

**"ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ EGFR, RAS ΠΟΥ
ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ
ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΣΕ
ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΟΓΚΟΥΣ"**

ΚΑΣΙΑΝΗ- ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΚΑΠΑΤΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Γεώργιος Κ. Κουκούλης**, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- **(Επιβλέπων)**
2. **Δρ. Μαρία Ιωάννου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Σπυρίδων Ποταμιάνος**, Καθηγητής Γαστρεντερολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

© 2016 Κασιανή- Αναστασία Καπάτου

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

- 1^{ος} Εξεταστής**
(Επιβλέπων) **Δρ. Γεώργιος Κ. Κουκούλης**
*Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
- 2^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Μαρία Ιωάννου**
*Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
- 3^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Σπυρίδων Ποταμιάνος**
*Καθηγητής Γαστρεντερολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας*
- 4^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Ευανθία Κωστοπούλου**
*Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
- 5^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Γεώργιος Νταλέκος**
*Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας*
- 6^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Ανδρέας Καψωριτάκης**
*Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας- Γαστρεντερολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*
- 7^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Μαρία Σαμαρά**
*Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής- Μοριακής
Ιστοπαθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής και Μοριακής Ιστοπαθολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Η ολοκλήρωσή της δε θα ήταν δυνατή δίχως τη συμβολή καταξιωμένων δασκάλων και συναδέλφων.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής και επιβλέποντα της παρούσας διατριβής Δρ. Γεώργιο Κ. Κουκούλη, , στον οποίο οφείλω την ιδέα της διατριβής, αλλά και την εξασφάλιση των απαραίτητων προϋποθέσεων για την εκπόνηση της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, Αναπληρωτή Καθηγητή Γαστρεντερολογίας Δρ. Σπυρίδωνα Ποταμιάνο και Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Δρ. Μαρία Ιωάννου για την στήριξη τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Επίκουρο Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Δρ. Μαρία Σαμαρά, η οποία προσέφερε ουσιαστική βοήθεια στην εκπαίδευση μου στη Μοριακή Ιστοπαθολογία, την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, αλλά και την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ τους συναδέλφους του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, για τη βοήθεια και τη συνεργασία τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση και κατανόηση τους.

Κασιανή- Αναστασία Καπάτου

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνομα: Κασιανή- Αναστασία
Επώνυμο: Καπάτου
Έτος γέννησης: 1979
Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμη/ 1 παιδί
Τηλέφωνα επικοινωνίας: οικία: 2421073519
Κινητό:6944116318
E- mail: s.kapatou@yahoo.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Πτυχίο Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Ημερομηνία Λήψης Πτυχίου : 01/7/2004

Βαθμός Πτυχίου : «Λίαν καλώς»

Τίτλος ειδικότητας Παθολογικής Ανατομικής, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας

Ημερομηνία λήψης ειδικότητας: 26/6/2012

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

16/11/15- 11/12/15 & 05/5/2015- 01/8/2015: Παθολογοανατόμος *University College Hospital Galway, Department of Pathology and Cytology, Ireland*

23/10/2013- 22/10/14: Παθολογοανατόμος, Επικουρικός ιατρός στο Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας»

15/6/2005- 14/6/2006: Αγροτικός ιατρός στο Περιφερειακό Ιατρείο Στεφανοβικείου, ΚΥ Βελεστίου

15/3/2005- 14/6/2005: Τρίμηνη εκπαίδευση στο Γενικό Νοσοκομείο Βόλου «Αχιλλοπούλειο»

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Δημοσιεύσεις:

Samara M., Kapatou K., Ioannou M. et al. "Mutation profile of KRAS and BRAF genes in patients with colorectal cancer: association with morphological and prognostic criteria". *Genet Mol Res.* 2015 14;14(4):16793-802.

G. Koukourakis, E. Filopoulos, K. Kapatou et al. "Hemangiopericytoma of the breast: a case report and a review of the literature." *Case Rep Oncol Med.* ;2015:210643

PJ Vlachostergios, F. Karasavvidou, Gr. Kakkas, K.Kapatou et al. "Lack of prognostic significance of p16 and p27 after radical prostatectomy in hormone-naïve prostate cancer". *J Negat Results Biomed.* 2012 Jan 5;11(1):2

Christodoulidis G, Spyridakis M, Symeonidis D, Kapatou K, et al. "Clinicopathological differences between right- and left-sided colonic tumors and impact upon survival". *Tech Coloproctol.* 2010 Nov;14 Suppl 1:S45-7

Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια:

Samara M, Kapatou K, Ioannou M, Papamichali R, Potamianos SP, Kapsoritakis AN et al. "EGFR and KRAS gene profile in patients with colorectal cancer: correlation with clinicopathological parameters". 8th International congress of Internal Medicine, Larissa 2016

M. Samara, K. Kapatou, A. Athanassiadis, G.K. Koukoulis "Comparison of different methods for detecting K- ras mutations in colorectal carcinomas". 98th USCAP Annual meeting, Boston, March 2009.

K. Kapatou, R. Papamichali, K. Zacharouli, F. Karasavvidou."Epithelial-myoepithelial carcinoma of the parotid gland. A case report". 27th International congress of the International Academy of Pathology, Athens 2008

F. Karasavvidou, G. Kalodimos, S. Barbanis, K. Kapatou, et al. "SP-A Immunohistochemical expression in prostate adenocarcinomas". 27th International congress of the International Academy of Pathology, Athens 2008

Στη μητέρα μου Ελευθερία...

Περίληψη

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί την τρίτη συχνότερη μορφή καρκίνου και την τέταρτη σε συχνότητα αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Η εφαρμογή των αντί-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικά σχήματα έχει βελτιώσει τη συνολική επιβίωση και την ποιότητα ζωής ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου. Τελευταία, πλήθος μελετών έχει επισημάνει την προγνωστική/ προβλεπτική σημασία γενετικών αλλαγών σε γονίδια του σηματοδοτικού μονοπατιού του EGF-υποδοχέα. Οι μεταλλάξεις του KRAS γονιδίου ελέγχονται πλέον στην καθημερινή κλινική πράξη σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου. Ωστόσο, η έρευνα συνεχίζεται για τη σημασία άλλων βιοδεικτών συμπεριλαμβανομένων των BRAF μεταλλάξεων και της έκφρασης του EGF-υποδοχέα καθώς μέχρι σήμερα τα δεδομένα είναι ασαφή ή ελλιπή.

Στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε την ύπαρξη KRAS/BRAF μεταλλάξεων και τη συσχέτισή τους με τις κλινικο-ιστοπαθολογικές παραμέτρους σε 322 ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. Επιπλέον, συλλέξαμε νωπό νεοπλασματικό και φυσιολογικό ιστό από 50 ασθενείς και μελετήσαμε την έκφραση, σε επίπεδο mRNA μεταγράφων των KRAS και EGFR γονιδίων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Στη συνέχεια έγινε συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης με τα κύρια κλινικο-ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των καρκινωμάτων.

Από τη μελέτη μας προέκυψε ότι η συχνότητα και κατανομή των KRAS και BRAF μεταλλάξεων στον Ελληνικό πληθυσμό είναι ανάλογη με αυτή που περιγράφεται σε προηγούμενες μελέτες. Οι G>A νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις, στο κωδικόνιο 12 του KRAS γονιδίου, εμφάνισαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων ($p<0.05$). Αντιθέτως, οι G>C νουκλεοτιδικές μεταθέσεις στο ίδιο κωδικόνιο, εμφάνισαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων ($p<0.005$). Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των KRAS/ BRAF p.V600E μεταλλάξεων και της εντόπισης του όγκου στο δεξιό κόλον, σε σχέση με τα καρκινώματα που εντοπίζονταν στο αριστερό κόλον, συμπεριλαμβανομένου και του ορθού ($p<0.05$, $p<0.005$ αντίστοιχα). Στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p<0.005$) παρατηρήθηκε επίσης μεταξύ του χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης και της απουσίας των KRAS μεταλλάξεων. Από τα δεδομένα μας, όσον αφορά στην p.V600E μετάλλαξη του BRAF γονιδίου, υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας της V600E μετάλλαξης και του χαμηλού βαθμού ιστολογικής διαφοροποίησης των καρκινωμάτων παχέος εντέρου ($p<0.005$), καθώς και του αυξημένου αριθμού λεμφαδενικών μεταστάσεων (N2) ($p<0.05$) στους ασθενείς με μεταστατική νόσο.

Με τη μέθοδο της απόλυτης ποσοτικοποίησης, η έκφραση των KRAS/ EGFR γονιδίων σε επίπεδο mRNA μεταγράφων ήταν υψηλότερη στον καρκινικό ιστό σε σχέση με το φυσιολογικό τοίχωμα του παχέος εντέρου και το εύρημα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό ($p < 0.05$). Η έκφραση του KRAS γονιδίου έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον αριθμό των λεμφαδενικών μεταστάσεων, στις περιπτώσεις των ασθενών με λεμφαδενική συμμετοχή. Διαπιστώθηκε επίσης, θετική συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης έκφρασης του EGF-υποδοχέα και της ύπαρξης μεταλλάξεων του KRAS γονιδίου, χωρίς ωστόσο να αποδειχθεί στατιστικά σημαντική, πιθανά λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων.

Συνοψίζοντας, τα ευρήματά μας επιβεβαιώνουν ότι τα καρκινώματα δεξιάς εντόπισης ακολουθούν διαφορετικό μονοπάτι καρκινογένεσης σε σχέση με τα αριστερής εντόπισης καρκινώματα. Επιπλέον, η παρουσία των KRAS/BRAF μεταλλάξεων σχετίζεται με επιθετική συμπεριφορά και χειρότερη επιβίωση των ασθενών με αδenoκαρκινώματα παχέος εντέρου. Η μέτρηση της έκφρασης των KRAS mRNA μεταγράφων θα μπορούσε να αποτελέσει έναν υποψήφιο βιοδείκτη για την εκτίμηση της μεταστατικής ικανότητας του όγκου και την παρακολούθηση (follow-up) των ασθενών στα πλαίσια πιθανής υποτροπής της νόσου. Η αυξημένη έκφραση των mRNA μεταγράφων του EGF-υποδοχέα, σε ασθενείς με KRAS μεταλλάξεις υποδηλώνει την ύπαρξη κι άλλων ρυθμιστικών μηχανισμών, πέραν των KRAS μεταλλάξεων. Ενδεχομένως η εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης να αποτελέσει στο μέλλον ένα χρήσιμο βιοδείκτη με προγνωστική ή προβλεπτική αξία. Ωστόσο, απαιτείται εκτενέστερη μελέτη σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και σε συνάρτηση με δείκτες επιβίωσης ή απάντησης των ασθενών στη στοχευμένη θεραπεία.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third most commonly diagnosed type of cancer and the fourth most common cause of cancer related death worldwide. The introduction of anti- EGFR moAbs in combination with chemotherapy regimens for mCRC patients improved overall survival and quality of life. Nowadays several clinical studies have highlighted the predictive role of gene alterations involved in the EGFR pathway. KRAS mutations are the most clearly defined for clinical practice in CRC patients. However the study for the other biomarkers, including BRAF mutations and EGFR expression is still active, as until now the data is ambiguous or incomplete.

In this study we investigated the presence of KRAS / BRAF mutations and their correlation with the clinical-histopathological parameters in 322 patients with colon cancer. In addition, we collected fresh paired tumor and normal tissue from 50 patients and investigated the expression level of KRAS and EGFR gene, in mRNA transcripts using the method of real time polymerase chain reaction. Then the correlation between expression levels and various clinicopathological parameters was examined.

Our study showed that frequency and distribution of KRAS and BRAF mutations in Greek population are similar to that described in previous studies. G>A transition at codon 12 of KRAS gene showed a statistically significant correlation with the absence of lymph node metastases ($p<0.05$). Instead, G>C transversion in the same codon, showed statistically significant correlation with the presence of lymph node metastases ($p<0.005$). KRAS/ BRAF p.V600E mutations were correlated with tumour location in the right colon compared to those located in the left colon and rectum ($p<0.05$, $p<0.005$ respectively). There was statistically significant correlation between the absence of KRAS mutations and high grade tumors ($p<0.005$). The presence of BRAF p.V600E mutation was associated with high grade tumors ($p<0.005$) and increased number of lymph node metastasis (N2), in patients with metastatic disease ($p<0.05$).

According to absolute quantification method mRNA expression of KRAS/EGFR genes was higher in tumour compared to normal tissue and this finding was statistically significant ($p<0.05$). Among patients with lymph node involvement, mRNA expression of KRAS gene was significantly associated with the number of lymph node metastasis. We also found a positive correlation between increased mRNA expression of the EGF-receptor and the presence of the KRAS gene mutations, but not proved to be statistically significant, possibly due to small number of patients.

In summary our findings confirm that tumours with right location follow different pathway of carcinogenesis compared to left located tumours. Moreover, the presence of KRAS/BRAF mutations was associated with aggressive behavior and

worse survival of patients with colorectal adenocarcinomas. KRAS mRNA expression could be a candidate biomarker for assessing invasive capacity of the tumor and possible recurrence of the disease. Increased mRNA expression of the EGF-receptor in patients with KRAS mutations indicates the presence of other regulatory mechanisms beyond KRAS mutations. Assessment of expression levels may serve as a useful biomarker of prognostic and predictive value in the future. However, more extensive study is needed on a larger number of patients and based on survival rates or response of the patient to targeted therapy.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1. Παχύ έντερο

1.1 Εμβρυολογία παχέος εντέρου	16
1.2 Μακροσκοπική ανατομική του παχέος εντέρου	16
1.3 Μικροσκοπική ανατομική του παχέος εντέρου	19
1.4 Ιστολογική ταξινόμηση των νεοπλασμάτων του παχέος εντέρου σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας	21
1.5 Καρκίνος του καρκίνου παχέος εντέρου	23
1.5.1 Επιδημιολογικά δεδομένα	23
1.5.2 Αίτια και παράγοντες κινδύνου	24
1.5.3 Γενετικό υπόβαθρο του καρκίνου του παχέος εντέρου	28
1.5.4 Εντόπιση	35
1.5.5 Κλινική εικόνα	38
1.5.6 Προσυμπτωματικός έλεγχος και πρόληψη	38
1.5.7 Ιστοπαθολογική αξιολόγηση	39
1.5.7.1 Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά καρκινωμάτων παχέος εντέρου	39
1.5.7.2 Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά καρκινωμάτων παχέος εντέρου	40
1.5.8 Πρόδρομες αλλοιώσεις καρκίνου παχέος εντέρου	50
1.5.8.1 Εστίες με ανώμαλες κρύπτες	50
1.5.8.2 Αδενώματα	51
1.5.8.3 Αλλοιώσεις με «οδοντωτή» μορφολογία	52
1.5.9 Σταδιοποίηση	53
1.5.10 Θεραπεία ορθοκολικού καρκίνου	57
1.5.10.1 Χειρουργική αντιμετώπιση	57
1.5.10.2 Επικουρική χημειοθεραπεία	57
1.5.10.3 Επικουρική ακτινοθεραπεία	58
1.5.10.4 Νέο- επικουρική ακτινο/χημειοθεραπεία	58
1.5.10.5 Θεραπεία μεταστατικής νόσου	59
1.5.11 Πρόγνωση	60

Κεφάλαιο 2. Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR)

2.1	Εισαγωγή- Δομή πρωτεϊνικού μορίου	65
2.2	Προσδέτες της οικογένειας των αυξητικών παραγόντων	67
2.3	Ενεργοποίηση και βιολογική λειτουργία του EGF- υποδοχέα	68
2.4	Ενδοκύττωση του EGF- υποδοχέα	70
2.5	EGF- υποδοχέας και καρκίνος	71
Κεφάλαιο 3. Ογκογονίδια RAS		
3.1	Εισαγωγικά στοιχεία	74
3.2	Δομή και έκφραση του KRAS γονιδίου	75
3.3	Η πρωτεΐνη ras (p21)	77
3.4	Δομή πρωτεϊνών ras	78
3.5	Υποκυτταρική εντόπιση και μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών ras	81
3.6	Βιοχημικές ιδιότητες της πρωτεΐνης ras	87
3.7	Έκφραση της πρωτεΐνης ras	88
3.8	Ενεργοποίηση των πρωτεϊνών ras	89
3.9	Μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που ενεργοποιούνται από τις ras πρωτεΐνες	90
3.10	K-Ras και καρκίνος	94
3.11	K-Ras και καρκίνος παχέος εντέρου	97
Κεφάλαιο 4. Ογκογονίδια RAF		
4.1	Δομή γονιδίου BRAF	98
4.2	Δομή B-Raf πρωτεΐνης	99
4.3	Ρύθμιση της δραστικότητας της B- Raf κινάσης	102
4.4	Ενεργοποίηση της B-Raf πρωτεΐνης	103
4.5	Έκφραση της B-Raf πρωτεΐνης	104
4.6	B-Raf και καρκίνος	105
4.7	B-Raf και καρκίνος παχέος εντέρου	108
II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		
Κεφάλαιο 1. Σκοπός μελέτης		110
Κεφάλαιο 2. Υλικό και μεθοδολογία		
2.1	Υλικό μελέτης	110
2.2	Μελέτη σε γενετικό επίπεδο	112

2.2.1 Απομόνωση γενομικού DNA από νωπό ιστό	112
2.2.2 Απομόνωση γενομικού DNA από μονιμοποιημένο ιστό	112
2.2.3 Φωτομέτρηση DNA	114
2.2.4 Ηλεκτροφόρηση γενομικού DNA	115
2.2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	117
2.2.6 Επιλεκτική ενίσχυση αλληλουχιών του KRAS γονιδίου	121
2.2.7 Επιλεκτική ενίσχυση αλληλουχιών του BRAF γονιδίου	123
2.2.8 Ανίχνευση μεταλλάξεων με τη μέθοδο πολυμορφισμών μεγέθους περιοριστικού τμήματος	124
2.2.9 Ανάλυση της αλληλουχίας της πρωτοταγούς δομής του DNA με τη μέθοδο Sanger	127
2.3 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των mRNA μεταγράφων	130
2.3.1 Τεχνική απομόνωσης RNA	131
2.3.2 Φωτομέτρηση RNA	132
2.3.3. Ηλεκτροφόρηση RNA	132
2.3.4 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)	132
2.3.5 Έλεγχος της ποιότητας των cDNA δειγμάτων	134
2.4 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου	135
2.4.1 Ανάλυση RQ-PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I	136
2.4.2 Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης	137
2.4.3 Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού	138
2.4.4 Σχετική και απόλυτη ποσοτικοποίηση	142
2.4.4.1 Απόλυτη ποσοτικοποίηση	143
2.4.4.2 Σχετική ποσοτικοποίηση	144
2.4.5 Πειραματικό μέρος	146
2.4.5.1 Πειραματικό πρωτόκολλο	146
2.4.5.2 Κατασκευή πρότυπων καμπυλών	148
2.4.5.3 Απόλυτη ποσοτικοποίηση	149
2.4.5.4 Σχετική ποσοτικοποίηση	150
2.5 Στατιστική ανάλυση	151
Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα	
3.1 Εκτίμηση κλινικο-ιστοπαθολογικών παραμέτρων	152
3.2 Μεταλλάξεις KRAS	155

3.3 Μεταλλάξεις BRAF	159
3.4 Επίπεδα έκφρασης των mRNA μεταγράφων των KRAS και EGFR γονιδίων	161
3.4.1 Σχετική ποσοτικοποίηση	163
3.4.2 Απόλυτη ποσοτικοποίηση	166
Κεφάλαιο 4. Συζήτηση- Συμπεράσματα	173
4.1 KRAS γονίδιο και καρκίνος παχέος εντέρου	175
4.2 BRAF γονίδιο και καρκίνος παχέος εντέρου	181
4.3 Έκφραση KRAS γονιδίου και καρκίνος παχέος εντέρου	184
4.4 Έκφραση EGFR γονιδίου και καρκίνος παχέος εντέρου	187
4.5 Συμπεράσματα- Μελλοντικοί στόχοι	191
Βιβλιογραφία	195

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Παχύ έντερο

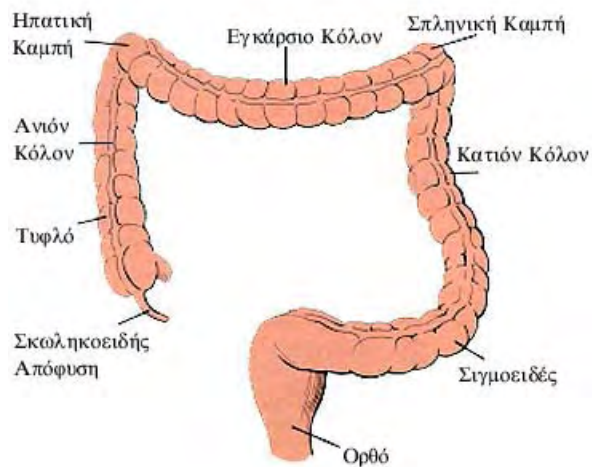
1.1 Εμβρυολογία παχέος εντέρου

Το πρωτογενές ή αρχέγονο έντερο προέρχεται από το έσω βλαστικό δέρμα, το οποίο καλύπτει την κοιλιακή επιφάνεια του εμβρυϊκού δίσκου (1). Μετά την κεφαλουραία κάμψη του εμβρύου, το αρχέγονο έντερο διαιρείται σε *πρόσθιο*, *μέσο* και *οπίσθιο* έντερο.

Το παχύ έντερο προέρχεται από το *μέσο* και το *οπίσθιο* έντερο. Συγκεκριμένα, η σκωληκοειδής απόφυση, το τυφλό, το ανιόν και τα εγγύς δύο τριτημόρια του εγκάρσιου κόλου προέρχονται από το *μέσο* έντερο, ενώ από το *οπίσθιο* έντερο προέρχεται το άπω τριτημόριο του εγκάρσιου, το κατιόν, το σιγμοειδές, το ορθό και το εγγύς τμήμα του πρωκτού.

1.2 Μακροσκοπική ανατομική του παχέος εντέρου

Το παχύ έντερο αποτελεί τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα κι εκτείνεται από το πέρας του ειλεού έως τον πρωκτό. Το συνολικό του μήκος είναι περίπου 1.5 μέτρο και υποδιαιρείται στα ακόλουθα τμήματα: τυφλό με τη σκωληκοειδή απόφυση, ανιόν κόλον, εγκάρσιο κόλον, κατιόν κόλον, σιγμοειδές, ορθό και πρωκτικό σωλήνα (Εικ 1).



Εικόνα 1. Μακροσκοπική ανατομική παχέος εντέρου.

Η διάμετρος του αυλού του παχέος εντέρου είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη διάμετρο του λεπτού εντέρου, γεγονός που δικαιολογεί και την ονομασία του· εμφανίζει το μεγαλύτερο εύρος στο τμήμα του τυφλού, στη συνέχεια μειώνεται προοδευτικά μέχρι το ορθό, για να διογκωθεί πάλι αμέσως πάνω από τον πρωκτικό σωλήνα, σχηματίζοντας την κοπροδόχο λήκυθο.

Με βάση τη λειτουργία του, το παχύ έντερο θα μπορούσε να διακριθεί σε μια απορροφητική (δεξιά) μοίρα που περιλαμβάνει το τυφλό, το ανιόν και το δεξιό ήμισυ του εγκάρσιου κόλου, και μια αποθηκευτική (αριστερή) μοίρα που περιλαμβάνει το υπόλοιπο εγκάρσιο, το κατιόν, το σιγμοειδές και το ορθό.

Το τυφλό αποτελεί την πρώτη μοίρα του παχέος εντέρου. Έχει μήκος περίπου 6 εκ. και χωρητικότητα 100-150 κυβικά εκ. Στο κάτω μέρος του καταλήγει τυφλά, ενώ προς τα πάνω συνέχεια με το ανιόν κόλον. Αντίστοιχα προς το όριο του με το ανιόν κόλον, υποδέχεται την εκβολή του ειλεού διαμέσου της ειλεοτυφλικής βαλβίδας. Το τυφλό, σε ολόκληρη την επιφάνειά του, καλύπτεται από περιτόναιο και για το λόγο αυτό είναι εξαιρετικά ευκίνητο. Η σκωληκοειδής απόφυση αποτελεί ένα στενό προσάρτημα του τυφλού, έχει σχήμα σωληνοειδές και εκφύεται στο όριο μεταξύ του έσω και οπίσθιου τοιχώματος του τυφλού. Από περιγραφική άποψη διακρίνεται στη βάση, το σώμα και την κορυφή. Κατά μέσο όρο το μήκος υπολογίζεται στα 7-9εκ. και το πάχος της είναι περίπου 0.5εκ. Η σκωληκοειδής απόφυση περιβάλλεται εξολοκλήρου από το περιτόναιο και κρέμεται από μια πτυχή του, το μεσεντερίδιο. Ο τρόπος στήριξής της δικαιολογεί το γεγονός ότι είναι εξαιρετικά ευκίνητη και ότι μπορεί να ανευρίσκεται σε διάφορες θέσεις. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων χαρακτηρίζεται από οπισθοτυφλική ή οπισθοκολική θέση, κατά την οποία η σκωληκοειδής απόφυση βρίσκεται πίσω από το τυφλό ή το κατώτερο τμήμα του ανιόντος κόλου.

Η δεύτερη μοίρα του παχέος εντέρου αποτελείται από το κόλον, το οποίο διακρίνεται σε τέσσερα τμήματα το ανιόν, το εγκάρσιο, το κατιόν και το σιγμοειδές κόλον.

Το ανιόν κόλον αποτελεί την προς τα πάνω συνέχεια του τυφλού και έχει μήκος περίπου 15εκ. Μόλις φτάσει στην κάτω επιφάνεια του δεξιού λοβού του ήπατος, στρέφεται προς τα αριστερά σχηματίζοντας τη δεξιά ή ηπατική κολική καμπή. Η τελευταία προς τα πίσω έρχεται σε σχέση με το κάτω πόλο του δεξιού νεφρού, ενώ προς τα εμπρός έρχεται σε σχέση με το δεξιό λοβό του ήπατος, τον πυθμένα της χοληδόχου κύστης και την κατιούσα μοίρα του 12δακτύλου.

Το εγκάρσιο κόλον έχει μήκος περίπου 45εκ. και εκτείνεται από τη δεξιά έως την αριστερή (σπληνική) κολική καμπή. Η τελευταία έρχεται σε σχέση προς τα άνω με το κάτω άκρο του σπλήνα, προς τα πίσω με το άνω μέρος του αριστερού νεφρού, προς τα εμπρός με το σώμα του στομάχου και προς τα έσω με την ουρά του παγκρέατος. Το εγκάρσιο κόλον καλύπτεται εξολοκλήρου από το περιτόναιο και

κρέμεται από δυο πτυχές του, το εγκάρσιο μεσόκολο και τον γαστροκολικό σύνδεσμο.

Το κατιόν κόλον εκτείνεται από την αριστερή κολική καμπή μέχρι το στόμιο της ελάσσονος πυέλου, όπου μεταπίπτει στο σιγμοειδές. Το μήκος του είναι περίπου 25 εκ. Το περιτόναιο καλύπτει μερικώς το κατιόν κόλον, μόνο από την πρόσθια και τις πλάγιες επιφάνειες του. Στις περιπτώσεις που το κατιόν κόλον περιβάλλεται εξ' ολοκλήρου από το περιτόναιο, κρέμεται από το κατιόν μεσόκολο.

Το σιγμοειδές κόλον αποτελεί τη συνέχεια του κατιόντος κόλου, έπειτα από την είσοδο του τελευταίου στην ελάσσονα πύελο. Το μήκος του ανέρχεται κατά μέσο όρο στα 40 εκ. Πορεύεται μέσα στην πύελο, όπου στο ύψος του τρίτου ιερού σπονδύλου μεταπίπτει στο ορθό. Το σιγμοειδές καλύπτεται πλήρως από περιτόναιο και κρέμεται από μια πτυχή του, η οποία ονομάζεται μεσοσιγμοειδές. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σιγμοειδές να είναι σταθερό στο αρχικό και τελικό τμήμα του και εξαιρετικά ευκίνητο στο υπόλοιπο μήκος του. Επίσης, το σιγμοειδές, για τους παραπάνω λόγους, χαρακτηρίζεται από μια ποικιλία θέσεων και σχημάτων, με πιο συνηθισμένο το σχήμα του λατινικού S, γεγονός που δικαιολογεί και την ονομασία του.

Το απευθυσμένο ή ορθό έντερο αποτελεί τη συνέχεια του σιγμοειδούς και εκτείνεται από τον τρίτο ιερό σπόνδυλο έως την ορθοπρωκτική συμβολή. Έχει μήκος περίπου 10 εκ. και διάμετρο 4 εκ., η οποία αυξάνει βαθμιαία από άνω προς τα κάτω, σχηματίζοντας στο ύψος του πυελικού εδάφους την κοπροδόχο λήκυθο. Το περιτόναιο περιβάλλει τα δυο άνω τριτημόρια του ορθού μόνο κατά την πρόσθια και τις πλάγιες επιφάνειες του. Το κατώτερο τριτημόριο του απευθυσμένου δεν περιβάλλεται από περιτόναιο, καθώς το τελευταίο, στο σημείο αυτό, ανακάμπει σχηματίζοντας το ευθυκυστικό κόλπωμα στους άνδρες ή το ευθυμητρικό κόλπωμα στις γυναίκες. Μεγάλη σημασία έχουν οι στενές σχέσεις που παρουσιάζει το απευθυσμένο με τα παρακείμενα όργανα. Συγκεκριμένα, το κατώτερο τμήμα του ορθού, προς τα εμπρός, έρχεται σε σχέση με την ουροδόχο κύστη, τις σπερματοδόχες κύστες, τους σπερματικούς πόρους και τον προστάτη αδένα στους άνδρες, ενώ στις γυναίκες με τη μήτρα και τον κολεό.

Ο πρωκτικός σωλήνας αποτελεί την τελική μοίρα του παχέος εντέρου, η οποία ξεκινά από την ορθοπρωκτική συμβολή και καταλήγει στον πρωκτό. Ο πρωκτός ή δακτύλιος αποτελεί το τελικό άκρο του εντερικού σωλήνα και αποτελείται, από περιγραφικής άποψης, από τον αιμορροϊδικό δακτύλιο και τον πρόδρομο του πρωκτού.

Η κατανομή των αγγείων στο παχύ έντερο εξηγείται από τον τρόπο διάπλασης του γαστρεντερικού σωλήνα. Το τυφλό, το ανιόν και τα δυο πρώτα τριτημόρια του εγκάρσιου κόλου αιματώνονται από κλάδους της άνω μεσεντέριας αρτηρίας. Οι φλέβες ακολουθούν τις αρτηρίες και καταλήγουν στην άνω μεσεντέρια φλέβα, ενώ η λέμφος παροχετεύεται στα άνω μεσεντέρια λεμφογάγγλια. Το κάτω τριτημόριο

του εγκάρσιου κόλου, το κατιόν, το σιγμοειδές και η ανώτερη μοίρα του ορθού αιματώνονται από κλάδους της κάτω μεσεντέριας αρτηρίας. Οι αντίστοιχες φλέβες καταλήγουν στην κάτω μεσεντέρια φλέβα, ενώ η λέμφος παροχετεύεται στα κάτω μεσεντέρια λεμφογάγγλια. Η κατώτερη μοίρα του απευθυσμένου αιματώνεται από κλάδους της έσω λαγόνιας αρτηρίας, ενώ οι φλέβες του καταλήγουν στην έσω λαγόνια φλέβα. Ομοίως η λέμφος παροχετεύεται στους έσω λαγόνιους λεμφαδένες.

Η νεύρωση του παχέος εντέρου είναι ενδοτοιχωματική και προέρχεται από δυο περιφερικά φυτικά γαγγλιοφόρα πλέγματα, το μυεντερικό πλέγμα του Auerbach και το υποβλεννογόνιο πλέγμα του Meissner (2).

1.3 Μικροσκοπική ανατομική του παχέος εντέρου

Το τοίχωμα του παχέος εντέρου αποτελείται από τέσσερις χιτώνες, οι οποίοι από έξω προς τα έσω είναι οι εξής: ο ορογόνος, ο μυϊκός, ο υποβλεννογόνιος και ο βλεννογόνος.

Ο ορογόνος χιτώνας προέρχεται από το περισπλάχνιο πέταλο του περιτοναίου, το οποίο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, περιβάλλει εξ'ολοκλήρου το τυφλό, τη σκωληκοειδή απόφυση, το εγκάρσιο, τις δυο κολικές καμπές και το σιγμοειδές, ενώ στο ανιόν, το κατιόν και την ενδοπυελική μοίρα του απευθυσμένου καλύπτει μόνο την πρόσθια και τις δυο πλάγιες επιφάνειες. Τα τμήματα που δεν περιβάλλονται πλήρως από περιτόναιο βρίσκονται καθηλωμένα στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα και στη θέση του ορογόνου χιτώνα παρατηρείται μια στιβάδα ινώδους συνδετικού ιστού. Κατά μήκος των κολικών ταινιών, παρατηρούνται προσεκβολές του ορογόνου χιτώνα πληρούμενες από λιπώδη συνδετικό ιστό, οι οποίες σχηματίζουν τις *επιπλοϊκές αποφύσεις* του παχέος εντέρου.

Ο μυϊκός χιτώνας του παχέος εντέρου αποτελείται από μια έσω κυκλοτερή και μια έξω επιμήκη στιβάδα λείων μυϊκών ινών. Η τελευταία εμφανίζει ταινιοειδείς παχύνσεις, σχηματίζοντας με τον τρόπο αυτό τις *κολικές ταινίες*. Μεταξύ των δυο παραπάνω στιβάδων βρίσκεται το μυεντερικό πλέγμα του Auerbach.

Ο υποβλεννογόνιος χιτώνας παρεμβάλλεται μεταξύ του μυϊκού χιτώνα και του βλεννογόνου και αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό. Περιέχει αιμοφόρα αγγεία, λεμφαγγεία, νεύρα, ινοβλάστες, κολλαγόνο, λιποκύτταρα και φλεγμονώδη κύτταρα. Στο χιτώνα αυτό παρατηρούνται δυο νευρικά πλέγματα: το υποβλεννογόνιο πλέγμα του Meissner και το εν τω βάθει υποβλεννογόνιο νευρικό πλέγμα (πλέγμα του Henle).

Ο βλεννογόνος του παχέος εντέρου αποτελείται από τη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα, το χόριο και το επιθήλιο.

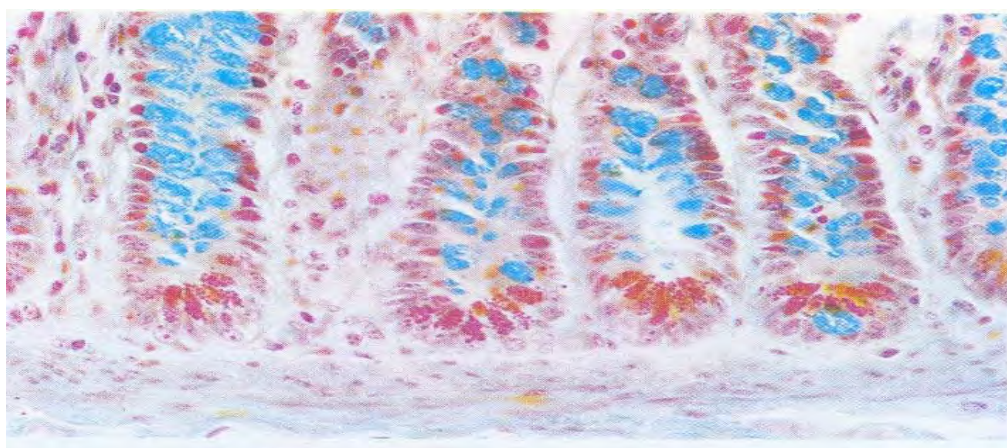
Το εντερικό επιθήλιο του επιφανειακού βλεννογόνου και των κρυπτών του *Liberkuhn* είναι μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο και περιλαμβάνει διάφορους τύπους κυττάρων με συγκεκριμένες λειτουργίες:

Τα *επιπολής απορροφητικά* κύτταρα είναι τα πλέον πολυάριθμα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου. Πρόκειται για υψηλά κυλινδρικά κύτταρα που διαθέτουν ωοειδείς πυρήνες τοποθετημένους στη βάση του κυττάρου. Στην ελεύθερη επιφάνεια τους εμφανίζουν πολυάριθμες μικρολάχνες, οι κορυφές των οποίων καλύπτονται από παχύ γλυκοκάλυκα. Κύριες λειτουργίες των κυττάρων αυτών είναι η τελική πέψη και η απορρόφηση ιόντων και νερού. Τα *καλυκοειδή* κύτταρα συνθέτουν, αποθηκεύουν και εκκρίνουν βλέννη. Στο κυτταρόπλασμα τους περιέχονται πολυάριθμα, ευμεγέθη βλεννώδη κυστίδια, τα οποία γίνονται ορατά με κατάλληλες χρώσεις βλέννης (Εικ. 2). Στη συνήθη ιστολογική χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης το κυτταρόπλασμα εμφανίζεται κενό και οι πυρήνες παρουσιάζουν εντομές λόγω της παρουσίας των εν λόγω κυστιδίων βλέννης. Στο επιθήλιο των κρυπτών, εκτός από τα παραπάνω κύτταρα, παρατηρούνται επίσης κύτταρα *Paneth*, εντεροενδοκρινή κύτταρα, ανώριμες μορφές των διαφόρων τύπων των εντερικών κυττάρων καθώς επίσης και πολυδύναμα αρχέγονα κύτταρα (*stem cells*). Τα κύτταρα *Paneth* βρίσκονται κυρίως στο λεπτό έντερο. Στο παχύ έντερο παρατηρούνται σε μικρότερο ποσοστό και κυρίως στο τυφλό. Πρόκειται για εκκριτικά κύτταρα με σημαντική αντιμικροβιακή δράση. Διαθέτουν άφθονα ηωσινόφιλα κοκκία τοποθετημένα προς την αυλική επιφάνεια του κυτταροπλάσματος και περιέχουν κυρίως λυσοζύμη. Τα *ενδοκρινή* κύτταρα του παχέος εντέρου ανήκουν στο διάχυτο νευροενδοκρινές σύστημα (DNES) και παράγουν ενδοκρινείς, παρακρινείς ή νευροκρινείς ορμόνες. Παρουσιάζουν αντίθετη πολικότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου, καθώς ο πυρήνας τους βρίσκεται στο κορυφαίο τμήμα του κυτταροπλάσματος. Διαθέτουν έντονα ηωσινόφιλα κοκκία που βρίσκονται τοποθετημένα κάτω από τον πυρήνα και περιέχουν διάφορες ορμόνες όπως ουσία P, σεροτονίνη, σωματοστατίνη, γλυκεντίνη, παγκρεατικό πολυπεπτίδιο, αγγειοενεργό εντερικό πεπτίδιο (VIP) (3).

Η επιθηλιακή επένδυση της επιφάνειας του βλεννογόνου και των κρυπτών δε μένει σταθερή αλλά αντικαθίσταται μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα (6-7 ημέρες), γεγονός που απαιτεί τη συνεχή αναγέννηση της. Κατά μήκος των κρυπτών παρατηρούνται άωρες μορφές των διαφόρων ειδών των εντερικών κυττάρων, οι οποίες πολλαπλασιάζονται ταχέως και καθώς μετακινούνται προς το επιφανειακό επιθήλιο διαφοροποιούνται στους αντίστοιχους κυτταρικούς τύπους. Η συνεχής αναγέννηση και η διατήρηση της ομοιόστασης του επιθηλίου επιτυγχάνεται από τα πολυδύναμα εντερικά κύτταρα (εντερικά *stem* κύτταρα) που βρίσκονται στη βάση των εντερικών κρυπτών (4). Μεταξύ του εντερικού επιθηλίου και του υποκείμενου χορίου υπάρχει η *βασική μεμβράνη*. Πρόκειται για μια συνεχή, στερούμενη

κυττάρων, στιβάδα που αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου IV, πρωτεογλυκάνες και λαμινίνη. Το *χόριο* είναι ο χαλαρός συνδετικός ιστός που περιβάλλει τα πολυάριθμα εντερικά αδένια, τις *κρύπτες του Liberkuhn*. Παρέχει ένα υποστηρικτικό δίκτυο για το επιθήλιο και ρυθμίζει τις λειτουργίες των επιθηλιακών κυττάρων. Περιέχει διάφορα είδη κυττάρων, όπως ινοβλάστες, αγγειακά ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα, κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος (λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, μακροφάγα) και ένα βασικό τύπο μυοϊνοβλαστών- τους εντερικούς υποεπιθηλιακούς μυοϊνοβλάστες. Οι τελευταίοι εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για το συντονισμό του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των επιθηλιακών κυττάρων (4).

Η βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα είναι μια καλά ανεπτυγμένη μυϊκή στιβάδα, που παρεμβάλλεται μεταξύ του χορίου και του υποβλεννογόνιου χιτώνα. Αποτελείται από μια έσω κυκλωτή και μια έξω επιμήκη στιβάδα λείων μυϊκών κυττάρων.



Εικόνα 2. Βλεννογόνος κρυπών παχέος εντέρου- ιστοχημική χρώση Alcian blue. Αναδεικνύεται η βλέννη (μπλε) των καλυκοειδών κυττάρων. Στη βάση των κρυπών αναγνωρίζονται τα κύτταρα Paneth, με τα πολυάριθμα ηωσινόφιλα κοκκία προσανατολισμένα στην αυλική επιφάνεια του κυττάρου.

1.4 Ιστολογική ταξινόμηση των νεοπλασμάτων του παχέος εντέρου σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO).

Τα νεοπλάσματα του παχέος εντέρου ταξινομούνται σύμφωνα με την κατάταξη της WHO (2010) (5) ως εξής (Πίνακας 1):

Επιθηλιακοί όγκοι	Μεσεγγυματικοί όγκοι
<p>Προκακοήθεις αλλοιώσεις Αδένωμα</p> <ul style="list-style-type: none"> • Σωληνώδες 	<p>Λειομύωμα Λίπωμα Αγγειοσάρκωμα</p>

<ul style="list-style-type: none"> • Λαχνωτό • Σωληνολαχνωτό <p>Δυσπλασία χαμηλού βαθμού Δυσπλασία υψηλού βαθμού</p> <p>Αλλοιώσεις με οδοντωτή μορφολογία</p> <ul style="list-style-type: none"> • Υπερπλαστικός πολύποδας • Οδοντωτό άμισχο αδένωμα • Σύνηθες οδοντωτό αδένωμα <p><i>Αμαρτώματα</i></p> <p>Πολύποδας συνδρόμου Cowden Juvenile πολύποδας Πολύποδας Peutz- Jeghers</p> <p><i>Καρκινώματα</i></p> <p>Αδενοκαρκίνωμα</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ηθμοειδές αδενοκαρκίνωμα • Μυελοειδές καρκίνωμα • Μικροθηλώδες καρκίνωμα • Βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα • Οδοντωτό αδενοκαρκίνωμα • Καρκίνωμα με κύτταρα signet- ring <p>Αδενοπλακώδες καρκίνωμα Ατρακτοκυτταρικό καρκίνωμα Καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα</p> <p><i>Νευροενδοκρινικά νεοπλάσματα</i></p> <p>Νευροενδοκρινής όγκος (NET)</p> <ul style="list-style-type: none"> • NET G1 (καρκινοειδές) • NET G2 <p>Νευροενδοκρινές καρκίνωμα (NEC)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Μεγαλοκυτταρικό NEC • Μικροκυτταρικό NEC <p>Μικτό αδενονευροενδοκρινικό καρκίνωμα</p> <p>Κυττάρων EC, NET με παραγωγή σεροτονίνης</p> <p>Κυττάρων L, NETs με παραγωγή πεπτιδίου τύπου γλουκαγόνου PP/PYY</p>	<p>Στρωματικός όγκος (GIST) Σάρκωμα Karosi Λειομυοσάρκωμα</p> <p>Λεμφώματα</p> <p>Δευτεροπαθείς όγκοι</p>
---	---

Πίνακας 1. Ιστολογική ταξινόμηση νεοπλασμάτων παχέος εντέρου βάσει WHO.

1.5 Καρκίνος του παχέος εντέρου

1.5.1 Επιδημιολογικά δεδομένα

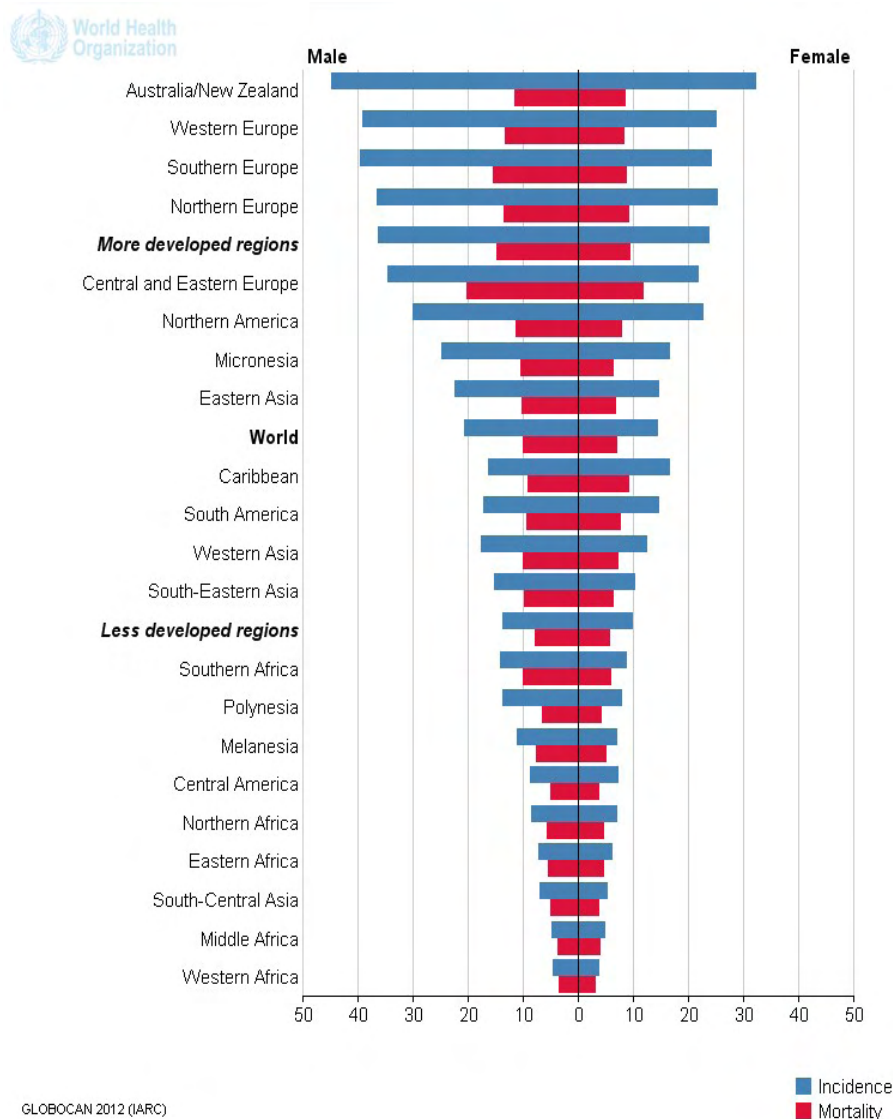
Σύμφωνα με πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες παγκόσμιας κλίμακας, εκτιμάται ότι τα νέα περιστατικά καρκίνου, για το 2012, ανέρχονται περίπου σε 14 εκατομμύρια. Μεταξύ αυτών, ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί την τρίτη συχνότερη μορφή καρκίνου στους άνδρες, έπειτα από τον καρκίνο του πνεύμονα και του προστάτη, σημειώνοντας 746.000 νέα περιστατικά (10% του συνόλου των περιστατικών με καρκίνο). Στις δε γυναίκες αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα μορφή καρκίνου, έπειτα από τον καρκίνο του μαστού, σημειώνοντας περίπου 614.000 νέα περιστατικά (9.2% του συνόλου) (6).

Όσον αφορά στους δείκτες επίπτωσης και επιπολασμού, παρατηρείται ποικίλη γεωγραφική κατανομή, με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης της νόσου στις ανεπτυγμένες χώρες σε σχέση με τις αναπτυσσόμενες. Συγκεκριμένα, τη μεγαλύτερη επίπτωση της νόσου εμφανίζουν η Δυτική/Βόρεια Ευρώπη και η Αυστραλία/ Ν. Ζηλανδία, ενώ στην Αφρική και την Ασία η συχνότητα της νόσου είναι σημαντικά μικρότερη (Εικ. 3). Μεταξύ των χωρών της Ευρώπης, οι χώρες των Βαλκανίων, ανάμεσα τους και η Ελλάδα εμφανίζουν σημαντικά μικρότερη συχνότητα εμφάνισης της εν λόγω νόσου, σε σχέση με εκείνες της Κεντρικής Ευρώπης (7).

Η νόσος είναι επίσης ελάχιστα συχνότερη στους άρρενες, με μια αναλογία προσβολής των δύο φύλων άντρες: γυναίκες περίπου 1.2:1 (6).

Η συχνότητα του ορθοκολικού καρκίνου αυξάνει επίσης με την ηλικία, ενώ είναι σπάνια πριν την ηλικία των 40 ετών, εκτός από τα άτομα με γενετική προδιάθεση ή τους ασθενείς που πάσχουν από νόσους που προδιαθέτουν, όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου.

Όσον αφορά στους δείκτες θνησιμότητας, εκτιμάται ότι ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί την τέταρτη σε συχνότητα αιτία θανάτου από καρκίνο, καθώς οι θάνατοι που αποδόθηκαν στη νόσο, για το έτος 2012, ανέρχονται σε 694.000 έναντι των συνολικά 8.2 εκατομμυρίων θανάτων ασθενών με καρκίνο (6).



Εικόνα 3. Καρκίνος παχέος εντέρου. Εκτίμηση της επίπτωσης και της θνητότητας με βάση την ηλικία και για τα δυο φύλα (6)

1.5.2 Αίτια και παράγοντες κινδύνου

- ✓ **Σποραδικός καρκίνος:** Οι περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου παχέος εντέρου είναι σποραδικές, στις οποίες είναι σημαντικοί τόσο οι γενετικοί όσο και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (Πίνακας 2) (8). Ένα ποσοστό της τάξεως του 20% ασθενών με τη μορφή αυτή ορθοκολικού καρκίνου εμφανίζει κάποια στοιχεία οικογενούς κινδύνου, χωρίς όμως να πληρούνται τα σαφή κριτήρια που έχουν οριστεί για τη διάγνωση του κληρονομικού ορθοκολικού καρκίνου (9).
- ✓ **Κληρονομικός καρκίνος:** 5-10% περίπου των περιπτώσεων του ορθοκολικού καρκίνου συμβαίνει σε έδαφος γνωστών κληρονομούμενων καρκινικών συνδρόμων (10).

Σποραδική μορφή ορθοκολικού καρκίνου (88-94%)

Ατομικό ιστορικό

- Αυξημένη ηλικία
- Άρρεν φύλο
- Χολοκυστεκτομή
- Ουρητηροεντερική αναστόμωση
- Ορμονικοί παράγοντες: ατοκία, προχωρημένη ηλικία πρώτης εγκυμοσύνης, πρώιμη εμμηνόπαυση

Περιβαλλοντικοί παράγοντες

- Δίαιτα πλούσια σε λιπαρά και κρέας και φτωχή σε φυτικές ίνες και ασβέστιο
- Καθιστική ζωή
- Παχυσαρκία
- Σακχαρώδης διαβήτης
- Κάπνισμα
- Ακτινοβολία
- Επαγγελματικοί κίνδυνοι (π.χ. έκθεση σε αμίαντο)
- Αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ

Ατομικό ιστορικό σποραδικών όγκων

- Ιστορικό πολύποδων παχέος εντέρου
- Ιστορικό καρκινώματος παχέος εντέρου (κίνδυνος 1.5-3% για ανάπτυξη 2^{ου} ορθοκολικού καρκίνου μέσα στα πρώτα 5 έτη από την αρχική διάγνωση)
- Ιστορικό καρκίνου λεπτού εντέρου, ενδομητρίου, μαστού ή ωθηκών

Οικογενής ορθοκολικός καρκίνος

Συγγενείς πρώτου ή δευτέρου βαθμού με αυτό τον τύπο καρκίνου, δίχως να πληρούνται τα κριτήρια του κληρονομικού ορθοκολικού καρκίνου:

- Συγγενής πρώτου βαθμού αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου 2-3 φορές
- Δύο ή περισσότεροι συγγενείς πρώτου βαθμού αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου 4-25 φορές
- Μεμονωμένο περιστατικό ηλικίας <45 ετών αυξάνει τον κίνδυνο 3-9 φορές
- Οικογενειακό ιστορικό αδενώματος παχέος εντέρου διπλασιάζει τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου

Ορθοκολικός καρκίνος σε έδαφος φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (1-2%)

- Ελκώδης κολίτιδα
- Νόσος Crohn's

Κληρονομικός ορθοκολικός καρκίνος (5-10%)

- Σύνδρομα πολυποδίασης: οικογενής πολυποδίαση (FAP), σύνδρομο Gardner's σύνδρομο Turcot's, σύνδρομο επίπεδου αδενώματος
- Κληρονομικός - μη σχετιζόμενος με πολυποδίαση- ορθοκολικός καρκίνος (HNPCC)
- Σύνδρομα με αμαρτωματώδεις πολύποδες: σύνδρομο Peutz- Jeghers, σύνδρομο Cowden, σύνδρομο νεανικής πολυποδίασης

Πίνακας 2. Αίτια και παράγοντες κινδύνου.

Οι δυο βασικές μορφές του κληρονομικού ορθοκολικού καρκίνου είναι ο κληρονομικός- μη σχετιζόμενος με πολυποδίαση- ορθοκολικός καρκίνος (HNPCC) και η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (FAP). Υπάρχουν διάφορα σύνδρομα με αμαρτωματώδεις πολύποδες που επίσης σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος παχέος εντέρου, όπως το σύνδρομο Peutz- Jeghers, το σύνδρομο Cowden και το σύνδρομο νεανικής πολυποδίασης (9, 11).

Η *οικογενής πολυποδίαση (FAP)* είναι μια πάθηση που εμφανίζει αυτοσωμικά επικρατή κληρονομικότητα, με σχεδόν πλήρη διεισδυτικότητα μέχρι την ηλικία των 40 ετών. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολυάριθμων (>100) αδενωμάτων του παχέος εντέρου, με ενδογενή τάση για κακοήθη εξαλλαγή. Η νόσος είναι αποτέλεσμα μετάλλαξης, στη βλαστική σειρά (germline mutation), στο γονίδιο της αδενωματώδους πολυποδίασης του παχέος εντέρου (Adenomatous Polyposis Coli, APC), το οποίο εδράζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 5 (5q21-22). Για τη διάγνωση της κλασικής μορφής της νόσου έχουν καθιερωθεί τα ακόλουθα κριτήρια: (1) 100 ή περισσότερα αδενώματα του παχέος εντέρου ή (2) μετάλλαξη της βλαστικής σειράς του γονιδίου APC ή (3) οικογενειακό ιστορικό FAP σε συνδυασμό με τουλάχιστον ένα από τα ακόλουθα: επιδερμοειδείς κύστες, οστεώματα, δεσμοειδείς όγκοι. Στην περίπτωση που ο αριθμός των αδενωμάτων δεν ξεπερνά τα 100, γίνεται λόγος για την ατελή μορφή της νόσου (attenuated FAP). Το σύνδρομο Gardner είναι μια υποκατηγορία της νόσου FAP, η οποία εκτός από τα αδενώματα του παχέος εντέρου, περιλαμβάνει επιδερμοειδείς κύστες, οστεώματα, οδοντικές ανωμαλίες και δεσμοειδείς όγκους. Άλλη μια υποκατηγορία της νόσου FAP είναι το σύνδρομο Turcot, το οποίο σχετίζεται με όγκους του εγκεφάλου (5).

Ο *κληρονομικός- μη σχετιζόμενος με πολυποδίαση- ορθοκολικός καρκίνος (HNPCC)* είναι μια ετερογενής ομάδα διαταραχών που κληρονομείται κατά τον αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου, καρκίνου του ενδομητρίου, του λεπτού εντέρου και άλλων οργάνων.

Στις περιπτώσεις εκείνες που η διαταραχή προκαλείται από δυσλειτουργία της βλαστικής σειράς των γονιδίων επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (Mismatch Repair genes, MMR), γίνεται λόγος για το *σύνδρομο Lynch* (12). Πριν την ανακάλυψη της δυσλειτουργίας των MMR γονιδίων, χρησιμοποιούνταν κλινικά διαγνωστικά κριτήρια (κριτήρια Amsterdam I και II) για τον εντοπισμό οικογενειών με πιθανή κληρονομική μορφή καρκίνου του παχέος εντέρου. Οι οικογένειες που πληρούσαν τα εν λόγω κριτήρια αναφέρονταν ως πάσχουσες από HNPCC. Μέσω περαιτέρω γενετικών αναλύσεων, διαπιστώθηκε ότι ο κληρονομικός- μη σχετιζόμενος με πολυποδίαση- ορθοκολικός καρκίνος (HNPCC) αποτελεί στην πραγματικότητα μια ετερογενή ομάδα διαταραχών (Πίνακας 3), η οποία περιλαμβάνει και περιπτώσεις με άγνωστη μέχρι σήμερα γενετική βάση. Για την ανάδειξη των ατόμων που θα

πρέπει να υποβληθούν σε περαιτέρω έλεγχο χρησιμοποιούνται τα κριτήρια Bethesda (13).

Όνοματολογία	Κλινικός ορισμός	Γενετικό Υπόβαθρο
HNPC	Κριτήρια Amsterdam I, II	<ul style="list-style-type: none"> • Απουσία
Οικογενής ορθοκολικός καρκίνος (τύπος X) Προδιάθεση ορθοκολικού καρκίνου χωρίς σύνδρομο Lynch	Κριτήρια Amsterdam I	<ul style="list-style-type: none"> • Άγνωστη γενετική βάση • Απουσία δυσλειτουργίας MMR γονιδίων
Σύνδρομο Lynch	Οικογενής συγκέντρωση περιστατικών ορθοκολικού καρκίνου ή/και άλλων καρκίνων	<ul style="list-style-type: none"> • Διαταραχή γονιδίων DN A MMR στους γαμέτες • Μεθυλίωση του <i>MLH1</i> εκκινητή • Αδρανοποίηση του <i>MSH2</i>, λόγω έλλειψης των 3' εξονίων του γονιδίου EPCAM
Πιθανό σύνδρομο Lynch	Οικογενής συγκέντρωση περιστατικών ορθοκολικού καρκίνου ή/και άλλων καρκίνων	<ul style="list-style-type: none"> • Παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας και απουσία έκφρασης των DNA MMR πρωτεϊνών στους όγκους • Όχι ένδειξη μεθυλίωσης του <i>MLH1</i> εκκινητή
Υποψία συνδρόμου Lynch	Αναθεωρημένα κριτήρια Bethesda Κριτήρια Amsterdam I, II	<ul style="list-style-type: none"> • Απουσία

Πίνακας 3. Οικογενείς περιπτώσεις κληρονομικού ορθοκολικού καρκίνου χωρίς πολυποδίαση (5).

- ✓ Ορθοκολικός καρκίνος σε έδαφος φλεγμονώδους νόσου: Αποτελεί τη σοβαρότερη επιπλοκή σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, καθώς ευθύνεται για το ένα τρίτο των θανάτων των ασθενών. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκινώματος παχέος εντέρου εξαρτάται από διάρκεια της φλεγμονώδους νόσου, την έκταση της φλεγμονής, την παρουσία πρωτοπαθούς σκληρυντικής χολαγγειίτιδας ή παλίνδρομης ειλεΐτιδας. Η νόσος Crohn επίσης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος παχέος εντέρου, ο δε σχετικός κίνδυνος αυτής είναι αντίστοιχος της ελκώδους κολίτιδας (14, 15).

1.5.3 Γενετικό υπόβαθρο του καρκίνου του παχέος εντέρου

Μοντέλα πολυσταδιακής καρκινογένεσης

Οι πρώτες προσπάθειες διατύπωσης μιας ποσοτικής κυρίως περιγραφής της καρκινογένεσης, που να αντανακλά στη βασική βιολογική διαδικασία μετατροπής ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό, χρονολογούνται πριν από περισσότερο από μισό αιώνα (16). Οι Armitage και Doll ήταν από τους πρώτους που μελέτησαν τη συχνότητα εμφάνισης πολλών καρκινωμάτων σε συνάρτηση με την ηλικία και διατύπωσαν την υπόθεση πως η θετική αυτή συσχέτιση που παρατηρείται πιθανόν να σχετίζεται με τα στάδια που απαιτούνται για το σχηματισμό κακοήθειας (17).

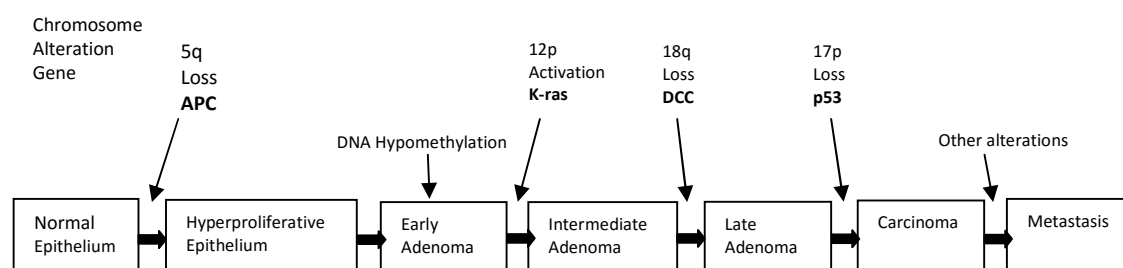
Ένα από τα πιο γνωστά μοντέλα καρκινογένεσης περιγράφηκε από τον Weinberg R., σύμφωνα με το οποίο για την ανάπτυξη κακοήθειας απαιτείται η ενεργοποίηση μιας σειράς ογκογονιδίων που δρουν σε κατάλληλα μονοπάτια και κατάλληλο κυτταρικό υπόστρωμα (18). Αρκετοί ερευνητές μελέτησαν τους μηχανισμούς της *in vivo* καρκινογένεσης, διαχωρίζοντας τη σε τρία διακριτά στάδια: την έναρξη (initiation), την προαγωγή (promotion) και την εξέλιξη (progression) (19, 20). Αρχικά απαιτείται η επίδραση ενός μεταλλαξογόνου ή καρκινογόνου παράγοντα. Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιείται ο πολλαπλασιασμός ορισμένων μόνο κυττάρων από το σύνολο των κυττάρων που δέχτηκαν την επίδραση του παραπάνω παράγοντα. Η κλωνική αυτή επέκταση αποτελεί το πιο απλό μοντέλο προαγωγής ενός όγκου και περιλαμβάνει γενετικούς και επιγενετικούς μηχανισμούς. Στο τρίτο στάδιο, μια σειρά ποιοτικών και κληρονομήσιμων αλλαγών στον παραπάνω υποπληθυσμό κυττάρων οδηγεί στην κακοήθεια ή σε αυξημένη τάση ανάπτυξης κακοήθειας (21).

Από τα πιο καλά μελετημένα παραδείγματα πολυσταδιακής καρκινογένεσης είναι το μοντέλο καρκινογένεσης του παχέος εντέρου, το οποίο προτάθηκε αρχικά από τον Vogelstein και τους συνεργάτες του (22, 23, 24).

Το αρχικό αυτό μοντέλο βασίστηκε στις ακόλουθες παρατηρήσεις: Επιδημιολογικές μελέτες για συνήθεις όγκους στον άνθρωπο, δείχνουν πως η συχνότητα εμφάνισής τους αυξάνει με την πρόοδο της ηλικίας. Μία προτεινόμενη εξήγηση είναι πως για την ανάπτυξη ενός καρκινικού όγκου απαιτούνται 3-7 «χτυπήματα», τα οποία πιθανότατα αναπαριστούν διαδοχικές μεταλλάξεις σε γονίδια που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η πρώτη μετάλλαξη σε ένα κύτταρο, έχει ως αποτέλεσμα μια περιορισμένη αύξηση των απογόνων του. Μια δεύτερη μετάλλαξη σε κάποιο από αυτά τα κύτταρα οδηγεί ενδεχομένως στην ανάπτυξη ενός μικρού μεγέθους καλοήθους όγκου. Στη συνέχεια ένα κύτταρο από τον όγκο αυτό αποκτά μια τρίτη μετάλλαξη που του δίνει τη δυνατότητα να αναπτυχθεί εις βάρος των άλλων κυττάρων και να δημιουργήσει ένα πιο επιθετικό υποπληθυσμό από κύτταρα που φέρουν και τις τρεις μεταλλάξεις.

Τελικά το κύτταρο αποκτά έναν επαρκή αριθμό «χτυπημάτων» που το καθιστά ικανό να διηθεί τους γύρω ιστούς και να μεθίσταται, μετατρέπεται δηλαδή σε καρκινικό. Στο μοντέλο αυτό των διαδοχικών «χτυπημάτων» εξηγείται η θετική συσχέτιση που παρατηρείται μεταξύ της συχνότητας των όγκων και της ηλικίας, δεδομένου ότι απαιτούνται αρκετά χρόνια ώστε ένας οργανισμός να αποκτήσει τις μεταλλάξεις που θα τον οδηγήσουν σε κακοήθεια.

Παρατηρήσεις στη μορφολογία των όγκων επίσης έρχονται σε συμφωνία με την παραπάνω θεωρία. Το αδеноκαρκίνωμα του παχέος εντέρου έχει αποτελέσει, όχι τυχαία, παράδειγμα πάνω στο οποίο έχουν βασισθεί πολλές θεωρίες γενετικής του καρκίνου. Ένας από τους λόγους είναι πως το αδеноκαρκίνωμα αυτό, στην πλειονότητα των περιπτώσεων προέρχεται από μια σαφώς ορισμένη και αναγνωρίσιμη βλάβη, το αδένωμα. Το τελευταίο είναι μια μικρού μεγέθους καλοήθους βλάβη και αποτελεί την πρώτη εκδήλωση νεοπλασίας στο επιθήλιο του παχέος εντέρου. Με την πάροδο του χρόνου, όμως, αυξάνεται το μέγεθός του, τα κύτταρα που το αποτελούν αποδιοργανώνονται και τελικά έχουμε το σχηματισμό καρκινώματος. Σύμφωνα με το μοντέλο του Vogelstein, οι μορφολογικές αυτές μεταβολές συνοδεύονται από την απόκτηση συγκεκριμένων μεταλλάξεων (Εικ. 4). Τα κύτταρα της καλοήθους πρόδρομης βλάβης φέρουν τις ίδιες μεταλλάξεις με τον καρκινικό ιστό, πλην όμως τουλάχιστον μίας.

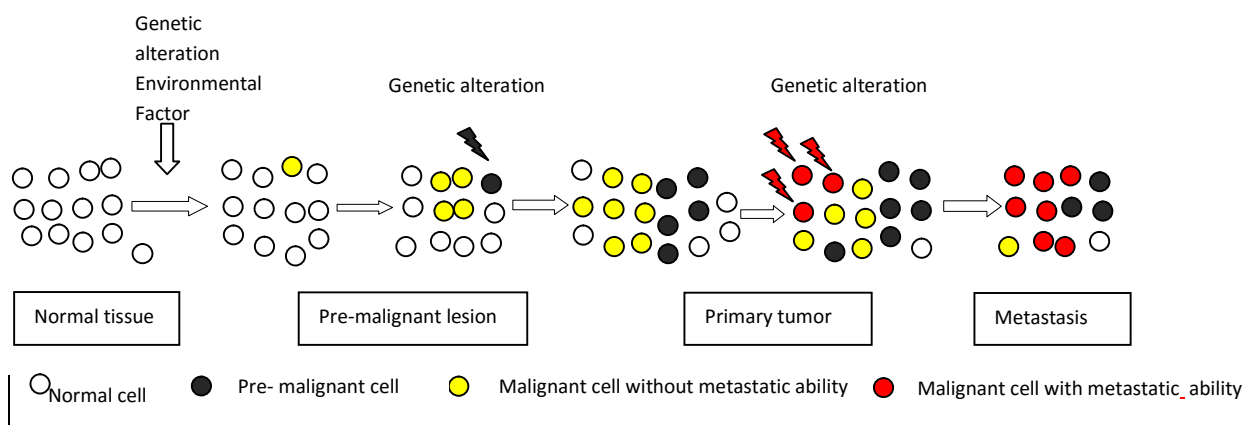


Εικόνα 4. Μοντέλο πολυσταδιακής καρκινογένεσης παχέος εντέρου, όπως περιγράφηκε από τους Vogelstein & Kinzler (24).

Στη διαδικασία της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου οι πρώτες αλλαγές που συμβαίνουν σε γενετικό επίπεδο είναι μεταλλάξεις που οδηγούν σε αποσιώπηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου APC (Adenomatous Polyposis Coli, APC). Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις που οδηγούν σε διαταραχή της έκφρασης του ογκογονιδίου KRAS επίσης αποτελούν πρώιμο συμβάν στην παραπάνω διαδικασία. Απώλεια ετεροζυγωτίας στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 18 (18q) παρατηρείται σε μεταγενέστερο στάδιο και συντελεί στην αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως το DCC. Σε αώτερο στάδιο παρατηρείται μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 στο χρωμόσωμα 17p, γεγονός που συμβάλει στην περαιτέρω απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και του

μηχανισμού της απόπτωσης. Επιπλέον, γενετικές αλλαγές που παρατηρούνται στα τελευταία στάδια της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου αφορούν απώλεια γονιδίων στα χρωμοσώματα 1q, 4p, 6p, 8p, 9q και 22q. Είναι πλέον γνωστό, ότι τα κύτταρα ενός κακοήθους νεοπλάσματος παρουσιάζουν βιολογική και φαινοτυπική ετερογένεια. Η ετερογένεια αυτή είναι αποτέλεσμα των διαφορετικών γενετικών αλλαγών που υπάρχουν σε κάθε καρκινικό κύτταρο. Αρκετά χρόνια πριν, ο Fidler, μελετώντας το μελάνωμα, απέδειξε πως ένας πρωτοπαθής όγκος είναι δυνατό να περιέχει υποπληθυσμούς καρκινικών κυττάρων με μεταστατική ή μη ικανότητα (25).

Τα καρκινικά κύτταρα που παρουσιάζουν υψηλή δυνατότητα μετάστασης συχνά διαθέτουν περισσότερες γενετικές μεταλλάξεις από τα μη- μεταστατικά κύτταρα. Παρατηρείται επίσης διαφορετική έκφραση σε διάφορα γονίδια μεταξύ των δύο παραπάνω τύπων καρκινικών κυττάρων. Αφού τα κύτταρα με τη δυνατότητα μετάστασης είναι εκείνα που θα δημιουργήσουν τον μεταστατικό όγκο σε κάποιο απομακρυσμένο όργανο, θεωρείται πως τα καρκινικά κύτταρα του μεταστατικού όγκου φέρουν όλες τις απαραίτητες εκείνες γενετικές μεταλλάξεις που απαιτούνται για τη διατήρηση του κακοήθους φαινοτύπου, συμπεριλαμβανόμενης της διηθητικής και της μεταστατικής ικανότητας (Εικ. 5) (26).



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση ενός μοντέλου πολυσταδιακής καρκινογένεσης σε συνάρτηση με την άθροιση γενετικών αλλαγών στα κύτταρα (Yokota et al, 2000).

Μηχανισμοί μοριακής γενετικής του καρκίνου του παχέος εντέρου

Η υπόθεση ότι ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί εξέλιξη πολύποδα διατυπώθηκε για πρώτη φορά το 1974 (27). Η παραπάνω θεωρία του Vogelstein και των συνεργατών του για την κλασική αλληλουχία «αδενώματος - καρκινώματος» του παχέος εντέρου και τις διαδοχικές γενετικές αλλαγές που τη συνοδεύουν, αποτέλεσε το βασικό και απαραίτητο υπόστρωμα όσον αφορά την έρευνα και κατανόηση της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου. Εντούτοις, ο ορθοκολικός καρκίνος είναι μια ετερογενής νόσος. Τόσο τα καρκινώματα του παχέος εντέρου όσο και οι πρόδρομες αλλοιώσεις τους, παρουσιάζουν διαφορετικό μοριακό

προφίλ, διακριτά ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά και διαφορές στη φυσική ιστορία της νόσου. Έχει πλέον διαπιστωθεί ότι στη νόσο συμμετέχουν τουλάχιστον τρία διαφορετικά μοριακά μονοπάτια (28). Πρόκειται για το *μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας* (Chromosomal INstability, CIN), το οποίο είναι και το συχνότερο, το *μονοπάτι του φαινοτύπου μεθυλίωσης των νησίδων CpG* (CpG Island Methylator Phenotype, CIMP), το οποίο είναι το δεύτερο βασικό μονοπάτι όσον αφορά τη σποραδική μορφή του ορθοκολικού καρκίνου και περιλαμβάνει περιπτώσεις σποραδικών όγκων με υψηλού βαθμού μικροδορυφορική αστάθεια και τέλος το *μονοπάτι της αμιγούς μικροδορυφορικής αστάθειας* (MicroSatellite Instability, MSI), το οποίο προκύπτει από μεταλλάξεις των γεννητικών κυττάρων στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση σφαλμάτων αντιστοίχισης κατά την αντιγραφή του DNA (Mismatch Repair genes, MMR). Ο κληρονομικός- μη σχετιζόμενος με πολυποδίαση- ορθοκολικός καρκίνος (HNPCC) αναπτύσσεται μέσω του τελευταίου μοριακού μηχανισμού.

A) Το μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας (chromosomal instability CIN)

Υπολογίζεται ότι η πλειονότητα των περιπτώσεων του καρκίνου του παχέος εντέρου (70-85% περίπου) αναπτύσσεται μέσω του μοριακού μονοπατιού της χρωμοσωμικής αστάθειας (29). Πρόκειται για μια γενετική διαταραχή που προκύπτει μέσω της άθροισης αριθμητικών ή δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών (ανευπλοϊδία) (30). Στο μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας περιλαμβάνεται η μετάλλαξη στο *APC* γονίδιο ή/και έλλειψη του χρωμοσώματος 5q, το οποίο περιέχει το γονίδιο *APC*, η μετάλλαξη του ογκογονιδίου *KRAS*, η απώλεια του χρωμοσώματος 18q και η έλλειψη του χρωμοσώματος 17p, το οποίο περιλαμβάνει το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53* (29, 31).

Το *APC* γονίδιο είναι ένα εξαιρετικά σημαντικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εμπλέκεται στον μηχανισμό της χρωμοσωμικής αστάθειας όσον αφορά στην ανάπτυξη κακοήθειας στο παχύ έντερο. Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μεγέθους 312 kDa αποτελούμενη από 2843 αμινοξέα, η οποία παρουσιάζει πολλές λειτουργίες. Χαρακτηρίζεται από πολλές διαφορετικές περιοχές μέσω των οποίων αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες όπως η *β-κατενίνη* και οι κινάσες GSK 3β και Bub (32). Η φυσιολογική σύνδεση της πρωτεΐνης *APC* με τη *β-κατενίνη*, ασκεί ανασταλτική δράση στο σηματοδοτικό κυτταρικό μονοπάτι *Wnt*, μέσω του οποίου ρυθμίζονται σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη, η απόπτωση και η διαφοροποίηση (33, 34). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *APC* φαίνεται να είναι βασικής σημασίας στα αρχικά στάδια της αλληλουχίας «αδενώματος- καρκινώματος» του παχέος εντέρου (35). Συγκεκριμένες μεταλλάξεις, που οδηγούν σε καρκινογένεση, συνήθως προκαλούν διαταραχή της σύνδεσης της *APC* πρωτεΐνης με τη *β-κατενίνη* (36).

Σύμφωνα με σχετικές μελέτες, μεταλλάξεις στο *APC* γονίδιο παρατηρούνται συχνά τόσο στα καρκινώματα που εντοπίζονται στο κόλον (60%) όσο και στον καρκίνο του ορθού (82%) (37).

Το *KRAS* γονίδιο είναι ένα ακόμη σημαντικό γονίδιο του μονοπατιού της χρωμοσωμικής αστάθειας. Πρόκειται για ένα πρωτο-ογκογονίδιο που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση των ενδοκυττάρων μηνυμάτων, όπως αναλύεται εκτενέστερα στη σχετική ενότητα. Μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού *RAS/RAF/MEK/ERK* ρυθμίζει βασικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η διαφοροποίηση και η κυτταρική διαίρεση. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, οι μεταλλάξεις του *KRAS* γονιδίου παρατηρούνται συχνότερα στα κωδικόνια 12, 13, 61 και σπανιότερα στο κωδικόνιο 146 του γονιδίου. Πρόκειται για “ενεργοποιητικές” μεταλλάξεις, που εξασφαλίζουν τη διατήρηση της *Kras* πρωτεΐνης σε ενεργό μορφή, γεγονός που προδιαθέτει στην ανάπτυξη και κακοήγη εξαλλαγή των αδενωμάτων του παχέος εντέρου (38). Οι παραπάνω μεταλλάξεις ανευρίσκονται σε ποσοστό περίπου 35-42% των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου (39).

Είναι γνωστό πως στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 18 εδράζονται τα ογκοκατασταλτικά γονίδια *DCC*, *SMAD2* και *SMAD4*. Τα δύο τελευταία μετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του *TGF-β* (*Tumor Growth Factor-β*) παράγοντα, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και της απόπτωσης (40). Απώλεια των συγκεκριμένων περιοχών του χρωμοσώματος 18 όπου εδράζονται τα παραπάνω γονίδια διαπιστώνεται έως και στο 60% των περιπτώσεων ορθοκολικού καρκίνου (22).

Η γενετική διαταραχή του γονιδίου *TP53*, συνήθως μέσω απώλειας ετεροζυγωτίας του χρωμοσώματος 17p και σπανιότερα μέσω μετάλλαξης, συμβαίνει συνήθως στα όψιμα στάδια της αλληλουχίας «αδενώματος-καρκινώματος» του παχέος εντέρου. Η πρωτεΐνη *p53* φυσιολογικά δρα ως επιβραδυντής του κυτταρικού κύκλου, παρέχοντας με τον τρόπο αυτό επαρκή χρόνο για επιδιόρθωση του *DNA* από ενδεχόμενες βλάβες. Σε περιπτώσεις εκτεταμένης γενετικής βλάβης, μέσω προ- αποπτωτικών γονιδίων επάγει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (41). Στα καρκινώματα του παχέος εντέρου, γενετική διαταραχή του εν λόγω γονιδίου παρατηρείται σε ποσοστό 50-75% (39).

Το γενετικό μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας και η αντίστοιχη ιστοπαθολογική μορφολογική ακολουθία «αδενώματος-καρκινώματος», έχει προσφέρει τα βασικά θεμέλια της μοριακής ταξινόμησης της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου. Παρά το γεγονός ότι αποτελεί το συχνότερο γενετικό μηχανισμό ανάπτυξης των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου, είναι πλέον γνωστό ότι ο ορθοκολικός καρκίνος επάγεται και με άλλους γενετικούς μηχανισμούς.

B) Το μονοπάτι του φαινοτύπου μεθυλίωσης των CpG νησίδων (CpG Island Methylator Phenotype, CIMP)

Ο συγκεκριμένος γενετικός μηχανισμός παρατηρείται στο 15% περίπου των σποραδικών περιπτώσεων καρκινώματος του παχέος εντέρου (42). Το μονοπάτι αυτό χαρακτηρίζεται από επιγενετική αστάθεια, η οποία προκύπτει από την αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, μέσω υπερμεθυλίωσης των αντίστοιχων εκκνητών τους και από την υπομεθυλίωση του συνολικού DNA που συνυπάρχει (43). Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν τη, μέσω υπερμεθυλίωσης των εκκνητών, αποσιώπηση των γονιδίων και την υπομεθυλίωση του ολικού DNA δεν είναι πλήρως κατανοητοί.

Αρκετή έρευνα διεξάγεται για τον καθορισμό σαφών κριτηρίων και δεικτών με σκοπό το χαρακτηρισμό των παραπάνω περιπτώσεων και ορισμένοι μελετητές προτείνουν την περαιτέρω διάκριση των όγκων αυτών σε υψηλού (CIMP-high/CIMP-1) και χαμηλού βαθμού (CIMP-low/CIMP-2), ανάλογα με το βαθμό υπερμεθυλίωσης των CpG νησίδων (44). Εντούτοις, οι διαφορές μεταξύ υψηλόβαθμης (CIMP-high) και χαμηλόβαθμης (CIMP-low) μεθυλίωσης των νησίδων CpG μπορεί να μην είναι απλώς ποσοτικές. Οι όγκοι που εμφανίζουν υψηλόβαθμη μεθυλίωση των νησίδων CpG χαρακτηρίζονται από συχνότερες μεταλλάξεις του *BRAF* γονιδίου και εμφανίζουν μεθυλίωση σε αρκετούς δείκτες, σύμφωνα με μια γενικευμένη αύξηση *de novo* μεθυλίωσης (45, 46).

Αντίθετα, οι όγκοι χαμηλόβαθμης μεθυλίωσης εμφανίζουν πολύ συχνά μεταλλάξεις του γονιδίου *KRAS* (92%) και χαρακτηρίζονται από ένα «πυκνότερο» πρότυπο μεθυλίωσης σε μικρότερο αριθμό γονιδίων (45, 46). Είναι πιθανό να απαιτείται συνέργεια μεταξύ των μεταλλάξεων στα γονίδια *KRAS* ή/και *BRAF* και συγκεκριμένων προτύπων μεθυλίωσης του DNA για τη δημιουργία πρώιμων ογκογόνων συμβάντων (47).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα καρκινώματα του παχέος εντέρου που αναπτύσσονται μέσω του συγκεκριμένου γενετικού μηχανισμού παρουσιάζουν διαφορές, σε σχέση με τους όγκους που αναπτύσσονται μέσω των άλλων μονοπατιών, όσον αφορά στην πρόδρομη βλάβη (47). Τα καρκινώματα του παχέος εντέρου που αναπτύσσονται μέσω του μηχανισμού της χρωμοσωμικής αστάθειας, όπως επίσης και οι περιπτώσεις του *κληρονομικού- μη σχετιζόμενου με πολυποδίαση- ορθοκολικού καρκίνου (HNPCC)* προέρχονται από τα αδενώματα (48, 49). Όσον αφορά στο μονοπάτι μεθυλίωσης CIMP, τα οδοντωτά άμισχα αδενώματα (SSA) και τα συνήθη οδοντωτά αδενώματα (TSA) θεωρούνται ως η κύρια ιστοπαθολογική πρόδρομη αλλοίωση (28).

Γ) Το μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας (MicroSatellite Instability pathway, MSI)

Πρόκειται για τον τύπο της γενομικής αστάθειας που προκαλείται από μεταλλάξεις στις νουκλεοτιδικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, γνωστές ως μικροδορυφορικές επαναλήψεις (microsatellites). Οι νουκλεοτιδικές επαναλήψεις είναι διάσπαρτες σε όλη την έκταση του γονιδιώματος. Η μικροδορυφορική αστάθεια αφορά στην ασυμφωνία και επομένως αστάθεια, που προκύπτει από τις μικροδορυφορικές επαναλήψεις μεταξύ των καρκινικών και των γεννητικών κυττάρων. Το μονοπάτι αυτό συνδέεται στενά με το μηχανισμό επιδιόρθωσης MMR (Mismatch Repair system), που έχει ως στόχο την αποκατάσταση των σφαλμάτων που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA από τις DNA πολυμεράσες. Το σύστημα αυτό διαθέτει τουλάχιστον επτά διαφορετικές πρωτεΐνες (MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1, PMS2) οι οποίες, συνδεδεμένες με ποικίλους τρόπους, σχηματίζουν ετεροδιμερή μόρια, τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να αναγνωρίσουν και να επιδιορθώσουν λάθη κατά την αντιγραφή του DNA. Οι μικροδορυφορικές επαναλήψεις είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς σε τέτοιου είδους λάθη κατά το ζευγάρωμα των βάσεων κι επομένως οποιαδήποτε μετάλλαξη οδηγεί σε διαταραχή του μηχανισμού επιδιόρθωσης MMR, θα μπορούσε να προδιαθέσει στην ανάπτυξη μικροδορυφορικής αστάθειας (50).

Οι ασθενείς που πάσχουν από το σύνδρομο Lynch ή τον κληρονομικό- μη σχετιζόμενο με πολυποδίαση- ορθοκολικό καρκίνο (HNPCC) αναπτύσσουν MSI όγκους, καθώς φέρουν στα γεννητικά κύτταρα μεταλλάξεις στα MMR γονίδια (51). Ανεπάρκεια του MMR συστήματος μπορεί επίσης να συμβεί μέσω υπερμεθυλίωσης των εκκνητών των MMR γονιδίων. Τέτοιου είδους καρκινώματα χαρακτηρίζονται επομένως τόσο από το μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας όσο και από το CIMP μονοπάτι. Ο μηχανισμός αυτός φαίνεται να ισχύει στις σποραδικές μορφές των MSI όγκων (52). Το μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας διαφέρει από εκείνο της χρωμοσωμικής αστάθειας στο γεγονός ότι χαρακτηρίζεται από φυσιολογικό καρυότυπο με μοναδικό μοριακό γενετικό προφίλ (53). Οι όγκοι που παρουσιάζουν μικροδορυφορική αστάθεια διακρίνονται στη συνέχεια σε όγκους υψηλού (MSI-high) και χαμηλού (MSI-low) βαθμού μικροδορυφορικής αστάθειας, ανάλογα με τις ποσοτικές διαφορές που παρουσιάζουν στο βαθμό της αστάθειας. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, οι ασθενείς που αναπτύσσουν καρκίνωμα παχέος εντέρου με αυτό το μηχανισμό τείνουν να έχουν καλύτερη πρόγνωση από εκείνους που φέρουν CIN όγκους (54, 55).

Συμπερασματικά, το βασικότερο γενετικό μονοπάτι καρκινογένεσης του παχέος εντέρου είναι το μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας (CIN), το οποίο χαρακτηρίζεται από ανευπλοειδία και περιλαμβάνει διαδοχικές μεταλλάξεις ή απώλεια των γονιδίων *APC*, *KRAS*, *SMAD2*, *SMAD4*, *DCC* και *TP53*. Το σηματοδοτικό

μονοπάτι Wnt διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλά από αυτά τα καρκινώματα. Η ενδοκυττάρια μεταφορά μηνυμάτων μέσω του RAS/RAF/MEK/ERK μονοπατιού αποτελεί ένα σημαντικό μονοπάτι που εμπλέκεται τόσο στο μηχανισμό της χρωμοσωμικής αστάθειας, όσο και στον μηχανισμό του φαινοτύπου μεθυλίωσης των CpG νησίδων (CIMP). Το μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας, μορφολογικά, διέρχεται από το αδένωμα με χαμηλού βαθμού δυσπλασία στο αδένωμα με υψηλόβαθμη δυσπλασία. Μικρός αριθμός περιπτώσεων, αναπτύσσει διηθητική νόσο, ένα καρκίνωμα με μοριακά μικροδορυφορική σταθερότητα (MSS).

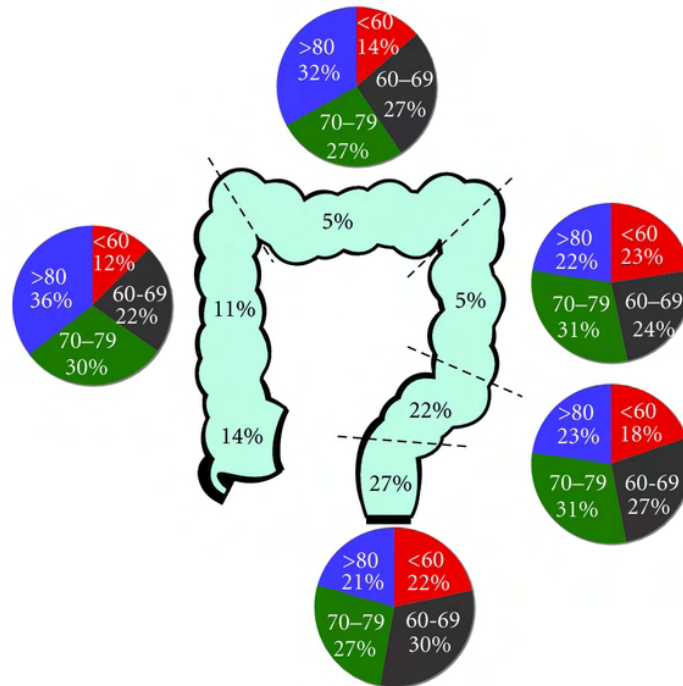
Το μονοπάτι φαινοτύπου μεθυλίωσης των CpG νησίδων (CIMP) σχετίζεται συνήθως με μεταλλάξεις του γονιδίου *BRAF*, ενώ οι όγκοι που δεν χαρακτηρίζονται από τέτοιου είδους μετάλλαξη (*BRAF* wild-type) είναι δυνατό να σχετίζονται με μεταλλάξεις του *KRAS* γονιδίου.

Μικρό ποσοστό καρκινωμάτων του παχέος εντέρου (<5%) αναπτύσσεται μέσω του μηχανισμού της αμιγούς μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) που προκαλείται από μετάλλαξη των γονιδίων του συστήματος MMR. Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων που σχετίζονται με την ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας αποτελούν η φλεγμονώδης λεμφοκυτταρική διήθηση του νεοπλάσματος, η φλεγμονώδης αντίδραση τύπου Crohn και ο βλεννώδης/κύτταρα signet-ring ή μυελώδης ιστολογικός τύπος (28).

1.5.4 Εντόπιση

Ο ορθοκολικός καρκίνος είναι δυνατό να αναπτυχθεί σε οποιοδήποτε σημείο κατά μήκος του παχέος εντέρου. Τα τελευταία χρόνια, πληθαίνουν διαρκώς οι μελέτες που υποστηρίζουν ότι η επιδημιολογία, η καρκινογένεση, το μοριακό προφίλ και η κλινική συμπεριφορά του ορθοκολικού καρκίνου μπορεί διαφέρουν, ανάλογα με το τμήμα του παχέος εντέρου, όπου αναπτύσσεται αρχικά το καρκίνωμα (56).

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, τα καρκινώματα του παχέος εντέρου εντοπίζονται στο σιγμοειδές και το ορθό. Εντούτοις, το ποσοστό των καρκινωμάτων με δεξιά εντόπιση αυξάνει με την άνοδο της ηλικίας των ασθενών (Εικ. 6) (56).



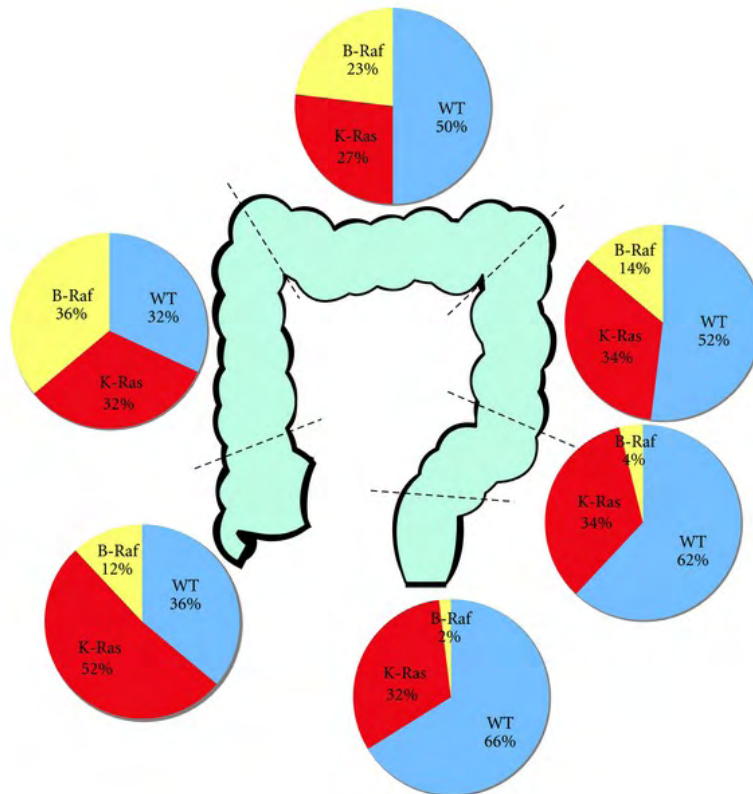
Εικόνα 6. Επιδημιολογία του ορθοκολικού καρκίνου με βάση την πρωτοπαθή εστία. (Δεδομένα από UK national statistics [http:// info.cancerresearchuk.org /cancerstats/ types/bowel/incidence/ukbowel-cancer-incidence-statistics](http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/types/bowel/incidence/ukbowel-cancer-incidence-statistics). Ηλικιακή κατανομή ανάλογα με την εντόπιση σύμφωνα με τους Hemminki et al. (57)

Επιπλέον, εκτός από την αυξημένη ηλικία, οι ορθοκολικοί καρκίνοι με εγγύς εντόπιση παρατηρούνται συχνότερα στα θηλυκά άτομα (58, 59). Άλλοι επιδημιολογικοί παράγοντες που έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος παχέος εντέρου με εγγύς εντόπιση είναι το ιστορικό προηγηθείσας χολοκυστεκτομής και η παχυσαρκία (60, 61).

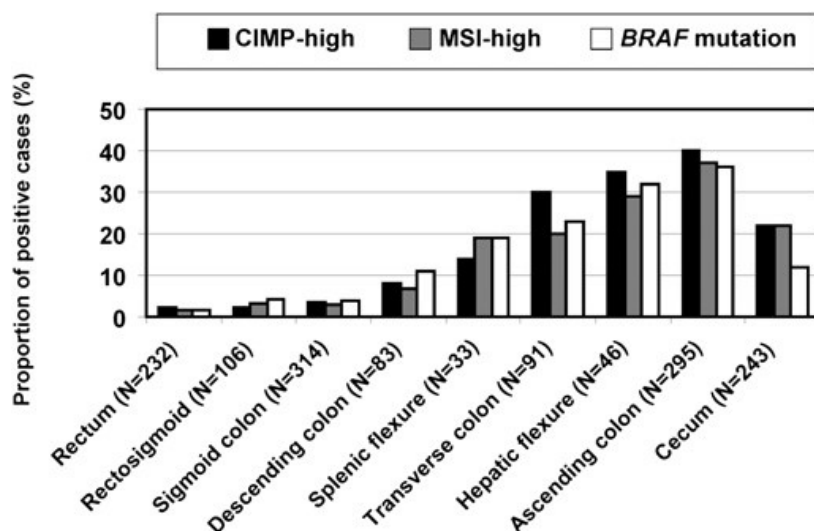
Όσον αφορά στην κλινική συμπεριφορά των όγκων, οι ασθενείς που αναπτύσσουν εγγύτερους όγκους είναι πιο πιθανό να παρουσιάσουν τοπικά προχωρημένη νόσο, καρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης (58, 59, 62) και καρκινωμάτωση του περιτοναίου (63). Αναφορικά με τους δείκτες επιβίωσης και την πρόγνωση των ασθενών με καρκίνωμα του παχέος εντέρου, οι περισσότερες μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η πρόγνωση είναι πιο δυσμενής όταν πρόκειται για όγκους με εγγύτερη εντόπιση σε σχέση με τους πιο περιφερικούς ορθοκολικούς καρκίνους (64, 65).

Επιπρόσθετα, νεότερα δεδομένα παρουσιάζουν συσχέτιση μεταξύ ανατομικής εντόπισης του όγκου και ιστολογικής διαφοροποίησης του, καθώς παρατηρείται αυξημένη συχνότητα των καρκινωμάτων χαμηλής διαφοροποίησης, των καρκινωμάτων με ενδοκυτταροπλασματική βλέννη (signet- ring cell carcinoma), όπως επίσης και των καρκινωμάτων βλενώδους διαφοροποίησης σε κεντρικότερα τμήματα του παχέος εντέρου (62, 66).

Όσον αφορά τα μοριακά χαρακτηριστικά των ορθοκολικών καρκινωμάτων, έχει παρατηρηθεί ότι οι συχνότητες του φαινοτύπου αυξημένης μεθυλίωσης των CpG νησίδων (CIMP- high), της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI- high) και των μεταλλάξεων του γονιδίου BRAF αυξάνονται βαθμιαία από το ορθό προς το ανιόν κόλον, ενώ οι μεταλλάξεις του KRAS εμφανίζουν τη μεγαλύτερη συχνότητα στην περιοχή του τυφλού. (Εικ. 7, 8) (56, 62).



Εικόνα 7. Συχνότητα μεταλλάξεων των KRAS, BRAF γονιδίων, σε σχέση με την αρχική εντόπιση του όγκου. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν από τη μελέτη των Yamauchi et al (62).



Εικόνα 8. Διάγραμμα συχνότητων των CIMP-high, MSI-high, και BRAF μεταλλάξεων του ορθοκολικού καρκίνου ανάλογα με την εντόπιση του στα διάφορα τμήματα του παχέος εντέρου. Οι συχνότητες αυξάνονται βαθμιαία από το ορθό προς το ανιόν κόλον, ενώ μειώνονται πάλι στο τυφλό. CIMP: CpG island methylator phenotype. MSI: microsatellite instability. M. Yamauchi et al (62).

1.5.5 Κλινική εικόνα

Ορισμένοι ασθενείς μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί, ιδιαίτερα όταν η διάγνωση του νεοπλασματος γίνεται στα πλαίσια προσυμπτωματικού ελέγχου ή παρακολούθησης των ασθενών. Η απώλεια αίματος από το ορθό και η αναιμία αποτελούν συχνά ευρήματα και οφείλονται στην αιμορραγία του νεοπλασματος.

Η κλινική εικόνα του καρκινώματος του παχέος εντέρου ποικίλει ανάλογα με την εντόπιση. Σε γενικές γραμμές, οι όγκοι που αναπτύσσονται στο δεξιό κόλον καθυστερούν να προκαλέσουν συμπτώματα, εξαιτίας της πιο υδαρούς σύστασης του περιεχομένου και της μεγαλύτερης διαμέτρου που εμφανίζει το παχύ έντερο στο δεξιό τμήμα του. Για το λόγο αυτό συνήθως εκδηλώνονται με αναιμία λόγω της χρόνιας μικροσκοπικής απώλειας αίματος. Αντιθέτως, οι όγκοι που εντοπίζονται στο αριστερό κόλον προκαλούν αποφρακτικά συμπτώματα ως πρώτη εκδήλωση. Οι όγκοι του σιγμοειδούς και του ορθού μπορούν να προκαλέσουν τεινεσμό και αιμορραγία. Άλλα μη ειδικά συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό, αδιαθεσία, απώλεια βάρους και κοιλιακό άλγος. Ένα ποσοστό των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο, περίπου το 25%, διαγιγνώσκεται με μεταστατική νόσο. Οι συχνότερες θέσεις εντόπισης των μεταστατικών εστιών είναι το ήπαρ και οι πνεύμονες. Στις περιπτώσεις αυτές η συμπτωματολογία των ασθενών μπορεί να προέρχεται και από τις μεταστατικές βλάβες (5).

1.5.6 Προσυμπτωματικός έλεγχος και πρόληψη

Είναι γεγονός ότι ο προσυμπτωματικός έλεγχος συμβάλλει αποτελεσματικά στη μείωση της θνητότητας από καρκίνο του παχέος εντέρου. Ασυμπτωματικοί ασθενείς ηλικίας >50 ετών θα πρέπει να υποβάλλονται σε μια από τις ακόλουθες μεθόδους προσυμπτωματικού ελέγχου: εξέταση κοπράνων για μικροσκοπική απώλεια αίματος, εύκαμπτη σιγμοειδοσκόπηση, βαριούχος υποκλυσμός διπλής αντίθεσης με εμφύσηση αέρα και κολονοσκόπηση. Είναι γεγονός ότι καμία από τις παραπάνω μεθόδους δεν μπορεί να θεωρηθεί με σιγουριά ως η ιδεατή μέθοδος προσυμπτωματικού ελέγχου, καθώς θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι κίνδυνοι, το κόστος και η αποτελεσματικότητά τους.

Για τους ασθενείς με ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό ορθοκολικών νεοπλασμάτων, FAP, HNPCC ή φλεγμονώδους νόσου του εντέρου, ακολουθούνται λεπτομερή και αυστηρά πρωτόκολλα παρακολούθησης εξαιτίας του υψηλότερου κινδύνου που διαθέτουν οι ασθενείς αυτοί (67).

Νεότερες τεχνικές, όπως η ενδοσκόπηση μεγέθυνσης, η χρωμοενδοσκόπηση και η συνεστιακή ενδοσκόπηση μπορούν να αυξήσουν την ευαισθησία της συμβατικής κολονοσκόπησης, ανιχνεύοντας και μη-προεξέχουσες αλλοιώσεις του βλεννογόνου. Οι μοριακές εξετάσεις αίματος και κοπράνων επίσης υπόσχονται σημαντικές αλλαγές στον τομέα του προσυμπτωματικού ελέγχου του καρκίνου του παχέος εντέρου. Εντούτοις, η πιο σημαντική αλλά και οικονομική μέθοδος πρόληψης του ορθοκολικού καρκίνου παραμένει η αλλαγή του τρόπου ζωής και πιο συγκεκριμένα η πλούσια σε φυτικές ίνες διατροφή, η αποφυγή λιπαρών τροφών, καπνίσματος και αλκοόλ, η φυσική άσκηση και η ρύθμιση του σωματικού βάρους (68, 69).

1.5.7 Ιστοπαθολογική αξιολόγηση

1.5.7.1 Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά καρκινωμάτων παχέος εντέρου

Τα καρκινώματα του παχέος εντέρου είναι δυνατόν να παρουσιάσουν ποικίλες μακροσκοπικές εικόνες. Σε αρκετές περιπτώσεις, ο όγκος αναπτύσσεται εξωφυτικά, με ενδοαυλική κυρίως ανάπτυξη, ενώ άλλοι όγκοι μπορεί να αναπτύσσονται ενδοφυτικά, παρουσιάζοντας εξέλκωση και ενδοτοιχωματική κυρίως ανάπτυξη. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου τα νεοπλάσματα αναπτύσσονται δακτυλιοειδώς, με κυκλοτερή συμμετοχή του εντερικού τοιχώματος και στένωση του αυλού του παχέος εντέρου. Ο εξωφυτικός τρόπος ανάπτυξης παρατηρείται συχνότερα σε όγκους που εντοπίζονται εγγύτερα της σπληνικής καμπής, ενώ αντίθετα τα νεοπλάσματα του κατιόντος κόλου και του ορθού είναι συχνότερα ενδοφυτικά και δακτυλιοειδή. Σπανιότερα, οι όγκοι παρουσιάζουν ένα διάχυτο πρότυπο διήθησης

με τη μορφή της πλαστικής λινίτιδας. Η συνύπαρξη περισσότερων του ενός προτύπων και η εξέγκωση αποτελούν συχνά φαινόμενα των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου.

Στις διατομές, τα εν λόγω καρκινώματα χαρακτηρίζονται από σχετικά ομοιογενή εμφάνιση, φαιή/ λευκωπή χροιά, ενώ στην περίπτωση που τα νεοπλάσματα παράγουν βλέννη, η εμφάνιση είναι περισσότερο ζελατινώδης.

Κατά την ιστολογική εξέταση ενός όγκου του παχέος εντέρου, ο καθορισμός της εντόπισής του είναι βασικής σημασίας για την επιλογή του κατάλληλου συστήματος σταδιοποίησης, όπως αναλύεται παρακάτω, για το χαρακτηρισμό των επιχώριων λεμφαδένων, αλλά και την εκτίμηση της κατάστασης των περιμετρικών χειρουργικών ορίων (circumferential radial margin, CRM), ανάλογα με την κάλυψη ή μη του πάσχοντος τμήματος του παχέος εντέρου από το περιτόναιο.

Κατά τη μακροσκοπική μελέτη των ορθοκολικών όγκων εκτιμάται επίσης και το μέγεθος αυτών. Είναι γεγονός ότι σύμφωνα με αρκετές μελέτες το μέγεθος του καρκινώματος του παχέος εντέρου, σε αντίθεση με άλλους όγκους, δε φαίνεται να έχει προγνωστική σημασία και να σχετίζεται με την έκβαση της νόσου (70, 71).

Ωστόσο, αναφέρεται ως πληροφορία κατά την ιστοπαθολογική εκτίμηση, καλύπτοντας περισσότερο ανάγκες ποιοτικού ελέγχου και κλινικο- ιστοπαθολογικών συσχετίσεων (π.χ. δυνατότητα σύγκρισης πραγματικού μεγέθους του όγκου με τις μετρήσεις των απεικονιστικών μεθόδων).

1.5.7.2 Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά καρκινωμάτων παχέος εντέρου

Ιστολογικοί τύποι

Η πλειονότητα των περιπτώσεων (>90%) των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου είναι *αδενοκαρκινώματα* (72). Ιστολογικά, χαρακτηρίζονται από νεοπλασματικούς αδενικούς σχηματισμούς, το ποσοστό των οποίων καθορίζει και το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου (Πίνακας 4).

Ιστολογικός τύπος	Κριτήρια	Διαφοροποίηση	Αριθμητική βαθμονόμηση (Grade)	Περιγραφική βαθμονόμηση (Grade)
Αδενοκαρκίνωμα	>95% αδενικές δομές	Καλής διαφοροποίησης	1	Χαμηλού βαθμού κακοήθειας (low grade)
	50-95% αδενικές δομές	Μέτριας διαφοροποίησης	2	Χαμηλού βαθμού κακοήθειας (low grade)
	<49% αδενικές δομές	Χαμηλής διαφοροποίησης	3	Υψηλού βαθμού κακοήθειας (high grade)

Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα	0%	Απουσία διαφοροποίησης	4	Υψηλού βαθμού κακοήθειας
Καρκίνωμα με κύτταρα με μορφολογία «δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου»	Εξ' ορισμού	Χαμηλής διαφοροποίησης	3	Υψηλού βαθμού κακοήθειας

Πίνακας 4. Κριτήρια ιστολογικής βαθμονόμησης των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου

Τα διαγνωστικά κριτήρια των επιθηλιακών νεοπλασμάτων του παχέος εντέρου ποικίλουν μεταξύ διαφορετικών χωρών. Στις Δυτικές χώρες, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας, το καθοριστικό στοιχείο για τη διάγνωση του καρκινώματος αποτελεί η διηθητική ανάπτυξη του νεοπλάσματος, πέρα από τη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα, στον υποβλεννογόνιο χιτώνα. Οι ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις διαγιγνώσκονται ως «δυσπλασία», ενώ ο όρος «αδενοκαρκίνωμα» χρησιμοποιείται μόνο στην περίπτωση που διαπιστώνεται διήθηση του υποβλεννογόνιου χιτώνα (73). Αντίθετα στην Ιαπωνία, για την περιγραφή των ενδοεπιθηλιακών όγκων χρησιμοποιούνται οι όροι «ήπια δυσπλασία- μέτρια δυσπλασία- ενδοβλεννογόνιο καρκίνωμα», ανάλογα με το βαθμό κυτταρολογικής και αρχιτεκτονικής ατυπίας και σύμφωνα με τα Ιαπωνικά κριτήρια του ορθοκολικού καρκίνου (Πίνακας 5) (74, 75).

Ενδοβλεννογόνιος επιθηλιακός όγκος			
Ιαπωνία	Χαμηλού βαθμού Αδένωμα	Υψηλού βαθμού αδένωμα	Ενδοβλεννογόνιο αδενοκαρκίνωμα
Μ. Βρετανία	Ήπια δυσπλασία	Μέτρια δυσπλασία	Έντονη δυσπλασία
ΗΠΑ	Χαμηλού βαθμού δυσπλασία		Υψηλού βαθμού δυσπλασία

Πίνακας 5. Διαφορές στην ιστοπαθολογική διάγνωση των ορθοκολικών ενδοεπιθηλιακών όγκων μεταξύ Ιαπωνίας και Δυτικών χωρών.

Σύμφωνα με την αναθεωρημένη ταξινόμηση της WHO για το 2010, ως *δυσπλασία* ορίζεται το αδιαμφισβήτητο, ιστοπαθολογοανατομικά, νεοπλασματικό επιθήλιο που δεν παρουσιάζει στοιχεία διηθητικής ανάπτυξης (76). Στις περιπτώσεις επομένως που είναι παρόντα στοιχεία κυτταρολογικής ή/και αρχιτεκτονικής νεοπλασίας, ο όρος της δυσπλασίας είναι κατάλληλος, ενώ ο όρος του *ενδοβλεννογόνιου αδενοκαρκινώματος* χρησιμοποιείται για τις αλλοιώσεις στις οποίες τεκμηριώνεται ιστολογικά η διήθηση του χορίου ή της βλεννογόνιας μυϊκής στιβάδας, αλλά όχι του υποβλεννογόνιου χιτώνα. Η ταξινόμηση της γαστρεντερικής

επιθηλιακής νεοπλασίας της Βιέννης (Vienna classification of GEN) επιχειρεί να επιλύσει τις παραπάνω διαφορές μεταξύ των χωρών και να εξορθολογήσει το σύστημα ταξινόμησης της γαστρεντερικής επιθηλιακής νεοπλασίας. Στο αναθεωρημένο σύστημά της (2002) περιλαμβάνονται πέντε κατηγορίες (Πίνακας 6) (77).

Κατηγορία	Διάγνωση
1	Αρνητικό για νεοπλασία
2	Αδιευκρίνιστο για νεοπλασία
3	Χαμηλόβαθμη νεοπλασία του βλεννογόνου Χαμηλού βαθμού αδένωμα Χαμηλού βαθμού δυσπλασία
4	Υψηλόβαθμη νεοπλασία του βλεννογόνου 4.1 Υψηλόβαθμο αδένωμα/ δυσπλασία 4.2 Μη διηθητικό καρκίνωμα (in situ) 4.3 Υποπτο για διηθητικό καρκίνωμα 4.4 Ενδοβλεννογόνιο καρκίνωμα
5	Υποβλεννογόνια διήθηση από το καρκίνωμα

Πίνακας 6. Αναθεωρημένη ταξινόμηση της Βιέννης για την γαστρεντερική επιθηλιακή νεοπλασία (2002).

Επιπρόσθετα, έχουν περιγραφεί κι άλλοι, σπανιότεροι, ιστολογικοί τύποι καρκινώματος του παχέος εντέρου, ορισμένοι από τους οποίους σχετίζονται με συγκεκριμένα μοριακά χαρακτηριστικά:

- **Βλεννώδες αδenoκαρκίνωμα:** πρόκειται για νεόπλασμα που χαρακτηρίζεται από την παρουσία εξωκυττάριας βλέννης σε έκταση >50% της συνολικής αλλοίωσης. Το επιθηλιακό της στοιχείο μπορεί να διατάσσεται σε αδενικές δομές, λωρίδες ή να αφορά μεμονωμένα νεοπλασματικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων με μορφολογία «δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου» (signet- ring cells). Τα καρκινώματα που παρουσιάζουν εξωκυττάρια παραγωγή βλέννης σε ποσοστό <50% της συνολικής έκτασης του όγκου, ταξινομούνται ως έχοντα βλεννώδες συστατικό κι όχι ως βλεννώδη αδenoκαρκινώματα. Στην πλειοψηφία τους τα εν λόγω καρκινώματα χαρακτηρίζονται μοριακά από υψηλού επιπέδου μικροδορυφορική αστάθεια (MSI- H).

- **Καρκίνωμα με κύτταρα με μορφολογία «δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου» (signet-ring cell carcinoma):** πρόκειται για υπότυπο αδenoκαρκινώματος, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την παρουσία νεοπλασματικών κυττάρων με ενδοκυττάρια βλέννη. Η τελευταία βρίσκεται στα κύτταρα με τη μορφή κενοτοπίου που απωθεί τον πυρήνα στην περιφέρεια και οδηγεί στη χαρακτηριστική μορφολογία των κυττάρων. Για τη διάγνωση του παραπάνω καρκινώματος θα πρέπει τα εν λόγω νεοπλασματικά κύτταρα να συνιστούν τουλάχιστον το 50% του συνόλου των κυττάρων του όγκου. Τα καρκινώματα αυτά συχνά χαρακτηρίζονται από επιθετική βιολογική συμπεριφορά, εκτός από τις περιπτώσεις εκείνες που σχετίζονται με υψηλού επιπέδου μικροδορυφορική αστάθεια (MSI- H) (78).
- **Μυελοειδές καρκίνωμα:** αποτελεί σπάνιο ιστολογικό τύπο που χαρακτηρίζεται από λωρίδες νεοπλασματικών κυττάρων με κενοτοπιώδη πυρήνα, έντονο πυρήνιο και άφθονο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Επίσης παρουσιάζει έκδηλη διήθηση από ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα. Σχετίζεται σχεδόν αποκλειστικά με υψηλού επιπέδου μικροδορυφορική αστάθεια (MSI- H) και συνήθως έχει ευμενή πρόγνωση (79).
- **Αδenoπλακώδες καρκίνωμα:** ο ασυνήθης αυτός ιστολογικός τύπος παρουσιάζει στοιχεία τόσο πλακώδους καρκινώματος όσο και αδenoκαρκινώματος, είτε διακριτά μεταξύ τους είτε ανάμικτα. Το αμιγές πλακώδες καρκίνωμα είναι εξαιρετικά σπάνιο (5).
- **Ατρακτοκυτταρικό καρκίνωμα:** πρόκειται για διφασικό καρκίνωμα με ατρακτοκυτταρικό σαρκωματώδες στοιχείο, στο οποίο τα νεοπλασματικά κύτταρα αντιδρούν ανοσοϊστοχημικά σε κερατίνες.
- **Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα:** σπάνιος όγκος που δεν παρουσιάζει μορφολογικά, ανοσοϊστοχημικά ή μοριακά στοιχεία περαιτέρω διαφοροποίησης, εκτός του επιθηλιακού του χαρακτήρα.
- **Σπάνιοι τύποι:** στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί διάφοροι άλλοι σπανιότεροι ιστολογικοί τύποι όπως το οδοντωτό αδenoκαρκίνωμα (serrated adenocarcinoma), το μικροθηλώδες αδenoκαρκίνωμα, το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα κ.α.

Σύμφωνα με την τελευταία ιστολογική ταξινόμηση κατά WHO (5), τα καρκινώματα του παχέος εντέρου κατατάσσονται ως εξής:

Αδενοκαρκίνωμα

- Ηθμοειδές αδενοκαρκίνωμα, με φαγεσωρικού τύπου νέκρωση
- Μυελοειδές καρκίνωμα
- Μικροθηλώδες καρκίνωμα
- Βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα
- Οδοντωτό αδενοκαρκίνωμα
- Καρκίνωμα με κύτταρα με μορφολογία «δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου»

Αδενοπλακώδες καρκίνωμα

Ατρακτοκυτταρικό καρκίνωμα

Καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων

Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα

Βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης (histological grade)

Στη διεθνή βιβλιογραφία, εδώ και πολλές δεκαετίες, έχουν προταθεί αρκετά κριτήρια για την ιστολογική βαθμονόμηση των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου (80- 82). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, το κριτήριο που παρουσιάζει την ευρύτερη αποδοχή και χρήση από τους περισσότερους παθολογοανατόμους βασίζεται στο ποσοστό των αδενικών σχηματισμών που εμφανίζει το καρκίνωμα. Σύμφωνα με το σύστημα ιστολογικής διαφοροποίησης κατά TNM, τα καρκινώματα του παχέος εντέρου που παρουσιάζουν ποσοστό αδενικών δομών >95% χαρακτηρίζονται ως «καλής διαφοροποίησης» (grade 1), τα καρκινώματα στα οποία το παραπάνω ποσοστό είναι 50-95% χαρακτηρίζονται ως «μέτριας διαφοροποίησης» (grade 2), ενώ εκείνα στα οποία το ποσοστό των αδενικών σχηματισμών είναι <49% χαρακτηρίζονται ως «χαμηλής διαφοροποίησης» (grade 3). Η κατηγορία των «αδιαφοροποίητων καρκινωμάτων» (grade 4) περιλαμβάνει τις περιπτώσεις εκείνες όπου δεν παρατηρείται σχηματισμός αδενικών δομών, παραγωγή βλέννης ή στοιχεία νευροενδοκρινικής, πλακώδους ή σαρκωματώδους διαφοροποίησης (83).

Σύμφωνα με το σύστημα ιστολογικής βαθμονόμησης της WHO, ο όγκος αξιολογείται με βάση το λιγότερο διαφοροποιημένο στοιχείο (5). Ο διαχωρισμός γίνεται ουσιαστικά δυο βαθμίδες, καθώς τα αδενοκαρκινώματα καλής και μέτριας διαφοροποίησης θεωρούνται «χαμηλού βαθμού κακοήθειας» (low-grade), ενώ τα αδενοκαρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης και τα αδιαφοροποίητα καρκινώματα θεωρούνται «υψηλού βαθμού κακοήθειας» (high-grade) (Πίνακας 4).

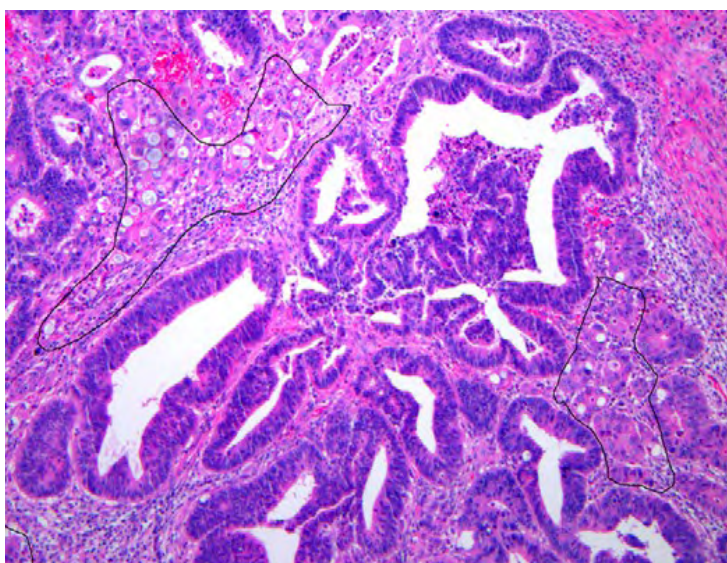
Στην πραγματικότητα, η παραπάνω ταξινόμηση με βάση τη μορφολογία, βρίσκει εφαρμογή μόνο στα αδενοκαρκινώματα, δίχως ιδιαίτερους χαρακτήρες (“adenocarcinoma, NOS”). Οι υπόλοιποι ιστολογικοί τύποι έχουν τη δική τους προγνωστική σημασία και η εν λόγω ιστολογική βαθμονόμηση δε χρησιμοποιείται. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα αδενοκαρκινώματα καθώς επίσης και τα αδιαφοροποίητα καρκινώματα που παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο

μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI- H), συμπεριφέρονται ως καρκινώματα χαμηλού ιστολογικού βαθμού κακοήθειας, ανεξαρτήτως μορφολογίας (5).

Όσον αφορά στα βλεννώδη αδenoκαρκινώματα, δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί απόλυτα εάν και με ποια κριτήρια θα πρέπει να ταξινομούνται (84). Σε γενικές γραμμές, ο βαθμός ιστολογικής ωρίμανσης του επιθηλίου καθορίζει και το βαθμό κακοήθειας του όγκου. Ωστόσο, πολλά βλεννώδη αδenoκαρκινώματα παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-H), γεγονός που τα καθιστά από άποψη βιολογικής συμπεριφοράς, ως καρκινώματα χαμηλού βαθμού κακοήθειας. Από την άλλη πλευρά, τα βλεννώδη καρκινώματα που χαρακτηρίζονται από χαμηλό επίπεδο μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-L) ή μικροδορυφορική σταθερότητα (MSS) συμπεριφέρονται ως βλάβες υψηλού κακοήθους δυναμικού.

Τα καρκινώματα αποτελούμενα από κύτταρα με μορφολογία «δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου» θεωρούνται εξ' ορισμού ως υψηλόβαθμης κακοήθειας καρκινώματα (85).

Όπως προαναφέρθηκε, σε ορισμένες περιπτώσεις, τα καρκινώματα παρουσιάζουν ιστολογικά μορφολογική ετερογένεια (Εικ. 9). Στις περιπτώσεις αυτές, η βαθμονόμηση γίνεται με βάση το λιγότερο καλά διαφοροποιημένο στοιχείο του καρκινώματος.



Εικόνα 9. Δυσχέρεια στην απόδοση του ιστολογικού βαθμού διαφοροποίησης. Ο όγκος παρουσιάζει περιοχές με χαμηλόβαθμη (low grade) αλλά και υψηλόβαθμη κακοήθεια (high grade). Στο μαύρο πλαίσιο έχουν σημειωθεί δυο εστίες χαμηλής διαφοροποίησης (86).

Πρόσφατα προτάθηκε μια διαφορετική προσέγγιση όσον αφορά το στοιχείο χαμηλής διαφοροποίησης ενός καρκινώματος, σύμφωνα με την οποία, το χαμηλής διαφοροποίησης επιμέρους συστατικό (ορίζεται ως μια περιοχή του καρκινώματος

δίχως αδενικούς σχηματισμούς) αξιολογείται ποσοτικά λαμβάνοντας ως μέτρο συγκεκριμένο πεδίο μικροσκοπικής παρατήρησης (87- 90).

Παρά το γεγονός ότι ο βαθμός ιστολογικής κακοήθειας (grade) αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα, (91- 93) δεν παρατηρείται ομοφωνία ως προς το σύστημα βαθμονόμησης, με διαφορετικές προτάσεις βασισμένες σε ταξινομήσεις των δυο ή των τριών ή των τεσσάρων επιπέδων (5, 84) και με σημαντικό βαθμό ετερογένεια μεταξύ των παρατηρητών (inter- observer variability). Η τελευταία είναι ιδιαίτερα εμφανής μεταξύ των καρκινωμάτων καλής και μέτριας διαφοροποίησης (grade 1 και 2), όπου σε αρκετές περιπτώσεις ο διαχωρισμός τους είναι δυσχερής και σε σημαντικό βαθμό υποκειμενικός. Επιπλέον, δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί η έκταση του λιγότερου διαφοροποιημένου στοιχείου του καρκινώματος που θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη από τους παθολογοανατόμους (88). Η υποκειμενικότητα και η ανακρίβεια στην ιστολογική αξιολόγηση των καρκινωμάτων αυτών μπορεί επίσης να σχετίζεται και με την ιστολογική ετερογένεια που εμφανίζουν οι όγκοι αυτοί σε αρκετές περιπτώσεις. Είναι προφανές ότι η ύπαρξη σημαντικής ετερογένειας στα μορφολογικά γνωρίσματα ενός όγκου θα καθιστούσε αναποτελεσματικό ακόμη και το πιο απλουστευμένο σύστημα ταξινόμησης (94). Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα, η μέθοδος βαθμονόμησης των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου που ακολουθείται από τους διαγνώστες παθολογοανατόμους να ποικίλει σημαντικά στην πράξη, βασιζόμενη άλλοτε αποκλειστικά στο ποσοστό των αδενικών δομών και άλλοτε στο λιγότερο διαφοροποιημένο συστατικό του όγκου, ανεξαρτήτως έκτασης (95).

Παρά τις παραπάνω δυσχέρειες, ο βαθμός ιστολογικής κακοήθειας των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου έχει αποδειχθεί, μέσω πολυάριθμων πολυμεταβλητών αναλύσεων, ότι αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα, ανεξαρτήτως σταδίου και συγκεκριμένα ο υψηλός βαθμός κακοήθειας θεωρείται δυσμενής προγνωστικός παράγοντας (70, 71, 96).

Επιπρόσθετα μικροσκοπικά χαρακτηριστικά

Εκτός από την ιστολογική ταξινόμηση (ιστολογικός τύπος και βαθμονόμηση) και τις παραμέτρους που καθορίζουν το παθολοανατομικό στάδιο του όγκου (αναλύεται παρακάτω) υπάρχουν κι άλλα χαρακτηριστικά του όγκου που αξιολογούνται κατά την μικροσκοπική εξέταση των ορθοκολικών καρκινωμάτων, τα οποία είτε σχετίζονται με την πρόγνωση της νόσου είτε με την πιθανότητα απάντησης των ασθενών στη θεραπεία.

- **Κατάσταση των εγχειρητικών ορίων:** εξετάζονται τα εγγύς και άπω εγκάρσια όρια, τα όρια του μεσεντερικού μίσχου και σε ορισμένες περιπτώσεις τα

περιμετρικά (CRM) όρια του χειρουργικού παρασκευάσματος της κολεκτομής. Όσον αφορά στην αξιολόγηση των εγκάρσιων ορίων, στις περιπτώσεις όπου η απόσταση του όγκου από το πλησιέστερο εγκάρσιο χειρουργικό όριο (εγγύς ή άπω άκρο του παρασκευάσματος) είναι ≥ 5 εκ. η τοπική υποτροπή της νόσου στην περιοχή της εντερικής αναστόμωσης είναι εξαιρετικά σπάνια (94). Στα παρασκευάσματα χαμηλής πρόσθιας εκτομής του ορθού, λόγω ανατομικών περιορισμών, τέτοιας διάστασης απόσταση των εγγύς χειρουργικών ορίων δύσκολα επιτυγχάνεται. Στις περιπτώσεις αυτές, εγχειρητικά όρια μήκους 2 εκ. θεωρούνται επαρκή όσον αφορά την αποφυγή τοπικής υποτροπής της νόσου και σε αρκετές περιπτώσεις (όγκοι T1 και T2) ακόμα και τα χειρουργικά όρια μήκους ≤ 1 εκ. μπορεί να αποδειχθούν επαρκή (97).

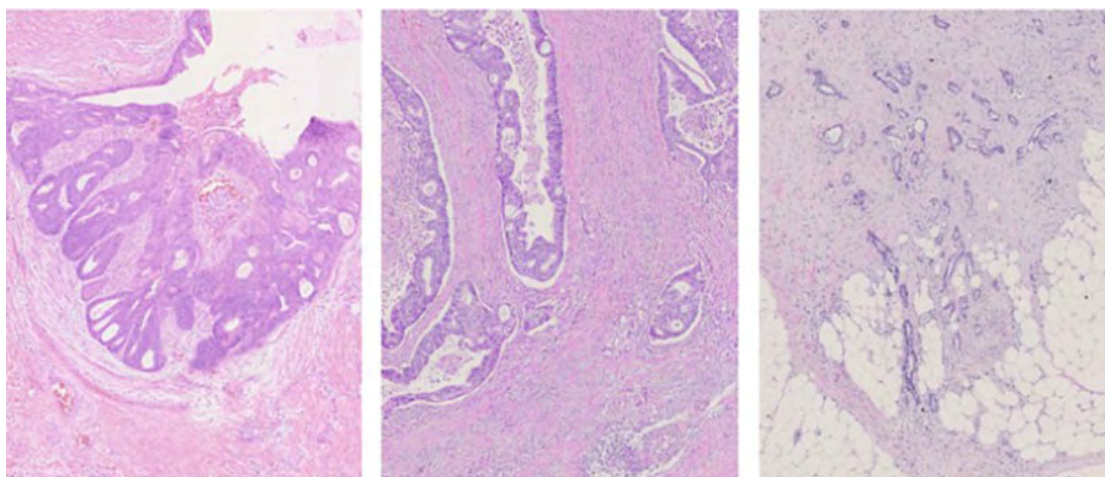
Τα περιμετρικά (CRM) όρια αξιολογούνται στις περιπτώσεις εκείνες όπου το χειρουργικό παρασκεύασμα της κολεκτομής είτε καλύπτεται ατελώς (ανιόν κόλον, κατιόν κόλον και άνω τμήμα του ορθού) είτε δεν περιβάλλεται καθόλου (κατώτερο τμήμα ορθού) από περιτόναιο. Αναπαριστούν ουσιαστικά το οπισθοπεριτοναϊκό ή περινεϊκό εξωτερικό όριο μαλακού ιστού της κολεκτομής. Τα όρια αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά καθώς σχετίζονται με τον κίνδυνο τοπικής υποτροπής του όγκου, ο οποίος αποτελεί με τη σειρά του ισχυρό προγνωστικό δείκτη της νόσου (98- 103).

Συγκεκριμένα, σύμφωνα με δημοσιευμένες μελέτες κλινικών δοκιμών, ο κίνδυνος τοπικής υποτροπής της νόσου αυξάνεται σημαντικά στις περιπτώσεις που ο όγκος απέχει ≤ 1 χιλ. από τη μη καλυπτόμενη από περιτόναιο επιφάνεια του παρασκευάσματος (102). Αντίθετα, ο κίνδυνος αυτός είναι πολύ μικρός όταν η εν λόγω απόσταση είναι ≥ 2 χιλ. Στα εγχειρητικά παρασκευάσματα κολεκτομών που καλύπτονται πλήρως από περιτόναιο (π.χ. εγκάρσιο κόλον ή σιγμοειδές) αξιολογείται η πλησιέστερη απόσταση του όγκου από την ελεύθερη ορογονική επιφάνεια, ως το αντίστοιχο εν τω βάθει όριο, καθώς το καρκίνωμα είναι δυνατό να εκτείνεται μέχρι το όριο αυτό με (pT4) ή χωρίς (pT3) διάσπαση του ορογόνου χιτώνα.

- **Αγγειακή διήθηση:** είναι πλέον γνωστό ότι η αγγειακή διήθηση αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα για τον καρκίνο του παχέος εντέρου (104-106). Δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί εάν αποτελεί εύρημα που μπορεί να επιφέρει από μόνο του κλινικές επιπτώσεις στη σταδιοποίηση του ορθοκολικού καρκινώματος (107). Σύμφωνα με την ισχύουσα ταξινόμηση κατά TNM, η αγγειακή διήθηση πρέπει να θεωρείται ποιοτικό χαρακτηριστικό κατηγορίας pT, το οποίο σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση, αλλά δεν επηρεάζει τη σταδιοποίηση της νόσου. Η ιστοπαθολογική αξιολόγηση της αγγειακής διήθησης ποικίλει σημαντικά, από 10% έως 89% (104), πιθανότατα λόγω των διαφορετικών κριτηρίων που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή της. Επιπλέον, η ιστολογική

διάγνωση της αγγειακής διήθησης μπορεί να είναι εξαιρετικά δυσχερής μόνο με τη χρήση των συμβατικών ιστολογικών χρώσεων αιματοξυλίνης- ηωσίνης (108). Η χρήση βοηθητικών τεχνικών όπως οι χρώσεις ελαστικών ινών και οι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες των ενδοθηλιακών κυττάρων μπορούν να διευκολύνουν σημαντικά την ανίχνευση της αγγειακής διήθησης. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχουν επίσημες κατευθυντήριες γραμμές (guidelines) όσον αφορά την ιστοπαθολογική αξιολόγηση της αγγειακής διήθησης, με αποτέλεσμα ο τρόπος προσέγγισης της τελευταίας να ποικίλει σημαντικά τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε ατομικό επίπεδο (109).

- **Ο τύπος της διηθητικής παρυφής του νεοπλάσματος:** στα καρκινώματα του παχέος εντέρου διαπιστώθηκε ότι η ύπαρξη διηθητικών έναντι απωθητικών ορίων αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα της νόσου (Εικ. 10), (110). Σύμφωνα με αρκετές μελέτες σε ασθενείς με καρκίνωμα του παχέος εντέρου, το διηθητικό πρότυπο ανάπτυξης του νεοπλάσματος σχετίζεται με μικρότερη επιβίωση (111- 116). Ο υποκείμενος μηχανισμός με τον οποίο η διηθητική ανάπτυξη ενός καρκινώματος οδηγεί σε μειωμένη επιβίωση δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένος. Τα διηθητικά όρια ενός ορθοκολικού καρκινώματος μπορεί να αποτελούν ένδειξη μειωμένης ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε μικρότερη επιβίωση από τη νόσο (113, 114, 117). Εναλλακτικά, το διηθητικό πρότυπο ανάπτυξης θα μπορούσε να αντανακλά συγκεκριμένες γενετικές διαταραχές που σχετίζονται με μικρότερη επιβίωση. Πράγματι, υπάρχουν μελέτες που παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση μεταξύ των διηθητικών ορίων και της μικροδορυφορικής αστάθειας, η οποία σχετίζεται με καλύτερη επιβίωση (118- 120).



Εικόνα 10. Παραδείγματα διηθητικής παρυφής καρκινωμάτων παχέος εντέρου- χρώση Η/Ε. Α. απωθητικά όρια, Β.ενδιάμεσο πρότυπο διηθητικής ανάπτυξης, Γ. αμγώς διηθητικά όρια (110)

- **Νεοπλασματικές εκβλαστήσεις:** σε αρκετές περιπτώσεις καρκινωμάτων του παχέος εντέρου παρατηρούνται, στη διηθητική παρυφή του νεοπλάσματος, ομάδες αποδιαφοροποιημένων κυττάρων που έχουν αποσπαστεί από τον κυρίως όγκο. Ο όρος «νεοπλασματικές εκβλαστήσεις» (“tumor budding”) αφορά στην παρουσία αδιαφοροποίητων νεοπλασματικών κυττάρων είτε μεμονωμένων είτε σε μικρές ομάδες έως 5 κυττάρων, στη διηθητική παρυφή του όγκου. Έχει διαπιστωθεί ότι η ύπαρξη των παραπάνω νεοπλασματικών εκβλαστήσεων σχετίζεται με καρκινώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας και δυσμενέστερης πρόγνωσης (56, 84). Κατά την ιστοπαθολογική μελέτη των ορθοκολικών καρκινωμάτων, προτείνεται η αξιολόγηση και αναφορά του παραπάνω ευρήματος, ανεξάρτητα από το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης του όγκου, καθώς σύμφωνα με πολυάριθμες μελέτες, η ύπαρξη νεοπλασματικών εκβλαστήσεων έχει συσχετισθεί με φτωχή πρόγνωση, με λεμφαδενικές και απομακρυσμένες μεταστάσεις, καθώς επίσης και με άλλα δυσμενή μικροσκοπικά χαρακτηριστικά όπως η αγγειακή διήθηση (121- 126). Παρ’ όλα αυτά, δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί τα κριτήρια αξιολόγησης του εν λόγω ευρήματος και παραμένουν αρκετά ερωτήματα, όπως για παράδειγμα εάν θα πρέπει η αντίστοιχη μικροσκοπική μελέτη να γίνεται στο σύνολο του όγκου (127, 128) ή στις εστίες όπου ανιχνεύεται η μεγαλύτερη δραστηριότητα των νεοπλασματικών εκβλαστήσεων (126). Επίσης, ορισμένοι μελετητές αναφέρουν ότι οι νεοπλασματικές εκβλαστήσεις διαπιστώνονται με ευκολία στις συμβατικές ιστολογικές χρώσεις αιματοξυλίνης- ηωσίνης (127, 128), ενώ άλλοι προτείνουν τη χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων (123, 129).
- **Φλεγμονώδης διήθηση:** η παρουσία φλεγμονώδους λεμφοκυτταρικής αντίδρασης γύρω από τον όγκο αποτελεί ένδειξη ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού απέναντι στο διηθητικό καρκίνωμα και έχει συσχετισθεί, σύμφωνα με αρκετές μελέτες, με ευνοϊκότερη πρόγνωση (70, 71). Ωστόσο, υπήρξαν μελέτες που απέτυχαν να επιβεβαιώσουν την προγνωστική σημασία της περινεοπλασματικής λεμφοκυτταρικής αντίδρασης, ενώ είναι γεγονός ότι η αξιολόγηση του παραπάνω ευρήματος είναι σε σημαντικό βαθμό υποκειμενική ή και δυσχερής όπως για παράδειγμα στην περίπτωση φλεγμονώδους αντίδρασης λόγω διήθησης του περιπλαχνικού λιπώδους ιστού ή σύγχρονης εκκολπωματίτιδας (86). Περισσότερη ομοφωνία απόψεων υπάρχει όσον αφορά την ύπαρξη μεγάλου αριθμού λεμφοκυττάρων που διηθούν το καρκίνωμα (tumor- infiltrating lymphocytes, TILs) και την παρουσία φλεγμονώδους αντίδρασης τύπου Crohn, στοιχεία που σχετίζονται με μικροδορυφορική αστάθεια και ευμενή πρόγνωση. (130- 133)

Ανοσοϊστοχημική μελέτη

Τα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου παρουσιάζουν θετική ανοσοέκφραση στις κερατίνες. Κατά κανόνα, παρουσιάζουν θετική ανοσοχρώση για την κερατίνη 20 και απουσία έκφρασης της κερατίνης 7. Το παραπάνω πρότυπο βοηθά σημαντικά στη διαφορική διάγνωση των αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου από αδενοκαρκινώματα διαφορετικής προέλευσης όπως π.χ. του πνεύμονα ή της ωοθήκης (134- 136).

Επίσης, τα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου υπερεκφράζουν το αντιγόνο CEA σε τέτοιο βαθμό, ώστε η απουσία ανοσοέκφρασης του παραπάνω αντιγόνου θέτει υπό αμφισβήτηση τη διάγνωση του ορθοκολικού καρκινώματος (137). Ο μεταγραφικός παράγοντας CDX-2 εκφράζεται επίσης ανοσοϊστοχημικά στα περισσότερα καρκινώματα του παχέος εντέρου και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων. Άλλοι παράγοντες στους οποίους παρατηρείται ανοσοθετικότητα είναι η γλυκοπρωτεΐνη TAG-72 (μονοκλωνικό αντίσωμα B72.3), το αντιγόνο LEA και η καθεψίνη Β (cathepsin B) (138, 139).

Σε μεγάλο ποσοστό των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου έχει αναφερθεί ανοσοθετικότητα στη χοριακή γοναδοτροπίνη hCG, ιδιαίτερα σε βλεννώδεις και χαμηλής διαφοροποίησης όγκους (140, 141). Τέλος, μικρό ποσοστό των αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου ενδέχεται να παρουσιάζει ανοσοέκφραση της καλρετινίνης, γεγονός που θα πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψη στις περιπτώσεις διαφορικής διάγνωσης με τα μεσοθηλιώματα (142).

1.5.8 Πρόδρομες αλλοιώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου

1.5.8.1 Εστίες με ανώμαλες κρύπτες

Οι εστίες με ανώμαλες κρύπτες (aberrant crypt foci, ACF) αποτελούν μικρές ομάδες ανώμαλων κρυπτών, οι οποίες αναγνωρίζονται είτε με ειδικές τεχνικές ενδοσκόπησης (μεγεθυντικό ενδοσκόπιο ή χρωμοενδοσκόπηση) είτε μετά από χρώση των χειρουργικών παρασκευασμάτων με κυανό του μεθυλενίου. Ιστολογικά διακρίνονται σε δύο βασικούς τύπους: τις εστίες που θυμίζουν υπερπλαστικούς πολύποδες και εκείνες που παρουσιάζουν δυσπλασία (μικροαδενώματα) (5). Οι ACF, ιδιαίτερα εκείνες που εμφανίζουν δυσπλασία, είναι πια ευρέως αποδεκτές ως πρόδρομες αλλοιώσεις του καρκινώματος του παχέος εντέρου μορφολογικά, ιστολογικά, βιολογικά και γενετικά.

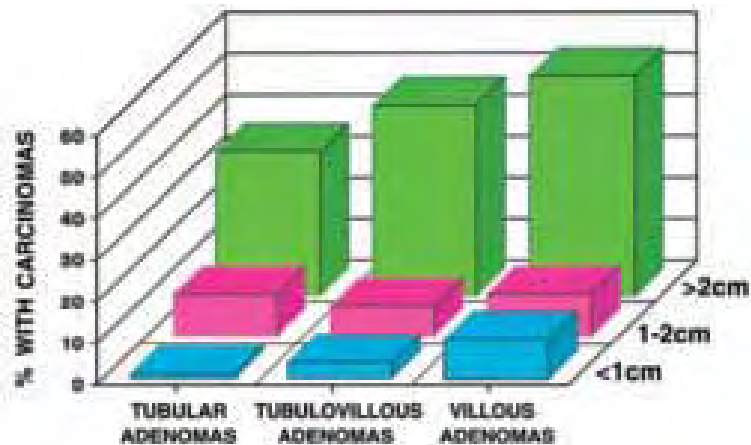
Πολυάριθμες μελέτες υποστηρίζουν ότι πιθανόν αποτελούν πρόδρομες νεοπλασματικές αλλοιώσεις, διευρύνοντας την κλασική αλληλουχία του καρκινώματος του παχέος εντέρου από «αδένωμα-καρκίνωμα» σε «ACF-αδένωμα-καρκίνωμα» (143). Εμφανίζονται συχνότερα, όπως και τα ορθοκολικά καρκινώματα, σε περιφερικά τμήματα του παχέος εντέρου. Όσον αφορά στο γενετικό τους προφίλ, παρουσιάζουν ογκογόνες μεταλλάξεις στα γονίδια APC, KRAS, p53 και επιγενετικές διαταραχές, όπως μεθυλίωση των CpG νησίδων. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί φαινοτυπικές διαταραχές, όπως μικροδορυφορική αστάθεια λόγω ανεπάρκειας των γονιδίων του συστήματος MMR.

1.5.8.2 Αδενώματα

Τα αδενώματα εξ' ορισμού διαθέτουν δυσπλαστικό επιθήλιο. Η δυσπλασία του επιθηλίου μπορεί να είναι χαμηλόβαθμη ή υψηλόβαθμη, ανάλογα με το βαθμό της αρχιτεκτονικής πολυπλοκότητας, την έκταση της πυρηνικής πολυστιβάδωσης και το βαθμό της πυρηνικής ατυπίας.

Μακροσκοπικά, τα περισσότερα αδενώματα είναι πολυποειδή μορφώματα, τα οποία προβάλλουν στον αυλό του παχέος εντέρου. Είναι δυνατό να διαθέτουν μίσχο ή να είναι άμισχα με ευρεία βάση. Σπανιότερα, μπορεί να είναι επίπεδα ή ενδοφυτικά. Με βάση την αρχιτεκτονική τους, διακρίνονται σε σωληνώδη (συχνότερα), λαχνωτά και σωληνολαχνωτά, ενώ αναγνωρίζονται και σπανιότεροι ιστοπαθολογικοί τύποι, όπως τα μικροσωληνώδη αδενώματα.

Η μεγάλη σημασία των αδενωμάτων έγκειται στο συσχετισμό τους με την ανάπτυξη σύγχρονου ή ετεροχρονισμένου καρκινώματος. Μέγεθος >1 εκατοστό, εκτεταμένη λαχνωτή αρχιτεκτονική, υψηλόβαθμη δυσπλασία και επίπεδη εμφάνιση, αποτελούν χαρακτηριστικά που σχετίζονται με αυξημένη συχνότητα ορθοκολικού καρκινώματος (Εικ. 11) (144, 145). Επίσης, ασθενείς με αδένωμα μεγέθους >20 χιλιοστά, με σωληνολαχνωτή ή αμιγώς λαχνωτή αρχιτεκτονική και εντόπιση στο εγγύς παχύ έντερο, ασθενείς με πολλαπλά αδενώματα (> 5), καθώς και άρρενες ασθενείς, παρουσιάζουν συχνότερα ετεροχρονισμένο προχωρημένο αδένωμα ή καρκίνωμα (146).



Εικόνα 11. Συχνότητα ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος σε αδενώματα του παχέος εντέρου, σε συνάρτηση με το μέγεθος και την αρχιτεκτονική τους (5)

1.5.8.3 Αλλοιώσεις με «οδοντωτή» μορφολογία (serrated lesions)

Πρόκειται για μια ετερογενή ομάδα αλλοιώσεων, οι οποίες χαρακτηρίζονται μορφολογικά από την οδοντωτή εμφάνιση του επιθηλιακού τους στοιχείου. Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται τα συνήθη οδοντωτά αδενώματα (traditional serrated adenomas, TSA), τα άμισχα οδοντωτά αδενώματα (sessile serrated adenomas, SSA) και οι αληθείς υπερπλαστικοί πολύποδες (147).

Οι υπερπλαστικοί πολύποδες αποτελούν τη συχνότερη μορφή αλλοιώσεων με οδοντωτή μορφολογία καθώς συνιστούν >75% του συνόλου των πολυπόδων με «πριονωτή» εμφάνιση. Έχουν περιγραφεί τρεις τύποι: ο μικροφουσαλιδώδης υπερπλαστικός πολύποδας (microvesicular hyperplastic polyp, MVHP), ο πλούσιος σε καλυκοειδή κύτταρα (goblet cell rich hyperplastic polyp, GCHP) και ο πτωχός σε βλέννη υπερπλαστικός πολύποδας (mucin-poor hyperplastic polyp, MPH) (5). Οι τύποι αυτοί παρουσιάζουν μεταξύ τους διαφορές όσον αφορά στη μορφολογία, στην εντόπιση και στο μοριακό τους προφίλ. Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη η κλινική τους σημασία.

Οι πλούσιοι σε καλυκοειδή κύτταρα υπερπλαστικοί πολύποδες απαντούν σχεδόν αποκλειστικά στο ορθοσιγμοειδές και εμφανίζουν συχνότερα μεταλλάξεις του *KRAS* γονιδίου (5). Αντίθετα, ο μικροφουσαλιδώδης υπερπλαστικός πολύποδας παρουσιάζει ευρεία διακύμανση όσον αφορά στην εντόπιση και εμφανίζει υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων του *BRAF* γονιδίου (28).

Τα άμισχα οδοντωτά αδενώματα (SSA) συνιστούν περίπου το 15-25% του συνόλου των αλλοιώσεων με οδοντωτή μορφολογία (5). Οι αλλοιώσεις αυτές χαρακτηρίζονται από αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων του *BRAF* γονιδίου, καθώς και από υψηλού βαθμού μεθυλίωση των CpG νησίδων (CIMP-high) (148). Θεωρούνται πρόδρομη αλλοίωση των σποραδικών καρκινωμάτων με μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) και είναι πιθανό να αποτελούν την πρόδρομη

βλάβη των καρκινωμάτων που χαρακτηρίζονται από υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων και μικροδορυφορική σταθερότητα. (CIMP/MSS) (5).

Τα *συνήθη οδοντωτά αδενώματα* (TSA) είναι σπάνια καθώς αντιστοιχούν σε <1% του συνόλου των αλλοιώσεων με οδοντωτή μορφολογία. Σε γενικές γραμμές δεν παρουσιάζουν συσχέτιση με τα καρκινώματα υψηλόβαθμης μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-H), αλλά ενδέχεται να σχετίζονται με καρκινώματα που παρουσιάζουν χαμηλού βαθμού μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-L) (149). Η πλειονότητα των περιπτώσεων των οδοντωτών αδενοκαρκινωμάτων προέρχεται από τα συνήθη οδοντωτά αδενώματα και παρουσιάζει είτε χαμηλού βαθμού μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-L) είτε απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας (MicroSatellite Stable, MSS). Ποσοστό 15-20% των αδενοκαρκινωμάτων με πριονωτή εμφάνιση προέρχεται από τα άμισχα οδοντωτά αδενώματα και παρουσιάζει υψηλού βαθμού μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H) (150).

1.5.9 Σταδιοποίηση

Το στάδιο του καρκίνου του παχέος εντέρου αποτελεί τον πιο σημαντικό προγνωστικό παράγοντα της νόσου. Τα πιο διαδεδομένα συστήματα σταδιοποίησης του ορθοκολικού καρκίνου περιλαμβάνουν την ταξινόμηση κατά Dukes (Dukes 1929), την τροποποίηση κατά Astler-Coller (Astler-Coller, AC 1954 και modified Astler and Coller, MAC) και το σύστημα σταδιοποίησης κατά TNM (American Joint Committee for Cancer staging, AJCC/ International Union Against Cancer, UICC).

Αρχικά, ο Cuthbert Dukes πρότεινε ένα σύστημα ταξινόμησης των καρκινωμάτων του ορθού βασισμένο στην έκταση της νόσου, λαμβάνοντας υπόψη το βάθος διήθησης του εντερικού τοιχώματος και την παρουσία ή μη λεμφαδενικών μεταστάσεων (151). Σύμφωνα με τη σταδιοποίηση κατά **Dukes**, τα καρκινώματα του παχέος εντέρου ταξινομούνται ως εξής:

- **A:** Ο όγκος περιορίζεται στο τοίχωμα του παχέος εντέρου
- **B:** Ο όγκος διηθεί πέραν του τοιχώματος, τους γύρω ιστούς
- **C:** Διηθημένοι λεμφαδένες

Έκτοτε, έγιναν αρκετές προσπάθειες τροποποίησης του παραπάνω συστήματος, με σκοπό την αύξηση της προγνωστικής του αξίας. Η πιο γνωστή είναι η τροποποίηση κατά **Astler & Coller**, σύμφωνα με την οποία, οι κατηγορίες B και C υποδιαιρούνται σε δύο επίπεδα, παρέχοντας με τον τρόπο αυτό περισσότερες πληροφορίες για το βαθμό διήθησης του τοιχώματος και των λεμφαδένων:

- **A:** Ο όγκος περιορίζεται στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου
- **B1:** Ο όγκος διηθεί το μυϊκό χιτώνα του εντέρου, αλλά δεν τον διαπερνά. Δεν

- παρατηρούνται λεμφαδενικές μεταστάσεις
- **B2:** Ο όγκος διαπερνά το μυϊκό χιτώνα. Δεν παρατηρούνται λεμφαδενικές μεταστάσεις.
- **C1:** Ο όγκος διηθεί το μυϊκό χιτώνα του εντέρου, αλλά δεν τον διαπερνά.
- Συνυπάρχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις
- **C2:** Ο όγκος διαπερνά το μυϊκό χιτώνα. Συνυπάρχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις.

Αργότερα, το σύστημα των Astler-Coller τροποποιήθηκε (**modified Astler Coller, MAC**) με την προσθήκη των σταδίων B3, όταν ο όγκος διηθεί γειτονικά όργανα χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις, C3 όταν ο όγκος διηθεί γειτονικά όργανα και έχει λεμφαδενικές μεταστάσεις και D όταν υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις (Πίνακας 7).

Dukes	Astler- Coller	Modified Astler- Coller
A: Ο όγκος περιορίζεται στο τοίχωμα.	A: Ο όγκος περιορίζεται στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου.	A: Ο όγκος περιορίζεται στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου.
B: Ο όγκος διηθεί τους γύρω ιστούς, λεμφαδένες φυσιολογικοί.	B1: Ο όγκος διηθεί το μυϊκό χιτώνα του εντέρου, λεμφαδένες φυσιολογικοί.	B1: Ο όγκος διηθεί το μυϊκό χιτώνα του εντέρου, λεμφαδένες φυσιολογικοί.
	B2: Ο όγκος διαπερνά το μυϊκό χιτώνα, λεμφαδένες φυσιολογικοί.	B2: Ο όγκος διαπερνά το μυϊκό χιτώνα, λεμφαδένες φυσιολογικοί
C: Διηθημένοι λεμφαδένες.	B3: Ο όγκος διηθεί γειτονικά όργανα, λεμφαδένες φυσιολογικοί	B3: Ο όγκος διηθεί γειτονικά όργανα, λεμφαδένες φυσιολογικοί
	C1: Ο όγκος διηθεί το μυϊκό χιτώνα του εντέρου. Συνυπάρχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις.	C1: Ο όγκος διηθεί το μυϊκό χιτώνα του εντέρου Συνυπάρχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις
	C2: Ο όγκος διαπερνά το μυϊκό χιτώνα. Συνυπάρχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις.	C2: Ο όγκος διαπερνά το μυϊκό χιτώνα. Συνυπάρχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις
		C3: Ο όγκος διηθεί γειτονικά όργανα. Συνυπάρχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις
-	-	D: Απομακρυσμένες μεταστάσεις

Πίνακας 7. Σύγκριση των συστημάτων ταξινόμησης κατά Dukes, Astler-Coller και τροποποιημένου Astler-Coller.

Το σύστημα **TNM** χρησιμοποιεί τρεις παραμέτρους, από τα αρχικά των οποίων προκύπτει άλλωστε και η ονομασία του: το βάθος διήθησης του πρωτοπαθούς όγκου (Tumor), την κατάσταση των λεμφαδένων (Node) και την παρουσία μεταστάσεων (Metastasis). Πρόκειται για ένα σύστημα ταξινόμησης, που χρησιμοποιείται ευρέως για τις περισσότερες κακοήθειες του ανθρώπινου οργανισμού. Διακρίνεται σε τρεις βασικές κατηγορίες, ανάλογα με τη θεραπευτική φάση κατά την οποία διενεργείται η ταξινόμηση: στην κλινική, προ-θεραπείας ταξινόμηση (pretreatment classification: cTNM), στη μετεγχειρητική, παθολογοανατομική ταξινόμηση (pathological classification, pTNM) και στην ταξινόμηση μετά από προεγχειρητική χημειο/ακτινοθεραπεία (preoperative chemo-radiotherapy, ypTNM). Τα καρκινώματα του παχέος εντέρου ταξινομούνται κατά TNM ως εξής:

Πρωτοπαθής όγκος (T)

- Tx** Μη εκτιμήσιμος πρωτοπαθής όγκος
- T0** Δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου
- Tis** Καρκίνωμα in situ: Τα καρκινικά κύτταρα περιβάλλονται από τη βασική μεμβράνη των αδενίων (ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα) ή παρατηρείται διήθηση του χορίου (ενδοβλεννογόνιο καρκίνωμα)
- T1** Ο όγκος διηθεί τον υποβλεννογόνιο χιτώνα
- T2** Ο όγκος διηθεί το μυϊκό χιτώνα
- T3** Ο όγκος διαπερνά το μυϊκό χιτώνα και εκτείνεται στον υπορογόνιο ή στους μη περιβαλλόμενους από περιτόναιο περικολικούς/περιορθικούς ιστούς
- T4** Ο όγκος διασπά το σπλαχνικό περιτόναιο και/ή διηθεί κατά συνέχεια ιστού γειτονικά όργανα ή δομές
 - T4a:** Ο όγκος διασπά το σπλαχνικό περιτόναιο
 - T4b:** Ο όγκος διηθεί κατά συνέχεια ιστού γειτονικά όργανα ή δομές

Επιχώριοι λεμφαδένες (N)

- Nx** Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν δύναται να εκτιμηθούν
- N0** Απουσία μεταστάσεων σε επιχώριους λεμφαδένες
- N1** Παρουσία μεταστάσεων σε 1 έως 3 επιχώριους λεμφαδένες
 - N1a:** Μετάσταση σε 1 επιχώριο λεμφαδένα
 - N1b:** Μετάσταση σε 2 ή 3 επιχώριους λεμφαδένες
 - N1c:** Νεοπλασματικά οζία στον υπορογόνιο ή στους μη περιβαλλόμενους από περιτόναιο περικολικούς/ περιορθικούς ιστούς, δίχως λεμφαδενικές μεταστάσεις
- N2** Παρουσία μεταστάσεων σε 4 ή περισσότερους επιχώριους λεμφαδένες
 - N2a:** Μετάσταση σε 4 έως 6 επιχώριους λεμφαδένες
 - N2b:** Μετάσταση σε 7 ή περισσότερους επιχώριους λεμφαδένες

Μετάσταση (M)

- Mx** Η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων δεν δύναται να εκτιμηθεί
- M0** Απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων
- M1** Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

M1a: Η μετάσταση περιορίζεται σε ένα όργανο

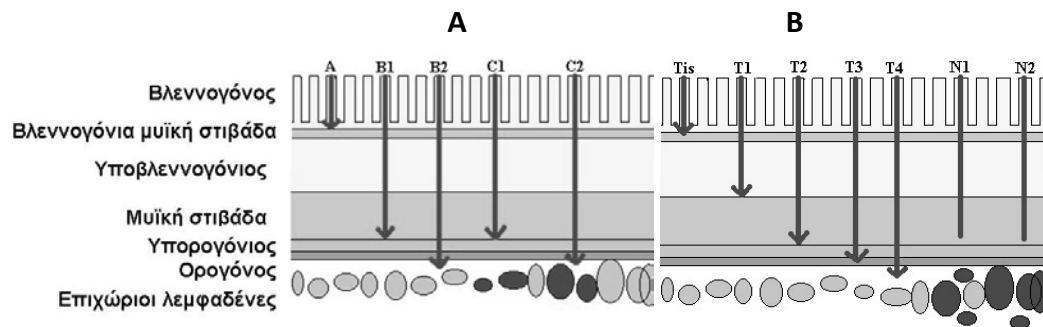
M1b: Μεταστάσεις σε περισσότερα του ενός όργανα ή στο περιτόναιο

TNM seventh edition (83, 152)

Εφ' όσον προσδιοριστούν, μετεγχειρητικά, οι παραπάνω παράμετροι για έναν ασθενή με καρκίνωμα του παχέος εντέρου, οι πληροφορίες που προκύπτουν συνδυάζονται για τον καθορισμό του σταδίου της νόσου. Η σταδιοποίηση αυτή αποτελεί τον πιο ισχυρό και αξιόπιστο προγνωστικό δείκτη της νόσου και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στο σχεδιασμό της θεραπευτικής στρατηγικής. Το εν λόγω σύστημα ταξινόμησης σχεδιάστηκε αρχικά για την πρόβλεψη της πρόγνωσης της νόσου (Εικ. 12). Εντούτοις, η λειτουργική του σημασία έχει επεκταθεί, καθώς αποτελεί βασική παράμετρο τόσο για την επιλογή της θεραπείας όσο και την επιλογή ασθενών για τις κλινικές δοκιμές (153). Η αντιστοιχία μεταξύ των σταδίων και των διαφόρων συστημάτων ταξινόμησης συνοψίζεται στον Πίνακα 8.

Στάδιο	T	N	M	Dukes	MAC
Στάδιο 0	Tis	N0	M0	-	-
Στάδιο I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
Στάδιο II	T3, T4	N0	M0	B	B2/ B3
	IIA T3	N0	M0		B2
	IIB T4a	N0	M0		B2
	IIC T4b	N0	M0		B3
Στάδιο III	Οποιοδήποτε	N1	M0	C	C1/C2/C3
	IIIA T	N1	M0		C1
	T1, T2	N2a	M0		C1
	IIIB T1	N1	M0		C2
	T3, T4a	N2a	M0		C1/C2
	T2, T3	N2b	M0		C1
	IIIC T1, T2	N2a	M0		C2
	T4a	N2b	M0		C3
	T3, T4a	N1, N2	M0		C3
	T4b				
Στάδιο IVA	Οποιοδήποτε	Οποιοδήποτε	M1a	-	D
	T	N			
Στάδιο IVB	Οποιοδήποτε	Οποιοδήποτε	M1b	-	D
	T	N			

Πίνακας 8. Σταδιοποίηση ορθοκολικού καρκίνου. American Joint Committee on Cancer tumor-node- metastasis (AJCC TNM) staging system, 7th edition, 2010.



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση των συστημάτων Astler- Coller (A) και TNM (B).

1.5.10 Θεραπεία ορθοκολικού καρκίνου

1.5.10.1 Χειρουργική αντιμετώπιση

Η χειρουργική θεραπεία αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο στην αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Στόχος της ογκολογικής χειρουργικής εκτομής είναι η πλήρης εξαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου με εξασφάλιση υγιών ορίων εκτομής, η συνοδός αφαίρεση των επιχώριων λεμφαδένων και η χειρουργική αποκατάσταση της συνέχειας του πεπτικού σωλήνα. Η έκταση και η μέθοδος της χειρουργικής επέμβασης εξαρτάται από την εντόπιση του πρωτοπαθούς όγκου, τα τροφοφόρα αγγεία και τα λεμφαγγεία παροχέτευσης του, όπως επίσης και από την επέκταση ή μη του όγκου σε παρακείμενα όργανα.

Η συνεχής βελτίωση των χειρουργικών τεχνικών έχει βοηθήσει σημαντικά στη μείωση της διεγχειρητικής διασποράς των καρκινικών κυττάρων, καθώς επίσης και στη μείωση της περιεγχειρητικής νοσηρότητας και του χρόνου νοσηλείας των ασθενών. Μια από τις σημαντικότερες εξελίξεις στην εγχειρητική τεχνική του καρκίνου του ορθού είναι η εφαρμογή της πλήρους αφαίρεσης του μεσο-ορθού (total mesorectum excision) με την οποία επιτυγχάνεται μείωση της τοπικής υποτροπής της νόσου, γεγονός που έχει με τη σειρά του ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών αυτών (154, 155).

1.5.10.2 Επικουρική χημειοθεραπεία

Σκοπός κάθε φαρμακευτικής θεραπείας είναι η χορήγηση της κατάλληλης φαρμακευτικής ουσίας, στον κατάλληλο ασθενή, έναντι της αντίστοιχης νόσου. Τα παραπάνω θεωρούνται συνήθως δεδομένα όταν πρόκειται για αντιμικροβιακή θεραπεία, στην περίπτωση όμως της συμβατικής αντικαρκινικής θεραπείας δύσκολα επιτυγχάνεται τέτοιου βαθμού ειδικότητα. Τις τελευταίες δυο δεκαετίες έχει σημειωθεί εξαιρετική πρόοδος, κυρίως λόγω της εκρηκτικής ανάπτυξης γνώσεων όσον αφορά στη μοριακή βιολογία του καρκίνου. Τελικός σκοπός της

εξατομικευμένης θεραπείας είναι η βελτιστοποίηση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας με ταυτόχρονη ελαχιστοποίηση της έκθεσης των ασθενών σε παρενέργειες, όπως η τοξικότητα των φαρμάκων.

Περίπου 1/3 των ασθενών, που διαγιγνώσκονται με ορθοκολικό καρκίνο πρώιμου σταδίου, παρουσιάζει λεμφαδενικές μεταστάσεις (στάδιο III), ενώ 1/4 των ασθενών παρουσιάζει διήθηση όλου του πάχους του εντερικού τοιχώματος δίχως συμμετοχή λεμφαδένων (στάδιο II) (156). Η επικουρική χημειοθεραπεία στοχεύει στη μικρομεταστατική νόσο, με απώτερο σκοπό τη βελτίωση της συνολικής επιβίωσης.

Οι φθοριοπυριμιδίνες, όπως η 5- φθοριοουρακίλη (5-FU), η λευκοβορίνη (leucovorin), η οξαλιπλατίνη (oxaliplatin) και η ιρινοτεκάνη (irinotecan), αποτελούν τους ακρογωνιαίους λίθους της χημειοθεραπείας του ορθοκολικού καρκίνου. Η χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας με βάση τις φθοριοπυριμιδίνες, με ή χωρίς οξαλιπλατίνη, αποτελεί τον κανόνα για την αντιμετώπιση ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο σταδίου III (157). Σύμφωνα με αρκετές μελέτες, η χορήγηση 5-φθοριοουρακίλης σε συνδυασμό με οξαλιπλατίνη (FOLFOX) σε ασθενείς σταδίου III είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ελεύθερης νόσου επιβίωσης (Disease Free Survival, DFS) σε ποσοστό σχεδόν 75% (158- 162).

Όσον αφορά στους ασθενείς σταδίου II, η χορήγηση του προαναφερθέντος θεραπευτικού σχήματος γίνεται επιλεκτικά, σε περιπτώσεις που χαρακτηρίζονται από αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου. Τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για την επιλογή των παραπάνω ασθενών αφορούν κυρίως σε ιστοπαθολογικά ευρήματα, όπως το προχωρημένο παθολογοανατομικό στάδιο του πρωτοπαθούς όγκου (pT4 έναντι pT3), η λεμφαγγειακή διήθηση, η χαμηλού βαθμού ιστολογική διαφοροποίηση του καρκινώματος και η εντερική απόφραξη ή διάτρηση (156).

Όσοι ασθενείς σταδίου II δεν παρουσιάζουν τους παραπάνω «παράγοντες αυξημένου κινδύνου», ταξινομούνται ως ασθενείς «ενδιάμεσου κινδύνου», για τους οποίους τα ενδεχόμενα οφέλη της χορήγησης επικουρικής χημειοθεραπείας δεν έχουν αποδειχθεί (156).

1.5.10.3 Επικουρική ακτινοθεραπεία

Ο ρόλος της επικουρικής ακτινοθεραπείας στα καρκινώματα που εντοπίζονται στο κόλον είναι περιορισμένος, αν και διερευνάται η σημασία της σε ασθενείς που εμφανίζουν υπολειμματική νόσο. Αποτελεί όμως θεραπευτική μέθοδο με ευρεία χρήση και αποδοχή όσον αφορά τα καρκινώματα που εντοπίζονται στο ορθό (163).

1.5.10.4 Νέο-επικουρική ακτινο/χημειοθεραπεία

Η νεο-επικουρική ακτινο/χημειοθεραπεία (neo-adjuvant chemoradiation therapy) αποτελεί πλέον έναν από τα βασικούς θεραπευτικούς χειρισμούς όσον

αφορά τα καρκινώματα που εντοπίζονται στο ορθό (164). Η συγκεκριμένη θεραπευτική προσέγγιση εφαρμόζεται κυρίως σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένους όγκους (pT4), ενώ το τελευταίο διάστημα χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο ως εναλλακτική θεραπεία και στα καρκινώματα ορθού T2 και T3, με σκοπό τον καλύτερο τοπικό έλεγχο της νόσου και τη διενέργεια, σε δεύτερο χρόνο, λιγότερο επιθετικού εγχειρητικού χειρισμού (164).

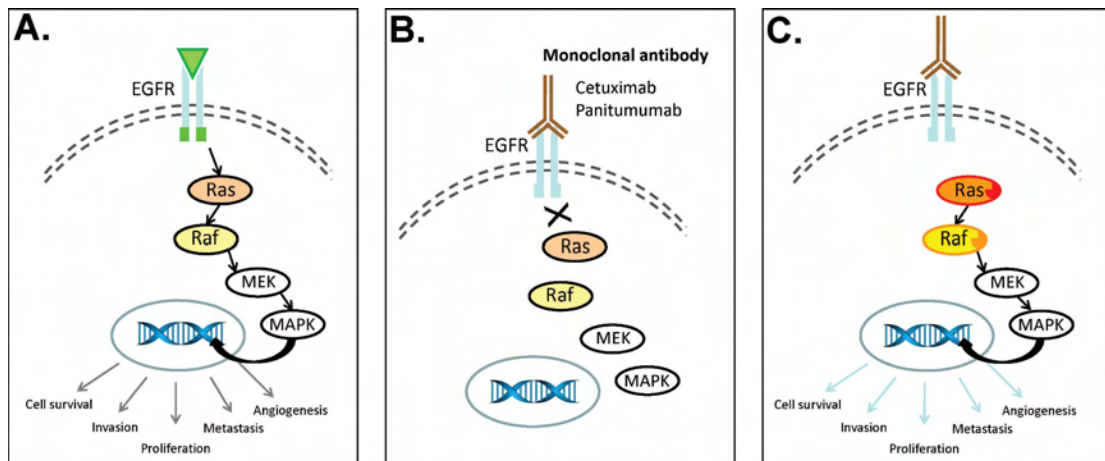
1.5.10.5 Θεραπεία μεταστατικής νόσου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου παρουσιάζει υψηλά ποσοστά θνητότητας. Οι περισσότεροι θάνατοι οφείλονται σε μεταστατική νόσο. Παρόλα αυτά, την τελευταία δεκαετία έχει σημειωθεί σημαντική βελτίωση στην επιβίωση των ασθενών με μεταστατικό καρκίνωμα του παχέος εντέρου (mCRC). Οι πρόσφατες εξελίξεις στην κατανόηση της μοριακής βιολογίας του ορθοκολικού καρκίνου έχουν οδηγήσει, μεταξύ άλλων, στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών ουσιών που στοχεύουν σε δυο διαφορετικούς μηχανισμούς, την αγγειογένεση (μπεβασιζουμάμπη/bevacizumab) (165) και τους υποδοχείς του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) (σετουξιμάμπη/cetuximab και πανιτουμουμάμπη/panitumumab) (166, 167).

Ήδη, από τη δεκαετία του 80, ο διαμεμβρανικός αυτός υποδοχέας με δράση τυροσινικής κινάσης, που μπορεί να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και την αναστολή της απόπτωσης των εντερικών καρκινικών κυττάρων με τη μεσολάβηση των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK, PI3K, JAK/STAT, αποτέλεσε επιλογή για τη δημιουργία στοχευμένης αντικαρκινικής θεραπείας (168). Η σετουξιμάμπη και η πανιτουμουμάμπη είναι δυο μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν απευθείας στην εξωκυττάρια περιοχή του EGF-υποδοχέα. Παρουσιάζουν σημαντική αποτελεσματικότητα έναντι του ορθοκολικού καρκίνου προχωρημένου σταδίου, ιδίως όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με συστηματική χημειοθεραπεία (169, 170).

Παράλληλα, η ύπαρξη γενετικών αλλαγών σε γονίδια που μετέχουν σε ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια, μεταγενέστερα του EGF-υποδοχέα, είναι δυνατό να οδηγήσει σε μια αέναη ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών που δεν απαντά στην αντί-EGFR θεραπεία (Εικ. 13). Μεταλλάξεις στα ογκογονίδια KRAS και BRAF σε συνδυασμό με απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως το PTEN, αποτελούν παραδείγματα τέτοιων γενετικών αλλαγών, τα οποία παρακάμπτοντας τον υποδοχέα EGFR, περιορίζουν την αποτελεσματικότητα των αντί-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων (171).

Πολυάριθμες μελέτες μέχρι σήμερα σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνωμα του παχέος εντέρου έδειξαν ότι η χορήγηση σετουξιμάμπης ή πανιτουμουμάμπης είναι μη αποτελεσματική στις περιπτώσεις που υπάρχουν μεταλλάξεις στο KRAS γονίδιο (172- 180).



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση αντί-EGFR θεραπείας μέσω μονοκλωνικών αντισωμάτων παρουσία ή απουσία μετάλλαξης στα KRAS/BRAF γονίδια **(A)**. Στα φυσιολογικά κύτταρα η ενεργοποίηση του EGFR οδηγεί στην ενδοκυττάρια μεταφορά του μηνύματος μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού RAS/RAF/MEK/ERK. **(B)**. Τα μονοκλωνικά αντισώματα στοχεύουν απευθείας την εξωκυττάρια περιοχή του EGFR, παρεμποδίζοντας έτσι τη σηματοδότηση του μονοπατιού RAS/RAF/MEK/ERK. **(C)**. Οι μεταλλάξεις του KRAS και πιθανώς και του BRAF γονιδίου, οδηγούν στη συνεχή σηματοδότηση του αντίστοιχου μονοπατιού, ανεξάρτητα από τη δέσμευση του EGFR από τα μονοκλωνικά αντισώματα (181).

Ωστόσο, σημαντικό ποσοστό (έως 65%) των ασθενών με μεταστατική νόσο ορθοκολικού καρκίνου, που δεν παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο *KRAS* γονίδιο (*wild type KRAS*), εξακολουθεί να μην ανταπακρίνεται στην αντί-EGFR θεραπεία (182). Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει το ενδιαφέρον πολλών μελετητών στην αναζήτηση επιπρόσθετων βιολογικών δεικτών με προβλεπτική αξία (*predictive value*), οι οποίοι θα μπορούν να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με το *KRAS* γονίδιο. Οι μεταλλάξεις στα *BRAF* και *PIK3CA* γονίδια, καθώς επίσης η απώλεια έκφρασης της *PTEN* πρωτεΐνης, αποτελούν υποσχόμενους προβλεπτικούς δείκτες όσον αφορά στην περαιτέρω επιλογή ασθενών, που θα μπορούσαν να επωφεληθούν από την αντί-EGFR θεραπεία (171, 183).

1.5.11 Πρόγνωση

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν προσδιοριστεί αρκετοί προγνωστικοί παράγοντες όσον αφορά στον καρκίνο του παχέος εντέρου, οι οποίοι σχετίζονται είτε με τον ίδιο τον ασθενή, είτε με τη θεραπεία που ακολουθείται, είτε με τη βιολογική συμπεριφορά του ίδιου του όγκου.

Η σταδιοποίηση της νόσου κατά TNM (AJCC/UICC) παραμένει ο «χρυσός κανόνας» της πρόγνωσης για τον καρκίνο του παχέος εντέρου (Πίνακας 9, American Joint Committee on Cancer tumor-node- metastasis (AJCC TNM) staging system, 7th

edition, 2010). Τα ποσοστά 5-ετούς επιβίωσης που εκτιμώνται για τους ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στη σταδιοποίηση κατά TNM.

Στάδιο	5- ετής συνολική επιβίωση
Στάδιο I	80-95%
Στάδιο IIA	72-75%
Στάδιο IIB	65-66%
Στάδιο IIIA	55-60%
Στάδιο IIIB	35-42%
Στάδιο IIIC	25-27%
Στάδιο IV	0-7%

Πίνακας 9. Ποσοστά επιβίωσης ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου σε σχέση με το στάδιο της νόσου. (93, 184- 187)

Εκτός από τη σταδιοποίηση του ορθοκολικού καρκίνου, η πορεία της νόσου εξαρτάται επίσης σε μεγάλο βαθμό από τη *θεραπευτική αντιμετώπιση*. Όπως προαναφέρθηκε, η σημαντική βελτίωση που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια όσον αφορά τις χειρουργικές τεχνικές έχει συντελέσει σημαντικά στη μείωση της διεγχειρητικής διασποράς των καρκινικών κυττάρων, καθώς επίσης και στη μείωση της περιεγχειρητικής νοσηρότητας και του χρόνου νοσηλείας των ασθενών. Η ποιότητα της χειρουργικής επέμβασης αλλά και της ιστοπαθολογικής μελέτης μπορεί εν μέρει να εκτιμηθεί από το σύνολο των εξαιρεθέντων λεμφαδένων κατά την ογκολογική χειρουργική κολεκτομή (188).

Στην πλειοψηφία των μελετών, οι ασθενείς στους οποίους επιτυγχάνεται χειρουργική εκτομή περισσότερων λεμφαδένων έχουν καλύτερη πρόγνωση, γεγονός που σχετίζεται τόσο με την πιο αξιόπιστη σταδιοποίηση της νόσου όσο και με τα θεραπευτικά πλεονεκτήματα μιας εκτενέστερης λεμφαδενεκτομής (189).

Η κατάσταση των χειρουργικών ορίων αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους προγνωστικούς δείκτες της νόσου. Τα εγχειρητικά όρια αποτελούν παράδειγμα προγνωστικού παράγοντα, που σχετίζεται τόσο με τη χειρουργική επάρκεια και αρτιότητα, όσο και με τη βιολογική συμπεριφορά του ίδιου του όγκου. Ιδιαίτερα στα καρκινώματα του ορθού, η εκτίμηση της πληρότητας και αρτιότητας του εγχειρητικού παρασκευάσματος αποτελεί μια χρήσιμη μέθοδο ποιοτικού ελέγχου της χειρουργικής θεραπείας με αποδεδειγμένη προγνωστική σημασία (190).

Η διάτρηση του παχέος εντέρου, ως επιπλοκή του εν λόγω καρκίνου είναι ασυνήθης, σχετίζεται όμως με δυσμενή έκβαση της νόσου, συμπεριλαμβανομένης της υψηλής ενδονοσοκομειακής θνητότητας και θνησιμότητας που παρατηρείται σε αυτές τις περιπτώσεις (191).

Ιστολογικά χαρακτηριστικά του όγκου, όπως ο ιστολογικός τύπος, ο βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης, καθώς επίσης και η παρουσία αγγειακής διήθησης αποτελούν σημαντικοί προγνωστικοί δείκτες της νόσου. Πρόκειται για στοιχεία που θα πρέπει να μελετώνται και να αναφέρονται κατά την ιστοπαθολογική μελέτη των παρασκευασμάτων των ογκολογικών κολεκτομών (85).

Υπάρχουν κι άλλα στοιχεία που προκύπτουν κατά τη μικροσκοπική μελέτη των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου, τα οποία έχουν συσχετισθεί, σύμφωνα με μελέτες, με την πρόγνωση και την πορεία της νόσου, όπως είναι το πρότυπο ανάπτυξης της διηθητικής παρυφής του νεοπλάσματος, η παρουσία νεοπλασματικών εκβλαστήσεων, η φλεγμονώδης λεμφοκυτταρική διήθηση γύρω από τον όγκο, η παρουσία ενός ή περισσότερων μορφολογικών χαρακτηριστικών που σχετίζονται με μικροδορυφορική αστάθεια (βλενώδης/ μυελώδης ιστολογικός τύπος, λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο, φλεγμονώδης αντίδραση τύπου Crohn) κ.α. Ωστόσο, λόγοι όπως η απουσία ομοφωνίας σχετικά με την προγνωστική τους σημασία, η έλλειψη αντικειμενικών κριτηρίων για την αξιολόγηση τους και η σημαντικού βαθμού ετερογένεια μεταξύ των παρατηρητών (inter-observer variability), έχουν οδηγήσει στον χαρακτηρισμό των παραπάνω ιστολογικών ευρημάτων ως προαιρετικών όσον αφορά στην ιστοπαθολογική αξιολόγηση και αναφορά (85, 192).

Δυσμενή χαρακτηριστικά πρωτοπαθούς όγκου	Αγγειακή διήθηση: δυσμενής σημασία	Αντίδραση ξενιστή: ευνοϊκή σημασία	Χειρουργική τεχνική: δυσμενής σημασία
<ul style="list-style-type: none"> • Μεγάλου βαθμού εν τω βάθει επέκτασης • Απόφραξη εντέρου • Διάτρηση εντέρου • Χαμηλή διαφοροποίηση • Διηθητική παρυφή/Νεοπλ. εκβλαστήσεις • Συγκεκριμένα μοριακά χαρακτηριστικά 	<ul style="list-style-type: none"> • Διήθηση εξωτοιχωματικών φλεβών • Διήθηση λεμφαγγείων • Διήθηση περινευρικών χώρων 	<ul style="list-style-type: none"> • Ενδονεοπλασματική φλεγμονή • Περινεοπλασματική φλεγμονή • Δεσμοπλασία • Αντιδραστικοί λεμφαδένες 	<ul style="list-style-type: none"> • Μικρής απόστασης χειρουργικά όρια • Ατελής εκτομή/ υπολειμματικός όγκος

Πίνακας 10. Οι κυριότεροι προγνωστικοί παράγοντες που δεν περιλαμβάνονται στην ταξινόμηση κατά TNM (WHO Classification of Tumors of the Digestive System IARC 2010).

Στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχει πληθώρα μοριακών και ανοσοϊστοχημικών δεικτών οι οποίοι έχουν μελετηθεί ως πιθανοί προγνωστικοί παράγοντες για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Παρόλα αυτά, κανένας από αυτούς τους δείκτες δε χρησιμοποιείται ακόμα για το σκοπό αυτό στην καθημερινή κλινική πράξη. Τα τελευταία χρόνια, έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες που αφορούν στην επίδραση των μεταλλάξεων του *KRAS* γονιδίου και στην πρόγνωση των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο, οι οποίες καταλήγουν σε αντικρουόμενα αποτελέσματα (193). Παρά το γεγονός ότι οι περισσότερες από αυτές υποστηρίζουν ότι οι εν λόγω μεταλλάξεις αποτελούν δυσμενή προγνωστικό παράγοντα, διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό στα επιμέρους αποτελέσματα, καθώς ορισμένοι μελετητές υπέδειξαν ότι οι μεταλλάξεις του *KRAS* γονιδίου έχουν προγνωστική σημασία μόνο σε ορισμένα στάδια (194- 201), ή μόνο όταν πρόκειται για συγκεκριμένους τύπους μεταλλάξεων (202- 212), ή σε συνδυασμό με άλλες γενετικές αλλαγές (213- 221) ή σε συνδυασμό με την εντόπιση του πρωτοπαθούς όγκου (204, 222, 223).

Εάν λάβει κανείς υπόψη μόνο τις πέντε μεγαλύτερες μελέτες, όπως περιγράφεται από τους Klump και τους συνεργάτες του (224), στις τέσσερις από αυτές δηλώνεται η προγνωστική σημασία των μεταλλάξεων του *KRAS* γονιδίου (197, 202, 205, 222).

Υπάρχουν επίσης μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες, ασθενείς των οποίων οι όγκοι χαρακτηρίζονται μοριακά από μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) παρουσιάζουν καλύτερη πρόγνωση από τους ασθενείς με απουσία μικροδορυφορικής αστάθειας (MSS καρκινώματα) (225).

Τα τελευταία χρόνια μελετάται επίσης η επίδραση των μεταλλάξεων του *BRAF* γονιδίου στην πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου. Μελέτες υποστηρίζουν ότι οι παραπάνω μεταλλάξεις έχουν δυσμενή προγνωστική αξία (226- 228). Ωστόσο, δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί εάν οι μεταλλάξεις του *BRAF* γονιδίου διαθέτουν οι ίδιες προγνωστική σημασία ή παρουσιάζουν διαφορετική επίδραση στην πρόγνωση, ανάλογα με το μοριακό μηχανισμό στον οποίο συμμετέχουν (229).

Η απώλεια του 18q χρωμοσώματος έχει αναφερθεί σε ποσοστό >70% του συνόλου των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου (230). Ασθενείς με τοπικά προχωρημένη νόσο σταδίου II/III και απώλεια του 18q χρωμοσώματος φαίνεται να χαρακτηρίζονται από σημαντικά δυσμενέστερη πρόγνωση (231- 234).

Η ανοσοϊστοχημεία αποτελεί μια σχετικά οικονομική μέθοδο, που χρησιμοποιείται στην καθημερινή διαγνωστική πράξη. Ωστόσο, δεν έχουν βρεθεί κατάλληλοι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες που θα μπορούσαν να εφαρμοσθούν ως δείκτες πρόγνωσης ή ανταπόκρισης στη θεραπεία του καρκινώματος του παχέος εντέρου. Η έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) έχει συσχετισθεί με επιθετική βιολογική συμπεριφορά του όγκου, χαμηλή επιβίωση, απομακρυσμένες μεταστάσεις και μειωμένη απάντηση στην νεο-επικουρική ακτινοθεραπεία (235- 238).

Η αυξημένη έκφραση του EGF-υποδοχέα έχει σχετισθεί, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, με δυσμενή πρόγνωση (239- 242).

Άλλοι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες, των οποίων η προγνωστική αξία μελετάται τα τελευταία χρόνια, περιλαμβάνουν πρωτεΐνες των σημαντικότερων σηματοδοτικών μονοπατιών που αφορούν την καρκινογένεση του παχέος εντέρου, όπως το Wnt μονοπάτι (243, 244), το μονοπάτι του αυξητικού παράγοντα TGF-β (245- 247) και της κινάσης MAPK (RAS/MAPK) (248- 250).

Επιπρόσθετα, δείκτες αναστολής του κυτταρικού κύκλου (251- 253), της απόπτωσης (254- 256), του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (257) και της επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (257) έχουν επίσης μελετηθεί όσον αφορά την προγνωστική τους αξία. Στον πίνακα που ακολουθεί συνοψίζονται οι σημαντικότεροι βιολογικοί παράγοντες που έχουν μελετηθεί τα τελευταία χρόνια ως προς την προγνωστική/ προβλεπτική τους σημασία (Πίνακας 11) (193).

Ιστολογικοί

Σταδιοποίηση TNM
Ιστολογική βαθμονόμηση
Χειρουργικά όρια
Ιστολογικός τύπος
Ανοσολογική απόκριση
Αριθμός προσβεβλημένων λεμφαδένων
Αγγειακή διήθηση

Δείκτες καρκινικού ιστού

- Ογκογονίδια

KRAS
EGFR
c-myc
TGFβ
BRAF

- Ογκοκατασταλτικά
γονίδια/LOH

p53
p27
p21
MCC
DCC
SMAD2
SMAD4
1pLOH
8pLOH
9pLOH
14pLOH

- Δείκτες πολλαπλασιασμού

Πυρηνικό αντιγόνο κυτταρικού πολ/σμού
Ki-67

	MIB-1
• Γενετική αστάθεια	Μικροδορυφορική αστάθεια Χρωμοσωμική αστάθεια Μονοπάτι CIMP Thymidylate synthase
• Απόπτωση	Bcl-2 BAX Αντιοξειδωτικά Fas/CD95 PI3K
• Αγγειογένεση	VEGF Μικροαγγειακή πυκνότητα Φωσφορυλάση θυμιδίνης Μόρια κυτταρικής προσκόλλησης
• Μετάσταση/ Διήθηση	Μεταλλοπρωτεΐνάσες θεμέλιας ουσίας Ενεργοποιητής πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης Αναστολέας πλασμινογόνου CD44 E- cadherin Μη- μεταστατική πρωτεΐνη 23

Πίνακας 11. Παράγοντες με πιθανή προγνωστική/προβλεπτική σημασία.

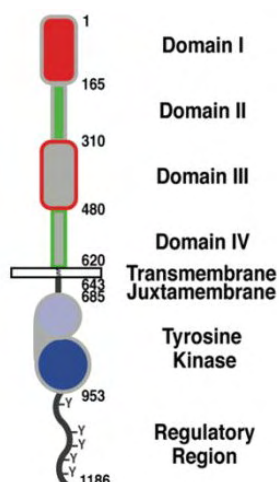
2. Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR)

2.1 Εισαγωγή- Δομή πρωτεϊνικού μορίου

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) είναι ο πρώτος της οικογένειας των επιδερμικών υποδοχέων (Human Epidermal Receptor, HER) που αναγνωρίστηκε (168). Σήμερα είναι γνωστό ότι η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τέσσερα μέλη: HER1 (EGFR ή ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) και HER4 (ErbB4).

Ο EGFR υποδοχέας είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 170 KDaltons αποτελούμενη από 1186 αμινοξέα (258). Συνιστάται από ένα

εξωκυττάριο τμήμα, μια διαμεμβρανική λιπόφιλη περιοχή και ένα ενδοκυττάριο κυτταροπλασματικό τμήμα (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Η εξωκυττάρια περιοχή αποτελείται από 4 τμήματα L1, CR1, L2 and CR2 ή L1, S1, L2 and S2. Οι περιοχές I (κόκκινο) και III (γκρι με κόκκινο περίγραμμα) εμφανίζουν περίπου 37% ομολογία στην ακολουθία τους, ενώ οι περιοχές II (πράσινο) και IV (γκρι με πράσινο περίγραμμα) είναι πλούσιες σε κυστεΐνη (259).

Το εξωκυττάριο τμήμα αποτελείται από τέσσερις περιοχές: L1, CR1, L2 και CR2 και είναι εκείνο στο οποίο προσδέεται ο προσδέτης. Το ενδοκυττάριο τμήμα του μορίου αποτελείται από την παραμεμβρανική περιοχή (JM), το κυτταροπλασματικό τμήμα με ενζυμική δράση κινάσης τυροσίνης και την καρβοξυτελική περιοχή (259).

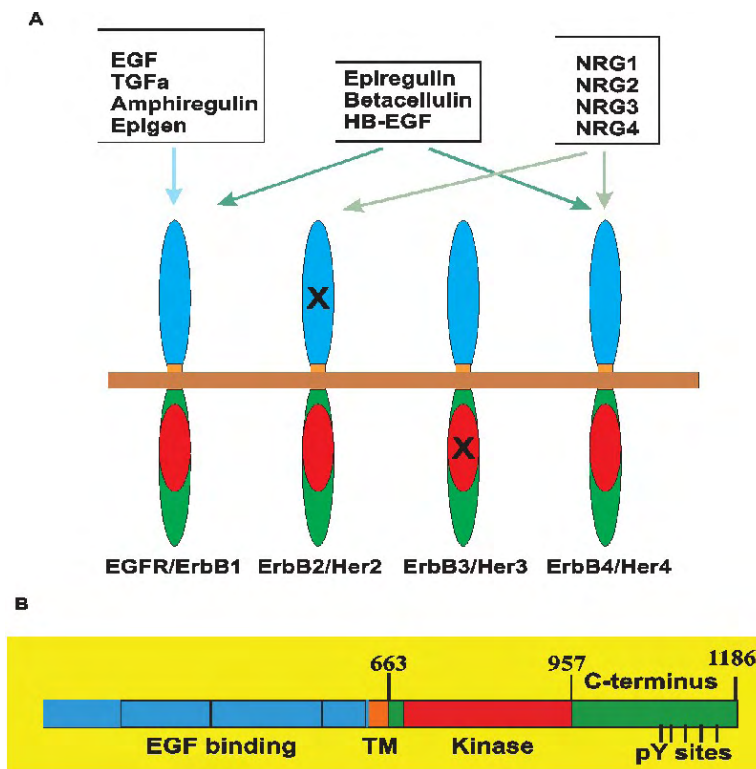
Η παραμεμβρανική περιοχή αποτελεί ουσιαστικά την προβολή του διαμεμβρανικού τμήματος στο εσωτερικό του κυττάρου. Μελέτες αναδεικνύουν διάφορες ρυθμιστικές λειτουργίες της περιοχής αυτής, όπως εσωτερίκευση του υποδοχέα για τη μετέπειτα αποδόμηση ή ανακύκλωσή του (260), προσανατολισμό του υποδοχέα σε πολωμένα κύτταρα (261), καθώς και αλληλεπιδράσεις με διάφορες πρωτεΐνες, όπως η Esp8 (262) και η καλμοδουλίνη (263, 264).

Η ενδοκυττάρια περιοχή εμφανίζει δραστικότητα τυροσινικής κινάσης, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα συμβάλλει τόσο στη μεταγωγή του σήματος προς το εσωτερικό του κυττάρου, μέσω φωσφορυλίωσης καταλοίπων τυροσίνης (265), όσο και στην ενδοκύτωση του υποδοχέα, μέσω φωσφορυλίωσης των υπολειμμάτων σερίνης και θρεονίνης που διαθέτει (266).

2.2 Προσδέτες της οικογένειας των υποδοχών αυξητικών παραγόντων

Οι ενδογενείς προσδέτες που ενεργοποιούν και ρυθμίζουν τη δράση των επιδερμικών υποδοχών HER μπορούν να διακριθούν σε δυο βασικές κατηγορίες: στους επιδερμικούς αυξητικούς παράγοντες ή «EGF αγωνιστές», οι οποίοι ενεργοποιούν τον EGF-υποδοχέα και στις ρυθμιστικές πρωτεΐνες NRG, οι οποίες ενεργοποιούν τους υποδοχείς ErbB3 και ErbB4 (267).

Έχουν περιγραφεί τουλάχιστον επτά διαφορετικοί EGF αγωνιστές- προσδέτες του EGF-υποδοχέα: ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF), ο αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης α (Transforming Growth Factor- α , TGF α), η αμφιρεγκουλίνη (Amphiregulin, AR), η β -σελουλίνη (betacellulin, BTC), η επιγκενίνη (epigen, EPN), η επιρεγκουλίνη (epiregulin, EPR) και ο συνδεόμενος στην ηπαρίνη EGF-παρόμοιος αυξητικός παράγοντας (Heparin Binding EGF-like Growth Factor (HB-EGF) (Εικ. 15) (268).

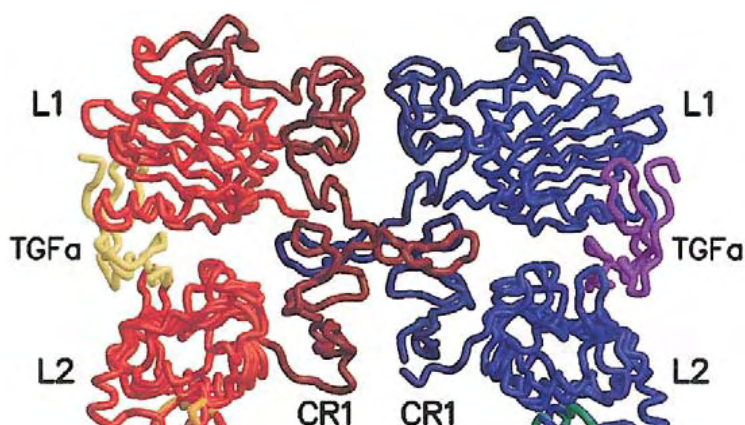


Εικόνα 15. Οικογένεια ErbB υποδοχών. Α. ErbB υποδοχείς και οι προσδέτες τους. Η οικογένεια των ErbB υποδοχών αποτελείται από τέσσερα μέλη: HER1/EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 και HER4/ErbB4. Β. Γραμμική αναπαράσταση δομής του EGFR (269).

2.3 Ενεργοποίηση και βιολογική λειτουργία του EGF-υποδοχέα

Υπό φυσιολογικές συνθήκες και απουσία προσδέτη, ο EGF-υποδοχέας υπάρχει στα κύτταρα σε μονομερή και διμερή μορφή (270, 271). Ωστόσο, η σύνδεση του ενδογενούς προσδέτη αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την αύξηση της δραστηριότητας της τυροσινικής κινάσης και την ενεργοποίηση του υποδοχέα.

Η σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διμερούς συμπλόκου στην επιφάνεια του κυττάρου με αναλογία προσδέτη:υποδοχέα 2:2 (270). Η παραπάνω πρόσδεση οδηγεί σε μεταβολή της στερεοχημικής διάταξης του μορίου του υποδοχέα, με επακόλουθο διμερισμό των εξωκυττάρων τμημάτων του συμπλόκου, κυρίως μέσω αλληλεπιδράσεων των CR1 περιοχών και μικρότερη συμμετοχή των L1 και L2 υποπεριοχών (Εικ. 16) (272).



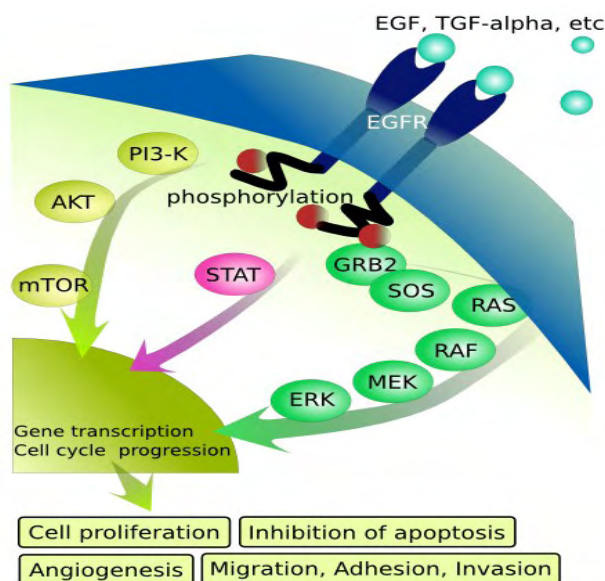
Εικόνα 16. Ομοδιμερές σύμπλοκο TGFα/EGFR. Η πρόσδεση των μορίων του EGF- αγωνιστή, TGFα (επισήμανση με κίτρινο και μωβ) οδηγεί σε διμερισμό των εξωκυττάρων περιοχών του υποδοχέα, κυρίως μέσω αλληλεπιδράσεων των CR1 υποπεριοχών.

Τα διαμεμβρανικά τμήματα των υποδοχέων του συμπλόκου διαχέονται κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα οι δύο κυτταροπλασματικές περιοχές κινάσης τυροσίνης να έρχονται σε επαφή και να επιτυγχάνεται φωσφορυλίωση του υποδοχέα και ενεργοποίηση της δραστηριότητας της τυροσινικής κινάσης.

Ο σχηματισμός ετεροδιμερών συμπλόκων μεταξύ των μελών της οικογένειας των επιδερμικών υποδοχέων HER είναι λιγότερο μελετημένος και κατανοητός σε σχέση με το σχηματισμό ομοδιμερών συμπλόκων του υποδοχέα EGFR. Ωστόσο, σχετικές μελέτες αναδεικνύουν ότι ο HER2 υποδοχέας είναι το μόριο που προτιμάται για το σχηματισμό ετεροδιμερών συμπλόκων με τον EGF υποδοχέα (273).

Η προαναφερθείσα ενεργοποίηση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών

μονοπατιών που ρυθμίζουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η αναστολή απόπτωσης και η αγγειογένεση (Εικ. 17) (274) .



Εικόνα 17. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα οδηγεί στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η αναστολή της απόπτωσης, η κυτταρική συνοχή και η αγγειογένεση (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f8/EGFR_signaling_pathway.png)

Ο τύπος του μορίου-προσδέτη και η ακριβής σύσταση του διμερούς συμπλόκου αποτελούν στοιχεία που καθορίζουν ποια σηματοδοτικά μονοπάτια θα πυροδοτηθούν (275).

Το πιο καλά ίσως μελετημένο μονοπάτι μεταγωγής σήματος του υποδοχέα EGFR είναι εκείνο που εμπλέκει την πρωτεΐνη RAS και το μονοπάτι RAF/MEK/ERK, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση βασικών μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, το σηματοδοτικό μονοπάτι EGFR/PI3K/PDK1/Akt αποτελεί κομβικό σημείο για τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης.

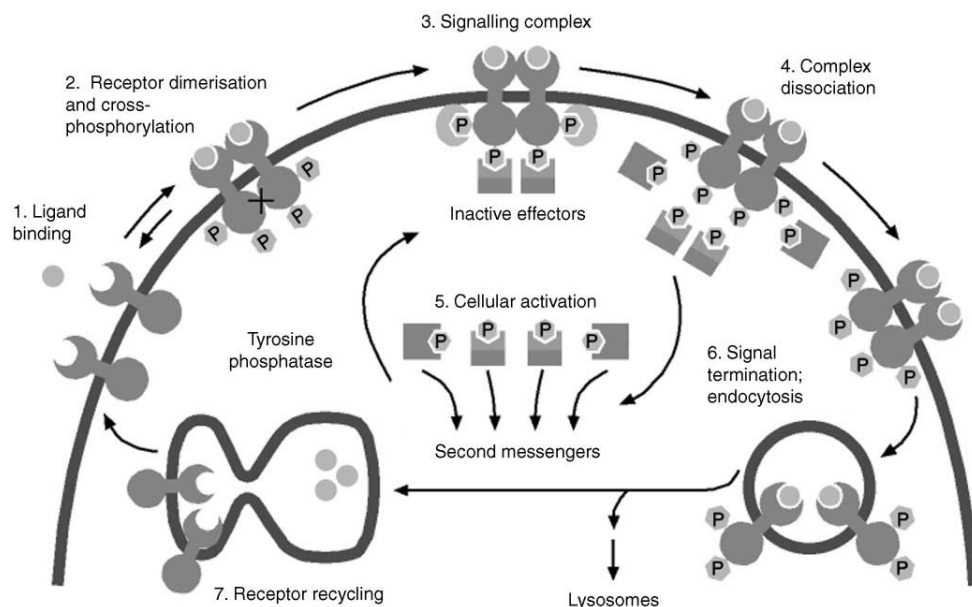
Ο EGF-υποδοχέας συμβάλλει στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της αλληλεπίδρασής του με τους STAT μεταγραφικούς παράγοντες (272). Έχει διαπιστωθεί ότι τα μονοπάτια μεταγωγής κυτταρικών σημάτων στα οποία εμπλέκεται ο EGFR, συμβάλλουν επιπρόσθετα στη ρύθμιση τόσο της αγγειογένεσης, μέσω των παραγόντων VEGF και MMPs (276) , όσο και της μετάστασης μέσω των μονοπατιών της φωσφολιπάσης C- γ, EGFR/PLC- γ. (277).

Η διαμόρφωση του EGFR μορίου λειτουργεί ουσιαστικά ως σύνδεση του εξωκυττάριου περιβάλλοντος με την ενδοκυττάρια μεταγωγή σημάτων, καθώς έχει ως στόχο τη μετατροπή εξωκυττάριων μηνυμάτων σε κυτταρικές απαντήσεις.

2.4 Ενδοκύττωση του EGF-υποδοχέα

Η ενεργοποίηση του EGFR, εκτός από την πυροδότηση των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών που προαναφέρθηκαν, θέτει σε λειτουργία μηχανισμούς που έχουν ως απώτερο σκοπό τη λήξη των αντίστοιχων κυτταρικών σημάτων (278).

Μετά τη σύνδεση του προσδέτη και την ενεργοποίηση του EGF-υποδοχέα, το ενεργοποιημένο σύμπλοκο δεσμεύεται σε καλυμμένα βοθρία της κυτταρικής μεμβράνης και υφίσταται εσωτερικευση μέσω ενός ενδογενούς μηχανισμού ενδοκύττωσης (279). Στη συνέχεια, τα εσωτερικευμένα μόρια του υποδοχέα υφίστανται είτε αποδόμηση μέσω του συστήματος της ομπικουϊτίνης λιγκάσης Cbl, είτε ανακύκλωση στην επιφάνεια του κυττάρου (Εικ. 18) (279).

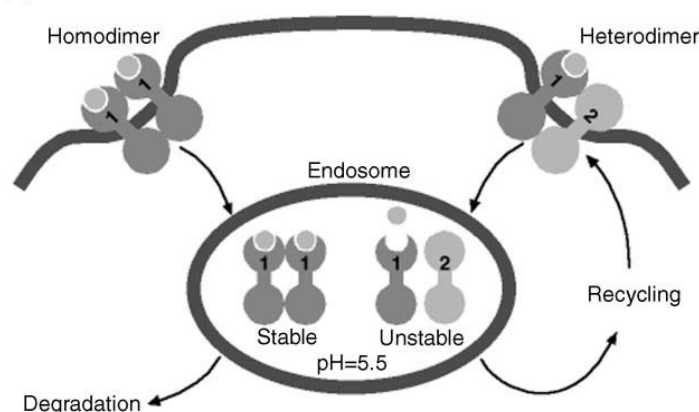


Εικόνα 18. Μοντέλο μεταγωγής σήματος του EGFR υποδοχέα. Σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα, στην κυτταρική επιφάνεια, δημιουργία διμερούς και ενεργοποίηση του υποδοχέα μέσω φωσφορυλίωσης. Ακολουθεί καταρράκτης ενζυμικών αντιδράσεων με κορύφωση την ενεργοποίηση ενζύμων και την κυτταρική απάντηση. Κατά τη λήξη του μηνύματος, το σύμπλοκο προσδέτη- υποδοχέα εσωτερικεύεται εντός καλυμμένων βοθρίων της πλασματικής μεμβράνης και οδηγείται προς αποδόμηση ή ανακύκλωση στην επιφάνεια του κυττάρου.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, οι παράγοντες που καθορίζουν τη «μοίρα» των εσωτερικευμένων υποδοχέων είναι ποικίλοι. Μέσα στα ενδοσώματα, ο EGF προσδέτης παραμένει συνδεδεμένος με τον υποδοχέα, γεγονός που οδηγεί στην αποδόμηση και των δύο. Αντίθετα, ο προσδέτης TGF α , διαχωρίζεται από τον

υποδοχέα και ο μιν πρώτος, βρισκόμενος σε ελεύθερη μορφή αποδομείται, ενώ ο υποδοχέας ανακυκλώνεται στην επιφάνεια του κυττάρου. Όταν το παραπάνω σύστημα έρθει σε κορεσμό, η περίσσεια ποσότητα του EGFR επίσης αποδομείται (280).

Ένας επιπρόσθετος παράγοντας που επηρεάζει την τύχη του εσωτερικευμένου συμπλόκου είναι η σταθερότητά του. Συγκεκριμένα, τα ενεργοποιημένα ομοδιμερή συμπλοκα του EGFR είναι σχετικά σταθερά και παραμένουν συνδεδεμένα με την ουμπικουϊτίνη Cbl, γεγονός που ευνοεί την αποδόμηση τους. Αντίθετα, τα ετεροδιμερή EGFR/HER2 είναι λιγότερο σταθερά, με αποτέλεσμα η ουμπικουϊτίνη Cbl να διαχωρίζεται από το σύμπλοκο και οι υποδοχείς να ακολουθούν το μονοπάτι της ανακύκλωσης, επιστρέφοντας με τον τρόπο αυτό στην επιφάνεια του κυττάρου (Εικ. 19) (279).



Εικόνα 19. Η σταθερότητα του ενεργοποιημένου συμπλόκου προσδέτη-υποδοχέα στο περιβάλλον του ενδοσώματος επηρεάζει την τύχη του υποδοχέα. Τα ετεροδιμερή συμπλοκα (1-2) είναι σχετικά ασταθή, γεγονός που ευνοεί την ανακύκλωση τους και την επιστροφή τους στην επιφάνεια του κυττάρου. Τα ομοδιμερή συμπλοκα (1-1) είναι σχετικά σταθερά και ακολουθούν το μονοπάτι της αποδόμησης, μέσω της ουμπικουϊτίνης Cbl.

2.5 EGF-υποδοχέας και καρκίνος

Ο EGF-υποδοχέας εντοπίζεται φυσιολογικά σε όλα τα επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα, όπως επίσης επιλεκτικά σε ορισμένα γλοιακά και λεία μυϊκά κύτταρα.

Η αυξημένη ενεργοποίηση του εν λόγω υποδοχέα μπορεί να οδηγήσει στη μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό, παρέχοντας συνεχή μηνύματα για κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αναστολή της απόπτωσης, αγγειογένεση και ικανότητα για μετάσταση, τα οποία αποτελούν βασικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Στον άνθρωπο, η κακοήθης εξαλλαγή ως αποτέλεσμα απορρύθμισης του EGF-υποδοχέα μπορεί να συμβεί με διάφορους μηχανισμούς όπως: αυξημένη έκφραση του υποδοχέα, ενεργοποιητικές (activating) μεταλλάξεις,

μεταβολές στη διαδικασία σχηματισμού των διμερών συμπλόκων, ενεργοποίηση μέσω αυτοκρινών βρόγχων, περιορισμός ή αναστολή του μηχανισμού ενδοκύττωσης του υποδοχέα (275).

Εκτός από τα κύτταρα που εκφράζουν φυσιολογικά τον EGFR, έχει διαπιστωθεί ότι ο ίδιος εκφράζεται ή και υπερεκφράζεται σε πολλούς όγκους του ανθρώπου και σε ποικίλο βαθμό (281). Ενδεικτικά, παρατίθενται ορισμένα παραδείγματα στον πίνακα που ακολουθεί:

Τύπος όγκου	Ποσοστό έκφρασης EGFR
Κεφαλής- τραχήλου	90-95%
Μαστού	82-90%
Νεφρικό καρκίνωμα	76-89%
Τραχήλου/μήτρας	90%
Οισοφάγου	43-89%
Παγκρέατος	30-89%
Μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα	40-80%
Προστάτη αδένα	40-80%
Παχέος εντέρου	25-77%
Ωθηκών	35-70%
Γλοίωμα	40-63%
Ουροδόχου κύστης	31-48%
Στομάχου	4-33%

Πίνακας 12. Ποσοστό ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του EGF υποδοχέα σε διάφορους όγκους (275).

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η αυξημένη έκφραση του EGFR έχει συσχετισθεί, σε αρκετές μελέτες, με προχωρημένο στάδιο νόσου, με εμφάνιση αντίστασης σε συγκεκριμένη θεραπεία (282- 284) και σε ορισμένες περιπτώσεις καρκίνου με φτωχή πρόγνωση των αντίστοιχων ασθενών (285- 288).

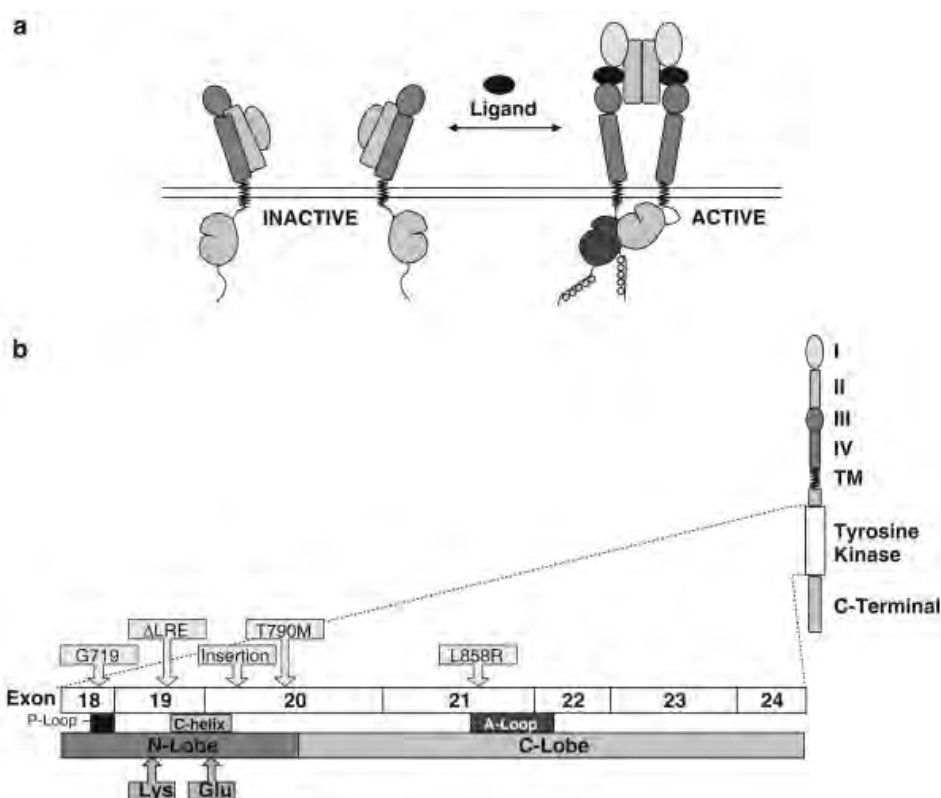
Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι η αυξημένη έκφραση του EGF-υποδοχέα θεωρείται γενικά δυσμενής προγνωστικός παράγοντας, υπάρχουν μελέτες με αντικρουόμενα αποτελέσματα (289).

Εκτός από την αυξημένη έκφραση του EGFR, υπάρχουν κι άλλοι μηχανισμοί που μπορούν να οδηγήσουν σε διαταραχή της ρύθμισης των σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως οι μεταλλάξεις στο EGFR γονίδιο.

Αν και έχουν καταγραφεί πολυάριθμοι τύποι μεταλλάξεων του EGF-υποδοχέα, η πιο συχνή και καλά μελετημένη είναι η μετάλλαξη τύπου EGFRVIII ή ΔEGFR. Πρόκειται για έλλειψη των εξονίων 2 - 7 του EGFR γονιδίου, γεγονός που οδηγεί σε απώλεια των υπολειμμάτων 6 – 276 στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα. Η συγκεκριμένη αλλαγή έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός υποδοχέα με διαρκή ενεργότητα, ο οποίος δεν υπόκειται σε ενδοκύττωση. Η μετάλλαξη τύπου EGFRVIII συναντάται συχνά σε υψηλού βαθμού κακοήθειας γλοιώματα και λιγότερο συχνά

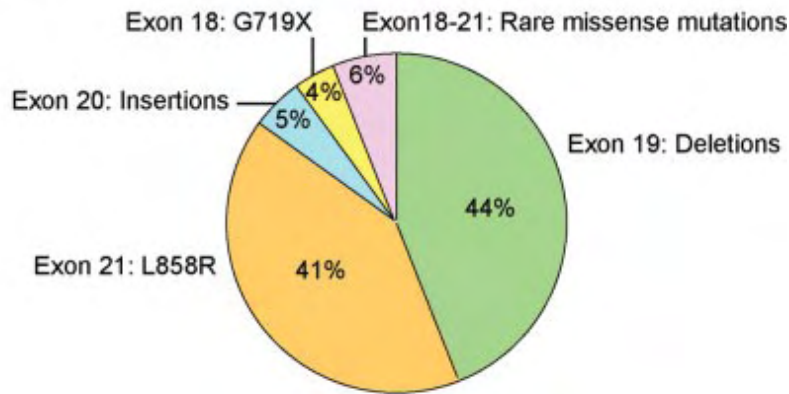
σε μη μικροκυτταρικούς όγκους του πνεύμονα και σε καρκινώματα μαστού και ωοθηκών (290- 293).

Άλλες μεταλλάξεις, που έχουν ανιχνευθεί στο EGFR γονίδιο, αφορούν στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα με δράση τυροσινικής κινάσης (TK domain) και αφορούν τα εξόνια 18 ή 19-21. Πρόκειται για ελλείψεις, προσθήκες ή σημειακές παρανοηματικές μεταλλάξεις με αντικατάσταση αμινοξέος (missense point mutations). Οι μεταλλάξεις αυτές χαρακτηρίζονται «ενεργοποιητικές» ('activating mutations'), καθώς οδηγούν σε ενεργοποίηση της δραστηριότητας της τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα ανεξάρτητα από τη σύνδεση προσδέτη (Εικ. 20) (294).



Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση ενεργοποίησης της TK περιοχής του EGF-υποδοχέα και των αντίστοιχων μεταλλάξεων. (a) Μετά τη σύνδεση του εξωκυττάριου προσδέτη, ο υποδοχέας διμερίζεται και ενεργοποιείται η περιοχή της τυροσινικής κινάσης. (b) Οι μεταλλάξεις της ενζυμικής περιοχής του υποδοχέα αφορούν στα αντίστοιχα τέσσερα πρώτα εξόνια 18-21 και οδηγούν σε ενεργοποίηση της δραστηριότητας της τυροσινικής κινάσης με μηχανισμό ανεξάρτητο της πρόσδεσης του υποδοχέα με αγωνιστή.

Οι παραπάνω μεταλλάξεις έχουν μελετηθεί εκτενώς στο μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα με πιο συχνές τις ελλείψεις στο εξόνιο 19 και τη σημειακή μετάλλαξη L858R στο εξόνιο 21 (295).



Εικόνα 21. Κατανομή των συχνότερων μεταλλάξεων (%) που παρατηρούνται στην ενζυμική περιοχή του EGF υποδοχέα σε μη μικροκυτταρικά καρκινώματα πνεύμονα.

Εκτός από τον καρκίνο του πνεύμονα, όπου οι παραπάνω μεταλλάξεις παρατηρούνται συχνά (296, 297), πρόσφατες μελέτες αναφέρουν την ύπαρξη σπάνιων σωματικών μεταλλάξεων στα εξόνια 18-21 στον καρκίνο του παχέος εντέρου (298- 300), ενώ ελλείψεις στο εξόνιο 19 του EGFR γονιδίου παρατηρούνται επίσης και σε πλακώδη καρκινώματα κεφαλής- τραχήλου (301).

Τα ενδοκυττάρια μηνύματα που σηματοδοτούνται από τον EGF-υποδοχέα είναι δυνατό να ενισχυθούν μέσω αύξησης των επιπέδων των αντίστοιχων μορίων-προσδετών, όπως του EGF ή του TGF-α καθώς και μέσω αλληλεπιδράσεων με τον HER2 ή άλλους υποδοχείς (302).

3. Ογκογονίδια RAS

3.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Στη διαδικασία της καρκινογένεσης συμμετέχουν ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια, γονίδια που εμπλέκονται στο μηχανισμό απόπτωσης, γονίδια επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, γονίδια της τελομεράσης και γονίδια που κωδικοποιούν miRNA μόρια.

Τα ογκογονίδια ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά κατά τη μοριακή ανάλυση ογκογόνων ρετροϊών που προκαλούν καρκίνο σε ποντίκια, γάτες και πιθήκους (ικκά ογκογονίδια, v-onc). Στα επόμενα έτη, διαπιστώθηκε ότι αντίστοιχες γονιδιακές αλληλουχίες υπάρχουν σε φυσιολογικά κύτταρα όλων των σπονδυλωτών ζώων, καθώς και του ανθρώπου (κυτταρικά ογκογονίδια, c-onc) (303).

Τα ογκογονίδια προέρχονται από φυσιολογικά κυτταρικά ή ιικά γονίδια, τα πρωτο-ογκογονίδια. Στον ανθρώπινο οργανισμό, η μετατροπή των πρωτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια μπορεί να γίνει με τρεις κυρίως τρόπους (304- 306):

- ✓ Σημειακές μεταλλάξεις (point mutations): απώλεια, εισαγωγή ή αντικατάσταση μιας μόνο βάσης.
- ✓ Γονιδιακή ενίσχυση (gene amplification): υπερέκφραση γονιδίου με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ογκοπρωτεΐνης.
- ✓ Χρωμοσωμικές μεταθέσεις (chromosomal translocations): παραγωγή χιμαιρικής πρωτεΐνης με ανώμαλη δραστηριότητα ή αυξημένη γονιδιακή έκφραση σε λανθασμένες συνθήκες.

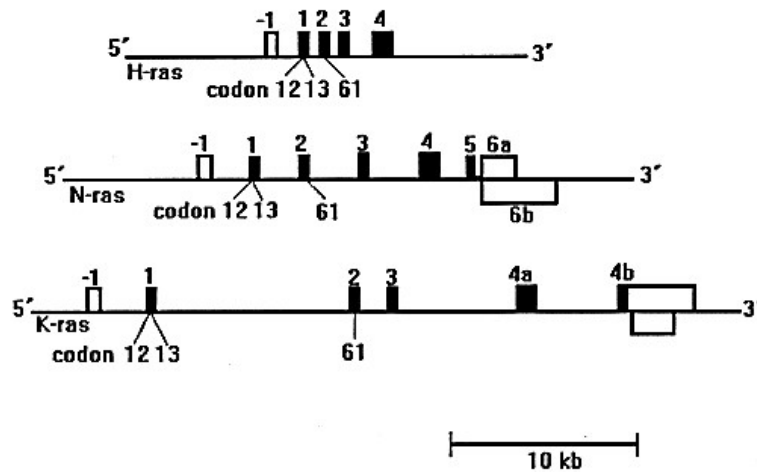
Η φυσιολογική δράση των πρωτο-ογκογονιδίων φαίνεται να σχετίζεται με σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η μεταγραφή, ο κυτταρικός κύκλος, η διαφοροποίηση και η απόπτωση (307). Τα πρωτο-ογκογονίδια κωδικοποιούν προϊόντα με ποικίλες λειτουργίες όπως αυξητικούς παράγοντες ή υποδοχείς τους (*EGFR*), ρυθμιστές αναδιάταξης χρωματίνης (*ALL1*), μεταγραφικούς παράγοντες (*myc*), ενδοκυττάριους διαβιβαστές σημάτων (*RAS*, *RAF*) και αποπτωτικούς παράγοντες (*BCL-2*). Η δράση των ογκογονιδίων διαφέρει από εκείνη των πρωτο-ογκογονιδίων, δεδομένου ότι τα ογκογονίδια μετά την ενεργοποίηση τους αποκτούν την ικανότητα να μετατρέπουν κύτταρα σε καρκινικά (308). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ογκογονίδια δρουν με επικρατή τρόπο, αρκεί δηλαδή η ενεργοποίηση ενός αλληλόμορφου, ώστε η ογκοπρωτεΐνη που παράγεται να μπορεί να συμβάλλει στη διαδικασία της καρκινογένεσης (309).

Τα ογκογονίδια της οικογένειας *ras* ανακαλύφθηκαν σε ιούς που εμφάνιζαν την ικανότητα εξαλλαγής κυττάρων και πρόκλησης σαρκώματος σε αρουραίους. Η οικογένεια περιλαμβάνει τρεις τύπους γονιδίων RAS: το KRAS (Kirsten), το HRAS (Harvey) και το NRAS.

Τα γονίδια RAS ανήκουν στα ονομαζόμενα βασικά γονίδια (Housekeeping genes). Πρόκειται δηλαδή για γονίδια τα οποία είναι συντηρημένα σε μεγάλο βαθμό κατά την εξελικτική διαδικασία και απαραίτητα για την κυτταρική επιβίωση, καθώς συμβάλουν στη ρύθμιση σημαντικών λειτουργιών του κυττάρου (310).

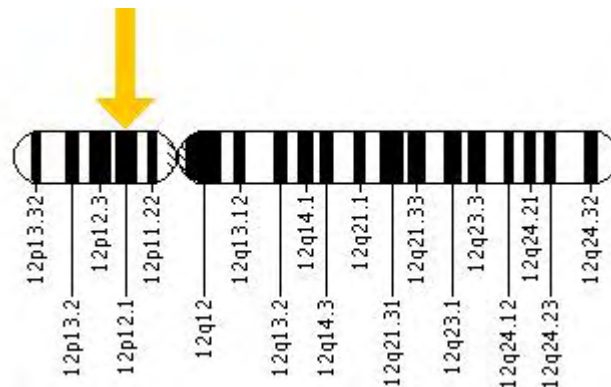
3.2 Δομή και έκφραση του KRAS γονιδίου

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα τα αντιπροσωπευτικά μέλη της οικογένειας *ras* είναι τα: *KRAS2*, *HRAS1*, και *NRAS*, ενώ υπάρχουν και τα ανενεργά ψευδογονίδια *KRAS1* και *HRAS2* (Εικ. 22).



Εικόνα 22. Δομή RAS γονιδίων. Τα μαύρα ορθογώνια αντιστοιχούν στα εξόνια και τα λευκά στα ιντρόνια, αντίστοιχα. Σημειώνονται επίσης τα κωδικόνια όπου παρατηρείται αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων.

Το KRAS γονίδιο εδράζεται στον κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 12 (Εικ. 23) και έχει μήκος περίπου 50 Kb. Διαθέτει συνολικά έξι εξόνια, από τα οποία κωδικοποιούνται σταθερά τα εξόνια 2,3 και 4 (310). Από το εναλλακτικό μάτισμα του τέταρτου εξωνίου προκύπτουν δύο ισομορφές πρωτεΐνης: οι *KRas4A* και *KRas4B*. Η πρώτη αποτελείται από 189 αμινοξέα και εκφράζεται ασθενώς στα ανθρώπινα κύτταρα, ενώ η *KRas4B* είναι η επικρατούσα μορφή, αποτελείται από 188 αμινοξέα και εμφανίζει υψηλή έκφραση στους περισσότερους ιστούς.



Εικόνα 23: Εντόπιση του KRAS γονιδίου στο κοντό βραχίονα του χρωμοσώματος 12 (12p12.1).

Το KRAS γονίδιο, φέρει υποκινητές πλούσιους σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες GC, ενώ λείπουν TATA ή CAT ρυθμιστικές περιοχές. Οι παραπάνω ιδιότητες είναι χαρακτηριστικές για γονίδια αναφοράς, όπως και για πολλά άλλα ογκογονίδια.

Η έκφραση του KRAS γονιδίου ρυθμίζεται μέσω της αλληλεπίδρασης του υποκινητή του και ειδικών πρωτεϊνών, κατά την έναρξη της μεταγραφής, αλλά και κατά τη διάρκεια αυτής, μέσω των miRNA μορίων (310).

Μία από τις πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την έκφραση του KRAS γονιδίου είναι η πρωτεΐνη ESXR1. Στα κύτταρα συναντάται σε τρεις διαφορετικές μορφές: στην πλήρη μορφή, με μοριακό βάρος 65 KDaltons και στα δύο θραύσματα προϊόντα πρωτεόλυσης, ένα αμινοτελικό μοριακού βάρους 45 KDaltons κι ένα καρβοξυτελικό θραύσμα μοριακού βάρους 20 KDaltons. Η πλήρης μορφή και το καρβοξυτελικό θραύσμα βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και πιθανόν αποτελούν αναστολείς του κυτταρικού κύκλου διατηρώντας τα κύτταρα στην M φάση (311). Αντίθετα το αμινοτελικό θραύσμα της πρωτεΐνης βρίσκεται στον πυρήνα κι έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με την αλληλουχία TAATGTTATTA του πρώτου εσωνίου του γονιδίου, καταλήγοντας σε αναστολή της έκφρασης του, τόσο σε επίπεδα mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης (312).

Όσον αφορά τα miRNAs μόρια (microRNAs), έχουν βρεθεί περισσότερα από 500 μόρια, τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση του 30% περίπου του συνολικού γονιδιώματος, συμπεριλαμβανομένων και των RAS γονιδίων (313). Στα γονίδια KRAS, τα miRNAs ελαττώνουν τη σταθερότητα του mRNA μορίου και αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση εμποδίζοντας την πρόσβαση στα ριβοσωμάτια (310).

3.3 Η πρωτεΐνη *ras* (*p21*)

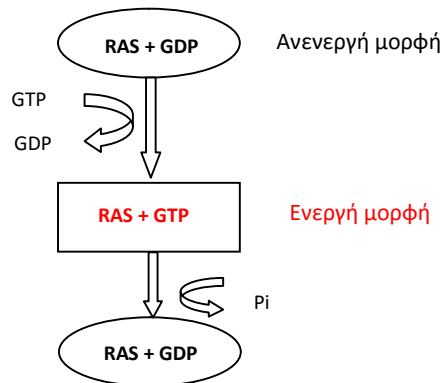
Τα γονίδια RAS των θηλαστικών κωδικοποιούν μικρές πρωτεΐνες μοριακού βάρους 21 KDalltons (*p21*) και μήκους 188 (K-Ras4B) ή 189 (K-Ras4A, H-Ras, N-Ras) αμινοξέων.

Οι πρωτεΐνες RAS ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των μονομερών ή μικρών G πρωτεϊνών (GTPases). Πρόκειται για πρωτεΐνες που έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν το GTP και να το υδρολύουν σε GDP. Στον άνθρωπο, η υπερ-οικογένεια των μικρών GTPασών έχει παραπάνω από 150 μέλη και με βάση την ομολογία που παρουσιάζουν στην αλληλουχία και τις λειτουργικές ιδιότητες διακρίνονται σε πέντε τουλάχιστον διακριτές κατηγορίες: (314).

- RAS: αποτελείται από μέλη που εμφανίζουν υψηλή ομολογία (55%) στην αλληλουχία και στις λειτουργίες με τις πρωτεΐνες H-Ras, N-Ras και K-Ras. Περιλαμβάνει, εκτός από τις πρωτεΐνες Ras p21, τις R-Ras, Ral, Rap, TC21, Rheb και M-Ras (315, 316).
- Rho: περιλαμβάνει στον άνθρωπο περίπου 20 μέλη- πρωτεΐνες, οι οποίες ρυθμίζουν την αναδιοργάνωση του σκελετού της ακτίνης.
- Rab: ρυθμίζουν την ενδοκυτταρική κυκλοφορία κυστιδίων.

- Arf: ρυθμίζουν το σχηματισμό και την ενδομεταφορά των μεταφορικών κυστιδίων στη συσκευή Golgi
- Ran: ρυθμίζουν την πυρηνο-κυτταροπλασματική μεταφορά και την οργάνωση των μικροσωληνίσκων κατά τη μεσόφαση.

Οι πρωτεΐνες *RAS* στην ενεργό τους μορφή έχουν δεσμευμένο το GTP, ενώ στην ανενεργό τους μορφή εμφανίζονται ως σύμπλεγμα με το GDP (Εικ. 24). Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών *RAS* είναι παροδική και το μεγαλύτερο ποσοστό τους βρίσκεται στην ανενεργό μορφή.



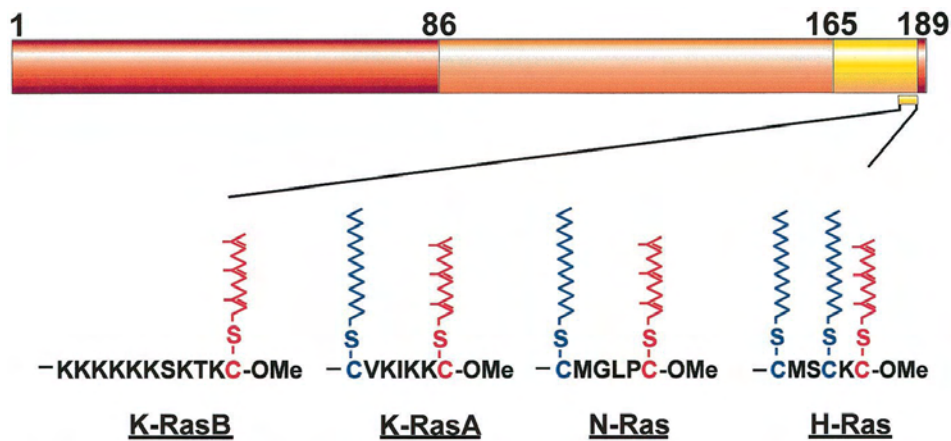
Εικόνα 24. Σχηματική αναπαράσταση των δυο μορφών της *RAS* πρωτεΐνης

3.4 Δομή πρωτεϊνών *RAS*

Η δομή των *RAS* πρωτεϊνών μελετάται εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια (303, 304, 317). Κρυσταλλογραφικές, μοριακές και βιοχημικές μελέτες αποκάλυψαν την ύπαρξη των εξής σημαντικών περιοχών: (318)

- Την καταλυτική περιοχή (G domain, αμινοξέα 1- 164): παρουσιάζει μεγάλη ομολογία στις τέσσερις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα τρία ανθρώπινα γονίδια *RAS*. Τα πρώτα 86 αμινοξέα είναι 100% ταυτόσημα μεταξύ τους, ενώ τα επόμενα 80 αμινοξέα διαφέρουν ελάχιστα, παρουσιάζοντας ομολογία περίπου 85% (Εικ. 25) (319). Περιλαμβάνει την περιοχή με την οποία συνδέονται οι διάφοροι τελεστές της πρωτεΐνης (effector domain, αμινοξέα 32-40), την περιοχή switch I (αμινοξέα 30-38) με την οποία συνδέονται τα μόρια GAP και την περιοχή switch II (αμινοξέα 59-67) με την οποία συνδέονται οι πρωτεΐνες GEF.

- Την ετερογενή περιοχή (HVR region, αμινοξέα 165- 185): διαφέρει σημαντικά η αλληλουχία των αμινοξέων, μεταξύ των ισομορφών της p21, εκτός από τη συντηρημένη Cys186.
- Το καρβοξυτελικό άκρο (C-terminal region, αμινοξέα 186- 189): κοινό στις τέσσερις πρωτεΐνες Ras, με ακολουθία CAAX (όπου C=κυστεΐνη, A= αλειφατικό αμινοξύ και X=σερίνη ή μεθειονίνη). Είναι απαραίτητο για τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και την πρόσδεση στη πλασματική μεμβράνη, όπως περιγράφεται παρακάτω.

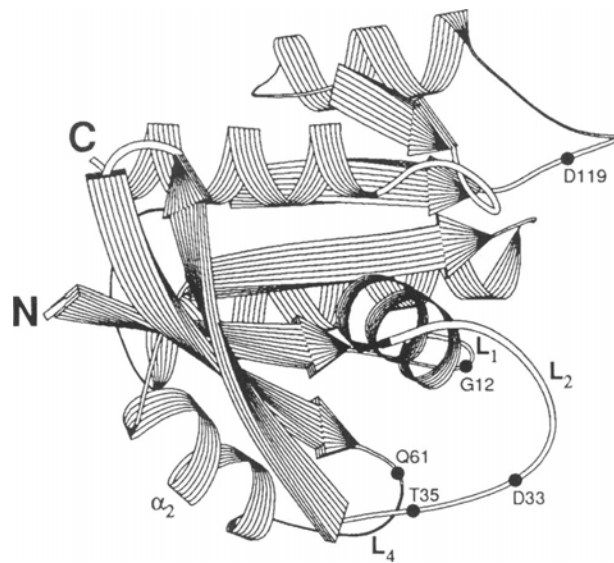


Εικόνα 25. Η ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων μεταξύ των Ras πρωτεϊνών από 0 έως 100% παριστάνεται με ένα χρωματικό διάγραμμα από κίτρινο σε πορτοκαλί έως κόκκινο αντίστοιχα.

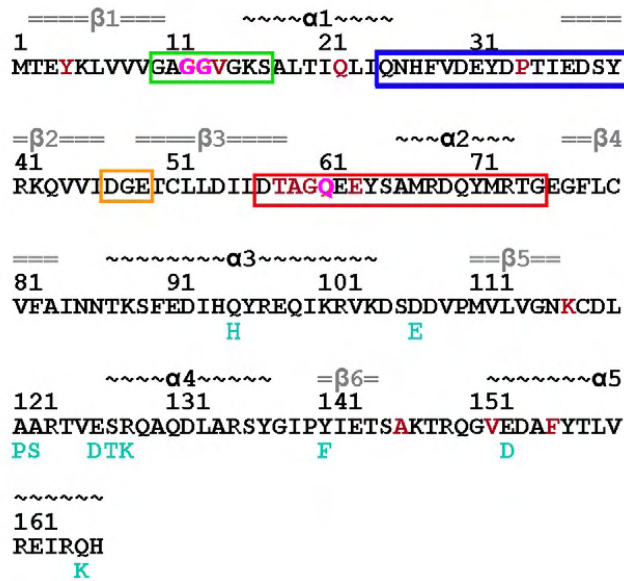
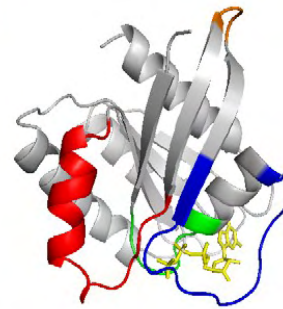
Αναγνωρίζονται επίσης τρία δομικά στοιχεία ιδιαίτερα σημαντικά για τη λειτουργία- διακόπτη (switch) των πρωτεϊνών RAS (Εικ. 26, 27) (320, 321).

- ✓ Ο βρόγχος L1 ή P: Τυλίγεται γύρω από τη β- και γ- φωσφορική ομάδα. Περιλαμβάνει τα αμινοξέα 10- 17, όπου περιέχεται η Gly12 που αποτελεί τη συχνότερη θέση σημειακής μετάλλαξης της πρωτεΐνης.
- ✓ Ο βρόγχος L2: ιδιαίτερα σημαντικός για τη βιολογική δραστηριότητα της πρωτεΐνης. Περιέχει τμήμα της περιοχή switch I (κατάλοιπα 25-40) που είναι βασική για την αλληλεπίδραση με τη GAP. Περιλαμβάνει επίσης ένα σημαντικό τμήμα της περιοχής τελεστή της ras, όπου τα σήματα παραλαμβάνονται και προωθούνται.

- ✓ Ο βρόγχος L4: επίσης συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με τη GAP. Αποτελεί τμήμα της περιοχής *switch II* (κατάλοιπα 57- 75 , περιοχή σύνδεσης των GEFs). Περιέχει επίσης την καλά συντηρημένη Glu61, που επίσης αποτελεί συχνή θέση σημειακής μετάλλαξης.



Εικόνα 26. Κρυσταλλική δομή της GTP-συνδεδεμένης RAS πρωτεΐνης. Παρουσιάζονται οι τρεις βρόγχοι L1, L2 και L4 που είναι σημαντικοί για την αλληλεπίδραση με τη GAP και για τη λειτουργία της πρώτης ως GTPάση (320)

A**B**

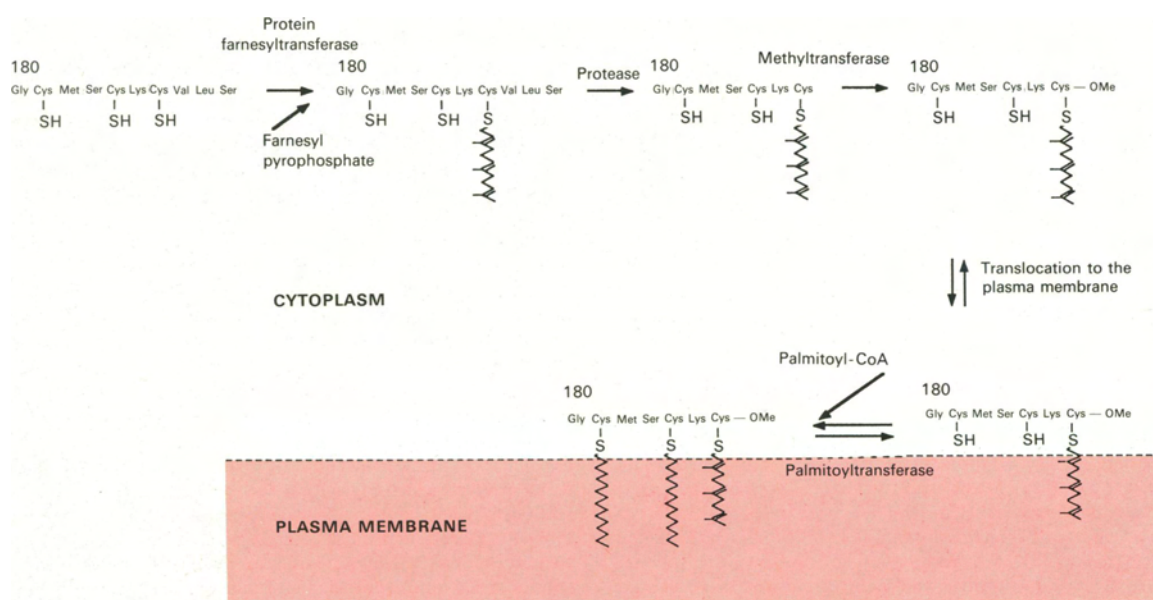
Εικόνα 27. (A) Παρουσιάζεται η αλληλουχία των αμινοξέων της καταλυτικής περιοχής των πρωτεϊνών H-ras και k-ras (τα διαφορετικά αμινοξέα σημαίνονται με γαλάζιο). Τα κατάλοιπα των αμινοξέων στις θέσεις 12, 13 και 61, των οποίων η αντικατάσταση έχει συσχετισθεί με μεγάλο αριθμό κακοηθειών, σημαίνονται με ροζ χρώμα. Άλλα κατάλοιπα αμινοξέων των οποίων οι μεταλλάξεις έχουν συσχετισθεί με όγκους ή άλλες νόσους σημαίνονται με καφέ χρώμα. **(B)** Ο βρόγχος P είναι σημειωμένος με πράσινο, η περιοχή switch I με μπλε και η περιοχή switch II με κόκκινο χρώμα (αντίστοιχα επισημάνθηκαν και οι σχετικές ακολουθίες)(321).

3.5 Υποκυτταρική εντόπιση και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών *ras*

Η *ras* πρωτεΐνη συντίθεται σε ελεύθερα ριβοσωμάτια του κυτταροπλάσματος, ως πρόδρομη μορφή προ-p21 και έχει χρόνο ημιζωής 24 ώρες τουλάχιστον (318).

Η πρόδρομη μορφή υπόκειται σε μια σειρά μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, που έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της υδροφοβικότητας της πρωτεΐνης και την πρόσδεσή της στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης. Οι τροποποιήσεις αυτές αφορούν αρχικά το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης CAAX και πυροδοτούνται από το κατάλοιπο κυστεΐνης στη θέση 186. Συγκεκριμένα, σε πρώτη φάση, πραγματοποιείται φαρνεσυλίωση της κυστεΐνης στη θέση 186, διάσπαση των τριών τελευταίων αμινοξέων (322) και μεθυλεστεροποίηση της καρβοξυλικής ομάδας της τελικής πια κυστεΐνης στη θέση 186. Οι αντιδράσεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός υδρόφοβου άκρου, ικανού να συνδεθεί με τη μεμβράνη.

Ωστόσο, για τη σταθερή σύνδεση με την πλασματική μεμβράνη απαιτείται και δεύτερη φάση τροποποιήσεων, η οποία δεν είναι κοινή για όλες τις RAS ισομορφές. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες *K-Ras4A*, *N-ras* και *H-ras* διαθέτουν στην HVR περιοχή ένα ή δύο κατάλοιπα κυστεΐνης (C¹⁸⁰ στην *k-Ras4A*, C¹⁸¹ στην *N-ras*, C¹⁸¹ και C¹⁸⁴ στην *H-ras*), τα οποία υφίστανται παλμιτοϋλίωση (Εικ. 28). Το προϊόν που προκύπτει αποκτά έντονη υδροφοβικότητα και ισχυρή δυνατότητα σύνδεσης με την πλασματική μεμβράνη (318).



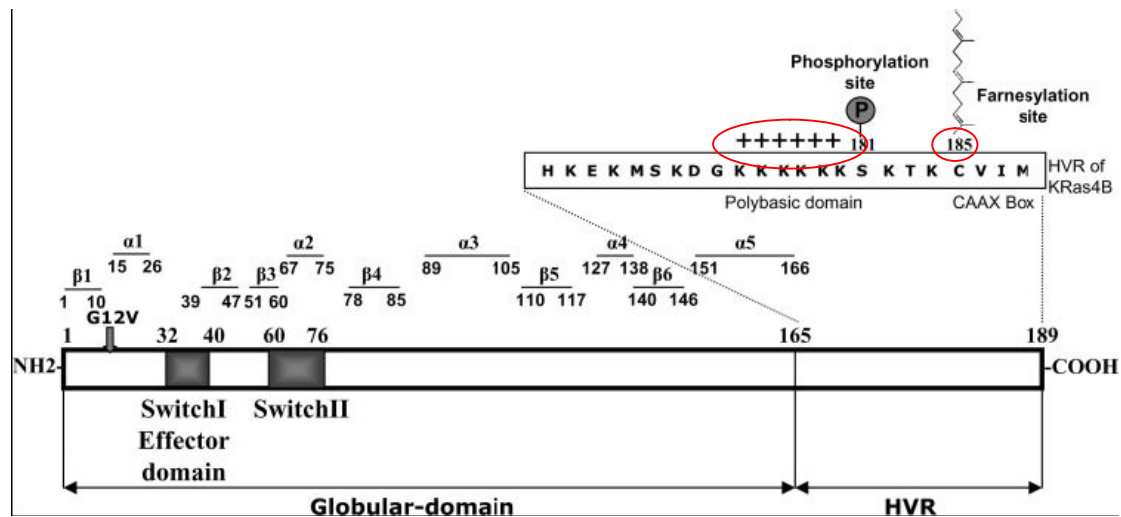
Εικόνα 28. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης *H-ras*: Σημειώνεται η αλληλουχία του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης και τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις (318).

Η παλμιτοϋλίωση των *N-ras* και *H-ras* πραγματοποιείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) και στη συσκευή Golgi, απ' όπου μεταφέρονται στη συνέχεια στην πλασματική μεμβράνη μέσω του κλασικού μονοπατιού εξωκυττάρωσης. Η παλμιτοϋλίωση είναι μια δυναμική διαδικασία (323), γεγονός που σημαίνει ότι οι παραπάνω πρωτεΐνες υφίστανται πολλαπλούς κύκλους παλμιτοϋλίωσης και από-παλμιτοϋλίωσης.

Συγκεκριμένα, στην κυτταρική μεμβράνη οι πρωτεΐνες *N-ras* και *H-ras* υφίστανται από-παλμιτοϋλίωση, έπειτα μεταφέρονται στο ΕΔ και στη συσκευή Golgi, όπου υπόκεινται ξανά σε παλμιτοϋλίωση και ακολουθεί η επιστροφή τους στην κυτταρική μεμβράνη. Προηγούμενες μελέτες υποστηρίζουν πως η παραπάνω ανακύκλωση είναι ταχύτερη στην πρωτεΐνη *N-ras* σε σχέση με την *H-ras*, πιθανότατα λόγω της μονήρους παλμιτοϋλίωσης που συμβαίνει στην πρώτη (324).

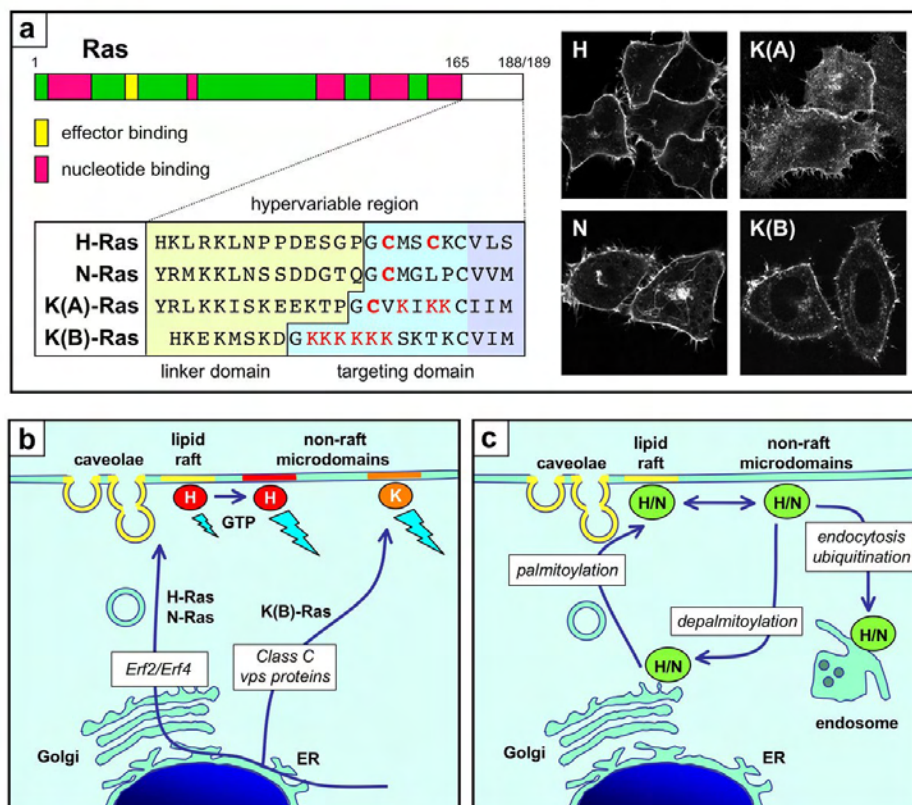
Η πρωτεΐνη *k-Ras4B* δε διαθέτει κατάλοιπα κυστεΐνης στην HVR περιοχή, ώστε να υποστούν παλμιτοϋλίωση. Ωστόσο, εμφανίζει εξίσου υψηλή συγγένεια πρόσδεσης με την πλασματική μεμβράνη. Αυτό επιτυγχάνεται χάρη σε μια

πολυβασική αλληλουχία από έξι κατάλοιπα λυσίνης (K¹⁷⁵- K¹⁸⁰) (318, 325), η οποία αντιδρά ηλεκτροστατικά με τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια της εσωτερικής στιβάδας της μεμβράνης (Εικ. 29). Μελέτες *in vitro* αναφέρουν την αύξηση της συγγένειας πρόσδεσης της πρωτεΐνης μετά την ενσωμάτωση στη μεμβράνη αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων (PS, PIPs) (326, 327). Η πλασματική μεμβράνη εξάλλου διαθέτει την υψηλότερη συγκέντρωση αρνητικά φορτισμένων λιπιδίων (327), γεγονός που επιτρέπει μια τέτοιου είδους σύνδεση.



Εικόνα 29. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του KRAS γονιδίου. Σημειώνεται η πολυβασική αλληλουχία της HVR περιοχής που υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, επιτρέποντας τη σύνδεση της πρωτεΐνης με την πλασματική μεμβράνη.

Ενώ οι πρωτεΐνες *N-ras* και *H-ras* ακολουθούν το κλασικό εκκριτικό μονοπάτι, η *K-Ras4B*, μεταφέρεται προς την κυτταρική επιφάνεια μέσω ενός μονοπατιού ανεξάρτητου από τη συσκευή Golgi (Εικ. 30) (328).

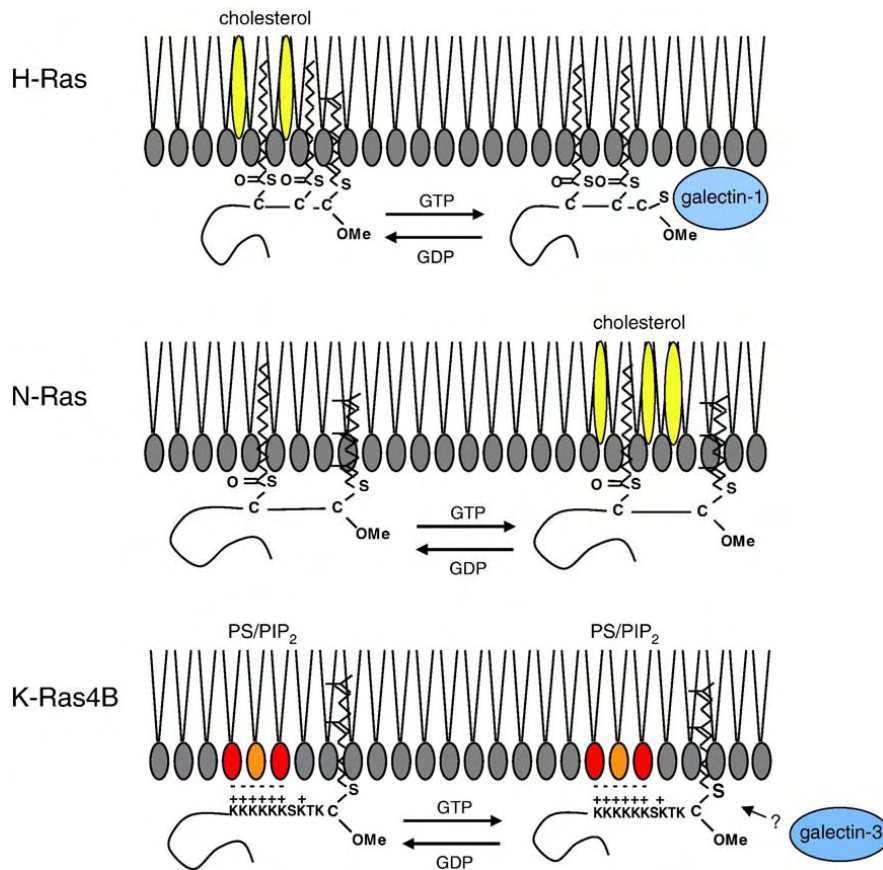


Εικόνα 30. Εντόπιση των πρωτεϊνών Ras, ανάλογα με την HVR περιοχή. **a.** Οι τέσσερις ισομορφές παρουσιάζουν ετερογένεια στην HVR περιοχή, εκτός από το καρβοξυτελικό άκρο CAAX. Με κόκκινο σημειώνονται τα αμινοξέα που υπόκεινται στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. **b.** Οι ισομορφές που υφίστανται παλμιτοϋλίωση, σε αντίθεση με την K(B)-Ras μεταφέρονται στην επιφάνεια μέσω της κλασικής εκκριτικής οδού. **c.** Ο συνεχής κύκλος παλμιτοϋλίωσης και από- παλμιτοϋλίωσης των H/NRas ρυθμίζει την εντόπισή τους, ενώ διαφορετικοί παράγοντες πυροδοτούν μηχανισμούς ενδοκυττάρωσης (328).

Μεταλλάξεις σε τέσσερα ή παραπάνω κατάλοιπα λυσίνης της πολυβασικής αλληλουχίας της *K-Ras4B* πρωτεΐνης, είτε στα κατάλοιπα κυστεΐνης που υφίστανται παλμιτοϋλίωση στις άλλες ισομορφές RAS, έχουν ως αποτέλεσμα την αδυναμία των παραπάνω πρωτεϊνών να συνδεθούν σταθερά με την πλασματική μεμβράνη (325).

Μετά την ολοκλήρωση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, ακολουθούν συγκεκριμένοι παράγοντες που προσδιορίζουν ακριβώς τη θέση τους στην πλασματική μεμβράνη. Οι κυριότεροι παράγοντες, από την πλευρά των *ras* πρωτεϊνών, είναι η περιοχή σύνδεσης (anchor) με λιπίδια, η παρακείμενη HVR περιοχή, η προσαρμοστικότητα της G περιοχής και το επίπεδο ενεργότητας της πρωτεΐνης, ενώ από την πλευρά της πλασματικής μεμβράνης, καθοριστικό ρόλο έχουν η συγκέντρωση φωσφολιπιδίων/χοληστερόλης, ο κυτταροσκελετός ακτίνης και η ενίσχυση με πρωτεΐνες κριώματος (scaffold), όπως η γαλεκτίνη-1 (galectin-1) (329). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ανενεργός μορφή της *H-ras* πρωτεΐνης εντοπίζεται

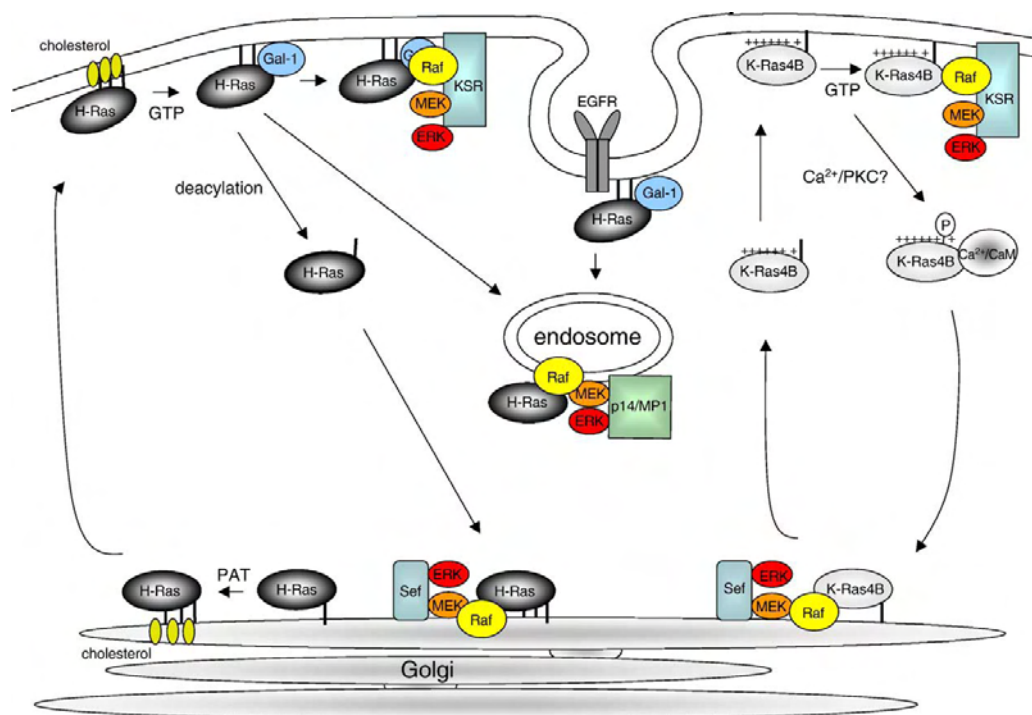
στις χοληστερινο-εξαρτώμενες περιοχές, ενώ όταν η πρωτεΐνη συνδέεται με GTP, η σύνδεση γίνεται σε διαφορετικά σημεία της μεμβράνης, με τη βοήθεια της γαλεκτίνης-1 (329). Αντίστροφα, η *N-ras* πρωτεΐνη στην ενεργό της μορφή εντοπίζεται στις χοληστερινο-εξαρτώμενες περιοχές. Η πρωτεΐνη *K-Ras4B* και στις δύο μορφές της εγκαθίσταται σε μη χοληστερινο-εξαρτώμενες περιοχές, πλούσιες σε αρνητικά φορτισμένα φωσfolιπίδια PS, PIP₂ (Εικ. 31).



Εικόνα 31. Η ακριβής εντόπιση των RAS ισομορφών στην πλασματική μεμβράνη καθορίζεται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών και της μεμβράνης (329).

Ο ρόλος των RAS πρωτεϊνών είναι στενά συνδεδεμένος με την εντόπιση τους στην κυτταρική μεμβράνη. Ωστόσο, υπάρχουν ενδοκυττάρια δεξαμενές *ras* πρωτεϊνών, οι οποίες ποικίλουν μεταξύ των ισομορφών και μεταξύ διαφορετικών ιστών. Τα τελευταία χρόνια έχουν μελετηθεί αρκετοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στη ρύθμιση της διαμερισματοποίησης των *ras* πρωτεϊνών και της σηματοδότησής τους από ενδοκυττάρια τμήματα (Εικ. 32). Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών *ras* στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης, έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγωγή σήματος μέσω του μονοπατιού Raf/MEK/ERK, με τη βοήθεια πρωτεϊνών όπως η KSR. Τα παραπάνω οδηγούν στη δημιουργία ενός άμεσου αλλά παροδικού σήματος.

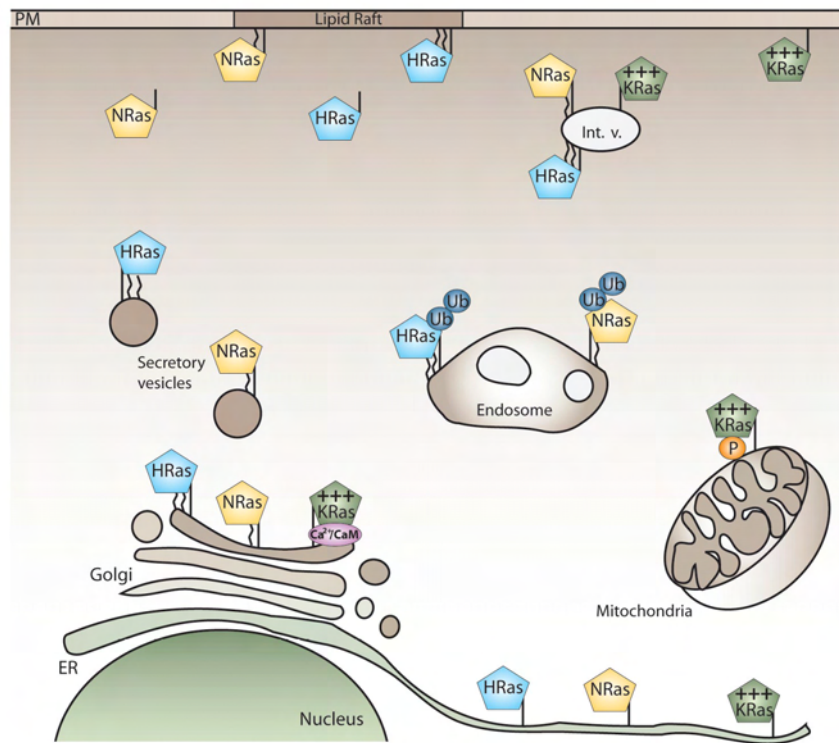
Όπως προαναφέρθηκε, η ενεργοποίηση των *N-ras* και *H-ras* πρωτεϊνών στην πλασματική μεμβράνη και η επακόλουθη από-παλμιτοϋλίωσή τους οδηγεί στη μεταφορά τους στη συσκευή Golgi. Εκεί, ενεργοποιούν το μονοπάτι Raf/MEK/ERK, με τη βοήθεια ειδικών για το Golgi πρωτεϊνών, όπως η πρωτεΐνη Sef. Η σηματοδότηση αυτή μέσω της συσκευής Golgi είναι λιγότερο άμεση από την αντίστοιχη της κυτταρικής μεμβράνης, διαρκεί όμως περισσότερο (324). Οι πρωτεΐνες *N-ras* και *H-ras* σηματοδοτούν μέσω RAF/MEK/ERK και στα ενδοσώματα, με τη βοήθεια της πρωτεΐνης p14/MP1 (330). Όσον αφορά στην πρωτεΐνη *K-Ras4B*, η μεταγωγή σήματος σε επίπεδο ενδομεμβρανών, ρυθμίζεται από διαφορετικούς μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, σε υψηλά επίπεδα Ca^{2+} η αλληλεπίδραση της *K-Ras4B* με την πρωτεΐνη καλμοντουλίνη (Calmodulin, CaM) οδηγεί στη μεταφορά της *K-Ras4B* σε ενδομεμβρανικά τμήματα, συμπεριλαμβανομένης και της συσκευής Golgi. Αντίστροφα, σε χαμηλά επίπεδα Ca^{2+} η πρωτεΐνη επιστρέφει στην κυτταρική μεμβράνη (Εικ. 32) (331, 332).



Εικόνα 32. Η δυναμική φύση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, ανάλογα και με το είδος της διέγερσης, επιτρέπει την ακριβή ρύθμιση της μεταγωγής σήματος σε επίπεδο κυτταρικής μεμβράνης ή ενδομεμβρανών (329).

Ένας εναλλακτικός μηχανισμός εμπλέκει την κινάση PKC, η οποία προκαλεί φωσφορυλίωση της σερίνης στη θέση 181 στην *K-Ras4B* ισομορφή, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση της πρωτεΐνης από την πλασματική μεμβράνη και τη

συγκέντρωση της σε ενδομεμβράνες, όπως το ΕΔ, η συσκευή Golgi και η εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Εικ. 33) (330, 333).



Εικόνα 33. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις καθορίζουν τη διαφορετική εντόπιση των ισομορφών *gas* στις διάφορες μεμβράνες. Με κάθετη γραμμή σημειώνεται η φαρνεσυλίωση, ενώ με κυματιστή η παλμιτοϋλίωση. Οι H-*ras* και N-*ras*, σε αντίθεση με την K-*ras* πρωτεΐνη, μετά από προσθήκη ουμπικουϊτίνης εντοπίζονται και στα πρώιμα ενδοσώματα. Η K-*ras* πρωτεΐνη παρουσιάζει διαφορετική εντόπιση, η οποία εξαρτάται από την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση της με τη μεμβράνη και ρυθμίζεται από το μηχανισμό $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ και την φωσφορυλίωση από την κινάση PKC (P) (Jura et al, 2006).

3.6 Βιοχημικές ιδιότητες της πρωτεΐνης *RAS* (p21)

Οι πρωτεΐνες *ras* έχουν δύο βασικές βιοχημικές ιδιότητες:

1. Πρόσδεση νουκλεοτιδίων γουανίνης (GTP/GDP): η πρόσδεση α - και β -φωσφορικής ομάδας γίνεται στα αμινοξέα 10-17, η πρόσδεση της γ -φωσφορικής ομάδας γίνεται στα αμινοξέα 57-60 (όταν προσδένεται GTP), ενώ η θέση πρόσδεσης του δακτυλίου της γουανίνης εντοπίζεται στα αμινοξέα 116-119 (334).
2. Υδρόλυση του GTP: η ενεργότητα της πρωτεΐνης ως GTPάση εδράζεται στα πρώτα 164 αμινοξέα. Κατά την υδρόλυση του GTP στο ενεργό σύμπλοκο της *ras*, ένα μόριο H_2O πλησιάζει τη γ -φωσφορική ομάδα. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη υπόκειται σε μεταβολή της στερεοδιάταξής της, κυρίως στις περιοχές *switch I* και *II* (βρόγχοι L2, L4) και το μόριο νερού συνδέεται με δεσμούς H- με τη

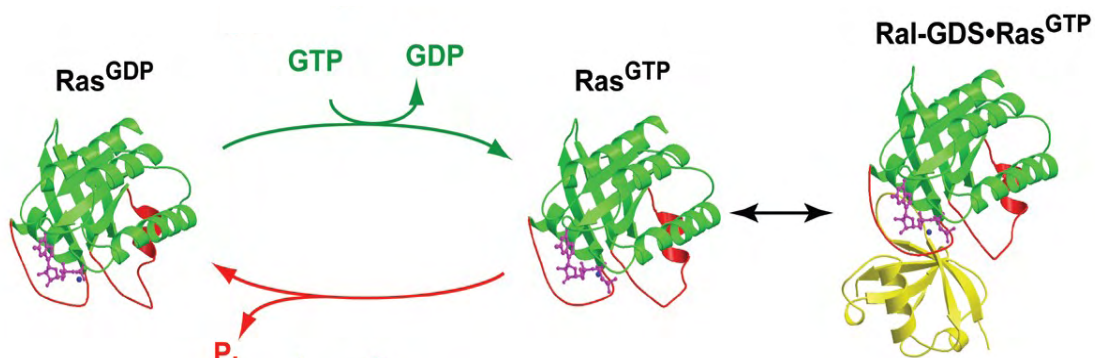
γλυκίνη στη θέση 61 και τη θρεονίνη στη θέση 35, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της GDP-p21, την απενεργοποίηση δηλαδή της πρωτεΐνης (318).

Η ρύθμιση του κύκλου GTP/GDP στις πρωτεΐνες *ras* πραγματοποιείται από τρία κυρίως μόρια (Εικ. 34), (314):

GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors): παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης, οι οποίοι διευκολύνουν την απομάκρυνση του GDP και τη δέσμευση του GTP από την *ras*.

GAPs (GTPase Activating Proteins): πρωτεΐνες ενεργοποίησης της GTPάσης, οι οποίες αυξάνουν το ρυθμό υδρόλυσης του GTP.

GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors): παράγοντες που εμποδίζουν τη δέσμευση του GTP, με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να παραμένει στην ανενεργή μορφή.



Εικόνα 34. Ρύθμιση του κύκλου GDP/GTP της πρωτεΐνης *ras* (314). Οι διαφορές στη δομή μεταξύ των δύο μορφών της *ras* (πράσινο) εντοπίζονται σε δύο βασικές περιοχές (κόκκινο) της πρωτεΐνης, την switch I & II. Η ενεργός κατάσταση της *ras* εμφανίζει υψηλή συγγένεια σύνδεσης με τους ενδιάμεσους τελεστές της πρωτεΐνης.

3.7 Έκφραση της πρωτεΐνης RAS (p21)

Τα γονίδια της οικογένειας *ras* εκφράζονται ποικιλοτρόπως στους περισσότερους ιστούς τρωκτικών και ανθρώπων (335- 337).

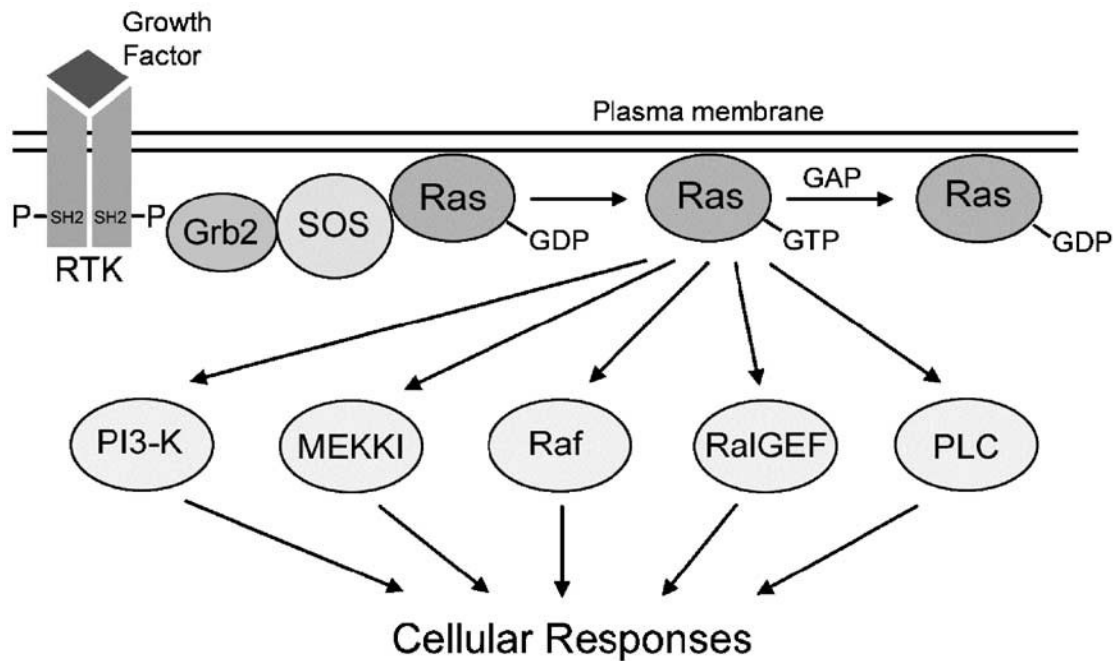
Ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε ανθρώπινους ιστούς έδειξαν σημαντικού βαθμού ετερογένεια όσον αφορά στην έκφραση των πρωτεϊνών *ras* στους διάφορους ιστούς (336). Ανάλογες μελέτες σε επίπεδο mRNA μορίων, σε ιστούς ποντικών, έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης της H-Ras ήταν αρκετά υψηλότερα στον εγκεφαλικό, στο μυϊκό ιστό και στο δέρμα, ενώ ήταν χαμηλά στο ήπαρ. Η έκφραση της K-Ras ήταν υψηλή στον πεπτικό σωλήνα, στους πνεύμονες και το θύμο αδέν, ενώ ήταν σπάνια

στο δέρμα και τους σκελετικούς μύες. Όσον αφορά στα επίπεδα έκφρασης της N-Ras πρωτεΐνης ήταν υψηλότερα στους όρχεις και το θύμο αδένι (337).

Διαφορετική έκφραση των πρωτεϊνών *ras* έχει επίσης παρατηρηθεί κατά την εμβρυογένεση ποντικών. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι η έκφραση της N-Ras ήταν μέγιστη τη 10^η μέρα της κυοφορίας, ενώ η έκφραση της K-Ra πρωτεΐνης ήταν στα χαμηλότερα επίπεδα προς το τέλος αυτής (337, 338). Η παρουσία της *K-Ras(B)* αποδείχθηκε απαραίτητη για τη φυσιολογική εμβρυογένεση και ανάπτυξη σε μελέτες με τρωκτικά (339, 340), όπως επίσης και για τη σωστή λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος (341).

3.8 Ενεργοποίηση των πρωτεϊνών *Ras*

Φυσιολογικά, σε συνθήκες κυτταρικής ηρεμίας οι πρωτεΐνες *RAS* βρίσκονται στην ανενεργό τους μορφή. Όταν επιδράσει κάποιο εξωκυττάριο ερέθισμα, όπως αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες, κυτοκίνες, νευροδιαβιβαστές, ξεκινά ένας πολύπλοκος μηχανισμός ενεργοποίησης της *RAS* πρωτεΐνης με σκοπό τη μετάδοση της πληροφορίας. Ένα από τα καλύτερα μελετημένα μονοπάτια μεταγωγής σήματος είναι εκείνο που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ενός υποδοχέα κινάσης τυροσίνης, όπως ο EGFR. Ειδικότερα, η σύνδεση του προσδέτη EGF στον υποδοχέα EGFR επάγει το σχηματισμό ομο- ή ετεροδιμερών και ενεργοποιεί τη δραστηριότητα της κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα. Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα σε συγκεκριμένα κατάλοιπα τυροσίνης στο ενδοκυττάριο τμήμα του. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα, οδηγεί στη σύνδεσή του με μια πρωτεΐνη-προσαρμογέα, τη Grb2 (growth factor receptor-binding protein 2) η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη με την πρωτεΐνη Sos. Η τελευταία είναι μια πλούσια σε προλίνη πρωτεΐνη που δρα ως μόριο GEF για τη Ras πρωτεΐνη. Η μεταφορά της πρωτεΐνης Sos στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης και η αλληλεπίδρασή της με το σύμπλοκο Ras*GDP, έχει ως αποτέλεσμα την ανάλογη μετατροπή των περιοχών Switch I και II και τη σύνδεση της Ras με το GTP, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης. Η ενδοκυττάρια εντόπιση της Sos αποτελεί θέση-κλειδί για την περαιτέρω ενεργοποίηση της *RAS* πρωτεΐνης (342). Μόλις ολοκληρωθεί η μετάδοση της πληροφορίας, το GTP υδρολύεται σε GDP, μέσω των πρωτεϊνών GAP, με τελικό αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της *RAS* πρωτεΐνης (Εικ. 35).



Εικόνα 35. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού ενεργοποίησης και σηματοδότησης της πρωτεΐνης Ras. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (receptor tyrosine kinase, RTK) από τον κατάλληλο αυξητικό παράγοντα οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωση των SH2 ενδοκυττάρων περιοχών του υποδοχέα και τη σύνδεσή του με την πρωτεΐνη Grb2. Η τελευταία είναι συνδεδεμένη με ένα μόριο GEF, τη SOS, η οποία καταλύει την αντικατάσταση του GDP από το GTP και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη. Μετά τη σηματοδότηση της Ras και τη μετάδοση της πληροφορίας προς το εσωτερικό του κυττάρου, η Ras επανέρχεται στην ανενεργό της μορφή, μέσω των μορίων GAP (342).

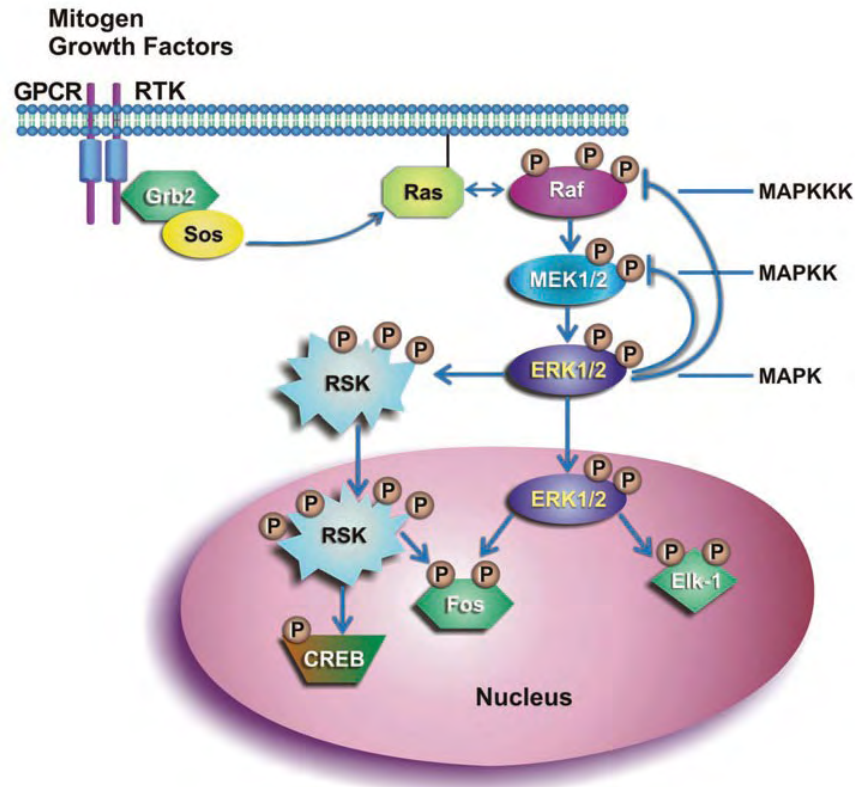
3.9 Μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που ενεργοποιούνται από τις RAS πρωτεΐνες

Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης *Ras* συντελεί στη ρύθμιση σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως ο μεταβολισμός, η μεταγραφή, ο κυτταρικός κύκλος, η διαφοροποίηση, η επιβίωση, η απόπτωση κι αυτό επιτυγχάνεται μέσω διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία μετέχει. Τα κυριότερα από αυτά τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος είναι τα ακόλουθα:

➤ Μονοπάτι μεταγωγής σήματος RAF/MEK/ERK (μονοπάτι MAPK)

Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης *Ras* έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της κυτταροπλασματικής, ανενεργού *Raf* κινάσης προς την πλασματική μεμβράνη, όπου και ενεργοποιείται. Η ενεργός *Raf* κινάση ενεργοποιεί με τη σειρά της δύο MAPK κινάσες, τις MEK 1/2. Οι MAPK κινάσες φωσφορυλιώνοντας κατάλοιπα θρεονίνης και τυροσίνης ενεργοποιούν δύο MAP κινάσες, τις ERK 1/2. Οι τελευταίες, αφού ενεργοποιηθούν, μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζουν με φωσφορυλίωση

τη δραστηριότητα μιας πληθώρας μεταγραφικών παραγόντων (Εικ. 36) (343). Αυτοί με τη σειρά τους προσδένονται σε ειδικές αλληλουχίες υποκινητών, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση γονιδίων και τη ρύθμιση σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως η διαφοροποίηση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός.



Εικόνα 36. Μηχανισμός ενεργοποίησης του RAF/MEK/ERK μονοπατιού.

➤ Μονοπάτι μεταγωγής σήματος RalGDS

Οι πρωτεΐνες *Ral A* και *B* ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των μικρών GTPασών, στην ίδια οικογένεια με τις *Ras p21* πρωτεΐνες, με τις οποίες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία, περίπου 58% (344). Όπως όλες οι GTPάσες, εναλλάσσονται μεταξύ ενός ενεργού συμπλέγματος GTP και ενός ανενεργού συμπλέγματος GDP. Αντίστοιχα με τις πρωτεΐνες *Ras*, η εναλλαγή αυτή ρυθμίζεται από παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEFs) και από μόρια που αυξάνουν το ρυθμό υδρόλυσης του GTP (GAPs).

Οι πρωτεΐνες *Ral* άρχισαν να αποτελούν αντικείμενο μελέτης, όταν διαπιστώθηκε ότι μεσολαβούν στα σηματοδοτικά μονοπάτια των *Ras* πρωτεϊνών. Η διαπίστωση αυτή βασίστηκε στην ανακάλυψη ότι οι *Ras* πρωτεΐνες έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύουν και να ενεργοποιούν μόρια της οικογένειας των Ral-GEFs: Ral-GDS (GDP dissociation stimulator), Rgl1, Rgl2, και Rlf (344, 345).

Συγκεκριμένα, το ενεργό σύμπλοκο GTP-Ras συνδέεται με τη Ral-GDS, με κατεύθυνση την κυτταρική μεμβράνη (346). Η ενεργότητα της Ral-GDS ως μόριο GEF, ενισχύεται μέσω ενεργοποίησης της PI3K πρωτεΐνης κατά την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Ras/PI3K/PDK1 (347). Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι υπάρχουν μηχανισμοί ενεργοποίησης της Ral-GDS, ανεξάρτητοι από την Ras πρωτεΐνη (348- 350). Αντίθετα, η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), δρα ως αρνητικός ρυθμιστής, καθώς φωσφορυλιώνοντας τη Ral-GDS, αναστέλλει τη σύνδεσή της με την πρωτεΐνη Ras.

Η Ral-GDS λειτουργεί με σκοπό την ενεργοποίηση των RalA και RalB, δύο Ral πρωτεϊνών με 85% ομολογία (351). Κύριοι τελεστές των ενεργών Ral πρωτεϊνών είναι η πρωτεΐνη RalBP1, η οποία δρα ως μόριο GAP για τις πρωτεΐνες Rac και Cdc42, η πρωτεΐνη φιλαμίνη και το πρωτεϊνικό σύμπλοκο *exocyst*, ενώ βρίσκονται σε συνεχή σύνδεση με το ένζυμο φωσφολιπάση D1 (PLD1). Μέσω των παραπάνω μορίων, οι ενεργείς πρωτεΐνες Ral μετέχουν στους μηχανισμούς της ενδοκυττάρωσης και στη διαμόρφωση της μορφολογίας του κυττάρου. Επιπλέον, το σηματοδοτικό μονοπάτι της Ral εμπλέκεται στη γονιδιακή έκφραση και στην ενεργότητα παραγόντων, όπως της κινάσης (Janus kinase, JNK), του μεταγραφικού παράγοντα Stat3 και του πυρηνικού παράγοντα NF-κB (347, 352). Επιπλέον, οι πρωτεΐνες Ral συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως επίσης και στη διαδικασία της καρκινογένεσης (353- 356).

➤ Μονοπάτι μεταγωγής σήματος PI3K

Οι πρωτεΐνες PI3K ανήκουν σε μια οικογένεια ενζύμων που φωσφορυλιώνουν τη θέση D3 του δακτυλίου ινσοιτόλης των μεμβρανικών φωσφορυλιωμένων ινσοιτολικών λιπιδίων (PI). Με βάση τη δομή, τη ρύθμιση και την εξειδίκευση του υποστρώματός τους, διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, από τις οποίες μόνο η κατηγορία I έχει τη δυνατότητα να παράγει *in vivo* τα δύο λιπίδια PI(3,4)P₂ και PI(3,4,5)P₃ (357).

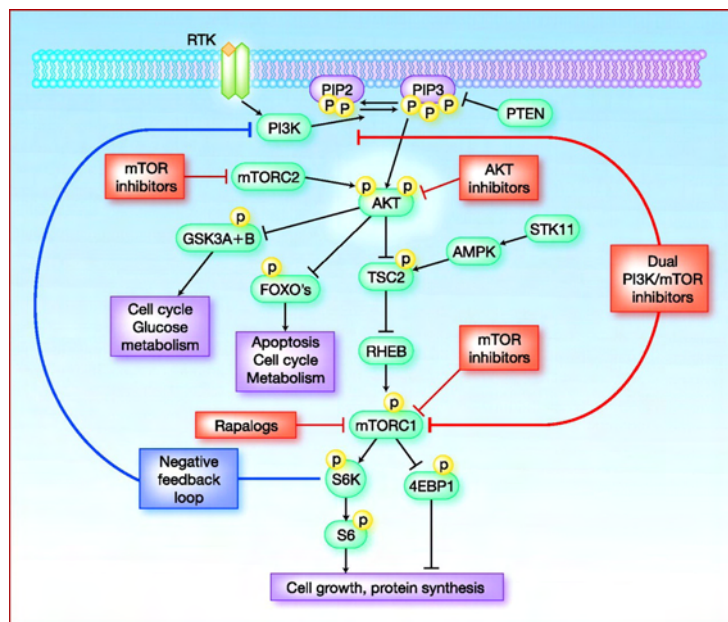
Τα μόρια PIP₂ και PIP₃ βρίσκονται φυσιολογικά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σε κυτταρική ηρεμία κι έχουν ως ρόλο τη μετάδοση ενδοκυττάρων σημάτων που ρυθμίζουν την επιβίωση, τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (358).

Οι πρωτεΐνες PI3K της κατηγορίας I είναι ετεροδιμερή ένζυμα, αποτελούμενα από μια καταλυτική υπομονάδα μοριακού βάρους 110kDa (p110α, p110β, p110γ και p110δ) και μια ρυθμιστική υπομονάδα. Η κατηγορία I υποδιαιρείται σε δύο υποκατηγορίες, τις IA και IB. Στην υποκατηγορία IA οι καταλυτικές υπομονάδες p110α, p110β και p110δ, συνδέονται με μια από τις ακόλουθες ρυθμιστικές υπομονάδες: p85α, p85β, p85γ, p50α και p55α. Η καταλυτική υπομονάδα p110γ

αποτελεί το μοναδικό μέλος της υποκατηγορίας IB και διαθέτει διαφορετική ρυθμιστική υπομονάδα την p87 ή την p101 (359).

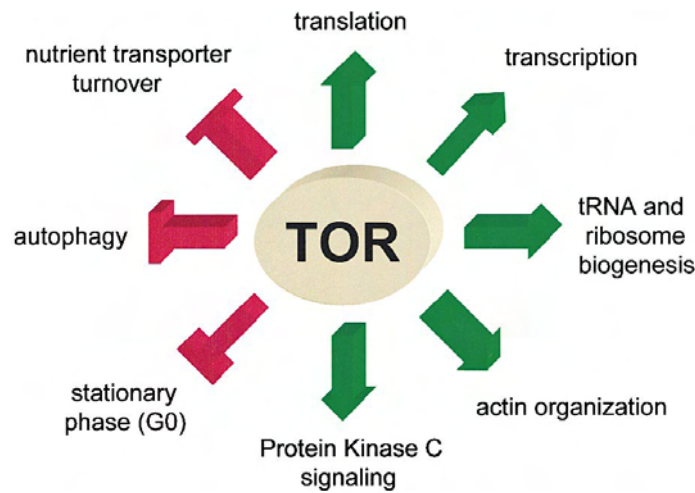
Η καταλυτική υπομονάδα p110 διαθέτει μια ειδική περιοχή αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη *Ras*, η οποία βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 133- 314 (360). Η ενεργός μορφή της *Ras* πρωτεΐνης (*Ras**GTP) συνδέεται με την κινάση *PI3K* στην παραπάνω θέση, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση της ενεργότητας της *PI3K* και την επακόλουθη αύξηση της συγκέντρωσης 3'-φωσφορυλιωμένων ινοσιτολικών λιπιδίων, *PIP*₂ και *PIP*₃. Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της GTPάσης *Rac*, η οποία με τη σειρά της εμπλέκεται στην αναδιοργάνωση των νηματιών ακτίνης και τη διαμόρφωση του κυτταροσκελετού (361).

Η πρωτεΐνη *PI3K* συμμετέχει στη ρύθμιση κι άλλων λειτουργιών του κυττάρου, όπως ο μεταβολισμός της γλυκόζης, η αναστολή απόπτωσης και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός (Εικ. 37), (362). Ένας από τους πιο καλά μελετημένους τελεστές της κινάσης *PI3K* είναι η πρωτεϊνική κινάση Β (PKB). Οι στόχοι της περιλαμβάνουν παράγοντες που υπεισέρχονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης, όπως η συνθετάση *GSK3*, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω των *GSK-3β/Cyclin D1*, (363) στην κυτταρική επιβίωση με τη συμμετοχή των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών *BAD* και μελών της οικογένειας *FOXO* (363, 364).



Εικόνα 37. Αναπαράσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού της *PI3K* κινάσης.

Η πρωτεϊνική κινάση Β, μέσω της κινάσης *mTOR*, μετέχει μεταξύ άλλων στη ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης και της πρωτεϊνοσύνθεσης (Εικ. 38) (365).



Εικόνα 38. Η πρωτεΐνη TOR ρυθμίζει σημαντικά και ποικίλα μονοπάτια που αφορούν την ανάπτυξη. Τα πράσινα βέλη αναπαριστούν σήματα ενεργοποίησης, ενώ τα κόκκινα αντιστοιχούν σε ανασταλτικά σήματα.

Ο προσδιορισμός των πολλαπλών σημάτων ενεργοποίησης της *Ras* πρωτεΐνης και των διαφόρων τελεστών υπογραμμίζει την πολυπλοκότητα μεταγωγής σημάτων μέσω της πρωτεΐνης *Ras*. Η διαβίβαση μέσω *Ras* δεν μπορεί να θεωρηθεί ως γραμμική κατεύθυνση των σημάτων από την κυτταρική μεμβράνη προς τον πυρήνα. Η *Ras* πρωτεΐνη βρίσκεται στο κέντρο ενός δικτύου διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών και λειτουργεί ως κεντρικός σταθμός-διακόπτης, όπου τα διάφορα σήματα καταχωρούνται, ενσωματώνονται και προωθούνται.

Παρόλο που έχουν μελετηθεί εκτενώς αρκετοί μηχανισμοί και παράγοντες που συμμετέχουν στα εμπλεκόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια της πρωτεΐνης *Ras*, παραμένουν αρκετοί προβληματισμοί και ερωτήματα. Είναι ακόμα υπό συζήτηση, αν οι τέσσερις ομόλογες *Ras* πρωτεΐνες, ασκούν διαφορετική μεταξύ τους βιολογική δράση (366) ή συμμετέχουν σε ξεχωριστά σηματοδοτικά μονοπάτια.

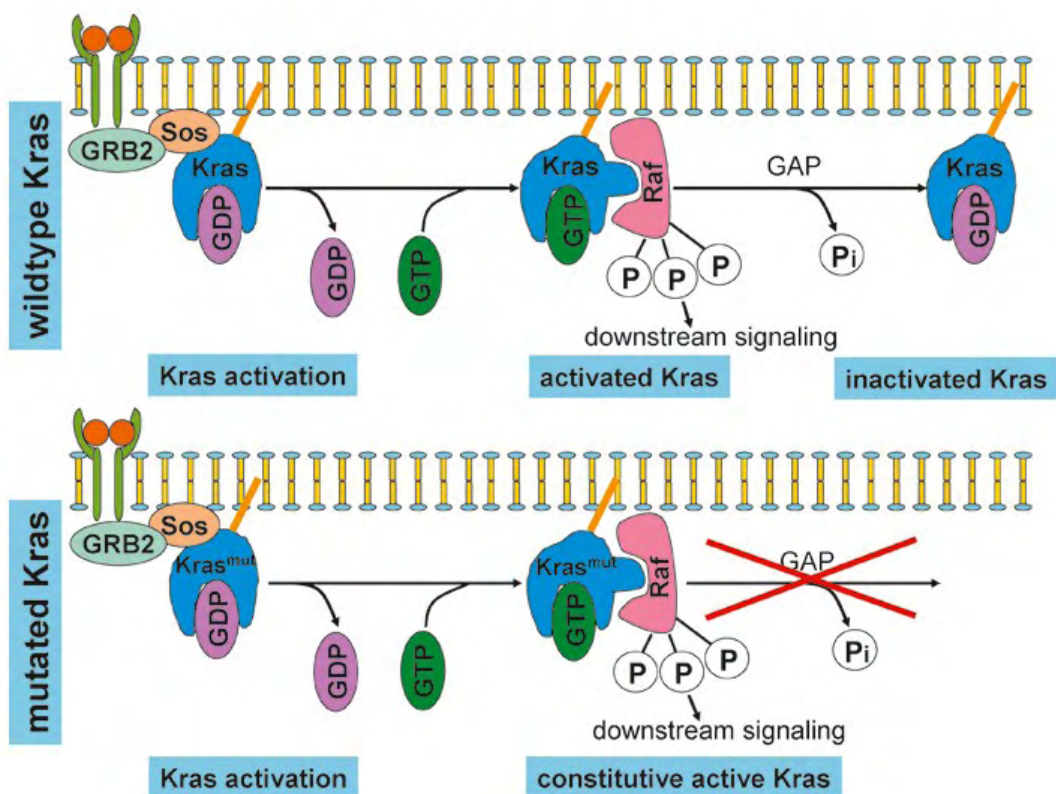
Η K-*Ras* πρωτεΐνη βρέθηκε να είναι ο δραστικότερος ενεργοποιητής της κινάσης Raf-1 (366, 367), ενώ η πρωτεΐνη H-*Ras* για την κινάση PI3K αντίστοιχα (367). Επίσης, διαπιστώθηκε *in vivo* ότι ένας παράγοντας GEF, ο Ras-GRF, ενεργοποιεί εκλεκτικά την πρωτεΐνη H-*Ras* κι όχι τις N-*Ras* και K-*Ras4B*, γεγονός που πιθανά αποδίδεται στη διαφορετική αλληλουχία της HVR περιοχής (368).

3.10 K-*Ras* και καρκίνος

Οι Jennifer Harvey (369) και Werner Kirsten (370) είναι οι πρώτοι που ανακάλυψαν τις ογκογόνες ιδιότητες των RAS γονιδίων, μελετώντας ρετροϊούς

που είχαν τη δυνατότητα να προκαλούν σάρκωμα σε αρουραίους (**Rat Sarcoma, RAS**).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η ενεργοποίηση των Ras είναι παροδική και το μεγαλύτερο ποσοστό τους βρίσκεται στην ανενεργό μορφή, κατάσταση που διαταράσσεται σε περίπτωση γενετικής βλάβης. Υπερέκφραση ή μεταλλάξεις των RAS γονιδίων συνεπάγονται υπερβολική παραγωγή της πρωτεΐνης p21^{ras} ή δομικές αλλοιώσεις που σταθεροποιούν την ενεργό μορφή της πρωτεΐνης (Εικ. 39). Δεδομένου ότι η Ras πρωτεΐνη διαδραματίζει βασικό ρόλο στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση, θεμελιώδεις βιολογικές διεργασίες του κυττάρου, όπως η επιβίωση, η διαφοροποίηση κι ο πολλαπλασιασμός, διαταράσσονται στις παραπάνω περιπτώσεις.



Εικόνα 39. Ενεργοποίηση της K-ras πρωτεΐνης. Μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα RTK, ακολουθεί ο σχηματισμός συμπλόκου με τις πρωτεΐνες Sos, GRB2 και K-ras και η ενεργοποίηση της τελευταίας. Μετά το τέλος της σηματοδότησης, η υδρόλυση του GTP επαναφέρει την πρωτεΐνη Ras στην ανενεργή της μορφή με τη μεσολάβηση των μορίων GAP. Η μεταλλαγμένη μορφή της Ras καθιστά αδύνατη την παραπάνω αντίδραση, οδηγώντας σε συνεχή σηματοδότηση (371).

Στον άνθρωπο, μεταλλάξεις στα ογκογονίδια *ras* ανευρίσκονται στο 30% περίπου του συνόλου των κακοηθειών (372). Συχνότερα αφορούν στο *KRAS* γονίδιο

και παρατηρούνται σε ένα ευρύ φάσμα διαφόρων τύπων καρκίνου (Πίνακας 13), (342).

Τύπος καρκίνου	Συχνότητα μεταλλάξεων (%)
Καρκίνωμα παγκρέατος	72-90
Καρκίνωμα παχέος εντέρου	32-57
Καρκίνωμα πνεύμονα	15-50
Καρκίνωμα ενδομητρίου	5-50
Καρκίνωμα χοληδόχου κύστης	14-38
Πολλαπλό μύελωμα	16-33
Καρκίνωμα όρχεως	9-12

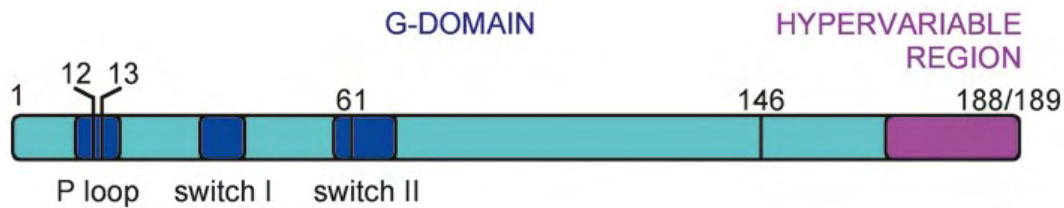
Πίνακας 13. Συχνότητα μεταλλάξεων του KRAS γονιδίου σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου.

Στις περιπτώσεις αδενοκαρκινώματος παγκρέατος, μεταλλάξεις στο *KRAS* γονίδιο εμφανίζονται εξαιρετικά συχνά, (373- 375), όπως επίσης συχνές είναι και στα αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου (206, 376, 377). Αντίθετα, υπάρχουν κακοήθειες όπου εμφανίζονται μεταλλάξεις συχνότερα στα άλλα *RAS* ογκογονίδια. Για παράδειγμα, στο πρωτοπαθές μελάνωμα είναι συχνές οι μεταλλάξεις στο *NRAS*, ενώ μεταλλάξεις στο *KRAS* γονίδιο είναι πολύ σπάνιες (378, 379).

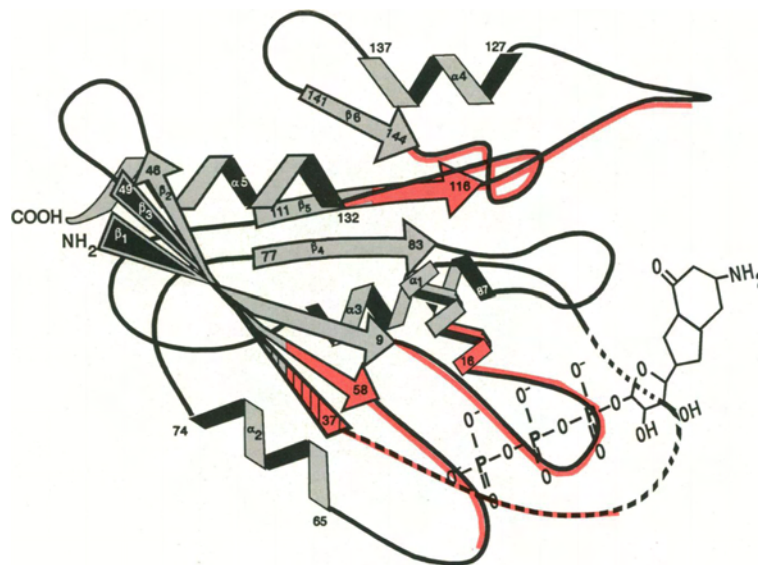
Σε αιματολογικές κακοήθειες, όπως σε ασθενείς με οξεία λευχαιμία, παρατηρούνται ως επί το πλείστον μεταλλάξεις στο *NRAS* γονίδιο (380). Το διαφορετικό φάσμα μεταλλάξεων των *RAS* γονιδίων, που παρατηρείται στους διάφορους όγκους, πιθανότατα αντανακλά τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασής τους στους διάφορους ιστούς και τους ξεχωριστούς ρόλους που διαδραματίζουν στην επιβίωση και την ανάπτυξη των κυττάρων.

Όσον αφορά το *KRAS* γονίδιο, η ογκογόνος δράση του μελετάται εκτεταμένα, περισσότερο από τρεις δεκαετίες (381- 385) και είναι πλέον γνωστό ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην ανάπτυξη όσο και στη διατήρηση του φαινοτύπου κακοήθειας (342).

Πρόκειται κυρίως για σημειακές “ενεργοποιητικές” μεταλλάξεις, οι οποίες εμφανίζονται κυρίως στα κωδικόνια 12, 13 και σπανιότερα στο κωδικόνιο 61 (Εικ. 40). Τα αμινοξέα που κωδικοποιούνται από τα κωδικόνια 12, 13 βρίσκονται στο βρόγχο P, στην περιοχή σύνδεσης του GTP, ενώ το αμινοξύ που κωδικοποιείται από το κωδικόνιο 61 εδράζεται στην περιοχή Switch II, περιοχή αλληλεπίδρασης με μόρια GEF. Μεταλλάξεις στα παραπάνω κωδικόνια, έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης, την αναστολή υδρόλυσης του GTP σε GDP και τη διατήρηση της πρωτεΐνης σε ενεργό μορφή (Εικ. 41).



Εικόνα 40. Δομή Kras γονιδίου. Στον άνθρωπο οι συχνότερες μεταλλάξεις αφορούν τα κωδικόνια 12, 13 και 61. (371)



Εικόνα 41. Σχεδιάγραμμα τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης gas παρουσία GTP (318) Σημειώνονται με κόκκινο οι περιοχές της πρωτεΐνης που συμμετέχουν στη σύνδεση με το GTP.

Εκτός από τις παραπάνω σημειακές μεταλλάξεις, η *K-Ras* πρωτεΐνη συμμετέχει στη διαδικασία της καρκινογένεσης μέσω άλλων μηχανισμών, όπως η ενίσχυση ή η υπερέκφραση του *KRAS* γονιδίου (386- 388). Αυτό μπορεί να συμβεί είτε μέσω γονιδιακής επέκτασης και δημιουργίας πολλών γονιδιακών αντιγράφων, είτε μέσω απορρύθμισης του μηχανισμού μεταγραφής. Το τελικό αποτέλεσμα σε κάθε περίπτωση είναι η απρόσφορη παραγωγή δομικά φυσιολογικής πρωτεΐνης gas.

3.11 *K-Ras* και καρκίνος παχέος εντέρου

Η δεύτερη υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων του *KRAS* γονιδίου παρατηρείται στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου (342). Μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο *KRAS* έχουν ανιχνευθεί στο 10-15% των αδενωμάτων μέγιστης διαμέτρου < 1 εκ. και σε πολύ υψηλότερο ποσοστό, 30- 60%, στα αδενώματα

μεγίστης διαμέτρου > 1 εκ. όπως επίσης και στα διηθητικά καρκινώματα του παχέος εντέρου (23, 377, 380). Το γεγονός αυτό δικαιολογεί τη διατύπωση της υπόθεσης ότι με βάση την αλληλουχία «αδενώματος- καρκινώματος» του παχέος εντέρου, οι μεταλλάξεις του *KRAS* λαμβάνουν χώρα σε πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης.

Στον ορθοκολικό καρκίνο, οι μεταλλάξεις του *KRAS* αφορούν ως επί το πλείστον σημειακές μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13 σε ποσοστό >90% (22, 204). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και σπανιότερες μεταλλάξεις σε άλλα κωδικόνια, όπως στα κωδικόνια 61 και 146 (389).

Έχουν ανιχνευθεί διάφορες μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 που αφορούν σε αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου στην πρώτη ή στη δεύτερη θέση του κωδικονίου, καθώς οποιαδήποτε αλλαγή του νουκλεοτιδίου της τρίτης θέσης οδηγεί σε συνώνυμο αμινοξύ. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούνται οι νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις G σε A (G>A) στην πρώτη (γλυκίνη> σερίνη, Gly> Ser) ή τη δεύτερη θέση (γλυκίνη> ασπαρτικό, Gly> Asp), μετάθεση νουκλεοτιδίων G>T στην πρώτη (γλυκίνη> κυστεΐνη, Gly> Cys) ή τη δεύτερη βάση (γλυκίνη> βαλίνη, Gly> Val) και μετάθεση νουκλεοτιδίων G>C στην πρώτη (γλυκίνη> αργινίνη, Gly> Arg) ή τη δεύτερη βάση (γλυκίνη> αλανίνη, Gly> Ala). Συχνότερες είναι οι μεταλλάξεις που οδηγούν στην αντικατάσταση του αμινοξέος της γλυκίνης σε ασπαρτικό p.G12D (c.35G>A) και βαλίνη p.G12V (c.35G>T). Όσον αφορά στο κωδικόνιο 13, η συχνότερη μετάλλαξη που παρατηρείται είναι η αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου p.Gly13Asp (c.38G>A) που οδηγεί στην αντικατάσταση της γλυκίνης από το ασπαρτικό (Gly>Asp) (203, 390).

Πολυάριθμες μελέτες, με κυριότερες τις πολυκεντρικές μελέτες RASCAL I και II (202, 203), έδειξαν ότι συγκεκριμένοι τύποι μεταλλάξεων του *KRAS* γονιδίου σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο. Έχει επίσης αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι οι εν λόγω μεταλλάξεις, στο σύνολο τους, δε σχετίζονται με αυξημένη θνητότητα από τη νόσο. Ωστόσο, μελέτη των Samowitz και των συνεργατών του έδειξε ότι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 13 σχετιζόταν με αύξηση κατά 40% της πιθανότητας θνητότητας από τη νόσο (204).

4. Ογκογονίδια RAF

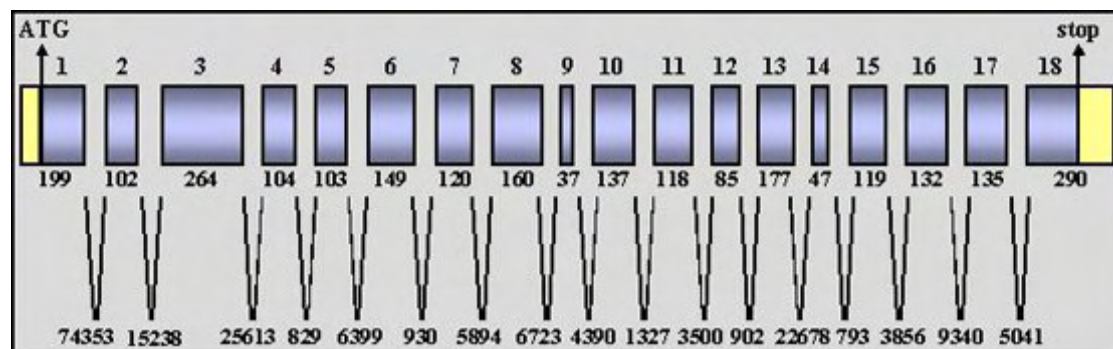
4.1 Δομή γονιδίου BRAF

Στον άνθρωπο, η οικογένεια των RAF ογκογονιδίων περιλαμβάνει τρία πρωτο-ογκογονίδια μέλη: A-RAF, B-RAF και C-RAF (ή RAF-1). Το γονίδιο BRAF εδράζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 7(q) στη θέση 34 (Εικ. 42).



Εικόνα 42. Χρωμοσωμική θέση του γονιδίου BRAF.

Αποτελείται από 18 εξόνια, τα οποία εκτείνονται σε μια περιοχή 190284 bp. Το μεταγραφόμενο mRNA του γονιδίου έχει μήκος 2513 bp. (Εικ. 43)



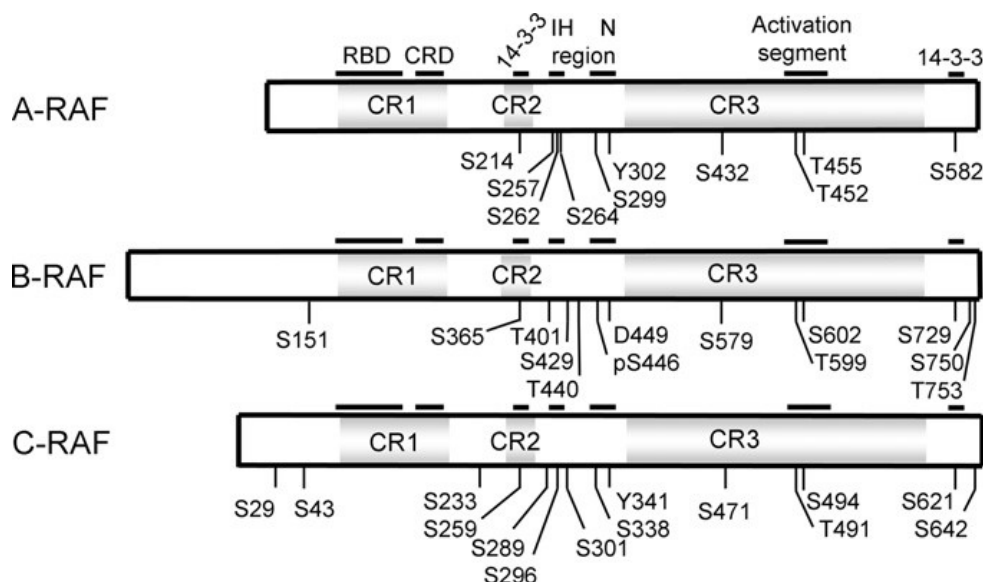
Εικόνα 43. Δομή του BRAF γονιδίου. Τα κουτιά αναπαριστούν τα εξόνια, με την αρίθμηση των εξονίων στην κορυφή και τον αριθμό των ζεύγων βάσεων στο κάτω μέρος. Τα ιντρόνια αντιπροσωπεύονται από τις μαύρες αγκύλες, όπου επίσης σημειώνεται ο αριθμός των ζεύγων βάσεων στο κάτω μέρος. Σημειώνονται επίσης με βέλη τα κωδικόνια έναρξης και λήξης.

4.2 Δομή BRAF πρωτεΐνης

Οι πρωτεϊνικές κινάσες Raf περιλαμβάνουν τρεις καλά συντηρημένες περιοχές, τις CR1, CR2 και CR3, οι οποίες διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό μεταξύ τους.

Η περιοχή CR1 περιλαμβάνει το τμήμα σύνδεσης με την *ras* πρωτεΐνη (Ras-binding domain, RBD) και μια υποπεριοχή πλούσια σε κατάλοιπα κυστεΐνης (cysteine-rich domain, CRD). Η περιοχή CR2 είναι πλούσια σε αμινοξέα σερίνης και θρεονίνης. Μεταξύ άλλων, περιλαμβάνει σε μια θέση σερίνη, η οποία μετά τη φωσφορυλίωση της μπορεί να συνδεθεί με τη 14-3-3 ρυθμιστική πρωτεΐνη. Η σύνδεση της τελευταίας με τη συγκεκριμένη φωσφορυλιωμένη σερίνη δρα ανασταλτικά. Η περιοχή CR3 αφορά την περιοχή με τη δράση της πρωτεϊνικής κινάσης. Βρίσκεται κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, ενώ αποτελεί την

περιοχή με την υψηλότερη ομολογία ανάμεσα στις πρωτεΐνες Raf. Μεταξύ της CR3 περιοχής και του καρβοξυτελικού άκρου υπάρχει μια διεγερτική θέση σύνδεσης με ρυθμιστική πρωτεΐνη 14-3-3 (Εικ.44).



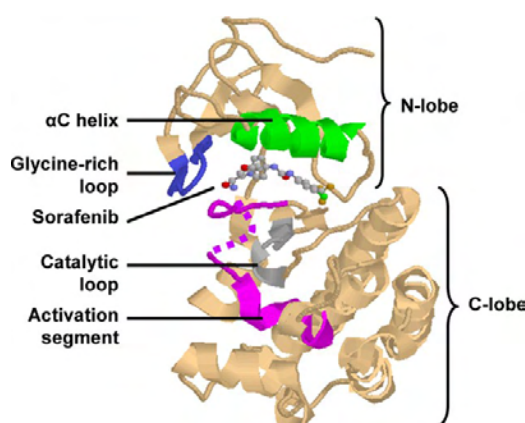
Εικόνα 44. Οργάνωση δομής των πρωτεϊνών Raf. Οι ενδείξεις CR1, CR2, CR3 υποδηλώνουν τη θέση των τριών υψηλά συντηρημένων περιοχών των πρωτεϊνών. Σημειώνονται οι θέσεις φωσφορυλίωσης επιλεγμένων υπολειμμάτων σερίνης (S), θρεονίνης (T) και τυροσίνης (Y). Επισημαίνονται επίσης οι δυο ανεξάρτητες μεταξύ τους θέσεις σύνδεσης με 14-3-3 ρυθμιστική πρωτεΐνη (391).

Η περιοχή της κινάσης Raf (kinase domain) διαθέτει ένα μικρό αμινοτελικό λοβό (N-lobe) και έναν ευμεγέθη καρβοξυτελικό λοβό (C-lobe), δομές που χαρακτηρίζουν όλες τις πρωτεϊνικές κινάσες. Ο μικρός λοβός λειτουργεί ως θέση δέσμευσης και προσανατολισμού του ATP. Περιλαμβάνει ένα βρόγχο πλούσιο σε κατάλοιπα γλυκίνης, ο οποίος αναφέρεται και ως βρόγχος P. Ο καρβοξυτελικός λοβός περιλαμβάνει τη θέση δέσμευσης των υποστρωμάτων της πρωτεΐνης. Η καταλυτική θέση της πρωτεΐνης εδράζεται στην αύλακα, μεταξύ των δυο λοβών (Εικ. 45). Οι δυο λοβοί της πρωτεϊνικής κινάσης έχουν τη δυνατότητα να μεταβάλλουν τη μεταξύ τους απόσταση, με αποτέλεσμα η παραπάνω καταλυτική αύλακα να στενεύει ή να διευρύνεται. Στην πρώτη μορφή, τα κατάλοιπα τίθενται σε ενεργή κατάσταση, ενώ η διευρυμένη μορφή επιτρέπει την είσοδο του ATP ή την απελευθέρωση του ADP από την θέση ενεργοποίησης. Μέσα σε κάθε λοβό, υπάρχει μια πολυπεπτιδική περιοχή, η οποία μπορεί να έχει ενεργό και ανενεργό διαμόρφωση (392).

Σε όλες τις πρωτεϊνικές κινάσες, το τμήμα ενεργοποίησης (activation segment) ξεκινά με την αλληλουχία των αμινοξέων: ασπαρτικό- φαινυλαλανίνη-γλυκίνη (Asp/Phe/Gly, DFG sequence). Στην ανενεργό διαμόρφωση, η πλευρική αλυσίδα της

φαινυλαλανίνης καταλαμβάνει τη θέση δέσμευσης του ATP (ATP- binding rocket), ενώ η πλευρική αλυσίδα του ασπαρτικού αμινοξέος απομακρύνεται από την ενεργό θέση. Η διαμόρφωση αυτή αναφέρεται και ως *DFG Asp- out* διαμόρφωση. Αντίθετα, στην ενεργό διαμόρφωση, η πλευρική αλυσίδα της φαινυλαλανίνης περιστρέφεται εκτός της θέσης δέσμευσης του ATP, ενώ η πλευρική αλυσίδα του ασπαρτικού αμινοξέος έρχεται αντικριστά με την παραπάνω θέση, δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό τη *DFG Asp- in* διαμόρφωση (392).

Στις περισσότερες πρωτεϊνικές κινάσες, το τμήμα ενεργοποίησης περιλαμβάνει μια ή περισσότερες θέσεις φωσφορυλίωσης. Οι θέσεις αυτές φωσφορυλιώνονται κατά κανόνα μέσω αντιδράσεων, που καταλύονται από μέλη της ίδιας οικογένειας κινασών, αλλά είναι επίσης δυνατό να φωσφορυλιώνονται και από άλλες πρωτεϊνικές κινάσες. Για παράδειγμα οι κινάσες Raf ενεργοποιούν τα μόρια MEK 1/2 καταλύοντας τη φωσφορυλίωση δύο υπολειμμάτων σερίνης που υπάρχουν στο τμήμα ενεργοποίησης (391).



Εικόνα 45. Διάγραμμα απεικόνισης της πρωτεΐνης Braf συνδεδεμένης με αναστολέα που δρα ως ανταγωνιστής του ATP (sorafenib). Ο βρόγχος P απεικονίζεται με μπλε χρώμα, ενώ το τμήμα ενεργοποίησης (activation segment) της πρωτεΐνης με μωβ χρώμα. Ο αναστολέας βρίσκεται συνδεδεμένος στη σχισμή μεταξύ των δύο λοβών (391).

Η B-Raf παρουσιάζει αρκετές διαφορές, ως προς τη δομή σε σχέση με τις άλλες δύο Raf πρωτεΐνες. Στις συντηρημένες περιοχές CR1, CR2 και CR3, η B-Raf έχει αρκετές διαφορές στα αμινοξέα. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, το εναλλακτικό μάτισμα των εξονίων 8b και 10, καθώς επίσης και η παρουσία δύο διαφορετικών αμινοτελικών άκρων για την εν λόγω πρωτεΐνη οδηγούν σε ποικίλες ισομορφές της B-Raf πρωτεΐνης, μεγέθους από 67 έως 99 KDa (393).

Συγκεκριμένα, η μεταβλητή περιοχή ανάμεσα στα τμήματα CR2 και CR3 υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα των εξονίων 8b και 10a. Τα δύο αυτά εξόνια εντοπίζονται στη συνδετική περιοχή μεταξύ της ρυθμιστικής αμινοτελικής και της καταλυτικής περιοχής και δρουν ως καθοριστικοί παράγοντες στη μετάβαση από την ενεργό στην ανενεργό μορφή. Τα δύο πρώτα εξόνια βρίσκονται στις πρωτεΐνες

B-Raf με το μεγαλύτερο αμινοτελικό άκρο. Τα συγκεκριμένα εξόνια κωδικοποιούν μια αλυσίδα μήκους 115 αμινοξέων, πλούσια σε γλυκίνη, ενώ δεν παρουσιάζουν ομολογία με τις αλληλουχίες των δυο άλλων Raf πρωτεϊνών (394).

4.3 Ρύθμιση της δραστηριότητας της B-Raf κινάσης

Σε φυσιολογικές συνθήκες, η ρύθμιση των Raf κινασών είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και περιλαμβάνει ποικίλα στάδια, όπως αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, φωσφορυλίωση, αποφωσφορυλίωση και αλλαγές στη διαμόρφωση της κινάσης. Η μεταφορά της κινάσης Raf στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της μικρής GTPάσης Ras αποτελεί το αρχικό συμβάν της διαδικασίας ενεργοποίησής της.

Η ενεργός μορφή της *ras* πρωτεΐνης (RAS- GTP) αλληλεπιδρά με την αντίστοιχη περιοχή σύνδεσης (RBD) και την πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή (CRD) της CR1 περιοχής της Raf κινάσης. Η σύνδεση στα δυο αυτά σημεία είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της Raf πρωτεΐνης. Όλες οι ισομορφές της Ras πρωτεΐνης μπορούν να αλληλεπιδρούν με τις κινάσες Raf. Ωστόσο, δεν παρουσιάζουν την ίδια αποτελεσματικότητα σύνδεσης, με την K-Ras να αποτελεί ισχυρότερο προσδέτη της Raf-1, σε σχέση με τις N-Ras και H-Ras (366, 367). Η μικρή GTPάση Rap διαθέτει παρόμοια με τη Ras περιοχή σύνδεσης με τελεστή (effector domain), αλλά δεν ασκεί την ίδια επίδραση σε όλες τις Raf κινάσες (395). Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη Rap ενεργοποιεί τη B-Raf, αλλά έχει ανασταλτική δράση στη Raf-1.

Η αλληλεπίδραση της Ras με την κινάση B-Raf αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για τη μεταφορά της τελευταίας στην κυτταρική μεμβράνη, αλλά δεν επαρκεί για την ενεργοποίησή της, καθώς απαιτούνται επιπρόσθετες αντιδράσεις φωσφορυλίωσης.

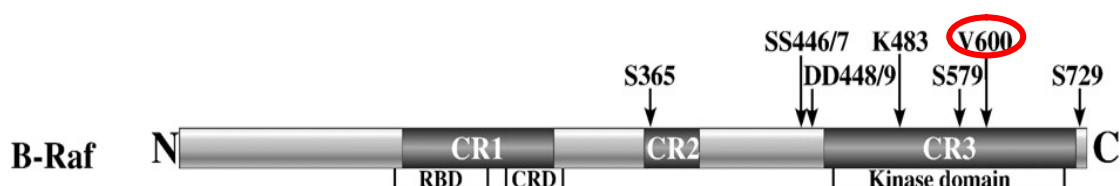
Η φωσφορυλίωση αποτελεί έναν πολύ σημαντικό μηχανισμό ρύθμισης της δραστηριότητας των Raf κινασών. Σε συνθήκες ηρεμίας, η κινάση βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ως σύμπλοκο με την πρωτεΐνη 14-3-3. Για τη σύνδεσή της με τη ρυθμιστική πρωτεΐνη 14-3-3 απαιτείται η φωσφορυλίωση δυο συγκεκριμένων καταλοίπων σερίνης, της Ser365 της CR2 περιοχής και της Ser729 κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο.

Η φωσφορυλίωση των υπολειμμάτων Thr599 και Ser602, που βρίσκονται εντός του τμήματος ενεργοποίησης, είναι μείζονος σημασίας για την ενεργοποίηση της B-Raf κινάσης (396). Οι Zhu και συνεργάτες του (397) έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση της Ser579 της καταλυτικής αγκύλης είναι βασική για την ενεργοποίηση της δραστηριότητας της κινάσης, πιθανότατα λόγω της σημασίας που έχει η θέση αυτή στη σύνδεση με τα υποστρώματα της πρωτεΐνης (MEK1/2). Επίσης, η N- περιοχή της B-Raf πρωτεΐνης, σε αντίθεση με τις κινάσες A-Raf και C-Raf, περιέχει αρνητικά φορτισμένες θέσεις (Asp448 και Asp449), καθώς και μια μόνιμα φωσφορυλιωμένη

σερίνη (pSer446), με αποτέλεσμα να μην απαιτούνται πρόσθετοι μετασχηματισμοί ώστε να φορτισθεί αρνητικά κατά την ενεργοποίηση της (Εικ. 46).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν παρουσιάζουν όλες οι κινάσες Raf την ίδια δραστικότητα. Ειδικότερα, η βασική δραστικότητα της πρωτεΐνης B-Raf είναι μεγαλύτερη από εκείνη της C-Raf, η οποία με τη σειρά της είναι πιο δραστική από την A-Raf.

Επιπλέον, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, θέσεις φωσφορυλίωσης που καταλύονται από τις πρωτεΐνες ERK, όπως η Ser151, Thr401, Ser750 και Thr753 σχετίζονται με παλίνδρομο ανασταλτικό μηχανισμό (398).



Εικόνα 46. Δομή της B-Raf κινάσης. Επισημαίνονται οι συντηρημένες περιοχές CR1, CR2, και CR3, η περιοχή σύνδεσης με την Ras (RBD), η πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή (CRD) και η περιοχή της κινάσης (kinase domain). Σημειώνονται επίσης ορισμένες σημαντικές θέσεις φωσφορυλίωσης. Με κόκκινο έχει κυκλωθεί η θέση της συχνότερης σημειακής μετάλλαξης p.V600E (c.1799 T>A) (399).

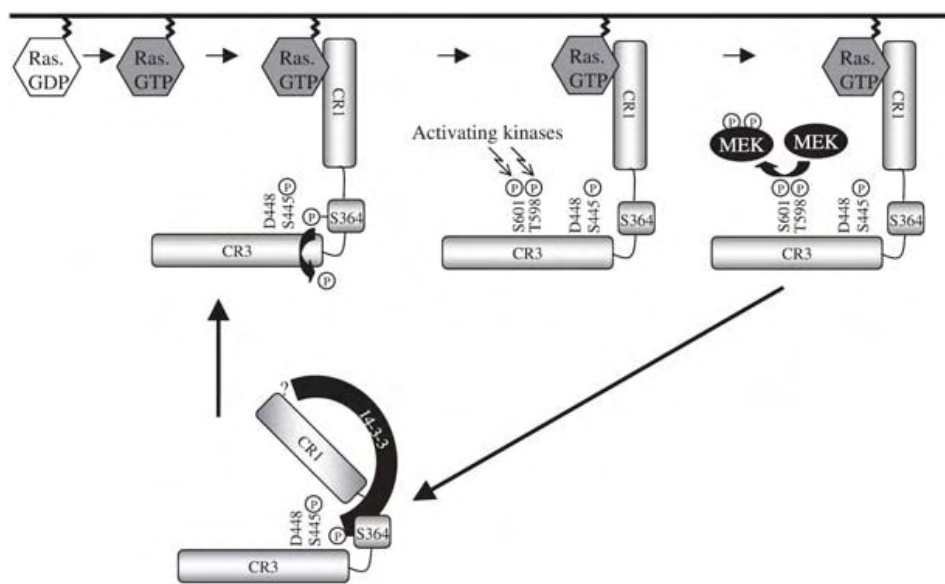
Εκτός από τις μικρές GTPάσες και τη φωσφορυλίωση, οι Raf κινάσες ρυθμίζονται και μέσω άλλων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, όπως είναι ο σχηματισμός ομο-/ετεροδιμερών (400, 401), η αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες 14-3-3 (402) και με διάφορες πρωτεΐνες-ικριώματα (scaffold proteins), όπως η KSR (403, 404), η CNK (405) και η RKIP (406, 407).

4.4 Ενεργοποίηση της B-Raf πρωτεΐνης

Το 2002, οι Dhillon και συνεργάτες πρότειναν ένα μοντέλο ενεργοποίησης της κινάσης Raf-1, το οποίο περιλαμβάνει φωσφορυλιώσεις και αλληλεπιδράσεις με διάφορα πρωτεϊνικά μόρια (408). Η πλήρης επέκταση του συγκεκριμένου μοντέλου στη B-Raf πρωτεΐνη δεν είναι δυνατή, καθώς οι δυο κινάσες παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ως προς τη ρύθμιση της ενεργότητας τους. Μια από τις κυριότερες διαφορές είναι το πρότυπο φωσφορυλίωσης τους όπως προαναφέρθηκε.

Ένα πιθανό μοντέλο ενεργοποίησης της πρωτεΐνης B-Raf, κατά αντιστοιχία με το μοντέλο ενεργοποίησης της Raf-1 περιγράφηκε από τους K. Mercer και C.A Pritchard (Εικ. 47) (409). Σε συνθήκες ηρεμίας, η B-Raf παραμένει στο κυτταρόπλασμα

σχηματίζοντας σύμπλοκο με την 14-3-3 πρωτεΐνη. Κατά αναλογία με τη Raf-1, είναι πιθανό, η σύνδεση της 14-3-3 να γίνεται στα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα pSer364 και pSer728. Σε αντίθεση με τη Raf-1, η B-Raf διαθέτει ανοιχτή διαμόρφωση στο κυτταρόπλασμα, λόγω της παρουσίας των phospho-S445, D448, καθώς επίσης και τη πιθανή συμμετοχή αμινοξέων που κωδικοποιούνται από το εξόνιο 10a. Μετά τη διέγερση από έναν προσδέτη και το σχηματισμό της ενεργούς μορφής της Ras πρωτεΐνης, η B-Raf αλληλεπιδρά με τη Ras και οδηγείται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Κατά αναλογία με τη Raf-1, η PP2A αποφωσφορυλιώνει το κατάλοιπο Ser364. Στη συνέχεια, ενεργοποιητικές κινάσες είναι σε θέση να φωσφορυλιώσουν τα κατάλοιπα των αμινοξέων S601 και T598, γεγονός που οδηγεί στην πλήρη ενεργοποίηση της B-Raf πρωτεΐνης. Η απενεργοποίηση των B-Raf, και Raf-1, περιλαμβάνει γεγονότα φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης, με επακόλουθη σύνδεση της 14-3-3 πρωτεΐνης.



Εικόνα 47. Μοντέλο ενεργοποίησης της B-Raf κατά αντιστοιχία με το μοντέλο ενεργοποίησης της Raf-1 των Dhillon et al (408). Από το συγκεκριμένο μοντέλο έχει παραληφθεί η πρόσδεση των πρωτεϊνών- κριωμάτων RKIP, MP-1 και KSR (Mercer και C.A Pritchard).

4.5 Έκφραση της B-Raf πρωτεΐνης

Υψηλά επίπεδα έκφρασης της B-Raf πρωτεΐνης συναντάμε στο νευρικό ιστό, καθώς και σε κυτταρικές σειρές νευρικής προέλευσης (410). Επίσης, έκφραση της B-Raf πρωτεΐνης παρατηρείται στους όρχεις και στο σπλήνα (411).

Το BRAF γονίδιο μπορεί με διαφορετικό μάτισμα να παράγει τουλάχιστον 10 διαφορετικές ισομορφές. Αυτές εκφράζονται ποικιλοτρόπως σε διαφορετικούς ιστούς ενήλικων ποντικών, όπως έχουν δείξει προηγούμενες μελέτες (393).

Αν και η B-Raf πρωτεΐνη είναι σχεδόν ανύπαρκτη σε πολλούς ιστούς, τα mRNA μετάγραφα αυτής είναι σαφώς ανιχνεύσιμα (393). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η πρωτεΐνη, ακόμη κι όταν εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα, μπορεί να έχει σημαντική δραστηριότητα MEK κινάσης, όπως αποδεικνύεται σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικών (MEFs). Η B-Raf πρωτεΐνη είναι μόλις ανιχνεύσιμη σε αυτά τα κύτταρα, ενώ οι Raf-1 και A-Raf πρωτεΐνες εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα. Ωστόσο, η B-Raf έχει σημαντικά υψηλότερο επίπεδο βιοχημικής δραστηριότητας από τις άλλες δύο πρωτεΐνες και φαίνεται να είναι ο σημαντικότερος παράγοντας ενεργοποίησης των MEK/ERK, έπειτα από διέγερση με αυξητικούς παράγοντες (412).

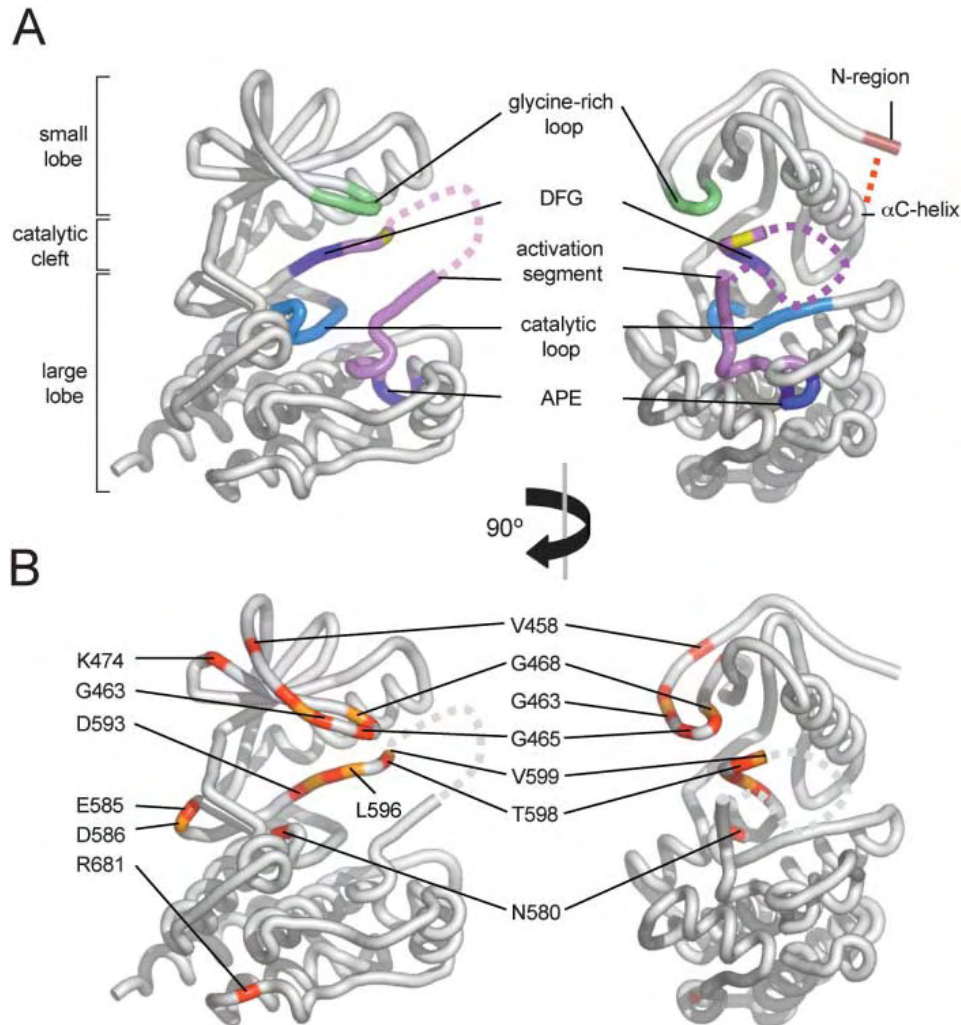
4.6 B-Raf και καρκίνος

Τα γονίδια Raf αναγνωρίστηκαν αρχικά ως ογκογονίδια ρετροϊών που μπορούν να προκαλέσουν όγκους σε ποντίκια και κοτόπουλα (413- 415). Στον άνθρωπο, έχουν ταυτοποιηθεί > 40 διαφορετικές μεταλλάξεις στο BRAF γονίδιο (416). Η συχνότερη από αυτές είναι μια παρανοσηματική σημειακή μετάλλαξη (missense point mutation) στο εξώνιο 15, η οποία απαντάται στο 90% περίπου του συνόλου των μεταλλάξεων του BRAF γονιδίου (417).

Η εν λόγω μετάλλαξη (c.1799T>A) οδηγεί στην αντικατάσταση της βαλίνης από το γλουταμινικό οξύ (p.V600E), στη θέση 600 της B-Raf πρωτεΐνης. Η B-Raf^{V600E} μπορεί να αποκτήσει μέχρι και 500 φορές περισσότερη δραστηριότητα ως προς την ενεργοποίηση της MEK/ERK σηματοδότησης στα καρκινικά κύτταρα (418). Επιπλέον, επιτρέπει τη σηματοδότηση του συγκεκριμένου μονοπατιού απουσία οποιουδήποτε εξωκυττάριου ερεθίσματος, με αποτέλεσμα το κύτταρο να αποκτά αυτάρκεια σε σήματα ανάπτυξης.

Η θέση 600 της B-Raf πρωτεΐνης εντοπίζεται στο τμήμα ενεργοποίησης, κοντά στο μοτίβο DFG (Εικ. 48). Εκεί βρίσκεται φυσιολογικά η βαλίνη, με μια μετρίου μεγέθους υδρόφοβη πλευρική αλυσίδα, που αλληλεπιδρά με τη φαινυλαλανίνη F467 του βρόγχου P. Η αντικατάσταση της βαλίνης από το γλουταμινικό αμινοξύ, διαταράσσει την παραπάνω υδρόφοβη αλληλεπίδραση και αποσταθεροποιεί τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, που διατηρεί το μοτίβο DFG σε ανενεργό προσανατολισμό. Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα την επαναφορά του μοτίβου DFG σε ενεργό μορφή και τον ενεργό προσανατολισμό του τμήματος ενεργοποίησης (418). Πρόκειται δηλαδή για μια παρανοσηματική σημειακή

μετάλλαξη που έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της κινάσης σε διαρκή ενεργό κατάσταση (419).

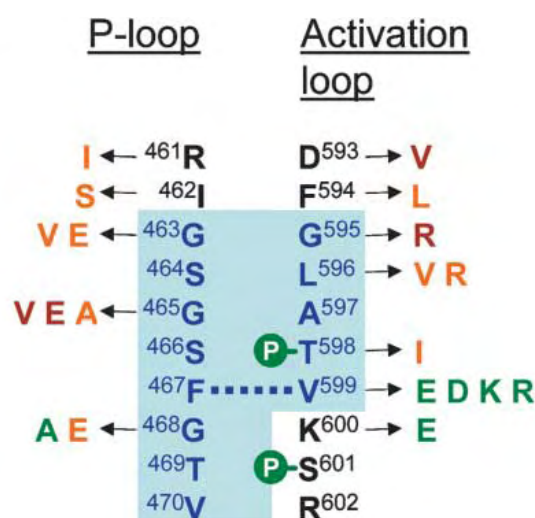


Εικόνα 48. Δομή της B-RAF περιοχής κινάσης (κατάλοιπα 447-725) **A:** Σημαντικά ενζυμικά και δομικά χαρακτηριστικά: επισημαίνεται ο μικρός λοβός, ο μεγάλος λοβός και η μεταξύ τους καταλυτική σχισμή (catalytic cleft). Με διαφορετικά χρώματα σημειώνονται: η περιοχή N, ο πλούσιος σε γλυκίνη βρόγχος, ο καταλυτικός βρόγχος, το τμήμα ενεργοποίησης και τα μοτίβα DFG και APE **B:** Μεταλλάξεις του B-RAF στον καρκίνο. Τα μεταλλαγμένα κατάλοιπα επισημαίνονται με κόκκινο και πορτοκαλί χρώμα (419).

Οι περισσότερες μεταλλάξεις του BRAF γονιδίου παρουσιάζουν την τάση να συγκεντρώνονται στον πλούσιο σε γλυκίνη βρόγχο και στο τμήμα ενεργοποίησης και συχνά αφορούν κατάλοιπα, που έχουν ως ρόλο τη σταθεροποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των περιοχών αυτών (419, 420).

Εκτός από τη V600E μετάλλαξη, άλλες μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί στο βρόγχο ενεργοποίησης (activation loop), σε μικρότερο όμως ποσοστό, είναι οι V599D, L596V, L596R, G595R και F594L. Επιπλέον, ποσοστό 11% των μεταλλαγών του BRAF γονιδίου αφορούν στα κατάλοιπα γλυκίνης του μοτίβου GXGXXG, στην

ATP- binding περιοχή της δομής κινάσης και συγκεκριμένα στις θέσεις G463, G465 και G468 (Εικ. 48). Σύμφωνα με τους Wan και συνεργάτες, οι μεταλλαγμένες μορφές της B-Raf κινάσης μπορούν να ταξινομηθούν σε ομάδες υψηλής, ενδιάμεσης και χαμηλής ενεργότητας, ανάλογα με την ικανότητά τους να διεγείρουν *in vitro* τη δραστηριότητα της B-Raf κινάσης. Στη μελέτη τους παρατήρησαν ότι η ομάδα υψηλής ενεργότητας υπερέβαινε την αντίστοιχη ενεργότητα της μη μεταλλαγμένης (wild-type) πρωτεΐνης 100 έως και 700 φορές και η μεταλλαγμένη B-Raf^{V600E} πρωτεΐνη είναι ενεργοποιημένη κατά 460 φορές (Εικ. 49).



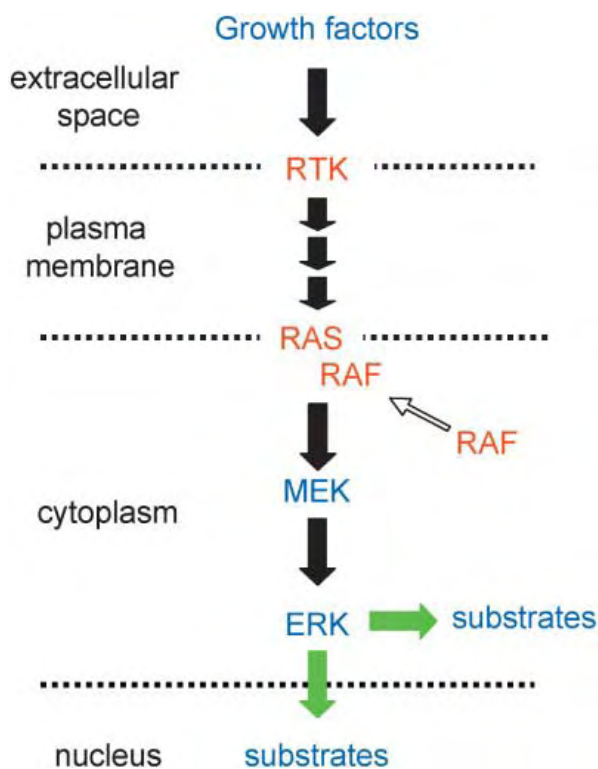
Εικόνα 49. Μεταλλάξεις της B-Raf πρωτεΐνης, εντός του βρόγχου P και του βρόγχου ενεργοποίησης. Υποδεικνύονται οι ενεργείς φωσφορυλιώσεις των υπολειμμάτων T598 και S601. Οι μεταλλάξεις που μελετήθηκαν από τους Wan και συνεργάτες διαχωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες: υψηλής ενεργότητας (πράσινο), ενδιάμεσης (πορτοκαλί) και χαμηλής ενεργότητας (κόκκινο), ανάλογα με την ικανότητα τους να διεγείρουν *in vitro* την ενεργότητα κινάσης της Braf (420).

Οι μεταλλάξεις του BRAF γονιδίου παρατηρούνται σε ένα ευρύ φάσμα κακοηθειών, που περιλαμβάνει τα κακοήθη μελανώματα (25-70%), τα θηλώδη καρκινώματα του θυρεοειδούς αδένου (36-53%), τα καρκινώματα του παχέος εντέρου (5-22%), ενώ ανιχνεύονται επίσης, σε μικρότερο ποσοστό, σε γλοιώματα, σαρκώματα, καθώς και στον καρκίνο του πνεύμονα, των ωοθηκών, του μαστού και του ήπατος (417, 419, 421, 422).

Μεταλλάξεις του BRAF γονιδίου παρατηρούνται σε κακοήθειες, στις οποίες συνυπάρχουν μεταλλάξεις στο RAS γονίδιο. Ωστόσο, κατά γενική ομολογία, τα δυο αυτά γονίδια δεν ανευρίσκονται ταυτόχρονα μεταλλαγμένα, παρά σε εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις (mutually exclusive). Είναι λοιπόν πιθανό, σε αυτού του είδους

τις κακοήθειες, ο παθογενετικός μηχανισμός να αφορά στην απορρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού RAS/BRAF/MEK/ERK σε διαφορετικά επίπεδα (418).

Οι ενεργοποιημένες κινάσες ERK με τη σειρά τους συμμετέχουν στη ρύθμιση πλήθους λειτουργιών, όπως η γονιδιακή έκφραση, η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, ο μεταβολισμός, η κυτταρική ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και η απόπτωση.



Εικόνα 50 Το μονοπάτι RAS/RAF/ERK. Αυξητικοί παράγοντες συνδέονται και ενεργοποιούν υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (PTKs), οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν τη RAS πρωτεΐνη. Η τελευταία, στην ενεργό της μορφή, συνδέεται με τη RAF και τη μεταφέρει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Εκεί η κινάση RAF ενεργοποιείται και ακολουθεί ο καταρράκτης φωσφορυλιώσεων/ενεργοποιήσεων των MEK/ERK κινασών, μεταφέροντας σήματα τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Με κόκκινο επισημαίνονται οι RTKs, RAS, RAF, μόρια που εμφανίζουν μεταλλάξεις στον καρκίνο (419).

4.7 B-Raf και καρκίνος παχέος εντέρου

Στα καρκινώματα παχέος εντέρου, οι μεταλλάξεις στο BRAF γονίδιο σχετίζονται με τη μεθυλίωση του γενομικού υλικού (148, 423). Επιπλέον, η μετάλλαξη V600E έχει σχετισθεί με καρκινώματα του παχέος εντέρου, τα οποία παρουσιάζουν ανεπάρκεια του συστήματος επιδιόρθωσης των βλαβών που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA (Mismatch Repair genes, MMR genes) (424).

Οι μεταλλάξεις του *BRAF* γονιδίου παρουσιάζουν επίσης ισχυρή συσχέτιση με το μοριακό μονοπάτι του φαινοτύπου της μεθυλίωσης των CpG νησίδων (CIMP) (425). Ο ακριβής μηχανισμός που διέπει την καρκινογένεση του παχέος εντέρου μέσω του συγκεκριμένου μονοπατιού δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Υπάρχουν όμως μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες οι εν λόγω μεταλλάξεις του *BRAF* γονιδίου εντοπίζονται και σε πρόδρομες αλλοιώσεις (βλάβες με οδοντωτή μορφολογία), γεγονός που υποδηλώνει ότι ενδεχομένως αποτελούν πρώιμο γενετικό συμβάν κατά την ανάπτυξη των CIMP όγκων (426- 428).

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός της μελέτης

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί μια από τις συχνότερες μορφές καρκίνου στον άνθρωπο και μια από τις συχνότερες αιτίες θανάτου από καρκίνο. Πρόκειται για μια νόσο με υψηλού βαθμού ετερογένεια σε κλινικό, μορφολογικό και μοριακό επίπεδο. Είναι πλέον αντιληπτό ότι τόσο για την πρόληψη και την έγκαιρη διάγνωση της νόσου, όσο και για τη βελτίωση της πρόγνωσης και το σχεδιασμό «εξατομικευμένης» θεραπείας, είναι απαραίτητη η εκτίμηση των κλινικών και ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών του όγκου αλλά και η ανάλυση του γενετικού προφίλ του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Τα τελευταία χρόνια μελετάται εκτεταμένα το μονοπάτι μεταγωγής κυτταρικών σημάτων του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και έχει γίνει πλέον αντιληπτός ο βασικός ρόλος που διαδραματίζει στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου. Οι μεταλλάξεις των ογκογονιδίων *KRAS* και *BRAF*, ανεξάρτητα από το μοριακό μηχανισμό στον οποίο εμπλέκονται, αποτελούν «σημεία- κλειδιά» στην ανάπτυξη των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η κατανομή των μεταλλάξεων των ογκογονιδίων *KRAS* και *BRAF* σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, στην περιφέρεια της Θεσσαλίας και η συσχέτισή τους με τις βασικές κλινικο-ιστοπαθολογικές παραμέτρους.

Επιπρόσθετα, εκτιμήσαμε την έκφραση των *EGFR* και *KRAS* γονιδίων σε επίπεδο mRNA μεταγράφων, με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) σε υγιείς και νεοπλασματικούς ιστούς ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου και έγινε συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης με τα κύρια κλινικο-ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των καρκινωμάτων που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη μας.

2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Υλικό μελέτης

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν 272 δείγματα ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο. Οι ασθενείς, ηλικίας 32 έως 84 ετών είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο παχέος εντέρου και προσήλθαν στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος

ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για μοριακή διερεύνηση κατά το χρονικό διάστημα 2008-2012.

Έγινε ανασκόπηση των ιστοπαθολογικών εκθέσεων των ασθενών και επανεξέταση αντιπροσωπευτικών ιστολογικών τομών των νεοπλασμάτων. Παράλληλα, συλλέχθηκαν πληροφορίες σχετικά με την ηλικία, το φύλο των ασθενών και την εντόπιση του όγκου. Επιπρόσθετα, εκτιμήθηκαν βασικές ιστοπαθολογικές παράμετροι των αντίστοιχων νεοπλασμάτων, όπως η παθολογοανατομική σταδιοποίηση των όγκων, ο ιστολογικός τύπος, ο βαθμός διαφοροποίησης των καρκινωμάτων και η παρουσία ή μη αγγειακής διήθησης.

Επιπλέον, έγινε συλλογή νωπού ιστού από 50 ασθενείς που προσήλθαν στα χειρουργεία του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Νοσοκομείου Λάρισας κατά το χρονικό διάστημα 2008-2012. Από τα χειρουργικά παρασκευάσματα των κολεκτομών, που προσήλθαν στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, πραγματοποιήθηκε λήψη νωπού ιστού τόσο από τον νεοπλασματικό όγκο, όσο και από το φυσιολογικό εντερικό τοίχωμα (σε απόσταση τουλάχιστον 10 εκ. από τον όγκο). Μετά την ολοκλήρωση κάθε δειγματοληψίας, ακολουθούσε η μονιμοποίηση των παρασκευασμάτων σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 10%, για τη μετέπειτα ιστοπαθολογική εκτίμηση. Τα κλινικο-ιστοπαθολογικά ευρήματα των ασθενών της μελέτης μας συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Χαρακτηριστικά ασθενών	Αριθμός ατόμων (N)	Συχνότητα (%)
Φύλο		
Άρρεν	180	56
Θήλυ	142	44
Εντόπιση όγκου		
Δεξιό κόλον	111	34.5
Αριστερό κόλον	152	47.2
Ορθό	59	18.3
Ιστολογικός τύπος		
Αδενοκαρκίνωμα	290	90.1
Βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα	26	8.1
Αδενοπλακώδες καρκίνωμα	1	0.3
Νευροενδοκρινική διαφοροποίηση	5	1.5
Βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης		
Καλής διαφοροποίησης	38	12
Μέτριας διαφοροποίησης	202	62.7
Μέτριας έως χαμηλής διαφοροποίησης	43	13.3
Χαμηλής διαφοροποίησης	39	12
Σταδιοποίηση κατά TNM		
Πρωτοπαθής όγκος (pT)		
T1	7	2
T2	43	13.3

T3	234	72.7
T4	38	12
Λεμφαδένες (N)		
N0: απουσία μεταστάσεων	143	44.4
N1: μεταστάσεις σε 1-3 λεμφαδένες	102	31.6
N2: μεταστάσεις σε ≥ 4 λεμφαδένες	77	24
Μετάσταση (M)		
M0	314	97.5
M1	8	2.5

Πίνακας 13. Κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών (N,%).

2.2 Μελέτη σε γενετικό επίπεδο (DNA)

2.2.1 Απομόνωση γενομικού DNA από νωπό ιστό

Η απομόνωση έγινε από τμήμα του νωπού ιστού, το οποίο τεμαχίστηκε με χειρουργικό νυστέρι και τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Falcon χωρητικότητας 50 ml.

Αντιδραστήριο

Λυτικό διάλυμα I: 1 ml SDS 0.5%
 0.5 ml πρωτεΐνάση K συγκέντρωσης 10mg/ml
 2 ml ATL (Tissue Lysis buffer, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

Πρωτόκολλο:

1. Προσθήκη λυτικού διαλύματος και ομογενοποίηση ιστού.
2. Επώαση του διαλύματος του ομογενοποιημένου ιστού σε υδατόλουτρο στους 37⁰ C για 48- 72 ώρες.
3. Επεξεργασία του διαλύματος σε αυτόματο μηχάνημα εξαγωγής DNA (MAGTRATION SYSTEM 12 GC NUCLEIC ACID EXTRACTOR, PSS, Europe).

2.2.2. Απομόνωση γενομικού DNA από μονιμοποιημένο ιστό

Απομονώθηκε DNA από δείγματα ιστού μονιμοποιημένα σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 10% και εγκλεισμένα σε κύβο παραφίνης. Σε αποστειρωμένο φιαλίδιο τοποθετήθηκαν 7- 10 τομές των παραπάνω κύβων, πάχους 10 μm. Για την

απομόνωση γενομικού DNA από μονιμοποιημένο ιστό χρησιμοποιήθηκε το QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

Αντιδραστήρια

Λυτικό διάλυμα II: 100 μl SDS 0.5%
100 μl πρωτεΐνάση K συγκέντρωσης 10mg/ml
400 μl ATL (Tissue Lysis buffer, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

Διάλυμα ξυλόλης
Διάλυμα αιθανόλης 96- 100%

Διάλυμα λύσης AL	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)
Διαλύματα εκπλύσεων AW1 & AW2	QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)
Δις απεσταγμένο νερό (ddH ₂ O)	

Πρωτόκολλο

1. Αποπαραφίνωση του ιστού με 1 ml διαλύματος ξυλόλης και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
2. Φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές (rpm) για 10 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος.
3. Επανάληψη των βημάτων 1, 2.
4. Προσθήκη 1 ml διαλύματος απόλυτης αιθανόλης (100%), φυγοκέντρηση του διαλύματος στις 12.000 στροφές (rpm) για 10 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος.
5. Προσθήκη λυτικού διαλύματος II και επώαση σε υδατόλουτρο στους 37⁰C για 48 ώρες.

Η απομόνωση του γενομικού DNA ολοκληρώνεται με τη βοήθεια του QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι στήλες πολυπροπυλενίου (QIAamp Spin Columns) χρησιμοποιούνται για την απομόνωση νουκλεϊκών οξέων. Η απομόνωση βασίζεται στη χρήση μεμβρανών από πηκτή σιλικόνης η οποία δεσμεύει επιλεκτικά νουκλεϊκά οξέα, ενώ είναι διαπερατή από πρωτεΐνες και δισθενή κατιόντα, που μπορεί να αναστείλουν την πολυμεράση κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Η διαδικασία της απομόνωσης συνεχίζει ως εξής:

6. Προσθήκη 400 μl AL διαλύματος στο σωληνάριο του δείγματος και καλή ανακίνηση (vortex).
7. Επώαση του δείγματος σε υδατόλουτρο στους 70°C για 10 λεπτά.
8. Σύντομη φυγοκέντρηση (spin) για να απομακρυνθούν οι σταγόνες από τα τοιχώματα των σωληναρίων.
9. Προσθήκη 400 μl απόλυτης αιθανόλης (100% αιθανόλη) και ανάδευση (vortex).
10. Μεταφορά του δείγματος σε QIAamp στήλη και φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές (rpm) για 1 λεπτό.
11. Αντικατάσταση του σωληναρίου συλλογής στο κάτω μέρος της στήλης και προσθήκη 500 μl διαλύματος AW1.
12. Φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές (rpm) , για 1 λεπτό.
13. Αντικατάσταση του σωληναρίου στο κάτω μέρος της στήλης και προσθήκη 500 μl AW2 διαλύματος.
14. Φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές (rpm), για 3 λεπτά.
15. Τοποθέτηση της στήλης σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf (1,5ml) και προσθήκη 100 μl δις απεσταγμένου νερού.
16. Επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές (rpm), για 1 λεπτό.
17. Το σωληνάριο τύπου erpendorf περιέχει το γενομικό DNA και φυλάσσεται στους 4°C μέχρι τη χρήση του.

2.2.3 Φωτομέτρηση DNA

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων γίνεται με φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο, βάσει της ιδιότητάς τους να απορροφούν ακτινοβολία μήκους κύματος 260nm. Συγκεκριμένα μετράται η οπτική πυκνότητα (Optical Density, OD) υδατικού διαλύματος DNA (αραίωση 1:20 - 1:100) σε μήκη κύματος 260nm και 280 nm σε κυβέτα χαλαζία με διαδρομή φωτός 1 εκ. Δεδομένου ότι σε μήκος κύματος 260 nm, η μία μονάδα οπτικής πυκνότητας (OD) για τα DNA μόρια ισούται με συγκέντρωση 50 μg DNA/ml, υπολογίζεται η συγκέντρωση μετά τη φωτομέτρηση ως εξής:

$$\text{Συγκέντρωση DNA (}\mu\text{g/ml)} = \text{αραίωση} \times 50 \times \text{τιμή OD}_{260}$$

Η απορρόφηση στα 260 nm αντιστοιχεί στο νουκλεϊκό οξύ που περιέχεται στο διάλυμα, ενώ η απορρόφηση στα 280 nm αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες ή άλλες προσμίξεις που έχουν ενδεχομένως παραμείνει στο διάλυμα. Η ποιότητα (καθαρότητα) του DNA εκτιμάται με βάση το λόγο OD_{260}/OD_{280} . Τιμές του λόγου μεταξύ 1.7 και 1.9 υποδηλώνουν παρουσία επαρκώς καθαρού DNA, ενώ τιμές

μικρότερες του 1.7 υποδηλώνουν πρόσμιξη με φαινόλη ή πρωτεΐνες και τιμές μεγαλύτερες του 1.9 πρόσμιξη με άλλα μακρομόρια.

2.2.4 Ηλεκτροφόρηση γενομικού DNA

Η ηλεκτροφόρηση μέσω πηκτώματος αγαρόζης είναι μια απλή, γρήγορη και καθιερωμένη μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθορισμό τμημάτων DNA. Η αγαρόζη, που προέρχεται από φύκη, είναι ένα ευθύγραμμο πολυμερές του οποίου η βασική δομή είναι D-γαλακτόζη-3,6-ανυδρο L-γαλακτόζη.

Η θέση του DNA στο πήκτωμα μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα μετά από χρώση με μικρές συγκεντρώσεις βρωμιούχου αιθιδίου (φθορίζουσα σε υπεριώδη ακτινοβολία χρωστική) που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Τα πηκτώματα (gels) αγαρόζης μπορούν να φτιαχτούν σε διαφορετικά μεγέθη, σχήματα και συγκεντρώσεις και η επιλογή ανάμεσα στις διαφορετικές παραμέτρους εξαρτάται πρωταρχικά από το μέγεθος των τμημάτων DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Τα πηκτώματα αγαρόζης συνήθως ηλεκτροφορούνται οριζόντια σε ηλεκτρικό πεδίο σταθερής ισχύος και κατεύθυνσης. Όταν εφαρμοστεί το ηλεκτρικό πεδίο κατά μήκος του πηκτώματος, το DNA, αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH, κατευθύνεται προς την άνοδο. Ο ρυθμός κινητικότητας του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από 4 παραμέτρους:

- Το μέγεθος του DNA. Το γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA κινείται με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογάριθμου του μοριακού του βάρους. Το γενομικό DNA ως μεγαλομοριακό μόριο εντοπίζεται ως μια ζώνη μεγάλου μοριακού βάρους, που μετατοπίζεται ελάχιστα από τη θέση φόρτωσης του δείγματος. Αντίθετα, στην περίπτωση ηλεκτροφόρησης κατακερματισμένου γενομικού DNA (κακής ποιότητας DNA) παρατηρείται μια ζώνη μεγάλου μοριακού βάρους και στη συνέχεια μια σειρά ζωνών μικρότερου μοριακού βάρους ή παρατηρούνται επικαλυπτόμενα τμήματα DNA μικρού μοριακού βάρους (smear).
- Τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Η κινητικότητα ενός τμήματος DNA διαφέρει σε πηκτώματα αγαρόζης διαφορετικής συγκέντρωσης. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος DNA τμημάτων.
- Τη στερεοδιάταξη του DNA. Η κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή (μορφή I), η ανοιχτή κυκλική μορφή (μορφή II) και το γραμμικό DNA (μορφή III) του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα

αγαρόζης. Οι σχετικές κινητικότητες των τριών μορφών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα, αλλά επηρεάζονται επίσης και από την ένταση του ρεύματος, την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και το βαθμό υπερελίκωσης της μορφής I του DNA. Κάτω από διαφορετικές συνθήκες, οι κινητικότητες αυτές μπορούν να αντιστραφούν.

Την ένταση του ρεύματος. Σε χαμηλή τάση (volts), η κινητικότητα γραμμικών τμημάτων DNA είναι ανάλογη με τα volts που χρησιμοποιούνται. Στην περίπτωση που αυξήσουμε την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (αύξηση των volts), η κινητικότητα τμημάτων DNA μεγάλου μοριακού βάρους αυξάνεται με διαφορετικό συντελεστή για κάθε τμήμα DNA και έτσι μειώνεται η διαχωριστική ικανότητα των πηκτωμάτων αγαρόζης. Τα πηκτώματα αγαρόζης που ηλεκτροφορούνται βυθισμένα μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα μπορούν να ηλεκτροφορηθούν εφαρμόζοντας περισσότερο ρεύμα από τα αντίστοιχα που ηλεκτροφορούνται χωρίς να είναι βυθισμένα.

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Υλικά

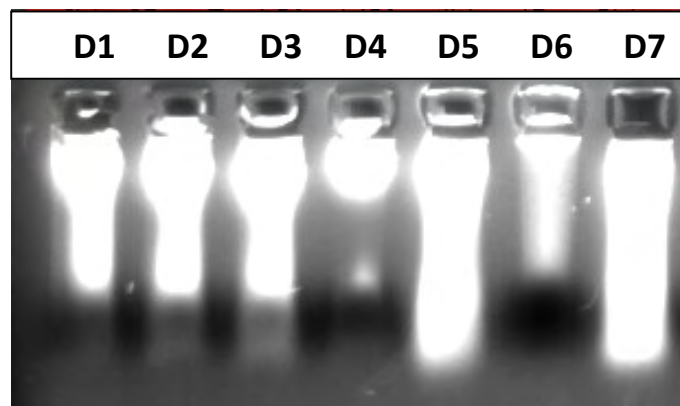
- Αγαρόζη (Invitrogen)
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE συγκέντρωσης 1x με σύσταση 100mM Tris-βορικό, 2mM Na₂EDTA
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) 0.5 mg/ml

Πρωτόκολλο

- ✓ Σε κωνική φιάλη προστίθενται αγαρόζη και 300 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE συγκέντρωσης 1x. Για την παρασκευή πηκτώματος 1%, 2% και 3% προστίθενται αντίστοιχα 3, 6 και 9 gr αγαρόζης.
- ✓ Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων ανακινώντας κατά διαστήματα κυκλικά τη φιάλη, μέχρις ότου διαλυθεί η αγαρόζη.
- ✓ Προσθήκη 20 ml βρωμιούχου αιθιδίου και ανάδευση (το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ισχυρός μεταλλαξιογόνος παράγοντας και για το λόγο αυτό σε όλη τη διαδικασία χρησιμοποιείται απαγωγός νηματικής ροής (laminar flow hood).
- ✓ Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος φθάσει περίπου στους 60°C, το διάλυμα τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο και αφήνεται να κρυώσει και να πήξει το πήκτωμα αγαρόζης. Όταν πήξει είναι έτοιμο για χρήση.

Διαδικασία ηλεκτροφόρησης

- ✓ Για την ηλεκτροφόρηση του γενομικού DNA χρησιμοποιείται πήκτωμα αγαρόζης με συγκέντρωση 1%.
- ✓ Το πήκτωμα αγαρόζης βυθίζεται μέσα στο δοχείο ηλεκτροφόρησης που περιέχει TBE ρυθμιστικό διάλυμα (1x).
- ✓ Από κάθε δείγμα DNA λαμβάνονται 5 μl στα οποία προστίθεται διάλυμα χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης (0.25% bromophenol blue/0.25% xylene cyanol FF/15% Ficoll Type 400 σε ddH₂O), η οποία λόγω μεγάλου μοριακού βάρους βοηθά να μη διαχυθεί το DNA κατά τη φόρτωσή του στις κατάλληλες θέσεις (πηγαδάκια) και ταυτόχρονα εξασφαλίζει την εύκολη παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης κατά μήκος του πηκτώματος αγαρόζης.
- ✓ Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, με τη βοήθεια του υπεριώδους φωτός, φωτογραφίζουμε το πήκτωμα αγαρόζης και σημειώνουμε τα δείγματά μας. Η συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή με κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα που επιτρέπει την αποθήκευση και περαιτέρω επεξεργασία των αποθηκευμένων αρχείων (Εικ. 51).



Εικόνα 51. Ηλεκτροφόρηση γενομικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%.

2.2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η μέθοδος της PCR αναπτύχθηκε το 1984 από τον βιοχημικό Kary Mullis, ο οποίος βραβεύτηκε για το λόγο αυτό με το Βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1993. Με τη μέθοδο αυτή συντίθεται μεγάλος αριθμός αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μια *in vitro* ενζυματική αντίδραση. Ο πολλαπλασιασμός αυτός του DNA κρίνεται απαραίτητος, αφού για την ανίχνευση μεταλλάξεων απαιτείται μεγάλος αριθμός DNA αντιγράφων (429). Η ευαισθησία και η ταχύτητα της μεθόδου

αυτής έχει επιφέρει επανάσταση στη Μοριακή Γενετική δίνοντας καινούργιες προοπτικές για τη μελέτη και ανάλυση γονιδίων.

Η τεχνική της PCR βασίζεται στον πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης DNA αλληλουχίας που οριοθετείται δεξιά και αριστερά από δύο εκκινητές - ολιγονουκλεοτίδια (primers). Η αλληλουχία κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA-εκμαγείου. Η αντίδραση περιλαμβάνει 20-40 επαναλαμβανόμενους κύκλους. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του εκμαγείου – DNA (DNA denaturation).

Στο πρώτο στάδιο, σε υψηλή θερμοκρασία (94°C- 96°C), γίνεται διάσπαση των δεσμών υδρογόνου της δίκλωνης αλυσίδας DNA με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των 2 συμπληρωματικών μονόκλωνων αλυσίδων DNA (429, 430).

- Υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία – στόχο (primer annealing)

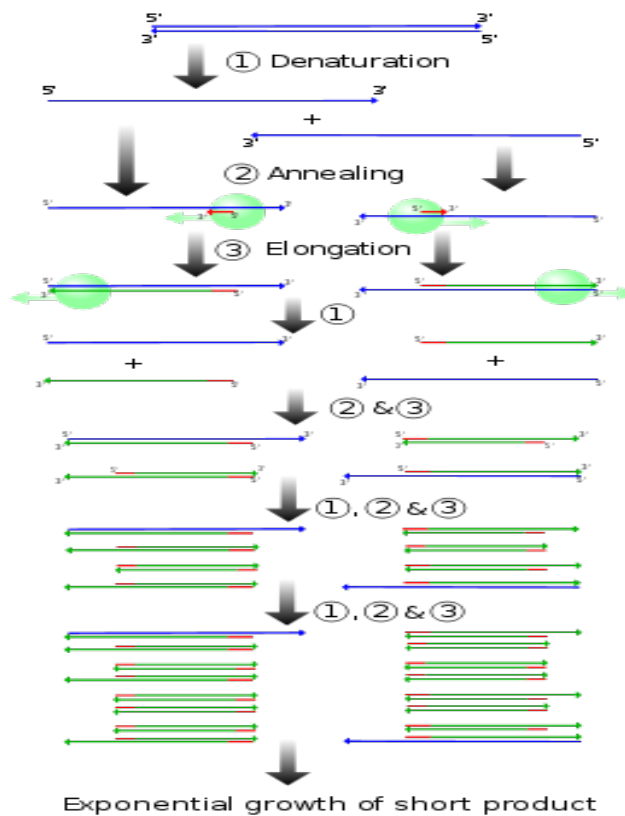
Στο δεύτερο στάδιο, με μείωση της θερμοκρασίας στους 50-65°C, οι εκκινητές υβριδοποιούνται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 18- 30 νουκλεοτιδίων με μη συμπληρωματικές αλληλουχίες, ώστε να μην υβριδίζονται μεταξύ τους. Η αλληλουχία κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς τη μια από τις δύο αλυσίδες του υπό εξέταση DNA. Υπό κανονικές συνθήκες, στη θερμοκρασία των 50°C, οι μονόκλωνες αλυσίδες DNA έχουν την τάση να επανενώνονται μεταξύ τους. Η συγκέντρωση των εκκινητών πρέπει επομένως να είναι τόσο υψηλή ώστε η σύνδεσή τους με την αντίστοιχη μονόκλωνη αλυσίδα να γίνεται πιο γρήγορα από την επανασύνδεση εκμαγείου- εκμαγείου. Από την άλλη πλευρά όμως, όταν η συγκέντρωση των εκκινητών είναι πολύ υψηλή, αυξάνει η πιθανότητα να δημιουργηθούν μη ομόλογοι (τυχαίοι) υβριδισμοί μεταξύ των εκκινητών και του DNA, με αποτέλεσμα να προκύπτουν DNA παραπροϊόντα.

- Επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA με 5'→3' προσανατολισμό.

Με επώαση στους 60-75°C και με τη δράση DNA πολυμερασών γίνεται η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων DNA με 5'→3' κατεύθυνση, μέχρι οι DNA πολυμεράσες να φτάσουν στο άκρο κάθε μονόκλωνης αλυσίδας DNA. Αρχικά ως ένζυμο της PCR χρησιμοποιήθηκε ένα τμήμα του μορίου της DNA πολυμεράσης της *E. coli*, το "τμήμα Klenow" (Klenow fragment). Η αδρανοποίηση του ενζύμου αυτού σε υψηλές θερμοκρασίες απαιτούσε την προσθήκη ενζύμου μετά το στάδιο αποδιάταξης σε κάθε κύκλο, γεγονός χρονοβόρο και αντιοικονομικό. Το πρόβλημα αυτό λύθηκε με την ανακάλυψη

και χρήση της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, της Taq πολυμεράσης, που απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Το ένζυμο αυτό διαθέτει μόνο 5'→3' και όχι 3'→5' εξωνουκλεοτιδική δράση. Η καλύτερη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου είναι 75-80⁰ C (431, 432).

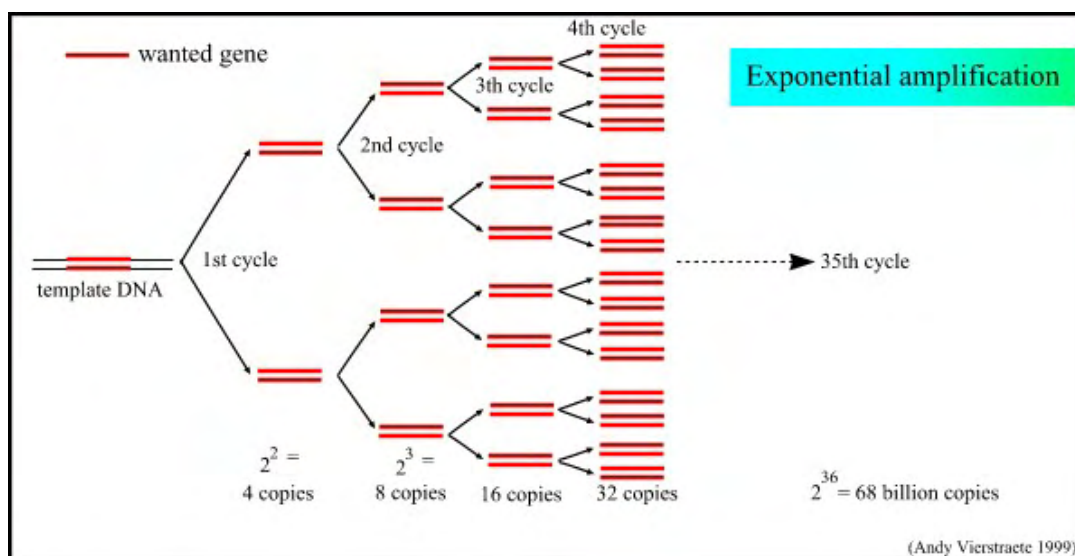
Η πιστότητα (fidelity) του ενζύμου, δηλαδή η σύνθεση DNA απόλυτα συμπληρωματικού προς το εκμαγείο, εξαρτάται από τη συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων στην αντίδραση, από τη συγκέντρωση ιόντων Mg²⁺, το μήκος του τμήματος DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε, τον αριθμό των κύκλων της PCR και τη θερμοκρασία σύνδεσης εκκινητή - εκμαγείου.



Εικόνα 52. Σχεδιάγραμμα επαναλαμβανόμενων κύκλων PCR. (1) Αποδιάταξη στους 94–96 °C. (2) Υβριδισμός εκκινητών στους ~65 °C (3) Επιμήκυνση και σύνθεση DNA στους 72°C. Απεικονίζονται 4 κύκλοι. Με μπλε γραμμές απεικονίζεται το αρχικό μόριο DNA (DNA template) Τα κόκκινα βέλη αναπαριστούν τις αλληλουχίες όπου προσαρμόζονται με υβριδισμό οι **εκκινητές** και ξεκινάει η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA από την **πολυμεράση** (πράσινοι κύκλοι). Μετά από κάθε κύκλο, τα μόρια DNA που προκύπτουν, χρησιμοποιούνται με τη σειρά τους ως καλούπι DNA για τον επόμενο κύκλο της PCR. ([Http://Upload.Wikipedia.Org](http://Upload.Wikipedia.Org)).

Ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης νέων DNA μορίων είναι δυνατό να επαναληφθεί πολλές φορές, στην πράξη όμως 30-40 κύκλοι είναι αρκετοί

για την αποτελεσματική ενίσχυση του DNA θραύσματος. Μετά από n κύκλους το προϊόν PCR περιέχει 2^n δίκλινα μόρια DNA που είναι αντίγραφα της αλληλουχίας που ορίζεται από τους εκκινητές (433).



Εικόνα 53 Εκθετική αύξηση της αλληλουχίας στόχου (434).

Ρυθμιστικοί παράγοντες:

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

1. επιλογή κατάλληλων εκκινητών
2. προσδιορισμό κατάλληλης θερμοκρασίας πρόσδεσης εκκινητών
3. κατάλληλες συγκεντρώσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και ιόντων Mg^{2+} .

Ρυθμιστικά διαλύματα της PCR αντίδρασης:

Για την PCR αντίδραση χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα που ρυθμίζουν την τιμή του pH και προμηθεύουν τους απαραίτητους συμπαράγοντες και τις σταθεροποιητικές ουσίες, που εξασφαλίζουν τη μέγιστη αποδοτικότητα..

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της PCR μεθόδου είναι ότι παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μικρό χρονικό διάστημα και ότι η αντίδραση αυτή μπορεί να γίνει ακόμη

και με τη χρήση ελάχιστης ποσότητας γενομικού DNA ή πολύ κακής ποιότητας (κατακερματισμένο DNA).

2.2.6 Επιλεκτική ενίσχυση αλληλουχιών του *KRAS* γονιδίου

Πραγματοποιήθηκε επιλεκτική ενίσχυση του εξονίου 2 του *KRAS* γονιδίου, προκειμένου τα δείγματά μας να ελεγχθούν για την ύπαρξη μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12, 13, που καλύπτουν ποσοστό >90% του συνόλου των γνωστών μεταλλάξεων. Χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί 5'→3' εκκινητές. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία κάθε εκκινητή, παρατίθεται στη συνέχεια:

Πρόσθιος εκκινητής 12a: 5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3' 30nts

Ανάστροφος εκκινητής 12b: 5'-TCAAAGAATGGTCCTGGACC-3' 20nts

Υλικά

- Γενομικό DNA (50-100 ng)
- Ζεύγος εκκινητών (12a, 12b), αρχικής συγκέντρωσης 10 pmoles/μl, 10x Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου αρχικής συγκέντρωσης 10X (Invitrogen, Life Technologies)
- Διάλυμα MgCl₂ αρχικής συγκέντρωσης 50 mM
- Ταq DNA πολυμεράση αρχικής συγκέντρωσης 5u/μl
- Μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) αρχικής συγκέντρωσης 40 mM
- ddH₂O

Πρωτόκολλο PCR αντίδρασης

- Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf 0,2 ml και σε τελικό όγκο 50 μl προστίθενται:

10X ρυθμιστικό διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 1X	= 5,0 μl
Διάλυμα MgCl ₂ τελικής συγκέντρωσης 2.0 mM	= 2,0 μl
Εκκινητής 12a τελικής συγκέντρωσης 0,4 μM	= 2,0 μl
Εκκινητής 12b τελικής συγκέντρωσης 0,4 μM	= 2,0 μl
dNTPs τελικής συγκέντρωσης 1,6 mM	= 2,0 μl
Τaq DNA πολυμεράση 2.0 units	= 0,4 μl
Συνολικός όγκος μίγματος αντιδραστηρίων	= 13,4 μl
- Προσθήκη περίπου 5- 7 μl γενομικού DNA
- Συμπλήρωση του όγκου με ddH₂O, μέχρι τα 50 μl

Η ποσότητα DNA κάθε δείγματος υπολογίζεται με βάση τη συγκέντρωσή του, όπως αυτή υπολογίζεται μετά τη φωτομέτρηση, ώστε να εξασφαλίσουμε 50-100 ng/αντίδραση.

Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας (Non Template Control, NTC) προκειμένου να ελεγχθούν τυχόν επιμολύνσεις κατά την PCR αντίδραση. Η PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή τύπου MJR σύμφωνα με τις ακόλουθες συνθήκες:

Στάδιο 1 : Αρχική Αποδιάταξη στους 94°C 10 λεπτά

Στάδιο 2: 94°C για 1 λεπτό (αποδιάταξη)

Στάδιο 3: 52°C για 1 λεπτό (πρόσδεση εκκινητών)

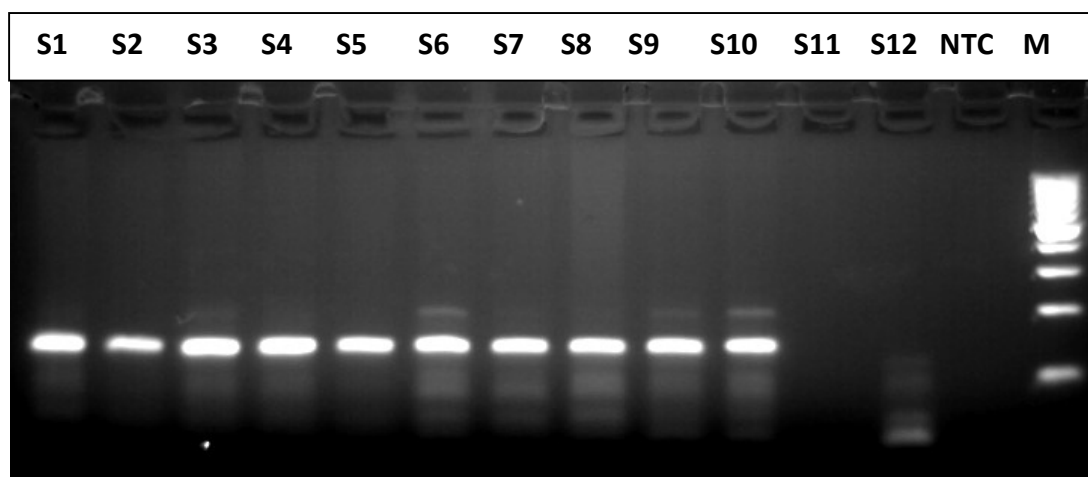
Στάδιο 4: 72°C για 2 λεπτά (επιμήκυνση)

Στάδιο 5: 72°C για 10 λεπτά

Στάδιο 6: 4°C διατήρηση

} X 30 κύκλοι

Τα PCR προϊόντα ελέγχονται στη συνέχεια σε πήκτωμα αγαρόζης 3% με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου και υπεριώδους ακτινοβολίας. Κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται μάρτυρας γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους προκειμένου να εκτιμηθεί η επιτυχής ενίσχυση των PCR προϊόντων (Εικ. 54).



Εικόνα 54. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. M, μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, 100 bp (Invitrogen, Life Technologies), NTC: αρνητικός μάρτυρας, S1-S12: Δείγματα που ενισχύθηκαν επιλεκτικά για το εξόνιο 2 του KRAS γονιδίου.

2.2.7 Επιλεκτική ενίσχυση αλληλουχιών του *BRAF* γονιδίου

Πρόσθιος εκκινητής BF: 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3' 23 nts
Ανάστροφος εκκινητής BR1: 5'-GGCCAAAATTTAATCAGTGGA-3' 21 nts

Πρωτόκολλο PCR αντίδρασης

- Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf 0,2 ml και σε τελικό όγκο 50 μl προστίθενται:

10x ρυθμιστικό διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 1x	= 5,0 μl
Διάλυμα MgCl ₂ τελικής συγκέντρωσης 2.0 mM	= 2,0 μl
Εκκινητής BF τελικής συγκέντρωσης 0,4 μM	= 2,0 μl
Εκκινητής BR1 τελικής συγκέντρωσης 0,4 μM	= 2,0 μl
dNTPs τελικής συγκέντρωσης 1,6 mM	= 2,0 μl
Taq DNA πολυμεράση 2.0 units	= 0,4 μl
Συνολικός όγκος μίγματος αντιδραστηρίων	=13,4 μl

- Προσθήκη 5- 7 μl γενομικού DNA
- Συμπλήρωση του όγκου με ddH₂O, μέχρι τα 50 μl.

Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας (Non Template Control, NTC) προκειμένου να ελεγχθούν τυχόν επιμολύνσεις κατά την PCR αντίδραση. Η PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή τύπου MJR σύμφωνα με τις ακόλουθες συνθήκες:

Στάδιο 1: Αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 10 λεπτά

Στάδιο 2: 94°C για 1 λεπτό (αποδιάταξη)

Στάδιο 3: 52°C για 1 λεπτό (πρόσδεση εκκινητών)

Στάδιο 4: 72°C για 2 λεπτά (επιμήκυνση)

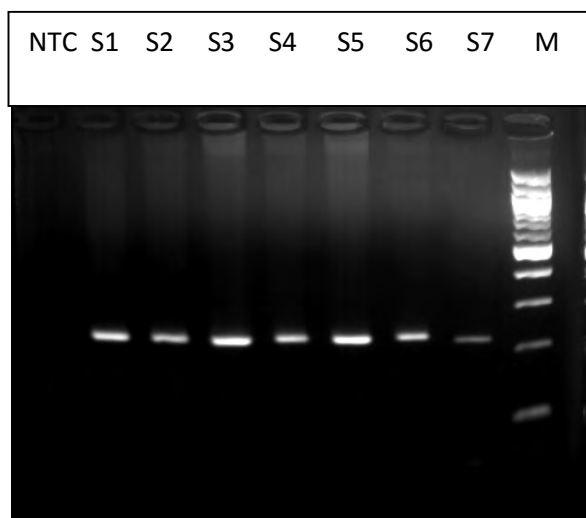
Στάδιο 5: 72°C για 10 λεπτά

Στάδιο 6: 4°C διατήρηση

} X 30 κύκλοι

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 3% με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου και υπεριώδους ακτινοβολίας. Κατά την

ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται μάρτυρας γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους προκειμένου να εκτιμηθεί η επιτυχής ενίσχυση των PCR προϊόντων (Εικ. 55).



Εικόνα 55 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. M, μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, 100 bp (Invitrogen, Life Technologies), NTC: αρνητικός μάρτυρας, S1-S7: Δείγματα που ενισχύθηκαν επιλεκτικά για το εξόνιο 15 του BRAF γονιδίου.

2.2.8 Ανίχνευση μεταλλάξεων με τη μέθοδο πολυμορφισμών μεγέθους περιοριστικού τμήματος.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες στο δίκλωνο DNA και τέμνουν μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν μήκος συνήθως 4-8 νουκλεοτίδια, που συχνά είναι παλίνδρομα, «διαβάζονται» δηλαδή το ίδιο και προς τις δύο κατευθύνσεις του DNA.

Η χρήση κατάλληλων περιοριστικών ενδονουκλεασών επιτρέπει: α) τη χαρτογράφηση ενός συγκεκριμένου DNA μορίου με βάση τον εντοπισμό των θέσεων αναγνώρισης ενός ή πολλαπλών ενζύμων, β) τη δυνατότητα σύνδεσης (ligation) DNA τμημάτων, που περιέχουν τα ίδια προεξέχοντα άκρα μεταξύ τους, ακόμη κι αν αυτά προέρχονται από διαφορετικά δείγματα (π.χ. με μόρια φορείς-vectors), που μπορούν να αναπαράγονται σε συγκεκριμένο ξενιστή παρέχοντας πολλά αντίγραφα της υπό μελέτης αλληλουχίας (κλωνοποίηση).

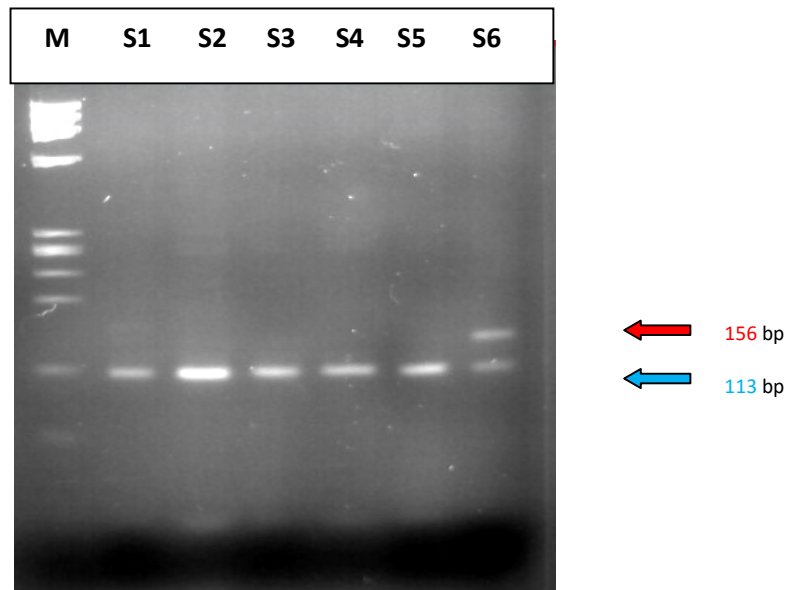
Η ανάδειξη της παρουσίας σημειακών μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του KRAS γονιδίου καθίσταται δυνατή με την εισαγωγή μιας μη ομόλογης βάσης στον 12α εκκινητή, που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας θέσης στο κωδικόνιο 12 που αναγνωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση *BstNI*. Η έλλειψη ενδογενών θέσεων αναγνώρισης από άλλες ενδονουκλεάσες στο κωδικόνιο 12 του KRAS γονιδίου αποκλείει την ψευδή ανεύρεση μεταλλάξεων.

Πρωτόκολλο επώασης με την περιοριστική ενδονουκλεάση BstNI:

10x ρυθμιστικό διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 1X	= 6,00 μl
BstNI ένζυμο (30 units/αντίδραση)	= 3, 00 μl
Συνολικός όγκος μίγματος αντιδραστηρίων	= 9,00 μl

- Προσθήκη 20-25 μl προϊόντος PCR
- Συμπλήρωση του όγκου με ddH₂O, μέχρι τα 60 μl
- Επώαση στους 60°C για > 16 ώρες

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση του προϊόντος επώασης σε πήκτωμα αγαρόζης 3% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (Εικ. 56). Η ηλεκτροφόρηση έγινε παρουσία μάρτυρα γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους (ΦΧ174DNA-HaeIII ladder, New England Biolabs Inc).



Εικόνα 56. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων επώασης με το ένζυμο BstNI σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. M, μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους ΦΧ174DNA-HaeIII ladder (New England Biolabs Inc), S1-S5: Δείγματα που φέρουν τη φυσιολογική αλληλουχία στο κωδικόνιο 12 του εξονίου 2 του KRAS γονιδίου, S6: Δείγμα που φέρει σε ετεροζυγωτία κάποια μετάλλαξη στο κωδικόνιο 12 του εξονίου 2 του KRAS γονιδίου.

2.2.9 Ανάλυση της αλληλουχίας της πρωτοταγούς δομής του DNA με τη μέθοδο Sanger (Sequence analysis)

Οι αλληλουχίες των υπο εξέταση περιοχών των KRAS και BRAF γονιδίων, που ενισχύθηκαν επιλεκτικά με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), ταυτοποιήθηκαν περαιτέρω με ανάλυση της αλληλουχίας της πρωτοταγούς δομής του DNA των δειγμάτων που εξετάστηκαν.

Καθαρίσαμε από τυχόν προσμίξεις τα υποψήφια προς ανάλυση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας PCR προϊόντα με το QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των καθαρισμένων PCR προϊόντων (2 μ L/δείγμα) σε πήκτωμα αγαρόζης 3%, παρουσία μάρτυρα γνωστού μεγέθους και μοριακού βάρους. Έγινε εκτίμηση της συγκέντρωσης του καθαρισμένου PCR προϊόντος σε συνάρτηση με το μοριακό βάρος (ng) του μάρτυρα και υπολογισμός του όγκου (μ L) που θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί για κάθε δείγμα, ώστε να έχουμε συγκέντρωση 10 ng/αντίδραση για κάθε δείγμα.

Ο υπολογισμός των αντιδραστηρίων της αντίδρασης τελικού όγκου 20 μ L γίνεται ως εξής:

Αντιδραστήρια	Καθαρισμένο PCR προϊόν	5X ρυθμιστικό διάλυμα	BigDye Terminator Dye v3.1 χρωστική	Εκκινητής	H ₂ O	T.V.
Ποσότητα	X μ l	2 μ l	4 μ l	1 μ l	Ψ μ l	20 μ l

Οι συνθήκες της PCR για την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας είναι οι εξής:

1. Αρχική αποδιάταξη: 96⁰C για 1 λεπτό
2. 25 κύκλοι με τα ακόλουθα στάδια:
 - Αποδιάταξη: 96⁰C για 20 δευτερόλεπτα
 - Υβριδισμός εκκινητών: 50⁰C για 5 δευτερόλεπτα
 - Επιμήκυνση : 60⁰C για 60 δευτερόλεπτα
3. Διατήρηση στους 4⁰C

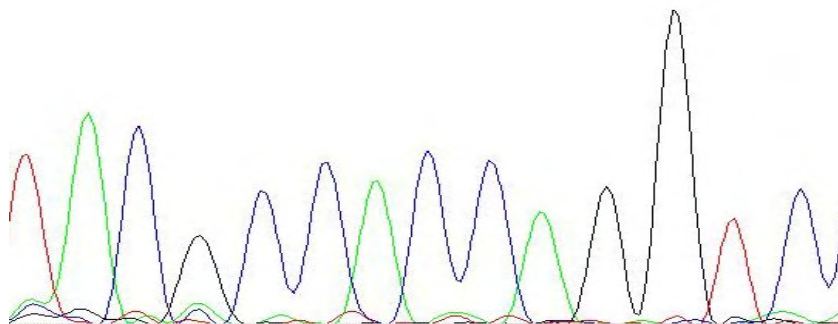
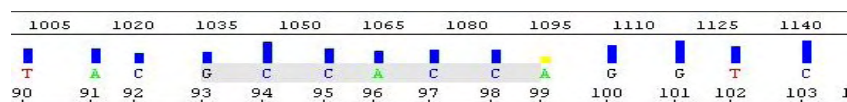
Ακολουθεί φόρτωμα των δειγμάτων σε κατάλληλη πλάκα 96 θέσεων (plate) και καθαρισμός των προϊόντων για απομάκρυνση περίσσειας της χρωστικής, εκκινητών, δεοξυριβονουκλεοτιδίων και αλάτων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το

αντιδραστήριο BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) και η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

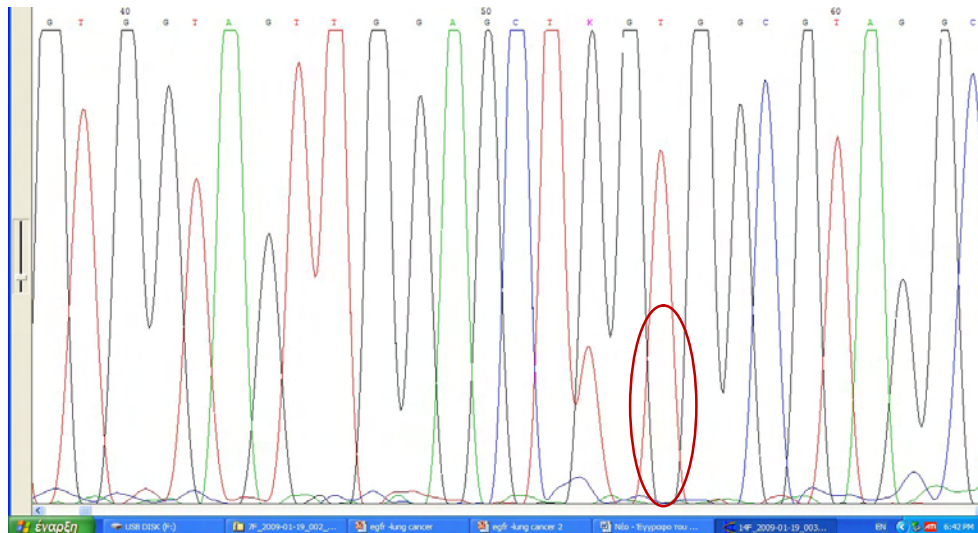
Σε κάθε PCR προϊόν που προυπήρχε στην πλάκα των 96 θέσεων (plate) προστέθηκαν:

1. 20 μl/αντίδραση διαλύματος (XTerminator), το οποίο δεσμεύει εκκινητές που δεν ενσωματώθηκαν κατά την προηγούμενη αντίδραση και τα ελεύθερα άλατα
2. 90 μl/αντίδραση διαλύματος καθαρισμού (SAM solution)
3. Ανάδευση
4. Καλή ανακίνηση για 30 λεπτά στις 1400 στροφές (rpm) σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Φυγοκέντρηση στις 3500 στροφές (rpm) για 2 λεπτά.
6. Τοποθέτηση της πλάκας σε γενετικό αναλυτή ABI 3500 (Applied Biosystems, Life Technologies, USA).

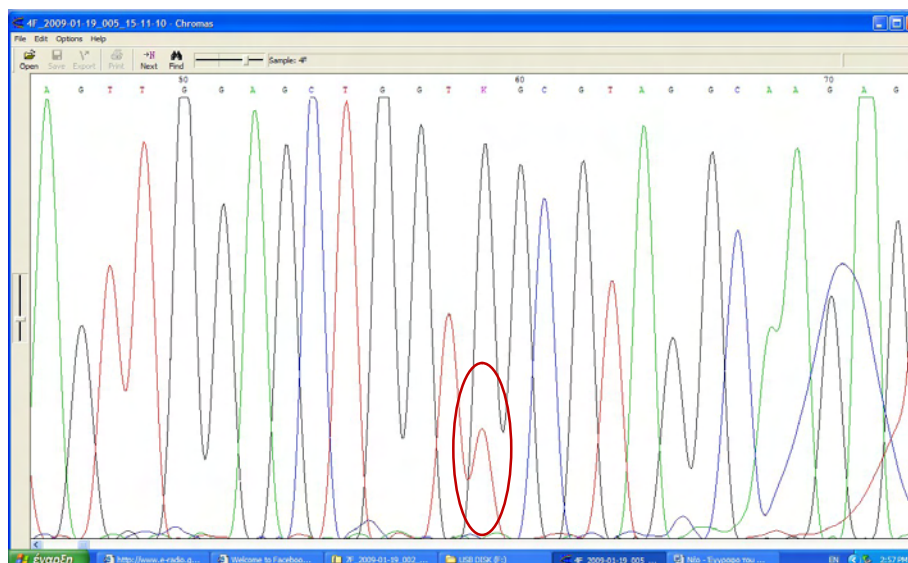
Στη συνέχεια, με τη χρήση του κατάλληλου λογισμικού προγράμματος έγινε η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των δειγμάτων και η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων στα γονίδια που εξετάστηκαν (Εικ. 57, 58, 59, 60, 61).



Εικόνα 57. Φυσιολογική αλληλουχία των κωδικονίων 12, 13 του εξονίου 2 του ογκογονιδίου KRAS. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με ανάστροφο (reverse) εκκινητή.



Εικόνα 58. Μεταλλαγμένη αλληλουχία (c.34 G>T) στο κωδικόνιο 12 που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.Gly12Cys, στο εξόνιο 2 του KRAS γονιδίου. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με πρόσθιο (forward) εκκινητή.



Εικόνα 59. Μεταλλαγμένη αλληλουχία (c.37 G>T) στο κωδικόνιο 13 που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.Gly13Cys, στο εξόνιο 2 του KRAS γονιδίου.

αφαιρεθούν εύκολα κατά τη διαδικασία απομόνωσής του. Για την αναστολή των RNAσών χρησιμοποιούνται διαλύματα που περιέχουν γουανιδίνιο, το οποίο όμως μπορεί να προκαλέσει σημαντικές βλάβες σε άλλα μόρια. Η επεξεργασία του RNA απαιτεί γενικά μεγάλη προσοχή (στείρο περιβάλλον, διαλύματα RNase-free, γάντια, χαμηλές θερμοκρασίες κλπ). Οι φρέσκοι ή κατεψυγμένοι (fresh-frozen) ιστοί είναι καταλληλότεροι, σε σχέση με τους μονιμοποιημένους σε φορμόλη ιστούς, για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων-στόχων καθώς εξασφαλίζουν καλύτερη ποιότητα και ποσότητα RNA μορίων.

2.3.1 Τεχνική απομόνωσης RNA

Πρωτόκολλο

1. Τμήμα του κατεψυγμένου ιστού τεμαχίζεται με χειρουργικό νυστέρι και τοποθετείται σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου falcon χωρητικότητας 50 ml.
2. Προσθήκη 4 ml διαλύματος λύσης RNA (Trizol) και ομογενοποίηση.
3. Προσθήκη ποσότητας χλωροφορμίου ίσης με 1/10 του όγκου του διαλύματος.
4. Καλή ανακίνηση (vortex) για 15 λεπτά.
5. Φυγοκέντρηση στους 4⁰C στις 12000 στροφές (rpm) για 15 λεπτά.
6. Αφαίρεση του υπερκείμενου διαυγούς διαλύματος, που περιέχει το RNA και μεταφορά σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf χωρητικότητας 2 ml.
7. Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπυλικής αλκοόλης και κατακρήμνιση του RNA με φύλαξη στους -20⁰C για 24 ώρες.
8. Την επόμενη μέρα ακολουθεί φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 12000 στροφές (rpm) για 30 λεπτά.
9. Αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος, και προσθήκη 1ml διαλύματος 70% αιθανόλης.
10. φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 12000 στροφές (rpm) για 20 λεπτά.
11. Επανάληψη των σταδίων 9, 10.
12. Μετά τη φυγοκέντρηση αφαιρείται το υπερκείμενο. Στο ίζημα περιέχεται το RNA. Αφήνεται να στεγνώσει, ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη.

13. Προσθήκη δις απεσταγμένου νερού (ddH₂O) ελεύθερου από RNAσες και διαλυτοποίηση του RNA.
14. Φύλαξη του RNA στους -80°C.

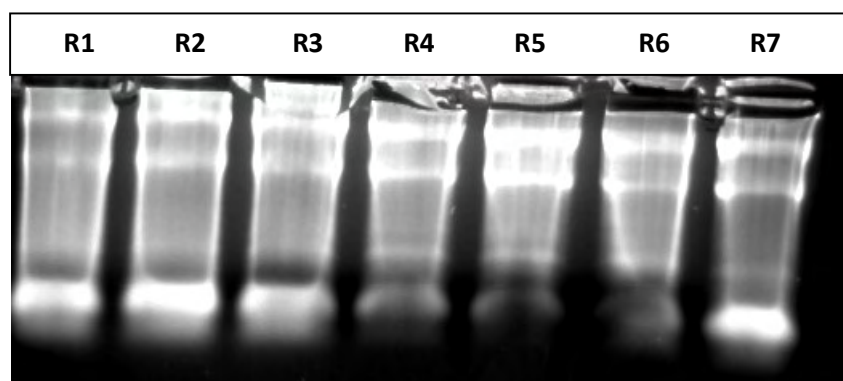
2.3.2 Φωτομέτρηση RNA

Σε μήκος κύματος 260 nm, η μία μονάδα οπτικής πυκνότητας (O.D.) για τα RNA μόρια ισοδυναμεί με συγκέντρωση 40 µg RNA/ml. Επομένως, η συγκέντρωση των RNA δειγμάτων υπολογίζεται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Συγκέντρωση RNA (}\mu\text{g/ml)} = \text{αραιώση} \times 40 \times \text{τιμή } OD_{260}$$

2.3.3 Ηλεκτροφόρηση RNA

Για την εκτίμηση της ποιότητας του RNA πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% με διαδικασία αντίστοιχη με αυτή που ακολουθείται για την ηλεκτροφόρηση DNA (Εικ. 62).



Εικόνα 62. Ηλεκτροφόρηση RNA δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

2.3.4 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η μεταγραφή του RNA σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) γίνεται μέσω της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT), με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase, RTase). Η τελευταία είναι ένα ένζυμο, το οποίο χρησιμοποιώντας ως καλούπι RNA μόρια, σχηματίζει συμπληρωματικά μόρια DNA. Αρχικά, χρησιμοποιούνται μόρια κατάλληλου εκκινητή στα οποία η πολυμεράση προσθέτει τα συμπληρωματικά προς το RNA δεοξυριβονουκλεοτίδια για τη δημιουργία του cDNA. Οι εκκινητές που

χρησιμοποιούνται για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής μπορούν να διακριθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες: τα τυχαία εξαμερή, τα ολιγομερή δεοξυθυμιδίνης και οι ειδικοί ως προς συγκεκριμένα γονίδια εκκινητές.

Στην παρούσα μελέτη, για τη σύνθεση του συμπληρωματικού cDNA από το RNA που απομονώθηκε από τους ιστούς, χρησιμοποιήθηκε το Transcription First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, version 6.0).

Πρωτόκολλο

1ο στάδιο:

Σε αποστειρωμένο σωληνάριο erpendorf χωρητικότητας 0,2 ml τοποθετείται:

- Δείγμα ολικού RNA (1 µg)
- Δις απεσταγμένο νερό ελεύθερο από RNασες (ddH₂O)

Η αναλογία RNA/ddH₂O καθορίστηκε με βάση τη συγκέντρωση του RNA, ώστε η τελική ποσότητα να είναι 1µg και ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 11 µl.

- Εκκινητής: 2 µl (τυχαία εξαμερή, random hexamer primers)

Το πρώτο στάδιο σύνθεσης cDNA περιλαμβάνει επώαση των ανωτέρω δειγμάτων σε θερμικό κυκλοποιητή τύπου MJR, σε θερμοκρασία 65⁰C για 5 λεπτά, με σκοπό την την πρόσδεση του εκκινητή. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται άμεσα σε πάγο και ακολουθεί το 2^ο στάδιο, κατά το οποίο φτιάχνεται και προστίθεται το κύριο μίγμα αντιδραστηρίων:

- 5X ρυθμιστικό διάλυμα: 4 µl
- Αντίστροφη μεταγραφάση: 0.5 µl
- Μίγμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs συγκέντρωσης 10mM): 2 µl
- Αναστολέας RNασών: 0.5 µl

Το παραπάνω μίγμα προστίθεται στο αρχικό και στη συνέχεια τα δείγματα επανατοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή τύπου MJR. Το δεύτερο στάδιο σύνθεσης cDNA περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 25⁰C για 10 λεπτά
- 50⁰C για 60 λεπτά
- 85⁰C για 5 λεπτά

- 4°C για διατήρηση

2.3.5 Έλεγχος της ποιότητας των cDNA δειγμάτων

Ο έλεγχος της ποιότητας των cDNA δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με συμβατική PCR για το γονίδιο RARα. Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί τον υποδοχέα α του ρετινοϊκού οξέος και εκφράζεται στην πλειοψηφία των κυττάρων. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη αντίδραση είναι οι εξής:

Εκκινητής	5' → 3' αλληλουχία
Πρόσθιος (Forward) Rar6:	GGTGCCTCCCTACGCCTTCT
Ανάστροφος (Reverse) Rar8:	GGCGCTGACCCCATAGTGGT

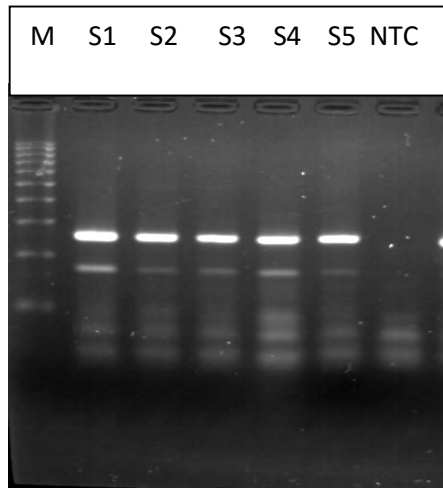
Πρωτόκολλο αντίδρασης PCR

Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf χωρητικότητας 0,2 ml προστίθεται μίγμα αντιδραστηρίων που παρασκευάζεται ως εξής:

10X Ρυθμιστικό διάλυμα	= 5,00 μl
Διάλυμα MgCl ₂ τελικής συγκέντρωσης 2.5mM	= 2, 00 μl
Πρόσθιος εκκινητής Rar6	= 2, 00 μl
Ανάστροφος εκκινητής Rar8	= 2, 00 μl
dNTPs τελικής συγκέντρωσης 800μM	= 1, 00 μl
Taq DNA πολυμεράση 2.5 units	= 0, 30 μl
Συνολικός όγκος διαλύματος	= 12,30 μl

- Προσθήκη 5 μl δείγματος cDNA
- Προσθήκη 32.7 μl H₂O, έτσι ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50 μl.

Στο τέλος κάθε PCR αντίδρασης, τα προϊόντα ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3% με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου και υπεριώδη ακτινοβολία, παρουσία μάρτυρα με γνωστό μέγεθος και μοριακό βάρος. Το αναμενόμενο μέγεθος του PCR προϊόντος είναι 286 ζεύγη βάσεων (Εικ. 63)



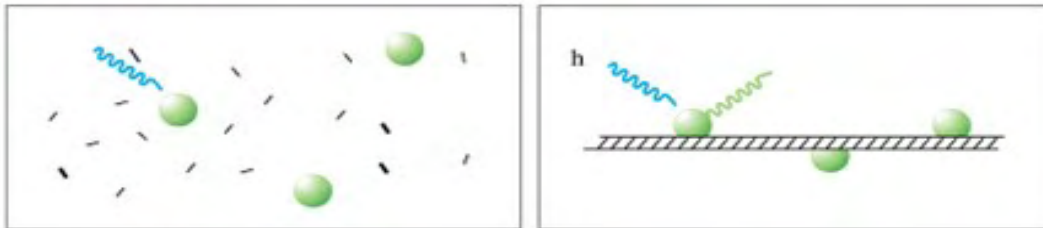
Εικόνα 63. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. M, μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, 100 bp (Invitrogen, Life Technologies), NTC: αρνητικός μάρτυρας, S1-S5: Δείγματα που ενισχύθηκαν επιλεκτικά για το γονίδιο του υποδοχέα α του ρετινοϊκού οξέος (RARα).

2.4 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative Real Time- Polymerase Chain Reaction, qRT- PCR)

Η μέθοδος της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) ακολουθεί τη βασική αρχή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, με τη διαφορά ότι εδώ το προϊόν της αντίδρασης μπορεί να ανιχνευθεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, σε *πραγματικό χρόνο*, σε αντίθεση με τη συμβατική PCR, όπου η ανίχνευση του προϊόντος είναι δυνατή μετά το τέλος της αντίδρασης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση φθορίζουσων χρωστικών ή σημασμένων ιχνηθετών και στη μέτρηση της έντασης του φθορισμού που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Σήμερα, είναι διαθέσιμες τρεις κύριες παραλλαγές τεχνικών PCR πραγματικού χρόνου (RQ-PCR) (Εικ. 64):

- ❑ Ανάλυση με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I
- ❑ Ανάλυση με ανιχνευτές υβριδισμού (Hybprobes)
- ❑ Ανάλυση με ανιχνευτές υδρόλυσης

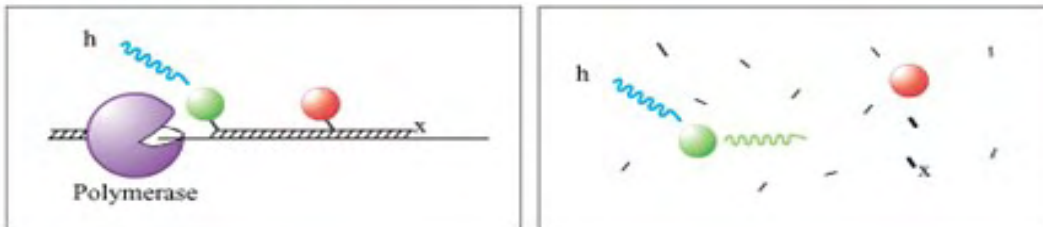
I. SYBR Green



II. Hybridization Probes



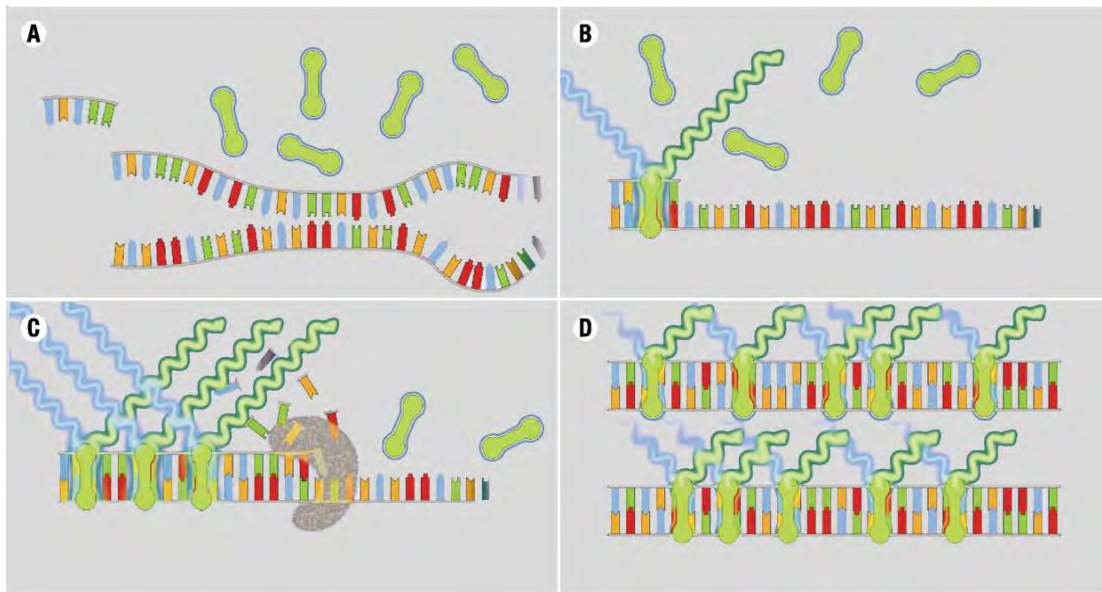
III. TaqMan Probes



Εικόνα 64: Παραλλαγές PCR πραγματικού χρόνου. I. Χρωστική SYBR Green. II. Ανιχνευτές υβριδισμού. III. Ανιχνευτές υδρόλυσης.

2.4.1 Ανάλυση RQ-PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I

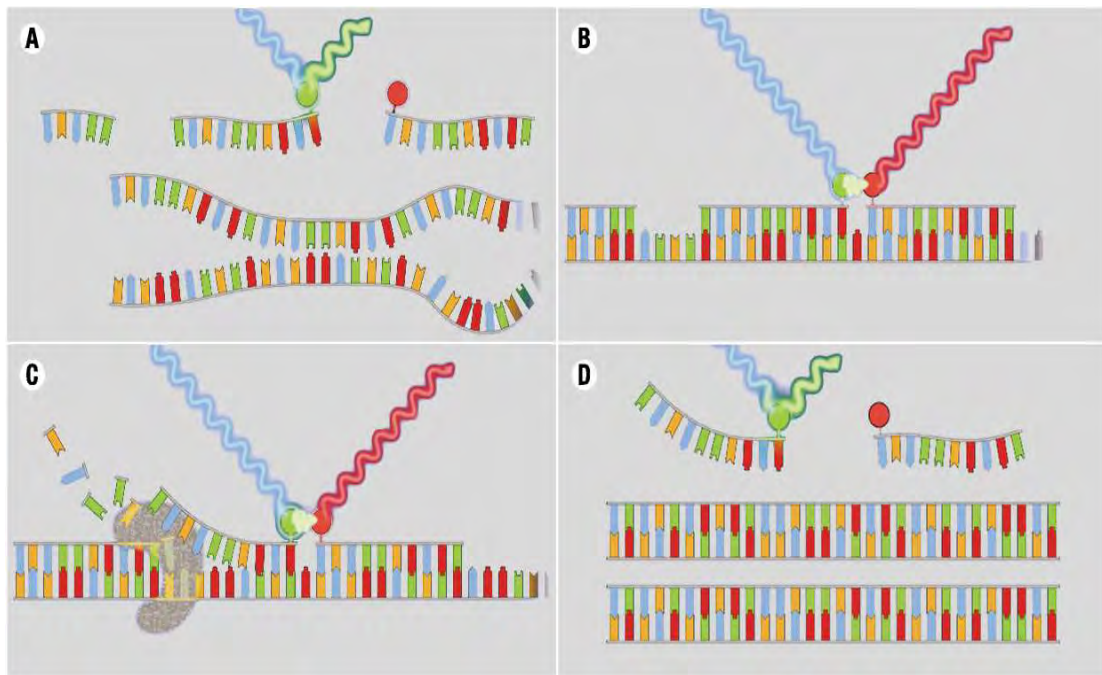
Η απλούστερη τεχνική RQ-PCR βασίζεται στην ανίχνευση των προϊόντων της PCR μετά την ενσωμάτωση της χρωστικής SYBR Green I στο DNA. Η χρωστική αυτή να προσδένεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA, όπου ενισχύει σημαντικά τον φθορισμό του (Εικ. 65). Το σήμα φθορισμού αυξάνει σταδιακά κατά τη διάρκεια της φάσης επιμήκυνσης, γίνεται μέγιστο στο τέλος κάθε αντίστοιχης φάσης και μειώνεται ή εκλείπει κατά τη φάση αποδιάταξης. Ωστόσο, αυτή η τεχνική δεν παρουσιάζει απόλυτη εξειδίκευση και ταυτόχρονα μπορεί ν' ανιχνευθούν διμερή των εκκινητών και μη ειδικά προϊόντα PCR. Προκειμένου να εκτιμηθεί αν έχουν σχηματιστεί ειδικά προϊόντα PCR, πραγματοποιείται ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve) (435).



Εικόνα 65: Η χρωστική SYBR Green I παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και εκπέμπει φθορισμό που ανιχνεύεται από το μηχάνημα.

2.4.2 Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης

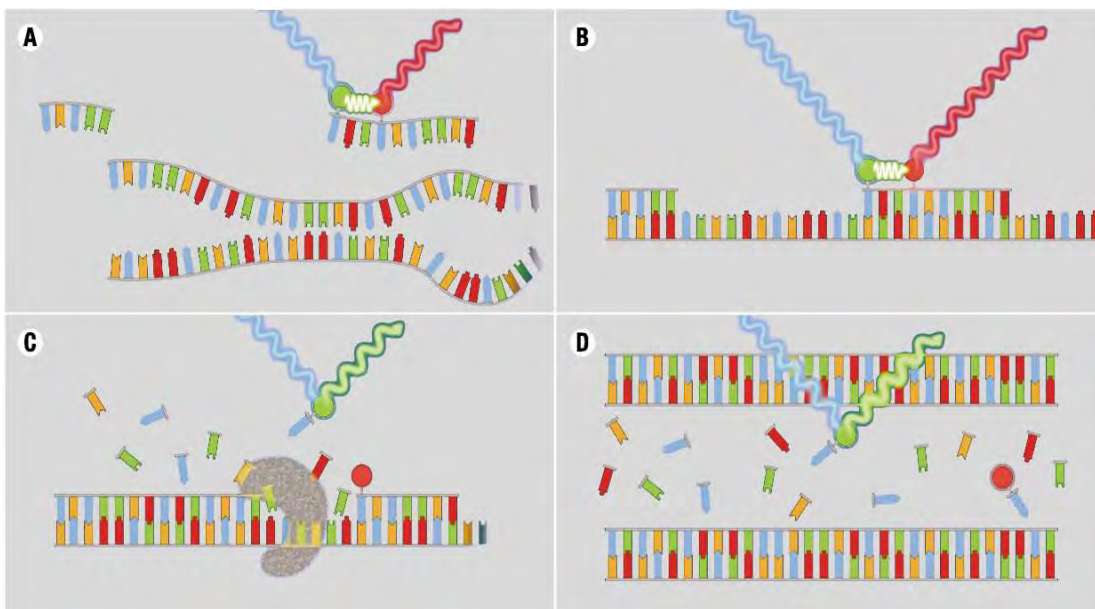
Η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης (hydrolysis probes) εκμεταλλεύεται την 5'→3' ενεργότητα εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης για ν' ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει τα ειδικά προϊόντα PCR που παράγονται καθώς εξελίσσεται η αντίδραση. Ο ανιχνευτής υδρόλυσης είναι συζευγμένος με ένα φθορισμόχρωμα αναφοράς (π.χ. FAM, VIC ή JOE) και μ' έναν καταστολέα φθορισμοχρώματος (π.χ. TAMRA), ο οποίος θα βρίσκεται μέσα στην αλληλουχία-στόχο. Καθώς τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται σε μικρή απόσταση, όσο ο ανιχνευτής είναι άθικτος, ο φθορισμός που εκπέμπεται από το φθορισμόχρωμα αναφοράς απορροφάται από τον καταστολέα φθορισμού. Για το λόγο αυτό, κατά την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου, ο ανιχνευτής υδρόλυσης αντικαθίσταται αρχικά από την αλυσίδα DNA μέσω της Taq πολυμεράσης και σταδιακά υδρολύεται από αυτή λόγω της ενεργότητας εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό του φθορισμοχρώματος αναφοράς και του καταστολέα του και επιτρέπει τη σταδιακή ανίχνευση του φθορισμού που επέμπει το φθορισμόχρωμα αναφοράς (Εικ. 66) (435).



Εικόνα 66: Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υδρόλυσης.

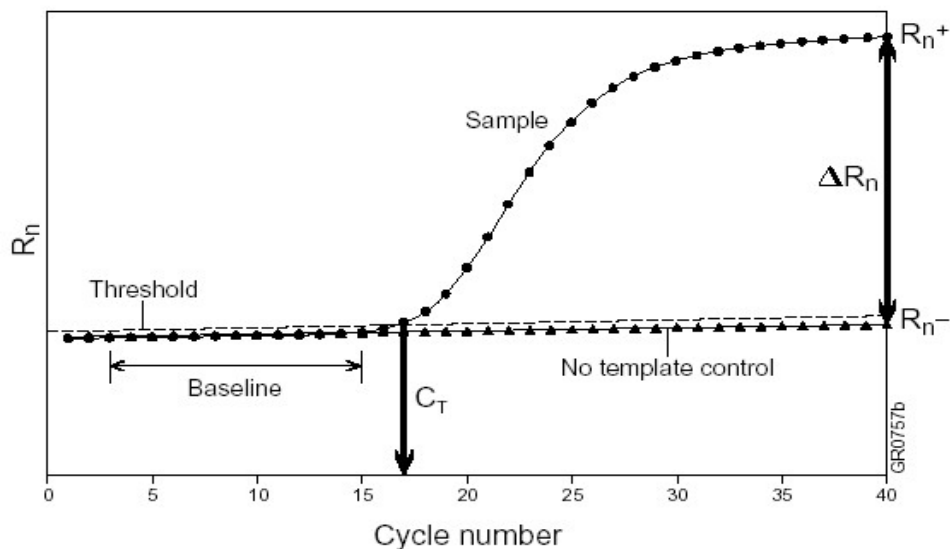
2.4.3 Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού

Η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτή υβριδισμού χρησιμοποιεί δύο αλληλοεπικαλυπτόμενους ανιχνευτές συγκεκριμένης αλληλουχίας, ο ένας σημασμένος στο 3' άκρο μ' ένα φθορισμόχρωμα-δότη (π.χ. FAM) και ο άλλος σημασμένος στο 5' άκρο μ' ένα φθορισμόχρωμα-δέκτη (π.χ. LC Red 640, LC Red 705). Οι δύο ανιχνευτές υβριδίζονται σε γειτονικές αλληλουχίες-στόχους στο πολυμερισμένο τμήμα DNA: έτσι τα δύο φθορισμοχρώματα συμπλησιάζουν (η απόσταση μεταξύ τους κυμαίνεται από 1-5 νουκλεοτίδια). Κατά τη διέγερση του φθορισμοχρώματος-δότη, εκπέμπεται ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος. Όταν τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται κοντά, το φως που εκπέμπεται από τον δότη θα διεγείρει το φθορισμόχρωμα-δέκτη, διαδικασία που αναφέρεται και ως μεταφορά συντονισμένης ενέργειας φθορισμού (fluorescence resonance energy transfer, FRET). Αυτό οδηγεί σε εκπομπή του φθορισμού, ο οποίος ανιχνεύεται κατά το στάδιο υβριδοποίησης και στο πρώτο μέρος του σταδίου επιμήκυνσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (Εικ. 67) (435- 437).



Εικόνα 67: Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υβριδισμού.

Σε όλους τους προαναφερόμενους τύπους RQ-PCR ανάλυσης η ένταση του σήματος φθορισμού αυξάνει εκθετικά κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Με βάση την ένταση του φθορισμού χωρίς ειδικότητα (background), καθορίστηκε το διαχωριστικό σημείο ή ουδός (cut-off level) για τον ειδικό φθορισμό. Αυτό το όριο (ή γραμμή μετάπτωσης) χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί ο κύκλος μετάπτωσης (Ct) κάθε δείγματος, που είναι ο κύκλος της αντίδρασης PCR στον οποίο ο φθορισμός υπερβαίνει για πρώτη φορά τον ουδό μετάβασης. Η τιμή μετάπτωσης είναι ευθέως ανάλογη προς το ποσό της αλληλουχίας-στόχου που περιέχεται στο δείγμα (Εικ. 68) (438- 439).



Εικόνα 68: Ανίχνευση του σήματος φθορισμού. Το σημείο κατά το οποίο το κάθε δείγμα εισέρχεται στην εκθετική φάση της αντίδρασης ορίζεται ως το “κατώφλι” μεταβολής του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος (Threshold Cycle ή C_T), είναι στατιστικά σημαντικό και αποτυπώνεται (μετράται) ως σήμα φθορισμού. Η μεταβολή αυτή της συγκέντρωσης γίνεται σε συγκεκριμένο κύκλο και εξαρτάται απόλυτα από την αρχική συγκέντρωση του κάθε δείγματος.

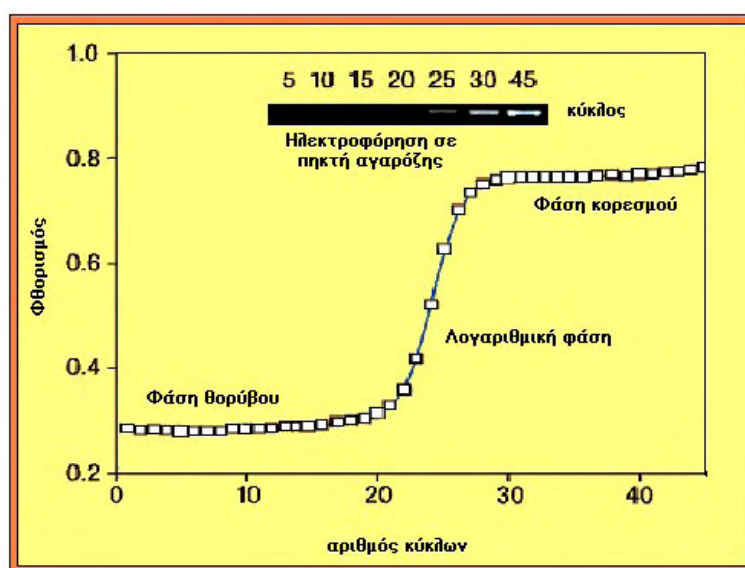
Στους πρώτους κύκλους της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού, το φθορίζον σήμα που εκπέμπεται είναι χαμηλό και δεν μπορεί να ξεχωρίσει από το αντίστοιχο σήμα του υποβάθρου του συστήματος. Η φάση αυτή είναι γνωστή με τον όρο «φάση υποβάθρου» ή «φάση θορύβου» (background phase). Μόλις συσσωρευτεί επαρκής ποσότητα προϊόντος και το αντίστοιχο σήμα ξεπεράσει το σήμα του υποβάθρου του συστήματος, ξεκινά η φάση της «εκθετικής ανάπτυξης» ή « λογαριθμική- γραμμική φάση» (exponential growth phase, log-linear phase) της αντίδρασης. Στη λογαριθμική φάση, η απόδοση της αντίδρασης είναι η μέγιστη δυνατή καθώς, σε ιδανικές συνθήκες, έχουμε το διπλασιασμό του προϊόντος σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Ακολουθεί η «γραμμική φάση» της αντίδρασης (linear phase), όπου πλέον παρατηρείται σταδιακή μείωση της απόδοσης της αντίδρασης λόγω της υπερβολικής συγκέντρωσης του προϊόντος και εν μέρει της αποικοδόμησης του. Τελικά επέρχεται η «φάση κορεσμού» (plateau) λόγω της μείωσης της διαθεσιμότητας των απαραίτητων αντιδραστηρίων και της δραστηκότητας της πολυμεράσης.

Σε αντίθεση με την ανάλυση στη φάση κορεσμού, η ανάλυση στην λογαριθμική- γραμμική φάση είναι περισσότερο ακριβής και μπορεί να περιγραφεί από τη σχέση:

$$N = N_0 \times E^n$$

όπου **N**: η τελική συγκέντρωση του προϊόντος της αντίδρασης, **N₀**: η αρχική συγκέντρωση του προϊόντος, **E**: η απόδοση της αντίδρασης (efficiency) και **n**: ο αριθμός των κύκλων της PCR.

Θεωρητικά, η μέγιστη τιμή της απόδοσης της αντίδρασης είναι 2, όταν δηλαδή το προϊόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού. Στην πραγματικότητα όμως η τιμή της είναι μικρότερη του 2, καθώς επηρεάζεται σημαντικά από τις συνθήκες του πειράματος, όπως η θερμοκρασία, η χρονική διάρκεια και οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων. Εντούτοις, στην αρχή της λογαριθμικής φάσης η απόδοση της αντίδρασης διατηρείται σταθερή για 2-5 κύκλους και μπορεί να υπολογιστεί με τη βοήθεια πρότυπων συγκεντρώσεων. Σε αντίθεση με συμβατικές μεθόδους όπως η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, η συνεχής παρακολούθηση της έντασης του φθορισμού καθιστά δυνατή την αναγνώριση αυτών των κύκλων (Εικ. 69) (Overview of LightCycler quantification methods. Roche Molecular Biochemicals, Technical Note No. LC 10/2000.)



Εικόνα 69. Παρακολούθηση των τριών φάσεων της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου και σύγκριση με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης της συμβατικής αντίδρασης PCR σε αντίστοιχο αριθμό κύκλων.

Ένα δείγμα μπορεί να θεωρηθεί θετικό, εάν η ελάχιστη τιμή μετάπτωσης ενός ή περισσότερων αντιγράφων του δείγματος αυτού είναι καθαρά εκτός κλίμακας των τιμών μετάπτωσης των αρνητικών δειγμάτων (π.χ. τουλάχιστον κατά έναν κύκλο χαμηλότερα από την κατώτερη ένδειξη που παρουσιάζει ένα μη ειδικά πολυμερισμένο δείγμα) και σε ορισμένη απόσταση (π.χ. τέσσερις κύκλοι) από το

τελικό στάδιο διάλυσης που χρησιμοποιείται για να εξασφαλίσει μέγιστη ευαισθησία.

Ένα δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό, εφόσον δεν παρατηρείται καθόλου ενίσχυση και όταν η κατώτερη τιμή μετάπτωσης του συγκεκριμένου δείγματος βρίσκεται εντός ή κοντά στην κλίμακα τιμών μετάπτωσης των αρνητικών δειγμάτων.

2.4.4 Σχετική και απόλυτη ποσοτικοποίηση

Με τη μέθοδο της qRT-PCR, οι τιμές της έντασης του φθορισμού που καταγράφονται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης αντιπροσωπεύουν την ποσότητα του προϊόντος που έχει παραχθεί στο συγκεκριμένο κύκλο της αντίδρασης. Ως **σημείο διέλευσης** (crossing point, **Cp**) ενός δείγματος, ορίζεται το σημείο εκείνο της αντίδρασης, όπου το σήμα φθορισμού του προϊόντος ξεπερνά το αντίστοιχο σήμα του υποβάθρου. Είναι προφανές ότι όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του υποστρώματος με την οποία ξεκινά η αντίδραση, τόσο μικρότερος αριθμός κύκλων θα απαιτείται για να φθάσει το αντίστοιχο δείγμα στο σημείο διέλευσης. Επομένως, το σημείο διέλευσης (Cp) ενός δείγματος και οι κύκλοι που απαιτούνται για να φτάσει σε αυτό είναι αντιστρόφως ανάλογα της αρχικής ποσότητας του γενετικού υλικού (DNA/ RNA ή cDNA) του δείγματος.

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι ανάλυσης με την qRT-PCR: η «σχετική» ποσοτικοποίηση και η ποσοτικοποίηση μέσω «πρότυπης καμπύλης» που καλείται επίσης και «απόλυτη» ποσοτικοποίηση (440).

Στη σχετική ποσοτικοποίηση γίνεται σύγκριση ανάμεσα στο δείγμα (DNA ή cDNA) που αφορά το γονίδιο που μας ενδιαφέρει και στο αντίστοιχο δείγμα, που χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς. Για να ληφθεί μια στρογγυλοποιημένη τιμή για κάθε δείγμα, διαιρείται η συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου που μας ενδιαφέρει προς τη συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς. Ο λόγος που προκύπτει είναι ο αριθμός των μεταγράφων του υπό μελέτη γονιδίου ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (441).

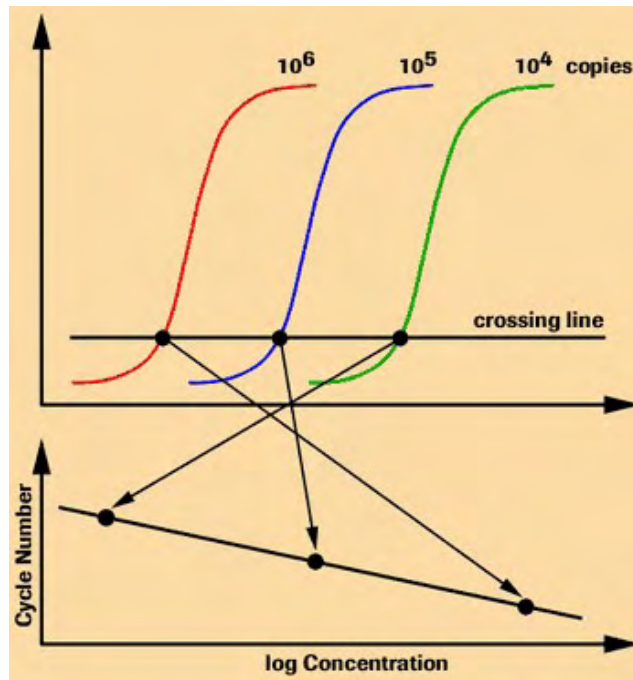
Η μέθοδος ποσοτικοποίησης με τη χρήση πρότυπης καμπύλης εφαρμόζεται επιτυχώς για να μετρηθεί μικρός αριθμός γονιδίων σε λίγα ή πολλά δείγματα καθώς και για να μετρηθεί ο αριθμός των ιικών αντιγράφων σ' ένα δεδομένο δείγμα. Για να ποσοτικοποιηθούν οι στόχοι στα δείγματα υπό μελέτη, κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη (standard curve) με διαδοχικές αραιώσεις (πενταπλάσια ή δεκαπλάσια διαδοχική αραιώση) γνωστών δειγμάτων, συνήθως πλασμιδιακού DNA που φέρει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει (442).

2.4.4.1 Απόλυτη ποσοτικοποίηση

Σύμφωνα με την τεχνική της απόλυτης ποσοτικοποίησης, οι τιμές της έντασης του φθορισμού, που λαμβάνονται κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης των προϊόντων της αντίδρασης, χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των δεδομένων ποσοτικοποίησης των δειγμάτων που μετέχουν στην αντίδραση. Πρόκειται για μια μέθοδο ποσοτικής ανάλυσης, η οποία για να καθορίσει τη συγκέντρωση των εξεταζόμενων δειγμάτων χρησιμοποιεί μια πρότυπη καμπύλη δειγμάτων με γνωστές αρχικές συγκεντρώσεις.

Όπως προαναφέρθηκε, η ποσότητα ενός δείγματος κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής- γραμμικής φάσης εξαρτάται από την αρχική ποσότητα του γενετικού υλικού του δείγματος, την απόδοση της αντίδρασης και τους κύκλους αυτής. Το σημείο διέλευσης, C_p , για κάθε δείγμα είναι ανάλογο της αρχικής του ποσότητας σε γενετικό υλικό κι επομένως μικρότερες τιμές C_p αντιστοιχούν σε δείγματα με μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση γενετικού υλικού.

Εάν χρησιμοποιηθούν πρότυπα δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις είναι δυνατόν να υπολογισθεί με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων η εξίσωση του διαγράμματος βαθμονόμησης $\log C$ ως προς το C_p σημείο και να γίνει ο υπολογισμός της απόδοσης E της αντίδρασης σύμφωνα με τον τύπο $E = 10^{-1 / κλίση}$ (Εικ. 70). Με βάση το διάγραμμα βαθμονόμησης μπορεί να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια ο ποσοτικός προσδιορισμός του αρχικού γενετικού υλικού στα άγνωστα δείγματα.



Εικόνα 70. Η αρχή της μεθόδου της απόλυτης ποσοτικοποίησης. Στον άξονα Χ σημειώνονται οι τιμές των λογαρίθμων των αρχικών συγκεντρώσεων (log concentration), ενώ στον άξονα Ψ σημειώνονται οι κύκλοι της αντίδρασης που αντιστοιχούν στα σημεία διέλευσης (C_p) των δειγμάτων.

2.4.4.2 Σχετική ποσοτικοποίηση

Πρόκειται για μια μέθοδο συγκριτικής ποσοτικοποίησης, καθώς συγκρίνονται τα επίπεδα έκφρασης δυο διαφορετικών γονιδίων σε κάθε δείγμα. Το ένα γονίδιο είναι το γονίδιο-στόχος που θέλουμε να μελετήσουμε (target gene), ενώ το άλλο γονίδιο αφορά σε γονίδιο αναφοράς (reference gene), το οποίο εμφανίζει σταθερή έκφραση στο συγκεκριμένο ιστό που μελετάμε. Το τελικό αποτέλεσμα της μεταξύ τους σύγκρισης δίνεται με τη μορφή του λόγου των συγκεντρώσεων των δυο γονιδίων για κάθε δείγμα της μελέτης. Με τη διαίρεση της συγκέντρωσης του γονιδίου-στόχου κάθε δείγματος προς την αντίστοιχη συγκέντρωση του γονιδίου-αναφοράς για το ίδιο δείγμα, η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης επιτυγχάνει τη διόρθωση της ενδεχόμενης ποιοτικής και ποσοτικής ετερογένειας που προκαλείται στα δείγματα εξαιτίας:

- Αποκλίσεων στις αρχικές ποσότητες των δειγμάτων
- Αποκλίσεων στην ανάκτηση του νουκλεϊκού οξέος
- Πιθανής αποδόμησης των δειγμάτων RNA
- Διαφορών ως προς την ποιότητα του γενετικού υλικού των δειγμάτων

- Αποκλίσεων σε σφάλματα φόρτωσης των δειγμάτων
- Αποκλίσεων στην αποδοτικότητα της σύνθεσης του cDNA

Το λογισμικό του συστήματος LightCycler 480, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή, προσφέρει δυο διαφορετικά μοντέλα ανάλυσης όσον αφορά τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης: τη βασική (basic analysis) και τη σύνθετη ανάλυση (advanced analysis). Η πρώτη χρησιμοποιεί τη μέθοδο σύγκρισης $\Delta\Delta C_T$ (μέθοδος σύγκρισης των C_T), ενώ η δεύτερη γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο της σχετικής πρότυπης καμπύλης, όπως περιγράφεται αναλυτικότερα στη συνέχεια.

Η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης στηρίζεται στην υπόθεση ότι η συγκέντρωση του γενετικού υλικού στο σημείο διέλευσης C_p (εκφράζεται σε κύκλους αντίδρασης) είναι κοινή για όλα τα δείγματα που περιέχουν το ίδιο γονίδιο- στόχο. Είναι προφανές ότι για κάθε δείγμα που μελετάμε απαιτείται διαφορετικός αριθμός κύκλων αντίδρασης πολυμερισμού ώστε να φτάσει το δείγμα στο C_p σημείο, ανάλογα με την αρχική ποσότητα του γενετικού υλικού που περιέχει. Στο τέλος του πειράματος, η συγκέντρωση κάθε δείγματος μπορεί να ποικίλει, ανάλογα με τους κύκλους που συμπληρώθηκαν μετά το σημείο τομής της αντίδρασης.

Το συγκεκριμένο μοντέλο ανάλυσης χρησιμοποιεί το σημείο διέλευσης των δειγμάτων (C_p), την αποδοτικότητα της αντίδρασης, τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης που ολοκληρώθηκαν, καθώς και άλλες παραμέτρους, ώστε να καθορίσει το μέγεθος της αύξησης της συγκέντρωσης του γενετικού υλικού κάθε δείγματος στο τέλος της ενίσχυσης των δειγμάτων. Οι παραπάνω υπολογισμοί χρησιμοποιούνται τόσο για το γονίδιο- στόχο όσο και για το γονίδιο αναφοράς με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία των αντίστοιχων λόγων.

Γονίδιο αναφοράς της β_2 - μικροσφαιρίνης (B_2M)

Όπως προαναφέρθηκε, στη σχετική ποσοτικοποίηση η έκφραση του γονιδίου-στόχου υπολογίζεται σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση ενός σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου- αναφοράς (reference gene, housekeeping gene). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η κανονικοποίηση της ποσοτικοποίησης του γονιδίου-στόχου και εκτιμάται η συγκέντρωση του γενετικού υλικού των εξεταζόμενων δειγμάτων.

Στην παρούσα μελέτη ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε αρχικά το γονίδιο της β_2 - μικροσφαιρίνης (beta-2-microglobulin, β_2M). Το συγκεκριμένο γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 15 και κωδικοποιεί τη β_2 - μικροσφαιρίνη, την ελαφρά β άλυσο των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC I).

Το συγκεκριμένο γονίδιο χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς καθώς παρουσιάζει μέτρια επίπεδα έκφρασης (1,000 – 10,000 μόρια ανά κύτταρο) και σύμφωνα με προυπάρχουσα βιβλιογραφία είναι σταθερά εκφραζόμενο και δεν επηρεάζεται από παραμέτρους όπως το στάδιο της νόσου ή την προέλευση του δείγματος (φυσιολογικός ιστός, αδένωμα ή καρκινικές αλλοιώσεις) (443-444).

2.4.5 Πειραματικό μέρος

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα ποσοτικοποίησης των mRNA μεταγράφων των εξεταζόμενων γονιδίων ο αναλυτής LightCycler 480 της εταιρείας Roche. Τα κύρια στάδια που περιλαμβάνει μια αντίδραση PCR σε πραγματικό χρόνο είναι τα εξής:

- **Προγραμματισμός των πειραματικών συνθηκών:** καθορίστηκε το πειραματικό πρωτόκολλο μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή, συνδεδεμένου με τον αναλυτή LightCycler 480.
- **Προετοιμασία δειγμάτων:** όπως και στη συμβατική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού, στο στάδιο αυτό γίνεται η προετοιμασία του μίγματος και των δειγμάτων της αντίδρασης. Το μίγμα περιλαμβάνει εκτός από τα απαιτούμενα αντιδραστήρια, τους κατάλληλους για τα γονίδια που μελετάμε εκκινητές, καθώς επίσης και τους ειδικά σημασμένους με φθοριοχρώματα ανιχνευτές, που έχουν επιλεγεί για τη συγκεκριμένη αντίδραση. Το τελικό διάλυμα που προκύπτει από το μίγμα της αντίδρασης και το γενετικό υλικό των δειγμάτων διανέμεται σε ειδική πλάκα πολλαπλών θέσεων (96-multiwell plate). Αφού τοποθετηθούν τα δείγματα στις αντίστοιχες θέσεις, η πλάκα καλύπτεται με διαφανή προστατευτική μεμβράνη. Στη συνέχεια, φυγοκεντρείται και τοποθετείται στην ειδική υποδοχή του οργάνου.
- **Ανάλυση αποτελεσμάτων:** μετά το τέλος κάθε πειράματος πραγματοποιείται η επεξεργασία των αντίστοιχων μετρήσεων με τη βοήθεια του λογισμικού του ηλεκτρονικού υπολογιστή του συστήματος και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.4.5.1 Πειραματικό πρωτόκολλο

Με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των *KRAS* και *EGFR* γονιδίων. Οι συνθήκες διεξαγωγής των αντίστοιχων πειραμάτων είναι οι ακόλουθες:

Πρόγραμμα qRT-PCR για τα γονίδια *KRAS*, *EGFR* και *B₂M*:

Προ-επώαση		1 κύκλος
Θερμοκρασία (°C)	Διατήρηση	Acquisition mode
90	0:10:00	None
Ενίσχυση		45 κύκλοι
Θερμοκρασία (°C)	Διατήρηση	Acquisition mode
95	0:00:10	None
60	0:00:30	Single
72	0:00:01	None
Ψύξη		1 κύκλος
Θερμοκρασία (°C)	Διατήρηση	Acquisition mode
40	0:00:30	None

Οι αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για τα παρακάτω πειράματα σχεδιάστηκαν από την εταιρεία Roche και τα PCR προϊόντα που προκύπτουν από την ενίσχυση έχουν τα ακόλουθα μεγέθη:

- Για το γονίδιο *KRAS* (γονίδιο – στόχος) : 121 ζεύγη βάσεων
- Για το γονίδιο *EGFR* (γονίδιο – στόχος) : 80 ζεύγη βάσεων
- Για το γονίδιο *B₂M* (γονίδιο αναφοράς): 76 ζεύγη βάσεων

Οι αντιδράσεις ποσοτικοποίησης πραγματοποιήθηκαν σε 50 ζεύγη δειγμάτων φυσιολογικού και καρκινικού ιστού ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου. Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το σύνολο των αντιδραστηρίων LightCycler 480 Probes Master (version 9.0) της εταιρείας Roche. Πρόκειται για ένα -έτοιμο προς χρήση- μίγμα αντίδρασης, ειδικά σχεδιασμένο για την ανίχνευση φθορισμού με τη χρήση ανιχνευτών υδρόλυσης. Περιέχει ως ένζυμο πολυμερισμού, τη FastStart Taq DNA πολυμεράση. Το συγκεκριμένο ένζυμο χρησιμοποιείται για *hot start* της αντίδρασης πολυμερισμού, γεγονός που αυξάνει σημαντικά την ειδικότητα και την ευαισθησία της αντίδρασης, καθώς ελαχιστοποιούνται τα μη ειδικά προϊόντα ενίσχυσης. Για την ανίχνευση της συγκέντρωσης της αλληλουχίας- στόχου, στη

συγκεκριμένη τεχνική, χρησιμοποιείται μονήρης 3'- μη επεκτεινόμενος- ανιχνευτής, ο οποίος διασπάται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

Το πρωτόκολλο της αντίδρασης qRT-PCR ήταν κοινό για όλα τα είδη πειραμάτων και υπολογίσθηκε ως εξής:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
cDNA δείγματος	5μl
ddH ₂ O	4 μl
Probes Master Mix	10 μl
Εκκινητές (RealTime ready assay)	1 μl
Συνολικός όγκος αντίδρασης	20μl

2.4.5.2 Κατασκευή πρότυπων καμπυλών

Μετά τον καθορισμό των πειραματικών πρωτοκόλλων και τον κατάλληλο προγραμματισμό του συστήματος, αρχικό βήμα για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αποτέλεσε η κατασκευή πρότυπων καμπυλών τόσο για τα γονίδια-στόχους της μελέτης *KRAS* και *EGFR*, όσο και για το γονίδιο-αναφοράς *B₂M*. Για το σκοπό αυτό, κατασκευάσθηκε πρότυπο διάλυμα (cDNA pool), το οποίο περιείχε ίση ποσότητα cDNA (5 μl) από τα δείγματα του φυσιολογικού ιστού και τα δείγματα του καρκινικού ιστού. Στη συνέχεια, το αρχικό αυτό πρότυπο διάλυμα (cDNA pool), φωτομετρήθηκε και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή του. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν τέσσερις διαδοχικές αραιώσεις 1/10, 1/100, 1/1000 και 1/10000 γνωστής συγκέντρωσης του πρότυπου διαλύματος.

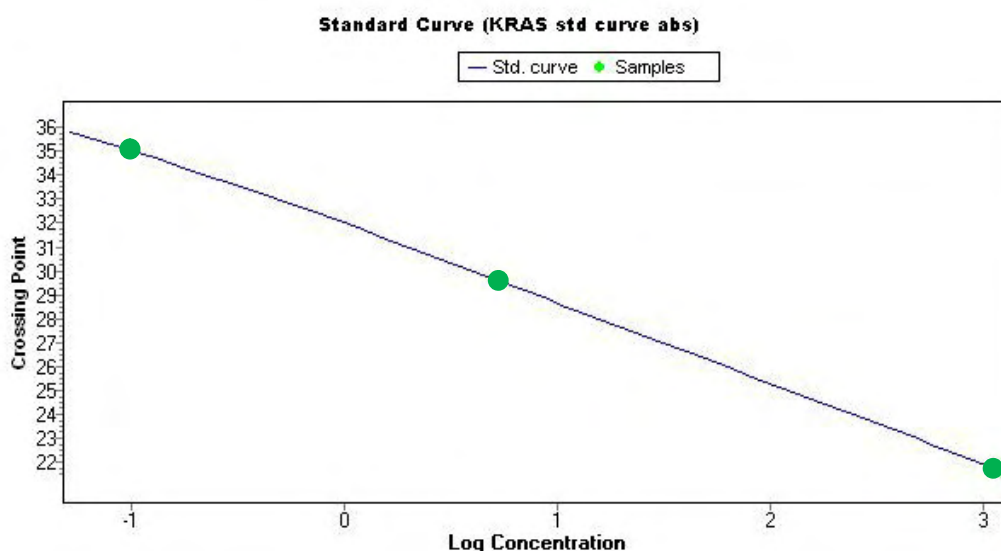
Για τις ανάγκες τόσο της σχετικής όσο και της απόλυτης ποσοτικοποίησης, κατασκευάσθηκαν πρότυπες καμπύλες (για τα γονίδια *KRAS*, *EGFR* και *B₂M*), οι οποίες αποτέλεσαν συνάρτηση της αραιώσης των προτύπων διαλυμάτων και του σημείου διέλευσης C_p των δειγμάτων αυτών (Εικ. 71- 75).

Όλες οι πρότυπες καμπύλες των πειραμάτων υπολογίσθηκαν με βάση το λογισμικό του συστήματος LightCycler 480 και με προϋπόθεση η τιμή της απόδοσης (Efficiency, E) να κυμαίνεται μεταξύ $1.9 < E < 2.1$, ενώ το σφάλμα (Error) να είναι μικρότερο < 0.05 .

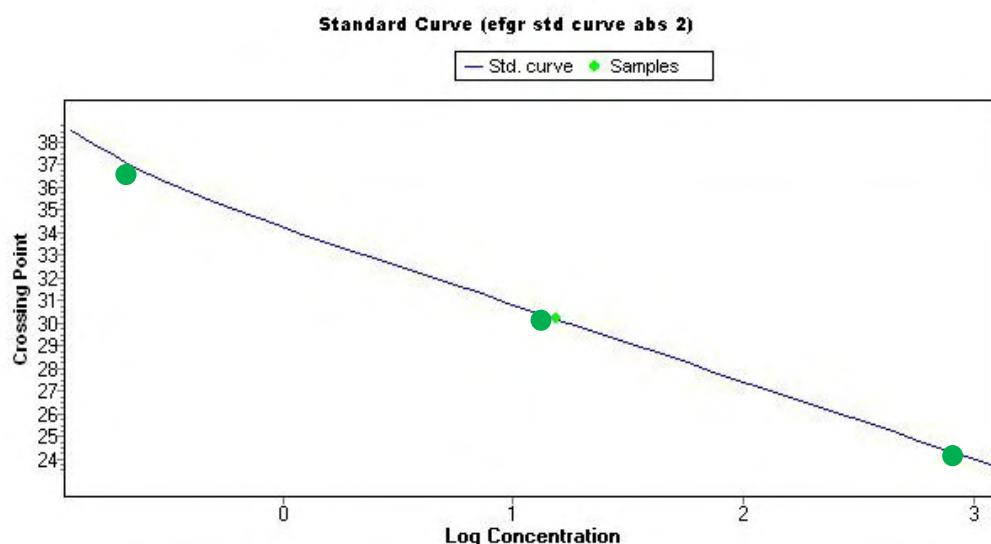
Μετά τον καθορισμό των πρότυπων καμπυλών, πραγματοποιήθηκε η αποθήκευση τους στο λογισμικό του συστήματος, ώστε να είναι δυνατή η ανάκλησή τους κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων που ακολούθησαν.

2.4.5.3 Απόλυτη ποσοτικοποίηση

Για τις ανάγκες της απόλυτης ποσοτικοποίησης της έκφρασης των γονιδίων KRAS και EGFR, οι πρότυπες καμπύλες που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζονται παρακάτω:



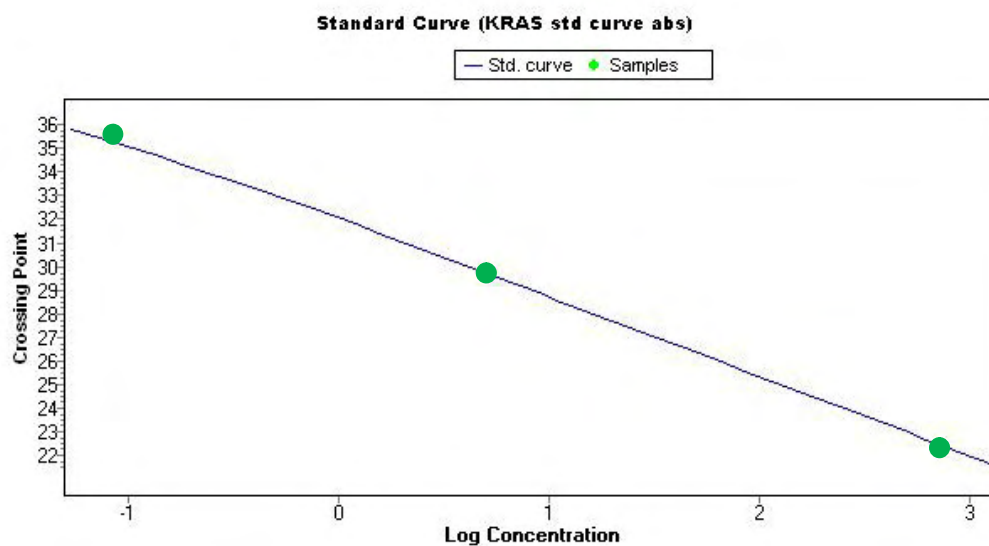
Εικόνα 71. Πρότυπη καμπύλη απόλυτης ποσοτικοποίησης των mRNA μεταγράφων του KRAS γονιδίου.



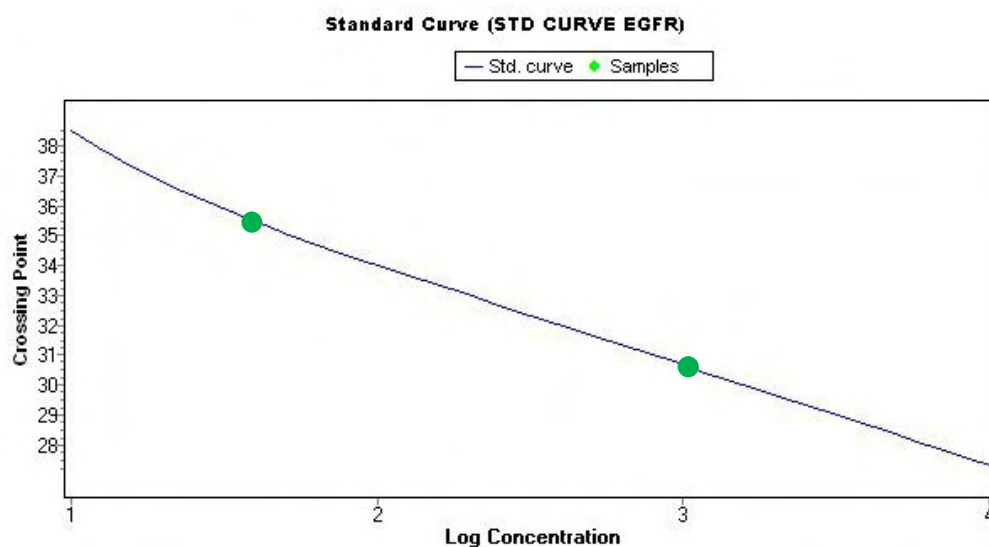
Εικόνα 72. Πρότυπη καμπύλη απόλυτης ποσοτικοποίησης των mRNA μεταγράφων του EGFR γονιδίου.

2.4.5.4 Σχετική ποσοτικοποίηση

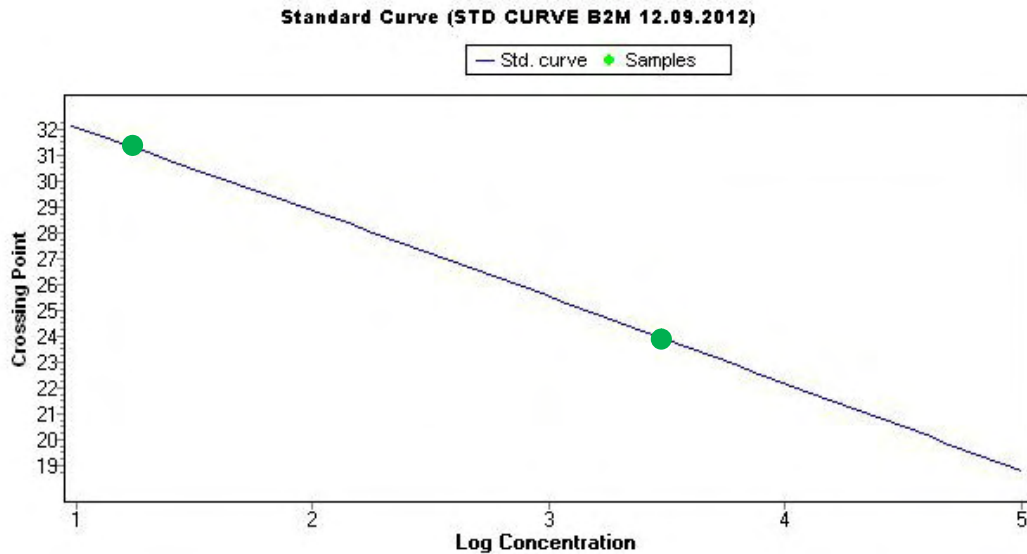
Για τις ανάγκες της σχετικής ποσοτικοποίησης της έκφρασης των γονιδίων KRAS και EGFR, οι πρότυπες καμπύλες που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζονται παρακάτω:



Εικόνα 73. Πρότυπη καμπύλη ποσοτικοποίησης των mRNA μεταγράφων του KRAS γονιδίου.



Εικόνα 74. Πρότυπη καμπύλη ποσοτικοποίησης των mRNA μεταγράφων του EGFR γονιδίου.



Εικόνα 75. Πρότυπη καμπύλη ποσοτικοποίησης των mRNA μεταγράφων του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης.

2.5 Στατιστική ανάλυση

Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσες τιμές (τυπική απόκλιση, Standard Deviation, SD), ενώ οι ποιοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται με τη μορφή απόλυτων και σχετικών συχνοτήτων. Για την αξιολόγηση των συσχετισμών μεταξύ των ποιοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος χ^2 (chi-square test) και η στατιστική σημαντικότητα εκφράστηκε με το p value ($p < 0.05$).

Για την αξιολόγηση των συσχετισμών των επιπέδων έκφρασης, μεταξύ των καρκινικών και των αντίστοιχων φυσιολογικών δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε τόσο μη παραμετρικός έλεγχος (Wilcoxon test), όσο και ο αντίστοιχος παραμετρικός έλεγχος (t- test) για ζευγαρωτές παρατηρήσεις. Όσον αφορά τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των καρκινικών δειγμάτων με βάση διάφορα ποιοτικά χαρακτηριστικά των αντίστοιχων ασθενών χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος t- test (t- test κατά Student για ανεξάρτητα δείγματα).

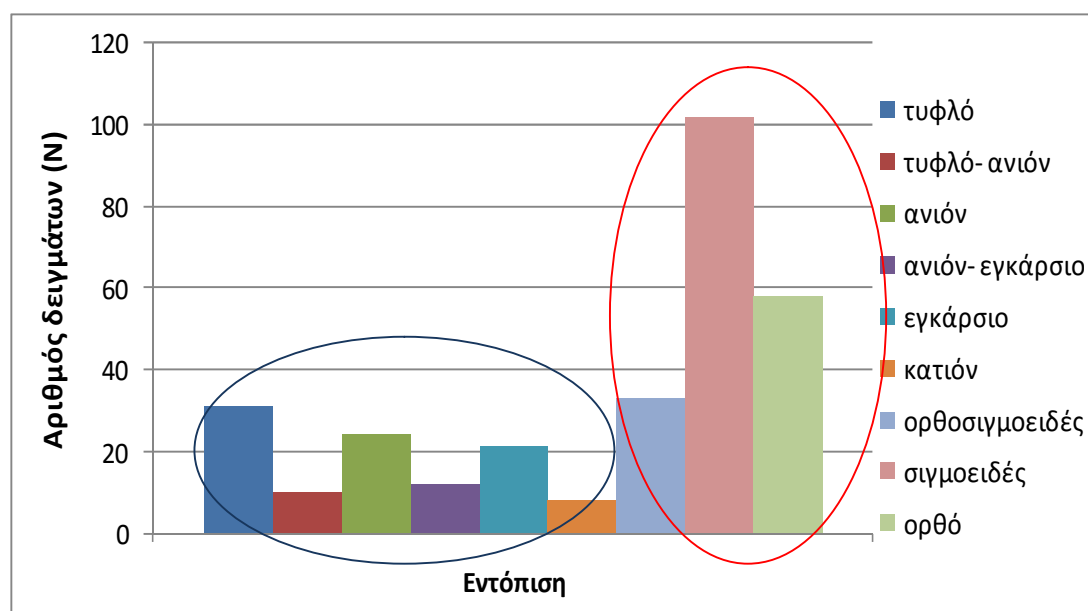
Σε ορισμένες περιπτώσεις αξιολόγησης της συσχέτισης μεταξύ ποσοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε επίσης ο συντελεστής συσχέτισης r (correlation coefficient r) και ο αντίστοιχος έλεγχος σημαντικότητας του r (t- test). Σε όλες τις περιπτώσεις η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε στο $p < 0.05$. Το σύνολο των στατιστικών ελέγχων υπολογίστηκε με τη βοήθεια του Microsoft Office EXCEL 2009.

3. Αποτελέσματα

3.1 Εκτίμηση κλινικο-ιστοπαθολογικών παραμέτρων

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν συνολικά 322 ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, από τους οποίους, οι 180 (56%) ήταν άρρενες και 142 (44%) ήταν θήλειες ασθενείς.

Η μέση ηλικία των ασθενών της μελέτης ήταν 67 έτη (τυπική απόκλιση SD: 10,7 έτη, εύρος: 30- 85). Όσον αφορά στην εντόπιση των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου, το 47,2% των περιπτώσεων (152 ασθενείς) εντοπίστηκε στο αριστερό κόλον, σε ποσοστό 34,5% των περιστατικών (111 ασθενείς) ο πρωτοπαθής όγκος βρισκόταν στο δεξιό κόλον, ενώ σε ποσοστό 18,3% των περιστατικών της μελέτης μας (59 ασθενείς), το ο καρκίνος εντοπίστηκε στο ορθό (Εικ. 76).



Εικόνα 76. Διάγραμμα εντόπισης των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου. Μπλε πλαίσιο: ασθενείς με δεξιά εντόπιση του όγκου. Κόκκινο πλαίσιο: ασθενείς με αριστερή εντόπιση του όγκου, συμπεριλαμβανομένου και του ορθού.

Όσον αφορά στον ιστολογικό τύπο των καρκινωμάτων της μελέτης μας, η πλειοψηφία των ασθενών (90,1%) είχε αδενοκαρκινώματα χωρίς ιδιαίτερους χαρακτήρες και μόλις το 8,1% των καρκινωμάτων ήταν βλενώδη. Από το σύνολο των 322 ασθενών που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή αναγνωρίστηκαν επίσης και σπανιότεροι ιστολογικοί τύποι. Συγκεκριμένα ανιχνεύθηκαν ένα καρκίνωμα με πλακώδη διαφοροποίηση (0.3%) και πέντε καρκινώματα με στοιχεία νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης (1.5%) (Πίνακας 14).

Όσον αφορά στο βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης (grade), 38/322 ασθενείς (12%) είχαν καλής διαφοροποίησης, 202/322 ασθενείς (63%) μέτριας και 39/322 ασθενείς (12%) χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι 43/322 ασθενείς (13%) παρουσίαζε σημαντικού βαθμού ιστολογική ετερογένεια, κυμαινόμενη μεταξύ μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης.

Παράλληλα, μελετήθηκε η παρουσία αγγειακής και περινευρικής διήθησης. Διαπιστώθηκε αγγειακή διήθηση σε 136/322 ασθενείς (42%), ενώ περινευρική διήθηση τεκμηριώθηκε σε ποσοστό 37% των περιστατικών (26/70 ασθενείς).

Όσον αφορά στο βάθος διήθησης του πρωτοπαθούς όγκου (pT), 234/322 ασθενείς (72%) παρουσίαζαν διήθηση όλου του πάχους του τοιχώματος του παχέος εντέρου με συμμετοχή του περικολικού λιπώδους ιστού pT3. Σε 43/322 ασθενείς (13%) ο όγκος διηθούσε το μυϊκό χιτώνα, χωρίς όμως να τον διαπερνά, pT2. Επιπρόσθετα, 38/322 ασθενείς (12%) εμφάνισαν διήθηση του σπλαχνικού περιτοναίου, pT4, ενώ σε μόλις 7/322 ασθενείς (3%), ο όγκος διηθούσε μέχρι τον υποβλεννογόνο χιτώνα, pT1.

Λεμφαδενικές μεταστάσεις εντοπίστηκαν σε 179/322 ασθενείς (55,6%). Οι 102 ασθενείς (31,6%) παρουσίασαν λεμφαδενικές μεταστάσεις σε 1 έως 3 λεμφαδένες (N1, κατά την έβδομη έκδοση του TNM), ενώ σε 77 ασθενείς (24%), οι λεμφαδενικές μεταστάσεις αφορούσαν περισσότερους από τρεις λεμφαδένες (N2).

Παράμετροι	Αριθμός Ατόμων (N)	Συχνότητα (%)
<u>Φύλο</u>		
Άρρενες	180	56%
Θήλειες	142	44%
<u>Εντόπιση</u>		
Δεξιό κόλον	111	34,5%
Αριστερό κόλον	152	47,2%
Ορθό	59	18,3%
<u>Προϋπάρχον αδένωμα</u>		
Παρόν	61	19%
Απόν	261	81%
<u>Ιστολογικός τύπος</u>		
Αδενοκαρκίνωμα, NOS	290	90,1%
Βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα	26	8,1%
Αδενοπλακώδες καρκίνωμα	1	0,3%
Καρκίνωμα με νευροενδοκρινική διαφ/ση	5	1,5%
<u>Ιστολογική βαθμονόμηση</u>		
Καλής διαφοροποίησης (grade 1)	38	12%
Μέτριας διαφοροποίησης (grade 2)	202	63%
Μέτριας έως χαμηλής διαφοροποίησης (grade 2-3)	43	13%

Χαμηλής διαφοροποίησης (grade 3)	39	12%
<u>Αγγειακή διήθηση</u>		
Παρούσα	136	42%
Απούσα	186	58%
<u>Περινευρική διήθηση</u>		
Παρούσα	26	37%
Απούσα	44	63%
<u>Βάθος διήθησης τοιχώματος</u>		
pT1	7	3%
pT2	43	13%
pT3	234	72%
pT4	38	12%
<u>Κατάσταση λεμφαδένων (LN)</u>		
N0: Απουσία μεταστάσεων	143	44,4%
N1: μεταστάσεις σε 1-3 LN	102	31,6%
N2: μεταστάσεις σε ≥ 4 LN	77	24%
<u>Απομακρυσμένες μεταστάσεις</u>		
Απούσες	314	97,5%
Παρούσες	8	2,5%

Πίνακας 14. Κλινικο-ιστοπαθολογικές παράμετροι των ασθενών.

Συγκρίνοντας το φύλο των ασθενών με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου παρατηρήσαμε συσχέτιση του ανδρικού φύλου με το χαμηλό βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης (grade 3), η οποία φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$). Δεν αναδείχθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ του φύλου των ασθενών και των παθολογοανατομικών ευρημάτων των αντίστοιχων όγκων (Πίνακας 15).

	Άρρενες (N)	Θήλειες (N)	χ^2	p
Χαμηλή διαφοροποίηση	28	11	4.76	p<0.05
Καλή διαφοροποίηση	18	20		
Απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων	77	66		ns
Παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων	103	76		
Απουσία αγγειακής διήθησης	104	82		ns
Παρουσία αγγειακής διήθησης	76	60		

Πίνακας 15. Συσχέτιση του φύλου των ασθενών με τα ιστοπαθολογικά ευρήματα των νεοπλασμάτων παχέος εντέρου

Η σύγκριση των αδενοκαρκινωμάτων καλής διαφοροποίησης (grade 1) με τα καρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης (grade 3) ανέδειξε στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με την απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων ($p < 0.005$) και αγγειακής διήθησης ($0.01 < p < 0.025$) (Πίνακες 16, 17).

Καρκινώματα	Απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (N)	Παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (N)	χ^2	p
Grade 1	25	13	8.09	$p < 0.005$
Grade 3	13	26		

Πίνακας 16. Συσχέτιση του βαθμού ιστολογικής διαφοροποίησης και της παρουσίας/απουσίας λεμφαδένων.

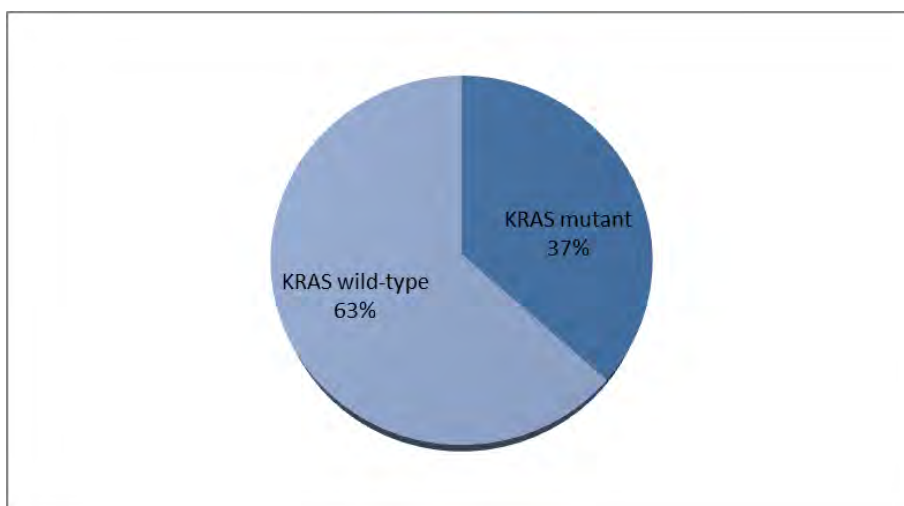
Καρκινώματα	Απουσία αγγειακής διήθησης (N)	Παρουσία αγγειακής διήθησης (N)	χ^2	p
Grade 1	28	10	6.05	$0.01 < p < 0.025$
Grade 3	18	21		

Πίνακας 17. Συσχέτιση του βαθμού ιστολογικής διαφοροποίησης και της παρουσίας/απουσίας αγγειακής διήθησης.

3.2 Μεταλλάξεις KRAS

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν συνολικά 322 ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου στην πλειοψηφία τους. Στο σύνολο των δειγμάτων μελετήσαμε την παρουσία μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12 και 13 του KRAS γονιδίου. 118/322 ασθενείς (36,65%) παρουσίασαν μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο γονίδιο, ενώ 204/322 ασθενείς (63,35%) δεν έφεραν μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα κωδικόνια (wild- type KRAS) (Εικ. 77).

Μελετώντας την κατανομή των μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12 και 13 του KRAS γονιδίου παρατηρήσαμε ότι 102/118 μεταλλάξεις (86,4%) εντοπίζονταν στο κωδικόνιο 12, με συχνότερες εκείνες που οδηγούν στην αντικατάσταση της γλυκίνης από ασπαρτικό (37%) ή βαλίνη (29%). Οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 13 περιορίζονταν σε ποσοστό 13.6% του συνόλου των μεταλλάξεων, με συχνότερη τη μετάλλαξη που οδηγεί σε αντικατάσταση της γλυκίνης από το ασπαρτικό (12%) (Πίνακας 18).



Εικόνα 77. Κατανομή μεταλλάξεων του KRAS γονιδίου. Ποσοστό (%) ασθενών.

Κωδικόνιο	Τύπος σημειακής μετάλλαξης	Αμινοξική αλλαγή	Αριθμός ατόμων (N)	Συχνότητα (%)
12	c.35G>A	p.G12D	44	37,0
	c.34G>A	p.G12S	4	3,4
	c.35G>T	p.G12V	34	29,0
	c.34G>T	p.G12C	10	8,5
	c.35G>C	p.G12A	7	6,0
	c.34G>C	p.G12R	3	2,5
13	c.38G>A	p.G13D	14	12,0
	c.37G>T	p.G13C	1	0,8
	c.37G>C	p.G13R	1	0,8

Πίνακας 18. Κατανομή και συχνότητα μεταλλάξεων του KRAS γονιδίου.

Ακολούθησε συσχέτιση των μεταλλάξεων του KRAS γονιδίου με τις διάφορες κλινικο- ιστοπαθολογικές παραμέτρους των καρκινωμάτων παχέος εντέρου.

Από τους 180 άρρενες ασθενείς που μελετήθηκαν, 61/180 (34%) εμφάνισαν μεταλλάξεις στο KRAS γονίδιο, ενώ 119/180 (66%) δεν έφεραν μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13 του KRAS γονιδίου και χαρακτηρίστηκαν ως wild-type. Από το σύνολο των 142 γυναικών που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη μας, 57/142 ασθενείς (40%) εμφάνισαν μεταλλάξεις στο KRAS γονίδιο, ενώ 85/142 γυναίκες (60%) δεν έφεραν μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13 του KRAS γονιδίου (wild-type). Με βάση τα παραπάνω, δεν διαπιστώνεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων του KRAS γονιδίου και του φύλου των ασθενών. Ωστόσο, μελετώντας αναλυτικότερα τον τύπο των μεταλλάξεων σε σχέση με το φύλο των ασθενών, βρέθηκε ότι οι άρρενες ασθενείς έφεραν συχνότερα μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 13 του KRAS γονιδίου, σε σχέση με τις γυναίκες ασθενείς ($p < 0.05$), (Πίνακας 20).

Μελετώντας ξεχωριστά τους τύπους των μεταλλάξεων, διαπιστώθηκε ότι οι G>C μεταθέσεις στο κωδικόνιο 12 αφορούν αποκλειστικά σε ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις (στάδιο C κατά Dukes), σε αντίθεση με τις G>A αντικαταστάσεις, οι οποίες ήταν συχνότερες στους ασθενείς που δεν είχαν λεμφαδενική συμμετοχή της νόσου (στάδιο B κατά Dukes). Παρατηρήσαμε ότι οι μεταλλάξεις αντικατάστασης G>A, συγκρινόμενες με τις επίσης συχνές μεταλλάξεις μετάθεσης G>T εμφανίζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p<0.05$) με την απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων. Επιπρόσθετα, οι G>C μεταθέσεις στο κωδικόνιο 12 εμφανίζουν στατιστικά πολύ σημαντική συσχέτιση ($p<0.005$) με την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων (Πίνακας 19).

	<u>Απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (Dukes B)</u>	<u>Παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (Dukes C)</u>	<i>P value</i>
Νουκλεοτιδική αλλαγή	Αριθμός μεταλλάξεων	Αριθμός μεταλλάξεων	
G>A	33	15	$p<0.05$
G>T	21	23	
G>C	0	10	$p<0.005$

Πίνακας 19. Συσχέτιση του τύπου των νουκλεοτιδικών αλλαγών και της παρουσίας/απουσίας λεμφαδενικών μεταστάσεων.

Όσον αφορά στην εντόπιση των καρκινωμάτων, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας των μεταλλάξεων του KRAS γονιδίου και της εντόπισης του όγκου στο δεξιό κόλον, σε σχέση με τα καρκινώματα που εντοπιζόνταν στο αριστερό κόλον, συμπεριλαμβανομένου και του ορθού ($p<0.05$), (Πίνακας 20). Αντίθετα, μελέτη της κατανομής των μεταλλάξεων του KRAS γονιδίου, σε συνδυασμό με την ιστολογική εκτίμηση της αγγειακής διήθησης, του βάθους διήθησης του εντερικού τοιχώματος (pT) και της κατάστασης των λεμφαδένων, δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (Πίνακας 20).

Η συσχέτιση της ύπαρξης μεταλλάξεων στο KRAS γονίδιο, σε συνδυασμό με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης των καρκινωμάτων, έδειξε ότι 13/38 καρκινώματα καλής διαφοροποίησης (34%) δεν έφεραν μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13 του KRAS γονιδίου που μελετήθηκαν, ενώ 25/38 καρκινώματα καλής διαφοροποίησης (66%) έφεραν KRAS μεταλλάξεις. Αναλύοντας τα 202 καρκινώματα μέτριας διαφοροποίησης, παρατηρήσαμε ότι 77/202 ασθενείς (38%) έφεραν KRAS μεταλλάξεις, ενώ 125/202 ασθενείς με καρκινώματα μέτριας διαφοροποίησης (62%) δεν έφεραν μεταλλάξεις (wild-type). Συνολικά 39 ασθενείς είχαν καρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης, από τους οποίους, 4/39 (10%) έφεραν μεταλλάξεις, ενώ 35/39 ασθενείς (90%) δεν έφεραν μεταλλάξεις στο KRAS γονίδιο.

Αξίζει να αναφερθεί ότι στη μελέτη μας υπήρχαν και 43 ασθενείς με υψηλού βαθμού ιστολογική ετερογένεια, η οποία κυμάνθηκε από μετρίου έως χαμηλού βαθμού διαφοροποίηση (grade 2 έως 3). 12/43 ασθενείς (28%) έφεραν μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13 του KRAS γονιδίου, ενώ οι υπόλοιποι 31/43 (72%) δεν έφεραν μεταλλάξεις (wild-type). Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτών ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p<0.005$) μεταξύ του χαμηλότερου βαθμού διαφοροποίησης και της απουσίας των KRAS μεταλλάξεων. Η συσχέτιση διατηρήθηκε στις διαδοχικές συγκρίσεις που έγιναν μεταξύ: α) καρκινωμάτων καλής και μέτριας διαφοροποίησης, β) καρκινωμάτων καλής και μέτριας έως χαμηλής διαφοροποίησης και γ) καρκινωμάτων μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης (Πίνακας 20).

Κλινικο- ιστοπαθολογικές παράμετροι	Αριθμός ατόμων (N)	Kras wild-type (N)	Kras μεταλλάξεις (N)			p value	
			Σύνολο	Κωδικόνιο 12	13		
Φύλο							
Άρρενες	180/322	119	61	49	12	ns	$p<0.05$
Θήλεις	142/322	85	57	53	4		
Αγγειακή διήθηση						ns	
Παρούσα	136/322	88	48	38	10		
Απούσα	186/322	116	70	64	6		
Περινευρική διήθηση						$0.10<p<0.25$	
Παρούσα	26/70	19	7	6	1		
Απούσα	44/70	24	20	18	2		
Εντόπιση						$p<0.05$	
ΑΡ κόλον	211/322	142	69	58	11		
ΔΕ κόλον	111/322	62	49	44	5		
Ιστολογική διαφοροποίηση						$p<0.005$	
Καλή (grade 1)	38/322	13	25	23	2		
Μέτρια (grade 2)	202/322	125	77	67	10		
Μέτρια έως χαμηλή	43/322	31	12	9	3		
Χαμηλή (grade 3)	39/322	35	4	3	1	$p<0.005$	
Βάθος διήθησης τοιχώματος (pT)						ns ns	
pT1	7/322	4	3	3	0		
pT2	43/322	31	12	10	2		
pT3	234/322	145	89	77	12		
pT4	38/322	24	14	12	2		
Κατάσταση λεμφαδένων (LN)						ns	
Απουσία μεταστάσεων (N0)	143/322	86	57	53	4		
Μεταστάσεις σε 1- 3	102/322		40	33	7		

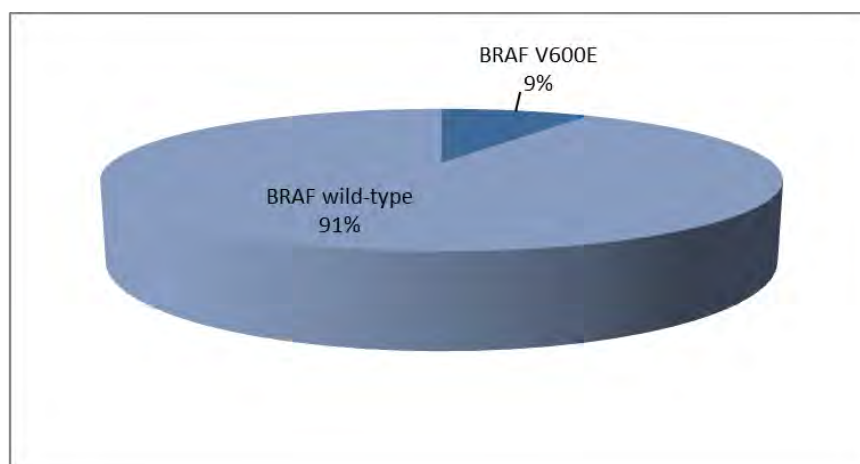
λεμφαδένες (N1)		62			
Μεταστάσεις σε ≥ 4	77/322		21	16	5
λεμφαδένες (N2)		56			

Πίνακας 20. Συσχέτιση KRAS μεταλλάξεων με κλινικο-ιστοπαθολογικές παραμέτρους των ασθενών.

3.3 Μεταλλάξεις *BRAF*

Όσον αφορά το γονίδιο *BRAF*, μελετήσαμε συνολικά 188 ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου. Ελέγξαμε την παρουσία μεταλλάξεων στο εξόνιο 15 του *BRAF* γονιδίου, καθώς εκεί απαντάται η πλειοψηφία των *BRAF* μεταλλάξεων και βρήκαμε ότι 17/188 ασθενείς (9%) έφεραν μετάλλαξη στο εξόνιο 15 του *BRAF* γονιδίου, ενώ οι υπόλοιποι 171/188 ασθενείς (91%) δεν έφεραν μεταλλάξεις και χαρακτηρίστηκαν ως wild-type *BRAF* ασθενείς (Εικ. 78).

Όλες οι μεταλλάξεις που παρατηρήθηκαν αφορούσαν τη παρανοηματική σημειακή μετάλλαξη c.1799T>A, η οποία οδηγεί στην αντικατάσταση της βαλίνης από το γλουταμινικό οξύ (p.V600E), στη θέση 600 της B-Raf πρωτεΐνης.



Εικόνα 78. Κατανομή μεταλλάξεων του *BRAF* γονιδίου. Ποσοστό (%) ασθενών.

Στη συνέχεια, μετά τον προσδιορισμό των ασθενών που έφεραν ή όχι μεταλλάξεις στο εξόνιο 15 του *BRAF* γονιδίου, ακολούθησε η συσχέτισή τους με τις κλινικο-ιστοπαθολογικές παραμέτρους των καρκινωμάτων της παρούσας μελέτης.

Όπως προαναφέρθηκε, 17 ασθενείς έφεραν μεταλλάξεις στο *BRAF* γονίδιο (p.V600E), από τους οποίους οι 10 ήταν θήλεα άτομα και οι 7 άρρενες. Συσχέτιση της παρουσίας των μεταλλάξεων σε συνάρτηση με το φύλο των ατόμων ανέδειξε σε ασθενή στατιστική συσχέτιση της παρουσίας της p.V600E μετάλλαξης με το

γυναικείο φύλο ($p < 0.25$, $p > 0.05$). Ωστόσο, παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της p.V600E μετάλλαξης και της εντόπισης των καρκινωμάτων στο δεξιό κόλον ($p < 0.005$). Η περαιτέρω συσχέτιση της παρουσίας της p.V600E μετάλλαξης με παραμέτρους όπως η αγγειακή και περινευρική διήθηση και το βάθος διήθησης του εντερικού τοιχώματος από τον πρωτοπαθή όγκο (pT), δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (Πίνακας 21).

Συγκρίνοντας την παρουσία της V600E μετάλλαξης με το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης είδαμε ότι 15 ασθενείς με αδενοκαρκινώματα καλής διαφοροποίησης δεν έφεραν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Επιπλέον, από τους 122 ασθενείς με μέτριας διαφοροποίησης καρκινώματα, 117/122 (96%) δεν έφεραν τη μετάλλαξη (wild-type *BRAF* ασθενείς), ενώ οι 5/122 ασθενείς (4%) έφεραν τη V600E μετάλλαξη. Καρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης παρουσίασαν 31 συνολικά ασθενείς. Η V600E μετάλλαξη ήταν παρούσα σε 7/31 ασθενείς (22.5%), ενώ οι υπόλοιποι 24/31 (77.5%) δεν έφεραν τη μετάλλαξη (wild-type *BRAF*). Αξίζει να σημειωθεί ότι υπήρξαν και 20 ασθενείς με υψηλού βαθμού ιστολογικής ετερογένειας καρκινώματα, που χαρακτηρίστηκαν από μετρίου έως χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης (grade 2 έως 3). Σε 5/20 ασθενείς (25%) παρατηρήσαμε τη συγκεκριμένη μετάλλαξη, ενώ οι υπόλοιποι 15/20 ασθενείς (75%) δεν την έφεραν. Συσχέτιση της παρουσίας της V600E μετάλλαξης με την ιστολογική βαθμονόμηση ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του χαμηλού βαθμού ιστολογικής διαφοροποίησης και της παρουσίας της μετάλλαξης V600E ($p < 0.005$), η οποία ήταν φανερή στις συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των καρκινωμάτων χαμηλής και καλής ή μέτριας διαφοροποίησης (Πίνακας 21).

Επιπρόσθετα, συγκρίναμε την παρουσία της V600E μετάλλαξης του *BRAF* γονιδίου και την κατάσταση των λεμφαδένων. Αρχικά πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των ασθενών που δεν εμφάνισαν λεμφαδενικές μεταστάσεις (N0) και εκείνων που παρουσίασαν λεμφαδενικές μεταστάσεις, ανεξαρτήτως αριθμού (N1, N2), όπου δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Ωστόσο, όταν έγινε επιμέρους σύγκριση μεταξύ των ασθενών που έχουν λεμφαδενική συμμετοχή τη νόσου και λήφθηκε υπόψη το επιμέρους στάδιο N (N1 και N2), διαπιστώθηκε ότι για την κατηγορία N2 (θετικοί λεμφαδένες από 4 και άνω) υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την παρουσία της V600E μετάλλαξης ($p < 0.05$) (Πίνακας 21).

Κλινικο- ιστοπαθολογικές παράμετροι	(N)	BRAF wild-type (N)	BRAF V600E (N)	p value
Φύλο				
Άρρενες	110/188	103	7	0.10 < p < 0.25
Θήλειες	78/188	68	10	
Αγγειακή διήθηση				

Παρούσα	79/188	72	7	ns
Απούσα	109/188	99	10	
Περινευρική διήθηση				
Παρούσα	26/70	23	3	ns
Απούσα	44/70	41	3	
Εντόπιση				
ΑΡ κόλον	116/188	111	5	p<0.005
ΔΕ κόλον	72/188	60	12	
Ιστολογική διαφοροποίηση				
Καλή (grade 1)	15/188	15	0	p<0.005
Μέτρια (grade 2)	122/188	117	5	
Μέτρια έως χαμηλή	20/188	15	5	
Χαμηλή (grade 3)	31/188	24	7	
Βάθος διήθησης τοιχώματος (pT)				
pT1	6/188	6	0	ns
pT2	23/188	21	2	
pT3	141/188	129	12	
pT4	18/188	15	3	
Κατάσταση λεμφαδένων (LN)				
Απουσία μεταστάσεων (N0)	94/188	85	9	ns p<0.05
Μεταστάσεις σε 1-3 λεμφαδένες (N1)	50/188	49	1	
Μεταστάσεις σε ≥ 4 λεμφαδένες (N2)	44/188	37	7	

Πίνακας 21. Συσχέτιση BRAF μεταλλάξεων με κλινικο-ιστοπαθολογικές παραμέτρους των ασθενών.

3.4 Επίπεδα έκφρασης των mRNA μεταγράφων των KRAS και EGFR γονιδίων

Για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *KRAS* και *EGFR* σε επίπεδο mRNA μεταγράφων, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι της σχετικής και της απόλυτης ποσοτικοποίησης. Συνολικά μελετήσαμε 50 ασθενείς, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε κολεκτομή λόγω καρκινώματος του παχέος εντέρου. Από τα χειρουργικά παρασκευάσματα των ασθενών πραγματοποιήθηκε λήψη νωπού ιστού τόσο από την περιοχή του καρκινώματος, όσο και από το φυσιολογικό τοίχωμα του παχέος εντέρου.

Η ηλικία των ασθενών της μελέτης με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qRT-PCR), κυμάνθηκε από 30 έως 86 έτη (μέση τιμή: 67,3 έτη, τυπική απόκλιση (SD): 11,1 έτη). Η μέγιστη διάμετρος των καρκινωμάτων κυμάνθηκε από 2 έως 9,6 εκατοστά (μέση τιμή; 4,8 εκ., τυπική απόκλιση (SD): 1,65 εκ.).

Παράμετροι	Αριθμός περιπτώσεων (N)	Συχνότητα (%)
Φύλο		
Άρρενες	28	56%
Θήλειες	22	44%
Εντόπιση		
Δεξιό κόλον	21	42%
Αριστερό κόλον	18	36%
Ορθό	11	22%
Προϋπάρχον αδένωμα		
Παρουσία	18	36%
Απουσία	32	64%
Ιστολογικός τύπος		
Αδενοκαρκίνωμα, NOS	46	92%
Βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα	3	6%
Καρκίνωμα με νευροενδοκρινική διαφ/ση	1	2%
Ιστολογική βαθμονόμηση		
Καλής διαφοροποίησης (grade 1)	8	16%
Μέτριας διαφοροποίησης (grade 2)	24	48%
Μέτριας έως χαμηλής διαφοροποίησης (grade 2-3)	1	2%
Χαμηλής διαφοροποίησης (grade 3)	17	34%
Αγγειακή διήθηση		
Παρούσα	22	44%
Απούσα	28	56%
Περινευρική διήθηση		
Παρούσα	18	36%
Απούσα	32	64%
Βάθος διήθησης τοιχώματος		
pT1	2	4%
pT2	9	18%
pT3	34	68%
pT4	5	10%
Κατάσταση λεμφαδένων (LN)		
N0: Απουσία μεταστάσεων	26	52%
N1: μεταστάσεις σε 1-3 LN	13	26%

N2: μεταστάσεις σε ≥ 4 LN	11	22%
Μεταλλάξεις KRAS		
Απουσία	31	62%
Παρουσία	19	38%
Μεταλλάξεις BRAF		
Απουσία	44	88%
Παρουσία	6	12%

Πίνακας 22. Κλινικο-ιστοπαθολογικές παράμετροι ασθενών που μετείχαν στη μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των KRAS και EGFR γονιδίων.

3.4.1 Σχετική ποσοτικοποίηση

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια λογισμικού του συστήματος Lightcycler 480. Υπολογίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *KRAS* και *EGFR* σε επίπεδο mRNA μεταγράφων, σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς $\beta 2M$. Τα δείγματα στα οποία, το γονίδιο αναφοράς εμφάνισε ικανοποιητική έκφραση αλλά το γονίδιο στόχος δεν παρουσίασε ανιχνεύσιμο σήμα φθορισμού, θεωρήθηκαν ότι είχαν εξαιρετικά χαμηλή έκφραση για το αντίστοιχο γονίδιο, γεγονός που καθιστά μη ανιχνεύσιμα τα επίπεδα έκφρασής του. Εξαιρέθηκαν τα δείγματα στα οποία δεν εκφράστηκε το γονίδιο αναφοράς $\beta 2M$, ή η εκτίμηση της έκφρασης ήταν ιδιαίτερα επισφαλής (σημείο C_p στους τελευταίους κύκλους της αντίδρασης). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων και η σχετική ποσοτικοποίηση έγινε με τη βοήθεια των πρότυπων καμπυλών, για τα γονίδια στόχους *KRAS*, *EGFR* και το γονίδιο αναφοράς $\beta 2M$.

Επίπεδα σχετικής έκφρασης *KRAS* γονιδίου

48/50 δείγματα ασθενών που μελετήθηκαν σε ζεύγη (φυσιολογικός - καρκινικός ιστός), κρίθηκαν επαρκή ποιοτικά και ποσοτικά για την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των mRNA μεταγράφων των υπό εξέταση γονιδίων. Στην εικόνα που ακολουθεί, απεικονίζονται τα αποτελέσματα ενός πειράματος σχετικής ποσοτικοποίησης (Relative Quantification), όπως αυτά υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού του συστήματος LightCycler 480. Σημειώνονται οι λόγοι σχετικής ποσοτικοποίησης (Target gene/Reference gene), καθώς και οι κύκλοι της αντίδρασης που απαιτήθηκαν προκειμένου αυτό να φθάσει στο σημείο C_p (Tgt C_p , Ref. C_p) (Εικ. 79).

Advanced Relative Quantification for ALL (1) (Relative Quantification)

Results

Bar Chart	Pairing	Sample Name	Target Name		Tgt Cp Mean	Ref. Cp Mean	Ratios	
			Targets	References			Tgt/Ref.	Norm
<input checked="" type="checkbox"/>	A1/C1	11A	KRAS	B2M	21.37	21.49	11.35	
<input checked="" type="checkbox"/>	A2/C2	11B	KRAS	B2M	22.50	20.05	1.939	
<input checked="" type="checkbox"/>	A3/C3	18N	KRAS	B2M	22.85	20.72	2.412	
<input checked="" type="checkbox"/>	A4/C4	27N	KRAS	B2M		40.00	0	
<input checked="" type="checkbox"/>	A5/C5	27T	KRAS	B2M	32.70	29.53	1.234	
<input checked="" type="checkbox"/>	A6/C6	30T	KRAS	B2M	32.94	32.64	9.958	
<input checked="" type="checkbox"/>	A7/C7	34N	KRAS	B2M	31.76	30.14	3.630	
<input checked="" type="checkbox"/>	A8/C8	46N	KRAS	B2M		40.00	0	
<input checked="" type="checkbox"/>	A9/C9	47N	KRAS	B2M	40.00		Invalid	
<input checked="" type="checkbox"/>	A10/C10	48N	KRAS	B2M	35.28	35.11	13.17	
<input checked="" type="checkbox"/>	A11/C11	51N	KRAS	B2M	37.46	36.55	9.901	
<input checked="" type="checkbox"/>	A12/C12	52T	KRAS	B2M		35.49	0	
<input checked="" type="checkbox"/>	B1/D1	53N	KRAS	B2M	36.69	35.39	6.640	
<input checked="" type="checkbox"/>	B2/D2	53T	KRAS	B2M	36.67	33.35	1.474	

Εικόνα 79 Αποτελέσματα πειράματος σχετικής ποσοτικοποίησης για το γονίδιο-στόχο KRAS.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα των δειγμάτων που προέρχονται από τους φυσιολογικούς ιστούς των ασθενών, η μέση τιμή των επιπέδων σχετικής έκφρασης του γονιδίου *KRAS* ήταν 3,94 (τυπική απόκλιση, SD: 6). Στα δείγματα των καρκινικών ιστών των ίδιων ασθενών, η αντίστοιχη μέση τιμή βρέθηκε 3,64 (τυπική απόκλιση, SD: 10,8). Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων (φυσιολογικές vs καρκινικές περιοχές των ίδιων ασθενών) στα επίπεδα της σχετικής έκφρασης του *KRAS* γονιδίου (Πίνακας 23). Ο στατιστικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε τόσο με μη παραμετρική μέθοδο (Wilcoxon test), όσο και με παραμετρική στατιστική (t test για ζευγαρωτές παρατηρήσεις).

KRAS/B2M	Φυσιολογικός ιστός	Καρκινικός ιστός
Μέση τιμή σχετικής έκφρασης	3,94	3,64
Wilcoxon test	ns (p>0,05)	
t test, ζεύγη παρατηρήσεων	ns (p>0,05)	

Πίνακας 23. Μη παραμετρικός και παραμετρικός στατιστικός έλεγχος των αποτελεσμάτων της σχετικής ποσοτικοποίησης για το *KRAS* γονίδιο.

Επίπεδα σχετικής έκφρασης EGFR γονιδίου

Για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης του EGFR γονιδίου σε επίπεδο mRNA μεταγράφων, 47/50 δείγματα ασθενών που μελετήθηκαν σε ζεύγη (φυσιολογικός - καρκινικός ιστός), κρίθηκαν επαρκή ποιοτικά και ποσοτικά για την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των mRNA μεταγράφων των υπό εξέταση γονιδίων. Στα δείγματα των φυσιολογικών ιστών των ασθενών, η μέση τιμή των επιπέδων της σχετικής έκφρασης του EGFR γονιδίου είναι 2,38 (τυπική απόκλιση, SD: 3,2). Στα αντίστοιχα καρκινικά δείγματα των ίδιων ασθενών, η αντίστοιχη μέση τιμή βρέθηκε 1,68 (τυπική απόκλιση, SD: 3,47). Τα καρκινικά δείγματα παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα σχετικής έκφρασης του EGFR γονιδίου σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Ωστόσο, η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Ο στατιστικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε και στην προκειμένη περίπτωση με μη παραμετρική (Wilcoxon test) και παραμετρική μέθοδο (t test για ζευγαρωτές παρατηρήσεις), με στάθμη στατιστικής σημαντικότητας το $p < 0,05$.

EGFR/B2M	Φυσιολογικός ιστός	Καρκινικός ιστός
Μέση τιμή σχετικής έκφρασης	2,38	1,68
Wilcoxon test	ns ($p > 0,05$)	
t test, ζεύγη παρατηρήσεων	ns ($p > 0,05$)	

Πίνακας 24. Μη παραμετρικός και παραμετρικός στατιστικός έλεγχος των αποτελεσμάτων της σχετικής ποσοτικοποίησης για το EGFR γονίδιο.

Τα αποτελέσματα της σχετικής ποσοτικοποίησης του EGFR γονιδίου υπολογίστηκαν με τη βοήθεια των πρότυπων καμπυλών του εν λόγω γονιδίου και του γονιδίου αναφοράς β2M. Στην εικόνα που ακολουθεί, απεικονίζονται τα αποτελέσματα ενός πειράματος σχετικής ποσοτικοποίησης (Relative Quantification), όπως αυτά υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού του συστήματος LightCycler 480. Σημειώνονται οι λόγοι σχετικής ποσοτικοποίησης (Target gene/Reference gene), καθώς και οι κύκλοι της αντίδρασης που απαιτήθηκαν προκειμένου αυτό να φθάσει στο σημείο Cp (Tgt Cp, Ref. Cp) (Εικ. 80).

Advanced Relative Quantification for ALL (Relative Quantification)

Results

Bar Chart	Pairing	Sample Name	Target Name		Tgt Cp Mean	Ref. Cp Mean	Ratios	
			Targets	References			Tgt/Ref.	Norm
<input checked="" type="checkbox"/>	A1/C1	11A	EGFR	B2M	34.66	28.62	0.5437	
<input checked="" type="checkbox"/>	A2/C2	11B	EGFR	B2M		36.07	0	
<input checked="" type="checkbox"/>	A3/C3	13T	EGFR	B2M	35.51	28.17	0.2391	
<input checked="" type="checkbox"/>	A4/C4	27N	EGFR	B2M			Invalid	
<input checked="" type="checkbox"/>	A5/C5	27T	EGFR	B2M			Invalid	
<input checked="" type="checkbox"/>	A6/C6	28N	EGFR	B2M	33.56	24.15	5.19E-2	
<input checked="" type="checkbox"/>	A7/C7	28T	EGFR	B2M	31.50	24.90	0.3596	
<input checked="" type="checkbox"/>	A8/C8	29N	EGFR	B2M	34.64	30.26	1.776	
<input checked="" type="checkbox"/>	A9/C9	29T	EGFR	B2M	32.53	26.70	0.6080	
<input checked="" type="checkbox"/>	A10/C10	30N	EGFR	B2M	39.34	30.91	0.3356	
<input checked="" type="checkbox"/>	A11/C11	30T	EGFR	B2M			Invalid	
<input checked="" type="checkbox"/>	A12/C12	31N	EGFR	B2M			Invalid	
<input checked="" type="checkbox"/>	B1/D1	31T	EGFR	B2M	31.19	29.69	12.45	
<input checked="" type="checkbox"/>	B2/D2	32N	EGFR	B2M		30.67	0	
<input checked="" type="checkbox"/>	B3/D3	32T	EGFR	B2M	32.66	26.53	0.4934	
<input checked="" type="checkbox"/>	B4/D4	33N	EGFR	B2M	32.99	28.57	1.633	
<input checked="" type="checkbox"/>	B5/D5	33T	EGFR	B2M	29.67	24.25	0.8107	
<input checked="" type="checkbox"/>	B6/D6	34N	EGFR	B2M		34.88	0	
<input checked="" type="checkbox"/>	B7/D7	34T	EGFR	B2M	29.58	23.33	0.4580	
<input checked="" type="checkbox"/>	B8/D8	35N	EGFR	B2M		38.56	0	
<input checked="" type="checkbox"/>	B9/D9	35T	EGFR	B2M	40.00	38.96	117.9	

Εικόνα 80 Αποτελέσματα πειράματος σχετικής ποσοτικοποίησης για το γονίδιο-στόχο EGFR.

3.4.2 Απόλυτη ποσοτικοποίηση

Η μέθοδος της απόλυτης ποσοτικοποίησης χρησιμοποιεί για κάθε γονίδιο μια πρότυπη καμπύλη δειγμάτων με γνωστές αρχικές συγκεντρώσεις, προκειμένου να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις των υπό μελέτη δειγμάτων. Οι πρότυπες καμπύλες για κάθε γονίδιο της μελέτης μπορούν να αποθηκεύονται στο λογισμικό του συστήματος και να εισάγονται σταθερά σε κάθε πείραμα προκειμένου να γίνει ανάλυση των αποτελεσμάτων. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η χρήση σε κάθε πείραμα ενός από τα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης (standard sample), που χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Αυτό εξασφαλίζει την ομαλοποίηση τυχόν αποκλίσεων κατά τη διεξαγωγή των διαφορετικών πειραμάτων.

Επίπεδα έκφρασης KRAS γονιδίου

48/50 δείγματα ασθενών που μελετήθηκαν σε ζεύγη (φυσιολογικός - καρκινικός ιστός), κρίθηκαν επαρκή ποιοτικά και ποσοτικά για την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των mRNA μεταγράφων του KRAS γονιδίου με τη μέθοδο της απόλυτης ποσοτικοποίησης. Στην εικόνα που ακολουθεί απεικονίζονται τα αποτελέσματα ενός πειράματος απόλυτης ποσοτικοποίησης (Absolute Quantification), όπως αυτά υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού του

συστήματος LightCycler 480. Σημειώνονται οι κύκλοι της αντίδρασης που απαιτήθηκαν προκειμένου κάθε δείγμα να φθάσει στο σημείο C_p καθώς και οι συγκεντρώσεις των αντίστοιχων δειγμάτων (Εικ. 81).

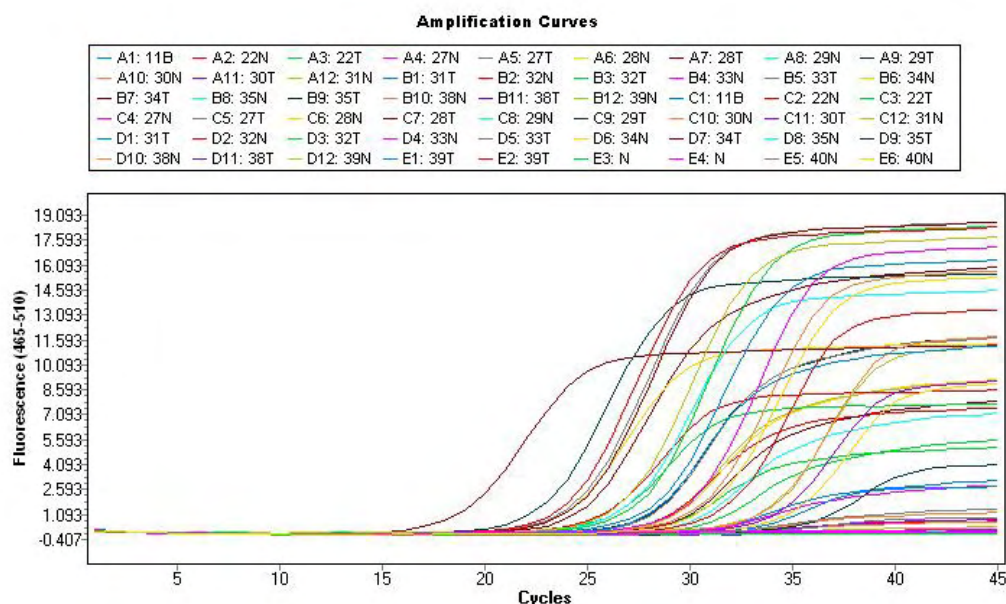
Abs Quant/2nd Derivative Max for ALL (Abs Quant/2nd Derivative Max)

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	36N	Unknown	32.49	7.23E-1	
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	36T	Unknown	28.86	8.91E0	
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	37N	Unknown	28.59	1.07E1	
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	37T	Standard	25.88	6.86E1	6.86E1
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	49N	Unknown	34.34	1.78E-1	
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	49T	Unknown	29.34	6.41E0	
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	50N	Unknown	33.89	2.53E-1	
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	50T	Unknown	29.27	6.72E0	

Εικόνα 81 Αποτελέσματα πειράματος απόλυτης ποσοτικοποίησης για το γονίδιο-στόχο KRAS.

Κατά τη διάρκεια της ποσοτικής qRT-PCR πραγματικού χρόνου, μπορούμε να δούμε τα επίπεδα φθορισμού των αντίστοιχων δειγμάτων καθώς και τα σημεία που ξεκινά η εκθετική φάση ανάπτυξης των δειγμάτων (amplification curves), όπως φαίνεται ενδεικτικά στην εικόνα που ακολουθεί (Εικ. 82).



Εικόνα 82. Καμπύλες εκθετικής φάσης ανάπτυξης των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της qRT-PCR αντίδρασης για το KRAS γονίδιο.

Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων απόλυτης ποσοτικοποίησης στα δείγματά μας, ακολούθησε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης (συγκέντρωση mRNA μεταγράφων), μεταξύ των φυσιολογικών και καρκινικών ιστών των ίδιων ασθενών. Στα δείγματα φυσιολογικού ιστού, η μέση τιμή της συγκέντρωσης για το *KRAS* γονίδιο ήταν 155 µg/ml (τυπική απόκλιση S.D: 344 µg/ml). Στα αντίστοιχα καρκινικά δείγματα, η μέση τιμή της συγκέντρωσης για το *KRAS* γονίδιο ήταν 1118 µg/ml (τυπική απόκλιση S.D: 2877 µg/ml). Από τα αποτελέσματα της ποσοτικής έκφρασης των mRNA μεταγράφων του *KRAS* γονιδίου προέκυψε ότι η έκφραση του *KRAS* γονιδίου ήταν σημαντικά υψηλότερη στα καρκινικά δείγματα σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα από το φυσιολογικό τοίχωμα του παχέος εντέρου. Ακολούθησε στατιστικός έλεγχος τόσο με μη παραμετρική όσο και με παραμετρική μέθοδο (Πίνακας 25).

KRAS	Φυσιολογικός ιστός	Καρκινικός ιστός
Μέση τιμή απόλυτης έκφρασης	155 (SD: 344)	1118 (SD: 2877)
Wilcoxon test	Z=5 (p<0,05)	
t test, ζεύγη παρατηρήσεων	t= 2,47 (p<0,05)	

Πίνακας 25. Μη παραμετρικός και παραμετρικός στατιστικός έλεγχος των αποτελεσμάτων της απόλυτης ποσοτικοποίησης για το *KRAS* γονίδιο.

Στη συνέχεια, ακολούθησε συσχέτιση των αποτελεσμάτων της απόλυτης ποσοτικοποίησης των φυσιολογικών – καρκινικών δειγμάτων με κλινικο-ιστοπαθολογικές παραμέτρους των ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, εξετάσαμε την πιθανή συσχέτιση της έκφρασης του *KRAS* γονιδίου με το φύλο, την ηλικία των ασθενών και την παρουσία/απουσία μεταλλάξεων στο *KRAS* γονίδιο. Επιπρόσθετα, συγκρίναμε την έκφραση του *KRAS* γονιδίου με την εντόπιση, το μέγεθος του όγκου, το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης του καρκινώματος, την ύπαρξη αγγειακής ή περινευρικής διήθησης και τη λεμφαδενική συμμετοχή της νόσου. Ακολούθησε στατιστικός έλεγχος με παραμετρικές μεθόδους. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης *r* για να αξιολογηθεί η συσχέτιση της έκφρασης του *KRAS* γονιδίου με την ηλικία των ασθενών και το μέγεθος των καρκινωμάτων. Για τις υπόλοιπες συγκρίσεις, χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος *t* κατά Student για ανεξάρτητα δείγματα. Η επεξεργασία όλων των παραπάνω παραμέτρων δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (Πίνακας 26).

Ποιοτικά χαρακτηριστικά	Μέση τιμή συγκέντρωσης (μg/ml)	Συσχέτιση με έκφραση γονιδίου, t test, p<0,05
Φύλο ασθενών		
• Άρρενες	850	ns
• Θήλειες	725	
Εντόπιση όγκου		
• Αριστερή	980	ns
• Δεξιά	600	
Μετάλλαξη KRAS γονιδίου		
• Παρούσα	1440	ns
• Απούσα	935	
Βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης		
• Grade 2	578	ns
• Grade2-3 & 3	1647	
Αγγειακή διήθηση νεοπλάσματος		
• Παρούσα	1366	ns
• Απούσα	930	
Περινευρική διήθηση νεοπλάσματος		
• Παρούσα	1357	ns
• Απούσα	995	
Λεμφαδενική συμμετοχή νόσου		
• Παρούσα	1450	ns
• Απούσα	867	

Πίνακας 26. Παραμετρικός στατιστικός έλεγχος των αποτελεσμάτων της απόλυτης ποσοτικοποίησης για το KRAS γονίδιο.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης του KRAS γονιδίου στα καρκινώματα του παχέος εντέρου δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την παρουσία ή απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων. Ωστόσο, η συσχέτιση με τον αριθμό των λεμφαδενικών μεταστάσεων στους ασθενείς με λεμφαδενική συμμετοχή αποδείχτηκε στατιστικά σημαντική ($t=2,32 > t_{crit}$, $p<0,05$).

Ποσοτικές μεταβλητές	Συσχέτιση με επίπεδα έκφρασης KRAS Συντελεστής συσχέτισης r, t έλεγχος σημαντικότητας r
Ηλικία ασθενών	ns
Μέγιστη διάμετρος όγκου	ns
Αριθμός λεμφαδενικών μεταστάσεων	p <0,05

Πίνακας 27. Συσχέτιση επιπέδων έκφρασης του KRAS γονιδίου με ποσοτικές μεταβλητές των καρκινωμάτων παχέος εντέρου.

Επίπεδα έκφρασης EGFR γονιδίου

47/50 δείγματα ασθενών που μελετήθηκαν σε ζεύγη (φυσιολογικός - καρκινικός ιστός), κρίθηκαν επαρκή ποιοτικά και ποσοτικά για την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των mRNA μεταγράφων του EGFR γονιδίου με τη μέθοδο της απόλυτης ποσοτικοποίησης. Στην εικόνα που ακολουθεί, απεικονίζονται τα αποτελέσματα ενός πειράματος απόλυτης ποσοτικοποίησης (Absolute Quantification), όπως αυτά υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού του συστήματος LightCycler 480. Σημειώνονται οι κύκλοι της αντίδρασης που απαιτήθηκαν προκειμένου κάθε δείγμα να φθάσει στο σημείο Cp καθώς και οι συγκεντρώσεις των αντίστοιχων δειγμάτων (Εικ. 83).

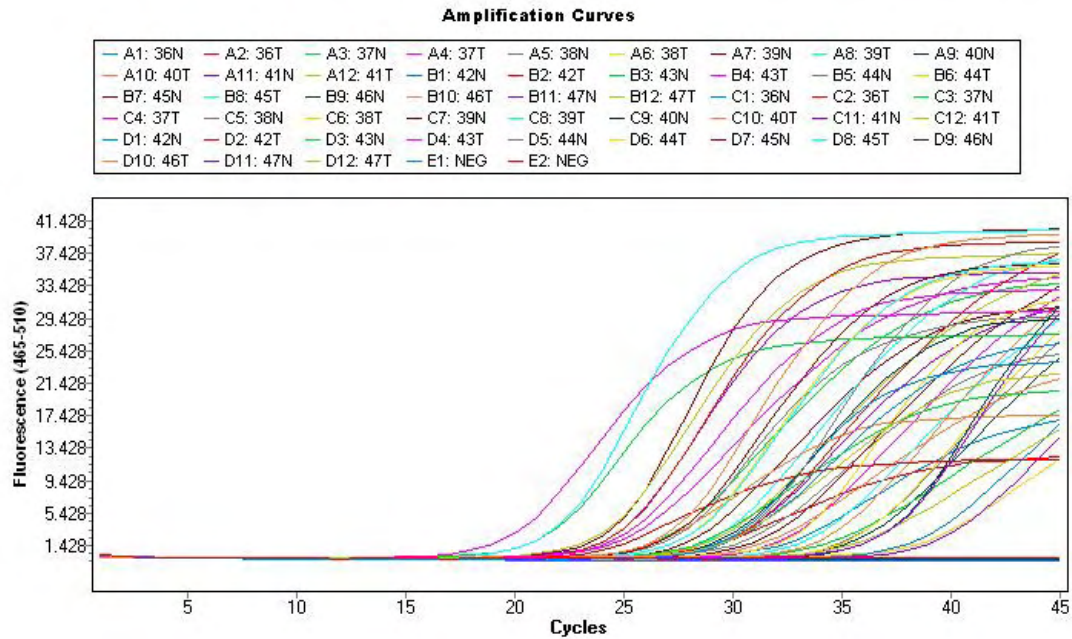
Abs Quant/2nd Derivative Max for ALL (Abs Quant/2nd Derivative Max)

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	36N	Unknown	32.36	3.51E0
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	36T	Unknown	28.22	5.81E1
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	37N	Unknown	27.00	1.32E2
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	37T	Unknown	25.31	4.15E2
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	38N	Unknown	30.82	1.00E1

Εικόνα 83. Αποτελέσματα πειράματος απόλυτης ποσοτικοποίησης για το γονίδιο-στόχο EGFR.

Κατά τη διάρκεια της ποσοτικής qRT-PCR πραγματικού χρόνου, μπορούμε να δούμε τα επίπεδα φθορισμού των αντίστοιχων δειγμάτων, καθώς και τα σημεία που ξεκινά η εκθετική φάση ανάπτυξης των δειγμάτων (amplification curves) για το EGFR γονίδιο, όπως φαίνεται ενδεικτικά στην εικόνα που ακολουθεί (Εικ. 84).



Εικόνα 84. Καμπύλες εκθετικής φάσης ανάπτυξης των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της qRT-PCR αντίδρασης για το EGFR γονίδιο.

Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων της απόλυτης ποσοτικοποίησης στα δείγματά μας, ακολούθησε σύγκριση της συγκέντρωσης των EGFR mRNA μεταγράφων μεταξύ των φυσιολογικών και καρκινικών ιστών των ιδίων ασθενών. Στα δείγματα φυσιολογικού ιστού, η μέση τιμή της συγκέντρωσης για το EGFR γονίδιο ήταν 92,5 µg/ml (τυπική απόκλιση S.D: 225,2 µg/ml). Στα αντίστοιχα καρκινικά δείγματα, η μέση τιμή της συγκέντρωσης για το EGFR γονίδιο ήταν 250,5 µg/ml (τυπική απόκλιση S.D: 721,5 µg/ml). Παρατηρήσαμε ότι η έκφραση του EGFR γονιδίου ήταν σημαντικά υψηλότερη στα καρκινικά δείγματα σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα από το φυσιολογικό τοίχωμα του παχέος εντέρου. Ακολούθησε στατιστικός έλεγχος με παραμετρική και μη παραμετρική μέθοδο (Πίνακας 28).

EGFR	Φυσιολογικός ιστός	Καρκινικός ιστός
Μέση τιμή απόλυτης έκφρασης	92,5 (SD: 225,2)	250,5 (SD: 721,5)
Wilcoxon test	Z=3,38 p<0,05	
t test, ζεύγη παρατηρήσεων	t= 2,01 οριακή τιμή για p<0,05	

Πίνακας 28. Μη παραμετρικός και παραμετρικός στατιστικός έλεγχος των αποτελεσμάτων της απόλυτης ποσοτικοποίησης για το EGFR γονίδιο.

Στη συνέχεια, ακολούθησε συσχέτιση των αποτελεσμάτων της απόλυτης ποσοτικοποίησης των φυσιολογικών – καρκινικών δειγμάτων με τις κλινικο-ιστοπαθολογικές παραμέτρους των ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, εξετάσαμε την πιθανή συσχέτιση της έκφρασης του EGFR γονιδίου με το φύλο, την ηλικία των ασθενών και την παρουσία/απουσία μεταλλάξεων στο KRAS γονίδιο. Επιπρόσθετα, συγκρίναμε την έκφραση του EGFR γονιδίου με την εντόπιση, το μέγεθος του όγκου, το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης του καρκινώματος, την ύπαρξη αγγειακής ή περινευρικής διήθησης και τη λεμφαδενική συμμετοχή της νόσου. Ακολούθησε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος t κατά Student για ανεξάρτητα δείγματα. Δεν αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (Πίνακας 29).

Ποιοτικά χαρακτηριστικά	Μέση τιμή συγκέντρωσης (μg/ml)	Συσχέτιση με έκφραση γονιδίου, t test, p<0,05
Φύλο ασθενών		
• Άρρενες	143	ns
• Θήλειες	395	
Εντόπιση όγκου		
• Αριστερή	165	ns
• Δεξιά	373	
Μετάλλαξη γονιδίου KRAS		οριακή τιμή t
• Παρούσα	498,60	ns
• Απούσα	96,47	
Βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης		
• Grade 2	310	ns
• Grade 2-3& 3	128	
Αγγειακή διήθηση νεοπλάσματος		
• Παρούσα	76,34	ns
• Απούσα	379,50	
Περινευρική διήθηση νεοπλάσματος		
• Παρούσα	265,60	ns
• Απούσα	241	
Λεμφαδενική συμμετοχή νόσου		
• Παρούσα	89	ns
• Απούσα	38	

Πίνακας 29. Στατιστικός έλεγχος των αποτελεσμάτων της απόλυτης ποσοτικοποίησης για το EGFR γονίδιο.

Ποσοτικές μεταβλητές	Συσχέτιση με επίπεδα έκφρασης EGFR Συντελεστής συσχέτισης r, t έλεγχος σημαντικότητας r
Ηλικία ασθενών	ns
Μέγιστη διάμετρος όγκου	ns
Αριθμός λεμφαδενικών μεταστάσεων	ns

Πίνακας 30. Συσχέτιση επιπέδων έκφρασης του EGFR γονιδίου με ποσοτικές μεταβλητές των καρκινωμάτων παχέος εντέρου.

Αξίζει να αναφέρουμε ότι τα επίπεδα έκφρασης (συγκέντρωση mRNA μεταγράφων) του EGFR γονιδίου ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις στο KRAS γονίδιο, σε σχέση με τους ασθενείς που χαρακτηρίστηκαν ως KRAS wild-type. Ωστόσο, η διαφορά αυτή δεν αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική $t = 1,91$ ($t_{crit} = 2,02$, για $p < 0,05$).

4. Συζήτηση- Συμπεράσματα

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί την τρίτη συχνότερη μορφή καρκίνου και την τέταρτη σε συχνότητα αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Εκτιμάται ότι 1.360.600 άτομα διαγιγνώσκονται ετησίως με καρκίνο του παχέος εντέρου, 694.000 ασθενείς αποβιώνουν κάθε χρόνο από τη νόσο, ενώ 3.544.000 ασθενείς ζουν με τη νόσο (6). Η νόσος εμφανίζεται πιο συχνά στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες. Αυξημένα ποσοστά εμφάνισης της νόσου έχουν εκτιμηθεί σε χώρες της Κεντρικής Ευρώπης. Ενδεικτικά για τους άρρενες έχουν καταγραφεί στη Σλοβακία (92 ανά 100.000), στην Ουγγαρία (87 ανά 100.000), στην Τσεχία (81 ανά 100.000). Τα ποσοστά εμφάνισης της νόσου, που αφορούν σε θήλεα άτομα, έχουν καταγραφεί σε χώρες όπως οι Νορβηγία, Δανία και Ολλανδία και είναι (54/ 53/ 50 ανά 100.000) αντίστοιχα. Σε ολόκληρη την Ευρώπη παρατηρείται έως και πέντε φορές διακύμανση στα ποσοστά εμφάνισης της νόσου, με τα χαμηλότερα ποσοστά να αφορούν στις χώρες των Βαλκανίων, της Βοσνίας- Ερζεγοβίνης (30 στους άντρες και 19 στις γυναίκες), της Ελλάδας (25 και 17) και της Αλβανίας (13 και 11) (7).

Διατροφή με χαμηλή περιεκτικότητα σε φρούτα, λαχανικά και ανεπεξέργαστα φυτικά τρόφιμα και υψηλή σε κόκκινο κρέας, επεξεργασμένα τρόφιμα και λιπαρά φαίνεται να προσδίδει αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (445). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η διατήρηση μιας υγιεινής διατροφής και η αποφυγή του καθιστικού τρόπου ζωής και της παχυσαρκίας μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου του παχέος εντέρου (7).

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι ο ορθοκολικός καρκίνος συνιστά μια ετερογενή και πολύπλοκη νόσο και ασθενείς που φέρουν ιστολογικά πανομοιότυπους όγκους μπορεί να διαφέρουν σημαντικά στην πρόγνωση και την πορεία της νόσου, καθώς επίσης και στην απάντηση που παρουσιάζουν στη θεραπεία (446, 447). Κρίνεται αναγκαία η αναζήτηση κατάλληλων βιολογικών δεικτών, με τη βοήθεια των οποίων θα μπορούν να αναγνωρίζονται, είτε οι ασθενείς με επιθετική νόσο και δυσμενή πρόγνωση, είτε εκείνοι που θα μπορούσαν να επωφεληθούν από τη χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας.

Στην εποχή της εξατομικευμένης θεραπείας, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ισχυρών και ανεξάρτητων προγνωστικών δεικτών που θα μπορούν με αξιοπιστία να κατευθύνουν τους ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο στην κατάλληλη θεραπευτική αντιμετώπιση. Επιπρόσθετα, είναι απαραίτητη η χρήση βιολογικών δεικτών που να προβλέπουν την απόκριση ή την αντίσταση των ασθενών σε ειδικά θεραπευτικά σχήματα, καθώς επίσης και την πιθανότητα παρουσίασης σοβαρών επιπλοκών από τη θεραπεία. Ωστόσο, στην πράξη, η διάκριση των παραπάνω δεικτών σε προγνωστικούς ή προβλεπτικούς παράγοντες συχνά είναι δυσχερής και πολλοί δείκτες παρουσιάζουν μικτή σημασία (448).

Κατά την «κλασική» ταξινόμηση του καρκίνου του παχέος εντέρου λαμβάνονται υπόψη τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του όγκου (π.χ. βαθμός διαφοροποίησης) ή το στάδιο της νόσου. Ωστόσο, τα τελευταία έτη ακολουθώντας τις εξελίξεις σε άλλους τύπους καρκίνου όπως π.χ. ο καρκίνος του μαστού, έχει αναπτυχθεί μια ταξινόμηση του καρκίνου του παχέος εντέρου χρησιμοποιώντας δεδομένα γονιδιακής έκφρασης από ολόκληρο το γονιδίωμα μέσω της βιοπληροφορικής. Αναγνωρίζονται, πλέον τρεις κύριοι υπότυποι καρκίνου του παχέος εντέρου (Colorectal Cancer Subtypes, CCS), καθένας από τους οποίους χαρακτηρίζεται από διακριτές (επι-) γενετικές και κλινικές ιδιότητες (449). Οι CCS1 όγκοι χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις στα γονίδια *KRAS* και *TP53*, εμφανίζουν υψηλή δραστικότητα του *Wnt* σηματοδοτικού μονοπατιού και παρουσιάζουν αξιοσημείωτη χρωμοσωμική αστάθεια (CIN). Οι CCS2 όγκοι χαρακτηρίζονται από μικροδορυφορική αστάθεια (MSI), παρουσιάζουν πλούσια φλεγμονώδη λεμφοκυτταρική διήθηση και εντοπίζονται συχνότερα στο ανιόν (δεξιά εντόπιση). Τέλος, οι CCS3 όγκοι χαρακτηρίζονται από φαινότυπο αυξημένης μεθυλίωσης των CpG νησίδων, δεν μπορούν να προσδιοριστούν βάσει χαρακτηριστικών μεταλλάξεων, ενώ όσο αφορά

στη πρόδρομη αλλοίωση, φαίνεται να σχετίζονται με τα άμισχα οδοντωτά αδενώματα (CCS3- serrated) (449).

Αρκετοί ερευνητές έχουν δημοσιεύσει αντίστοιχες ταξινομήσεις του καρκίνου του παχέος εντέρου (450- 453). Οι πρόσθετες ταξινομήσεις προκύπτουν από προσαρμοσμένες αναλύσεις βιοπληροφορικής σε διαφορετικά δεδομένα και ερμηνεία από διαφορετικές οπτικές γωνίες (454). Στις μελέτες αυτές ο αριθμός των υποτύπων ποικίλει από τρεις έως έξι, αλλά παρατηρούνται εμφανείς σχέσεις μεταξύ τους (455). Οι εν λόγω μοριακοί υπότυποι παρουσιάζουν αλληλεπικάλυψη με τα έως τώρα χρησιμοποιούμενα συστήματα μοριακής ταξινόμησης (CIN, MSI, CIMP) ή την ύπαρξη μεταλλάξεων (BRAF), αλλά δεν μπορούν να καθοριστούν λαμβάνοντας υπόψη μόνο μεμονωμένες μεταλλάξεις ή επιγενετικά χαρακτηριστικά (456). Αρκετές προσπάθειες και μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη με σκοπό την κατάληξη σε ένα ευρέως αποδεκτό σύστημα ταξινόμησης, που να εφαρμόζεται εύκολα τόσο στην κλινική πράξη όσο και στις προοπτικές μελέτες (456).

Τελευταία αξιολογούνται όλο και περισσότερο μοριακά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) και συγκεκριμένων σημειακών γενετικών αλλαγών (π.χ. KRAS μεταλλάξεις), καθώς έχει αποδειχτεί ότι σχετίζονται με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία. Για παράδειγμα, οι MSI όγκοι φαίνεται να μην ωφελούνται από τη χορήγηση 5- φλουορουρακίλης κατά την επικουρική χημειοθεραπεία (457), ενώ μεταλλάξεις στο KRAS γονίδιο προσδίδουν ανθεκτικότητα στη θεραπεία με αντισώματα έναντι του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR (183).

4.1 KRAS γονίδιο και καρκίνος παχέος εντέρου

Η πρόοδος που έχει πρόσφατα σημειωθεί στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου, την επέκταση και την αντίσταση στην χημειοθεραπεία, έχει συμβάλει σημαντικά στην επιλογή του καταλληλότερου θεραπευτικού χειρισμού του. Πληθώρα προοπτικών ή αναδρομικών κλινικών μελετών έχουν ανοίξει το δρόμο για τη χρήση βιοδεικτών στην καθημερινή κλινική πράξη, όσον αφορά στην επιλογή στοχευμένης θεραπείας και κατάλληλων φαρμακευτικών ουσιών, όπως η 5- φθοριοουρακίλη (5-FU), η οξαλιπλατίνη (oxaliplatin), η ιρινοτεκάνη (irinotecan), αλλά και νεότερης γενεάς αναστολέων, όπως η μπεβασιζουμάμπη (bevacizumab), η σετουξιμάμπη (cetuximab) και η πανιτουμουμάμπη (panitumumab) (458). Μικρά μόρια αναστολής της κινάσης τυροσίνης (TKIs), έχει παρατηρηθεί ότι είναι αποτελεσματικά σε διάφορους συμπαγείς όγκους, όπως στον καρκίνο του πνεύμονα και του παγκρέατος κι έχουν επίσης μελετηθεί εκτενώς στον καρκίνο του παχέος εντέρου (459).

Η σετουξιμάμπη και η πανιτουμουμάμπη είναι δυο μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν απευθείας στην εξωκυττάρια περιοχή του EGF-υποδοχέα. Παρουσιάζουν σημαντική αποτελεσματικότητα έναντι του ορθοκολικού καρκίνου προχωρημένου σταδίου, ιδίως όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με συστηματική χημειοθεραπεία (169, 170). Μεταλλάξεις στα ογκογονίδια KRAS και BRAF σε συνδυασμό με απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως το PTEN, αποτελούν παραδείγματα γενετικών αλλαγών, τα οποία παρακάμπτοντας τον EGF-υποδοχέα, περιορίζουν την αποτελεσματικότητα των αντί-EGFR μονοκλωνικών αντισωμάτων (171). Πολυάριθμες μελέτες σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνωμα του παχέος εντέρου έδειξαν ότι η χορήγηση σετουξιμάμπης ή πανιτουμουμάμπης είναι μη αποτελεσματική στους όγκους με μεταλλάξεις στο KRAS γονίδιο (172-180). Οι εν λόγω μεταλλάξεις οδηγούν στη συνεχή σηματοδότηση του κυτταρικού μονοπατιού του EGF-υποδοχέα, ανεξάρτητα από τη δέσμευση του τελευταίου από τα μονοκλωνικά αντισώματα (181).

Στα καρκινώματα του παχέος εντέρου, οι μεταλλάξεις του KRAS γονιδίου είναι συχνές και ανέρχονται σε ποσοστό περίπου 30-40%. Η πλειονότητα των μεταλλάξεων αυτών εδράζονται στο εξόνιο 2 και πιο συγκεκριμένα στα κωδικόνια 12 (74.5- 78%) και 13 σε μικρότερο ποσοστό (22- 25.5%). Έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις στα κωδικόνια 61 και 146, οι οποίες αντιπροσωπεύουν ένα μικρό ποσοστό των KRAS μεταλλάξεων (1-4%) ενώ δεν είναι πλήρως κατανοητή η κλινική τους σημασία στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Πιο συγκεκριμένα, συχνότερες είναι οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12, που οδηγούν στην αντικατάσταση του αμινοξέος της γλυκίνης σε ασπαρτικό (c.35G>A, p.G12D) ή βαλίνη (c.35G>T, p.G12V) και στο κωδικόνιο 13 η αντικατάσταση του αμινοξέος της γλυκίνης σε ασπαρτικό (c.38G>A, p.G13D) (202- 204, 207, 460 & 461).

Στην παρούσα μελέτη, από το σύνολο των 322 ασθενών που εξετάστηκαν για μεταλλάξεις στο εξόνιο 2 του KRAS γονιδίου, 118/322 ασθενείς (36.6%) έφεραν μεταλλάξεις. Η συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων του KRAS γονιδίου στον Ελληνικό πληθυσμό συμφωνεί με τα αποτελέσματα προηγούμενων μεγάλων μελετών (202- 204, 462). Στη δική μας μελέτη, η πλειοψηφία των μεταλλάξεων του KRAS γονιδίου (86.4%) εδράζονταν στο κωδικόνιο 12, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό των μεταλλάξεων (13.6%) εντοπιζόνταν στο κωδικόνιο 13 του KRAS γονιδίου. Μελετώντας την κατανομή των επιμέρους μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν, η αντικατάσταση της γλυκίνης από ασπαρτικό στο κωδικόνιο 12 (c.35G>A, p.G12D) ήταν η συχνότερη μετάλλαξη που παρατηρήθηκε και ακολούθησε η αντικατάσταση της γλυκίνης από βαλίνη στο ίδιο κωδικόνιο (c.35G>T, p.G12V) και στο κωδικόνιο 13 η αντικατάσταση του αμινοξέος της γλυκίνης από ασπαρτικό (c.38G>A, p.G13D), γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες (202- 204, 207, 460 & 461).

Παρατηρήσαμε επίσης ότι ο τύπος της μετάλλαξης του KRAS γονιδίου ενδέχεται να διαφέρει σημαντικά ανάλογα με το στάδιο της νόσου. Συγκεκριμένα, οι

νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις G>A, στο κωδικόνιο 12 του KRAS γονιδίου, εμφάνισαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων ($p<0.05$). Αντιθέτως, οι νουκλεοτιδικές αλλαγές G>C στο ίδιο κωδικόνιο, εμφάνισαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων ($p<0.005$). Τα ευρήματά μας συμφωνούν με προγενέστερη μελέτη, σύμφωνα με την οποία οι G>C νουκλεοτιδικές αλλαγές αφορούσαν αποκλειστικά σε ασθενείς με στάδιο νόσου C κατά Dukes (206). Στη συγκεκριμένη μελέτη διερευνήθηκαν 31 ασθενείς με στάδιο νόσου B κατά Dukes και 42 ασθενείς με στάδιο νόσου C κατά Dukes. Οι νουκλεοτιδικές αλλαγές G>A, που εντοπίστηκαν στο κωδικόνιο 12 του KRAS γονιδίου, αφορούσαν αποκλειστικά σε ασθενείς της πρώτης κατηγορίας, ενώ οι νουκλεοτιδικές αλλαγές G>C ανιχνεύθηκαν αποκλειστικά σε ασθενείς με στάδιο νόσου κατά Dukes C.

Στη δική μας μελέτη, δεν επιβεβαιώθηκε η αποκλειστική εντόπιση των παραπάνω μεταλλάξεων στους ασθενείς σταδίου B κατά Dukes, ωστόσο, οι νουκλεοτιδικές αλλαγές G>A στο κωδικόνιο 12 εμφάνισαν σημαντική ένδειξη συσχέτισης με τους εν λόγω ασθενείς. Με βάση τα παραπάνω, είναι δυνατή η υπόθεση ότι οι όγκοι των ασθενών με λεμφαδενική ή μη συμμετοχή της νόσου μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ως προς το γενετικό τους προφίλ και τον τύπο μεταλλάξεων που φέρουν. Η ιδέα ότι όλα τα καρκινώματα παθολογοανατομικού σταδίου (Dukes) C προέρχονται από την προοδευτική εξέλιξη των όγκων σταδίου B φαντάζει αρκετά απλοϊκή. Είναι πλέον γνωστό άλλωστε ότι η μεταστατική δυνατότητα ενός καρκινώματος εξαρτάται από τις γενετικές ανωμαλίες τις οποίες φέρει και είναι πιθανό οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις να σχετίζονται με την ικανότητα λεμφαδενικής μετάστασης στα καρκινώματα του παχέος εντέρου.

Στη μελέτη των Span και συνεργατών (207) υπήρξε συσχέτιση μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλλαγών G>C και της παρουσίας μεταστάσεων (στάδιο κατά Dukes D). Ωστόσο, σαφής συσχέτιση μεταξύ νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων G>A και απουσίας μεταστάσεων δεν αποδείχτηκε. Μελετήθηκαν συνολικά 117 καρκινώματα παχέος εντέρου, διαφορετικών σταδίων και αναλύθηκαν κλινικές παράμετροι, όπως η εντόπιση του όγκου, η 10-ετής επιβίωση, η χρονική περίοδος ελεύθερης νόσου, καθώς και η αιτία θανάτου σε σχέση την ύπαρξη μεταλλάξεων στο εξόνιο 2 του KRAS γονιδίου. Οι νουκλεοτιδικές αλλαγές G>A στην πρώτη και τη δεύτερη βάση και οι νουκλεοτιδικές μεταθέσεις G>C στη δεύτερη βάση βρέθηκε ότι σχετίζονται με πτωχή πρόγνωση σε σχέση με τις μεταθέσεις G>T στην πρώτη και τη δεύτερη βάση. Σύμφωνα με τις καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier της εν λόγω μελέτης, μεταξύ των ασθενών που απεβίωσαν λόγω της νόσου, οι ασθενείς χωρίς μεταλλάξεις στο KRAS γονίδιο είχαν σημαντικά μεγαλύτερη επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς που έφεραν KRAS μεταλλαγμένους όγκους.

Λαμβάνοντας υπόψη τον τύπο της μετάλλαξης, ήταν δυνατή η διάκριση των παραπάνω ασθενών σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία, στους ασθενείς με

μεγαλύτερης διάρκειας επιβίωση, παρατήρησαν μόνο νουκλεοτιδικές G>T μεταθέσεις στην πρώτη και τη δεύτερη βάση. Στη δεύτερη ομάδα, με τη μικρότερη επιβίωση, εντοπίστηκαν νουκλεοτιδικές G>A αλλαγές στην πρώτη και τη δεύτερη βάση καθώς και νουκλεοτιδικές G>C μεταθέσεις στη δεύτερη βάση. Η διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων αποδείχτηκε στατιστικά σημαντική ($p < 0.0001$). Σύμφωνα με τους μελετητές, οι καμπύλες αυτές επιβίωσης μπορούν τουλάχιστον εν μέρει να εξηγηθούν μέσω της συσχέτισης των παραπάνω μεταλλάξεων με το στάδιο κατά Dukes των ασθενών της μελέτης (207).

Σε προηγούμενες μελέτες αναφέρεται συσχέτιση των G>T μεταλλάξεων με μεγαλύτερη ικανότητα εξαλλαγής και των G>A μεταλλάξεων με απουσία υποτροπών του όγκου (195, 463). Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων των διαφόρων μελετών που έχουν δημοσιευτεί, όσον αφορά στον «προγνωστικό ρόλο» των KRAS μεταλλάξεων, μπορεί να είναι δυσχερής λόγω των διαφορετικών μεταλλάξεων του KRAS γονιδίου που ερευνώνται, διαφορών στον τρόπο συλλογής δεδομένων μεταξύ των διαφόρων μελετών, διαφορετικών συστημάτων σταδιοποίησης των ασθενών, αλλά και των διαφορετικών μεθοδολογιών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των εν λόγω μεταλλάξεων (193).

Κατά τις συλλογικές μελέτες RASCAL ερευνητές από όλο τον κόσμο είχαν προσκληθεί να συγκεντρώσουν κλινικά και ιστολογικά δεδομένα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου οι όγκοι των οποίων είχαν εξετασθεί για την ύπαρξη μεταλλάξεων στο KRAS γονίδιο (202, 203). Αυτό οδήγησε σε μια συλλογική βάση δεδομένων, η οποία ονομάστηκε «RASCAL». Στην πρώτη μελέτη RASCAL (202), μελετήθηκαν συνολικά 2721 ασθενείς, οι οποίοι συλλέχθηκαν από 22 ερευνητικά κέντρα 13 διαφορετικών εθνών. Στο 37.7% των ασθενών διαπιστώθηκαν μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13 του KRAS γονιδίου. Δε διαπιστώθηκε συσχέτιση ανάμεσα στις εν λόγω μεταλλάξεις και το φύλο, την ηλικία των ασθενών, την εντόπιση του όγκου ή το στάδιο κατά Dukes. Ωστόσο, η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι η παρουσία μετάλλαξης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου ($p < 0.001$) ή θανάτου ($p = 0.004$). Μετά την αξιολόγηση των επιμέρους μεταλλάξεων ξεχωριστά, μόνο η μετάλλαξη p.G12V (c.35G>T) στο κωδικόνιο 12 διαπιστώθηκε ότι φέρει ανεξάρτητο, αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου ($p = 0.007$) ή θανάτου ($p = 0.004$).

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η τυχόν επίδραση των KRAS μεταλλάξεων στα διαφορετικά στάδια του ορθοκολικού καρκίνου, περισσότεροι ασθενείς συμπεριλήφθηκαν στην παραπάνω βάση δεδομένων. Στη μελέτη RASCAL II αναλύθηκαν 3439 περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου, από 35 ερευνητικά κέντρα 19 διαφορετικών εθνών (203). Η μέση διάρκεια παρακολούθησης των ασθενών ήταν 55 μήνες. Το 35% των ασθενών έφερε μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13 του KRAS γονιδίου. Δε διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ των εν λόγω μεταλλάξεων και άλλων κλινικο-ιστοπαθολογικών παραμέτρων, όπως το φύλο, η

ηλικία των ασθενών, η εντόπιση του όγκου, το στάδιο κατά Dukes, ο ιστολογικός τύπος του καρκίνου κι η αγγειακή διήθηση.

Η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι το προχωρημένο στάδιο κατά Dukes, η ηλικία και η μετάλλαξη p.G12V σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση. Ξεχωριστή ανάλυση των αποτελεσμάτων της συγκεκριμένης μετάλλαξης στους ασθενείς με όγκους σταδίου B ή C κατά Dukes έδειξε ότι η αντικατάσταση της γλυκίνης από βαλίνη στο κωδικόνιο 12 οδήγησε σε σημαντική μείωση του ελεύθερου από τη νόσο χρονικού διαστήματος και του ποσοστού επιβίωσης στους ασθενείς σταδίου C. Η πολυκεντρική αυτή μελέτη προτείνει ότι η μετάλλαξη p.G12V στο κωδικόνιο 12 του KRAS γονιδίου, εκτός του ότι είναι σημαντική για την εξέλιξη της νόσου, προδιαθέτει ίσως σε πιο επιθετική βιολογική συμπεριφορά του όγκου σε ασθενείς προχωρημένου σταδίου. Αντίθετα, στο στάδιο B δε διαπιστώθηκε ανάλογη επίδραση της μετάλλαξης. Σύμφωνα με τους ερευνητές είναι δύσκολο να εξηγηθεί πως η συγκεκριμένη μετάλλαξη μπορεί να είναι ασήμαντη σε όγκους σταδίου B κατά Dukes αλλά συμβάλλει στην πρόγνωση ασθενών με πιο προχωρημένη νόσο. Είναι πιθανό, παρά το μεγάλο αριθμό ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, η τελευταία να παραμένει σημαντικά μικρής ισχύος και η πραγματική συσχέτιση μεταξύ της μετάλλαξης και του σταδίου B να μην μπορεί να ανιχνευτεί. Από την άλλη πλευρά, είναι επίσης πιθανό τα αποτελέσματα που αφορούν στους ασθενείς σταδίου C να υπόκεινται σε σφάλμα τύπου 1, δηλαδή η διαφορά που έχει ανιχνευτεί να μην ισχύει στην πραγματικότητα (203).

Στα δείγματα που μελετήσαμε δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του συνόλου των μεταλλάξεων του KRAS γονιδίου και του φύλου των ασθενών, γεγονός που συμφωνεί με προϋπάρχουσες μελέτες (203, 204, 464, 465). Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι στην παρούσα μελέτη, οι άρρενες ασθενείς παρουσίασαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p < 0.05$) με την ύπαρξη μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 13 του KRAS γονιδίου. Πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη από την Ιαπωνία έδειξε ότι οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 13 ήταν συχνότερες σε θήλεα άτομα με καρκίνο παχέος εντέρου (466). Οι διαφορές αυτές ενδεχομένως οφείλονται στο γεγονός ότι η δική μας μελέτη περιλαμβάνει Ευρωπαίους και όχι Ασιάτες ασθενείς, υποδεικνύοντας την ύπαρξη γεωγραφικής ετερογένειας.

Στη μελέτη των Samowitz και συνεργατών, αν και δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ των συνολικών μεταλλάξεων του KRAS γονιδίου και του φύλου των ασθενών, οι άρρενες ασθενείς είχαν σημαντικά μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν τη σημειακή μετάλλαξη c.35G>A που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.G12D στο κωδικόνιο 12 (204). Πρόκειται για μια μεγάλη πληθυσμιακά μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε στις Η.Π.Α. και αφορούσε σε 1413 ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. Οι συμμετέχοντες στη μελέτη ήταν λευκοί, έγχρωμοι ή ισπανόφωνοι και προέρχονταν είτε από Ιατρικό Πρόγραμμα Φροντίδας της Βόρειας Καλιφόρνιας ή από μια περιοχή οκτώ κομητειών στη Γιούτα. Παράγοντες που

σχετίζονται με το περιβάλλον ή τον τρόπο ζωής (π.χ. κατανάλωση αλκοόλ, κάπνισμα, διατροφή, θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης), επιδρώντας διαφορετικά σε άντρες και γυναίκες, ενδέχεται να επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά την πιθανότητα δημιουργίας των παραπάνω μεταλλάξεων.

Η σύγκριση μεταξύ της παρουσίας μεταλλάξεων στο KRAS γονίδιο και της μεταστατικής ικανότητας της νόσου στους λεμφαδένες δεν οδήγησε σε στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Τα αποτελέσματά μας βρίσκονται σε συμφωνία με αποτελέσματα προηγούμενων αντίστοιχων μελετών (203, 377, 464, 467). Οι Kressner και συνεργάτες μελέτησαν 191 αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου μέσα σε χρονικό διάστημα 6 ετών. Μεταλλάξεις του KRAS γονιδίου διαπιστώθηκαν στο 32% των ασθενών. Μεταξύ των μεταλλάξεων αυτών και του σταδίου Dukes δεν υπήρξε συσχέτιση (377).

Στη μελέτη των Wadler και συνεργατών περιλαμβάνονται συνολικά 72 ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, από τους οποίους το 35% παρουσίασε μεταλλάξεις του KRAS γονιδίου (464). Η ανάλυση των παραπάνω μεταλλάξεων σε σχέση με το φύλο, την ηλικία των ασθενών ή το στάδιο κατά Dukes δεν ανέδειξε συσχέτιση. Σε αντίστοιχα συμπεράσματα κατέληξαν και οι Beranek και συνεργάτες μελετώντας 53 καρκινώματα παχέος εντέρου (467).

Στη δική μας μελέτη αξίζει να σημειωθεί ότι υπήρξαν 39 καρκινώματα τα οποία χαρακτηρίστηκαν ιστολογικά ως χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης (grade 3). Μόνο τέσσερα έφεραν μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13 του KRAS γονιδίου. Σύγκριση της παρουσίας KRAS μεταλλάξεων μεταξύ όγκων χαμηλής και υψηλότερης διαφοροποίησης έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του χαμηλότερου βαθμού διαφοροποίησης και της απουσίας των μεταλλάξεων που μελετάμε ($p < 0.005$).

Στη μεγάλη πολυκεντρική μελέτη RASCAL, όπου μελετήθηκαν οι μεταλλάξεις του KRAS γονιδίου σε 2721 ασθενείς, διαπιστώθηκε επίσης ότι οι όγκοι χαμηλής διαφοροποίησης έφεραν λιγότερο συχνά τις εν λόγω μεταλλάξεις ($p = 0.002$) (202). Σε παρόμοια ευρήματα κατέληξε κι η μελέτη των Beranek και συνεργατών, αν και σε εκείνη ο αριθμός των υπό μελέτη καρκινωμάτων ήταν πολύ μικρότερος (467). Στη συγκεκριμένη μελέτη, υπήρξαν μόνο τρία καρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης, από τα οποία κανένα δεν έφερε μετάλλαξη στα κωδικόνια 12 ή 13 του KRAS γονιδίου. Ανάλογα αποτελέσματα αναφέρονται και στη μελέτη των Benedix και συνεργατών του, σύμφωνα με την οποία, οι όγκοι που έφεραν μεταλλάξεις στο KRAS γονίδιο ήταν λιγότερο συχνά χαμηλής διαφοροποίησης, χωρίς όμως η διαφορά αυτή να καταστεί στατιστικά σημαντική (468).

4.2 BRAF γονίδιο και καρκίνος παχέος εντέρου

Το BRAF γονίδιο, μέλος της οικογένειας των RAF ογκογονιδίων, κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης- θρεονίνης που δρα ως τελεστής της ενεργοποιημένης KRAS πρωτεΐνης (469).

Το μελάνωμα και οι όγκοι του θυρεοειδούς αδένου φέρουν σε μεγάλα ποσοστά (25%-70% και 36%-53% αντίστοιχα) μεταλλάξεις στο BRAF γονίδιο, ενώ στα καρκινώματα του παχέος εντέρου οι μεταλλάξεις του BRAF γονιδίου ανιχνεύονται σε μικρότερα ποσοστά, 5%-15% (183, 226). Η συχνότητα ανίχνευσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον πληθυσμό των ασθενών της μελέτης, δεδομένου ότι οι μεταλλάξεις του BRAF γονιδίου συνδέονται με δυσμενή πρόγνωση (179, 470) κι ο αριθμός των ασθενών που φέρουν BRAF μεταλλαγμένους όγκους μειώνεται στα μεταγενέστερα στάδια της θεραπείας (183, 470, 471). Επιπλέον, BRAF μεταλλάξεις παρατηρούνται σε ποσοστό 34-70% των σποραδικών μορφών ορθοκολικού καρκίνου με υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H), σε αντίθεση με τις KRAS μεταλλάξεις που είναι συχνότερες σε όγκους σταθερούς (MS-S) ή χαμηλόβαθμης μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-L) (226, 424, 470, 472, 473). Σε αμφότερους τους σταθερούς και ασταθείς όγκους, σε ποσοστό >90% των περιπτώσεων με BRAF μεταλλάξεις παρατηρείται ευρεία μεθυλίωση των CpG νησίδων (474, 475).

Η πιο συχνή και μελετημένη (>95%) μετάλλαξη του BRAF γονιδίου είναι μια παρανοηματική σημειακή μετάλλαξη (missense point mutation) στο εξόνιο 15, η οποία οδηγεί στην αντικατάσταση της βαλίνης από το γλουταμινικό οξύ (c.1799T>A, p.V600E), στη θέση 600 της B-Raf πρωτεΐνης (476, 477). Οι μεταβολές στην κυτταρική σηματοδότηση που προκύπτουν από την εν λόγω μετάλλαξη παραμένουν ασαφείς. Η B-Raf^{V600E} πρωτεΐνη μπορεί να αποκτήσει μέχρι και 500 φορές περισσότερη δραστικότητα ως προς την ενεργοποίηση της MEK/ERK σηματοδότησης στα καρκινικά κύτταρα (418). Επιπλέον, επιτρέπει τη σηματοδότηση του συγκεκριμένου μονοπατιού απουσία οποιουδήποτε εξωκυττάριου ερεθίσματος, με αποτέλεσμα το κύτταρο να αποκτά αυτονομία σε σήματα ανάπτυξης (477). Η μετάλλαξη V600E θα μπορούσε ωστόσο να έχει επιπλέον δράσεις, καθώς οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο BRAF γονίδιο παρατηρούνται μόνο στα καρκινώματα παχέος εντέρου που δε φέρουν KRAS μεταλλάξεις (183, 226, 472, 478).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι μεταλλάξεις στο BRAF γονίδιο παρατηρούνται πιο συχνά σε θήλεα άτομα όσον αφορά στο φύλο και σε όγκους δεξιάς εντόπισης (228, 468, 479).

Οι Zlobec και συνεργάτες πραγματοποίησαν μοριακή ανάλυση σε 404 δείγματα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου μελετώντας την ύπαρξη

μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) και μεταλλάξεων στα KRAS και BRAF γονίδια (228). Παρατήρησαν ότι οι BRAF μεταλλάξεις σχετίζονται θετικά με τη δεξιά εντόπιση του όγκου ($p < 0.001$), το χαμηλό βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης ($p = 0.029$) και την υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια ($p < 0.001$).

Οι Benedix και συνεργάτες μελέτησαν 171 ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου μέσα σε χρονικό διάστημα τεσσάρων ετών από το 2007 έως το 2010 (468). Αναλύθηκε, μεταξύ άλλων, η ύπαρξη BRAF μεταλλάξεων, καθώς και η σχέση αυτών με διάφορες κλινικο- ιστοπαθολογικές παραμέτρους. Διαπιστώθηκε ότι οι όγκοι που έφεραν BRAF μεταλλάξεις σχετίζονται σημαντικά με την ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων και το χαμηλό βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης. Στη μελέτη των Farina-Sarasqueta και συνεργατών μελετήθηκαν 106 ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο σταδίου II και 258 ασθενείς σταδίου III (479). Σε αμφότερες τις ομάδες παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των BRAF μεταλλάξεων και της δεξιάς εντόπισης του όγκου.

Ανάλογα αποτελέσματα προκύπτουν κι από τη δική μας μελέτη, όπου διαπιστώσαμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας της V600E μετάλλαξης του BRAF γονιδίου και του χαμηλού βαθμού ιστολογικής διαφοροποίησης των καρκινωμάτων παχέος εντέρου ($p < 0.005$). Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνονται από αντίστοιχες πρόσφατες μελέτες (228, 468, 480).

Οι μεταλλάξεις στο BRAF γονίδιο εντοπίστηκαν εξίσου σε ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις και μη. Ωστόσο, συγκρίνοντας τους ασθενείς που παρουσίασαν λεμφαδενικές μεταστάσεις σταδίου N1 και N2, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αυξημένου αριθμού λεμφαδενικών μεταστάσεων (N2) και της παρουσίας της V600E μετάλλαξης του BRAF γονιδίου ($p < 0.05$).

Μελέτη του Tran και συνεργατών του έδειξε ένα ξεχωριστό πρότυπο μεταστατικής ικανότητας των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου που φέρουν τη V600E μετάλλαξη. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει συσχέτιση αυτών των όγκων με αυξημένη συχνότητα περιτοναϊκών μεταστάσεων ή απομακρυσμένων λεμφαδενικών μεταστάσεων και μειωμένη συχνότητα πνευμονικών μεταστάσεων (481).

Πρόσφατα οι Pai και συνεργάτες μελέτησαν 259 αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου με εγγύς εντόπιση ως προς το μηχανισμό επιδιόρθωσης MMR/μικροδορυφορική αστάθεια MSI και την ύπαρξη KRAS ή BRAF V600E μεταλλάξεων, σε μια προσπάθεια να αξιολογήσουν την προγνωστική σημασία των παραπάνω γενετικών αλλαγών και την πιθανή συσχέτιση τους με διάφορες ιστοπαθολογικές παραμέτρους (482). Σε 181/259 αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου παρατηρήθηκε επάρκεια του μηχανισμού επιδιόρθωσης MMR και πραγματοποιήθηκε ανάλυση για την ύπαρξη KRAS ή BRAF V600E μεταλλάξεων. Συγκριτικά με τα BRAF wild-type αδενοκαρκινώματα, οι όγκοι που έφεραν BRAF

V600E μεταλλάξεις εμφάνισαν συχνότερα λεμφαγγειακή διήθηση ($p=0.008$) και μεγαλύτερο μέσο αριθμό λεμφαδενικών μεταστάσεων ($p=0.01$).

Στη μελέτη των Yokota και συνεργατών, 229 ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου που έλαβαν συστηματική χημειοθεραπεία λόγω προχωρημένης νόσου ή υποτροπής αξιολογήθηκαν όσον αφορά την ύπαρξη KRAS ή BRAF V600E μεταλλάξεων και την πιθανή συσχέτιση αυτών με διάφορες κλινικο-ιστοπαθολογικές παραμέτρους (483). Οι BRAF V600E μεταλλαγμένοι όγκοι εμφάνισαν συχνότερα περιτοναϊκές μεταστάσεις σε σχέση με τους BRAF wild-type όγκους ($p=0.0062$).

Οι Russo και συνεργάτες μελέτησαν 222 ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, στους οποίους διαπιστώθηκε ότι οι BRAF V600E μεταλλαγμένοι όγκοι συνδέονται με απομακρυσμένες λεμφαδενικές μεταστάσεις ως πρώτη εντόπιση υποτροπής της νόσου ($p<0.001$) (484).

Στη δική μας μελέτη διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αυξημένου αριθμού λεμφαδενικών μεταστάσεων (N2) και της παρουσίας της V600E μετάλλαξης του BRAF γονιδίου ($p<0.05$).

Ενδιαφέρον προκαλεί μια πρόσφατη μελέτη των Guo και συνεργατών του το 2014, η οποία αφορά στην έκφραση του ενεργοποιούμενου από το BRAF μεγάλου, μη κωδικοποιού RNA μορίου (BRAF- activated long non- coding RNA, BANCR) σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου (485). Τα μεγάλα, μη- κωδικοποιά μόρια RNA (lncRNAs) έχουν μήκος >200 νουκλεοτίδια και δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αλλά αλληλεπιδρούν με αυτές (486, 487). Παρά το γεγονός ότι τα lncRNA μόρια δεν έχουν μελετηθεί όσο τα microRNAs, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση διαφόρων κυτταρικών λειτουργιών, όπως η κυτταρική ανάπτυξη, ο μεταβολισμός, η πλειοδυναμία των βλαστικών κυττάρων, η απόπτωση και η μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων (488- 494). Τα λειτουργικά lncRNAs μόρια θεωρούνται ως ιδιαίτερα ελπιδοφόροι υποψήφιοι δείκτες όσον αφορά στη διάγνωση του καρκίνου στο μέλλον και στη σχεδίαση θεραπευτικών χειρισμών (495). Το BRAF ενεργοποιούμενο μόριο lncRNA (BANCR) είναι ένα επαναλαμβανόμενα αυξημένης έκφρασης μετάγραφο του χρωμοσώματος 9 που μετέχει ενδεχομένως στη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του μελανώματος (496, 497). Το μόριο BANCR είναι στενά συνδεδεμένο με τη μετάλλαξη BRAF V600E και παρά το γεγονός ότι η εν λόγω μετάλλαξη έχει εκτενώς μελετηθεί στον ορθοκολικό καρκίνο τα τελευταία χρόνια, η έκφραση και η βιολογική σημασία του BANCR στα καρκινώματα του παχέος εντέρου παραμένει ασαφής (485).

Ο βιολογικός μηχανισμός που διέπει την αυξημένη λεμφαδενική μετάσταση στους ορθοκολικούς καρκίνους με BRAF μεταλλάξεις παραμένει αδιευκρίνιστος. Κατά τη μελέτη των Guo και συνεργατών διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση BANCR στα δείγματα ασθενών με BRAF μεταλλαγμένους όγκους, ενώ παρατηρήθηκε επίσης

ότι αυτή η αυξημένη έκφραση επάγει την επιθηλιακή-μεσεγγυματική μετάβαση (EMT) και σχετίζεται με την αυξημένη μετάσταση στους λεμφαδένες (485).

4.3 Έκφραση του KRAS γονιδίου

Είναι πλέον ευρέως γνωστό ότι οι σημειακές μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο KRAS αυξάνουν σημαντικά την ενεργότητα της RAS-GTPάσης, η οποία με τη σειρά της, μέσω του ενδοκυττάριου μονοπατιού RAS-MAPK διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση (498). Μηχανισμοί όπως οι μεταβολές στον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου (Gene Copy Number, GCN) ή αλλαγές σε μεταφραστικούς και μετα- μεταφραστικούς μηχανισμούς μπορούν επίσης να επηρεάσουν την ενεργότητα της Ras πρωτεΐνης (499).

Οι Mekenkamp και συνεργάτες μελέτησαν τον αριθμό αντιγράφων του KRAS γονιδίου και την έκφραση των microRNAs που στοχεύουν το εν λόγω γονίδιο σε σχέση με την κλινική έκβαση των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου (mCRC) μετά από θεραπεία με σετουξιμάμπη. Παρατήρησαν ότι σε ένα σημαντικό ποσοστό των όγκων του παχέος εντέρου (21.2%), οι μεταβολές στον αριθμό αντιγράφων του KRAS γονιδίου συμβαίνουν ανεξάρτητα από τις KRAS μεταλλάξεις. Σε προηγούμενη μελέτη είχε παρατηρηθεί ότι η αύξηση του αριθμού αντιγράφων του KRAS γονιδίου σχετίζεται με αυξημένη ενεργότητα της RAS-GTPάσης σε κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου και με δυσμενή κλινική έκβαση σε αδενοκαρκινώματα πνεύμονα (500). Σύμφωνα με τους Mekenkamp και συνεργάτες, η αύξηση του αριθμού αντιγράφων του KRAS γονιδίου σχετίζεται με δυσμενή κλινική πορεία των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου, που δε φέρουν KRAS μεταλλάξεις και έλαβαν θεραπεία με σετουξιμάμπη. Δεν παρατηρήθηκε έως σήμερα ανάλογη επίδραση του αυξημένου αριθμού των KRAS αντιγράφων στην πρόγνωση ασθενών που έλαβαν άλλου είδους θεραπεία, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη πιθανής προβλεπτικής αξίας όσον αφορά στη θεραπεία με σετουξιμάμπη (499).

Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν, τουλάχιστον μέχρι σήμερα, δεδομένα που να εκτιμούν τα επίπεδα έκφρασης του KRAS γονιδίου, σε επίπεδο mRNA μεταγράφων, στα καρκινώματα του παχέος εντέρου. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν δημοσιευθεί αφορούν στην έκφραση της πρωτεΐνης ras με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους ή με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western (501- 507).

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η έκφραση του KRAS ογκογονιδίου σε επίπεδο mRNA μεταγράφων, με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR). Η σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης του KRAS γονιδίου δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση μεταξύ του φυσιολογικού και του καρκινικού ιστού στους ίδιους ασθενείς. Ωστόσο, με τη μέθοδο της απόλυτης ποσοτικοποίησης, διαπιστώθηκε ότι στον ορθοκολικό καρκίνο, η έκφραση του KRAS

γονιδίου είναι σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στο φυσιολογικό ιστό και το εύρημα αυτό είναι στατιστικά σημαντικό.

Το γονίδιο της β2-μικροσφαιρίνης (β2M) χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως γονίδιο αναφοράς για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των KRAS και EGFR γονιδίων σε επίπεδο mRNA μεταγράφων σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (443, 444, 508). Ωστόσο, το 2010, δημοσίευση των Sorby και συνεργατών (509) υποστήριξε ότι το γονίδιο της β2M είναι μεταβλητό στο συγκεκριμένο ιστό. Η άποψη αυτή φαίνεται να επιβεβαιώνεται από μεταγενέστερη μελέτη των Yasuhiro Nihon-Yanagi και συνεργατών (510), οι οποίοι έδειξαν ότι η έκφραση του γονιδίου της β2M μεταβάλλεται και εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα στον καρκινικό ιστό σε σχέση με το φυσιολογικό, γεγονός που καθιστά ακατάλληλο το συγκεκριμένο γονίδιο ως γονίδιο αναφοράς. Η μεταβλητή έκφραση της β2M σε φυσιολογικό και καρκινικό ιστό, εξηγεί τις διαφορές που απαντώνται ως προς την έκφραση των γονιδίων KRAS και EGFR, μεταξύ της σχετικής και της απόλυτης ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων μας.

Τα ευρήματα που προκύπτουν από την απόλυτη ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των εξεταζόμενων γονιδίων είναι σε συμφωνία με αντίστοιχα αποτελέσματα που έχουν παρατηρηθεί σε άλλα καρκινώματα, όπως στο αδενοκαρκίνωμα των πόρων του παγκρέατος και στα μη μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα. Στη μελέτη των Peng και συνεργατών (511), μελετήθηκε η έκφραση του ογκογονιδίου KRAS σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα των πόρων παγκρέατος και έγινε σύγκριση με την αντίστοιχη έκφραση του γονιδίου σε παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Η αξιολόγηση αυτή έγινε με τη μέθοδο της ποσοτικής qRT-PCR και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης και με γονίδιο αναφοράς την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH). Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι το KRAS γονίδιο είχε αυξημένη έκφραση στα αδενοκαρκινώματα των πόρων του παγκρέατος, καθώς και ότι η αυξημένη αυτή έκφραση παρουσίαζε σημαντική συσχέτιση με το μέγεθος του όγκου, την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων, το στάδιο της νόσου και την παρουσία περινευρικής διήθησης. Ωστόσο, δεν αναδείχτηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με το φύλο και την ηλικία των ασθενών, την ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων, την ιστολογική διαφοροποίηση του καρκινώματος και την παρουσία αγγειακής διήθησης.

Σε μια άλλη μελέτη, των Liang και συνεργατών του, αξιολογήθηκε η έκφραση των γονιδίων KRAS και EGFR σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα με τη μέθοδο της ημι-ποσοτικής RT-PCR (512). Και τα δύο γονίδια παρουσίασαν αυξημένη έκφραση στους καρκινικούς ιστούς σε σχέση με παρακείμενο μη καρκινικό ιστό. Όσον αφορά όμως το KRAS γονίδιο, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της έκφρασης αυτού με κλινικο- ιστοπαθολογικές παραμέτρους.

Στη δική μας μελέτη, δείξαμε ότι και στα καρκινώματα του παχέος εντέρου, το KRAS γονίδιο εμφανίζει υψηλότερη έκφραση στον καρκινικό ιστό σε σχέση με το φυσιολογικό τοίχωμα του παχέος εντέρου στους ίδιους ασθενείς. Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει ότι το μη μεταλλαγμένο (wild-type) KRAS γονίδιο χάνεται συχνά κατά την καρκινογένεση σε διάφορους τύπους καρκίνου (513). Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι απώλειες των αλληλομόρφων γονιδίων στη χρωμοσωμική περιοχή 12p είναι συχνές και αξίζει να σημειωθεί ότι το KRAS γονίδιο εδράζεται στην 12p12-13 χρωμοσωμική θέση. Μελέτη των Li και συνεργατών υποδεικνύει συσχέτιση των KRAS μεταλλάξεων και της απώλειας αλληλομόρφων γονιδίων στην 12p12-13 περιοχή σε ασθενείς με αδενοκαρκινώματα πνεύμονα (514). Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η απώλεια του μη μεταλλαγμένου KRAS αλληλομόρφου διευκολύνει πιθανά τον μετασχηματισμό των κυττάρων από το ένα μεταλλαγμένο KRAS αλληλόμορφο κατά την καρκινογένεση (515).

Η έκφραση του KRAS γονιδίου, σε επίπεδο mRNA μεταγράφων, ρυθμίζεται κατά την έναρξη της μεταγραφής με δύο τρόπους: μέσω της σύνδεσης πρωτεϊνών στον υποκινητή του KRAS γονιδίου και κατά τη διάρκεια της μεταγραφικής επιμήκυνσης, μέσω microRNA μορίων που επιδρούν στη σταθερότητα των KRAS mRNA μορίων (310). Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω των miRNAs είναι πιθανά αποτέλεσμα της ατελούς υβριδοποίησης του miRNA μορίου και των συμπληρωματικών αλληλουχιών που βρίσκονται στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR) του mRNA μορίου-στόχου. Η αλληλεπίδραση αυτή μειώνει τη σταθερότητα των mRNA μορίων και καταστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση εμποδίζοντας την πρόσβαση στα ριβοσώματα. Το miRNA-let7 έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει αρνητικά τα επίπεδα της RAS πρωτεΐνης και μειώνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Τα KRAS, NRAS και HRAS γονίδια διαθέτουν πολλαπλές let-7 miRNA συμπληρωματικές θέσεις στις 3' UTR περιοχές τους (516-518). Επιπρόσθετα, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η ικανότητα εξαλλαγής του KRAS ογκογονιδίου ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα υπερέκφρασης του μεταλλαγμένου KRAS αλληλομόρφου ή αντιστρόφως λόγω έλλειψης του φυσιολογικού, μη μεταλλαγμένου αλληλόμορφου γονιδίου (519). Αυξημένη έκφραση του KRAS γονιδίου μπορεί επίσης να προκληθεί λόγω απώλειας των p16INK4 (CDKN2A), p19INK4 (CDKN2D) ή p53 μορίων (520).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μας ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του ογκογονιδίου KRAS στα καρκινώματα του παχέος εντέρου και του αριθμού των λεμφαδενικών μεταστάσεων, στις περιπτώσεις των ασθενών με λεμφαδενική συμμετοχή της νόσου, γεγονός που μας οδηγεί στην υπόθεση ότι η υψηλή έκφραση του KRAS γονιδίου, σε επίπεδο mRNA μεταγράφων, σχετίζεται ενδεχομένως με επιθετικότερη συμπεριφορά της νόσου και μπορεί να δρα συνεπικουρικά ή ανεξάρτητα από το status των KRAS μεταλλάξεων. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να

προσδιοριστεί ο ρόλος της έκφρασης του KRAS γονιδίου στα καρκινώματα παχέος εντέρου. Επιπλέον είναι δυνατή η ανάπτυξη θεραπευτικών παραγόντων που θα οδηγήσουν σε μείωση της έκφρασης του KRAS γονιδίου μέσω στόχευσης συμπληρωματικών αλληλουχιών στον υποκινητή του γονιδίου ή μέσω στόχευσης miRNA μορίων που θα αναστείλουν το ογκογόνο μεταλλαγμένο RNA μήνυμα.

4.4 Έκφραση του EGFR γονιδίου

Τα τελευταία χρόνια, ένας από τους σημαντικότερους στόχους της έρευνας στο πεδίο της Ιατρικής είναι ο καθορισμός προγνωστικών και προβλεπτικών βιολογικών δεικτών. Πολλοί ερευνητές έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στο μονοπάτι του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR, εξαιτίας του ρόλου που διαδραματίζει στην καρκινογένεση και στην ανάπτυξη επιθετικής βιολογικής συμπεριφοράς. Η αυξημένη έκφραση του συγκεκριμένου υποδοχέα διαταράσσει το αντίστοιχο σηματοδοτικό μονοπάτι και ενεργοποιεί έναν καταρράκτη αντιδράσεων στο εσωτερικό του κυττάρου με τελικό αποδέκτη την ενεργοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με την καρκινογένεση. Στον ορθοκολικό καρκίνο, η αυξημένη έκφραση του EGF- υποδοχέα αποτελεί συχνό φαινόμενο 25-82% (521), σε αντίθεση με τις σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί το συγκεκριμένο υποδοχέα, οι οποίες είναι σπάνιες (0.34% έως 12%) στα καρκινώματα του παχέος εντέρου (298- 300, 522- 524).

Η έκφραση του EGFR έχει μελετηθεί ποικιλοτρόπως, σε επίπεδο DNA (gene copy number), RNA (mRNA μετάγραφα) και πρωτεϊνών. Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος (IHC) αποτελεί την κύρια μέθοδο για την εκτίμηση των επιπέδων της EGFR πρωτεΐνης και αποτελεί αναμφισβήτητα την ευκολότερη προσέγγιση για την κλινική μελέτη των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου (302). Ωστόσο, παρουσιάζει μειονεκτήματα, καθώς δεν υπάρχει ένα τυποποιημένο σύστημα βαθμονόμησης (standard scoring system) για την ταξινόμηση των δειγμάτων με βάση τη χαμηλή, μέτρια και υψηλή έκφραση της EGFR πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα, υπάρχει έλλειψη αντικειμενικότητας όσον αφορά στα κριτήρια αξιολόγησης των αποτελεσμάτων, γεγονός που οδηγεί σε σημαντική υποκειμενικότητα της μεθόδου (242, 302, 525, 526). Η ευαισθησία της μεθόδου ποικίλει, λόγω των ποικίλων αντισωμάτων που διατίθενται στο εμπόριο και των διαφορετικών πρωτοκόλλων εφαρμογής των ανοσοϊστοχημικών μεθόδων μεταξύ των εργαστηρίων και αποτελεί έναν ακόμη σημαντικό λόγο για τα αντικρουόμενα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία (526).

Στις εναλλακτικές μεθόδους αξιολόγησης της έκφρασης του EGF-υποδοχέα συγκαταλέγονται η μελέτη της ενίσχυσης του γονιδίου και του αριθμού των γονιδιακών αντιγράφων (Gene Copy Number) με τη μέθοδο του φθορίζοντα in situ υβριδισμού (FISH), η ποσοτικοποίηση της αντίστοιχης πρωτεΐνης με τη μέθοδο

ELIZA και η μελέτη της έκφρασης του υποδοχέα σε επίπεδο mRNA μεταγράφων, με τη μέθοδο της RT-PCR. Ωστόσο, στα καρκινώματα του παχέος εντέρου, με εξαίρεση την ανοσοϊστοχημική μέθοδο, υπάρχει ελάχιστη βιβλιογραφία για τις παραπάνω μεθόδους (527).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, μελετήθηκε η έκφραση του EGF-υποδοχέα με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR). Στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχουν ελάχιστες μελέτες για την έκφραση του EGFR με τη μέθοδο της qRT-PCR στον ορθοκολικό καρκίνο (527- 535). Οι μελέτες αυτές αξιολόγησαν την έκφραση του EGF-υποδοχέα, σε επίπεδο mRNA μεταγράφων και την ύπαρξη πιθανής συσχέτισής της με την απόκριση των ασθενών σε συγκεκριμένα χημειοθεραπευτικά σχήματα ή παραμέτρους επιβίωσης (529, 531, 532, 534). Οι Kuramotochi και συνεργάτες μελέτησαν τη μεταβολή της έκφρασης του υποδοχέα μεταξύ της πρωτοπαθούς εντόπισης του όγκου και των ηπατικών μεταστάσεων (533), καθώς επίσης και μεταξύ καρκινικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού (528, 533).

Οι Spindler και συνεργάτες σύγκριναν διάφορες μεθόδους εκτίμησης των επιπέδων έκφρασης του EGF-υποδοχέα (527). Στη συγκεκριμένη μελέτη, διαπιστώθηκε σημαντική ασυμφωνία των επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα σε επίπεδο DNA, RNA και πρωτεϊνών. Σε αντίστοιχα συμπεράσματα κατέληξαν οι Nannini και συνεργάτες, οι οποίοι μελέτησαν τα επίπεδα της EGFR πρωτεΐνης με ανοσοϊστοχημική μέθοδο (IHC) και μέθοδο ELIZA, ενώ μελέτησαν και με τη μέθοδο της RT-PCR την έκφραση του υποδοχέα σε επίπεδο mRNA μεταγράφων. Η μελέτη αυτή έδειξε επίσης ασυμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων εκτίμησης των επιπέδων έκφρασης του EGF-υποδοχέα (530).

Στις μελέτες που έγινε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του EGF-υποδοχέα σε καρκινικό και φυσιολογικό ιστό, τα αποτελέσματα ήταν αντικρουόμενα μεταξύ τους. Οι Kuramotochi και συνεργάτες μελέτησαν 31 ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και ηπατικές μεταστάσεις. Όλοι οι ασθενείς ήταν Ιάπωνες, ηλικίας 45 έως 85 ετών και είχαν υποβληθεί σε χειρουργική αφαίρεση των πρωτοπαθών όγκων και των ηπατικών μεταστάσεων. Μελετήθηκε η έκφραση του EGF-υποδοχέα σε επίπεδο mRNA και πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της RT-PCR (σχετική έκφραση, γονίδιο αναφοράς η β-ακτίνη) και ανοσοϊστοχημική μέθοδο (IHC) αντίστοιχα. Η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε ότι η σχετική έκφραση του EGFR στον καρκινικό ιστό ήταν χαμηλότερη σε σχέση με εκείνη του φυσιολογικού ιστού, ωστόσο η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (1.35 vs 1.39: $p=0.37$). Υπήρξε επίσης σημαντική συμφωνία στην έκφραση του υποδοχέα μεταξύ πρωτοπαθούς και μεταστατικής εστίας. Όσον αφορά στη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης μεταξύ mRNA μεταγράφων και πρωτεΐνης, δεν υπήρξε συμφωνία των αποτελεσμάτων

στους πρωτοπαθείς όγκους, ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε στις ηπατικές μεταστάσεις (533).

Οι Spindler και συνεργάτες (527) μελέτησαν την έκφραση του EGF-υποδοχέα σε 199 Δανούς ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, τόσο στον καρκινικό όσο και στο φυσιολογικό ιστό, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του φθορίζοντα *in situ* υβριδισμού (FISH), τη μέθοδο της RT-PCR με γονίδιο αναφοράς τη β-ακτίνη, τη μέθοδο ELISA και την ανοσοϊστοχημική μέθοδο. Παρατήρησαν ότι η σχετική έκφραση, σε επίπεδο mRNA μεταγράφων, του υποδοχέα στο φυσιολογικό τοίχωμα του παχέος εντέρου ήταν υψηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση του καρκινικού ιστού κι η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p=10^{-6}$). Σε επίπεδο πρωτεΐνης με τη μέθοδο ELISA, δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών συγκέντρωσης της EGFR πρωτεΐνης στο φυσιολογικό και καρκινικό ιστό ($p=0.98$). Ωστόσο, τα ευρήματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με την υπόθεση της αυξημένης έκφρασης του EGFR ως κύριο μηχανισμό απορρύθμισης του υποδοχέα στον ορθοκολικό καρκίνο και καθιστούν αναγκαία την περαιτέρω αξιολόγηση της έκφρασης του EGF- υποδοχέα σε προοπτικές μελέτες.

Στη δική μας μελέτη, η σχετική έκφραση του EGFR γονιδίου, σε επίπεδο mRNA μεταγράφων, δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του καρκινικού και του φυσιολογικού ιστού στους ίδιους ασθενείς, παρά το γεγονός ότι ο εν λόγω υποδοχέας θεωρείται πως υπερεκφράζεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Κατά τη σχετική ποσοτικοποίηση η έκφραση εκτιμάται με διαίρεση της συγκέντρωσης του γονιδίου-στόχου κάθε δείγματος προς την αντίστοιχη συγκέντρωση του γονιδίου-αναφοράς για το κάθε δείγμα. Στη δική μας μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς η β2-μικροσφαιρίνη και όχι η β-ακτίνη που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες που αναφέρθηκαν. Δεδομένου ότι μεταγενέστερες μελέτες έκριναν το γονίδιο της β2-μικροσφαιρίνης (β2M) ακατάλληλο, λόγω της μεταβλητής έκφρασής του, στα καρκινώματα του παχέος εντέρου, τα δεδομένα της σχετικής ποσοτικοποίησης δεν αξιολογήθηκαν περαιτέρω στη μελέτη μας.

Η εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των EGFR mRNA μεταγράφων με απόλυτη ποσοτικοποίηση έδειξε υψηλότερη έκφραση στα καρκινώματα του παχέος εντέρου σε σχέση με το φυσιολογικό εντερικό τοίχωμα των ίδιων ασθενών η οποία ήταν στατιστικά σημαντική. Δεν αναδείχτηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις των επιπέδων έκφρασης του EGFR γονιδίου με κλινικο-ιστοπαθολογικές παραμέτρους, όπως η ηλικία, το φύλο, ο βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης του όγκου ή το παθολογοανατομικό στάδιο της νόσου, γεγονός που συμφωνεί απόλυτα και με τα ευρήματα προηγούμενων ερευνητών (535).

Στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχει μία μόνο μελέτη μέχρι σήμερα, στην οποία έγινε εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των mRNA μεταγράφων του EGF-υποδοχέα με τη μέθοδο της απόλυτης ποσοτικοποίησης (535). Στη συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκαν συνολικά 41 ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου και

εντόπιση στο ορθό. Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης του EGFR σε συνάρτηση τόσο με κλινικο-ιστοπαθολογικές παραμέτρους, όπως η ηλικία, το φύλο, ο βαθμός ιστολογικής διαφοροποίησης του όγκου, το παθολογοανατομικό στάδιο της νόσου (pTN), όσο και με γενετικές παραμέτρους και συγκεκριμένα την παρουσία/ απουσία μεταλλάξεων στα γονίδια KRAS και BRAF, δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις. Ωστόσο, φάνηκε ότι η υψηλή έκφραση του EGF-υποδοχέα αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων, σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένη νόσο. Σύγκριση της απόλυτης έκφρασης του EGF-υποδοχέα μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού δεν πραγματοποιήθηκε. Στην παρούσα διατριβή, η εντόπιση των καρκινωμάτων των ασθενών αφορούσε ολόκληρο το παχύ έντερο, ενώ ήταν επίσης δυνατή η σύγκρισή της απόλυτης έκφρασης του εν λόγω υποδοχέα μεταξύ φυσιολογικού και καρκινικού ιστού.

Αξίζει να αναφερθεί επίσης ότι από τα αποτελέσματά μας φαίνεται να υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης έκφρασης του EGF-υποδοχέα, σε επίπεδο mRNA μεταγράφων και της ύπαρξης μεταλλάξεων του KRAS γονιδίου, χωρίς ωστόσο να αποδειχθεί στατιστικά σημαντική, ενδεχομένως λόγω του σχετικά μικρού αριθμού δειγμάτων. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν πιθανή συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των EGFR mRNA μεταγράφων με CA διουκλεοτιδικές επαναλήψεις στο ιντρόνιο 1 του EGFR γονιδίου, ή με την παρουσία μιας έλλειψης στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR) του EGFR mRNA μορίου (536-538).

Οι Ma και συνεργάτες μελέτησαν την ύπαρξη μεταλλάξεων στην πολυαδενική ουρά της 3' μη-μεταφραζόμενης περιοχής του EGFR γονιδίου (3' UTR polyA tract), την έκφραση του EGF-υποδοχέα σε επίπεδο mRNA μεταγράφων με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης, την ύπαρξη ή μη μικροδορυφορικής αστάθειας, καθώς επίσης και την ύπαρξη μεταλλάξεων στα KRAS και BRAF γονίδια σε 98 καρκινώματα του παχέος εντέρου και 47 καρκινώματα του ενδομητρίου (539). Όσον αφορά στα καρκινώματα του παχέος εντέρου, διαπιστώθηκε ότι η συχνότητα των KRAS και BRAF μεταλλάξεων ήταν υψηλότερη στους όγκους με polyA ελλείψεις, σε σχέση με τους μη μεταλλαγμένους polyA όγκους. Στη μελέτη των Yuan και συνεργατών, διαπιστώθηκε ότι η polyA έλλειψη στην 3' UTR περιοχή του EGFR γονιδίου οδηγεί πιθανά σε σταθεροποίηση του mRNA του υποδοχέα και κατ'επέκταση σε έκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης σε κυτταρικές σειρές (536). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, οι 3' UTR polyA ελλείψεις του γονιδίου του EGF-υποδοχέα είναι συχνές και επηρεάζουν την έκφραση του υποδοχέα σε κυτταρικές σειρές καρκινώματος του παχέος εντέρου και σε μικρό αριθμό δειγμάτων ασθενών. Σχετίζονται επίσης με την ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας. Στη μελέτη των Ma και συνεργατών οι 3' UTR polyA ελλείψεις ήταν πολύ συχνές - σε ποσοστό 80% των δειγμάτων - με σχεδόν αποκλειστική εντόπιση στους MSI-H όγκους (539).

Στη μελέτη των Ma και συνεργατών παρατήρησαν ότι σε καρκινώματα ενδομητρίου και παχέος εντέρου που είχαν μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H), οι όγκοι που έφεραν 3' UTR poly A ελλείψεις ήταν πιο πιθανό να φέρουν BRAF ή KRAS μεταλλάξεις. Δεδομένου ότι η παρουσία 3' UTR poly A ελλείψεων φαίνεται να οδηγεί σε σταθεροποίηση του EGFR mRNA μορίου, η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τα δικά μας αποτελέσματα, που δείχνουν υψηλά επίπεδα EGFR mRNA μεταγράφων σε ασθενείς που έφεραν KRAS μεταλλάξεις.

Στη μελέτη των Pentheroudakis και συνεργατών 226 δείγματα ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο, με γνωστό γονότυπο όσον αφορά στην ύπαρξη KRAS, NRAS, BRAF και PIK3CA μεταλλάξεων, μελετήθηκαν για την mRNA έκφραση του EGF-υποδοχέα και των συνδετών του EGF, TGFA, Amphiregulin (AREG) και Epregrulin (EREG) με τη μέθοδο της RT-PCR και γονίδιο αναφοράς τη β - γλυκουρονιδάση. Παρατήρησαν συσχέτιση μεταξύ του μεταλλαγμένου KRAS/BRAF γονότυπου και της μειωμένης έκφρασης των AREG και EREG mRNA μορίων-συνδετών του EGF-υποδοχέα. Ως πιθανή εξήγηση για τη συσχέτιση αυτή αναφέρεται το σταθερά ενεργοποιημένο RAS/RAF/MAPK σηματοδοτικό μονοπάτι, που καθιστά περιττή βιολογικά την ενεργοποίηση του μονοπατιού του του EGF-υποδοχέα. Εναλλακτικά, μια άλλη εξήγηση είναι η ύπαρξη μηχανισμού αρνητικής δράσης (negative feedback loop) που συνδέει την ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού με καταστολή της EGFR σηματοδότησης (540). Στη δική μας μελέτη παρατηρήσαμε μια θετική τάση μεταξύ της αυξημένης έκφρασης του EGF-υποδοχέα, σε επίπεδο mRNA μεταγράφων και της ύπαρξης μεταλλάξεων του KRAS γονιδίου, γεγονός που εξηγείται με βάση την ύπαρξη μηχανισμού καταστολής του EGFR μονοπατιού όταν είναι ενεργοποιημένο το MAPK σηματοδοτικό μονοπάτι.

4.5 Συμπεράσματα- μελλοντικοί στόχοι

Προκειμένου να προσδιορισθούν οι κατάλληλοι βιοδείκτες, όσον αφορά στην επιλογή των ασθενών που είναι πιθανό να απαντήσουν σε στοχευμένη αντί-EGFR θεραπεία, μελετήθηκαν διάφορα μόρια που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι του EGF-υποδοχέα, μεταξύ των οποίων κι ο ίδιος ο υποδοχέας EGFR.

Η επιλογή των ασθενών για στοχευμένη θεραπεία με βάση το μοριακό προφίλ κάθε όγκου θεωρείται ως η θεραπευτική στρατηγική του μέλλοντος. Παρά το γεγονός ότι η παρουσία KRAS μεταλλάξεων θεωρείται προγνωστικός/ προβλεπτικός δείκτης όσον αφορά στην ανταπόκριση στη θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα (ειδικότητα 93%), ωστόσο διαθέτει μειωμένη ευαισθησία (47%), καθώς η απουσία των εν λόγω μεταλλάξεων δεν εξασφαλίζει όφελος από τα συγκεκριμένα θεραπευτικά σχήματα (172, 173, 179, 180, 541). Το γεγονός αυτό οδήγησε στην έρευνα επιπρόσθετων βιοδεικτών εστιάζοντας στην ανάλυση μορίων που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι του EGF- υποδοχέα (542).

Συνοψίζοντας, στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε σε 322 ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου τις κλινικο- ιστοπαθολογικές παραμέτρους και την ύπαρξη KRAS/BRAF μεταλλάξεων. Επιπλέον, σε 50 ασθενείς συλλέξαμε νωπό νεοπλασματικό και φυσιολογικό ιστό και μελετήσαμε την έκφραση, σε επίπεδο mRNA μεταγράφων των KRAS και EGFR γονιδίων καταλήγοντας στα ακόλουθα συμπεράσματα:

Κλινικο/ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά:

- Συσχέτιση του ανδρικού φύλου με το χαμηλό βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης (grade 3), ($p < 0.05$).
- Η σύγκριση των αδενοκαρκινωμάτων καλής διαφοροποίησης (grade 1), με τα καρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης (grade 3) ανέδειξε συσχετίσεις τόσο με την απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων ($p < 0.005$), όσο και με την απουσία αγγειακής διήθησης ($0.01 < p < 0.025$)

KRAS/BRAF μεταλλάξεις

- Η συχνότητα και κατανομή των μεταλλάξεων στον Ελληνικό πληθυσμό συμφωνεί με τα αποτελέσματα προηγούμενων μεγάλων μελετών παγκόσμιας κλίμακας.
- Οι άρρενες ασθενείς έφεραν συχνότερα μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 13 του KRAS γονιδίου, σε σχέση με τις γυναίκες ασθενείς ($p < 0.05$). Οι νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις G>A, συγκρινόμενες με τις επίσης συχνές νουκλεοτιδικές μεταθέσεις G>T εμφανίζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p < 0.05$) με την απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων. Επιπρόσθετα, οι G>C μεταθέσεις στο κωδικόνιο 12 εμφανίζουν στατιστικά πολύ σημαντική συσχέτιση ($p < 0.005$) με την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων.
- Συσχέτιση των KRAS μεταλλάξεων και της εντόπισης του όγκου στο δεξιό κόλον, σε σχέση με τα καρκινώματα που εντοπίζονταν στο αριστερό κόλον, συμπεριλαμβανομένου και του ορθού ($p < 0.05$). Στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p < 0.005$) παρατηρήθηκε επίσης μεταξύ του χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης και της απουσίας των KRAS μεταλλάξεων.
- Ασθενής στατιστικά συσχέτιση της παρουσίας της p.V600E BRAF μετάλλαξης με το γυναικείο φύλο ($p < 0.25$, $p > 0.05$), αλλά στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εντόπιση των καρκινωμάτων στο δεξιό κόλον ($p < 0.005$).

- Στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της p.V600E BRAF μετάλλαξης και του χαμηλού βαθμού ιστολογικής διαφοροποίησης ($p < 0.005$), καθώς επίσης και του αυξημένου αριθμού λεμφαδενικών μεταστάσεων (pN2) σε ασθενείς με λεμφαδενική συμμετοχή της νόσου ($p < 0.05$).

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν ότι τα καρκινώματα δεξιάς εντόπισης ακολουθούν διαφορετικό μονοπάτι καρκινογένεσης σε σχέση με τα αριστερής εντόπισης καρκινώματα. Επιπλέον, η παρουσία των BRAF μεταλλάξεων σχετίζεται με επιθετική συμπεριφορά και χειρότερη επιβίωση των ασθενών με αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου.

Έκφραση KRAS/EGFR mRNA μεταγράφων

- Με τη μέθοδο της απόλυτης ποσοτικοποίησης, η έκφραση των KRAS/ EGFR γονιδίων σε επίπεδο mRNA μεταγράφων ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη στον καρκινικό ιστό σε σχέση με το φυσιολογικό τοίχωμα του παχέος εντέρου, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή κι άλλων μηχανισμών πέραν των KRAS μεταλλάξεων στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου.
- Τα επίπεδα έκφρασης του KRAS γονιδίου παρουσίασαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον αριθμό των λεμφαδενικών μεταστάσεων στους ασθενείς με λεμφαδενική συμμετοχή της νόσου ($p < 0.05$). Η μέτρηση της έκφρασης των KRAS mRNA μεταγράφων θα μπορούσε να αποτελέσει έναν υποψήφιο βιοδείκτη για την εκτίμηση της μεταστατικής ικανότητας του όγκου και την παρακολούθηση (follow-up) των ασθενών στα πλαίσια πιθανής υποτροπής της νόσου.
- Τα επίπεδα έκφρασης του EGFR γονιδίου ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις στο KRAS γονίδιο, σε σχέση με τους ασθενείς που χαρακτηρίστηκαν ως KRAS wild-type.

Συνοψίζοντας, το γεγονός ότι οι μισοί περίπου ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, που δε φέρουν KRAS μεταλλάξεις, δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με αντι-EGFR αναστολείς, αναδεικνύει την ύπαρξη άλλων παραγόντων- πέραν των KRAS μεταλλάξεων- που επηρεάζουν την αντίσταση των ασθενών στη θεραπεία. Οι παράγοντες αυτοί φαίνεται να περιλαμβάνουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των EGFR-προσδετών και πιθανή ενεργοποίηση άλλων μονοπατιών.

Είναι πιθανό η μελέτη της έκφρασης του EGF-υποδοχέα, σε επίπεδο mRNA μεταγράφων, να αποτελέσει στο μέλλον ένα χρήσιμο βιοδείκτη με προγνωστική ή προβλεπτική αξία για την απόκριση των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου σε

στοχευμένες θεραπείες και την πρόβλεψη μεταστατικής ικανότητας ή ανάπτυξης αντίστασης του όγκου. Επιπρόσθετα, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην παρακολούθηση της πορείας της νόσου στα πλαίσια εκτίμησης υποτροπής της νόσου. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η εκτενέστερη μελέτη σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και σε συνάρτηση με δείκτες επιβίωσης ή απάντησης των ασθενών στη στοχευμένη θεραπεία.

Βιβλιογραφία

- [1] **Κεραμέως- Φόρογλου Χ.** «Ιστολογία- Εμβρυολογία του ανθρώπου» Παρατηρητής 1987.
- [2] **Άγιος Α.Ε.** «Περιγραφική και εφαρμοσμένη Ανατομική». Τόμος Β' Τα σπλάχνα. University Studio Press 1997
- [3] **Mills S.E.** «Histology for Pathologists». 3rd. edition. USA 2007
- [4] **Leedham S.J., Brittan M., McDonald S.A., Wright N.A. et al:** "Intestinal stem cells", *J Cell Mol Med.* 2005; 9 (1):11-24.
- [5] **Bosman F.T., Carneiro F., Hruban R.H., Theise N. D.** "WHO Classification of Tumors of the Digestive System" 4th edition, IARC 2010
- [6] **Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., et al.** "GLOBOCAN 2012 v1.0,Cancer Incidence and Mortality Worldwide". *IARC CancerBase*, 2013; No.11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
- [7] **Ferlay J., Steliarova- Foucher E., Lortet- Tieulent J., et al.** "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012". *European Journal of Cancer* 2013 (49): 1374- 1403
- [8] **Weitz J., Koch M., Debus J. et al.** "Colorectal cancer". *Lancet* 2005; 365, (9454): 153- 65.
- [9] **Lynch HT et al.** "Hereditary colorectal cancer". *N Engl J Med* 2003; 348: 919–32
- [10] **Steward BW et al.** "Colorectal Cancer World Cancer Report". *Lyon: IARC Press*, 2003: 198–202
- [11] **Half EE, Bresalier RS.** "Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes". *Curr Opin Gastroenterol* 2004; 20: 32–42.
- [12] **Boland CR.** "Evolution of the nomenclature for the hereditary colorectal cancer syndromes". *Familial Cancer* 2005 4: 211–218.
- [13] **Umar A. et al.** "Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability". *J Natl Cancer Inst*, 2004. 96 (4): 261-8.

- [14] **Itzkowitz S.H., Hapraz N.** "Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel disease". *Gastroenterology* 2004; 126: 1634–48.
- [15] **Krok K.L., Lichtenstein G.R.** "Colorectal cancer in inflammatory bowel disease". *Curr Opin Gastroenterol* 2004; 20: 43–48.
- [16] **Nordling et al:** "a new theory on the cancer-inducing mechanism". *Br. J. Cancer* 1953; (7): 68-72.
- [17] **Armitage et al:** "The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis". *Br. J. Cancer* 1954; (8): 1-12.
- [18] **Weinberg R.** "Oncogenes and the Molecular Biology of Cancer". *The Journal of Cell Biology* 1983; (97): 1661-2.
- [19] **Pitot et al:** "The molecular determinants of carcinogenesis". *Symp Fundam Cancer Res.* 1986; 39:187-96.
- [20] **Farber et al:** "Cancer development as a multistep process: Experimental studies in animals". *Mechanisms of Environmental Carcinogenesis*, 1987 (2): 1-20.
- [21] **Boyd J.A. and Barrett J.C.** "Genetic and cellular basis of multistep carcinogenesis". *Pharmacol. Ther.* 1990; 46: 469-86.
- [22] **Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R., et al.** "Genetic alterations during colorectal tumor development". *New Engl J Med* 1988; (319): 525–32.
- [23] **Fearon E.R., Vogelstein B.** "A genetic model for colorectal tumorigenesis". *Cell* 1990; (61):759–67.
- [24] **Vogelstein B., Kinzler K.W.** "The multistep nature of cancer". *Trends Genet.* 1993; 9(4): 138-41.
- [25] **Fidler I.J.:** "Selection of successive tumor lines for metastasis". *Nature*, 1973 (242): 148-9.
- [26] **Yokota J.** "Tumor progression and metastasis". *Carcinogenesis* 2000; 21(3): 497-503.
- [27] **Morson B.** "President's address: The polyp-cancer sequence in the large bowel". *Proc R Soc Med.* 1974; (67): 451–7.
- [28] **Worthley D.L and Leggett B.A.** "Colorectal cancer: Molecular features and clinical opportunities". *Clin Biochem Rev* 2010; (2): 31-8.

- [29] **Grady et al:** "Genomic instability and colon cancer". *Cancer Metastasis Rev* 2004; (23):11-27.
- [30] **Rajagopalan H., Lengauer C.** "Aneuploidy and cancer". *Nature* 2004 (432): 338-41.
- [31] **Rowan A. et al.** "Refining molecular analysis in the pathways of colorectal carcinogenesis". *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005 3(11):1115-23.
- [32] **Harrison S., Benziger H.** "The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: A review". *The surgeon* 2011 (9): 200-210.
- [33] **Cadigan K.M., Liu Y.I.** "Wnt signaling: complexity at the surface". *J Cell Sci* 2006; (119):395-402.
- [34] **Kuhnert F., Davis C.R., Wang H.T., et al.** "Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1". *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; (101):266-71.
- [35] **Sillars-Hardebol A.H., Carvalho B., et al.** "Identification of key genes for carcinogenic pathways associated with colorectal adenoma- carcinoma progression". *Tumour Biol* 2010;31(2):89-96.
- [36] **Kennell J., Cadigan K.M.** "APC and beta-catenin degradation". *Adv Exp Med Biol* 2009; (656):1-12.
- [37] **Jass J.R., Whitehall V.L., Young J., Leggett BA.** "Emerging concepts in colorectal neoplasia". *Gastroenterology* 2002; (123):862-76.
- [38] **Saif M.W., Shah M.** "K-ras mutations in colorectal cancer: a practice changing discovery". *Clin Adv Hematol Oncol* 2009; 7(1):45-53.
- [39] **Leslie A., Carey F.A., Pratt N.R., Steele R.J.** "The colorectal Adenoma - carcinoma sequence". *Br J Surg* 2002; (89):845- 60.
- [40] **Bellam N. et al.** "TGF beta signaling alterations and colon cancer". *Cancer Treat Res* 2010 (155):85-103.
- [41] **Mills A.A.** "p53: link to the past, bridge to the future". *Genes Dev* 2005; (19):2091-9.
- [42] **Boland C.R. et al.** "Promoter methylation in the genesis of gastrointestinal cancer". *Yonsei Med J* 2009 50(3):309-21.

- [43] **Kim J.C., Choi J.S., Roh S.A., et al.** “Promoter methylation of specific genes is associated with the phenotype and progression of colorectal adenocarcinomas”. *Ann Surg Oncol* 2010; 17(7):1767-76.
- [44] **Teodoridis J.M. et al.** “CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer: causes and implications”. *Cancer Lett* 2008; 268(2):177-86.
- [45] **Issa J.P et al.** “CIMP, at last”. *Gastroenterology* 2005; (129): 1121–1124.
- [46] **Shen .L, Toyota M., Kondo Y. et al.** “Two distinct DNA methylator phenotypes in colorectal cancer”. *Proc. Am. Assoc Cancer Res.* 2006: 5727.
- [47] **Jass J.R.** “Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features”. *Histopathology* 2007; (50):113-30.
- [48] **Iino H., Jass J.R., Simms L.A., et al.** “DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer?” *J Clin Pathol* 1999; (52):5-9.
- [49] **German HNPCC Consortium, Müller A, Beckmann C, et al.** “Prevalence of the mismatch-repair-deficient phenotype in colonic adenomas arising in HNPCC patients: results of a 5-year follow-up study”. *Int J Colorectal Dis* 2006; (21):632-41.
- [50] **Shah S.N., Hile S.E., Eckert K.A.** “Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias and variability in clinical cancer phenotypes”. *Cancer Res* 2010 15: 70(2):431-5.
- [51] **Bellizzi A.M. et al:** “Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review”. *Adv Anat Pathol.* 2009 (6):405-17.
- [52] **Auclair J. et al.** “Intensity dependent constitutional MLH1 promoter methylation leads to early onset of colorectal cancer by affecting both alleles”. *Genes Chromosomes Cancer*, 2011, 50(3):178-85.
- [53] **Walther A., Johnstone E., Swanton C.** “Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer”. *Nat Rev Cancer* 2009; (9):489-99.
- [54] **Guastadisegni C. et al.** “Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data”. *Eur J Cancer* 2010; 46 (15):2788-98.
- [55] **Sheffer M., Bacolod M., Zuk O., et al.** “Association of survival and disease progression with chromosomal instability: A genomic exploration of colorectal cancer”. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009; 106(17):7131-7136.

- [56] **Greystoke A. Mullamitha S.** “How Many Diseases Are Colorectal Cancer?” *Gastroenterology Research and Practice*. 2012; 2012:1-12.
- [57] **Hemminki K., Santi I., Weires M., et al.** “Tumor location and patient characteristics of colon and rectal adenocarcinomas in relation to survival and TNM classes,” *BMC Cancer*, 2010;10 (1):688.
- [58] **Derwinger K., Gustavsson B.** “Variations in demography and prognosis by colon cancer location,” *Anticancer Research*, 2011: 31(6):2347–2350.
- [59] **Weiss J. M., Pfau P.R., O’Connor E.S. et al.** “Mortality by stage for right-versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results-Medicare data,” *Journal of Clinical Oncology*, 2011, 29: 4401–4409.
- [60] **Lagergren J., Ye W., Ekblom A.** “Intestinal cancer after cholecystectomy: is bile involved in carcinogenesis?” *Gastroenterology*, 2001: 121(3):542–547.
- [61] **Rehnan A. G., Tyson M., Egger M. et al.** “Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies,” *The Lancet*, 2008: 371 (9612):569–578.
- [62] **Yamauchi M., Morikawa T., Kuchiba A. et al.** “Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum,” *Gut*, 2012: 61(6):847–854.
- [63] **Sjo O. H., Berg M., Merok M. A. et al.** “Peritoneal carcinomatosis of colon cancer origin: highest incidence in women and in patients with right-sided tumors,” *Journal of Surgical Oncology*, 2011: 104(7):792–797.
- [64] **Christodoulidis G., Spyridakis M., Symeonidis D., Kapatou K., Manolakis A., Tepetes K.** “Clinicopathological differences between right- and left-sided colonic tumors and impact upon survival”. *Tech Coloproctol* 2010: 14 (1):45–47.
- [65] **Meguid R.A., Slidell M.B., Wolfgang C.L., et al.** “Is There a Difference in Survival Between Right- Versus Left-Sided Colon Cancers?” *Annals of Surgical Oncology* 15(9):2388–2394.
- [66] **Nawa T., Kato J., Kawamoto H., et al.** “Differences between right- and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology and histology”. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2008;(23):418–423.
- [67] **Winawer S., Fletcher R., Rex D.K. et al.** “Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale—update based on new evidence”. *Gastroenterology* 2003; 124: 544–60.

- [68] **Stein C.J., Colditz G.A.** “Modifiable risk factors for cancer”. *Br J Cancer* 2004; 90: 299–303.
- [69] **Hawk E.T., Umar A., and Viner J.L.** “Colorectal Cancer Chemoprevention: an overview of the science”. *Gastroenterology* 2004; 126: 1423–47.
- [70] **Compton C.C., Fielding L.P., Burgart L.J., et al.** “Prognostic factors in colorectal cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999”. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 979–94.
- [71] **Compton C.C., Fenoglio-Preiser C.M., Pettigrew N., Fielding L.P.** “American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors consensus conference: Colorectal Working Group”. *Cancer* 2000; 88:1739–57.
- [72] **Boyle P., Levin B.** “World Cancer Report”. *IARC: Lyon, France* 2008.
- [73] **Day D.W., Jass J.R., Price A.B., et al.** “Morson and Dawson’s Gastrointestinal Pathology”. *J Clin Pathol.* 2003; 56(5): 399.
- [74] **Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum editor.** “Japanese Classification of Colorectal Carcinoma”. 2nd ed. Tokyo: Kanehara & Co., Ltd., 2009
- [75] **Yoshida N., Naito Y., Yagi N., Yanagisawa A.** “Importance of histological evaluation in endoscopic resection of early colorectal cancer” *World J Gastrointest Pathophysiol* 2012; 3(2): 51-59
- [76] **Hamilton S.R., Aaltonen L.A.,** editors. “World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumours of the digestive system”. *Lyon, France: IARC Press*, 2010: 104-109
- [77] **Dixon M.F.** “Gastrointestinal epithelial neoplasia: Vienna revisited”. *Gut* 2002; 51: 130-131.
- [78] **Pande R., Sunga A., Levea C., et al.** “Significance of signet-ring cells in patients with colorectal cancer”. *Dis Colon Rectum* 2008; 51(1):50-5.
- [79] **Selves J.** “Histological types and prognostic factors in colorectal cancer”. *Med Sci* 2009; 25(1): 9-12.
- [80] **Dukes C.** “Histological grading of rectal cancer”. *Proc R Soc Med.* 1937; 30:371–376.
- [81] **Stewart F.W, Spies J.W.** “Biopsy histology in the grading of rectal carcinoma”. *Am J Pathol.* 1929 (5):109–115.

- [82] **Grinnell R.S.** "The grading and prognosis of carcinoma of the colon and rectum". *Ann Surg.* 1939; 109:500–533.
- [83] **Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., et al.** "TNM Classification of Malignant Tumours". *New York: Wiley-Blackwell* 2009.
- [84] **Jass J.R., O'Brien J., Riddell R.H., Snover D.C.** "Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma: Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology". *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 13-23
- [85] **Washington M.K., Berlin J., Branton P., et al.** "Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum". *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133: 1539-51.
- [86] **Puppa G.** "TNM staging system of colorectal carcinoma: surgical pathology of the seventh edition". *Diagnostic Histopathology* 2011 17(6):243-262.
- [87] **Ueno H., Hashiguchi Y., Kajiwara Y., et al.** "Proposed objective criteria for "grade 3" in early invasive colorectal cancer". *Am J Clin Pathol* 2010; 134: 312-22
- [88] **Ueno H., Mochizuki H., Hashiguchi Y., et al.** "Histological grading of colorectal cancer: a simple and objective method". *Ann Surg* 2008; 247: 811-8.
- [89] **Ueno H., Kajiwara Y., Shimazaki H., et al.** "New Criteria for Histologic Grading of Colorectal Cancer". *Am J Surg Pathol* 2012; 36:193–201.
- [90] **Barresi V., Reggiani Bonetti L., Branca G., et al.** "Colorectal carcinoma grading by quantifying poorly differentiated cell clusters is more reproducible and provides more robust prognostic information than conventional grading". *Virchows Arch* 2012 461:621–628.
- [91] **Riboli E.B., Secco G.B., Lapertosa G., et al.** "Colorectal cancer: relationship of histologic grading to disease prognosis". *Tumori.* 1983; 69: 581–584.
- [92] **Freedman L.S., Macaskill P., Smith A.N.** "Multivariate analysis of prognostic factors for operable rectal cancer". *Lancet.* 1984; 29: 733–736.
- [93] **Greene F.L., Stewart A.K., Norton H.J.** "A new TNM staging strategy for node-positive (Stage III) colon cancer: an analysis of 50,042 patients". *Ann Surg.* 2002; 236: 416–421.
- [94] **Compton C.C.** "Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features". *Mod Pathol* 2003; 16: 376-88.

- [95] **Turner R.R., Li C., Compton C.C.** "Newer pathologic assessment techniques for colorectal carcinoma". *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6871-6.
- [96] **Compton C.C.** "Updated protocol for the examination of specimens removed from patients with colorectal carcinoma". *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:1016–25.
- [97] **Quirke P.** "Limitations of existing systems of staging for rectal cancer: the forgotten margin". Rajagopalan NT, editor. *Rectal cancer research*. 2001: 63–81.
- [98] **Quirke P., Scott N.** "The pathologist's role in the assessment of local recurrence in rectal carcinoma". *Surg Oncol Clin NAm* 1992; 3:1-17.
- [99] **Quirke P., Durdy P., Dixon M.F, Williams N.S.** "Local recurrence of rectal adenocarcinoma due to inadequate surgical resection". *Lancet* 1986; 2:996-9
- [100] **Adam I.J., Mohamdee M.O., Martin I.G, et al.** Role of the circumferential margin involvement in the local recurrence of rectal cancer. *Lancet* 1994; 344: 707-11
- [101] **Petersen V.C, Baxter K.J, Love S.B, Shepherd N.A.** "Identification of objective pathologic prognostic determinants and models of prognosis in Dukes'B colon cancer" *Gut* 2002; 51:65- 9
- [102] **Stocchi L., Nelson H., Sargent D.J., et al.** "Impact of surgical and pathological variables in rectal cancer: a United States community and cooperative group report". *J Clin Oncol* 2001; 19:3895-902.
- [103] **Bateman A.C., Carr N.J., Warren B.F.** "The retroperitoneal surface in distal caecal and proximal ascending colon carcinoma: the Cinderella surgical margin?" *J Clin Pathol* 2005; 58:426- 8
- [104] **Sternberg A., Amar M., Alfici R., Groisman G.** "Conclusions from a study of venous invasion in stage IV colorectal adenocarcinoma" *J Clin Pathol* 2002; 55: 17-21.
- [105] **Talbot I.C., Ritchie S., Leighton M., et al.** "The clinical significance of invasion of veins by rectal cancer" *Br J Surg* 1980; 67: 439- 42
- [106] **Washington M.K.** "Colorectal carcinoma: selected issues in pathologic examination and staging and determination of prognostic factors". *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 1600-7
- [107] **Greene F.L.** "Current TNM staging of colorectal cancer" *Lancet Oncol* 2007; 8: 572-3

- [108] **Kingston E.F, Goulding H., Bateman A.C.** "Vascular invasion is underrecognized in colorectal cancer using conventional hematoxylin and eosin staining" *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 1867-72
- [109] **Compton C.C.** "Optimal pathologic staging: defining stage II disease". *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6862-70
- [110] **Morikawa T., Kuchiba A., Qian Z. R. et al.**, "Prognostic significance and molecular associations of tumor growth pattern in colorectal cancer," *The Annals of Surgical Oncology*, 2012: 19(6):1944–1953.
- [111] **Jass J.R., Atkin W.S., Cuzick J. et al.** "The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases". *Histopathology* 1986; 10:437–59
- [112] **Jass J.R., Love S.B., Northover J.M.** "A new prognostic classification of rectal cancer" *Lancet* 1987;1:1303–6.
- [113] **Halvorsen T.B., Seim E.** "Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer" *J Clin Pathol* 1989;42:162–6.
- [114] **Shepherd N.A., Saraga E.P., Love S.B., Jass J.R.** "Prognostic factors in colonic cancer" *Histopathology* 1989; 14:613–20
- [115] **Cianchi F., Messerini L., Palomba A., et al.** "Character of the invasive margin in colorectal cancer: does it improve prognostic information of Dukes staging?" *Dis Colon Rectum*. 1997; 40:1170–5
- [116] **Zlobec I., Baker K., Minoo P., et al.** "Tumor border configuration added to TNM staging better stratifies stage II colorectal cancer patients into prognostic subgroups" *Cancer* 2009; 115:4021–9.
- [117] **Zlobec I., Lugli A.** "Invasive front of colorectal cancer: dynamic interface of pro-/anti-tumor factors". *World J Gastroenterol*. 2009; 15: 5898–906
- [118] **Colomer A., Erill N., Vidal A., et al.** "A novel logistic model based on clinicopathological features predicts microsatellite instability in colorectal carcinomas". *Diagn Mol Pathol*. 2005; 14:213–23.
- [119] **Halvarsson B., Anderson H., Domanska K., Lindmark G., Nilbert M.** "Clinicopathologic factors identify sporadic mismatch repair– defective colon cancers". *Am J Clin Pathol*. 2008; 129:238–44.
- [120] **Roman R., Verdu M., Calvo M., et al.** "Microsatellite instability of the colorectal carcinoma can be predicted in the conventional pathologic examination. A

prospective multicentric study and the statistical analysis of 615 cases consolidate our previously proposed logistic regression model". *Virchows Arch.* 2010; 456:533–41.

[121] **Hase K., Shatney C., Johnson D., et al.** "Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer". *Dis Colon Rectum.* 1993; 36:627-635

[122] **Hori H., Fujimori T., Fujii S., et al.** "Evaluation of tumor cell dissociation as a predictive marker of lymph node metastasis in submucosal invasive colorectal carcinoma". *Dis Colon Rectum.* 2005; 48:938-945

[123] **Kazama S., Watanabe T., Ajioka Y., et al.** "Tumour budding at the deepest invasive margin correlates with lymph node metastasis in submucosal cancer detected by anticytokeratin antibody CAM5.2". *Br J Cancer* 2006; 94:293-298.

[124] **Morodomi T., Isomoto H., Shirouzu K., et al.** "An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers: lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer". *Cancer* 1989; 63:539-543.

[125] **Shinto E., Mochizuki H., Ueno H., et al.** "A novel classification of tumour budding in colorectal cancer based on the presence of cytoplasmic pseudo-fragments around budding foci". *Histopathology* 2005; 47:25-31.

[126] **Ueno H., Murphy J., Jass J.R., et al.** "Tumour "budding" as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer". *Histopathology* 2002; 40:127-132.

[127] **Wang L.M., Kevans D., Mulcahy H., et al.** "Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer". *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 134-41.

[128] **Nakamura T., Mitomi H., Kanazawa H., et al.** "Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer". *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 568-72.

[129] **Prall F., Nizze H., Barten M.** "Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma". *Histopathology* 2005; 47: 17-24

[130] **Dolcetti R., Viel A., Doglioni C., et al.** "High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability". *Am J Pathol.* 1999; 154:1805-1813

[131] **Greenon J.K., Bonner J.D., Ben-Yzhak O., et al.** "Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas". *Am J Surg Pathol.* 2003; 27:563-570.

- [132] **Jass J.R, Do K-A., Simms L.A, et al.** "Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors". *Gut* 1998;42:673-679.
- [133] **Ropponen K.M., Eskelinen M.J, Lipponen P.K, et al.** "Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer". *J Pathol.* 1997; 182:318-324.
- [134] **Berezowski K., Stastny J.F, Kornstein M.J.** "Cytokeratins 7 and 20 and carcinoembryonic antigen in ovarian and colonic carcinoma". *Mod Pathol* 1996; 9: 426-9
- [135] **Legendijk J.H, Mullink H., Van Diest P.J, Meijer C.JL.** "Tracing the origin of adenocarcinomas with unknown primary using immunohistochemistry: differential diagnosis between colonic and ovarian carcinomas as primary sites". *Hum Pathol* 1998, 29: 491- 97
- [136] **Loy T.S, Calaluce R.D.** "Utility of cytokeratin immunostaining in separating pulmonary adenocarcinomas from colonic adenocarcinomas". *Am J Clin Pathol* 1994 102: 764-7.
- [137] **O' Brien M.J., Zamsheck N., Burke B., et al.** "Immunocytochemical localization of carcinoembryonic antigen in benign and malignant colo-rectal tissues. Assessment of diagnostic value". *Am J Clin Pathol* 1981, 75: 283-90
- [138] **Listrom M.B. et al.** "Immunoreactivity of tumor- associated glycoprotein (TAG- 72) in normal, hyperplastic and neoplastic colon". *Hum. Pathol* 1989; 20: 994-1000
- [139] **Bleday R. et al.** "Characterization of a new monoclonal antibody to a cell surface antigen on colorectal cancer and fetal gut tissues". *Cancer* 1986; 57: 433-40
- [140] **Campo E. et al.** "Human chorionic gonadotropin in colorectal carcinoma. An immunohistochemical study". *Cancer* 1987; 59: 1611- 16
- [141] **Hainsworth J.D. et al.** "Human chorionic gonadotropin production by colon carcinoma. Biochemical heterogeneity and identification of a chemotherapy-sensitive subpopulation". *Cancer* 1985; 56: 1337-40
- [142] **Gotzos V. et al.** "Selective distribution of calretinin in adenocarcinomas of the human colon and adjacent tissues". *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 701-11.
- [143] **Lei Cheng L., Lai M.D.** "Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer". *World J Gastroenterol* 2003; 9(12):2642-2649.

- [144] **Heitman S.J., Ronksley P.E., Hilsden R.J., et al.** "Prevalence of Adenomas and Colorectal Cancer in Average Risk Individuals: A Systematic Review and Meta-analysis". *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009. 7: 1272- 78
- [145] **Lampert R., Kudo S.E., Vieth M., et al.** Pragmatic Classification of superficial neoplastic colorectal lesions. *Gastrointest Endosc* 2009 70: 1182- 1199
- [146] **Martinez M.E., Baron J.A., Lieberman D.A. et al.** "A pooled analysis of advanced colorectal neoplasia diagnoses after colonoscopic polypectomy". *Gastroenterology* 2009 136: 832- 841
- [147] **Farris A.B. et al:** "Sessile serrated adenoma: challenging discrimination from other serrated colonic polyps". *Am J Surg Pathol* 2008 32:30-5.
- [148] **Sandmeier D., Benhattar J., Martin P., Bouzourene H.** "Serrated polyps of the large intestine: a molecular study comparing sessile serrated adenomas and hyperplastic polyps". *Histopathology* 2009; 55(2):206-13.
- [149] **East J.E et al.** "Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural history and clinical management". *Gastroenterol Clin North Am* 2008; 37: 25-46.
- [150] **O'Brien M.J. et al:** "Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points". *Am J Surg Pathol* 2006 30(12):1491-501.
- [151] **Dukes C.E.** "The classification of cancer of the rectum". *J Pathol Bacteriol* 1932; 35: 323-32
- [152] **Edge S.B., Byrd D.R., Carducci M.A., et al, eds.** "American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual". 7th Ed. New York: Springer; 2009.
- [153] **Quirke P., Williams G.T., Ectors N., et al.** "The future of the TNM staging system in colorectal cancer: time for a debate?" *Lancet Oncol* 2007; 8:651–7.
- [154] **Mortenson, M.M., et al.** "Total mesorectal excision and pelvic node dissection for rectal cancer: an appraisal". *Surg Oncol Clin N Am*, 2007. 16(1): p. 177-97.
- [155] **Barabouti, D.G. and W.D. Wong.** "Current management of rectal cancer: total mesorectal excision (nerve sparing) technique and clinical outcome". *Surg Oncol Clin N Am*, 2005. 14(2): p. 137-55.

- [156] **Dotan E. and Cohen S.J.** “Challenges in the management of stage II colon cancer”. *Semin Oncol.* 2011; 38(4): 511–520.
- [157] **Voon P.J. and Kong H.L.** “Tumor genetics and genomics to personalize cancer treatment”. *Ann Acad Med Singapore* 2011; 40: 362- 8
- [158] **Wolmark N. et al.** “Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, fluorouracil and levamisole, and fluorouracil, leucovorin, and levamisole in patients with Dukes’ B and C carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-04”. *J Clin Oncol.* 1999; 17(11):3553–9.
- [159] **Andre T., et al.** “Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial”. *J Clin Oncol.* 2009; 27(19):3109–16.
- [160] **Engstrom P.F., Benson A.B. 3rd, Saltz L.** “Colon cancer. Clinical practice guidelines in oncology”. *J Natl Compr Canc Netw.* 2003; 1(1):40–53.
- [161] **Haller D.G., et al.** “Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in highrisk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089”. *J Clin Oncol.* 2005; 23(34):8671–8.
- [162] **Kuebler J.P., et al.** “Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07”. *J Clin Oncol.* 2007; 25(16):2198–204.
- [163] **Stintzing S.** “Management of colorectal cancer”. *F1000 Prime Reports* 2014, 6:108
- [164] **Moral M. et al.** “Factors influencing prognosis after neo-adjuvant chemoradiation therapy for rectal carcinoma”. *Acta Chir Belg,* 2009. 109(3):345-51.
- [165] **Ferrara N., Hillan K.J, Novotny W.** “Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy”. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333:328–35.
- [166] **Goldberg R.M.** “Cetuximab”. *Nat Rev Drug Discov* 2005: 10–1.
- [167] **Giusti R.M., Shastri K.A., Cohen M.H, et al.** “FDA drug approval summary: panitumumab (Vectibix)”. *Oncologist* 2007; 12:577–83.
- [168] **Sato J.D., Kawamoto T., Le A.D., et al.** “Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors” *Mol. Biol. Med.* 1983 (1): 511–529.

- [169] **Cunningham D., Humblet Y., Siena S., et al.** "Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan refractory metastatic colorectal cancer". *N Engl J Med* 2004; 351:337-45.
- [170] **Van Cutsem E., Peeters M., Siena S., et al.** "Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy refractory metastatic colorectal cancer" *J Clin Oncol* 2007;25:1658-64.
- [171] **Frattini M., Saletti P., Romagnani E, et al.** "PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients". *Br J Cancer* 2007; 97: 1139-45.
- [172] **Amado R.G. et al.** "Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer". *J Clin Oncol* 2008; 6: 1626–34
- [173] **Karapetis C.S. et al.** "K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer". *N Engl J Med* 2008; 359: 1757–65.
- [174] **Lievre A. et al.** "KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab". *J Clin Oncol* 2008; 26: 374–9.
- [175] **De Roock W. et al.** "KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab". *Ann Oncol* 2008; 19: 508–15.
- [176] **Cappuzzo F. et al.** "Primary resistance to cetuximab therapy in EGFR FISH-positive colorectal cancer patients". *Br J Cancer* 2008; 99: 83–9.
- [177] **Di Fiore F. et al.** "Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy". *Br J Cancer* 2007; 96: 1166–9.
- [178] **Khambata-Ford S. et al.** "Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab". *J Clin Oncol* 2007; 25: 3230–7.
- [179] **Van Cutsem E., Kohne C.H, Lang I., et al.** "Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status". *J Clin Oncol* 2011; 29:2011–9.

- [180] **Bokemeyer C., Bondarenko I., Hartmann J.T, et al.** "Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study". *Ann Oncol* 2011; 22:1535–46.
- [181] **Bedeir A. and Krasinskas A.M.** "Molecular diagnostics of colorectal cancer". *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135:578- 87.
- [182] **Yang Z.Y. et al.** "Promising biomarkers for predicting the outcomes of patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies: a systematic review with meta-analysis". *Int. J Cancer* 2013 15; 133(8):1914-25
- [183] **De Roock W., Claes B., Bernasconi D., et al.** "Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis". *Lancet Oncol* 2010; 11: 753-62.
- [184] **Gill S., Loprinzi C.L, Sargent D., et al.** "Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much?" *J Clin Oncol* 2004; 22: 1797–806.
- [185] **Greene F.L., Stewart A.K., Norton H.J.** "New tumor-node-metastasis staging strategy for node-positive (stage III) rectal cancer: an analysis". *J Clin Oncol* 2004; 22: 1778–84.
- [186] **Gunderson L.L., Sargent D., Tepper J.E., et al.** "Impact of T and N stage and treatment on survival and relapse in adjuvant rectal cancer: a pooled analysis". *J Clin Oncol* 2004; 22: 1785–96.
- [187] **Staib L., Link K.H., Blatz A., Beger H.G.** "Surgery of colorectal cancer: surgical morbidity and five- and ten-year results in 2400 patients monoinstitutional experience". *World J Surg* 2002; 26: 59–66.
- [188] **Weitz J. Et al.** "Colorectal cancer". *Lancet* 2005; 365: 153-65.
- [189] **LeVoyer T.E., Sigurdson E.R., Hanlon A.L., et al.** "Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089". *J Clin Oncol* 2003; 21: 2912–19.
- [190] **Nagtegaal I.D., van der Velde C.J.H, van der Worp E., et al.** "Macroscopic evaluation of rectal cancer resection specimen: clinical significance of the pathologist in quality control". *J Clin Oncol* 2002; 20: 1729–34.

- [191] **Anwar M.A., D'Souza F., Coulter R., et al.** "Outcome of acutely perforated colorectal cancers: experience of a single district general hospital". *Surg Oncol* 2006; 15(2):91–96.
- [192] **Jass J.R.** "ADASP: Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma". *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 13-23.
- [193] **Deschoolmeester V., et al.** "A Review of the Most Promising Biomarkers in Colorectal Cancer: One Step Closer to Targeted Therapy". *The Oncologist* 2010; 15:699–731.
- [194] **Halter S.A., Webb L., Rose J.** "Lack of ras mutations and prediction of long term survival in carcinoma of the colon". *Mod Pathol* 1992; 5:131–134
- [195] **Benhattar J., Losi .L, Chaubert P. et al.** "Prognostic significance of K-ras mutations in colorectal carcinoma". *Gastroenterology* 1993; 104:1044- 1048
- [196] **Lee J.C., Wang S.T., Lai M.D. et al.** "K-ras gene mutation is a useful predictor of the survival of early stage colorectal cancers". *Anticancer Res* 1996; 16: 3839–3844
- [197] **Ahnen D.J., Feigl P., Quan G. et al.** "Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: A Southwest Oncology Group study". *Cancer Res* 1998; 58:1149 –1158
- [198] **Belly R.T., Rosenblatt J.D, Steinmann M. et al.** "Detection of mutated K12-ras in histologically negative lymph nodes as an indicator of poor prognosis in stage II colorectal cancer". *Clin Colorectal Cancer* 2001; 1:110 –116
- [199] **Font A., Abad A., Monzó M. et al.** "Prognostic value of K-ras mutations and allelic imbalance on chromosome 18q in patients with resected colorectal cancer". *Dis Colon Rectum* 2001; 44:549 –557.
- [200] **Geido E., Scitutto A., Rubagotti A. et al.** "Combined DNA flow cytometry and sorting with k-ras2 mutation spectrum analysis and the prognosis of human sporadic colorectal cancer". *Cytometry* 2002; 50:216 –224
- [201] **Richman S.D., Seymour M.T., Chambers P. et al.** "KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: Results from the MRC FOCUS trial". *J Clin Oncol* 2009; 27:5931–5937.
- [202] **Andreyev H.J. et al.** "Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study". *J Natl Cancer Inst* 1998 6; 90 (9): 675-84

- [203] **Andreyev H.J. et al.** "Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the "RASCAL II" study". *Br J Cancer* 2001 1; 85 (5): 692-6
- [204] **Samowitz W.S., Curtin K., Schaffer D. et al.** "Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: A population based study". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9:1193–1197.
- [205] **Finkelstein S.D., Sayegh R., Bakker A. et al.** "Determination of tumor aggressiveness in colorectal cancer by K-ras-2 analysis". *Arch Surg* 1993; 128: 526–531
- [206] **Moerkerk P., Arends J.W., van Driel M. et al.** "Type and number of Ki-ras point mutations relate to stage of human colorectal cancer". *Cancer Res* 1994; 54:3376–3378
- [207] **Span M., Moerkerk P.T., de Goeij A.F. et al.** "A detailed analysis of K-ras point mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients". *Int J Cancer* 1996; 69:241–245.
- [208] **Cerottini J.P., Caplin S., Saraga E. et al.** "The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer". *Am J Surg* 1998; 175:198–202
- [209] **Bazan V., Migliavacca M., Zanna I. et al.** "Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype". *Ann Oncol* 2002; 13:1438 – 1446
- [210] **Bazan V., Agnese V., Corsale S. et al.** "Specific TP53 and/or Ki-ras mutations as independent predictors of clinical outcome in sporadic colorectal adenocarcinomas: Results of a 5-year Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GOIM) prospective study". *Ann Oncol* 2005; 16(4): 50– 55.
- [211] **Poehlmann A., Kuester D., Meyer F. et al.** "K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique". *Pathol Res Pract* 2007; 203:489–497.
- [212] **Abubaker J., Bavi P., Al-Haqawi W. et al.** "Prognostic significance of alterations in KRAS isoforms KRAS-4A/4B and KRAS mutations in colorectal carcinoma". *J Pathol* 2009; 219:435– 445
- [213] **Bell S.M., Scott N., Cross D. et al.** "Prognostic value of p53 overexpression and c-Ki-ras gene mutations in colorectal cancer". *Gastroenterology* 1993; 104:57–64

- [214] **Hardingham J.E., Butler W.J., Roder D. et al.** "Somatic mutations, acetylator status, and prognosis in colorectal cancer". *Gut* 1998; 42:669–672.
- [215] **Liang J.T., Cheng Y.M., Chang K.J. et al.** "Reappraisal of K-ras and p53 gene mutations in the recurrence of Dukes' B2 rectal cancer after curative resection". *Hepatogastroenterology* 1999; 46:830–837
- [216] **Tortola S., Marcuello E., González I. et al.** "p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer". *J Clin Oncol* 1999; 17:1375–1381
- [217] **Esteller M., González S., Risques R.A. et al.** "K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer". *J Clin Oncol* 2001; 19:299–304
- [218] **González-Aguilera J.J., Oliart S., Azcoita M.M. et al.** "Simultaneous mutations in K-ras and TP53 are indicative of poor prognosis in sporadic colorectal cancer". *Am J Clin Oncol* 2004; 27:39–45.
- [219] **Janssen K.P., Abal M., El Marjou F. et al.** "Mouse models of K-ras-initiated carcinogenesis". *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756:145–154.
- [220] **Lee S., Cho N.Y., Choi M. et al.** "Clinicopathological features of CpG island methylator phenotype-positive colorectal cancer and its adverse prognosis in relation to KRAS/BRAF mutation". *Pathol Int* 2008; 58:104–113.
- [221] **Nash G.M., Gimbel M., Cohen A.M. et al.** "KRAS mutation and microsatellite instability: Two genetic markers of early tumor development that influence the prognosis of colorectal cancer". *Ann Surg Oncol* 2010; 17:416–424
- [222] **Elnatan J., Goh H.S., Smith D.R.** "C-KI-RAS activation and the biological behaviour of proximal and distal colonic adenocarcinomas". *Eur J Cancer* 1996;32:491–497.
- [223] **Pajkos G., Kiss I., Sándor J. et al.** "The prognostic value of the presence of mutations at the codons 12, 13, 61 of K-ras oncogene in colorectal cancer". *Anticancer Res* 2000; 20:1695–1701.
- [224] **Klump B., Nehls O., Okech T. et al.** "Molecular lesions in colorectal cancer: Impact on prognosis? Original data and review of the literature". *Int J Colorectal Dis* 2004; 19:23–42
- [225] **Popat S., Hubner R., Houlston R.S.** "Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis". *J Clin Oncol* 2005 Jan 20; 23(3):609-18.

- [226] **Di Nicolantonio F., Martini M., Molinari F., et al.** “Wild-type Braf is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer”. *J Clin Oncol*. 2008; 26(35):5705–12.
- [227] **Samowitz W.S. et al.** “Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite stable colon cancers”. *Cancer Res* 2005; 65: 6063- 69
- [228] **Zlobec I., Bihl M.P., Schwarb H. et al.** “Clinicopathological and protein characterization of BRAF- and K-RAS-mutated colorectal cancer and implications for prognosis”. *Int J Cancer* 2010; 127:367–380.
- [229] **Maestro M.L., Vidaurreta M., Sanz-Casla M.T et al.** “Role of the BRAF mutations in the microsatellite instability genetic pathway in sporadic colorectal cancer”. *Ann Surg Oncol* 2007; 14:1229 –1236
- [230] **Popat S., Houlston R.S.** “A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis”. *Eur J Cancer* 2005; 41:2060–70.
- [231] **Aschele C., Debernardis D., Lonardi S., et al.** “Deleted in colon cancer protein expression in colorectal cancer metastases: a major predictor of survival in patients with unresectable metastatic disease receiving palliative fluorouracil-based chemotherapy”. *J Clin Oncol* 2004; 22:3758–65.
- [232] **Reymond M.A., Dworak O., Remke S., et al.** “DCC protein as a predictor of distant metastases after curative surgery for rectal cancer”. *Dis Colon Rectum* 1998; 41:755–60.
- [233] **Shibata D., Reale M.A., Lavin P., et al.** “The DCC protein and prognosis in colorectal cancer”. *N Engl J Med* 1996; 335:1727–32.
- [234] **Sun X.F., Rutten S., Zhang H., et al.** “Expression of the deleted in colorectal cancer gene is related to prognosis in DNA diploid and low proliferative colorectal adenocarcinoma”. *J Clin Oncol* 1999; 17:1745–50
- [235] **Giatromanolaki A., Sivridis E., Koukourakis M.I.** “Angiogenesis in colorectal cancer: prognostic and therapeutic implications”. *Am J Clin Oncol* 2006; 29:408–17
- [236] **Giralt J., Navalpotro B., Hermosilla E., et al.** “Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and cyclooxygenase-2 in patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy”. *Oncology* 2007; 71:312–9.
- [237] **Nozue M., Isaka N., Fukao K.** “Overexpression of vascular endothelial growth factor after preoperative radiation therapy for rectal cancer”. *Oncol Rep* 2001; 8:1247- 9.

- [238] **Zlobec I., Steele R., Compton C.C.** “VEGF as a predictive marker of rectal tumor response to preoperative radiotherapy”. *Cancer* 2005; 104:2517–21.
- [239] **Azria D., Bibeau F., Barbier N., et al.** “Prognostic impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression on loco-regional recurrence after preoperative radiotherapy in rectal cancer”. *BMC Cancer* 2005; 5:62.
- [240] **Galizia G., Lieto E., Ferraraccio F., et al.** “Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in colon cancer patients undergoing curative surgery”. *Ann Surg Oncol* 2006; 13:823–35.
- [241] **Lyll M.S., Dundas S.R., Curran S., et al.** “Profiling markers of prognosis in colorectal cancer”. *Clin Cancer Res* 2006; 12:1184–91.
- [242] **Zlobec I., Vuong T., Hayashi S., et al.** “A simple and reproducible scoring system for EGFR in colorectal cancer: application to prognosis and prediction of response to preoperative brachytherapy”. *Br J Cancer* 2007; 96:793–800.
- [243] **Martensson A., Oberg A., Jung A., et al.** “Beta-catenin expression in relation to genetic instability and prognosis in colorectal cancer”. *Oncol Rep* 2007; 17:447–52.
- [244] **Lugli A., Zlobec I., Minoo P., et al.** “Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules APC, beta-catenin and E-cadherin in colorectal cancer: a tissue microarray-based analysis”. *Histopathology* 2007; 50:453–64.
- [245] **Baker K., Zlobec I., Tornillo L., et al.** “Differential significance of tumour infiltrating lymphocytes in sporadic mismatch repair deficient versus proficient colorectal cancers: a potential role for dysregulation of the transforming growth factor-beta pathway”. *Eur J Cancer* 2007; 43:624–31.
- [246] **Kouraklis G., Kakisis J., Theoharis S., et al.** “Prognostic significance and correlation with survival of bcl-2 and TGF-beta RII in colon cancer”. *Dig Dis Sci* 2003; 48:2284–9.
- [247] **Tsamandas A.C., Kardamakis D., Ravazoula P., et al.** “The potential role of TGFbeta1, TGFbeta2 and TGFbeta3 protein expression in colorectal carcinomas. Correlation with classic histopathologic factors and patient survival”. *Strahlenther Onkol* 2004; 180:201–8.
- [248] **Al-Mulla F., Hagan S., Behbehani A.I., et al.** “Raf kinase inhibitor protein expression in a survival analysis of colorectal cancer patients”. *J Clin Oncol* 2006; 24:5672–9.

- [249] **Minoo P., Zlobec I., Baker K., et al.** “Loss of raf-1 kinase inhibitor protein expression is associated with tumor progression and metastasis in colorectal cancer”. *Am J Clin Pathol* 2007; 127:820–7.
- [250] **Zlobec I., Baker K., Minoo P., et al.** “Node-negative colorectal cancer at high-risk of distant metastasis identified by combined analysis of lymph node status, vascular invasion and RKIP expression”. *Clin Cancer Res* 2008; 14:143–8.
- [251] **Lin L.C., Lee H.H, Hwang W.S., et al.** “p53 and p27 as predictors of clinical outcome for rectal-cancer patients receiving neoadjuvant therapy”. *Surg Oncol* 2006; 15:211–6.
- [252] **Mitomi H., Mori A., Kanazawa H., et al.** “Venous invasion and down-regulation of p21 (WAF1/CIP1) are associated with metastasis in colorectal carcinomas”. *Hepatogastroenterology* 2005; 52:1421–6.
- [253] **Peng J.J., Cai S.J, Lu H.F., et al.** “Predicting prognosis of rectal cancer patients with total mesorectal excision using molecular markers”. *World J Gastroenterol* 2007; 13:3009–15.
- [254] **Nehls O., Okech T., Hsieh C.J, et al.** “Studies on p53, BAX and Bcl-2 protein expression and microsatellite instability in stage III (UICC) colon cancer treated by adjuvant chemotherapy: major prognostic impact of proapoptotic BAX”. *Br J Cancer* 2007; 96:1409–18.
- [255] **Chang H.J., Jung K.H., Kim D.Y., et al.** “Bax, a predictive marker for therapeutic response to preoperative chemoradiotherapy in patients with rectal carcinoma”. *Hum Pathol* 2005; 36:364–71.
- [256] **Zlobec I., Minoo P., Baker K., et al.** “Loss of APAF-1 expression is associated with tumour progression and adverse prognosis in colorectal cancer”. *Eur J Cancer* 2007; 43:1101–7.
- [257] **Allegra C.J., Paik S., Colangelo L.H., et al.** “Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes’ B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study”. *J Clin Oncol* 2003; 21:241–50.
- [258] **Velu T.J., Beguinot L., Vass W.C, et al.** “Epidermal-growth-factor-dependent transformation by a human EGF receptor proto –oncogene”. *Science* 1987; 238:1408-10
- [259] **Ferguson K.M.** “A structure-based view of Epidermal Growth Factor Receptor regulation”. *Annu Rev Biophys.* 2008; 37: 353–373

- [260] **Kil S.J., Carlin C.** “EGF receptor residues leu(679), leu(680) mediate selective sorting of ligand-receptor complexes in early endosomal compartments” *J. Cell. Physiol.* 185 (2000) 47–60.
- [261] **He C., Hobert M., Friend L., Carlin C.** “The epidermal growth factor receptor juxtamembrane domain has multiple basolateral plasma membrane localization determinants, including a dominant signal with a polyproline core” *J. Biol. Chem.* 2002 (277):38284–38293
- [262] **Castagnino P., Biesova Z., Wong W.T., et al.** “Direct binding of eps8 to the juxtamembrane domain of EGFR is phosphotyrosine- and SH2-independent” *Oncogene* 1995 (10) 723–729.
- [263] **Martin-Nieto J., Villalobo A.** “The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site” *Biochemistry* 1998 (37) 227–236
- [264] **Li H., Villalobo A.** “Evidence for the direct interaction between calmodulin and the human epidermal growth factor receptor” *Biochem. J.* 2002 (362) 499–505.
- [265] **Lombardo C.R., Consler T.G., Kassel D.B.** “In vitro phosphorylation of the epidermal growth factor receptor autophosphorylation domain by csrc: identification of phosphorylation sites and c-src SH2 domain binding sites” *Biochemistry* 1995 (34) 16456–16466.
- [266] **Thien C.B., Langdon W.Y.** “Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases” *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2001 (2) 294–307.
- [267] **Yarden Y., Sliwkowski M.X.** “Untangling the ErbB signalling network”. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2:127–37
- [268] **Harris R.C., Chung E. and Coffey R.J.** “EGF receptor ligands. Experimental Cell Research” 2003 (284) 2–13.
- [269] **Wang Z.** “Mutual Regulation of Receptor-Mediated Cell Signalling and Endocytosis: EGF Receptor System as an Example. Molecular Regulation of Endocytosis” *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* Ch.12, July 2012.
- [270] **Sako Y., Minoghchi S., Yanagida T.** “Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells” *Nat. Cell. Biol.* 2000 (2) 168–172.
- [271] **Moriki T., Maruyama H., Maruyama I.N.** “Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain” *J. Mol. Biol.* 2001 (311) 1011–1026.

- [272] **Jorissen R. N., Walker F., Pouliot N. et al.** "Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling" *Experimental Cell Research* 2003 (284) 31–53.
- [273] **Graus-Porta D., Beerli R.R., Daly JM., Hynes N.E.** "ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling" *EMBO J.* 1997 (16) 1647–1655.
- [274] **Stintzing S., Heinemann V., Jung A., et al.** "The Treatment of Colorectal Carcinoma with Monoclonal Antibodies". *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106(12): 202–6.
- [275] **Sebastian S. et al.** "The complexity of targeting EGFR signaling in cancer: From expression to turnover". *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1766 120- 139.
- [276] **Ferrara N.** "Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor" *J. Mol. Med.* 1999 (77) 527–543.
- [277] **Wells A., Ware M.F., Allen F.D., Lauffenburger D.A.** "Shaping up for shipping out: PLCgamma signaling of morphology changes in EGF stimulated fibroblast migration" *Cell Motil. Cytoskelet.* 1999 (44) 227–233.
- [278] **Dikic I.** "Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation" *Biochem. Soc. Trans.* 2003 (31) 1178–1181.
- [279] **Yarden Y.** "The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities". *European Journal of Cancer* 2001 (37):3–8.
- [280] **Wells A.** "Molecules in focus: EGF receptor" *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1999 (31) 637-643.
- [281] **Salomon DS., Brandt R., Ciardiello F. et al.** "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies". *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 19:183-232.
- [282] **Sartor C.I.** "Biological modifiers as potential radiosensitizers: targeting the epidermal growth factor receptor family". *Semin Oncol* 2000; 27(11):15-20.
- [283] **Newby J.C., Johnston S.R., Smith I.E. et al.** "Expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer". *Clin Cancer Res* 1997; 3:1643-1651.
- [284] **Chen X., Yeung T.K., Wang Z.** "Enhanced drug resistance in cells coexpressing ErbB2 with EGF receptor or ErbB3". *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277:757-763.

- [285] **Klijn J.G., Look M.P., Portengen H. et al.** "The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer: results of a 10 year follow-up study". *Breast Cancer Res Treat* 1994; 29:73-83.
- [286] **Fischer-Colbrie J., Witt A., Heinzl H. et al.** "EGFR and steroid receptors in ovarian carcinoma: comparison with prognostic parameters and outcome of patients". *Anticancer Res* 1997; 17:613-619.
- [287] **Magne N., Pivot X., Bensadoun R.J. et al.** "The relationship of epidermal growth factor receptor levels to the prognosis of unresectable pharyngeal cancer patients treated by chemoradiotherapy". *Eur J Cancer* 2001; 37:2169-2177
- [288] **Poon T.C.W., Chan A.T.C, To K.F. et al.** "Expression and prognostic significance of epidermal growth factor receptor and HER2 protein in nasopharyngeal carcinoma". *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20:229-913.
- [289] **Nicholson R.I, Gee J.M, Harper M.E.** "EGFR and cancer prognosis". *Eur J Cancer* 2001; 37 (4):9-15.
- [290] **Nishikawa R., Ji X.D., Harmon R.C. et al.** "A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity". *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:7727- 7731.
- [291] **Moscattello D.K., Holgado-Madruga M., Godwin A.K. et al.** "Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors". *Cancer Res* 1995; 55:5536-5539.
- [292] **Wikstrand C.J., Hale L.P., Batra S.K. et al.** "Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas". *Cancer Res* 1995; 55:3140-3148.
- [293] **Sauter G., Maeda T., Waldman F.M et al.** "Patterns of epidermal growth factor receptor amplification in malignant gliomas". *Am J Pathol* 1996; 148:1047-1053.
- [294] **Gazdar AF.** "Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors". *Oncogene* 2009; 28 (1) S24-S31.
- [295] **Shigematsu H. and Gazdar A. F.** "Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers" *Int. J. Cancer*: 2006: (118):257–262.

- [296] **Lynch T.J., Bell D.W., Sordella R., et al** "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib". *N Engl J Med* 2004, 350(21):2129-2139
- [297] **Kosaka T., Yatabe Y., Endoh H., et al.** "Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications". *Cancer Res* 2004, 64(24):8919-8923.
- [298] **Nagahara H., Mimori K., Ohta M., et al.** "Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in colorectal carcinoma". *Clin Cancer Res* 2005; 11:1368–71
- [299] **Metzger B., Chambeau L., Begon D. Y, et al.** "The human epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in European patients with advanced colorectal cancer harbors infrequent mutations in its tyrosine kinase domain" *BMC Medical Genetics* 2011, 12:144
- [300] **Yunxia Z., Jun C., Guanshan Z et al.** "Mutations in epidermal growth factor receptor and K-ras in Chinese patients with colorectal cancer". *BMC Medical Genetics* 2010, 11:34.
- [301] **Lee J.W., Soung Y.H., Kim S.Y., et al.** "Somatic mutations of EGFR gene in squamous cell carcinoma of the head and neck". *Clin Cancer Res* 2005; 11:2879–82.
- [302] **Arteaga C.L.** "Epidermal Growth Factor Receptor Dependence in Human Tumors: More Than Just Expression?" *The Oncologist* 2002; 7(4):31-39.
- [303] **Lowy D.R., Willumsen B.M.** "Function and regulation of ras". *Annu Rev Biochem.* 1993; 62: 851- 91.
- [304] **Barbacid M.** "ras genes". *Annu Rev Biochem* 1987 56: 779- 827.
- [305] **Alitalo K.** "oncogene amplification in tumor cells". *Adv Cancer Res* 1986:47: 235- 282.
- [306] **Haluska F.G.** "oncogene activation by chromosome translocations in human malignancy". *Annu Rev Genetics* 1987: 21: 321- 347.
- [307] **Croce C.M.** "oncogenes and cancer". *N Eng J Med* 2008 (358): 502-511.
- [308] **Todd R., Wong D.T** "Oncogenes". *Anticancer Res.* 1999 19 (6): 4729–46.
- [309] **Levine A.J.** "the tumor suppressor genes". *Annu Rev Biochem* 1993 62: 623- 651.
- [310] **Jancik S., Drabek J. et al.** "Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers". *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010 Article ID 150960.

- [311] **Ozawa H. et al.** "Paired-like homeodomain protein ESXR1 possesses a cleavable C-terminal region that inhibits cyclin degradation". *Oncogene* 2004 23: 6590–6602.
- [312] **Yanagihara M. et al.** "Paired-like homeoprotein ESXR1 acts as a sequence-specific transcriptional repressor of the human K-ras gene". *Oncogene* 2005 24: 5878–5887.
- [313] **Lewis B.P. et al.** "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets". *Cell*: 2005 120: 15–20.
- [314] **Mitin N. et al.** "Signaling interplay in ras superfamily function" *Curr. Biol.* 2005: 15: 563-574.
- [315] **Bos J.L. et al.** "Ras-like GTPases". *Biochim. Bioph. Acta*, 1997 1333: 19-31.
- [316] **Matsumoto K. et al.** "Novel small GTPase M-Ras participates in reorganization of actin cytoskeleton". *Oncogene* 1997 15: 2409-2417.
- [317] **Apolloni A. et al.** "H-ras but Not K-ras Traffics to the Plasma Membrane through the Exocytic Pathway". *Molecular and cellular biology* 2000: 2475–2487.
- [318] **Grand R. J. et al.** "The biochemistry of ras p21". *Biochem. J.* 1991 279: 609-631.
- [319] **Sagi D. B.** "A ras by any other name". *Mol and Cell Biol*: 2001: 1441-1443.
- [320] **Wittinghofer F. et al.** "Three-Dimensional Structure of p21 in the Active Conformation and Analysis of an Oncogenic Mutant" *Environmental Health Perspectives*: 1991: 93, 11-15.
- [321] **Lukman S. et al.** "The Distinct Conformational Dynamics of K-Ras and H-Ras A59G" *PLoS Comput Biol* 2010 9; 6(9).
- [322] **Gutierrez L., Magee A. I., Marshall C. J. et Hancock J. F.** "Post-translational processing of p21 ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis". *The EMBO Journal* 1989; 8(4):1093 - 1098.
- [323] **Smotrys J.E. and Linder M.E.** "Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function". *Annu Rev. Biochem.* 2004; 73: 559-87
- [324] **Rocks O., Peyker A., Kahms M., et al.** "An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms". *Science* 2005 18; 307 (5716): 1746-52.

- [325] **Hancock J.F, Paterson H. and Marshall C.J.** "A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane". *Cell* 1990 5; 63(1):133-9.
- [326] **Leventis R. et al.** "Lipid characteristics of the polybasic carboxy-terminal sequence of K-ras4B". *Biochem.* 1998; 19:7640-8.
- [327] **Okeley N.M et al.** "A designed probe for acidic phospholipids reveals the unique enriched anionic character of the cytosolic face of the mammalian plasma membrane". *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 21833-40.
- [328] **Omerovic J., Laude A.J. and Prior I. A.** "Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform specific signaling" *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64(19-20): 2575–2589.
- [329] **Plowman S.J.et al.** "Ras signaling from plasma membrane and endomembrane microdomains". *Bioch. Et Bioph. Acta* 2005; 1746(3):274-83.
- [330] **Jura N., Bar-Sagi D.** "Mapping Cellular Routes of Ras . A Ubiquitin Trail". *Cell Cycle* 2006; 5:23, 2744-2747.
- [331] **Fivaz M. et al.** "Reversible intracellular translocation of KRas but not HRas in hippocampal neurons regulated by Ca²⁺/calmodulin". *J Cell Biol* 2005; 170:429 41
- [332] **Villalonga P. et al:** "Calmodulin binds to K-Ras but not to H- or N-Ras and modulates downstream signaling". *Mol Cell Biol* 2001, 21:7345–7354.
- [333] **Bivona T.G.et al:** "PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis". *Mol Cell* 2006; 21:481–494.
- [334] **Schweins T. et al:** "substrate- assisted catalysis as a mechanism for GTP hydrolysis of p21ras and other GTP-binding proteins". *Nature Struct Biol* 1995; 2: 36-44.
- [335] **Chesa P.G. et al:** "Expression of p21ras in normal and malignant human tissues: lack of association with proliferation and malignancy". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 3234-38.
- [336] **Furth M.E.et al.** "Expression of ras proto-oncogene proteins in normal human tissues". *Oncogenes* 1987; 1: 47-58
- [337] **Leon J. et al.** "Differential expression of the ras gene family in mice". *Mol and Cell Biol* 1987; 7: 1535-40.

- [338] **Muller R. et al.** “transcription of c-onc genes c-rasKi and c-fms during mouse development”. *Mol. Cell. Biol* 1983; 3:1062-69.
- [339] **Plowman S.J et al.** “While K-ras is essential for mouse development expression of the K-ras 4A splice variant is dispensable”. *Mol. Cell. Biol* 2003; 23: 9245-50
- [340] **Koera K. et al.** “K-ras is essential for the development of mouse embryo”. *Oncogene* 1997; 15:1151- 59.
- [341] **Potenza N. et al.** “replacement of K-ras with H-ras supports normal embryonic development despite inducing cardiovascular pathology in adult mice”. *EMBO Rep* 2005; 6: 432-7.
- [342] **Friday B.B. et al.** “K-ras as a target for cancer therapy”. *Bioch. Et Bioph. Acta* 2005; 1756(2):127-44.
- [343] **Mebratu Y. and Tesfaigzi Y.** “How erk1/2 activation controls cell proliferation and cell death is subcellular localization the answer?” *Cell Cycle* 2009; 8:8, 1168-1175.
- [344] **Feig L.A. et al.** “Evidence for a Ras/Ral signaling cascade” *Trends Biochem Sci.* 1996; 21(11):438-41.
- [345] **Quilliam L.A. et al.** “A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases” *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 71: 391-444
- [346] **Kishida S. et al.** “ Colocalization of Ras and Ral on themembrane is required for Ras-dependent Ral activation through Ral GDP dissociation stimulator”. *Oncogene* 1997; 15:2899–2907.
- [347] **Feig L.A.et al:** “Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame”. *Trends Cell Biol.* 2003; 13(8):419-25.
- [348] **Bhattacharya M. et al.** “b-Arrestins regulate a Ral-GDS Ral effector pathway that mediates cytoskeletal reorganization”. *Nat. Cell Biol.* 2002; 4, 547–555.
- [349] **Hofer F. et al.** “Ras-independent activation of Ral by a Ca²⁺- dependent pathway”. *Curr. Biol.* 1998; 14, 839–842.
- [350] **Wolthuis, R.M. et al.** “Activation of the small GTPase Ral in platelets”. *Mol. Cell. Biol.* 1998; 18, 2486–2491.

- [351] **Chardin P. et al.** "The ral gene: a new ras-related gene isolated by the use of a synthetic probe". *EMBO J.* 1986; 5: 2203-8.
- [352] **Henry D.O. et al.** "Ral GTPases contribute to regulation of cyclin D1 through activation of NF- κ B". *Mol.Cell. Biol.* 2000; 20: 8084-92.
- [353] **Rosario M. et al.** "Activation of the Ral and phosphatidylinositol 30 kinase signaling pathways by the ras-related protein TC21". *Mol.Cell. Biol.* 2001; 21:3750–3762.
- [354] **Yamazaki Y. et al.** "Ral promotes anchorage-independent growth of a human fibrosarcoma, HT1080". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 280: 868–873.
- [355] **Hamad N.M. et al:** "Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells". *Genes Dev.* 2002; 16: 2045–2057.
- [356] **Gonzalez G.A. et al.** "RalGDS is required for tumor formation in a model of skin carcinogenesis". *Cancer cell* 2005; 7: 219-26.
- [357] **Jimenez C., Hernandez C., Pimentel B. and Carrera A.C.** "The p85 Regulatory Subunit Controls Sequential Activation of Phosphoinositide 3-Kinase by Tyr Kinases and Ras". *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(44): 41556–41562.
- [358] **Garcia Z. et al.** "Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division". *EMBO Journal* 2006; 25: 655–661.
- [359] **Wymann M.P. et al.** "Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding". *Current Opinion in Cell Biology* 2005; 17: 141-9.
- [360] **Rodriguez- Viciana P. et al.** "Activation of Phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation". *Embo J* 1996; 15: 2442-51.
- [361] **Cantrell D. A.** "Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways". *Journal of Cell Science* 2001; 114(8): 1439-1445.
- [362] **Van der Heijden M. S. and Bernards R.** "Inhibition of the PI3K Pathway: Hope We Can Believe in?" *Clin Cancer Res* 2010; 16(12):3094-9.
- [363] **Stephens L. et al.** "Phosphoinositide 3-kinases as drug targets in cancer" *Current Opinion in Pharmacology* 2005; 5:357–365.
- [364] **Vanhaesebroeck B. et al.** "Signaling by Distinct Classes of Phosphoinositide 3-Kinases". *Experimental Cell Research* 1999; 253: 239–254.
- [365] **Schmelzle T. and Hall M.N.** "TOR, a Central Controller of Cell Growth". *Cell* 2000; 103: 253–262.

- [366] **Voice J.K. et al.** "Four Human Ras Homologs Differ in Their Abilities to Activate Raf-1, Induce Transformation, and Stimulate Cell Motility". *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 17164- 17170.
- [367] **Yan J. et al.** "Ras Isoforms Vary in Their Ability to Activate Raf-1 and Phosphoinositide 3-Kinase". *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 24052-6.
- [368] **Jones M.K et al.** "Ras-GRF Activates Ha-Ras, but Not N-Ras or K-Ras 4B, Protein in Vivo". *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 1782- 1787.
- [369] **Harvey J.J.** "An unidentified virus which causes the rapid production of tumors in mice". *Nature* 1964; 12(204): 1104-5.
- [370] **Kirsten W.H. et al:** "Properties of a murine sarcoma virus". *Bibl. Haematol.* 1970; 36: 246-9.
- [371] **Wicki A., Herrmannb R., Christoforic G.** "Kras in metastatic colorectal cancer" *Swiss Med Wkly.* 2010; 19; 140: w13112.
- [372] **Bos JL.** "The ras gene family and human carcinogenesis". *Mutation Research* 1988; 195:255–271.
- [373] **Dergham S.T. et al.** "Prevalence and clinical significance of combined K-ras mutation and p53 aberration in pancreatic adenocarcinoma" *Int. J. Pancreatol.* 1997: 21:127–143
- [374] **Wang J.Y. et al.** "Unique K-ras mutational pattern in pancreatic adenocarcinoma from Taiwanese patients" *Cancer Lett.* 180; 2002 153– 158.
- [375] **Shibata D. et al.** "Detection of c-K-ras mutations in fine needle aspirates from human pancreatic adenocarcinomas" *Cancer Res.* 1990; 50(4):1279-83.
- [376] **Bos J.L. et al.** "Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers" *Nature* 1987; 327: 293–297.
- [377] **Kressner U., Bjorheim J., Westring S., et al.** "Ki-ras mutations and prognosis in colorectal cancer" *Eur. J. Cancer* 1998; 34:518– 521
- [378] **Goydos J.S. et al.** "Detection of B-RAF and N-RAS mutations in human melanoma" *J. Am. Coll. Surg.* 2005;200:362– 370
- [379] **Reifenberger J. et al.** "Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas" *Int. J. Cancer* 2004; 109:377– 384.
- [380] **Bos JL.** "ras oncogenes in human cancer: a review". *Cancer Res* 1989; 49:4682–4689

- [381] **Der C.J. et al.** "Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1982; 79:3637–3640.
- [382] **Caulin C. et al.** "Inducible activation of oncogenic K-ras results in tumor formation in the oral cavity" *Cancer Res.* 2004 (64): 5054–5058
- [383] **Vitale-Cross L. et al.** "Conditional expression of K-ras in an epithelial compartment that includes the stem cells is sufficient to promote squamous cell carcinogenesis" *Cancer Res.* 2004; (64): 8804–8807
- [384] **Tuveson D.A. et al.** "Endogenous oncogenic Kras (G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects" *Cancer Cell* 2004; (5): 375– 387.
- [385] **Chan I.T. et al.** "Conditional expression of oncogenic K-ras from its endogenous promoter induces a myeloproliferative disease" *J. Clin. Invest.* 2004; (113): 528–538.
- [386] **Galiana C. et al.** "High frequency of Ki-ras amplification and p53 gene mutations in adenocarcinomas of the human esophagus" *Mol. Carcinog.* 1995; (14): 286– 293
- [387] **Coleman W.B. et al.** "Overexpression of c-K-ras, c-N-ras and transforming growth factor beta co-segregate with tumorigenicity in morphologically transformed C3H 10T1/2 cell lines" *Carcinogenesis* 1994; (15):1005– 1012
- [388] **von Lintig F.C. et al.** "Ras activation in human breast cancer" *Breast Cancer Res. Treat.* 2000; 62: 51– 62.
- [389] **Loupakis F. et al.** "KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer" *British Journal of Cancer* 2009; 101: 715–721.
- [390] **Brink M. et al.** "K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study" *Carcinogenesis* 2003; 24(4): 703-710.
- [391] **Roskoski R. JR. et al.** "RAF protein-serine/threonine kinases: Structure and regulation" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010; (399): 313– 317.
- [392] **Seeliger M.A., Ranjitkar P., Kasap C., et al.** "Equally potent inhibition of c-Src and Abl by compounds that recognize inactive kinase conformations" *Cancer Res.* 2009; (69): 2384–239.

- [393] **Barnier J.V., Papin C., Eychene A., et al.** "The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression". *J Biol Chem* 1995; 270(40):23381-9.
- [394] **Stephens R.M., Sithanandam G., Copeland T.D., et al.** "95-kilodalton B-Raf serine/threonine kinase: identification of the protein and its major autophosphorylation site". *Mol Cell Biol* 1992; 12(9):3733-42.
- [395] **Ohtsuka T., Shimizu K., Yamamori B., et al.** "Activation of Brain B-Raf Protein Kinase by Rap1B Small GTP-binding Protein" *J Biol Chem* 1996; 271(3):1258– 61.
- [396] **Zhang B.H., Guan K.L.** "Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601" *EMBO J.* 2000; (19) 5429–5439.
- [397] **Zhu J., Balan V., Bronisz A., et al.** "Identification of Raf-1 S471 as a novel phosphorylation site critical for Raf-1 and B-Raf kinase activities and for MEK binding" *Mol. Biol. Cell.* 2005; (16) 4733–4744.
- [398] **Ritt D.A., Monson D.M, Specht S.I., Morrison D.K.** "Impact of feedback phosphorylation and Raf heterodimerization on normal and mutant B-Raf signaling" *Mol. Cell. Biol.* 2010; (30) 806–819.
- [399] **Leicht D. T., Balan V., Kaplun A. et al.** "Raf kinases: Function, regulation and role in human cancer" *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; (1773) 1196–1212.
- [400] **Luo Z., Tzivion G., Belshaw P.J. et al.** "Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism" *Nature* 1996; (383) 181–185.
- [401] **Rushworth L.K., Hindley A.D., O'Neill E., Kolch W.** "Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization" *Mol. Cell. Biol.* 2006; (26) 2262–227.
- [402] **Tzivion G., Luo Z., Avruch J.** "A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity" *Nature* 1998; (394) 88–92.
- [403] **Xing H., Kornfeld K., Muslin A.J.** "The protein kinase KSR interacts with 14-3-3 protein and Raf" *Curr. Biol.* 1997; (7) 294–300.
- [404] **Douziech M., Sahmi M., Laberge G., Therrien M.** "A KSR/CNK complex mediated by HYP, a novel SAM domain-containing protein, regulates RAS-dependent RAF activation in *Drosophila*" *Genes Dev.* 2006; (20) 807–819.
- [405] **Anselmo A.N., Bumeister R., Thomas J.M., et al.** "Critical contribution of linker proteins to Raf kinase activation" *J. Biol. Chem.* 2002; (277) 5940–5943.

- [406] **Yeung K., Seitz T., Li S., et al.** "Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP" *Nature* 1999; (401) 173–177
- [407] **Yeung K., Janosch P., McFerran B., et al.** "Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein" *Mol. Cell. Biol.* 2000; (20) 3079–3085.
- [408] **Dhillon A.S., Meikle S., Yazici Z. et al.** "Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation" *EMBO J.* 2002 (21) 64–71.
- [409] **Mercer K.E., Pritchard C.A.** "Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target" *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; (1653) 25– 40.
- [410] **Morice C., Nothias F., Konig S. et al.** "Raf-1 and B-Raf proteins have similar regional distributions but differential subcellular localization in adult rat brain" *Eur J Neurosci* 1999; 11(6):1995– 2006.
- [411] **Storm S.M., Cleveland J.L. and Rapp U.R.** "Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues". *Oncogene* 1990; 5(3):345-51.
- [412] **Huser M., Luckett J., Chiloehes A., et al.** "MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function". *Embo J* 2001; 20(8):1940-51.
- [413] **Rapp U.R., Goldsborough M.D., Mark G.E. et al.** "Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1983; (80) 4218–4222.
- [414] **Jansen H.W., Lurz R., Bister K. et al.** "Homologous cell-derived oncogenes in avian carcinoma virus MH2 and murine sarcoma virus 3611" *Nature* 1984; (307): 281–284.
- [415] **Sutrave P., Bonner T.I., Rapp U.R. et al.** "Nucleotide sequence of avian retroviral oncogene v-mil: homologue of murine retroviral oncogene v-raf". *Nature* 1984; (309) 85– 88.
- [416] **Bamford S., Dawson E., Forbes S. et al.** "The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website". *Br J Cancer* 2004; 91:355–8. Available from: <http://www.sanger.ac.uk/cosmic>.
- [417] **Davies H., Bignell G.R., Cox C. et al.** "Mutations of the BRAF gene in human cancer". *Nature* 2002 (417) 949–954.
- [418] **Cantwell-Dorris E.R., O'Leary J.J. and Sheils O.M.** "BRAfV600E: Implications for Carcinogenesis and Molecular Therapy" *Mol Cancer Ther* 2011; 10:385-394.

- [419] **Garnett M., Marais R.** "Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene". *Cancer Cell* 2004; 6:313–9.
- [420] **Wan, P.T., et al.** "Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF" *Cell* 2004 19; 116(6):855-67.
- [421] **Dhomen N., Marais R.** "BRAF signaling and targeted therapies in melanoma". *Hematol Oncol Clin North Am* 2009; 23:529–45,
- [422] **Xing M.** "BRAF mutation in thyroid cancer". *Endocr Relat Cancer* 2005; 12:245–62
- [423] **Nagasaka T. et al.** "Mutations in both KRAS and BRAF may contribute to the methylator phenotype in colon cancer". *Gastroenterology* 2008 (134): 1950-60
- [424] **Rajagopalan H., Bardelli A., Lengauer C., et al.** "Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatchrepair status". *Nature* 2002; 418:934.
- [425] **Weisenberger D., Siegmund K., Campan M., et al.** "CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer". *Nat Genet* 2006; 38:787–93.
- [426] **Park S., Rashid A., Lee J., Kim S. et al.** "Frequent CpG island methylation in serrated adenomas of the colorectum". *Am J Pathol* 2003; 162:815–22.
- [427] **Yang S., Farraye F., Mack C. et al.** "BRAF and KRAS Mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: relationship to histology and CpG island methylation status". *Am J Surg Pathol* 2004; 28:1452–9.
- [428] **Dong S., Lee E., Jeon E. et al.** "Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum". *Mod Pathol* 2005; 18:170–8.
- [429] **Mullis K.B., Ferre .F, Gibbs R.A.** "The polymerase chain reaction". *J. Evol. Biol.* 1994; (8):399-401.
- [430] **Rolfs A., Schuller I., Finckh U., and Weber-Rolfs I.** "PCR: Clinical diagnostics and research". *Folia Parasitologica* 1992; 40:186.
- [431] **Chien A., Edgar D.B., Trela J.M.** "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*". *J. Bacteriol* 1976; 174 (3): 1550–1557
- [432] **Lawyer F. Stoffel S. Saiki R. et al.** "High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity". *PCR methods and applications* 1993; 2(4): 275–287.

- [433] **Dieffenbach C.W., Dveksler G.S.** "PCR Primer, A Laboratory manual" *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1995
- [434] **Old R.W., Primrose S.B.** "Principles of gene manipulation, an introduction to genetic engineering" *5th edition, Blackwell science*, 1994.
- [435] **Klein D.** "Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations". *Trends Mol Med* 2002; 8:257-260.
- [436] **Ginzinger D.G.** "Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream". *Exp Hematol* 2002; 30:503-512.
- [437] **Cross N.** "Quantitative PCR techniques and applications". *British Journal of Haematology* 1995, 89:693-697.
- [438] **Ong Y.L., Irvine A.** "Quantitative real-time PCR: a critique of method and practical considerations". *Hematology* 2002; 7(1):59-67.
- [439] **Gabert J., Beillard E. et al.** "Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia -A Europe against cancer program" *Leukemia* 2003, 17:2318-2357.
- [440] **Lossos I.S. et al.** "Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies". *Leukemia* 2003; 17:789-795.
- [441] **Van der Velden V.H.J, Hochhaus A., Cazzaniga G., et al.** "Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects" *Leukemia* 2003, 17:1013-1034.
- [442] **Beillard E. et al.** "Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' RQ-PCR - A Europe against cancer program". *Leukemia* 2003, 17:2474-2486.
- [443] **Kheirelseid E. AH., Chang KH., Newell J., et al.** "Identification of endogenous control genes for normalisation of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer" *BMC Molecular Biology* 2010, 11:12
- [444] **Dydensborg A.B., Herring E., Auclair J., et al.** "Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006, 290(5):1067-1074.

- [445] **World Cancer Research Fund.** "Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective". *Washington: World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research*; 1997.
- [446] **Zlobec I., Lugli A.** "Prognostic and predictive factors in colorectal cancer". *J Clin Pathol* 2008; 61:561–569.
- [447] **Weiser M.R., Landmann R.G., Kattan M.W.et al.** "Individualized prediction of colon cancer recurrence using a nomogram". *J Clin Oncol* 2008; 26:380– 385.
- [448] **De Roock W., Biesmans B., De Schutter J. et al.** "Clinical biomarkers in oncology: Focus on colorectal cancer". *Mol Diagn Ther* 2009; 13:103–114.
- [449] **De Sousa E., Melo F., Wang X., et al.** "Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions". *Nat Med* 2013; 19:614–8.
- [450] **Budinska E., Popovici V., Tejpar S., et al.** "Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer". *J Pathol* 2013; 231:63–76.
- [451] **Roepman P., Schlicker A., Tabernero J., et al.** "Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition". *Int J Cancer* 2014; 134:552–62.
- [452] **Marisa L., de Reynies A., Duval A., et al.** "Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value". *PLoS Med* 2013;10(5): 1001453.
- [453] **Sadanandam A., Lyssiotis C.A., Homicsko K., et al.** "A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy". *Nat Med* 2013; 19:619–25.
- [454] **Wang X., Markowitz F., De Sousa E., et al.** "Dissecting cancer heterogeneity—an unsupervised classification approach". *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45:2574–9.
- [455] **Sadanandam A., Wang X., Melo F.D.S.E, et al.** "Reconciliation of classification systems defining molecular subtypes of colorectal cancer -Interrelationships and clinical implications". *Cell Cycle* 2014; 13:353–7.
- [456] **Linnkamp J., Wang X., Medema J. et al.** "Colorectal Cancer Heterogeneity and Targeted Therapy: A Case for Molecular Disease Subtypes". *Cancer Res* 2014; 75(2); 245-9.

- [457] **Ribic C.M., Sargent D.J., Moore M.J, et al.** “Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer”. *N Engl J Med* 2003; 349:247–57.
- [458] **Lech G., Słotwiński R., Słodkowski M. et al.** “Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances”. *World J Gastroenterol* 2016; 22(5): 1745- 1755.
- [459] **Ng K., Zhu A.X.** “Targeting the epidermal growth factor receptor in metastatic colorectal cancer” *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2008; (65) 8–20
- [460] **Morkel M., Riemer P., Blaker H. et al.** “Similar but different: distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance”. *Oncotarget*, 2015; 6(25): 20785- 20795.
- [461] **Neumann J., Zeindl- Eberhart E., Kirchner T. et al.** “Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer”. *Pathology- Research and Practice* 2009; (205) 858- 862.
- [462] **Forbes S.A., Beare D., Gunasekaran P. et al.** “COSMIC: exploring the world’s knowledge of somatic mutations in human cancer”. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43:805-11.
- [463] **Seeburg P. H., Colby W. W., Capon D. J., et al.** “Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12”. *Nature* 1984; 312: 71-75.
- [464] **Wadler S., Bajaj R., Neuberg D., et al.** “Prognostic implications of c-Ki-ras2 mutations in patients with advanced colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and interferon: a study of the eastern cooperative oncology group (EST2292)”. *Cancer J. Sci. Am.* 1997; 3: 284–288.
- [465] **Suchy B., Zietz C., and Rabes H. M.** “K-ras point mutations in human colorectal carcinomas: relation to aneuploidy and metastasis”. *Int. J. Cancer* 1992; 52: 30–33.
- [466] **Uetake H., Watanabe T., Yoshino T. et al.** “Clinicopathological features of patients with colorectal cancer among KRAS wild type p.G13D and other mutations: results from a multicenter, cross-sectional study by the Japan Study Group of KRAS mutation in colorectal cancer”. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 29(15):3605.
- [467] **Beranek M., Bures J., Palicka V. et al.** “A relationship between K-ras gene mutations and some clinical and histologic variables in patients with primary colorectal carcinoma”. *Clin. Chem. Lab. Med.* 1999; 37: 723–727.

- [468] **Benedix F., Meyer F., Kube R., et al.** “Influence of anatomical subsite on the incidence of microsatellite instability, and KRAS and BRAF mutation rates in patients with colon carcinoma”. *Pathology – Research and Practice* 2012; (208) 592–597.
- [469] **Sridhar S.S., Hedley D. Siu L.L.** “Raf kinase as a target for anticancer therapeutics”. *Molecular Cancer Therapeutics* 2005; 4:677–85.
- [470] **Roth A., Tejpar S., Delorenzi M., et al.** “Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial”. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 28:466–74.
- [471] **Laurent-Puig P., Cayre A., Manceau G., et al.** “Analysis of PTEN, BRAF and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer”. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27:5924–30.
- [472] **Minoo P., Moyer M.P, Jass J.R.** “Role of BRAF-V600E in the serrated pathway of colorectal tumourigenesis”. *Journal of Pathology* 2007; 212:124–33.
- [473] **French A.J, Sargent D.J, Burgart L.J, et al.** “Prognostic significance of defective mismatch repair and BRAF V600E in patients with colon cancer”. *Clinical Cancer Research* 2008; 14:3408–15.
- [474] **Curtin K., Slattery M.L, Samowitz W.S.** “CpG island methylation in colorectal cancer: past, present and future”. *Pathology Research International* 2011; 12:902674.
- [475] **Ogino S., Nosho K., Kirkner G.J, et al.** “CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer”. *Gut* 2009; 58:90–6.
- [476] **Ikenoue T., Hikiba Y., Kansi F., et al.** “Functional analysis of mutations within the kinase activation segment of B-Raf in human colorectal tumors”. *Cancer Research* 2003; 63:8132–7.
- [477] **Fransén K., Klintonäs M., Osterström A., et al.** “Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas”. *Carcinogenesis* 2004; 25:527–33.
- [478] **Tol J., Nategaal I.D, Punt C.J.** “BRAF mutation in metastatic colorectal cancer”. *New England Journal of Medicine* 2009; 361:98–9.
- [479] **Farina-Sarasqueta A., van Lijnschoten G., Moerland E., et al.** “The BRAF V600E mutation is an independent prognostic factor for survival in stage II and stage III colon cancer patients” *Ann. Oncol.* 2010; (21): 2396–2402.

- [480] **Yaeger R., Cercek A., Chou J.F, et al.** "BRAF mutation predicts for poor outcomes after metastasectomy in patients with metastatic colorectal cancer". *Cancer* 2014; 120:2316-24.
- [481] **Tran B., Kopetz S., Tie J., et al.** "Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer". *Cancer* 2011; 117(20):4623-32.
- [482] **Pai R.K., Jayachandran P., Koong A.C, et al.** "BRAF-mutated, microsatellite-stable adenocarcinoma of the proximal colon: an aggressive adenocarcinoma with poor survival, mucinous differentiation, and adverse morphologic features". *Am J Surg Pathol* 2012; 36: 744-52
- [483] **Yokota T., Ura T., Shibata N., et al.** "BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer". *Br J Cancer* 2011; 104:856-62.
- [484] **Russo A.L., Borger D.R., Szymonifka J., et al.** "Mutational Analysis and Clinical Correlation of Metastatic Colorectal Cancer". *Cancer* 2014; 120:1482-90.
- [485] **Guo Q., Zhao Y., Chen J., et al.** "BRAF-activated long noncoding RNA contributes to colorectal cancer migration by inducing epithelial-mesenchymal transition". *Oncol Lett* 2014; 8:869-75.
- [486] **Ponting C.P., Oliver P.L and Reik W.** "Evolution and functions of long noncoding RNAs". *Cell* 2009; 136: 629-641.
- [487] **Mercer T.R., Dinger M.E and Mattick J.S.** "Long non-coding RNAs: insights into functions". *Nat Rev Genet* 10: 155-159, 2009.
- [488] **Loewer S., Cabili M.N, Guttman M. et al.** "Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells". *Nat Genet* 2010; 42: 1113-1117.
- [489] **Sigova A.A., Mullen A.C., Molinie B., et al.** "Divergent transcription of long noncoding RNA/mRNA gene pairs in embryonic stem cells". *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 2876-2881.
- [490] **Gupta R.A., Shah N., Wang K.C, et al.** "Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis". *Nature* 2010; 464: 1071-1076.
- [491] **Tsai M.C, Spitale R.C. and Chang H.Y.** "Long intergenic noncoding RNAs: new links in cancer progression". *Cancer Res* 2011; 71: 3-7.

- [492] **Gutschner T., Hämmerle M., Eissmann M., et al.** “The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells”. *Cancer Res* 2013; 73: 1180-1189.
- [493] **Meola N., Pizzo M., Alfano G., et al.** “The long noncoding RNA Vax2os1 controls the cell cycle progression of photoreceptor progenitors in the mouse retina”. *RNA* 2012; 18: 111-123.
- [494] **Chisholm K.M, Wan Y., Li R., et al.** “Detection of long non-coding RNA in archival tissue: correlation with polycomb protein expression in primary and metastatic breast carcinoma”. *PLoS One* 2012; 7: e47998.
- [495] **Qi P. and Du X.** “The long non-coding RNAs, a new cancer diagnostic and therapeutic gold mine”. *Mod Pathol* 2013; 26: 155-165.
- [496] **McCarthy N.** “Epigenetics. Going places with BANCER”. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 451.
- [497] **Flockhart R.J, Webster D.E, Qu K., et al.** “BRAFV600E remodels the melanocyte transcriptome and induces BANCER to regulate melanoma cell migration”. *Genome Res* 2012; 22: 1006-1014.
- [498] **Scaltriti M., Baselga J.** “The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy”. *Clin Cancer Res* 2006, 12:5268–5272.
- [499] **Mekenkamp L. JM, Tol J., Dijkstra J.R. et al.** “Beyond KRAS mutation status: influence of KRAS copy number status and microRNAs on clinical outcome to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients” *BMC Cancer* 2012, 12:292
- [500] **Soh J., Okumura N., Lockwood W.W., et al.** “Oncogene mutations, copy number gains and mutant allele specific imbalance (MASI) frequently occur together in tumour cells”. *PLoS One* 2009, 4:7464.
- [501] **Gallick G. E., Kurzrock R., Kloetzer W. S. et al.** “Expression of p21ras in fresh primary and metastatic human colorectal tumors”. *Pro. Natl. Acad. Sci USA* 1985; 82: 1795- 1799.
- [502] **Halaschek- Wiener J., Wacheck V., Schlagbauer H. et al.** “A Novel Ras Antagonist Regulates Both Oncogenic Ras and the Tumor Suppressor p53 in Colon Cancer Cells”. *Molecular Medicine* 2000; 6(8): 693- 704
- [503] **Kim K., Kuo T., Cai J. et al.** “N-ras PROTEIN: FREQUENT QUANTITATIVE AND QUALITATIVE CHANGES OCCUR IN HUMAN COLORECTAL CARCINOMAS”. *Int. J. Cancer:* 1997; 71:767- 775.

- [504] **Jansson D.S., Radosevich J.A., Carney W.P. et al.** "An immunohistochemical analysis of ras oncogenes expression in epithelial neoplasms of the colon". *Cancer* 1990; 65(6): 1329- 37.
- [505] **Bhatavdekar J.M., Patel D.D., Chikhlikar P.R. et al.** "Molecular markers are predictors of recurrence and survival in patients with Dukes B and Dukes C colorectal adenocarcinoma". *Dis Colon Rectum*. 2001; 44 (4): 523- 33.
- [506] **Wang S., Yu Y.X., Zhang J.Q.** "P21ras expression, DNA ploidy and prognosis in colorectal cancer". *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 1994; 32 (8): 480- 2
- [507] **Zlatian O. M., Comănescu M. V., Roșu A. F. et al.** "Histochemical and immunohistochemical evidence of tumor heterogeneity in colorectal cancer" *Rom J Morphol Embryol* 2015, 56(1):175–181
- [508] **Lupberger J., Kreuzer K.-A., Baskaynak G. et al.** "Quantitative analysis of beta-actin, beta-2-microglobulin and porphobilinogen deaminase mRNA and their comparison as control transcripts for RT-PCR". *Molecular and Cellular Probes* 2002; 16:25–30
- [509] **Sørby L.A., Andersen S.N., Bukholm I.RK., et al.** "Evaluation of suitable reference genes for normalization of real-time reverse transcription PCR analysis in colon cancer". *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2010, 29:144
- [510] **Nihon-Yanagi Y., Terai K., Murano T. et al.** "β-2 microglobulin is unsuitable as an internal reference gene for the analysis of gene expression in human colorectal cancer". *BIOMEDICAL REPORTS* 2013; 1: 193-196,
- [511] **Peng J., Valeshabad A. K., Li Q. and Wang Y.** "Differential expression of RBM5 and KRAS in pancreatic ductal adenocarcinoma and their association with clinicopathological features". *ONCOLOGY LETTERS* 2013; 5: 1000-1004
- [512] **Liang H., Zhang J., Shao C., et al.** "Differential expression of RBM5, EGFR and KRAS mRNA and protein in non-small cell lung cancer tissues". *J Exp Clin Cancer Res* 2012; 31: 36.
- [513] **Zhang Z., Wang Y., Vikis H.G., et al.** "Wildtype KRAS2 can inhibit lung carcinogenesis in mice," *Nature Genetics*, 2001:29(1):25–33.
- [514] **Li J., Zhang Z., Dai Z., et al.** "LOH of chromosome 12p correlates with KRAS2 mutation in non-small cell lung cancer," *Oncogene*, 2003: 22(8):1243–1246.
- [515] **Hegi M.E., Devereux T.R., Dietrich W.F., et al.** "Allelotype analysis of mouse long carcinomas reveals frequent allelic losses on chromosome 4 and an association

between allelic imbalances on chromosome 6 and K-ras activation" *Cancer Research* 1994; 54(23): 6257–6264.

[516] **Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K., et al.** "Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival" *Cancer Research*, 2004; 64(11):3753–3756.

[517] **Goga A. and Benz C.** "Anti oncomir suppression of tumor phenotypes" *Molecular Interventions* 2007; 7(4):199–202.

[518] **Johnson S. M., Grosshans H., Shingara J. et al.** "RAS is regulated by the let-7 microRNA family" *Cell* 2005;120(5): 635–647.

[519] **Marshall C.J.** "How does p21ras transform cells?" *Trends in Genetics*, 1991; 7 (3):91–95.

[520] **Serrano M.** "The tumor suppressor protein p16INK4a," *Experimental Cell Research*, 1997 237(1): 7–13.

[521] **Spaulding D.C. and Spaulding B.O.** "Epidermal growth factor receptor expression and measurement in solid tumors". *Semin Oncol* 2002; 29: 45-54,

[522] **Barber T., Vogelstein B., Kinzler K., Velculescu V.** "Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas". *N Engl J Med* 2004; 351:2883

[523] **Moroni M., Sartore-Bianchi A., Benvenuti S., et al.** "Somatic mutation of EGFR catalytic domain and treatment with gefitinib in colorectal cancer". *Ann Oncol.* 2005 Nov; 16(11):1848-9

[524] **Ogino S., Meyerhardt J.A., Cantor M. et al.** "Molecular Alterations in Tumors and Response to Combination Chemotherapy with Gefitinib for Advanced Colorectal Cancer". *Clin Cancer Res* 2005; 11(18).

[525] **Liu J., Hu J., Cheng L. et al.** "Biomarkers predicting resistance to epidermal growth factor receptor- targeted therapy in metastatic colorectal cancer with wild-type KRAS". *OncoTargets and Therapy* 2016; 9 557- 565

[526] **Custodio A. et Feliu J.** "Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: Beyond KRAS mutations". *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2013; (85): 45–81.

[527] **Spindler K.L.G., Lindebjerg J., Nielsen J.N., et al.** "Epidermal growth factor receptor analyses in colorectal cancer: A comparison of methods". *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* 2006; 29: 1159-1165,

- [528] **Yang D., Schneider S., Azuma M. et al.** “Gene Expression Levels of Epidermal Growth Factor Receptor, Survivin, and Vascular Endothelial Growth Factor as Molecular Markers of Lymph Node Involvement in Patients with Locally Advanced Rectal Cancer” *Clinical Colorectal Cancer*, 2006;6(4): 305-311.
- [529] **Toiyama Y., Inoue Y., Saigusa S. et al.** “Gene Expression Profiles of Epidermal Growth Factor Receptor, Vascular Endothelial Growth Factor and Hypoxia-inducible Factor-1 with Special Reference to Local Responsiveness to Neoadjuvant Chemoradiotherapy and Disease Recurrence After Rectal Cancer Surgery” *Clinical Oncology* 2010; (22) 272–280
- [530] **Nannini M., Pantaleo M. A., Paterini P., et al.** “Molecular detection of epidermal growth factor receptor in colorectal cancer: does it still make sense?” *The Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. 2011; 13, 542–548
- [531] **Vallböhmer D., Zhang W., Gordon M., et al.** “Molecular Determinants of Cetuximab Efficacy” *J Clin Oncol* 2005; 23:3536-3544.
- [532] **Vallböhmer D., Iqbal S., Yang D.Y., et al.** “Molecular determinants of irinotecan efficacy” *Int. J. Cancer*: 2006; 119, 2435–2442.
- [533] **Kuramochi H., Hayashi K., Nakajima G. et al.** “Epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels and protein expression levels in primary colorectal cancer and corresponding liver metastases” *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 65:825–831
- [534] **Zhang W., Azuma M., Lurje G., et al.** “Molecular Predictors of Combination Targeted Therapies (Cetuximab, Bevacizumab) in Irinotecan-Refractory Colorectal Cancer (BOND-2 Study)” *ANTICANCER RESEARCH* 2010; 30: 4209-4218.
- [535] **Ho-Pun-Cheung A., Assenat E., Bascoul-Mollevi C., et al.** “EGFR and HER3 mRNA expression levels predict distant metastases in locally advanced rectal cancer” *Int. J. Cancer*: 2011; 128, 2938–2946.
- [536] **Yuan Z., Shin J., Wilson A., et al.** “An A13 repeat within the 39-untranslated region of epidermal growth factor receptor (EGFR) is frequently mutated in microsatellite instability colon cancers and is associated with increased EGFR expression”. *Cancer Res*. 2009; 69(19):7811–7818.
- [537] **Rego R.L., Foster N.R., Smyrk T.C., et al.** “Prognostic effect of activated EGFR expression in human colon carcinomas: comparison with EGFR status”. *Br J Cancer*. 2010; 102(1):165–172.

- [538] **Baranovskaya S., Martin Y., Alonso S., et al.** “Down-regulation of epidermal growth factor receptor by selective expansion of a 59-end regulatory dinucleotide repeat in colon cancer with microsatellite instability”. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(14):4531–4537.
- [539] **Ma D., Chen Z., Nero C.** “Somatic Deletions of the PolyA Tract in the 39 Untranslated Region of Epidermal Growth Factor Receptor Are Common in Microsatellite Instability–High Endometrial and Colorectal Carcinomas”. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136: 510- 516.
- [540] **Pentheroudakis G., Kotoula V. De Roock W. Et al.** “Biomarkers of benefit from cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer: interaction of EGFR ligand expression with RAS/RAF, PIK3CA genotypes”. *BMC Cancer* 2013: 13:49.
- [541] **Van Cutsem E., Kohne C.H, Hitre E., et al.** “Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer”. *New England Journal of Medicine* 2009; 360:1408–17.
- [542] **Rizzo S., Bronte G., Fanale D., et al.** “Prognostic vs predictive molecular biomarkers in colorectal cancer: is KRAS and BRAF wild type status required for anti-EGFR therapy?” *Cancer Treatment Reviews* 2010; 36S3:S56–61.