αυξητικού επιδερμικού παράγοντα {Epidermal Growth Factor Receptor EGFR} και του C-KIT/CD117 σε Καρκινώματα Αγνώστου Πρωτοπαθούς Εστίας {ΚΑΠΕ}

ΛΕΥΚΟΘΕΑ Σ. ΝΤΟΒΑ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2, περί της νομικής κατοχύρωσης του Ιατρικού Τμήματος)



Ημερομηνία αίτησης της κ Ντόβας Λευκοθέας: 7-11-2003

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 524^α/27-1-2004

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Παυλίδης Νικόλαος, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μαλάμου-Μήτση Βασιλική, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

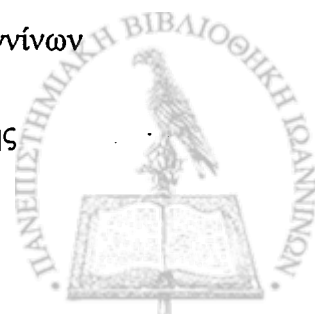
Γεωργίου Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 16-02-2004

«Μοριακή Μελέτη των Γονιδίων του Αυξητικού Επιδερμικού Παράγοντα EGFR και του CKIT/CD117 σε Καρκινώματα Αγνώστου Πρωτοπαθούς Εστίας».

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 607^α/29-5-2007

Καναβάρος Παναγιώτης	Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία-Εμβρυολογία Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
Μαλάμου -Μήτση Βασιλική	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
Μαρσέλος Μάριος-Αθανάσιος	Καθηγητής Φαρμακολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
Παυλίδης Νικόλαος	Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
Γεωργίου Ιωάννης	Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
Μπάη Μαρία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
Μπριασούλης Ευάγγελος	Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων



Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 20-6-2007

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας



“Nature is nowhere accustomed more openly to display her secret mysteries than in cases where she shows traces of her workings apart from the beaten path; nor is there any better way to advance the proper practice of medicine than to give our minds to the discovery of the usual law of Nature by careful investigation.”

-William Harvey 1657



Αφιερώνεται στους σεβαστούς μου καθηγητές:
Ν. Παυλίδη, Β. Μαλάμου-Μήτση και Ι. Γεωργίου



Στους γονείς μου Στέφανο και Σπυριδούλα
και στον αδερφό μου Λευτέρη



Με βαθιά ευγνωμοσύνη
στον Dr. Γεώργιο Βαρθολομάτο
που με αγάπη με δημιούργησε επιστημονικά,
αποτελώντας το πρότυπό μου ως Άνθρωπος και Επιστήμων



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στην Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, στο Αιματολογικό Εργαστήριο-Μονάδα Μοριακής Βιολογίας και στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του ίδιου Νοσοκομείου, με χρηματική υποστήριξη των Ερευνητικών Προγραμμάτων Ογκολογίας από το Υπουργείο Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης, την Πανηπειρωτική Φιλεκπαιδευτική Εταιρεία και την Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου.

Την επίβλεψη της διατριβής είχε ο Καθηγητής Παθολογίας Ογκολογίας κ. Νικόλαος Παυλίδης, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική του καθοδήγηση, τη συνεχή παρακολούθηση και την ηθική του συμπαράσταση σε όλα τα στάδια της διατριβής. Την Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας κ. Βασιλική Μαλάμου-Μήτση ευχαριστώ θερμά, για την πολύτιμη βοήθειά της για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης, το αμείωτο ενδιαφέρον και την πολύπλευρη συμπαράστασή της. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας κ. Ιωάννη Γεωργίου καθώς μου ενέπνευσε την αγάπη για την έρευνα και την επιστημονική πρόοδο, με βοήθησε και με ενδυνάμωσε ώστε να υπερνικήσω κάθε δυσκολία που παρουσιάστηκε κατά τη διεξαγωγή της παρούσας διατριβής.

Το εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας είναι ένα κύτταρο ανεξάντλητης γνώσης, πυρήνας του οποίου είναι ο Dr. Γεώργιος Βαρθολομάτος που το διευθύνει με σεβασμό προς την επιστήμη και την έρευνα. Τον ευχαριστώ λοιπόν για την επιστημονική καθοδήγηση, την αμέριστη βοήθεια, την ανεκτίμητη ηθική και ψυχολογική υποστήριξη και την πολύτιμη συμπαράσταση.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω:

Τον Διευθυντή του Αιματολογικού Εργαστηρίου κ. Νικόλαο Κολαίτη για την υποστήριξη και όλες τις επιστημονικές γνώσεις που μου μετέδωσε.

Τον υποδιευθυντή του Αιματολογικού Εργαστηρίου κ. Γεώργιο Κακοσίμο, για την αμέριστη βοήθεια.

Την Ομάδα Μοριακής Ογκολογίας για το οργανωτικό πνεύμα, τη συλλογική εργασία, τους νέους στόχους που θέσαμε και κατακτήσαμε.

Τους ιατρούς κ.κ Πενθερουδάκη, Καραβασίλη και Μπριασούλη και τη γραμματεία της Ογκολογικής Κλινικής για την άψογη συνεργασία.



Τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής κ.κ Π. Καναβάρο, Μ. Μπάη, Μ. Μαρσέλο και Ε. Μπριασούλη για την προθυμία τους να αποτελέσουν μέλη της επιτροπής αφιερώνοντας μέρος από τον πολύτιμο χρόνο τους.

Τις κυρίες Ε.Μπαράκου και Ε. Ντόκου και όλους τους συναδέλφους του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών για την βοήθειά τους και το ομαδικό τους πνεύμα, καθοριστικής σημασίας για την εύρυθμη λειτουργία του εργαστηρίου.

Τον Κώστα, για την ανεκτίμητη βοήθεια σε περίπλοκα υπολογιστικά προγράμματα

Τους μαθητές μου, που μου έδωσαν κουράγιο

Όλους τους Φίλους για την ηθική υποστήριξη και την ανοχή τους για το χρόνο που δεν τους διέθετα.

Ο ακρογωνιαίος λίθος των όσων έχω καταφέρει ήταν και θα είναι η οικογένειά μου. Τους ευχαριστώ λοιπόν, γιατί στάθηκαν δίπλα μου, μοιράστηκαν τις αγωνίες μου και γιατί πάντα με συμβουλεύουν με σοφία και αγάπη. Ελπίζω να είναι υπερήφανοι για την κόρη τους, όπως εγώ για εκείνους.

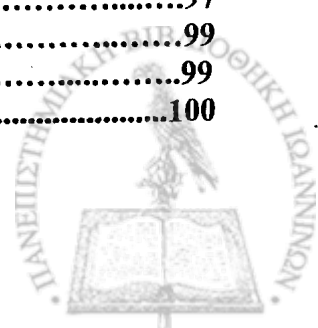


ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ – ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	25
1.1 ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΑΓΝΩΣΤΗΣ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΕΣΤΙΑΣ (ΚΑΠΕ).....	27
1.1.1 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ.....	29
1.1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ-ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ.....	32
1.1.3 ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΠΕ.....	33
1.1.4 ΠΡΟΓΝΩΣΗ.....	34
1.1.5 ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΥΠΟ-ΟΜΑΔΕΣ ΤΟΥ ΚΑΠΕ.....	36
1.1.5.1 Κατεξοχήν ηπατική μεταστατική νόσος.....	36
1.1.5.2 Μεταστατικό ΚΑΠΕ λεμφαδενικής εντόπισης.....	36
1.1.5.3 Το μεταστατικό ΚΑΠΕ περιτοναϊκής κοιλότητας.....	38
1.1.5.4 Μεταστατικό ΚΑΠΕ στους πνεύμονες.....	39
1.1.5.5 Μεταστατικό ΚΑΠΕ οστών.....	39
1.1.5.6 Το μεταστατικό ΚΑΠΕ Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ).....	40
1.1.5.7 Τα μεταστατικά ΚΑΠΕ με νευροενδοκρινικούς χαρακτήρες.....	40
1.1.5.8 Κακοήθες μεταστατικό μελάνωμα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας.....	41
1.1.6 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΚΑΠΕ.....	42
1.1.7 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ.....	46
1.1.7.1 Κλινική εξέταση.....	47
1.1.7.2 Ο ρόλος του παθολογοανατόμου.....	48
1.1.7.3 Ο ρόλος του ακτινολόγου.....	53
1.1.7.4 Ο ρόλος του ενδοσκόπου.....	54
1.1.8 ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΡΟΥ.....	55
1.1.9 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ.....	56
1.1.9.1 Περιοχική θεραπεία.....	56
1.1.9.2 Ορμονοθεραπεία.....	56
1.1.9.3 Συστηματική θεραπεία.....	57



1.2 ΟΙ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	58
1.3 Η ΔΙΑΚΟΠΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΩΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	60
1.3.1 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΙ ΜΕΤΑΓΩΓΕΙΣ ΣΗΜΑΤΟΣ.....	63
1.3.2 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΩΣ ΣΤΟΧΟΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ.....	65
1.3.3 ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΘΕΣΗ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ.....	67
1.3.4 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ErbB.....	69
1.4 EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor): Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΟΥ ΑΥΧΗΤΙΚΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ.....	70
1.4.1 Η ΟΡΘΟΛΟΓΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ EGFR.....	72
1.4.2 ΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΕΞΕΛΕΓΚΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ EGFR.....	73
1.4.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ ΤΟΥ EGFR ΓΟΝΙΔΙΟΥ, ΑΠΟ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΙΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΣΤΟ ΙΝΤΡΟΝΙΟ 1.....	75
1.4.4 ΜΙΚΡΟΜΟΡΙΑΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ (TKIS) ΤΟΥ EGFR.....	77
1.4.5 ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΣΤΟ EGFR ΠΡΟΚΑΛΕΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ TKIs.....	80
1.5 C-KIT/CD117 (Stem Cell Factor Receptor): Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΟΥ ΑΡΧΕΓΟΝΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ	81
1.5.1 ΤΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ C-KIT.....	83
1.5.2 Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ C-KIT.....	87
1.5.3 ΜΙΚΡΟΜΟΡΙΑΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ C-KIT.....	92
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ.....	95
2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	97
2.1.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ.....	97
2.1.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	99
α. Εξοπλισμός.....	99
β. Διαλύματα.....	100



γ. Απομόνωση DNA.....	101
γ.1) Απομόνωση γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα.....	102
γ.2) Απομόνωση γενωμικού DNA από ιστικό βιοπτικό υλικό παραφίνης...	103
γ.3) Απομόνωση-καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	105
δ. Μέθοδος αλυσωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....	106
δ.1) Ανάπτυξη της τεχνικής PCR.....	106
δ.2) Θερμικοί κύκλοι.....	107
δ.3) DNA πολυμεράση.....	108
δ.4) Συστατικά του μίγματος αντιδρώντων και συνθήκες αντίδρασης.....	108
δ.5) Προφυλάξεις κατά την παρασκευή του μίγματος αντιδρώντων της PCR.....	109
ε) Ηλεκτροφόρηση DNA.....	112
ε.1) Παρασκευή πηκτής αγαρόζης.....	113
2.2 Η ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ.....	115
2.2.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ.....	116
α) Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονής αλυσίδας Single strand conformation polymorphism analysis (SSCP).....	118
α.1) Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE).....	120
α.2) Προετοιμασία των δειγμάτων για SSCP ανάλυση.....	121
α.3) Προετοιμασία της συσκευής κάθετης ηλεκτροφόρησης.....	121
α.4) Προετοιμασία του διαλύματος για το πήγμα πολυακρυλαμιδίου.....	121
α.5) Ηλεκτροφόρηση πήγματος πολυακρυλαμιδίου (PAGE).....	122
α.6) Εμφάνιση των δειγμάτων με χρώση αργύρου (Silver staining).....	123
β) Αλληλούχιση του DNA.....	126
2.3 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ.....	129
α) Ιστοική επεξεργασία.....	129
β) Επανάκτηση αντιγόνων.....	130
 ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	135
 3.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ ΑΥΣΗΤΙΚΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (EGFR) ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΤΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΠΕ.....	137
3.1.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ EGFR.....	137



3.1.2 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ EGFR.....	145
3.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (C-KIT/CD117) ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΤΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΠΕ.....	147
3.2.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ C-KIT.....	147
3.2.2 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ C-KIT.....	149
3.3 ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	152
ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	155
ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ.....	173
Περίληψη.....	175
Summary.....	181
ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ-ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	187
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	191



ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

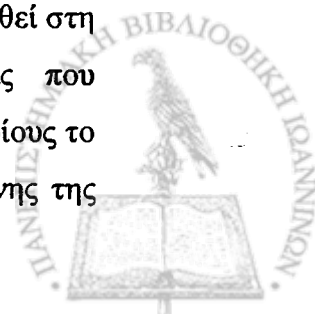
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΑΓΝΩΣΤΗΣ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΕΣΤΙΑΣ (ΚΑΠΕ)

Στην γενική ογκολογική πρακτική, το μεταστατικό καρκίνωμα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας, αφορά κατά προσέγγιση το 3-5% των ασθενών με συμπαγείς όγκους [1-3]. Οι συγκεκριμένοι ασθενείς προσδιορίζονται με το διαγνωστικό όρο ως Μεταστατικό Καρκίνωμα Άγνωστης Πρωτοπαθούς Εστίας (ΚΑΠΕ). Το ΚΑΠΕ αντιπροσωπεύει μια ετερογενή ομάδα μεταστατικών όγκων για τους οποίους η πρωτοπαθής εστία της νεοπλασίας δεν μπορεί να εντοπισθεί παρά το λεπτομερές ιατρικό ιστορικό, την ενδελεχή κλινική εξέταση και την εκτενή κλινικοεργαστηριακή διαγνωστική προσέγγιση. Η πρωτοπαθής εστία μπορεί είτε να έχει βραδύ ρυθμό αύξησης είτε να έχει υποστρέψει, με αποτέλεσμα σπάνια να γίνεται αντιληπτή κατά τη διάρκεια της κλινικής παρακολούθησης [4-5].

Στην ογκολογία απαντώνται διάφοροι όροι ως συνώνυμα του ΚΑΠΕ όπως: ο άγνωστος πρωτοπαθής όγκος, το καρκίνωμα ή το αδenoκαρκίνωμα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας, οι μεταστάσεις άγνωστης προέλευσης, οι μεταστάσεις από τους άγνωστους πρωτοπαθείς όγκους και ο όγκος άγνωστης ή μη καθορισμένης προέλευσης. Τα τελευταία χρόνια, ο όρος ο οποίος έχει ευρέως αποδεχθεί και καθιερωθεί είναι ο «Καρκίνος Άγνωστης Πρωτοπαθούς Εστίας» με τη διεθνή ονομασία “Cancer of Unknown Primary”. Ιστορικά, ο ορισμός του ΚΑΠΕ εξελισσόταν με την πάροδο των ετών σύμφωνα με την εισαγωγή νέων κριτηρίων ταυτοποίησης και την εξέλιξη των διαγνωστικών εργαλείων.

Στις αρχές της δεκαετίας του 1970, ορισμένοι ερευνητές υποστήριζαν ότι η διάγνωση του ΚΑΠΕ θα μπορούσε να δοθεί μόνο εάν ο αρχικός όγκος δεν βρεθεί στη νεκροψία [6]. Σήμερα, η διάγνωση ΚΑΠΕ αποδίδεται σε ασθενείς που παρουσιάζονται με ιστολογικά επιβεβαιωμένο μεταστατικό καρκίνο στους οποίους το λεπτομερές ιατρικό ιστορικό, η πλήρης φυσική εξέταση συμπεριλαμβανόμενης της



πυελικής και πρωκτικής εξέτασης, η γενική εξέταση αίματος, οι βιοχημικές εξετάσεις ρουτίνας, η γενική εξέταση ούρων, η εξέταση κοπράνων για λανθάνουσα αιμορραγία, η ανοσοϊστοχημική ιστοπαθολογική επανεξέταση βιοπτικού υλικού, η ακτινογραφία θώρακος, η υπολογιστική τομογραφία (ΥΤ) της κοιλίας και της πυέλου και σε ορισμένες περιπτώσεις η μαστογραφία, αποτυγχάνει να προσδιορίσει την αρχική εστία [7-8]. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1) απεικονίζεται ο διαγνωστικός αλγόριθμος που χρησιμοποιείται στην κλινική προσέγγιση ασθενών με ΚΑΠΕ.

Πίνακας 1: Σύνολο εργαστηριακών διαγνωστικών εξετάσεων απαιτούμενων για την ταυτοποίηση ασθενών με ΚΑΠΕ

Βασικές διαγνωστικές εξετάσεις	
Ιστοπαθολογία	Ανασκόπηση του βιοπτικού υλικού με χρήση ανοσοϊστοχημείας
Εργαστηριακές εξετάσεις	Γενική αίματος, βιοχημικός έλεγχος ρουτίνας, γενική ούρων και Mayer κοπράνων για ανακάλυψη λανθάνουσας αιμορραγίας
Απεικονιστικές εξετάσεις	Ακτινογραφία θώρακα, αξονική τομογραφία κοιλίας-πυέλου
Επιλεκτικές εξετάσεις	
Απεικονιστικές εξετάσεις	Αξονική τομογραφία κρανίου-τραχήλου για λεμφαδενική νόσο στον τράχηλο Μαστογραφία επί μεταστάσεων σε μασχαλιαίους λεμφαδένες
Ενδοσκοπήσεις	ΩΡΑ πανενδοσκόπηση, βρογχοσκόπηση, ενδοσκόπηση ανώτερου και κατώτερου πεπτικού, επί κλινικών ενδείξεων
Ειδικές εξετάσεις	
PET scan	Στην υποομάδα των μεταστάσεων κεφαλής-τραχήλου
Ηλεκτρονική μικροσκόπηση	Στη διαφορική διάγνωση νευροενδοκρινικών όγκων χαμηλής διαφοροποίησης



Παρά τις πρόσφατες προόδους τόσο στη μοριακή ανοσοϊστοχημεία όσο και στις απεικονιστικές τεχνικές, η αντιμετώπιση αυτών των ασθενών παραμένει ένα πραγματικό δίλημμα για τους κλινικούς ογκολόγους. Παρά το γεγονός ότι η πλειονότητα των ασθενών με ΚΑΠΕ είναι σχετικά ανθεκτικοί στη συστηματική θεραπεία και έχουν βραχεία επιβίωση, ορισμένες κλινικοπαθολογικές υποομάδες που καθορίζονται είτε από κλινικά είτε από ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα, έχει διαπιστωθεί ότι ανταποκρίνονται στη θεραπεία και εμφανίζουν μια σχετικά καλύτερη πρόγνωση.

1.1.1 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Τα καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας ταξινομούνται σε τέσσερις κύριες υποομάδες, σύμφωνα με τα μορφολογικά ιστολογικά χαρακτηριστικά με χρώσεις ρουτίνας: (α) αδenoκαρκινώματα καλής ή μέτριας διαφοροποίησης, (β) χαμηλής διαφοροποίησης αδenoκαρκινώματα, (γ) καρκινώματα πλακώδους επιθηλίου, (δ) αδιαφοροποίητα νεοπλάσματα.

Περίπου οι μισοί (50%) από τους ασθενείς θα διαγνωσθούν με μεταστατικό αδenoκαρκίνωμα, 30% με αδιαφοροποίητα ή χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα, 15% με καρκινώματα εκ πλακωδών κυττάρων, ενώ το υπόλοιπο 5% θα έχει κάποιο αδιαφοροποίητο νεόπλασμα. Με τις σύγχρονες τεχνικές της ανοσοϊστοχημείας οι περισσότεροι όγκοι που ανήκουν στα αδιαφοροποίητα νεοπλάσματα μπορούν πλέον να χαρακτηρισθούν καλύτερα, συμπεριλαμβάνοντας χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα, νευροενδοκρινικούς όγκους, λεμφώματα, όγκους από γεννητικά κύτταρα, μελάνωματα, σαρκώματα και εμβρυϊκούς όγκους.

Στην παιδική ηλικία, οι εμβρυϊκές κακοήθειες αποτελούν την πλειονότητα σπανίων περιπτώσεων εκτεταμένων κακοηθειών χωρίς ταυτοποιημένη πρωτοπαθή εστία. Στον πίνακα 2 απεικονίζονται οι συχνότεροι ιστολογικοί τύποι του ΚΑΠΕ, ενώ τα κλινικά χαρακτηριστικά των κύριων ιστοπαθολογικών τύπων του ΚΑΠΕ απεικονίζονται στον πίνακα 3.



Πίνακας 2: Ιστοπαθολογική ταξινόμηση του ΚΑΠΕ

Ιστολογικός τύπος	Ποσοστό (%)
Αδενοκαρκίνωμα υψηλής και μέσης διαφοροποίησης	50
Χαμηλής διαφοροποίησης ή αδιαφοροποίητο	30
Πλακώδη καρκινώματα	15
Αδιαφοροποίητα νεοπλάσματα	5



Πίνακας 3: Κλινικά χαρακτηριστικά ιστολογικών τύπων ΚΑΠΕ

Διάμεση ηλικία (εύρος)	Κύριες μεταστατικές εντοπίσεις	Ειδικά κλινικά χαρακτηριστικά	Κύρια θεραπεία/αποτελεσματικότητα	Σετής σχετική επιβίωση (%)
Αδενοκαρκίνωμα (καλής-μέσης διαφοροποίησης)	58 Ήπαρ, πνεύμονες οστά Μασχαλιαίοι λεμφαδένες Περιτόναιο	Ο πιο συχνός τύπος ενηλίκων, πτωχή πρόγνωση Γυναίκες, σχετικά καλής πρόγνωσης Γυναίκες, σχετικά καλής πρόγνωσης	Χημειοθεραπεία/ Ανακουφιστική Τοπική-περιοχική/ Δραστική Χημειοθεραπεία συνδυασμού πλατίνης/ Δραστική	4 60 12
Πτωχής διαφοροποίησης καρκίνωμα	37 (17-70) Λεμφαδένες μέσης κατανομής, πνεύμονας	Ταχεία αύξηση του όγκου Ευνοϊκή ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία	Χημειοθεραπεία συνδυασμού πλατίνης ± ταξανών/ Δραστική	13-16
Επιδερμοειδές καρκίνωμα	60 Τραχηλικοί λεμφαδένες	Αναλογία ανδρών/γυναικών 6:1	Τοπική περιοχική θεραπεία ή χημειοθεραπεία συνδυασμού πλατίνης/ Δραστική	30
Εμβρυϊκά καρκινώματα	8 (1-17) Μυελός οστών, οστικά, λεμφαδένες, Πνεύμων	Ο κατεχογίν τύπος της παιδικής ηλικίας	Χημειοθεραπεία συνδυασμού καρβοπλατίνης, αδριαμικίνης, ιωφωσφαμίδης/ Δραστική	17



1.1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ-ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ

Στοιχεία από επιδημιολογικές έρευνες και εκτεταμένες καταγραφές υποδεικνύουν ότι το ΚΑΠΕ αποτελεί το 2,3-4,2% όλων των ανθρώπινων κακοήθων νεοπλασιών. Στον πίνακα 4 απεικονίζεται η επιδημιολογία του ΚΑΠΕ ανά τον κόσμο.

Πίνακας 4: Επιδημιολογία του ΚΑΠΕ

Γεωγραφική περιοχή	Πηγή	Συχνότητα (%)	Χρονική περίοδος
ΗΠΑ	SEER	2.3	1973-1987
Αυστραλία	New South Wales Registry	4.2	1970-1990
Ολλανδία	Eindhoven Cancer Registry	4.0	1984-1992
Φιλανδία	IARC	2.5	--
Γερμανία	--	7.8	1968-1984
Ρωσία	--	3.6	--
Ελβετία	Τοπικές καταχωρήσεις	2.3	1984-1993
Ιαπωνία	IARC	3.0	--

Αναφορικά με τη γενική επίπτωση των συμπαγών όγκων στις Ηνωμένες Πολιτείες, το ΚΑΠΕ αντιπροσωπεύει περίπου 40.000 από τις 950.000 νέων περιπτώσεων καρκίνου ετησίως [9]. Η ετήσια επίπτωση υπολογίζεται σε 7-12 περιπτώσεις ανά πληθυσμό 100.000 κατοίκων ετησίως στις ΗΠΑ και 18-19 περιπτώσεις ανά πληθυσμό 100.000 κατοίκων ετησίως στην Αυστραλία [10,11]. Στην Ολλανδία, σχεδόν 2.500 νέοι ασθενείς διαγιγνώσκονται ετησίως με ποσοστό επίπτωσης 6.7 για πληθυσμό 100.000 ανδρών και 5.3 για πληθυσμό 100.000 γυναικών [12]. Επομένως το ΚΑΠΕ αντιπροσωπεύει το έβδομο με όγδοο συχνότερο είδος καρκίνου και την τέταρτη κατά σειρά πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο και στα δύο φύλα.



Η διάμεση ηλικία κατά την εμφάνιση είναι περίπου τα 60 έτη με οριακά υψηλότερη συχνότητα στους άνδρες. Σε αντίθεση με τα παραπάνω επιδημιολογικά στοιχεία, το ΚΑΠΕ στην παιδική ηλικία αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 1% των διαγνωσμένων συμπαγών κακοήθων όγκων [2, 10-14].

1.1.3 ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΠΕ

Φυσική Ιστορία

Το κλινικό σύνδρομο ΚΑΠΕ αντιπροσωπεύει μια μοναδική βιολογική οντότητα, η οποία χαρακτηρίζεται από την κλινική εκδήλωση μεταστάσεων πριν η αρχική εστία γίνει αρκετά μεγάλη ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευσή της. Η φυσική ιστορία αυτών των ασθενών διαφέρει αρκετά από εκείνη των ασθενών με γνωστούς πρωτοπαθείς όγκους. Η πρόιμη διασπορά, η κλινική απουσία πρωτοπαθούς εστίας, το απρόβλεπτο μεταστατικό δυναμικό και η επιθετικότητα, αποτελούν τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά αυτών των όγκων. Στον πίνακα 5 απεικονίζονται τα βασικά χαρακτηριστικά τα οποία προσδιορίζουν την ιδιόμορφη κλινική οντότητα των ΚΑΠΕ. Η πρόιμη διασπορά δικαιολογεί και την έλλειψη συμπτωμάτων που σχετίζονται με τον αρχικό όγκο.

Πίνακας 5 : ΚΑΠΕ: Βασικά κλινικά χαρακτηριστικά

- ✓ Πρόιμη διασπορά
- ✓ Κλινική απουσία της πρωτοπαθούς εστίας κατά τη διάγνωση
- ✓ Απρόβλεπτο πρότυπο μεταστατικής διασποράς
- ✓ Επιθετικότητα

Το απρόβλεπτο μεταστατικό δυναμικό αναφέρεται στις διαφορές εντόπισης μεταστατικών εστιών μεταξύ των γνωστών και των άγνωστων πρωτοπαθών όγκων. Χαρακτηριστικά, ο καρκίνος του πνεύμονα που εκδηλώνεται ως ΚΑΠΕ εμφανίζει οστικές μεταστάσεις σε ποσοστό 4%, ενώ όταν εκδηλώνεται με γνωστή πρωτοπαθή εστία, οι οστικές μεταστάσεις αγγίζουν το 30-50%. Ομοίως, ο καρκίνος του παγκρέατος που εκδηλώνεται ως ΚΑΠΕ, έχει τετραπλάσια συχνότητα εμφάνισης



οστικών μεταστάσεων, ενώ ο καρκίνος του προστάτη που εκδηλώνεται ως ΚΑΠΕ εμφανίζει πιο συχνά μεταστάσεις στο ήπαρ και στον πνεύμονα παρά στα οστά. Παρόμοια απρόβλεπτο μεταστατικό χαρακτήρα φαίνεται να έχουν και οι σπλαχνικές μεταστατικές εστίες [15].

Φαίνεται ότι αυτές οι νεοπλασίες της οικογένειας ΚΑΠΕ, δεν ακολουθούν την κλασσική τύπου 1 ανάπτυξη (από μια προκαρκινωματώδη κατάσταση στην κακοήθη), αλλά είναι κακοήθειες από την αρχή της νόσου (τύπου 2 ανάπτυξη). Ωστόσο, η κύρια διαφορά των ΚΑΠΕ, από άλλες τύπου 2 ανάπτυξης κακοήθειες, είναι ότι δεν σχηματίζουν μητρική εστία και δεν ακολουθούν κάποιο προβλέψιμο δυναμικό μεταστατικής εξάπλωσης [7].

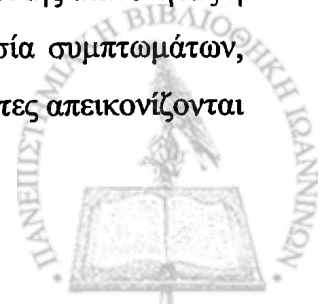
Περισσότερο από το 50% των ασθενών με ΚΑΠΕ εμφανίζουν πολλαπλές καρκινικές εστίες, ενώ στο υπόλοιπο ποσοστό ανευρίσκεται μοναδική εστία κυρίως στο ήπαρ, τα οστά, πνεύμονα και λεμφαδένες [16].

Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου, καθώς και τα ευρήματα σχετίζονται με τις εντοπίσεις και την έκταση της μεταστατικής νόσου. Σε περιπτώσεις γενικευμένης και πολυσυστηματικής νόσου από αδενοκαρκίνωμα, προεξάρχουν τα γενικά συμπτώματα (~80%) όπως καταβολή και απώλεια βάρους, ενώ συνήθη ευρήματα αποτελούν η διόγκωση των λεμφαδένων, η ηπατομεγαλία, ο ασκίτης και τα δερματικά οζία. Η καρκινωμάτωση περιτοναίου εκδηλώνεται με συμπτωματολογία ασκίτη, ενώ η ομάδα του επιδερμοειδούς καρκινώματος τραχηλικών λεμφαδένων συνήθως στερείται συστηματικών εκδηλώσεων [16].

1.1.4 ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η πρόγνωση των ασθενών με ΚΑΠΕ είναι πτωχή, με διάμεση επιβίωση 5 έως 10 μήνες [16,17]. Η επιβίωση διαφέρει στους διάφορους ιστολογικούς τύπους του «συνδρόμου», αλλά γενικά, στις περισσότερες μελέτες λιγότεροι από 25% και 10% των ασθενών αναφέρονται να επιβιώνουν ένα και πέντε χρόνια αντίστοιχα [18,19].

Σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες που έχουν αναγνωρισθεί στο ΚΑΠΕ είναι η ιστοπαθολογία, τα όργανα κυρίας μεταστατικής εντόπισης, το φορτίο της νόσου και η κατάσταση της φυσικής ικανότητας (η κατάσταση φυσικής ικανότητας ή performance status PS, διαβαθμίζεται κατά WHO από 0 = απουσία συμπτωμάτων, έως 4 = πλήρης κλινικοστατισμός). Οι κύριοι προγνωστικοί παράγοντες απεικονίζονται στον πίνακα 6.



Πίνακας 6: Προγνωστικοί παράγοντες στο ΚΑΠΕ

	Ευνοϊκοί παράγοντες	Δυσμενείς παράγοντες
Ιστοπαθολογία	Καρκίνωμα πτωχής διαφοροποίησης Επιδερμοειδές καρκίνωμα Νευροενδοκρινικό καρκίνωμα	Αδενοκαρκίνωμα
Όργανο κύριας μεταστατικής εντόπισης	Λεμφαδένες (εκτός υπερκλειδίων)	Ήπαρ, πνεύμονες οστά
Νεοπλασματική μάζα		≥3 εντοπίσεις
Φύλο	Θήλυ	Άρρεν
Κατάσταση φυσικής ικανότητας	0-1	>1

Σε μελέτη 657 ασθενών με ΚΑΠΕ [17] διαπιστώθηκε ότι η λεμφαδενική εντόπιση και η νευροενδοκρινική διαφοροποίηση συσχετίζονται με μακρύτερη επιβίωση, ενώ ο αυξανόμενος αριθμός οργάνων με μεταστατικές εστίες, οι ηπατικές μεταστάσεις και ο ιστολογικός τύπος του αδενοκαρκινώματος αποτελούν αρνητικούς προγνωστικούς παράγοντες.

Η προγνωστική σημασία του ιστολογικού τύπου των ΚΑΠΕ [19] μπορεί να αιτιολογηθεί ως εξής: τα αδιαφοροποίητα νεοπλάσματα και τα πτωχής διαφοροποίησης καρκινώματα παρουσιάζουν περισσότερο ευνοϊκή πρόγνωση, επειδή πιθανότατα αντιπροσωπεύουν χημειοευαίσθητους και δυνητικά ιάσιμους όγκους. Σε αντίθεση, τα καλώς και μετρίως διαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα έχουν πιο πτωχή πρόγνωση διότι αντιστοιχούν, σε μεγάλη αναλογία, σε νεοπλασίες του γαστρεντερικού.

Προγνωστικούς δείκτες επίσης αποτελούν η συνολική μάζα του νεοπλασματικού ιστού και η κατανομή της νόσου αμφοτερόπλευρα του διαφράγματος. Επιπλέον, η τοπογραφία της λεμφαδενικής μεταστατικής νόσου αποτελεί παράγοντα με διττή προγνωστική σημασία. Συγκεκριμένα, μεταστατική



νόσος επιδερμοειδούς καρκινώματος σε τραχηλικούς λεμφαδένες, αδenoκαρκινώματος σε μασχαλιαίους λεμφαδένες σε γυναίκες και λεμφαδενική νόσος από χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα, αποτελούν εκδηλώσεις μεταστατικής νόσου ευνοϊκής πρόγνωσης. Αντίθετα, υπερκλείδια λεμφαδενική εντόπιση αποτελεί αρνητικό προγνωστικό παράγοντα [17, 20, 21].

Έχει υποστηριχθεί ότι, εκτός τους κλασσικούς προγνωστικούς παράγοντες (εντοπίσεις, συνολική μάζα νεοπλασματικής νόσου κλπ), ενδέχεται, άλλοι παράγοντες συσχετιζόμενοι με τη βιολογία του όγκου, να είναι μείζονος σημασίας και να συσχετίζονται ενδεχομένως με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία [22,23].

1.1.5 ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΥΠΟ-ΟΜΑΔΕΣ ΤΟΥ ΚΑΠΕ

Ανάλογα με την περιοχή εντόπισης των μεταστάσεων διακρίνονται οι παρακάτω υπο-ομάδες του ΚΑΠΕ, όπως αναφέρονται στον πίνακα 7.

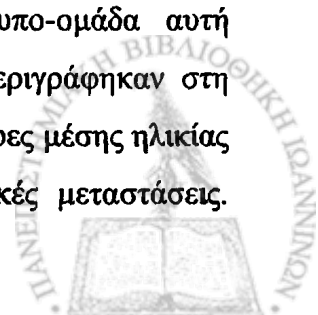
1.1.5.1 Κατεξοχήν ηπατική μεταστατική νόσος

Ασθενείς με κατεξοχήν ηπατική μεταστατική νόσο αποτελούν το 25% περίπου του συνόλου των διαγνώσεων με ΚΑΠΕ. Πιο συχνοί ιστολογικοί τύποι είναι τα αδenoκαρκινώματα. Η πρόγνωση αυτής της υπο-ομάδας είναι πολύ πτωχή με διάμεση επιβίωση 3-7 μήνες. Ασθενείς με νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης ηπατικές μεταστάσεις άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας έχουν καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και σχετικά μακρύτερη επιβίωση [16, 17, 24].

1.1.5.2 Μεταστατικό ΚΑΠΕ λεμφαδενικής εντόπισης

Λεμφαδενική νόσος μέσης γραμμής

Στην υπο-ομάδα αυτή των ασθενών, η νόσος εκδηλώνεται με μεταστάσεις σε λεμφαδένες κατανομής μέσης γραμμής (μεσοθωρακικοί-οπισθοπεριτοναϊκοί λεμφαδένες) και παραπέμπει σε εξωγοναδικούς όγκους. Η υπο-ομάδα αυτή αναφέρθηκε αρχικά το 1979 [25] και τα χαρακτηριστικά της περιγράφηκαν στη συνέχεια από τους Gresco και συν. [26]. Εμφανίζεται κυρίως σε άνδρες μέσης ηλικίας κάτω των 50 ετών με λεμφαδενικές εντοπίσεις ή/και πνευμονικές μεταστάσεις.



Ιστοπαθολογικά ταξινομούνται ως αδιαφοροποίητα καρκινώματα ή πτωχής διαφοροποίησης αδενοκαρκινώματα [16,26]. Οι όγκοι αυτοί, αν και είναι ταχέως εξελισσόμενοι, ανταποκρίνονται εντυπωσιακά στη χημειοθεραπεία και ικανό ποσοστό ασθενών (15%) κερδίζει μακροχρόνια επιβίωση. Από τον ορολογικό έλεγχο, η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροφίνη (β-HGC) ή η αλφα-εμβρυϊκή σφαιρίνη (AFP) είναι δυνατό να βρεθούν αυξημένες σε μερικούς ασθενείς. Λίγοι ασθενείς έχουν όλα τα στοιχεία αυτού του συνδρόμου.

Μεμονωμένη λεμφαδενική μετάσταση μασχάλης σε γυναίκες

Η υπο-ομάδα αυτή χαρακτηρίζει κυρίως γυναίκες διάμεσης ηλικίας 52 ετών. Αν και η κλινική συνδρομή ανάγει την διαφοροδιαγνωστική σκέψη σε καρκίνο του μαστού, σε μικρό ποσοστό των γυναικών αυτών (0,3%) διαγιγνώσκεται στη συνέχεια πρωτοπαθής καρκίνος του μαστού. Ιστολογικά πρόκειται συνήθως για αδενοκαρκίνωμα με θετικότητα σε υποδοχείς οιστρογόνων ή προγεστερόνης στο 20-30% των περιπτώσεων [27]. Η μαστογραφία και το υπερηχογράφημα του μαστού συστήνονται για τη διαγνωστική διερεύνηση αυτών των ασθενών ΚΑΠΕ αλλά αποτελούν απεικονιστικές μεθόδους με πτωχή ευαισθησία για τη συγκεκριμένη κατηγορία των ασθενών [28]. Η εξέταση μαγνητικού συντονισμού του μαστού (MRI) ενδεχόμενα πλεονεκτεί στη διαγνωστική ικανότητα προσδιορισμού της αρχικής εντόπισης σε μερικούς από αυτούς τους ασθενείς [28,29]. Οι ασθενείς αυτής της υπο-ομάδας αντιμετωπίζονται σύμφωνα με τις κατευθυντήριες θεραπευτικές οδηγίες για τον καρκίνο του μαστού σταδίου III με ικανοποιητικό ποσοστό επιβίωσης την 5-ετία [30]. Άνδρες ασθενείς της ίδιας ομάδας έχουν χειρότερη πρόγνωση [31].

Λεμφαδενικές μεταστάσεις τραχήλου

Λεμφαδενικές τραχηλικές μεταστάσεις από το κλινικά μη ανιχνεύσιμο αρχικό καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων αποτελούν το 1-2 % των κακοηθειών της περιοχής της κεφαλής-τραχήλου. Με την τοπικοπεριοχική θεραπεία, αυτοί οι ασθενείς, μπορούν να επιτύχουν μια ιδιαίτερα μακρά επιβίωση [32]. Οι ασθενείς με υπερκλειδία λεμφαδενοπάθεια ιστολογικά έχουν είτε πλακώδη είτε αδιαφοροποίητα καρκινώματα και παρουσιάζουν χειρότερη πρόγνωση. Η τομογραφία εκπομπής



ποζιτρονίων (PET), είναι χρήσιμη λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας της για τον εντοπισμό ενός αρχικού όγκου στην περιοχή της κεφαλής-τραχήλου [5, 33].

Μεμονωμένη βουβωνική λεμφαδενική εντόπιση

Ασθενείς με μεμονωμένη βουβωνική λεμφαδενική εντόπιση, αποτελούν μια λιγότερο συχνή υποομάδα, με πιο κοινό ιστολογικό τύπο αυτό του αδιαφοροποίητου καρκινώματος. Επίσης μπορούν να διαγνωσθούν πλακώδη καρκινώματα ή μικτοί αδενοπλακώδη καρκινώματα. Η κλινική εξέταση της ορθοπρωκτικής περιοχής, λεπτομερής γυναικολογική εξέταση και πιθανώς κυστεοσκόπηση είναι απαραίτητες διαγνωστικές εξετάσεις για αυτούς τους ασθενείς. Τα λεμφώματα και τα μεταστατικά ή αμελανωτικά μελανώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας πρέπει επίσης να αποκλεισθούν [34,35].

1.1.5.3 Το μεταστατικό ΚΑΠΕ περιτοναϊκής κοιλότητας

Συνήθως πρόκειται για γυναίκες ασθενείς με διάμεση ηλικία τα 60 έτη, οι οποίες παρουσιάζονται με ασκίτη και περιτοναϊκές μάζες, χωρίς να διαπιστώνεται πρωτοπαθής όγκος στις ωθήκες. Αυτό το σύνδρομο έχει ονομασθεί επίσης «πολυεστιακό εξωωθηκικό καρκίνωμα ή περιτοναϊκό ορώδες θηλώδες καρκίνωμα». Σήμερα πλέον αναγνωρίζεται ως ξεχωριστή κλινικοπαθολογοανατομική οντότητα και ονομάζεται πρωτοπαθές αδenoκαρκίνωμα περιτοναίου [36].

Η διάγνωση απαιτεί ερευνητική λαπαροτομία ή λαπαροσκόπηση. Οι βιοψίες από τις περιτοναϊκές εμφυτεύσεις ταξινομούνται ιστολογικά ως ορώδες θηλώδες αδenoκαρκίνωμα, με ή χωρίς ψαμμώδη σωμάτια. Τα επίπεδα του αντιγόνου Ca 125 στον ορό είναι συνήθως αυξημένα. Τα ποσοστά απάντησης στη χημειοθεραπεία και η επιβίωση είναι παρόμοια με αυτά του καρκίνου ωθηκών σταδίου III κατά FIGO. Στη διαφορική διάγνωση περιλαμβάνονται το μεσοθηλίωμα του περιτοναίου, το ψευδομύξωμα του περιτοναίου και ο κακοήθης ασκίτης που αναπτύσσεται από όγκους του γαστρεντερικού σωλήνα ή άλλων οργάνων [37,38].



Μη ορώδες θηλώδες αδενοκαρκίνωμα περιτοναίου

Μερικοί ασθενείς διαγιγνώσκονται με μη ορώδεις-θηλώδεις όγκους κοιλίας και μπορεί να απαντηθούν και στα δυο φύλα. Στις περιπτώσεις που πρόκειται για βλεννοπαραγωγό αδενοκαρκίνωμα με παρουσία κυττάρων δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου, πρέπει να διερευνάται η πιθανότητα προέλευσης από το γαστρεντερικό σύστημα. Οι όγκοι σε αυτούς τους ασθενείς δεν ανταποκρίνονται στη χημειοθεραπεία όπως τα ορώδη θηλώδη αδενοκαρκινώματα του περιτοναίου και η πρόγνωση είναι πολύ πτωχή [39].

1.1.5.4 Μεταστατικό ΚΑΠΕ στους πνεύμονες

Παρεγχυματικές πνευμονικές μεταστάσεις

Οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζονται με πολλαπλές αμφοτερόπλευρες πνευμονικές μεταστάσεις και την ιστολογική διάγνωση του αδενοκαρκινώματος οποιουδήποτε βαθμού διαφοροποίησης. Η πρόγνωση είναι πτωχή για τους περισσότερους ασθενείς. Οι νέοι άνδρες ασθενείς με πιθανό εξωγοναδικό όγκο πρέπει να αποκλειστούν προσεκτικά από αυτήν την ομάδα ασθενών [16,17]

Μεμονωμένη κακοήθης πλευριτική συλλογή

Σε μικρή ομάδα ασθενών μπορεί η κακοήθης πλευριτική συλλογή να αποτελεί τη μόνη διαπιστούμενη μεταστατική εστία. Το αδενοκαρκίνωμα είναι ο κύριος ιστολογικός τύπος, ενώ οι πρωτοπαθείς εστίες από τον πνεύμονα, το μαστό ή την ωθήκη πρέπει να αποκλειστούν. Το μεσοθηλίωμα πρέπει επίσης να συμπεριληφθεί στη διαφορική διάγνωση. Η πρόγνωση και αυτού του υποσυνόλου είναι επίσης πτωχή [16,17]

1.1.5.5 Μεταστατικό ΚΑΠΕ οστών

Μικρό ποσοστό ασθενών με ΚΑΠΕ προσέρχονται με συμπτώματα από τις οστικές μεταστάσεις οι οποίες είναι συνήθως πολλαπλές. Το αδενοκαρκίνωμα είναι η συχνότερη ιστολογική διάγνωση. Ο καρκίνος του προστάτη και ο καρκίνος του



μαστού πρέπει να αποκλεισθούν σε άνδρες και γυναίκες ασθενείς αντίστοιχα [16,40,41].

1.1.5.6 Το μεταστατικό ΚΑΠΕ Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ)

Στο 15% του συνόλου των ασθενών που παρουσιάζονται με μεταστάσεις στο ΚΝΣ δεν θα προσδιορισθεί σαφής πρωτοπαθής εντόπιση παρά την ενδελεχή έρευνα. Στους ασθενείς αυτούς η νευρολογική σημειολογία προεξάρχει των συμπτωμάτων. Ιστολογικά κυριαρχούν τα μεταστατικά αδenoκαρκινώματα και τα πλακώδη καρκινώματα. Οι ασθενείς με μονήρη μεταστατική εστία έχουν καλύτερη επιβίωση εφόσον αυτή είναι δυνητικά χειρουργικά εξαιρέσιμη [42-45]

1.1.5.7 Τα μεταστατικά καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας με νευροενδοκρινικούς χαρακτήρες

Τα μεταστατικά καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας με νευροενδοκρινικούς χαρακτήρες αντιπροσωπεύουν ένα ευρύ φάσμα νεοπλασιών. Τρεις διαφορετικές κλινικοπαθολογοανατομικές υποομάδες νευροενδοκρινών όγκων έχουν περιγραφεί. Η πρώτη υποομάδα περιλαμβάνει τα χαμηλής κακοήθειας νευροενδοκρινικά καρκινώματα (π.χ μεταστατικά καλής διαφοροποίησης καρκινώματα) που προσβάλλουν συνήθως το ήπαρ και μερικές φορές συνδέονται με συμπτώματα από την έκκριση των αγγειοδραστικών πεπτιδίων. Η δεύτερη υποομάδα περιλαμβάνει το αναπλαστικό καρκίνωμα από μικρού μεγέθους κύτταρα, με μια ιστολογική εμφάνιση και μια κλινική συμπεριφορά που είναι παρόμοια με το μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα ή το εξωπνευμονικό μικροκυτταρικό καρκίνωμα. Η τρίτη υποομάδα αντιπροσωπεύει τα χαμηλής διαφοροποίησης αδenoκαρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας με νευροενδοκρινείς χαρακτήρες που ανοσοϊστοχημικά προσδιορίζεται από την έκφραση χρωμογρανίνης, συναπτοφυσίνης και άλλων νευροενδοκρινικών δεικτών. Μερικοί από αυτούς τους ασθενείς μπορούν να παρουσιάζουν κλινική εικόνα που προσομοιάζει με εκείνη του εξωγοναδικού συνδρόμου [46,47].



1.1.5.8 Κακοήθες μεταστατικό μελάνωμα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας

Η διάγνωση του μεταστατικού μελανώματος άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας, υπολογίζεται ότι αντιπροσωπεύει το 2-6% των περιπτώσεων μελανώματος. Το 10-15% από αυτές τις περιπτώσεις είναι αμελανωτικά μελανώματα [48]. Παρά την έκφραση διαφορετικών απόψεων στη βιβλιογραφία φαίνεται ότι η κλινική πορεία των ασθενών με μελάνωμα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας είναι παρόμοια με αυτή των ασθενών με το πρωτοπαθές μελάνωμα δέρματος, όταν συγκρίνονται για το ίδιο κλινικό στάδιο της νόσου [49,50].

Πίνακας 7: Υπο-ομάδες ΚΑΠΕ

Περιοχή εντόπισης	Ιστολογικός τύπος
Κατεξοχήν ηπατικές μεταστάσεις ή/και μεταστάσεις σε άλλα όργανα	Αδενοκαρκίνωμα
Λεμφαδένες Λεμφαδενική νόσος μέσης κατανομής (μεσοθωρακικοί-οπισθοπεριτοναϊκοί λεμφαδένες)	Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα ή χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα
Μασχαλιαίοι	Αδενοκαρκίνωμα μέτριας ή χαμηλής διαφοροποίησης
Τραχηλικοί	Πλακώδες καρκίνωμα
Βουβωνικοί	Αδιαφοροποίητο ή πλακώδες καρκίνωμα
Περιτοναϊκή κοιλότητα Αδενοκαρκινωμάτωση περιτοναίου	Ορώδες θηλώδες αδενοκαρκίνωμα
Κακοήθης ασκίτης	Βλενοπαραγωγό αδενοκαρκίνωμα με ή χωρίς την παρουσία κυττάρων δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου
Πνεύμονες Πνευμονικές μεταστάσεις	Αδενοκαρκίνωμα
Πλευριτική συλλογή	Αδενοκαρκίνωμα
Οστά	Αδενοκαρκίνωμα
Εγκεφαλικές μεταστάσεις	Αδενοκαρκίνωμα ή πλακώδες καρκίνωμα
Νευροενδοκρινικοί όγκοι	Χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα με στοιχεία νευροενδοκρινικής προέλευσης
Κακοήθες μελάνωμα	Αδιαφοροποίητο νεόπλασμα με μελανωματικά χαρακτηριστικά

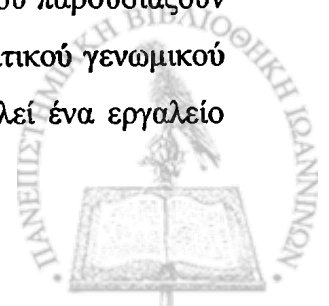


1.1.6 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΚΑΠΕ

Παρά την ιστολογική τους ετερογένεια οι όγκοι αυτοί εκδηλώνουν παρόμοια επιθετική βιολογική και κλινική συμπεριφορά. Αυτό το ασυνήθιστο μοντέλο ανάπτυξης υποδηλώνει ότι το ΚΑΠΕ αναπτύσσεται ακολουθώντας μια μοναδική αλληλουχία μοριακών και βιοχημικών γεγονότων. Μέχρι σήμερα, οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της νόσου, δεν έχουν διαλευκανθεί και οι περιορισμένες πληροφορίες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία είναι αντιφατικές και ατελέσφορες.

Η πλειονότητα διαφόρων ερευνών που στοχεύουν στην διασαφήνιση της βιολογίας που διέπει τα ΚΑΠΕ, έχει επικεντρωθεί: α) στη μελέτη των χρωμοσωμικών ανωμαλιών, β) της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης διαφόρων πρωτεϊνών και γ) την ταυτοποίηση πιθανών μεταλλαγών σε ένα ή σε μικρή ομάδα συσχετιζόμενων μεταξύ τους γονιδίων. Οι ερευνητικές αυτές προσπάθειες, ενθαρρύνονται από την πεποίθηση ότι η απορρύθμιση ενός ή κάποιων γονιδίων καθώς και των κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών τους, μπορεί να οδηγήσει στη συστηματική διασπορά και την υποτροπή της αρχικής εστίας. Οι παραπάνω υποθέσεις δεν έχουν επιβεβαιωθεί, καθώς οι μέχρι τώρα έρευνες δεν ανέδειξαν ειδικές γονιδιακές/πρωτεϊνικές ανωμαλίες ικανές να προκαλούν ανάπτυξη και επιβίωση μεταστατικών κακοήθων κλώνων.

Ανευπλοειδία παρατηρείται σε ένα ποσοστό της τάξης του 70-90% στους συμπαγείς όγκους, αντικατοπτρίζοντας διαταράξεις στην αντιγραφή των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης [51]. Σε 12 από 13 μελετηθέντες ασθενείς με ΚΑΠΕ ανευρέθηκαν ανωμαλίες στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 1 (1p), εύρημα το οποίο είναι συνακόλουθο με το κοινό χαρακτηριστικό των 1p δομικών ανωμαλιών που παρατηρούνται στους συμπαγείς όγκους [52]. Καθώς η παρουσία ενός επιπλέον αντιγράφου στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 12 χαρακτηρίζει ειδικά τους όγκους γεννητικών κυττάρων, ο Motzer ανέλυσε 40 ασθενείς με ΚΑΠΕ και βρήκε ανωμαλίες στο χρωμόσωμα σε 12 ασθενείς [53]. Η παρουσία ισοχρωμοσώματος i(12p) προβλέπει την απάντηση σε χημειοθεραπεία βασισμένη σε πλατίνα και έτσι μπορεί να θεωρηθεί ως ειδικός δείκτης για καρκίνο γεννητικών κυττάρων σε ασθενείς με ΚΑΠΕ που παρουσιάζουν λεμφαδενικές μεταστάσεις μέσης κατανομής. Η τεχνική του συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (comparative genomic hybridization), πιθανά να αποτελεί ένα εργαλείο



αυξημένης ευαισθησίας σε σχέση με την καρυοτυπική ανάλυση για την σύνδεση με ακρίβεια των ΚΑΠΕ με διάφορες κατηγορίες πρωτοπαθών όγκων [54].

Σε πολλούς συμπαγείς όγκους βρίσκονται ογκογονίδια που είτε είναι ενισχυμένα, είτε υπερεκφράζονται. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται ευνοούν τον κακοήθη μετασχηματισμό και την επιβίωση, καθώς ενεργοποιούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επάγουν την κυτταρική μετανάστευση, αναστέλλουν την απόπτωση και επάγουν την νέο-αγγειογένεση. Στην ανοσοϊστοχημική μελέτη των Pavlidis και συν. που αφορούσε την έκφραση των πρωτεϊνών c-myc, Ras, HER2 σε 26 ασθενείς με ΚΑΠΕ, παρατηρήθηκε σχεδόν ολοκληρωτική έκφραση για τις δύο πρώτες πρωτεΐνες (96%, 92% και 65% αντίστοιχα), ενώ υπερέκφραση σε αναλογία μικρότερη του ενός τρίτου για το σύνολο των μελετηθέντων πρωτεϊνών [55].

Οι Hainsworth και συν. μελέτησαν 100 ασθενείς με ΚΑΠΕ και ομοίως παρατήρησαν υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER2 στο 11% των δειγμάτων, χωρίς να υπάρχουν διαφορές στην συνολική επιβίωση μεταξύ των ασθενών που είτε υπερέκφραζαν είτε όχι την HER2 πρωτεΐνη [56]. Οι Fizazi και συν. βρήκαν ανοσοϊστοχημική υπερέκφραση του HER2 σε μόνον 2 από τους 56 μελετηθέντες ασθενείς με ΚΑΠΕ (4%), ενώ επίσης δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της έκφρασης του HER2 με την ιστολογική διαφοροποίηση, τη θεραπεία και την κλινική έκβαση [57]. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης των Pavlidis και συν. οι Rashid και συν. μελέτησαν την ανοσοϊστοχημική έκφραση του HER2 σε 76 ασθενείς με ΚΑΠΕ και βρήκαν συνολική έκφραση του HER2 σε ποσοστό 68%, ενώ το ποσοστό υπερέκφρασης ήταν 24% [58].

Επιπλέον, οι Van de Wouw και συν. παρατήρησαν ανοσοϊστοχημική υπερέκφραση της HER2 πρωτεΐνης σε 16/45 ασθενείς με ΚΑΠΕ (35%) [36]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι παρατηρήθηκε συνέκφραση του HER2 με το EGFR και το VEGF ή το COX2 σε περισσότερους από τους μισούς όγκους, ενώ ασθενείς που έφεραν θετικούς όγκους για EGFR, HER2 και COX2, εμφάνιζαν διπλάσια διάρκεια επιβίωσης σε σχέση με τους υπόλοιπους. Σε γενικές γραμμές, οι παραπάνω μελέτες συμφωνούν με την εικόνα υπερέκφρασης των ογκοπρωτεϊνών c-myc, Ras και HER2 στο ένα τρίτο με ένα τέταρτο των ασθενών με ΚΑΠΕ και δημιουργούν αισιοδοξία για την χρήση των πρωτεϊνών Ras/HER2 ως δείκτες ταξινόμησης των ασθενών, σε κατηγορίες αυξημένης ή μειωμένης ωφέλειας από την στοχευμένη θεραπεία των συγκεκριμένων μορίων.



Προσφάτως, ο υποδοχέας του αυξητικού επιδερμικού παράγοντα (EGFR) τέθηκε υπό διερεύνηση καθώς υπήρχαν αυξημένα στοιχεία για το ρόλο του στον κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων. Οι Fizzazi και συν. μελέτησαν την ανοσοϊστοχημική έκφραση του EGFR σε 56 ασθενείς με ΚΑΠΕ και βρέθηκε υπερέκφραση σε 2 ασθενείς (4%), ενώ στη μελέτη των Rashid και συν βρέθηκε υπερέκφραση σε 46 από 76 δείγματα ΚΑΠΕ (61%) [57,58]. Ωστόσο και οι δύο ερευνητικές ομάδες απέτυχαν να συσχετίσουν την πρωτεϊνική έκφραση του EGFR με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, απάντηση στη χημειοθεραπεία και με την επιβίωση των ασθενών.

Οι ίδιες ομάδες μελέτησαν την ανοσοϊστοχημική έκφραση του διαμεμβρανικού υποδοχέα C-KIT. Στην μελέτη των Fizzazi και συν. βρέθηκε υπερέκφραση του C-KIT σε 6 από 56 δείγματα ΚΑΠΕ (11%), ενώ οι Rashid και συν. μελετώντας 76 ασθενείς βρήκαν υπερέκφραση σε 3 (4%) [57,58]. Και στις δύο μελέτες η πρωτεϊνική έκφραση του C-KIT δεν κατάφερε να επιδείξει προγνωστική χρησιμότητα όσο αφορά την απάντηση στη θεραπεία και την επιβίωση.

Διάφορες μελέτες προσπάθησαν να συσχετίσουν την επιθετικότητα του ΚΑΠΕ με την έκφραση του p53, αλλά τα αποτελέσματά τους ήταν αντιφατικά. Η μελέτη των Bar-Eli και συν. έδειξε ότι αν και υπήρχαν ενδείξεις υψηλής μεταλλακτικότητας για το γονίδιο p53 μιας και το ΚΑΠΕ αποτελεί έναν ιδιαίτερα επιθετικό τύπο καρκίνου, η συχνότητα των μεταλλάξεων που ανευρέθησαν στις περιπτώσεις που μελετήθηκαν ήταν μόλις 26%. Οι Bar-Eli και συν. υπέθεσαν τότε ότι οι μεταλλάξεις στο p53 γονίδιο ίσως δεν παίζουν τόσο σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του ΚΑΠΕ [59]. Εν αντιθέσει, σε μελέτη των Briasoulis και συν. παρατηρήθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53 σε ποσοστό 53% [60]. Η ασυμφωνία που παρατηρείται μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής μελέτης και της ανάλυσης μεταλλάξεων για το γονίδιο p53, πιθανών να οφείλεται στις διαφορές των ειδικών αντισωμάτων για το φυσικού τύπου και μεταλλαγμένου p53 γονιδιακού προϊόντος, στην ύπαρξη μεταλλάξεων εκτός της μελετώμενης περιοχής (εξόνια 5-9) και στην διαφορετική επιρροή των ρυθμιστικών παραγόντων του p53, όπως είναι ο MDM2, P14ARF και ο p21[3,61].

Στην ίδια μελέτη των Briasoulis και συν, η υπερέκφραση του Bcl-2 γονιδίου ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 40% σε 47 περιπτώσεις ασθενών με ΚΑΠΕ. Ωστόσο, καμία από τις παραπάνω ογκοπρωτεΐνες δεν συσχετίστηκε με οποιαδήποτε κλινικοπαθολογοανατομική παράμετρο [61].

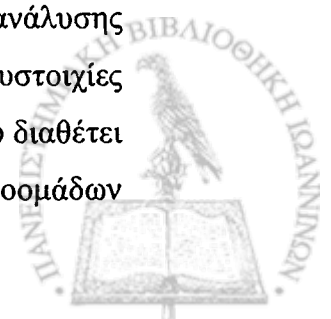


Παράλληλα οι Hifen και συν. μελέτησαν την αγγειογένεση σε 54 ασθενείς με ΚΑΠΕ. Στη συγκεκριμένη μελέτη βρέθηκε ότι η μικροαγγειακή πυκνότητα, όπως αυτή εκτιμήθηκε με την έκφραση του CD-34 και ο αγγειακός ενδοθηλικός αυξητικός παράγοντας (VEGF vascular endothelial growth factor) ήταν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες στο μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα ήπατος άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας [62].

Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη των van de Wouw και συν. δεν βρέθηκε προγνωστική αξία της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του CD34 (δείκτης μικροαγγειακής πυκνότητας) ούτε του VEGF-A, που να αφορά την κλινική έκβση των ασθενών με ΚΑΠΕ [36]. Στην συγκεκριμένη μελέτη, ο VEGF βρέθηκε να υπερεκφράζεται σε 12 από 46 ασθενείς (26%). Παράλληλα, οι Karavasillis και συν. μελέτησαν την έκφραση του CD34, VEGF και της θρομβοσποντίνης-1 (TSP-1) σε βιοψτικό υλικό 81 ασθενών με ΚΑΠΕ [63]. Αν και παρατηρήθηκε ισχυρή έκφραση των VEGF και της TSP-1 σε ποσοστά 83% και 20% αντίστοιχα, δεν υπήρξε συσχετισμός με οποιαδήποτε κλινικοπαθολογική παράμετρο. Η μικροαγγειακή πυκνότητα των όγκων ασθενών που ανήκαν σε ομάδα μη ευνοϊκής πρόγνωσης ΚΑΠΕ, συγκρινόμενη με εκείνη των ασθενών που ανήκαν σε ομάδα ευνοϊκής πρόγνωσης, έδειξε συσχέτιση με την έκφραση του VEGF και την απουσία έκφρασης της TSP-1.

Η ίδια ερευνητική ομάδα μελέτησε σε 75 ασθενείς ΚΑΠΕ, την ανοσοϊστοχημική έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών του στρώματος (MMP) 2 και 9, καθώς κατέχουν ρόλο κλειδί για την εξωκυττάρια αποδόμηση του στρώματος, και βρήκε υπερέκφραση σε ποσοστά 49% και 36% αντίστοιχα [64]. Η έκφραση της MMP-2 συσχετίστηκε με την έκφραση της MMP-9, ενώ η ιστική έκφραση του αναστολέα τους TIMP-1, βρέθηκε υψηλότερη στην ομάδα ασθενών μη ευνοϊκής πρόγνωσης και συσχετίστηκε με μικρότερο χρόνο επιβίωσης.

Τα μεγάλα τεχνολογικά άλματα που έχουν συμβεί τα τελευταία 15 χρόνια, έδωσαν τη δυνατότητα στους ερευνητές να μεταβούν από την έρευνα της έκφρασης μοναδικών γονιδίων, στην ταυτόχρονη μελέτη της μεταγραφής χιλιάδων γονιδίων που συν-εκφράζονται σε έναν ιστό. Μικροσυστοιχίες συμπληρωματικού DNA (complementary DNA) ή ολιγονουκλεοτιδίων, πλατφόρμες σειριακής ανάλυσης γονδιακής έκφρασης (serial analysis of gene expression, SAGE) και μικροσυστοιχίες πρωτεϊνών που εκφράζονται στους ιστούς, είναι μερικά από ισχυρά όπλα που διαθέτει η σύγχρονη τεχνολογία απέναντι στην πρόκληση της εξερεύνησης των υποομάδων



ΚΑΠΕ, της ανίχνευσης βιοχημικών στόχων απαραίτητων για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων που θα άξιζαν αναστολής και της ταυτοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων που έχουν «σιωπήσει» και χρήζουν επιδιόρθωσης.

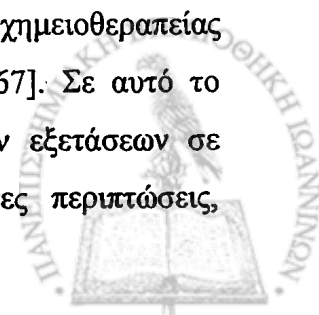
Αυτού του είδους οι τεχνολογίες υψηλής απόδοσης μαζί με μελέτες ορθολογικού σχεδιασμού, προσφέρουν τη δυνατότητα υπερνίκησης των σοβαρών εμποδίων που καταστούν αδύνατη μεχρι σήμερα, την επιτυχή ανάπτυξη στοχευμένης θεραπείας για τα ΚΑΠΕ. Τα προβλήματα που θα πρέπει να ξεπεραστούν είναι: α) η ανικανότητα ταυτοποίησης ενός βιολογικού στόχου που ευθύνεται για την ανάπτυξη της αύξησης των καρκινικών κυττάρων, β) η ανικανότητα ανάπτυξης ενός «έξυπνου» φαρμάκου που θα μπορούσε να αναστείλει τη δράση του, γ) η μη υψηλή ειδικότητα των φαρμάκων και δ) η αδυναμία της επιλογής των όγκων που θα εξαρτώνται από αυτό το μοριακό στόχο.

Από τα παραπάνω δεδομένα της βιβλιογραφίας, προκύπτει ότι είναι εξαιρετικά αναγκαία η εκτεταμένη μοριακή έρευνα πάνω στο ετερογενές σύνδρομο του ΚΑΠΕ, έτσι ώστε να προκύψουν τα κατάλληλα στοιχεία που θα προάγουν την γνώση για τους υποκείμενους μοριακούς μηχανισμούς που διέπουν τη συγκεκριμένη νόσο. Η εύρεση του γονιδιακού προφίλ έκφρασης χιλιάδων γονιδίων σε σχέση με έρευνες μεμονωμένων γονιδίων, αναμένεται να φωτίσει την σκοτεινή έως σήμερα παθοφυσιολογία των ΚΑΠΕ, να δώσει απαντήσεις όσο αφορά την πρωτοπαθή εστία και να παρέχει στοιχεία για αποτελεσματική στοχευμένη-βιολογική θεραπεία.

1.1.7 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Στην κλινική πρακτική, η διαγνωστική έρευνα σε περιπτώσεις ΚΑΠΕ εστιάζεται συνήθως στην αναζήτηση λανθάνουσας πρωτοπαθούς εστίας για την κατά το δυνατό πιο «εξειδικευμένη» θεραπευτική αντιμετώπιση. Έχει όμως αποδειχθεί ότι εκτεταμένος διαγνωστικός έλεγχος επιβαρύνει αναιτιολόγητα τον άρρωστο με ΚΑΠΕ αυξάνοντας το διαγνωστικό κόστος χωρίς ουσιαστικό διαγνωστικό ή θεραπευτικό όφελος [65,66].

Μια ορθολογική διαγνωστική προσέγγιση εστιάζει κατά κύριο λόγο στην αναζήτηση των διακριτών υποομάδων, στις οποίες η χορήγηση χημειοθεραπείας μπορεί να προσφέρει μακροχρόνια ύφεση ή ακόμη και ίαση [8,67]. Σε αυτό το πλαίσιο η λελογισμένη χρήση απεικονιστικών και ενδοσκοπικών εξετάσεων σε συνδυασμό με εξειδικευμένη ανοσοϊστοχημεία και σε ορισμένες περιπτώσεις,



μοριακές και κυτταρογενετικές μέθοδοι μπορούν να συμβάλλουν ουσιαστικά στη διάγνωση [68]. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να ταυτοποιηθούν οι υποομάδες ΚΑΠΕ περισσότερο ευνοϊκής πρόγνωσης, όπως αναφέρονται στον πίνακα 8, και να αποφευχθούν εσφαλμένες ιστοπαθολογοανατομικές διαγνώσεις [69].

Πίνακας 8: Υποομάδες ΚΑΠΕ ευνοϊκής και δυσμενούς πρόγνωσης

Υποομάδες ευνοϊκής πρόγνωσης	Υποομάδες δυσμενούς πρόγνωσης
Φτωχής διαφοροποίησης καρκινώματα μέσης κατανομής	Μεταστατικό αδenoκαρκίνωμα ήπατος ή άλλων οργάνων
Αδenoκαρκίνωμα περιτοναϊκής κοιλότητας σε γυναίκες	Κακοήθης ασκίτης (αδenoκαρκίνωμα)
Αδenoκαρκίνωμα μασχάλης σε γυναίκες	Πολλαπλές εγκεφαλικές μεταστάσεις αδenoκαρκινώματα ή πλακώδη καρκινώματα
Πλακώδες καρκίνωμα τραχηλικών λεμφαδένων	Πολλαπλές πνευμονικές ή υπεζωκοτικές μεταστάσεις (αδenoκαρκινώματα)
Μεμονωμένη βουβωνική λεμφαδενοπάθεια	Πολλαπλές οστικές μεταστάσεις (αδenoκαρκινώματα)
Φτωχής διαφοροποίησης νευροενδοκρινικά καρκινώματα	
Οστικές μεταστάσεις σε άνδρες και αυξημένη τιμή PSA	
Ασθενείς με μονήρη, σχετικά μικρή, δυνητικά εξαιρεσιμη εστία	

1.1.7.1 Κλινική εξέταση

Η φυσική εξέταση πρέπει να είναι ενδελεχής και να μην παραλείπεται η ψηλάφηση του θυρεοειδούς αδένος και η δακτυλική εξέταση του ορθού. Στις γυναίκες οι μαστοί και η πύελος και στους άνδρες ο προστάτης αδένος θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην αρχική φυσική εξέταση.



1.1.7.2 Ο ρόλος του Παθολογοανατόμου

Η λήψη επαρκούς δείγματος από τον καρκινικό ιστό, είναι μείζονος σημασίας για την οπτική μικροσκόπηση, την ανοσοϊστοχημεία, για επιπλέον εκφράσεις διαφόρων δεκτών και υποδοχέων, όπως επίσης για περισσότερο ειδικές μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας ή και γονιδιακών αναλύσεων. Η αναρρόφηση με λεπτή βελόνη, μια κοινή διαγνωστική διαδικασία, παρέχει συχνά ανεπαρκές υλικό για την παθολογοανατομική αξιολόγηση, ειδικά σε ασθενείς με καρκινώματα πτωχής διαφοροποίησης.

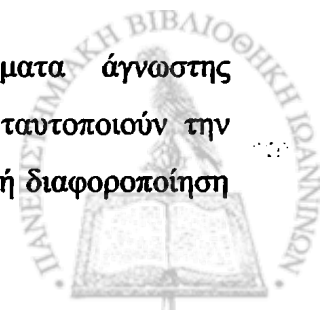
Είναι απαραίτητη η συνεργασία του παθολογοανατόμου με τον κλινικό ιατρό όσο αφορά το ιατρικό ιστορικό του ασθενούς, τα κλινικά ευρήματα και τα επιπλέον εργαστηριακά αποτελέσματα. Χωρίς αμφιβολία η συνεργασία μεταξύ παθολογοανατόμου και κλινικού αυξάνει τις πιθανότητες της ειδικής διάγνωσης σε ασθενείς με ΚΑΠΕ.

Ιστολογική εξέταση ρουτίνας – Ιστοχημικές χρώσεις

Η εξέταση με οπτικό φωτομικροσκόπιο σπανίως είναι ικανή να ταυτοποιήσει την πρωτοπαθή εστία σε ασθενείς με ΚΑΠΕ. Η αρχική μικροσκόπηση μπορεί κυρίως να χαρακτηρίσει τη μορφολογία των κυττάρων και τη διαφοροποίηση του όγκου. Εκτός από τη χρώση ρουτίνας με αιματοξυλίνη και ηωσίνη, επιπλέον ιστοχημικές χρώσεις μπορούν να εφαρμοσθούν όπως mucicarmine, Alcian Blue και acid-Sciff για να ανιχνεύσουν βλέννη ή βλενοπολυσακχαρίτες και trichrome ή methyl-green pyronine έτσι ώστε να αποκλεισθούν ορισμένα λεμφώματα και αδιαφοροποίητα κακοήγη νεοπλάσματα [65]. Ωστόσο, η ανάπτυξη των ανοσοϊστοχημικών τεχνικών υψηλότερης ευαισθησίας και ειδικότητας έχει περιορίσει την αξία των παραπάνω ιστοχημικών χρώσεων.

Ανοσοϊστοχημεία

Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε μεταστατικά καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας έχουν τη δυνατότητα ορισμένες φορές να ταυτοποιούν την πρωτοπαθή εστία, ιδίως όταν οι μεταστάσεις εμφανίζονται με πτωχή διαφοροποίηση



κατά την αρχική ιστολογική εξέταση ρουτίνας. Η δυνατότητα χρώσεων με τεχνικές ανοσοπεροξειδάσης σε τομές ιστών εγκλεισμένων σε κύβους παραφίνης, διευκολύνει τη διαγνωστική εφαρμογή της ανοσοϊστοχημείας για την ταυτοποίηση της μητρικής εστίας. Διάφορα κυτταρικά συστατικά όπως: ένζυμα, ορμονικοί υποδοχείς, ορμόνες, και άλλα αντιγόνα (κυτταροπλασματικά, πυρηνικά και κυτταρικών μεμβρανών), μπορούν να ταυτοποιηθούν με τη χρήση διαφόρων πολυκλωνικών ή μονοκλωνικών αντισωμάτων [3]. Στον πίνακα 9 απεικονίζονται μερικοί αντιπροσωπευτικοί συνδυασμοί αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται κυρίως σε πρωτόκολλα ανοσοϊστοχημείας σε ασθενείς με ΚΑΠΕ.

Πίνακας 9: Η χρήση δεικτών ανοσοϊστοχημείας στο ΚΑΠΕ

Καρκινικός τύπος	Ανοσοϊστοχημικός δείκτης
Καρκίνωμα	Cytokeratin, EMA, κερατίνες υψηλού & χαμηλού M.B
Λέμφωμα	CLA, EMA (\pm), B- & T- κυτταρικοί δείκτες
Σάρκωμα	Vimentin, Desmin, Μυοσίνη, CD34
Μελάνωμα	S-100, HMB-45, Vimentin, NSE, ειδικό μελανοκυτταρικό αντιγόνο
Νευροενδοκρινικός	Chromogranin, Synaptophysin, Cytokeratin, EMA, NSE
Γεννητικού κυττάρου	Cytokeratin, EMA, HCG, AFP
Καρκίνος προστάτη	PSA, Cytokeratin, EMA, 34BE12
Καρκίνος μαστού	Cytokeratin, EMA, ER,PR
Καρκίνος θυρεοειδούς	Thyroglobulin, Cytokeratin, EMA, Calcitonin

EMA= epithelial membrane antigen, CLA= common leucocyte antigen, NSE= neuron specific enolase, HCG= chorionic gonadotrophin, AFP= a-fetoprotein, PSA= prostate specific antigen, ER=estrogen receptor, PR=progesterone receptor

Η ανάπτυξη μονοκλωνικών αντισωμάτων ενάντια σε διάφορα πολυπεπτίδια κυτταροκερατινών (CK), έχει ανοίξει νέους δρόμους στην έρευνα των φυσιολογικών και καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων. Μεταξύ αυτών, οι CK7 και CK20, έχουν



ευρέως μελετηθεί στους συμπαγείς όγκους. Η CK20 είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στη διάγνωση γαστρεντερικών αδενοκαρκινωμάτων, ενώ η CK7 σε αναπνευστικές και γυναικολογικές κακοήθειες. Επιπλέον, ο καθορισμός του φαινοτύπου CK7/CK20 έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμος στη διάγνωση ορισμένων συμπαγών όγκων και αποδεικνύεται ότι έχει ικανή ευαισθησία κατάδειξης της λανθάνουσας πρωτοπαθούς εστίας. Γενικά, ο CK7+/CK20- φαινότυπος υποδεικνύει καρκίνο στον πνεύμονα, στον μαστό ή στις ωοθήκες, ο CK7+/CK20+ παγκρετικό καρκίνο, ο CK7-/CK20+ ορθοκολικό καρκίνο και ο CK7-/CK20- καρκίνο του προστάτη, νεφρών και ηπατικά καρκινώματα [66,67]. Ωστόσο η ύπαρξη ψευδώς θετικών και ψευδώς αρνητικών φαινοτυπικών αποτελεσμάτων δυσχαιρένει την οριστική διάγνωση της πρωτοπαθούς εστίας με την χρήση αυτής και μόνο της μεθόδου.

Οι τεχνολογικές εξελίξεις των τελευταίων 15 ετών έδωσαν τη δυνατότητα να πραγματοποιηθεί η μετάβαση από την έρευνα ενός γονιδίου, στην ταυτόχρονη μελέτη χιλιάδων γονιδίων ή και γονιδιακών προϊόντων που εκφράζονται σε έναν ιστό. Οι πλατφόρμες σειριακής ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης (serial analysis of gene expression) και οι πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες ιστών, είναι τα νέα όπλα για την ταξινόμηση των υποομάδων ΚΑΠΕ, την αναγνώριση βιοχημικών στόχων υπεύθυνων για την επιβίωση των κακοήθων κυττάρων και την ανεύρεση αποσιωπημένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Σε μια προσπάθεια ανάλυσης της υποκείμενης βιολογίας των ΚΑΠΕ, οι νέες ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν στραφεί στην ταυτοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης μιας σειράς γονιδίων που ανήκουν σε οικογένειες ογκογονιδίων, ογκοκατασταλτικών γονιδίων, γονιδίων διαμεμβρανικών υποδοχέων, αντι-αποπτωτικών γονιδίων και γονιδίων αυξητικών παραγόντων [71] Η συσχέτιση κλινικοπαθολογικών παραμέτρων με την έκφραση των πιο πάνω γονιδίων γίνεται με απώτερο σκοπό την ανάδειξη μοριακών στόχων σε μια προσπάθεια στοχευμένης θεραπείας με τη χρήση κυρίως μονοκλωνικών αντισωμάτων. Στον πίνακα 10 απεικονίζονται οι πολλά υποσχόμενοι μοριακοί στόχοι των οποίων η ανοσοϊστοχημική έκφραση έχει μελετηθεί στα ΚΑΠΕ την τελευταία περίπου δεκαετία.



Πίνακας 10: Νέοι μοριακοί στόχοι ανοσοϊστοχημικών ερευνών στα ΚΑΠΕ

Γονιδιακό προϊόν	Πρωτεϊνική λειτουργία
Ras	Ογκοπρωτεΐνη
HER2	Διαμεμβρανικός υποδοχέας
EGFR	Διαμεμβρανικός υποδοχέας
C-KIT	Διαμεμβρανικός υποδοχέας
PDGFR	Διαμεμβρανικός υποδοχέας
BCL2	Αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη
p53	Ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη
VEGF	Παράγοντας αγγειογένεσης
VEGFR	Διαμεμβρανικός υποδοχέας

Ηλεκτρονική μικροσκόπηση

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δεν χρησιμοποιείται ευρέως, διότι είναι σχετικά ακριβό και συστήνεται σε περιπτώσεις νεοπλασμάτων χαμηλής διαφοροποίησης. Η ηλεκτρονική μικροσκόπηση είναι χρήσιμη για τη διάκριση των λεμφωμάτων από τα καρκινώματα, των αδενοκαρκινωμάτων από καρκινώματα πλακωδών κυττάρων και φυσικά χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση νευροενδοκρινικών όγκων, μελανωμάτων ή σαρκωμάτων πτωχής διαφοροποίησης [3]. Η ηλεκτρονική μικροσκόπηση θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση νεοπλασμάτων πτωχής διαφοροποίησης σε νέους ασθενείς, ιδιαίτερα, όταν η ανοσοϊστοχημεία δεν καταλήγει σε οριστική τελική διάγνωση.

Μοριακή διαγνωστική

Η μοριακή κυτταρογενετική χρησιμοποιείται με περιορισμό για την ταυτοποίηση της πρωτοπαθούς εστίας, αφού ελάχιστες ογκο-ειδικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες έχουν ταυτοποιηθεί. Το ισοχρωμόσωμα του βραχέος σκέλους του χρωμοσώματος 12, i(12p), ή και η απαλοιφή ολόκληρου του αυτού του σκέλους, είναι μια χρωμοσωμική ανωμαλία χαρακτηριστική του καρκίνου των όρχεων, αλλά, και άλλων όγκων που σχετίζονται με τα γεννητικά κύτταρα. Σε μια ομάδα νέων ανδρών ασθενών με καρκίνωμα πτωχής διαφοροποίησης και με κλινικά χαρακτηριστικά



εξωγοναδικών όγκων γεννητικών κυττάρων, πραγματοποιήθηκε μοριακή γενετική ανάλυση και βρέθηκε ότι υπήρχε ισοχρωμόσωμα i12p, στο 25% των μελετούμενων περιστατικών. Αυτοί οι ασθενείς, αποδείχθηκε ότι είχαν όγκους ευαίσθητους στη χημειοθεραπεία για όγκους γεννητικών κυττάρων [68].

Επιπλέον χρωμοσωμικές ανωμαλίες έχουν βρεθεί και σε διάφορα άλλα καρκινώματα, λεμφώματα και σαρκώματα όπως: οι χρωμοσωμικές αναδιατάξεις t [11;22] [q24;q12] σε PNET και Ewing σαρκώματα, t [8;14] [q24;q32] σε non-Hodgkin's λεμφώματα, t [3;13] σε ραβδομυοσαρκώματα και απαλοιφή ολόκληρου του βραχέος σκέλους του χρωμοσώματος 3 (3p) στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Η κυτταρογενετική ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση νέων ασθενών με καρκινώματα πτωχής διαφοροποίησης ή αδιαφοροποίητα νεοπλάσματα, τα οποία δυνητικά μπορούν να απαντήσουν σε συστηματική χημειοθεραπεία [68-70].

Συμπερασματικά, η εκτεταμένη παθολογοανατομική αξιολόγηση με χρήση ανοσοϊστοχημείας, η χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και οι μοριακές κυτταρογενετικές αναλύσεις, μπορούν να κατηγοριοποιήσουν τους ασθενείς με ΚΑΠΕ στις ειδικές υποομάδες σε ποσοστό 20% [3].

DNA μικροσυστοιχίες- η νέα μοριακή προσέγγιση των ΚΑΠΕ

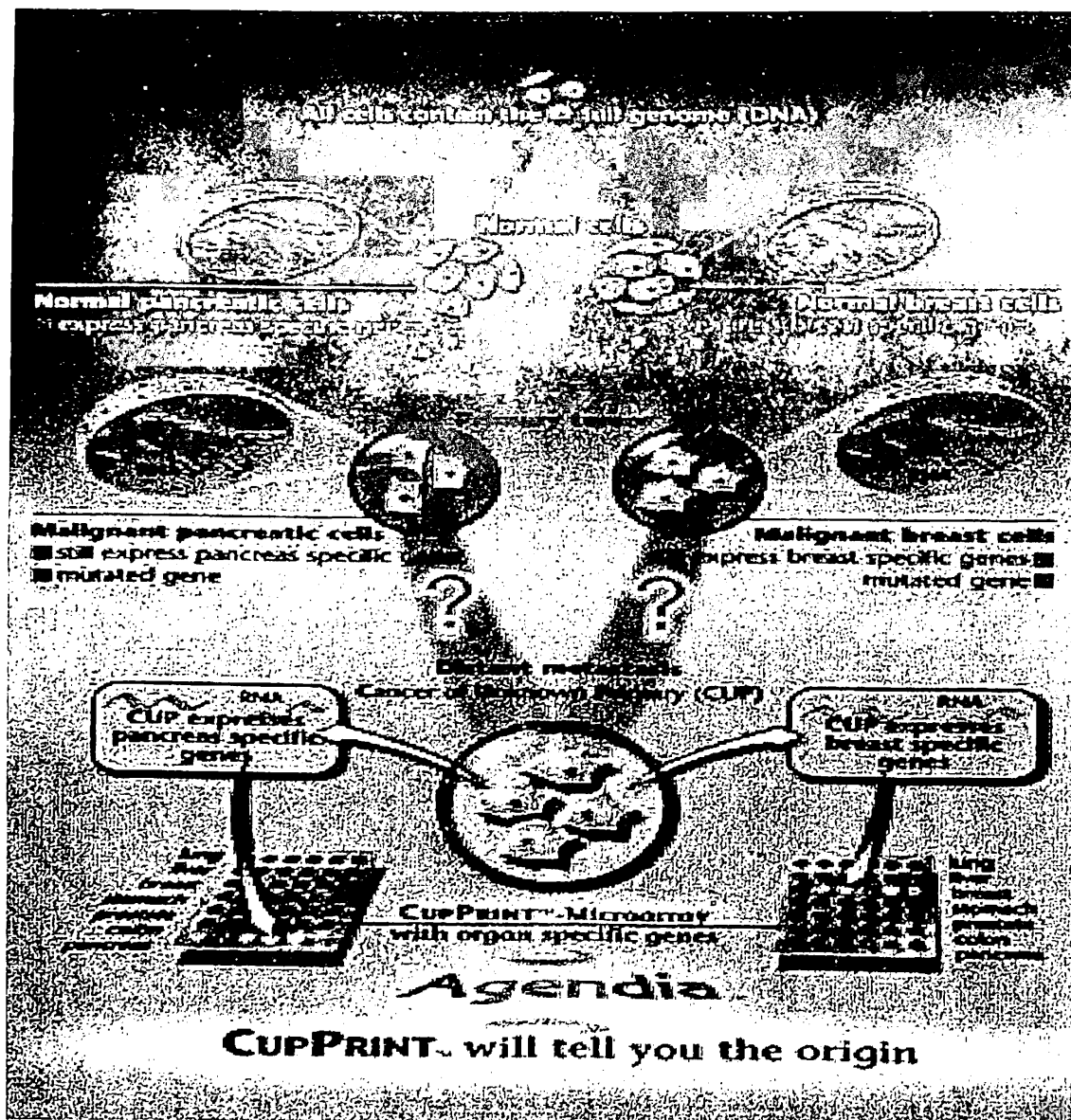
Οι γενετικές δοκιμασίες, αν και αποτελούν σχετικά νέα εργαλεία για την βαθύτερη κατανόηση του καρκίνου, αναπτύσσονται ταχύτατα καλύπτοντας ένα ευρύ φάσμα που ξεκινάει από την διαλογή ατόμων που φέρουν γενετική προδιάθεση για εμφάνιση καρκίνου, μέχρι την πρόγνωση της συμπεριφοράς του όγκου.

Η ταυτοποίηση του γονιδιακού προφίλ των όγκων με την τεχνολογία CupPrint® (Agendia), αποτελεί καινοτομία στην κλασσική μοριακή διαγνωστική του καρκίνου. Οι μικροσυστοιχίες έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την αποκάλυψη των γονιδιακών προφίλ ή «γενωμικών αποτυπωμάτων» σε διάφορους τύπους καρκίνου. Η συσσώρευση των όλων αυτών των γενετικών προφίλ σε τεράστιες βάσεις δεδομένων με την βοήθεια εξελιγμένων υπολογιστικών αλγορίθμων, οδήγησε στη δημιουργία ορισμένων ομάδων γονιδίων, των οποίων ο βαθμός έκφρασης μπορεί να υποδείξει τον τύπο του ιστού στον οποίο ανήκουν.



Με την CupPrint® τεχνολογία συγκρίνονται τα μοναδικά χαρακτηριστικά γονιδιακής έκφρασης του προς εξέταση βιοπτικού υλικού, με την γονιδιακή έκφραση γνωστών τύπων καρκίνων μέσω μιας τεράστιας βάσης δεδομένων. Συγκεκριμένα φαίνεται ότι τα καρκινικά κύτταρα που βρίσκονται σε απομακρυσμένες μεταστατικές εστίες, διατηρούν σε μεγάλο βαθμό τη χαρακτηριστική γονιδιακή έκφραση πρωτοπαθούς εστίας. Έτσι το CupPrint® μπορεί να συγκρίνει το προφίλ μετάστασης με τα προφίλ που ανήκουν στη βάση δεδομένων και να καθορίσει πιθανή θέση της πρωτοπαθούς εστίας.

Η τεχνολογία αυτή, φαίνεται να είναι ιδιαίτερος χρήσιμη για τη διάγνωση αποτελεσματική θεραπεία των ΚΑΠΕ. Μετρώντας την ενεργότητα περίπου ειδικών βιοδεικτών, είναι δυνατή η ταυτοποίηση της πρωτοπαθούς εστίας και η πλειονότητα των ασθενών με ΚΑΠΕ.



Εικόνα 1: Η τεχνολογία των DNA μικροσυστοιχιών της CupPrint® για την ταυτοποίηση πρωτοπαθούς εστίας των ΚΑΠΕ

1.1.7.3 Ο ρόλος του ακτινολόγου

Ο συμβατικός ακτινολογικός έλεγχος παρουσιάζει περιορισμένη διαγνωστική αξία στο πλαίσιο του συνδρόμου ΚΑΠΕ. Η απλή ακτινογραφία θώρακος αποτελεί προϋπόθεση για τη διάγνωση, αλλά έχει μικρή μόνο συμβολή στη διαφορική διάγνωση μεταξύ πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς ενδοθωρακικής νεοπλασματικής νόσου [72]. Βασικό απεικονιστικό εργαλείο στην διαγνωστική προσέγγιση του ΚΑΠΕ αποτελεί η αξονική υπολογιστική τομογραφία [73,74], καθώς μπορεί να διευκρινίσει την έκταση των μεταστάσεων και να παρέχει καθοδήγηση για την επιλογή της κατάλληλης θέσης για λήψη βιοψτικού υλικού [72,75].

Η μαστογραφία προτείνεται σε γυναίκες με μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα με μασχαλιαίους λεμφαδένες, παρόλο που η ευαισθησία της είναι περίπου στο 20% [73]. Σε περίπτωση που υπάρχει σοβαρή ένδειξη πρωτοπαθούς εστίας στο μαστό και δεν επαρκούν τα αποτελέσματα της μαστογραφίας και των υπερήχων πιθανών να ζητηθεί τομογραφία μαγνητικού συντονισμού (MRI, magnetic resonance imaging). Νεότερες απεικονιστικές τεχνικές όπως το PET-ct scan (positron emission tomography) υποστηρίζεται ότι μπορεί να επηρεάσουν τη θεραπευτική παρέμβαση σε ορισμένες περιπτώσεις ασθενών με ΚΑΠΕ [74,76-83].

1.1.7.4 Ο ρόλος του ενδοσκόπου

Η ενδοσκόπηση θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση ασθενών με ΚΑΠΕ, οι οποίοι εμφανίζουν ειδικά κλινικά χαρακτηριστικά. Ο ενδοσκοπικός έλεγχος θα πρέπει να είναι καθοδηγούμενος από συμπτωματολογία ή τη σημειολογία [3,84]. Η ινωσκοπική βρογχοσκόπηση συνίσταται σε περιπτώσεις ακτινογραφικών ενδείξεων από τον πνεύμονα ή το μεσοθωράκιο, καθότι ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί μια από τις συχνότερα υποκρυπτόμενες πρωτοπαθείς εστίες και η διάγνωση της πρωτοπαθούς ή δευτεροπαθούς φύσεως των πνευμονικών εντοπίσεων δεν είναι πάντα εύκολη από την απλή ακτινογραφία πνεύμονα [67]. Από τις υπόλοιπες ενδοσκοπήσεις η πρωκτοσκόπηση και η κολποσκόπηση συνιστώνται στις περιπτώσεις επιδερμοειδών καρκινωμάτων σε βουβωνικούς λεμφαδένες, ενώ η ενδοσκόπηση του πεπτικού δεν φαίνεται να αποδίδει [85].



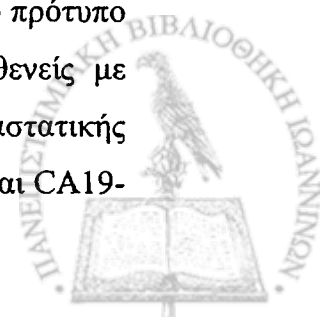
1.1.8 ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΡΟΥ

Ως καρκινικοί δείκτες ορίζονται οι βιολογικοί δείκτες της παρουσίας του καρκίνου. Οι δείκτες αυτοί, μπορούν να βρεθούν πάνω στον όγκο ή να ανιχνευθούν στον ορό αίματος ασθενών με καρκίνο, με τη βοήθεια ιστοχημικών, ανοσομετρικών και βιοχημικών τεχνικών.

Ο έλεγχος διαλυτών καρκινικών δεικτών στον ορό των ασθενών με ΚΑΠΕ, έχει περιορισμένη κλινική σημασία αναφορικά με τη διάγνωση της πρωτοπαθούς εστίας αλλά και την πρόγνωση της νόσου. Σε παλαιότερη μελέτη των Pavlidis και συν. αξιολογήθηκε η ορολογική έκφραση των έξι χρησιμοποιούμενων στην κλινική πράξη δεικτών (CEA, CA15-3, CA19-9, CA125, β-HCG, AFP) και διαπιστώθηκε πολλαπλή μη ειδική έκφραση στην πλειονότητα των ασθενών: 70% από τους ασθενείς είχαν έκφραση άνω των τριών δεικτών με παθολογικά αυξημένες τιμές, ενώ δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους [86].

Στη συγκεκριμένη μελέτη, οι συχνότερα διαπιστωθέντες παθολογικά αυξημένοι δείκτες ήταν εκείνοι που ανήκουν στην κατηγορία των ογκο-εμβρυϊκών αντιγόνων (CEA, CA15-3, CA19-9, CA125), οι οποίοι διαπιστώθηκαν αυξημένοι στο 60% περίπου των περιπτώσεων. Αν και διαπιστώθηκαν ορολογικά αυξημένες τιμές των τεσσάρων γλυκοπρωτεϊνικών καρκινικών αντιγόνων, η ιστική έκφραση ορισμένων από αυτές τις γλυκοπρωτεΐνες φάνηκε ότι ήταν πολύ μεγαλύτερη. Στα οκτώ περιστατικά ΚΑΠΕ που έγινε ταυτόχρονη ορολογική και ιστική έκφραση των βλεννικών αντιγόνων, διαπιστώθηκε ότι το CA15-3 αντιγόνο ανιχνεύεται σε παθολογικές τιμές ως διαλυτό αντιγόνο στον ορό ασθενών με ΚΑΠΕ στις 50% μόνο από τις περιπτώσεις που υπερεκφράζεται σε κυτταρικό επίπεδο. Παρόμοια ορολογική υπο-έκφραση του CA15-3 κατά 50% (ως κυκλοφορούν αντιγόνο) έχει διαπιστωθεί και από άλλους ερευνητές και στον καρκίνο του μαστού [87]. Παρατηρήσεις έχουν γίνει επίσης και για το CA125 και έχει υποστηριχθεί ότι η σχετικά υψηλής ειδικότητας συγκέντρωση του δείκτη στον ορό αίματος ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών, συχετίζεται με παράγοντες που ρυθμίζουν την έκκρισή του, παρά με την ιστική του έκφραση [88].

Στη μελέτη των Pavlidis και συν. δεν μπόρεσε να διακριθεί ιδιαίτερο πρότυπο έκφρασης των ογκο-εμβρυϊκών γλυκοπρωτεϊνικών αντιγόνων στους ασθενείς με ΚΑΠΕ, ωστόσο, υπήρξε αντιστοιχία της έκφρασης με τα όργανα μεταστατικής εντόπισης και την έκταση της νόσου. Συγκεκριμένα αυξημένες τιμές CEA και CA19-



9 συσχετίστηκαν με ηπατική μεταστατική εντόπιση και των CA15-3 και CA19-9 με την έκταση της νόσου εκφρασμένης σε αριθμό οργάνων με μεταστατική εντόπιση. Τέλος αυξημένη έκφραση του CA 19-9 συσχετίστηκε με αδενοκαρκινώματα καλής έως μέσης διαφοροποίησης, ενώ δεν υπήρξε συσχέτιση της έκφρασης των παραπάνω καρκινικών δεικτών με την απάντηση ή όχι στη χημειοθεραπεία [86]. Παρά την απουσία κλινικής σημασίας των καρκινικών δεικτών ορού σε ασθενείς με ΚΑΠΕ, συνίσταται να γίνεται εκτίμηση των τιμών στον ορό του PSA και της β-HCG σε άνδρες προκειμένου να αποκλεισθεί η άτυπη κλινική εκδήλωση εξωγοναδικού όγκου και καρκίνου του προστάτη [85].

1.1.9 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ

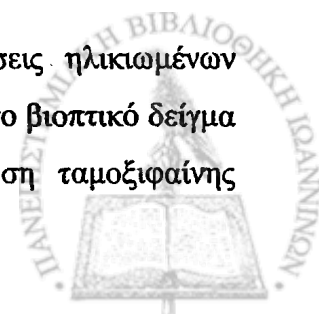
Το ΚΑΠΕ είχε ανέκαθεν ταυτισθεί με δυσμενή πρόγνωση και κάθε θεραπευτική προσπάθεια κρινόταν απογοητευτική [6]. Σήμερα, έχει αναγνωρισθεί ότι υπό τον όρο ΚΑΠΕ συμπεριλαμβάνονται υπο-ομάδες διαφορετικής πρόγνωσης και ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία και ως εκ τούτου η θεραπευτική τακτική θα πρέπει να προσαρμόζεται κατά περίπτωση [84]. Η θεραπεία μπορεί να είναι περιοχική ή συστηματική, να έχει θεραπευτικό ή ανακουφιστικό στόχο ή τέλος να είναι απλά υποστηρικτική.

1.1.9.1 Περιοχική θεραπεία

Στο ΚΑΠΕ πρακτικές τοπικής ή περιοχικής αντιμετώπισης με ακτινοθεραπεία ή χειρουργική, περιορίζονται στις περιπτώσεις εντοπισμένης λεμφαδενικής νόσου που εστιάζεται είτε στην περιοχή του τραχήλου σε στάδιο N2 και μικρότερο, είτε στη μασχάλη σε γυναίκες ασθενείς [89]. Σε περιπτώσεις τραχηλικής νόσου υψηλότερων σταδίων (N3), συνδυασμένη ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία σισπλατίνας προσφέρει καλύτερα αποτελέσματα ανταπόκρισης και επιβίωσης [89,90].

1.1.9.2 Ορμονοθεραπεία

Δοκιμαστική ορμονοθεραπεία επιχειρείται στις περιπτώσεις ηλικιωμένων ανδρών με ΚΑΠΕ με υψηλή τιμή PSA στον ορό ή θετική χρώση στο βιοψτικό δείγμα ή με οστεοβλαστικές οστικές μεταστάσεις [91,92]. Η χορήγηση ταμοξιφαίνης



ενδείκνυται σε περιπτώσεις γυναικών με αδενοκαρκίνωμα το οποίο εκφράζει θετικότητα για οιστρογονικούς υποδοχείς και κυρίως σε περιπτώσεις με εντόπιση σε μασχαλιαίους λεμφαδένες, σε συνδυασμό με τοπική θεραπεία [93,94].

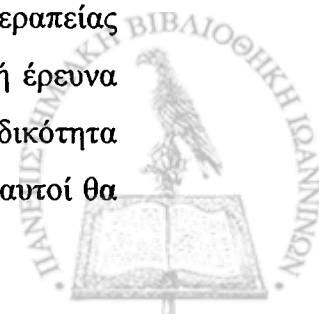
1.1.9.3 Χημειοθεραπεία

Με εξαίρεση τις κλινικές υπο-ομάδες λιγότερο δυσμενούς πρόγνωσης, οι οποίες έχουν ταυτοποιηθεί τις τελευταίες δυο δεκαετίες ως ιδιαίτερα χημειοευαίσθητες, κανένα χημειοθεραπευτικό σχήμα δεν έχει αποδεχθεί δραστικό για τη μεγάλη ομάδα των ασθενών με ηπατικές, οστικές ή πολύ-οργανικές μεταστάσεις από ΚΑΠΕ [97,67]. Οι μέχρι τώρα κλινικές μελέτες που αφορούσαν ποικίλους εμπειρικούς χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς κατέληξαν σε απογοητευτικά αποτελέσματα [95,96].

Κλινικές υπο-ομάδες λιγότερο δυσμενούς πρόγνωσης μετά από συστηματική χημειοθεραπεία αποτελούν ασθενείς με νόσο μέσης γραμμής, (χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα με ανατομική εντόπιση σε οπισθοπεριτοναϊκούς και μεσιθωρακικούς λεμφαδένες) και γυναίκες με περιτοναϊκή καρκινωμάτωση. Και στις δύο αυτές υποομάδες ασθενών, η νεοπλασματική νόσος παρουσιάζει ευαισθησία σε χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς με βάση την πλατίνα [98,99].

Στην διεθνή ιατρική βιβλιογραφία δεν υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις που να υποστηρίζουν την υπεροχή ενός φαρμάκου ή συνδυασμού χημειοθεραπευτικών παραγόντων στην ομάδα των ασθενών με σπλαχνική/πολυσυστηματική μεταστατική εντόπιση. Στις περισσότερες μελέτες το ποσοστό ανταπόκρισης είναι κάτω του 25% και η διάμεση επιβίωση των ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία κυμαίνεται από 5,5 έως 11 μήνες [100-103]. Το πτωχό θεραπευτικό αποτέλεσμα σε αυτούς τους ασθενείς δεν φαίνεται να αναστρέφεται ούτε με την χορήγηση χημειοθεραπείας υψηλών δόσεων [104,105]. Στον πίνακα 11 αναφέρονται οι προτεινόμενες θεραπευτικές στρατηγικές σύμφωνα με τις κλινικές υποομάδες ΚΑΠΕ.

Η εμπειρική κυτταροτοξική χημειοθεραπεία φαίνεται ότι έχει φθάσει σε φάση "πλατώ" ως προς την κλινική δραστηριότητα στην ομάδα ασθενών με σπλαχνική ή πολυσυστηματική εντόπιση ΚΑΠΕ. Ο δρόμος για περαιτέρω βελτίωση της θεραπείας περνά από τη γνώση της μοριακής βιολογίας των όγκων, την μεταφραστική έρευνα και την εισαγωγή σε θεραπευτική δοκιμασία βιολογικών παραγόντων με ειδικότητα στόχων. Στην κλινική πράξη, σε θεραπεία εκτός πρωτοκόλλου, οι ασθενείς αυτοί θα



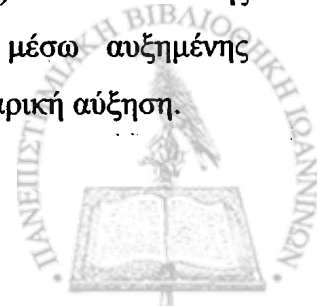
πρέπει να αντιμετωπίζονται κατά την κρίση του θεράποντος ογκολόγου ή με σχήμα ήπιας τοξικότητας ή και με μονή συμπτωματική αγωγή.

Πίνακας 11: Θεραπευτική αντιμετώπιση

Υπο-τύπος ΚΑΠΕ	Προτεινόμενη θεραπεία
Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα με κατεξοχήν λεμφαδενική εντόπιση	Συνδυασμός πλατίνας ± ταξάνης
Περιτοναϊκή καρκινωμάτωση γυναικών	Παρόμοια με καρκίνο ωοθήκης FIGO III: χημειοθεραπεία πλατίνας ± ταξάνης
Μεμονωμένες λεμφαδενικές μεταστάσεις μασχάλης σε γυναίκες	Όπως σε γυναίκες με καρκίνο μαστού και παρόμοια συμμετοχή λεμφαδένων
Πλακώδες καρκίνωμα τραχηλικών λεμφαδένων	Ακτινοθεραπεία για νόσο σταδίου N1-N2. Εισαγωγική χημειοθεραπεία πλατίνας για νόσο N3
Ηπατικές/οστικές ή πολυσυστηματικές μεταστάσεις από αδenoκαρκίνωμα	Συμμετοχή σε θεραπευτικά πρωτόκολλα θεραπευτικών δοκιμασιών ή χημειοθεραπεία ήπιας τοξικότητας. Μόνο συμπτωματική αγωγή είναι αποδεκτή

1.2 ΟΙ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Σημαντικό ρόλο στη δημιουργία αλλά και στην παθογένεση του καρκίνου, κατέχουν οι γενετικές τροποποιήσεις πληθώρας γονιδίων. Υπάρχουν τρεις ευρείες κατηγορίες γονιδίων, οι οποίες φαίνεται να συμμετέχουν στην ανάπτυξη του καρκίνου: α) ογκοκατασταλτικά γονίδια, β) γονίδια επιδιόρθωσης μεταλλάξεων και γ) ογκογονίδια [106-108]. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια αποτελούν μια ομάδα γονιδίων, των οποίων η δράση χάνεται ως αποτέλεσμα σωματικών ή σε επίπεδο βλαστικής σειράς μεταλλάξεων. Τα επιδιορθωτικά γονίδια αποτελούν μια υποκατηγορία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων που συμμετέχουν σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA (π.χ τα DNA mismatch repair γονίδια). Η απώλεια της δράσης τους, συσχετίζεται άμεσα με ανάπτυξη καρκίνου, μέσω αυξημένης συχνότητας μεταλλάξεων σε άλλα γονίδια που ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση.



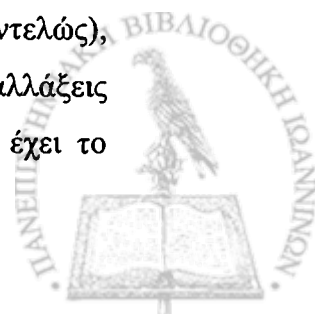
Τα ογκογονίδια, είναι γονίδια άμεσα υπεύθυνα της καρκινικής εξαλλαγής και συχνά παρουσιάζονται ως διαφοροποιημένες μορφές των πρωτο-ογκογονιδίων που φυσιολογικά ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση [106-110]. Σε καρκινικά κύτταρα έχουν βρεθεί τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές διαφορές μεταξύ των πρωτο-ογκογονιδίων και των αντίστοιχων ογκογονιδίων. Ένα πρωτο-ογκογονίδιο είναι δυνατό να μετατραπεί σε ογκογονίδιο όταν η μετάλλαξη που θα συμβεί στην κωδικοποιούσα περιοχή, θα ενεργοποιήσει τη βιολογική δράση της παραγόμενης πρωτεΐνης, χωρίς να επηρεάσει το συνολικό ποσό παραγωγής της. Εναλλακτικά, ένα πρωτο-ογκογονίδιο μετατρέπεται σε ογκογονίδιο και παράγει επιπλέον ποσότητες πρωτεΐνης, μέσω γονιδιακής ενίσχυσης (πολλαπλά αντίγραφα) ή μετάλλαξης, χρωμοσωμικών αναδιατάξεων, ένθεσης ή απαλοιφής της ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου [110].

Οι μεταλλάξεις μπορούν να αποσιωπήσουν ή να ενισχύσουν τη λειτουργία ενός γονιδίου

Η λειτουργία ενός γονιδίου μπορεί να αναλυθεί δημιουργώντας κατ' αρχήν ένα μεταλλαγμένο οργανισμό που στερείται εντελώς του γονιδίου αυτού. Μια μετάλλαξη που εξουδετερώνει απόλυτα τη γονιδιακή λειτουργία, συνήθως λόγω εξάλειψης του γονιδίου, ονομάζεται εκμηδενιστική μετάλλαξη (null mutation). Αν το γονίδιο είναι απαραίτητο (essential gene), τότε η εκμηδενιστική μετάλλαξη είναι θανατηφόρα (lethal mutation).

Η εκτίμηση της επίδρασης ενός γονιδίου στο φαινότυπο βασίζεται στο χαρακτηρισμό μιας εκμηδενιστικής μετάλλαξης του. Αν μια μετάλλαξη δεν επηρεάζει το φαινότυπο, τότε είναι πιθανόν να πρόκειται για λανθάνουσα μετάλλαξη (leaky mutation), που επιτρέπει τη σύνθεση αρκετού ενεργού προϊόντος ώστε να επιτελείται επαρκώς η λειτουργία του, ακόμη και αν η ενεργότητα του προϊόντος μειώνεται ποσοτικά ή αλλοιώνεται ποιοτικά σε σχέση με αυτήν του αγρίου τύπου (wild type). Ωστόσο, αν μια εκμηδενιστική μετάλλαξη αποτυγχάνει να επηρεάσει τον φαινότυπο, φαίνεται πως η λειτουργία του συγκεκριμένου γονιδίου δεν είναι απαραίτητη.

Οι εκμηδενιστικές μεταλλάξεις ή άλλες μεταλλάξεις που εμποδίζουν τη γονιδιακή λειτουργία (χωρίς όμως απαραίτητα να την καταργούν εντελώς), ονομάζονται μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας (loss of function). Οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας είναι υπολειπόμενες. Μερικές φορές μια μετάλλαξη έχει το



αντίθετο αποτέλεσμα, δηλαδή κάνει την πρωτεΐνη να αποκτήσει μια νέα λειτουργία. Τέτοιες αλλαγές καλούνται μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας (gain of function) και είναι επικρατείς.

Δεν οδηγούν όλες οι μεταλλάξεις σε ανιχνεύσιμες αλλαγές του φαινοτύπου. Οι μεταλλάξεις χωρίς εμφανή αποτελέσματα ονομάζονται σιωπηλές μεταλλάξεις (silent mutations). Διαίρονται σε δύο τύπους. Μερικές αφορούν αλλαγές βάσεων στο DNA, οι οποίες δεν προκαλούν αλλαγή αμινοξέων της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Άλλες προκαλούν την αντικατάσταση κάποιου αμινοξέως, η οποία όμως δεν επηρεάζει τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Αυτές οι μεταλλάξεις καλούνται ουδέτερες αντικαταστάσεις (neutral substitutions).

1.3 Η ΔΙΑΚΟΠΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΩΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η ανάπτυξη και εξάπλωση του καρκίνου, πραγματοποιείται μέσω γεγονότων που συμβαίνουν τόσο εσωτερικά, όσο και εξωτερικά του καρκινικού κυττάρου. Εξωκυττάρια γεγονότα συμβαίνουν στον αγγειακό χώρο και στο στρώμα. Ωστόσο κεντρικός ρόλος στην απορρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας αποδίδεται στα σηματοδοτικά συστήματα. Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, ένα ευρύ φάσμα παραγόντων αύξησης, κυτταροκινών και πρωτο-ογκογονιδίων μεταφέρουν σήματα αύξησης, μέσω ενεργοποίησης φωσφορυλιωμένων μορίων. Τα μόρια αυτά, αποτελούνται από πρωτεϊνικές κινάσες, μεταφέρουν σήματα από την κυτταρική επιφάνεια προς τον πυρήνα, οδηγώντας σε γονιδιακή μεταγραφή και ενεργοποίηση εκατομμυρίων μεταβολικών διαδικασιών. Η κυτταρική σηματοδότηση ελέγχεται πολύ αυστηρά μέσω ειδικών μηχανισμών για την εύρυθμη λειτουργία του κυττάρου. Η απορρύθμιση αυτών των μηχανισμών εξαιτίας γενετικών τροποποιήσεων μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία κακοήθους φαινότυπου που εμπερικλείει βιολογικά φαινόμενα όπως: ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, αναστολή της απόπτωσης, μετάσταση και αγγειογένεση. Οι πρωτεϊνικές κινάσες παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην απορρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης και συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί δυο μονοπάτια υπεύθυνα για τη διατήρηση του κακοήθους φαινοτύπου.



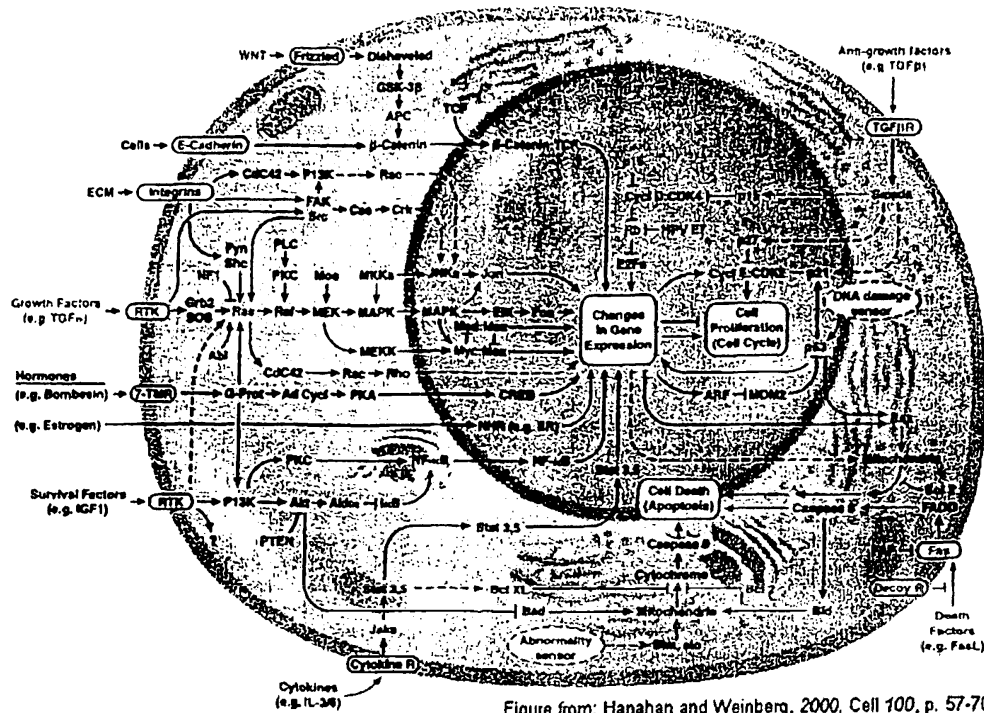
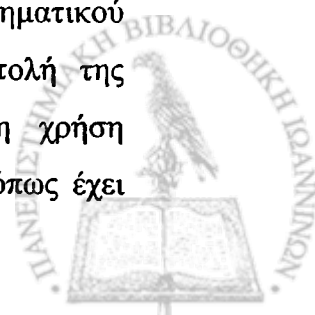


Figure from: Hanahan and Weinberg, 2000, Cell 100, p. 57-70

Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των κυριότερων οδών ενεργοποίησης στο κύτταρο

Το μονοπάτι της κινάσης 3-OH φωσφατύδυλοϊνositόλης και οι καθοδικοί της στόχοι, όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης Akt και p70 S6, είναι σημαντικοί τελεστές της ογκογονικής σηματοδότησης όπως είναι το μονοπάτι των κινασών Ras-Raf-MAP (ενεργοποιητικές μιτογόνες πρωτεΐνες). Μέσω διασταύρωσης διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών, αυτά τα δύο σηματοδοτικά μόρια αλληλεπιδρούν και με άλλες σημαντικές κυτταροπλασματικές κινάσες όπως είναι οι : bcr-abl, src και JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activators of transcription). Ο ρόλος αυτών των μορίων στην ογκογένεση, τα καθιστά ελκυστικούς στόχους για αντικαρκινική θεραπεία.

Η ρύθμιση της ενεργότητας της κινάσης μπορεί να επιτευχθεί μέσω διαφόρων στρατηγικών όπως: μπλοκάρισμα της κυκλοφορίας του προσδέματος, αναστολή της ένωσης του προσδέματος στην εξωκυττάρια περιοχή των μεμβρανικών υποδοχέων, αναστολή της φωσφορυλιωτικής ενεργότητας μέσω μπλοκαρίσματος πρόσδεσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), διακοπή των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και μειορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των κινασών με χρήση αντισηματικού RNA. Το μπλοκάρισμα του προσδέτη στην κυκλοφορία και η αναστολή της δέσμευσής του από μεμβρανικούς υποδοχείς έχει επιτευχθεί με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, αποτελώντας μια επιτυχημένη στρατηγική, όπως έχει



αποδειχθεί από τη χρήση της τρανστουζουμάβης, μεβασιζουμάβης και σετουξιμάβης, για τη θεραπεία συμπαγών όγκων. Ενώ η αναστολή ενδοκυττάρων σημάτων μπορεί να επιτευχθεί με πληθώρα προσεγγίσεων, η αναστολή της πρόσδεσης του ATP στην περιοχή κινάσης πολλών πρωτεϊνών αποτελεί τη μοναδική έως σήμερα προσέγγιση, όπως αποδεικνύεται από τη χρήση των ερλοτινίβη, imatinib και γεφιτινίβη. Στον πίνακα 12 συνοψίζονται μεταγωγείς σήματος – στόχοι και οι αναστολείς τους στις κλινικές μελέτες.

Ένα πρόβλημα που έχει προκύψει για αυτές τις θεραπευτικές τακτικές, είναι η εμφάνιση ανθεκτικότητας μέσω ειδικών μεταλλάξεων στην περιοχή της τυροσινικής κινάσης. Είναι προφανές όμως, ότι η ανακάλυψη πληθώρας βιολογικών στόχων της καρκινικής σηματοδότησης έχει δημιουργήσει νέους παράγοντες που βρίσκονται σε διάφορες φάσεις κλινικής ανάπτυξης. Στο μέλλον, η επιτυχία αυτών των παραγόντων δεν θα βασίζεται μόνο στις φαρμακολογικές τους ικανότητες αλλά και στην ανάπτυξη κλινικής στρατηγικής που θα συμπεριλαμβάνει δυνητικούς βιολογικούς δείκτες πρόγνωσης και διάγνωσης και κατάλληλες στρατηγικές επιλογής ασθενών

Πίνακας 12: Αναστολείς της μεταγωγής σήματος σε διάφορες κλινικές μελέτες¹¹¹

Φάρμακο	Μόριο-στόχος	Στάδιο κλινικής δοκιμής	Τοξικότητα
ZD6474	EGFR, VEGFR2 TKI	I	Διάρροια, ναυτία, δυσκοιλιότητα, ανορεξία
Sorafenib	Raf and VEGFR kinase inhibitor	III	Δύσπνοια, κόπωση, διάρροια, εξανθήματα
SU11248	PDGFR, VEGFR, C-KIT, FLT-3	III	Κόπωση, διάρροια, ναυτία
Vatalanib	VEGFR-1-2, KDR, PDGFR, C-KIT	III	Διάρροια, πονοκέφαλος εξανθήματα
AEE788	VEGFR, EGFR, HER2	I	Διάρροια, εξανθήματα
AG-013736	VEGFR-1-2, KDR, C-KIT	I	Αιμόπτυση, πρωτεϊνουρία, υπέρταση
AMG706	PDGFR, VEGFR-I, C-KIT, R2, R3	II	Υπέρταση, πονοκέφαλος
MLN518	PDGFR, C-KIT, FLT3	II	
CEP-701	FLT3, TRK	I	
CEP-2583	NGFR	I	
CCI-779 mTOR		III	Υπερτριγλυκεριδαμία, υπερχοληστερολαιμία, θρομβοκυτταροπενία, υπεργλυκαμία
RAD 001	mTOR	II	Υπερτριγλυκεριδαμία, υπερχοληστερολαιμία, θρομβοκυτταροπενία, υπεργλυκαμία
AP23573	mTOR	II	Υπερτριγλυκεριδαμία, υπερχοληστερολαιμία, θρομβοκυτταροπενία, υπεργλυκαμία
ARRY-0401	MEK	II	
PD 0325901	MEK	I/II	Εξάνθημα
BMS-354825	Abl/src	I/II	
AZM475271	Abl/src	I	



1.3.1 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΙ ΜΕΤΑΓΩΓΕΙΣ ΣΗΜΑΤΟΣ

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση, ρυθμίζονται από ένα μεγάλο αριθμό ορμονών, αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών. Τα μόρια αυτά, αλληλεπιδρούν με αντίστοιχους κυτταρικούς υποδοχείς και επικοινωνούν με τον πυρήνα διαμέσου δικτύου ενδοκυττάρων σηματοδοτικών οδών. Η σηματοδότηση σε καρκινικά κύτταρα διαφοροποιείται σημαντικά από τη δράση ογκογονιδίων διαμέσω πρωτεϊνικής υπερέκφρασης ή μεταλλάξεων, οδηγώντας έτσι, σε απορρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης, αναστολή της απόπτωσης, έναρξη μεταστάσεων και ανώμαλο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα στοιχεία από τα οποία αποτελούνται αυτά τα ανώμαλα σηματοδοτικά μονοπάτια και τα οποία είναι ειδικά σε νεοπλασματικά κύτταρα, παρουσιάζονται ως ειδικοί δυνητικοί στόχοι νέας αντικαρκινικής θεραπείας. Στους δυνητικούς αυτούς στόχους, εμπεριέχονται προσδέματα (ligands) και κυρίως αυξητικοί παράγοντες, κυτταρικοί υποδοχείς, ενδοκυτταριοί δευτερεύοντες μεταγωγείς σημάτων και πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες. Εμφανίζονται λοιπόν, αρκετές θέσεις-κλειδιά πάνω στα σηματοδοτικά μονοπάτια, οι οποίες θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχο της αντικαρκινικής θεραπείας.

Το πρώτο σημείο παρέμβασης σε ένα σηματοδοτικό καταρράκτη, είναι η εξουδετέρωση των προσδεμάτων πριν συνδεθούν με τους υποδοχείς τους. Η προσέγγιση αυτή, έχει επιτυχώς καθιερωθεί με τη χρήση της μπεβασιζουμάβης (bevacizumab), μονόκλωνου αντισώματος που στοχεύει τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) [112]. Το δεύτερο σημείο παρέμβασης, είναι η άμεση αναστολή των υποδοχέων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί: α) με την αποτροπή της πρόσδεσης των αυξητικών παραγόντων με τους υποδοχείς τους, όπως συμβαίνει με τη δράση της σετουξιμάβης, ενός χμαιοειδούς αντισώματος το οποίο στοχεύει τον υποδοχέα του αυξητικού επιδερμικού παράγοντα (EGFR) [113] και β) με την αναστολή της δραστηριότητας κινάσης των υποδοχέων με μικρού μοριακού μεγέθους αναστολείς φωσφορυλιωμένων υποδοχέων όπως είναι η ερλοτινίβη [114]. Τέλος, τρίτη παρέμβαση μπορεί να επιτευχθεί με την αναστολή σηματοδότησης κυτταροπλασματικών δευτερευόντων σηματοδοτικών μορίων και κυρίως πρωτεϊνικών κινασών. Παράδειγμα της τελευταίας προσέγγισης είναι η ιματινίβη, ένας αναστολέας της δραστηριότητας κινάσης πρωτεϊνών όπως το bcr-abl, c-kit και του υποδοχέα PDGFR [115].

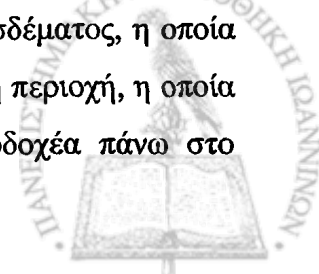


Οι πρωτεϊνικές κινάσες, είναι ένζυμα τα οποία προσδένουν ομοιοπολικά φώσφορο στην πλευρική αλυσίδα αμινοξικών καταλοίπων σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης σε συγκεκριμένες ενδοκυττάριας πρωτεΐνες. Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών ρυθμίζει την ενζυμική τους δραστηριότητα, την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες και μόρια, την τοποθέτησή τους μέσα στο κύτταρο και την προστασία τους από ενδεχόμενη αποδόμηση μέσω πρωτεασών. Αυτή η ενεργότητα είναι συνήθως αυστηρώς ρυθμιζόμενη και ελεγχόμενη. Η διαταραχή της σηματοδότησης των πρωτεϊνικών κινασών από μεταλλάξεις ή άλλες γενετικές διαφοροποιήσεις, έχει ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση της δραστηριότητας κινάσης και τον κακοήθη μετασχηματισμό των κυττάρων.

Ανάμεσα στα 32,000 περίπου κωδικεύοντα γονίδια του ανθρώπινου γενώματος, υπάρχουν περισσότερες από 520 πρωτεϊνικές κινάσες, που ασκούν αυστηρό έλεγχο στην φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών. Έτσι λοιπόν, οι πρωτεϊνικές κινάσες εμφανίζονται ως η δεύτερη πιο σημαντική ομάδα κυτταρικών στόχων θεραπείας, μετά τους υποδοχείς συνδεδεμένους με G πρωτεΐνες (G-protein-coupled receptors) [116].

Οι πρωτεΐνες τυροσινικής κινάσης (Protein tyrosine kinases, PTKs) περιλαμβάνουν μια μεγάλη κατηγορία από περίπου 40 ογκοκατασταλτικά γονίδια και πάνω από 100 κυρίαρχα ογκογονίδια [117]. Οι PTKs αποτελούν επίσης, την μεγαλύτερη κατηγορία προϊόντων ογκογονιδίων, με μεγάλη δομική ομολογία. Οι PTKs ρυθμίζουν κυρίως την κυτταρική επικοινωνία και ανάπτυξη. Σωματικές μεταλλάξεις σε αυτή την κατηγορία των γονιδίων μπορούν να προκαλέσουν σημαντικό αριθμό ανθρώπινων καρκινωμάτων, δείχνοντας έτσι έμφαση για μια ακόμη φορά, στην αντίστροφη σχέση μεταξύ της ρύθμισης της φυσιολογικής ανάπτυξης και της ογκογένεσης [118]. Μέχρι σήμερα, είναι γνωστά πάνω από 90 γονίδια στο ανθρώπινο γένωμα που κωδικοποιούν PTKs. Τα 58 από αυτά, κωδικοποιούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς των PTKs και διακρίνονται σε 20 υποοικογένειες, ενώ τα υπόλοιπα 32 κωδικοποιούν κυτταροπλασματικές PTKs που διαχωρίζονται σε 10 υποοικογένειες [119,120].

Οι υποδοχείς των πρωτεϊνικών κινασών (Receptor tyrosine kinases RTKs), εμφανίζουν διάφορα δομικά χαρακτηριστικά. Είναι γλυκοπρωτεΐνες που αποτελούνται από: α) μια εξωκυττάρια περιοχή σύνδεσης του προσδέματος, η οποία εξασφαλίζει ειδικότητα σύνδεσης, β) μια υδρόφοβη, διαμεμβρανική περιοχή, η οποία αγκυροβολεί στην μεμβράνη και εξασφαλίζει τη θέση του υποδοχέα πάνω στο



κύτταρο και γ) μια ενδοκυττάρια πρωτεϊνική αλληλουχία, η οποία περιέχει τόσο ρυθμιστικές όσο και καταλυτικές περιοχές. Η σύνδεση του προσδέματος με τον υποδοχέα, επάγει την ενεργοποίηση της ενδοκυττάριας περιοχής του, η οποία φέρει δραστικότητα τυροσινικής κινάσης και οδηγεί σε έναρξη σηματοδοτικών γεγονότων ειδικών για κάθε υποδοχέα.

Οι RTKs διακρίνονται σε κατηγορίες ανάλογα με την ομολογία της αλληλουχίας τους, τα δομικά χαρακτηριστικά και τα διακριτά μοτίβα της εξωκυττάριας περιοχής. Στα σπονδυλωτά έχουν ανακαλυφθεί έως σήμερα 19 διαφορετικές οικογένειες. Όταν το πρόσδεμα συνδέεται με RTKs, επάγει τον διμερισμό του υποδοχέα με αλλαγές στη διαμόρφωση, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την ενδομοριακή φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης σε πολλαπλές θέσεις. Επιπλέον, είναι δυνατή και η δημιουργία ετεροδιμερών υποδοχέων, όπως συμβαίνει με τη δράση του αλφα-μετασχηματικού αυξητικού παράγοντα, όπου οδηγεί στον σχηματισμό ετεροδιμερών υποδοχέων αποτελούμενων από HER-2 και EGFR [121]. Σε κακοήθεις όγκους, ένας μεγάλος αριθμός από αυτούς τους υποδοχείς είτε υπερεκφράζεται, είτε μεταλλάσσεται με αποτέλεσμα να διαταράσσεται όλο το δίκτυο ενδοκυττάριας σηματοδότησης και να δημιουργείται ανώμαλη κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση.

Εξαιτίας λοιπόν, του μεγάλου ποσοστού των ανθρώπινων κακοηθειών που φέρουν ογκογόνες μεταλλάξεις, η διακοπή της ανώμαλης ενδοκυττάριας σηματοδότησης αποτελεί πλέον τον κύριο στόχο στην προσπάθεια εύρεσης νέων και αποτελεσματικότερων φαρμάκων.

1.3.2 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΩΣ ΣΤΟΧΟΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Η μη ρυθμιζόμενη αυτόνομη αύξηση των κυττάρων, συμβαίνει ως αποτέλεσμα διαταραγμένης μεταγωγής σημάτων, εξαιτίας συνήθως ογκογόνων μεταλλάξεων που επηρεάζουν με άμεσο τρόπο την ενδοκυττάρια μετάδοση του σήματος [122]. Τα περισσότερα εξωκυττάρια σήματα, ενισχύονται και διαβιβάζονται εντός του κυττάρου, είτε από καταρράκτες πρωτεϊνικών κινασών, είτε από ενεργοποιημένους μέσω τυροσινικής φωσφορυλίωσης υποδοχέων, ή μέσω υποδοχέων που συνδέονται με GTP-προσδένουσες πρωτεΐνες [116]. Οι πρωτεϊνικές κινάσες μπορούν να θεωρηθούν ως σημαντικοί ρυθμιστές των ενδοκυττάριας σηματοδοτικών



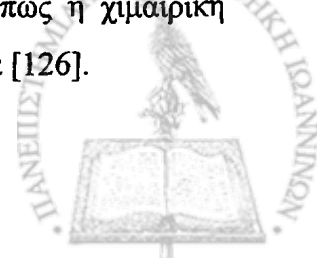
μονοπατιών, η ενεργότητα των οποίων συνήθως ελέγχεται και ρυθμίζεται κατά τρόπο εξαιρετικά αυστηρό [116]. Ωστόσο, μεταλλαγμένα αλληλόμορφα αυτών των πρωτεϊνικών κινασών, είναι ικανά να διαταράξουν ολόκληρο το κυτταρικό δίκτυο σηματοδότησης προκαλώντας την απορρύθμιση παροδικών διαδικασιών, όπως αλλαγή στο σχήμα και την κινητικότητα του κυττάρου, ή λιγότερο αναστρέψιμων διαδικασιών, όπως η κυτταρική διαίρεση, η διαφοροποίηση και η απόπτωση [116,122].

Οι τυροσινικές κινάσες, θεωρούνται ιδιαίτερα ελκυστικοί στόχοι αντικαρκινικής θεραπείας με μικρομοριακούς παράγοντες. Οι τύποι και ο αριθμός πρωτεϊνικών κινασών που χρησιμοποιούνται προς νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις παρουσιάζουν αλματώδη ανάπτυξη [123]. Με βάση την εξειδικευμένη ενζυμική τους δραστηριότητα είναι δυνατή η κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνών αυτών σε τρεις κατηγορίες: α) ειδικές τυροσίνης, β) ειδικές σερίνης-θρεονίνης και γ) ειδικές τυροσίνης-σερίνης-θρεονίνης. Κάθε κύτταρο περιέχει περίπου πενήντα με εκατό πρωτεϊνικές κινάσες. Τίθεται λοιπόν το ερώτημα εάν είναι δυνατό να επιτευχθεί συναγωνιστική στόχευση της θέσης όπου γίνεται η πρόσδεση του ATP, κατά τρόπο ειδικό και επιλεκτικό.

Πρόσφατες εξελίξεις στη μοριακή παθοφυσιολογία του καρκίνου, αποκάλυψαν πληθώρα πρωτεϊνικών κινασών που εμπλέκονται στην ανοδική ή καθοδική ρύθμιση σχετικών ογκογονιδίων [122,124]. Ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον έχουν συγκεντρώσει οι υποδοχείς με δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης (RPTKs). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η επαγόμενη της σύνδεσης του προσδέματος ενεργοποίηση των RPTK είναι αυστηρώς ελεγχόμενη, όταν όμως μεταλλάσσονται ή μεταβάλλονται δομικά οδηγούν το κύτταρο σε καρκινικό μετασχηματισμό. Συγκεκριμένα, πάνω από το 50% των γνωστών RPTK, έχουν βρεθεί επανειλημμένα, να φέρουν μεταλλάξεις ή να υπερεκφράζονται σε πληθώρα νεοπλασιών [122,124,125].

Η ανάπτυξη και διατήρηση κακοήθειας μέσω δράσης των RPTK, μπορεί να προκληθεί με τους παρακάτω μηχανισμούς:

α) γενωμικές επαναδιατάξεις, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, οι οποίες δημιουργούν χιμαιρικές πρωτεΐνες με καταλυτική περιοχή και με περιοχή που παρέχει την ενεργοποίηση (μέσω διμερισμού), όπως η χιμαιρική πρωτεΐνη BCR-ABL που απαντάται στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία [126].



β) μεταλλάξεις που οδηγούν στην συνεχόμενη -ανεξάρτητη προσδέματος- ενεργοποίηση της δραστικότητας τυροσινικής κινάσης, οι οποίες συσχετίζονται με διάφορες κακοήθειες όπως η οξεία μυελογενής λευχαιμία (Flt-3) και οι γαστρεντερικοί όγκοι (c-Kit) [127].

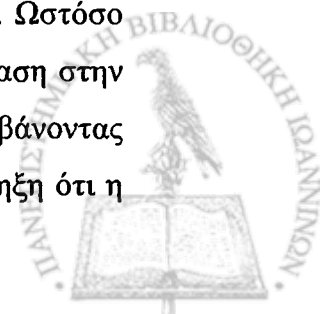
γ) απορρύθμιση της δραστικότητας κινάσης μέσω ενεργοποίησης ογκογονιδίων ή απώλειας ογκοκατασταλτικής λειτουργίας. Οι μηχανισμοί αυτοί συμβαίνουν σε καρκίνους με ενεργοποιημένα ογκογονίδια, όπως το Ras, που απορρυθμίζει την ενεργότητα της Ras-κινάσης, είτε με απορρυθμισμένες κυκλινοεξαρτόμενες κινάσες λόγω απώλειας της ογκοκατασταλτικής λειτουργίας (λ.χ στο ρετινοβλάστωμα) [128].

δ) απορρύθμιση της τυροσινικής κινάσης λόγω υπερέκφρασης, όπως συμβαίνει με τον υποδοχέα EGFR και άλλων συγγενικών RPTK. Η μετασχηματιστική δράση οφείλεται σε αυξημένη ενεργότητα κινάσης, λόγω ενισχυμένης τάσης διμερισμού, προκαλώντας ποσοτικές και ποιοτικές μεταβολές σε πρωτεϊνικά μέλη των σηματοδοτικών μονοπατιών [129].

ε) άτοπη έκφραση αυξητικών παραγόντων, μπορεί να συμμετέχει στην ανάπτυξη και διατήρηση του νεοπλασματικού φαινοτύπου. Συγκεκριμένα, η απρογραμμάτιστη έκφραση των αυξητικών παραγόντων του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF A-D) και των αντίστοιχων υποδοχέων τους, στα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει συσχετισθεί με παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από νεοαγγειογένεση και αυξημένη αγγειακή διείσδυση [130]

1.3.3 ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΘΕΣΗ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ

Η ανακάλυψη θεραπευτικών παραγόντων, που βασίζονται στη θεωρία της αναστολής των τυροσινικών κινάσεων δεν είναι ουτοπία. Ωστόσο η ρύθμιση της ενεργότητας των RPTK με μικρομοριακά συστατικά, αποδείχθηκε ιδιαίτερα επίπονη. Έπειτα από δοκιμές διάφορων τρόπων αναστολής (π.χ πεπτιδομιμητικά μόρια, μη συναγωνιστικοί και αλλοστερικοί αναστολείς), η στόχευση της καταλυτικής θέσης των κινάσεων με ATP συναγωνιστικούς αναστολείς, φαίνεται να είναι η περισσότερο υποσχόμενη προσέγγιση στην ανακάλυψη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων. Ωστόσο υπάρχουν δύο κυρίως μεγάλα εμπόδια που πρέπει να υπερνικηθούν: πρόσβαση στην ενδοκυττάρια περιοχή και επιλεκτικότητα της αναστολής [131,132]. Λαμβάνοντας υπ' όψη ότι υπάρχουν περίπου 600 πρωτεϊνικές κινάσες, δεν προκαλεί έκπληξη ότι η



επιλεκτικότητα αποδείχθηκε το μεγαλύτερο εκ των δύο προβλημάτων. Η συγγένεια αλλά και η απόκλιση μεταξύ των θέσεων πρόσδεσης του ATP, επέτρεψε την ανάπτυξη μοντέλων ορθολογικού σχεδιασμού φαρμάκων. Η πρόσφατη ανάπτυξη στην κρυσταλλοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών (είναι διαθέσιμες πάνω από πενήντα κρυσταλλικές δομές), επιβεβαίωσε ότι η περιοχή πρόσδεσης του ATP είναι πράγματι ένας ελκυστικός στόχος για το σχεδιασμό φαρμάκων.

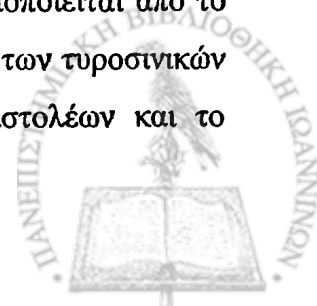
Η θέση πρόσδεσης του ATP

Το ATP προσδέεται στις πρωτεϊνικές κινάσες, μέσα σε μια βαθιά κοιλότητα που σχηματίζεται μεταξύ των δύο ενδοκυττάρων προεξοχών τους. Εκτός από το οδοντωτό υδρογονικών δεσμών μοτίβο "δότης-δέκτης", που εντοπίζεται στην εύκαμπτη περιοχή του υποδοχέα, οι αλληλεπιδράσεις με τα νουκλεοτίδια είναι λιποφιλικής και Van Der Waals φύσης [133]. Παρά το γεγονός ότι η θέση πρόσδεσης του ATP είναι υψηλώς διατηρημένη μεταξύ των πρωτεϊνικών κινασών, η αρχιτεκτονική των περιοχών που βρίσκονται κοντά στη θέση πρόσδεσης του ATP, παρουσιάζει σημαντική διαφοροποίηση. Η θέση πρόσδεσης του ATP, για καθαρά πρακτικούς λόγους, διακρίνεται από τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

α) Περιοχή αδενίνης. Αυτή η υδρόφοβη περιοχή, περιέχει δύο σημαντικούς υδρογονοδεσμούς, που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση των N-1 και N-6 αμινομάδων του δακτυλίου της αδενίνης, με την ομάδα NH και τις καρβοξυλομάδες, της εύκαμπτης περιοχής της πρωτεϊνικής κινάσης. Πολλοί πιθανοί αναστολείς, χρησιμοποιούν τουλάχιστον έναν από αυτούς τους δύο υδρογονοδεσμούς. Παρόλο που η περιοχή αυτή δεν χρησιμοποιείται από το ATP, μερικές καρβοξυλομάδες από την εύκαμπτη περιοχή της κινάσης (περιοχή 123 της πρωτεϊνικής κινάσης A, PKA), μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως δέκτες υδρογονοδεσμού, για την αναστολή της πρόσδεσης του ATP.

β) Περιοχή σακχάρου. Στις περισσότερες πρωτεϊνικές κινάσες αυτή η περιοχή είναι υδρόφοβη, εκτός του EGFR. Αυτή η διαφορετικότητα του EGFR, έδωσε την ευκαιρία για ανάπτυξη αναστολέων με μεγάλη ειδικότητα και εξειδίκευση.

γ) Υδροφοβική "τσέπη", ή "τσέπη" επιλογής. Η "τσέπη" δεν χρησιμοποιείται από το ATP, όμως μελετάται για τους περισσότερους από τους αναστολείς των τυροσινικών κινασών. Παίζει σημαντικό ρόλο στην επιλεκτικότητα των αναστολέων και το



μέγεθός της ρυθμίζεται από δύο αμινοξικά κατάλοιπα των θέσεων 120 και 183 της PKA.

δ) Υδροφοβικό δίκτυο. Το δίκτυο αυτό, είναι μια σχισμή που ανοίγει σε διαλύτες. Δεν χρησιμοποιείται από το ATP, όμως μελετάται γιατί μπορεί να προσδώσει αυξημένη συγγένεια πρόσδεσης.

ε) Περιοχή πρόσδεσης φωσφορικών. Η περιοχή αυτή, είναι η λιγότερο σημαντική ως προς τη συγγένεια πρόσδεσης, εξαιτίας της υψηλής έκθεσής της σε διαλύτες. Όμως, είναι ιδιαίτερος χρήσιμη για τη βελτίωση της εκλεκτικότητας ή και για την αύξηση επιπλέον συγγένειας. Η τριφωσφορική ομάδα του ATP δεσμεύεται από μια "θηλιά" πλούσια καταλοίπων γλυκίνης, η οποία αποπρωτονιώνει την υδροξυλομάδα που είναι και ο τελικός φωσφορικός αποδέκτης, κατά την καταλυτική διεργασία [133,134].

Σύμφωνα με τα παραπάνω μοντέλα, η ανάπτυξη ενός φαρμάκου που μπορεί να στοχεύσει ειδικά μία και μόνο τυροσινική κινάση, θεωρείται αδύνατη. Θα πρέπει λοιπόν να δοθεί ιδιαίτερη έμφαση, σε μόρια που μπορούν να έχουν ένα λογικό ανασταλτικό προφίλ με ικανή εκλεκτικότητα, έτσι ώστε η αναπόφευκτη αναστολή και άλλων συγγενικών κινασών, να ανήκει στις αποδεκτές "παρενέργειες" του φαρμάκου.

1.3.4 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ErbB

Η σηματοδότηση μέσω των RPTKs, απαιτεί τον ολιγομερισμό των υποδοχέων, μετά τη σύνδεση του κατάλληλου προσδέματος. Ακολουθεί τυροσινική αυτοφωσφορυλίωση των ενδοκυττάρων υπομονάδων του υποδοχέα, ενεργοποίηση της καταλυτικής ενεργότητας και δημιουργία φωσφορυλιωμένων τυροσινικών καταλοίπων. Πάνω στις ενεργοποιημένες φωσφοτυροσίνες προσδένονται ειδικά κυτταροπλασματικές σηματοδοτικές πρωτεΐνες που περιέχουν δομές με ομολογία Src-2 και δομές πρόσδεσης τυροσινών [125,135]. Τριάντα περίπου RPTKs, εμπλέκονται σε διάφορους τύπους καρκίνου, η απορρύθμιση όμως του συστήματος EGFR, φαίνεται να είναι η επικρατέστερη. Ο EGFR γνωστός ως και ErbB1, ανήκει στην οικογένεια συγγενών υποδοχέων όπως και οι ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) και ErbB4 (HER4). Οι υποδοχείς αυτοί, ενεργοποιούνται από κοινά προσδέματα και σχηματίζουν όμο- και ετεροδιμερή, αποτελώντας την αρχή διαφορετικών σηματοδοτικών ενδοκυττάρων μονοπατιών [129,136]. Η μεγαλύτερη παρατηρούμενη ικανότητα του HER2 να σχηματίζει ετεροδιμερή, μπορεί να εξηγηθεί γιατί η HER2 υπρέκφραση που επάγει διμερισμό ανεξάρτητο του προσδέτη, έχει



συσχετισθεί με πτωχή πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Η ενεργοποίηση του EGFR έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει την κυτταρική διαίρεση, επάγει την απόκριση αγγειογενετικών παραγόντων (π,χ VEGF, IL-8), μειώνει την απόπτωση και αυξάνει την κινητικότητα [129,136].

Εξαιτίας της συμμετοχής του στην ανάπτυξη διαφόρων ειδών νεοπλασιών, όπως μαστού, πνεύμονα, παχέος εντέρου, ωθηκών κεφαλής και τραχήλου, το σύστημα EGFR, έχει απλεχθεί ως πρωτότυπος στόχος για την ανάπτυξη νέων "έξυπνων" φαρμάκων.

1.4 EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor): Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

Ο υποδοχέας του αυξητικού επιδερμικού παράγοντα (EGFR), είναι ένας υποδοχέας με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης (tyrosine kinase receptor, TKR) που ανήκει στην οικογένεια υποδοχέων ErbB, η οποία συχνά είναι διαφοροποιημένη σε επιθηλιακούς καρκίνους [136]. Η επιλεκτική διακοπή της EGFR σηματοδότησης μέσω νεοαναπτυχθέντων παραγόντων, αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο έρευνας και μπορεί να αποτελέσει αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση ιδιαίτερος στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Non-small-cell lung cancer NSCLC).

Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί περίπου 518 κινάσες, εκ των οποίων οι 90 είναι τυροσινικές κινάσες και 43 είναι τύπου τυροσινικής κινάσης [137].



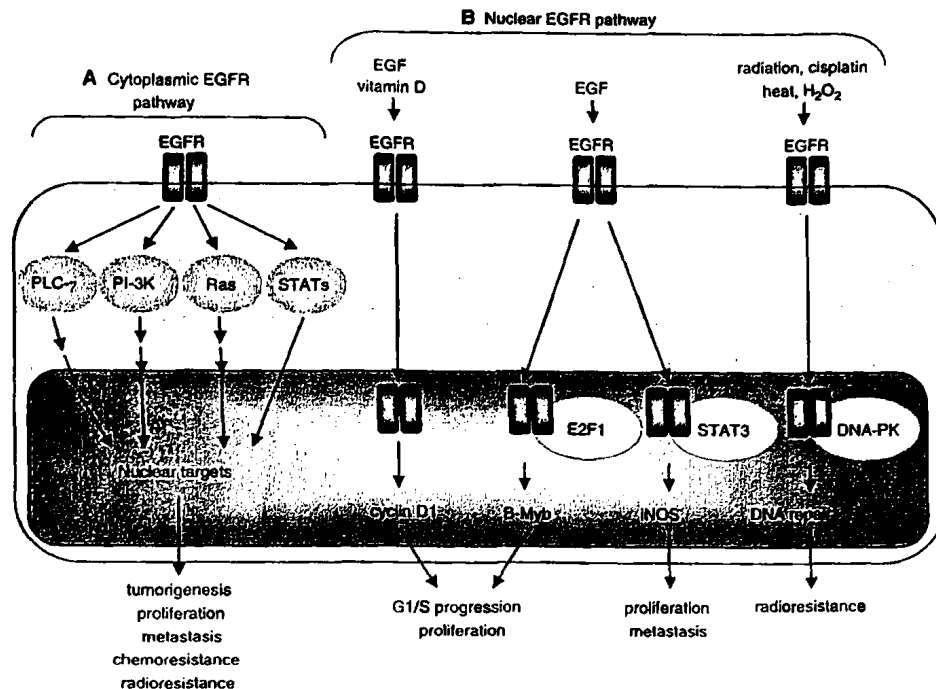
Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της πρωτεϊνικής δομής του υποδοχέα EGFR.



Ο EGFR-a μεγέθους 170-kDa (1186 αμινοξέα), είναι μια πρωτεΐνη συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη που κωδικοποιείται από 28 εξόνια, τα οποία αντιστοιχούν σε περίπου 190,000 νουκλεοτίδια που ανευρίσκονται στο χρωμόσωμα 7p12. Ο EGFR-a, είναι μέλος της οικογένειας των τυροσινικών κινασών, που αποτελούν υποοικογένεια των τεσσάρων στενά συνδεδεμένων υποδοχέων: HER-1/ErbB1, HER-2/neu/ErbB2, HER-3/ErbB3 και HER-4/ErbB4. Δομικά, κάθε υποδοχέας αποτελείται από μια εξωκυττάρια περιοχή στον οποία προσδένεται ο συνδέτης, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυττάρια περιοχή.

Όλα τα μέλη της οικογένειας έχουν ενδοκυττάρια ενεργότητα τυροσινικής κινάσης, εκτός του ErbB3 [137,138]. Σε ανενεργή μορφή, όλοι οι υποδοχείς βρίσκονται με τη μορφή μονομερούς. Μετά την πρόσδεση του συνδέτη, όπως του αυξητικού επιδερμικού παράγοντα (EGF) και του α-μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα (α-TGF), οι υποδοχείς υφίστανται διαμορφωτικές αλλαγές που διευκολύνουν τον όμο- ή έτερο- διμερισμό τους [139]. Ο επαγόμενος του αυξητικού παράγοντα διμερισμός του EGFR, ακολουθείται από ενδομοριακή αυτοφωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης που ανευρίσκονται στο βρόγχο της καταλυτικής περιοχής. Στη συνέχεια, σηματοδοτικά μόρια που έχουν περιοχές κατάλληλες για δέσμευση σε κατάλοιπα τυροσίνης, προσδένονται στο καρβοξυτελικό άκρο των φωσφορυλιωμένων τυροσινών και ενεργοποιούν με τη σειρά τους άλλες πρωτεΐνες της ενδοκυττάριας σηματοδοτικής οδού. Τα μονοπάτια ενεργοποίησης μέσω EGFR, συμπεριλαμβάνουν τους Akt και STAT (signal transducer and activator of transcription) σηματοδοτικούς καταρράκτες υπεύθυνους για την κυτταρική επιβίωση και τον MAPK (mitogen activated protein kinase) καταρράκτη, ο οποίος επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [140,141].





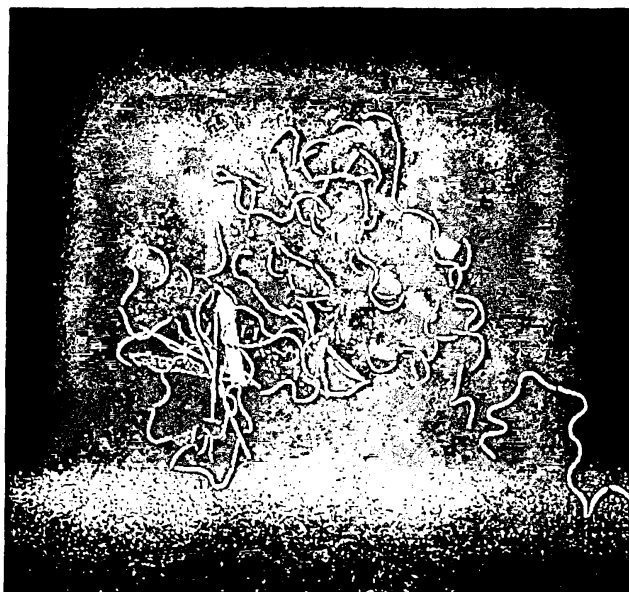
Εικόνα 4: Διαγραμματική απεικόνιση των οδών ενεργοποίησης του EGFR

1.4.1 Η ΟΡΘΟΛΟΓΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ EGFR

Στις αρχές του 1960, απομονώθηκε μια πρωτεΐνη από τους υπογνάθιους αδένες επίμυων που επιτάχυνε την έκφυση των κοπτήρων και της διάνοιξης των οφθαλμών σε νεογέννητα ζώα [142]. Η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε αυξητικός επιδερμικός παράγοντας (EGF). Είκοσι χρόνια αργότερα, έρευνες πάνω στον υποδοχέα του EGF απέδειξαν ότι ο υποδοχέας αυτός, εμφανίζει δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση [143-145]. Επιπλέον βρέθηκε ότι α) ο EGFR είναι προϊόν πρωτοογκογονιδίου, ικανού να επάγει καρκίνο όταν μετατραπεί σε ογκογονίδιο, β) εκφράζεται σε πολλούς καρκινικούς τύπους σε αυξημένα επίπεδα σε σχέση με την έκφρασή του σε φυσιολογικούς ιστούς [146] και γ) η χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά του EGFR μπορούσαν να αναστείλουν την δράση του [147]. Από τη στιγμή που ο EGFR αποδείχθηκε ότι συντελεί με σημαντικό τρόπο στην καρκινογένεση, γεννήθηκε η ιδέα ότι η στόχευση του υποδοχέα αυτού θα μπορούσε να είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος θεραπείας καρκίνων που εκφράζουν τον EGFR [148]. Τελικά η ιδέα αυτή, οδήγησε στην ανάπτυξη νέας στοχευμένης αντικαρκινικής



θεραπείας με τη χρήση μικρών μορίων-αναστολέων τυροσινικής κινάσης του EGFR όπως είναι η γεφτινίβη και η ερλοτινίβη.



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση πρωτεϊνικής δομής του EGFR υποδοχέα κατά την αναστολή του με ερλοτινίβη

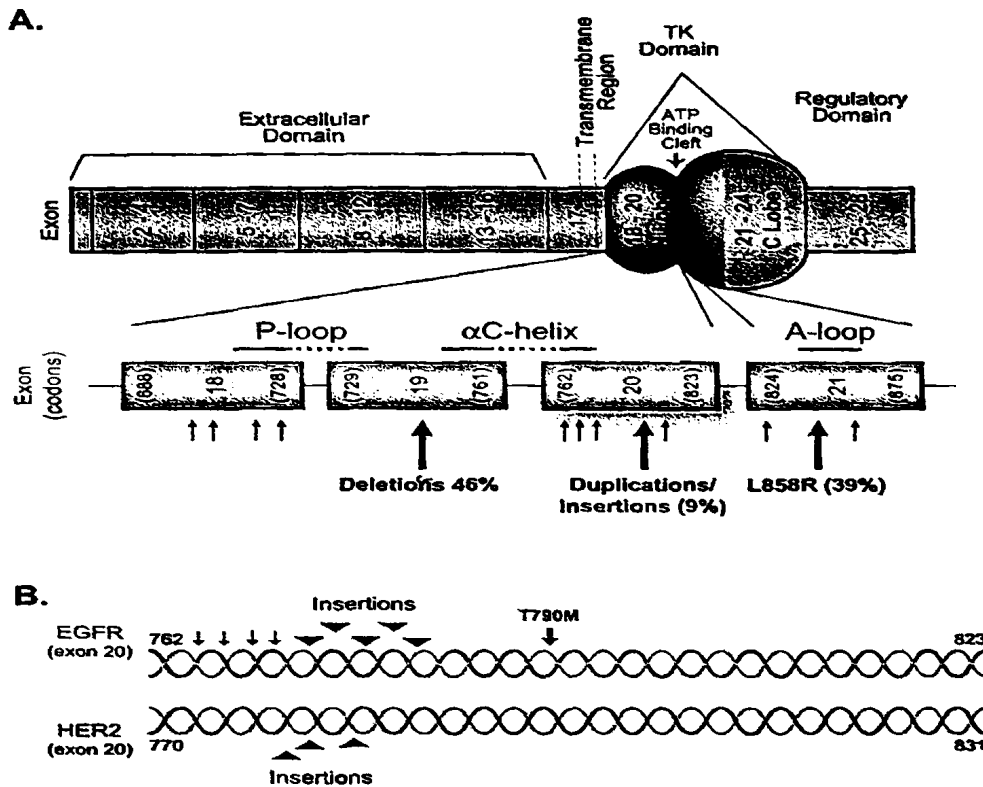
1.4.2 ΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΕΞΕΛΕΓΚΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ EGFR

Ο υποδοχέας EGFR επάγει την καρκινογένεση μέσω τεσσάρων κυρίως μηχανισμών: α) υπερέκφρασης του EGF, συνδεδεμένο μόριο του EGFR, [149] β) γονιδιακής ενίσχυσης του EGFR [150,151] γ) ενεργοποιητικών μεταλλάξεων του EGFR και δ) μεταγραφικής ρύθμισης από πολυμορφική αλληλουχία του γονιδίου EGFR [152]. Στα γλοιώματα έχουν ταυτοποιηθεί επτά κατηγορίες μεταλλαγμένων μορφών του EGFR (vI-vVII), στα οποία συνήθως έχει συμβεί εξάλειψη συγκεκριμένων εξονίων που κωδικοποιούν μέρος της εξωκυττάριας περιοχής του EGFR [153].

Το αποτέλεσμα της απώλειας αυτής, είναι η δομική ενεργοποίηση του υποδοχέα κατά τρόπο ανεξάρτητο του συνδέτη (ligand-independent) και κατ'επέκταση μη ελεγχόμενη ενεργοποίηση σηματοδοτικών οδών και αποφυγή αποπτωτικών μηχανισμών. Η μεταλλαγμένη μορφή EGFRvIII είναι η συχνότερη μορφή που ανιχνεύεται σε ποσοστό άνω του 50% σε γλοιοβλαστώματα που φέρουν γονιδιακή ενίσχυση του EGFR. Στη μορφή αυτή έχει συμβεί μια, εντός του πλαισίου ανάγνωσης, απαλοιφή 2-7 εξονίων (801 bp) που αντιστοιχούν στην εξωκυττάρια



περιοχή του υποδοχέα, με αποτέλεσμα την αδιάκοπη ενεργοποίησή του. Επιπλέον έχουν περιγραφεί και άλλες μεταλλαγμένες μορφές του EGFR με διαδοχικούς διπλασιασμούς τμημάτων είτε της ενδοκυττάριας, είτε της εξωκυττάριας περιοχής του υποδοχέα [153,154].



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση εξονίων και συχνότερων γενετικών τροποποιήσεων του EGFR γονιδίου

Πρόσφατα δεδομένα, που δημοσιεύθηκαν σχεδόν ταυτόχρονα από δύο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες, αναφέρουν ότι η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο EGFR, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο για τον διαχωρισμό ασθενών σε αυτούς που θα απαντήσουν και σε αυτούς που δεν θα απαντήσουν σε στοχευμένη θεραπεία κατά του συγκεκριμένου υποδοχέα [155,156]. Συγκεκριμένα, οι Lynch και συν., βρήκαν ετερόζυγες μεταλλάξεις εντός της περιοχής τυροσινικής κινάσης του EGFR, σε οκτώ από εννέα όγκους ασθενών που απάντησαν στη θεραπεία με γεφιτινίβη. Εν αντιθέσει, ουδεμία μετάλλαξη ανιχνεύθηκε σε επτά ασθενείς που δεν απάντησαν στη θεραπεία [155]. Οι Paez και συν., βρήκαν ότι πέντε όγκοι από πέντε ασθενείς που απάντησαν στη θεραπεία με γεφιτινίβη, έφεραν μεταλλάξεις στην

περιοχή κινάσης του EGFR, ενώ όγκοι ασθενών που είχαν πρόοδο νόσου παρά τη χρήση γεφιτινίβης, είχαν αλληλόμορφα φυσικού τύπου για το γονίδιο EGFR [156]. Και στις δύο μελέτες, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ολόκληρης της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του γονιδίου EGFR, ωστόσο γενετικές αλλαγές ανιχνεύθηκαν μόνο στα εξόνια 18, 19 και 21, καθιστώντας τα έτσι γνωστά ως θερμά σημεία (hot spots) ανίχνευσης μεταλλάξεων για μελλοντικές μοριακές μελέτες.

Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα των ανωτέρω, οι Marchetti και συν., πραγματοποίησαν ανάλυση των εξονίων αυτών σε 860 ασθενείς με NSCLC χρησιμοποιώντας ως τεχνική γονιδιακού screening την PCR/Single Stranded Conformational Polymorphism [157]. Σε 454 πλακώδη καρκινώματα δεν ανευρέθηκε ουδεμία μετάλλαξη, ενώ τριάντα εννέα συνολικά μεταλλάξεις βρέθηκαν σε 375 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονος (10%). Όλες οι μεταλλάξεις που ταυτοποιήθηκαν δεν ανευρέθηκαν σε υγιή παρακείμενο πνευμονικό ιστό των πασχόντων ασθενών. Από το σύνολο των μεταλλάξεων οι δέκα οκτώ (46%) ήταν μεταλλάξεις στο εξόνιο 19, επίσης δέκα οκτώ (46%) στο εξόνιο 21 και τρεις (8%) στο εξόνιο 8. Οι συχνότερες μεταλλάξεις που παρατηρήθηκαν, ήταν η μετάλλαξη υποκατάστασης στο εξόνιο 21 και στη θέση 2573 του εξονίου μιας κυτοσίνης από γουανίνη (2573 T>G) με αποτέλεσμα την υποκατάσταση λευκίνης από αργινίνη στη θέση 858 της μεταφραζόμενης mRNA αλληλουχίας (L858R)

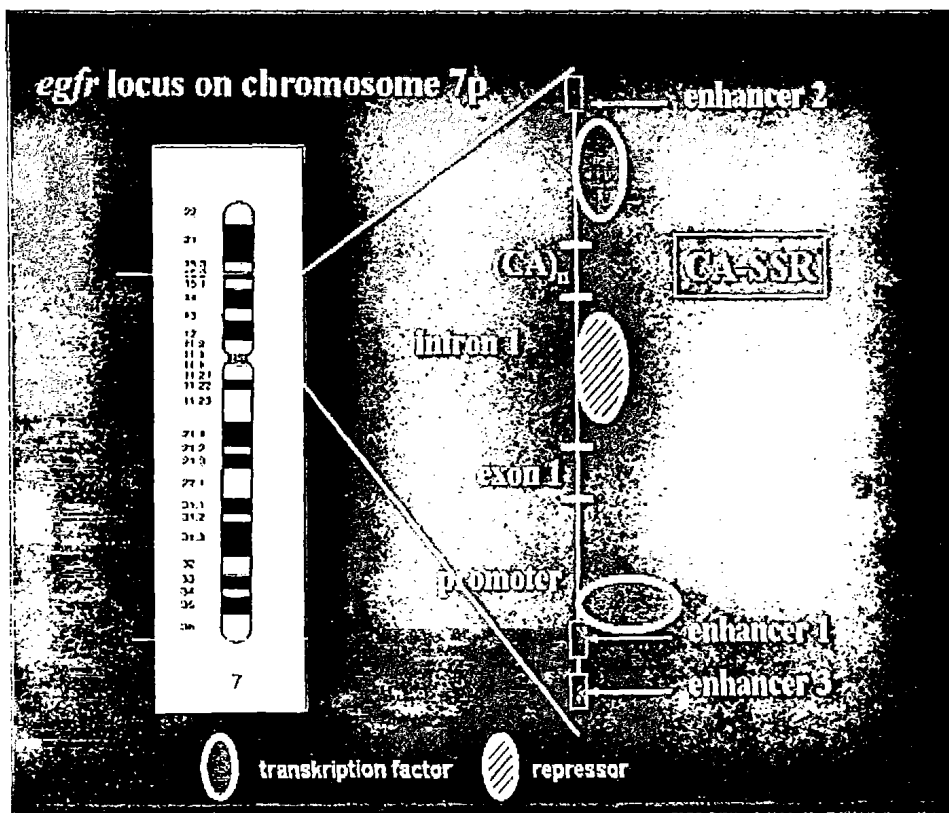
1.4.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ ΤΟΥ EGFR ΓΟΝΙΔΙΟΥ, ΑΠΟ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΙΝΟΥΚΛΕΟΤΙΑΙΚΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΣΤΟ ΙΝΤΡΟΝΙΟ 1

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους 170kDa, η οποία μετά την πρόσδεση του κατάλληλου συνδέτη, ενεργοποιεί την κυτταρική αύξηση [159,159]. Έχει βρεθεί ότι ο εν λόγω υποδοχέας εκφράζεται τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε κακοήθεις κυτταρικούς τύπους [160]. Ωστόσο η υπερέκφραση και μόνο του EGFR είναι ικανή να μετασηματίσει NIH 3T3 κύτταρα, με τρόπο επαγόμενο του EGF [161,162]. Τα επίπεδα έκφρασης του EGFR ρυθμίζονται κυρίως μέσω της παραγόμενης ποσότητας του mRNA [163,164]. Η μεταγραφή του γονιδίου μπορεί να ξεκινήσει από πολλές θέσεις έναρξης μέσα στον προαγωγό του γονιδίου, ο οποίος αποτελεί μια περιοχή



α σε γουανίνη και κυτοσίνη που στερείται όμως πλαισίων CAAT ή TATA

Έχει αποδειχθεί ότι το πρώτο ιντρόνι πολλών γονιδίων, λαμβανομένου και του EGFR, εμφανίζει σημαντική ρυθμιστική λειτουργία αφορά τη μεταγραφική δραστηριότητα [166]. Έχουν ταυτοποιηθεί δύο κικά στοιχεία με δράση συνέργειας ανοδικά του προαγωγού και καθοδικά του ου 1 του γονιδίου [167]. Κοντά στο καθοδικό στοιχείο ενίσχυσης, οήθηκε μια πολυμορφική, απλή επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (Simple ice Repeat, SSR), μεγέθους 14-21 επαναλαμβανόμενων δινουκλεοτιδίων ης-αδενίνης (CA) με ετεροζυγωτία σε ποσοστό 72% στον Καυκάσιο μό [168]. Είχε ήδη αποδειχθεί για το γονίδιο καρβοξυλάσης του ακέτυλο-μου Α, ότι μια CA επαναλαμβανόμενη περιοχή σε μια εκ των δύο περιοχών αγωγού, μπορούσε να μειώσει τη δράση του [169]



7: Σχηματική απεικόνιση της CA-SSR επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας στον τόπο 7p.



Στηριζόμενοι στα ανωτέρω, αλλά και στο γεγονός ότι υπάρχει καθοδικό στοιχείο ενίσχυσης του γονιδίου EGFR πολύ κοντά σε περιοχή επαναλαμβανόμενων δινουκλεοτιδίων CA εντός του ιντρονίου 1, δημιουργήθηκε η υπόθεση ότι οι διαφοροποιήσεις στον αριθμό των CA επαναλήψεων θα μπορούσαν να είναι μερικώς υπεύθυνες για τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του πρωτο-ογκογονιδίου EGFR. Οι Gebhardt και συν. μελέτησαν *in vitro* την επιρροή του αριθμού των CA-SSR, στην μεταγραφική δραστηριότητα του EGFR και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μεταγραφική ενεργότητα ελαττώνεται, όσο αυξάνεται ο αριθμός των CA δινουκλεοτιδίων [152]. Συγκεκριμένα, απέδειξαν ότι η μεταγραφή του γονιδίου EGFR μειώνεται κατά 80% σε αλληλία με 21 CA επαναλήψεις, σε σχέση με τη μεταγραφική ενεργότητα των αλληλίων με 16 CA επαναλήψεις.

Ο ρόλος του μήκους της CA παλίνδρομης αλληλουχίας στην μεταγραφική ρύθμιση, μπορεί να διευκρινιστεί με τη βοήθεια ιδιοτήτων του DNA που επηρεάζουν την κάμψη της περιοχής του καθοδικού στοιχείου ενίσχυσης του γονιδίου EGFR. Γενικά, η κάμψη του DNA κατά τρόπο άμεσα συνδεδεμένο με την αλληλουχία του, επηρεάζει πληθώρα βιολογικών φαινομένων, όπως η αντιγραφή του DNA, ο τοπικός ανασυνδυασμός και η μεταγραφή [170]. Αναλύσεις της δομής της έλικας [171,172] στην περιοχή CA-SSR και στις αμφίπλευρες αλληλουχίες, υποδεικνύουν ότι η επανάληψη δινουκλεοτιδίων καθιστούν αυτή τη συγκεκριμένη περιοχή της αλληλουχίας εξαιρετικά ευλύγιστη. Όσο μεγαλύτερο το μήκος της CA αλληλουχίας, τόσο μεγαλύτερη η ικανότητα κάμψης της περιοχής. Έτσι το DNA μπορεί να πάρει μια δευτεροταγή διαμόρφωση η οποία είναι ικανή να ενισχύσει ή να αποτρέψει την πρόσδεση ενός μεταγραφικού παράγοντα κοντά στο γειτνιάζον στοιχείο ενίσχυσης. Με τον τρόπο αυτό, μια μεταγραφικά ενεργή πρωτεΐνη που προσδένεται καθοδικά της CA-SSR περιοχής μπορεί να λειτουργήσει ως ρυθμιστικό στοιχείο για τη μεταγραφική δραστηριότητα του EGFR.

1.4.4 ΜΙΚΡΟΜΟΡΙΑΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ (TKIS) ΤΟΥ EGFR

Γεφιτινίβη (Gefitinib)

Στην αρχή της δεκαετίας του 1990, η ανακάλυψη της δομής και του καταλυτικού μηχανισμού της φυσικού τύπου τυροσινικής κινάσης του EGFR,

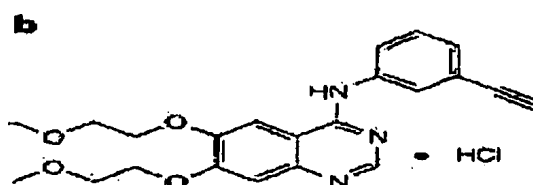


οδήγησε στην ταυτοποίηση μιας νέας κατηγορίας TKIs [173]. Η πρώτη δραστική ουσία που χρησιμοποιήθηκε, είχε *in vitro* ενεργότητα ($IC_{50} = 50 \text{ nM}$) έναντι των κυττάρων στοματικού καρκίνου και *in vivo* ενεργότητα έναντι των A431 καρκινικών αλλομοσχευμάτων σε ποντίκια, ωστόσο μεταβολιζόταν ταχύτατα ($t_{1/2} = 1 \text{ hour}$). Δομικές αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν για να ενισχύσουν την *in vivo* ενεργότητα και σταθερότητα, οδήγησαν στην ανάπτυξη του ZD1839 (gefitinib; 4-quinazolinamine, N-[3-chloro-4-fluorophenylamino]7-methoxy-6-[3-(4-morpholinyl)propoxy])), το οποίο επιτύχανε υψηλά και σταθερά επίπεδα στο αίμα για περίοδο μεγαλύτερη των εικοσιτεσσάρων ωρών.

Εκλεκτικότητα της γεφτινίβης περιγράφηκε μόνο για επτά από τις 133 κινάσες τυροσινικού τύπου που κωδικοποιούνται από το ανθρώπινο γένωμα. Σε προκλινικές μελέτες κυτταρικών σειρών και καρκινικών αλλομοσχευμάτων, η γεφτινίβη προκαλούσε αναστολή αύξησης διαφόρων συμπαγών τύπων καρκίνου συμπεριλαμβάνοντας καρκίνο του προστάτη, πνεύμονα, μαστού και ωοθηκών [174]. Η γεφτινίβη βρέθηκε επιπλέον να ενισχύει την αντικαρκινική ιδιότητα κυτταροτοξικών παραγόντων [175,176], ακτινοβολίας [177,178] και ορμονικής θεραπείας [179].

Ερλοτινίβη (Erlotinib)

Η ερλοτινίβη, παράγωγο της quinalozone, είναι ένας επίσης από του στόματος διαθέσιμος ATP-συναγωνιστικός αναστολέας της φυσικού τύπου τυροσινικής κινάσης του EGFR ([6,7-bis (2-methoxyethoxy)-quinazolin-4-yl][3-ethylphenyl] amine) [180].



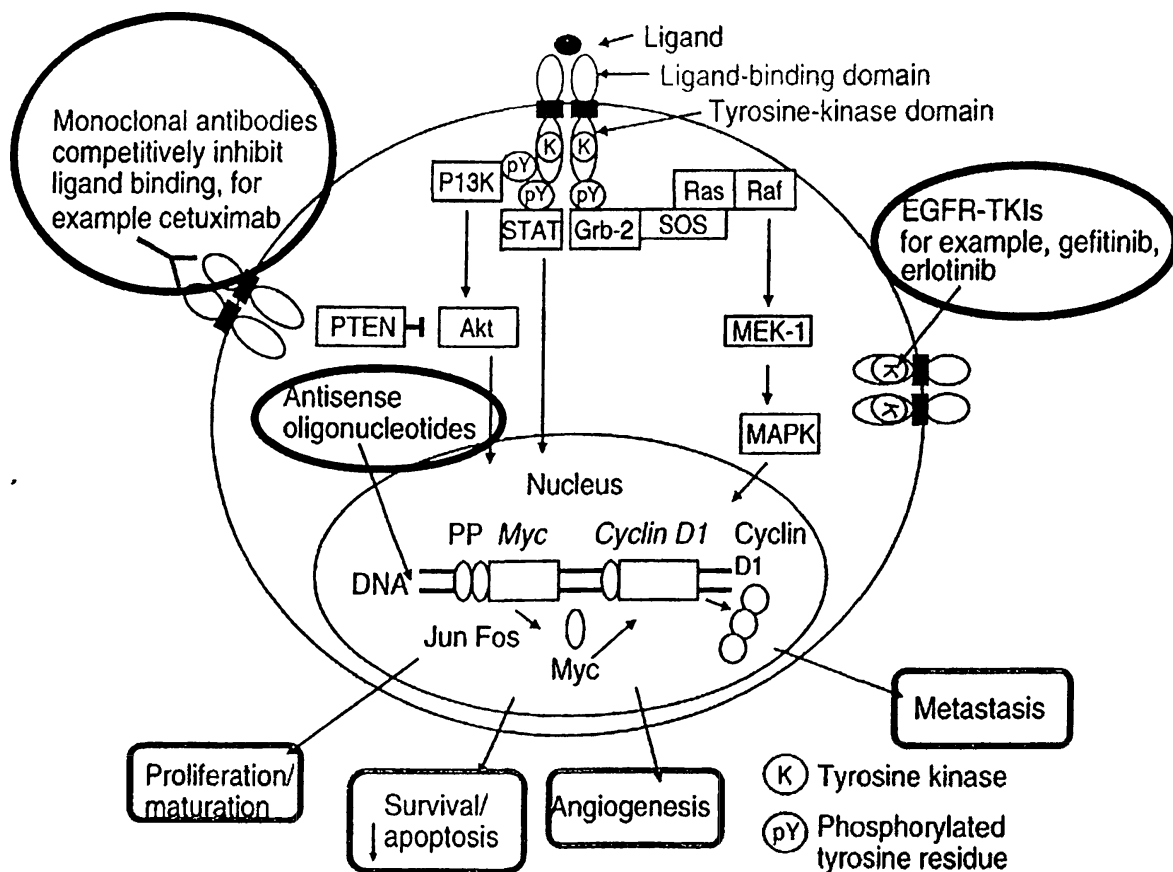
Erlotinib hydrochloride

N-[3-ethylphenyl]-6,7-bis
(2-methoxyethoxy)-4-quinazolinamine;
 $C_{22}H_{23}N_3O_4 \cdot HCl$;
 $M_r = 429.90$;
CAS registry number: 183319-69-9

Εικόνα 8: Χημική δομή ερλοτινίβης



Όμοια με την γεφιτινίβη, η ερλοτινίβη, αναστέλλει την φωσφορυλίωση του EGFR και καθυστερεί την ανάπτυξη των όγκων σε καρκινικά αλλομοσχεύματα. In vitro μελέτες με DiFi κύτταρα (κυτταρική σειρά ορθοκολικού καρκίνου), έδειξαν ότι η ερλοτινίβη σταματά τον κυτταρικό κύκλο στην G1 φάση και αυξάνει την απόπτωση [181]. Αναλύσεις για την ειδικότητα της ερλοτινίβης, απέδειξαν ότι εμφανίζει μεγάλη ειδικότητα για τυροσινικές κινάσες όπως είναι οι: SRC, LCK, PDGFR, FAK, MET, CFS1R και ο IGFR, ενώ υποδεκαπλάσια ειδικότητα παρατηρήθηκε για τους υποδοχείς ErbB2 και VEGFR [182,183].



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση των αναστολέων και του ενδοκυττάριου σήματος του EGFR γονιδίου



1.4.5 ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΣΤΟ EGFR ΠΡΟΚΑΛΕΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ TKIS.

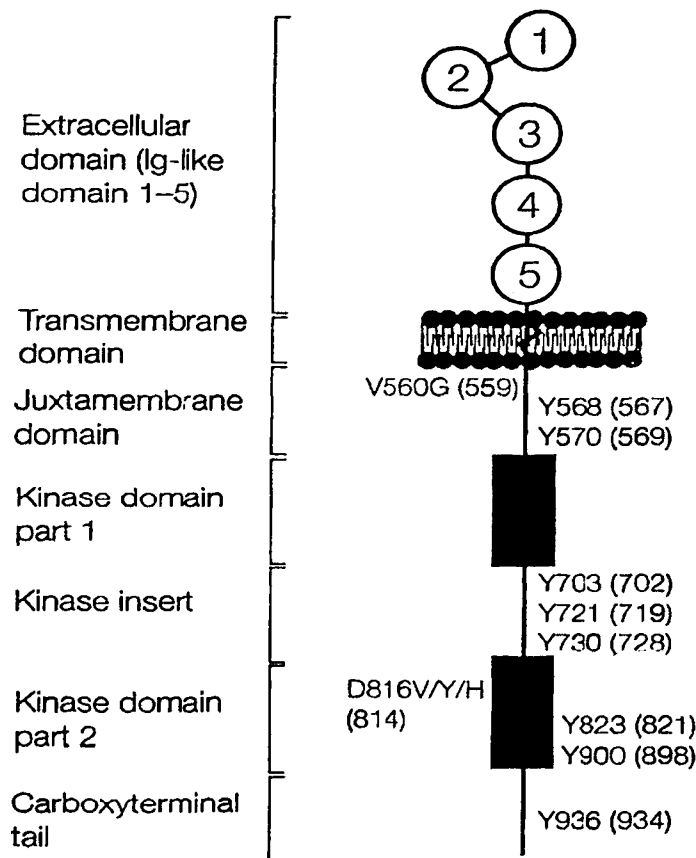
Οι σωματικές ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στα εξόνια που κωδικοποιούν την περιοχή τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα EGFR, εμφανίζονται σε ποσοστό περίπου 10% στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) σε ασθενείς των Ηνωμένων Πολιτειών [183] ενώ το ποσοστό αυτό αυξάνει σε ασθενείς της Ανατολικής Ασίας [184-186] Το 90% των μεταλλάξεων αυτών βρίσκεται είτε με τη μορφή απαλοιφής μιας σειράς νουκλεοτιδίων, εντός πλαισίου ανάγνωσης στο εξόνιο 19, με αποτέλεσμα την εξάλειψη τεσσάρων αμινοξέων (Leu-Arg-Glu-Ala), είτε ως σημειακή μεταλλάξη στο εξόνιο 21, με αποτέλεσμα την αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της θυμίνης από αργινίνη (2573 T→G) και κατά συνέπεια την υποκατάσταση του αμινοξέως αργινίνη από λευκίνη στη θέση 858 της αμινοξικής αλληλουχίας (L858R). Και οι δύο αυτοί τύποι των μεταλλάξεων έχουν συσχετισθεί με ευαισθησία έναντι στη θεραπεία με μικρομοριακούς αναστολείς ενεργότητας τυροσινικής κινάσης όπως είναι το gefitinib και ερλοτινίβη.

Ωστόσο σε ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών που αρχικά απαντά εξαιρετικά καλά σε αγωγή με αναστολείς, στη συνέχεια, παρατηρείται προοδευτική ανθεκτικότητα και εξέλιξη της νόσου. Μεταλλάξεις του γονιδίου KRAS, έχουν συσχετισθεί σε μερικές περιπτώσεις με πρωταρχική ανθεκτικότητα έναντι στη θεραπεία με γεφτινίβη και ερλοτινίβη [187], ωστόσο, οι μηχανισμοί της δευτερογενούς ή επίκτητης ανθεκτικότητας δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Οι Pao και συν. σε μια προσπάθεια να διευκρινίσουν την επίκτητη ανθεκτικότητα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα στη γεφτινίβη και την ερλοτινίβη με επιπρόσθετες μεταλλάξεις στην περιοχή κινάσης του EGFR ανέλυσαν το γονιδιακό προφίλ των εξονίων 18 έως και 24 σε πέντε ασθενείς που αρχικά απάντησαν στη θεραπεία, μετέπειτα όμως εμφάνισαν ανθεκτικότητα και εξέλιξη της νόσου [188]. Βρέθηκε λοιπόν, ότι οι ασθενείς αυτοί έφεραν στο εξόνιο 20 μια επιπρόσθετη μετάλλαξη (2369 C→T) η οποία προκαλούσε υποκατάσταση μεθιονίνης από θρεονίνη στη θέση 790 (T790M), ενώ δεν υπήρξε σε ασθενείς οι οποίοι δεν λάμβαναν την συγκεκριμένη θεραπεία. Αν και δεν είναι θεωρείται υπεύθυνη για όλους τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας, η μετάλλαξη αυτή συσχετίστηκε με επίκτητη ανθεκτικότητα του μεταλλαγμένου υποδοχέα EGFR.



1.5 C-KIT/CD117 (Stem Cell Factor Receptor): Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΟΥ ΑΡΧΕΓΟΝΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

Το πρωτο-ογκογονίδιο c-kit, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 4q11-q12, κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 145 kDa, τον υποδοχέα c-KIT. Η πρωτεΐνη αυτή, γνωστή ως υποδοχέας του παράγοντα των αρχέγονων κυττάρων (Stem Cell Factor receptor, SCF) ή CD117, ανήκει στην οικογένεια τάξης III των υποδοχέων με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης (RPTKs) [189]. Στην τύπου III οικογένεια των RPTKs, ανήκουν εκτός του C-KIT, ο υποδοχέας του παράγοντα διέγερσης αποικιών (colony stimulating factor 1, CSF-1) και ο υποδοχέας του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (platelet derived growth factor PDGFR) α και β). Οι κινάσες αυτής της τάξης, αποτελούνται από μια εξωκυττάρια δομή που απαρτίζεται από πέντε δομές τύπου ανοσοσφαιρίνης, μια μονή διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυττάρια περιοχή η οποία φέρει δραστικότητα τυροσινικής κινάσης [190,191].



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση του υποδοχέα C-KIT. Σημειώνονται τα κατάλοιπα τυροσίνης που υφίστανται φωσφορυλίωση (με μαύρο χρώμα) καθώς και οι δύο σημαντικότερες ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του υποδοχέα (με κόκκινο χρώμα).

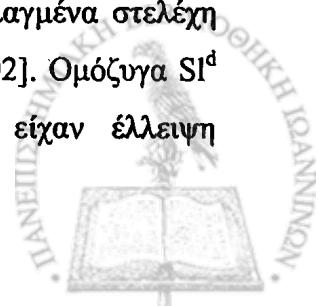


Η ενεργοποίηση του υποδοχέα C-KIT μετά την πρόσδεση του SCF, προκαλεί το διμερισμό του και την περαιτέρω ενεργοποίηση της ενδογενούς δραστηριότητας τυροσινικής κινάσης [192]. Η διαδικασία του διμερισμού φαίνεται να επάγεται από την ταυτόχρονη σύνδεση δύο μορίων SCF, σε δύο ανενεργά μονομερή του υποδοχέα [193,194]. Η τέταρτη περιοχή τύπου ανοσοσφαιρίνης της εξωκυττάριας περιοχής του KIT, έχει τον μεγαλύτερο ρόλο για την αλληλεπίδραση των δύο μονομερών του υποδοχέα [195]. Η κρυσταλλική δομή του ανθρώπινου SCF έχει καθοριστεί και πιστεύεται ότι το τμήμα που προσδέεται με τον υποδοχέα περιέχει φορτισμένες περιοχές που προσδίδουν ειδικότητα και μια υδροφοβική περιοχή που προσδίδει την απαραίτητη ενέργεια για την πρόσδεση [196,197]. Μελέτες φθορισμού για τον KIT διμερισμό σε αιμοποιητικά κύτταρα έδειξαν ότι ο παράγοντας SCF προκάλεσε ανιχνεύσιμη αύξηση διμερών εντός λίγων λεπτών μετά την ενεργοποίηση [198].

Η εσωτερίκευση του υποδοχέα είναι συνέπεια της ενεργοποίησής του και μελέτες απαλοιφής χοληστερόλης υποδηλώνουν ότι τα μεμβρανικά λιπίδια είναι απαραίτητα για τη διαδικασία αυτή [199]. Μετά την έναρξη της ενεργότητας κινάσης, τυροσινικά κατάλοιπα που βρίσκονται κυρίως εκτός της περιοχής κινάσης, φωσφορυλιώνονται και λειτουργούν ως "δεξαμενές" για σηματοδοτικά μόρια που φέρουν είτε φωσφοτυροσινικές περιοχές πρόσδεσης, είτε περιοχές με Src-2 ομολογία (SH2 domains) [199].

Η κρυσταλλική δομή της ενεργού περιοχής κινάσης του υποδοχέα KIT, έχει διευκρινιστεί πρόσφατα [200]. Η δομή υπέδειξε ότι η διαμόρφωση της περιοχής κινάσης του μη φωσφορυλιωμένου υποδοχέα φέρει πολλές ομοιότητες με αυτή του ενεργοποιημένου υποδοχέα. Συνεπώς, ο φυσικός διαχωρισμός σε μονομερή λειτουργεί πιθανώς με όμοιο τρόπο με τον μηχανισμό που αποτρέπει την αυτοφωσφορυλίωση όταν δεν υπάρχει διαθέσιμος προσδέτης. Ο διαλυτός και ο μεμβρανικός τύπος του SCF, έχουν διαφορετική επίδραση στην KIT αυτοφωσφορυλίωση. Η διέγερση με τη διαλυτή μορφή, προκαλεί ταχύτατη αλλά παροδική αυτοφωσφορυλίωση, ενώ η διέγερση με τη μεμβρανική μορφή προκαλεί παρατεταμένη φωσφορυλίωση [201].

Η διαφορετική λειτουργία του SCF *in vivo*, φάνηκε σε μεταλλαγμένα στελέχη ποντικών που εξέφραζαν μόνο τη διαλυτή μορφή του SCF (SI^d) [202]. Ομόζυγα SI^d ποντίκια, υπέφεραν από σοβαρή αναιμία, δεν ήταν γόνιμα, είχαν έλλειψη



χρωματισμού στο τρίχωμα και τα μαστοκύτταρα του δέρματος ήταν ανεπαρκή. Οι ομοζυγώτες ποντικών με εντελώς κατεστραμμένο το γονίδιο για τον SCF, πέθαιναν σε εμβρυϊκό στάδιο ή περιγεννητικά. Επιπλέον σε κυτταρική ερυθροποιητική σειρά, η ενεργοποίηση με τη μεμβρανική μορφή του SCF, προκαλούσε μεγαλύτερο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, σε σχέση με αυτή που προκαλούσε η διαλυτή μορφή. Βιοχημικές αναλύσεις απέδειξαν ότι το βιολογικό αυτό φαινόμενο, σχετίζεται με την συνεχόμενη φωσφορυλίωση του Erk1/2 και του p38 MAPK μετά την διέγερση με μεμβρανικό SCF [203].

Συνοψίζοντας, ο διμερισμός των KIT μονομερών μετά την πρόσδεση του SCF, αυξάνει τη συγκέντρωση δομών κινάσης που οδηγούν στην αυτοφωσφορυλίωση. Οι περισσότερες περιοχές τυροσινικής φωσφορυλίωσης εντοπίζονται εκτός της περιοχής κινάσης και δρουν για την περαιτέρω ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών πρωτεϊνών.

1.5.1 ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ C-KIT

Το μονοπάτι της κινάσης 3'-φωσφοϊνοσιτόλης (PI3K).

Η κινάση 3'-φωσφοϊνοσιτόλη (PI3K), φωσφορυλιώνει *in vitro* την 3'-υδροξυλομάδα του δακτυλίου ινοσιτόλης της φωσφατίδουλοϊνοσιτόλης (PtdIns), της 4'-φωσφορικής φωσφατίδουλοϊνοσιτόλης [PtdIns(4)P] και της 4,5-διφωσφορικής φωσφατίδουλοϊνοσιτόλης [PtdIns(4,5)P₂] [204]. Ωστόσο, *in vivo* το προτιμητέο υπόστρωμα είναι η [PtdIns(4,5)P₂], όπου μετά τη δράση του ενζύμου παράγεται η 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατίδουλοϊνοσιτόλη [PtdIns(3,4,5)P₃]. Η PI3K εμπλέκεται σε πολλά βιολογικά φαινόμενα κυτταρικής σηματοδότησης, όπως στη σύνθεση του DNA, την κυτταρική επιβίωση, τη χημειοταξία και τη μετανάστευση μεμβρανικών κυστιδίων και υποδοχέων επί της μεμβράνης [205]. Καθοδικοί στόχοι των 3'-φωσφολιπιδίων που δημιουργεί η PI3K είναι η κινάση σερίνης/θρεονίνης Akt και η πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Η Akt κινάση είναι σημαντική της αντιαποπτωτικής σηματοδότησης. Η περιοχή PH (Pleckstrin homology) της κινάσης Akt, αλληλεπιδρά με τα φωσφολιπίδια που δημιούργησε η PI3K, με αποτέλεσμα να μεταναστεύει προς τη μεμβράνη όπου και ενεργοποιείται από τη φωσφορυλίωση της σερίνης και της θρεονίνης [206,207].



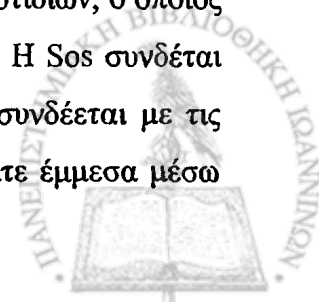
Το μονοπάτι της κινάσης JAK-STAT

Οι Janus (JAKs) κινάσες, είναι κυτταροπλασματικές τυροσινικές κινάσες που ενεργοποιούνται ταχύτατα μετά την σύνδεση του κατάλληλου παράγοντα σε υποδοχείς κυτοκινών ή RTKs. Οι πιο σημαντικοί στόχοι της ενεργοποιημένης JAK κινάσης, είναι σηματοδοτικά μόρια και ενεργοποιητές της μεταγραφής (STAT) [208]. Οι STATs αποτελούν ομάδα παραγόντων μεταγραφής, οι οποίοι αποτελούνται από μια περιοχή πρόσδεσης με το DNA, ακολουθούμενη από μια ρυθμιστική SH2 περιοχή και C-τελική περιοχή ενεργοποίησης. Ενεργοποιημένες JAKs ή RTKs, φωσφορυλιώνουν τις κυτταροπλασματικές STATs, οι οποίες με τη σειρά τους διμερίζονται και μετατοπίζονται προς τον πυρήνα. Οι πυρηνικές STATs, ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων καθώς προσδένονται στην περιοχή των προαγωγών τους. Επιπλέον οι STATs 1,3 και 5, φέρουν φωσφορυλιωμένη σερίνη στο C-τελικό τους άκρο, ρυθμίζοντας έτσι, την μεταγραφική τους ενεργότητα.

Η SCF διέγερση, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του JAK-STAT σηματοδοτικού μονοπατιού [208-211]. Μετά την πρόσδεση του SCF, οι STAT1, STAT5A και STAT 5B, συνδέονται με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα KIT, φωσφορυλιώνοντας τα κατάλοιπα τυροσίνης [212]. Ωστόσο, διαφορετικές περιοχές του υποδοχέα KIT συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των STAT1 και STAT5A/B. Η τυροσινική φωσφορυλίωση των STAT από τον SCF, έχει συσχετισθεί με αυξημένη πρόσδεση των STAT πάνω στο DNA [213,214]. Επιπλέον της τυροσινικής φωσφορυλίωσης, ο SCF φωσφορυλιώνει και την σερίνη της STAT3 [215].

Το μονοπάτι των Ras-Erk

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras-Erk, είναι κεφαλαιώδους σημασίας διαφόρων κυτταρικών απαντήσεων, όπως είναι η κυτταρική διαίρεση και η επιβίωση [216]. Η πρωτεΐνη Ras φέρει δύο διαμορφώσεις, μια ενεργή μορφή συνδεδεμένη με τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP) και μια αδρανή μορφή συνδεδεμένη με διφωσφορική γουανοσίνη (GDP). Οι RTKs ενεργοποιούν την Ras, συνδέοντάς την με την πρωτεΐνη Sos, έναν παράγοντα ανταλλάκτη γουανινικών νουκλεοτιδίων, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τους διφωσφορικούς δεσμούς της γουανοσίνης. Η Sos συνδέεται με την προσαρμοστική πρωτεΐνη Grb2, η οποία με τη σειρά της συνδέεται με τις ενεργοποιημένες RTKs μέσω της SH2 περιοχής της, είτε άμεσα, είτε έμμεσα μέσω



άλλων μορίων, όπως είναι οι SHP2 και η ShcA. Ο ενεργός υποδοχέας KIT, μεταφέρει το σύμπλοκο Grb2/Sos κοντά στη μεμβράνη, όπου επίσης βρίσκεται και η πρωτεΐνη Ras. Η ενεργοποιημένη Ras αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο και ξεκινά την ενεργοποίηση της σερίνης/θρεονίνης Raf-1 κινάσης. Η Raf-1 στη συνέχεια θα ενεργοποιήσει τις κινάσες Mek1 και Mek2. Κύτταρα που στερούνται την Raf-1 κινάση, διατηρούν την ικανότητά τους για ενεργοποίηση των Erk1/2, υποδηλώνοντας τη σύνδεση με άλλες κινάσες, όπως είναι οι A-Raf και η B-Raf. Οι μιτογόνες πρωτεϊνικές κινάσες Erk1 και Erk2, είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης, που ενεργοποιούνται διαμέσου φωσφορυλίωσης από τις Mek1/2. Οι κυτταροπλασματικοί στόχοι των Erk1/2 είναι άλλες κινάσες σερίνης-θρεονίνης, όπως η RSK, η Mnk1/2 και η φωσφολιπάση A₂. Ένα τμήμα της ενεργοποιημένης Erk και της ριβοσωμικής S6 κινάσης (RSK), μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου και φωσφορυλιώνει διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, επηρεάζοντας έτσι την μεταγραφική τους ενεργότητα.

Το μονοπάτι των SFK

Οι SFKs ανήκουν στην οικογένεια των Src πρωτεϊνικών κινασών και συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών λειτουργιών, όπως είναι η χημειοταξία, η προσκόλληση, η επιβίωση και η μετανάστευση πρωτεϊνών [217]. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι SFKs είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη και ότι η λειτουργία τους διαφέρει ανάμεσα στα μέλη της ίδιας οικογένειας.

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα KIT, προκαλεί την ραγδαία αύξηση της SFK ενεργότητας [217,218]. Συγκεκριμένα η SFK αλληλεπιδρά με τις τυροσίνες 568 και 570 της παραμεμβρανικής περιοχής του υποδοχέα, διαμέσου της SH2 περιοχής της [219]. Οι SFKs είναι σημαντικές για την εσωτερίκευση του υποδοχέα KIT, που επάγεται από τη σύνδεση με τον προσδέτη [220]. Ομοίως η SFK συμμετέχει στη δράση για την εσωτερίκευση του υποδοχέα EGFR και φαίνεται να κατέχει έναν διατηρημένο ρόλο γενικά για την εσωτερίκευση των υποδοχέων που ανήκουν στην υπεροικογένεια των RTKs [221]. Ωστόσο η συμμετοχή των SFKs στην επαγόμενη από τον υποδοχέα KIT μιτογονική δραστηριότητα δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη.



Η φωσφολιπάση Cγ

Υπάρχουν δύο μορφές φωσφολιπάσης Cγ: η PLCγ1, η οποία εκφράζεται ευρέως και η PLCγ2, η οποία εκφράζεται μόνον στα αιμοποιητικά κύτταρα. Ο ρόλος της PLCγ, έγκειται στην υδρόλυση της 4,5-διφωσφορικής-ινοσιτόλης (PIP2) σε διακυλογλυκερόλη (DAG) και 1,4,5-τριφωσφορική-ινοσιτόλη (IP3) [222]. Η DAG προσδένεται και ενεργοποιεί νέες PKCs, ενώ η IP3 επάγει την ενδοκυττάρια απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} προκαλώντας πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών που ρυθμίζονται από τα ιόντα αυτά.

Προσαρμοστικές πρωτεΐνες

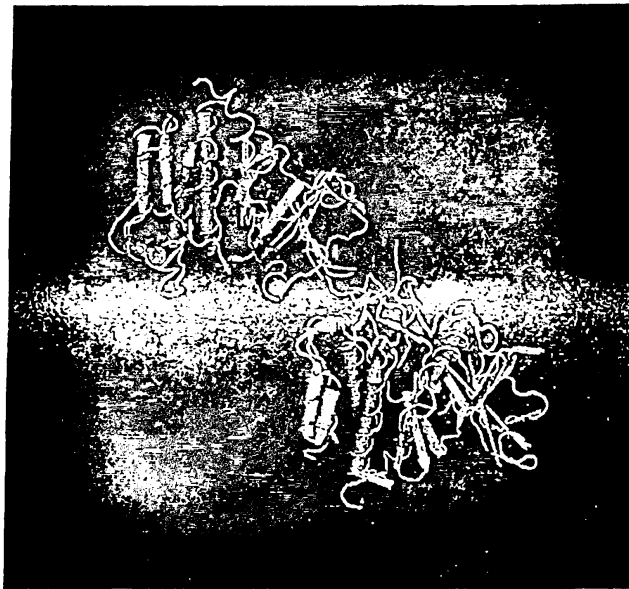
Προσαρμοστικές πρωτεΐνες ορίζονται οι πρωτεΐνες εκείνες, οι οποίες στερούνται ενζυμικής δραστηριότητας, διαθέτουν όμως την ικανότητα να αλληλεπιδρούν ταυτοχρόνως με τουλάχιστον δύο άλλες πρωτεΐνες. Η ικανότητα των πρωτεϊνών να ενώνονται σε σύμπλοκα μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, παρέχει ευέλικτους μηχανισμούς για τη ρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης.

Η Grb2 είναι μια προσαρμοστική πρωτεΐνη που εκφράζεται ευρέως και συνδέει τους RTKs υποδοχείς με τον Ras-Erk σηματοδοτικό καταρράκτη. Τα τυροσινικά κατάλοιπα 703 και 936 του υποδοχέα KIT είναι εκείνα τα οποία και αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Grb2, μέσω των SH2 περιοχών της. Ωστόσο η συμβολή της Grb2 μετά τη σύνδεσή της με τον υποδοχέα KIT στην ενεργοποίηση του Ras-Erk μονοπατιού συγκρινόμενη με τη συμβολή άλλων προσαρμοστικών πρωτεϊνών, όπως η SHP2 και η ShcA, παραμένει αδιευκρίνιστη [223-225].



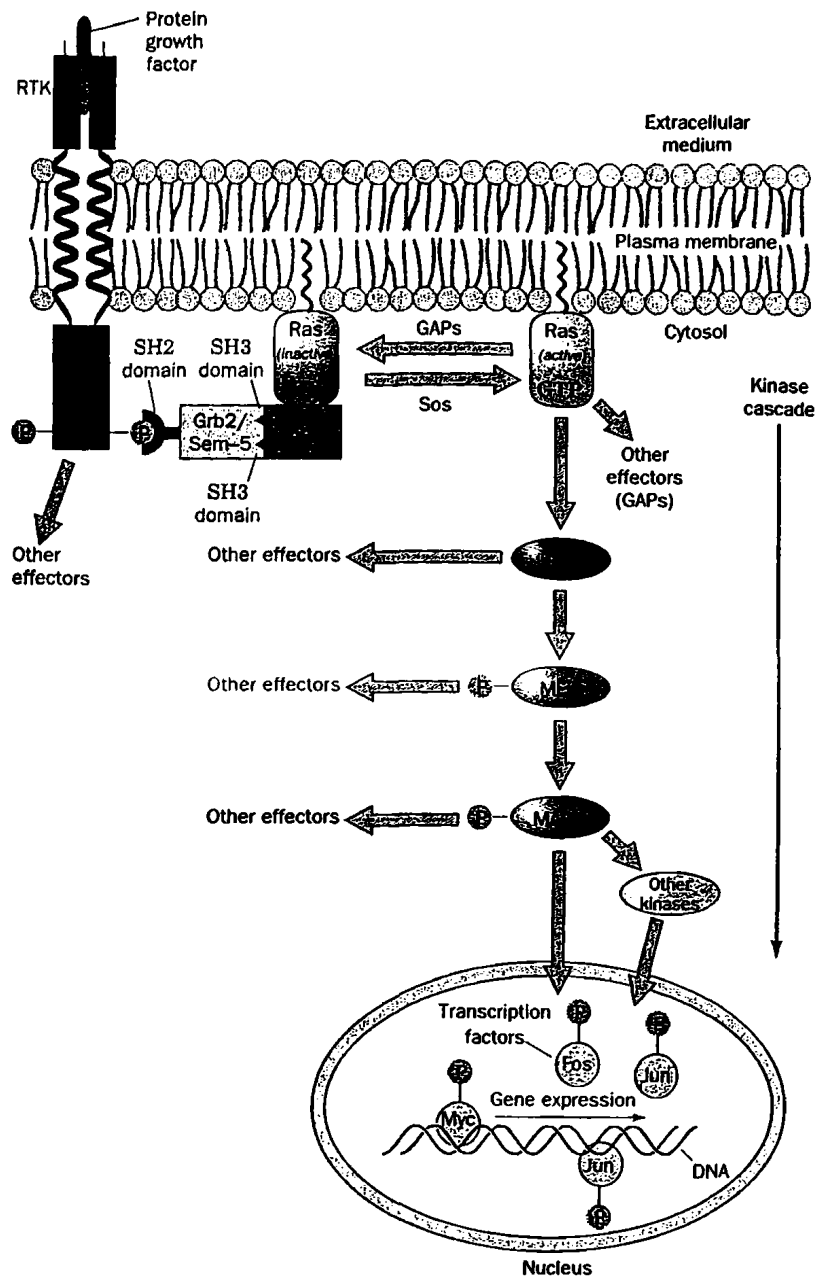
1.5.2 Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ C-KIT

Η ενεργοποίηση της δραστηριότητας τυροσινικής κινάσης, μέσω διμερισμού του υποδοχέα, πραγματοποιείται μετά τη σύνδεση του υποδοχέα με πρόσδεμά του, τον παράγοντα του αρχέγονου κυττάρου (SCF).



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της πρωτεϊνικής δομής του ενεργοποιημένου C-KIT υποδοχέα, με εμφανή τα δύο μονομερή του συμπλόκου

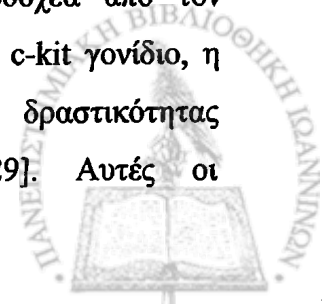
Η σύνδεση του προσδέματος προκαλεί ενεργοποίηση της δραστηριότητας κινάσης δημιουργώντας φωσφορυλιωμένους στα κατάλοιπα τυροσίνης υποδοχείς, πάνω στους οποίους προσδένονται ειδικά, πρωτεΐνες-μεταγωγείς της ενδοκυττάριας σηματοδότησης [226].



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της C-KIT ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος

Μεταλλάξεις απώλειας δραστικότητας του c-kit γονιδίου, υποδηλώνουν τη σημασία του υποδοχέα για τη φυσιολογική ανάπτυξη των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων, των μαστοκυττάρων, των μελανοκυττάρων, των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων και των ενδιάμεσων κυττάρων του Cajal [227].

Εκτός της φυσιολογικής ενεργοποίησης του c-KIT υποδοχέα από τον παράγοντα SCF, είναι δυνατή μέσω ογκογόνων μεταλλάξεων στο c-kit γονίδιο, η συνεχόμενη και ανεξάρτητη του προσδέτη ενεργοποίηση της δραστικότητας τυροσινικής κινάσης του συγκεκριμένου υποδοχέα [228,229]. Αυτές οι

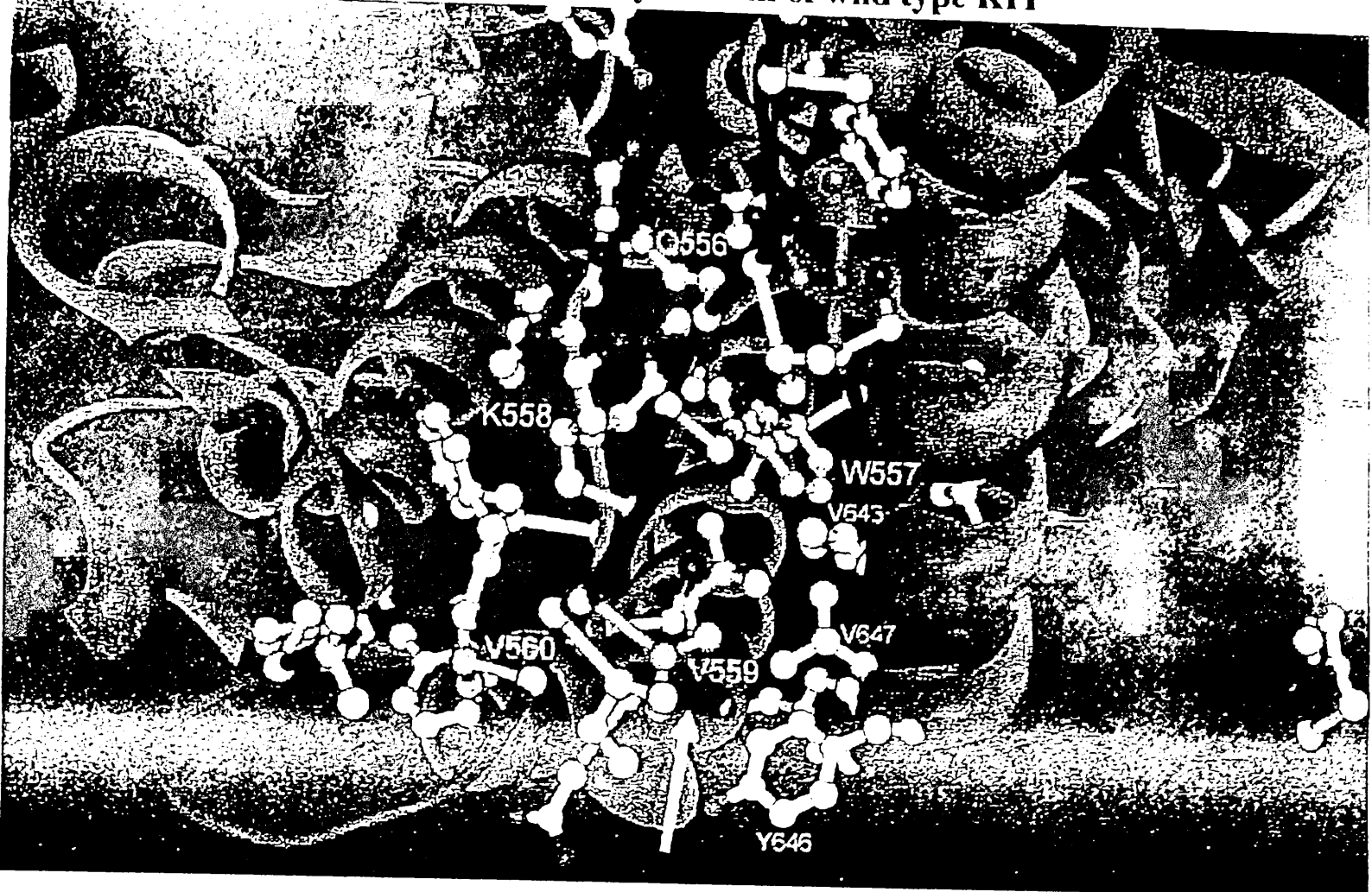


ενεργοποιητικές μεταλλάξεις, έχουν ως αποτέλεσμα τον διμερισμό και την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα με ενεργοποίηση της δραστικότητας τυροσινικής κινάσης, οδηγώντας σε περαιτέρω ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών και σε φαινόμενα ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις, που επιδρούν στη συνεχόμενη και ανεξάρτητη προσδέματος ενεργοποίηση του υποδοχέα, έχουν ανευρεθεί σε πληθώρα, ιδιαίτερα υψηλής κακοήθειας, νεοπλασμάτων. Η δραστικότητα κινάσης του υποδοχέα c-KIT, ενέχεται στην παθοφυσιολογία μιας πληθώρας ανθρώπινων κακοηθειών όπως: ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, η χρόνια μυελογενής λευχαιμία, το μελάνωμα, ο στρωματικός όγκος του γαστρεντερικού σωλήνα (GIST, *gastrointestinal stromal tumor*), ο καρκίνος γεννητικών κυττάρων και το νευροβλάστωμα [229,230]. Οι μεταλλάξεις στην παραμεμβρανική (*juxtamembrane*) περιοχή του υποδοχέα, εντοπίζονται γύρω από τις δύο κύριες θέσεις αυτοφωσφορυλίωσης, οι οποίες αντιστοιχούν σε περιοχές πρόσδεσης τυροσινικών πρωτεϊνών (*protein tyrosine binding, PTB domains*). Πρόκειται για τις τυροσίνες Tyr-568 και Tyr-570, που εμπλέκονται κυρίως στην ανάπτυξη των γαστρεντερικών στρωματικών όγκων (GISTs) [229].

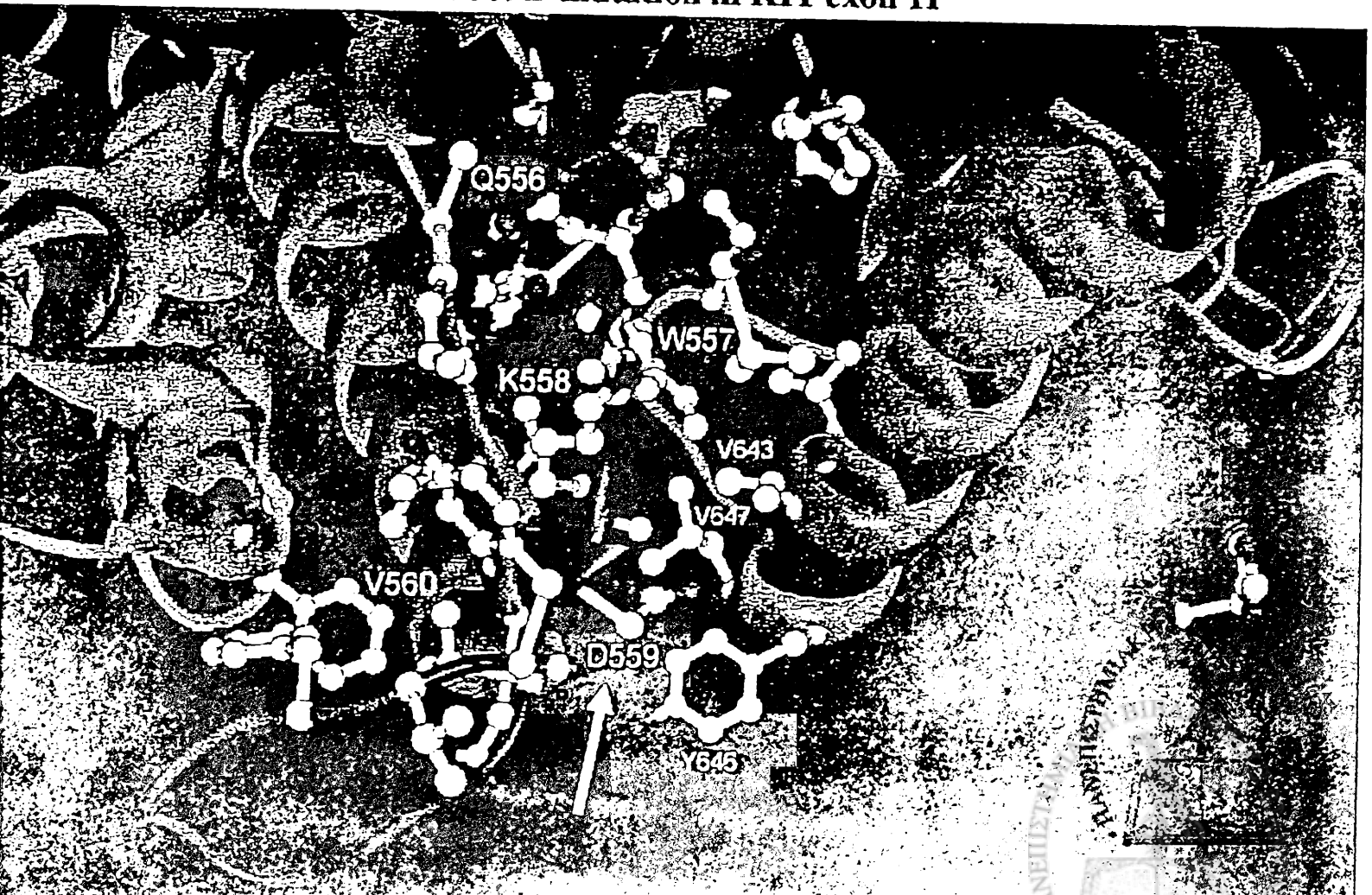
Οι συγκεκριμένες ογκογόνες μεταλλάξεις, μετασχηματίζουν φυσιολογικά κύτταρα μέσω ενισχυμένου διμερισμού του C-KIT υποδοχέα: ο μηχανισμός στηρίζεται στη γεφύρωση δύο C-KIT κινάσων, σε πολύ κοντινή μεταξύ τους απόσταση, με αποτέλεσμα να λειτουργούν ως υπόστρωμα και ένζυμο, η μια για την άλλη. Συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις μετασχηματίζουν τη δομή του υποδοχέα και την σταθεροποιούν στον ενεργό σχηματισμό C-KIT Activation-loop (A-loop). Επιπλέον, οι μεταλλαγμένες μορφές του υποδοχέα, δεν επιτρέπουν την πρόσδεση άλλων ενδοκυττάρων ρυθμιστικών της ενεργοποίησης πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να μην διακόπτεται η αυτοφωσφορυλίωση και η συνεχόμενη ενεργότητα του υποδοχέα.



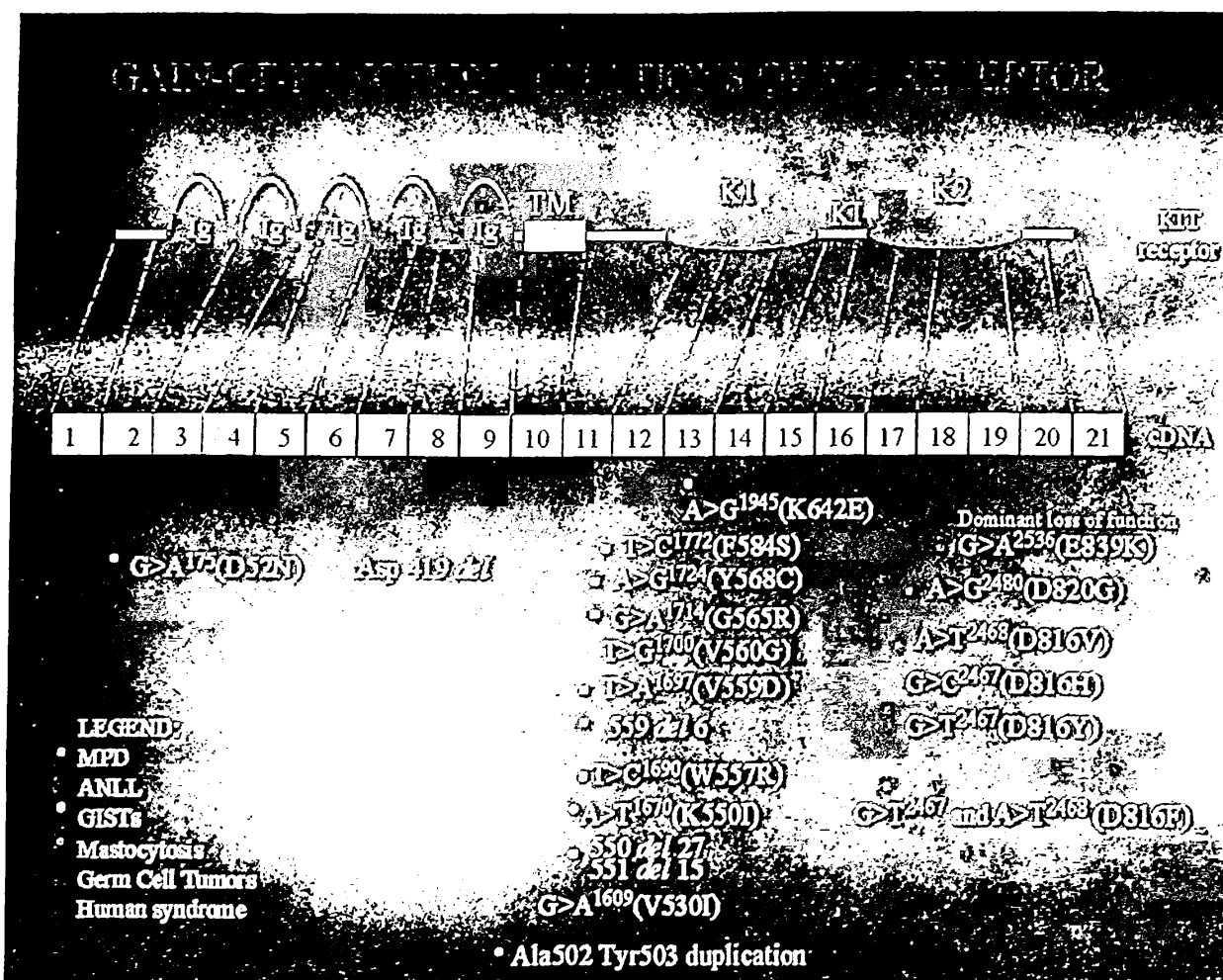


B

V559D mutation in KIT exon 11



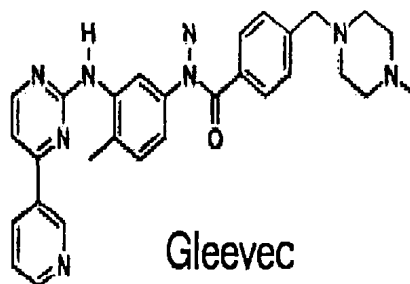
Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του γονιδίου c-kit, έχουν ανευρεθεί και σε άλλα εξόνια και συγκεκριμένα στα εξόνια 2, 8, 9, 13 και 17, με εξαιρετικά ωστόσο μικρή συχνότητα εμφάνισης. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ενεργοποιητικών μεταλλάξεων αφορά διαφοροποιήσεις αμινοξέων στην παραμεμβρανική περιοχή του C-KIT υποδοχέα. Οι μεταλλάξεις αυτές, αποτελούνται από μικρές απαλοιφές εντός του πλαισίου ανάγνωσης, σημειακές μεταλλάξεις ή και συνδυασμό αυτών, στο εξόνιο 11 και κυρίως μεταξύ των κωδικονίων 550 έως 562 [228].



Εικόνα 14: Διαγραμματική απεικόνιση των εμφανιζόμενων ενεργοποιητικών μεταλλάξεων του γονιδίου C-KIT

1.5.3 ΜΙΚΡΟΜΟΡΙΑΚΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ C-KIT

Το STI571 (Glivec, Gleevec, Ιματινίβη) είναι ένα μικρό συνθετικό μόριο, το οποίο εμφανίζει επιλεκτική αναστολή της ενεργότητας τυροσινικής κινάσης των υποδοχέων C-KIT και PDGFR (platelet derived growth factor receptor a and b)[188] Η λειτουργία του στηρίζεται στην ανταγωνιστική αναστολή για την θέση πρόσδεσης της 5'-τριφωσφορικής αδενοσίνης με το ένζυμο [231].



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση πρωτεϊνικής δομής του C-KIT υποδοχέα κατά την αναστολή του με Gleevec και η χημική δομή Gleevec

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε σε ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML) και σε ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ALL), οι οποίοι λόγω χρωμοσωμικής αναδιάταξης φέρουν το χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας, το οποίο παράγει την υβριδική BCR-ABL. Η χημική αυτή πρωτεΐνη εμφανίζει συνεχόμενη ενεργότητα τυροσινικής κινάσης και το STI571 αποδείχτηκε εξαιρετικός αναστολέας αυτής, επάγοντας πλήρη ύφεση της νόσου σε σχεδόν όλους τους ασθενείς με CML και στους Φιλαδέλφεια θετικούς ασθενείς με ALL [232,233].

Τα αποτελέσματα μελετών φάσης I και II για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του STI571 σε μεταστατικούς στρωματικούς όγκους του γαστρεντερικού (GIST), παρείχαν στοιχεία για το ρόλο του γονιδίου C-KIT στα GISTs, υποδεικνύοντας τη δυναμική του αναστολέα στη θεραπεία αυτής της χημειο-

ανθεκτικής νεοπλασίας [234,235]. Το κύριο όμως εύρημα μιας πολυκεντρικής μελέτης (CSTI571 B2222) ήταν ότι ασθενείς με GIST αλλά με διαφορετικού τύπου C-KIT μεταλλάξεις, εμφάνιζαν διαφορετικό βαθμό ανταπόκρισης στη θεραπεία με STI571. Συγκεκριμένα, ασθενείς με μεταλλάξεις στο εξόνιο 11, εμφάνιζαν εξαιρετικά καλή ανταπόκριση σε σχέση με ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις στα εξόνια 9 και 7, ή είχαν φυσικού τύπου αλληλόμορφα για το γονίδιο C-KIT [235]. Ωστόσο, εάν το STI571 μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς και σε άλλους C-KIT θετικούς όγκους και κατά πόσο το μεταλλακτικό προφίλ του c-kit εξονίου 11 επηρεάζει το θεραπευτικό αποτέλεσμα και σε άλλους πιθανούς στόχους, είναι δύο από πολλά ερωτήματα που παραμένουν έως και σήμερα αναπάντητα χρήζοντας περαιτέρω διερεύνηση.



ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ



ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, χρησιμοποιήθηκε αρχειακό βιοπτικό υλικό από 50 περιπτώσεις ασθενών με διάγνωση καρκινώματος άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας (ΚΑΠΕ), προκειμένου να πραγματοποιηθεί τόσο η μοριακή μελέτη του γονιδιακού status των EGFR και C-KIT υποδοχέων, όσο και η μελέτη της φαινοτυπικής τους έκφρασης. Όλοι οι ασθενείς είχαν διαγνωσθεί και αντιμετωπίστηκαν με κοινή θεραπευτική στρατηγική, κατά τη χρονική περίοδο 1988 έως και 2005, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της Ελληνικής Συνεργαζόμενης Ογκολογικής Ομάδας (HECOG). Το μεγαλύτερο μέρος του βιοπτικού υλικού προήλθε από τα Παθολογοανατομικά εργαστήρια του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου και του Γενικού Νοσοκομείου (Γ. Χατζηκώστα) Ιωαννίνων, ενώ το υπόλοιπο υλικό συλλέχθηκε από το Παθολογοανατομικό εργαστήριο του Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ Θεσσαλονίκης.

Η διάγνωση των εν λόγω ασθενών, πραγματοποιήθηκε στα Ογκολογικά Τμήματα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και ΑΧΕΠΑ Θεσσαλονίκης, και αφορούσε μεταστατική νεοπλασία χωρίς ανεύρεση πρωτοπαθούς εστίας, μετά από προτυποποιημένη διαγνωστική προσέγγιση. Όλοι οι ασθενείς πληρούσαν τα κριτήρια ορισμού της διάγνωσης των ΚΑΠΕ, όπου η πρωτοπαθής εστία δεν έγινε δυνατό να διαγνωσθεί κατά την αρχική διερεύνηση, έπειτα από λεπτομερές ιατρικό ιστορικό, ενδελεχή κλινική εξέταση, βασικό αιματολογικό, ουρολογικό, βιοχημικό, ανοσοϊστοχημικό και απεικονιστικό έλεγχο.



Πίνακας 12: Κλινικά χαρακτηριστικά μελετούμενης ομάδας ασθενών ΚΑΠΕ

Χαρακτηριστικά	No	(%)
Ασθενείς	50	100
Φύλο		
Άνδρες	29	58
Γυναίκες	21	42
Ηλικία		
Διάμεση	68	
Διακύμανση	45-85	
Ιστορικό καπνίσματος	39	78
Κατάσταση φυσικής ικανότητας		
0	6	12
1	28	56
2	16	32
Ιστολογικός τύπος		
Αδενοκαρκινώματα	28	56
Αδιαφοροποίητα καρκινώματα	17	34
Νευροενδοκρινικά καρκινώματα	2	4
Πλακώδη καρκινώματα	3	6
Βαθμός διαφοροποίησης		
1	5	10
2	12	24
3	25	50
Μη διαθέσιμος	8	16
Μεταστατικές εντοπίσεις		
Ήπαρ	9	18
Οστά	5	10
Πνεύμονες	5	10
Λεμφαδένες	11	22
Μαλακά μόρια	4	8
Εγκέφαλος	2	4
Περιτοναϊκή κοιλότητα	10	20
Χημειοθεραπεία		
Συνδυασμοί με βάση την πλατίνα	43	
Συνδυασμοί με τις ταξάνες	30	
Άλλη θεραπεία (ακτινοθεραπεία, παρηγορητική)	7	
Συνολική επιβίωση		
Διάμεση	9 μήνες	
Διακύμανση	1-11 μήνες	



2.1.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

α. Εξοπλισμός

- Ψυχόμενη μικροφυγόκεντρος (Universal 16R, Hettich Zentrifugen)
- Φυγόκεντρος (Labofuge GL, Heraeus)
- Μικροφυγόκεντρος (ABBOT Laboratories)
- Vortex
- Πιπέτες όγκου 10, 50, 200, 1000 μ l
- Δοκιμαστικοί σωλήνες χωρητικότητας 10 ml
- Μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες χωρητικότητας 2 ml
- Μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες χωρητικότητας 200 μ l (MicroAmp Reaction tubes with Cap, Perkin Elmer Applied Biosystems California, USA, Part No N801-0540)
- Θερμοστατούμενος θάλαμος
- Ψυχρός θάλαμος σταθερής θερμοκρασίας 4°C
- Υδατόλουτρο
- Συσκευή θερμοκυκλοποιητή Gene Amp PCR System 9700 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, California, USA)
- Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό EC (E-C Apparatus Corporation, St Petesburg, Florida)
- Συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας Vilber Lourmat (Marne La Valle, Cedex 1, France)
- Ψηφιακή συσκευή KODAK digital science DC 120 και software ηλεκτρονικού επεξεργαστή (Electronic Documentation and Analysis System, KODAK Digital Science)



β. Διαλύματα

➤ 0.5M EDTA pH 8.0

Σε 800ml υπερκάθαρου νερού, προστίθενται 186.1gr EDTA και αναδεύονται σε μαγνητικό αναδευτήρα. Κατά τη διάρκεια της ανάδευσης προστίθενται 20gr καυστικού νατρίου, έτσι ώστε να ρυθμιστεί το pH στο 8.0 και να διαλυθεί πλήρως το EDTA. Ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 1000ml με την προσθήκη επιπλέον υπερκάθαρου νερού.

➤ TBE σε stock 10x

Σε 800ml υπερκάθαρου νερού, προστίθενται 108 gr Tris και 55 gr βορικού οξέος. Προστίθενται 40ml 0.5M EDTA και ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 1000ml με την προσθήκη επιπλέον υπερκάθαρου νερού.

➤ G.L.B (ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης)

Χρησιμοποιούνται οι αναλογίες: 0,25% w/v κυανούν της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue), 0,25% w/v κυανολικό ξυλένιο (xylene cyanol) και 30% γλυκερόλη. Η διατήρηση του συγκεκριμένου διαλύματος φόρτωσης γίνεται στους 4°C

➤ Ammoniumpersulphate 10%

0.1gr ammoniumpersulphate προστίθενται σε 1.0 ml υπερκάθαρου νερού.

➤ Αποδιατακτική χρωστική φόρτωσης σε πήγμα ακρυλαμιδίου (Gel loading dye) 2x

Σε 9.5ml φορμαμιδίου προστίθενται 400μl 0.5M EDTA, 25mg μπλε της βρωμοφαινόλης, 25mg κυανό της ξυλόλης και 100μl υπερκάθαρου νερού.

➤ Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 1x

Αναμιγνύονται 500ml TBE-buffer 10x με 4.5L υπερκάθαρου νερού.



➤ **PAGE gel (ποσότητες για ένα πήγμα πολυακρυλαμιδίου)**

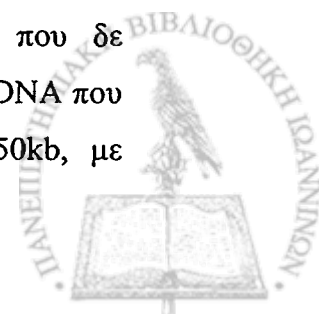
Σε ογκομετρικό δοχείο των 250ml προστίθενται οι κατάλληλοι όγκοι των εξής αντιδραστηρίων: 30% acrylamied/bis, TBE-buffer 10x, H₂O, TEMED και ammoniumpersulphate 10%. Αναμιγνύονται πολύ καλά υπό μαγνητική ανάδευση με προσοχή για αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων αέρα.

➤ **Πίνακας 14: Συστατικά και % διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυακρυλαμιδίου**

Reagent	3.5% gel	5% gel	8% gel	12% gel	20% gel
30% Acrylamide/Bis	11.6ml	16.6ml	26.6ml	40.0ml	66.6ml
5xTBE	20.0ml	20.0ml	20.0ml	20.0ml	20.0ml
H ₂ O	67.7ml	62.7ml	52.7ml	39.3ml	1.7ml
TEMED	40μl	40μl	40μl	40μl	40μl
10% ammoniumpersulphate	700μl	700μl	700μl	700μl	700μl

γ. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας QIAGEN (QIAGEN GmbH, Germany) και με τη χρήση των προϊόντων QIAamp® DNA Mini Kit και QIAamp DNA Blood Mini Kit. Τα εν λόγω προϊόντα αποτελούν μια γρήγορη και εύκολη μέθοδο για την εξαγωγή καθαρού ολικού DNA για αξιόπιστες PCR και Southern blotting. Ολικό DNA, μπορεί να απομονωθεί από περιφερικό αίμα, μυελό των οστών, λεμφοκύτταρα, κύτταρα καλλιέργειας και ιστούς. Η χρησιμοποιούμενη διαδικασία είναι κατάλληλη για δείγματα φρέσκου ή κατεψυγμένου περιφερικού αίματος ή ακόμη και αίματος το οποίο έχει επεξεργαστεί με ηπαρίνη, κιτρικά άλατα ή EDTA. Διαχωρισμός των λεμφοκυττάρων με τεχνική διαβάθμισης συγκέντρωσης (Ficoll treatment) δεν είναι απαραίτητος. Ο καθαρισμός δεν απαιτεί χρήση τοξικών ουσιών και συγκεκριμένα φαινόλης/χλωροφορμίου. Το DNA εκλύεται σε AE buffer ή νερό είναι ελεύθερο πρωτεϊνών, νουκλεασών και άλλων αναστολέων και είναι έτοιμο για περαιτέρω χρήση π.χ σε PCR ή άλλες ενζυμικές αντιδράσεις. Σε περίπτωση που δε χρησιμοποιηθεί αμέσως, μπορεί να φυλαχθεί με ασφάλεια στους -20° C. Το DNA που απομονώνεται με την χρήση των QIAamp kits έχει μέγεθος μέχρι 50kb, με



θραύσματα των 20-30kb να κυριαρχούν. Το DNA αυτού του μεγέθους αποδιατάσσεται πλήρως κατά τη διάρκεια της θερμικής κυκλοποίησης και μπορεί να ενισχυθεί με υψηλή αποδοτικότητα.

γ.1) Απομόνωση γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα

Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε μετά από συλλογή δειγμάτων περιφερικού αίματος υγιών εθελοντών με τη χρήση του QIAamp DNA Blood Mini Kit, σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

Πρωτόκολλο

- Σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο των 1.5ml (eppendorf), μεταφέρονται με τη χρήση πιπέττας κατάλληλου όγκου, 20μl QIAGEN protease (ή Proteinase K).
- Στη συνέχεια προστίθενται 200 μl ολικού αίματος και 200 μl buffer AL. Το μίγμα αναδεύεται για 15sec με τη χρήση δονητικού αναδευτήρα (vortex stirrer). Για να επιτευχθεί αποδοτική λύση των κυττάρων, είναι σημαντική η πλήρης ανάμιξη του αίματος με το buffer AL μέχρις ότου σχηματιστεί ένα ομοιογενές διάλυμα.
- Ακολουθεί επώαση σε θερμαινόμενο επωαστήρα στους 56° C για 10 min.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για λίγα δευτερόλεπτα (spin-down), έτσι ώστε να απομακρυνθούν σταγόνες από την εσωτερική επιφάνεια του πώματος.
- Προστίθενται 200 μl αιθανόλης (96-100%) και το δείγμα αναδεύεται για 15sec με τη χρήση δονητικού αναδευτήρα.
- Το μίγμα που προκύπτει, τοποθετείται προσεκτικά στην στήλη QIAamp Spin Column, το πώμα κλείνει και φυγοκεντρείται για 1min στα 6000g (8000rpm).
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, η στήλη τοποθετείται σε νέο σωληνάριο ενώ το σωληνάριο που περιέχει το έκλουσμα απορρίπτεται.
- Προσεκτικά ανοίγεται το πώμα της στήλης και προστίθενται 500μl buffer AW1. Ακολουθεί φυγοκέντρωση 1min στα 6000g (8000rpm).
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, η στήλη τοποθετείται σε νέο σωληνάριο ενώ το σωληνάριο που περιέχει το έκλουσμα απορρίπτεται.



- Προσεκτικά ανοίγεται το πώμα της στήλης και προστίθενται 500μl buffer AW2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 3min σε μέγιστη ταχύτητα στα 20,000g (14,000rpm).
- Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο των 1,5ml, ενώ το σωληνάριο που περιέχει το έκλουσμα απορρίπτεται.
- Προσεκτικά ανοίγεται το πώμα της στήλης και προστίθενται 200μl buffer AE ή δισαπεσταγμένο νερό. Η στήλη επωάζεται για 5min σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντρηση 1min στα 6000g (8000rpm).
- Το τελικό έκλουσμα περιέχει το απομονωθέν γενωμικό DNA σε συγκέντρωση περίπου 30ng/μl, καθώς 200μl περιφερικού αίματος ($\approx 5 \times 10^6$ λεμφοκύτταρα/ml) αποδίδουν συνήθως 6μg DNA.

γ.2) Απομόνωση γενωμικού DNA από ιστικό βιοπτικό υλικό παραφίνης

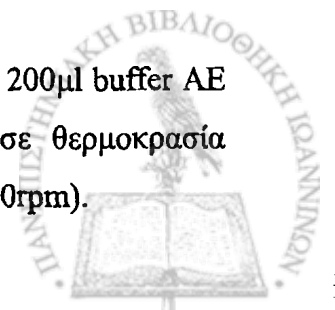
Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε μετά από συλλογή δειγμάτων ιστών, οι οποίοι είχαν ληφθεί προ της χορήγησης χημειοθεραπείας στο σύνολο των περιπτώσεων, είχαν μονιμοποιηθεί σε ουδέτερη φορμόλη 10% και είχαν εγκλεισθεί σε κύβους παραφίνης. Χρησιμοποιήθηκαν από κάθε δείγμα 5 τομές των 10mm και η απομόνωση του DNA έγινε με τη χρήση του QIAamp DNA Mini Kit, σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

Πρωτόκολλο

- Οι τομές ιστού-παραφίνης μεταφέρονται σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο των 1.5ml (eppendorf) και ακολουθείται πρωτόκολλο αποπαραφίνωσης των δειγμάτων.
- Σε κάθε σωληνάριο προστίθενται 1ml προθερμασμένης ξυλόλης στους 40° C και τα δείγματα τοποθετούνται σε ανακινούμενο επωαστήρα για 30 min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα και απόρριψη του υπερκειμένου με πιπέττα έτσι ώστε να μην διαταραχθεί ο ιστός.
- Επαναλαμβάνονται τα βήματα 2 και 3.
- Στη συνέχεια προστίθενται 1ml αιθανόλης 96% και το δείγμα αναδεύεται για 15sec με τη χρήση δονητικού αναδευτήρα.



- Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα και απόρριψη του υπερκειμένου με πιπέττα έτσι ώστε να μην διαταραχθεί ο ιστός.
- Επαναλαμβάνονται τα βήματα 4 και 5.
- Τα δείγματα μεταφέρονται σε θερμαινόμενο επωστήρα και αφήνονται στους 40° C μέχρι την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης.
- Στη συνέχεια προστίθενται 180 μl buffer ALT και 20μl Proteinase K. Το μίγμα αναδεύεται για 15sec με τη χρήση δονητικού αναδευτήρα.
- Ακολουθεί επώαση σε θερμαινόμενο και ανακινούμενο επωαστήρα στους 56° C για 3h μέχρι την πλήρη λύση του ιστού.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για λίγα δευτερόλεπτα (spin-down), έτσι ώστε να απομακρυνθούν σταγόνες από την εσωτερική επιφάνεια του πώματος.
- Προστίθενται 200 μl buffer AL και το δείγμα αναδεύεται για 15sec με τη χρήση δονητικού αναδευτήρα.
- Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 70° C για 10min και εν συνεχεία το δείγμα φυγοκεντρείται για λίγα δευτερόλεπτα (spin-down), έτσι ώστε να απομακρυνθούν σταγόνες από την εσωτερική επιφάνεια του πώματος.
- Προστίθενται 200 μl αιθανόλης (96-100%) και το δείγμα αναδεύεται για 15sec με τη χρήση δονητικού αναδευτήρα.
- Το μίγμα που προκύπτει, τοποθετείται προσεκτικά στην στήλη QIAamp Spin Column, το πώμα κλείνει και φυγοκεντρείται για 1min στα 6000g (8000rpm).
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, η στήλη τοποθετείται σε νέο σωληνάριο ενώ το σωληνάριο που περιέχει το έκλουσμα απορρίπτεται.
- Προσεκτικά ανοίγεται το πώμα της στήλης και προστίθενται 500μl buffer AW1. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 1min στα 6000g (8000rpm).
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, η στήλη τοποθετείται σε νέο σωληνάριο ενώ το σωληνάριο που περιέχει το έκλουσμα απορρίπτεται.
- Προσεκτικά ανοίγεται το πώμα της στήλης και προστίθενται 500μl buffer AW2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 3min σε μέγιστη ταχύτητα στα 20,000g (14,000rpm).
- Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο των 1,5ml, ενώ το σωληνάριο που περιέχει το έκλουσμα απορρίπτεται.
- Προσεκτικά ανοίγεται το πώμα της στήλης και προστίθενται 200μl buffer AE ή δισαπεσταγμένο νερό. Η στήλη επώάζεται για 5min σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντρηση 1min στα 6000g (8000rpm).



- Το τελικό έκλουσμα περιέχει το απομονωθέν γενωμικό DNA σε συγκέντρωση περίπου 25-75ng/μl, καθώς 25mg ιστού αποδίδουν συνήθως 10-30μg DNA.

γ.3) Απομόνωση-καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Για τον καθαρισμό των προϊόντων PCR από παραπροϊόντα της αντίδρασης, εκκινητές κ.α, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης και εν συνεχεία επανάκτηση του επιθυμητού προϊόντος με το πρωτόκολλο QIAquick Gel Extraction Kit της QIAGEN.

Πρωτόκολλο

- Το θραύσμα DNA αποκόπτεται από το πήγμα αγαρόζης με νυστέρι.
- Το κομμάτι πήγματος που εμπεριέχει το θραύσμα DNA τοποθετείται σε διαφανές άχρωμο erpendorf των 1,5ml και ζυγίζεται. Για κάθε έναν όγκο αγαρόζης (100mg≈100μl), προστίθενται 3 όγκοι buffer QG.
- Ακολουθεί επώαση στους 50° C για 10min (ή μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του πήγματος). Κάθε 2 λεπτά το δείγμα αναδεύεται με vortex έτσι ώστε να διευκολυνθεί η διαλυτοποίηση της αγαρόζης.
- Μετά την πλήρη διάλυση της αγαρόζης, ελέγχεται το χρώμα του μίγματος, το οποίο θα πρέπει να είναι κίτρινο. Το buffer QG περιέχει δείκτη pH που επιτρέπει τον καθορισμό της άριστης τιμής του pH στην οποία επιτυγχάνεται η μεγαλύτερη δυνατή απορρόφηση του DNA από το διοξείδιο του πυριτίου της στήλης. Η απορρόφηση είναι συνήθως 95% όταν το $pH \leq 7.5$ και μειώνεται δραματικά σε υψηλότερες τιμές pH.
- Εάν το χρώμα του μίγματος είναι πορτοκαλί ή ιώδες, προστίθενται 10μl HCl 6N. Το pH θα γίνει όξινο και το χρώμα θα μετατραπεί σε κίτρινο.
- Στη συνέχεια προστίθεται ένας όγκος ισοπροπανόλης και το μίγμα αναδεύεται με vortex.
- Το μίγμα μεταφέρεται στη στήλη QIAquick spin column και φυγοκεντρείται σε μέγιστη ταχύτητα για 1 min.
- Το έκλουσμα αποχύνεται και η στήλη επανατοποθετείται στο σωληνάριο.



- Ακολουθεί πλύση με την προσθήκη 0,75ml διαλύματος PE και φυγοκέντρηση για 1min.
- Το έκλουσμα αποχύνεται και η στήλη φυγοκεντρείται για επιπλέον 1min στις 13,000rpm (17,900g).
- Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο των 1,5ml.
- Για την έκλουση του DNA προστίθενται στο κέντρο της στήλης 50μl διαλύματος EB (10mM Tris-Cl, pH=8.5) ή δισαπασταγμένο νερό. Η στήλη επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5min και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 1min.

δ. Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Μία από τις πλέον σύγχρονες δημοφιλείς και καταλυτικής σημασίας τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας, είναι η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction PCR). Η αντίδραση PCR επιτυγχάνει την ταχεία και αξιόπιστη παραγωγή πολλών αντιγράφων, δηλαδή πολλαπλή αντιγραφή (amplification), επιλεγόμενων τμημάτων DNA *in vitro*: για το λόγο ακριβώς αυτό, αποτελεί ισχυρό πειραματικό «εργαλείο» σε ευρύτατο φάσμα ερευνητικών εφαρμογών. Ενδεικτικό της αξίας της τεχνικής είναι ότι, αν και αναπτύχθηκε σχετικά πρόσφατα (1983), αναγνωρίστηκε σχεδόν αμέσως από τη διεθνή επιστημονική κοινότητα. Μάλιστα, σε εξαιρετικά σύντομο χρονικό διάστημα μετά την πρώτη της βιβλιογραφική αναφορά [236], ο επινοητής της PCR Kary Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Nobel (1993).

δ.1) Ανάπτυξη της τεχνικής PCR

Οι ιδιότητες των ενζύμων πολυμερισμού του DNA στις οποίες στηρίζεται η αρχή της PCR ήταν ήδη γνωστές από τη δεκαετία του 1950 και είχαν ήδη χρησιμοποιηθεί σε περιορισμένη κλίμακα για την αντιγραφή (replication) αλληλουχιών του DNA *in vitro*. Ωστόσο η τεχνική PCR η οποία εξασφαλίζει όχι μόνο αντιγραφή (replication) αλλά και πολλαπλασιασμό (amplification) αλληλουχιών του DNA *in vitro* δεν αναπτύχθηκε παρά μόνο κατά τη δεκαετία του 1980. Η τεχνική εισήχθη από τον μοριακό βιολόγο Kary Mullis το 1983.



Η τεχνική στηρίζεται σε *in vitro* ενζυματική σύνθεση DNA, με προγραμματισμένους κύκλους αλλαγής θερμοκρασιών για την αποδιάταξη-αναδιάταξη του DNA, με τη βοήθεια μιας θερμοάντοχης DNA πολυμεράσης και υπό την παρουσία τριφωσφορικών δινουκλεοτιδίων και κατάλληλων εκκινητών. Συγκεκριμένα, ο κύκλος αλλαγής θερμοκρασιών ρυθμίζει τα διαδοχικά χρονικά διαστήματα κατά τα οποία το υπο εξέταση υπόστρωμα-εκμαγείο DNA (DNA template) ευρίσκεται σε μερικώς αποδιαταγμένη μορφή που επιτρέπει τοπική αποσύνδεση των δύο αλυσίδων και εκκίνηση της αντίδρασης πολυμερισμού ή πλήρως αποδιαταγμένη (μονόκλωνη) μορφή που επιτρέπει τερματισμό της αντίδρασης πολυμερισμού και επανάληψη του κύκλου.

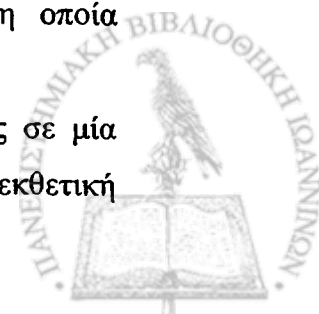
Εκτός από το ένζυμο (DNA πολυμεράση), το υπόστρωμα-εκμαγείο (DNA template) και, βέβαια, τα τέσσερα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs, δηλ. dATP, dCTP, dGTP, dTTP) που επίσης απαιτούνται ως υποστρώματα της DNA πολυμεράσης, το μίγμα της αντίδρασης θα πρέπει να περιέχει δύο ολιγονουκλεοτίδια ως εκκινητές της αντίδρασης πολυμερισμού (oligonucleotide primers). Οι εκκινητές αυτοί είναι συνθετικά ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια με αλληλουχίες συμπληρωματικές προς τις αλληλουχίες που ευρίσκονται αμέσως πριν (upstream) και αμέσως μετά (downstream) από την επιλεγόμενη περιοχή πολυμερισμού. Το πρώτο ολιγονουκλεοτίδιο (upstream) λειτουργεί ως εκκινητής σύνθεσης του κωδικεύοντος κλώνου (sense primer) και το δεύτερο (downstream) ως εκκινητής σύνθεσης του αντιπαράλληλου, μη κωδικεύοντος, κλώνου (antisense primer).

δ.2) Θερμικοί κύκλοι

Κατά τη διάρκεια ενός θερμικού κύκλου PCR, συμβαίνει διαδοχικά:

- Πλήρης θερμική αποδιάταξη του DNA (denaturation), η οποία εξαρτάται από το περιεχόμενο βάσεων GC% του DNA template
- Πρόσδεση των εκκινητών στις αντίστοιχες συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA template (annealing), η οποία εξαρτάται από τις ιδιότητες υβριδισμού των εκκινητών
- Επιμήκυνση των αλυσίδων DNA, δηλ. αντίδραση πολυμερισμού, η οποία εξαρτάται από το βέλτιστο ενεργότητα της DNA πολυμεράσης.

Η επανάληψη των συγκεκριμένων σταδίων θερμικού κύκλου επί η φορές σε μία συσκευή προγραμματισμού θερμοκρασιών (PCR cycler machine) επιτρέπει εκθετική



αύξηση του αριθμού μορίων του επιλεγέντος τμήματος DNA (target fragment), με τελική απόδοση 2^n μόρια DNA ανά αρχικό μόριο DNA template.

δ.3) DNA πολυμεράση

Η πρακτική αξία της τεχνικής PCR εξαρτάται κατά πολύ από την επιλογή της κατάλληλης DNA πολυμεράσης. Δύο είναι τα σημαντικότερα κριτήρια επιλογής: η θερμοσταθερότητα (thermal stability) και η ($3' \rightarrow 5'$) εξωνουκλεολυτική ενεργότητα (exonucleolytic proofreading) του ενζύμου. Ιδιαίτερα η θερμοσταθερότητα, υπήρξε καθοριστικός παράγοντας για την καθιέρωση της PCR ως απλής και εύχρηστης μεθόδου, κυρίως μετά την εισαγωγή της χρήσης της DNA πολυμεράσης του θερμοφίλου βακτηρίου *Thermus aquaticus* (Taq polymerase) και γενικότερα θερμοσταθερών πολυμερασών οι οποίες δεν μετουσιώνονται κατά το στάδιο της θερμικής αποδιάταξης.

Εκτός από την ($5' \rightarrow 3'$) ενεργότητα επιμήκυνσης της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας, οι DNA πολυμεράσες είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν και μία επιδιορθωτική, ($3' \rightarrow 5'$) εξωνουκλεολυτική ενεργότητα. Όσο μεγαλύτερη είναι αυτή η επιδιορθωτική ενεργότητα, τόσο περισσότερο αξιόπιστο είναι το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR ως προς την αλληλουχία DNA που παράγεται.

δ.4) Συστατικά του μίγματος αντιδρώντων και συνθήκες αντίδρασης

Το μίγμα αντιδρώντων μιας τυπικής αντίδρασης PCR, όπως εφαρμόζεται στις σύγχρονες ερευνητικές και διαγνωστικές εφαρμογές θα πρέπει να περιλαμβάνει:

H ₂ O, δισαπασταγμένο και αποστειρωμένο, για τη ρύθμιση του τελικού όγκου
Sense primer, εκκινητής του κωδικεύοντος μονόκλωνου DNA
Antisense primer, εκκινητής του αντικωδικεύοντος μονόκλωνου DNA
DNA polymerase buffer, κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει Mg ²⁺
dNTPs, ισομοριακό μίγμα dATPs, dCTPs, dGTPs, dTTPs
DNA template, υπόστρωμα-εκμαγείο DNA
DNA polymerase, θερμοσταθερή DNA πολυμεράση



Το μίγμα επωάζεται τυπικά σε 25-30 θερμικούς κύκλους αποδιάταξης (denaturation 94°C) – πρόσδεσης (annealing 55-65°C) – επιμήκυνσης (elongation 72°C). Η θερμοκρασία του σταδίου πρόσδεσης επιλέγεται με βάση τις θερμικές ιδιότητες των δύο εκκινητών. Οι ιδιότητες αυτές έχουν άμεση σχέση με την χαρακτηριστική «θερμοκρασία τήξης» T_m , η οποία υπολογίζεται με βάση τον τύπο

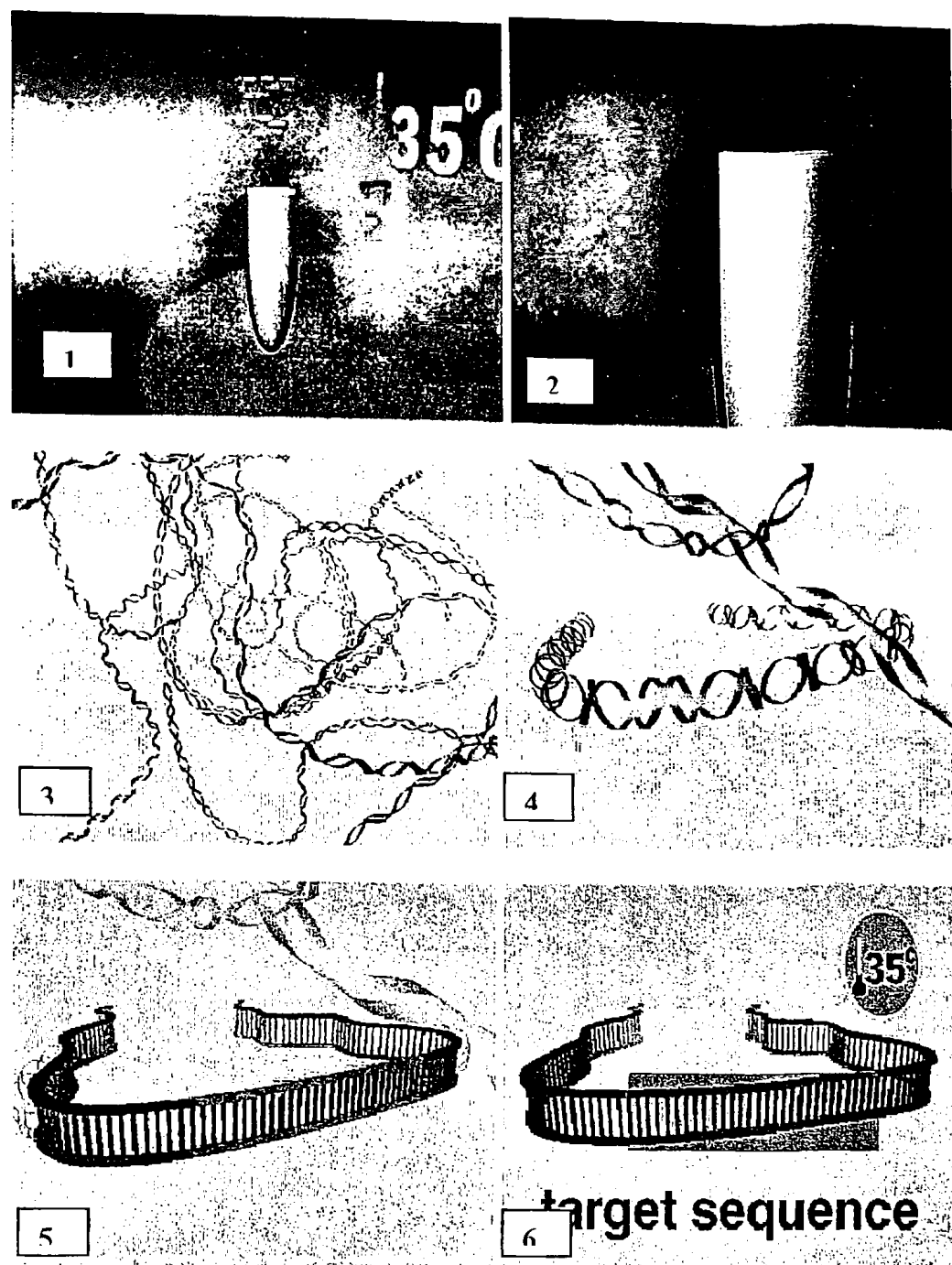
$$T_m = 2 \times (\text{αριθμός ζευγών AT}) + 4 \times (\text{αριθμός ζευγών GC})$$

Η θερμοκρασία πρόσδεσης των δύο εκκινητών, επιλέγεται κατά κανόνα 5-10°C μικρότερη των τιμών T_m των δύο εκκινητών, ενώ οι δύο τιμές T_m δεν θα πρέπει να διαφέρουν, κατά κανόνα, άνω των 5°C μεταξύ τους. Εκτός των ανωτέρω, οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών ελέγχονται εκ των προτέρων ώστε να περιοριστούν, για παράδειγμα, περιπτώσεις μη ειδικής δέσμευσης σε ανεπιθύμητες περιοχές του εκμαγείου DNA, περιπτώσεις τυχαίας συμπληρωματικότητας αλληλουχίας μεταξύ των δύο εκκινητών κλπ. Οι έλεγχοι αυτοί κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών της PCR μπορούν να γίνουν με προγράμματα ηλεκτρονικής επεξεργασίας (π.χ PC/Gene, IntelliGenetics, Oxford Molecular).

δ.5) Προφυλάξεις κατά την παρασκευή του μίγματος αντιδρώντων της PCR

- Η διεξαγωγή της αντίδρασης PCR θα πρέπει να γίνεται σε αποστειρωμένους χώρους, με γάντια τα οποία πρέπει να αλλάζονται συχνά. Επίσης, όλα τα αντικείμενα που χρησιμοποιούνται για την εκτέλεση του πειράματος πρέπει να είναι αποστειρωμένα. Επειδή η αντίδραση PCR μπορεί να δημιουργήσει αντίγραφα ακόμα και ενός μορίου DNA, πρέπει να λαμβάνονται προφυλάξεις έτσι ώστε να αποφευχθεί επιμόλυνση (contamination) του μίγματος αντίδρασης με ξένα τμήματα DNA που μπορεί να χρησιμεύσουν ως εκμαγεία (templates).
- Κατά την προσθήκη των συστατικών του μίγματος, τα αντιδραστήρια φυλάσσονται σε θερμοκρασία 0-4°C.
- Ακολουθείται αυστηρά η αναγραφόμενη σειρά προσθήκης, με την οποία ελαχιστοποιούνται οι αντιδράσεις μη ειδικής πρόσδεσης μεταξύ του DNA και των εκκινητών.
- Το μίγμα των ενζύμων μεταφέρεται πάντοτε σε δοχείο πάγου και προστίθεται τελευταίο και χωρίς χρονοτριβή. Δεν απαιτείται χρόνος απόψυξης (το διάλυμα συντήρησης περιέχει 50% γλυκερόλη), ενώ το υπόλοιπο του όγκου φυλάσσεται αμέσως στον καταψύκτη φύλαξης (-20°C).

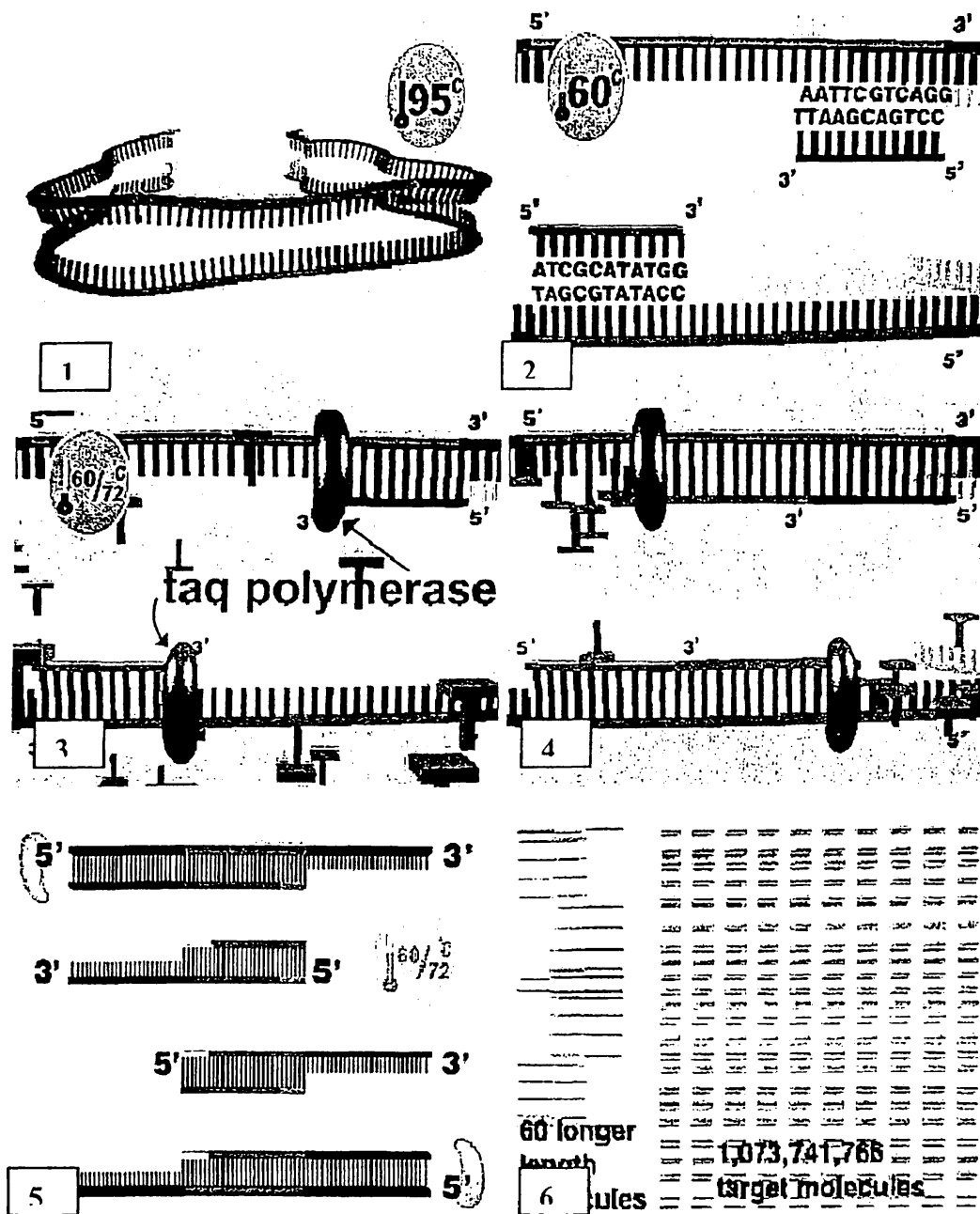




να 15α : Σχηματική απεικόνιση σε στάδια, των διαφόρων βημάτων που γίνονται κατά την εκτέλεση της αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης.

- Το δείγμα
- Οι δίκλωνες αλυσίδες του DNA
 - αλληλουχία στόχος (target sequence)





Εικόνα 15β : Σχηματική απεικόνιση σε στάδια, των διαφόρων βημάτων που λαμβάνουν χώρα κατά την εκτέλεση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

1. Η θερμική αποδιάταξη του DNA
2. Η πρόσδεση των εκκινητών
3. Η έναρξη της αντιγραφής των αλυσίδων
4. Η ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου
5. Η δημιουργία αντιγράφων του αρχικού DNA-στόχου
6. Η τελική δημιουργία ενός περίπου δισεκατομμυρίου αντιγράφων-κλώνων



ε. Ηλεκτροφόρηση DNA

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού, αναγνώρισης και απομόνωσης τμημάτων DNA. Πραγματοποιείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και βασίζεται στο ότι το DNA, ως ασθενές οξύ παρουσιάζει αρνητικό φορτίο σε ουδέτερο pH. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, όταν το DNA βρεθεί υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, να μετακινείται προς το θετικό πόλο (την άνοδο) [237].

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα μετακίνησης του DNA στην πηκτή αγαρόζης είναι:

1) Το μέγεθος του τμήματος του DNA.

Τα γραμμικά μόρια του DNA μετακινούνται στην πηκτή αγαρόζης με ρυθμούς αντιστρόφως ανάλογους του δεκαδικού λογαρίθμου των μοριακών βαρών τους.

2) Η συγκέντρωση της αγαρόζης.

Η μετακίνηση ενός μορίου DNA εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Ένα γραμμικό μόριο DNA με δεδομένο μέγεθος έχει διαφορετική κινητικότητα διαμέσου πηκτών με διαφορετικές συγκεντρώσεις αγαρόζης. Χρησιμοποιούνται, έτσι, πηκτές αγαρόζης διαφορετικών συγκεντρώσεων προκειμένου να επιτευχθεί ο βέλτιστος διαχωρισμός τμημάτων DNA, τα οποία έχουν παραπλήσιο μέγεθος.

3) Η στερεοδιάταξη του DNA.

Μόρια DNA του ίδιου μοριακού βάρους αλλά διαφορετικής διαμόρφωσης έχουν διαφορετική κινητικότητα στην πηκτή αγαρόζης, που εξαρτάται από το βαθμό υπερελίκωσης. Η σειρά αύξησης της κινητικότητας είναι: μόριο ανοιχτού κύκλου, ευθύγραμμο μόριο και, τέλος, μόριο κλειστού υπερσπειρωμένου κύκλου.

4) Το ηλεκτρικό πεδίο.

Η κινητικότητα του μορίου του DNA είναι ανάλογη της τάσης του εφαρμοζόμενου πεδίου. Γενικά ισχύει, ότι όσο χαμηλότερη τάση εφαρμόζεται, τόσο καλύτερος διαχωρισμός επιτυγχάνεται.

5) Η κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου

6) Η σύσταση του DNA σε βάσεις και η θερμοκρασία



Η ηλεκτροφορητική συμπεριφορά του DNA σε πηκτή αγαρόζης (αντίθετα με ό,τι συμβαίνει σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου) δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη σύσταση σε βάσεις του DNA, ή τη θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση. Έτσι, σε πηκτές αγαρόζης, οι σχετικές ηλεκτροφορητικές κινητικότητες τμημάτων DNA διαφορετικών μεγεθών δεν μεταβάλλονται σε εύρος θερμοκρασίας από 4° C έως 30° C. Γενικά, η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου.

7) Η παρουσία παρεμβαλλόμενων χρωστικών

Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), μια φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση DNA σε πηκτές αγαρόζης και πολυακρυλαμιδίου, ελαττώνει την ηλεκτροφορητική κινητικότητα του γραμμικού DNA κατά 15% περίπου.

Σημείωση: Επειδή το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ισχυρό μεταλλαξιογόνο και μέτρια τοξικό, θα πρέπει να χρησιμοποιείται με ιδιαίτερα μεγάλη προσοχή. Έχει καρκινογόνο δράση καθώς ενσωματώνεται μεταξύ των βάσεων του DNA (intercalating agent) και προκαλεί μεταλλάξεις μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift mutagen). Τα stock διαλύματα φυλάσσονται στους 4° C, σε ειδικά σωληνάρια που δεν επιτρέπουν την άμεση έκθεσή του στο φως.

8) Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης

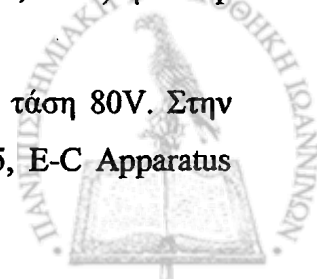
Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA επηρεάζεται από τη σύσταση και την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Ρυθμιστικά διαλύματα με μεγάλη ιοντική ισχύ οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα θερμοκρασίας που επηρεάζουν την κινητικότητα του DNA και το πήγμα αγαρόζης. Αντίθετα, σε διαλύματα χαμηλής ιοντικής ισχύος δεν παρατηρείται μετακίνηση του DNA. Συνήθως χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν EDTA (pH=8.0) και Tris-Acetate (TAE), Tris-Borate (TBE) ή Tris-Phosphate (TPE) σε συγκέντρωση περίπου 50mM με pH που ρυθμίζεται μεταξύ των τιμών 7.5-7.8. Στη συγκεκριμένη μελέτη για όλες τις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκε διάλυμα TBE 1x.

ε.1) Παρασκευή πηκτής αγαρόζης

- Επιλέγεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετούνται οι αντίστοιχοι υποδοχείς και το κτένι για τη δημιουργία των φρεατίων, εντός των οποίων θα φορτωθούν τα δείγματα.



- Σε κωνική φιάλη που περιέχει 100ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x προστίθενται 1,5g agarόζης (Agarose, SIGMA-Aldrich Co., St Louis, USA). Είναι σημαντικό το διάλυμα παρασκευής της agarόζης και το διάλυμα ηλεκτροφόρησης να είναι το ίδιο, καθώς ακόμη και μικρές διαφορές στην ιοντική ισχύ ή στο pH μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα του DNA.
- Το περιεχόμενο της φιάλης διαλύεται πλήρως με σύντομο βρασμό σε φούρνο μικροκυμάτων. Απαιτείται πλήρης διάλυση της agarόζης, η οποία όταν δεν έχει διαλυθεί πλήρως δίνει την εντύπωση ύπαρξης μικρών «φακών» που επιπλέουν στο διάλυμα.
- Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος ελαττωθεί στους 50-60° C, προστίθενται 5μl διαλύματος EtBr συγκέντρωσης 10mg/ml, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0,5mg/ml.
- Στη συνέχεια το μίγμα αποχύνεται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στερεοποιηθεί. Η πηκτή θα πρέπει να έχει πάχος 3-5mm.
- Μετά την στερεοποίηση του πήγματος, αφαιρείται το κτένι προσεκτικά υπό προσθήκη μικρού όγκου TBE στον κενό χώρο των φρεατίων. Προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x μέχρι ύψους 0,5cm πάνω από την επιφάνεια της πηκτής.
- Μετά το πέρας των προγραμματισμένων θερμικών κύκλων της PCR, 10μl από το τελικό προϊόν κάθε δείγματος, αναμιγνύονται με 2.5 μl διαλύματος «φόρτωσης» (DNA gel loading buffer 5x) και προστίθενται στα φρεάτια του πήγματος. Το GLB (Gel Loading Buffer) έχει μεγαλύτερο ειδικό βάρος από το νερό, λόγω υψηλής συγκέντρωσής του σε γλυκερόλη, με αποτέλεσμα το δείγμα DNA να κατακρατείται στον πυθμένα του φρεατίου και να εισχωρεί στην πηκτή της agarόζης μετά τη εφαρμογή της διαφοράς δυναμικού. Επιπρόσθετος ρόλος του GLB, είναι η παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης, λόγω των αρνητικά φορτισμένων χρωστικών που περιέχει, οι οποίες με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου κινούνται προς το θετικό πόλο.
- Σε γειτνιάζοντα φρεάτια, προστίθενται μάρτυρες μοριακών βαρών, όπως είναι τα: 1kb DNA ladder (5μl, 0.1mg/ml) (Promega, Madison, WI, USA) ή 100bp DNA ladder (Promega, Madison, WI, USA).
- Στη συνέχεια εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού με σταθερή τάση 80V. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το τροφοδοτικό EC 105, E-C Apparatus



Corporation, St Petersburg, Florida. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα που εξαρτάται από το μήκος της πηκτής και το μέγεθος του DNA.

- Η διακοπή της ηλεκτροφόρησης ορίζεται από τη χρωστική bromophenol blue, που εμπεριέχεται στο διάλυμα GLB και η οποία θα πρέπει να έχει καλύψει περί τα 2/3 της απόστασης έως την άκρη του πήγματος.
- Η εμφάνιση των ζωνών DNA-EtBr γίνεται με έκθεση του πήγματος σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (Uv-transilluminator, Vilber Lourmat LaValle, Cedex 1, France), έτσι ώστε να γίνει οπτικοποίηση του αποτελέσματος μέσω φθορισμού. Για καταχώρηση και επεξεργασία του αποτελέσματος γίνεται φωτογράφιση της πηκτής με ψηφιακή μηχανή KODAK digital science DC 120 και μεταφορά της εικόνας σε ηλεκτρονικό επεξεργαστή Electrophoresis Documentation and Analysis System, Kodak digital science.
- Κατά την επεξεργασία, τα πρότυπα δείγματα των DNA ladders, χρησιμοποιούνται για την ανάλυση του μοριακού μεγέθους των προϊόντων της PCR των δειγμάτων.

Τα αναφερόμενα διαλύματα είναι:

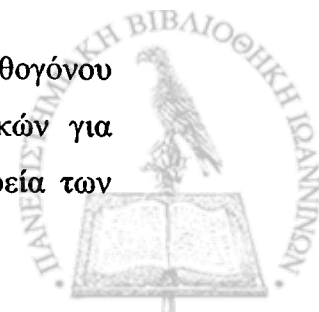
• DNA gel loading buffer = bromophenol blue 0.25% (w/v), xylene cyanol 0.25% (w/v), glycerol 30% (w/v)

TAE = Tris-Acetate 40mM, Na₂EDTA 1mM, pH=8.0

2.2 Η ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

Τα ευρήματα του Προγράμματος του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (Human Genome Project), προσφέρουν τα μέγιστα στη μοριακή τεχνολογία παρέχοντας νέα εργαλεία και νέες δυνατότητες για ιατρική πρόοδο. Μέχρι σήμερα, εκατοντάδες νέα, άγνωστα γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί. Η κλωνοποίηση των γονιδίων αυτών αυξάνει την κατανόηση όχι μόνο των μονογονιδιακών ασθενειών αλλά και αυτή των σύνθετων, πολυγονιδιακών συνδρόμων, όπως είναι η αρτηριοσκλήρυνση και ο καρκίνος.

Η γνώση του μεταλλακτικού φάσματος ενός συγκεκριμένου παθογόνου γονιδίου, έχει τεράστια σημασία στο σχεδιασμό ανιχνευτικών στρατηγικών για διαγνωστικούς σκοπούς αλλά και για αναγνώριση φορέων. Η κλινική πορεία των



περισσότερων γενετικών διαταραχών είναι ανομοιογενής. Έτσι, η γνώση του φάσματος των μεταλλάξεων των γενετικών αυτών διαταραχών επιτρέπει τη διερεύνηση της μοριακής τους παθοφυσιολογίας. Η δυνατότητα συσχετίσεων μεταξύ του γονότυπου και του φαινότυπου των ασθενών, μπορεί να οδηγήσει σε εξατομικευμένες προγνωστικές προβλέψεις αλλά και θεραπευτικές αντιμετώπισεις για τους ασθενείς αυτούς. Επιπλέον, επιτρέπει τη διερεύνηση συσχετίσεων δομής και λειτουργίας των γονιδίων, με τελικό στόχο τη διαλεύκανση του ρόλου των πρωτεϊνών που παράγονται από τα διαταραγμένα γονίδια. Αυτό θα οδηγήσει στην ανάπτυξη στρατηγικών μετατροπής ή παράκαμψης της ανώμαλης γονιδιακής λειτουργίας διαμέσου φαρμακολογικών ή γενετικών χειρισμών.

Η ανίχνευση μεταλλάξεων και οι κλινικές προεκτάσεις της διαδικασίας αυτής δεν είναι πάντα χωρίς προβλήματα. Έτσι, μεταλλάξεις σε πολλές γενετικές περιοχές μπορεί να προκαλούν το ίδιο κλινικό σύνδρομο. Ακόμη περισσότερο, μεταλλάξεις της ίδιας γενετικής περιοχής μπορεί να προκαλούν διαφορετικά σύνδρομα. Έτσι η γνώση της παρουσίας μιας μετάλλαξης δεν προβλέπει την κλινική έκφραση του φέροντα αυτή.

2.2.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

Οι μέθοδοι ανίχνευσης μεταλλάξεων μπορούν να διαχωριστούν σε:

- Ειδικές τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων (mutation detection), καλά χαρακτηρισμένων αλλαγών της αλληλουχίας, όπου ένα δείγμα DNA ελέγχεται για την παρουσία ή απουσία μιας συγκεκριμένης μετάλλαξης
- Τεχνικές σάρωσης (mutation screening), για την ταυτοποίηση λιγότερο χαρακτηρισμένων αλλαγών της αλληλουχίας, όπου ένα δείγμα σαρώνεται για οποιαδήποτε αλλαγή αναφορικά με κάποια αλληλουχία αναφοράς.



Πίνακας 15: Ειδικές τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων

Μέθοδος	Σχόλια
Περιοριστική πέψη DNA μετά από ενίσχυση με PCR	Μόνο όταν μια μετάλλαξη δημιουργεί ή απαλοίφει μια περιοριστική θέση. Το μέγεθος των παραγόμενων προϊόντων ελέγχεται σε πηκτική αгарόζης
Υβριδισμός DNA μετά από ενίσχυση PCR με ειδικά ολιγονουκλεοτίδια (ASO) σε Southern αποτύπωση	Γενική μέθοδος για σημειακές μεταλλάξεις
PCR με χρήση αλληλίο-ειδικών εκκινητών	Γενική μέθοδος για σημειακές μεταλλάξεις
Προσδιορισμός ολιγονουκλεοτιδικής (OLA) σύνδεσης	Γενική μέθοδος για σημειακές μεταλλάξεις
PCR με εκκινητές που προσδένονται κοντά σε περιοχή πιθανής μετάλλαξης ή σημείο θραύσεως χρωμοσώματος	Η επιτυχής ενίσχυση δηλώνει ύπαρξη της συγκεκριμένης μετάλλαξης ή αναδιάταξης
Έλεγχος μεγέθους επαναλαμβανόμενων τρινουκλεοτιδίων	Μόνο για ασθένειες που σχετίζονται με τρινουκλεοτιδικές επαναλήψεις, μεγάλου μεγέθους επαναλήψεις απαιτούν αποτύπωση Southern οι μικρότερες μπορούν να γίνουν με PCR

Οι πρώτες είναι πολύ χρήσιμες για διαγνωστικούς λόγους, ενώ οι δεύτερες χρησιμοποιούνται μεν στη διαγνωστική σε περιπτώσεις γονιδίων με πολλαπλές μεταλλάξεις αλλά είναι και ιδιαιτέρως χρήσιμες για τη διερεύνηση συσχετίσεων γονότυπου με φαινότυπο. Αποτελούν με τον τρόπο αυτό, ισχυρό εργαλείο για να συσχετιστεί αιτιολογικά μια αλλαγή της αλληλουχίας με μια κλινική κατάσταση, είτε αυτή αναφέρεται στη διάγνωση, είτε στην πρόγνωση της ασθένειας.

Πίνακας 16 : Ανίχνευση μεταλλάξεων με τεχνικές σάρωσης

Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Αλληλούχιση	Ανιχνεύει όλες τις αλλαγές Οι μεταλλάξεις χαρακτηρίζονται πλήρως	Δύσκολη Παρέχει αχρείαστη πληροφορία
Κινητικότητα ετεροδίπλων διαμέσω πηκτικής	Πολύ απλή	Μόνο για μικρές αλληλουχίες (<200bp) Περιορισμένη ευαισθησία Δεν αποκαλύπτει τη θέση της αλλαγής
Ανάλυση πολυμορφισμών μέσω διαμόρφωσης μονής αλυσίδας (SSCP)	Απλή	Μόνο για μικρές αλληλουχίες Δεν αποκαλύπτει τη θέση της αλλαγής
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική βαθμιδωτής αποδιάταξης (DGGE)	Μεγάλη ευαισθησία	Η επιλογή των εκκινητών είναι κρίσιμη, Δεν αποκαλύπτει τη θέση της αλλαγής



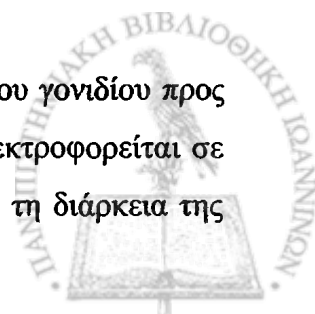
α. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονής αλυσίδας Single strand conformation polymorphism analysis (SSCP)

Ως SSCP ορίζεται η μοριακή τεχνική κατά την οποία επιτυγχάνεται ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μονής αλυσίδας νουκλεϊνικών οξέων. Ο διαχωρισμός αυτός, βασίζεται σε αλλαγές στην αλληλουχία (ακόμη και μίας μόνο βάσης), οι οποίες επιδρούν στην δευτεροταγή δομή των μορίων με αποτέλεσμα να δημιουργείται ορατή διαφορά της κινητικότητας κατά την ηλεκτροφόρησή τους σε πήγμα.

Η κινητικότητα δίκλωνου μορίου DNA κατά την ηλεκτροφόρησή του σε πήγμα, εξαρτάται από το μέγεθος της αλυσίδας αλλά είναι ανεξάρτητη της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Ωστόσο, η κινητικότητα μονών αλυσίδων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό ακόμη και από πολύ μικρές αλλαγές στην αλληλουχία, της τάξης μιας και μόνο βάσης ανάμεσα σε εκατοντάδες. Οι μικρές αυτές αλλαγές είναι παρατηρήσιμες εξαιτίας της σχετικής μη σταθερής φύσης του μονόκλωνου DNA. Απουσία συμπληρωματικού κλώνου, η μονή αλυσίδα αναδιπλώνεται και δημιουργεί ενδοκλωνικούς δεσμούς μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων της, σχηματίζοντας έτσι βρόγχους και πτυχές που δίνουν στην μονή αλυσίδα μια μοναδική τρισδιάστατη δομή, ανεξάρτητα από το μήκος της. Μια μονονουκλεοτιδική αλλαγή μπορεί να επηρεάσει δραματικά την κινητικότητα εντός της πηκτής, αλλάζοντας τους ενδοκλωνικούς δεσμούς των βάσεων, επιδρώντας έτσι στην τρισδιάστατη διαμόρφωση της αλυσίδας.

Η SSCP που ανακοινώθηκε για πρώτη φορά το 1989, ως ένα μέσο ανίχνευσης DNA πολυμορφισμών, ή γενικότερων αλλαγών στην αλληλουχία, αποτελεί μια οικονομική, αξιόπιστη και υψηλής ευαισθησίας μέθοδο για τον καθορισμό γενετικών αλλαγών. Όπως οι πολυμορφισμοί μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs) έτσι και οι πολυμορφισμοί διαμόρφωσης μονής αλυσίδας (SSCPs) είναι παραλλαγές αλληλίων κληρονομούμενων γενετικών γνωρισμάτων, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως γενετικοί δείκτες. Αντίθετα με την RFLP ανάλυση, η SSCP ανάλυση μπορεί να ανιχνεύσει DNA πολυμορφισμούς και μεταλλάξεις σε πολλαπλές θέσεις μέσα σε θραύσματα DNA. Ωστόσο, ως μέθοδος σάρωσης μεταλλάξεων, η SSCP, χρησιμοποιείται συχνότερα για την ανάλυση πολυμορφισμών σε συγκεκριμένους γενετικούς τόπους, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται στην ιατρική διαγνωστική.

Στην τεχνική αυτή μετά από PCR ενίσχυσης της περιοχής του γονιδίου προς διερεύνηση, η διπλή αλυσίδα αποδιατάσσεται με θέρμανση και ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Κατά τη διάρκεια της



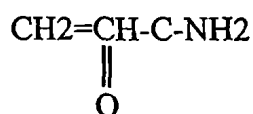
ηλεκτροφόρησης, οι μονές αλυσίδες αναδιπλώνονται σε τρισδιάστατες δομές ανάλογα με την αρχική τους αλληλουχία. Έτσι, ο διαχωρισμός είναι συνάρτηση του σχήματος της μονής αλυσίδας. Εάν υπάρχει έστω και μια σημειακή αλλαγή της αλληλουχίας, η μονή αλυσίδα θα αποκτήσει διαφορετική τρισδιάστατη δομή με επακόλουθο διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Η ευαισθησία της μεθόδου επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους, όπως το μήκος του θραύσματος, το είδος της μετάλλαξης, την περιεκτικότητα σε G+C, τη θέση της μετάλλαξης σε σχέση με τα άκρα. Για παράδειγμα για θραύσματα 100-150bp η ευαισθησία μπορεί να είναι 100%, ενώ για θραύσματα 500bp η ευαισθησία μειώνεται στο 50%. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται χαμηλές συγκεντρώσεις DNA κατά την ηλεκτροφόρηση για αποφυγή επαναδιάταξης σε διπλή αλυσίδα, ενώ συνήθως χρειάζεται σήμανση του DNA με ραδιενεργό ουσία ή η χρησιμοποίηση χρώσης αργύρου μετά από ηλεκτροφόρηση για την αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης του DNA.

Οι κινητικότητες μονόκλωνων μορίων DNA, εξαρτώνται από την θερμοκρασία. Επομένως για την επίτευξη του καλύτερου δυνατού διαχωρισμού, είναι σημαντικό η ηλεκτροφόρηση του πηγματος να πραγματοποιείται υπό σταθερή θερμοκρασία. Η ευαισθησία της SSCP επηρεάζεται από το pH του διαλύματος της ηλεκτροφόρησης. Δίκλινα μόρια DNA, αποδιατάσσονται μετά από έκθεσή τους σε συνθήκες βασικού pH. Αργότερα βρέθηκε ότι προσθέτοντας γλυκερόλη στο πήγμα του πολυακρυλαμιδίου ελαττώνεται το pH του διαλύματος ηλεκτροφόρησης –και ιδίως όταν αυτό είναι Tris borate buffer- με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου. Το μέγεθος του προς ανάλυση μορίου επηρεάζει επίσης την SSCP. Για την απόκτηση των καλύτερων δυνατών αποτελεσμάτων το μέγεθος του θραύσματος θα πρέπει να κυμαίνεται από 100 έως 300bp. Ωστόσο η παρουσία γλυκερόλης στο πήγμα, επιτρέπει με αποδεκτή ευαισθησία την ανάλυση μεγαλύτερων θραυσμάτων.



α.1) Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

Το ακρυλαμίδιο είναι ένα μονομερές το οποίο εμφανίζει την εξής δομή:



Παρουσία ελευθέρων ριζών, τα οποία παρέχονται από το ammonium persulphate και σταθεροποιούνται από το TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine), μια αλυσιδωτή αντίδραση ξεκινάει όπου τα μονομερή του ακρυλαμιδίου πολυμερίζονται σε μακριές αλυσίδες. Με την παρουσία του N',N'-methylenebisacrylamide, πραγματοποιείται διασταυρούμενη σύνδεση (cross-link) των αλυσίδων αυτών, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πηγματος με πορώδη υφή, η οποία εξαρτάται από το μήκος των αλυσίδων αλλά και από το βαθμό της διασταυρούμενης-σύνδεσης. Το μήκος της αλυσίδας καθορίζεται από τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στην αντίδραση πολυμερισμού (μεταξύ 3.5% έως 20%) όπου: εισάγεται 1 μόριο διασταυρούμενου-συνδέτη για κάθε 29 μονομερή ακρυλαμιδίου. Η αποτελεσματική διακύμανση ικανού διαχωρισμού μη-αποδιατακτικών πηγμάτων ακρυλαμιδίου αναφέρεται στον πίνακα 17.

Πίνακας 17: Διακύμανση αποτελεσματικού διαχωρισμού μορίων DNA σε πηγμάτα πολυακρυλαμιδίου

Acrylamide (%w/v)	Διακύμανση αποτελεσματικού διαχωρισμού (bp)
3.5	1000-2000
5.0	80-500
8.0	60-400
12.0	40-200
15.0	25-150
20.0	6-100

Προσοχή:

Το ακρυλαμίδιο είναι δυνητικά νευροτοξικό και απορροφάται μέσω του δέρματος. Η δράση του ακρυλαμιδίου είναι αθροιστική. Πάντοτε λαμβάνονται τα κατάλληλα προστατευτικά μέτρα (γάντια, μάσκα) όταν χρησιμοποιούνται σε σκόνη το ακρυλαμίδιο και το δις-ακρυλαμίδιο. Παρότι το πολυακρυλαμίδιο δεν θεωρείται



τοξικό, θα πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή, εξαιτίας της πιθανότητας να περιέχει μικρές ποσότητες ακρυλαμιδίου, το οποίο όμως δεν έχει πολυμεριστεί.

α.2) Προετοιμασία των δειγμάτων για SSCP ανάλυση

- Σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο (eppendorf) των 200μl αναμιγνύονται 10μl προϊόντος PCR με 10 μl gel loading buffer.
- Το μίγμα θερμαίνεται στον θερμικό-κυκλοποιητή (PCR machine) στους 94° C για 5 min, έτσι ώστε να γίνει πλήρης αποδιάταξη των DNA θραυσμάτων
- Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται σε παγόλουτρο 4° C, για να αποτραπεί ο σχηματισμός ετερόδιπλων και επανουσίωσης των δειγμάτων.

α.3) Προετοιμασία της συσκευής κάθετης ηλεκτροφόρησης

- Πραγματοποιείται σχολαστικός καθαρισμός των γυάλινων πλακών (μια μεγάλη/μια μικρή), με διάλυμα σάπωνος.
- Οι πλάκες στεγνώνουν και καθαρίζονται ξανά με ακετόνη.
- Στη συνέχεια τοποθετούνται η μια πάνω στην άλλη και διαχωρίζονται με πλαστικά διαχωριστικά (spacers).
- Όταν η ευθυγράμμιση είναι σωστή, σφραγίζονται με τη χρήση σφιγκτήρων, και με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε να δέχονται και από τις δύο πλευρές την ίδια πίεση, διαφορετικά υπάρχει κίνδυνος να σπάσουν.
- Τέλος τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και οι δύο δεξαμενές που σχηματίζονται, γεμίζονται με συνολικά 1L διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE buffer 1x.

α.4) Προετοιμασία του διαλύματος για το πήγμα πολυακρυλαμιδίου

- Σε καθαρό ποτήρι ζέσεως των 250ml, αναμιγνύονται acrylamid/bis-acrylamid, TBE buffer 10x, TEMED και το απαιτούμενο νερό, αναλόγως την επιθυμητή επι τοις εκατό σύσταση σε πολυακρυλαμίδιο του πήγματος.
- Προστίθεται το ammoniumpersulphate (APS) και το διάλυμα αναδεύεται καλά αποφεύγοντας την εισαγωγή φυσαλίδων αέρα.



- Το διάλυμα αποχύνεται γρήγορα και προσεκτικά μεταξύ των γυάλινων πλακών, καθώς ο πολυμερισμός ξεκινά με την προσθήκη του APS.
- Στη συνέχεια τοποθετούνται τα κατάλληλα κτένια και το πήγμα αφήνεται για 90min σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί πλήρως ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου σε πολυακρυλαμίδιο.

α.5) Ηλεκτροφόρηση πήγματος πολυακρυλαμιδίου (PAGE)

- Το μίγμα του DNA με τη χρωστική φορτώνεται στα σχηματιζόμενα φρεάτια χρησιμοποιώντας μικροπιπέτα ή σύριγγα Hamilton. Η διαδικασία πρέπει να γίνει σταθερά με μια κίνηση και με ταχύτητα, διότι το δείγμα DNA παρουσιάζει τάση διάχυσης μόλις η άκρη του ρύγχους της πιπέτας αγγίζει το διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
- Μετά το πέρας της διαδικασίας φόρτωσης, η συσκευή σφραγίζεται και τα ηλεκτρόδια συνδέονται στους κατάλληλους πόλους (το θετικά φορτισμένο βρίσκεται στην κάτω δεξαμενή). Τα μη αποδιατακτικά πήγματα πολυακρυλαμιδίου ηλεκτροφορούνται συνήθως με τάση που κυμαίνεται από 1V/cm έως 8V/cm.
- Όταν οι χρωστικές έχουν καλύψει την επιθυμητή απόσταση, η συσκευή αποσυνδέεται από το ρεύμα, αποσφραγίζεται και το διάλυμα ηλεκτροφόρησης και των δύο δεξαμενών αποχύνεται.
- Απομακρύνονται οι γυάλινες πλάκες και τοποθετούνται στον πάγκο. Χρησιμοποιώντας λεπτή σπάτουλα ανασηκώνεται η γωνία της μικρότερης πλάκας, ελέγχοντας ότι το πήγμα παραμένει προσκολλημένο στην μεγαλύτερη πλάκα. Η μικρή πλάκα απομακρύνεται όπως επίσης και τα διαχωριστικά (spacers).
- Το πήγμα καλύπτεται με πλαστική μεμβράνη, αναστρέφεται με προσοχή και αφαιρείται η μεγάλη γυάλινη πλάκα.
- Στη συνέχεια χρησιμοποιείται απεικονιστική τεχνική για την εμφάνιση των ζωνών του DNA επάνω στο πήγμα.



α.6) Εμφάνιση των δειγμάτων με χρώση αργύρου (Silver staining)

Υψηλής ευαισθησίας ανίχνευση νουκλεϊνικών οξέων (σε επίπεδο νανογραμμαρίου) επιτυγχάνεται με χημική αναγωγή ιόντων αργύρου. Αυτή η μέθοδος χρώσης νουκλεϊνικών οξέων με ιόντα αργύρου, είναι μια φωτοχημική αντίδραση στην οποία ιόντα αργύρου προσδένονται στις βάσεις των νουκλεϊνικών οξέων και εν συνεχεία ανάγονται από χημικά αντιδραστήρια ή φως. Το πρωτόκολλο χρώσης αργύρου, εμφανίζει την ίδια ευαισθησία με τις ραδιοϊσοτοπικές μεθόδους ανίχνευσης χωρίς ωστόσο να είναι το ίδιο επικίνδυνο καθώς δεν εμπεριέχονται ραδιενεργά αντιδραστήρια. Ωστόσο είναι αρκετά πολύπλοκο και χρονοβόρο καθώς απαιτεί την προετοιμασία και το χειρισμό διαφόρων διαλυμάτων.

Πρωτόκολλο

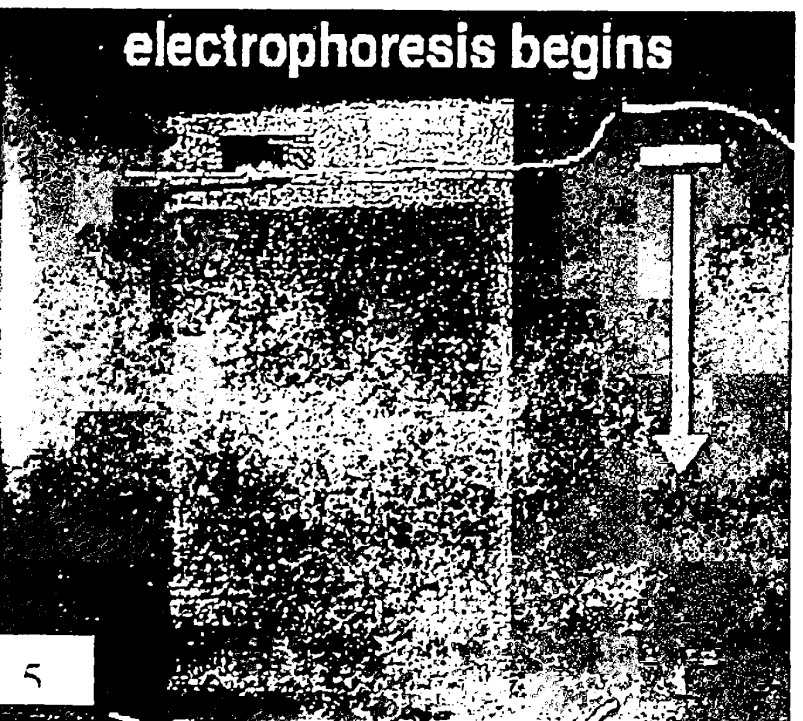
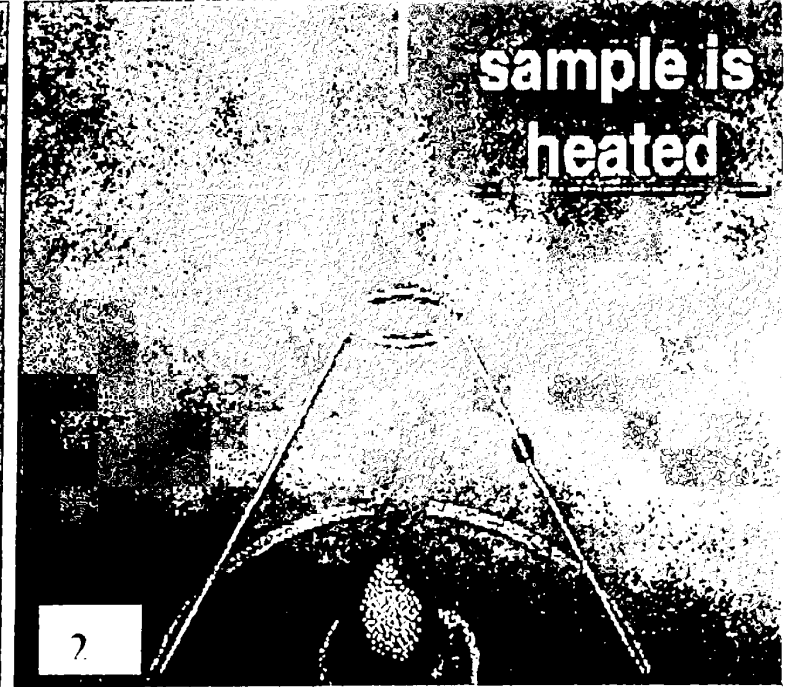
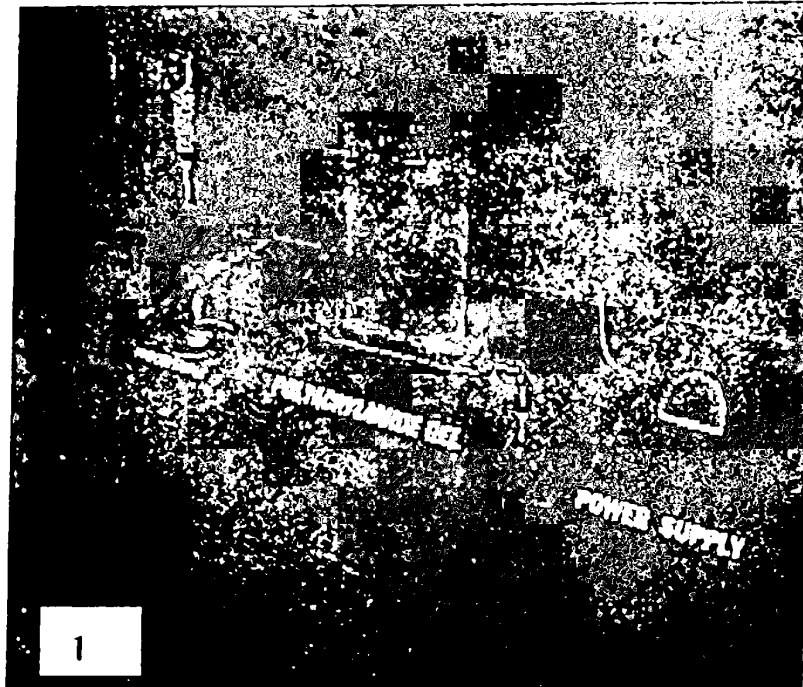
- Το πήγμα μεταφέρεται πάνω στην πλαστική μεμβράνη σε πλαστικό δοχείο χωρητικότητας 2L.
- Πραγματοποιείται μονιμοποίηση του πηγματος με την εμβάπτισή του σε 500 ml διαλύματος οξικού οξέος 10% για 20min υπό συνεχή ανακίνηση.
- Το διάλυμα οξικού οξέος αναρροφάται και το πήγμα εκπλένεται με απεσταγμένο νερό για 2min.
- Η διαδικασία έκπλυσης επαναλαμβάνεται 3 φορές.
- Στη συνέχεια προστίθενται 500ml διαλύματος νιτρικού αργύρου 1%, AgNO_3 (1gr/L) και αφήνεται υπό ανακίνηση για 30 min.
- Το διάλυμα νιτρικού αργύρου αναρροφάται και το πήγμα εκπλένεται με απεσταγμένο νερό.
- Ακολουθεί εμβάπτισή του πηγματος σε 500ml διαλύματος εμφάνισης το οποίο περιέχει: 3gr NaOH, 1.5ml HCOH (formaldehyde) και 1mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, τα οποία διαλύονται σε απεσταγμένο νερό υπό ισχυρή μαγνητική ανάδευση. Το πήγμα αφήνεται στο διάλυμα εμφάνισης για 10 min περίπου.
- Μετά την πλήρη ανάπτυξη της χρώσης, το διάλυμα εμφάνισης αναρροφάται και το πήγμα εκπλένεται με απεσταγμένο νερό 2 με 3 φορές.
- Το πήγμα μονιμοποιείται με 500ml 2% AcOH για 15min.
- Εκπλένεται με απεσταγμένο νερό και στεγνώνει στους 80°C.



Σημειώσεις

- Το διάλυμα για το πήγμα πολυακρυλαμιδίου (χωρίς APS) θα πρέπει να παρασκευάζεται λίγο πριν την χρήση του, ωστόσο εάν αυτό δεν είναι εφικτό, είναι δυνατή η διατήρησή του στους -20°C για μία εβδομάδα το μέγιστο.
- Το διάλυμα μετά την προσθήκη APS αποχύνεται ταχύτατα μεταξύ των πλακών, διότι ο πολυμερισμός πραγματοποιείται, ανάλογα με την συγκέντρωση, από 30min έως 90min.
- Η SSCP ανάλυση γίνεται σε πήγματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυακρυλαμιδίου συνήθως κυμαινόμενες από 6% έως και 12%. Η επιθυμητή κάθε φορά συγκέντρωση βρίσκεται εμπειρικά, όπως επίσης και η θερμοκρασία ηλεκτροφόρησης.
- Τα θραύσματα PCR πριν την SSCP, δεν χρειάζεται να υποβληθούν σε καθαρισμό. Η παρουσία εκκινητών, πολυμεράσης κλπ. δεν επηρεάζουν την ανάλυση.





β. Αλληλούχιση του DNA (DNA sequencing)

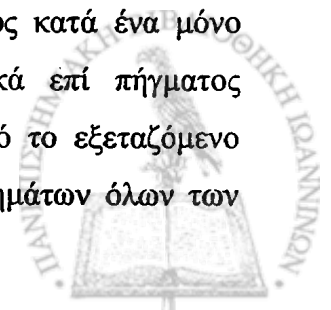
Η αλληλούχιση του DNA, αν και αποτελεί σήμερα μέθοδο κοινής πρακτικής στην εργαστηριακή έρευνα, δεν αναπτύχθηκε παρά μόνον μετά το 1975. Οι λόγοι είναι κυρίως (α) ότι τα φυσικά μόρια DNA είναι πολύ μεγάλου μεγέθους σε σύγκριση με άλλα νουκλεϊνικά οξέα (π.χ ένα μόριο tRNA έχει μόνο 74-95 βάσεις, ενώ τα μόρια DNA κυμαίνονται σε τάξη μεγέθους μεταξύ του 10³ και 10¹¹ bp) και (β) ότι οι τεχνικές απομόνωσης μικρών τμημάτων DNA (περιοριστική πέψη, κλωνοποίηση DNA, PCR) δεν ήταν διαθέσιμες πριν την δεκαετία του 1970. Πριν από την ανάπτυξη τεχνικών αλληλούχισης DNA, είχαν ήδη αλληλουχηθεί μόρια tRNA και βακτηριακών rRNA, κυρίως 5S και 16S rRNA.

Ο ακριβής προσδιορισμός της αλληλουχίας των νουκλεοτιδικών βάσεων μιας πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας DNA (δηλ. προσδιορισμός μιας αλληλουχίας DNA) είναι απαραίτητος σε πολλές πειραματικές μεθόδους της μοριακής βιολογίας ως τελικό στάδιο ανάλυσης. Η γνώση της επακριβούς αλληλουχίας ενός γονιδίου επιτρέπει (α) την «εικονική» διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου αυτού με πληροφορική ανάλυση, αλλά και (β) σχεδιασμό πειραμάτων γονιδιακής υπερέκφρασης, απομόνωσης του κωδικευόμενου γονιδιακού προϊόντος και δομικής-λειτουργικής μελέτης του προϊόντος αυτού με εργαστηρικές μεθόδους βιοχημείας και βιοφυσικής.

Είναι εμφανές από τα ανωτέρω ότι η ανάπτυξη των μεθόδων προσδιορισμού αλληλουχίας DNA, δηλ. μεθόδων αλληλούχισης (DNA Sequencing) έχει ευρεία και ουσιαστική συνεισφορά στη σύγχρονη βιοχημική έρευνα.

Οι μέθοδοι αλληλούχισης DNA που είναι διαθέσιμες σήμερα στους ερευνητές είναι δύο: 1) η χημική μέθοδος αλληλούχισης ή μέθοδος Maxam-Gilbert (1977) και 2) η ενζυμική μέθοδος ή μέθοδος Sanger (1975-1977) [Frederic Sanger, Nobel Prize 1980, Walter Gilbert Nobel Prize 1980]. Σήμερα, χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά η ενζυμική μέθοδος (μέθοδος Sanger), η οποία προσφέρει ταχύτητα, ευελιξία και πρακτικότητα ανάλυσης.

Αν και σημαντικά διαφορετικές, οι δύο αυτές μέθοδοι στηρίζονται σε ένα κοινό σημείο: Μονόκλινα μόρια DNA που διαφέρουν σε μήκος κατά ένα μόνο νουκλεοτίδιο είναι δυνατόν να διαχωρισθούν ηλεκτροφορητικά επί πήγματος πολυακρυλαμιδίου. Στόχος και των δύο μεθοδολογιών είναι από το εξεταζόμενο DNA να παρασκευασθεί ένα ελεγχόμενο μίγμα μονόκλωνων τμημάτων όλων των



δυνατών μεγεθών, τα οποία στη συνέχεια να διαχωρισθούν μεταξύ τους ηλεκτροφορητικά και να αναγνωσθούν με βάση (α) το μοριακό τους μέγεθος και (β) την αζωτούχο βάση του 3'-τελικού νουκλεοτιδίου. Αυτό που διαφέρει είναι η μέθοδος παρασκευής του μοριακού μίγματος : Στην χημική μέθοδο, το προ-σημανθέν DNA υδρολύεται (με πιπεριδίνη) σε θέσεις συγκεκριμένων αζωτούχων βάσεων, μετά από ειδική χημική τροποποίηση των βάσεων αυτών, π.χ των πουρινών (A+G) με μυρμηκικό οξύ, των πυριμιδινών (C+T) με υδραζίνη, των κυσινών με υδραζίνη σε περιβάλλον υψηλής ιονικής ισχύος, των θυμινών με υπερμαγγανικό κάλιο, των γουανινών με θειϊκό διμεθύλιο (μεθυλίωση). Στην ενζυμική μέθοδο, το DNA χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα-εκμαγείο (template) για τη σύνθεση νέων αλυσίδων με αντίδραση DNA πολυμεράσης, ενώ η εξειδίκευση των νεοσυντιθέμενων τμημάτων ως προς την αζωτούχο βάση του 3'-τελικού νουκλεοτιδίου εξασφαλίζεται με τη χρήση νουκλεοτιδίων τερματισμού.

Πειραματική αρχή της μεθόδου Sanger

Για την εφαρμογή της πειραματικής διαδικασίας αλληλούχισης κατά Sanger απαιτούνται τα εξής «αντιδρώντα» μόρια (πολυνουκλεοτίδια, ολιγονουκλεοτίδια και μονονουκλεοτίδια):

➤ Νουκλεοτιδικά υποστρώματα

1. Υπόστρωμα-εκμαγείο DNA (DNA template), εισάγεται στο πειραματικό μέρος (α), βλ. κατωτέρω.

Το DNA προέρχεται συνήθως από προϊόν PCR, το οποίο έχει υποστεί κατάλληλη διαδικασία καθαρισμού.

2. Εκκινητής αλληλούχισης (sequencing primer), εισάγεται στο πειραματικό μέρος (β), βλ. κατωτέρω.

Κατάλληλο (συνθετικό) ολιγοδεοξυνουκλεοτίδιο, το οποίο υβριδίζει σε συγκεκριμένη θέση επί της συμπληρωματικής αλληλουχίας του υποστρώματος-εκμαγείου DNA και επιτρέπει εκκίνηση της αντίδρασης πολυμερισμού.

3. Υποστρώματα-μονονουκλεοτίδια (dNTP), εισάγονται στο πειραματικό μέρος (γ), βλ. κατωτέρω.



Μίγμα των τεσσάρων τριφωσφορικών 2'-δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs, δηλ. dATP, dCTP, dGTP και dTTP) που απαιτούνται ως υποστρώματα της DNA πολυμεράσης.

4. Μονονουκλεοτίδια τερματισμού (ddNTP), εισάγονται στο πειραματικό στάδιο (δ), βλ.κατωτέρω.

Πρόκειται για τριφωσφορικά 2,3'-διδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs, δηλ. ddATP, ddCTP, ddGTP και ddTTP), τα οποία λειτουργούν ως νουκλεοτίδια τερματισμού της επιμήκυνσης της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας (chain terminators). Η ιδιότητα αυτή οφείλεται στο ότι τα 2,3'-διδεοξυριβονουκλεοτίδια στερούνται του 3'-υδροξυλίου που είναι απαραίτητο για τον σχηματισμό του 3'5'-φωσφοδιεστερικού δεσμού κατά την αντίδραση πολυμεράσης. Σημειώνεται ότι η ενζυμική μέθοδος αλληλούχησης αναφέρεται πολύ συχνά και ως μέθοδος τερματισμού αλυσίδας (chain termination sequencing) ή και ως μέθοδος τερματισμού με διδεοξυνουκλεοτίδια (dideoxynucleotide termination sequencing).

➤ Πρωτόκολλο

Κατά τεκμήριο τα τυπικά πειραματικά στάδια που ακολουθούνται είναι τα εξής:

- (α) Αποδιάταξη της διπλής έλικας DNA (template denaturation) είτε με έκθεση σε αλκαλικό pH, είτε με θέρμανση σε θερμοκρασίες άνω της T_m
- (β) Πρόσδεση του εκκινητή (primer annealing), με επώαση υβριδισμού στην κατάλληλη θερμοκρασία
- (γ) Επιμήκυνση αλυσίδας (chain elongation), δηλ. στάδιο της ενζυμικής αντίδρασης της DNA πολυμεράσης, με επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία παρουσία δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTP)
- (δ) Τερματισμός του πολυμερισμού (επιμήκυνσης) της αλυσίδας DNA με προσθήκη διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) (chain termination)

Μετά τα ανωτέρω στάδια ακολουθεί ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των προϊόντων και ανίχνευση δηλ. «ανάγνωση» της αλληλουχίας, όπου ανάλογα με το σχεδιασθέν πρωτόκολλο αλληλούχησης, εφαρμόζεται ανίχνευση με αυτοραδιογραφία, φθορισμομέτρηση, αντίδραση χημειοφωταύγειας ή χρώση νιτρικού αργύρου.



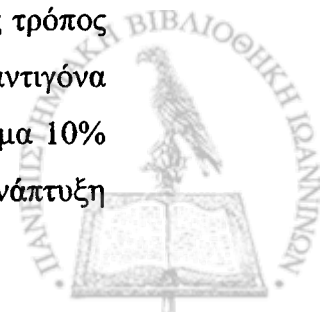
2.3 Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία επιτρέπει τον εντοπισμό αντιγόνων σε τομές ιστών με τη χρήση σημασμένων αντισωμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης αντιγόνου- αντισώματος και με τη χρήση ενός δείκτη οπτικοποίησης της σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος, όπως είναι τα φθοριοχρώματα, ένζυμα, ραδιενεργά στοιχεία ή ο κολλοειδής χρυσός. Οι Albert H. Coons και συν, ήταν οι πρώτοι που σήμαναν αντισώματα με φθοριοχρώματα και τα χρησιμοποίησαν για να ταυτοποιήσουν αντιγόνα σε ιστούς. Με την εξάπλωση και την ανάπτυξη της τεχνικής της ανοσοϊστοχημείας, ενζυμικοί δείκτες έχουν εισαχθεί όπως: η υπεροξειδάση και η αλκαλική φωσφατάση. Ο κολλοειδής χρυσός χρησιμοποιήθηκε σε ανοσοϊστοχημικές αντιδράσεις ηλεκτρονικού και οπτικού φωτομικροσκοπίου. Άλλοι δείκτες, συμπεριλαμβανομένων των ραδιενεργών στοιχείων ανιχνεύονται με αυτοραδιογραφία.

Καθώς η ανοσοϊστοχημεία βασίζεται στην ειδική αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος, παρουσιάζεται πλεονεκτικότερη έναντι άλλων κλασσικών μεθόδων χρώσης, οι οποίες μπορούν να ταυτοποιήσουν έναν περιορισμένο αριθμό πρωτεϊνών, ενζύμων και ιστικών στοιχείων. Για το λόγο αυτό ακριβώς, η ανοσοϊστοχημεία ως τεχνική κεφαλαιώδους σημασίας, χρησιμοποιείται ευρέως για την έρευνα αλλά και την κλινική διαγνωστική. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι ανοσοϊστοχημείας για τον εντοπισμό αντιγόνων και η επιλογή της καταλληλότερης θα πρέπει να γίνεται με βάση συγκεκριμένες παραμέτρους, όπως: ο τύπος του υπό εξέταση δείγματος και ο βαθμός ευαισθησίας που απαιτείται.

α) Ιστική επεξεργασία

Η επεξεργασία του ιστού μετά τη λήψη του, (βιοψία, χειρουργικό παρασκεύασμα) είναι θεμελιώδους σημασίας για την επιτυχή εφαρμογή της ανοσοϊστοχημείας. Άμεση και επαρκής μονιμοποίηση του ιστού είναι απαραίτητη για την διατήρηση της αρχιτεκτονικής του ιστού και της μορφολογίας των κυττάρων. Αντίθετα ακατάλληλη ή παρατεταμένη μονιμοποίηση μπορεί να ελαττώσει σημαντικά την ικανότητα δέσμευσης των αντισωμάτων. Ένας και μοναδικός τρόπος μονιμοποίησης για όλα τα αντιγόνα δεν υπάρχει. Ωστόσο, πολλά αντιγόνα ανιχνεύονται με επιτυχία σε τομές ιστών που έχουν μονιμοποιηθεί με διάλυμα 10% φορμόλης και έχουν εγκλεισθεί σε κύβους παραφίνης. Η ανακάλυψη και η ανάπτυξη



τεχνικών ανάδειξης αντιγονικών θέσεων ενίσχυσε περαιτέρω τη χρήση φορμόλης ως μονιμοποιητικού διαλύματος ρουτίνας για την εφαρμογή τεχνικών ανοσοϊστοχημείας.

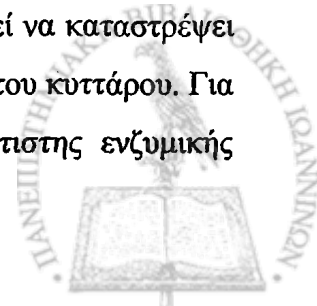
Τα διαλύματα μονιμοποίησης που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι:

1. διάλυμα 10% ουδέτερης φορμόλης
2. 4% paraformaldehyde σε 0.1M phosphate buffer
3. 2% paraformaldehyde με 0.2% picric acid σε 0.1M phosphate buffer
4. PLP fixative: 4% paraformaldehyde, 0.2% periodate και 1.2% lysine σε 0.1M phosphate buffer
5. 4% paraformaldehyde με 0.05% glutaraldehyde

β) Ανάδειξη αντιγόνων

Η ανάδειξη πολλών αντιγόνων μπορεί να ενισχυθεί με προεργασία των δειγμάτων με αντιδραστήρια αντιγονικής επανάκτησης, τα οποία μπορούν να διασπάσουν τους πρωτεϊνικούς δεσμούς (protein cross-links) μέσω γεφυρών μεθυλενίου που σχηματίζονται κατά τη μονιμοποίηση με φορμόλη, επανακτώντας έτσι κρυμμένους αντιγονικούς επιτόπους. Στις τεχνικές επανάκτησης συμπεριλαμβάνεται η θέρμανση, για διάφορους χρόνους επώασης, τομών παραφίνης μέσα σε υδατικό διάλυμα, το οποίο συνήθως αναφέρεται και ως διάλυμα επανάκτησης. Η τεχνική αυτή καλείται Heat Induced Epitope Retrieval (HIER). Μια άλλη μέθοδος χρησιμοποιεί ενζυμική πέψη με διάφορα ένζυμα και καλείται Proteolytic Induced Epitope Retrieval (PIER). Για την τεχνική θέρμανσης χρησιμοποιούνται ως θερμαντικά μέσα, φούρνος μικροκυμάτων, αυτόκαυστο και υδατόλουτρο. Ο χρόνος επώασης των 20 min φαίνεται να είναι ο πιο ικανοποιητικός, ενώ το σύνηθες διάλυμα επανάκτησης είναι το διάλυμα κιτρικών με pH=6 (Citrate buffer, pH=6). Η πρωτεΐνάση K είναι αποτελεσματική για την ενζυμική πέψη μεμβρανικών αντιγόνων όπως είναι οι ιντεγκρίνες, CD31, vWF κ.α

Η πρωτεολυτική ενζυμική μέθοδος (με χρήση πρωτεΐνάσης K, τρυψίνης, πεψίνης, προνάσης και άλλων πρωτεασών) χρησιμοποιείται επίσης για την επανάκτηση της ανοσοδραστικότητας των αντιγόνων με διάφορους ωστόσο βαθμούς επιτυχίας. Επιπλέον, η χρήση της μεθόδου με ενζυμική πέψη μπορεί να καταστρέψει κάποιους αντιγονικούς επιτόπους καθώς επίσης και τη μορφολογία του κυττάρου. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη κάθε φορά η εύρεση της βέλτιστης ενζυμικής συγκέντρωσης και του χρόνου επώασης.



Η κύρια αιτία μη ειδικής χρώσης (background staining), είναι η μη-ανοσολογική πρόσδεση των αντισωμάτων λόγω υδροφοβικών και ηλεκτροστατικών δυνάμεων σε συγκεκριμένες θέσεις μέσα στον ιστό. Η μη ειδική χρώση είναι συνήθης, ωστόσο μπορεί να μειωθεί με το μπλοκάρισμα αυτών των θέσεων με φυσιολογικό ορό.

Ενεργότητα ενδογενούς υπεροξειδάσης εμφανίζεται σε πολλούς ιστούς και μπορεί να ανιχνευθεί με την αντίδραση μονιμοποιημένων τομών με το χρωμογόνο/υπόστρωμα DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride). Η εξάλειψη της ενδογενούς δραστηριότητας υπεροξειδάσης, γίνεται με την προεργασία των δειγμάτων με υπεροξείδιο του υδρογόνου πριν την επώαση με το αντίσωμα.

Ειδικά δείγματα μάρτυρες (controls) θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για κάθε πρωτόκολλο. Οι θετικοί μάρτυρες (positive control) ελέγχουν την διαδικασία που χρησιμοποιείται. Εάν θετικό δείγμα εμφανίσει αρνητική χρώση, θα πρέπει η διαδικασία να επαναληφθεί μέχρις ότου το θετικό δείγμα να εμφανίζει έντονη χρώση. Ο αρνητικός μάρτυρας (negative control) χρησιμοποιείται για να ελέγξει την ειδικότητα του χρησιμοποιούμενου αντιγόνου.

Η ανοσοϊστοχημεία μπορεί να διακριθεί σε ανοσοϊστοχημεία άμεσης και έμμεσης μεθόδου. Στην άμεση μέθοδο, χρησιμοποιείται ένα μόνον αντίσωμα κατάλληλα σημασμένο (π.χ με φλουοροσκεΐνη FITC), το οποίο προσδένεται ευθέως στα αντιγόνα του ιστού. Η τεχνική αυτή είναι σύντομη και γρήγορη, ωστόσο, δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη εξαιτίας της μικρής ενίσχυσης του σήματος και σπανίως χρησιμοποιείται σήμερα μετά την εισαγωγή της έμμεσης μεθόδου.

Η έμμεση μέθοδος αποτελείται από ένα πρώτο μη σημασμένο αντίσωμα, το οποίο προσδένεται στα αντιγόνα του ιστού και από ένα δεύτερο σημασμένο αντίσωμα, το οποίο προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα θα πρέπει να είναι ειδικό εναντίον των ανοσοσφαιρινών IgG του είδους από το οποίο προήλθε το πρώτο αντίσωμα. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ πιο ευαίσθητη, εξαιτίας της ενίσχυσης του σήματος διαμέσου της πολλαπλής πρόσδεσης του δεύτερου αντισώματος σε διαφορετικές αντιγονικές θέσεις πάνω στο πρώτο αντίσωμα. Όταν το δεύτερο αντίσωμα σημαίνεται με φθοριοχρωστική (π.χ ροδαμίνη, Texas red), τότε η τεχνική καλείται έμμεση μέθοδος ανοσοφθορισμού, ενώ όταν χρησιμοποιείται κάποιο ένζυμο για την σήμανση (π.χ υπεροξειδάση, αλκαλική φωσφατάση), τότε καλείται έμμεση ανοσοενζυμική μέθοδος.



Τα συστήματα DakoCytomation's EnVision βασίζονται πάνω στην τεχνολογία των πολυμερών. Το σύστημα αυτό, επιτρέπει την πρόσδεση μεγάλου αριθμού ενζυμικών μορίων (υπεροξειδάσης ή αλκαλικής φωσφατάσης) σε ένα δεύτερο αντίσωμα μέσω του συνδέσμου δεξτράνης. Τα πλεονεκτήματα είναι πολλά και κυρίως είναι η αυξημένη ειδικότητα, η ελαχιστοποίηση μη ειδικής χρώσης και η μείωση των βημάτων που ακολουθούνται σε άλλες συμβατικές τεχνικές. Το πρωτόκολλο αποτελείται από τα εξής βήματα: α) εφαρμογή του κυρίως αντισώματος, β) εφαρμογή του πολυμερούς που είναι ενζυμικά σημασμένο και γ) εφαρμογή του χρωμογόνου υποστρώματος. Η EnVision+ τεχνική αναπτύχθηκε αργότερα και παρέχει αυξημένη ευαισθησία.

➤ Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την ανοσοϊστοχημική χρώση είναι τα εξής:

- Οι τομές παραφίνης εναποτίθενται πάνω σε γυάλινα πλακίδια μικροσκόπησης SuperFrost plus.
- Στη συνέχεια τα πλακίδια τοποθετούνται στον κλίβανο στους 60° C όπου και παραμένουν για ολονύκτια επώαση.
- Ακολουθεί αποπαραφίνωση, με τοποθέτηση των πλακιδίων σε κυψελίδα με ξυλόλη προθερμασμένη στους 60° C για 10 min.
- Επαναλαμβάνεται το τρίτο βήμα για επιπλέον 10min.
- Τα πλακίδια επανυδατώνονται με διαδοχική εμβάπτιση σε αιθανόλη 100°, 100°, 96° και 96° και ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό 4 φορές.
- Στη συνέχεια τοποθετούνται σε φούρνο μικροκυμάτων 2 φορές διαδοχικά από 15 min την κάθε φορά, σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών (citrate buffer) για την ανάδειξη των αντιγονικών θέσεων και τοποθετούνται σε απεσταγμένο νερό.
- Ακολουθεί εφαρμογή διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου συγκέντρωσης 3% σε μεθυλική αλκοόλη για 30 min, με σκοπό τη δέσμευση της ενδογενούς υπεροξειδάσης και εκπλένονται ξανά 4 φορές με απεσταγμένο νερό.
- Τα πλακίδια τοποθετούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS (trisaline buffer) για 10 min και εφαρμόζεται το κατάλληλο κάθε φορά αντίσωμα για τον ανάλογο χρόνο επώασης.



- Μετά το πέρας της επώασης, τα πλακίδια τοποθετούνται εκ νέου σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS για 10 min και εκπλένονται με απεσταγμένο νερό.
- Ακολουθεί εφαρμογή του Envision kit (DakoCytomation) για την αντίδραση της υπεροξειδάσης για 30 min και εφαρμόζεται ξανά ρυθμιστικό διάλυμα TBS για 10 min.
- Εφαρμόζεται το χρωμογόνο DAB για 3 min και τα πλακίδια εκπλένονται με απεσταγμένο νερό 2 φορές.
- Στη συνέχεια εφαρμόζεται διάλυμα αιματοξυλίνης 10% για 2 min και τα πλακίδια εκπλένονται με τρεχούμενο νερό βρύσης.
- Τα δείγματα αφυδατώνονται με διαδοχική εμβάπτιση σε αιθανόλη 95% για 1 min και 100% αιθανόλη επί 2 φορές για 3 min.
- Τα πλακίδια καθαρίζονται με ξυλόλη.
- Τέλος τα πλακίδια επικαλύπτονται με την καλυπτρίδα.



ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (EGFR) ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΤΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΠΕ

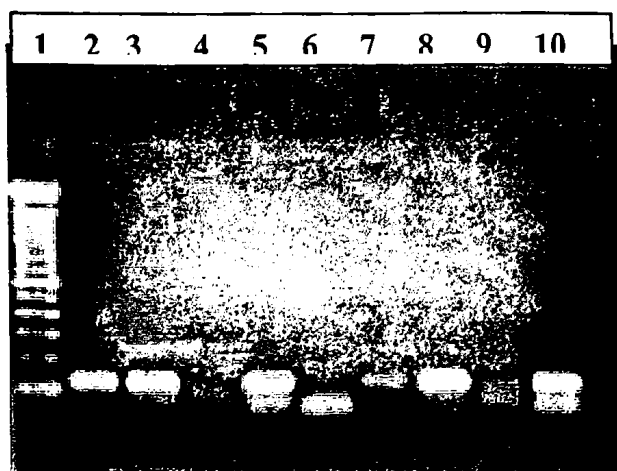
3.1.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ EGFR

Ανάλυση της μικροδορυφορικής αλληλουχίας του ιντρονίου 1 του γονιδίου EGFR

Η μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα του EGFR έχει συσχετισθεί με τον αυξανόμενο αριθμό μιας μικρής επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας κυτοσίνης-αδενίνης (SSR CA) του ιντρονίου 1 του γονιδίου σε διάφορα είδη καρκίνων. Κατά την ανάλυση των 50 δειγμάτων ΚΑΠΕ της παρούσας ερευνητικής εργασίας, ανιχνεύθηκαν πέντε διαφορετικού μήκους αλληλόμορφα με CA SSR που κυμαίνονται από 16 έως 20 επαναλήψεις. Τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης είχε το αλληλόμορφο 16 (39%), ακολουθούμενο από τα αλλήλια 18 (34%), 19 (11%), 20 (11%) και 17 (5%). Πέντε δείγματα εμφάνισαν ανευπλοειδία, καθώς ανιχνεύθηκαν τρία αλληλόμορφα σε καθένα από αυτά, γεγονός που υποδηλώνει τη γενετική τους αστάθεια. Όλα τα δείγματα εμφανίστηκαν ετερόζυγα, με κοινότυπο τον 16/18 (78%). Όσο αφορά τα πέντε ανευπλοειδικά δείγματα, που έφεραν τρία διαφορετικά EGFR αλληλόμορφα, η ανοσοϊστοχημική τους εκτίμηση έδειξε ότι υπερέκφραζαν την EGFR πρωτεΐνη σε ποσοστό 40%. Τριάντα τέσσερα δείγματα ήταν ετερόζυγα με αλληλόμορφα που έφεραν έως και 18 SSR CA επαναλήψεις, ενώ τέσσερα εξ αυτών εμφάνιζαν ισχυρή έκφραση του EGFR (ποσοστό 12%). Μεταξύ των ένδεκα δειγμάτων όπου ένα τουλάχιστον εκ των αλληλομόρφων τους εμφάνιζε πάνω από 18 CA SSR δεν υπήρξε κανένα που να υπερεκφράζει την EGFR πρωτεΐνη. Η συσχέτιση μεταξύ του μεγέθους της επαναλαμβανόμενης CA αλληλουχίας του ιντρονίου 1 και την πρωτεϊνικής υπερέκφρασης εμφάνισε οριακά στατιστική σημασία ($p=0.06$). Επιπλέον, στα είκοσι δείγματα που έφεραν τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο με 16 CA επαναλήψεις, το μήκος του άλλου αλληλομόρφου συσχετίστηκε με αντιστρόφως ανάλογη σχέση της πρωτεϊνικής EGFR έκφρασης ($p=0.04$). Όταν οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε τρεις υποομάδες, ανάλογα με το μήκος της SSR

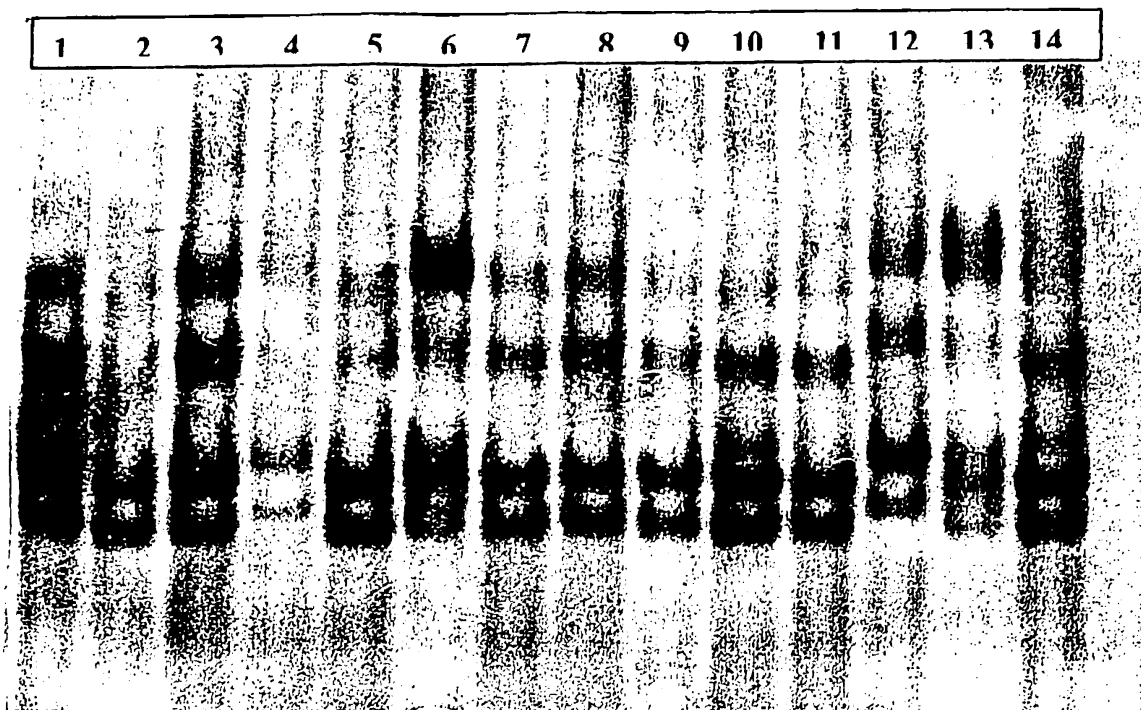


αλληλουχίας (τρία αλληλόμορφα, δύο αλληλόμορφα μέχρι 18 CA επαναλήψεις, οποιοδήποτε εκ των δύο αλληλομόρφων με περισσότερες από 18 CA επαναλήψεις), δεν προέκυψε καμία διαφορά ως προς την ολική επιβίωση ($p > 0.05$).



Εικόνα 19. Βέλτιστες συνθήκες για την ενίσχυση του ιντρονίου 1 του γονιδίου EGFR
Διαδρομή 1: DNA Marker

Διαδρομές 1-10: αντιστοιχούν σε προϊόντα αντίδρασης PCR με διαφορετικές συγκεντρώσεις $MgCl_2$, primers, DNA-εκμαγείου και θερμοκρασίας πρόσδεσης εκκινητών. Ως βέλτιστες συνθήκες επιλέχθηκαν εκείνες που ακολουθήθηκαν από το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στη διαδρομή οκτώ.



Εικόνα 20. Απεικόνιση της SSCP ανάλυσης για τις CA επαναλήψεις του ιντρονίου 1 του γονιδίου EGFR.

Διαδρομές: 1,2,3,5,7,8,9,10,11,13,14 αντιστοιχούν σε ετερόζυγα δείγματα με 16/18 CA επαναλήψεις

Διαδρομές: 4, 12 αντιστοιχούν σε ετερόζυγα δείγματα με 19/20 CA επαναλήψεις

Διαδρομή 6: αντιστοιχεί σε υπερπλοειδικό δείγμα με 16/19/20 επαναλήψεις

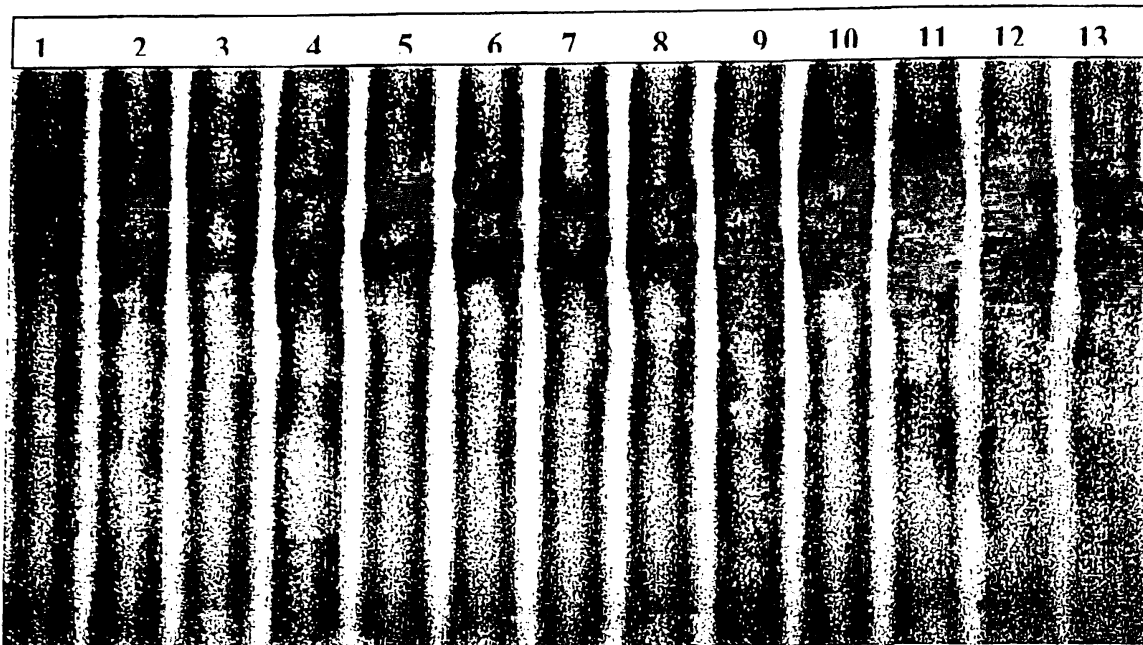
Μεταλλάξεις και ενίσχυση του γονιδίου EGFR

Πέραν της μη μεταφραζόμενης περιοχής του γονιδίου EGFR, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε και το μεταλλακτικό προφίλ των πενήντα δειγμάτων ΚΑΠΕ για τα εξόνια 18, 19, 21, που αντιστοιχούν στην ενδοκυττάρια περιοχή του υποδοχέα με δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης. Από τα πενήντα δείγματα, τα σαράντα οκτώ δεν εμφάνισαν ανώμαλο ηλεκτροφορητικό πρότυπο μετά από SSCP ηλεκτροφόρηση, σε σύγκριση με το πρότυπο DNA περιφερικού αίματος από αντίστοιχη ομάδα υγιών εθελοντών (ομάδα ελέγχου). Στα δύο δείγματα όπου και παρατηρήθηκε ανώμαλο ηλεκτροφορητικό πρότυπο, πραγματοποιήθηκε ανάλυση αλληλούχισσης (sequencing) των εξονίων για την ταυτοποίηση υπαρχόντων μεταλλάξεων ή/και πολυμορφισμών. Στο ένα δείγμα ταυτοποιήθηκε σημειακός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (single nucleotide polymorphism, SNP), όπου μια κυτοσίνη μεταπίπτει σε θυμίνη στη θέση 2508 του εξονίου 21 (2508C>T). Ωστόσο, πρόκειται για σιωπηλό πολυμορφισμό,

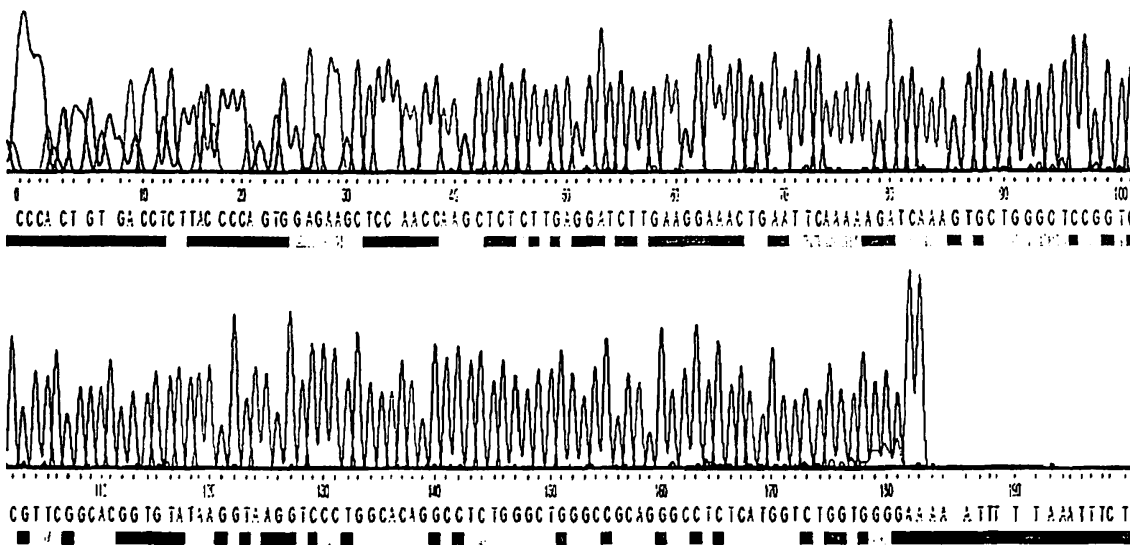
καθώς και τα δύο κωδικόνια CGC και CGT κωδικοποιούν το ίδιο αμινοξικό κατάλοιπο την αργινίνη (R). Πρόκειται λοιπόν για τον συνώνυμο R836R πολυμορφισμό, ο οποίος δεν έχει καμμία λειτουργική συνέπεια στην παραγόμενη πρωτεΐνη. Στο δεύτερο δείγμα ΚΑΠΕ που εμφάνισε ανώμαλο ηλεκτροφορητικό πρότυπο, η ανάλυση αλληλούχισης ταυτοποίησε μια νουκλεοτιδική υποκατάσταση γουανίνης από κυτοσίνη στην ιντρονική περιοχή εκατέρωθεν του εξονίου 19. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη (intervening sequence, IVS) IVS19+24G>A συμβαίνει σε μη κωδικοποιούσα περιοχή του DNA, ωστόσο πιθανώς να είναι μια RNA processing mutation, διότι δημιουργεί μια νέα θέση AG εναλλακτικού ματίσματος. Επομένως, είναι δυνατό κατά τη μεταγραφή του DNA, να δημιουργηθεί ένα νέο mRNA μετάγραφο, με τελικό αποτέλεσμα κατά τη ριβοσωμική μετάφραση να παραχθεί μια νέα πρωτεΐνη με διαφορετική αμινοξική αλληλουχία και τεταρτοταγή δομή, η οποία καθορίζει και τη λειτουργία της. Ελέγχοντας ανοσοϊστοχημικά τις πιθανές επιπτώσεις της εν λόγω μετάλλαξης στην πρωτεϊνική έκφραση του γονιδίου, βρέθηκε ότι ο όγκος εμφάνιζε θετική EGFR χρώση μέτριας έντασης. Ο συγκεκριμένος ασθενής που έφερε την IVS19+24G>A μετάλλαξη ήταν καπνιστής και είχε διαγνωστεί με πνευμονικές και ηπατικές μεταστάσεις. Η βρογχοσκόπηση ήταν φυσιολογική και η βιοψία του πνεύμονα αποκάλυψε την ύπαρξη ενός καρκινώματος με χαμηλή διαφοροποίηση. Στον ασθενή χορηγήθηκε χημειοθεραπευτικό σχήμα πλατίνας-ταξάνης, ωστόσο υπέκυψε επτά μήνες αργότερα.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των πενήντα ΚΑΠΕ δειγμάτων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αληθούς χρόνου για την ταυτοποίηση γονιδιακής ενίσχυσης των εξονίων 18,19,21 του EGFR. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε ποσοτική Real-time PCR με χρήση SYBR Green, ως φθορίζουσα χρωστική. Για την σύγκριση του αριθμού των γονιδιακών αντιγράφων ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε DNA περιφερικού αίματος υγιούς ατόμου, ενώ ως γονιδιακή ενίσχυση, ορίστηκε ο αριθμός των κύκλων πριν την εκθετική ανάπτυξη του γνωστού δείγματος. Ωστόσο στην παρούσα ερευνητική μελέτη δεν παρουσιάστηκε αυξημένος αριθμός αντιγράφων για κανένα εκ των τριών εξονίων και σε κανένα δείγμα.



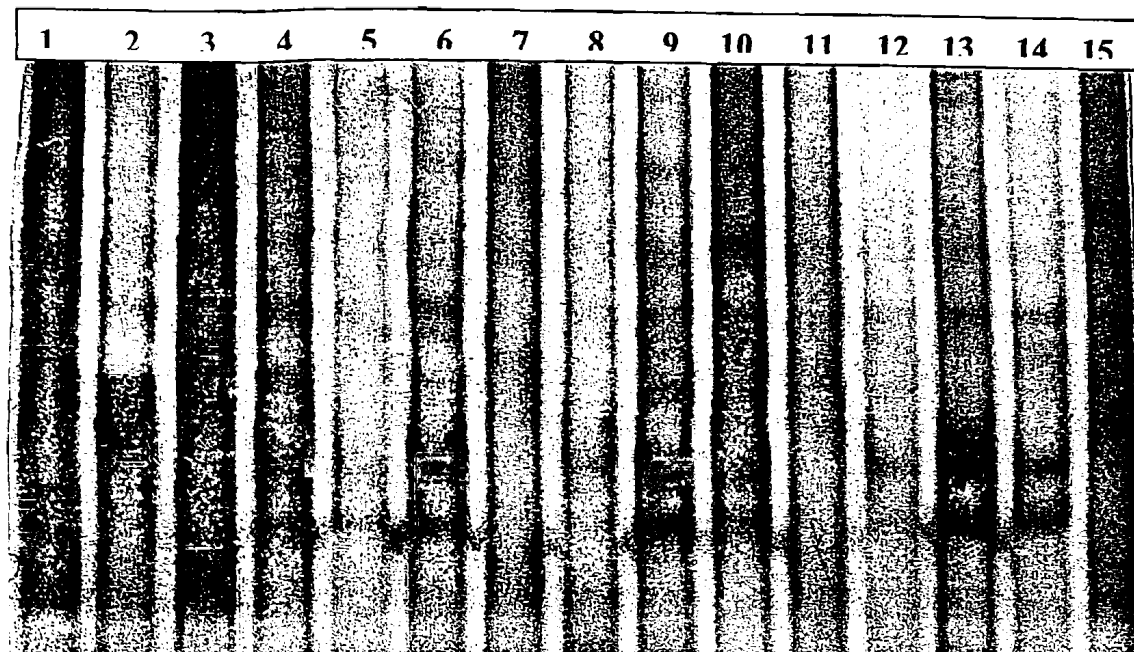


Εικόνα 21. Απεικόνιση της SSCP ανάλυσης του εξονίου 18, όπου δεν παρατηρείται σε καμία διαδρομή ανώμαλο ηλεκτροφορητικό πρότυπο.

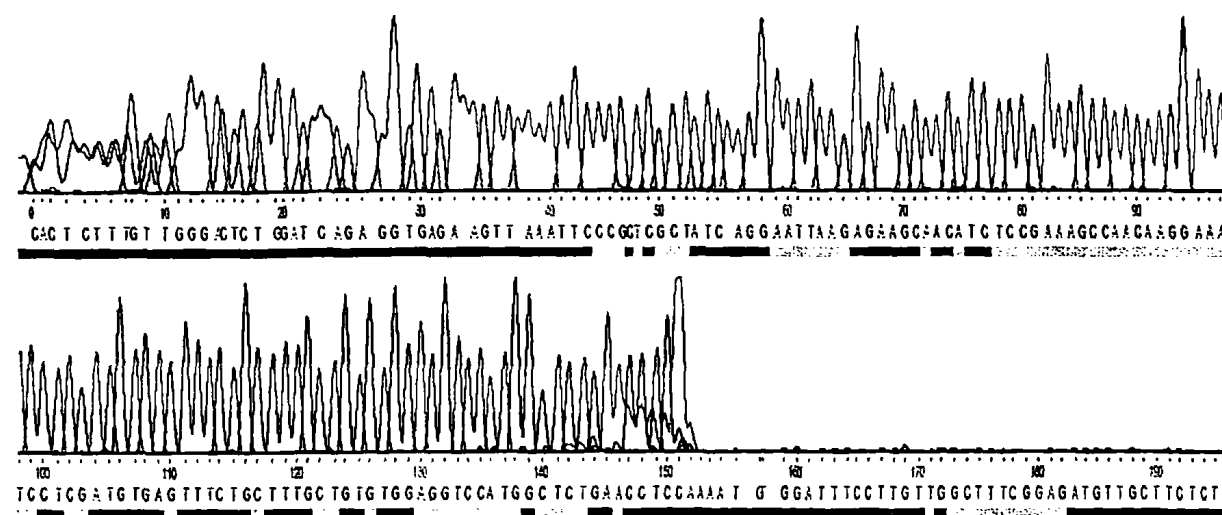


Εικόνα 21. Απεικόνιση χρωμοδιαγράμματος κατά την ανάγνωση της αλληλουχίας του εξονίου 18. Η αλληλουχία αυτή ταυτίζεται με την φυσικού τύπου αλληλουχία που είναι κατατεθειμένη σε τράπεζα αλληλουχιών στο NCBI, όπως ταυτοποιήθηκε από την *in silico* επεξεργασία με το υπολογιστικό πρόγραμμα BLASTn. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>)



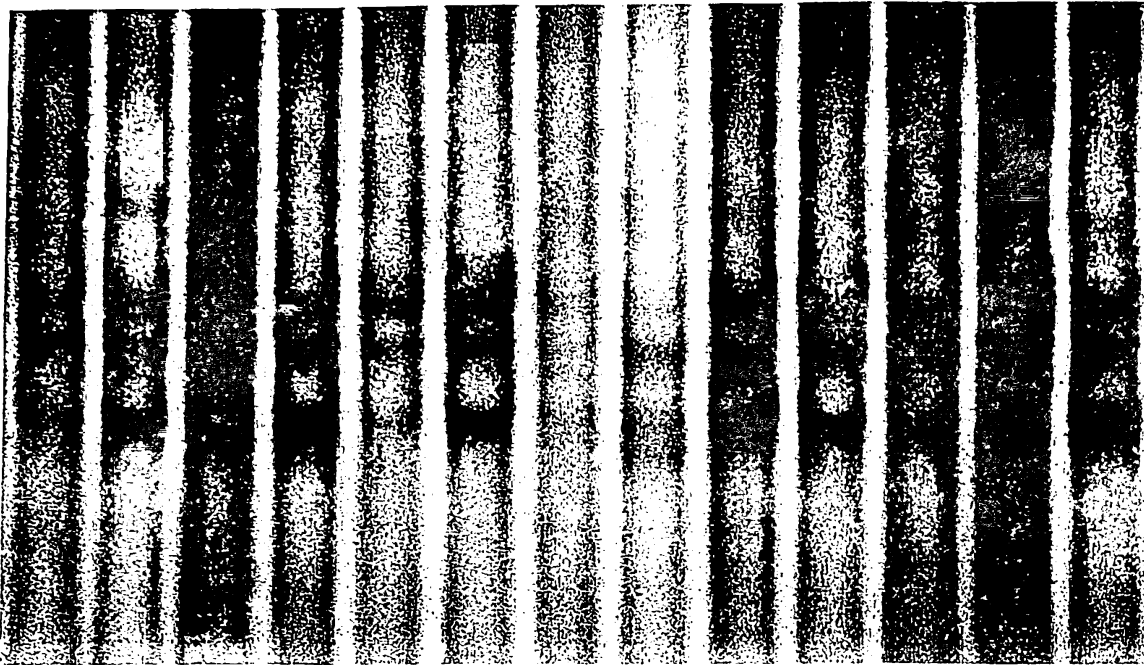


Εικόνα 22. Απεικόνιση της SSCP ανάλυσης του εξονίου 21, όπου δεν παρατηρείται σε καμία διαδρομή ανώμαλο ηλεκτροφορητικό πρότυπο.

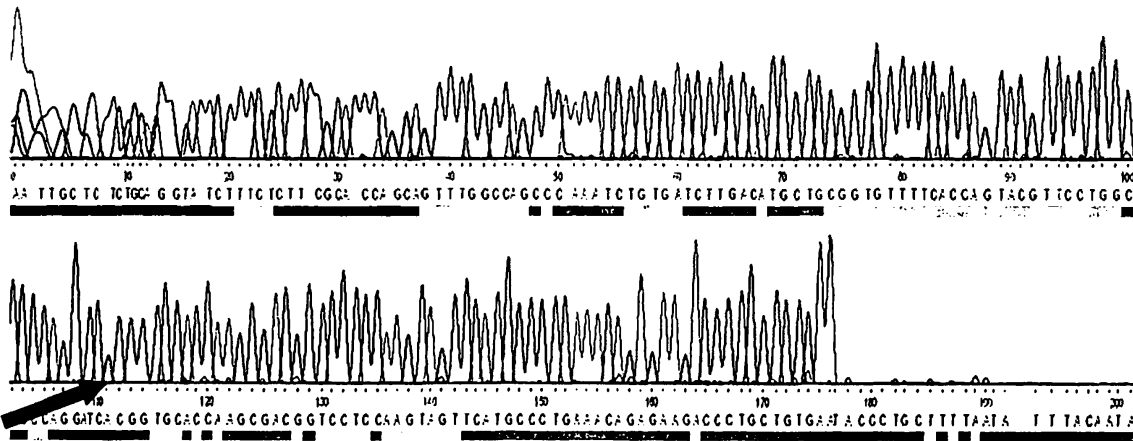


Εικόνα 23. Απεικόνιση χρωμοδιαγράμματος κατά την ανάγνωση της αλληλουχίας του εξονίου 21. Η αλληλουχία αυτή ταυτίζεται με την φυσικού τύπου αλληλουχία που είναι κατατεθειμένη σε τράπεζα αλληλουχιών στο NCBI, όπως ταυτοποιήθηκε από την *in silico* επεξεργασία με το υπολογιστικό πρόγραμμα BLASTn. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>)



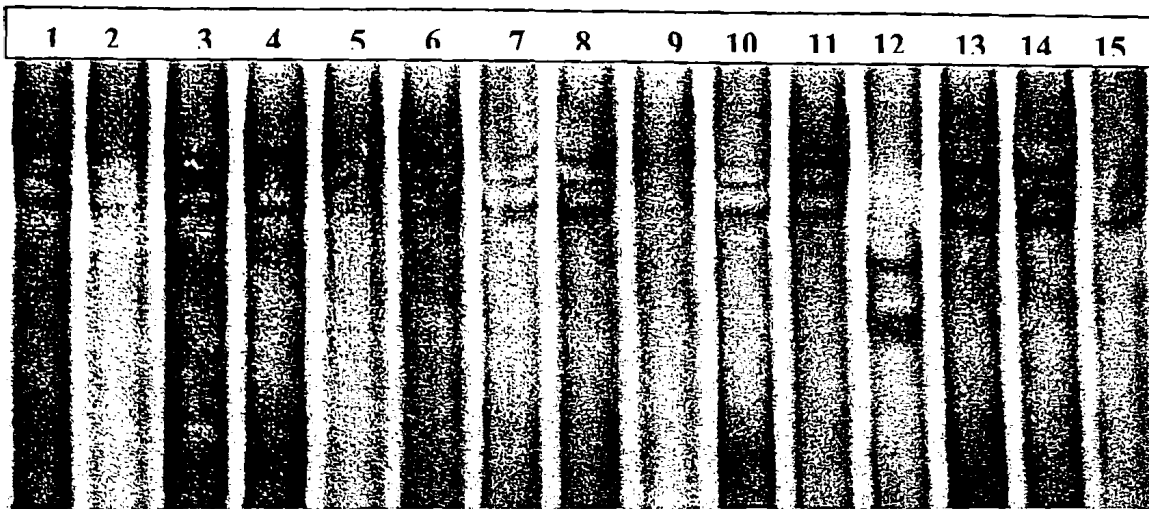


Εικόνα 24. Σε όλες τις διαδρομές εκτός της διαδρομής 8, εμφανίζεται ομοιόμορφο ηλεκτροφορητικό πρότυπο για το εξόνιο 21. Στη διαδρομή 8 αντιστοιχεί το δείγμα με το σιωπηλό πολυμορφισμό, SNP R836R.

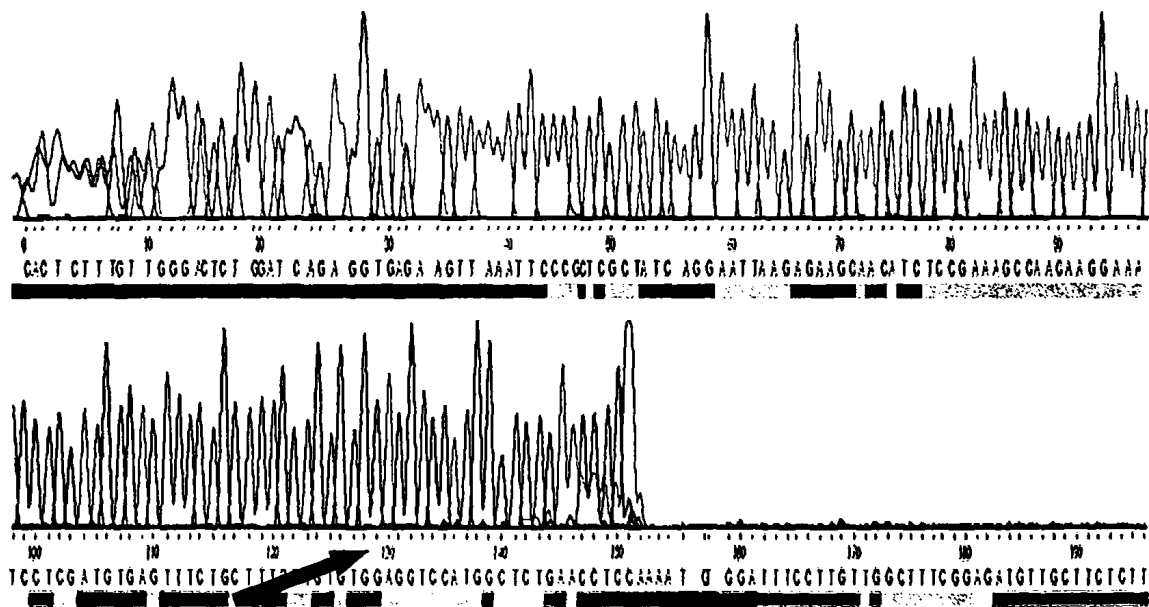


Εικόνα 25. Απεικόνιση χρωμοδιαγράμματος κατά την ανάγνωση της αλληλουχίας του εξονίου 21. Στη θέση 111 απεικονίζεται η υποκατάσταση 2508G>A, όπως ταυτοποιήθηκε από την *in silico* επεξεργασία με το υπολογιστικό πρόγραμμα BLASTn. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). Η υποκατάσταση αυτή δεν επηρεάζει την αλληλουχία της πρωτεΐνης, διότι η παραγόμενη τριπλέτα κωδικοποιεί το ίδιο αμινοξύ, με αποτέλεσμα η συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλλαγή να χαρακτηρίζεται ως synonymous SNP R836R.





Εικόνα 26. Σε όλες τις διαδρομές εκτός της διαδρομής 12, εμφανίζεται ομοιόμορφο ηλεκτροφορητικό πρότυπο για το εξόνιο 19 . Στη διαδρομή 12 αντιστοιχεί το δείγμα με την IVS19+24G>A μετάλλαξη.



Εικόνα 27. Απεικόνιση χρωμοδιαγράμματος κατά την ανάγνωση της αλληλουχίας του εξονίου 19 στο δείγμα που έφερε την IVS19+24G>A μετάλλαξη, όπως αυτή εμφανίστηκε στη θέση 130 του διαγράμματος.

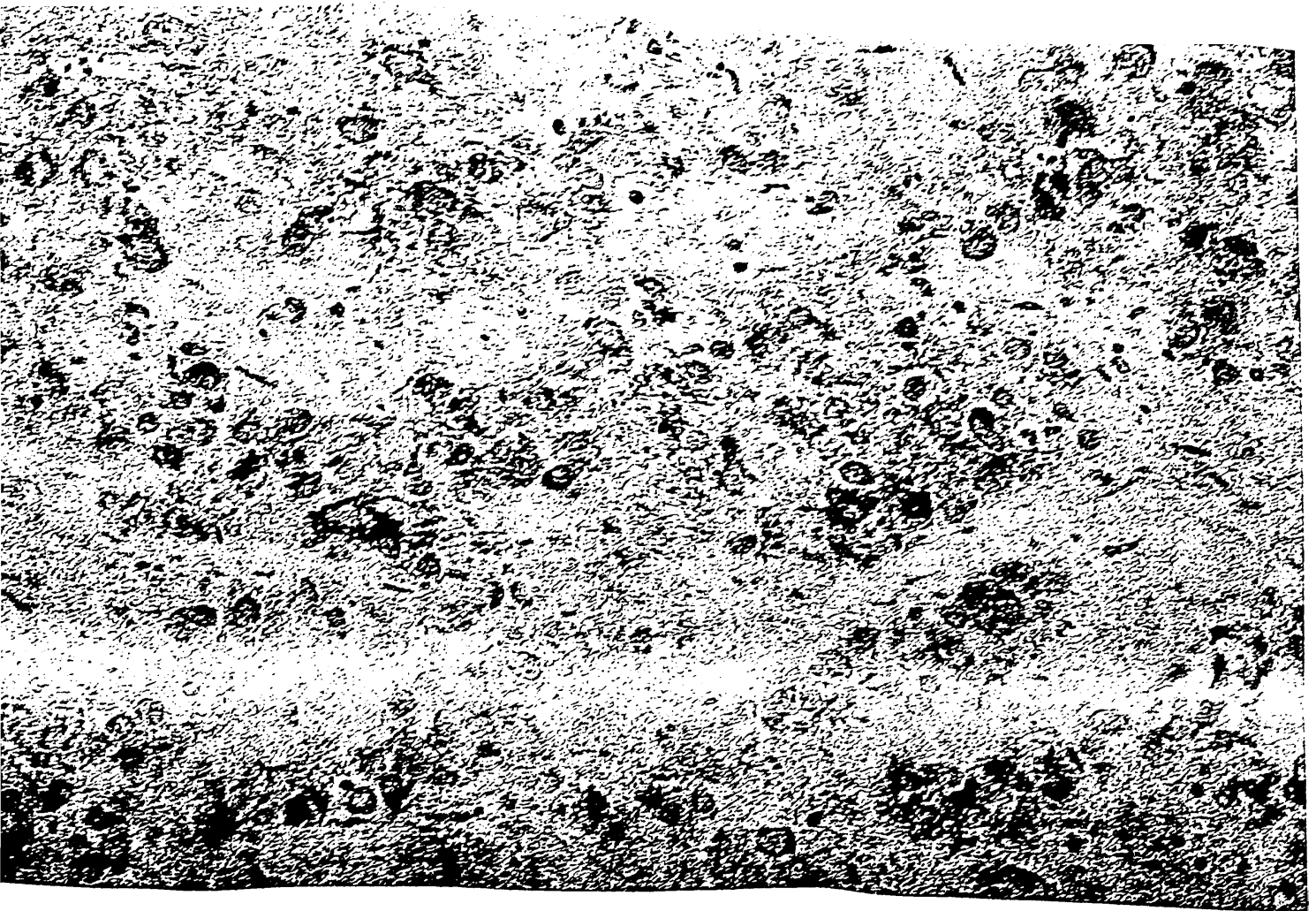


3.1.2 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ EGFR

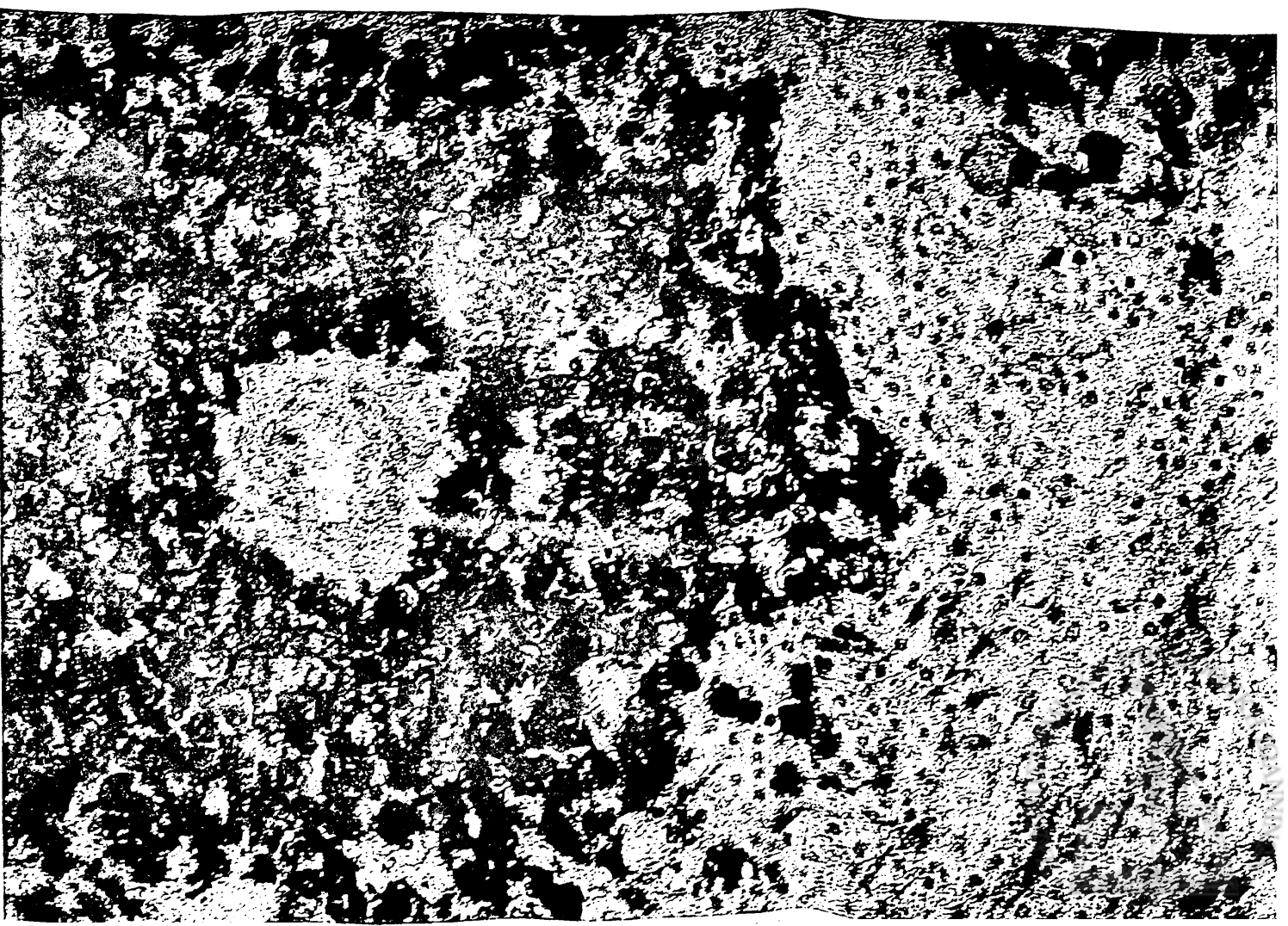
Σαράντα έξι περιπτώσεις ΚΑΠΕ αξιολογήθηκαν ως προς την έκφραση του EGFR. Στα μισά εκ των δειγμάτων βρέθηκε αρνητική ή ασθενής χρώση με ποσοστά εμφάνισης 26% και 20% αντιστοίχως. Το 42% των δειγμάτων εμφάνισε μέτρια χρώση, ενώ εντόνως θετική χρώση εμφάνισε ένα μικρό ποσοστό της τάξης του 12%. Η χρώση ήταν εντοπισμένη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των νεοπλασματικών κυττάρων. Σε μικρό ποσοστό των περιπτώσεων παρατηρήθηκε επιπλέον και κυτταροπλασματική χρώση (15%).

Δεν παρατηρήθηκε στατιστική συσχέτιση μεταξύ της EGFR πρωτεϊνικής υπερέκφρασης και ύπαρξης μεταστατικών θέσεων σε άλλα όργανα ($p > 0.05$, Fisher's Exact Test). Επίσης, δεν βρέθηκε συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής υπερέκφρασης ούτε της έκφρασης του EGFR με προγνωστική αξία για την επιβίωση των ασθενών ($p > 0.05$). Τα έξι εκ των δειγμάτων που υπερέκφραζαν την EGFR πρωτεΐνη δεν εμφάνιζαν κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο κλινικής παρουσίασης και μεταστατικής συμπεριφοράς, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ταξινόμησή τους σε συγκεκριμένη κλινικοπαθολογική υποομάδα, ούτε εμφάνιζαν κάποιο στοιχείο το οποίο θα μπορούσε να υποδηλώσει την πρωτοπαθή εστία. Οι τρεις ασθενείς εμφάνιζαν μεταστάσεις μέσης γραμμής, δύο σπλαχνικές μεταστάσεις και ένας εξ αυτών περιτοναϊκή καρκινωμάτωση.





Εικόνα 28. Απεικόνιση δείγματος ΚΑΠΕ με ασθενή EGFR ανοσοϊστοχημική έκφραση



Πίνακας 18. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της EGFR πρωτεΐνης σε 50 δειγματα ΚΑΠΕ

Χρώση	Αριθμός δειγμάτων ΚΑΠΕ	Ποσοστό έκφρασης
<i>Αρνητική</i>	13	26%
<i>Ασθενώς θετική</i>	10	20%
<i>Μετρίως θετική</i>	21	42%
<i>Ίσχυρώς θετική</i>	6	12%
Μήκος ιντρονικής 1 αλληλουχίας SSR	Αριθμός δειγμάτων ΚΑΠΕ	Ποσοστό με EGFR υπερέκφραση
<i>Παρουσία τριών αλληλίων</i>	5	40%
<i>Όγκοι με αλληλία μήκους μέχρι $\leq 18 CA$</i>	34	12%
<i>Όγκοι με τουλάχιστον ένα αλληλίο $> 18 CA$</i>	11	0%

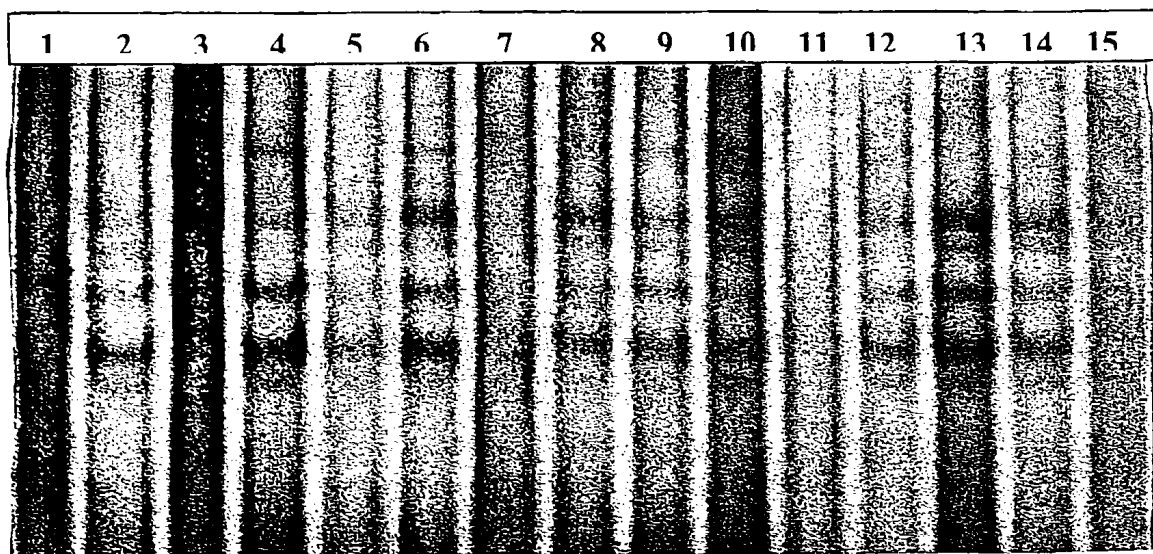
3.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (C-KIT/CD117) ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΤΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΠΕ

3.2.1 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ C-KIT

Στην παρούσα μελέτη, αναλύθηκε η κωδικοποιούσα αλληλουχία του εξονίου 11 (κωδικόνια 550-590), που αντιστοιχεί στην παραμεμβρανική περιοχή του c-kit υποδοχέα. Συνολικά αναλύθηκαν πενήντα δείγματα ΚΑΠΕ, δύο γαστρεντερικοί στρωματικοί όγκοι (GISTs) ως θετικοί μάρτυρες και λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος δύο υγιών εθελοντών ως αρνητικοί μάρτυρες. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γενετικού υλικού, το εξόνιο 11 ενισχύθηκε με PCR και η ποιότητα των αντιγράφων ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης. Στη συνέχεια τα προϊόντα της PCR, αναλύθηκαν για ύπαρξη μεταλλάξεων ή/και πολυμορφισμών με ηλεκτροφόρηση μη αποδιατακτικού πήγματος, σύμφωνα με τη μοριακή τεχνική της SSCP. Σε κανένα εκ των πενήντα ΚΑΠΕ δειγμάτων, όπως επίσης και σε δύο αρνητικούς μάρτυρες, δεν ανιχνεύθηκε ουδεμία σημειακή μετάλλαξη, πολυμορφισμός, ένθεση ή απαλοιφή του εξονίου 11. Τα SSCP πειράματα δεν ταυτοποίησαν ανώμαλο ηλεκτροφορητικό πρότυπο (aberrant pattern) των δειγμάτων



ΚΑΠΕ σε σχέση με αυτό που εμφάνισαν οι δύο γαστρεντερικοί όγκοι (θετικοί μάρτυρες), οι οποίοι έφεραν μεταλλάξεις του εξονίου 11 του c-kit γονιδίου. Σε μια προσπάθεια αύξησης της ευαισθησίας της μεθόδου, ώστε να αποκαλυφθούν τυχόν διαφορές στη μεταναστευτική πορεία των DNA αλυσίδων διαμέσου του πλέγματος του πολυακρυλαμιδίου, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον πειραματικά πρωτόκολλα σε θερμοκρασία δωματίου, σε ψυχρό θάλαμο (σταθερή θερμοκρασία 4°C) και με προσθήκη ή όχι γλυκερόλης στο μίγμα της γέλης. Ωστόσο και πάλι δεν ανιχνεύθηκαν ανώμαλα ηλεκτροφορητικά πρότυπα. Για την πλήρη απόδειξη της έλλειψης μεταλλάξεων ή/και πολυμορφισμών στην θερμή κατά τα άλλα περιοχή μεταλλάξεων του εξονίου 11, σε πέντε εκ των δειγμάτων ΚΑΠΕ έγινε ανάγνωση της αλληλουχίας και επιβεβαίωση του αγρίου τύπου (wild type) του εξονίου.



Εικόνα 30. Απεικόνιση της SSCP ανάλυσης του εξονίου 11 του γονιδίου c-kit, όπου δεν παρατηρείται σε καμία διαδρομή ανώμαλο ηλεκτροφορητικό πρότυπο.

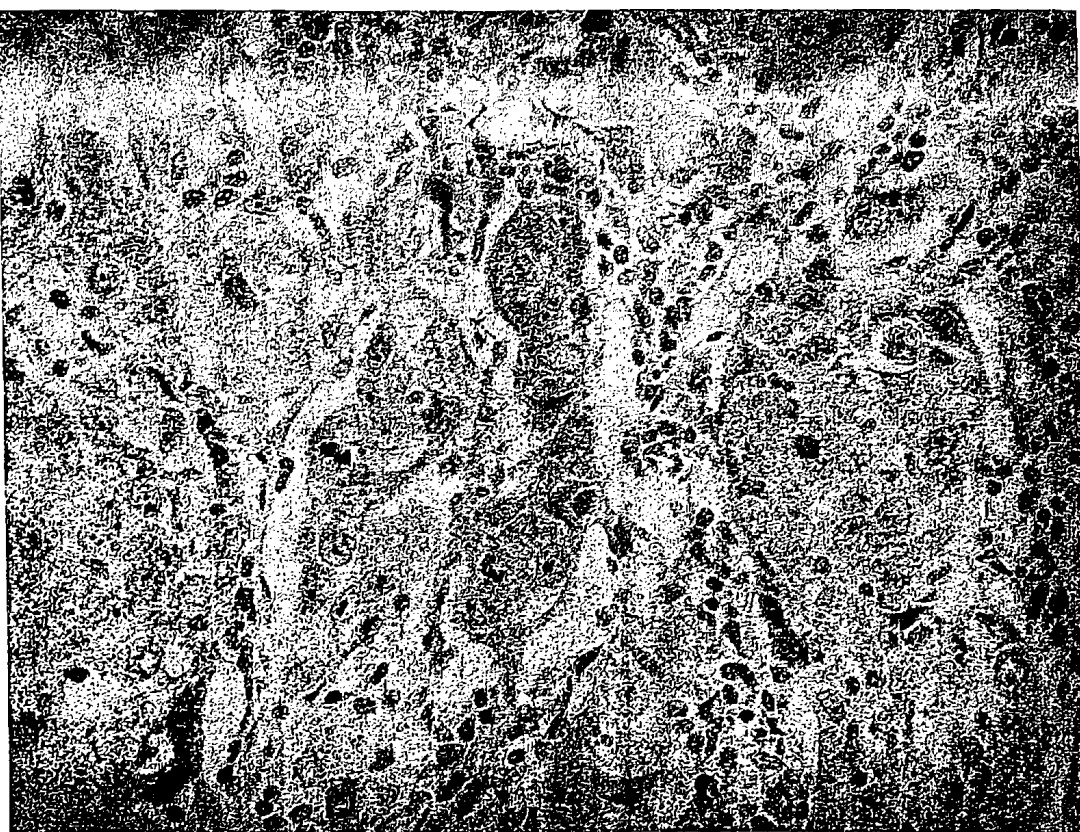


Εικόνα 31. Απεικόνιση της SSCP ανάλυσης του εξονίου 11 του γονιδίου c-kit όπου, παρατηρείται το ανώμαλο ηλεκτροφορητικό πρότυπο των δειγμάτων που βρίσκονται στις θέσεις 1,2,12,13. Τα δείγματα αυτά είναι δείγματα από GISTs που έφεραν τη V559D, τη συχνότερη παρατηρούμενη μετάλλαξη στο εξόνιο 11 και χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. Είναι φανερή η διαφορά του ηλεκτροφορητικού προτύπου μεταξύ των GISTs δειγμάτων (mutant) και των δειγμάτων ΚΑΠΕ (wild type).

3.2.2 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ C-KIT

Ανοσοϊστοχημική εκτίμηση της πρωτεΐνης KIT (CD117), ήταν δυνατή σε 37 από τις 50 περιπτώσεις με ΚΑΠΕ, λόγω εξάντλησης του βιοπτικού υλικού. Επτά από τα τριάντα επτά δείγματα (19%), χαρακτηρίστηκαν αρνητικής CD117 έκφρασης, ενώ θετική έκφραση παρατηρήθηκε σε όλους τους τριάντα εναπομείναντες όγκους (81% των περιπτώσεων). Είκοσι ένα δείγματα ήταν ασθενώς θετικά (57%), τέσσερα μετρίως θετικά (11%) και πέντε εμφάνισαν εντόνως θετική CD117 χρώση (13%). Οι συγκρίσεις για την ένταση της χρώσης έγιναν σύμφωνα με την χρώση που εμφάνισαν μαστοκύτταρα, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως ως εσωτερικοί θετικοί μάρτυρες. Η ανοσοϊστοχημική χρώση των θετικών δειγμάτων εντοπίστηκε στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ή στη μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα νεοπλασματικών κυττάρων. Η εμφάνιση μόνο κυτταροπλασματικής χρώσης, θεωρήθηκε ως ψευδώς θετικό αποτέλεσμα διότι εμφανίστηκε σε αρνητικούς μάρτυρες για το CD117 κατά τη διάρκεια προσαρμοστικών-δοκιμαστικών πειραμάτων. Στα δείγματα με μεμβρανική και κυτταροπλασματική χρώση δεν ανιχνεύθηκε επίταση περιτυρηνικής χρώσης (Golgi apparatus). Δεν παρατηρήθηκε

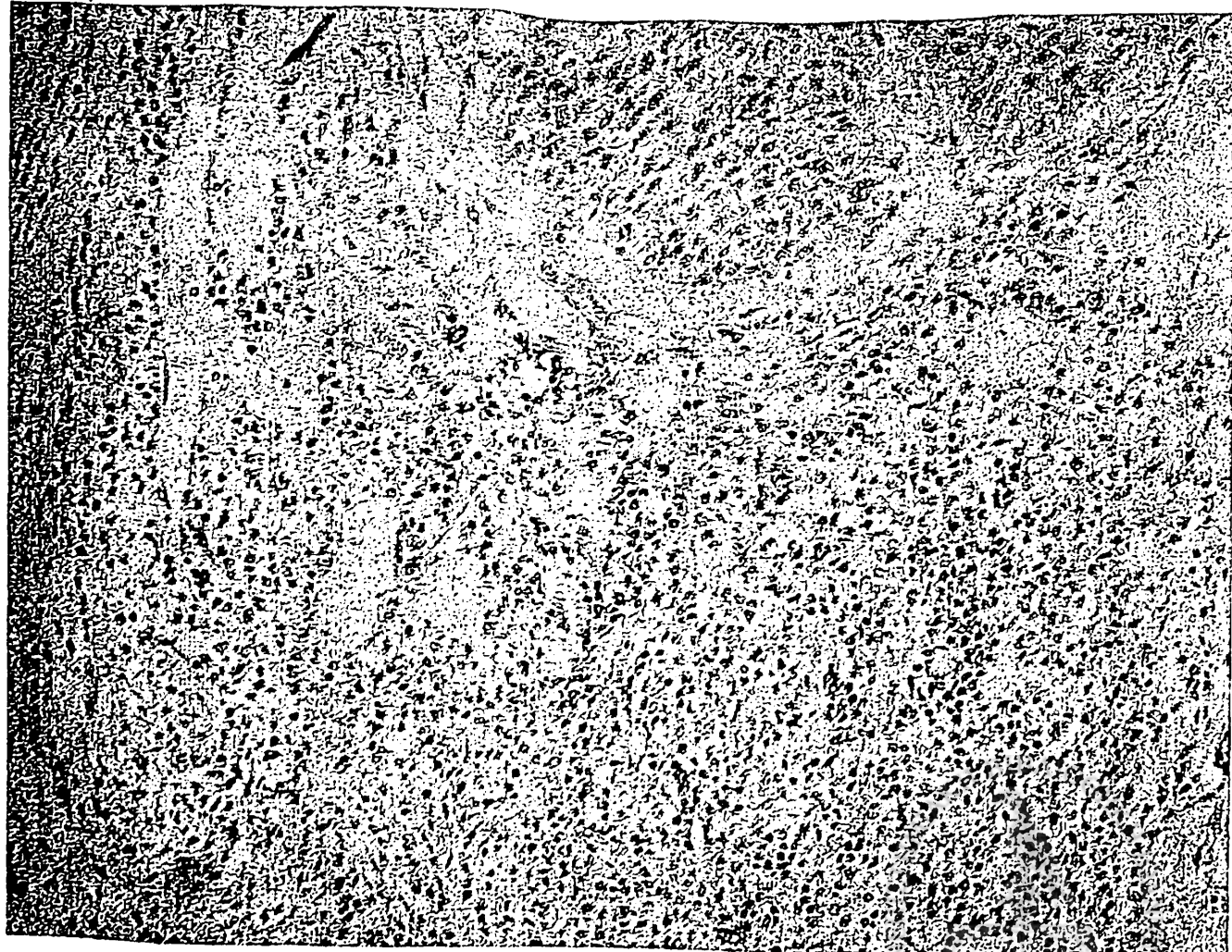
ιστική συσχέτιση μεταξύ της C-KIT πρωτεϊνικής υπερέκφρασης και επιβίωσης ασθενών ($p>0.05$) ούτε με κάποια άλλη κλινικοπαθολογική παράμετρο, ωστόσο, ω του υψηλού βαθμού CD117 θετικότητας των ΚΑΠΕ, τα αποτελέσματα ολογήθηκαν σύμφωνα με τον τύπο των καρκινωμάτων και βρέθηκε ότι θετικοί: 7/7 γαστρεντερικοί στρωματικοί όγκοι, 4/12 σεμινώματα, 2/20 μη προκυτταρικοί και 3/15 μικροκυτταρικοί καρκίνοι του πνεύμονα.



κόνα 32. Απεικόνιση δείγματος ΚΑΠΕ με ασθενή C-KIT ανοσοϊστοχημική φραση



Εικόνα 33. Απεικόνιση δείγματος ΚΑΠΕ με έντονη C-KIT ανοσοϊστοχημική έκφραση

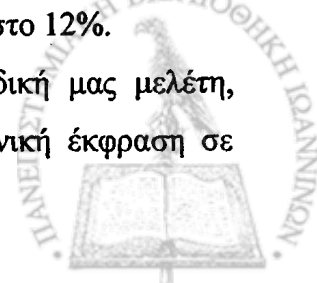


Εικόνα 33. Απεικόνιση δείγματος ΚΑΠΕ με αρνητική C-KIT ανοσοϊστοχημική έκφραση, ενώ τα μαστοκύτταρα, ως εσωτερικοί θετικοί μάρτυρες, παρουσιάζουν έντονη έκφραση

3.3 ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Με βάση τα αποτελέσματα που προαναφέρθηκαν στα κεφάλαια 2.4-2.5 καταλήγουμε επιγραμματικά στα ακόλουθα συμπεράσματα.

- Η EGFR μεταλλακτική διαλογή μέσω SSCP μοριακής μεθόδου αξιολογείται ως μια ταχύτατη, αξιόπιστη και με μεγάλη ευαισθησία μέθοδος.
- Στο σύνολο των ασθενών της παρούσας μελέτης, η αλληλική τρισωμία και το μήκος των αλληλομόρφων έως και 18 CA επαναλήψεις, έδειξαν μια τάση για συσχέτιση με αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση του EGFR.
- Συγκεκριμένα υπό την παρουσία αλληλομόρφου με 16 CA επαναλήψεις, το μήκος του δευτέρου αλληλομόρφου συσχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με την έκφραση της πρωτεΐνης.
- Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ενισχύουν την άποψη επίδρασης του EGFR γονιδιακού πολυμορφισμού του ιντρονίου 1 στη ρύθμιση της πρωτεϊνικής έκφρασης των νεοπλασματικών κυττάρων.
- Αν και η μελετούμενη ομάδα των ΚΑΠΕ ήταν περιορισμένη, η SSR αλληλουχία του ιντρονίου 1 του EGFR δεν μπορεί να θεωρηθεί ως δείκτης βιολογικής συμπεριφοράς και κλινικής έκβασης και για αυτό δεν θα ήταν χρήσιμη η ταξινόμηση σε υποομάδες των ασθενών ούτε η προσαρμοσμένη θεραπεία με βάση αυτόν τον βιολογικό δείκτη.
- Η μόνη μετάλλαξη του EGFR που ταυτοποιήθηκε είναι ιντρονική και δεν ανήκει σε θερμά σημεία “hot-spots” μεταλλάξεων των εξονίων 18,19,21 που μελετήθηκαν.
- Η μετάλλαξη αυτή πιθανώς να προκαλεί εναλλακτικό τρόπο ματίσματος του mRNA και δημιουργία μιας νέας πρωτεΐνης με άγνωστες ιδιότητες.
- Στην παρούσα μελέτη δεν ανευρέθηκαν στοιχεία που να υποδηλώνουν ενίσχυση των εξονίων 18,19, 21 του EGFR κατά την ανάλυση των πενήντα ασθενών με ΚΑΠΕ.
- Σε συμφωνία με αντίστοιχες δημοσιευμένες μελέτες, το 75% των όγκων ΚΑΠΕ που μελετήθηκαν εξέφραζαν την EGFR πρωτεΐνη, αν και υπερέκφραση (εντόνως θετική χρώση) παρατηρήθηκε μόνο στο 12%.
- Τα ανοσοϊστοχημικά δεδομένα που προέκυψαν από τη δική μας μελέτη, ενισχύουν την άποψη ότι υπάρχει συνεχής EGFR πρωτεϊνική έκφραση σε



ευρύ φάσμα όγκων. Ωστόσο αυτό το προφίλ έκφρασης δεν έχει αξιολογήσιμη προγνωστική σημασία, ούτε προγνωστική αξία κλινικού οφέλους από αντι-EGFR θεραπευτικές στρατηγικές

- Τα αποτελέσματα της μελέτης, παρέχουν προκαταρκτικά στοιχεία από τα οποία υποδηλώνεται η μη συμβολή του EGFR στην ανάπτυξη του πρωτοπαθούς μεταστατικού καρκίνου και προβλέπουν την έλλειψη κλινικού οφέλους των ασθενών με ΚΑΠΕ από στοχευμένη TKI θεραπεία.
- Όσο αφορά το γονίδιο C-KIT, η μοριακή μέθοδος διαλογής μεταλλάξεων που χρησιμοποιήθηκε, η PCR-based SSCP, αξιολογείται ως μια γρήγορη, οικονομική και υψηλής ευαισθησία τεχνική.
- Κατά την ανάλυση των “hot spot” μεταλλάξεων του εξονίου 11 του γονιδίου C-KIT, δεν ανευρέθηκε ουδεμία μετάλλαξη στη μελετούμενη ομάδα των ΚΑΠΕ.
- Η έκφραση της C-KIT ογκοπρωτεΐνης σε ασθενείς με ΚΑΠΕ αν και εμφανίζεται με ποσοστό 81% δεν σχετίζεται με ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο εξόνιο 11 του γονιδίου c-kit.
- Υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης KIT στους συμπαγείς όγκους, μπορεί να είναι άλλοι μοριακοί μηχανισμοί και όχι οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του εξονίου 11.
- Τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης δεν έδειξαν συσχέτιση της c-kit υπερέκφρασης με την επιβίωση.
- Σε συμφωνία με όλη τη σχετική προηγούμενη δημοσιευμένη εμπειρία, η παρούσα μελέτη δεν κατάφερε να δώσει στην έκφραση της πρωτεΐνης KIT προγνωστική αξία για την επιβίωση των ασθενών με ΚΑΠΕ
- Η πειραματική έρευνα που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, είναι η πρώτη μελέτη που υποδεικνύει την έλλειψη γνωστών δεικτών ενεργοποίησης της EGFR και C-KIT σηματοδότησης σε ασθενείς με ΚΑΠΕ
- Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την υπάρχουσα ετερογένεια που χαρακτηρίζει κάθε μελετώμενο σύνολο ασθενών με ΚΑΠΕ και ταυτόχρονα την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση των παθογενετικών μηχανισμών που θα μπορούσαν να αναδείξουν την βιολογική ταυτότητα των ΚΑΠΕ.



ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ



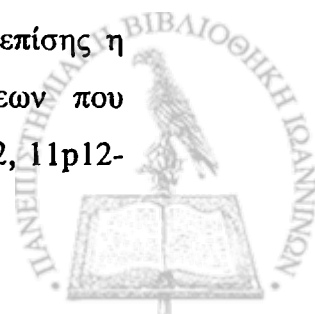
ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας, χαρακτηρίζονται από κλινικά σημεία και συμπτώματα ενός όγκου, του οποίου ο ιστολογικός τύπος καθώς και η πρωτοπαθής εστία δεν είναι δυνατό να διαπιστωθούν τη στιγμή της διάγνωσης, αποτελώντας έτσι μια ξεχωριστή οντότητα σπουδαίου κλινικού και βιολογικού ενδιαφέροντος. Τα κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΚΑΠΕ, είναι ετερογενή και η πρόγνωση τους είναι πολύ δύσκολο να εκτιμηθεί. Ακριβώς για το λόγο αυτό, δεν είναι δυνατό να υπάρξει μια βάση κοινής θεραπευτικής αγωγής, ούτε μια ορθολογική στρατηγική εξατομικευμένης θεραπείας χωρίς γνώση της πρωτοπαθούς εστίας και της βιολογικής της συμπεριφοράς.

Παρά το μεγάλο φάσμα εμφάνισης πρωτοπαθών εστιών, τα ΚΑΠΕ, φαίνεται να μοιράζονται κοινά βιολογικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένου του επιθετικού μεταστατικού δυναμικού, πολύ νωρίς κατά την ανάπτυξη του όγκου [238]. Προκύπτει λοιπόν η ανάγκη δημιουργίας και καθιέρωσης νέων μοριακών μεθόδων που θα συνεισφέρουν στην κατανόηση της μεταστατικής διεργασίας, στην εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας και στον ξεκάθαρο διαχωρισμό υπο-ομάδων ασθενών καλύτερης πρόγνωσης ή απάντησης σε εξατομικευμένη στοχευμένη θεραπεία [239,240].

Τις τελευταίες δεκαετίες γενετικές μελέτες παρείχαν πληθώρα καινούργιας αξιοποιήσιμης πληροφορίας που αφορά την παθογένεση διαφόρων νεοπλασματικών νόσων. Η μελέτη των γενετικών αλλαγών, δίνει πλέον τις απαραίτητες βιολογικές παραμέτρους για την ταξινόμηση διαφόρων νεοπλασμάτων, συνεισφέροντας στην εξατομικευμένη διάγνωση και θεραπεία. [241]. Παρόλα αυτά, πολύ λίγες μελέτες στηριζόμενες σε γενετικές τεχνικές έχουν επικεντρωθεί στο γενετικό χαρακτηρισμό των ΚΑΠΕ. Ένα γνωστό γενετικό χαρακτηριστικό του συνδρόμου ΚΑΠΕ, είναι η μικρή συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων στο γονίδιο p53 [242], όπως επίσης η εμφάνιση ισοχρωμοσώματος i(12p) [68,243] και κάποιων αναδιατάξεων που εστιάζονται κυρίως στις χρωμοσωμικές περιοχές 1q21, 3p13, 6q15-23, 7q22, 11p12-



5, 11q14-24 [244]. Έτσι λοιπόν, έως σήμερα, τα γενετικά χαρακτηριστικά των ΚΑΠΕ παραμένουν αδιευκρίνιστα, παρόλο που θεωρητικά θα μπορούσαν να καθορίσουν τις φαινοτυπικές ιδιαιτερότητες αυτών των νεοπλασμάτων. Είναι φανερή λοιπόν η ανάγκη περαιτέρω μοριακών μελετών των μεταλλάξεων και της πρωτεϊνικής έκφρασης γονιδίων - "κλειδιών" για την επιλογή ασθενών με ΚΑΠΕ, που θα ωφεληθούν από την στοχευμένη θεραπεία με "έξυπνα" φάρμακα.

Το γονίδιο EGFR εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7p12, αποτελείται από 28 εξόνια και κωδικοποιεί τον 170-KDa διαμεμβρανικό υποδοχέα, ο οποίος βρίσκεται με τη μορφή ανενεργού μονομερούς. Κατά την πρόσδεση του αυξητικού επιδερμικού παράγοντα (EGF) ή του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα άλφα (TGF α), στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα, αυτός υφίσταται διαμορφωτικές αλλαγές, διμερισμό και αυτοφωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης, που εντοπίζονται στην ενδοκυττάρια περιοχή του, με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης (TK). Με την φωσφορυλίωση καταλλήλων πρωτεϊνικών μορίων από τις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες του υποδοχέα, ενεργοποιούνται ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT, Ras/Raf/MAPK που ελέγχουν την κυτταρική επιβίωση, απόπτωση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων [245]. Προκλινικές μελέτες κατά τη δεκαετία του '90, έδειξαν τις μετασχηματιστικές ικανότητες του ενεργοποιημένου EGFR σε κυτταροκαλλιέργειες, ενώ οι ανοσοϊστοχημικές ενδείξεις υπερέκφρασης της EGFR πρωτεΐνης σε διάφορους τύπους καρκίνων ανέδειξαν τον υποδοχέα ως προϊόν ογκογονιδίου με πιθανό θεραπευτικό ενδιαφέρον [246,247]. Η αναζωπύρωση αυτού του ενδιαφέροντος, συνέβη, όταν έγινε σαφές ότι: α) οι όγκοι επηρεάζονταν άμεσα από την ανώμαλη σηματοδότηση υποδοχέων με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης, β) η δράση τους ως ογκογονίδια ήταν απαραίτητη για τη δημιουργία της νεοπλασίας και τη διατήρηση του κακοήθους φαινότυπου [248].

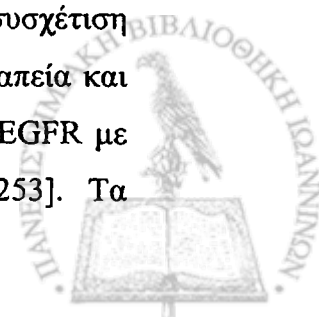
Η ανακάλυψη αντισωμάτων (σετουξιμάβη) και μικρών χημικών μορίων (γεφιτινίβη, ερλοτινίβη) που αναστέλλουν τη δράση του EGFR σε καρκίνους κεφαλής, τραχείας και στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) δημιούργησε ελπίδα θεραπευτικής στρατηγικής, μέσω εξάλειψης της ανώμαλης λειτουργίας του ογκογονιδίου, ή των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στα ενδοκυττάρια μονοπάτια. Πληθώρα πειραματικών στοιχείων υποδηλώνουν ότι ο EGFR επάγει την καρκινογένεση μέσω κυρίως τεσσάρων μηχανισμών: α) της υπερέκφρασης των προσδεμάτων του EGFR υποδοχέα, β) της γονιδιακής ενίσχυσης του EGFR από πολλαπλά αντίγραφα του γονιδίου, γ) της αυξημένης μεταγραφικής ενεργότητας του

EGFR γονιδίου και δ) της ενεργοποίησης του EGFR από ενεργοποιητικές μεταλλάξεις. Μέχρι σήμερα η συμβολή των ανωτέρω βιολογικών φαινομένων στην παθογένεση των καρκινωμάτων άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας δεν έχει μελετηθεί. Σε θεωρητικό επίπεδο, η μειωμένη απόπτωση και η ενεργοποιημένη κυτταρική επιβίωση που προκαλούνται από την ανώμαλη EGFR σηματοδότηση, θα μπορούσαν να καθιστούν τα καρκινικά κύτταρα των ΚΑΠΕ ικανά διαφυγής του κυτταρικού θανάτου, συσσωρεύοντας γενετικές βλάβες και αναπτύσσοντας μεταστατικό φαινότυπο.

Ακολουθώντας τις απαιτήσεις της σύγχρονης ογκολογίας, στην παρούσα ερευνητική μελέτη, έγινε προσπάθεια διευκρίνησης της ύπαρξης ή όχι συνεχούς EGFR ενεργοποίησης στα ΚΑΠΕ, μελετώντας τέσσερις διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς παράλληλα: την πρωτεϊνική έκφραση, την ρυθμιστική μικροδορυφορική επαναλαμβανόμενη αλληλουχία στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου, την γονιδιακή του ενίσχυση επί του γενώματος και την ανίχνευση πιθανών ενεργοποιητικών μεταλλάξεων. Η επιλογή των παραπάνω μοριακών παραμέτρων έγινε καθώς όχι μόνο γιατί αυτές σχετίζονται άμεσα με την ενεργοποίηση της EGFR σηματοδοτικής πορείας αλλά και διότι αποτελούν πιθανούς προγνωστικούς δείκτες αντι- EGFR θεραπευτικής με μεγάλο κλινικό όφελος [249,250]. Η EGFR μεταλλακτική διαλογή μέσω SSCP μοριακής μεθόδου δημοσιεύθηκε πρόσφατα ως μια ταχύτατη, αξιόπιστη και με μεγάλη ευαισθησία τεχνική σε μελέτη 860 ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. [251].

Σε συμφωνία με αντίστοιχες δημοσιευμένες μελέτες, το 75% των όγκων ΚΑΠΕ της παρούσας μελέτης, εξέφραζαν την EGFR πρωτεΐνη, αν και υπερέκφραση παρατηρήθηκε μόνο στο 12%. Πρόσφατα οι Rashid και συν. δημοσίευσαν μελέτη όπου σε 76 όγκους με ΚΑΠΕ παρατηρήθηκε 75% EGFR πρωτεϊνική έκφραση, ενώ η υπερέκφραση του υποδοχέα εκτιμήθηκε σε ένα ποσοστό της τάξης του 42% [58].

Αναδρομικές μελέτες έχουν δείξει ότι η EGFR υπερέκφραση των όγκων, αποτελεί αρνητικό προγνωστικό δείκτη για την έκβαση των ασθενών με καρκίνο [58, 252]. Ωστόσο, τα νεότερα δεδομένα από προοπτικές μελέτες με τη χρήση μικρομοριακών αναστολέων των TKIs, είναι αμφιλεγόμενα. Ενώ μελέτες θεραπείας με γεφιτινίβη των μη μικροκυτταρικών όγκων του πνεύμονα δεν έδειξαν συσχέτιση της EGFR πρωτεϊνικής έκφρασης με την επιβίωση, την απάντηση στη θεραπεία και την παράταση επιβίωσης, άλλες μελέτες έδειξαν συσχέτιση της έκφρασης EGFR με την επιβίωση και την απάντηση σε θεραπεία με ερλοτινίβη [246, 253]. Τα

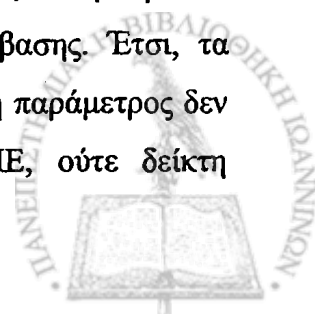


ανοσοϊστοχημικά δεδομένα που προέκυψαν από τη δική μας μελέτη, ενισχύουν την άποψη ότι υπάρχει συνεχής EGFR πρωτεϊνική έκφραση σε ευρύ φάσμα όγκων, ωστόσο αυτό το προφίλ έκφρασης δεν έχει αξιολογήσιμη προγνωστική σημασία, ούτε προβλεπτική σημασία κλινικού όφελους από αντι-EGFR θεραπευτικές στρατηγικές.

Στο πρώτο ιντρόνιο του EGFR γονιδίου έχει χαρτογραφηθεί μια μικροδορυφορική υψηλώς πολυμορφική αλληλουχία, που αποτελείται από 9-23 επαναλήψεις των αζωτούχων βάσεων αδενίνης-κυτοσίνης (Simple Sequence Repeats) [250]. Στην επαναλαμβανόμενη αυτή αλληλουχία, αν και αυτή βρίσκεται σε απόσταση μεγαλύτερη των 1000 ζευγών βάσεων καθοδικά του υποκινητή, αναλύσεις ελικοειδούς διαμόρφωσης υποδεικνύουν ρυθμιστικό ρόλο για τη μεταγραφή του γονιδίου. Από ανάλογες μελέτες έχει προταθεί ότι ο αριθμός των CA επαναλήψεων πιθανόν να επηρεάζει την στερεοδιαμόρφωση του DNA μετά την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων [156]. Στο σύνολο των ασθενών της παρούσας μελέτης, η αλληλική τρισωμία και το μήκος των αλληλομόρφων έως και 18 CA επαναλήψεις, έδειξαν μια τάση για συσχέτιση με αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση του EGFR. Συγκεκριμένα υπό την παρουσία αλληλομόρφου με 16-CA επαναλήψεις, το μήκος του δευτέρου αλληλομόρφου συσχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με την έκφραση της πρωτεΐνης.

Πειραματικά και κλινικά δεδομένα, υποστηρίζουν αυτή την αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του SSR μήκους του ιντρονίου1 του EGFR γονιδίου και της πρωτεϊνικής έκφρασης, όπως αυτή φάνηκε σε 13 κυτταρικές σειρές αλλά και σε ασθενείς με καρκινώματα μαστών, πνεύμονα κεφαλής και τραχήλου [156, 254]. Στις μελέτες αυτές το πιο συχνά εμφανιζόμενο αλληλομόρφο ήταν αυτό με τις 16-CA επαναλήψεις, το μήκος της SSR αλληλουχίας δεν συσχετίστηκε με την έκφραση της EGFR πρωτεΐνης σε φυσιολογικούς ιστούς και το μήκος των αλληλίων δεν φάνηκε να έχει προγνωστική σημασία για την επιβίωση των ασθενών.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ενισχύουν την επίδραση του EGFR γονιδιακού πολυμορφισμού του ιντρονίου 1 στη ρύθμιση της πρωτεϊνικής έκφρασης των νεοπλασματικών κυττάρων. Αν και η μελετούμενη ομάδα των ΚΑΠΕ ήταν αριθμητικώς μικρή, η SSR αλληλουχία του ιντρονίου 1 του EGFR, δεν μπορεί να θεωρηθεί ως δείκτης βιολογικής συμπεριφοράς και κλινικής έκβασης. Έτσι, τα ευρήματα της μελέτης, υποδηλώνουν ότι η συγκεκριμένη βιολογική παράμετρος δεν αποτελεί χρήσιμο δείκτη ταξινόμησης των ασθενών με ΚΑΠΕ, ούτε δείκτη στοχευμένης θεραπείας.



Οι δύο καλύτερα τεκμηριωμένοι δείκτες για την TKI θεραπεία ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC), είναι η παρουσία ενεργοποιητικών μεταλλάξεων ή η ενίσχυση του EGFR γονιδίου. Η πληθώρα των ενεργοποιητικών μεταλλάξεων (86%) παρατηρείται στα εξόνια 18,19, 21 που κωδικοεύουν την ενδοκυττάρια περιοχή με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα και ανευρίσκονται σε ποσοστό 10% μεταξύ Καυκασίων ασθενών με NSCLC. Πολυνουκλεοτιδικές απαλοιφές εντός του πλαισίου ανάγνωσης του εξονίου 19, που εξαλείφουν την αμινοξική αλληλουχία LREA και σημειακές μεταλλάξεις στο εξόνιο 21 που προκαλούν την L858R αμινοξική υποκατάσταση είναι οι συχνότερα εμφανιζόμενες [246].

Οι μεταλλαγμένοι EGFR υποδοχείς δεσμεύουν, κατά τρόπο ανεξέλεγκτο της EGF πρόσδεσης, το ATP και προκαλούν, μέσω της ενεργοποίησης των PI3K/AKT, JAK/STAT σηματοδοτικών μονοπατιών, επιλεκτική βιολογική επίδραση στην κυτταρική επιβίωση, χωρίς ωστόσο να επηρεάζουν τη Ras/MAPK σηματοδότηση [255,256]. Καθώς αυτές οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερος ευαίσθητες στην αναστολή με χρήση TKIs χημικών μορίων συγκριτικά με τον αγρίου τύπου EGFR υποδοχέα, η παρουσία ενεργοποιητικών μεταλλάξεων φάνηκε να είναι προγνωστικός παράγοντας της απάντησης σε στοχευμένη θεραπεία με γεφτινίβη ή ερλοτινίβη και της επιβίωσης σε διάφορες κλινικές μελέτες [253, 257-259]. Επιπλέον, τα αυξημένα αντίγραφα του EGFR έχουν επίσης συσχετισθεί με την απάντηση στη γεφτινίβη ή την ερλοτινίβη και με την επιβίωση σε ασθενείς με NSCLC [253,258,259].

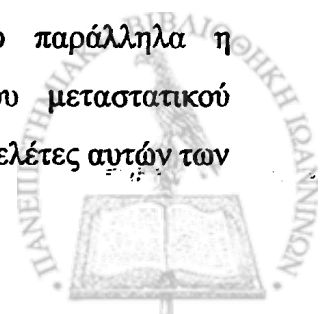
Μεταλλάξεις στην περιοχή τυροσινικής κινάσης του EGFR δεν έχουν ανευρεθεί σε ιστούς ή κυτταρικές νεοπλασματικές σειρές, γεγονός το οποίο υποστηρίζεται και από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης. Οι ασθενείς που μελετήθηκαν ήταν Καυκάσιας προέλευσης, καπνιστές και κανένας από αυτούς δεν εμφάνιζε κλινικά στοιχεία που να υποδηλώνουν ύπαρξη NSCLC, ούτε παθολογικά χαρακτηριστικά βρογχοκυψελιδικού καρκινώματος. Η μόνη μετάλλαξη που ταυτοποιήθηκε είναι ιντρονική και δεν ανήκει σταθερμά σημεία “hot-spots” μεταλλάξεων των εξονίων που μελετήθηκαν. Ωστόσο, είναι πιθανό η μετάλλαξη αυτή να προκαλεί εναλλακτικό τρόπο ματίσματος του mRNA και δημιουργία μιας νέας πρωτεΐνης με άγνωστες ιδιότητες. Για το λόγο αυτό κρυσταλλογραφικές μελέτες και επιμόλυνση κυτταρικών σειρών με τη μεταλλαγμένη αλληλουχία του γονιδίου κρίνονται απαραίτητες για την διευκρίνιση της επίδρασης της μετάλλαξης αυτής στη λειτουργία της πρωτεΐνης.



Ενίσχυση του γονιδίου EGFR έχει βρεθεί στο 10-20% ασθενών με NSCLC και στο 30-40% γλοιωμάτων υψηλού βαθμού κακοήθειας, ενώ δεν έχει αναφερθεί σε άλλους τύπους κακοήθων νεοπλασμάτων [260,261]. Στην παρούσα μελέτη δεν ανευρέθησαν στοιχεία που να υποδηλώνουν ενίσχυση των εξονίων 18,19 και 21 του EGFR κατά την ανάλυση των πενήντα ασθενών με ΚΑΠΕ. Το γεγονός αυτό βέβαια δεν αποκλείει την γονιδιακή ενίσχυση άλλων περιοχών του γονιδίου, όμως ενισχύει την άποψη όπου θεωρείται απίθανη η αναστολή με TKIs της ανώμαλης EGFR σηματοδότησης στα ΚΑΠΕ.

Η πειραματική έρευνα που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής, είναι η πρώτη μελέτη που υποδεικνύει την έλλειψη γνωστών δεικτών ενεργοποίησης της EGFR σηματοδότησης σε ασθενείς με καρκίνο άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας. Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ταυτόχρονα η μεταγραφική ρύθμιση μέσω της SSR δινουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ιντρονίου 1 του EGFR γονιδίου, η γονοτυπική ανάλυση των μεταλλάξεων/πολυμορφισμών αλλά και της γονιδιακής ενίσχυσης των τριών σημαντικότερων εξονίων του υποδοχέα και τέλος η πρωτεϊνική του έκφραση. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν οδηγεί στη θεώρηση ότι άλλοι μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για την ανώμαλη EGFR σηματοδότηση, τέτοιοι όπως υπερέκφραση του αυξητικού παράγοντα EGF, ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στην εξωκυττάρια ή ενδοκυττάρια εκτός της TK περιοχής του υποδοχέα αλλά και επίδραση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων. Επιπλέον τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, παρέχουν προκαταρκτικά στοιχεία που υποδηλώνουν τη μη συμβολή του EGFR στην ανάπτυξη του πρωτοπαθούς μεταστατικού καρκίνου και προβλέπουν την έλλειψη κλινικού οφέλους των ασθενών με ΚΑΠΕ από στοχευμένη TKI θεραπεία.

Παρόλο που η κυτταροτοξική χημειοθεραπεία εξακολουθεί να είναι ο θεμέλιος λίθος της συστηματικής θεραπείας κατά του καρκίνου, σε ορισμένα είδη νεοπλασιών έχει περιορισμένη αποτελεσματικότητα ενώ ταυτόχρονα προκαλεί σημαντική τοξικότητα. Έχουν παρέλθει περισσότερα από είκοσι χρόνια, από τη στιγμή που ο EGFR προτάθηκε ως πιθανός στόχος αντικαρκινικής θεραπείας. Οι TKs, αναστολείς του EGFR, ερλοτινίβη και γεφτινίβη έχουν φανεί δραστικοί σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ενώ παράλληλα η σετουξιμάβη αποτελεί ένα δραστικό παράγοντα εναντίον του μεταστατικού ορθοκολικού καρκίνου. Ωστόσο, διάφορες πολυκεντρικές κλινικές μελέτες αυτών των



νέων φαρμακευτικών θεραπειών έχουν αποτύχει να δώσουν τα αναμενόμενα σπουδαία αποτελέσματα.

Ένας πιθανός λόγος για την αποτυχία μελετών φάσης III που συνδύασαν αναστολείς του EGFR με χημειοθεραπεία, ως θεραπεία πρώτης γραμμής για ασθενείς με NSCLC, θεωρείται η έλλειψη κατάλληλης επιλογής ασθενών ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι ευαισθησίας του όγκου έναντι της EGFR αναστολής. Ο πιο προφανής δείκτης ευαισθησίας αυτών των δεικτών είναι το ποσοστό έκφρασης του EGFR εντός του όγκου, όμως, έχει αποδειχθεί ότι η ανίχνευση αυτού του υποδοχέα από μόνη της, δεν προβλέπει την απάντηση σε θεραπεία είτε με ερλοτινίβη, είτε με γεφιτινίβη σε ασθενείς με NSCLC. Προκύπτει λοιπόν το συμπέρασμα ότι και άλλοι παράγοντες συνεργούν και είναι καθοριστικής σημασίας για την απάντηση στη θεραπεία, όπως π.χ η ενεργοποίηση του EGFR. Η γνώση ότι ορισμένοι όγκοι εμφανίζουν ανωμαλίες στην έκφραση δεικτών και τα δεδομένα που προκύπτουν από αλληλούχιση γονιδίων παρέχουν τα μέσα για την απόδειξη της αξιοπιστίας των θεραπευτικών στόχων και των στοχευμένων θεραπειών.

Στο εγγύς μέλλον αναμένονται επιπλέον μελέτες υψηλής γενωμικής τεχνολογίας, όπως η χρήση mRNA – microarrays, έτσι ώστε να προκύψουν διαφωτιστικά στοιχεία για την ταυτόχρονη έκφραση ενός συνόλου γονιδίων καθώς επίσης και για την ενδεχόμενη συνεισφορά τους στη δημιουργία μιας κοινής μοριακής ταυτότητας αυτής της ιδιότυπης, τόσο γονοτυπικά όσο και φαινοτυπικά, ομάδας των καρκινωμάτων άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας.

Το γονίδιο c-kit, εντοπίζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 4 και φέρει την γενετική πληροφορία για την κωδίκευση της πρωτεΐνης C-KIT, η οποία είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης τύπου III. Οι υποδοχείς που ανήκουν στη συγκεκριμένη οικογένεια αποτελούνται από μια εξωκυττάρια περιοχή με πέντε ανοσοσφαιρινικού τύπου πρωτεϊνικά μοτίβα, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και τέλος την παραμεμβρανική και κυτταροπλασματική περιοχή που εντοπίζονται κάτω από την κυτταρική μεμβράνη [262]. Η παραμεμβρανική (juxtamembrane JM) περιοχή, είναι υπεύθυνη για τον διμερισμό δύο υποδοχέων κατά την πρόσδεση στο εξωκυττάριο τμήμα του καταλλήλου προσδέματος, του παράγοντα των αρχέγονων κυττάρων (Stem Cell Factor, SCF).

Μετά τη σύνδεση του προσδέματος, ακολουθεί ενεργοποίηση και διμερισμός του υποδοχέα, με αποτέλεσμα την αυτοφωσφορύλιωση τυροσινικών καταλοίπων στις περιοχές με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης (TK-I και TK-II), που ανευρίσκονται



στην κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα [206]. Με διαδοχικό τρόπο, οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες αλληλεπιδρούν με διαφόρων τύπων πρωτεϊνικά υποστρώματα, προκαλώντας την έναρξη μετάδοσης σηματοδοτικών μηνυμάτων που ρυθμίζουν την πυρηνική μεταγραφική ενεργότητα. Το διαβιβαζόμενο μήνυμα προκαλεί αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίηση των κυττάρων (μέσω της Grb2/SOS/Ras/Raf/MAPK οδού και της JAK/STAT οδού), όπως επίσης και αναστολή της απόπτωσης (μέσω της PI3K/AKT/mTOR οδού) [263]. Αυτή η μοριακή καθοδήγηση που παρέχεται από τον υποδοχέα KIT είναι πιθανό, υπό ανώμαλες συνθήκες, να επηρεάζει την επιθετικότητα και το διηθητικό/μεταναστευτικό δυναμικό των νεοπλασματικών κυτταρικών κλώνων.

Η κυρίαρχη ογκογόνος δυναμικότητα της ενεργοποίησης του υποδοχέα KIT έχει περιγραφεί για πρώτη φορά σε κακοήθεις γαστρεντερικούς στρωματικούς όγκους (GIST). Το 85-90% των όγκων αυτών, φέρουν ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του γονιδίου c-kit που προκαλούν διμερισμό του υποδοχέα ανεξάρτητο του προσδέματος και ενεργοποίηση της δραστηριότητας τυροσινικής κινάσης κατά μη ελεγχόμενο τρόπο [264]. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι κυρίως μικρές απαλοιφές εντός πλαισίου ανάγνωσης ή σημειακές μεταλλάξεις και εντοπίζονται συνήθως (σε ποσοστό 80%) στο εξόνιο 11 που κωδικοποιεί την παραμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα (κυρίως στα κωδικόνια 550-562) και κάποιες φορές στα εξόνια 9, 13, 14 και 17, που κωδικοποιούν την εξωκυττάρια περιοχή και την περιοχή τυροσινικής κινάσης. Προκλινικές μελέτες σε συνδυασμό με κλινικές παρατηρήσεις απέδειξαν ότι η συνεχιζόμενη ενεργοποίηση του C-KIT είναι ένα απαραίτητο και ταυτόχρονα ικανό ογκογόνο ερέθισμα για τον νεοπλασματικό μετασχηματισμό, καθώς επίσης ότι είναι απαραίτητο στοιχείο για την συνεχιζόμενη αύξηση των GISTs [206,265,266].

Η ανακάλυψη της ιματινίβης (Gleevec^R, Novartis) έχει εγκαινιάσει νέες θεραπευτικές στρατηγικές με τη χρήση φαρμάκων που στοχεύουν ειδικά κάποιες νεοπλασματικές μοριακές διαφοροποιήσεις. Η ιματινίβη ανταγωνίζεται την πρόσδεση του ATP, αναστέλλοντας έτσι τις περιοχές τυροσινικής κινάσης υποδοχέων όπως οι BCR-ABL, KIT, PDGFR. Σε ασθενείς με μεταστατικά GIST, παρατηρήθηκε εξαιρετικά καλή απάντηση με τον αναστολέα της KIT τυροσινικής κινάσης [267,268]. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι GIST ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις στο εξόνιο 11 του c-kit γονιδίου απάντησαν πολύ καλύτερα στην ιματινίβη (ποσοστό υποτροπής όγκου 72%) και είχαν μεγαλύτερη επιβίωση σε σχέση με ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις σε άλλα εξόνια ή είχαν αγρίου τύπου αλληλουχία για το c-kit

γονίδιο (ποσοστό υποτροπής όγκου 32% και 12% αντιστοίχως) [269,270]. Συνεπώς, ιδιαίτερα χρήσιμη κρίνεται η ανίχνευση ενεργοποιητικών μεταλλάξεων του εξονίου 11 του c-kit γονιδίου, σε μια προσπάθεια ταξινόμησης ασθενών με συμπαγείς όγκους, που θα έχουν μεγάλη πιθανότητα κλινικού οφέλους απαντώντας σε από του στόματος μη τοξική θεραπεία με TKIs.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι, η έκφραση της KIT ογκοπρωτεΐνης σε ασθενείς με άγνωστη πρωτοπαθή εστία, αν και εμφανίζεται σε ποσοστό 81%, δεν σχετίζεται με ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο εξόνιο 11 του γονιδίου c-kit. Η χρησιμοποιούμενη μοριακή μέθοδος διαλογής μεταλλάξεων, η PCR-based SSCP, είναι μια γρήγορη, οικονομική και υψηλής ευαισθησίας τεχνική, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση νουκλεοτιδικών αλλαγών μικρότερων των τριών ζευγών βάσεων σε μήκος, σε δείγματα που περιέχουν κατ' ελάχιστο, ποσοστό 10% μεταλλαγμένου DNA. Η ανοσοϊστοχημική μελέτη της KIT πρωτεϊνικής έκφρασης έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές σε ποσοστά όπως: 70% στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, 84% στα σεμινώματα, 65% στα αδenoειδή κυστικά καρκινώματα, 35% στα μελανώματα και περιστασιακά σε 47 άλλους τύπους νεοπλασιών. Σπανιότερα όμως, παρατηρείται υπερέκφραση της KIT πρωτεΐνης στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, στα σεμινώματα και στα αδenoειδή κυστικά καρκινώματα (συνήθως σε αναλογίες μικρότερες του ενός τρίτου των περιπτώσεων) [271].

Παρά τη συχνή έκφραση της πρωτεΐνης, μέχρι σήμερα δεν έχουν αναφερθεί ενεργοποιητικές c-kit μεταλλάξεις σε άλλα είδη όγκων παρά μόνον στα GISTs. Οι Went και συν. ανέλυσαν την αλληλουχία των εξονίων 2, 8, 9, 11, 13, 17 του γονιδίου c-kit, σε 24 μη GISTs όγκους που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη. Εν τούτοις, παρά την υπερέκφραση του γονιδίου, βρήκαν μόνο μια μετάλλαξη [271]. Οι Burger και συν. μελέτησαν 26 δείγματα μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα για ύπαρξη c-kit μεταλλάξεων του εξονίου 11 με χρήση PCR-SSCP τεχνικής, χωρίς όμως να ανιχνεύσουν ουδεμία μετάλλαξη. Επίσης οι Sihto και συν. δεν κατάφεραν να εντοπίσουν c-kit μεταλλάξεις στα εξόνια 9, 11, 13, 17 σε 316 μη-GIST συμπαγείς όγκους με χρήση της PCR-DHPLC τεχνικής [272,273].

Η απουσία c-kit ενεργοποιητικών μεταλλάξεων, όπως επίσης και η έλλειψη αυστηρών αποδεικτικών ευρημάτων ότι η δράση της συγκεκριμένης ογκοπρωτεΐνης είναι σημαντική για τον κυτταρικό μετασχηματισμό και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων σε άλλου είδους νεοπλασιών εκτός των GIST, θα μπορούσαν να εξηγήσουν

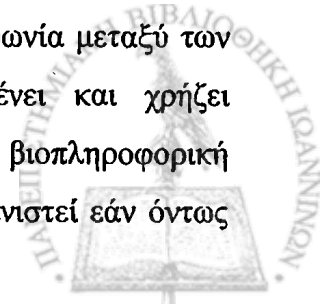


την αποτυχία της θεραπείας με ιματινίβη σε ασθενείς με σαρκώματα μαλακών μοριών, με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και με καρκινώματα γεννητικών κύτταρων [206,269,274].

Ωστόσο, προς το παρόν, τα αποτελέσματα αυτά είναι προκαταρκτικά και η έλλειψη στοιχείων δεν είναι απόδειξη έλλειψης της C-KIT χρησιμότητας ως θεραπευτικού στόχου. Υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης KIT στους συμπαγείς όγκους, μπορεί να είναι εκτός των ενεργοποιητικών μεταλλάξεων, άλλοι μοριακοί μηχανισμοί, όπως: ενίσχυση των αντιγράφων του γονιδίου στο γένωμα, υπερπλοειδίες στο χρωμόσωμα 4, αυτοκρινής ενεργοποίηση του KIT υποδοχέα από υπερέκφραση του SCF, διασταυρούμενη ενεργοποίηση του KIT από άλλες κινάσες και υπομεθυλίωση του προαγωγού του γονιδίου [273]. Εφόσον αποδειχθεί ότι η ενεργότητα του C-KIT είναι θεμελιώδης για την επιβίωση των νεοπλασματικών κυττάρων, η αναστολή του από την ιματινίβη ή άλλους αναστολείς που δρουν σε διαφορετικές θέσεις του υποδοχέα, θα παρέχει σπουδαίο κλινικό όφελος. Ωστόσο μια τέτοια θεραπευτική στρατηγική, μπορεί να διευκρινιστεί με την ανάπτυξη καλά σχεδιασμένων κλινικών μελετών, που θα στηρίζονται σε προκλινικές παρατηρήσεις.

Σε αντίθεση με τα παρόντα αποτελέσματα, οι Rashid και συν. προσφάτως δημοσίευσαν μελέτη όπου σε 76 ασθενείς με ΚΑΠΕ, μόνο οι 9 εμφάνισαν ανοσοϊστοχημική έκφραση του KIT [58]. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει την υπάρχουσα ετερογένεια που χαρακτηρίζει κάθε μελετώμενη σειρά ασθενών με ΚΑΠΕ. Σε συμφωνία με όλη τη σχετική προηγούμενη δημοσιευμένη εμπειρία, η παρούσα μελέτη δεν κατάφερε να δώσει στην έκφραση της πρωτεΐνης KIT προγνωστική σημασία για την επιβίωση των ασθενών [74,270]. Μέχρι σήμερα, πέρα από επιδημιολογικές παρατηρήσεις, δεν έχει βρεθεί ένας ή συνδυασμός μοριακών δεικτών για τα ΚΑΠΕ, ούτε έχουν ταυτοποιηθεί μοριακές ανωμαλίες με προγνωστική αξία. Μελέτες της έκφρασης των γονιδίων *c-myc*, *ras*, *c-erb-B2*, *bcl2*, *p53* και μελέτες μικροαγγειακής πυκνότητας καταλήγουν σε αντικρουόμενα αποτελέσματα και δεν έχουν καταφέρει να ταυτοποιήσουν μια ομάδα χαρακτηριστικών ανωμαλιών που να είναι μοναδικά της βιολογίας των ΚΑΠΕ [3,275].

Τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης δεν οδήγησαν σε συσχέτιση της *c-kit* υπερέκφρασης με την επιβίωση. Έτσι η ασυμφωνία μεταξύ των επιστημόνων για την πραγματική φύση των ΚΑΠΕ παραμένει και χρήζει διαλεύκανσης. Μελέτες πολλαπλής γονιδιακής έκφρασης όπως η βιοπληροφορική των DNA μικροστοιχείων είναι απαραίτητες, έτσι ώστε να διευκρινιστεί εάν όντως



ισχύει η θεώρηση του συνδρόμου ΚΑΠΕ ως ενιαίας οντότητας με ιδιαίτερα γυνοτυπικά και φαινοτυπικά γνωρίσματα ή εάν πρόκειται για απλές κοινές μεταστάσεις ποικίλων καρκίνων με αδιευκρίνιστη πρωτοπαθή εστία.

Γενικά, γνωρίζοντας ότι πολλοί σηματοδοτικοί οδοί εμπλέκονται στην κυτταρική αύξηση ενός όγκου, με υψηλή πιθανότητα διασταυρούμενης δράσης μεταξύ τους, η στοχευμένη θεραπεία εναντίον ενός και μόνο δείκτη πιθανολογείται αναποτελεσματική για να επάγει αντικαρκινική δράση. Οι στοχευμένες θεραπείες θα πρέπει να είναι κατάλληλα σχεδιασμένες ώστε να προκαλούν κάθετη ή οριζόντια κατά μήκος του σηματοδοτικού άξονα αναστολή, σχετικών και αλληλοεμπλεκόμενων μεταβιαστικών οδών. Η κάθετη αναστολή στοχεύει πολλαπλά σημεία που ανήκουν στο ίδιο ενδοκυττάριο μονοπάτι, ενώ η οριζόντια δρα σε σημεία κατά μήκος πολλών μονοπατιών.

Τα σύγχρονα κλινικά αποτελέσματα από τη χρήση στοχευμένης θεραπείας υποδεικνύουν τη δυνατότητα συσχέτισης της θεραπευτικής απάντησης με τον μοριακό φαινότυπο και την φαρμακοκινητική-φαρμακοδυναμική ενός αντινεοπλασματικού φαρμάκου. Η δυνατότητα αυτή, είναι ικανή να καθοδογήσει τον ογκολόγο στη σωστή επιλογή ομάδων ασθενών, στη βελτιστοποίηση των φαρμακευτικών δόσεων, στην επιβεβαίωση της απάντησης, στο σχεδιασμό συνδυασμένων θεραπειών και στην καλύτερη κατανόηση των γενετικών ποικιλομορφιών, όσο αφορά στη θεραπευτική απάντηση. Λαμβάνοντας υπόψη τις σύγχρονες ερευνητικές προσπάθειες και τη διαθεσιμότητα γενωμικής, πρωτεομικής και χημικής οργανολογίας υψηλής απόδοσης, η στενή συνεργασία κλινικών και βασικών επιστημόνων θα επιταχύνει τη δημιουργία και χρήση ενός γενετικού και φαινοτυπικού αλγορίθμου που: α) θα ταυτοποιεί την πρωτοπαθή εστία, β) θα επιλέγει-ταξινομεί τους ασθενείς και γ) θα κατευθύνει προς μη τοξική στοχευμένη θεραπεία, όλα με γνώμονα το μεγαλύτερο κλινικό όφελος για τους ασθενείς με μεταστατικά καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας.

Στόχος είναι η πλήρης διαλεύκανση των παθογενετικών βιολογικών μηχανισμών των ΚΑΠΕ, ο μίτος που θα μας καθοδηγήσει σ' αυτόν τον δαιδαλώδη λαβύρινθο τώρα αρχίζει, σιγά-σιγά, να ξετυλίγεται...

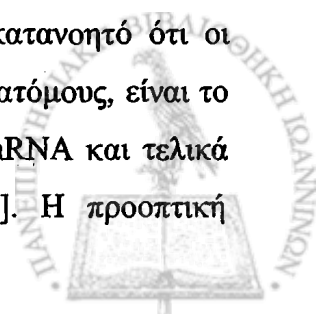


ΚΑΠΕ ΤΟ ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ Η MICROARRAYS ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ ΣΤΗΝ ΕΠΟΧΗ ΤΩΝ “OMICS”

Ένα νέο πεδίο γενετικών αναλύσεων σφαιρικής γενωμικής ανάλυσης και πρωτεϊνικής έκφρασης, έχει αναδυθεί τα τελευταία χρόνια, καθηδηγούμενο από τη διαπίστωση ότι κλασσικές τεχνικές συσχέτισμού και ανάλυσης μπορούν πλέον να εφαρμοστούν ταυτόχρονα σε χιλιάδες ομάδες γονιδίων, με την εφαρμογή της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών. Η γενετική ανατομική της γονιδιακής και μεταγραφικής αφθονίας, μπορεί να διευκρινήσει την “αρχιτεκτονική” ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών, παρέχοντας έτσι, μια νέα προσέγγιση για τη συσχέτιση της γονοτυπικής με τη φαινοτυπική ποικιλομορφία.

Η βιολογική συμπεριφορά των όγκων παραδοσιακά έχει συσχετισθεί με τον ιστοπαθολογικό τύπο, σε μια προσπάθεια να προβλεφθεί η κλινική συμπεριφορά τους [276]. Η μακροσκοπική και η μικροσκοπική εξέταση χρησιμοποιείται για να θέσει την ακριβή διάγνωση και στη συνέχεια να προβλέψει την πρόγνωση και να καθοδηγήσει τη θεραπεία. Η ιστολογική διάγνωση του καρκίνου βασίζεται σε δομικές-μορφολογικές ανωμαλίες, στο επίπεδο τόσο της ιστικής αρχιτεκτονικής, όσο και της κυτταρικής/πυρηνικής μορφολογίας. Ο ιστολογικός τύπος του καρκίνου σύμφωνα με την ιστογενετική ταξινόμηση καθορίζεται με βάση τον ιστό/κύτταρο από τον οποίο προήλθε. Οι συχνότεροι ανθρώπινοι κακοήθεις όγκοι πρόερχονται από επιθηλιακά κύτταρα, ορίζονται ως καρκινώματα και ταξινομούνται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: πλακώδη καρκινώματα, αδενοκαρκινώματα και ποικίλλα αδιαφοροποίητα καρκινώματα. Τόσο τα παθολογοανατομικά, όσο και τα κλινικά και λοιπά εργαστηριακά ευρήματα χρησιμοποιούνται για να καθορίσουν το εύρος των μεταστάσεων δηλαδή το κλινικοπαθολογοανατομικό στάδιο της νόσου. Η κλασσική ιστοπαθολογική προσέγγιση έχει αναπτυχθεί και χρησιμοποιείται επιτυχώς τα τελευταία 150 χρόνια. Ωστόσο υπάρχουν περιορισμοί: για κάθε έναν ασθενή, η πρόγνωση που δίνεται μπορεί να είναι αρκετά ευρεία, αφού αρκετοί όγκοι εμφανίζουν πολλές μορφολογικές ομοιότητες, όμως η βιολογική συμπεριφορά τους μπορεί να είναι πολύ διαφορετική.

Έχει περάσει αρκετός χρόνος από τη στιγμή που έγινε κατανοητό ότι οι φαινοτυπικές ανωμαλίες που αναγνωρίζονται από τους παθολογοανατόμους, είναι το αποτέλεσμα αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης στο επίπεδο του mRNA και τελικά στην έκφραση των παραγόμενων πρωτεϊνικών προϊόντων [277]. Η προοπτική



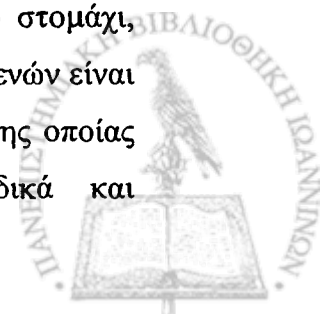
βρίσκεται στην ανάπτυξη νέων τεχνικών, που θα βασίζονται στις μοριακές αλλαγές των καρκινικών κυττάρων και θα παρέχουν χρήσιμα στοιχεία, πέραν αυτών που παρέχονται από την παραδοσιακή ιστοπαθολογία στην κλινική πράξη.

Τα τελευταία 30 χρόνια, η πρωτεϊνική έκφραση εξετάζεται με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας. Η τελευταία αποτελεί την κύρια μέθοδο για τον καθορισμό του ιστολογικού τύπου ποικίλων καρκίνων και για την ταυτοποίηση των λεμφωμάτων [278,279]. Η ανίχνευση χρήσιμων μορίων/δεικτών με ανοσοϊστοχημεία έχει αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμη για τη διάγνωση, πρόγνωση και πρόβλεψη της χημειοευαισθησίας σε πολλές περιπτώσεις. Εν τούτοις, μόνο ένας περιορισμένος αριθμός δεικτών μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κάθε περίπτωση.

Η αρχή μιας νέας εποχής, της εποχής των “omics”, ξεκίνησε το 1990 όπου τα ραγδαία άλματα της τεχνολογίας επέτρεψαν την έρευνα χιλιάδων γονιδίων από ένα και μόνο δείγμα [280]. Αυτή η ραγδαία εξέλιξη της επιστήμης, μέσω των μικροσυστοιχιών και της βιοπληροφορικής, αύξησε τη γνώση γύρω από τη βιολογία και την παθολογία του καρκίνου [281]. Για παράδειγμα, μελετώντας το γονιδιακό προφίλ έκφρασης, είναι δυνατή η ταυτοποίηση της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους [282], η παρατήρηση διαφορών στην έκφραση των γονιδίων στα διάφορα στάδια της νόσου [283], ο συσχετισμός της γονιδιακής έκφρασης με την έκβαση και την απάντηση στη θεραπεία [284] και η κατηγοριοποίηση υποομάδων ασθενών που αφενός εμφανίζουν ιστολογική ομοιογένεια, αφετέρου έχουν κλινική ετρογένεια [285].

Το κλινικό χαρακτηριστικό των ΚΑΠΕ, είναι η αδυναμία ταυτοποίησης της πρωτοπαθούς εστίας. Η νέα εποχή των γονιδιακών και μεταγραφικών μικροσυστοιχιών έχει ανανεώσει την ελπίδα ότι η αδυναμία αυτή μπορεί να ξεπεραστεί.

Τα περισσότερα είδη καρκίνου εμφανίζονται κλινικά με την πρωτοπαθή τους εστία. Ωστόσο, ένα ποσοστό 10-15% των καρκίνων εμφανίζεται με τη μορφή μεταστάσεων σε συμπαγή όργανα, σωματικές κοιλότητες ή στους λεμφαδένες χωρίς να είναι εμφανής η πρωτοπαθή τους εστία [74,286,287]. Οι περισσότεροι από αυτούς τους δευτεροπαθείς όγκους είναι αδenoκαρκινώματα, των οποίων η πρωτοπαθής εστία ανευρίσκεται συνήθως στο μαστό, τις ωοθήκες, τον προστάτη, το στομάχι, πάγκρεας, κόλον και πνεύμονα [287]. Η πρόγνωση και η θεραπεία των ασθενών είναι στενά συνδεδεμένη με τη θέση της αρχικής εστίας του όγκου, η γνώση της οποίας είναι ζωτικής σημασίας, καθώς δημιουργούνται περισσότερο ειδικά και

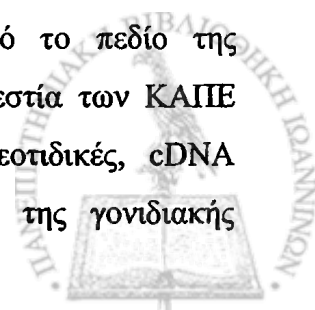


αποτελεσματικά χημειοθεραπευτικά σχήματα [288]. Συνεπώς, είναι απαραίτητη η διερεύνηση των ασθενών με κλινική εξέταση, ακτινολογικό έλεγχο και καρκινικούς δείκτες ορού για την ανεύρεση της πρωτοπαθούς εστίας [74,289,290]. Τα μεταστατικά καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας, αποτελούν ένα σημαντικό κλινικό πρόβλημα, καθώς αποτελούν το 3-5% των εμφανιζόμενων καρκίνων και μία από τις δέκα συχνότερες νεοπλασματικές διαγνώσεις με ιδιαίτερα πτωχή πρόγνωση. [74].

Σε ασθενείς με ΚΑΠΕ, πραγματοποιείται βιοψία από τη μεταστατική εστία και ιστολογική εξέταση για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση της νεοπλασίας, να καθοριστεί ο ιστολογικός τύπος του όγκου ή ο υπότυπος αυτού (π.χ, λέμφωμα, μικροκυτταρικό καρκίνωμα, νευροενδοκρινικό καρκίνωμα, αδenoκαρίνωμα κ.λ.π) και να δοθούν πληροφορίες για την πρόγνωση και την επιλογή της θεραπείας. Ειδικά όταν πρόκειται για αδenoκαρίνωμα, η βιοψία μπορεί να δώσει πληροφορίες για την πρωτοπαθή εστία, παρέχοντας πληροφορίες για την πρόγνωση και την επιλογή της θεραπείας με το μεγαλύτερο όφελος για τον ασθενή [288,291,292].

Τα μεταστατικά αδenoκαρκινώματα μπορούν συνήθως να διαγνωστούν με τη μικροσκοπική τους εκτίμηση. Επειδή τα αδenoκαρκινώματα μοιράζονται κοινή καταγωγή από αδενικά επιθήλια, η μορφολογία από μόνη της μπορεί να δώσει ελάχιστη βοήθεια για τον καθορισμό της πρωτοπαθούς εστίας. Όμως με τη συσχέτιση ορισμένων κλινικών δεδομένων, συμπεριλαμβανομένου του φύλου και της θέσης της μετάστασης, σε ένα ποσοστό 55% των περιπτώσεων μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια η πρωτοπαθής εστία. Σε αυτές τις περιπτώσεις ιδιαίτερα χρήσιμη είναι η εφαρμογή ανοσοϊστοχημικών τεχνικών για την ανίχνευση πρωτεϊνικών μορίων δεικτών [286, 293-299]. Προτεινόμενα γονιδιακά προϊόντα ως δυνητικοί δείκτες προσδιορισμού της πρωτοπαθούς εστίας είναι το αντιγόνο CA125, CA 19-9, το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο CEA, CDX2, οι κυτοκερατίνες CK7, CK20, οι υποδοχείς οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR), η μεσοθηλίνη, ο παράγοντας pS2, το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA), η όξινη προστατική φωσφατάση (PAP), οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες A και B, ο θυρεοειδικός μεταγραφικός παράγοντας (TTF1) και άλλοι [286, 293, 300-339].

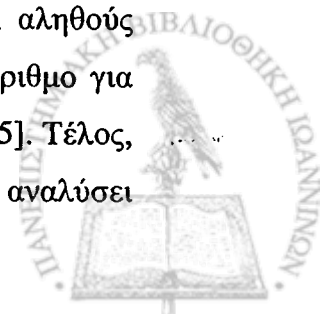
Νέες τεχνολογίες υψηλής απόδοσης, προερχόμενες από το πεδίο της γονιδιακής έκφρασης, έρχονται να καθορίσουν την πρωτοπαθή εστία των ΚΑΠΕ δίνοντας νέα διάσταση στην αντιμετώπισή τους. Ολιγονουκλεοτιδικές, cDNA μικροσυστοιχίες και χρήση της μεθόδου σειριακής ανάλυσης της γονιδιακής



έκφρασης (Serial analysis of gene expression, SAGE) είναι ρομποτικές τεχνολογίες με δυνατότητα ανάλυσης έκφρασης χιλιάδων γονιδίων ταυτόχρονα επιτρέποντας την ακριβή πρόβλεψη της πρωτοπαθούς εστίας με μεγάλα ποσοστά επιτυχίας. Οι τεχνολογίες αυτές στοχεύουν είτε στην ταξινόμηση των ΚΑΠΕ σε ομάδες όγκων με γνωστή πρωτοπαθή εστία, είτε στην ανίχνευση μιας κοινής μοριακής υπογραφής χαρακτηριστικής των ΚΑΠΕ.

Υπάρχουν δύο διαφορετικές αντιλήψεις πάνω στις οποίες έχει βασιστεί η μεθοδολογία των νουκλεϊκών ή των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών. Σύμφωνα με την πρώτη, κάθε επιθηλιακός τύπος εμφανίζει διαφορετική βιολογική λειτουργία εκφράζοντας συγκεκριμένα γονίδια που σχετίζονται με αυτή τη λειτουργία. Η διατήρηση αυτής της ιστο-ειδικής γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης μπορεί να επιτρέψει την ταυτοποίηση της πρωτοπαθούς εστίας ενός ασθενή με ΚΑΠΕ. Οι Dennis και συν. χρησιμοποιώντας SAGE βάσεις δεδομένων ομαδοποίησαν αδενοκαρκινώματα ανάλογα με την θέση της προέλευσής τους [340]. Οι Su και συν. χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτιδικές μικροσυστοιχίες των 12533 γονιδίων κατάφεραν να εντοπίσουν 110 γονίδια ικανά να ταξινομήσουν όγκους σε 11 διαφορετικές πρωτοπαθείς εστίες με ακρίβεια 75-87% [341]. Ομοίως οι Bloom και συν. κατέληξαν σε μια ομάδα 400 γονιδίων για την ταξινόμηση μεταστατικών όγκων αναλόγως με την πρωτοπαθή τους εστία με 84% ακρίβεια, χρησιμοποιώντας cDNA και ολιγονουκλεοτιδικές μικροσυστοιχίες [342]. Οι Tothil και συν. χρησιμοποιώντας μια cDNA μικροσυστοιχία, κατάφεραν να ταξινομήσουν 11 από 13 ΚΑΠΕ ασθενείς με μια πιθανή πρωτοπαθή εστία [343].

Σύμφωνα με τη δεύτερη αντίληψη, οι όγκοι με άγνωστη πρωτοπαθή εστία δεν φέρουν ένα ιστο-ειδικό γονιδιακό προφίλ που αντικατοπτρίζει την πρωτοπαθή εστία, αλλά μοιράζονται μια κοινή πολυγονιδιακή υπογραφή. Οι Ramaswamy και συν. χρησιμοποίησαν ολιγονουκλεοτιδικές μικροσυστοιχίες και μεθοδολογία ιεραρχικής ομαδοποίησης για να μελετήσουν την έκφραση 16063 γονιδίων σε 144 πρωτοπαθείς όγκους που ανήκαν σε 14 διαφορετικές ιστολογικές κατηγορίες [344]. Ωστόσο, δεν ήταν δυνατή η ταξινόμηση των αδενοκαρκινωμάτων και των κακοηθειών με πτωχή διαφοροποίηση. Πρόσφατα οι Ma και συν. χρησιμοποιώντας μια γονιδιακή μικροσυστοιχία των 22000 γονιδίων και την τεχνολογία ποσοτικής PCR αληθούς χρόνου (Real time-qPCR) 92 γονιδίων δημιούργησαν έναν γενετικό αλγόριθμο για την ταυτοποίηση 32 διαφορετικών ιστολογικών τύπων με ακρίβεια 87% [345]. Τέλος, η τεχνολογία CupPrint® ,στηριζόμενη σε DNA μικροσυστοιχίες, μπορεί να αναλύσει



περίπου 500 ιστο-ειδικούς βιοδείκτες ταυτοποιώντας την πρωτοπαθή εστία και κατατασσοντάς τη μεταξύ 43 διαφορετικών τύπων με ακρίβεια 88%.

Τα αποτελέσματα αυτών των μεγάλης κλίμακας μελετών είναι ενθαρρυντικά καθώς υποστηρίζουν την υπόθεση ότι στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης υπάρχουν διαφορές μεταξύ των κυρίων θέσεων της πρωτοπαθούς εστίας και ότι αυτές οι διαφορές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προσδιορίσουν τις πρωτοπαθείς εστίες των μεταστατικών όγκων. Προς το παρόν και παρά τις ενθαρρυντικές υποσχέσεις, δεν είναι δυνατή η μεταφορά των *microarray* δεδομένων στην καθημερινή κλινική πράξη εξαιτίας του υψηλού κόστους και της απαιτούμενης υψηλής εξειδίκευσης στη μεθοδολογία και ερμηνεία των ευρημάτων.

Ωστόσο, οι νέες τεχνολογίες γονιδιακής έκφρασης, η βιοπληροφορική και οι ανάπτυξη νέων τρόπων στατιστικών αναλύσεων αποτελούν ένα εξαιρετικά δυνατό και χρήσιμο εργαλείο, καθώς συνδυαζόμενα, μπορούν να απαντήσουν σε μέχρι χθές αναπάντητα ερωτήματα επί της βιολογίας του καρκίνου που διέπει τα ΚΑΠΕ.



ΕΠΙΣΤΗΜΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΝΟΨΕΙΣ ΤΩΝ ΕΡΓΩΝ ΤΗΣ ΕΚΔΟΣΗΣ
ΤΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

ΑΝΑΚΑΙΝΩΜΕΝΗ ΕΚΔΟΣΗ
ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 1984



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ EGFR & C-KIT ΣΕ
ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΑΓΝΩΣΤΗΣ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΕΣΤΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΕΥΚΟΘΕΑ Σ. ΝΤΟΒΑ



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας (ΚΑΠΕ), χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα κλινικά σημεία και συμπτώματα και αντιπροσωπεύουν μια ετερογενή ομάδα μεταστατικών όγκων για τους οποίους η πρωτοπαθής εστία δεν μπορεί να διαπιστωθεί, με αποτέλεσμα να συγκεντρώνουν μεγάλο κλινικό και βιολογικό ενδιαφέρον. Τα ΚΑΠΕ αντιπροσωπεύουν το 5% με 10% όλων των συμπαγών όγκων.

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΚΑΠΕ, εμφανίζουν εξαιρετική ετερογένεια, ενώ και ο καθορισμός της πρόγνωσης είναι σχεδόν αδύνατος. Για το λόγο αυτό, δεν υπάρχει μια βάση ενιαίας θεραπείας, ούτε κάποια ορθολογική εξατομικευμένη στρατηγική από τη στιγμή που δεν υπάρχει οποιαδήποτε γνώση για την πρωτοπαθή εστία και τη βιολογική συμπεριφορά του όγκου. Παρά όμως την εμφανιζόμενη ποικιλομορφία στην εμφάνιση της μητρικής εστίας, τα ΚΑΠΕ φαίνεται να διέπονται από κοινούς βιολογικούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητάς τους να μεθίστανται πολύ νωρίς κατά την εξέλιξη του όγκου. Προκύπτει λοιπόν η ανάγκη της δημιουργίας μοριακών μέσων που θα μπορούν να διευκρινίσουν τη μεταστατική διεργασία, να εντοπίσουν την πρωτοπαθή εστία και να ταξινομήσουν τους ασθενείς σε υποομάδες καλύτερης πρόγνωσης ή απάντησης στη θεραπεία.

Κατά τη διάρκεια της περασμένης δεκαετίας, γενετικές αναλύσεις παρείχαν πολύτιμη πληροφορία πάνω στην παθογένεση διαφόρων τύπων νεοπλασιών. Ωστόσο, ελάχιστες μελέτες με τη βοήθεια μοριακών τεχνικών έχουν επικεντρωθεί στη γενετική ταυτοποίηση των ΚΑΠΕ.

Σε μια προσπάθεια διερεύνησης του γενετικού και μεταφραστικού προφίλ των ΚΑΠΕ, η παρούσα εργασία εστιάστηκε στην ανάλυση μεταλλάξεων και γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων EGFR και C-KIT, χρησιμοποιώντας μια αλληλουχία μοριακών τεχνικών που επιτρέπουν την ανίχνευση γενωμικών και πρωτεϊνικών διαταραχών.

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) είναι μια τύπου I διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, αποτελούμενη από μια εξωκυττάρια περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη και μια ενδοκυττάρια περιοχή με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης (TK). Μετά την πρόσδεση του συνδέτη, ο υποδοχέας διμερίζεται



ενεργοποιώντας την TK περιοχή, με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση ενδοκυττάρων υποστρωμάτων που ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση, την αναστολή της απόπτωσης, τη μετάσταση και τη διαφοροποίηση.

Το πρωτοογκογονίδιο c-kit κωδικοποιεί έναν τύπου III διαμεμβρανικό υποδοχέα (CD117), του οποίου η κυτταροπλασματική περιοχή φέροντας ενεργότητα τυροσινικής κινάσης συμμετέχει στην αναστολή της απόπτωσης, τη ρύθμιση της κυτταρικής συνοχής, και την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ενεργοποίηση του υποδοχέα KIT, συνεχόμενη και ανεξάρτητη προσδέματος, μπορεί να επιτευχθεί μέσω ενεργοποιητικών μεταλλάξεων κάτι που παρατηρείται πολύ συχνά στους στρωματικούς γαστρεντερικούς όγκους (GISTs).

Το μεταλλακτικά θερμό σημείο του γονιδίου c-kit είναι το εξόνιο 11 που κωδικοποιεί την παραμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα, η οποία ευθύνεται για το διμερισμό και κατ' επέκταση ενεργοποίηση της δραστηριότητας τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα.

Αν και κεφαλαιώδους σημασίας, η σηματοδότηση τόσο του EGFR, όσο και του C-KIT στα ΚΑΠΕ μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί. Ακολουθώντας λοιπόν την ανάγκη για εμβάθυνση στη μοριακή βιολογία αυτών των υποδοχέων στα ΚΑΠΕ αλλά και τις επιταγές της σύγχρονης ογκολογίας και της στοχευμένης θεραπευτικής στρατηγικής, πραγματοποιήθηκε EGFR ανάλυση γονιδιακών μεταλλάξεων και ενίσχυσης, ρύθμισης της μεταγραφής και πρωτεϊνικής έκφρασης καθώς και C-KIT ανάλυση μεταλλάξεων και πρωτεϊνικής έκφρασης σε πενήντα δείγματα αρχειακού υλικού ΚΑΠΕ.

Κατά την ανάλυση των 50 δειγμάτων ΚΑΠΕ της παρούσας ερευνητικής εργασίας, 37 (74%) εξέφραζε την EGFR πρωτεΐνη, υπερέκφραση όμως εντοπίστηκε μόλις σε έξι δείγματα (12%). Ουδεμία συσχέτιση δεν βρέθηκε μεταξύ της πρωτεϊνικής έκφρασης του EGFR και της μεταστατικής εστίας ή της επιβίωσης των ασθενών ($p>0.05$). Μελετώντας την μικρού μήκους επαναλαμβανόμενη δινουκλεοτιδική αλληλουχία (SSR) του ιντρονίου 1, ανιχνεύθηκαν πέντε διαφορετικά αλληλόμορφα με 16 έως και 20 επαναλήψεις CA (κυτοσίνης-αδενίνης), με το αλληλόμορφο 16 να εμφανίζει τη μεγαλύτερη συχνότητα (39%). Όλα τα δείγματα ήταν ετερόζυγα με κυρίαρχο γονότυπο τον 16/18 CA επαναλήψεων (78%). Πέντε δείγματα εμφάνισαν υπερπλοειδία τριών αλληλομόρφων, ενώ παράλληλα εμφάνισαν EGFR υπερέκφραση σε ποσοστό 40% των περιπτώσεων, ενώ δείγματα με αλληλόμορφα μήκους άνω των 18 CA επαναλήψεων δεν εμφάνισαν πρωτεϊνική

υπερέκφραση. Παρουσία του 16-CA αλληλομόρφου, το μήκος του δευτέρου αλληλομόρφου συσχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με την έκφραση του EGFR υποδοχέα ($p=0.04$). Το μήκος της ρυθμιστικής αλληλουχίας του ιντρονίου 1 του γονιδίου EGFR δεν βρέθηκε να έχει προγνωστική σημασία για την επιβίωση των ασθενών. Επιπλέον δεν βρέθηκαν στοιχεία γονιδιακής ενίσχυσης των EGFR εξονίων 18,19, 21, ανιχνεύθηκαν όμως δύο μεταλλάξεις. Στο εξόνιο 21 ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη 2508C>T, η οποία όμως αποτελεί σιωπηλό νουκλεοτιδικό πολυμορφισμό, καθώς η φυσικού και μεταλλαγμένου τύπου τριπλέτα, κωδικοποιούν για το ίδιο αμινοξύ (R836R). Στην ιντρονική αλληλουχία, ανοδικά του εξονίου 19 ανιχνεύθηκε μια G>A υποκατάσταση (IVS19+24G>A) που δημιουργεί μια νέα θέση AG ως δέκτη ματίσματος, με πιθανή δημιουργία ανώμαλου mRNA ματίσματος και ενδεχομένως την παραγωγή μιας νέας πρωτεΐνης με διαφορετική αμινοξική αλληλουχία και τεταρτοταγή δομή, επομένως και με διαφορετική λειτουργία.

Η γονιδιακή ανάλυση του C-KIT απέτυχε να ανιχνεύσει μεταλλάξεις στο εξόνιο 11 του γονιδίου σε κανένα από τα πενήντα μελετούμενα δείγματα ΚΑΠΕ. Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση αποκάλυψε θετική μεμβρανική CD117 έκφραση σε 30 δείγματα (81%), ενώ επτά δείγματα (19%), βρέθηκαν αρνητικά έκφρασης του CD117. Η έκφραση της πρωτεΐνης KIT δεν συσχετίστηκε με την κλινική έκβαση των ασθενών που μελετήθηκαν.

Με την παρούσα ερευνητική εργασία για πρώτη φορά αναφέρεται η απουσία γνωστών δεικτών ενεργού EGFR και C-KIT σηματοδότησης σε ασθενείς με ΚΑΠΕ. Ωστόσο, παρόλο που είναι δυνατό να υπάρχουν μηχανισμοί συνεχούς ενεργοποίησης των EGFR και C-KIT υποδοχέων, τα ευρήματα της παρούσης μελέτης παρέχουν ενδείξεις που συνηγορούν υπέρ της έλλειψης EGFR και C-KIT συμμετοχής στην ανάπτυξη της πρωτοπαθούς μεταστατικής νόσου και ως εκ τούτου έλλειψης κλινικού οφέλους από στοχευμένη θεραπεία μέσω αναστολέων των τυροσινικών κινασών.



SUMMARY

**EGFR & C-KIT GENE AND TRANSCRIPTIONAL PROFILING
IN METASTATIC CARCINOMA OF UNKNOWN PRIMARY
SITE**

DOCTORATE THESIS

by Lefkothea S. Dova



SUMMARY

Cancer of unknown primary site (CUP), represents a human malignancy with peculiar phenotype as it is manifested by clinical signs and symptoms of a tumor whose origin cannot be ascertained at the time of diagnosis. Early metastatic potential and occult protopathic determination, are the two major characteristics which underline its distinctiveness, challenging global scientific interest. CUP constitutes 5% to 10% of all solid tumors.

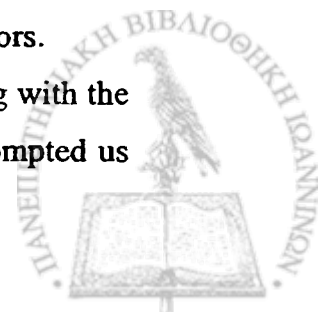
Patients suffering from CUP, deprive accurate prognosis assessment, as they appear with inhomogeneous clinical features due to their relatively heterogeneous nature. This heterogeneity of CUP, as it is reflected by different pathogenetic patterns and clinical outcomes, suggests a clear need for extensive investigation on a molecular basis, of its genetic and phenotypic alterations. Intensive research will shed light on its molecular mechanisms, providing a genomewide algorithm for evidence-based individualized clinical treatment. The major challenge of translational research is to develop and establish tools that contribute to a better understanding of the metastatic process, to trace the site at which each tumor has arisen, and to classify subgroups with a better prognosis or response to a patient-tailored specific therapy.

In the last decade, genetic analysis has provided a vast amount of valuable novel information about the pathogenesis of various tumor entities. However, very few studies utilizing molecular techniques have focused on the genetic characterization of CUPs.

To investigate the genetic and transcriptional profile of a series of CUPs, we have chosen to start from EGFR and C-KIT mutational and gene expression analysis using a sequence of molecular techniques, capable of detecting genome and protein wide aberrations.

The importance of EGFR signaling is not known in CUP, neither any of its potential markers for pathway activation have been studied to date. We retrospectively analysed fifty CUP specimens for EGFR gene mutation, gene amplification and gene transcriptional regulation as well as protein expression in an effort to study the biologic significance of the receptor in these systemic tumors.

Additional to the EGFR analysis, the lack of data on KIT status along with the prospect for beneficial tyrosine kinase inhibition with smart drugs have prompted us



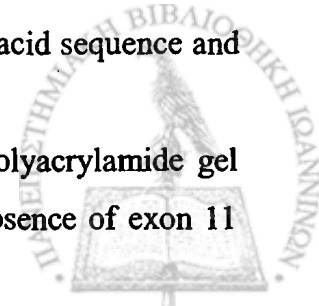
also, to screen for c-kit gene mutations and to study the CD117 protein expression in CUP.

The epidermal growth factor receptor (EGFR) is a type I transmembrane receptor with intrinsic tyrosine kinase activity of its cytoplasmic tail. The EGFR pathway was shown to be constitutionally active in a varying proportion of lung, colon, breast and urogenital carcinomas. Its activation provides intracellular signals leading to proliferation, angiogenesis, inhibition of apoptosis, tissue invasion and metastasis.

The proto-oncogene c-kit encodes a type III transmembrane receptor (CD117) with cytoplasmic tyrosine kinase activity involved in inhibition of apoptosis, regulation of cell adhesion and induction of cellular proliferation. Constitutive ligand-independent KIT activation can occur by gain-of-function mutations mainly observed in gastrointestinal stromal tumours. The most common such mutations are seen in exon 11 of the gene, the mutated exon encoding a juxtamembrane domain that facilitates spontaneous KIT receptor dimerisation and activation of tyrosine kinase

Among the 50 immunostained tumors, 37 (74%) expressed EGFR protein but only six (12%) strongly. No correlation was found between EGFR protein expression and metastatic site or patient survival ($p>0.05$). We determined the short sequence repeat (SSR) length of EGFR intron 1 and detected five alleles with CA repeat numbers 16 to 20, allele 16 being the most common (39%). All samples were heterozygous, the commonest genotype consisting of allele lengths of 16/18 dinucleotides (78%). Five samples had three intron 1 alleles and were associated with EGFR overexpression in 40% of cases, while samples with alleles of >18 CA repeats showed no EGFR overexpression. When a 16-CA allele was present, the length of the other allele was inversely correlated to EGFR protein expression ($p=0.04$). EGFR intron 1 allele length had no prognostic significance for survival. There was no evidence of EGFR exon 18,19, 21 amplification, while two mutations were detected. Exon 21 2508C>T was a silent nucleotide polymorphism as it caused no aminoacid change (R836R). A G>A substitution in intronic sequences flanking exon 19 (IVS19+24G>A) created a new AG splice acceptor site resulting in aberrant mRNA splicing and potentially production of a protein with distinct aminoacid sequence and tertiary structure.

C-KIT analysis failed to detect any shifted band in the polyacrylamide gel electrophoreses either at room temperature or at 4⁰C, indicating absence of exon 11



mutations in the 50 samples studied. Immunohistochemical analysis revealed positive membranous CD117 expression in 30 samples (81%) while seven samples (19%) were negative for CD117. The expression of KIT protein did not correlate with the clinical outcome of the patients in our cohort.

We report for the first time absence of known markers of active EGFR and C-KIT signaling in patients with CUP. Although other mechanisms of constitutive EGFR and C-KIT activity may be present, our data provide preliminary evidence for lack of contribution of EGFR or C-KIT in the development of primary metastatic disease and lack of benefit from therapy with tyrosine kinase inhibitors.



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ



ΚΑΠΕ: Καρκινώματα Αγνωστης Πρωτοπαθούς Εστίας

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor, υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα

C-KIT: υποδοχέας παράγοντα αρχέγονων κυττάρων

SCF: Stem Cell Factor, παράγοντας αρχέγονων κυττάρων

IHC: ImmunoHistoChemistry, ανοσοϊστοχημεία

SSCP: Single Strand Conformational Polymorphism, διαμορφωτικός πολυμορφισμός μονής αλυσίδας

PCR: Polymerase Chain Reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

PAGE: PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, ηλεκτροφόρηση πήγματος πολυακρυλαμίδιου

GLB: Gel Loading Buffer, ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης πήγματος

CK: cytokeratin, κυτοκερατίνη

CD: Cluster of Differentiation, δείκτες διαφοροποίησης κυτταρικής επιφάνειας

CA: Cytocin-Adenin, ζεύγη βάσεων κυτοσίνης-αδενίνης

SNP: Single Nucleotide Polymorphism, πολυμορφισμός μονής βάσης

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism, πολυμορφισμός μήκους περιοριστικού θραύσματος

TK: Tyrosine Kinase, τυροσινική κινάση

TKI: Tyrosine Kinase Inhibitor, αναστολέας τυροσινικής κινάσης

TBS: TriSaline Buffer, ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH: 7.6

TAE: TrisAcetate EDTA buffer, ρυθμιστικό διάλυμα Tris-οξικού-EDTA

TBE: TrisBorate EDTA buffer, ρυθμιστικό διάλυμα Tris-βορικού-EDTA

APS: Ammuniumpersulphate, θειϊκό αμμώνιο

SAGE: Serial Analysis of Gene Expression, σειριακή ανάλυση γονιδιακής έκφρασης

JAK: Janus Kinase, κινάση Janus

STAT: Signal Transduction Activators of Transcription, ενεργοποιητές μεταγραφής από τη μεταγωγή ενδοκυττάριου σήματος

CSF: Colony Stimulating Factor, παράγοντας ενεργοποίησης αποικιών

JM: Juxta-membrane, παραμεμβρανική περιοχή

PDGFR: Platelet Derived Growth Factor Receptor, υποδοχέας αυξητικού παράγοντα προερχόμενος από αιμοπετάλια

IVS: InterVening Sequence, παρεμβαλλόμενη αλληλουχία

Intron: ιντρόνιο, εσώνιο



Exon: εξόνιο
ATP: Adenoside Tri Phosphate, τρισφωφορική αδενοσίνη
PI3K: 3'-Phospho-Inositole Kinase, κινάση της 3'-φωσφορικής-ινοσιτόλης
SSR: Simple Sequence Repeat, επαναλαμβανόμενη αλληλουχία μικρού μήκους
NSCLC: Non Small Cell Lung Cancer, μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
GIST: GastroIntestinal Stromal Tumor, στρωματικός όγκος του γαστρεντερικού συστήματος
RTK: Receptor Tyrosine Kinase, υποδοχέας με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinases, πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποίησης μίτωσης
IL-1: Interleukin-1, ιντερλευκίνη-1
dH₂O: απεσταγμένο ύδωρ
bp: base pairs, ζεύγη βάσεων
Ca: καρκίνωμα
cDNA: Complementary DNA, συμπληρωματικό DNA
mRNA: Messenger RNA, αγγελιοφόρο RNA
EtBr: Ethidium Bromide, βρωμιούχο αιθίδιο
EtOH: Ethanol, αιθανόλη
Mg: Magnesium, μαγνήσιο
kDa: Kilo Dalton, μονάδα μέτρησης πρωτεϊνικού βάρους
T_m: Temperature melting, θερμοκρασία τήξης
RT: Room Temperature, θερμοκρασία δωματίου
ml: milliliter, χιλιοστόλιτρο
μl: microliter, μικρόλιτρο
et al: και συν: και συνεργάτες
w/v: weight per volume, βάρος κατ' όγκο
v/v: volume per volume, όγκος κατ' όγκο

Σημείωση: Οι αγγλικοί όροι έχουν αποδοθεί στην ελληνική γλώσσα με βάση το αγγλοελληνικό λεξικό Βιοχημείας, Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας της Ελληνικής Βιοχημικής και Βιοφυσικής Εταιρείας (Χορηγός: Ευρωπαϊκή Ένωση, Ιωάννινα 1995)



ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΔΕΛΤΙΟ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗΣ ΠΡΑΞΗΣ

Το Δελτίο είναι ετήσιο και εκδίδεται από τον Ινστιτούτο Εκπαιδευτικής Έρευνας (ΙΕΕ)

Ο Διευθυντής του Ινστιτούτου Εκπαιδευτικής Έρευνας είναι ο κ. Γεώργιος Κωνσταντίνου

Ο Γραμματέας του Ινστιτούτου Εκπαιδευτικής Έρευνας είναι ο κ. Γεώργιος Κωνσταντίνου

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Κωνσταντίνου Γ. (1987). Η σημασία της έρευνας στην εκπαιδευτική πράξη. *Επιστημονικό Δελτίο*, 10(1), 1-10.

2. Κωνσταντίνου Γ. (1988). Η σημασία της έρευνας στην εκπαιδευτική πράξη. *Επιστημονικό Δελτίο*, 11(1), 1-10.

3. Κωνσταντίνου Γ. (1989). Η σημασία της έρευνας στην εκπαιδευτική πράξη. *Επιστημονικό Δελτίο*, 12(1), 1-10.

4. Κωνσταντίνου Γ. (1990). Η σημασία της έρευνας στην εκπαιδευτική πράξη. *Επιστημονικό Δελτίο*, 13(1), 1-10.

5. Κωνσταντίνου Γ. (1991). Η σημασία της έρευνας στην εκπαιδευτική πράξη. *Επιστημονικό Δελτίο*, 14(1), 1-10.

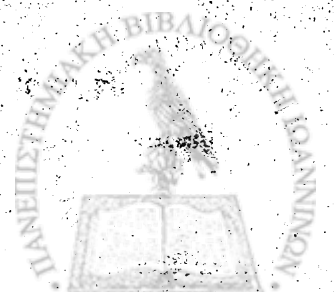
6. Κωνσταντίνου Γ. (1992). Η σημασία της έρευνας στην εκπαιδευτική πράξη. *Επιστημονικό Δελτίο*, 15(1), 1-10.

7. Κωνσταντίνου Γ. (1993). Η σημασία της έρευνας στην εκπαιδευτική πράξη. *Επιστημονικό Δελτίο*, 16(1), 1-10.

8. Κωνσταντίνου Γ. (1994). Η σημασία της έρευνας στην εκπαιδευτική πράξη. *Επιστημονικό Δελτίο*, 17(1), 1-10.

9. Κωνσταντίνου Γ. (1995). Η σημασία της έρευνας στην εκπαιδευτική πράξη. *Επιστημονικό Δελτίο*, 18(1), 1-10.

10. Κωνσταντίνου Γ. (1996). Η σημασία της έρευνας στην εκπαιδευτική πράξη. *Επιστημονικό Δελτίο*, 19(1), 1-10.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

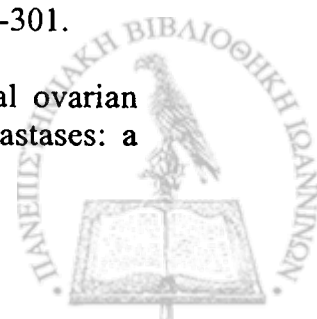
1. Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, et al. SEER Cancer Statistics review. Bethesda, National Cancer Institute, 1999.
2. Levi F, Te VC, Erler G, Randimbison L, La Vecchia C. Epidemiology of unknown primary tumors. *Eur J Cancer* 2002, 38, 1810-1812.
3. Van de Wouw AJ, Jansen RL, Speel EJ, Hillen HF. The unknown biology of the unknown primary tumour: a literature review. *Ann Oncol* 2003; 14(2):191-196.
4. Jordan III WE, Shildt RA. Adenocarcinoma of unknown primary site. The Brooke Army Medical Center experience. *Cancer*, 1985, 55, 857-860
5. Califano J, Westra WH, Koch W, Meiningner G, Reed A, Yip L et al. Unknown primary head and neck squamous cell carcinoma: molecular identification of the site of origin. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(7):599-604.
6. Holmes FF, Fouts TL. Metastatic cancer of unknown primary site. *Cancer* 1970; 26(4):816-820.
7. Frost P, Raber MN, Abbruzzese JL. Unknown primary tumors as a unique clinical and biological entity: a hypothesis. *Cancer Bull* 1989, 41, 139-141.
8. Abbruzzese JL, Abbruzzese MC, Lenzi R, Hess KR, Raber MN. Analysis of a diagnostic strategy for patients with suspected tumors of unknown origin. *J Clin Oncol* 1995; 13(8):2094-2103.
9. Silverberg E, Luber J. *Cancer Statistics* 1987, 37, 2-19
10. Muir C. Cancer of unknown primary site. *Cancer* 1995, 75, 353-356
11. Coates M, Armstrong B. NSW Central Cancer Registry. *Cancer in South Wales. Incidence and Mortality.* NSW, Cancer Council, 1995
12. Visser O, Coebergh JWW, Schouten JL. *Incidence of cancer in the Netherlands 1993.* Utrecht, The Netherlands Cancer Registry, 1993.
13. Neumann G. The impact of cancer with unspecified site. *Off Gesundheitswes* 1988, 50, 13-19.
14. Komov DV, Komarov IG, Podrguliskii KR, et al. Cancer metastases from an unestablished primary tumor. *Sov Med Rev F Oncology* 1991, 4, 1-33



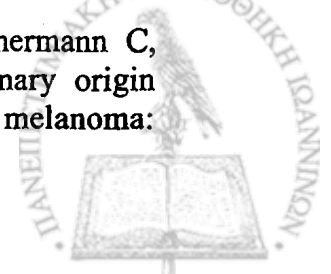
15. Nystrom JS, Weiner JM, Hellefanger-Juttner J, et al. Metastatic and histologic presentation in unknown primary cancer. *Semin Oncol* 1977, 4, 53-58
16. Briasoulis E, Pavlidis N. Cancer of Unknown Primary Origin. *Oncologist* 1997; 2(3):142-152.
17. Abbruzzese JL, Abbruzzese MC, Hess KR, Raber MN, Lenzi R, Frost P. Unknown primary carcinoma: natural history and prognostic factors in 657 consecutive patients. *J Clin Oncol* 1994;12:1272-1280.
18. Altman E, Cadman E. An analysis of 1539 patients with cancer of unknown primary site. *Cancer* 1986;57:120-124. Lembersky BC, Thomas LC. Metastases of unknown primary site. *Med Clin North Am* 1996;80(1):153-171.
19. Pasterz R, Savaraj N, Burgess M, Legha S, Benjamin R, Schwarz B. Analysis of prognostic factors in patients with metastatic carcinoma of unknown primary (mcup) (meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol* 1985;4:151-151. vd Gaast A, Verweij J, Henzen Logmans SC, Rodenburg CJ, Stoter G. Histological subtype as the main prognostic parameter in a subset of patients (pts) with metastatic carcinoma of unknown primary (cup) treated with cisplatin-based chemotherapy (meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol* 1990;9:A1100
20. Van der Gaast A, Verweij J, Planting AST, Hop WCJ, Stoter G. Simple Prognostic Model to Predict Survival in Patients With Undifferentiated Carcinoma of Unknown Primary Site. *J Clin Oncol* 1995;13(7):1720-1725.
21. Pasterz R, Savaraj N, Burgess M. Prognostic factors in metastatic carcinoma of unknown primary. *J Clin Oncol* 1986;4:1652-1657.
22. Lenzi R, Hess KR, Abbruzzese MC, Raber MN, Ordopez NG, Abbruzzese JL. Poorly differentiated carcinoma and poorly differentiated adenocarcinoma of unknown origin: Favorable subsets of patients with unknown-primary carcinoma? *J Clin Oncol* 1997;15(5):2056-2066.
23. Abbruzzese JL, Sidransky D, Abbruzzese M, Lenzi R, Raber M, Frost P. Unknown primary carcinoma (upc): a novel biologic perspective (meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol* 1992;11:A247
24. Ayoub JP, Hess KR, Abbruzzese MC, Lenzi R, Raber MN, Abbruzzese JL. Unknown primary tumors metastatic to liver. *J Clin Oncol* 1998; 16(6):2105-2112.
25. Fox RM, Woods RL, Tattersall MH, McGovern VJ. Undifferentiated carcinoma in young men: the atypical teratoma syndrome. *Lancet* 1979; 1(8130):1316-1318.



26. Greco FA, Vaughn WK, Hainsworth JD. Advanced poorly differentiated carcinoma of unknown primary site: recognition of a treatable syndrome. *Ann Intern Med* 1986; 104(4):547-553
27. Jackson B, Scott-Conner C, Moulder J. Axillary metastasis from occult breast carcinoma: diagnosis and management. *Am Surg* 1995; 61(5):431-434.
28. Leibman AJ, Kossoff MB. Mammography in women with axillary lymphadenopathy and normal breasts on physical examination: value in detecting occult breast carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 1992; 159(3):493-495.
29. Schorn C, Fischer U, Luftner-Nagel S, Westerhof JP, Grabbe E. MRI of the breast in patients with metastatic disease of unknown primary. *Eur Radiol* 1999; 9(3):470-473. Tilanus-Linthorst MM, Obdeijn AI, Bontenbal M, Oudkerk M. MRI in patients with axillary metastases of occult breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 44(2): 179-182.
30. Ellerbroek N, Holmes F, Singletary E, Evans H, Oswald M, McNeese M. Treatment of patients with isolated axillary nodal metastases from an occult primary carcinoma consistent with breast origin. *Cancer* 1990; 66(7):1461-1467.
31. Matsuoka K, Ohsumi S, Takashima S, Saeki T, Aogi K, Mandai K. Occult breast carcinoma presenting with axillary lymph node metastases: follow-up of eleven patients. *Breast Cancer* 2003; 10(4):330-334.
32. Koivunen P, Laranne J, Virtaniemi J, Back L, Makitie A, Pulkkinen J et al. Cervical metastasis of unknown origin: a series of 72 patients. *Acta Otolaryngol* 2002; 122(5):569-574.
33. Jereczek-Fossa BA, Jassem J, Orecchia R. Cervical lymph node metastases of squamous cell carcinoma from an unknown primary. *Cancer Treat Rev* 2004; 30(2):153-164.
34. Zaren HA, Copeland EM, III. Inguinal node metastases. *Cancer* 1978; 41(3):919-923.
35. Guarischi A, Keane TJ, Elhakim T. Metastatic inguinal nodes from an unknown primary neoplasm. A review of 56 cases. *Cancer* 1987; 59(3):572-577
36. van de Wouw AJ, Jansen RL, Griffioen AW, Hillen HF. Clinical and immunohistochemical analysis of patients with unknown primary tumour. A search for prognostic factors in UPT. *Anticancer Res* 2004; 24(1): 297-301.
37. Zang RY, Zhang ZY, Cai SM, Tang MQ, Chen J, Li ZT. Epithelial ovarian cancer presenting initially with extraabdominal or intrahepatic metastases: a

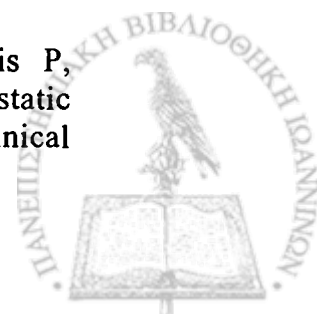


- preliminary report of 25 cases and literature review. *Am J Clin Oncol* 2000; 23(4):416-419.
38. Strnad CM, Grosh WW, Baxter J, Burnett LS, Jones HW, III, Greco FA et al. Peritoneal carcinomatosis of unknown primary site in women. A distinctive subset of adenocarcinoma. *Ann Intern Med* 1989.
 39. Ringenber QS, Doll DC, Loy TS, Yarbrow JW. Malignant ascites of unknown origin. *Cancer* 1989; 64(3):753-755.
 40. Katagiri H, Takahashi M, Inagaki J, Sugiura H, Ito S, Iwata H. Determining the site of the primary cancer in patients with skeletal metastasis of unknown origin: a retrospective study. *Cancer* 1999; 86(3):533-537.
 41. Gentile PS, Carloss HW, Huang TY, Yam LT, Lam WK. Disseminated prostatic carcinoma simulating primary lung cancer. Indications for immunodiagnostic studies. *Cancer* 1988; 62(4):711-715.
 42. Maesawa S, Kondziolka D, Thompson TP, Flickinger JC, Dade L. Brain metastases in patients with no known primary tumor. *Cancer* 2000; 89(5):1095-1101.
 43. Nguyen LN, Maor MH, Oswald MJ. Brain metastases as the only manifestation of an undetected primary tumor. *Cancer* 1998; 83(10):2181-2184.
 44. Maillefert JF, Tavernier C, Tebib J. Determining the site of the primary cancer in patients with skeletal metastasis of unknown origin: A retrospective study. *Cancer* 2000; 88(7): 1759-1761.
 45. Le Chevalier T, Smith FP, Caille P, Constans JP, Rouesse JG. Sites of primary malignancies in patients presenting with cerebral metastases. A review of 120 cases. *Cancer* 1985; 56(4):880-882.
 46. Garrow GC, Greco FA, Hainsworth 3D. Poorly differentiated neuroendocrine carcinoma of unknown primary tumor site. *Semin Oncol* 1993; 20(3):287-291.
 47. Hainsworth JD, Johnson DH, Greco FA. Poorly differentiated neuroendocrine carcinoma of unknown primary site. A newly recognized clinicopathologic entity. *Ann Intern Med* 1988; 109(5):364-371.
 48. Laveau F, Picot MC, Dereure O, Guilhou JJ, Guillot B. [Metastatic melanoma of unknown primary site]. *Ann Dermatol Venereol* 2001; 128(8-9):893-898.
 49. Schlagenhauff B, Stroebel W, Ellwanger U, Meier F, Zimmermann C, Breuninger H et al. Metastatic melanoma of unknown primary origin shows prognostic similarities to regional metastatic melanoma:



recommendations for initial staging examinations. *Cancer* 1997;80(1):60-65.

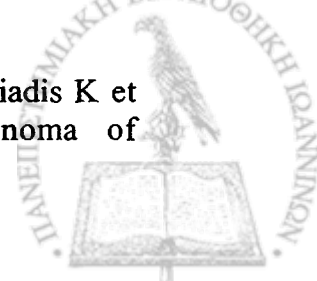
50. Anbari KK, Schuchter LM, Bucky LP, Mick R, Synnestvedt M, Guerry D et al. Melanoma of unknown primary site: presentation, treatment, and prognosis-a single institution study. University of Pennsylvania Pigmented Lesion Study Group. *Cancer* 1997; 79(9): 1816-1821.
51. Hedley DW, Leary JA, Kirsten F. Metastatic adenocarcinoma of unknown primary site: abnormalities of cellular DNA content and survival. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985;21:185-89.
52. Abbruzzese JL, Lenzi R, Raber MN, Pathak S., Frost P. The biology of unknown primary tumours. *Semin Oncol* 1993;20:238-43.
53. Motzer RJ, Rodriguez E, Reuter VE. Genetic analysis as an aid in diagnosis for patients with midline carcinomas of uncertain histologies. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:341-46.
54. Wessendorf S, Fritz B, Wrobel G, et al. Automated screening for genomic imbalances using matrix-based comparative genomic hybridization. *Lab Invest* 2002;82:47-60.
55. Pavlidis N, Briasoulis E, Bai M, Fountzilas G, Agnanti N. Overexpression of C-myc, Ras and C-erbB-2 oncoproteins in carcinoma of unknown primary origin. *Anticancer Res* 1995;15:2563-67.
56. Hainsworth JD, Lenington WJ, Greco FA. Overexpression of Her-2 in patients with poorly differentiated carcinoma or poorly differentiated adenocarcinoma of unknown primary site. *J Clin Oncol* 2000;18:632-35.
57. Fizazi K, Voigt JJ, Lesimple T, Lortholary A, Bugat R. Carcinoma of unknown primary (CUP): Are the tyrosine kinase receptors HER-2, EGF-R, and c-Kit suitable targets for therapy? *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003;22:3549 (abstr).
58. Rashid A, Hess KR, Lenzi R, Raber MN, Abbruzzese JL, et al. Overexpression and prevalence of molecular markers in patients with cancer of unknown primary (CUP). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005;24:9683 (abstr).
59. Bar-Eli M, Abbruzzese JL, Lee-Jackson D, Frost P. p53 gene mutation spectrum in human unknown primary tumors. *Anticancer Res* 1993;13(5A):1619-1623.
60. Vousden KH, Woude GF. The ins and outs of p53. *Nat Cell Biol* 2000;2:E178-180.
61. Briasoulis E, Tsokos M, Fountzilas G, Bafaloukos D, Kosmidis P, Samantas E et al. Bcl2 and p53 protein expression in metastatic carcinoma of unknown primary origin: biological and clinical



- implications. A Hellenic Co-operative Oncology Group study. *Anticancer Res* 1998;18(3B):1907-1914.
62. Hifen HF, Hak LE, Joosten-Achjanie SR, Arends JW. Microvessel density in unknown primary tumors. *Int J Cancer* 1997; 74(1):81-85.
63. Karavasilis V, Malamou-Mitsi V, Briasoulis E, Tsanou E, Kitsou E, et al. Angiogenesis in cancer of unknown primary: a clinicopathological study of CD34, VEGF and TSP-1. *BMC Cancer* 2005;5:25-32.
64. Karavasilis V, Malamou-Mitsi V, Briasoulis E, Tsanou E, Kitsou E, et al. Matrix metalloproteinases in carcinoma of unknown primary. *Cancer* 2005;104:2282-7.
65. Stewart JF, Tattersall MH, Woods RL, Fox RM. Unknown primary adenocarcinoma: incidence of overinvestigation and natural history. *Br Med J* 1979; 1(6177):1530-1533.
66. Levine MN, Drummond MF, Labelle RJ. Cost-effectiveness in the diagnosis and treatment of carcinoma of unknown primary origin. *CMAJ* 1985; 133(10):977-987.
67. Hainsworth JD, Greco FA. Treatment of patients with cancer of an unknown primary site. *N Engl J Med* 1993; 329(4):257-263.
68. Motzer RJ, Rodriguez E, Reuter VE, Bosl GJ, Mazumdar M, Chaganti RS. Molecular and cytogenetic studies in the diagnosis of patients with poorly differentiated carcinomas of unknown primary site. *J Clin Oncol* 1995;13(1):274-282.
69. Hainsworth JD, Wright EP, Johnson DH, Davis BW, Greco FA. Poorly differentiated carcinoma of unknown primary site: clinical usefulness of immunoperoxidase staining. *J Clin Oncol* 1991; 9(11): 1931-1938.
70. Mackay B, Ordonez NG. Pathological evaluation of neoplasms with unknown primary tumor site. *Semin Oncol* 1993; 20(3):206-228.
71. Pentheroudakis G and Pavlidis N. Perspectives for targeted therapies in cancer of unknown primary site. *Cancer Treat Rev* 2006; 32:637-644
72. Nystrom JS, Weiner JM, Wolf RM, Bateman JR, Viola MV. Identifying the primary site in metastatic cancer of unknown origin. Inadequacy of graphic procedures. *JAMA* 1979; 241(4):381-383.
73. Karsell PR, Sheedy PF, O'Connell MJ. Computed tomography in search of cancer of unknown origin. *JAMA* 1982; 248(3):340-343.
74. Varadhachary GR, Abbruzzese JL, Lenzi R. Diagnostic strategies for unknown primary cancer. *Cancer* 2004; 100(9): 1776-1785.

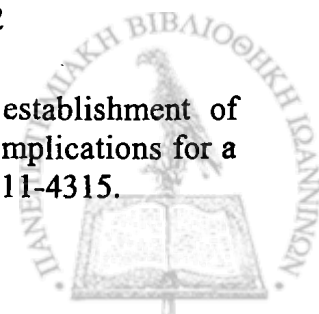


75. Gamble AR, Bell JA, Ronan JE, Pearson D, Ellis IO. Use of tumour marker immunoreactivity to identify primary site of metastatic cancer. *BMJ* 1993; 306(6873):295-298.
76. Mantaka P, Baum RP, Hertel A, Adams S, Niessen A, Sengupta S et al. PET with 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) in patients with cancer of unknown primary (CUP): influence on patients' diagnostic and therapeutic management. *Cancer Biother Radiopharm* 2003; 18(1) :47-58.
77. Rusthoven KE, Koshy M, Paulino AC. The role of fluorodeoxyglucose positron emission tomography in cervical lymph node metastases from an unknown primary tumor. *Cancer* 2004; 101(11):2641-2649.
78. Regelink G, Brouwer J, de Bree R, Pruijm J, van der Laan BF, Vaalburg W et al. Detection of unknown primary tumours and distant metastases in patients with cervical metastases: value of FDG-PET versus conventional modalities. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002; 29(8):1024-1030.
79. Stoeckli SJ, Mosna-Firlejczyk K, Goerres GW. Lymph node metastasis of squamous cell carcinoma from an unknown primary: impact of positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30(3):411- 416.
80. Bohuslavizki KH, Klutmann S, Kroger S, Sonnemann U, Buchert R, Werner JA et al. FDG PET detection of unknown primary tumors. *J Nucl Med* 2000; 41(5):816-822.
81. Delgado-Bolton RC, Fernandez-Perez C, Gonzalez-Mate A, Carreras JL. Meta-analysis of the performance of 18F-FDG PET in primary tumor detection in unknown primary tumors. *J Nucl Med* 2003; 44(8): 1301-1314.
82. Rades D, Kuhnel G, Wildfang I, Borner AR, Schmoll HJ, Knapp W. Localised disease in cancer of unknown primary (CUP): the value of positron emission tomography (PET) for individual therapeutic management. *Ann Oncol* 2001; 12(11):1605-1609.
83. Joshi U, van der Hoeven JJ, Comans EF, Herder GJ, Teule GJ, Hoekstra OS. In search of an unknown primary tumour presenting with extracervical metastases: the diagnostic performance of FDG-PET. *Br J Radiol* 2004; 77(924): 1000-1006.
84. Pavlidis N, Briassoulis E, Hainsworth J, Greco FA. Diagnostic and therapeutic management of cancer of an unknown primary. *Eur J Cancer* 2003; 39(14): 1990-2005.
85. Mousseau M, Schaerer R, Lutz JM, Menegoz F, Faure H, Swiercz P. Hepatic metastasis of unknown primary site]. *Bull Cancer Paris* 1991;78:725-736.
86. Pavlidis N, Kalef-Ezra J, Briassoulis E, Skarlos D, Kosmidis P, Saferiadis K et al. Evaluation of six tumor markers in patients with carcinoma of



unknown primary. *Med Pediatr Oncol* 1994; 22(3): 162-167

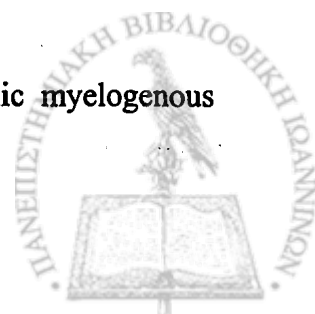
87. Barak V, Roisman I, Livni N, Rosemann E, Treves A, Sulkes A, Gez E, Durst AL. CA 15-3 expression in serum and tissue of breast cancer (meeting abstract). Eighth Mediterranean Congress of Chemotherapy 1992; May 24-9, 1992, Athen:-9,-9.
88. Jacobs IJ, Bast RC. The CA125 tumour associated antigen: a review of the literature. *Hum Reprod* 1989;4:1-12
89. Friesland S, Lind MG, Lundgren J, Munck-Wikland E, Fernberg JO. Outcome of ipsilateral treatment for patients with metastases to neck nodes of unknown origin. *Acta Oncol* 2001; 40(1):24-28.
90. Koivunen P, Laranne J, Virtaniemi J, Back L, Makitie A, Pulkkinen J et al. Cervical metastasis of unknown origin: a series of 72 patients. *Acta Otolaryngol* 2002; 122(5):569-574.
91. Harper CL, Lofts F3, Otter M, Mansi 3L. Prostate-specific antigen (PSA) immunohistochemistry in the presence of a normal serum PSA as an aid to diagnosis of adenocarcinoma of unknown primary site. *Br J Hosp Med* 1996; 55(6):367-368.
92. Simon MA, Bartucci EJ. The search for the primary tumor in patients with skeletal metastases of unknown origin. *Cancer* 1986; 58(5): 1088-1095.
93. Yu H, Yang MT, Rong TH, Long H, Ou W. [Clinical analysis of seven patients with occult breast cancer and literature reviews]. *Ai Zheng* 2002; 21(5):541-543.
94. Brill KL, Brenin DR. Occult breast cancer and axillary mass. *Curr Treat Options Oncol* 2001; 2(2):149-155.
95. Greco FA, Burris HA, III, Litchy S, Barton 3H, Bradof 3E, Richards P et al. Gemcitabine, carboplatin, and paclitaxel for patients with carcinoma of unknown primary site: a Minnie Pearl Cancer Research Network study. *J Clin Oncol* 2002; 20(6):1651-1656.
96. Culine S, Lortholary A, Voigt 33, Bugat R, Theodore C, Priou F et al. Cisplatin in combination with either gemcitabine or irinotecan in carcinomas of unknown primary site: results of a randomized phase II study—trial for the French Study Group on Carcinomas of Unknown Primary (GEFCAPI 01). *J Clin Oncol* 2003; 21(18):3479-3482
97. Bell CW, Pathak S, Frost P. Unknown primary tumors: establishment of cell lines, identification of chromosomal abnormalities, and implications for a second type of tumor progression. *Cancer Res* 1989; 49(15):4311-4315.



98. Strnad CM, Grosh WW, Baxter J, Burnett LS, Jones HW, III, Greco FA et al. Peritoneal carcinomatosis of unknown primary site in women. A distinctive subset of adenocarcinoma. *Ann Intern Med* 1989;
99. Greco FA, Vaughn WK, Hainsworth 3D. Advanced poorly differentiated carcinoma of unknown primary site: recognition of a treatable syndrome. *Ann Intern Med* 1986; 104(4):547-553.
100. Piga A, Nortilli R, Cetto GL, Cardarelli N, Fedeli SL, Fiorentini G et al. Carboplatin, doxorubicin and etoposide in the treatment of tumours of unknown primary site. *Br J Cancer* 2004; 90(10): 1898-1904.
101. Falkson CI, Cohen GL. Mitomycin C, epirubicin and cisplatin versus mitomycin C alone as therapy for carcinoma of unknown primary origin. *Oncology* 1998; 55(2):116-121.
102. Warner E, Goel R, Chang 3, Chow W, Verma S, Dancey J et al. A multicentre phase II study of carboplatin and prolonged oral etoposide in the treatment of cancer of unknown primary site (CUPS). *Br J Cancer* 1998; 77(12):2376-2380.
103. Farrugia DC, Norman AR, Nicolson MC, Gore M, Bolodeoku EO, Webb A et al. Unknown primary carcinoma: randomised studies are needed to identify optimal treatments and their benefits. *Eur J Cancer* 1996; 32A(13):2256-2261.
104. Culine S, Fabbro M, Assens C, Ychou M, Romieu G, Kramar A et al. Four-step high-dose sequential chemotherapy with hematopoietic progenitor-cell support as induction treatment for patients with solid tumors. *Ann Oncol* 1997; 8(10):951-956.
105. Culine S, Fabbro M, Ychou M, Romieu G et al. Chemotherapy in carcinomas of unknown primary site : a high-dose intensity policy. *Ann Oncol* 1999, 10, 569-575.
106. Levine AJ: The genetic origins of neoplasia. *JAMA* 273:592, 1995.
107. Pietras RJ, Pegram MD: Oncogene activation and breast cancer progression. *Endocrinology of breast cancer*, Totowa, NJ, Humana Press Inc, 1999, pp 133-153.
108. Li FP, Fraumeni JF: Soft tissue sarcomas, breast cancer and other neoplasms: A familial syndrome? *Ann Intern Med* 71:747-752, 1999
109. Hoskins K, Weber BL: Recent advances in breast cancer biology. *Curr Opin Oncol* 7:495-500, 1995
110. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al: Studies of the HER2 proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244:707-712, 1989



111. Adjei A. and Hidalgo M : Treating cancer by blocking cell signals. *Journal of Clinical Oncology*:5279-5280, 23, 2005
112. Susman E: Bevacizumab adds survival benefit in colorectal cancer. *Lancet Oncol* 6:136, 2005.
113. Meyerhardt JA, Mayer RJ: Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 352:476-487, 2005.
114. Erlotinib (Tarceva) for advanced non-small cell lung cancer. *Med Lett Drugs Ther* 47:25-26, 2005.
115. Druker BJ: Imatinib as a paradigm of targeted therapies. *Adv Cancer Res* 91:1-30, 2004
116. Blume-Jensen P, Hunter T: Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411:355-356, 2001
117. Cohen P: Protein kinases, the major drug targets of the 21st century? *Nat Rev Drug Discov* 1:309-316, 2002
118. Futreal P, Kasprzyk A, Birney E, et al: Cancer and genomics. *Nature* 409:850-852, 2001
119. Plowman GD, Sudarsanam S, Bingham J, et al: The protein kinases of the *Caenorhabditis elegans*: A model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13603-13610, 1999
120. Robinson DR, Wu YM, Lin SF: The protein kinase family of the human genome. *Oncogene* 19:5548-5557, 2000
121. Kolibaba KS, Druker BJ: Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Acta* 1333:F217-F218, 1997
122. Hanahan D and Weinberg R,A. 2000, The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70
123. Adams J. L and Lee D. 1999, Recent progress towards the identification of selective inhibitors of serine/threonine protein kinases. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2, 96-109
124. Hunter T. 2000, Signaling -2000 and beyond. *Cell* 100, 113-117
125. Schlessinger J. 2000, Cell signalling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103, 211-225
126. Cortes L.E., Kantarjian H., Talpaz M., et al. 1996, Chronic myelogenous leukemia : a review. *Am J Med* 100, 555-570



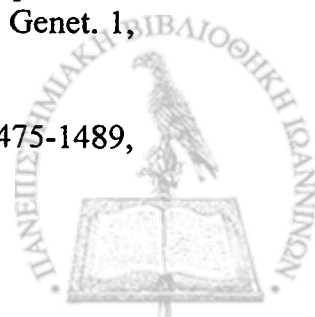
127. Lux M.L., Rubin P.S., Biase T.L., et al. 2000, KIT extracellular nad kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 156, 791-795.
128. Sher C.J. 2000, The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 60, 3689-3695.
129. Yarden Y, Sliwkowski MX: Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127-137,2001
130. Matter, A. 2001. Tumor angiogenesis as a therapeutic target. *Drug Discov Today* 6, 1005-1023
131. Davies S.P, Reddy H., Caivano M., and Cohen P. 2000. Specificity and mechanisms of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351, 95-105
132. Dalgarno D. C., Metcalf, C. A., Shakespeare , W. C., and Sawyer, T.K. 2000. Signal transduction drug discovery: targets, mechanisms and structure-based design. *Curr Opin Drug Discov Devel* 3, 549-564
133. Engh, R.A., and Bossemeyer, D. 2002. Structural aspects of protein kinase control- role of conformational flexibility. *Pharmacol Ther* 93, 99-111
134. Mc Manon, G., Sun, L., and Wang, J.Y. 1998. Protein kinase inhibitors: structural determinants for target specificity. *Curr Opin Drug Devel* 1, 131-146.
135. Pawson, T., and Nash, P. 2000. Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev* 14, 1027-1047
136. Hackel, P. O., Zwick, E., Prenzel, N., and Ulrich A. 1999. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11, 184-189
137. Mendelsohn J, Baseiga J: Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 21:2787-2799, 2003
138. Manning G, Whyte DB, Martinez R, et al: The protein kinase complement of the human genome. *Science* 289:1912-1934, 2002
139. Citri A, Skaria KB, Yarden Y: The deaf and the dumb: The biology of ErbB2 and ErbB3. *Exp Cell Res* 284:54-5, 2003
140. Schiessinger J: Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 110:669-672, 2002
141. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, et al: Epidermal growth factor receptor: Mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284:31-53, 2003



142. Cohen S: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new born animal. *J Biol Chem* 237:1555-1562, 1962
143. Hunter T, Cooper JA: Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells. *Cell* 24:741-752, 1981
144. Anderson SM, Hayward WS, Neel BJ, et al: Avian erythroblastosis virus produces two mRNAs. *J Virol* 36:676-683,1980
145. Downward J, Yarden Y, Mayes E, et al: Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307:521-527, 1984
146. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME: EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37(Supplement 4):S9-15, 2001
147. Gill GN, Kawamoto T, Cochet C, et al: Monoclonal anti-EGF receptor antibodies which are inhibitors of growth binding and antagonists of the EGF-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J Biol Chem* 259:7755-7760, 1984
148. Mendelsohn J: Targeting of the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J Clin Oncol* 20:1S-23S, 2003
149. Sandgren EP, Luetkeke NC, Palmiter RD, et al: Overexpression of the TGF alpha in transgenic mice: induction of hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell* 61:1121-1135,1990
150. Xu YH, Richert N, Ito S, et al: Characterization of epidermal growth factor receptor gene expression in malignant and normal human cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:7308-7312,1984
151. Di Fiore PP, Pierce JH, Fleming TP, et al: Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell* 51:1063-1070,1987
152. G.Gebhardt F., Zankers K.S., and Brandt B. Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol Chem*: 247, 13176-13180, 1999
153. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, et al: Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N-and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4309-4313,1992
154. Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD: EGF mutant receptor VIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 8:83-96, 2001



155. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al: Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of NSCLC to gefitinib. *N Engl J Med* 350:2129-2139, 2004
156. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al: EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304:1497-1500, 2004
157. Marketti A, Martella C, Felicioni L, et al: EGFR mutation in non small cell lung cancer: Analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 23:857-865, 2005
158. Savage C.R and Cohen S. *J Biol Chem*, 247, 7609-7611, 1972
159. Carpenter G and Cohen S. *Annu Rev Biochem.* 56, 881-914, 1987
160. Adamson E.D and Rees A.R. *Mol Cell Biochem.* 34, 129-152, 1981
161. DiFiore P., Pierce J, Fleming T, Haazon R et al. *Cell* 51, 1063-1070, 1987
162. Merlino G.T., Ishii S., Whang-Peng J., Knutsen T., Xu Y., Clark A.J., et al., Structure and localization of genes encoding aberrant and normal epidermal growth factor receptor RNAs from A431 human carcinoma cells: *Mol. Cell Biol.* 5, 1722-1734, 1987
163. Velu T., Bequinet L., Vass M., Willingham M., Merlino G.T., et al. Epidermal growth factor dependent transformation by a human EGF receptor proto-oncogene: *Science.* 238, 1408-1410, 1987
164. Xu Y., Richert N., Ito S., Merlino G.T and Pastan I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 7308-7312, 1985
165. Ishii S., Xu Y., Stratton R., Roe B., Merlino G.T and Pastan I. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 4920-4924, 1985
166. Chrysogelos S.A. Chromatin structure of the EGFR gene suggests a role for intron 1 sequences in its regulation in breast cancer cells. *Nucleic Acid Res.* 21, 5736-5741, 1993
167. Maekawa T., Immamoto F., Merlino G.T, Pastan I and Ishii S. *J. Biol. Chem.* 264, 5488-5494, 1989
168. Chi D., Hing A., Helms C., Steinbruek T., Mishra S.A., and Donis-Keller, H. Two chromosome 7 dinucleotide repeat polymorphisms at gene loci epidermal growth factor receptor (EGFR) and $\alpha 2(I)$ collagen (COL1A2). *Hum Mol Genet.* 1, 135, 1992
169. Dignam J, Lebovitz R. M., and Roeder R.G. *Nucleic Acid Res* 11, 1475-1489, 1983



170. Travers A.A., and Klug A. (1990) DNA Topology and Its Biological Effects (Cozzarelli N.R and Wang J. C eds) Cold Spring Habor Laboratory Press, Cold Spring Habor, NY
171. Gabrelian A., and Pongor S. FEBBS Lett. 393,65-66, 1996
172. Gabrelian A., Simonsits A., and Pongor S. FEBBS Lett. 393,124-130, 1996
173. Ward WH, Cook PN, Slater AM, et al: Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Investigation of a catalytic mechanism, structure-based searching and discovery of a potent inhibitor. *Biochem Pharmacol* 48:659-666, 1994
174. Sitronak FM: Studies with ZD1839 in preclinical models. *Semin Oncol* 30:12-20, 2003
175. Sitronak FM, Zakowski MF, Miller VA, et al: Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase. *Clin Cancer Res* 6:4885-4892, 2000
176. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, et al: Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD1839(Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 6:2053-2063, 2000
177. She Y, Lee F, Chen J, et al: The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1389 selectively potentiates radiation response of human tumors in nude mice, with a marked improvement in therapeutic index. *Clin Cancer Res* 9:3773-3778, 2003
178. Williams KJ, Telfer BA, Stratford IJ, et al: ZD1839 (Iressa), a specific oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, potentiates radiotherapy in a human colorectal cancer xenograft model. *Br J Cancer* 86:1157-1161, 2002
179. Nicholson RI, Hutcheson IR, Harper ME, et al: Modulation of epidermal growth factor receptor in endocrine-resistant, oestrogen receptor positive breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 8:175-182, 2001
180. Ciardiello F, Tortora G: A novel approach in the treatment of cancer: Targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 7:2958-2970,2001
181. Moyer JD, Barbacci EG, Iwata KK, et al: Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,744, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res* 57: 4838-4848, 1997



182. Pao W, Miller VA, Kris MG: Targeting the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase with gefitinib (Iressa) in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Semin Cancer Biol* 14:33-40, 2004
183. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, et al: EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from 'never smokers' and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:13306-13311, 2004
184. Huang SF, Liu HP, Li LH, Ku YC, Fu YN, et al: High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patients in non small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan. *Clin Cancer Res* 10:8195-8203,2004
185. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, et al: Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: Biological and clinical implications. *Cancer Res* 64:8919-8923, 2004
186. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, et al: Clinical and biological features of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst*, 2004
187. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q et al: KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinoma to gefitinib or erlotinib. *PLoS Medicine* 2:e17, 2004
188. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, et al : Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR Kinase domain. *PLoS medicine* 2: e73, 2005
189. Reilly JT. Class III receptor tyrosine kinases: role in leukaemogenesis. *Br J Haematol* 2002, 116, 744-757
190. Yarden Y, Escobedo J.A, Kuang W.J, Yang-Feng T.L et al. 1986, *Nature* 323, 226-232
191. Ulrich A, and Schlessinger J. 1990, *Cell* 61, 203-212
192. Blume-Jensen P, Claesson-Welsh L, Siegbahn A et al. Activation of the human *c-kit* product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. *EMBO J* 1991;10:4121-4128.
193. Philo JS, Wen J, Wypych J et al. Human stem cell factor dimer forms a complex with two molecules of the extracellular domain of its receptor, Kit. *J Biol Chem* 1996;271:6895-6902.
194. Lemmon MA, Pinchasi D, Zhou M et al. Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *J Biol Chem* 1997;272:6311-6317.



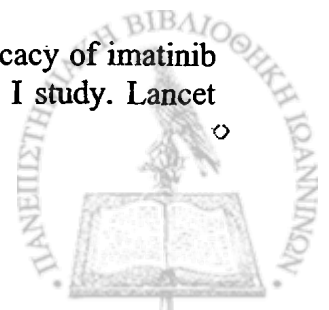
195. Blechman JM, Lev S, Barg J et al. The fourth immunoglobulin domain of the stem cell factor receptor couples ligand binding to signal transduction. *Cell* 1995;80:103–113.
196. Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A et al. Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:7732–7737.
197. Jiang X, Gurel O, Mendiaz EA et al. Structure of the active core of human stem cell factor and analysis of binding to its receptor kit. *EMBO J* 2000;19:3192–3203.
198. Broudy VC, Lin NL, Buhring HJ et al. Analysis of *c-kit* receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer. *Blood* 1998;91:898–906.
199. Jahn T, Seipel P, Coutinho S et al. Analysing *c-kit* internalization using a functional *c-kit*-EGFP chimera containing the fluorochrome within the extracellular domain. *Oncogene* 2002;21:4508–4520.
200. Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature* 1995;373:573–580. Mol CD, Lim KB, Sridhar V et al. Structure of a *c-kit* product complex reveals the basis for kinase transactivation. *J Biol Chem* 2003;278:31461–31464.
201. Miyazawa K, Williams DA, Gotoh A et al. Membranebound steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of *c-kit* gene-encoded protein than its soluble form. *Blood* 1995;85:641–649.
202. Brannan CI, Lyman SD, Williams DE et al. Steel-Dickie mutation encodes a *c-kit* ligand lacking transmembrane and cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:4671–4674.
203. Kapur R, Majumdar M, Xiao X et al. Signaling through the interaction of membrane-restricted stem cell factor and *c-kit* receptor tyrosine kinase: genetic evidence for a differential role in erythropoiesis. *Blood* 1998;91:879–889.
204. Morgan SJ, Smith AD, Parker PJ. Purification and characterization of bovine brain type I phosphatidylinositol kinase. *Eur J Biochem* 1990;191:761–767.
205. Fresno Vara J, Casado E, de Castro J et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 2004;30:193–204.
206. Linnekin D. Early signaling pathways activated by *c-kit* in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:1053–1074.
207. Steelman L, Pohnert S, Shelton J et al. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2004;18:189–218.



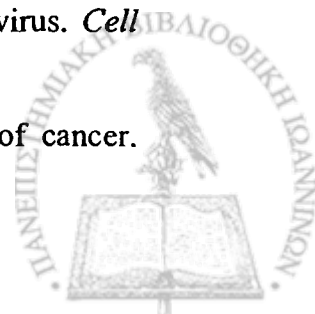
208. Brizzi MF, Zini MG, Aronica MG et al. Convergence of signalling by interleukin-3, granulocyte-macrophage colonystimulating factor, and mast cell growth factor on JAK2 tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1994;269:31680–31684.
209. Weiler SR, Mou S, DeBerry CS et al. JAK2 is associated with the *c-kit* proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood* 1996;87:3688–3693.
210. Linnekin D, Weiler SR, Mou S et al. JAK2 is constitutively associated with *c-Kit* and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Acta Haematol* 1996;95:224–228.
211. Radosevic N, Winterstein D, Keller JR et al. JAK2 Contributes to the intrinsic capacity of primary hematopoietic cells to respond to SCF. *Exp Hematol* 2004;32:149–156.
212. Brizzi MF, Dentelli P, Rosso A et al. STAT protein recruitment and activation in *c-Kit* deletion mutants. *J Biol Chem* 1999;274:16965–16972.
213. Deberry C, Mou S, Linnekin D. Stat1 associates with *c-kit* and is activated in response to stem cell factor. *Biochem J* 1997;327:73–80.
214. Ryan JJ, Huang H, McReynolds LJ et al. Stem cell factor activates STAT-5 DNA binding in IL-3-derived bone marrow mast cells. *Exp Hematol* 1997;25:357–362.
215. Gotoh A, Takahira H, Mantel C et al. Steel factor induces serine phosphorylation of Stat3 in human growth factor dependent myeloid cell lines. *Blood* 1996;88:138–145.
216. Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:513–609.
217. Linnekin D, DeBerry CS, Mou S. Lyn associates with the juxtamembrane region of *c-Kit* and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells. *J Biol Chem* 1997;272:27450–27455.
218. Krystal GW, DeBerry CS, Linnekin D et al. Lck associates with and is activated by Kit in a small cell lung cancer cell line: inhibition of SCF-mediated growth by the Src family kinase inhibitor PP1. *Cancer Res* 1998;58:4660–4666.
219. Price DJ, Rivnay B, Fu Y et al. Direct association of Csk homologous kinase (CHK) with the diphosphorylated site Tyr568/570 of the activated *c-KIT* in megakaryocytes. *J Biol Chem* 1997;272:5915–5920.
220. Broudy VC, Lin NL, Liles WC et al. Signaling via Src family kinases is required for normal internalization of the receptor *c-Kit*. *Blood* 1999;94:1979–1986.



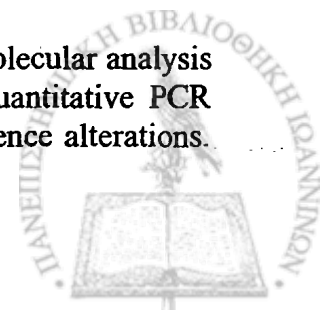
221. Ware MF, Tice DA, Parsons SJ et al. Overexpression of cellular Src in fibroblasts enhances endocytic internalization of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*
222. Wilde JJ, Watson SP. Regulation of phospholipase C gamma isoforms in haematopoietic cells: why one, not the other? *Cell Signal* 2001;13:691-701.
223. Tauchi T, Feng GS, Marshall MS et al. The ubiquitously expressed Syp phosphatase interacts with *c-kit* and Grb2 in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 1994;269:25206-25211.
224. Tauchi T, Boswell HS, Leibowitz D et al. Coupling between p210bcr-abl and Shc and Grb2 adaptor proteins in hematopoietic cells permits growth factor receptor-independent link to ras activation pathway. *J Exp Med* 1994;179:167-175.
225. Thommes K, Lennartsson J, Carlberg M et al. Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the *c-Kit*/stem cell factor receptor. *Biochem J* 1999;341:211-216.
226. Scheijen B, Griffin JD. Tyrosine kinase oncogenes in normal haemopoiesis and haematological diseases. *Oncogene* 2002, 21, 3314-3333
227. Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ, Corless CL. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity : a novel molecular approach to the treatment of KIT positive malignancies. *J Clin Oncol* 2002, 20, 1692-1703
228. Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y. Classes of C-KIT activating mutations : proposed mechanisms of actions and implications for disease classification and therapy. *Leuk Res* 2001, 7, 571-576
229. Rubin BP, Singer S, Tsao C, et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2001, 61, 8118-8121
230. Hubbard S.R, Mohammadi M, Schlessinger J. 1998, *J Biol. Chem.* 273, 11987-11990.
231. Radford IR. Imatinib. Novartis. *Curr Opin Investig Drugs* 2002, 3, 492-499
232. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001, 344, 1038-1042
233. Goldman JM, Druker B. Chronic myeloid leukemia: current treatment options. *Blood* 2001, 98, 2039-2042
234. Van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, et al. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet* 2001, 358, 1421-1423



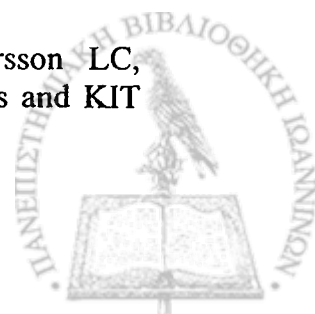
235. Verweij J, Judson I, van Oosterom AT. STI571: a magic bullet? *Eur J Cancer* 2001, 37, 1816-1819
236. Saiki RK, Gelfand DH, Stoggel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Elrich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839), 487-491
237. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory
238. Abbruzzese JL, Lenzi R, Raber MN, Pathak S, Frost P. (1993). The biology of unknown primary tumors. *Semin Oncol* 20, 238-43.
239. Ruddon RW, and Norton S (1993). Use of biological markers in the diagnosis of cancers of unknown primary tumor. *Semin Oncol* 20, 251-60
240. Hess KR, Abruzzese MC, Lenzi R, Raber MN, and Abruzzese JL (1999). Classification and regression tree analysis of 1000 consecutive patients with unknown primary carcinoma. *Clin Can Res* 5, 3403-410.
241. Mitelman F, Johansson B, Madahal N, and Mertens F (1997). Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 95, 1-8.
242. Bar-Eli M, Abruzzese JL, Lee-Jackson D, and Frost P (1993). p53 gene mutation spectrum in human unknown primary tumors. *Anticancer Res* 13, 1619-24.
243. Ison HI, Motzer RJ, Rodriguez E, Changanti RSK, and Bosi GJ (1991). Genetic analysis in the diagnosis of neoplasms of unknown primary tumor site. *Semin Oncol* 20, 229-37.
244. Pantou D, Tsarouha H, Papadopoulou A, Mahaira L, Kyriazoglou I, Apostolikas N, Markidou S, Trangas T, Pandis N and Bardi G (2003). Cytogenetic profile of unknown primary tumors: Clues for their pathogenesis and clinical management. *Neoplasia* 5, 23-31.
245. Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 2002;110:669-672.
246. Pao W, Miller VA. Epidermal growth factor receptor mutations, small molecule kinase inhibitors and non small cell lung cancer: Current knowledge and future directions. *J Clin Oncol* 2005;23:2556-2568.
247. Vennstrom B, Bishop JM. Isolation and characterization of chicken DNA homologous to the two putative oncogenes of avian erythroblastosis virus. *Cell* 1982;28:135-143.
248. Weinstein I. Cancer: Addiction to oncogenes-The Achilles heel of cancer. *Science* 2002;297:63-64.



249. Baselga J, Arteaga CL. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor targeting in cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:2445-2459.
250. Burkhard Brandt, Silke Hermann, Kurt Straif, Nicola Tidow, et al. Modification of Breast Cancer Risk in Young Women by a Polymorphic Sequence in the *egfr* Gene. *Cancer Research* 2004;64:7-12
251. Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, et al. EGFR mutations in NSCLC: Analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 2005;23:857-865.
252. Yano S, Kondo K, Yamaguchi M, Richmond G, Hutchison M, et al. Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition. *Anticancer Res* 2003;23:3639-50.
253. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, et al. Erlotinib in lung cancer-Molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 2005;353:133-144.
254. Gebhardt F, Zanker KS, Brandt B. Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol Chem* 1999;274:13176-13180.
255. Sordella R, Bell DW, Haber DA, et al. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 2004;305:1163-1167.
256. Tracy S, Mukohara T, Hansen M, et al. Gefitinib induces apoptosis in the EGFR L858R NSCLC cell line H3255. *Cancer Res* 2004;64:7241-7244
257. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer : Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-1500.
258. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, et al. EGFR gene and protein and gefitinib sensitivity in non small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:643-655.
259. Takano T, Ohe Y, Sakamoto H, Tsuta K, Matsuno Y, et al. EGFR gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:6829-6837.
260. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, et al. EGFR in non small cell lung carcinomas : Correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 2003;21:3798-3807.
261. Arjona D, Bello MJ, Alonso ME, Aminoso C, Isla A, et al. Molecular analysis of the EGFR gene in astrocytic gliomas: mRNA expression, quantitative PCR analysis of non-homogeneous gene amplification and DNA sequence alterations. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005;31:384-394.



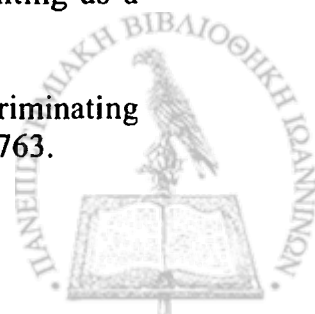
262. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 1987;6:3341-3351.
263. Kitamura Y, Hirota S. Kit as a human oncogenic tyrosine kinase. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2924-2931.
264. Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2001;61:8118-8121.
265. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279:577-580.
266. de Silva MVC, Reid R. Gastrointestinal stromal tumors (GIST): C-kit mutations, CD117 expression, differential diagnosis and targeted cancer therapy with imatinib. *Pathol Oncol Res* 2003;9:13-19.
267. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295:139-145.
268. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van der Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002;347:472-480.
269. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003;21:4342-4349.
270. Debiec-Rychter M, Dumez H, Judson I, Wasag B, Verweij J, Brown M, et al. Use of c-kit/PDGFRα mutational analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours entered on phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer* 2004;40:689-695.
271. Went PT, Dirnhofer S, Bundi M, Mirlacher M, Schraml P, Mangialaio S, et al. Prevalence of KIT expression in human tumors. *J Clin Oncol* 2004;22:4514-4522.
272. Burger H, den Bakker MA, Stoter G, et al. Lack of c-kit exon 11 activating mutations in c-kit/CD117 positive SCLC tumour specimens. *Eur J Cancer* 2003;39:793-799.
273. Sihto H, Sarlomo-Rikala M, Tynninen O, Tanner M, Andersson LC, Franssila K, et al. KIT and PDGFRα tyrosine kinase gene mutations and KIT amplifications in human solid tumors. *J Clin Oncol* 2005;23:49-57.



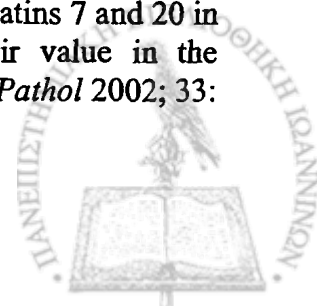
274. Johnson BE, Fisher B, Fisher T, et al. Phase II study of imatinib in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:5880-5887.
275. Campiglio M, Locatelli A, Olgiati C, et al. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in breast cancer cells by the EGFR tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) is independent of EGFR expression level. *J Cell Physiol* 2004;198:259-268.
276. Wyllie AD. Growth and Neoplasia. In Muir's text of Pathology, MacSween RNM, Whaley K(eds). Edward Arnold: London, 1992:355-410
277. Liotta L., Petricoin E. Molecular profiling of human cancer. *Nature Rev Genetics* 2000;1:48-56
278. Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry. Churchill Livingstone: Edinburg, 2002.
279. Jaffe ES. Kematopathology: integration of morphologic features and biologic markers for diagnosis. *Mod Pathol* 1999; 12:109-115
280. Emmert-Buck MR, Strausberg RL, Krizman DB et al. Molecular profiling of clinical tissue specimens: feasibility and applications. *Am J Pathol* 2000; 156:1109-1115
281. Alizadeh AA, Ross DT, Perou CM, van de Rijn M. Towards a novel classification of human malignancies based on gene expression patterns. *J Pathol* 2001; 195:41-52
282. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, et al. Systemic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nature Genet* 2000; 24:227-235
283. Logsdom CD, Simeone DM, Binkley C, et al. Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2003; 63:2649-2657
284. Vant Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415:530-536
285. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-511
286. DeYoung BR, Wick MR. Immunohistologic evaluation of metastatic carcinomas of unknown origin: an algorithmic approach. *Semin Diagn Pathol* 2000;17:184-193
287. Nystrom JS, Weiner LM, Heffelfinger-Juttner J, et al. Metastatic and histologic presentations in unknown primary cancer. *Semin Oncol* 1977;4:53-58



288. Mintzer DM, Warhol M, Martin AM, Greene G. Cancer of unknown primary: changing approaches. A multidisciplinary case presentation from the Joan Karnell Cancer of Pennsylvania Hospital. *Oncologist* 2004;9:330-338
289. Hillen HF. Unknown primary tumors. *Postgrad Med J* 2000; 76:690-693
290. Varadhachary GR, Abbruzzese JL, Lenzi R. Diagnostic strategies for unknown primary cancer. *Cancer* 2004; 100:1776-1785
291. Blaszyk H, Hartmann A, Bjornsson J. Cancer of unknown primary: clinicopathologic correlations. *APMIS* 2003; 111:1089-1094
292. Sheahan K, O'Keane JC, Abramowitz A, *et al.* Metastatic adenocarcinoma of an unknown primary site. A comparison of the relative contributions of morphology, minimal essential clinical data and CEA immunostaining status. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 729-735.
293. Lagendijk JH, Mullink H, van Diest PJ, Meijer GA, Meijer CJ. Immunohistochemical differentiation between primary adenocarcinomas of the ovary and ovarian metastases of colonic and breast origin. Comparison between a statistical and an intuitive approach. *J Clin Pathol* 1999; 52: 283-290.
294. Pecciarini L, Giulia Cangi M, Doglioni C. Identifying the primary sites of metastatic carcinoma: the increasing role of Immunohistochemistry. *Curr Diagn Pathol* 2001; 7: 168-175.
295. Hammar SP. Metastatic adenocarcinoma of unknown primary origin. *Hum Pathol* 1998; 29: 1393-1402.
296. Perry A, Parisi JE, Kurtin PJ. Metastatic adenocarcinoma to the brain: an immunohistochemical approach. *Hum Pathol* 1997; 28: 938-943
297. Lagendijk JH, Mullink H, Van Diest PJ, Meijer GA, Meijer A.
Tracing the origin of adenocarcinomas with unknown primary using immunohistochemistry: differential diagnosis between colonic and ovarian carcinomas as primary sites. *Hum Pathol* 1998;29:491-497
298. Brown RW, Campagna LB, Dunn JK, Cagle FT. Immunohistochemical identification of tumor markers in metastatic adenocarcinoma. A diagnostic adjunct in the determination of primary site. *Am J Clin Pathol* 1997; 107: 12-19.
299. Ellis IO, Hitchcock A. Tumour marker immunoreactivity in adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 1988; 41: 1064-1067.
300. Torenbeek R, Lagendijk Jh, Van Diest Pj, *et al.* Value of a panel of antibodies to identify the primary origin of adenocarcinomas presenting as a bladder carcinoma. *Histopathology* 1998;32:20-27
301. Tot T. Cytokeratins 20 and 7 as biomarkers: usefulness in discriminating primary from metastatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 2002; 38: 758-763.



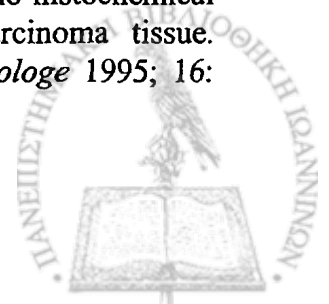
302. Tot T. Adenocarcinomas metastatic to the liver the value of cytokeratins 20 and 7 in the search for unknown primary tumors. *Cancer* 1999; 85: 171-177.
303. Zamecnik J, Kodet R. Value of thyroid transcription factor- 1 and surfactant apoprotein A in the differential diagnosis of pulmonary carcinomas: a study of 109 cases. *Virchows Arch* 2002; 440:353-361.
304. Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 303-310.
305. Moskaluk CA. Zhang H, Powell SM, *et al.* Cdx2 protein expression in normal and malignant human tissues: an immunohistochemical survey using tissue microarrays. *Mod Pathol* 2003; 16: 913-919.
306. Ordonez NG. Application of mesothelin immunostaining in tumor diagnosis, *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1418-1428.
307. Kaufmann O, Dietel M. Thyroid transcription factor-1 is the superior immunohistochemical marker for pulmonary adenocarcinomas and large cell carcinomas compared to surfactant proteins A and B. *Histopathology* 2000; 36: 8-16.
308. Kaufmann O, Deidesheimer T, Muehlenberg M, Deicfce P, Dietto M. Immunohistochemical differentiation of metastatic breast carcinomas from metastatic adenocarcinomas of other common primary sites. *Histopathology* 1996; 29: 233-240.
309. Frierson HF Jr, Moskaluk CA. Powell SM, *et al.* Large-scale molecular and tissue microarray analysis of mesothelin expression in common human carcinomas. *Hum Pathol* 2003; 34: 605-609.
310. Wick MR, Lillemoe TJ, Copland GT, *et al.* Gross cystic disease fluid protein-15 as a marker for breast cancer immunohistochemical analysis of 690 human neoplasms and comparison with alpha-lactalbumin. *Hum Pathol* 1989; 20: 281-287.
311. Loy TS, Quesenberry JT, Sharp SC. Distribution of CA 125 in adenocarcinomas. An immunohistochemical study of 481 cases. *Am J Clin Pathol* 1992; 98: 175-179.
312. Chu P, Wu E, Weiss LM. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol* 2000; 13: 962-972.
313. Park SY, Kim HS, Hong EK, Kim WIL Expression of cytokeratins 7 and 20 in primary carcinomas of the stomach and colorectum and their value in the differential diagnosis of metastatic carcinomas to the ovary. *Hum Pathol* 2002; 33: 1078-1085.



314. Stenhouse G, Fyfe N, King G, Chapman A, Kerr KM. Thyroid transcription factor 1 in pulmonary adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2004; 57: 383-387.
315. Machado JC, Nogueira AM, Cameiro F, Reis CA, Sobrinho-Simoes M. Gastric carcinoma exhibits distinct types of cell differentiation: an immunohistochemical study of trefoil peptides (TFF1 and TFF2) and mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6). *J Pathol* 2000; 190: 437-443.
316. Jobsis AC, De Vries GP, Meijer AE, Ploem JS. The immunohistochemical detection of prostatic acid phosphatase: its possibilities and limitations in tumour histochemistry. *Histochem J* 1981; 13: 961-973.
317. Haines AM, Larkin SE, Richardson AP, Stirling RW, Hcyder-man E. A novel hybridoma antibody (PASE/4LJ) to human pro-static acid phosphatase suitable for immunohistochemistry. *Br J 100. Cancer* 1989; 60: 887-892.
318. Ohshio G, Ogawa K, Kudo H, *et al.* Immunohistochemical studies on the localization of cancer associated antigens DU-PAN-2 and CA19-9 in carcinomas of the digestive tract. *J Gastroenterol. Hepatol* 1990; 5: 25-31.
319. Taguchi T, Kijima 11, Mitomi T, Osamura RY. Immunohisto-chemical study of colorectal adenocarcinomas and adenomas with antibodies against carcinoembryonic antigen (CEA), CA19-9 keratin, alpha-tubulin and secretory component (SC). *Gastroenterol Jpn* 1991; 26: 294-302.
320. Yamaguchi K, Enjoji M, Tsuneyoshi M. Pancreatoduodenal carcinoma: a clinicopathologic study of 304 patients and immunohistochemical observation for CEA and CA19-9. *J Surg Oncol* 1991; 47: 148-154.
321. Mizutani Y, Nakajima T, Morinaga S, *et al.* Immunohistochemical localization of pulmonary surfactant apoproteins in various lung tumors. Special reference to nonmucus producing lung adenocarcinomas. *Cancer* 1988; 61: 532-537.
322. Nicholson AG, McCormick CJ, Shimosato Y, Butcher DN, Sheppard MN. The value of PE-10, a monoclonal antibody against pulmonary surfactant, in distinguishing primary and 106 metastatic lung tumours. *Histopathology* 1995; 27: 57-60.
323. Arends JW, Verstynen C, Bosnian FT, Hilgers J, Steplewski 7. Distribution of monoclonal antibody-defined monosialoganglioside in normal and cancerous human tissues: an immunoperoxidase study. *Hybridoma* 1983; 2: 219-229.
324. Magnani JL, Nilsson B, Brockhaus M, *et al.* A monoclonal antibody-defined antigen associated with gastrointestinal cancer is a ganglioside containing sialylated lacto-N-fucopentaose II. *J Biol Chem* 1982; 257: 14365-14369.
325. Atkinson BF, Ernst CS, Herlyn M, *et al.* Gastrointestinal cancer-associated antigen in immunoperoxidase assay. *Cancer Res* 1982; 42: 4820-4823.



326. Walker RA, Day SJ. Expression of the antigen detected by the monoclonal antibody CA 19.9 in human breast tissues. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1986; 409: 375-383.
327. Neunteufel W, Breiteneker G. Tissue expression of CA 175 in benign and malignant lesions of ovary and Fallopian tube: a comparison with CA 19-9 and CEA. *Gynecol Oncol* 1989; 32: 297-302.
328. Almeida R, Silva E, Santos-Silva F. *et al.* Expression of intestine-specific transcription factors, CDX1 and CDX2, in intestinal metaplasia and gastric carcinomas. *J Pathol* 2003; 199: 36-40.
329. Satoh F, Umemura S, Osamura RY. Immunohistochemical analysis of GCDFP-15 and GCDFP-24 in mammary and nonmammary tissue. *Breast Cancer* 2000; 7: 49-55.
330. Mazoujian G, Pinkus GS, Davis S, Haagensen DE Jr. Immuno-histochemistry of a gross cystic disease fluid protein (GCDFP-15) of the breast. A marker of apocrine epithelium and breast carcinomas with apocrine features. *Am J Pathol* 1983; 121: 105-112.
331. Miettinen M, Sarlomo-Rikala M. Expression of calretinin, thrombomodulin, keratin 5, and mesothelin in lung carcinomas of different types: an immunohistochemical analysis of 596 tumors in comparison with epithelioid mesotheliomas of the pleura. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 150-158.
332. Argani P, Lacobuzio-Donahue C, Ryu B, *et al.* Mesothelin is overexpressed in the vast majority of ductal adenocarcinomas of the pancreas: identification of a new pancreatic cancer marker by serial analysis of gene expression (SAGE). *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3862-3868.
333. Leung WK, Yn J, Chan FK, *et al.* Expression of trefoil peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) in gastric carcinomas, intestinal metaplasia, and non-neoplastic gastric tissues. *J Pathol* 2002; 197: 587-588.
334. Tan D, Li Q, Deeb G, *et al.* Thyroid transcription factor-1 expression prevalence and its clinical implications in non-small cell lung cancer a high-throughput tissue microarray and immunohistochemistry study. *Hum Pathol* 2003; 34: 597-604.
335. Sagol O, Tuna B, Coker A, *et al.* Immunohistochemical detection of pS2 protein and heat shock protein-70 in pancreatic adenocarcinomas. Relationship with disease extent and patient survival. *Pathol Res Pract* 2002; 198: 77-84.
336. Ahr A, Scharl A, Gohring UJ, Crombach G, Stoffl M. Immuno-histochemical detection of pS2 protein in paraffin sections of breast carcinoma tissue. Comparison with results of an immuno-radiometry assay. *Pathologe* 1995; 16: 278-284.



337. Soubeyran I, Wafflart J, Bonichon F, *et al.* Immunohistochemical determination of pS2 in invasive breast carcinomas: a study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 34: 119-128.
338. Pallud C, Le Doussal V, Pichon MF, *et al.* Immunohistochemistry of pS2 in normal human breast and in various histological forms of breast tumours. *Histopathology* 1993; 23: 249-256.
339. Luqmani YA, Ryall G, Shousha S, Coombes RC. An immunohistochemical survey of pS2 expression in human epithelial cancers. *Int J Cancer* 1992; 50: 302-304.
340. Dennis JL, Vass K, Wit EC, Keith N, Oien KA. Identification from public data of molecular markers of adenocarcinoma characteristic of the site of origin. *Cancer Res* 2002;62:5999-6005.
341. Su AI, Welsh JB, Sapinoso LM, *et al.* Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures. *Cancer Res* 2001;61:7388-93.
342. Bloom G, Yang IV, Boulware D, *et al.* Multi-platform, multi-site, microarray-based human tumour classification. *Am J Pathol* 2004;164:9-16.
343. Tothill RW, Kowalczyk A, Rischin D, Bousioutas A, Haviv I, *et al.* An expression-based site of origin diagnostic method designed for clinical application to cancer of unknown origin. *Cancer Res* 2005;65:4031-40.
344. Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, Mukherjee S, Yeang CH, *et al.* Multiclass cancer diagnosis using tumour gene expression signatures. *PNAS* 2001;98:15149-154.
345. Ma XJ, Patel R, Wang X, Salunga R, Murage J, *et al.* Molecular classification of human cancers using a 92-gene Real-Time quantitative polymerase chain reaction assay. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:465-473.



... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

