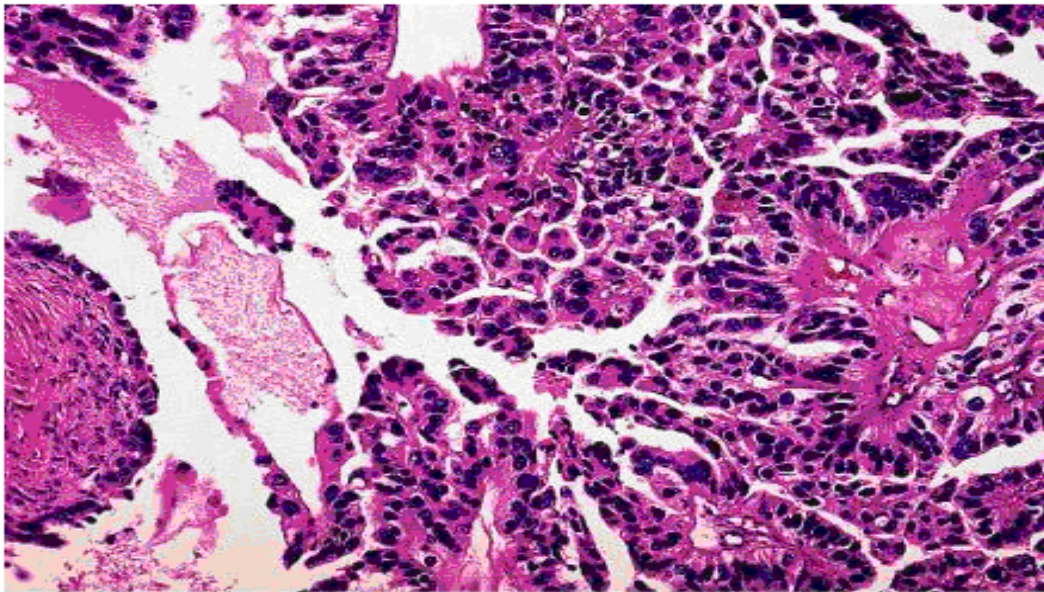


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

***ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ
ΤΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ EGFR ΣΕ
ΑΡΧΕΙΑΚΟ ΥΛΙΚΟ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΩΟΘΗΚΩΝ***



ΠΑΠΠΑ ΝΙΚΟΛΕΤΑ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ – ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ -ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2010

Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής – Μοριακής Ιστοπαθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κουκούλης Γεώργιος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- **Σαμαρά Μαρία**, Λέκτορας Παθολογικής Ανατομικής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **Μπαλατσός Νικόλαος**, Λέκτορας Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **Λιαδάκη Καλλιόπη**, Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής, κύριο Κουκούλη Γεώργιο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό του καθώς και για την συμπαράστασή του σε κάθε στάδιο της εργασίας μου, την κυρία Σαμαρά Μαρία, για όλα όσα μου δίδαξε καθώς και για την καθοδήγησή σε όλη την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας, την κυρία Λιαδάκη Καλλιόπη και τον κύριο Μπαλατσό Νικόλαο ως μέλη της τριμελούς επιτροπής καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής - Μοριακής Ιστοπαθολογίας για την υποστήριξή τους και την φιλική τους διάθεση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.Περίληψη	4
1.Summary	5
1.Εισαγωγή.....	6
- 1.1 Γενικά.....	6
- 1.2 Ορμόνες Ωοθηκών	8
- 1.3 Παθολογία της ωοθήκης	10
- 1.4 Καρκινογένεση.....	16
- 1.5 Επιδημιολογία και παθογένεια του καρκίνου ωοθήκης.....	20
- 1.6 Πιθανές αιτίες που οδηγούν σε επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών.....	21
- 1.7 Προτεινόμενο μοντέλο καρκινογένεσης της ωοθήκης	22
- 1.8 Θεραπεία καρκίνου ωοθήκης.....	24
- 1.9 Το γονίδιο του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR)	26
- 1.10 Αναστολείς EGFR	32
- 1.11 Το γονίδιο K-RAS	33
2.Σκοπός μελέτης.....	37
3.Πειραματικό μέρος	38
- 3.1 Υλικό μελέτης.....	38
- 3.2 Μεθοδολογία.....	38
- Α. Επιλογή υλικού	38
- Β. Απομόνωση γενωμικού DNA	38
- Γ. Έλεγχος ποσότητας-εκτίμηση ποσότητας γενωμικού DNA	41
- Δ. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης(PCR)	43
- Ε. Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων με χρήση περιοριστικών ενζύμων- Πολυμορφισμοί μεγέθους περιοριστικών ενζύμων (RFLPs)	55
- ΣΤ. Ανάλυση πρωτοταγούς αλληλουχίας (Sequencing)	58
- Ζ. Αποτελέσματα.....	60
4. Συζήτηση.....	68
5. Βιβλιογραφία.....	71

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι επιθηλιακοί όγκοι αποτελούν τον πιο κοινό τύπο καρκίνου των ωοθηκών. Διακρίνονται σε 2 κατηγορίες, τον τύπο I (low-grade) και τύπο II (high-grade). Ο πιο κοινός τύπος καρκίνου των ωοθηκών είναι ο ορώδης. Υπάρχουν διακριτές μοριακές αλλαγές που διακρίνουν τους δύο τύπους καρκινώματος. Οι πιο σημαντικές είναι οι μεταλλάξεις που πραγματοποιούνται στο πρώτο-ογκογονίδιο EGFR καθώς και στο KRAS ογκογονίδιο. Το μονοπάτι EGFR → RAS → RAF → MEK → ERK → MAPK, είναι σημαντικό για την μετάδοση σημάτων ανάπτυξης στον πυρήνα των κυττάρων. Μεταλλάξεις στα γονίδια KRAS ή EGFR έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού και οδηγούν σε νεοπλασματικό μετασχηματισμό.

Οι πιο συχνές μεταλλαγές του KRAS σε καρκινώματα ωοθηκών είναι οι σημειακές μεταλλάξεις στο εξόνιο 2 και συγκεκριμένα στα κωδικόνια 12 και 13 σε ποσοστό 3-11%. Το γονίδιο του EGFR παίζει σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι καρκινογένεσης των ωοθηκών τόσο μέσω της υπερέκφρασής του όσο και μέσω των μεταλλαγών που φέρει κυρίως στα εξόνια 18-21. Μελέτες έχουν δείξει ότι το 60-98% των επιθηλιακών καρκίνων των ωοθηκών υπερεκφράζουν το EGFR. Καθώς ο EGFR υπερεκφράζεται καρκινώματα ωοθήκης, το μονοπάτι που ενεργοποιεί έχει γίνει στόχος στην ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων λόγω της ικανότητάς τους να ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να αναστέλλουν την απόπτωση. Οι αναστολείς EGFR χωρίζονται σε 2 κατηγορίες, τους αναστολείς κινάσης τυροσίνης (TKIs) και τα μονοκλωνικά αντί-EGFR αντισώματα (MABs).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 30 δείγματα παραφिनομένου ιστού από ορώδεις και θηλώδεις όγκους ωοθηκών. Τα δείγματα επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν με μοριακές τεχνικές όπου βρέθηκαν τα εξής αποτελέσματα μεταλλαγής: για το γονίδιο EGFR δεν παρατηρήθηκε ύπαρξη μεταλλάξεων στα εξόνια 18-21, ενώ για το γονίδιο K-ras ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις σε ποσοστό 10% σε φυσιολογικές ωοθήκες και 45% σε παθολογικές (ορώδη και βλεννώδη) και συγκεκριμένα το 78% αντιστοιχεί στο κωδικόνιο 12 και το 22% στο κωδικόνιο 13.

SYMMARY

Epithelial ovarian cancer is the most common malignancy of the ovary. It is divided into 2 broad categories, type I (low-grade) and type II (high-grade). The most common type of ovarian cancer is the serous tumor. There are distinct molecular changes that divide those two types of carcinoma. The most important changes are the mutations that take place in EGFR and KRAS genes. The signaling pathway EGFR → RAS → RAF → MEK → ERK → MAPK plays an important role in the signal transduction into the nucleus. Mutations on these genes activate this pathway resulting to neoplastic alteration.

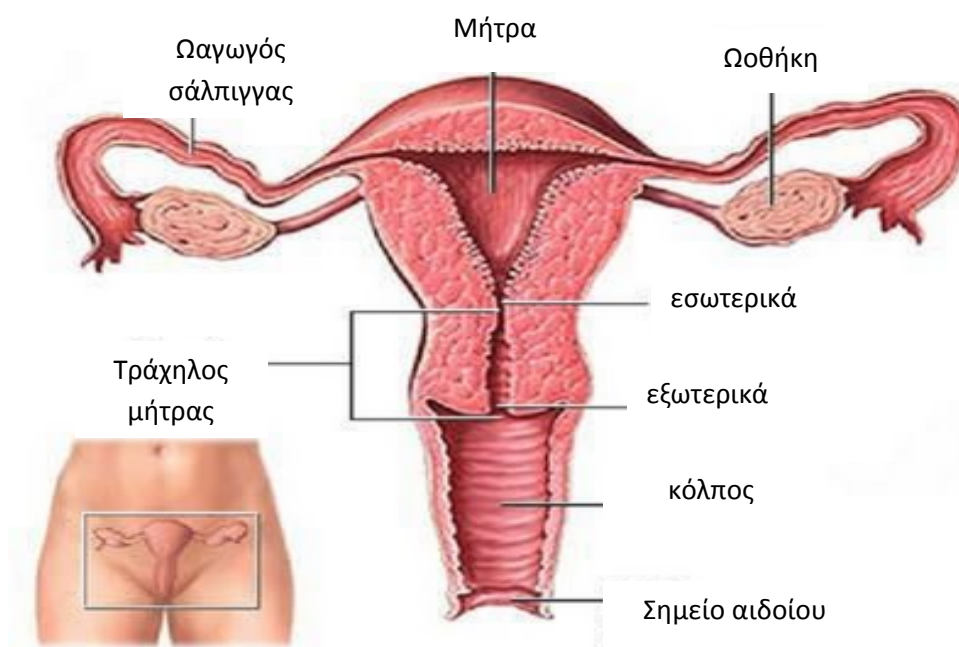
The most common mutations in the KRAS gene are point mutations at the hot spot codons 12 and 13 of exon 2 at a rate of 3-11%. Overexpression of EGFR takes place to the molecular carcinogenesis of ovarian cancer, while mutations in exons 18, 19, 20, 21 of the gene have been observed too. Several studies have shown that 60-98% of ovarian cancer overexpress EGFR. Hence, the pathway that EGFR activates has become target in the development of anti-cancer drugs because of their ability to check cell proliferation and inhibit apoptosis. The EGFR inhibitors consist of 2 tyrosine kinase inhibitors (TKIs) and anti-EGFR monoclonal antibodies (MABs).

In this study, 30 samples of paraffin tissue from serous and mucinous carcinoma have been studied. Those samples were treated and analyzed by molecular biology techniques which showed the following mutation percentages: for the EGFR gene there was no particular mutation observed for the exons 18-21. As for the K-ras gene mutations were detected at a percentage of 10% in normal ovary, and 45% in pathological (serous and mucinous), and more specifically 78% of this percentage was observed in codon 12 and 22% in codon 13.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

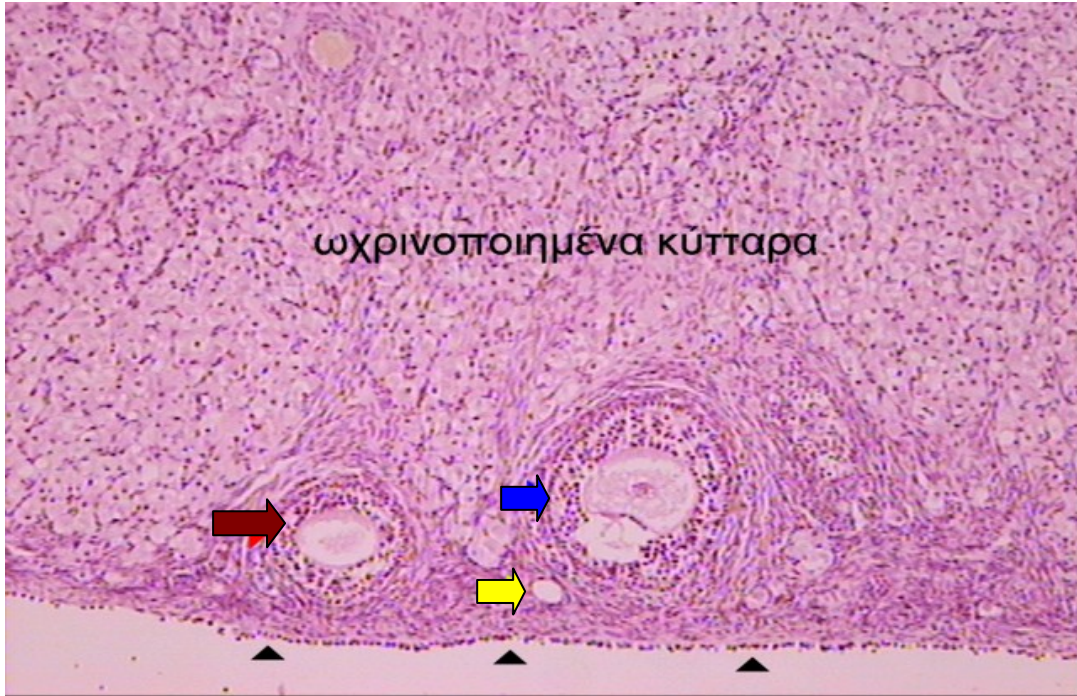
Οι ωθήκες αποτελούν τους γεννητικούς αδένες του γυναικείου σώματος. Είναι όργανο με διπλή λειτουργία καθώς συμβάλλει στην παραγωγή και διατήρηση ωαρίων στο γυναικείο οργανισμό. Επιπλέον παράγει οιστρογόνα και προγεστερόνη, ορμόνες που επηρεάζουν πολλά από τα θηλυκά χαρακτηριστικά καθώς και αναπαραγωγικές λειτουργίες.⁽¹⁾ Η κύρια λειτουργία των ωθηκών είναι η αναπαραγωγή.



ΕΙΚΟΝΑ 1: Απεικόνιση γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος.

Οι ωθήκες έχουν σφαιρικό σχήμα, με διαστάσεις περίπου 3cm x 1,5cm x 1,5cm (το μέγεθος περίπου μιας ελιάς). Εντοπίζονται συμμετρικά και στις δύο πλευρές της μήτρας, σε μια περιοχή που ονομάζεται ωθητικό βοθρίο.⁽¹⁾ Το βοθρίο συνήθως βρίσκεται κάτω από την εξωτερική λαγόνιο αρτηρία και μπροστά από τον ουρητήρα και την εσωτερική λαγόνιο αρτηρία. Κάθε ωθήκη προσκολλάται στον κροσσό της σάλπιγγας. Καλύπτεται από περιτοναϊκό περίβλημα και αποτελείται από το βλαστικό επιθήλιο, τη φλοιώδη και μυελώδη ουσία. Η μυελώδης ουσία είναι γεμάτη

αιμοφόρα αγγεία, ενώ στη φλοιώδη βρίσκονται τα ωοθυλάκια που περιέχουν τα ωάρια.



ΕΙΚΟΝΑ 2: Η ωοθήκη εξωτερικά καλύπτεται από το επιφανειακό επιθήλιο που αποτελείται από μία στιβάδα μικρών κυβοειδών κυττάρων (μαύρα βέλη). Στη φλοιώδη μοίρα της ωοθήκης διακρίνονται ένα άωρο ωοθυλάκιο (κίτρινο βέλος), ένα πολύστιβο πρωτογενές ωοθυλάκιο (κόκκινο βέλος) και ένα δευτερογενές ωοθυλάκιο (μπλε βέλος). Στο άνω μέρος της εικόνας παρατηρούνται πολλά ωχρινοποιημένα κύτταρα. (χρώση αιματοξυλίνη-ηωσίνης, μεγέθυνση X50)

Τα ωοθυλάκια είναι πάρα πολλά (περίπου 70.000), ωστόσο πολύ λίγα (400 - 500) ωριμάζουν ενώ τα υπόλοιπα ατροφούν. Σε κάθε έμμηνο κύκλο ωριμάζει ένα ωοθυλάκιο, έρχεται στην εξωτερική επιφάνεια της ωοθήκης, σπάει και ελευθερώνεται ένα ωάριο, μια διαδικασία που ονομάζεται ωορρηξία.⁽²⁾ Μετά την ωορρηξία ακολουθεί η εκκριτική φάση, όπου οι ωοθήκες προετοιμάζονται να υποστηρίξουν την πιθανή εγκυμοσύνη και το ενδομήτριο γίνεται κατάλληλο για την εμφύτευση, εφόσον γονιμοποιηθεί το ωάριο που απελευθερώθηκε κατά την ωορρηξία. Το ωάριο αυτό φτάνει στη μήτρα μετά από μερικές ημέρες και αν γονιμοποιηθεί αναπτύσσεται, αλλιώς αποβάλλεται.⁽²⁾ Αν δεν υπάρξει γονιμοποίηση και εγκυμοσύνη, το ενδομήτριο αποπίπτει και η γυναίκα έχει περίοδο και ξεκινά έναν νέο

εμμηνορρησιακό κύκλο. Συνεπώς η ωοθήκη αποτελεί ένα όργανο που βρίσκεται σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας σε όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής της γυναίκας.⁽²⁾ Παρόλα αυτά σε περίπτωση όπου η μία ωοθήκη είναι απύσχα ή δυσλειτουργεί τότε η άλλη ωοθήκη συνεχίζει να παράγει ωάρια για απελευθέρωση.

Ως ενδοκρινής αδένας η ωοθήκη έχει πολύ μεγάλη σημασία στη ρύθμιση των ορμονικών λειτουργιών του γυναικείου οργανισμού. Η λειτουργία των ωοθηκών συντονίζεται από τον υποθάλαμο και την υπόφυση, που βρίσκονται στον εγκέφαλο, μέσω άλλων ορμονών, οι οποίες συντίθενται στην υπόφυση και φτάνουν μέχρι τις ωοθήκες. Άρα, και η αναπαραγωγική λειτουργία ελέγχεται κεντρικά από τον εγκέφαλο, σε μεγάλο βαθμό.

Οι δύο λειτουργίες που αναφέρθηκαν παραπάνω, η αναπαραγωγική και η ενδοκρινής, δεν είναι ανεξάρτητες αλλά συνδέονται άμεσα μεταξύ τους. Οι ωοθήκες λειτουργούν ως ενδοκρινείς αδένες υπό την επίδραση ορμονών της υπόφυσης, της θυλακιοτρόπου (FSH) και της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) και παράγουν κυρίως οιστρογόνα.⁽³⁾ Παράλληλα, η ωοθήκη είναι και δεξαμενή ωοθυλακίων, τα οποία βρίσκονται σε διάφορα στάδια ωρίμανσης (αρχέγονα, πρωτογενή, δευτερογενή).

1.2 Ορμόνες ωοθηκών

Μια από τις λειτουργίες της ωοθήκης είναι η παραγωγή ορμονών. Οι βασικότερες ορμόνες που παράγονται είναι τα οιστρογόνα, η προγεστερόνη καθώς επίσης και λίγα ανδρογόνα.

•Οιστρογόνα: Πρόκειται για μια ομάδα στεροειδών χημικών ενώσεων, γνωστά για τον ρόλο τους στον οιστρογονικό κύκλο, που λειτουργούν ως οι κύριες γυναικείες ορμόνες. Τα τρία κύρια φυσικά οιστρογόνα είναι η οιστραδιόλη, η οιστριόλη και η οιστρόνη.⁽²⁾ Παράγονται κυρίως από πρωτογενή ωοθυλάκια κατά την διάρκεια της ωρίμανσης τους, το ωχρό σωματίο, και τον πλακούντα. Η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH) και η

ωχρινοτρόπος ορμόνη (LH) διεγείρουν την παραγωγή οιστρογόνου στις ωοθήκες. Σε μικρότερες ποσότητες, οιστρογόνο παράγεται σε ιστούς όπως το ήπαρ, τα επινεφρίδια και ο μαστός.⁽²⁾ Η βιοσύνθεση του οιστρογόνου αρχίζει στα κύτταρα του ωοθυλακίου με τη σύνθεση της ανδροστενδιόνης από τη χοληστερόλη. Η ανδροστενδιόνη είναι ουσία με μέτρια ανδρογενή δραστηριότητα. Περνά τον βασικό υμένα και μπαίνει στα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας της ωοθήκης, όπου μετατρέπεται σε οιστρόνη και οιστραδιόλη, είτε κατευθείαν είτε μέσω της τεστοστερόνης.

•Προγεστερόνη: Είναι ορμόνη που παράγεται φυσιολογικά στο σώμα για να διασφαλίσει την δημιουργία μιας παχιάς στιβάδας της μήτρας (ενδομήτριο), που διευκολύνει την εμφύτευση του εμβρύου στα τοιχώματά της κατά τις πρώτες ημέρες της εγκυμοσύνης και την ανάπτυξή του. Εάν δεν υπάρχει επαρκής ποσότητα προγεστερόνης κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της εγκυμοσύνης, το ενδομήτριο στερείται βασικών χαρακτηριστικών που επιτρέπουν την εμφύτευση του εμβρύου με συνέπεια το έμβρυο να μην μπορεί να επιζήσει. Το πρόβλημα αυτό αποκαλείται ανεπάρκεια ωχρινικής φάσης (ωχροό σωματίο). Η ανεπάρκεια ωχρινικής φάσης είναι αποτέλεσμα της ανεπαρκούς παραγωγής της προγεστερόνης από τις ωοθήκες κατά τη διάρκεια του δεύτερου μισού του εμμηνορρυσιακού κύκλου.⁽¹⁾ Οι ωοθήκες συνεχίζουν να παράγουν προγεστερόνη κατά τη διάρκεια των πρώτων 8-10 εβδομάδων της εγκυμοσύνης. Μετά από αυτό το διάστημα των 8-10 εβδομάδων, ο πλακούντας γίνεται πλέον η κύρια πηγή παραγωγής προγεστερόνης και οι ωοθηκικές ορμόνες δεν παίζουν τόσο σημαντικό ρόλο.

1.3 Παθολογία της ωοθήκης

Είδαμε τη δομή της ωοθήκης καθώς επίσης και τον ρόλο που αυτή επιτελεί σε μία από τις βασικότερες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού σε φυσιολογικές συνθήκες. Κάποια δυσλειτουργία του οργάνου μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις με αποτέλεσμα ήπιες ή σοβαρότερες βλάβες.

Μερικές παθολογικές καταστάσεις περιγράφονται παρακάτω:

A. Φλεγμονώδεις παθήσεις

- **Κοινή φλεγμονή:** Αυτή συνήθως συνυπάρχει με φλεγμονή των σαλπίγγων. Σπάνια είναι ξανθοκοκκιωματώδης⁽⁴⁾
- **Αυτοάνοση ωοθηκίτιδα:** Χαρακτηρίζεται από λεμφοκυτταρικές και πλασματοκυτταρικές φλεγμονώδεις διηθήσεις κυρίως γύρω από τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια. Συνήθως συνδυάζεται με την αυτοάνοση νόσο του Addison. Προκαλεί πρωτοπαθή ωοθηκική ανεπάρκεια και αμηνόρροια.⁽⁴⁾

B. Μη νεοπλασματικές παθήσεις

- **Κύστεις:** Αυτές διακρίνονται σε εξωθητικές και σε ωοθηκικές. Οι πρώτες περιλαμβάνουν τις κύστεις Morgani και τις περιωθητικές.⁽⁴⁾ Οι ωοθηκικές κύστεις είναι οι εξής:

α) Έγκλειστες κύστεις: Είναι συχνές στις ηλικιωμένες γυναίκες και δεν έχουν κλινική σημασία. Περιβάλλονται από κυβοειδές επιθήλιο.⁽⁴⁾

β) Θυλακικές και ωχρινικές κύστεις: Θεωρούνται φυσιολογικές παραλλαγές. Πρόκειται για ακίνδυνες κύστεις και προέρχονται από θυλάκια τα οποία έχουν υποστεί ρήξη. Τέτοιες κύστεις είναι συχνά πολλαπλές, συνήθως μικρές με διάμετρο 1-1,5cm και περιέχουν διαυγές ορώδες υγρό.⁽⁴⁾ Καλύπτονται από κοκκιώδη επενδυτικά ή ωχρινικά κύτταρα και με

την συσσώρευση του υγρού συνήθως προκαλείται ατροφία αυτών των κυττάρων. Μερικές φορές φτάνουν τη διάμετρο των 4-5cm με αποτέλεσμα να γίνονται ψηλαφητές και να προκαλούν έντονους πόνους στην πύελο.⁽⁴⁾

γ) Πολυκυστικές ωοθήκες: Ολιγομηνόρροια, δασυτριχία, παχυσαρκία και ίσως και στειρότητα είναι συμπτώματα που μπορεί να εμφανιστούν εξαιτίας της υπερβολικής παραγωγής οιστρογόνων και ανδρογόνων από πολλαπλά κυστικά θυλάκια στις ωοθήκες. Αυτή η κατάσταση ονομάζεται επίσης σύνδρομο των Stein-Leventhal.⁽⁴⁾

Οι κύριες βιοχημικές ανωμαλίες στις περισσότερες ασθενείς είναι η υπερβολική παραγωγή ανδρογόνων και τα υψηλά επίπεδα ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH), σε αντίθεση με τη θυλακιοτρόπο ορμόνη (FSH) που παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα. Η προέλευση αυτών των αλλοιώσεων είναι ελάχιστα κατανοητή, ωστόσο προτείνεται ότι οι ωοθήκες σε αυτή την κατάσταση παράγουν περίσσεια ανδρογόνων, τα οποία μετατρέπονται στις περιφερικές λιπαποθήκες σε οιστρόνη, και αυτή μέσω του υποθαλάμου αναστέλλει την έκκριση της FSH από την υπόφυση. Η βάση της υπερβολικής αυτής έκκρισης δεν είναι γνωστή.

- **Φλοιώδης στρωματική υπερπλασία:** Οι ωοθήκες είναι δυνατόν να έχουν κανονικό μέγεθος ή να είναι μεγαλύτερες με οζώδη επιφάνεια. Με κατάλληλες χρώσεις αποκαλύπτονται άφθονα σταγονίδια λιποειδών που αποδίδονται σε στεροειδή. Τα κύτταρα αντιστοιχούν σε κύτταρα θήκης των ωοθυλακίων και θεωρούνται δραστικά όσον αφορά στην παραγωγή ορμονών.⁽⁴⁾

- **Ενδομητρίωση:** Οι ωοθήκες αποτελούν τη συνηθέστερη θέση εμφάνιση της ενδομητρίωσης. Παρατηρούνται συχνά αιμορραγίες ενώ άλλοτε παρατηρείται πλήρης κυστική εκφύλιση. Οι εστίες αυτές μπορούν να αποτελέσουν θέσεις ανάπτυξης αδενωματώδους υπερπλασίας και ενδομητριοειδούς καρκινώματος.⁽⁴⁾

Γ. Νεοπλάσματα ωοθηκών

Ο καρκίνος των ωοθηκών, αν και είναι ο τρίτος σε συχνότητα μεταξύ των καρκίνων του γεννητικού συστήματος των γυναικών, είναι ο πιο θανατηφόρος. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι ωοθήκες είναι λιγότερο προσπελάσιμες και δεν έχουν άμεση διέξοδο προς τα έξω για να δώσουν πρώιμα συμπτώματα. Ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου αυξάνεται με την ηλικία. Το υψηλότερο ποσοστό των περιπτώσεων έχουν διαγνωσθεί σε γυναίκες ηλικίας 50-59 ετών.⁽⁵⁾ Περίπου το 65% των γυναικών με καρκίνο ωοθηκών πεθαίνουν μέσα σε 5 χρόνια από την διάγνωση. Σε πρώιμο στάδιο είναι ασυμπτωματικός, ενώ και σε προχωρημένο στάδιο οι ενδείξεις δεν είναι σαφείς. Δεν υπάρχουν αποτελεσματικοί δείκτες που να μπορούν να εξασφαλίζουν την διάγνωση της ασθένειας.⁽⁵⁾

- **Όγκοι ωοθήκης:** Συνιστούν μια εκπληκτική ποικιλία παθήσεων η οποία αποδίδεται στους τρεις τύπους κυττάρων που απαρτίζουν τη φυσιολογική ωοθήκη: το πολυδύναμο επιθήλιο που καλύπτει την επιφάνεια (εμβρυικό), τα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα και τα πολυδύναμα βλαστικά γεννητικά στρωματικά κύτταρα.⁽⁴⁾ Καθένας από αυτούς τους τύπους κυττάρων προκαλεί μια ποικιλία όγκων. Τα νεοπλάσματα επιθηλιακής προέλευσης συνιστούν την πλειονότητα όλων των πρωτοπαθών όγκων των ωοθηκών και οι κακοήθεις μορφές τους αποτελούν το 90% όλων των καρκίνων της ωοθήκης. Οι όγκοι από βλαστικά κύτταρα και βλαστικά γεννητικά στρωματικά κύτταρα είναι λιγότερο συχνόι και, αν και συνιστούν το 15-20% όλων των όγκων, είναι υπεύθυνοι για λιγότερο από 10% των καρκίνων της ωοθήκης.

- **Επιφανειακοί επιθηλιακοί – στρωματικοί όγκοι:** Αποτελούν την πλειοψηφία των κακοήθων όγκων ωοθήκης στις γυναίκες. Ταξινομούνται σε διακριτές. Προέρχονται από το εμβρυικό επιθήλιο και μπορεί να είναι είτε επιθηλιακοί (ορώδεις, βλεννώδεις όγκοι) ή να έχουν διακριτή σύσταση στρώματος (κυσταδένωμα, όγκος Brenner).⁽⁴⁾ Αν και τα νεοπλάσματα διαιρούνται σε καλοήθη και κακοήθη, οι επιφανειακοί επιθηλιακοί όγκοι έχουν και μια ενδιάμεση κατηγορία, την επονομαζόμενη όγκοι χαμηλού

κακοήθους δυναμικού. Επομένως, οι κύριες κατηγορίες όγκου συνοψίζονται ως εξής :

» **Ορώδεις όγκοι**: Είναι οι συχνότεροι από τους όγκους ωοθήκης και απαντώνται στην ηλικία 30-40 ετών. Μπορεί να είναι συμπαγείς ή κυστικοί και είναι γνωστοί ως κυσταδενώματα ή κυσταδενοκαρκινώματα . Σε ποσοστά 60% είναι καλοήθεις, 15% χαμηλού κακοήθους δυναμικού και 25% κακοήθεις.⁽⁴⁾

» **Βλεννώδεις όγκοι**: Διαφέρουν από τους ορώδεις καθώς στο επιθήλιό τους φέρουν κύτταρα που εκκρίνουν βλέννα. Εμφανίζονται σε ασθενείς της ίδιας ηλικίας με τους ορώδεις όγκους αλλά είναι λιγότερο κακοήθεις. Σε ποσοστό 80% αυτών είναι χαμηλού κακοήθους δυναμικού, ενώ το υπόλοιπο 10% είναι κακοήθεις (κυσταδενοκαρκινώματα).⁽⁴⁾

» **Όγκοι Ενδομητριοειδούς**: Είναι συμπαγείς ή κυστικοί όγκοι αλλά μερικές φορές αναπτύσσονται ως μια μάζα στο τοίχωμα μιας ενδομήτριας κύστης. Αν και υπάρχουν καλοήθεις και οριακές μορφές, οι όγκοι τύπου ενδομητριοειδούς είναι συνήθως κακοήθεις. Στο 30% των περιπτώσεων είναι αμφοτερόπλευροι και στο 15-30% των ασθενών αυτών συνυπάρχει καρκίνωμα ενδομητρίου.⁽⁴⁾

» **Κυσταδανοϊνωμα**: Το κυσταδανοϊνωμα αποτελεί παραλλαγή του ορώδους κυσταδενώματος, όπου παρατηρείται μεγαλύτερη έκταση του ινώδους στρώματος που βρίσκεται κάτω από το κυλινδρικό επενδυτικό επιθήλιο. Αυτοί οι όγκοι είναι καλοήθεις και συνήθως μικροί και πολύχρωμοι. Η καρκινωμάτωση εξαλλαγή είναι σπάνια.⁽⁴⁾

» **Όγκος Brenner**: Είναι ασυνήθης ωοθηκικός και συμπαγής όγκος. Μπορεί να προέρχεται από το επιφανειακό ή το ουρογεννητικό επιθήλιο. Σπανιότερα σχηματίζονται ως όζοι μέσα στο τοίχωμα ενός βλεννώδους κυσταδενώματος. Αν και οι περισσότεροι είναι καλοήθεις, έχουν περιγραφεί τόσο κακοήθεις όσο και οριακοί όγκοι.⁽⁴⁾

» **Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα**: Αποτελείται από διαυγή κύτταρα, γεμάτα γλυκογόνο. Προέρχεται από το βλαστικό επιθήλιο της ωοθήκης και

θεωρείται ως παραλλαγή του ενδομητριοειδούς καρκινώματος με το οποίο συχνά συνυπάρχει.⁽⁴⁾

» **Τερατώματα**: Είναι νεοπλάσματα προέλευσης βλαστικού κυττάρου και αποτελούν το 15-20% περίπου των όγκων της ωοθήκης. Εμφανίζονται κατά τις δύο πρώτες δεκαετίες της ζωής και όσο νεότερη είναι η ασθενής τόσο μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα κακοήθειας. Πάνω από το 90% αυτών των νεοπλασμάτων αποτελούν καλοήγη κυστικά ώριμα τερατώματα, τα οποία είναι γνωστά και ως δερμοειδείς κύστεις.⁽⁴⁾ Αυτά τα νεοπλάσματα μερικές φορές προκαλούν στειρότητα ενώ σε ποσοστό περίπου 1% υπάρχει πιθανότητα εξαλλαγής σε κακοήγη όγκο. Σε αντίθεση με τα ώριμα τερατώματα που είναι καλοήγη, τα ανώριμα κακοήγη τερατώματα είναι ογκώδη και κυρίως συμπαγή, ενώ συνυπάρχουν και περιοχές νέκρωσης. Εμφανίζονται σε νεαρή ηλικία με μέσο όρο ηλικίας τα 18 χρόνια.

• **Όγκοι γεννητικών ταινιών-στρώματος ωοθήκης**: Συνιστούν περίπου το 5% των ωοθηκικών νεοπλασμάτων. Στην κατηγορία αυτή συγκαταλέγονται μη εξειδικευμένοι όγκοι, όπως τα ινώματα και τα ινοσαρκώματα καθώς και εξειδικευμένοι, όπως οι κοκκιοκυτταρικοί όγκοι.⁽⁴⁾

» **Ινώματα και ινοσαρκώματα**: Σχετίζονται στενά με το θήκωμα. Οι όγκοι αυτής της κατηγορίας δε διαφέρουν σε τίποτε από τα ινώματα που αναπτύσσονται σε άλλα όργανα του σώματος. Αποτελούνται από ατρακτοειδή κύτταρα που διατάσσονται σε δεσμίδες. Υπάρχει υποστρωμα κολλαγόνου. Μερικοί ινώδεις όγκοι εμφανίζουν αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα και ταξινομούνται ως ινοσαρκώματα. Τα κακοήγη θηκώματα είναι ιστολογικά πανομοιότυπα με τα ινοσαρκώματα. Τα νεοπλάσματα αυτά είναι συνήθως μεγάλου μεγέθους.⁽⁴⁾

» **Κοκκιοκυτταρικοί - θηκωμάτωδεις όγκοι**: Παρουσιάζουν μορφολογική ποικιλία. Σε ποσοστό 18% αποτελούνται από κύτταρα παρόμοια με αυτά της κοκκιώδους στιβάδας των ωοθυλακίων ενώ σε ποσοστό 67% παρουσιάζουν σχεδόν ίση αναλογία κοκκιωδών κυττάρων και κυττάρων θήκης. Στο 15% των περιπτώσεων επικρατούν κύτταρα θήκης επομένως γίνεται λόγος για θηκώματα. Σπάνια είναι κακοήθεις όγκοι.⁽⁴⁾

Οι μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα σχετικά με την καρκινογένεση των ωοθηκών, υποστηρίζουν ότι το καρκίνωμα ξεκινά στην ωοθήκη και επεκτείνεται σε διπλανά όργανα της πυέλου και της κοιλιακής κοιλότητας προτού γίνει η μετάσταση σε κοντινές περιοχές. Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται σταδίου I όταν περιορίζεται στην ωοθήκη, ενώ θεωρείται σταδίου II όταν εξαπλωθεί στην πύελο. Περαιτέρω εξάπλωση του καρκίνου σε κοιλιακά όργανα κατατάσσεται ως στάδιο III ενώ επέκταση πέρα από την κοιλιακή κοιλότητα συνιστά το τελικό στάδιο καρκίνου (στάδιο IV).⁽³⁾ Τελικά, όπως έχει αποδειχτεί, ο καρκίνος των ωοθηκών χωρίζεται σε δύο βασικές κατηγορίες, τα νεοπλάσματα τύπου I και II, τα οποία ακολουθούν διαφορετικά μονοπάτια καρκινογένεσης.⁽⁷⁾

Οι όγκοι **τύπου I** τείνουν να περιορίζονται στο στάδιο I, δηλαδή περιορίζονται συνήθως στην ωοθήκη και αναπτύσσονται αργά. Τείνουν να είναι όγκοι χαμηλού βαθμού κακοήθειας με διακριτές αλλοιώσεις, που εξελίσσονται από κυσταδενώματα σε αδenoϊνώματα.⁽⁸⁾ Οι ορώδεις όγκοι είναι οι πιο κοινοί επιφανειακοί επιθηλιακοί όγκοι. Πιο συγκεκριμένα, το ορώδες καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης ταξινομείται στους όγκους τύπου I ενώ το ορώδες καρκίνωμα στους όγκους τύπου II. Εκτός από τα ορώδη καρκινώματα, οι όγκοι τύπου I περιέχουν βλεννώδη καρκινώματα, ενδομητριοειδή, κακοήθεις όγκους Brenner και διαυγοκυτταρικού τύπου καρκινώματα. Οι όγκοι τύπου I σχετίζονται με διακριτές μοριακές αλλαγές που σπάνια εντοπίζονται στους όγκους τύπου II.⁽⁸⁾ Τα καρκινώματα **τύπου II** συμπεριλαμβάνουν υψηλού βαθμού ορώδη καρκινώματα, καρκινοσαρκώματα και αδιαφοροποίητα καρκινώματα.⁽⁸⁾ Οι όγκοι τύπου II σχεδόν πάντα παρουσιάζουν επιθετική συμπεριφορά, κάνουν μεταστάσεις σε μικρό χρονικό διάστημα και στερούνται πρόδρομων αλλοιώσεων. Μεταξύ των δύο ομάδων υπάρχουν σημαντικές κλινικές, παθολογικές και μοριακές διαφορές.⁽⁸⁾

1.4 Καρκινογένεση

Η καρκινογένεση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα φυσιολογικά κύτταρα μετατρέπονται σε καρκινικά. Φυσιολογικά, η κυτταρική διαφοροποίηση πραγματοποιείται σε όλους τους ιστούς. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού και προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, συνήθως με τη μορφή της απόπτωσης, διατηρείται με αυστηρή ρύθμιση και των δύο διαδικασιών με σκοπό να εξασφαλιστεί η ακεραιότητα των οργάνων και των ιστών. Μεταλλάξεις στο DNA που οδηγούν σε καρκίνο, διαταράσσουν τελείως την παραπάνω ισορροπία. Συνήθως απαιτούνται περισσότερες από μια μεταλλάξεις για να προκληθεί καρκινογένεση.⁽³⁾ Αυτό οδηγεί σε απορρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης, έτσι ο ραγδαίος πολλαπλασιασμός των κυττάρων μπορεί να δημιουργήσει καλοήθεις όγκους που κάποιες φορές μπορεί να μετατραπούν σε κακοήθεις (καρκίνος). Ένας καλοήθης όγκος δεν εξαπλώνεται σε άλλα μέρη του σώματος ενώ ένα κακοήθες νεόπλασμα κάνει μεταστάσεις και αποτελεί κίνδυνο για την ανθρώπινη ζωή.⁽³⁾ Υπάρχει ένας μηχανισμός ρύθμισης των κυτταρικών διαιρέσεων στον οποίο εμπλέκονται εξωκυττάριοι αυξητικοί παράγοντες, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων καθώς και πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος. Ένας σημαντικός αριθμός γονιδίων εμπλέκεται στο μονοπάτι της καρκινογένεσης και ρυθμίζει τη λειτουργία ενός πληθυσμού κυττάρων. Για να μετατραπεί ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό απαιτείται συσσώρευση μεταλλάξεων.⁽³⁾ Τα γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία της καρκινογένεσης διακρίνονται σε 3 βασικές κατηγορίες : ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά και γονίδια επιδιορθωτικών ενζύμων.

» **Ογκογονίδια**: Όλα τα κύτταρα περιέχουν γονίδια τα οποία ονομάζονται πρωτο-ογκογονίδια και τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση.⁽⁹⁾ Όταν μεταλλάσσονται, μετατρέπονται σε ογκογονίδια. Τα ογκογονίδια μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή μιας μη φυσιολογικής πρωτεΐνης. Έτσι, δημιουργείται κίνδυνος για ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Έχουν ανακαλυφθεί περίπου 100 ογκογονίδια

τα οποία είναι ικανά να προκαλέσουν όγκους. Μερικές από τις κατηγορίες των ογκογονιδίων κωδικοποιούν: ⁽⁹⁾

α) **Αυξητικούς παράγοντες** (εξωκυττάριοι): Η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων σχετίζεται με υπερέκφραση αυξητικών παραγόντων όπως ο c-myc (αντιστοιχεί στον PDGF παράγοντα) και ο TGF-α (μέσω σύνδεσης με τον EGFR).⁽⁹⁾

β) **Υποδοχείς αυξητικών παραγόντων** (κυτταρική μεμβράνη): Οι πρωτεΐνες των μεταλλαγμένων υποδοχέων αποδίδουν συνεχή μιτογόνα σήματα στα κύτταρα ενεργοποιώντας μηχανισμούς που μπορεί να επάγουν καρκινογένεση. Τα πιο τεκμηριωμένα παραδείγματα αφορούν την οικογένεια του EGFR.⁽⁹⁾

γ) **Πρωτεΐνες μεταγωγής σημάτων** (κυτταρόπλασμα): Η δράση τους σχετίζεται με υπερέκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν μόρια-μεταφορείς μηνυμάτων στον πυρήνα του κυττάρου. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα γονίδια της οικογένειας RAS.⁽⁹⁾

δ) **Πυρηνικούς παράγοντες μεταγραφής**: Έχει παρατηρηθεί ότι μεταλλάξεις σε γονίδια που ρυθμίζουν την μεταγραφή του DNA σχετίζονται με κακοήθεις εξαλλαγές. Ένα τέτοιο γονίδιο είναι το γονίδιο myc.⁽⁹⁾

ε) **Κυκλίνες και κινάσες που εξαρτώνται από κυκλίνες**: Μεταλλάξεις οι οποίες επιδρούν στην έκφραση των κυκλινών επιτρέπουν στα κύτταρα να μετακινούνται ελεύθερα προς την φάση S του κυτταρικού κύκλου. Αυτό είναι συνηθισμένο κατά την κακοήθη εξαλλαγή. Τα γονίδια των κυκλινών ενισχύονται και υπερεκφράζονται σε πολλά καρκινώματα.

» Τα **ογκοκατασταλτικά γονίδια**: Μια δεύτερη κατηγορία γονιδίων η οποία εμπλέκεται στο μονοπάτι της καρκινογένεσης είναι τα ογκοκατασταλτικά γονίδια.⁽⁹⁾ Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμποδίζουν την ανεξέλεγκτη κυτταρική αύξηση. Οποιαδήποτε μετάλλαξη οδηγεί κατά κανόνα σε έλλειψη ή αδρανοποίησή τους και αυξάνει τις πιθανότητες για

ανάπτυξη καρκίνου. Μερικές από τις κατηγορίες ογκοκατασταλτικών γονιδίων κωδικοποιούν:

α) **Διαλυτούς παράγοντες αναστολείς του πολλαπλασιασμού:** Συνδέονται με υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και αναστέλλουν τη μετάδοση των μηνυμάτων πολλαπλασιασμού.⁽⁹⁾

β) **Παράγοντες που ρυθμίζουν την σύνδεση των κυττάρων:** Σε αυτή την κατηγορία ανήκει το γονίδιο DCC (Deleted in Colorectal Cancer). Απώλεια της σύνδεσης μεταξύ των κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα μεταβολή της φυσιολογικής διαφοροποίησης και επαγωγή πολλαπλασιασμού. Το γονίδιο DCC σχετίζεται με τον καρκίνο του εντέρου.⁽¹⁾ Ενεργοποιείται από το μόριο της νετρίνης-1, το οποίο παράγεται από μια δομή που ονομάζεται πλάκα δαπέδου και επιτρέπει τον προσανατολισμό των νευρικών αξόνων, βοηθά στην ανάπτυξη του ραχιο-κοιλιακού άξονα, του εγκεφάλου και της σπονδυλικής στήλης. Όταν το DCC διεγείρεται από της νετρίνη-1 προωθεί την εξέλιξη του νευρικού άξονα. Ως πιθανό ογκοκατασταλτικό γονίδιο, φυσιολογικά εμποδίζει την κυτταρική ανάπτυξη απουσία νετρίνης.⁽¹⁾ Η εξάλειψή του δε θεωρείται βασική για το σχηματισμό όγκου, αλλά αποτελεί μία από τις πολλές αλλαγές που οδηγούν στην ανάπτυξη του όγκου.

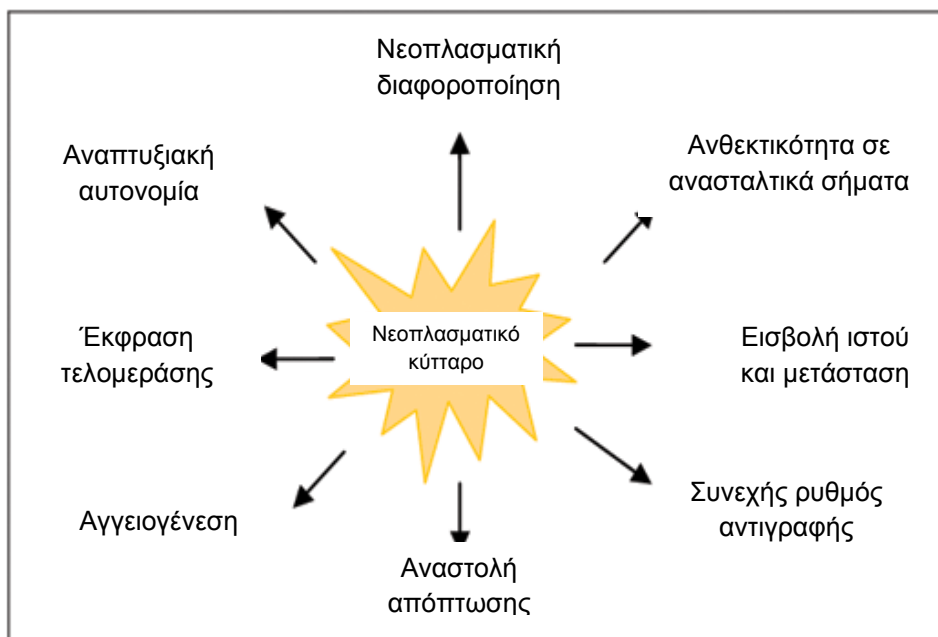
γ) **Παράγοντες της οδού μετάδοσης μηνυμάτων:** Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι πρωτεΐνες GAP (GTPase Activating Proteins) που έχουν ενεργότητα ATPάσης.⁽⁹⁾ Οι πρωτεΐνες GAP είναι μόρια που η βασική τους λειτουργία είναι να ρυθμίζουν αρνητικά τις RAS και τις συγγενικές με τις RAS πρωτεΐνες, μειώνοντας τη διάρκεια ζωής της ενεργούς μορφής τους. Με άλλα λόγια, καταλύουν την υδρόλυση του GTP αυξάνοντας τον ρυθμό υδρόλυσης.⁽⁹⁾

δ) **Παράγοντες που ρυθμίζουν την μεταγραφή και τον κυτταρικό κύκλο:** Τα πιο γνωστά μόρια αυτής της κατηγορίας είναι το γονίδιο Rb του ρετινοβλαστώματος και το γονίδιο p53.⁽⁹⁾

» **Γονίδια που ρυθμίζουν την απόπτωση ή τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο:** Παραδείγματα τέτοιων γονιδίων είναι τα Bcl-2, Bax και Bad. Το Bcl2 έχει κυρίως αντιαποπτωτική δράση. Το γονίδιο Bax αναστέλλει τη δράση του Bcl-2 και επιταχύνει το θάνατο των κυττάρων.⁽³⁾ Τα σχετικά επίπεδα των δύο αυτών γονιδίων φαίνεται ότι ρυθμίζουν την επιβίωση των κυττάρων. Ακόμη, το p53 γονίδιο φαίνεται να επάγει την απόπτωση αυξάνοντας το ρυθμό μεταγραφής του Bax γονιδίου.⁽⁹⁾

» **Γονίδια που συμμετέχουν σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς (repair genes):** Κωδικοποιούν πρωτεΐνες που επιδιορθώνουν τυχόν λάθη που γίνονται κατά την αντιγραφή του DNA. Οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί έχουν μέγιστη σημασία για τη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος, όπως επισημαίνεται από διάφορες κληρονομικές νόσους στις οποίες τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που αφορούν την επισκευή του DNA είναι ελαττωματικές.⁽³⁾ Τα άτομα που γεννιούνται με τέτοιες μεταλλάξεις βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου. Ένα παράδειγμα ασθένειας είναι και το σύνδρομο του κληρονομικού μη πολυποδιακού καρκινώματος του παχέος εντέρου (HNPCC) το οποίο οφείλεται στο MSH-2γονίδιο.⁽³⁾

Συνοπτικά τα χαρακτηριστικά τα οποία παρατηρούνται σε ένα καρκινικό κύτταρο, απεικονίζονται στο παρακάτω διάγραμμα:



ΕΙΚΟΝΑ 3: Χαρακτηριστικά νεοπλασματικού κυττάρου.

1.5 Επιδημιολογία και παθογένεια του καρκίνου ωοθήκης

Η πλειονότητα του καρκίνου των ωοθηκών συμβαίνει σποραδικά ενώ μόνο το 5-10% είναι αποτέλεσμα γενετικής (οικογενειακής) προδιάθεσης. Συμπτώματα όπως πόνοι στην λεκάνη ή την κοιλιά, πρήξιμο της ευρύτερης κοιλιακής περιοχής, συχνουρία, δυσκολία στο φαγητό καθώς και αίσθημα κορεσμού παρατηρούνται σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών.⁽³⁾ Δυστυχώς, στο 68% των ασθενών η διάγνωση της νόσου γίνεται σε προχωρημένο στάδιο (III ή IV) ενώ το ποσοστό επιβίωσης για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 5 ετών είναι μόλις 30%.

Ο καρκίνος των ωοθηκών διακρίνεται από μεγάλη ετερογένεια.⁽³⁾ Αποτελείται από μια ποικίλη ομάδα όγκων, καθένας με διαφορετικά μικροσκοπικά χαρακτηριστικά και διαφορετικό βιολογικό και γενετικό υπόβαθρο. Η ετερογένεια αυτή αντανακλά τα διαφορετικά μοριακά μονοπάτια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση αυτού του οργάνου.

Υπάρχουν στοιχεία για ενδεχόμενη γενετική προέλευση των καρκίνων της ωοθήκης. Οι περισσότερες μελέτες μέχρι τώρα δε δίνουν σαφή

συμπεράσματα. Έχουν παρατηρηθεί κυτταρογενετικές ανωμαλίες όπως τρισωμία 12 και ποικίλες χρωμοσωμικές απώλειες, αφαιρέσεις και μετατοπίσεις. Η ποικιλία αυτών των μεταβολών υποδηλώνει ότι θα πρέπει να είναι δευτερογενή γεγονότα, που εμφανίζονται κατά την καρκινογενετική διαδικασία.⁽³⁾ Άλλα ευρήματα υποστηρίζουν ότι η υπερέκφραση των γονιδίων *myc*, *c-erbB2* και *EGFR* συμβάλλει πιθανά στα τελικά στάδια της ογκογένεσης. Επιπρόσθετα υπάρχουν οικογενή σύνδρομα βασισόμενα σε κληρονομικές μεταλλάξεις της βλαστικής γραμμής. Τα οικογενή σύνδρομα υπολογίζονται σε ποσοστό 3-5% όλων των καρκίνων της ωοθήκης. Σε μερικές περιπτώσεις έχουν ανιχνευθεί μεταλλάξεις στο *BRCA-1* γονίδιο.⁽³⁾ Η κληρονόμηση αυτού του γονιδίου προδιαθέτει την ανάπτυξη τόσο καρκίνου του μαστού όσο και ωοθήκης σε νεαρή ηλικία, ωστόσο ο ρόλος του δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί.

1.6 Πιθανές αιτίες που οδηγούν σε επιθηλιακό καρκίνο ωοθηκών

Υπάρχουν πολλές απόψεις για τις φυσιολογικές διαδικασίες του οργανισμού που αυξάνουν τον κίνδυνο κακοήθους μετασχηματισμού του επιθηλίου της ωοθήκης. Μερικές από τις πιθανές αιτίες πρόκλησης καρκίνου των ωοθηκών είναι οι εξής⁽¹⁰⁾ :

- **Ακατάπαυστη ωορρηξία:** Το επιθήλιο της επιφάνειας της ωοθήκης καταστρέφεται κατά την ωορρηξία και οι μεταγενέστεροι μηχανισμοί επιδιόρθωσης θέτουν τα κύτταρα σε αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν μεταλλάξεις και κακοήθειες. Γυναίκες με ιστορικό πολλαπλών κυήσεων,⁽¹¹⁻¹³⁾ αυξημένη χρονική διάρκεια θηλασμού⁽¹⁴⁾ και χρήση αντισυλληπτικών βρίσκονται σε μειωμένο κίνδυνο.^(11,15)

- **Διέγερση γοναδοτροπίνης:** Πιθανή διέγερση της επιφάνειας του επιθηλίου από τις ορμόνες FSH και LH θέτει πιθανά τα κύτταρα σε αυξημένο ρίσκο ανάπτυξης καρκίνου. Οι FSH, LH, HCG ορμόνες διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό της καρκινικής μάζας και ίσως ενεργοποιούν μία MAP

κινάση.⁽¹⁶⁾ Παράλληλα, η υπερέκφραση της FSH οδηγεί σε απορρύθμιση του EGFR με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η διαδικασία ογκογένεσης.

- Ορμονική διέγερση: Έχει παρατηρηθεί ότι αυξημένες συγκεντρώσεις ανδρογόνων στο μικροπεριβάλλον του όγκου προωθούν την καρκινογένεση, ενώ αντίθετα οι προγεστίνες μειώνουν αυτόν τον κίνδυνο.⁽¹⁷⁾

- Φλεγμονή: Η φλεγμονή συνοδεύει κάθε ωορρηξία με την απελευθέρωση κυτοκινών και την αναδόμηση του ιστού. Ασθενείς με χρόνια χρήση ασπιρίνης, μη στεροειδών και αντιφλεγμονωδών φαρμάκων έχουν μειωμένο ρίσκο εμφάνισης καρκίνου, ενώ αντίθετα ασθενείς που εκτίθενται σε προϊόντα που επιφέρουν φλεγμονή παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης.⁽¹⁸⁾

1.7 Προτεινόμενο μοντέλο καρκινογένεσης της ωοθήκης

Κατά κανόνα, ένα καρκινικό κύτταρο πρέπει να ξεπεράσει πολλούς μηχανισμούς προστασίας για να αναπτυχθεί και να εξελιχθεί σε έναν κλινικά αποδεδειγμένο όγκο. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν το μη ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό, την αναστολή της απόπτωσης, την αγγειογένεση, τη στρωματική διείσδυση, τη διαφοροποίηση και τη μετάσταση σε νέους ιστούς.⁽¹⁹⁾ Μερικά από τα στοιχεία τα οποία αναγνωρίζονται σε κάθε μια από τις παραπάνω διαδικασίες είναι τα ακόλουθα:

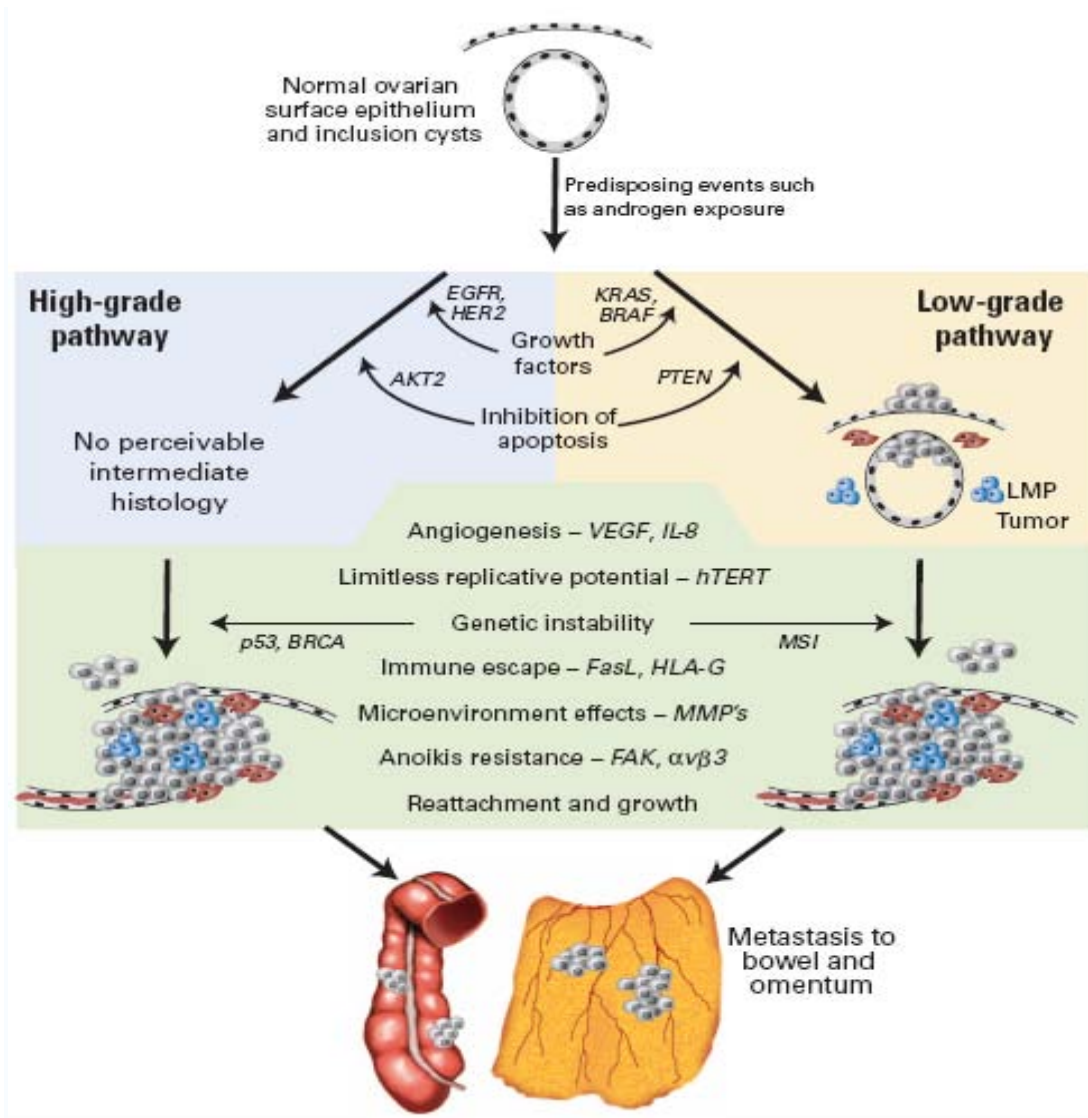
- Αυτονομία ανάπτυξης: Στον καρκίνο των ωοθηκών ένας σημαντικός αριθμός ογκογονιδίων επιτρέπει στα κύτταρα να αναπτύσσονται ανεξάρτητα από τα φυσιολογικά σήματα ανάπτυξης. Ο υποδοχέας EGFR εκφράζεται στην φυσιολογική επιφάνεια του επιθηλίου της ωοθήκης ενώ υπερεκφράζεται στο 35-70% των επιθηλιακών καρκίνων των ωοθηκών.⁽²⁰⁾ Ακόμη, πολλά μονοπάτια ανάπτυξης εμπλέκουν σήματα μέσω της ογκοπρωτεΐνης RAS, μιας G-πρωτεΐνης η οποία προσκολλάται στην

κυτταρική μεμβράνη και ενεργοποιείται από πολλούς υποδοχείς κινάσης τυροσίνης. Η πρωτεΐνη RAS ενεργοποιεί μια σειρά από κινάσες σερίνης/θρεονίνης οι οποίες οδηγούν σε φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων (Erk1, Erk2), οι οποίοι βοηθούν στην έναρξη σημάτων ανάπτυξης μέσω του κυτταρικού κύκλου. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο KRAS είναι κοινές σε αδενοκαρκινώματα και η συχνότητα ποικίλει σε διαφορετικούς ιστολογικούς υποτύπους.^(21,22)

- Αντίσταση σε σήματα αναστολής της ανάπτυξης: Σε πρώιμα μετασχηματισμένα κύτταρα, τα ανασταλτικά σήματα πρέπει να ξεπεραστούν. Παρόλο που δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες, λαμβάνοντας υπόψη την σειρά συγκεκριμένων γεγονότων της καρκινογένεσης, θεωρείται ότι διαταραχές στις κυκλίνες που δρουν στον κυτταρικό κύκλο παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση.⁽¹⁰⁾

- Αναστολή απόπτωσης: Ένα ακόμη σημαντικό χαρακτηριστικό του καρκίνου είναι ο μειωμένος ρυθμός απόπτωσης που οδηγεί σε παρατεταμένη επιβίωση του νεοπλασματικού κυττάρου.⁽¹⁰⁾ Ως εκ τούτου, τα καρκινικά κύτταρα διαφοροποιούνται λιγότερο συχνά από τα αντίστοιχα φυσιολογικά, ιδίως στους επιθηλιακούς καρκίνους, όπου τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα υφίστανται ραγδαία αλλαγή. Πολλά μόρια που συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία αλλάζουν στον καρκίνο των ωοθηκών για να αναστείλουν τον κυτταρικό θάνατο, όπως το p53.

- Συνεχής ρυθμός αντιγραφής: Τα φυσιολογικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε καθορισμένο αριθμό προτού επιτευχθεί η γήρανση και ακολουθήσει η απόπτωση. Ο έλεγχος της απόπτωσης βρίσκεται στα τελομερή, στο τέλος των χρωμοσωμάτων, τα οποία αποτελούνται από DNA και πρωτεΐνες.⁽¹⁰⁾ Χωρίς την προστασία που παρέχεται από τα τελομερή, τα χρωμοσώματα που εκτίθενται υφίστανται μαζικές μειώσεις. Τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα διατηρούν το μήκος του τελομερούς με την παραγωγή της τελομεράσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση της τελομεράσης⁽²³⁾ αποτελεί ένα πρώιμο και απαραίτητο γεγονός στη διαδικασία της καρκινογένεσης.



ΕΙΚΟΝΑ 4: Προτεινόμενο μοντέλο καρκινογένεσης της ωθήκης.

1.8 Θεραπεία του καρκίνου ωθήκης

Η κύρια θεραπεία του καρκίνου των ωθηκών είναι η χειρουργική τεχνική, η οποία εξελίσσεται ραγδαία, σε συνδυασμό με τις χημειοθεραπείες. Όσο μικρότερη είναι η έκταση του όγκου τόσο πιο αποτελεσματική είναι και η χημειοθεραπεία. Η ύπαρξη δεικτών που ηγούνται της ανάπτυξης αλλοιώσεων στοχεύει στην πρώιμη ανίχνευση του καρκίνου των ωθηκών. Οι όγκοι τύπου I δεν παρουσιάζουν τις ίδιες προκλήσεις όπως οι όγκοι τύπου II γιατί είναι γενικά εντοπισμένοι και συνήθως εξαπλώνονται πολύ αργά.⁽⁸⁾ Επειδή αναπτύσσονται αργά, οι

θεραπευτικοί παράγοντες που είναι αποτελεσματικοί στους όγκους τύπου II δεν είναι τόσο αποτελεσματικοί στους τύπου I, και ως εκ τούτου είναι απαραίτητες νέες προσεγγίσεις για την θεραπεία τους.

Καινούργιες μοριακά στοχευμένες θεραπείες, που στοχεύουν σε συγκεκριμένα βιολογικά μονοπάτια, που επηρεάζουν την εξέλιξη του καρκίνου αναπτύχθηκαν ως εναλλακτικές μορφές θεραπείας για ασθενείς μη-ανταποκρινόμενους στην υπάρχουσα χημειοθεραπεία. Ο σκοπός της στοχευμένης θεραπείας είναι να αναπτυχθούν αντικαρκινικοί παράγοντες για συγκεκριμένα μόρια-κλειδιά που παίζουν σημαντικό ρόλο στα μονοπάτια της καρκινογένεσης.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν τη μεγαλύτερη υπεροικογένεια συντηρημένων γονιδίων στο ανθρώπινο γονιδίωμα και αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη οικογένεια γονιδίων που εμπλέκονται στον ανθρώπινο καρκίνο.⁽⁸⁾ Απορρύθμιση των πρωτεϊνικών κινασών οδηγεί σε κακοήθεις μεταλλάξεις, και ως εκ τούτου τα γονίδια αυτά μπορεί να συνιστούν πιθανούς στόχους για θεραπευτική προσέγγιση. Σε πολλά καρκινώματα τύπου I υπάρχει ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών, εξαιτίας των μεταλλάξεων που παρατηρούνται στα γονίδια K-ras ή B-raf, που αποτελούν ρυθμιστές των MAP κινασών.⁽⁸⁾

Η υπεροικογένεια EGF αποτελεί έναν ακόμη θεραπευτικό στόχο. Πρόκειται για γονίδια που κωδικοποιούν μόρια-υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης και οι οποίοι εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου επιδρώντας στα μονοπάτια του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης και της αγγειογένεσης. Οι EGFR αναστολείς αποτελούν μια νέα σειρά αντικαρκινικών φαρμάκων που στοχεύει σε συγκεκριμένους μοριακούς δείκτες και εξασφαλίζει αποτελεσματικότερη κατά άτομο θεραπεία.⁽²⁴⁾

1.9 Το γονίδιο του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)

Ο EGFR είναι ένας από τα τέσσερα μέλη της οικογένειας HER (Human Epidermal Receptor).⁽²⁴⁾ Η οικογένεια των γονιδίων EGFR ή αλλιώς ERBB, αποτελείται από 4 δομικά-σχετιζόμενους διαμεμβρανικούς υποδοχείς, τους EGFR, ErbB2, ErbB3 και ErbB4.^(26,27,28) Παίζουν σημαντικό ρόλο στην μοριακή παθογένεση του καρκίνου και αποτελούν θεραπευτικό στόχο σε πολλούς τύπους καρκίνου, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος των ωοθηκών. Τα 4 μόρια είναι υποδοχείς κινάσης τυροσίνης και συνδυαζόμενοι περιέχουν 89 κυτταροπλασματικές τυροσίνες, 40 από τις οποίες αλληλεπιδρούν με μία ή περισσότερες πρωτεΐνες σύνδεσης για ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών όταν αυτά φωσφορυλιωθούν.⁽²⁹⁾ Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης για έναν υποδοχέα ErbB επιτρέποντας την ενεργοποίηση ενός πολύπλοκου και ποικίλου δικτύου σηματοδοτικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Τα μόρια αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την προσκόλληση, την κινητικότητα, τη διείσδυση και την αγγειογένεση. Ως εκ τούτου, η γονιδιακή ενίσχυση, οι γενετικές μεταλλάξεις και ο διαφορετικός ρυθμός μεταγραφής/μετάφρασης έχουν ως αποτέλεσμα την απουσία έκφρασης ή υπερέκφραση του ErbB/EGFR ή την ενεργοποίηση μονοπατιών μεταγωγής σημάτων. Η υπερέκφραση του EGFR σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση και μειωμένη θεραπευτική απόκριση γεγονός που καθιστά αναγκαία την εύρεση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων που στοχεύουν σε συγκεκριμένα μόρια-κλειδιά.

• Δομή και λειτουργία του ErbB υποδοχέα

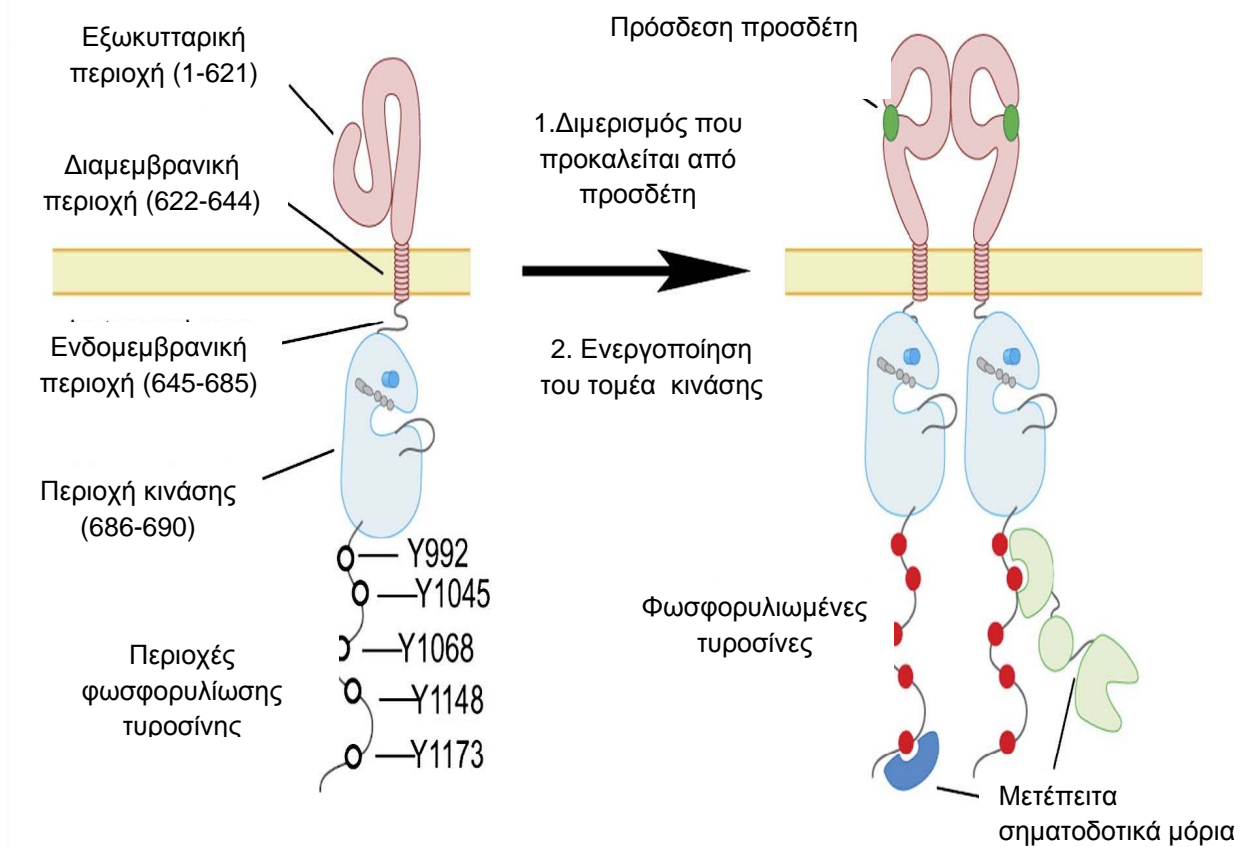
Κάθε υποδοχέας της οικογένειας ErbB έχει κοινή δομή και αποτελείται από τρία τμήματα : ένα εξωκυττάριο (External Cellular Domain, ECD), ένα διαμεμβρανικό τμήμα (Transmembrane Domain, TMD) και ένα ενδοκυττάριο τμήμα (Internal Cellular Domain, ICD).⁽²⁶⁾

Το εξωκυττάριο τμήμα είναι υψηλά γλυκοσυλιωμένο και χωρίζεται σε 4 περιοχές. Οι I και III περιοχές παρέχουν ειδική θέση σύνδεσης του

προσδέτη (ligand). Οι II και IV αποτελούν περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνες, χαρακτηριστικό γνώρισμα των υποδοχέων κινάσης της τυροσίνης.⁽³⁰⁾

Το διαμεμβρανικό τμήμα αποτελείται κυρίως από υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα. Εξασφαλίζει τη συγκράτηση του υποδοχέα μέσα στην κυτταρική μεμβράνη και τη μεταφορά σημάτων από το εξωκυττάριο στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα που ακολουθεί μετά τη σύνδεση του προσδέτη καθώς και για την σταθεροποίηση διμερισμένων συμπλόκων υποδοχέων.^(31,32)

Το ενδοκυττάριο τμήμα χωρίζεται σε τρεις περιοχές: στην JD περιοχή (juxtamembrane), την περιοχή κινάσης τυροσίνης TMD και την καρβοξυτελική ρυθμιστική περιοχή.^(26,33,34) Η JD περιοχή βρίσκεται δίπλα στην TMD και ο ρόλος τους είναι να ρυθμίζουν τη σηματοδότηση του ErbB υποδοχέα με ελάττωση της συγγένειας του προσδέτη, μείωση της δραστηριότητας της κινάσης τυροσίνης και αύξηση της ενδοκύττωσης που ακολουθεί τη σύνδεση του προσδέτη.^(35,36) Επιπλέον, η JD περιοχή συμβάλλει στην εξειδίκευση του υποστρώματος του ErbB υποδοχέα, και έτσι, στην περαιτέρω ενεργοποίηση διακριτών σηματοδοτικών μονοπατιών.^(36,37) Η TKD αποτελεί μια υψηλά συντηρημένη καταλυτική περιοχή στους υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης ErbB. Τέλος, η καρβοξυτελική περιοχή περιέχει κατάλοιπα τυροσίνης που μετατρέπονται σε τρανς-φωσφορυλιωμένες περιοχές και ακολουθεί σύνδεση του προσδέτη και διμερισμό υποδοχέα. Έτσι, ρυθμίζει την δραστηριότητα της κινάσης καθώς και την στρατολόγηση εξωγενών υποστρωμάτων που περιέχουν είτε SH₂ ή PTB(πρωτεϊνικά μοτίβα πρόσδεσης τυροσίνης).^(38,39)



Εικόνα 5: Δομή ErbB υποδοχέα

• Διαλυτές, εναλλακτικές ισομορφές ErbB

Τα φυσιολογικά, καλοήθη κύτταρα συνθέτουν διαλυτές ισομορφές υποδοχέων (sErbBs) που έχουν έλλειψη των διαμεμβρανικών και ενδοκυτταρικών τμημάτων τους και συνθέτουν πρωτεολυτικά κατακερματισμένες ισομορφές που περικλείουν μόνο το διαμεμβρανικό ή το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα.^(40,41) Και οι τέσσερις υποδοχείς έχουν διαλυτές μορφές. Η φυσιολογική εμφάνιση αυτών των ισομορφών καθώς και άλλων εναλλακτικών ισομορφών ErbB παρέχουν ένα ακόμα επίπεδο για την ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού του υποδοχέα EGFR (ErbB). Παράδειγμα για την κατανόηση της λειτουργίας και της πιθανής κλινικής εφαρμογής των διαλυτών ισομορφών των υποδοχέων πιστεύεται ότι αποτελεί ο διαλυτός υποδοχέας του αγγειακού επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (sVEGFR). Μόρια τέτοιου τύπου πιθανολογείται ότι μπορούν να χρησιμεύσουν ως διαγνωστικοί προγνωστικοί δείκτες.⁽⁴²⁾

- Οικογένεια ErbB προσδετών

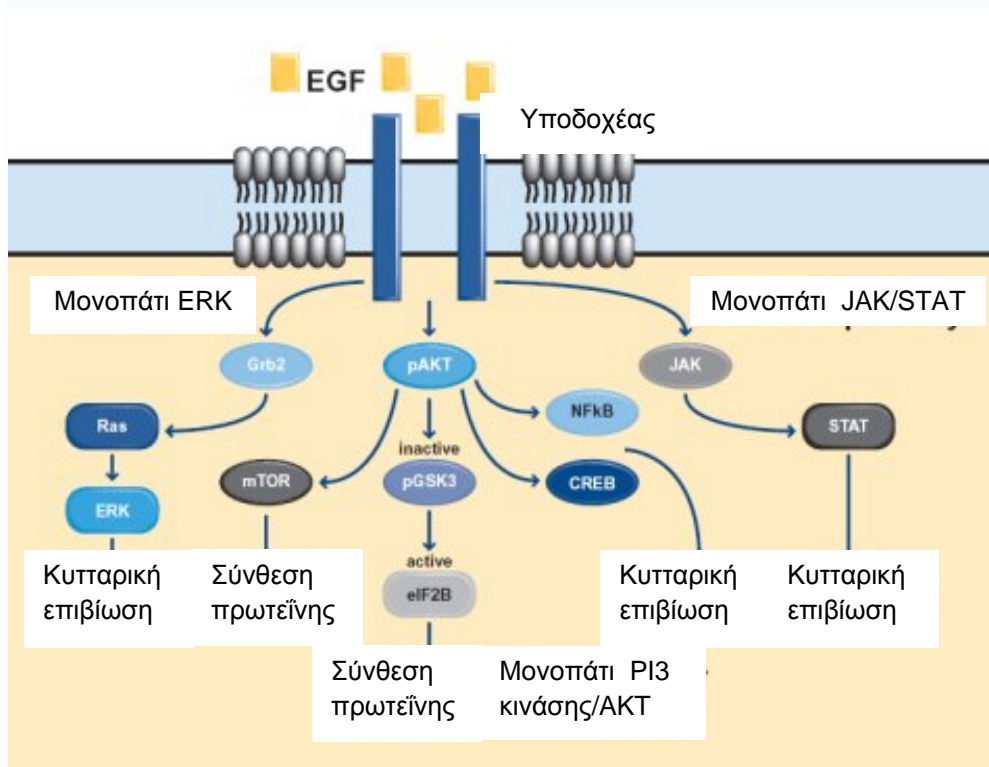
Ταξινομούνται σε ομάδες ανάλογα με την ικανότητα πρόσδεσης και ενεργοποίησης των διαφορετικών υποδοχέων ErbB. Μία ομάδα αφορά σε προσδέτες που προσδένονται αποκλειστικά στον EGFR υποδοχέα και αποτελείται από τον EGF,^(43,48) τον TGF-α (transforming growth factor)^(44,45) και τον AR (AmphiRegulin).^(58,60,65) Μία επιπλέον ομάδα περιλαμβάνει τους EPI (epiregulin), BTC (BeTaCellulin) και HB-EGF (Heparin-Binding EGF) οι οποίοι προσδένονται στους EGFR και ErbB4.

- Σηματοδοτική μεταγωγή ErbB υποδοχέα

Η μεταγωγή του σήματος ξεκινά με σύνδεση του προσδέτη στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δομική αλλαγή του υποδοχέα, και δημιουργία ομοδιμερών ή ετεροδιμερών με άλλα μέλη της οικογένειας ErbB.⁽⁵²⁻⁵⁶⁾ Ο διμερισμός επιτρέπει την φωσφορυλίωση ειδικών περιοχών πλούσιων σε τυροσίνη, διεγείροντας τη δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης. Η εξωγενής φωσφορυλίωση του υποστρώματος οδηγεί σε ενεργοποίηση ενδοκυττάρων μονοπατιών που ρυθμίζουν ποικιλία βιολογικών αποκρίσεων σε ιστούς, καθώς επίσης και μονοπατιών σημαντικών για την κυτταρική διαφοροποίηση και την εμβρυική ανάπτυξη.⁽⁵⁷⁻⁶⁴⁾ Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς ErbB έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν μόρια-υποστρώματα όπως οι RAS-GAP πρωτεΐνες. Κάθε υποδοχέας ErbB είναι ικανός να στρατολογεί ένα συγκεκριμένο υποείδος πρωτεϊνών προσαρμοστών και σηματοδοτικών μορίων, όπως οι MAPK και PI3K/Akt πρωτεΐνες, που στην συνέχεια ενεργοποιούν μεταγενέστερα μόρια και διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κυτταρικά μονοπάτια επιβίωσης.^(58,63)

Πιο συγκεκριμένα, έχουν αναγνωριστεί τρία σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία επηρεάζονται από τον EGFR υποδοχέα. Το πρώτο μονοπάτι αφορά στη μεταγωγή σήματος μέσω των RAS-RAF-MAP κινασών, όπου η φωσφορυλιωμένη μορφή του EGFR υποδοχέα στρατολογεί τον νουκλεοτιδικό παράγοντα ανταλλαγής γουανίνης (GEF) μέσω των πρωτεϊνών GRB2 και SHC, ενεργοποιώντας το γονίδιο Ras και στη

συνέχεια διεγείροντας το Raf και το μονοπάτι των MAP κινασών επηρεάζοντας ως εκ τούτου τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διείσδυση του όγκου και την ικανότητα μετάστασης.⁽⁹⁾ Το δεύτερο μονοπάτι εμπλέκει την PI3K/AKT σηματοδότηση, που ενεργοποιεί σήματα βασικής κυτταρικής επιβίωσης και αναστολής της απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι ο NFκB.⁽⁹⁾ Τέλος, το τρίτο μονοπάτι εμπλέκει την JAK/STAT σηματοδότηση που συμμετέχει στην ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική επιβίωση. Η ενεργοποίηση του EGFR υποδοχέα μπορεί να οδηγήσει σε φωσφορυλίωση των μορίων.⁽⁹⁾



ΕΙΚΟΝΑ 6: Σηματοδοτικό μονοπάτι EGFR.

Οι ErbB υποδοχείς και οι προσδέτες τους ρυθμίζουν πολλαπλές κυτταρικές διαδικασίες κατά την εμβρυονική ανάπτυξη και εκφράζονται σε ποικιλία ιστών επιθηλιακής, μεσεγχυματικής και νευρικής προέλευσης. Έχει παρατηρηθεί ότι ο EGF ανιχνεύεται σε φυσιολογικές ωθήκες στην επιφάνεια του επιθηλίου και όχι στο στρώμα αυτής. Διάφορες μελέτες που έχουν αναλύσει την έκφραση EGFR με ανοσοιστοχημεία έδειξαν ότι σε φυσιολογική ωθήκη ο EGFR υποδοχέας εκφράζεται στην επιφάνεια του

επιθηλίου της ωοθήκης. Ο EGFR ανιχνεύτηκε σε όλα τα στάδια της θυλακιώδους ανάπτυξης. Οι διαλυτές ισομορφές (sErbB) θεωρούνται πιθανοί δείκτες σε μια ποικιλία καρκίνων. Οι συγκεντρώσεις τους όμως μπορεί να αλλάξουν από διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες όπως η ηλικία, η εγκυμοσύνη ή η εμμηνόπαυση, όπως επίσης και από παθολογικές καταστάσεις (καρκίνος ωοθηκών). Οι υποδοχείς EGFR και ErbB2 (HER2) καθώς και πιθανοί μιτογόνοι αυξητικοί παράγοντες, όπως EGF και TGF- α , εκφράζονται κατά προτίμηση σε πολλαπλασιαζόμενους κυτταρικούς τύπους της ωοθήκης, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανά ρυθμίζουν φυσιολογικές λειτουργίες μέσα στην ωοθήκη, και ίσως να επηρεάζουν ή να επηρεάζονται από την γοναδοτροπίνη ή/και την έκκριση στεροειδών ορμονών.

Γεγονότα που συμβάλλουν στην αδρανοποίηση ή υπερέκφραση των υποδοχέων αυτών όπως είναι η γονιδιακή ενίσχυση, η ύπαρξη μεταλλάξεων ή η υπερέκφραση του ίδιου του προσδέτη, ενδέχεται να οδηγούν σε αυξανόμενη κυτταρική ανάπτυξη και μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων. Ωστόσο, η γονιδιακή ενίσχυση και κατ' επέκταση η υπερέκφραση του EGFR υποδοχέα έχουν παρατηρηθεί σε ποικιλία καρκίνων όπως στον καρκίνο της ωοθήκης.

Η υπερέκφραση των ErbB υποδοχέων και των προσδετών τους σχετίζεται με το μετασχηματισμό και την ογκογένεση των επιθηλιακών κυττάρων της επιφάνειας της ωοθήκης, οδηγώντας σε αυξημένη δραστηριότητα της κινάσης τυροσίνης και κατ' επέκταση σε ενεργοποίηση συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών.⁽⁵⁷⁾ Μελέτες αναφέρουν ότι τα καρκινώματα της ωοθήκης εκφράζουν το EGFR σε ποσοστά από 4-100%. Ο μέσος όρος έκφρασης του EGFR σε κακοήθεις όγκους ωοθήκης κυμαίνεται περίπου στο 48%.^(67-72,74-76,77,78,79,80,81-92) Παρόλα αυτά, δεν έχει βρεθεί συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου και την ηλικία του ασθενούς, το στάδιο της ασθένειας, το στάδιο και το μέγεθος του όγκου και την ανταπόκριση σε θεραπεία. Από προηγούμενες μελέτες φαίνεται επίσης ότι δεν υπάρχει διαφορά στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ οριακού και κακοήθους ορώδους καρκίνου των ωοθηκών, ενώ η έκφραση

του EGF υποδοχέα είναι σημαντικά αυξημένη στα βλεννώδη κυσταδενώματα, χωρίς ωστόσο να υπάρχει συσχέτιση με το στάδιο της ασθένειας.

1.10 Αναστολείς EGFR

Η κατανόηση της υπεροικογένειας του EGFR και των προσδετών τους έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διάφορων θεραπευτικών στρατηγικών συμπεριλαμβανομένου των μικρών μορίων-αναστολέων που αναστέλλουν τη δράση του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (TKIs), και των μονοκλωνικών αντισωμάτων (Mabs) που δρουν στο εξωκυττάριο τμήμα και αναστέλλουν τη σύνθεση EGFR με τη βοήθεια αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων.

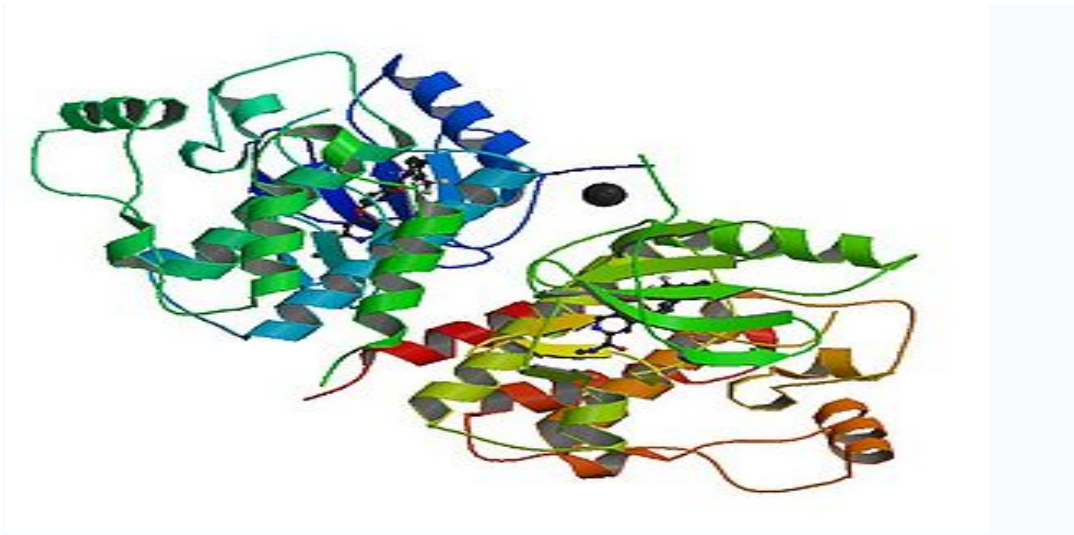
- **TKIs:** Αποτελούν μόρια-αναστολείς κινάσης τυροσίνης, είναι μικρού μοριακού βάρους και δρουν μπλοκάροντας τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα κινάσης. Έχουν την ικανότητα να προσδένουν τον αναστολέα αντιστρεπτά ή μη. Δύο από τα πιο γνωστά μόρια είναι το gefitinib και το erlotinib.⁽⁹³⁾ Από όλους τους αναστολείς EGFR, οι TKIs είναι οι πιο ευρέως μελετημένοι σε συμπαγείς όγκους, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου των ωθηκών.

- **Mabs (Monoclonal antibodies):** Τα μόρια αυτά δρουν στο εξωκυττάριο τμήμα του EGFR υποδοχέα όπου προκαλούν εγκόλπωση και αποικοδόμηση του υποδοχέα όταν προσδεθούν σε αυτόν. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα Herceptin (Trastuzumab), Erbitux (Cetuximab), Vectibix (Panitumumab).⁽⁹³⁾

Η στοχευμένη θεραπεία μπορεί να αποτελέσει μια καινοτομία σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο των ωθηκών. Κάποιοι από τους παραπάνω αναστολείς χρησιμοποιούνται ήδη είτε μόνοι τους είτε σε συνδυασμό με τις συμβατικές χημειοθεραπείες.

1.11 Το γονίδιο K-ras

Οι G-πρωτεΐνες ή GTPάσες είναι μικρές πρωτεΐνες που δεσμεύουν το GTP και το υδρολύουν σε GDP. Οι πρωτεΐνες αυτές χωρίζονται σε 2 μεγάλες κατηγορίες: τις ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες (Gaβγ) και τις μονομερείς ή τις μικρές G-πρωτεΐνες. Οι μονομερείς πρωτεΐνες έχουν μοριακό βάρος 20-30 kDa. Το πρώτο γονίδιο μιας μικρής G-πρωτεΐνης που ανακαλύφθηκε ήταν το γονίδιο της πρωτεΐνης RAS. Το γονίδιο αυτό υπάρχει στο 12 χρωμόσωμα και περιλαμβάνει τα γονίδια H-ras, N-ras και K-ras. Η πρωτεΐνη RAS είναι μια μονομερής GTPάση μοριακού βάρους 21 kDa και έχει 188 αμινοξέα. Τα πρώτα 164 αμινοξέα είναι ίδια σε όλες τις RAS πρωτεΐνες, ενώ η περιοχή στο C-τελικό άκρο διαφέρει (165-185 αμινοξέα).⁽⁹⁾ Η περιοχή αυτή είναι ετερογενής και στη θέση 186 υπάρχει ένα κατάλοιπο κυστεΐνης υψηλά διατηρημένο. Η πρωτεΐνη RAS έχει την περιοχή πρόσδεσης, όπου προσδένονται διάφορα μόρια προσδέτες για την μετάδοση του μηνύματος, την περιοχή switch I, μια επιπλέον περιοχή πρόσδεσης για τους προσδέτες (effectors) και την GAP πρωτεΐνη, και τέλος την περιοχή switch II στην οποία συνδέονται οι GEFs. Οι δύο αυτές περιοχές (switch I και switch II) αποτελούν θέσεις αναγνώρισης για τελεστές και μόρια-υποδοχείς εξαιτίας της θέσης τους στο γονίδιο (είναι εκτεθειμένες στην επιφάνειά του).^(1,9) Είναι τα μόνα κύρια σημεία της πρωτεΐνης που κινούνται κατά την ενεργοποίηση της RAS.. Η περιοχή switch I (θέση: 30- 38 αμινοξέα) αποτελεί τμήμα πρόσδεσης μεταξύ της RAS*GTP και των μορίων Raf1, B-raf και PI3 κινάσης στο μονοπάτι σηματοδότησης. Η περιοχή switch II (θέση: 60-72 αμινοξέα) χρησιμεύει για σταθερές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της RAS και των μεταγενέστερων μορίων του μονοπατιού.⁽⁹⁾ Ακόμη, παρουσιάζει μια G-περιοχή χαρακτηριστική της υπεροικογένειας των GTPασών. Το μοτίβο αλληλουχίας που χαρακτηρίζει τις GTPάσες συμμετέχει στη δέσμευση του νουκλεοτιδίου. Τρία δομικά στοιχεία είναι σημαντικά για την λειτουργία-διακόπτη (switch) των RAS πρωτεϊνών: οι βρόγχοι L1 (βρόγχος P), L2 (βρόγχος τελεστής) και L4 οι οποίοι έρχονται σε επαφή με τη γ-φωσφορική ομάδα του GTP.⁽⁹⁾



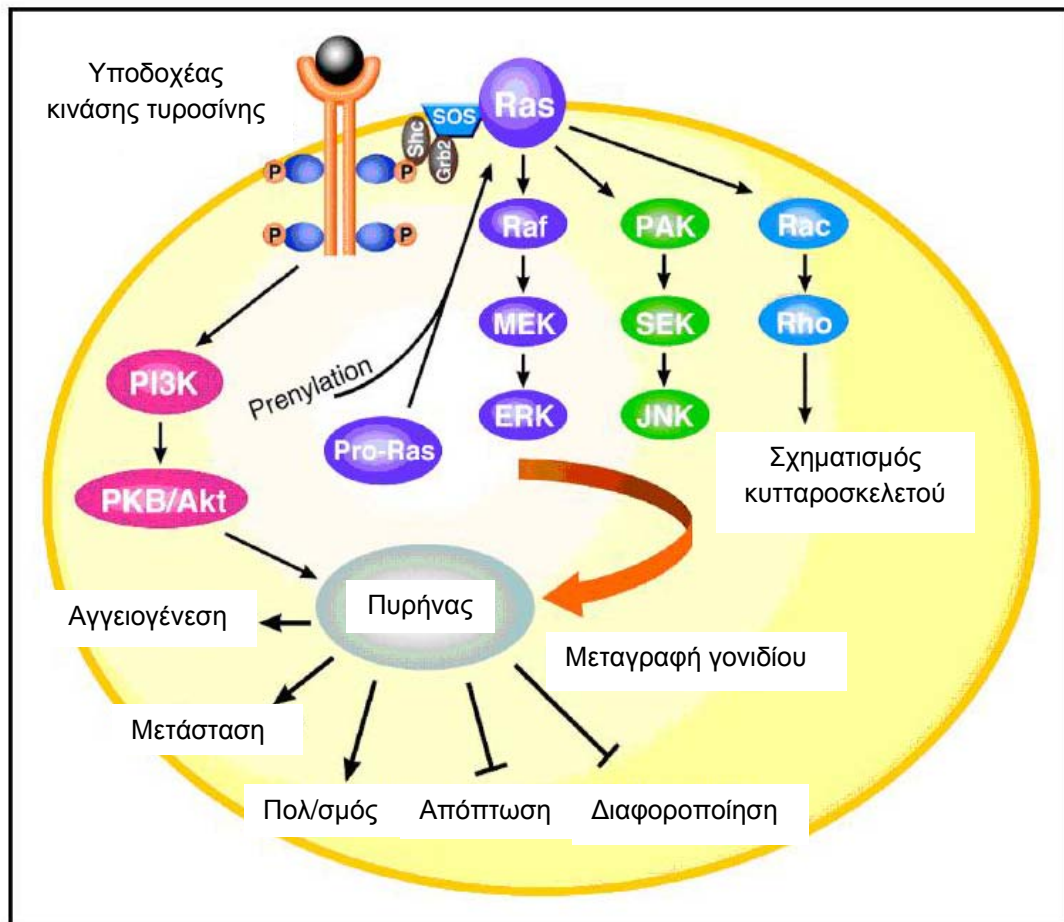
Εικόνα 7: Απεικόνιση τρισδιάστατης δομής KRAS

Οι GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) αποτελούν παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης. Η μετάβαση από την ανενεργή μορφή GDP στην ενεργή GTP μπορεί να επιταχυνθεί από πρωτεΐνες που αναγκάζουν το συνδεδεμένο GDP να αποσυνδεθεί. Οι GEFs διαδραματίζουν ένα ουσιαστικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος μέσω των πρωτεϊνών RAS, όπου μαζί με τις πρωτεΐνες-προσαρμογείς, διαμορφώνουν τη σύνδεση μεταξύ των ενεργοποιημένων υποδοχέων κίνησης τυροσίνης και της πρωτεΐνης RAS.⁽⁹⁾

Τα μέλη της οικογένειας των RAS υπάρχουν σε 2 μορφές: την ανενεργό RAS*GDP μορφή και την ενεργό RAS*GTP μορφή. Η μετάβαση μεταξύ ενεργούς και ανενεργούς κατάστασης πραγματοποιείται μέσω ενός μονοκατευθυνόμενου κύκλου. Η διάρκεια ζωής της ενεργούς μορφής είναι μεγάλης σπουδαιότητας για την σηματοδοτική λειτουργία της πρωτεΐνης RAS.⁽⁹⁾ Μόνο μέσω της GTP μορφής μπορεί το σήμα να διαβιβαστεί στο μόριο που ακολουθεί. Το χρονικό διάστημα για τη μεταγωγή σημάτων καθορίζεται από το ρυθμό υδρόλυσης του GTP μορίου. Χαμηλός ρυθμός υδρόλυσης και συνεπώς διατήρηση της ενεργούς GTP μορφής συσχετίζεται με υψηλή ένταση στη μεταγωγή σήματος. Η μείωση του χρονικού διαστήματος που μεσολαβεί από τη διέγερση της GTPάσης οδηγεί σε εξασθενημένη μεταγωγή σημάτων. Υπό την επίδραση της πρωτεΐνης GAP (GTPase Activating Protein) το ποσοστό υδρόλυσης του

GTP μορίου αυξάνεται.⁽⁹⁾ Ο ρόλος των GAP πρωτεϊνών είναι να μειώνουν τη διάρκεια ζωής της ενεργού μορφής λειτουργώντας ως αρνητικοί ρυθμιστές της σηματοδότησης της RAS πρωτεΐνης. Η μετάβαση από την ανενεργή στην ενεργή μορφή μπορεί να επιταχυνθεί από τις πρωτεΐνες GEFs που λειτουργούν θετικοί ρυθμιστές των RAS.

Η κύρια οδός για την ενεργοποίηση της RAS πρωτεΐνης είναι μέσω των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης, όπως ο EGFR, οι οποίοι μεταφέρουν το σήμα μέσω πρωτεϊνών προσαρμογέων και των GEFs, στην πρωτεΐνη RAS. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης RAS μπορεί επίσης να ξεκινήσει από υποδοχείς συνδεδεμένους με G-πρωτεΐνες ή από υποδοχείς που συνδέονται με κινάσες τυροσίνης. Στη συνέχεια, η ενεργοποίηση της RAS ενεργοποιεί μόρια που ακολουθούν και οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η μεταφορά του σήματος στον πυρήνα και η έκφραση της πρωτεΐνης που εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση.⁽⁹⁾



ΕΙΚΟΝΑ 8: Σηματοδοτικό μονοπάτι RAS.

Η σύγκριση των βιοχημικών ιδιοτήτων των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών RAS με τη φυσιολογική RAS πρωτεΐνη δείχνει ότι η αυξανόμενη διάρκεια ζωής της GTP ενεργούς μορφής σχετίζεται με την ογκογόνο δραστηριότητα. Η πλειονότητα των μεταλλάξεων του γονιδίου ras εντοπίζονται κυρίως στα κωδικόνια 12, 13 και 61. Αποτέλεσμα αυτών των μεταλλάξεων είναι η διατήρηση ενεργούς μορφής της RAS πρωτεΐνης και συνεπώς ενεργοποίηση του Ras/Raf/Mek/Erk μονοπατιού. Το κωδικόνιο 12 είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στις αντικαταστάσεις αμινοξέων. Η αντικατάσταση της γλυκίνης 12 με οποιοδήποτε αμινοξύ εκτός της προλίνης οδηγεί στην ενεργοποίηση της RAS πρωτεΐνης. Στον καρκίνο των ωθηκών οι K-ras μεταλλάξεις είναι οι πιο κοινές αλλαγές. Το 90% των μεταλλαγών εντοπίζονται στα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου, ενώ τα ποσοστά μεταλλάξεων κυμαίνονται μεταξύ 3-11% στον καρκίνο των ωθηκών γενικότερα. Οι μεταλλάξεις στο 61 κωδικόνιο είναι σπάνιες και επομένως δεν συμπεριλαμβάνονται στη μελέτη.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν οι μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR και την πρωτεΐνη RAS σε καρκινώματα ωθήκης, και κυρίως στις κατηγορίες των ορωδών και βλενωδών καρκινωμάτων και συσχετίσθηκε η παρουσία/απουσία μεταλλάξεων με τα ιστολογικά δεδομένα των τύπων αυτών στα πλαίσια μιας προσπάθειας εύρεσης προβλεπτικών και προγνωστικών δεικτών.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Υλικό μελέτης

Έγινε συλλογή αρχειακού υλικού δειγμάτων ωθήκης, όπου επιλέχθηκαν δείγματα ασθενών με ορώδη και βλεννώδη καρκινώματα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν:

- 10 ασθενείς που δεν εμφανίζουν στοιχεία κακοήθειας σύμφωνα με την ιστολογική έκθεση και αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (φυσιολογικοί μάρτυρες- ομάδα Α)
- 10 ασθενείς με ορώδες κυσταδένωμα, που αποτέλεσαν την ομάδα Β
- 10 ασθενείς με βλεννώδες κυσταδένωμα και αποτέλεσαν την ομάδα Γ

3.2 Μεθοδολογία

A. Επιλογή υλικού

Στα δείγματα που επιλέχθηκαν έγινε επιλογή κατάλληλων περιοχών ώστε το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων να ξεπερνά το 70%. Η επιλογή έγινε με παρατήρηση πλακιδίου ηωσίνης/αιματοξυλίνης σε οπτικό μικροσκόπιο. Στη συνέχεια επιλέχθηκε η επιθυμητή περιοχή και μέρος του υλικού συλλέχθηκε με τη βοήθεια μικροτόμου τύπου Leica.

B. Απομόνωση γενωμικού DNA

Χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα 10 τομές πάχους 10μm που τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια τύπου erpendorf και ακολούθησε η διαδικασία αποπαραφίνωσης του ιστού ως εξής:

• Αποπαραφίνωση ιστού

1. Οι τομές παραφίνης τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο τύπου errendorf και προσθέσαμε 1ml ξυλόλης. Η ξυλόλη έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει την παραφίνη. Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στο μεσοδιάστημα γίνεται συχνή ανακίνηση σε αναδευτήρα (vortex).
2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Γίνεται προσεκτικά η αφαίρεση του υπερκειμένου και διατηρείται το ίζημα.
4. Στο ίζημα γίνεται προσθήκη 1ml ξυλόλης για να αφαιρεθούν τυχόν υπολείμματα παραφινών. Τα βήματα 1-3 επαναλαμβάνονται.
5. Στο ίζημα γίνεται προσθήκη 1ml απόλυτης αιθανόλης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Γίνεται προσεκτικά η αφαίρεση του υπερκειμένου και διατηρείται το ίζημα.
7. Επανάληψη των βημάτων 7 και 8.
8. Γίνεται προσεκτικά η αφαίρεση του υπερκειμένου.
9. Προστίθενται 200 ml ATL διαλύματος λύσης ιστού (Tissue Lysis Buffer), 100μl SDS 10% (Sodium Dodecyl Sulfate), 100μl πρωτεϊνάση K (η πρωτεϊνάση είναι ένζυμο που βοηθά στο σπάσιμο των μεμβρανών). Επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 37° C για τουλάχιστον 24h.

• Απομόνωση γενωμικού DNA με το kit της Qiagen (Qiamp DNA mini kit).

1. Μετά την αποπαραφίνωση των δειγμάτων, τα δείγματα μεταφέρονται σε θερμοκρασία δωματίου, και προστίθεται σε αυτά διάλυμα λύσης 200μl. Ακολουθεί σύντομη ανακίνηση.
2. Στη συνέχεια τοποθετούνται για 10 λεπτά στους 70° C (υδατόλουτρο).

3. Ακολουθεί προσθήκη 200ml απόλυτης αιθανόλης και σύντομη ανακίνηση.
 4. Γίνεται μεταφορά 700ml του παραπάνω μίγματος των δειγμάτων σε ειδικές στήλες με φίλτρο και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
 5. Το υποκείμενο διάλυμα αφαιρείται και στη στήλη προστίθενται 500ml διαλύματος AW1, στο οποίο έχει προηγουμένως προστεθεί ποσότητα απόλυτης αιθανόλης σύμφωνα με οδηγίες του κατασκευαστή.
 6. Φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
 7. Το υποκείμενο διάλυμα αφαιρείται ξανά και προστίθενται 500ml διαλύματος AW2.
 8. Φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 6 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
 9. Αλλάζουμε στήλη και φυγοκεντρούμε ξανά το δείγμα στις 12000 στροφές για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
 10. Αλλάζουμε ξανά τη στήλη και προσθέτουμε 60ml H₂O. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 8000 στροφές για 1 λεπτό.
 11. Προσθέτουμε άλλα 60ml H₂O, αφήνουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρηση.
- Ό,τι έχει περάσει από τη στήλη είναι πλέον το DNA που απομονώθηκε και το οποίο συλλέγεται σε σωληνάριο τύπου erpendorf.

Γ. Έλεγχος ποσότητας-Εκτίμηση ποσότητας γενωμικού DNA

• Ηλεκτροφόρηση :

Για να ελέγξουμε την ποιότητα του DNA και να εκτιμήσουμε την ποσότητά του, ηλεκτροφορούμε ποσότητα DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Το πήκτωμα περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), σε συγκέντρωση 10mg/μl, που έχει την ιδιότητα να προσδένεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και να φθορίζει σε UV ακτινοβολία. Το *βρωμιούχο αιθίδιο* είναι μια φθορίζουσα χρωστική η οποία ενσωματώνεται στο δίκλωνο μόριο του προϊόντος PCR και τοποθετώντας τη στο πήκτωμα αγαρόζης, το οποίο έχει τρεχτεί το δείγμα με ηλεκτροφόρηση, σε μηχανήμα UV μας επιτρέπει να δούμε τα προϊόντα PCR ή DNA που έχουν ηλεκτροφορηθεί.

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης αποτελεί έναν απλό και αποδοτικό τρόπο ελέγχου και διαχωρισμού των δειγμάτων. Βασίζεται στην παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης, το οποίο τήκεται με την βοήθεια κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα τμήματα DNA μετακινούνται. Οι φωσφορικές ομάδες των δεοξυριβονουκλεοτιδίων προσδίδουν αρνητικό φορτίο στο DNA το οποίο, παρουσία του διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE 1X , θα κινηθεί από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο. Όσο πιο μεγάλο είναι το προϊόν που τρέχουμε, τόσο πιο δύσκολα κινείται μέσα στο πήκτωμα αγαρόζης. Έτσι, χρησιμοποιώντας πηκτώματα με διαφορετική συγκέντρωση αγαρόζης, πετυχαίνουμε τον επιθυμητό διαχωρισμό ανάλογα με το εύρος των βάσεων που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Τα δείγματα πριν την ηλεκτροφόρηση αναμιγνύονται πρώτα με χρωστική. Η χρωστική που χρησιμοποιούμε περιέχει γλυκερόλη, έτσι ώστε να είναι «βαριά» και να κάθεται κάτω στα «πηγαδάκια» του πηκτώματος αγαρόζης.

Η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται τα τμήματα DNA εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA, την συγκέντρωση της αγαρόζης, τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης και τέλος του δυναμικού που εφαρμόζεται στα άκρα του πηκτώματος. Ηλεκτροφορούμε 5μl DNA που

αναμιγνύουμε με 3μl χρωστική και βλέπουμε οπτικά την ποιότητα-ποσότητα DNA σε σύστημα UV ακτινοβολίας.

• Παρασκευή πηκτώματος/αγαρόζης :

Χρησιμοποιήσαμε πηκτώματα αγαρόζης που διαφέρουν στη σύστασή τους. Πιο συγκεκριμένα, πήκτωμα αγαρόζης με συγκέντρωση 1% χρησιμοποιήσαμε για να ηλεκτροφορήσουμε το DNA που είναι μακρομόριο. Για να το παρασκευάσουμε χρησιμοποιήσαμε 3gr αγαρόζης και 300ml TBE. Προσθέτουμε 20μl βρωμιούχο αιθίδιο και ρίχνουμε σε εκμαγείο. Αφού πήξει, μαζεύουμε και φυλάσσουμε στο ψυγείο, για να μην αφυδατωθεί, μέσα σε αλουμινόχαρτο λόγω αιθιδίου.

Σε πήκτωμα αγαρόζης με σύσταση 2% ηλεκτροφορούμε προϊόντα PCR μεγέθους μεγαλύτερου των 500 βάσεων. Για να το παρασκευάσουμε θα χρησιμοποιήσουμε 6gr αγαρόζη και 300ml TBE 1%.

Σε πήκτωμα αγαρόζης με σύσταση 3% ηλεκτροφορούμε προϊόντα PCR μεγέθους μικρότερου των 500 βάσεων. Τα τμήματα αυτά είναι μικρού μεγέθους και κινούνται γρήγορα μέσα από τους πόρους του πηκτώματος. Για να το παρασκευάσουμε θα χρησιμοποιήσουμε 9gr αγαρόζη και 300ml TBE 1%.

Παρατηρώντας την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA βλέπουμε ότι σχηματίζεται ένα «smear». Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το DNA λόγω της μονιμοποίησης του αρχικού υλικού στη φορμόλη έχει υποστεί «βλάβες» και είναι κατακερματισμένο.

Δ. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Το DNA που απομονώθηκε ενισχύθηκε επιλεκτικά με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για τα εξόνια 18, 19, 20 και 21 του γονιδίου του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR.

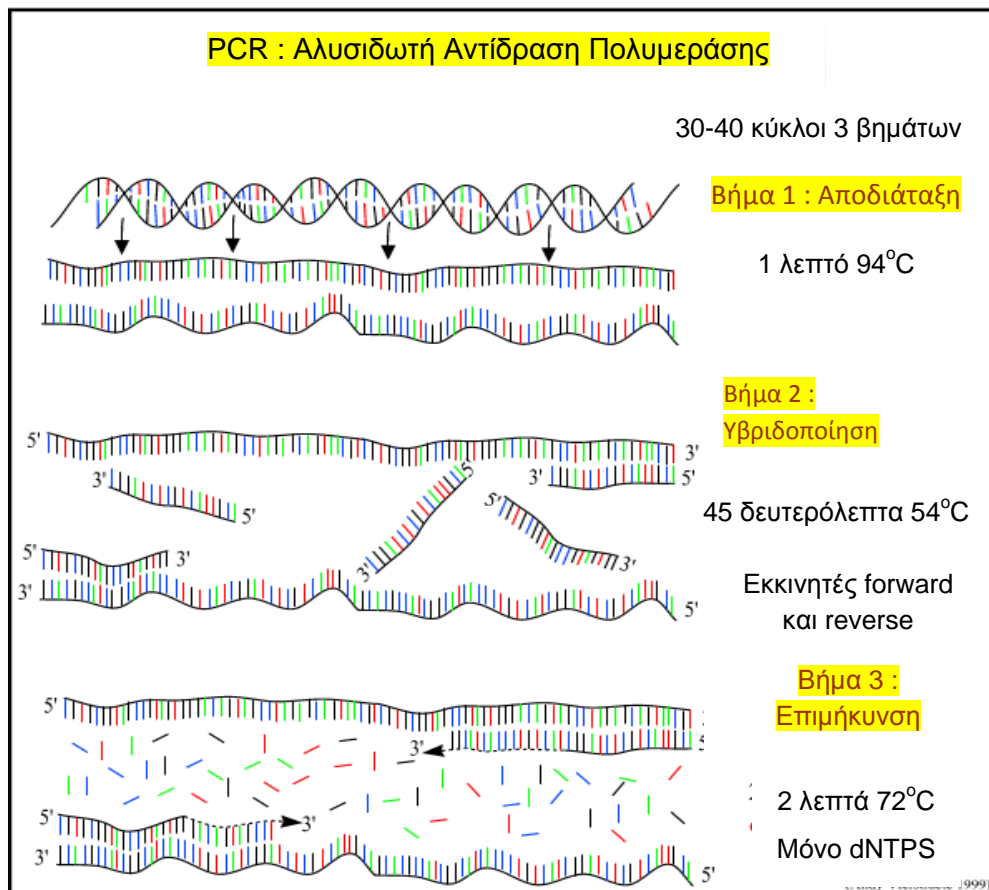
Η τεχνική της PCR αποτελείται από τρία στάδια :

Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την αποδιάταξη του DNA. Πραγματοποιείται στους 95°C.

Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την υβριδοποίηση των δύο εκκινητών στις δύο πλευρές του DNA στόχου σε θερμοκρασία περίπου 45-60°C ανάλογα με το σημείο τήξης των εκκινητών.

Το τρίτο στάδιο περιλαμβάνει την σύνθεση και επιμήκυνση της νέας αλυσίδας DNA. Με την δράση ενός ενζύμου, κυρίως της Taq DNA πολυμεράσης η επιμήκυνση γίνεται σε θερμοκρασία 72°C.

Η σειρά των παραπάνω τριών σταδίων αποτελούν ένα κύκλο της αντίδρασης PCR. Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει τα παραπάνω τρία στάδια. Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι (25-40) εξασφαλίζουν με εκθετικό ρυθμό έναν ικανοποιητικό αριθμό αντιγράφων για να προχωρήσει η περαιτέρω μελέτη.



Εικόνα 9: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Προετοιμασία PCR Αντίδρασης: Σε σωληνάριο τύπου erpendorf τοποθετείται DNA στόχος, 2 εκκινητές, το ένζυμο της Taq DNA πολυμεράσης, ιόντα Mg^{++} που είναι απαραίτητα για την δράση του ενζύμου, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), καθώς και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), με pH=8.2, για την δράση του ενζύμου και νερό. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται στην PCR απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq) και έχει την ιδιότητα να παραμένει ενεργό για αρκετή ώρα ακόμη και σε θερμοκρασία 95°C, που είναι απαραίτητη για την αποδιάταξη του DNA. Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας σε κάθε κύκλο της PCR πραγματοποιείται με την βοήθεια αυτοματοποιημένων συσκευών, τους θερμοκυκλοποιητές. Οι συσκευές αυτές μπορούν να ανεβοκατεβάζουν τις θερμοκρασίες σε λιγότερο από 1 λεπτό, για αυξομείωση έως και 40° C.

Προϊόν PCR: Το κύριο μόριο της αντίδρασης είναι δίκλωνο DNA στο οποίο προστίθενται οι 2 εκκινητές, οι οποίοι φέρουν συμπληρωματικά άκρα ως προς τα 5' άκρα της περιοχής που θέλουμε να ενισχύσουμε επιλεκτικά ώστε να μπορούν να υβριδοποιηθούν. Για επιτυχή πολλαπλασιασμό της επιθυμητής περιοχής DNA, ο αριθμός των κύκλων εξαρτάται από την συγκέντρωση του DNA καθώς και από την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Υπερβολικός αριθμός κύκλων μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή μη ειδικών προϊόντων, ενώ μικρότερος αριθμός κύκλων από το απαιτούμενο έχει ως αποτέλεσμα την μη ανίχνευση του DNA.

- Παράγοντες που επηρεάζουν την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR.

1. Θερμοκρασία Υβριδισμού: Εξαρτάται από το μήκος και την σύσταση των εκκινητών σε βάσεις GC και AT. Όταν οι εκκινητές δεν ξεπερνούν τις 22 βάσεις, η θερμοκρασία τήξης υπολογίζεται από τον τύπο $T_m: (A+T) \times 2^\circ C + (G+C) \times 4^\circ C$. Ως καλύτερη θερμοκρασία υβριδισμού επιλέγεται συνήθως η υψηλότερη θερμοκρασία που δίνει καλύτερα προϊόντα, καθώς η χαμηλότερη οδηγεί στο σχηματισμό μη ειδικών προϊόντων.

2. DNA αλληλουχία-στόχος: 100ng περίπου είναι αρκετά για γονιδιακό πολλαπλασιασμό. Ακόμη, και θραύσματα του DNA είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με την τεχνική της PCR. Η αλληλουχία της περιοχής που θέλουμε να ενισχύσουμε μπορεί να είναι άγνωστη, αυτό όμως που θα πρέπει να γνωρίζουμε είναι οι 3 περιοχές αυτής καθώς είναι απαραίτητες για την σύνθεση των εκκινητών.

3. Εκκινητές: Θα πρέπει να αποτελούνται από βάσεις που η περιεκτικότητα σε G και C να είναι παρόμοια με το τμήμα που πρόκειται να αυξηθεί. Ακόμη, θα πρέπει να αποφεύγονται εκκινητές που περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, ενώ θα πρέπει να γίνεται και έλεγχος ως προς την συμπληρωματικότητα. Δεν θα πρέπει να παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή 5' άκρο τους για να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών και η απόστασή τους θα είναι μεγαλύτερη των 100

βάσεων. Τέλος, θα πρέπει να έχουν και παραπλήσια θερμοκρασία αποδιάταξης ή τήξης (T_m).

4. DNA πολυμεράση: Η βέλτιστη θερμοκρασία για δράση είναι 72°C αλλά είναι αρκετά σταθερή ακόμη και σε θερμοκρασία 94°C . Προστίθεται μια στην αρχή της αντίδρασης και παραμένει ενεργή για 40-45 κύκλους, καθιστώντας δυνατή την αυτοματοποίηση της PCR με την χρήση των κυκλοποιητών.

5. Συγκέντρωση ιόντων Mg^{++} : Χρησιμοποιούνται κυρίως ως συμπαραγόντας της Taq DNA πολυμεράσης. Η συγκέντρωσή τους έχει μεγάλη επίδραση στην ειδικότητα του προϊόντος της PCR. Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις κυμαίνονται περίπου στα $1,5\text{mM}$ - 3mM . Περίσσεια ιόντων Mg^{++} έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση μη ειδικού προϊόντος ενώ αντίθετα έλλειψή τους οδηγεί σε μη επαρκή ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος.

6. Συγκέντρωση τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs): Τα dNTPs αποτελούν απαραίτητα συστατικά για την σύνθεση των νέων αλυσίδων του DNA. Οι συγκεντρώσεις τους κυμαίνονται μεταξύ 50 - $200\mu\text{M}$. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις προκαλείται παραγωγή παραπροϊόντων από την πολυμεράση. Τα dNTPs δεσμεύουν τα ιόντα Mg^{++} και επομένως το ποσό τους προσδιορίζει και το ελεύθερο ποσό διαθέσιμου Mg^{++} . Εάν η συγκέντρωση των dNTPs αλλάξει σημαντικά, τότε αλλάζει και η συγκέντρωση του ελεύθερου ποσού του διαθέσιμου Mg^{++} . Επομένως, η συγκέντρωση των dNTPs θα πρέπει να βελτιστοποιείται παράλληλα με αυτή των ιόντων Mg^{++} . Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήσαμε συγκέντρωση 40mM dNTPs.

7. Αριθμός κύκλων: Ο αριθμός των κύκλων σε μια αντίδραση PCR προσδιορίζεται πειραματικά βάσει της επιθυμητής παραγωγής, αλλά και του μεγέθους του προϊόντος PCR. Ο βέλτιστος αριθμός κυμαίνεται μεταξύ 30 - 40 κύκλοι. Μετά από κάποιους κύκλους, η εκθετική ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής σταματά σταδιακά και διέρχεται σε μια στατική φάση

- Αναστολείς και ενισχυτές της αντίδρασης PCR

Πολλοί παράγοντες οδηγούν σε αναστολή της PCR αντίδρασης. Μπορεί να οφείλονται στην ίδια την φύση των δειγμάτων καθώς επίσης στη μέθοδο και τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του DNA. Για παράδειγμα η ηπαρίνη ως αντιπηκτικό δρα ως αναστολέας της PCR. Αντίθετα, το EDTA προτιμάται σε αυτές τις περιπτώσεις.

Ενισχύσαμε επιλεκτικά τα εξόνια 18, 19, 20 και 21 του γονιδίου EGFR και το εξόνιο 2 του γονιδίου KRAS. Για το κάθε εξόνιο που μελετήσαμε, χρησιμοποιήσαμε διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων και διαφορετικούς εκκινητές. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

εξόνιο 18:

18F: 5'- AGCATGGTGAGGGCTGAGGTGAC – 3'

18R: 5'- ATATACAGCTTGCAAGGACTCTGG –3'

```
5'caagcccatgccgtggctgctggctccccctgctggccatgtctggcactgcttccagcatggtgagg  
gctgaggtgacccctgtctctgtgttctgtccccccagctgtggagcctcttacaccagtgagaagctc  
ccaaccaagctctctgaggatctgaaggaaactgaattcaaaaagatcaaagtgctgggctccggtgcg  
ttcggcacggtgtataaggtaaggtccctggcacagcctctgggctgggccgcagggcctctcatggtctgg  
tggggagccagagtccttgcaagctgtatattccatcatctactttactctttgtttcactgagtgtttg'3
```

ΕΙΚΟΝΑ 10: Απεικόνιση τμήματος του εξονίου 18 του γονιδίου EGFR. Με έντονη γραμματοσειρά παρουσιάζονται οι περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών 18F και 18R.

Εξόνιο 19:

19F: 5'- AAATAATCAGTGTGATTTCGTGGAG –3'

19R: 5'- GAGGCCAGTGCTGTCTCTAAGG – 3'

5'actttataacaggctttacaagcttgagattctttatct**aaataatcagtgattcgaggag**cccaacagc
tgcagggctgcggggcgctcacagccccagcaatatcagccttaggtcggctccacagccccagtgccct
caccttcgggggtgcatcgctggtaacatccaccagatcactgggcagcatgtggcaccatctcacaattgcca
gttaacgttctctctctctctgcatagggactctggatccagaaggtgagaaagttaaattcccgtcgtatc
aaggaattaagagaagcaacatctccgaaagccaacaaggaaatcctcgatgtgagttctgcttgctgtgg
gggtccatggctctgaacctcaggccccacctttctcatgtctggcagctgctctgctctagaccctgctcatctcc
acatcctaaatgttcactttctatgtctttcccttctagctctagtgggtataactccctcc**cttagagacagcac**
tggcctccca'3

ΕΙΚΟΝΑ 11: Απεικόνιση τμήματος του εξονίου 19 του γονιδίου EGFR. Με έντονη γραμματοσειρά παρουσιάζονται οι περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών 19F και 19R.

Εξόνιο 20 :

20F: 5'- TGTA AACGACGGCCAGTCCTCGATGAAGCCTACGTGATG –3'

20R: 5'- CAGGAAACAGCTATGACCGGCAGCCGAAGGGTATGAGCTG-3'

5'accatgcgaagccacactgacgtgcctctccctccctcc**aggaagcctacgtgatg**gccagcgtggaca
acgtgtgccgctgctgggcatctgcctcacctccaccgtgcagctcatcacg**cagctcatgcccttcggctc**
gactatgtccgggaacacaaagaca'3

ΕΙΚΟΝΑ 12: Απεικόνιση τμήματος του εξονίου 20 του γονιδίου EGFR. Με έντονη γραμματοσειρά παρουσιάζονται οι περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών 20F και 20R.

Εξόνιο 21:

21F: 5'- GCAGCGGGTTACATCTTCTTTC – 3'

21R: 5'- CAGCTCTGGCTCACACTACCAG – 3'

```
5'gatggagaaaagttaatggtcgagcagcgggttacatcttctttcatgCGcctttcattcttggatcagta
gtcactaacgttcgccagccataagtcctcgacgtggagaggctcagagcctggcatgaacatgaccctg
aattcggatgcagagcttctccatgatgatctgtccctcacagcagggtcttctctgtttcagggcatgaact
actggaggaccgtcgcttgggcaccgcgacctggcagccaggaacgtactggtgaaaacaccgcagc
atgtcaagatcacagattttgggctggccaaactgctgggtgCGgaagagaaagaataccatgcagaag
gaggcaaagtaaggagggtggcttaggtcagccagcatttctgacaccagggaccagggtgccttcca
ctagctgtattgtttaacacatgcaggggaggatgctctccagacattctgggtgagctcgcagcagctgctg
ctggcagctgggtccagccagggctctctggtagtgtagccagagctgctttgggaacagtactgtgctg
ggacagtgaat gaggatgta tccccaggtg'3
```

EIKONA 13: Απεικόνιση τμήματος του εξονίου 21 του γονιδίου EGFR. Με έντονη γραμματοσειρά παρουσιάζονται οι περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών 21F και 21R.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το μείγμα της αντίδρασης στις ανάλογες συγκεντρώσεις είναι:

Αντιδραστήρια	Όγκος/ Δείγμα
DNA	5μl
10* buffer	5μl
MgCl ₂ (50mM)	2,5μl (2,5mM)
18F (10pmol/μl)	3μl (30pmols)
18R (10pmol/μl)	3μl (30pmols)
dNTPs (40mM)	3 μl (2,5mM)
Taq polymerase (5u/μl)	0,3μl (0,03u/μl)
ddH ₂ O	28,2μl

Αντιδραστήρια	Όγκος/ Δείγμα
DNA	7μl
10* buffer	5μl
MgCl₂ (50mM)	1,5μl (1,5mM)
19F (10pmol/μl)	3μl (30pmols)
19R (10pmol/μl)	3μl (30pmols)
dNTPs (40mM)	2 μl (1,6mM)
Taq polymerase (5u/μl)	0,3μl (0,03u/μl)
ddH₂O	28,2μl

Αντιδραστήρια	Όγκος/ Δείγμα
DNA	5μl
10* buffer	5μl
MgCl₂ (50mM)	2,5μl (2,5mM)
20F (10pmol/μl)	3μl (30pmols)
20R (10pmol/μl)	3μl (30pmols)
dNTPs (40mM)	3 μl (2,4mM)
Taq polymerase (5u/μl)	0,3μl (0,03u/μl)
ddH₂O	28,2μl

Αντιδραστήρια	Όγκος/ Δείγμα
DNA	5μl
10* buffer	5μl
MgCl ₂ (50mM)	2,5μl (2,5mM)
21F (10pmol/μl)	3μl (30pmols)
21R (10pmol/μl)	3μl (30pmols)
dNTPs (40mM)	3 μl (2,4mM)
Taq polymerase (5u/μl)	0,3μl (0,03u/μl)
ddH ₂ O	28,2μl

Ο τελικός όγκος σε κάθε δείγμα που ετοιμάζουμε είναι 50μl.

Χρησιμοποιήθηκε συσκευή PCR τύπου Eppendorf και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλεκτική ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων είναι οι ακόλουθες :

Για το εξόνιο 19 επιλέξαμε τις εξής συνθήκες :

- 94 °C → 10 λεπτά , αρχική αποδιάταξη
 - 94 °C → 1 λεπτό , στάδιο αποδιάταξης
 - 58 °C → 1 λεπτό , στάδιο υβριδοποίησης
 - 72 °C → 1 λεπτό , στάδιο επιμήκυνσης
 - 72 °C → 10 λεπτά , τελική επιμήκυνση
 - 4°C → διατήρηση
- } x 40 κύκλοι

Το μέγεθος του προϊόντος PCR είναι 148 ζεύγη βάσεων.

Για τα εξόνια 18, 20,21 επιλέξαμε τις εξής συνθήκες :

- 95 °C → 15 λεπτά , αρχική αποδιάταξη
 - 95 °C → 1 λεπτό , στάδιο αποδιάταξης
 - 60 °C → 1 λεπτό , στάδιο υβριδοποίησης
 - 72 °C → 1 λεπτό , στάδιο επιμήκυνσης
 - 72 °C → 3 λεπτά , τελική επιμήκυνση
 - 18 °C → διατήρηση
- } x 40 κύκλοι

Τα μεγέθη των προϊόντων PCR για τα εξόνια 18, 20, 21 είναι 261, 108 και 525 ζεύγη βάσεων αντίστοιχα.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης. Για το εξόνιο 21 χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 2% ενώ για τα εξόνια 18, 19 και 20 χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 3% λόγω διαφορετικού μεγέθους προϊόντων PCR. Σε κάθε πηγαδάκι φορτώνουμε 15μl του PCR δείγματος το οποίο έχει αναμιχθεί προηγουμένως με 3μl χρωστικής. Παράλληλα στα πηκτώματα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε κ μάρτυρας γνωστού μεγέθους (100bp ladder, New England Biolabs) για να πιστοποιήσουμε τα μεγέθη των προϊόντων PCR.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το εξόνιο 2 του γονιδίου Kras προκειμένου το δείγμα να αλληλουχηθεί είναι:

2F : 5'-CATgTTCTAATATAgTCACA-3'

12b: 5'-TCAAAGgAATggTCCTggACC-3'

5' tttgattataaaagggtactggtggagatattgatagtgattataaccttatg**gtgacatggttctaataatagt**
cacattttcattatttttattataaggcctgctgaaaatgactgaatataaacttggttagttggagctggtg
gcgtaggcaagagtgccctgacgatacagctaattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaacaat
agaggtaaactctgttttaatatgcatattact**ggcgcaggaccattctttgata**cagataaaggtttctc
tgac cattttcatg-3'

ΕΙΚΟΝΑ 14: Απεικόνιση τμήματος του εξονίου 2 του γονιδίου Kras. Με έντονη γραμματοσειρά παρουσιάζονται οι περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών 2F και 12b. Στο πλαίσιο βρίσκεται η περιοχή που σημειώνεται η πλειοψηφία των μεταλλάξεων, τα κωδικόνια 12, 13.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το μείγμα της αντίδρασης στις ανάλογες συγκεντρώσεις είναι:

Αντιδραστήρια	Όγκος/ Δείγμα
DNA	6μl
10* buffer	5μl
MgCl₂ (50mM)	2μl (2mM)
2F (10pmol/μl)	3μl (30pmols)
12b (10pmol/μl)	3μl (30pmols)
dNTPs (40mM)	2 μl (1,6mM)
Taq polymerase (5u/μl)	0,4μl (0,04u/μl)
ddH₂O	28,6 μl

Ο τελικός όγκος σε κάθε αντίδραση είναι 50μl.

Οι συνθήκες της PCR είναι:

- 94 °C → 10 λεπτά , αρχική αποδιάταξη
 - 94 °C → 10 λεπτά, στάδιο αποδιάταξης
 - 52 °C → 1 λεπτό , στάδιο υβριδοποίησης
 - 72 °C → 2 λεπτά, στάδιο επιμήκυνσης
 - 72 °C → 10 λεπτά , τελική επιμήκυνση
 - 18 °C → διατήρηση
- } x 30 κύκλοι

Το μέγεθος του κομματιού που ενισχύεται είναι 215 ζεύγη βάσεων. Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Παράλληλα, ένα άλλο ζευγάρι εκκινητών χρησιμοποιήθηκε για την επιλεκτική ενίσχυση του εξονίου του γονιδίου KRAS προκειμένου να ακολουθήσει επώαση προϊόντος PCR με κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο.

Εκκινητής πρόσθιος 12a: 5'-ACTgAATATAAACTTgTggTAgTTggACCT-3'

Εκκινητής αντίστροφος 12b: 5'-TCAAAGaATggTCCTggACC-3

```
5'gactgaatat aaacttgtgg tagttggagc tggtggcgta ggcaagagtg ccttgacgat
acagctaatt cagaatcatt ttgtggacga atatgatcca acaatagagg taaatctgt tttaatatgc
atattactgg tgcaggacca ttctttgata cagataaagg tttctctgac cattttcatg'3
```

ΕΙΚΟΝΑ 15: Απεικόνιση τμήματος του εξονίου 2 του γονιδίου K-ras. Με έντονη γραμματοσειρά παρουσιάζονται οι περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών 12a και 12b. Ο 12a εκκινητής φέρει λάθος βάση (mismatch) δημιουργώντας νέα θέση εισδοχής για το περιοριστικό ένζυμο BstNI.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το μείγμα της αντίδρασης στις ανάλογες συγκεντρώσεις είναι:

Αντιδραστήρια	Όγκος/ Δείγμα
DNA	6μl
10* buffer	5μl
MgCl ₂ (50mM)	2μl (2mM)
12aF (10pmol/μl)	3μl (30pmols)
12b (10pmol/μl)	3μl (30pmols)
dNTPs (40mM)	2 μl (1,6mM)
Taq polymerase (5u/μl)	0,4μl (0,04u/μl)
ddH ₂ O	28,6 μl

Ο τελικός όγκος σε κάθε αντίδραση είναι 50μl.

Οι συνθήκες της PCR είναι:

- 94 °C → 10 λεπτά , αρχική αποδιάταξη
 - 94 °C → 1 λεπτό , στάδιο αποδιάταξης
 - 52 °C → 1 λεπτό, στάδιο υβριδοποίησης
 - 72 °C → 2 λεπτά στάδιο επιμήκυνσης
 - 72 °C → 10 λεπτά , τελική επιμήκυνση
 - 18 °C → διατήρηση
- } x 30 κύκλοι

Το μέγεθος του κομματιού που ενισχύεται είναι 215 ζεύγη βάσεων. Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης.

E. Ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων–πολυμορφισμοί μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLPs)

Το γενωμικό DNA μπορεί να κοπεί σε συγκεκριμένες θέσεις από εξειδικευμένα ένζυμα τα οποία ονομάζονται περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA και

κόβουν το μόριο μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν μήκος συνήθως 4-8 νουκλεοτίδια και συχνά είναι παλίνδρομες. Γνωρίζοντας επομένως την πλήρη αλληλουχία ενός γονιδίου μπορούμε μετά από πέψη με ένα περιοριστικό ένζυμο σε ένα αριθμό δειγμάτων και σύγκριση των τμημάτων DNA που προκύπτουν, να εντοπίσουμε την ύπαρξη ή την απουσία μίας σημειακής μετάλλαξης.

Στη συγκεκριμένη εργασία για την πέψη του γονιδίου EGFR χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα, για τα 4 εξόνια που μελετήθηκαν.

Για το εξόνιο 18 χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο *ApaI* (10.000U/ml). Το ένζυμο αυτό πέπτει στο φυσιολογικό γονίδιο (wild-type) την αλληλουχία GGGCC που ενισχύθηκε προηγουμένως με την μέθοδο της PCR. Σε αντίθεση, η μεταλλαγμένη αλληλουχία (mutant) δεν πέπτεται εξαιτίας της αντικατάστασης βάσης που πραγματοποιείται σε αυτή. Συγκεκριμένα, υπάρχει αντικατάσταση της δεύτερης βάσης G από την παραπάνω αλληλουχία σε X.

5' . . . G G G C C ↓ C . . . 3'

3' . . . C ↓ C C G G G . . . 5'

Το μείγμα επωάζεται στους 37°C για 24 ώρες και στη συνέχεια το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.

Για το εξόνιο 20, χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο *NlaIII*(10.000U/ml). Το ένζυμο αυτό πέπτει την αλληλουχία CACG του μεταλλαγμένου τμήματος DNA (T790M) εξαιτίας της αντικατάστασης βάσης που πραγματοποιείται σε αυτή. Συγκεκριμένα, υπάρχει αντικατάσταση της τρίτης βάσης C > T από την παραπάνω αλληλουχία (GACG). Σε αντίθεση, η φυσιολογική αλληλουχία δεν πέπτεται.

5' . . . C A T G ↓ . . . 3'

3' . . . ↓ G T A C . . . 5'

Το μείγμα επωάζεται στους 37°C για 24 ώρες.

Για το εξόνιο 21 χρησιμοποιήθηκαν δύο περιοριστικά ένζυμα, το MscI (10.000U/ml) και το PvuII (10.000U/ml). Το MscI ένζυμο πέπτει τη φυσιολογική αλληλουχία TGGCCA. Η μεταλλαγμένη αλληλουχία δεν πέπτεται εξαιτίας της αντικατάστασης βάσης που πραγματοποιείται σε αυτή. Στη θέση αυτή εμφανίζεται η μετάλλαξη L858R. Συγκεκριμένα στην παραπάνω αλληλουχία υπάρχει αντικατάσταση της πρώτης βάσης T > G. Παράλληλα το ένζυμο PvuII αναγνωρίζει και πέπτει την μεταλλαγμένη αλληλουχία CAGCTG, που έχει ως σκοπό το διαχωρισμό της μεταλλαγμένης αλληλουχίας L861Q από τη φυσιολογική η οποία δεν πέπτεται.



Το μείγμα επωάζεται στους 37°C για 24 ώρες περίπου και στη συνέχεια το προϊόν της πέψης ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3%.

Αντιδραστήρια	Όγκος/Δείγμα
Ένζυμο (10000u/ml)	3μl
10*buffer	6μl
H ₂ O	41μl
Προϊόν PCR	10μl

Ο τελικός όγκος στην αντίδραση επώασης είναι 60μl μετά τα αντιδραστήρια

Για την πέψη του γονιδίου K-ras χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο BstNI (10.000U/ml) με την εξής θέση αναγνώρισης :



Όπως υποδεικνύεται και από τη θέση αναγνώρισης το ένζυμο θα κόψει τα ενισχυμένα τμήματα DNA που φέρουν οποιαδήποτε μετάλλαξη του

φυσιολογικού κωδικονίου GGT ενώ θα αφήσουν ανέπαφα τα ενισχυμένα τμήματα DNA που φέρουν το φυσιολογικό κωδικόνιο 12 (GGT) .

Αντιδραστήρια	Όγκος/Δείγμα
Ένζυμο (10000u/ml)	3μl
10*buffer	6μl
H ₂ O	26μl
Προϊόν PCR	20μl

Το μείγμα της πέψης έχει τελικό όγκο 60 μl και επωάζεται στους 60 °C για 16 ώρες. Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.

ΣΤ. Ανάλυση πρωτοταγούς αλληλουχίας (Sequencing):

Αναλύσαμε την αλληλουχία των περιοχών που ενισχύθηκαν επιλεκτικά με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) προκειμένου να εντοπίσουμε τυχόν μεταλλαγές που δεν ανιχνεύθηκαν με περιοριστικά ένζυμα.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

Το προϊόν PCR καθαρίστηκε με το Qiaquick PCR purification kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και ηλεκτροφορήθηκε παρουσία μάρτυρα γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους (100bp, New England Biolabs) σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Με βάση το μοριακό βάρος (ng) κάθε ζώνης του μάρτυρα εκτιμήθηκε η συγκέντρωση των καθαρισμένων προϊόντων PCR. Στη συνέχεια, ποσότητα του καθαρισμένου προϊόντος PCR ενισχύθηκε επιλεκτικά με κατάλληλα σημασμένους εκκινητές για να αναλυθεί στη συνέχεια.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	Καθαρισμένο PCR	Sequencing mix (ABI BigDye Terminators)	Εκκινητές 2F/2R	H ₂ O
ΟΓΚΟΣ/ ΔΕΙΓΜΑ	x [*]	4 μl	1 μl	y [*]

- x^{*} → η ποσότητα (ng) που πρέπει να βάλω από το συγκεκριμένο προϊόν PCR στην αντίδραση ανάλογα με πυκνότητα του δείγματος για να διαβάσει τη συγκεκριμένη αλληλουχία, σύμφωνα με τον κανόνα ng=0,1 x bp που προτείνεται.

- y^{*} → η ποσότητα νερού έτσι ώστε να έχουμε να τελικό όγκο αντίδρασης 10μl

Οι συνθήκες της PCR είναι:

95 °C → 20 δευτερόλεπτα , στάδιο αποδιάταξης	} x 25 κύκλοι
50 °C → 15 δευτερόλεπτα, στάδιο υβριδοποίησης	
60 °C → 60 δευτερόλεπτα, στάδιο επιμήκυνσης	

Ακολουθεί καθαρισμός των αντιδράσεων με Sephadex ως εξής:

Παρασκευή διαλύματος Sephadex :

- Διαλύω 0,5gr σε 8ml dd H₂O
- Αναδεύω 30 λεπτά διατηρώντας το Sephadex σε πάγο.

Καθαρισμός με Sephadex:

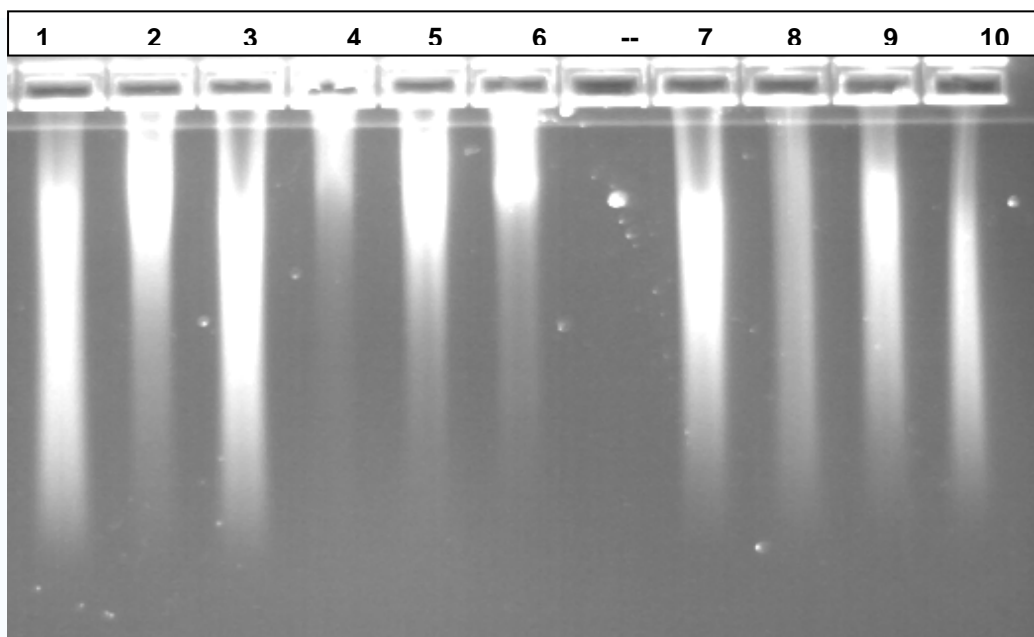
- Μεταφέρω 600-700 μl υγρού Sephadex σε στήλη.
- Φυγοκεντρώ για 3 λεπτά στις 3470 στροφές στους 8 °C.
- Πετάω το νερό που έχει περάσει από τη στήλη και η στήλη είναι έτοιμη.
- Φορτώνω προσεκτικά 10μl του PCR στη στήλη και αφήνω για 15 λεπτά στον πάγο και σε σκοτάδι.
- Φυγοκεντρώ για 3 λεπτά στις 3470 στροφές στους 8 °C.

Μετά τον καθαρισμό φορτώνω το προϊόν που εκλούεται από τη στήλη σε πλάκα 96 θέσεων και το τοποθετώ αναλυτή Megabase 1000 Amersham.

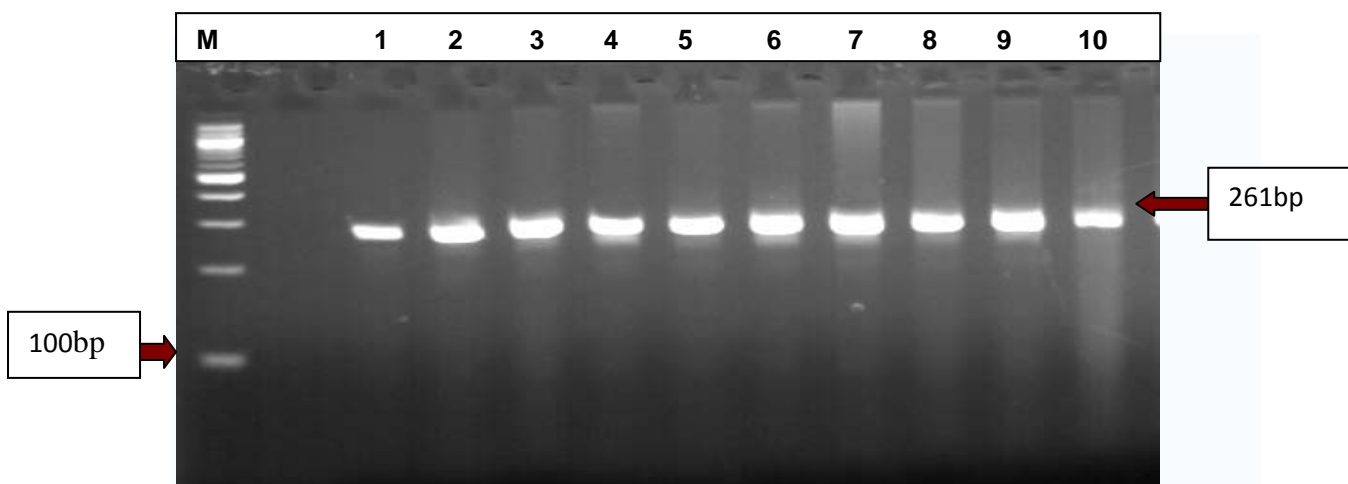
Z. Αποτελέσματα

Μελετήθηκαν 30 περιστατικά από το αρχείο του τμήματος Παθολογικής Ανατομικής. Ταξινομήθηκαν σε ομάδες ανάλογα με την ιστολογική τους έκθεση. Την πρώτη ομάδα (Α) αποτέλεσαν άτομα με φυσιολογικές ωοθήκες, η δεύτερη ομάδα (Β) περιλάμβανε άτομα με ορώδες κυσταδένωμα ωοθήκης και στην τρίτη ομάδα (Γ) εντάχθηκαν ασθενείς με βλεννώδες κυσταδένωμα ωοθήκης.

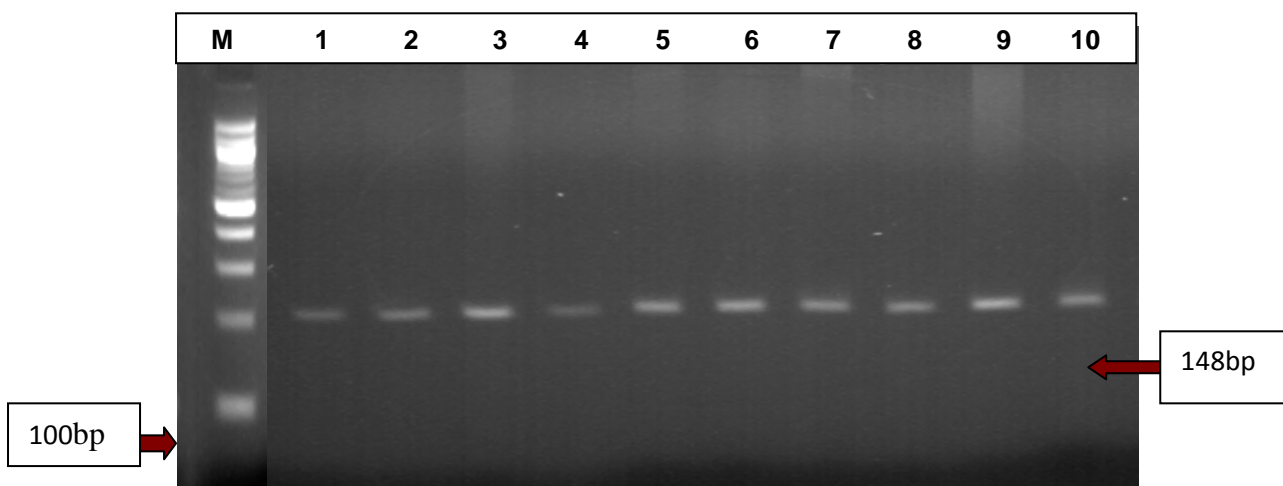
Σε όλα τα περιστατικά έγινε απομόνωση γενωμικού υλικού και ακολούθησε επιλεκτική ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων των γονιδίων EGFR και K-ras με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και τη χρήση κατάλληλων εκκινήτων. Ακολούθησε ανίχνευση των πιθανών μεταλλάξεων με τη χρήση κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων και ανάλυση της πρωτοταγούς αλληλουχίας για την πιθανή εύρεση νέων μεταλλάξεων.



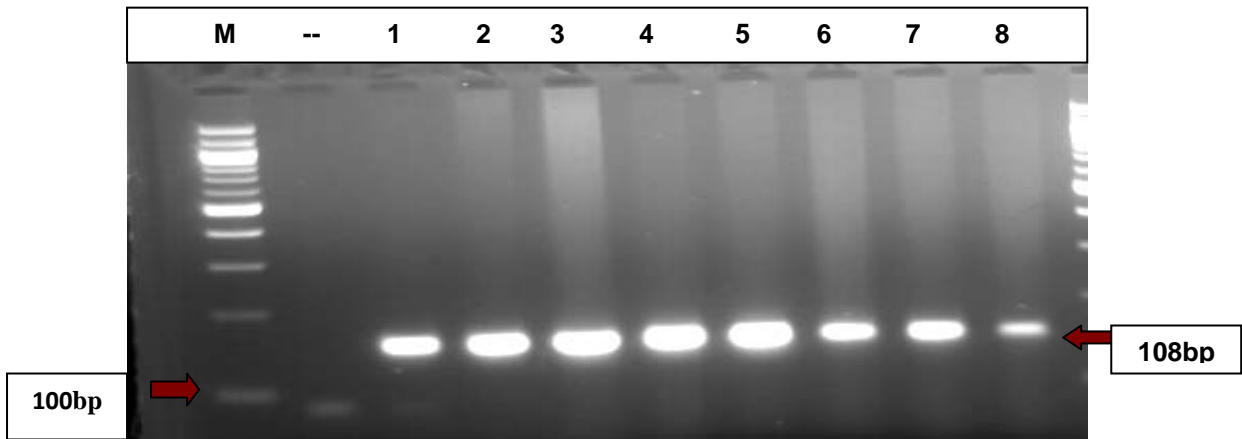
Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA παραφίνης της σε πήκτωμα αγαρόζης.1%. Το DNA εμφανίζεται κατακερματισμένο.



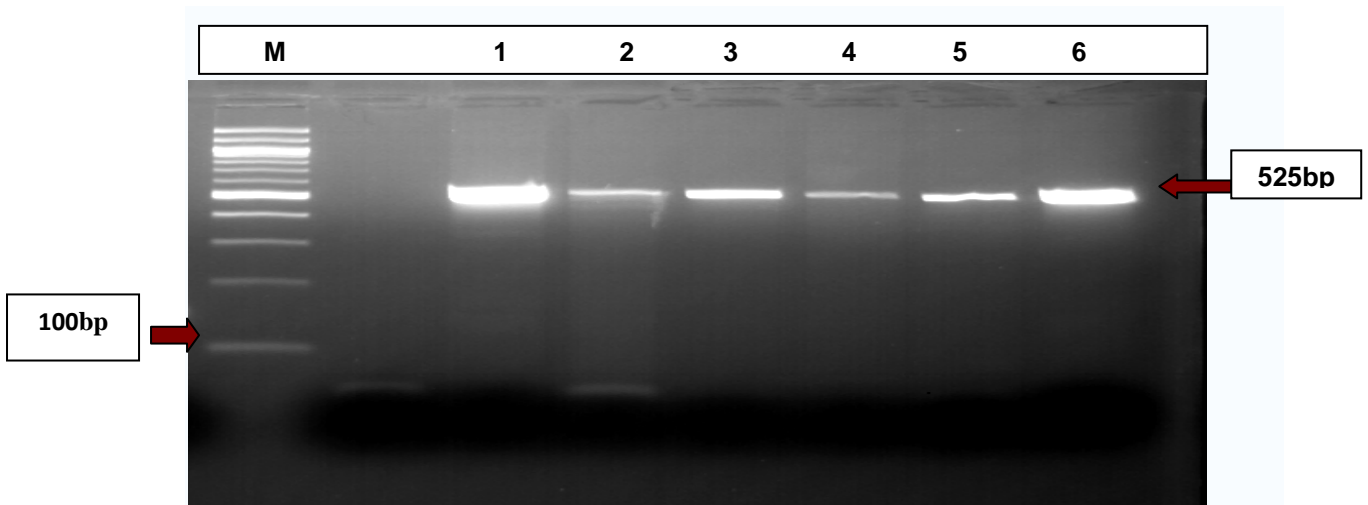
Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση PCR των δειγμάτων για το γονίδιο EGFR για το εξόνιο 18 σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp. Το μέγεθος του κομματιού είναι 261bp.



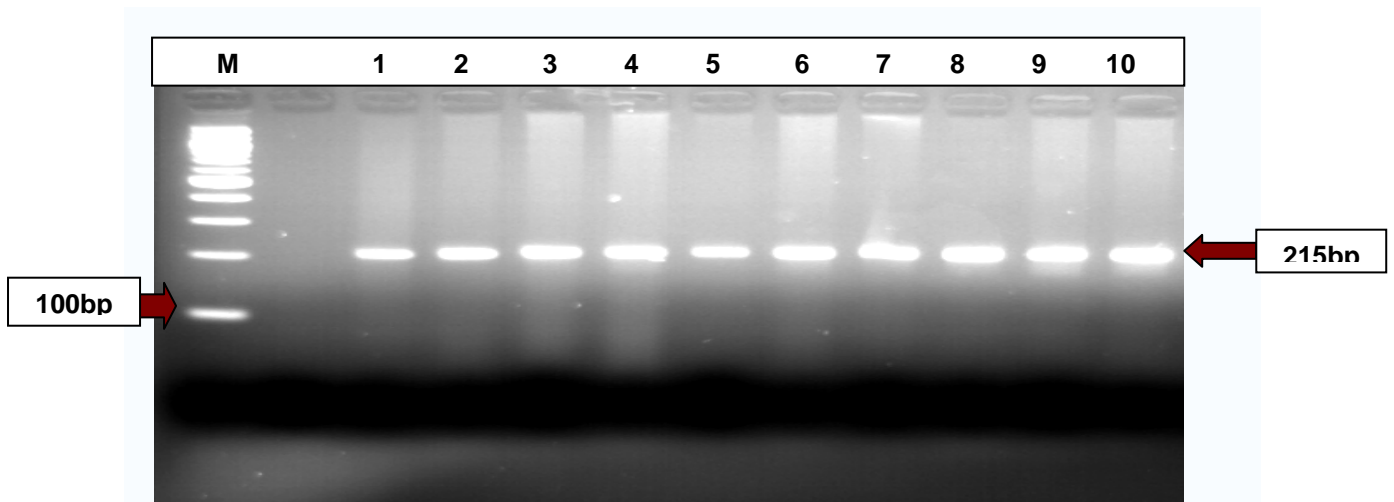
Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση PCR των δειγμάτων για το γονίδιο EGFR για το εξόνιο 19 σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp. Το μέγεθος του κομματιού είναι 148bp.



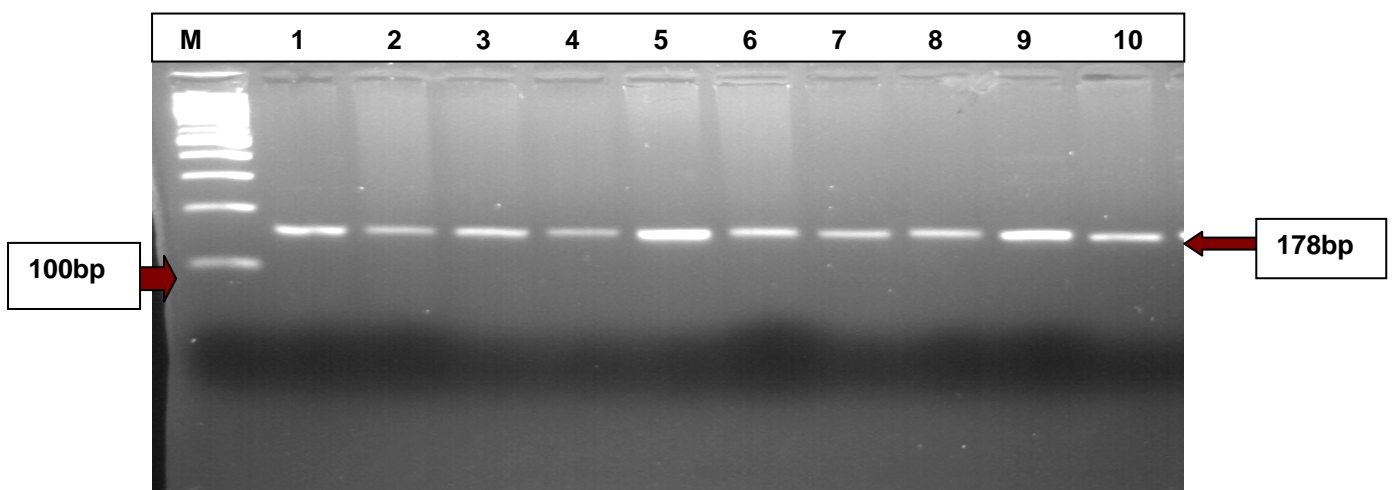
Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση PCR των δειγμάτων για το γονίδιο EGFR για το εξόνιο 20 σε πήκτωμα αгарόζης 3%. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp. Το μέγεθος του κομματιού είναι 108bp.



Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση PCR των δειγμάτων για το γονίδιο EGFR για το εξόνιο 21 σε πήκτωμα αгарόζης 2%. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp. Το μέγεθος του κομματιού είναι 525bp.

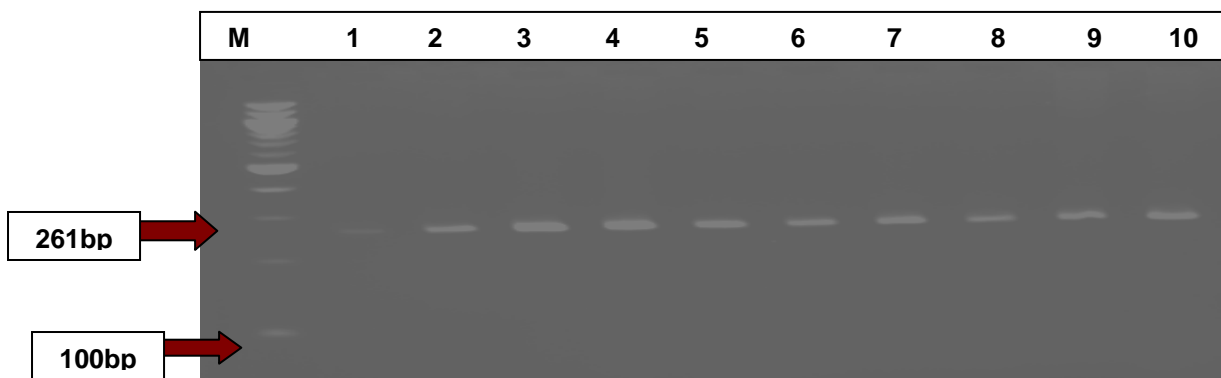


Εικόνα 21: Ηλεκτροφόρηση PCR των δειγμάτων για το γονίδιο K-ras. Για την ενίσχυση χρησιμοποιήθηκε το ζευγάρι των εκκινητών 2F-12b. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp. Το μέγεθος του κομματιού είναι 215 bp και ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.

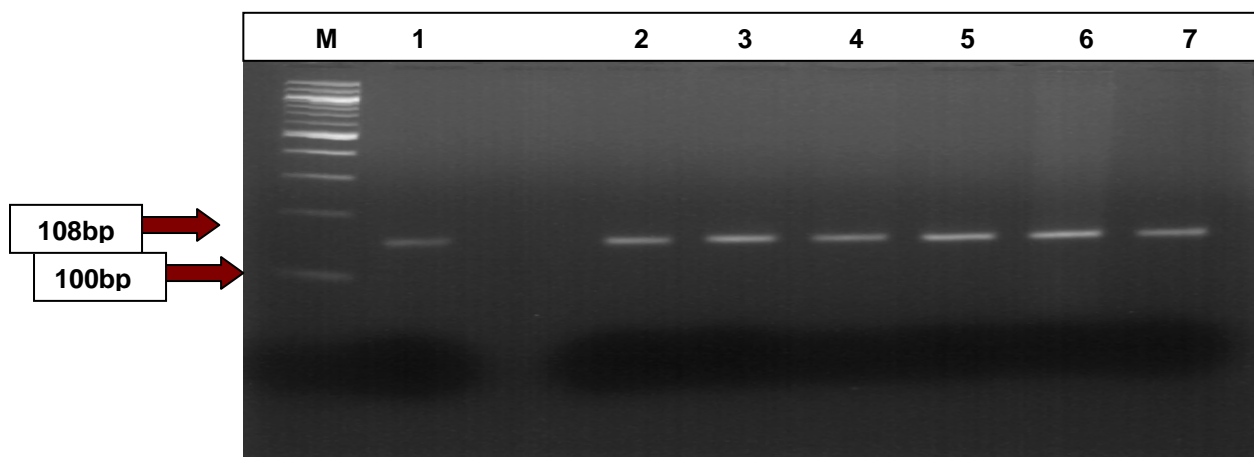


Εικόνα 22: Ηλεκτροφόρηση PCR των δειγμάτων για το γονίδιο K-ras. Για την ενίσχυση χρησιμοποιήθηκε το ζευγάρι των εκκινητών 12a-12b. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp. Το μέγεθος του κομματιού είναι 178 bp και ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.

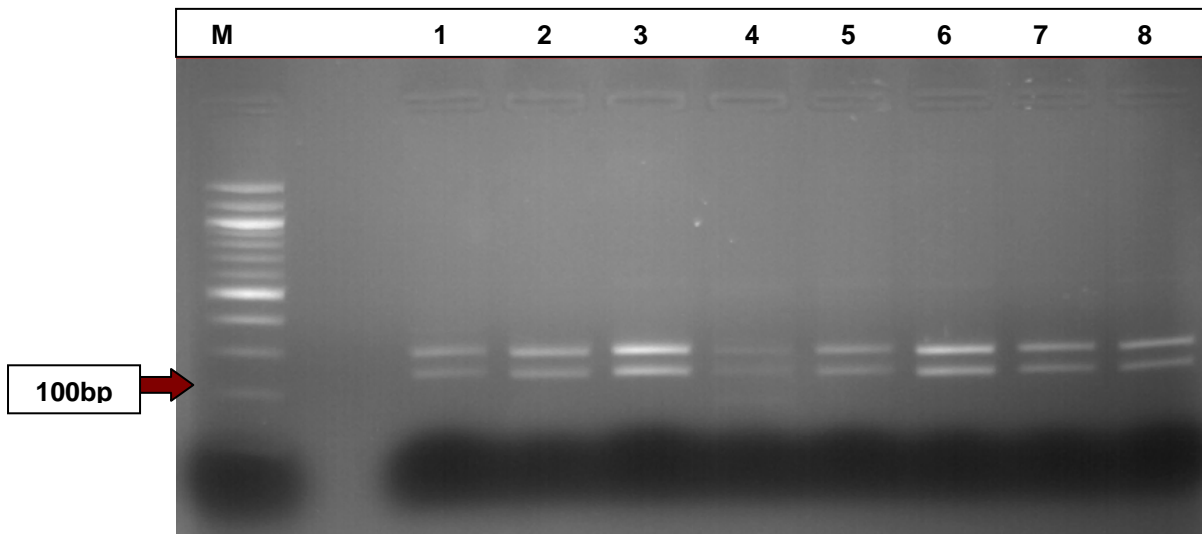
Ακολούθησε η χρήση των περιοριστικών ενζύμων *ApaI*, *NlaIII*, *Pvu* και *MscI* για την ανίχνευση των μεταλλαγών στα εξόνια 18, 20 και 21 αντίστοιχα του γονιδίου EGFR, ενώ για το γονίδιο K-ras χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *BstNI* για την ανίχνευση των μεταλλαγών στο εξόνιο 2 στα κωδικόνια 12 και 13.



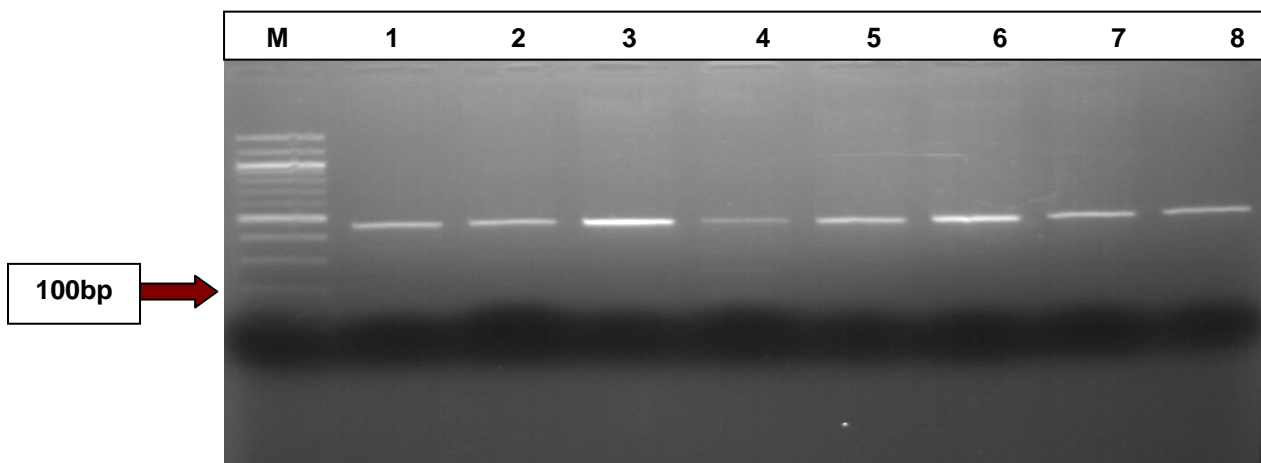
Εικόνα 23: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πέψης των δειγμάτων με το ένζυμο ApaI για το γονίδιο EGFR για το εξόνιο 18. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp και ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.



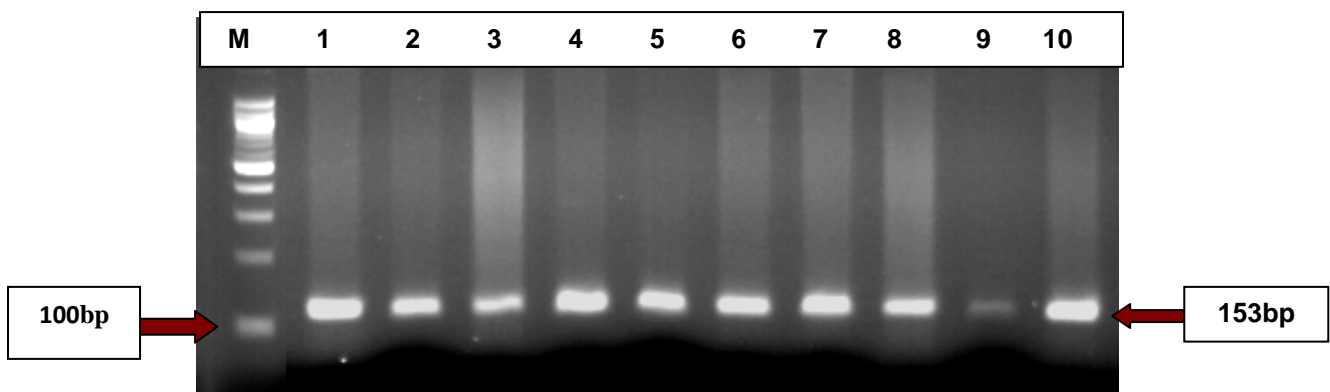
Εικόνα 24: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πέψης των δειγμάτων με το ένζυμο NlaIII για το γονίδιο EGFR για το εξόνιο 20. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp και ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.



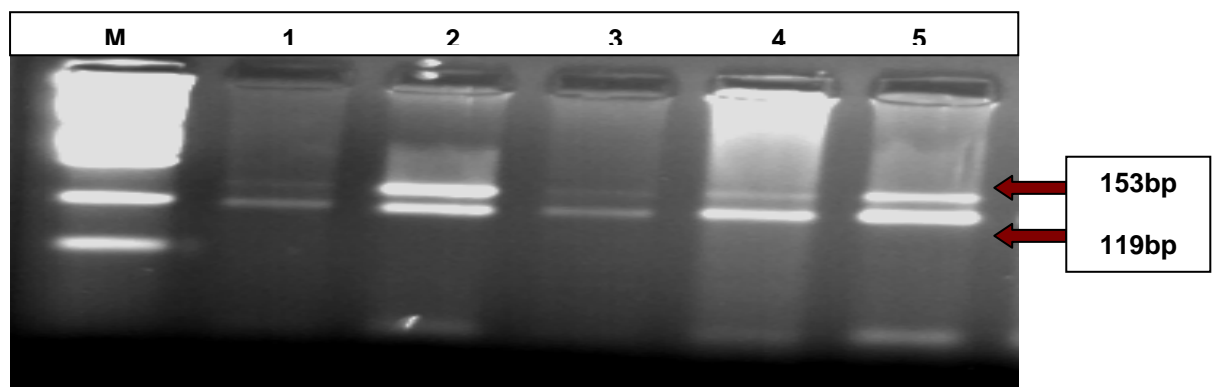
Εικόνα 25: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πέψης των δειγμάτων με το ένζυμο MscI για το γονίδιο EGFR για το εξόνιο 21. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp και ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.



Εικόνα 26: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πέψης των δειγμάτων με το ένζυμο PvuII για το γονίδιο EGFR για το εξόνιο 21. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp και τρέχτηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

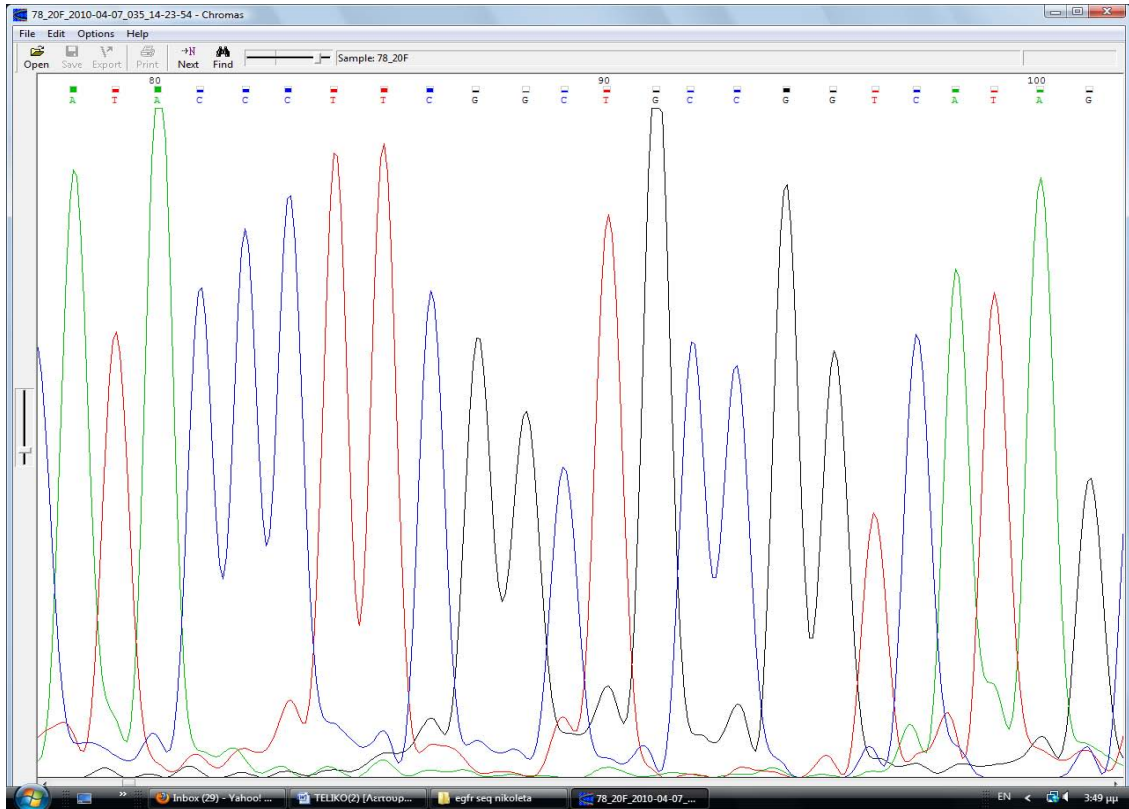


Εικόνα 27: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πέψης των δειγμάτων με το ένζυμο BstNI για το γονίδιο KRAS. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp και τρέχτηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Όλα τα δείγματα είναι αρνητικά για μεταλλαγή στο κωδικόνιο 12.

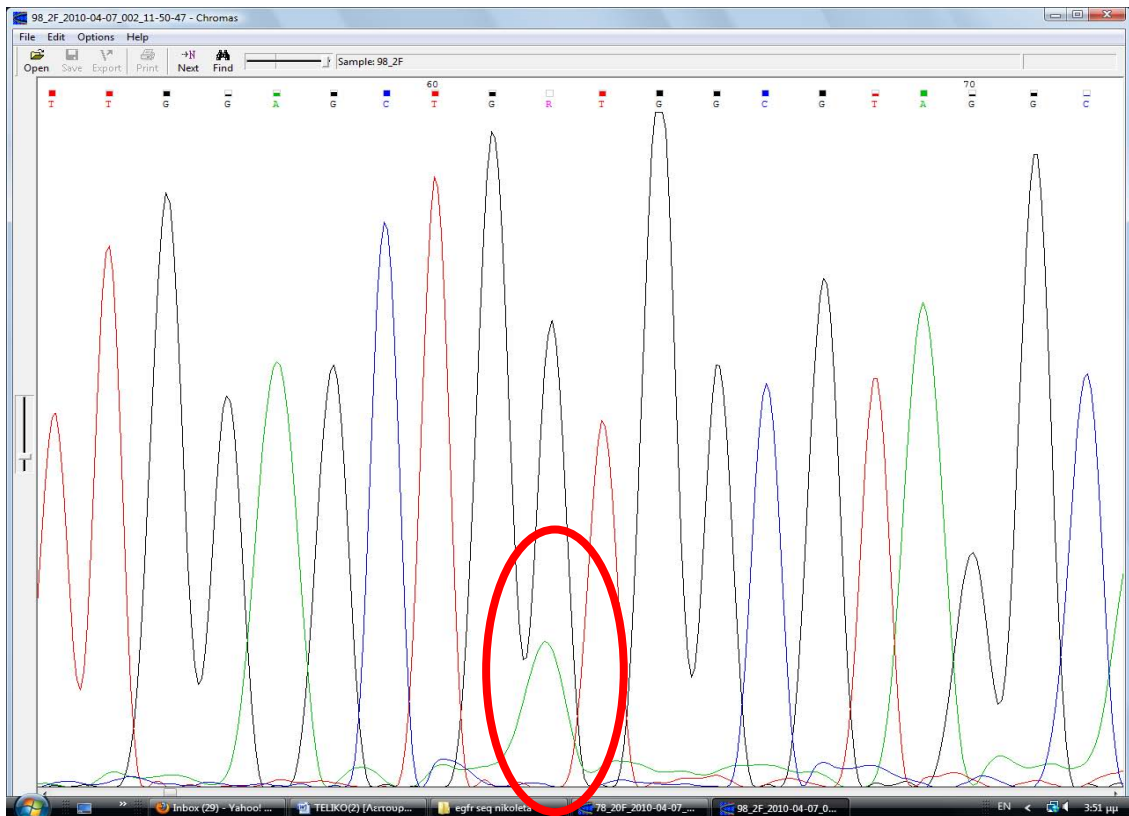


ΕΙΚΟΝΑ 28: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πέψης με το ένζυμο BstNI για το γονίδιο Kras. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp. Όλα τα δείγματα είναι θετικά για μεταλλαγή στο κωδικόνιο 12. Το γονίδιο που έχει τη μεταλλαγή κόβεται σε κομμάτια των 119bp και 34bp (πολύ μικρό για να φανεί στην ηλεκτροφόρηση).

Ακολούθησε ανάλυση της πρωτοταγούς αλληλουχίας των ενισχυόμενων τμημάτων προκειμένου να ανιχνευθούν είτε νέες μεταλλάξεις είτε μεταλλάξεις σε διαφορετικές περιοχές από αυτές που αναγνωρίζουν τα περιοριστικά ένζυμα.



Εικόνα 29: Ανάλυση πρωτοπαγούς αλληλουχίας εξονίου 20 του γονιδίου EGFR.



Εικόνα 30: Ανάλυση πρωτοπαγούς αλληλουχίας εξονίου 2 του γονιδίου K-ras. Σημειώνεται το κωδικόνιο 12 στο οποίο παρατηρείται η μετάλλαξη GGT>GAT.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες θανάτου. Είναι η πέμπτη αιτία θανάτου μεταξύ των γυναικών, ενώ πενταετής επιβίωση επιτυγχάνεται σε ποσοστό περίπου 45% των ασθενών.⁽¹⁰⁾ Τα ορώδη και τα βλεννώδη καρκινώματα είναι από τους πιο κοινούς τύπους κακοήθειας. Σε αυτού του είδους τις νεοπλασίες είναι συχνή η εμφάνιση μεταλλάξεων σε γονίδια που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια όπως αυτό των MAP κινασών. Δύο από τα πιο σημαντικά γονίδια στον καρκίνο των ωοθηκών είναι τα γονίδια KRAS και EGFR, καθώς σημειακές μεταλλάξεις τους μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά την μετάδοση του μηνύματος μέσω του μονοπατιού RAS→MEK→ERK.

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 30 δείγματα παραφινωμένου ιστού που περιλάμβαναν άτομα χωρίς κακοήθεια και άτομα με ορώδη και βλεννώδη κυσταδενώματα ωοθήκης. Από αυτά, 10 περιστατικά αφορούν ασθενείς χωρίς κακοήθεια, σύμφωνα πάντα με τα ιστολογικά ευρήματα, 10 περιστατικά αφορούν ασθενείς με ορώδη και 10 με βλεννώδη κυσταδενώματα.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την ύπαρξη μεταλλάξεων στα εξόνια 18-21 του γονιδίου EGFR. Τόσο η χρήση περιοριστικών ενζύμων για συγκεκριμένες μεταλλάξεις, όσο και η ανάλυση της πρωτοταγούς αλληλουχίας δεν έδειξαν μεταλλάξεις σε κανένα από τα δείγματα που μελετήθηκαν, γεγονός που συμφωνεί με τη μελέτη της Sylvania Stadlmann και των συνεργατών της αν και ο αριθμός των δειγμάτων μας δεν είναι πολύ μεγάλος που να επιτρέπει στατιστική ανάλυση των δειγμάτων.

Οι απόψεις για τα ποσοστά μεταλλάξεων στα τέσσερα εξόνια του EGFR γονιδίου σε καρκινώματα ωοθήκης δίστανται. Μελέτες όπως αυτή της Sylvania Stadlmann και των συνεργατών της αναφέρουν ότι σημειακές μεταλλάξεις στα εξόνια 18, 19, 20 και 21 είναι σπάνιες σε καρκινώματα ωοθήκης.⁽⁹⁴⁾ Άλλες μελέτες, όπως αυτή του Charles N. Landen και των συνεργατών του αναφέρουν ότι τα ποσοστά μεταλλαγών για τα τέσσερα εξόνια του EGFR γονιδίου κυμαίνεται μεταξύ 35-70%.⁽¹⁰⁾

Παράλληλα, μελετήσαμε τα ποσοστά μεταλλάξεων στο γονίδιο K-ras που ενεργοποιείται μέσω μηνυμάτων από τον EGFR υποδοχέα και αποτελεί μόριο κλειδί για την μεταγωγή σημάτων στο μονοπάτι RAS-RAF-MAP κινασών. Σύμφωνα με την πρόσφατη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το ποσοστό των μεταλλάξεων για το γονίδιο K-ras κυμαίνεται μεταξύ 30-50% σε καρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης, ενώ αντίθετα δεν παρατηρούνται ποσοστά μεταλλαγής σε υψηλής διαφοροποίησης όγκους.⁽⁷⁾ Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις του γονιδίου K-ras παρατηρείται σε ποσοστό 35% σε χαμηλής διαφοροποίησης ορώδη καρκινώματα και σε ποσοστό 33% σε οριακούς όγκους,⁽⁷⁾ ενώ αντίθετα το ποσοστό για ορώδη καρκινώματα υψηλής διαφοροποίησης κυμαίνεται μεταξύ 0-12%.⁽⁹⁵⁾ Όσον αφορά τα βλεννώδη κυσταδενώματα, στους οριακούς όγκους και στα καρκινώματα οι μεταλλάξεις του K-ras κυμαίνονται μεταξύ 33-86%.⁽⁴⁴⁾ Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων (>90%) συμβαίνει στο εξόνιο 2 του γονιδίου K-ras και συγκεκριμένα στα κωδικόνια 12 και 13 όπου εντοπίζονται πάνω από το 98% των μεταλλάξεων. Στους περισσότερους καρκίνους, τα γονίδια EGFR και K-ras είναι “αποκλειστικά μεταλλαγμένα” (mutually exclusive) δηλαδή δεν συνυπάρχουν μεταλλάξεις και στα δύο γονίδια ταυτόχρονα.

Στην παρούσα εργασία, μεταλλάξεις στο K-ras γονίδιο ανιχνεύτηκαν σε ποσοστό 10% στην ομάδα Α (φυσιολογικές ωοθήκες) ενώ το ποσοστό έφτασε στο 45% στα παθολογικά δείγματα (ομάδες Β, Γ). Όλες οι μεταλλάξεις εντοπίστηκαν στα κωδικόνια 12 και 13 του εξονίου 2 του γονιδίου. Στα 20 παθολογικά δείγματα που εξετάστηκαν (ορώδη, βλεννώδη καρκινώματα) τα 9 (45%) έφεραν μεταλλάξεις και μάλιστα 7 από αυτές ήταν στο κωδικόνιο 12 (78%) και 2 στο κωδικόνιο 13 (22%). Στο κωδικόνιο 13 και οι δύο μεταλλάξεις ήταν GGC>GAC που οδηγεί σε αμινοξική αλλαγή της γλυκίνης από ασπαραγίνη (Gly13Asp). Στο κωδικόνιο 12, τρεις μεταλλάξεις αφορούσαν αντικατάσταση γλυκίνης από βαλίνη (Gly12Val, GGT>GTT), δύο μεταλλάξεις αφορούσαν αντικατάσταση γλυκίνης από ασπαραγίνη (Gly12Asp, GGT>GAT), μία μετάλλαξη οδηγούσε σε αντικατάσταση γλυκίνης από κυστεΐνη (Gly12Cys, GGT>TGT) και μια μετάλλαξη είχε ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση γλυκίνης από αλανίνη (Gly12Ala, GGT>GCT).

Βέβαια, πρέπει να σημειωθεί ότι στην παρούσα εργασία δεν μπορούμε να κάνουμε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων λόγω του μικρού αριθμού των περιστατικών ανά κατηγορία (φυσιολογικές ωθήκες, ορώδη, βλεννώδη κυσταδενώματα. Ωστόσο, δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες αναφορικά με τα ποσοστά των μεταλλαγών στα δύο αυτά γονίδια σε καρκινώματα ωθήκης στον ελληνικό πληθυσμό. Τα ποσοστά μεταλλάξεων ποικίλουν στις μέχρι τώρα μελέτες γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη γεωγραφικής ετερογένειας και καταδεικνύει την ανάγκη για περαιτέρω μελέτες στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου με μεγαλύτερο αριθμό περιστατικών.

Ο καρκίνος των ωθηκών αποτελεί μία από τις βασικότερες κακοήθειες στο γυναικείο πληθυσμό. Η εύρεση νέων βιολογικών φαρμάκων, μονοκλωνικά αντισώματα και αναστολείς κινάσης τυροσίνης, καθιστά αναγκαία την περαιτέρω διερεύνηση των μορίων και των μηχανισμών που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια και μηχανισμούς καρκινογένεσης, προκειμένου να βρεθούν προβλεπτικοί και προγνωστικοί δείκτες, που θα μπορούν να εφαρμοστούν τόσο στον καρκίνο των ωθηκών όσο και ευρύτερα σε καρκίνους που ακολουθούν τους ίδιους μηχανισμούς καρκινογένεσης. Οι δείκτες αυτοί θα συμβάλλουν πιθανά στην πρόγνωση της ασθένειας σε αρχικά στάδια, στη βελτίωση των συμπτωμάτων της και στην αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. www.wikipedia.com
2. www.google.com
3. Βασική Παθολογοανατομία – Kumar Cotran Robbins
4. Elsevier Inc 2004 Rosai and Ackerman's Surgical Pathology 9E.
5. Ovarian Cancer: A clinical challenge that needs some basic answers, Kate Lawrenson, Simon A. Gayther February 2009.
6. Cancer mortality in Europe, 1995-1999, and an overview of trends since 1960. Levi F, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C (2004). Int J Cancer 110: 155-169.
7. A proposed model Based on Morphological and Molecular Genetic Analysis, Ie-Ming Shih, Robert J. Kurman, May 2004
8. Early detection and treatment of ovarian cancer : shifting from early stage to minimal volume of disease based on a new model of carcinogenesis/ Robert J. Kurman, Richard Roden, April 2008
9. Διακυπταρική Επικοινωνία Μεταγωγή Σήματος ,Αιμιλία Ζίφα 2007
10. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer, Charles N. Landen Jr, Michael J. Birrer, Anil K. Sood, February 2008.
11. Characteristics relating to ovarian cancer risk: Collaborative analysis of 12 US case-control studies. II Invasive epithelial ovarian cancers in white women, Whittermore AS, Harris R, Intyrre J, AM J Epidemiol 136: 1184-1203, 1992.
12. Parity, contraception, infertility, and the risk of epithelial ovarian cancer, Risch HA, Marrett LD, Howe GR, Am J Epidemiol 140: 585-597, 1994.
13. Risk factors for invasive epithelial ovarian cancer, results from a Swedish case-control study, Riman T, Dickman PW, Nilsson S, et al, Am J Epidemiol 156: 363-373, 2002.
14. Pregnancy, breast feeding, and oral contraceptives and the risk of epithelial ovarian cancer, Gwinn ML, Lee NC, Rhodes PH, et al, J Clin Epidemiol 43: 559-568, 1990.
15. An epidemiologic case-control study of ovarian cancer and reproductive factors, Nasca PC, Greenwald P, Chorost S, et al, J Clin Epidemiol 119: 705-713, 1984.

- 16.** Follicle-stimulating hormone activates mitogen-activated protein kinase in preneoplastic and neoplastic ovarian surface epithelial cells, Choi JH, Choi KC, Auersperg N, et al: *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5508-5516, 2004.
- 17.** Epithelial ovarian cancer risk among women with polycystic ovary syndrome, Schildkraut JM, Schwingl PJ, Bastos E, et al, *Obstet Gynecol* 88: 554-559, 1996.
- 18.** Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer, Ness RB, Cottreau C, *J Natl Cancer Inst* 91: 1459-1467, 1999.
- 19.** The hallmarks of cancer, Hanahan D, Weinberg RA, *Cell* 100:57-70, 2000.
- 20.** The prognostic value of epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer, Bartlett JM, Langdon SP, Simpson BJ, et al, *Br J Cancer* 73:301-306, 1996.
- 21.** Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma, Singer G, Oldt R, Cohen Y, et al, *J Natl Cancer Inst* 95:484-486, 2003.
- 22.** Mutation of KRAS protooncogene and loss of heterozygosity on 6q27 in serous and mucinous ovarian carcinomas, Suzuki M, Saito S, Saga Y, et al, *Cancer Genet Cytogenet* 118:132-135, 2000.
- 23.** Telomerase as a prognostic marker in breast cancer. High-throughput tissue microarray analysis of hTERT and hTR, Poremba C, Heine B, Diallo R, et al, *J Pathol* 198:181-189, 2002.
- 24.** Implications of EGFR inhibition in ovarian cancer cell proliferation, Shawna L. Bull Phelps, John O. Schorge, Michael J. Peyton, Hisayuki Shigematsu, Li-Lin Xiang, David S. Miller, Jayanthi S. Lea, 2008.
- 25.** Clinical implications of the ErbB/epidermal growth factor (EGF) receptor family and its ligands in ovarian cancer, Jacqueline M. Lafky, Jason A. Wilken, Andre T. Baron, Nita J. Maihle, 2008
- 26.** Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells, A. Ullrich, L. Coussens, J.S. Hayflick, T.J. Dull, A. Gray, A.W. Tam, J. Lee, Y. Yarden, T.A. Libermann, J. Schlessinger, *Nature* 309(1984) 418-425.
- 27.** Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene, L. Coussens, T.L. Yang-

Feng, Y.C. Liao, E. Chen, A. Gray, J.McGrath, P.H. Seeburg, T.A. Libermann, J. Schlessinger, U. Francke, *Science* 230(1985) 1132-1139.

28. A v-erbB-related protooncogene, c-erbB2, is distinct from the c-erbB1/epidermal growth factor receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma, K. Semba, N. Toyoshima, T. Yamamoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82(1985) 6497-6501.

29. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family, W.X. Schulze, L. Deng, M. Mann, *Mol. Syst. Biol.* 1:2005.0008(2005).

30. Localization of a major receptor-binding domain for the epidermal growth factor by affinity labelling, I. Lax, W.H. Burgess, F. Bellot, A. Ullrich, J. Schlessinger, D. Givol, *Mol Cell. Biol.* 8(1988) 1831-1834.

31. Growth factor receptor tyrosine kinases, Y. Yarden, A. Ullrich, *Annu. Rev. Biochem.* 57(1988) 443-478

32. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity, A. Ullrich, J. Schlessinger, *Cell* 61(1990) 203-212.

33. Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor, J. Downward, P. Parker, M.D. Waterfield, *Nature* 311(1984) 483-485.

34. The epidermal growth factor receptor gene and its product, T. Hunter, *Nature* 311(1984) 414-416.

35. Protein-tyrosine kinases, T. Hunter, J.A. Cooper, *Annu. Rev. Biochem.* 54(1985) 897-930.

36. Protein kinase C phosphorylation at Thr 654 of the unoccupied EGF receptor and EGF binding regulate functional receptor loss by independent mechanisms, C.R. Lin, W.S. Chen, C.S. Lazar, C.D. Carpenter, G.N. Gill, R.M. Evans, M.G. Rosenfeld, *Cell* 44(1986) 839-848.

37. The juxtamembrane regions of the epidermal growth factor receptor and gp185erbB2 determine the specificity of signal transduction, O. Segatto, F. Lonardo, D. Wexler, F. Fazioli, J. H. Pierce, D. P. Bottaro, M.F. White, P.P. Di Fiore, *Mol. Cell. Biol.* 11(1991) 3191-3202.

38. Receptor signalling: when dimerization is not enough, G. Jiang, T. Hunter, *Curr Biol.* 9(1999) R568-R571.

39. Non-catalytic domains of cytoplasmic protein-tyrosine kinases: regulatory elements in signal transduction, T. Pawson, *Oncogene* 3 (1988) 491-495.

- 40.** Soluble ErbB receptors (Segfr/sErbBs): serum biomarkers in breast and ovarian cancer, in: E.P. Diamandis, H.A. Fritsche, H. Lilja, D.W. Chan, M.K. Schwartz (Eds.), *Tumor markers: Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications*, AACR Press J.M. Lafky, T.M. Greenwood, A.T. Baron, C.H. Borden, E.M. Cora, N.J. Mahle, Washington, DC, 2002, pp. 427-431.
- 41.** Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor, S.Y. Lin, K. Makino, W. Xia, A. Martin, Y. Wen, K.Y. Kwong, L. Bourguignon, M.C. Hung, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 802-808.
- 42.** Characterization of epidermal growth factor receptor gene expression in malignant and normal human cell lines, Y.H. Xu, N. Richert, S. Ito, G. T. Merlino, I. Pastan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81(1984) 7308-7312.
- 43.** Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor, H. Gregory, *Nature* 257(1975) 325-327.
- 44.** Transforming growth-factor alpha: an oncogene developmental growth factor, D.S. Salomon, N. Kim, T. Saeki, F. Ciardiello, *Cancer Cells* 2 (1990) 389-397.
- 45.** Membrane-anchored growth factors, J. Massague, A. Pandiella, *Annu. Rev. Biochem.* 62(1993) 515-541.
- 46.** Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family, M. Shoyab, G.D. Plowman, V.L. McDonald, J.G. Bradley, G.J. Todaro, *Science* 243(1989) 1074-1076.
- 47.** Epidermal growth factor, G. Carpenter, S. Cohen, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 7709-7712.
- 48.** Amphiregulin inducing tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor and p185erbB2. Evidence that amphiregulin acts exclusively through the epidermal growth factor receptor at the surface of human epithelial cells, G.R. Johnson, B. Kannan, M. Shoyab, K. Stromberg, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 2924-2931.
- 49.** Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding the human heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor? Diphtheria toxin receptor, Z. Fen, M.S. Dhady, M. Yoshizumi, R.J. Hilker, T. Quertermous, R.L. Eddy, T.B. Shows, M.E. Lee, *Biochemistry (Mosc)* 32 (1993) 7932-7938.

- 50.** Activation of HER4 by heparin-binding EGF-like growth factor stimulates chemotaxis but not proliferation, K. Elenius, S. Paul, G. Allison, J. Sun, M. Klagsbrun, *EMBO J.* 16 (1997) 1268-1278.
- 51.** Activation of ErbB4 by the bifunctional epidermal growth factor family hormone epiregulin is regulated by ErbB2, D.J. Riese II, T. Komurasaki, G.D. Plowman, D.F. Stern, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 11288-1294.
- 52.** Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor, Y. Yarden, J. Schlessinger, *Biochemistry (Mosc)* 26 (1987) 1443-1451.
- 53.** Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for the model of intermolecular allosteric activation, Y. Yarden, J. Schlessinger, *Biochemistry (Mosc)* 26 (1987) 1434-1442.
- 54.** Heterodimerization of the erbB1 and erbB2 receptors in human breast carcinoma cells: a mechanism for receptor transregulation, R. Goldman, R.B. Levy, E. Peles, Y. Yarden, *Biochemistry (Mosc)* 29 (1990) 11024-11028.
- 55.** Intermolecular association of the p185neu protein and EGF receptor modulates EGF receptor function, T. Wada, X.L. Qian, M.I. Greene, *Cell* 61(1990) 1339-1347.
- 56.** A neu acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signalling, K.L. Carraway III, L.C. Cantley, *Cell* 78(1994) 815-824.
- 57.** The ErbB signalling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions, I. Alroy, Y. Yarden, *FEBS Lett* 410(1997) 83-86.
- 58.** Neuregulins and their receptors: a versatile signalling module in organogenesis and oncogenesis, Burden, Y Yarden, *Neuron* 18(1997) 847-855.
- 59.** The ErbB signalling network: receptor heterodimerization in development and cancer, M.A. Olayioye, R.M. Neve, H.A. Lane, N.E. Hynes, *EMBO J.* 19 (2000) 3159-3167.
- 60.** Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy, E. Raymond, S. Faivre, J.P. Armand, *Drugs* 60(suppl 1) (2000) 15-23 discussion 41-12.

- 61.** Cell signalling by receptor tyrosine kinases, J. Schlessinger, *Cell* 103 (2000) 211-225.
- 62.** EGF-ERBB signalling: towards the systems level, A. Citri, Y. Yarden, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7(2006) 505-516.
- 63.** Epidermal growth factor receptor(EGFR) signalling in cancer, N. Normanno, nco, A. De Luca, C. Bianco, L. Strizzi, M. Mancino, M.R. Maiello, A. Carotenuto, G. De Feo, F. Caponigro, D.S. Salomon, *Gene* 366(2006) 2-16.
- 64.** The EGF receptor family: spearheading a merger of signalling and therapeutics, E.M. Bublil, Y. Yarden, *Curr. Opin. Cell Biol.* 19(2007) 124-134
- 65.** The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification, N. Prenzel, O.M. Fischer, S. Streit, S. Hart, A. Ullrich, *Endocr. Relat. Cancer* 8(2001) 11-31.
- 66.** Cellular localization of human epidermal growth factor receptor, B. Gusterson, G. Cowley, J.A. Smith, B. Ozanne, *Cell Biol. Int. Rep.* 8 (1984) 649-658.
- 67.** Epidermal growth factor receptor expression in normal ovarian epithelium and ovarian cancer. I. Correlation of receptor expression with prognostic factors in patients with ovarian cancer, A. Berchuck, G.C Rodriguez, A. Kamel, R.K. Dodge, J.T. Soper, D.L. Clarke-Pearson, R.C. Bast Jr., *Am J. Obstet. Gynecol.* 164(1991) 669-674.
- 68.** Expression of epidermal growth factor receptor in normal ovary and in ovarian tumors, C.J. Stewart, O.J. Owens, .J.A. Richond, A.M. McNicol, *Int. J. Gynecol. Pathol.* 11(1992) 266-272.
- 69.** Immunohistochemical localization of c-erbB2 protein and epidermal growth factor receptor in normal surface epithelium, surface inclusion cysts, and common epithelial tumors of the ovary, D.P. Wang, I. Konishi, M. Koshiyama, Y. Nanbu, T. Iwai, H. Nonogaki, T. Mori, S. Fujii, *Virchows ro*
- 70.** Occurrence of epidermal growth factor receptors in benign and malignant ovarian tumors and normal ovarian tissues: an immunohistochemical study, S.C. Henzen-Longmans, M.E. van der Burg, J.A. Foekens, P.M. Berns, R. Brusse, J.H. Fieret, J.G. Klijn, S. Chadha, C.J. Rodenburg, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118(1992) 303-307.

- 71.** Epidermal growth factor receptor in ovarian tumors: correlation of immunohistochemistry with ligand binding assay, S.C. Henzen-Longmans, M.E. van der Burg, J.A. Foekens, E.M. Berns, J.G. Klijn, *Br.J. Cancer* 66(1992) 1015-1021.
- 72.** Ki-67 staining in benign, borderline, malignant primary and metastatic ovarian tumors: correlation with steroid receptors, epidermal growth factor receptor and cathepsin D, S.C. Henzen-Longmans, M.E. van der Burg, J.A. Foekens, E.M. Berns, J.G. Klijn, E.J. Fieret, *Int. J. Cancer* 57(1994) 468-472.
- 73.** Immunoreactivity of antibodies to epidermal growth factor, transforming growth factors alpha and beta, and epidermal growth factor receptor in the premenopausal ovary, J.P. Scurry, K.A. Hamand, S.B. Astley, R.E. Leake, M. Wells, *Pathology(Phila)* 26(1994) 130-133.
- 74.** Frequent immunohistochemical detection of EGF supergene family members in ovarian carcinogenesis, K. Stromberg, G.R. Johnson, D.M. O'Connor, C.M. Sorensen, W.J. Gullick, B. Kannan, *Int. J. Gynecol. Pathol.* 13(1994)342-347.
- 75.** Coexpression of the HER2 gene product, p185HER2, and epidermal growth factor receptor, p170EGF, on epithelial ovarian cancers and normal tissues, R.C. Bast Jr, L. Pusztai, B.J. Kerns, J.A. MacDonald, P. Jordan, L. Daly, C.M. Boyer, J. Mendelsohn, A. Berchuck, *Hybridoma* 17(1998) 313-321.
- 76.** Expression and action of transforming growth factor alpha in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer, V. Doraiswamy, J.A. Parrott, M.K. Skinner, *Biol. Reprod.* 63(2000)789-796.
- 77.** The expression of EGF receptors, EGF-like factors and c-myc in ovarian and cervical carcinomas and their potential clinical significance, M. Kohler, I. Janz, H.O. Wintzer, E. Wagner, T. Bauknecht, *Anticancer Res.* 9 (1989) 1537-1547.
- 78.** Expression of metastasis-related nm23-H1 and nm23H2 genes in ovarian carcinomas: correlation with clinicopathology, EGFR, c-erbB2, and erbB3 genes, and sex steroid receptor expression, M. Mandai, I. Konishi, M. Koshiyama, T. Mori, S. Arao, H. Tashiro, H. Okamura, H. Nomura, H. Hiai, M. Fukumoto, *Cancer Res.* 54(1994) 1825-1830.

- 79.** C-erbB growth factor receptor proteins in ovarian tumours, B.J. Simpson, H.A. Phillips, A.M. Lessells, S.P. Langdon, W.R. Miller, *Int. J. Cancer* 64(1995) 202-206.
- 80.** Overexpression and relationships of HER2/neu, epidermal growth factor receptor, p53, Ki-67, and tumour necrosis factor alpha in epithelial ovarian cancer, B.A. Goff, K. Shy, B.E. Greer, H.G. Muntz, M. Skelly, A.M. Gown, *Eur. J. Gynecol. Oncol.* 17(1996) 487-492.
- 81.** The growth factor receptors HER2/neu and EGFR, their relationship, and their effects on the prognosis in early stage (FIGO I-II) epithelial ovarian carcinoma, I. Skirnisdottir, B. Sorbe, T. Seidal, *Int. J. Gynecol. Cancer* 1(2001) 119-129.
- 82.** Expression of epidermal growth factor receptors in human cervical, ovarian, and vulval carcinomas, W.J. Gullick, J.J. Marsden, N. Whittle, B. Ward, L. Bobrow, M.D. Waterfield, *Cancer Res* 46(1986) 285-292.
- 83.** Clinical significance of oncogenes and growth factors in ovarian carcinomas, T. Bauknecht, G. Birmelin, F. Kommos, J. Steroid. *Biochem. Mol. Biol.* 37(1990) 855-862.
- 84.** Immunolocalization of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product in human ovarian carcinoma, K. Ito, H. Sasano, N. Ozawa, S. Sato, S.G. Silverberg, A. Yajima, *Int. J. Gynecol. Pathol.* 11(1992) 253-257.
- 85.** Expression of epidermal growth factor-related proteins and epidermal growth factor receptor in common epithelial ovarian tumours, H. Niikura, H. Sasano, S. Sato, A. Yajima, *Int. J. Pathol.* 16(1997) 60-68.
- 86.** Epidermal growth factor receptor expression has no independent prognostic significance in advanced ovarian cancer, M. Baekelandt, G.B. Kristensen, C.G. Trope, J.M. Nesland, R. Holm, *Anticancer Res.* 19(1999) 4469-4474.
- 87.** Prognostic significance of p53, HER2, and EGFR overexpression in borderline and epithelial ovarian cancer, J.S. Nielsen, E. Jakobsen, K. Bertelsen, A. Jakobsen, *Int. J. Gynecol. Cancer* 14(2004) 1086-1096.
- 88.** A new prognostic model comprising p53, EGFR, and tumour grade in early stage epithelial ovarian carcinoma and avoiding the problem of

inaccurate surgical staging, I. Skirnisdottir, T. Seidal, B. Sorbe, *Int. J. Gynecol. Cancer* 14(2004) 259-270.

89. Effect of epidermal growth factor receptor expression level on survival in patients with epithelial ovarian cancer, A. Psyrri, M. Kassir, Z. Yu, A. Bamias, P.M. Weinberger, S. Markakis, D. Kowalski, R.L. Camp, D.L. Rimm, M.A. Dimopoulos, *Clin. Cancer Res.* 11(2005) 8637-8643.

90. Clinical and biological characteristics of clear cell carcinomas of the ovary in FIGO stages I-II, I. Skirnisdottir, T. Seidal, M.G. Krlsson, B. Sorbe, *Int. J. Oncol.* 26(2005) 177-183.

91. Gene amplification, mutation, and protein expression of EGFR and mutations of ERBB2 in serous ovarian carcinoma, H. Lassus, H. Shihto, A. Leminen, H. Joensuu, J. Isola, N.N. Nupponen, R. Butzow, *J. Mol. Med.* 84(2006) 671-681.

92. Epithelial growth factor receptor status in primary and recurrent ovarian cancer, Sylvia Stadlmann, Uwe Gueth, Ulrich Reiser, Pierre-Andre Diener, Alain Gustave Zeimet, Edward Wight, Martina Mirlacher, Guido Sauter, January 2006

93. The emerging role of epidermal growth factor receptor inhibitors in ovarian cancer, M.J. Palayekar, T.J. Herzog, 2008.

94. Epithelial growth factor receptor status in primary and recurrent ovarian cancer, S. Stadlmann, U. Gueth, U. Reiser, P.A. Diener, A.G. Zeimet, E. Wight, M. Mirlacher, G. Sauter, M.J. Mihatsch, G. Singer, *Mod. Pathol.* 19(2006) 671-610.

95. Origins and molecular pathology of ovarian cancer, Department of pathology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA 2005

