



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Μοριακή ανάλυση έκφρασης γονιδίου *RASSF1* στον
σποραδικό καρκίνο μαστού.**

**ΜΑΡΙΑ ΛΑΓΙΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2016

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μοριακή ανάλυση έκφρασης γονιδίου *RASSF1* στον σποραδικό καρκίνο μαστού.

ΜΑΡΙΑ ΛΑΓΙΟΥ

A.M.: 71304

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΡΟΥΠΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας - Μοριακής Διαγνωστικής, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΥΡΥΚΛΕΙΑ ΛΙΑΝΙΔΟΥ, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας - Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΡΟΥΠΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας - Μοριακής Διαγνωστικής, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΓΟΥΤΑΣ, Επίκουρος Καθηγητής Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής – Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

01/03/2016

Στον σύζυγό μου

Νικ. Π. Κομνηνό

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή – σκοπός: Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η ανάπτυξη και η επικύρωση καινοτόμων και αξιόπιστων μεθόδων για τη μελέτη της DNA μεθυλίωσης του πρώτου υποκινητή του ογκοκατασταλτικού *RASSF1* γονιδίου (από τον οποίο μεταγράφεται το κυριότερο μετάγραφο στον μαστό, το *RASSF1A*) και της mRNA έκφρασής του και η αξιολόγησή τους σε ασθενείς με καρκίνο μαστού.

Υλικά και μέθοδοι: Αναλύθηκε DNA και RNA από 81 παγωμένους ιστούς ασθενών με καρκίνο του μαστού και γνωστά κλινικά /ιστοπαθολογανατομικά δεδομένα (ηλικία, μέγεθος όγκου, ιστολογική διάγνωση, grade, λεμφαδενική διήθηση, μετάσταση, ER, PR, HER2 υποδοχείς) και από 4 φυσιολογικούς ιστούς μαστού γυναικών. Οι ασθενείς επιλέχθηκαν με βάση τη διαθεσιμότητα του υλικού και την ύπαρξη >70% καρκινικών κυττάρων στην ταχεία βιοψία. Η ανίχνευση της μεθυλίωσης του πρώτου υποκινητή του *RASSF1* γονιδίου έγινε με την μέθοδο του Pyrosequencing στον αναλυτή PyroMark Q96 (Qiagen), όπου αναλύθηκαν συνολικά 9 CpG δινουκλεοτίδια σε 117 bp της 1^{ης} CpG νησίδας του *RASSF1* γονιδίου που εκτείνεται στον πρώτο υποκινητή. Για τη μελέτη της mRNA έκφρασης χρησιμοποιήθηκε η real-time RT-qPCR στο θερμικό κυκλοποιητή Rotor-Gene Q με το SYBR Green PCR kit και το κατάλληλο σετ προτυποποιημένων εκκινητών της Qiagen με το οποίο ανιχνεύονται όλα τα *RASSF1* μετάγραφα (A-H). Ως μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η $2^{-\Delta Ct}$ ($RQ = 2^{-\Delta Ct}$, όπου RQ η mRNA έκφραση) με γονίδιο αναφοράς τη $\beta 2$ -μικροσφαιρίνη. Για την στατιστική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό IBM SPSS Statistics version 21.

Αποτελέσματα: Αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν οι δύο μέθοδοι ανάλυσης *RASSF1* έκφρασης με επιτυχία. Ως όριο της μεθυλίωσης ορίστηκε το 57,09% (από τον μέσο όρο των φυσιολογικών + 2SD), λαμβάνοντας υπόψη ότι ανιχνεύθηκε background μεθυλίωσης και στα φυσιολογικά δείγματα. Με τον τρόπο αυτό, χαρακτηρίστηκαν ως υπο-μεθυλιωμένα τα 59 (72,8%) ενώ ως υπερ-μεθυλιωμένα τα 22 δείγματα (27,2%). Ακόμα, αφού υπολογίστηκε η διάμεσος των τιμών mRNA έκφρασης των δειγμάτων ($RQ \cdot 1000 = 2,27$) χαρακτηρίστηκαν τα 40 δείγματα (49,4%) ως υπερ-εκφραζόμενα ενώ τα 41 (50,6%) ως υπο-εκφραζόμενα. Από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε ότι δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης και της mRNA έκφρασης ($p=0,207$), δεδομένο που ενισχύεται με την αδυναμία

εύρεσης ενός μοντέλου γραμμικής παλινδρόμησης, βάσει του οποίου θα μπορούσε να υπολογισθεί η mRNA έκφραση από την μεθυλίωση. Ακόμη, βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά του μέσου όρου της μεθυλίωσης ανάλογα με την κατάσταση των ER υποδοχέων, με στάθμη εμπιστοσύνης 95% (t-test, $p=0,001$), το οποίο επιβεβαιώνεται με το χωρισμό σε ομάδες και έλεγχο χ^2 -test ($p=0,016$). Οριακά συσχετίζονται η *RASSF1* υπερ-μεθυλίωση με την θετικότητα των PR υποδοχέων (χ^2 , $p=0,06$) και την λεμφαδενική διήθηση (χ^2 , $p=0,07$). Από την λογαριθμιστική παλινδρόμηση για την λεμφαδενική διήθηση, βρέθηκε ότι η πιθανότητα λεμφαδενικής διήθησης αυξάνεται με την παρουσία αρνητικών ER υποδοχέων ($p=0,008$ με RR 0,09-C.I. 0,14-0,52), το ποσοστό της *RASSF1* μεθυλίωσης ($p=0,006$ με RR 7,96-C.I. 1,82-34,86) και το επίπεδο έκφρασης του *RASSF1* ($p=0,047$ με RR 3,94-C.I. 1,02-15,29). Από την ανάλυση επιβίωσης προέκυψε ότι μεταξύ εμφάνισης μετάστασης και mRNA υπερ-έκφρασης του *RASSF1* γονιδίου υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση (log rank test, $p=0,040$).

Συμπεράσματα: Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, η υπερμεθυλίωση του πρώτου υποκινητή του *RASSF1* γονιδίου μπορεί να οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης άλλων μεταγράφων από τον δεύτερο υποκινητή με αρνητική προγνωστική σημασία για τις ασθενείς. Η αναπτυσσόμενη μέθοδος ανίχνευσης μεθυλίωσης λοιπόν θα μπορούσε μελλοντικά να επεκταθεί με ανάλογα αξιόπιστο τρόπο και στο δεύτερο υποκινητή του *RASSF1* γονιδίου, ώστε να υπάρχει μια συνολική εικόνα της ενεργότητας των υποκινητών του. Όσον αφορά την μελέτη mRNA έκφρασης, ένας νέος σχεδιασμός της μεθόδου με χρήση probes ειδικών για όλα τα *RASSF1* μετάγραφα σε συνδυασμό με ειδικά αντισώματα για την ανίχνευση των διαφόρων πρωτεϊνικών ισομορφών απευθείας στον ιστό (με IHC ή Western Blot) -και πιο ειδικά του *RASSF1A*-, θα μπορέσουν να εξειδικεύσουν την μελέτη αυτή, ξεπερνώντας τα υπάρχοντα προβλήματα και να προσφέρουν επιπρόσθετα χρήσιμα προβλεπτικά και προγνωστικά εργαλεία για την παρακολούθηση και θεραπεία των ασθενών με καρκίνο μαστού.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: καρκίνος μαστού

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: *RASSF1A*, Pyrosequencing, Real-Time qPCR, μεθυλίωση, ανάλυση έκφρασης

ABSTRACT

Background-goal of the study: The aim of this study was to develop and validate innovative and reliable methods for the study of DNA methylation of the first promoter of tumor suppressor *RASSF1* gene (from which the primary transcript variant in breast is transcribed; *RASSF1A*) and its mRNA expression and their evaluation in breast cancer patients.

Materials and methods: DNA and RNA from 81 frozen tissues of breast cancer patients with known clinical and histopathological data (age, tumor size, histology, grade, lymph node infiltration, metastasis, ER, PR, HER2 receptors) and from 4 normal breast tissues were analyzed. Patients were selected based on the availability of the material and the existence of >70% of tumor cells in the frozen section. Detection of methylation of the first promoter of *RASSF1* gene was performed by Pyrosequencing in the PyroMark Q96 analyzer (Qiagen), where a total of 9 CpG dinucleotides were analyzed in 117 bp of the 1st CpG island of *RASSF1* gene covering the entire length of the first promoter. In order to study the mRNA expression, a real-time RT-qPCR method was used in the Rotor-Gene Q thermal cycler by using the SYBR Green PCR kit and a suitable set of standardized primers from Qiagen wherein all *RASSF1* transcript variants are detectable (A-H). As method of relative quantification, the $2^{-\Delta Ct}$ was used ($RQ = 2^{-\Delta Ct}$, wherein RQ is the mRNA expression) with beta2-microglobulin as a reference gene. For the statistical analysis, the IBM SPSS Statistics version 21 software was used.

Results: Two methods of *RASSF1* expression analysis were developed and validated. The threshold of methylation was defined at 57.09% (average of normals + 2SD), considering that background methylation was detected in normal samples. In this way, 59 samples were designated as hypomethylated (72.8%) while 22 samples as hyper-methylated (27.2%). After calculating the median of the sample mRNA expression values ($RQ \cdot 1000 = 2.27$), 40 samples were classified as over-expressing (49.4%), while 41 (50.6%) as sub-expressing.

From the statistical analysis, it was shown that between methylation and mRNA expression no significant negative correlation was found ($p=0.207$),

data that was further supported by the inability to find a linear regression model, under which mRNA expression could be calculated from methylation. Furthermore, a statistically significant difference of the average methylation depending on the condition of the ER receptors was detected (t-test, $p=0.001$) that was also confirmed by the division into groups and χ^2 -test ($p=0.016$). The *RASSF1* hyper-methylation was also marginally correlated with positive PR receptors (χ^2 , $p=0.06$) and lymph node infiltration (χ^2 , $p=0.07$). Logistic regression showed that the probability of lymph node infiltration was increased by the presence of negative ER receptors ($p=0.008$, RR 0.09, CI 0.14-0.52, the percentage of *RASSF1* methylation ($p=0.006$, RR 7.96, CI 1.82-34.86) and the level of *RASSF1* expression ($p=0.047$, RR 3.94, CI 1.02-15.29). Survival analysis showed that there is statistically significant correlation between metastasis and *RASSF1* gene mRNA over-expression (log rank test, $p=0.040$).

Conclusions: According to this study results, hypermethylation of the first promoter of *RASSF1* gene could result in increased transcription of other variant transcripts from the second promoter with negative prognostic significance for the patients. The developed methylation detection method could be extended in the future in an analogous reliable way in the second promoter of the *RASSF1* gene as well, in order to allow for an overall view of the activity of the gene promoters. Regarding the expression study, a new design strategy with probes specific for all *RASSF1* transcripts in conjunction with specific antibodies for the detection of different protein isoforms in the tissue (by IHC and Western Blot), and especially of RASSF1A, would enable to specialize this study, overcoming the existing problems and offer additional useful predictive and prognostic tools for monitoring and treatment of patients with breast cancer.

SUBJECT AREA: Breast cancer

KEYWORDS: RASSF1A, Pyrosequencing, Real-Time qPCR, methylation, expression analysis

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	X
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	XIV
ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	XVI
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Ο ΜΑΣΤΟΣ- ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ	1
1.1 Ανατομία, μορφολογία και κατασκευή του μαστού	1
1.2 Αγγείωση, νεύρωση και λεμφικό σύστημα του μαστού	3
1.3 Στοιχεία φυσιολογίας του μαστού.....	4
1.4 Παθήσεις του μαστού.....	5
1.4.1 Διαταραχές ανάπτυξης	5
1.4.2 Φλεγμονές.....	6
1.4.3 Καλοήθεις επιθηλιακές βλάβες	6
1.4.4 Όγκοι του μαστού	6
1.5 Καρκίνος του μαστού	6
1.5.1 Επιδημιολογικά δεδομένα καρκίνου του μαστού	7
1.5.2 Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων.....	8
1.5.3 Παράγοντες κινδύνου	9
1.6 Ταξινόμηση καρκίνου του μαστού.....	11
1.6.1 Ιστοπαθολογοανατομική ταξινόμηση.....	11
1.6.2 Βαθμός διαφοροποίησης.....	12
1.6.3 Το σύστημα σταδιοποίησης TNM.....	13
1.6.4 Μοριακή ταξινόμηση με βάση αναλύσεις ρουτίνας υποδοχέων..	15
1.6.5 Κυριότεροι βιοδείκτες του καρκίνου του μαστού	16
1.6.6 Μοριακές δοκιμές και νέα μοριακή ταξινόμηση.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ.....	21
2.1 Εισαγωγή.....	21
2.2 Μεθυλίωση DNA	22
2.3 Μεθυλίωση και καρκίνος	26
2.4 Τεχνικές ανάλυσης μεθυλίωσης	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΓΟΝΙΔΙΟ <i>RASSF1</i>.....	32
3.1 Εισαγωγή.....	32
3.2 Δομή <i>RASSF1</i> και <i>RASSF1A</i> μεταγράφου	32
3.3 Βιολογικός ρόλος <i>RASSF1A</i>	34

3.4	DNA αλλαγές στο γονίδιο <i>RASSF1A</i>	37
3.5	Μεθυλίωση του <i>RASSF1A</i> και καρκίνος	40
3.6	Υπόλοιπα μέλη οικογένειας <i>RASSF</i>	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗΣ <i>RASSF1</i>.....		45
4.1	Ανάλυση μεθυλίωσης.....	45
4.1.1	Εισαγωγή	45
4.1.2	Pyrosequencing	45
4.1.3	Ανάλυση μεθυλίωσης με Pyrosequencing	49
4.1.4	Εφαρμογές και πλεονεκτήματα Pyrosequencing	49
4.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) 50	
4.2.1	Επισκόπηση μεθόδου	50
4.2.2	Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time qPCR)	54
4.2.3	Αντίστροφης μεταγραφής ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (reverse transcription qPCR, RT-qPCR).....	57
Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ		59
5.1	Δείγματα ασθενών.	59
5.2	Απομόνωση DNA	59
5.2.1	Αντιδραστήρια / αναλώσιμα υλικά / εξοπλισμός	60
5.2.2	Πειραματική πορεία	60
5.3	Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού DNA	61
5.3.1	Αντιδραστήρια/ υλικά/ εξοπλισμός.....	62
5.3.2	Πειραματική πορεία	63
5.4	Δημιουργία πλήρως μεθυλιωμένου και αμεθυλιώτου δείγματος ελέγχου– Αντίδραση μεθυλοτρανσφεράσης (<i>M.SssI</i>)	63
5.4.1	Αντιδραστήρια / υλικά / εξοπλισμός.....	63
5.4.2	Πειραματική πορεία	63
5.4.3	Καμπύλη των δειγμάτων ελέγχου.....	64
5.5	Αντίδραση μετατροπής του μεθυλιωμένου DNA με όξινο θειώδες νάτριο (Sodium Bisulfite Conversion)	64
5.5.1	Αντιδραστήρια / υλικά / εξοπλισμός.....	65

5.5.2	Πειραματική πορεία	65
5.6	PCR για τον πρώτο υποκινητή του <i>RASSF1</i>	66
5.7	Ανάλυση μεθυλίωσης με την μέθοδο Pyrosequencing.....	67
5.7.1	Αντιδραστήρια / υλικά / εξοπλισμός.....	67
5.7.2	Πειραματική πορεία	67
5.8	Απομόνωση του RNA	69
5.8.1	Αντιδραστήρια / υλικά / εξοπλισμός.....	69
5.8.2	Πειραματική πορεία	70
5.9	Ποσοτικός προσδιορισμός RNA	72
5.9.1	Αντιδραστήρια / υλικά / εξοπλισμός.....	73
5.9.2	Πειραματική πορεία	73
5.10	Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)	74
5.10.1	Αντιδραστήρια / υλικά / εξοπλισμός.....	75
5.10.2	Πειραματική πορεία	75
5.10.3	PCR ελέγχου παραχθέντος cDNA.....	77
5.11	Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων	78
5.11.1	Αντιδραστήρια / υλικά / εξοπλισμός.....	78
5.11.2	Πειραματική Πορεία.....	79
5.12	Ανάλυση έκφρασης γονιδίου <i>RASSF1</i> με real-time qPCR.....	80
5.12.1	Αρχικός σχεδιασμός στον θερμικό κυκλοποιητή LightCycler 1.5	80
5.12.2	Θερμικός κυκλοποιητής Rotor-Gene Q.	85
5.12.3	Καθαρισμός PCR προϊόντων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.....	90
5.12.4	Υπολογισμός της συγκέντρωσης των προτύπων δειγμάτων	91
5.12.5	Μαθηματική ανάλυση της μελέτης έκφρασης του γονιδίου <i>RASSF1A</i> και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		94
6.1	Εισαγωγή.....	94
6.2	Ανίχνευση μεθυλίωσης του πρώτου υποκινητή του <i>RASSF1</i> γονιδίου.....	98
6.3	Κατασκευή καμπύλης αναφοράς RT-qPCR των γονιδίων της β2-μικροσφαιρίνης και του <i>RASSF1</i>	102

6.4	Αποτελέσματα αρχικού σχεδιασμό εκκινήτων για την μελέτη έκφρασης του <i>RASSF1</i> γονιδίου	104
6.5	Μελέτη έκφρασης <i>RASSF1</i> γονιδίου στον θερμικό κυκλοποιητή Rotor-Gene Q.....	107
6.6	Στατιστική ανάλυση πειραματικών αποτελεσμάτων	110
6.6.1	Περιγραφική στατιστική ανάλυση	110
6.6.2	Έλεγχος κανονικότητας δεδομένων	111
6.6.3	Συσχέτιση ποσοτικών παραμέτρων.	112
6.6.4	Σύγκριση ποσοστών στις ποιοτικές μεταβλητές	113
6.6.5	t-test και Mann - Whitney	114
6.6.6	Γραμμική παλινδρόμηση (Linear Regression).....	117
6.6.7	Διωνυμική Λογαριθμιστική Παλινδρόμηση (Binary Logistic Regression)	117
6.6.8	Ανάλυση επιβίωσης.....	119
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7		120
ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ		120
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ		127
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι		129
ΑΝΑΦΟΡΕΣ		134

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1-1. Ο μαστός. (http://www.smyrlis-laparoscopic.gr).....	2
Σχήμα 1-2 . Αρτηρίες, φλέβες και λεμφαγγεία μαστού. (http://www.e-mastology.gr).....	3
Σχήμα 1-3: Επιδημιολογικά δεδομένα καρκίνου για την Ελλάδα. Αριστερά εμφανίζονται τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου ανά κατηγορία καρκίνου και δεξιά τα ποσοστά θνησιμότητας ανά κατηγορία καρκίνου για τις γυναίκες το 2012. (http://eu-cancer.iarc.fr/EUCAN/Default.aspx).....	7
Σχήμα 1-4: Τα δέκα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. ⁽⁹⁾	8
Σχήμα 2-1. Δομές χρωματίνης. (http://www.med.uoi.gr/haematology/img/figure1.jpg)	23
Σχήμα 2-2. Μηχανισμός μεθυλίωσης. ⁽⁴³⁾	24
Σχήμα 2-3. Οι τρεις προτεινόμενοι μηχανισμοί της μεταγραφικής καταστολής. ⁽⁴⁴⁾	25
Σχήμα 2-4. Τα μονοπάτια της μεθυλίωσης. ⁽⁴⁹⁾	26
Σχήμα 2-5. Μοντέλα μηχανισμών όπου η μεθυλίωση οδηγεί στην ογκογένεση. ⁽⁴¹⁾	27
Σχήμα 2-6. Η μεθυλίωση σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα. ⁽⁴⁵⁾	28
Σχήμα 2-7. Μετατροπή DNA με όξινο θειώδες νάτριο. (www.neb.com).....	29
Σχήμα 3-1. Ο γενετικός τόπος 3p21.3 ⁽⁶⁷⁾	33
Σχήμα 3-2. Γονίδιο του <i>RASSF1</i> . (Α) Δομή του <i>RASSF1</i> , όπου φαίνονται τα 8 εξόνια, οι υποκινητές με τα βέλη και οι CpG νησίδες με τις μαύρες ράβδους. Τα λευκά τετράγωνα αντιπροσωπεύουν μη-κωδικοποιούσες περιοχές και τα μαύρα κωδικοποιούσες. (Β) Τα διαφορετικά μετάγραφα του <i>RASSF1</i> με τις αντίστοιχες δομικές περιοχές των ισομόρφων. ⁽⁶¹⁾	34
Σχήμα 3-3. Δομικές περιοχές της πρωτεΐνης <i>RASSF1A</i> . ⁽⁷⁰⁾	34
Σχήμα 3-4. Σχηματική αναπαράσταση ορισμένων μονοπατιών του <i>RASSF1A</i> . ⁽⁶¹⁾	36
Σχήμα 3-5. Οι πολυμορφισμοί του <i>RASSF1A</i> και οι θέσεις τους στην αλληλουχία του. ⁽⁸⁸⁾	39
Σχήμα 3-6. Συσχέτιση πολυμορφισμών με τον βιολογικό ρόλο του <i>RASSF1A</i> . ⁽⁸⁸⁾	39
Σχήμα 3-7. Τα μέλη της οικογένειας <i>RASSF</i> . ⁽⁶⁸⁾	43
Σχήμα 4-1. Οι χημικές αντιδράσεις και η σχηματική αναπαράσταση του Pyrosequencing. ⁽¹³⁰⁾	45
Σχήμα 4-2. Το πυρόγραμμα. (www.qiagen.com).....	46
Σχήμα 4-3 Σχηματική αναπαράσταση της PCR. (Α) Αναπαστάση του πρώτου κύκλου της PCR. (Β) Αναπαράσταση των τριών πρώτων κύκλων. (http://panacea.med.uoa.gr).....	51

Σχήμα 4-4. Η κινητική της PCR. (www.lifetechnologies.com)	52
Σχήμα 4-5. Η κινητική της real-time qPCR. (www.abbottmolecular.com)	53
Σχήμα 4-6 Καμπύλη βαθμονόμησης qPCR. ⁽¹⁴⁷⁾	54
Σχήμα 4-7 Αναπαράσταση RT-PCR. (https://en.wikipedia.org)	55
Σχήμα 4-8. One-step και Two-step RT-PCR (https://upload.wikimedia.org/)	56
Σχήμα 5-1. Φωτογραφία Qubit® φθορισμομέτρου.....	62
Σχήμα 5-2. Σύστημα προετοιμασίας δειγμάτων για Pyrosequencing.....	67
Σχήμα 5-3. Η RNA εκλεκτικότητα και ευαισθησία του Quant-iT™ RNA Assay Kit. (http://www.lifetechnologies.com/).....	72
Σχήμα 5-4. Επισκόπηση των τριών διαφορετικών συστημάτων εκκινητών κατά τη σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA. (www.roche-applied-science.com).....	75
Σχήμα 5-5. Η θέση των εκκινητών Invitrogen στο mRNA του RASSF1 γονιδίου.....	81
Σχήμα 5-6. Οι θέσεις των εκκινητών IDT στο mRNA του RASSF1 γονιδίου...	83
Σχήμα 5-7. Ο θερμικός κυκλοποιητής Rotor-Gene Q.....	85
Σχήμα 5-8. Το σύστημα θέρμανσης του θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene Q.....	86
Σχήμα 5-9. Το σύστημα ψύξης του θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene Q.....	86
Σχήμα 5-10. Διαθέσιμα κανάλια θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene Q.....	87
Σχήμα 5-11. Απεικόνιση οπτικού συστήματος του θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene Q.....	87
Σχήμα 5-12. Η περιοχή ενίσχυσης του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης. (www.qiagen.com/gr/shop/pcr/real-time-pcr-enzymes-and-kits/two-step-qrt-pcr/quantitect-primer-assays?catno=QT00088935#geneglobe)	88
Σχήμα 5-13. Η περιοχή ενίσχυσης του RASSF1 γονιδίου. (https://www.qiagen.com/gr/shop/pcr/real-time-pcr-enzymes-and-kits/two-step-qrt-pcr/quantitect-primer-assays?catno=QT01016134#geneglobe)	89
Σχήμα 6-1. Ηλεκτροφόρηση αгарόζης με προϊόντα από PCR αντιδράσεις για την ανίχνευση επιγενετικών τροποίσεων στον πρώτο υποκινητή του RASSF1 γονιδίου.....	98
Σχήμα 6-2. Πυρόγραμμα μη μεθυλιωμένου συνθετικού δείγματος (μέσος όρος μεθυλίωσης 14%).....	99
Σχήμα 6-3. Πυρόγραμμα 40% μεθυλιωμένου συνθετικού δείγματος (μέσος όρος μεθυλίωσης 47%).....	97
Σχήμα 6-4. Πυρόγραμμα υπερ-μεθυλιωμένου δείγματος ασθενούς (μέσος όρος μεθυλίωσης 82%).....	100
Σχήμα 6-5. Πυρόγραμμα υπο-μεθυλιωμένου δείγματος ασθενούς (μέσος όρος μεθυλίωσης 37%).....	100

Σχήμα 6-6. Καμπύλη αναφοράς του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης.....	103
Σχήμα 6-7. Καμπύλη αναφοράς του RASSF1A γονιδίου.....	103
Σχήμα 6-8. Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων με τους εκκινητές της Invitrogen. Κατά σειρά από αριστερά εμφανίζονται ο δείκτης μοριακών βαρών PCR marker και δείγματα cDNA.....	105
Σχήμα 6-9. Εικόνα ηλεκτροφόρησης αγαρόζης για την qPCR με τους εκκινητές της IDT. Κατά σειρά από αριστερά προς τα δεξιά εμφανίζονται ο δείκτης μοριακών βαρών PCR marker, 2 δείγματα cDNA και το γενωμικό DNA.....	106
Σχήμα 6-10. Αναφορά προγράμματος Primer Premier για τους εκκινητές IDT στο γενωμικό DNA για το RASSF1. (Τα βέλη δείχνουν τα μη θερμοδυναμικώς σταθερά πιθανά προϊόντα που προέρχονται από εσφαλμένη υβριδοποίηση των εκκινητών).....	106
Σχήμα 6-11. Εικόνα ηλεκτροφόρησης για τον έλεγχο των PCR προϊόντων της real-time qPCR. Στη μέση είναι ο δείκτης μοριακών βαρών PCR marker, αριστερά τα PCR προϊόντα της β2-μικροσφαιρίνης και δεξιά του RASSF1.....	107
Σχήμα 6-12. Γραφική παράσταση και εξίσωση γραμμικής παλινδρόμησης έκφρασης - μεθυλίωσης.....	117
Σχήμα 6-13. Διάγραμμα ανάλυσης επιβίωσης μετάστασης-μεθυλίωσης.....	119
Σχήμα 6-14. Διάγραμμα ανάλυσης επιβίωσης μετάστασης-έκφρασης.....	119

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1-1. Ιστολογική ταξινόμηση καρκίνου του μαστού σε σχέση με το βαθμό διαφοροποίησης.....	13
Πίνακας 1-2. TNM σύστημα σταδιοποίησης (όπου «m0+» αναφέρεται σε μοριακή ανίχνευση του καρκίνου, «m1» αναφέρεται σε μικρομεταστάσεις).....	14
Πίνακας 1-3. Κατάταξη σε στάδια μετά την TNM σταδιοποίηση.....	14
Πίνακας 4-1. Πλεονεκτήματα Pyrosequencing. ⁽¹³³⁾	48
Πίνακας 5-1. Διαδοχικές αραιώσεις για την δημιουργία των δειγμάτων ελέγχου.....	64
Πίνακας 5-2. Συστατικά της PCR αντίδρασης για την ενίσχυση του πρώτου υποκινητή του RASSF1 γονιδίου.....	66
Πίνακας 5-3. Συνθήκες της PCR αντίδρασης για τον πρώτο υποκινητή του RASSF1 γονιδίου.....	66
Πίνακας 5-4. Αλληλουχία εκκινητών για την ενίσχυση του πρώτου υποκινητή του RASSF1 γονιδίου.....	66
Πίνακας 5-5. Αλληλουχία εκκινητή αλληλούχησης για τον πρώτο υποκινητή του RASSF1 γονιδίου.....	67
Πίνακας 5-6. Συστατικά μίγματος εκμαγείου RNA-εκκινητή κατά τη σύνθεση του cDNA.....	76
Πίνακας 5-7. Συστατικά που περιέχονται στο δεύτερο μίγμα της σύνθεσης του cDNA.....	76
Πίνακας 5-8. Συστατικά της PCR αντίδρασης για το γονίδιο αναφοράς PBGD.....	77
Πίνακας 5-9. Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο αναφοράς PBGD.....	78
Πίνακας 5-10. Αλληλουχία εκκινητών για το γονίδιο αναφοράς της ακτίνης...78	
Πίνακας 5-11. Χαρακτηριστικά εκκινητών Invitrogen.....	81
Πίνακας 5-12. Συστατικά συμβατικής PCR για την δοκιμή των εκκινητών Invitrogen του RASSF1 γονιδίου.....	82
Πίνακας 5-13.. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα συμβατικής PCR για την δοκιμή των εκκινητών Invitrogen του RASSF1 γονιδίου.....	82
Πίνακας 5-14. Χαρακτηριστικά εκκινητών IDT.....	83
Πίνακας 5-15. Αντιδραστήρια συμβατικής PCR για την δοκιμή των εκκινητών IDT του RASSF1 γονιδίου.....	84
Πίνακας 5-16. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα συμβατικής PCR για την δοκιμή των εκκινητών Invitrogen του RASSF1 γονιδίου.....	84
Πίνακας 5-17. Συστατικά της PCR αντίδρασης για την μελέτη έκφρασης του RASSF1 γονιδίου.....	89

Πίνακας 5-18. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα της PCR αντίδρασης για την μελέτη έκφρασης του RASSF1 γονιδίου.....	89
Πίνακας 6-1. Κλινικά και ιστοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο του μαστού.....	95
Πίνακας 6-2. Ποσοτικός προσδιορισμός DNA και RNA δειγμάτων.....	97
Πίνακας 6-3. Ποσοστά RASSF1 μεθυλίωσης δειγμάτων. Με πράσινο σημειώνονται τα φυσιολογικά, με μπλε τα υπο- και με κόκκινο τα υπερ-μεθυλωμένα δείγματα.....	101
Πίνακας 6-4. Συγκεντρώσεις προτύπων διαλυμάτων (βαθμονομητών).....	102
Πίνακας 6-5. Στατιστικά στοιχεία επαναληψιμότητας και ενδιάμεσης αναπαραγωγιμότητας καμπύλης αναφοράς του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης.....	104
Πίνακας 6-6. Στατιστικά στοιχεία επαναληψιμότητας και ενδιάμεσης αναπαραγωγιμότητας καμπύλης αναφοράς του RASSF1A γονιδίου.....	104
Πίνακας 6-7. Σχετική mRNA έκφραση του RASSF1 γονιδίου σε σχέση με την β2-μικροσφαιρίνη. Με πράσινο σημειώνονται τα φυσιολογικά, με μπλε τα υπο- και με κόκκινο τα υπερ- εκφρασμένα δείγματα.....	109
Πίνακας 6-8. Περιγραφική στατιστική ανάλυση ποσοτικών κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των ασθενών.....	110
Πίνακας 6-9. Περιγραφική στατιστική ανάλυση ποιοτικών (ομαδοποιημένων) κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των ασθενών.....	110
Πίνακας 6-10. Έλεγχος κανονικότητας ποσοτικών μεταβλητών.....	111
Πίνακας 6-11. Πίνακας συσχετίσεων ποσοτικών δεδομένων.....	112
Πίνακας 6-12. Πίνακας ελέγχου ανεξαρτησίας παραμέτρων.....	113
Πίνακας 6-13. t-test RASSF1 μεθυλίωσης.....	114
Πίνακας 6-14. Mann-Whitney test RASSF1 μεθυλίωσης.....	115
Πίνακας 6-15. t-test mRNA έκφρασης.....	115
Πίνακας 6-16. Mann-Whitney test mRNA έκφρασης.....	116
Πίνακας 6-17. Αποτέλεσμα διωνιμικής λογαριθμιστικής παλινδρόμησης για τη λεμφαδενική διήθηση.....	118
Πίνακας 6-18. Αποτέλεσμα διωνυμικής λογιστικής παλινδρόμησης για την μετάσταση.....	118

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του ΑΤΤΙΚΟΝ Π.Γ.Ν, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης Κλινικής Χημείας του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του ΕΚΠΑ, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Διαγνωστικής της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ κ. Χρ. Κρούπη.

Αρχικώς θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Χρ. Κρούπη για την καθοδήγηση, τις υποδείξεις, την συμπαράσταση και την ενθάρρυνση απέναντι στις δυσκολίες που αντιμετώπισα κατά την πειραματική διαδικασία, για τον χρόνο που αφιέρωσε κατά την παραμονή μου εκεί αλλά και την δυνατότητα να διευρύνω τους ορίζοντες της σκέψης και της οπτικής μου επιστημονικά.

Ευχαριστώ πολύ την Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας – Κλινικής Χημείας του Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ κ. Ε. Λιανίδου για την ανάθεση του θέματος της παρούσης εργασίας, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεχίσω τις σπουδές μου μετά την παύση αυτών με τον ερχομό των παιδιών μου στη ζωή μου. Την ευχαριστώ που με εμπιστεύτηκε και έκανε δεκτή την αίτησή μου, συνέπειες της οποίας ήταν η επαφή με νέα δεδομένα και τεχνικές που αφορούν τον κλάδο της Κλινικής Χημείας, η συμμετοχή σε ενδιαφέροντα συνέδρια και η γνωριμία, μέσω των διαλέξεων του προγράμματος, με σημαντικούς επιστήμονες της χώρας μας και όχι μόνο.

Ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής – Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ κ. Νικ. Γούτα στο Ευγενίδειο Θεραπευτήριο για την διάθεση των ιστών των ασθενών, προκειμένου να πραγματοποιηθεί αυτή η εργασία.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια Ιατρικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας κ. Π. Μουτσάτσου-Λαδικού και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας του ΑΤΤΙΚΟΝ Π.Γ.Ν για την φιλοξενία στο εργαστήριο και την δυνατότητα πραγματοποίησης πρακτικής άσκησης σε ένα σύγχρονο εργαστήριο που καθημερινά εξυπηρετεί πολλούς συναθρώπους μας με ιδιαίτερη ταχύτητα και αξιοπιστία.

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Τρ. Λιλόγλου στο Πανεπιστήμιο του Liverpool (Dept. Of Molecular and Clinical Cancer Medicine) για την παραχώρηση του αναλυτή PyroMark Q96 για την πραγματοποίηση του Pyrosequencing.

Ευχαριστώ την Διδάκτορα του Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ κ. Νικ. Πουμπουρίδου για την συνεργασία, την βοήθεια και καθοδήγηση καθόλη την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής, καθώς και την υποψήφια Μεταπτυχιακή φοιτήτρια Αντωνία Σαρλή για την υποστήριξη και συνεργασία στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του ΑΤΤΙΚΟΝ. Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες εργαστήκαμε δεν ήταν οι ιδανικότερες, όμως η παρέα των τριών μας ήταν ευχάριστη και θα μου λείψει. Εύχομαι και στις δυο από καρδιάς καλή σταδιοδρομία.

Ευχαριστώ τους συμφοιτητές μου Αγγελίδη Ηλία, Αναστασοπούλου Μαρίτα, Λαζαρίδου Μαριφίλη, Παρασκευόπουλο Παναγιώτη, Ρούκη Άντζελα, Σίμου Άννα και Τέμο Μαρία για τις υπέροχες μέρες, την ευχάριστη παρέα, το γέλιο και την υποστήριξη που μου προσέφεραν κατά την κοινή μας πορεία. Εύχομαι από καρδιάς σε όλους καλή τύχη και να κάνουν πραγματικότητα τα όνειρά τους.

Ευχαριστίες θα απευθύνω και σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας του ΑΤΤΙΚΟΝ για τις συμβουλές και την εκμάθηση πρακτικών που αφορούν τη λειτουργία ενός σύγχρονου εργαστηρίου.

Ευχαριστώ τους γονείς μου, την ευρύτερη οικογένεια και τους φίλους μου για την συμπαράσταση και την υποστήριξη καθόλη την διάρκεια των δύο αυτών ετών.

Τελειώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον σύζυγο, σύντροφο και πατέρα των παιδιών μου Νικ. Π. Κομνηνό, όπου χωρίς την δική του συγκαταβατικότητα, υποστήριξη, κατανόηση, ανοχή, αντοχή, υπομονή, αγάπη, θυσία και σεβασμό δεν θα είχα την δυνατότητα να συνεχίσω τις σπουδές μου, επιτυγχάνοντας έναν ακόμη προσωπικό στόχο. Κατά τη διάρκεια των δύο αυτών ετών υπερέβαλε εαυτόν. Η συμβολή του ήταν τεράστια σε αυτό μου το εγχείρημα και το ελάχιστο που μπορώ να κάνω για

να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου είναι να του αφιερώσω αυτή την εργασία.

Ελπίζω οι κόρες μου, Ηλιάνα και Δανάη, όταν μεγαλώσουν να μπορέσουν να κατανοήσουν τους λόγους για τους οποίους «η μαμά πάει στο σχολείο και διαβάζει».

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

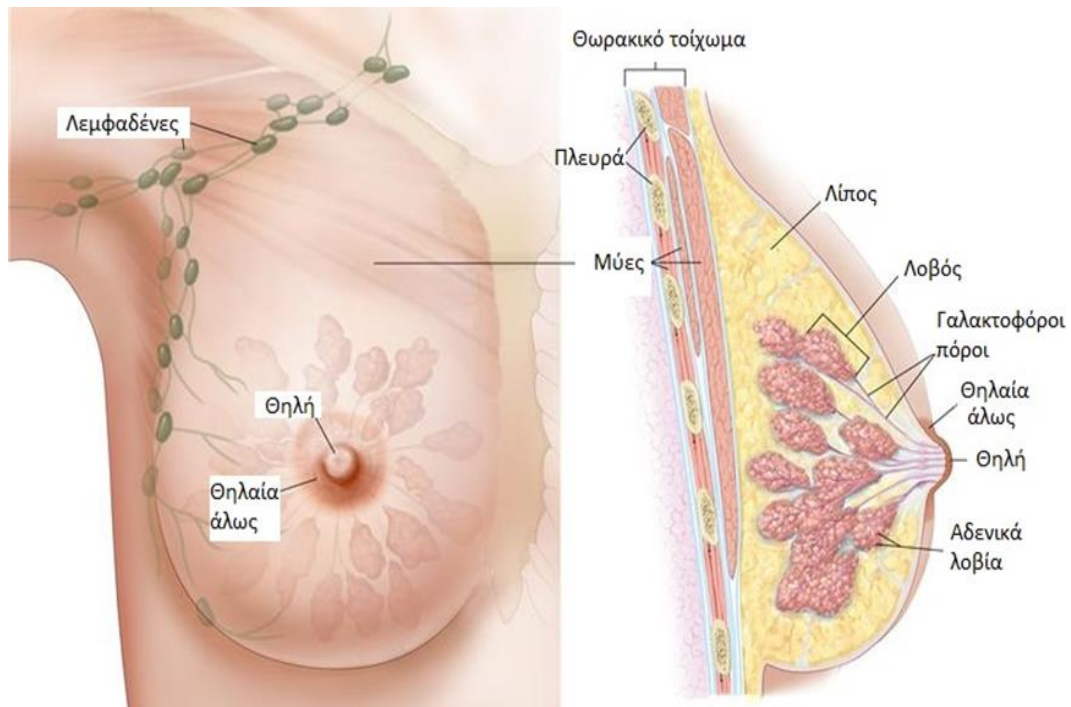
Ο ΜΑΣΤΟΣ – ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ

1.1 Ανατομία, μορφολογία και κατασκευή του μαστού

Ο μαστός αποτελεί περίπου ημισφαιρική, λιπώδη πτυχή του δέρματος, που περιέχει το μαστικό (ή μαζικό) αδένα. Μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξής του, κάθε μαστός καταλαμβάνει την πρόσθια επιφάνεια του θώρακα, από τη 2^η ως την 6^η πλευρά. Προς τα έξω εκτείνεται μέχρι την πρόσθια μασχαλιαία γραμμή, ενώ προς τα έσω μέχρι το πλάγιο χείλος του στήνους. Ανάμεσα στους δυο μαστούς σχηματίζεται ο μεσομάστιος κόλπος.

Χωρίζεται σε τέσσερα τεταρτημόρια: το άνω-έξω, το κάτω-έξω, το άνω-έσω και το κάτω-έσω. Το άνω-έξω τεταρτημόριο είναι παχύτερο από τα υπόλοιπα, διότι περιέχει μεγαλύτερη μάζα μαστικού αδένα, καθώς και μία προσεκβολή προς τη μασχάλη, που αναφέρεται και ως ουρά του Spence. Επίσης διακρίνεται στην πρόσθια και οπίσθια επιφάνεια και την περιφέρεια.

Η πρόσθια επιφάνεια του μαστού καλύπτεται από λεπτό και λείο δέρμα, στο μέσο περίπου του οποίου βρίσκονται η θηλή και η θηλέα άλω. Η θηλή αποτελεί έπαρμα του δέρματος και στην κορυφή της παρουσιάζει 15-20 στόμια στα οποία εκβάλλουν οι γαλακτοφόροι πόροι. Πριν από την εκβολή του στη θηλή, κάθε γαλακτοφόρος πόρος εμφανίζει μία διευρυμένη μοίρα, το γαλακτοφόρο κόλπο, όπου είναι δυνατή η συλλογή γάλακτος. Η διακλάδωση των μεγάλων πόρων οδηγεί στην τελική λοβιακή μονάδα του μαστικού αδένα. Η θηλέα άλω είναι μία υποστρόγγυλη και ελαφρά επηρμένη περιοχή γύρω από τη θηλή (σχήμα 1-1).



Σχήμα 1-1. Ο μαστός. (<http://www.smyrtilis-laparoscopic.gr>)

Η περιφέρεια του μαστού μεταβαίνει βαθμιαία στο γύρω δέρμα.

Από άποψη κατασκευής ο μαστός αποτελείται από το δέρμα, το περιμαστικό λίπος και το μαστικό αδένα. Ο μαστικός αδένας έχει σχήμα δισκοειδές και σε διατομή είναι λευκωπός, υπόσκληρος και ελαστικός. Βρίσκεται στον υποδόριο ιστό και αποτελείται από 15-20 σύνθετους σωληνοκυψελοειδείς αδένες, που περιβάλλονται από κοινό υπόστρωμα συνδετικού ιστού και διατάσσονται ακτινοειδώς γύρω από τη θηλή.

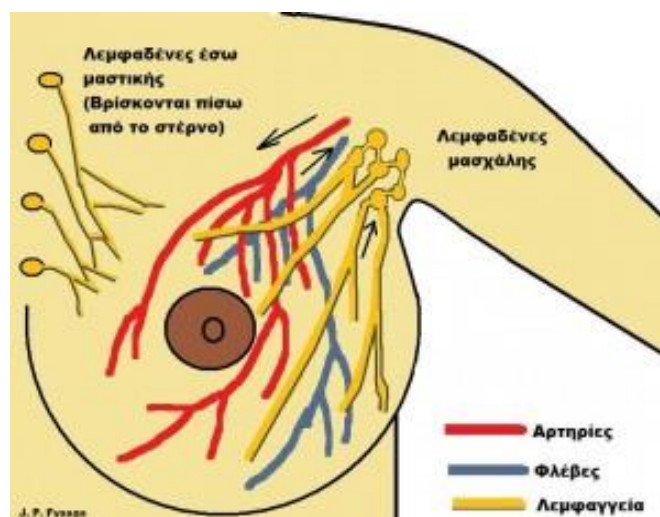
Το υπερκείμενο δέρμα του μαστού είναι κερατινοποιημένο πλακώδες επιθήλιο, το οποίο συνεχίζει μέσα στους πόρους και αλλάζει απότομα σε ένα διπλής στοιβάδας κυβοειδές επιθήλιο. Στο φυσιολογικό μαστό, οι αυλοί των πόρων και των λοβίων καλύπτονται από δυο τύπους κυττάρων. Ένα χαμηλό, επίπεδο ασυνεχές στρώμα κυττάρων, που έχουν την ικανότητα να συσπώνται και περιέχουν μυοϊνίδια (μυοεπιθηλιακά κύτταρα), επικάθεται πάνω στη βασική μεμβράνη. Ένα δεύτερο στρώμα επιθηλιακών κυττάρων επενδύει τον αυλό. Τα κύτταρα του αυλού του τελικού πόρου και των λοβίων παράγουν γάλα, ενώ αυτά που καλύπτουν το μεγαλύτερο σύστημα των πόρων δεν παράγουν. Τέλος, ένα αρχέγονο βλαστικό κύτταρο στον τελικό πόρο δίνει γέννηση σε μυοεπιθηλιακά και άλλα κύτταρα του αυλού.

Οι μύες που βρίσκονται στην περιοχή του μαστού είναι ο μείζων θωρακικός, ο ελάσσων θωρακικός, ο πρόσθιος οδοντωτός, ο πλατύς ραχιαίος, ο κορακοβραχιόνιος, ο υποπλάτιος και ο έξω λοξός κοιλιακός ^(1,2,3,4,7).

1.2 Αγγείωση, νεύρωση και λεμφικό σύστημα του μαστού

Οι αρτηρίες που αγγειώνουν το μαστό προέρχονται από την έσω μαστική, την πλάγια και άνω θωρακική, το θωρακικό κλάδο της ακρωμιοθωρακικής, τους διαπιτράινοντες κλάδους των μεσοπλεύριων αρτηριών και την υποπλάτιο αρτηρία (σχήμα 1-2).

Το φλεβικό δίκτυο του μαστού είναι πλούσιο και διακρίνεται σε επιπολής και εν τω βάθει. Οι επιπολής φλεβικοί κλάδοι εκβάλλουν στην έσω μαστική φλέβα και συνδέονται με το αλωαίο φλεβικό πλέγμα. Οι εν τω βάθει φλεβικοί κλάδοι ακολουθούν τρεις βασικές οδούς προς την έσω μαστική, τη μασχαλιαία και τις μεσοπλεύριες φλέβες (σχήμα 1-2).



Σχήμα 1-2. Αρτηρίες, φλέβες και λεμφαγγεία μαστού. (πηγή: <http://www.e-mastology.gr/>)

Το λεμφαγγειακό δίκτυο του μαστού είναι πλούσιο και αποχετεύει τη λέμφο προς δύο κατευθύνσεις, προς τους μασχαλιαίους και προς τους λεμφαδένες της έσω μαστικής αρτηρίας. Οι λεμφαδένες του μαστού διακρίνονται σε τρεις ομάδες, τους μασχαλιαίους, τους υπερκλειδίους και εκείνους της έσω μαστικής αρτηρίας. Η εξωτερική οδός προς τη μασχάλη απάγει το 75% της λέμφου από τη θηλή και το έξω τμήμα του μαστού, η δε εσωτερική οδός προς τα έσω μαστικά γάγγλια αποχετεύει κυρίως τη λέμφο από το εν τω βάθει και έσω τμήμα του μαστού. Μεταξύ των δύο αυτών κυρίων οδών υπάρχουν

πολλές αναστομώσεις, καθώς και με τις υπόλοιπες, μικρότερης σημασίας λεμφικές οδούς. Η λεμφική αποχέτευση έχει σημαντική κλινική σπουδαιότητα, λόγω της εξάπλωσης του καρκίνου του μαστού κατά μήκος των λεμφαγγείων προς τα λεμφογάγγλια (σχήμα 1-2) .

Η νεύρωση του μαστού γίνεται από το 4^ο-6^ο μεσοπλευρίο νεύρο, το μεσοπλευροβραχιόνιο νεύρο, το θωρακοραχιαίο, το μακρύ θωρακικό ή νεύρο του Bell και από το αυτόνομο νευρικό σύστημα ^(1, 2, 3).

1.3 Στοιχεία φυσιολογίας του μαστού

Ο μαστός αρχίζει να αναπτύσσεται κατά την ήβη. Η ανάπτυξη και λειτουργία του εξαρτάται αποκλειστικά από την επίδραση πολλαπλών ορμονικών παραγόντων για τους οποίους αποτελεί ένα από τους σπουδαιότερους αδένες-στόχους. Οι ενδοκρινικές επιδράσεις γίνονται δυνατές από την παρουσία ειδικών υποδοχέων, που βρίσκονται στη μεμβράνη και τον πυρήνα των κυττάρων, στο αδενικό επιθήλιο και στο διαμέσο και λιπώδη ιστό. Τέτοιοι υποδοχείς έχουν απομονωθεί για την προλακτίνη, τα οιστρογόνα, την προγεστερόνη, την αυξητική ορμόνη, τις θυρεοειδικές ορμόνες, την ινσουλίνη και τα γλυκοκορτικοειδή. Η ενδοκρινική δραστηριότητα χαρακτηρίζεται από καθορισμένες χρονικά μεταβολές, γι' αυτό η ανάπτυξη και λειτουργική κατάσταση του μαστού αποτελεί σε κάθε φάση της ζωής της γυναίκας έκφραση της δραστηριότητας του ενδοκρινικού της συστήματος.

Η προλακτίνη φαίνεται ότι ασκεί κυρίαρχη επίδραση στα επιθηλιακά στοιχεία του μαστού, αλλά αυτή εκδηλώνεται κυρίως σε συνέργεια με τα οιστρογόνα και την προγεστερόνη. Τα οιστρογόνα φαίνεται ότι αυξάνουν τον αριθμό υποδοχέων για την προλακτίνη στη μεμβράνη των εκκριτικών κυττάρων του επιθηλίου, των κυστιδίων και των γαλακτοφόρων πόρων. Με την συνδιασμένη δράση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης προκαλείται παραγωγή γάλακτος, ελέγχοντας τη σύνθεση των πρωτεϊνών του γάλακτος, της καζεΐνης και της α-λακταλβουμίνης. Μετά τη γέννηση του νεογνού, η αιφνίδια απώλεια της έκκρισης οιστρογόνων και προγεστερόνης από τον πλακούντα επιτρέπει την γαλακτογονική επίδραση της προλακτίνης, που προέρχεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης της μητέρας (ρυθμίζεται από τον παράγοντα που ονομάζεται ανασταλτική ορμόνη για την προλακτίνη). Η έκκριση του

γάλακτος προϋποθέτει την παρουσία ορμονών που είναι απαραίτητες για την προμήθεια αμινοξέων, γλυκόζης, λιπαρών οξέων και ασβεστίου.

Ο ρόλος των οιστρογόνων στην ανάπτυξη και λειτουργία του μαστού είναι πολύπλοκος και απαιτεί τη συνεργική δράση κυρίως της προλακτίνης και λιγότερο της αυξητικής ορμόνης. Με την παρουσία αυτών, τα οιστρογόνα ασκούν επίδραση στο αδενικό επιθήλιο προάγοντας την ανάπτυξη του εκφορητικού συστήματος με επιμήκυνση και πάχυνση των γαλακτοφόρων πόρων.

Η προγεστερόνη, σε συνέργεια κυρίως με τα οιστρογόνα κατά την ανάπτυξη των μαστών στην γαλουχία, επιδρά και προκαλεί την ανάπτυξη των λοβιδίων και των εκκριτικών χαρακτηριστικών των κυττάρων των κυψελών.

Η αυξητική ορμόνη και η ινσουλίνη είναι αναγκαίες κυρίως για την συνεργική τους δράση με την προλακτίνη. Ενώ η παρουσία γλυκοκορτικοειδών και θυρεοειδικών ορμονών φαίνεται απαραίτητη για τις περισσότερες φάσεις της ανάπτυξης και λειτουργίας του μαστού.

Η βιολογική δράση των ορμονών στον μαστό μεταβάλλεται με πολυάριθμους παράγοντες όπως η μεταβολή της ορμονοέκκρισης κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου, η σχετική προς άλλες ορμόνες αυξομείωση της συγκεντρώσεως μαστοτρόπων ορμονών καθώς και η ποικίλουσα δεκτικότητα του αδένα, όπως καθορίζεται από τις μεταβολές στη διαθεσιμότητα των υποδοχέων του στις διάφορες ορμόνες ^(4, 5).

1.4 Παθήσεις του μαστού

1.4.1 Διαταραχές ανάπτυξης

Οι διαταραχές ανάπτυξης του μαστού διακρίνονται τις συγγενείς και τις επίκτητες. Στις συγγενείς ανωμαλίες του μαστού κατατάσσονται η πολυθηλία, η πολυμαστία, ο υπεράριθμος μαστός, η υπερτροφία, η αμαστία, η αθηλία, το Σύνδρομο Poland, η εισολκή της θηλής και ο επικουρικός μαστικός αδένας. Στις επίκτητες ανωμαλίες μαστού ανήκουν η αμφοτερόπλευρη υποσταστία, η υπολειπόμενη ανάπτυξη, η πρώιμη θηλαρχή, η μακρομαστία–γιγαντομαστία, η ασυμμετρία μαστών, η οζώδης μαστοπάθεια και η σωληνώδης διαταραχή ^(1, 6, 7).

1.4.2 Φλεγμονές

Οι φλεγμονές που πλήττουν το μαστό είναι η οξεία μαστίτιδα, η περιπορική μαστίτιδα, η διάταση των εκφορητικών μαστικών πόρων, η λιπώδης νέκρωση, η λεμφοκυτταρική μαστοπάθεια και η κοκκιωματώδης μαστίτιδα ^(6, 7).

1.4.3 Καλοήθεις επιθηλιακές βλάβες

Πρόκειται για μια ποικιλία καλοήθων μεταβολών στους πόρους και τα λόβια του μαστού. Διακρίνονται σε τρεις ομάδες, σύμφωνα με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου τους μαστού:

- 1) Μη υπερπλαστικές – ινοκυστικές αλλοιώσεις
- 2) Υπερπλαστικές αλλοιώσεις χωρίς ατυπία
- 3) Υπερπλαστική νόσος με ατυπία ^(6, 7).

1.4.4 Όγκοι του μαστού

1.4.4.1 Νεοπλάσματα του στρώματος

Ο μαστός έχει δύο τύπους στρώματος, το ενδολοβιακό (intracanalicular) και το περιλοβιακό (pericanalicular). Το ενδολοβιακό επεξεργάζεται αυξητικούς παράγοντες για τα επιθηλιακά κύτταρα, με συνέπεια τον πολλαπλασιασμό του μη νεοπλασματικού επιθηλιακού στοιχείου του θηλώματος του ινοαδενώματος και του φυλλώδους όγκου. Το περιλοβιακό στρώμα είναι η απαρχή του ίδιου τύπου όγκων που βρίσκονται στο συνδετικό ιστό και σε άλλες περιοχές του σώματος, όπως είναι το ινοαδένωμα, ο φυλλώδης όγκος και τα σαρκώματα ^(6,7).

1.4.4.2 Άλλες στρωματικές βλάβες

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται παθήσεις όπως η ψεοδοαγγειωματοώδης στρωματική υπερπλασία, οι ινώδεις όγκοι, τα λιπώματα, τα αμαρτώματα και η ινωμάτωση ^(6,7).

1.5 Καρκίνος του μαστού

Ως καρκίνος μαστού ορίζεται η ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των κυττάρων του μαστού, που οδηγεί σε εμφάνιση κακοήθειας και μετάστασης. Πρόκειται για την δεύτερη πιο συχνά εμφανίσιμη μορφή καρκίνου, μετά τον καρκίνο του δέρματος και είναι η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες, μετά από τον καρκίνο του πνεύμονα. Η πιθανότητα ότι ο καρκίνος του μαστού

θα είναι υπεύθυνος για το θάνατο μιας γυναίκας είναι περίπου 1 στις 36 (περίπου 3%) (www.cancer.org).

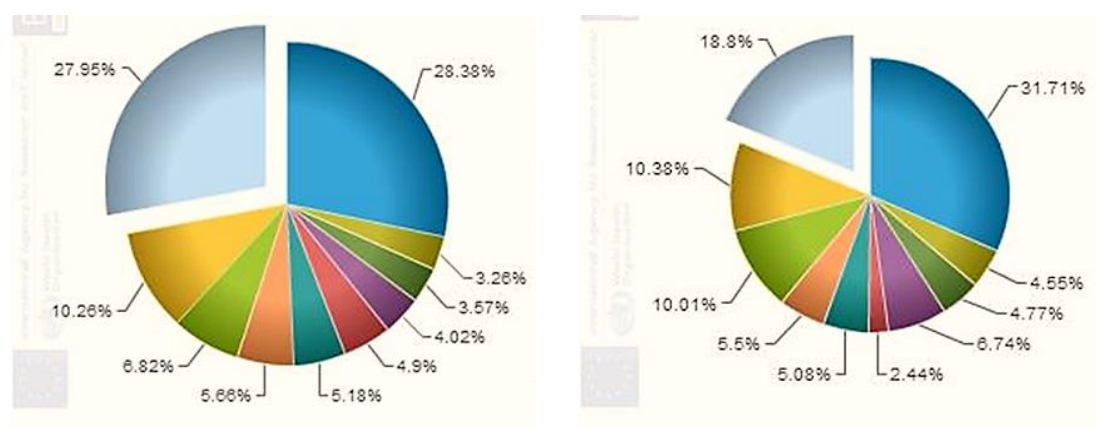
1.5.1 Επιδημιολογικά δεδομένα καρκίνου του μαστού

Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις της Αμερικάνικης Εταιρείας του Καρκίνου (American Cancer Society), όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, υπολογίζεται ότι 1 στις 8 Αμερικανίδες θα νοσήσει από διηθητικό καρκίνο του μαστού κάποια χρονική στιγμή στη ζωή της και πως για το 2015:

- περίπου 231.840 νέες περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου του μαστού θα διαγνωσθούν.
- περίπου 60.290 νέες περιπτώσεις με καρκίνωμα in situ θα διαγνωστούν.
- περίπου 40.290 γυναίκες θα πεθάνουν από καρκίνο του μαστού. (www.cancer.org)

Όσον αφορά τον Ευρωπαϊκό πληθυσμό, σύμφωνα με το Cancer Research UK, το 2012 από τις 464.000 νέες περιπτώσεις καρκίνου στις γυναίκες στο 29% διαγνώσθηκε διηθητικός καρκίνος μαστού. (www.cancerresearchuk.org)

Στην επίσημη ιστοσελίδα του Ευρωπαϊκού Γραφείου της Διεθνούς Υπηρεσίας για την Έρευνα του Καρκίνου του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, EUCAN) εμφανίζονται τα στοιχεία που αφορούν τη χώρα μας. Σύμφωνα με αυτά, για το 2012, το 27,95% των καρκινοπαθών γυναικών διαγνώστηκε με καρκίνο μαστού (σχήμα 1-3). Το ίδιο έτος, το 18,8% των καρκινοπαθών γυναικών είχαν τον καρκίνο του μαστού ως αιτία θανάτου (σχήμα 1-3).



Σχήμα 1-3. Επιδημιολογικά δεδομένα καρκίνου για την Ελλάδα. Αριστερά εμφανίζονται τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου και δεξιά τα ποσοστά θνησιμότητας ανά κατηγορία καρκίνου για τις γυναίκες το 2012. (<http://eco.iarc.fr/eucan/Country.aspx?ISOCountryCd=300>)

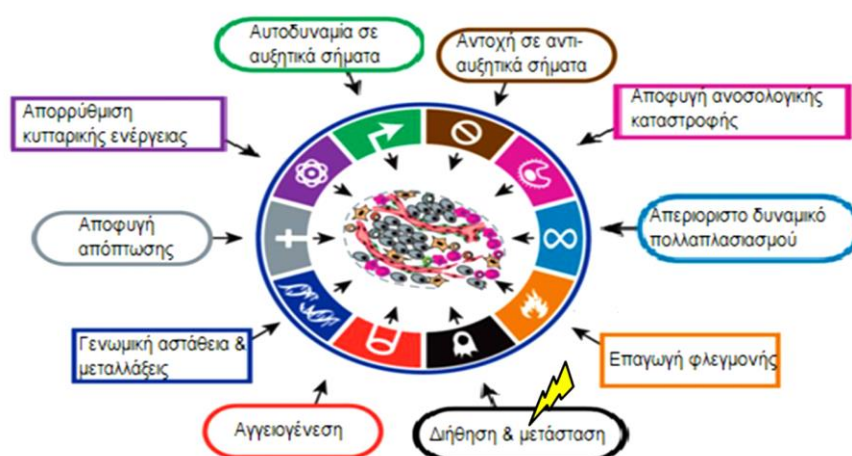
1.5.2 Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων

Η καρκινογένεση είναι μια πολύπλοκη και πολυσταδιακή διεργασία, μέσω της οποίας τα φυσιολογικά κύτταρα μεταπίπτουν σε καρκινικά δημιουργώντας περισσότερους από 100 διαφορετικούς τύπους και υποτύπους καρκίνου σε διάφορα όργανα. Το 2000 οι Hanahan και Weinberg πρότειναν ότι όλη αυτή η πολυπλοκότητα χαρακτηρίζεται από 6 διαφορετικά χαρακτηριστικά. ⁽⁸⁾

Με την χρήση της εξελισσόμενης τεχνολογίας στη μάχη κατανόησης των μηχανισμών που διέπουν την καρκινογένεση, ήρθαν στο φως επιπλέον χαρακτηριστικά και έτσι το 2011 οι Hanahan και Weinberg πρόσθεσαν άλλα 4.

Συνοπτικά τα 10 χαρακτηριστικά του καρκίνου, κατά Hanahan και Weinberg, είναι:

- 1) Αυτοδυναμία σε αυξητικά σήματα
- 2) Αντοχή ενάντια στα αντιαυξητικά σήματα
- 3) Αποφυγή της απόπτωσης
- 4) Απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού
- 5) Ικανότητα για αγγειογένεση
- 6) Ικανότητα για διήθηση γειτονικών ιστών και μετάσταση σε απομακρυσμένα όργανα-ιστούς
- 7) Απορρύθμιση της κυτταρικής ενέργειας
- 8) Αποφυγή της ανοσολογικής καταστροφής
- 9) Εμφάνιση γενωμικής αστάθειας και μεταλλάξεων
- 10) Επαγωγή της φλεγμονής. ⁽⁹⁾



Σχήμα 1-4: Τα δέκα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. ⁽⁹⁾

Οι γονιδιακές μεταβολές, που χαρακτηρίζουν την καρκινογένεση, επηρεάζουν την κυτταρική λειτουργία. Οι αλλαγές αυτές πραγματοποιούνται σε δύο είδη γονιδίων, τα πρωτο-ογκογονίδια, που επάγουν την καρκινογένεση και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, που καταστέλλουν την καρκινογένεση.

Τα πρωτο-ογκογονίδια ενεργοποιούνται και μετατρέπονται σε ογκογονίδια μέσω μηχανισμών γονιδιακής ενίσχυσης (πχ τα HER2 και EGFR), σημειακών μεταλλάξεων (πχ στα εξόνια 12 και 13 του *RAS*), χρωμοσωμικής μετάθεσης (μέσω ένθεσης ενός γονιδίου σε κάποια άλλη περιοχή με υψηλή μεταγραφική δραστηριότητα ή δημιουργώντας ένα νέο χιμαιρικό γονίδιο, πχ *BRC-ALB*) ή ύστερα από επιμόλυνση από DNA ή RNA ογκογόνο ιό. Επίσης, μπορούν να δράσουν συνεργιστικά με άλλες γενετικές ή επιγενετικές αλλαγές. Τα ογκογονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες λειτουργούν ως αυξητικοί παράγοντες, μεμβρανικοί υποδοχείς, πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος, μεταγραφικοί παράγοντες ή ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια πληρούν την «υπόθεση των δύο κτυπημάτων» του Knudson και χωρίζονται σε 2 κατηγορίες:

- τα gatekeepers, όπου ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και
- τα caretakers, όπου συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA και φροντίζουν για την ακεραιότητα του γονιδιώματος. Η απώλειά τους μπορεί να οδηγήσει σε μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability, MIN).

Χάνουν τη λειτουργικότητά τους με κάποιον από τους ακόλουθους μηχανισμούς: μέσω απώλειας ολόκληρου του χρωμοσώματος λόγω μιτωτικού μη-διαχωρισμού ή μιτωτικού ανασυνδυασμού μέσω διασκελισμού, απαλοιφής τμήματος χρωμοσώματος, σημειακής μετάλλαξης και απενεργοποίησης μέσω επιγενετικού μηχανισμού. ^(10,11,12)

1.5.3 Παράγοντες κινδύνου

Οι παράγοντες κινδύνου που συνηγορούν στην εμφάνιση ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και αναφέρονται ακολούθως, είναι μόνο η μια πλευρά του νομίσματος. Εάν κάποια γυναίκα πληροί πολλούς από αυτούς δεν συνεπάγεται απαραίτητα ότι θα νοσήσει. Αλλά ακόμα και όταν μια γυναίκα νοσήσει, είναι πολύ δύσκολο να γνωρίζουμε το εάν και κατά πόσο

συνεισέφερε κάποιος/κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες στην εκδήλωση της νόσου.

- Ηλικία: όσο αυξάνεται η ηλικία της γυναίκας, τόσο περισσότερες πιθανότητες έχει να νοσήσει.
- Έμμηνος ρύση: γυναίκες με πρώιμη εμμηναρχή ή καθυστερημένη εμμηνόπαυση έχουν αυξημένες πιθανότητες να νοσήσουν.
- Φύλο: οι γυναίκες έχουν περισσότερες πιθανότητες να νοσήσουν εν σχέση με τους άντρες.
- Πρώτη τελειόμηνη κύηση: οι γυναίκες με πρώτη τελειόμηνη κύηση πριν τα 20 έτη έχουν τον μισό κίνδυνο εν σχέση με τις άτοκες ή εκείνες που είχαν την πρώτη τελειόμηνη κύηση μετά τα 35.
- Οικογενειακό ιστορικό: όσο αυξάνεται ο αριθμός των προσβεβλημένων συγγενών πρώτου βαθμού τόσο αυξάνονται και οι πιθανότητες να νοσήσει μια γυναίκα (σχεδόν διπλασιάζονται εάν νοσεί ένας και τριπλασιάζονται εάν νοσούν δυο). Οφείλονται στην κληρονόμηση ισχυρά διεισδυτικών γονιδίων, όπως *BRCA1/2*, *PALB2* κλπ.
- Προσωπικό ιστορικό υγείας: εάν μια γυναίκα έχει νοσήσει στο παρελθόν από καρκίνο ή άλλες παθήσεις του μαστού, έχει αυξημένες πιθανότητες να νοσήσει ξανά.
- Φυλή/εθνικότητα: η συνολική επίπτωση του καρκίνου είναι 1:15 για τις Καυκάσιες, 1:20 για τις Αφροαμερικανές, 1:26 για τις Ασιάτισσες/κατοίκους των νησιών του Ειρηνικού και 1:27 για τις Ισπανικής καταγωγής.
- Έκθεση σε οιστρογόνα: οι θεραπείες ορμονικής υποκατάστασης με τη χρήση οιστρογόνων ή/και προγεστερόνης φαίνεται πως αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης, αλλά όχι θανάτου.
- Έκθεση σε ακτινοβολία: κυρίως αφορά την έκθεση σε ραδιενεργές ουσίες, ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και υπεριώδη ακτινοβολία, όπου δημιουργούνται βλάβες σε επίπεδο DNA.
- Διατροφή: έχουν γίνει πολλές μελέτες που ενοχοποιούν ή απενεχοποιούν διάφορα διατροφικά συστατικά για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού.
- Κατανάλωση αλκοόλ: όσο αυξάνεται η ημερήσια κατανάλωση αλκοόλ τόσο αυξάνονται και ο κίνδυνος εκδήλωσης της νόσου, λόγω των ελεύθερων

ριζών που απελευθερώνονται από τον μεταβολισμό της αιθανόλης και την επαγωγή του κυτοχρώματος P-4502.

- Παχυσαρκία: υπάρχει μειωμένος κίνδυνος για παχύσαρκες γυναίκες κάτω των 40 ετών, λόγω ασταθούς εμμήνου ρύσεως και απουσίας ορμονών, ενώ αυξάνει σε μετεμμηνοπαυσιακές παχύσαρκες γυναίκες λόγω σύνθεσης οιστρογόνων στις λιποαποθήκες.
- Μητρικός θηλασμός: όσο περισσότερο θηλάζει μια γυναίκα τόσο μειώνεται ο κίνδυνος.
- Περιβαλλοντικές τοξίνες: πολλές από αυτές έχουν οιστρογονικές επιδράσεις, παρόλα αυτά ακόμα ερευνάται η συμβολή τους.
- Κάπνισμα: η συμβολή του καπνίσματος στην αύξηση του κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου έχει μελετηθεί εκτενώς και συσχετιστεί θετικά με αυτόν.
(7,13,14,15,16,17)

1.6 Ταξινόμηση καρκίνου του μαστού

1.6.1 Ιστοπαθολογοανατομική ταξινόμηση

Η κατανομή των καρκινωμάτων είναι η ακόλουθη:

- περίπου το 50% εμφανίζεται στο άνω-έξω τεταρτημόριο
- το 10% σε καθένα από τα υπόλοιπα τεταρτημόρια
- το 20% στην κεντρική ή υποθηλαία περιοχή

Η τρέχουσα ταξινόμηση των κύριων τύπων είναι η ακόλουθη:

- In situ (μη διηθητικό) στο 15%-30%
- Διηθητικό στο 70%-85%.

1.6.1.1 In situ (μη διηθητικό) καρκίνωμα

Αναφέρεται σε ένα νεοπλασματικό πληθυσμό κυττάρων που περιορίζεται στα όρια των πόρων και στα λόβια της βασικής μεμβράνης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα κύτταρα μπορεί να επεκταθούν στο υπερκείμενο δέρμα εντός των γαλακτοφόρων πόρων, χωρίς να διαπεράσουν την βασική μεμβράνη και εμφανίζονται κλινικά ως νόσος Paget. Αυτός ο τύπος καρκινώματος δεν εισβάλλει στα λεμφαγγεία και τα αιμοφόρα αγγεία και δεν μπορεί να δώσει μεταστάσεις. Διαχωρίζεται σε δυο κατηγορίες:

- Πορογενές καρκίνωμα in situ (DCIS, Ductal Carcinoma In Situ)

- Λοβιακό καρκίνωμα in situ (LCIS, Lobular Carcinoma In Situ).

1.6.1.2 Διηθητικό ή Διεισδυτικό Καρκίνωμα

Ο νεοπλασματικός πληθυσμός κυττάρων έχει εισχωρήσει μέσα από τη βασική μεμβράνη στο στρώμα. Τα κύτταρα εισβάλλουν στα αγγεία, φθάνουν στους επιχώριους λεμφαδένες και σε απομακρυσμένες περιοχές, προκαλώντας μεταστάσεις. Το Διηθητικό Καρκίνωμα διαχωρίζεται στις ακόλουθες υποκατηγορίες:

- Διηθητικό Καρκίνωμα Μη Ειδικού Τύπου (NST, Non Specific Type) /Πορογενές διηθητικό (IDC, Invasive Ductal Carcinoma).
- Διηθητικό Λοβιακό Καρκίνωμα (ILC, Invasive Lobular Carcinoma).
- Μυελοειδές Καρκίνωμα (Medullary Carcinoma).
- Κολλοειδές ή Βλεννώδες Καρκίνωμα (Mucinous Carcinoma).
- Σωληνώδες Καρκίνωμα (Tubular Carcinoma).^(6,7, www.cancer.org, www.breastcancer.org)

1.6.2 Βαθμός διαφοροποίησης

Η ιστολογική βαθμολόγηση του ιστού μιας ασθενούς με καρκίνου του μαστού πραγματοποιείται κατά την βιοψία από τον παθολογοανατόμο σε σχέση με έναν φυσιολογικό ιστό μαστού. Ο βαθμός διαφοροποίησης (grade) μπορεί να βοηθήσει στην πρόγνωση της νόσου και στη λήψη απόφασης σχετικά με το θεραπευτικό σχήμα μετά το χειρουργείο. Σε γενικές γραμμές, ένας χαμηλού βαθμού όγκος έχει βραδεία ανάπτυξη και λίγες πιθανότητες εξάπλωσης σε σχέση με έναν υψηλού βαθμού. Στον ακόλουθο πίνακα 1-1 εμφανίζεται η ερμηνεία των βαθμών διαφοροποίησης.

Πίνακας 1-1. Ιστολογική ταξινόμηση καρκίνου του μαστού σε σχέση με το βαθμό διαφοροποίησης.

Βαθμός	Ερμηνεία
1 ή χαμηλού βαθμού	Καλά διαφοροποιημένα. Τα κύτταρα της βιοψίας είναι ελαφρώς διαφορετικά από τα φυσιολογικά και συνήθως αναπτύσσονται αργά.
2 ή μέτριου βαθμού	Μετρίως διαφοροποιημένα. Τα κύτταρα της βιοψίας δεν μοιάζουν με τα φυσιολογικά και τείνουν να αναπτύσσονται πιο γρήγορα από αυτά.
3 ή υψηλού βαθμού	Ασθενώς διαφοροποιημένο. Τα κύτταρα της βιοψίας είναι εντελώς διαφορετικά από τα φυσιολογικά και τείνουν να αναπτύσσονται και να εξαπλώνονται ταχέως (μεγάλος αριθμός μιτώσεων).

Τα DCIS καρκινώματα βαθμολογούνται επίσης και ο βαθμός διαφοροποίησης σχετίζεται με το πόσο ανώμαλα εμφανίζονται τα καρκινικά κύτταρα (πυρηνικός βαθμός, nuclear grade). Η παρουσία νέκρωσης (περιοχές νεκρών ή σε απόπτωση καρκινικών κυττάρων) επίσης σημειώνεται. Ο όρος comedo carcinoma χρησιμοποιείται συχνά για να περιγράψει DCIS με εξέχουσα νέκρωση. Εάν ένας αυλός μαστού γεμίζει με νεκρά ή αποπτωτικά κύτταρα, ο όρος comedo necrosis μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Οι όροι comedo carcinoma και comedo necrosis συνδέονται με υψηλότερο βαθμό διαφοροποίησης του DCIS. (www.cancer.org, www.breastcancer.org)

1.6.3 Το σύστημα σταδιοποίησης TNM

Οι American Joint Committee on Cancer (AJCC) και Union for International Cancer Control (UICC) θέσπισαν ένα σύστημα σταδιοποίησης, το αποκαλούμενο TNM σύστημα. Το σύστημα αυτό ονομάστηκε από τα αρχικά των λέξεων Tumor (όγκος), Lymph Nodes (λεμφαδένες) και Metastasis (μετάσταση), καθώς βασίζεται στο μέγεθος του όγκου, την έκταση της εξάπλωσης στους λεμφαδένες και την παρουσία μετάστασης.

Το γράμμα T ακολουθείται από τους αριθμούς από το 0 έως το 4, για την περιγραφή του μεγέθους και της εξάπλωσης του όγκου στο δέρμα ή στο θωρακικό τοίχωμα κάτω από το στήθος.

Το γράμμα N ακολουθείται από τους αριθμούς από το 0 έως το 3, οι οποίοι υποδεικνύουν τον αριθμό των προσβεβλημένων λεμφαδένων.

Το γράμμα M ακολουθείται από το 0 ή το 1, οι οποίοι δείχνουν την εξάπλωση σε παρακείμενα ή απομακρυσμένα όργανα.

Στον πίνακα 1-2 παρατίθεται συνοπτικά το TNM σύστημα σταδιοποίησης

Πίνακας 1-2. TNM σύστημα σταδιοποίησης (όπου «mol+» αναφέρεται σε μοριακή ανίχνευση του καρκίνου, «mi» αναφέρεται σε μικρομεταστάσεις).

T (πρωτοπαθής όγκος)	Tx (δεν εκτιμάται) T0 (καμμία ένδειξη) Tis (DCIS, LCIS, Paget) T1a-T1b-T1c (<2cm) T2 (>2cm και < 5cm) T3 (>5cm) T4a-T4b-T4c-T4d
-----------------------------	--

N (κατάσταση λεμφαδένων)	Nx (δεν εκτιμάται) N0 (δεν έχει εξαπλωθεί σε γειτονικούς λεμφαδένες) N0(i+) – N0(mol+) (ανίχνευση με μοριακές μεθόδους ή ανοσοϊστοχημεία) N1mi- N1a- N1b- N1c (σε 1-3 λεμφαδένες) N2a-N2b (σε 4-9 λεμφαδένες) N3a-N3b-N3c (σε πολλούς γειτονικούς)
M (μετάσταση)	Mx (δεν εκτιμάται) M0 (δεν παρατηρείται σε απεικονιστικές εξετάσεις) cM0(i+) (στο μυελό των οστών ή το αίμα, <0,2 mm) M1 (σε οστά, πνεύμονες, εγκέφαλο, ήπαρ)

Μετά την TNM ταξινόμηση ακολουθεί η σταδιοποίηση. Κάθε στάδιο χαρακτηρίζεται με λατινικούς αριθμούς (από το I έως και το IV) και γράμματα (από το A έως και το C). Επίσης συμπεριλαμβάνεται και το 0 που υποδηλώνει μη διηθητικό καρκίνο. Ο πίνακας 1-3 περιέχει όλα τα στάδια και την ερμηνεία τους. (www.cancer.org, www.breastcancer.org, www.cancerstaging.com)

Πίνακας 1-3. Κατάταξη σε στάδια μετά την TNM σταδιοποίηση.

Στάδιο 0	Tis, N0, M0 (DCIS)
Στάδιο IA	T1, N0, M0 (≤2cm, δεν έχει εξαπλωθεί σε λεμφαδένες, δεν έχει μεταστάσεις σε απομακρυσμένες περιοχές)
Στάδιο IB	T0 ή T1, N1mi, M0 (≤2cm, μικρομεταστάσεις σε 1 έως 3 μασχαλιαίους λεμφαδένες, δεν έχει μεταστάσεις σε απομακρυσμένες περιοχές)
Στάδιο IIA	T0 ή T1, N1 (αλλά όχι N1mi), M0 (≤2cm, μικρομεταστάσεις σε 1 έως 3 λεμφαδένες, δεν έχει μεταστάσεις σε απομακρυσμένες περιοχές) ή T2, N0, M0 (≥2cm και ≤5cm, δεν έχει εξαπλωθεί σε λεμφαδένες, δεν έχει μεταστάσεις σε απομακρυσμένες περιοχές)
Στάδιο IIB	T2, N1, M0 (≥2cm και ≤5cm, έχει εξαπλωθεί σε 1-3 μασχαλιαίους λεμφαδένες, δεν έχει μεταστάσεις σε απομακρυσμένες περιοχές) ή T3, N0, M0 (>5cm, δεν έχει εξαπλωθεί σε λεμφαδένες, δεν έχει μεταστάσεις σε απομακρυσμένες περιοχές)
Στάδιο IIIA	T0-T2, N2, M0 (<5cm, έχει εξαπλωθεί σε 4-9 λεμφαδένες, δεν έχει μεταστάσεις σε απομακρυσμένες περιοχές) ή T3, N1 ή N2, M0 (>5cm, έχει εξαπλωθεί σε 4-9 λεμφαδένες, δεν έχει μεταστάσεις

	σε απομακρυσμένες περιοχές)
Στάδιο IIIB	T4, N0-N2, M0 (έχει εξαπλωθεί στο θωρακικό τοίχωμα, με ή χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις, δεν έχει μεταστάσεις σε απομακρυσμένες περιοχές)
Στάδιο IIIC	κάθε T, N3, M0 (οποιοδήποτε μεγέθους, έχει εξαπλωθεί σε λεμφαδένες, δεν έχει μεταστάσεις σε απομακρυσμένες περιοχές)
Στάδιο IV	κάθε T, κάθε N, M1 (οποιοδήποτε μεγέθους, με ή χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις, με μεταστάσεις σε άλλα όργανα)

1.6.4 Μοριακή ταξινόμηση με βάση αναλύσεις ρουτίνας υποδοχέων

Τα φυσιολογικά κύτταρα του μαστού φέρουν στη μεμβράνη τους ορμονικούς υποδοχείς οιστρογόνων (estrogen receptors, ERs) και προγεστερόνης (progesterone receptors, PRs) καθώς και τον υποδοχέα της ανθρώπινης επιδερμικής πρωτεΐνης 2 (Human epidermal receptor protein-2, HER2), οι οποίοι λαμβάνουν σήματα ανάπτυξης μέσω της πρόσδεσης των συνδέτων τους. Τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να μην φέρουν κανένα από τους ανωτέρω υποδοχείς (triple negative breast cancer) ή να φέρουν κάποιο τύπο ή και τους τρεις.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η απουσία ή η παρουσία αυτών των ανωτέρω μορίων, συνήθως πραγματοποιείται στη βιοψία ανοσοϊστοχημεία (immunohistochemistry, IHC).

Για το HER2, από την IHC λαμβάνεται απάντηση για τον εάν υπάρχουν υποδοχείς στη μεμβράνη και τα αποτελέσματα δίνονται ως 0 (αρνητικό), 1+ (αρνητικό), 2+ (μεταίχμιο/borderline) και 3+ (υπερέκφραση). Όταν η απάντηση είναι 2+, τότε ζητείται η εκτέλεση in situ υβριδισμού (είτε με χρήση φθορίζουσών ουσιών/FISH είτε με χρωστικές/CISH) και λαμβάνεται απάντηση για τον αριθμό των αντιγράφων των γονιδίων ως θετικό (επιπλέον αντίγραφα/υπερέκφραση) ή αρνητικό (φυσιολογικός αριθμός αντιγράφων).

Η γνώση της ύπαρξης και του αριθμού των ανωτέρω υποδοχέων είναι ιδιαίτερας σημαντικής, καθώς οι υποδοχείς αυτοί είναι ισχυροί προγνωστικοί δείκτες όσον αφορά την ανταπόκριση στη θεραπεία με φάρμακα που έχουν αναπτυχθεί.

Επομένως, μια ασθενής μπορεί να χαρακτηριστεί ως θετική ή αρνητική για κάθε έναν από αυτούς. Οι περιπτώσεις που μπορεί να προκύψουν είναι οι ακόλουθες:

- Θετικοί ορμονικοί υποδοχείς: η ασθενής είναι ER+ ή/και PR+. Η ασθενής ανταποκρίνεται σε θεραπεία με ταμοξιφαίνη ή αναστολείς αρωματάσης.
- Αρνητικοί ορμονικοί υποδοχείς: η ασθενής είναι ER- και PR-.
- Θετικοί HER2: πρακτικά σημαίνει ότι παράγεται πολύ πρωτεΐνη ή υπάρχουν επιπλέον αντίγραφα του γονιδίου. Οι ασθενείς μπορούν να υποβληθούν σε θεραπεία με φάρμακα που στοχεύουν το HER2, όπως το Trastuzumab (Herceptin), το Pertuzumab (Perjeta), το Ado-trastuzumab emtansine (Kadcyl) και το Lapatinib (Tykerb).
- Αρνητικοί HER2: ο όγκος δεν έχει περίσσεια HER2 και η ασθενής δεν θα ανταποκριθεί στην ανωτέρω στοχευμένη θεραπεία.
- Τριπλά θετικό: η ασθενής είναι PR+, ER+ και HER2+.
- Τριπλά αρνητικό: η ασθενής είναι PR-, ER- και HER2-. Αυτοί οι όγκοι τείνουν να εμφανίζονται πιο συχνά στις νεότερες γυναίκες και σε γυναίκες που είναι Αφρο-Αμερικανής ή Ισπανικής καταγωγής.
(www.cancer.org, www.breastcancer.org)

1.6.5 Κυριότεροι βιοδείκτες του καρκίνου του μαστού

Οι προγνωστικοί και οι προβλεπτικοί δείκτες έχουν ιδιαίτερη σημασία στην λήψη απόφασης για το θεραπευτικό σχήμα που θα εφαρμοστεί στην ασθενή, αλλά έχουν διακριτούς ρόλους. Οι προγνωστικοί δείκτες σχετίζονται με την έκβαση των ασθενών ανεξάρτητα από την θεραπεία που λαμβάνουν, ενώ οι προβλεπτικοί μαρτυρούν την ανταπόκριση στη θεραπεία και σχετίζονται με την ευαισθησία ή την αντίσταση του όγκου στη θεραπεία. Οι προβλεπτικοί δείκτες μπορεί να αποτελέσουν και το θεραπευτικό στόχο.⁽¹⁸⁾

Ως προγνωστικοί και σε ορισμένες περιπτώσεις προβλεπτικοί δείκτες θεωρούνται η παρουσία ER και PR, ο υποδοχέας EGF-R καθώς και η έκφραση του HER2, η κυτταροκερατίνη CK-19, η καθεψίνη D και η μαστοσφαιρίνη A (mammaglobin-1) στον καρκινικό ιστό. Τα αντιγόνα CA 15-3, CA 27.29, CA 549, MCA και CEA στον ορό χρησιμοποιούνται στην

παρακολούθηση ασθενών με μεταστατική νόσο και ενεργό θεραπεία, σε συνδυασμό πάντα με τη κλινική εξέταση και τις απεικονιστικές μεθόδους. ^(18,19)

Βιβλιογραφικά αναφέρονται και άλλοι δείκτες που χρησιμοποιούνται ερευνητικά και είναι το Ki67 (πυρηνική πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό), οι κυκλίνες E και D1, το πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιασμού (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA), η καβεολίνη, ο υποδοχέας CXCR4, η σουρβινίνη (survinin), οι χημειοκίνες CCL2 και CCL5, η πρωτεΐνη FOXP3, ογκογονίδια (πχ C- myc, N- myc), ογκοκατασταλτικά γονίδια, μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, το bcl-2, πρωτεάσες που σχετίζονται με την δυσέσδυση, αγγειογενετικοί δείκτες. ⁽¹⁸⁻²²⁾

Τα microRNAs στον ιστό ή το περιφερικό αίμα φαίνεται ότι έχουν δυνητικό σημαντικό ρόλο στη διάγνωση, την πρόγνωση και την ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού και έχουν συνδεθεί με όλα τα στάδια της εξέλιξης της νόσου. ^(23,24)

Στο περιφερικό αίμα (ή «υγρή βιοψία») δείκτες βλαστικών κυττάρων, δείκτες που σχετίζονται με την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση των καρκινικών κυττάρων (Epithelial to Mesenchymal Transition/EMT markers), δείκτες που σχετίζονται με τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Circulating Tumor Cells, CTCs) και ελεύθερα κυκλοφορούν DNA (cell free DNA, cfDNA) βρίσκονται υπό έρευνα γύρω από τον καρκίνο του μαστού. ^(24,25,26)

Η επιστημονική κοινότητα καταβάλλει προσπάθειες ανεύρεσης πολλών νέων βιοδεικτών οι οποίοι θα βοηθήσουν στην πρόληψη, την πρόωπη και έγκαιρη διάγνωση, αλλά και θα αποτελέσουν θεραπευτικούς στόχους ώστε να μειωθεί η θνησιμότητα των γυναικών από καρκίνο του μαστού.

1.6.6 Μοριακές δοκιμές και νέα μοριακή ταξινόμηση

Με την ραγδαία εξέλιξη της τεχνολογίας έχουν αναπτυχθεί μοριακά tests, τα οποία έχουν ως στόχο τη διάγνωση και την πρόγνωση. Τα εξαγόμενα από τους προσδιορισμούς αυτούς αποτελέσματα (συνήθως χρησιμοποιούνται μαθηματικοί αλγόριθμοι για τον υπολογισμό του τελικού αριθμητικού αποτελέσματος), έχουν βοηθήσει στην λήψη αποφάσεων σχετικά με το είδος και το χρόνο εφαρμογής της θεραπευτικής αγωγής των ασθενών, προσφέροντας καλύτερη ποιότητα ζωής και εξατομικευμένη, ή τουλάχιστον

προσαρμοσμένη, θεραπευτική αγωγή στις ασθενείς. Σημειώνεται ότι δεν έχουν όλα τα tests έγκριση από το FDA. (29, www.labtestsonline.gr)

- MammaPrint (Agendia, Huntington Beach, CA): αναπτύχθηκε ως ένα in vitro διαγνωστικό εργαλείο για την πρόβλεψη του κινδύνου μετάστασης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού και ήταν το πρώτο που εγκρίθηκε από το FDA το Φεβρουάριο του 2007. Τα 70 γονίδια που ελέγχει το MammaPrint με μικροσυστοιχίες είναι προγνωστικά της ανάπτυξης μετάστασης. Για την ανάλυση χρησιμοποιούνται νωποί ή προσφάτως κατεψυγμένοι καρκινικοί ιστοί ή ιστοί που προέρχονται από τη βιοψία ή την χειρουργική αφαίρεση. (28,29,www.agendia.com)

- Oncotype DX (Genomic Health Inc, Redwood City, CA): πρόκειται για μια πολυγονιδιακή ανάλυση (21 γονίδια, χρήση RT-PCR, σε ιστούς εγκλεισμένους σε παραφίνη), που έχει σχεδιαστεί για να υποστηρίζει την επιλογή εξατομικευμένης θεραπείας σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Η ανάλυση αυτή παρέχει έναν ποσοτικοποιημένο υπολογισμό της πιθανότητας του οφέλους από τη χημειοθεραπεία και της εμφάνισης απόμακρων υποτροπών (Recurrence Score, RS). Ακόμα, παρέχει μια εξατομικευμένη πρόβλεψη του κινδύνου 10-ετους υποτροπής στις ασθενείς, προκειμένου να βοηθήσει στη λήψη αποφάσεων σχετικά με τη θεραπεία σε γυναίκες με DCIS. Στο σημείο αυτό, πρέπει να προστεθεί το γεγονός ότι είναι διαθέσιμη η εξέταση του Oncotype DX στην Ελλάδα από το 2007 και καλύπτεται από τον ΕΟΠΥΥ κατά 80%. (22,30,www.oncotypedx.com)

- Prosigna Assay (NanoString Technologies Inc, Seattle, Washington, USA): είναι μια in vitro διαγνωστική δοκιμασία, η οποία χρησιμοποιεί το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων (εκχυλίζεται RNA από FFPEs, ελέγχονται 58 γονίδια), που βρίσκονται στον ιστό του καρκίνου του μαστού συνδυαστικά με κλινικές παραμέτρους, για την αξιολόγηση του κινδύνου της ασθενούς. Η ανάπτυξη της μεθόδου βασίστηκε στη δοκιμή PAM50. Χρησιμοποιείται ως προγνωστικός δείκτης επιβίωσης και, με βάση την ανάλυση αυτή, μπορεί να εκτιμηθεί η έκβαση της νόσου χωρίς υποτροπή για 10 έτη. Για κάθε ασθενή, υπολογίζεται το ROR score (Risk Of Recurrence score) και αναφέρεται ως κίνδυνος της υποτροπής. Έλαβε έγκριση από το FDA τον Σεπτέμβριο 2013. (31,www.nanostring.com)

- Genomic Grade Index (GGI, πλέον MapQuant Dx™, Qiagen πρώην Ipsogen Inc): χρησιμοποιεί 97 γονίδια προκειμένου να αξιολογηθούν καλύτερα οι προγνωστικές πληροφορίες των γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό έναντι της κλασσικής ιστολογικής ταξινόμησης. Τα γονίδια αυτά έχουν διαφορική έκφραση μεταξύ των ιστολογικών βαθμών I και III. Η δοκιμασία είναι χρήσιμη στον διαχωρισμό των grade II ασθενών για την υποβολή τους σε χημειοθεραπεία ή όχι. Αρχικά μελετήθηκαν με microarrays, πλέον όμως χρησιμοποιείται η qRT-PCR. (32-35)

- Mammostrat (Applied Genomics, Inc): είναι ένα προγνωστικό test στο οποίο μετρώνται τα επίπεδα έκφρασης 5 γονιδίων με IHC σε ασθενείς με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς σε πρώιμο καρκίνο του μαστού για την εκτίμηση του δείκτη επικινδυνότητας. (34, 36, www.breastcancer.org, <https://cancergenetics.wordpress.com>)

- EndoPredict (Sividon Diagnostics, Myriad Genetics): είναι ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται για να προβλέψει τον κίνδυνο μεταστάσεων σε ασθενείς ER+ και HER2- που λαμβάνουν αγωγή με ορμονοθεραπεία μόνο. Η μέθοδος βασίζεται στην ανάλυση των γονιδίων όγκου σε συνδυασμό με κλασικούς προγνωστικούς παράγοντες της κατάστασης των λεμφαδένων και του μεγέθους του όγκου. Ανιχνεύεται με αυτό τον τρόπο η πιθανότητα μετάστασης. (27,37, www.endopredict.com)

- Theros-Breast Cancer Gene Expression Ratio Assay (Biotheranostics): βασίζεται στη μελέτη 3 γονιδίων με qRT-PCR και αφορά ER+ ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με ταμοξιφαίνη. (27, 34, <https://www.ucare.org>)

- Rotterdam Signature 76-Gene Panel: με χρήση microarrays μπορεί να προβλέψει την πιθανότητα ότι μια ασθενής με καρκίνο του μαστού σε πρώιμο στάδιο να αναπτύξει μετάσταση. Η δοκιμασία αντιπροσωπεύει ένα προγνωστικό μοριακό δείκτη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες. Δεν είναι εμπορικά διαθέσιμη. (34, <https://www.ucare.org>)

Χρησιμοποιώντας κατάλληλους όρους αναζήτησης στη βιβλιογραφία και το διαδίκτυο, θα βρει κανείς πολλά ακόμα tests που βρίσκονται υπό ανάπτυξη, δοκιμή ή αναμένονται τα πρώτα αποτελέσματα από εργασίες επικύρωσής τους, τα οποία δεν αναφέρονται στην παρούσα εργασία. Για περισσότερες

πληροφορίες, υπάρχουν στην βιβλιογραφία της εργασίας διάφορες αναφορές σχετικά με αυτά, όπως πχ η G. Arpino et al.⁽³⁴⁾

Αναμένεται ότι η χρήση NGS (Next Generation Sequencing) στην ανάλυση RNA (RNA sequencing) στον ιστό των ασθενών θα οδηγήσει σε νέες πληροφορίες αναφορικά με την πρόγνωση και τη θεραπεία των ασθενών.⁽²²⁾

Όπως αναφέραμε, η έρευνα σχετικά με την γονιδιακή έκφραση έχει προχωρήσει και προτείνει νέες μορφές ταξινόμησης, οι οποίες δεν σχετίζονται με μικροσκοπικές παρατηρήσεις αλλά πλέον σε γονιδιακή ανάλυση. Οι ομάδες αυτές είναι:

- Αυλοκυτταρικού τύπου A (Luminal type A): είναι ER+, PR±, HER2- και low Ki67
- Αυλοκυτταρικού τύπου B (Luminal type B): είναι ER+, PR±, HER2± και high Ki67.
- Τύπου HER2 (HER2 enriched type): έχουν επιπλέον αντίγραφα του HER2 γονιδίου.
- Claudin-low: χαρακτηρίζεται από χαμηλή έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη δημιουργία στενοσυνδέσεων και προσκόλλησης κυττάρου-κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των claudin 3, 4, και 7, occludin και E-καδερίνης, καθώς και από υψηλή έκφραση γονιδίων, όπως των μεσεγχυματικών γονιδίων Vimentin, Snail1, Snail 2 και Twist1.
- Normal-like: το μοτίβο της γονιδιακής έκφρασης χαρακτηρίζεται από την υψηλή έκφραση γονιδίων των βασικών χαρακτηριστικών των επιθηλιακών κυττάρων και των αδιποκυττάρων και τη χαμηλή έκφραση γονιδίων χαρακτηριστικών των επιθηλιακών κυττάρων του αυλού.
- Βασικού τύπου (basal type): οι πλειοψηφία των όγκων αυτού του τύπου είναι τριπλά αρνητικοί.^(38,39)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

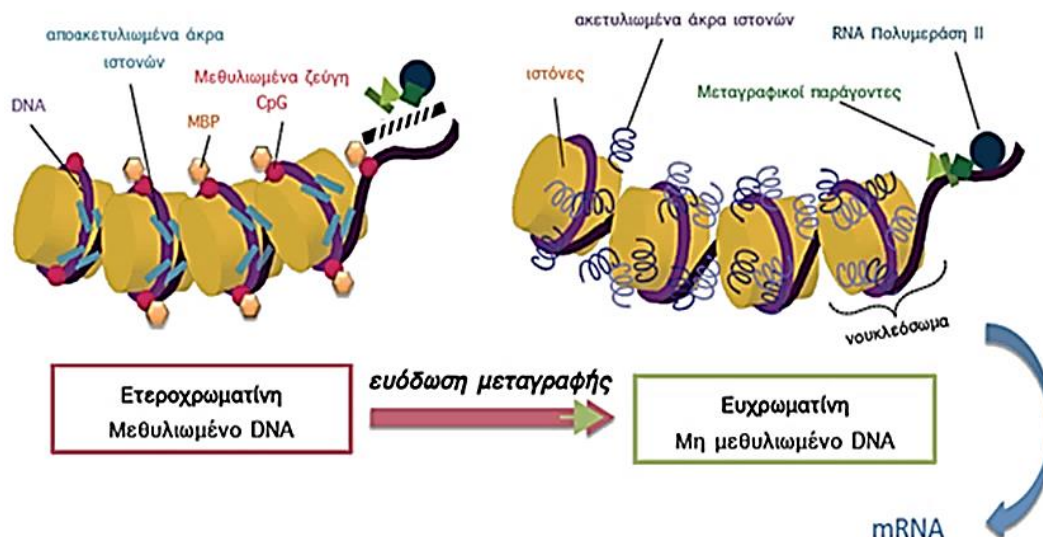
ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ

2.1 Εισαγωγή

Ο βιολόγος Charles H. Waddington το 1942 χρησιμοποίησε τον όρο επιγενετική, για να εξηγήσει ότι η διαμόρφωση του φαινοτύπου, δηλαδή οι μορφολογικές και λειτουργικές ιδιότητες ενός οργανισμού, καθορίζεται από το γονιδίωμα υπό την επήρεια του περιβάλλοντος. Σήμερα, ο όρος επιγενετική χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης που προκύπτουν κατά ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Οι επιγενετικές διεργασίες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση και μπορούν να προκύψουν είτε τυχαία είτε υπό την επίδραση του περιβάλλοντος. Οι αλλαγές που συμβαίνουν είναι κληρονομήσιμες και αναστρέψιμες αλλά δεν μεταβάλλουν την γονιδιακή δομή. Η επιγενετική, με την ευρεία έννοια του όρου, αποτελεί τη γέφυρα μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου, τροποποιώντας το τελικό προϊόν του γονιδίου χωρίς αλλαγή της ακολουθίας του DNA, προσφέροντας ένα είδος μεταγραφικού ελέγχου.

Οι κυριότεροι μηχανισμοί είναι:

1. η μεθυλίωση του DNA (εξετάζεται παρακάτω)
2. οι τροποποιήσεις των ιστονών. Οι ιστόνες (H3, H4, H2A, H2B) είναι οι δομικές πρωτεΐνες των νουκλεοσωμάτων και έχουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της χρωματίνης. Κάθε τύπος ιστονών υποβάλλεται σε διαφορετικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβάνοντας κυρίως την ακετυλίωση, τη μεθυλίωση και τη φωσφορυλίωση. Οι τροποποιήσεις των ιστονών ρυθμίζονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Μεταβάλλοντας τη διάταξη της χρωματίνης, οδηγούν σε ενεργοποίηση ή αποσιώπηση της μεταγραφής, έτσι ώστε η ανοιχτή της δομή (ευχρωματίνη) να ισοδυναμεί με ενεργό μεταγραφή, ενώ η συμπαγής χρωματίνη (ετεροχρωματίνη) να ισοδυναμεί με καταστολή της γονιδιακής έκφρασης, σταθεροποίηση της δομής των χρωμοσωμάτων και καταστολή της κινητικότητας των μεταθετονίων (transposons). (σχήμα 2-1)



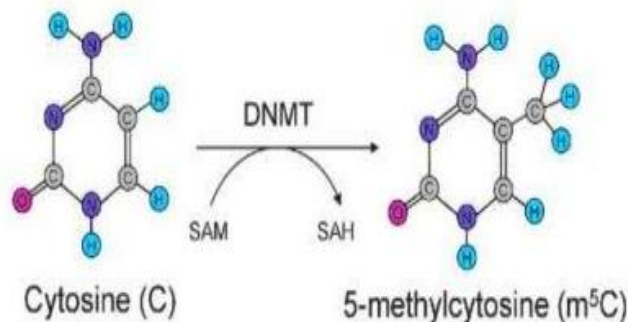
Σχήμα 2-1. Δομές χρωματίνης. (<http://www.med.uoi.gr/haematology/img/figure1.jpg>)

3. τα μη κωδικοποιούντα RNAs. Είναι λειτουργικά μόρια RNA, τα οποία δε μεταφράζονται σε πρωτεΐνη. Έχουν σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση της ακολουθίας, της δομής και της έκφρασης των αγγελιοφόρων RNA, επηρεάζοντας την έκφραση της πρωτεΐνης των αντίστοιχων γονιδίων. Ένα από τα σπουδαιότερα μη κωδικοποιούμενα RNA είναι τα microRNAs.

Από τους επιγενετικούς μηχανισμούς κανένας δε λειτουργεί ανεξάρτητα, ενώ υπάρχει ουσιαστική αλληλεπίδραση, τόσο μεταξύ τους, όσο και με το περιβάλλον. Λειτουργούν με αμοιβαία συνεργασία, με σκοπό την έκφραση ή τη σίγαση της γενετικής πληροφορίας (σχήμα 2-1).^(40,41)

2.2 Μεθυλίωση DNA

Ο μηχανισμός της μεθυλίωσης του DNA πραγματοποιείται με τη δημιουργία ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ μιας μεθυλομάδας και του άνθρακα 5 του πυριμιδινικού δακτυλίου της κυτοσίνης (C), δίνοντας ως τελικό προϊόν την 5-μεθυλοκυτοσίνη (5-methylcytosine, 5mC). Δότης της μεθυλομάδας είναι η S-αδενοσυλομεθειονίνη (S-adenosylmethionine, SAM). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από τις μεθυλοτρανσφεράσες (DNA methyltransferases, DNMTs), όπως οι DNMT1, που συντηρεί τη μεθυλίωση, η DNMT3A και η DNMT3B, που καταλύουν την de novo μεθυλίωση. Οι προστιθέμενες μεθυλομάδες προεξέχουν στην μεγάλη αύλακα του DNA, αλλάζοντας χωροταξικά την περιοχή. Πρόκειται για μια δυναμική κατάσταση, δηλαδή μη-μεθυλιωμένες περιοχές μετατρέπονται σε μεθυλιωμένες και αντιστρόφως. (σχήμα 2-2)^(41,42,43)



Σχήμα 2-2. Μηχανισμός μεθυλίωσης. ⁽⁴³⁾

Η μεθυλίωση πραγματοποιείται στην κυτοσίνη ενός GC δινουκλεοτιδίου. Τα GC δινουκλεοτίδια μπορεί να βρίσκονται συγκεντρωμένα και να σχηματίζουν τις CpG νησίδες (CpG islands) με μήκος που κυμαίνεται από 200 bp έως 5 kb. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου 45000 CpG islands στο ανθρώπινο γονιδίωμα και βρίσκονται στο 5' άκρο των γονιδίων ή αλλιώς στην περιοχή του υποκινητή τους. Αυτές οι περιοχές είναι πλούσιες σε GC (60 με 70%) και έχουν αναλογία CpG με GpC τουλάχιστον 0,6. ⁽⁴³⁻⁴⁶⁾

Ο ρόλος της μεθυλίωσης είναι πολλαπλός και ιδιαίτερα σημαντικός στη λειτουργία του κυττάρου. Η μεθυλίωση οδηγεί στη μεταγραφική καταστολή (γονιδίων, μη κωδικοποιούντων ή μη εκφραζόμενων περιοχών), στην εντύπωση γονιδίων (imprinted genes), στην απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος στα θηλυκά, στην αλλαγή της δομής της χρωματίνης για την διατήρηση της διαμόρφωσης και της ακεραιότητας του χρωμοσώματος. Επίσης, κατά την αντιγραφή του DNA σηματοδοτεί τη μητρική αλυσίδα ώστε να λειτουργήσουν σωστά οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί, αλλά λειτουργεί και ως μηχανισμός άμυνας έναντι διαμεταθετών γενετικών στοιχείων (τρανσποζόνια). ^(41,44,45)

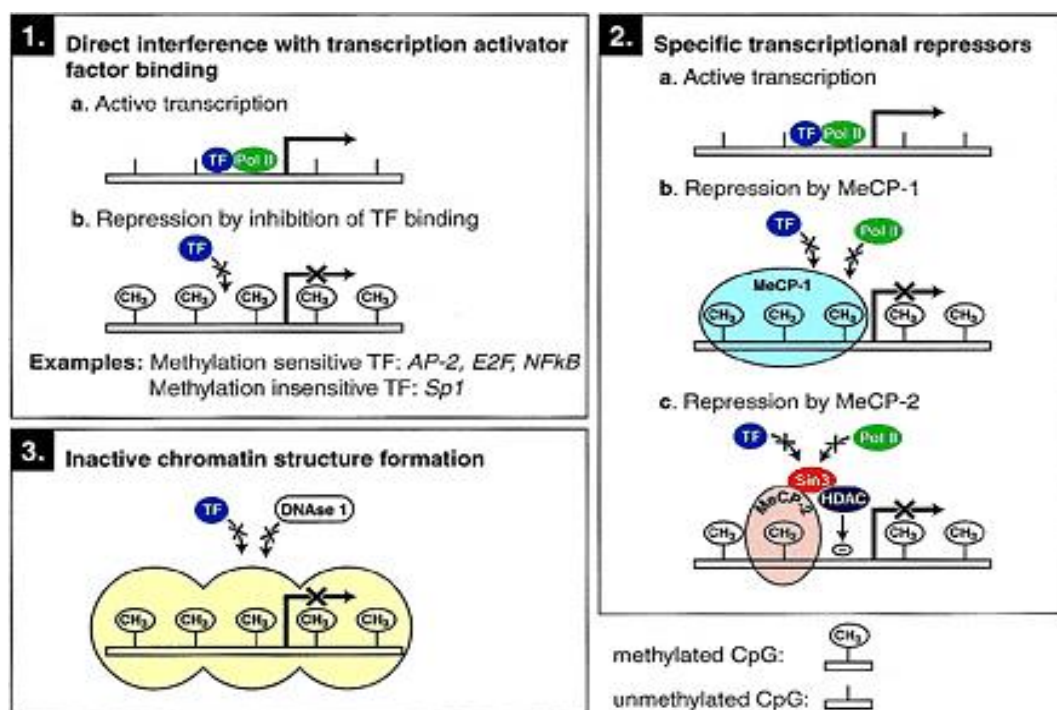
Έχουν προταθεί 3 μηχανισμοί που οδηγούν τελικά στην μεταγραφική καταστολή μέσω της μεθυλίωσης (σχήμα 2-3).

Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει την άμεση παρεμβολή στην πρόσδεση των ειδικών μεταγραφικών παραγόντων στις θέσεις αναγνώρισής τους στους αντίστοιχους υποκινητές τους.

Ο δεύτερος μηχανισμός προτείνει την άμεση πρόσδεση ειδικών, για το μεθυλιωμένο DNA, κατασταλτικών μεταγραφικών παραγόντων, των MeCP

πρωτεϊνών (methyl-DNA binding proteins), οι οποίες ενώνονται με τη μεθυλοκυτοσίνη και προκαλούν παρεμπόδιση.

Ο τρίτος μηχανισμός σχετίζεται με την αλλαγή της δομής της χρωματίνης, η οποία υφίσταται τη δράση αποακετυλασών ιστονών (HDAC, histone deacetylase) και μεθυλοτρανσφερασών ιστονών (HMT, histone methyltransferase).



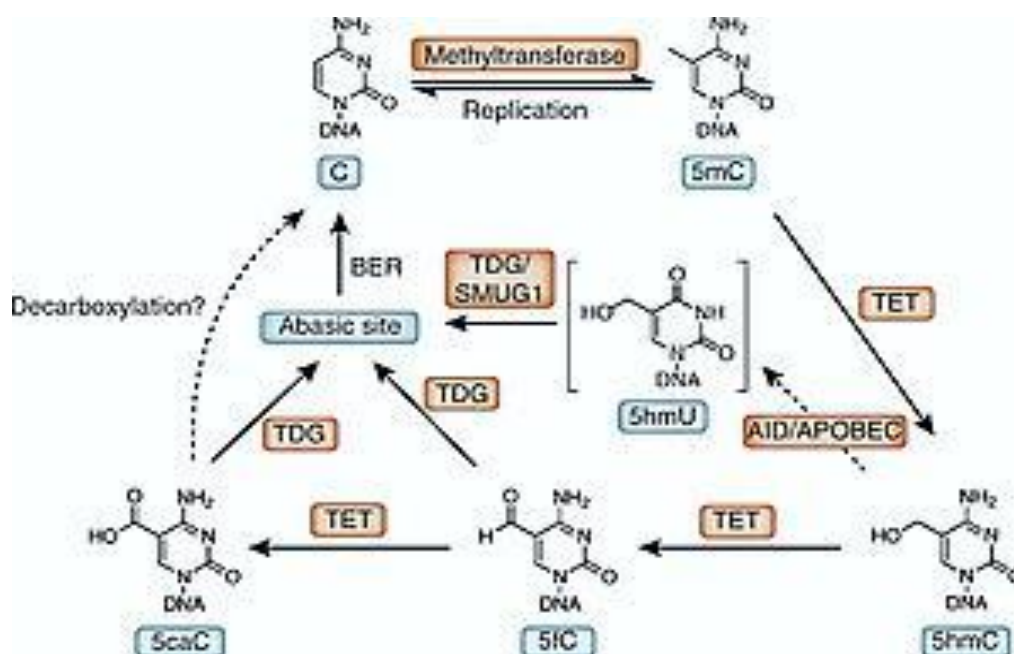
Σχήμα 2-3. Οι τρεις προτεινόμενοι μηχανισμοί της μεταγραφικής καταστολής. ⁽⁴⁴⁾

Ένα σημαντικό ζήτημα που αφορά τη μεθυλίωση του DNA και τη μεταγραφική σίγαση είναι το εάν η μεθυλίωση είναι ένας κύριος μηχανισμός ελέγχου ή μια δευτερεύουσα επίδραση της γονιδιακής δραστηριότητας. Στην περίπτωση ορισμένων γονιδίων με λίγα CpG νουκλεοτίδια, η αύξηση της μεθυλίωσης εμφανίζεται μετά την μεταγραφική καταστολή, ενώ σε άλλες περιπτώσεις, η απώλεια της μεθυλίωσης εμφανίζεται μετά την ενεργοποίηση της μεταγραφής. ^(41,44,47)

Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, η μεθυλίωση είναι αντιστρεπτή διαδικασία. Κατά την προεμφυτευτική διαδικασία του εμβρύου τα επίπεδα μεθυλίωσης μειώνονται δραματικά, ακολουθεί μια de novo μεθυλίωση στα CpG κατάλοιπα και όχι στα CpG islands, ενώ μετά την εμφύτευση παραμένουν μη μεθυλιωμένα μόνο τα ιστοειδικά γονίδια για την ανάπτυξη των οργάνων του

εμβρύου. Ο μηχανισμός που διέπει την απομεθυλίωση δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος.⁽⁴¹⁾

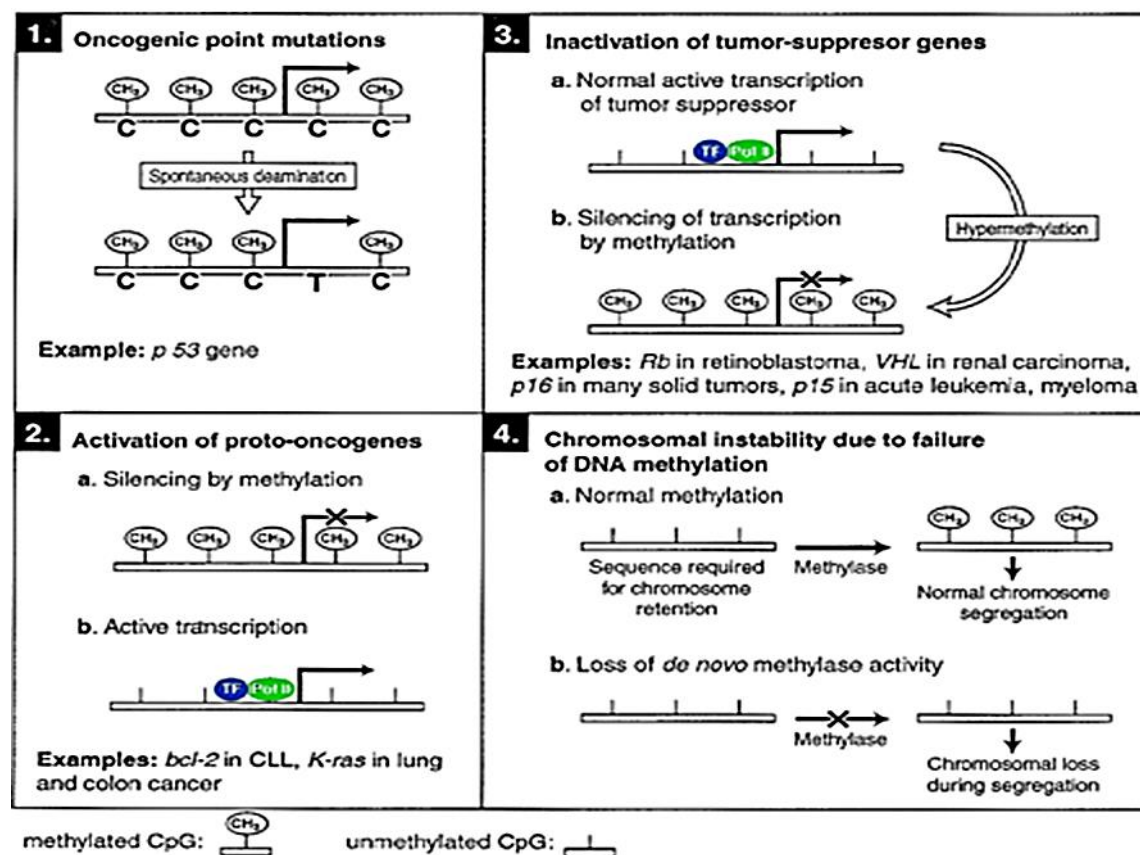
Η απομεθυλίωση μπορεί να είναι ενεργή ή παθητική. Στην ενεργή απομεθυλίωση, η 5mC οξειδώνεται σε 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη (5hmC). Η 5hmC στη συνέχεια μετατρέπεται σε κυτοσίνη με τη βοήθεια των DNMTs, ή απαμινώνεται σε 5-υδροξυμεθυλοουρακίλη (5hmU) μέσω της δράσης των AID/APOEC, η οποία επιδιορθώνεται με εκτομή βάσης. Μία άλλη μεταβολική οδός που μπορεί να ακολουθήσει η 5hmC είναι η περαιτέρω οξείδωσή της σε 5-φορμυλοκυτοσίνη (5fC) μέσω των TET (ten-eleven translocation) πρωτεϊνών και εν συνεχεία, σε 5-καρβοξυλοκυτοσίνη (5caC). Η αφαίρεση της 5caC επιτυγχάνεται είτε μέσω της αποκαρβοξυλίωσης, είτε μέσω της εκτομής βάσης μέσω των TDG (Thymine DNA Glycosylase) και στη συνέχεια της μετατροπής της κυτοσίνης μέσω του BER (Base Excision Repair) μονοπατιού. Στην παθητική διαδικασία απομεθυλίωσης, η μετατροπή της 5mC σε 5hmC δεν επιτρέπει τη διατήρηση της κατάστασης μεθυλίωσης, διότι η DNMT1, η οποία είναι υπεύθυνη για τη μετάδοση και διατήρηση των μοτίβων μεθυλίωσης, δεν μπορεί να αντιγράψει και επομένως να διατηρήσει την 5hmC, όπως μπορεί με την 5mC (σχήμα 2-4).^(48,49)



Σχήμα 2-4. Τα μονοπάτια της μεθυλίωσης.⁽⁴⁹⁾

2.3 Μεθυλίωση και καρκίνος

Η συμβολή της μεθυλίωσης στην ογκογένεση φαίνεται να πραγματοποιείται μέσω των μηχανισμών που περιγράφονται στο σχήμα 2-5.



Σχήμα 2-5. Μοντέλα μηχανισμών όπου η μεθυλίωση οδηγεί στην ογκογένεση. ⁽⁴⁴⁾

Ο μηχανισμός 1 αφορά την μεταλλαγή της κυτοσίνης σε θυμίνη εντός των GC δινουκλεοτιδίων από τα ένζυμα DNA-MTάσες, μέσω της υδρολυτικής απαμίνωσης της 5mC. Μια μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη μπορεί, μέσω απαμίνωσης, να μετατραπεί σε ουρακίλη. Αυτή η βλάβη επιδιορθώνεται από την DNA-ουρακιλογλυκοζιτάση, αλλά οι DNA-MTάσες μπορούν να μπλοκάρουν τον επιδιορθωτικό μηχανισμό οδηγώντας σε C → U → T μετάβαση.

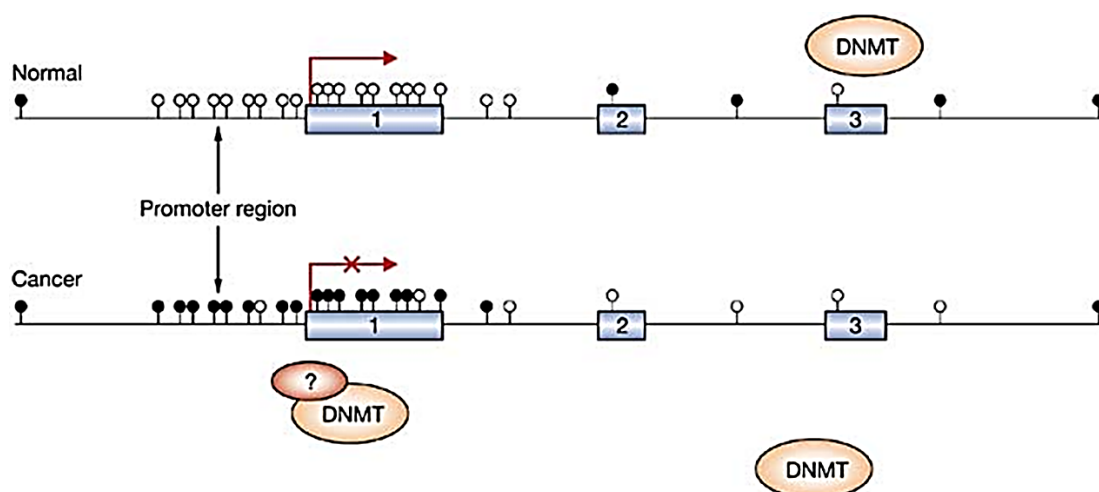
Ο μηχανισμός 2 αφορά την ενεργοποίηση των πρωτο-ογκογονιδίων μέσω υπομεθυλίωσής του υποκινητή τους. Η υπομεθυλίωση έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί στην μεταγραφική ενεργοποίηση των ρετροτρανσποζονίων, διαμεταθετών στοιχείων που έχουν την ικανότητα να μετακινούνται εντός του γονιδιώματος και να παρεμβάλονται εντός της γονιδιακής αλληλουχίας

διαταράσσοντας την αλληλουχία σημαντικών γονιδίων για την κυτταρική λειτουργία.

Ο μηχανισμός 3 αφορά την απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων μέσω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή τους, λόγω αυξημένων επιπέδων DNA-MTασών ή παροδικής σίγασης της μεταγραφής τους.

Ο μηχανισμός 4 αφορά την χρωμοσωμική αστάθεια που προκύπτει από την απώλεια της de novo μεθυλίωσης και οδηγεί σε έκφραση ογκογονιδίων ή καταστολή ογκοκατασταλτικών γονιδίων. ^(41,44)

Σε κάθε περίπτωση και όποιος και να είναι ο μηχανισμός μέσω του οποίου πραγματοποιείται η μεθυλίωση, ένα είναι το αποτέλεσμα· η αλλαγή των επιπέδων μεταγραφής. Στο σχήμα 2-6 απεικονίζονται συνοπτικά αλλά απολύτως περιγραφικά και ουσιαδώς η μεθυλίωση σε ένα φυσιολογικό και ένα καρκινικό κύτταρο. Οι λευκοί κύκλοι αφορούν CpGs, οι μαύροι κύκλοι τις μεθυλιωμένες περιοχές, οι αριθμοί 1-2-3 τα εξόνια του εικονιζόμενου γονιδίου και οι μεθυλοτρανσφεράσες DNMTs.



Σχήμα 2-6. Η μεθυλίωση σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα. ⁽⁴⁵⁾

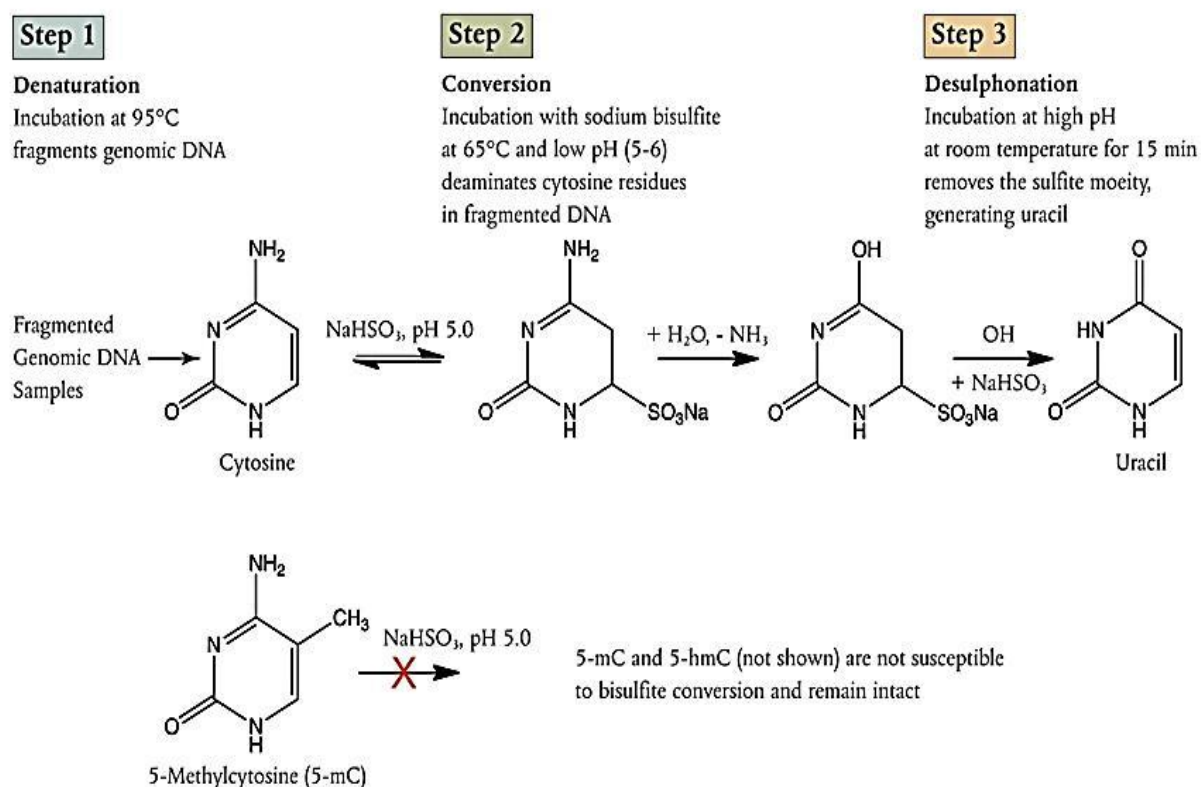
2.4 Τεχνικές ανάλυσης μεθυλίωσης

Από τα τέλη της δεκαετίας του 1970 ως και σήμερα έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι ανάλυσης μεθυλίωσης. Αρχικά χρησιμοποιούνταν συμβατικές μέθοδοι όπως η HPLC και η TLC, ραδιοεπισημάνση, μέθοδοι που χρησιμοποιούσαν αντισώματα, μέθοδοι που χρησιμοποιούσαν ειδικά περιοριστικά ένζυμα ευαίσθητα στη μεθυλίωση. Με την έλευση της μεθόδου

επεξεργασίας του DNA με όξινοθειώδες νάτριο, άλλαξε ριζικά η μεθοδολογία ανάλυσης μεθυλίωσης.⁽⁵⁰⁾

Η Frommer και η ομάδα της, το 1992, κατέδειξαν τη χρησιμότητα της μετατροπής αυτής σε συνδυασμό με PCR. Εκμεταλλεύτηκαν το διαφορετικό βαθμό απαμίνωσης της κυτοσίνης και της 5mC, από το όξινοθειώδες νάτριο, προς ουρακίλη και θυμίνη, αντίστοιχα, σε συνδυασμό με ενίσχυση της αλληλουχίας με PCR. Η μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη μετατρέπεται αρχικά σε ουρακίλη από το όξινοθειώδες νάτριο και στη συνέχεια σε θυμίνη από την πολυμεράση και με χρήση κατάλληλων εκκινητών γίνεται η ενίσχυση της περιοχής. Η πληροφορία δεν χάνεται, αλλά ενισχύεται.⁽⁵¹⁾

Σχηματικά η επεξεργασία του DNA με όξινοθειώδες νάτριο δίδεται στο σχήμα 2-7, όπου φαίνεται και μια τυπική πειραματική διαδικασία.



Σχήμα 2-7. Μετατροπή DNA με όξινοθειώδες νάτριο. (<https://www.neb.com>)

Ακολουθώντας θα αναφερθούν ορισμένες τεχνικές που χρησιμοποιούνται διεθνώς.

- MSP (methylation specific PCR): γίνεται χρήση εκκινητών είτε για τη μεθυλιωμένη αλληλουχία είτε για τη μη μεθυλιωμένη. Σαν τεχνική

χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, είναι χαμηλού κόστους και μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιοδήποτε εργαστήριο. Παρέχει όμως ποιοτική εκτίμηση για τη μεθυλίωση. ⁽⁵²⁻⁵⁴⁾

- qMSP (quantitative MSP): συνδιάζει τα πλεονεκτήματα της PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιώντας εκκινητές και ανιχνευτές επισημασμένους με φθορίζοντα μόρια για την ποσοτικοποίηση. Είναι ταχεία, επειδή παρακάμπτει επιπλέον βήματα της PCR, την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα, ή την υβριδοποίηση. Ένα μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η εμφάνιση ψευδών θετικών αποτελεσμάτων που προκαλούνται από την ενίσχυση του μη μετατραπέντος DNA. ⁽⁵²⁻⁵⁴⁾ Το MethyLight, για παράδειγμα, βασίζεται στη χρήση Taqman probes και εκκινητών, οι οποίοι είναι ειδικοί για το κατεργασμένο με όξινο θειώδες νάτριο DNA. ^(55,56)
- Multiplex Nested MSP: στο πρώτο στάδιο χρησιμοποιούνται εκκινητές που ενισχύουν το τροποποιημένο με όξινο θειώδες νάτριο DNA ανεξαρτήτως μεθυλίωσης. Ακολουθούν αραίωση και μια δεύτερη PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές (για τη μεθυλιωμένη αλληλουχία και τη μη μεθυλιωμένη) MSP. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κλινικά δείγματα κακής ποιότητας ή περιορισμένης ποσότητας. Επίσης, ποσοτική multiplex MSP αναπτύχθηκε για να δημιουργήσει μια πιο ευαίσθητη πλατφόρμα MSP. ⁽⁵³⁾
- In Situ MSP: πρόκειται για συνδυασμό in situ υβριδισμού και MSP και πραγματοποιείται απευθείας στον ιστό. Η ανίχνευση της μεθυλίωσης βασίζεται στο χρώμα που λαμβάνεται. Κάθε πλακίδιο επεξεργάζεται με ειδικούς εκκινητές και επισημασμένοι με διγοξίνη ανιχνευτές χρησιμοποιούνται για την χρωματική ανίχνευση. ^(53,55)
- COBRA (Combined bisulfite restriction analysis): η ανάλυση μεθυλίωσης γίνεται με ευαισθησία και ποσοτικά. Χρησιμοποιείται περιοριστική ενδονουκλεάση η οποία αναγνωρίζει την αλληλουχία που περιέχει τα CpGs. Μετά την μετατροπή με όξινο θειώδες νάτριο και την ενίσχυση με PCR, ακολουθεί πέψη του κλωνοποιημένου τμήματος με την ειδική ενδονουκλεάση. ^(52,55)

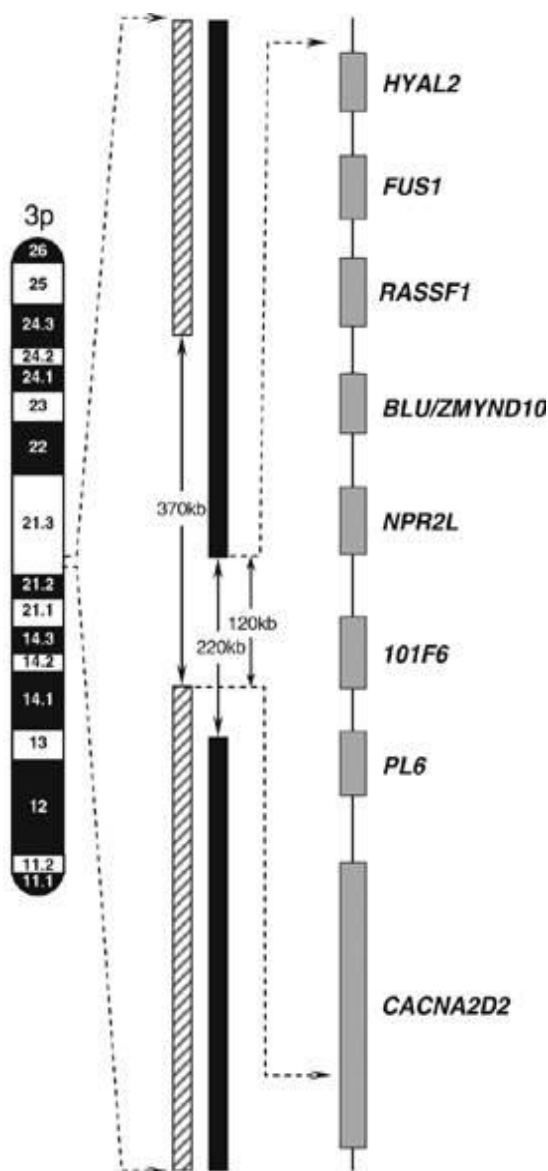
- Ms-SNuPE (methylation-sensitive single nucleotide primer extension): τα PCR προϊόντα υφίστανται ηλεκτροφόρηση, τα θραύσματα μετουσιώνονται και ένας ειδικός εκκινητής υβριδοποιείται στο σημείο ενδιαφέροντος. Ραδιενεργό dCTP ή dTTP θα προστεθεί παρουσία DNA πολυμεράσης και η ποσότητα της ραδιενέργειας που θα ενσωματωθεί στο DNA με την προσθήκη από το ένζυμο dCTP συσχετίζεται με το μεθυλιωμένο DNA, ενώ η ποσότητα της ραδιενέργειας που ενσωματώθηκε με την προσθήκη dTTP συσχετίζεται με την ποσότητα μη μεθυλιωμένων κυτοσινών. ^(52,55)
- BiPS (Bisulfite-PCR-SSCP): μετά την μετατροπή με όξινο θειώδες νάτριο ακολουθεί ενίσχυση με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που ενισχύουν και τη μεθυλιωμένη και τη μη μεθυλιωμένη αλληλουχία. Ο διαχωρισμός γίνεται με χρήση SSCP. ⁽⁵²⁾
- MALDI-TOF Mass Array Analysis: το κατεργασμένο DNA επισημαίνεται με την T7 αλληλουχία υποκινητή (T7R) κατά την PCR, επωάζεται με αλκαλική φωσφατάση, ακολουθεί *in vitro* μεταγραφή από την DNA πολυμεράση, η οποία χρησιμοποιεί τον T7R και το προϊόν επωάζεται με RNaseA. Τα θραύσματα που προκύπτουν αναλύονται με MALDI-TOF MS, όπου τα σήματα μάζας του προϊόντος διάσπασης διαφέρουν κατά 32 Da όταν και τα δύο CpGs είναι μεθυλιωμένα εν σχέση με το σήμα που λαμβάνεται όταν μόνο ένα από τα δύο είναι μεθυλιωμένο. ⁽⁵³⁾
- High-Resolution Melting Analysis: μετά την ενίσχυση με PCR, ακολουθείται σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας ώστε να βρεθεί η T_m (θερμοκρασία τήξης) του προϊόντος ενίσχυσης. Επειδή μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλη κατά την μετατροπή με όξινο θειώδες νάτριο και ενισχύονται ως θυμίνη, ενώ οι 5mCs θα παραμείνουν ως έχουν και θα ενισχύονται ως κυτοσίνη, η μεθυλιωμένη ακολουθία θα έχει μια υψηλότερη G:C αναλογία, και ως εκ τούτου, μια υψηλότερη T_m , από την αντίστοιχη μη μεθυλιωμένη ακολουθία. Εάν η ενίσχυση γίνει με εκκινητές που δεν διαφοροποιούν μεθυλιωμένα και μη μεθυλιωμένα μόρια, οι ιδιότητες τήξης των προϊόντων της PCR μπορούν να εξεταστούν στο θερμικό κυκλοποιητή με βραδεία αύξηση της θερμοκρασίας κάτω από συνεχή ή βαθμηδόν παρακολούθηση των επιπέδων φθορισμού. ^(50,57)

- MS-qFRET (Methylation specific quantum dot fluorescence resonance energy transfer): πρόκειται για συνδυασμό MSP και QD-FRET τεχνολογίας. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην PCR είναι βιοτινυλιωμένοι και ειδικοί για τη μεθυλίωση με την παρουσία ενός Cy5-σημασμένου νουκλεοτίδιου (κυτοσίνη). Το προκύπτον επισημασμένο αμπλικόνιο συνδέεται με στρεπταβιδίνη επικαλυμμένη με QDs (quantum dots). Στη μέθοδο αυτή, τα QDs παίζουν το ρόλο του δότη για το FRET και μεταδίδουν ενέργεια στο Cy5 που είναι ο δέκτης.⁽⁵⁸⁾
- Live-cell imaging: τεχνική απεικόνισης ζώντος κυττάρου που επιτρέπει την σύλληψη των μακροπρόθεσμων δυναμικών αλλαγών στη μεθυλίωση του DNA τρισδιάστατα. Αυτή η τεχνική συνίσταται στην κατασκευή ενός φθορίζοντος ανιχνευτή που μπορεί να δεσμεύεται ειδικά με μεθυλιωμένο DNA χρησιμοποιώντας την ανθρώπινη μεθυλο-CpG δεσμευτική πρωτεΐνη τομέα 1 (Methyl-CpG binding protein 1, MBD1), στην έκφραση του ανιχνευτή στο κύτταρο και την παρατεταμένη τρισδιάστατη απεικόνιση. Παρατηρούνται χρονοεξαρτώμενες μεταβολές της κατάστασης μεθυλίωσης.⁽⁵⁹⁾
- MIRA (methylated-CpG island recovery assay): εκμεταλλεύεται την εγγενή εξειδίκευση και υψηλή συγγένεια ενός μεθυλιωμένου CpG με ένα σύμπλοκο δεσμευτικής πρωτεΐνης (MBD2B και MBD3L1) σε μεθυλιωμένα CpG δινουκλεοτιδίων γενωμικού DNA. Λειτουργεί σε δίκλωνο DNA και δεν εξαρτάται από την εφαρμογή των ευαίσθητων σε μεθυλίωση περιοριστικών ενζύμων. Είναι συμβατή με μικροσυστοιχίες και νέας γενιάς αλληλούχησης τεχνικές.⁽⁶⁰⁾
- Bisulfite Sequencing: βασίζεται στην μετατροπή του DNA με όξινο θειώδες νάτριο, όπου μετατρέπεται η μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη σε ουρακίλη, ενώ η μεθυλιωμένη παραμένει ως επί το πλείστον ανεπηρέαστη, στην ενίσχυση της αλληλουχίας με PCR, με εκκινητές που υβριδίζονται σε περιοχές που δεν επηρεάζονται από τη μεθυλίωση και στην DNA αλληλούχιση. Στο κεφάλαιο 4 αναφέρεται λεπτομερώς η μέθοδος του Pyrosequencing, που είναι υποπερίπτωση του Bisulfite Sequencing.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΓΟΝΙΔΙΟ *RASSF1*

3.1 Εισαγωγή



Σχήμα 3-1. Ο γενετικός τόπος 3p21.3. ⁽⁶⁷⁾

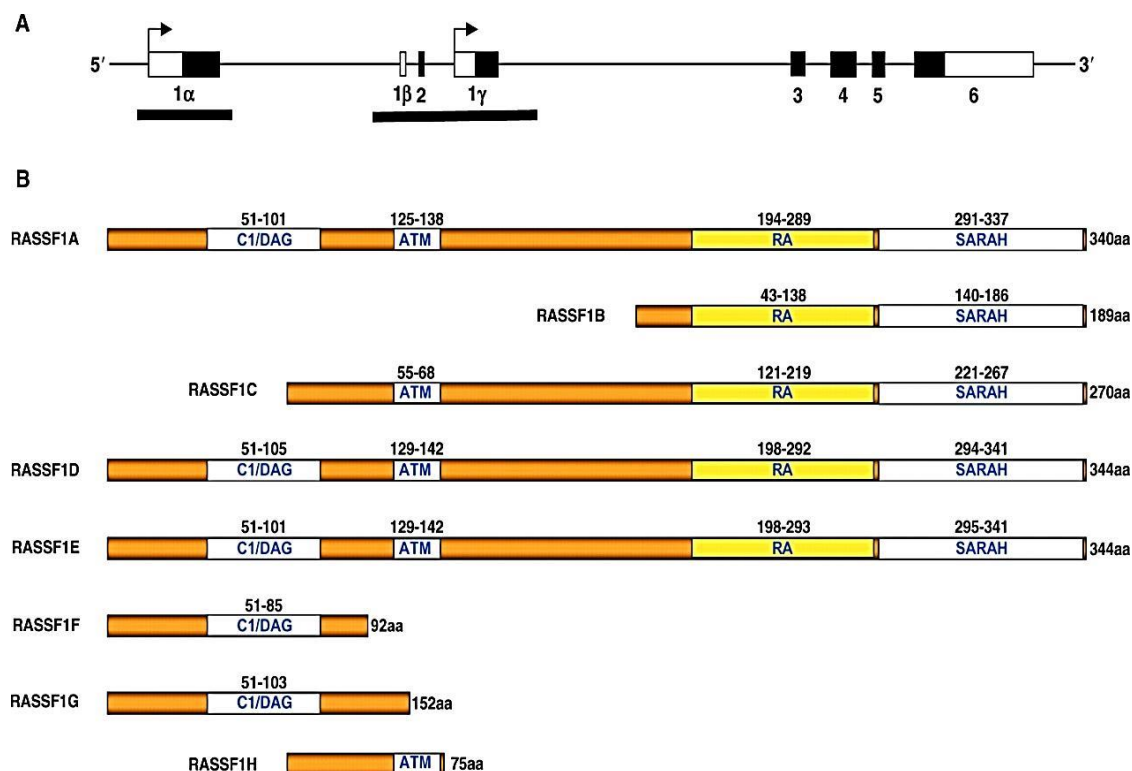
Για πολλά χρόνια υπήρχε η υποψία ότι ένα ή περισσότερα ογκοκατασταλτικά γονίδια εδράζονται στον γενετικό τόπο 3p21.3 (σχήμα 3-1), επειδή αυτή η περιοχή υποφέρει συχνά απώλεια της ετεροζυγωτίας (Loss of Heterozygosity, LOH), σε πολλούς τύπους καρκίνου. Το 2000 ο Dammann και η ομάδα του κλωνοποίησαν ένα γονίδιο που βρίσκεται σε αυτή την περιοχή, το οποίο φάνηκε να καταστέλλεται μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή του. Το γονίδιο αυτό ονομάστηκε *RASSF1* (Ras-Association Domain Family 1). ^(61,62)

Από τότε και έπειτα ξεκίνησε να εμφανίζεται μια πληθώρα εργασιών σχετικά με τον φυσιολογικό ρόλο και την λειτουργία του, τον τρόπο σίγασής του (κυρίως μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή του) και τη συσχέτισή του με την καρκινογένεση. ^(63,64)

3.2 Δομή *RASSF1* και *RASSF1A* μεταγράφου

Το *RASSF1* (RalGDS/AF-6, NCBI Reference Sequence: NG_023270.1) ανήκει σε μια υπεροικογένεια πρωτεϊνών με 10 μέλη (*RASSF1*- *RASSF10*), τα οποία μοιράζονται κοινά μοτίβα και δομές, όπως οι τομείς Ras association

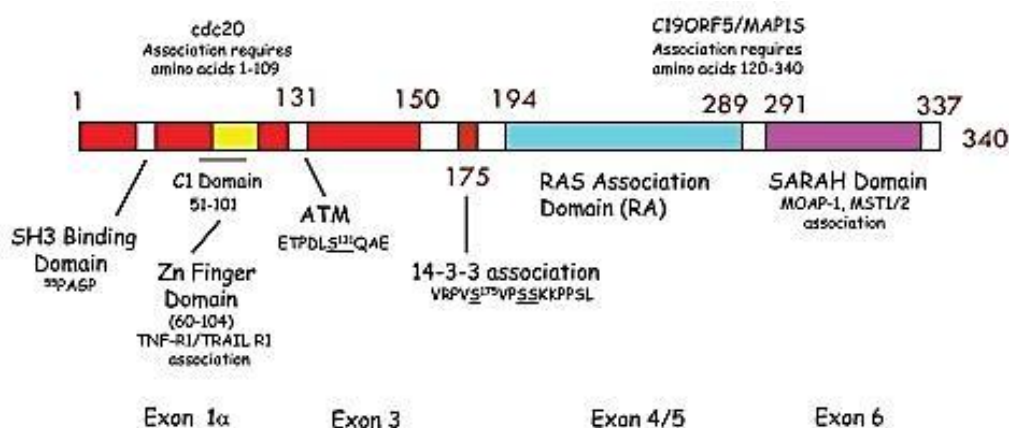
(RA) και Salvador-RASSF-Hippo (SARAH). Καλύπτει 18151 bp του ανθρώπινου γονιδιώματος, περιέχει 8 εξόνια (1α, 1β, 2, 1γ, 3, 4, 5 και 6) και φέρει 2 υποκινητές, όπου με διαφορετική χρήση τους και μέσω εναλλακτικού ματίσματος, παράγονται 8 μετάγραφα (*RASSF1A* έως H, σχήμα 3-2). Οι ισομορφές *RASSF1A* και *RASSF1C* είναι οι κυριότερες, εκφράζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και μεταγράφονται από 2 διαφορετικούς υποκινητές που απέχουν περίπου 3,5 kb. Το ισόμορφο B εκφράζεται κυρίως σε κύτταρα του αιμοποιητικού, το D σε καρδιακά κύτταρα και το E σε παγκρεατικά κύτταρα. Υπάρχουν δύο CpG νησίδες στους υποκινητές. Η πρώτη νησίδα (737 bp, 85 CpGs, 71,5% GC), καλύπτει την περιοχή του υποκινητή του *RASSF1A* (καθώς και των D, E, F, H και G). Η δεύτερη νησίδα (1365 bp, 139CpG, 67,9% GC) περιλαμβάνει την περιοχή υποκινητή για τα B και C. Ολόκληρο το πρώτο εξόνιο του κάθε *RASSF1* ισομόρφου περιέχεται εντός της νησίδας CpG. ^(61,63-67)



Σχήμα 3-2. Γονίδιο του *RASSF1*. (A) Δομή του *RASSF1*, όπου φαίνονται τα 8 εξόνια (1α, 1β, 2αβ, 2γ, 3, 4, 5 και 6), οι υποκινητές με τα βέλη και οι CpG νησίδες με τις μαύρες ράβδους. Τα λευκά τετράγωνα αντιπροσωπεύουν μη-κωδικοποιούσες περιοχές και τα μαύρα κωδικοποιούσες. (B) Τα διαφορετικά μετάγραφα του *RASSF1* με τις αντίστοιχες δομικές περιοχές των ισομόρφων. ⁽⁶¹⁾

Το *RASSF1A* (NCBI Reference Sequence: NM_007182.4) μεταγράφεται από τον πρώτο υποκινητή, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 340 καταλοίπων βάρους 39

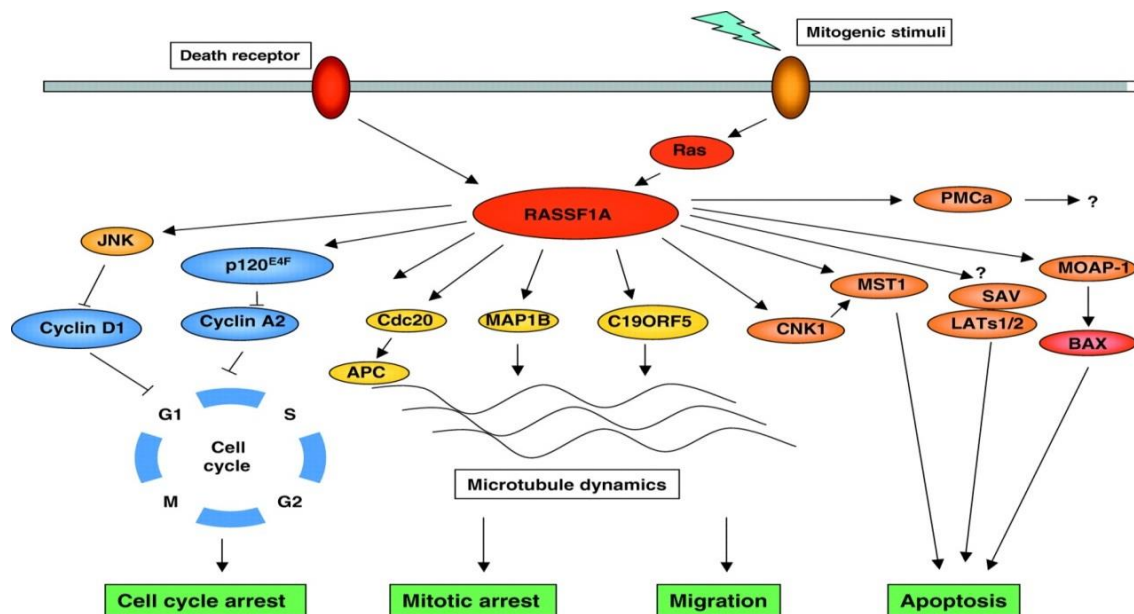
kDa και το mRNA της αποτελείται από 1968 βάσεις. Στο αμινοτελικό άκρο (κατάλοιπα 51-101) βρίσκεται η περιοχή C1, η οποία είναι πλούσια σε κατάλοιπα κυστεΐνης, έχει υψηλή ομολογία με τον diacylglycerol(DAG)/phorbol ester binding τομέα της πρωτεϊνικής κινάσης C1 και περιέχει ένα zing finger motif. Στο εξόνιο 3 βρίσκεται η περιοχή ATM (ataxia telagectasia mutant, κατάλοιπα 126-138) το οποίο έχει αποδειχθεί ότι φωσφορυλιώνεται in vitro από την κινάση ATM. Η περιοχή RA (κατάλοιπα 194-289) χρησιμεύει για τις αλληλεπιδράσεις με άλλες Ras και GTPάσες πρωτεΐνες και παρόλο που δεν είναι ομόλογες, παρομοιάζει δομικά με αυτές καθώς φέρει 5 έλικες β-φύλλου και 3 α-έλικες. Η περιοχή SARAH βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο και μεσολαβεί σε αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-πρωτεϊνών (protein-protein interactions) για την επίτευξη του ρόλου της. Δομικά διαθέτει 2 α-έλικες, οι οποίες κατά την αλληλεπίδραση των Salvador, RASSF και Hippo επιτρέπουν το σχηματισμό ομο- και ετερο-διμερών (σχήμα 3-3).^(61,63-69)



Σχήμα 3-3. Δομικές περιοχές της πρωτεΐνης RASSF1A.⁽⁷⁰⁾

3.3 Βιολογικός ρόλος *RASSF1A*

Το *RASSF1A* είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το οποίο εμπλέκεται σε βασικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως απεικονίζονται στο σχήμα 3-4. Το *RASSF1A* μπορεί να ρυθμίσει το δίκτυο των μικροσωληνίσκων, την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, μέσω αλληλεπιδράσεων με διάφορους παράγοντες και τα σηματοδοτικά μονοπάτια τους.



Σχήμα 3-4. Σχηματική αναπαράσταση ορισμένων μονοπατιών του RASSF1A. ⁽⁶¹⁾

Επάγει την απόπτωση μέσω αλληλεπίδρασης με την Ras πρωτεΐνη, την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη CNK1 (μέσω των CRIC και PDZ τμημάτων του), την προ-αποπτωτική κινάση MST1 (mammalian sterile 20-like kinase 1) και τον ρυθμιστή της απόπτωσης MOAP-1 (modulator of apoptosis-1). Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο KRas-RASSF1A-MOAP-1 συνεργεί στην ενεργοποίηση του Bax μονοπατιού και στον κυτταρικό θάνατο. Ακόμα, έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με τον C19ORF5 παράγοντα (chromosome 19 open reading frame 5), μια ειδική πρωτεΐνη πρόσδεσης μικροσωληνίσκων. Οι MST1 και MST2, που ενεργοποιούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια SAPK-JNK και H₂O, έχει βρεθεί ότι δεσμεύονται στην περιοχή SARAH της RASSF1A. Ακόμα μπορεί να μεσολαβήσει στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και τη γήρανση καρκινικών κυττάρων με ανεξάρτητη από το p53 ρύθμιση του p21^{Cip1 / WAF1} αναστολέα. ⁽⁶¹⁻⁸⁰⁾

Ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό μέσω αλληλεπιδράσεων με τους μικροσωληνίσκους και το Cdc20 (αναστέλλοντας το APC-Cdc20 σύμπλοκο και καταστέλλοντας τις κυκλίνες A και B), τις MAP (microtubule-associated proteins) πρωτεΐνες, την Aurora-A (που φωσφορυλιώνει την RASSF1A στον RA τομέα και αναστέλλεται η επαγωγή της M φάσης), τον παράγοντα μεταγραφής p120^{E4F} (επάγωντας τη διακοπή της G1 φάσης από την RASSF1A και της S φάσης από τον p120^{E4F}) και αναστέλει την συσσώρευση της κυκλίνης D1. ^(61-72, 74,78,81)

Συνεντοπίζεται με το δίκτυο των μικροσωληνίσκων κατά τη μεσόφαση και βρίσκεται στις ατράκτους και κεντροσωμάτια στη διάρκεια της μίτωσης. Μεταφέρεται από τους μικροσωληνίσκους στα χωρισμένα κεντροσωμάτια κατά την πρόφαση, στη συνέχεια, στις ίνες της ατράκτου και των πόλων κατά τη διάρκεια της μετάφασης και της ανάφασης και, τέλος, στο midbody κατά τη διάρκεια της κυτταροκίνησης. Δεσμεύεται στην τουμπουλίνη και με τον τρόπο αυτό σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους ρυθμίζοντας την μιτωτική πρόοδο. Υπερέκφραση του *RASSF1A* δείχθηκε ότι οδηγεί σε μια σύλληψη-arrest σε διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου: τη μετάφαση, την G1, την G2/M και την προμετάφαση. Η περιοχή της *RASSF1A* που σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους και την σταθερότητά του έχει βρεθεί ότι βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 120 και 185. Η σταθερότητα αυτή από την *RASSF1A* είναι RAN-GTP εξαρτώμενη, καθώς προωθεί την συσσώρευση της GTP μορφής του RAN μέσω της MST2 επαγόμενης φωσφορυλίωσης από τον παράγοντα RCC1 (RAN guanine nucleotide exchange factor).^(64,66, 82)

Η ομάδα του Arnette αναφέρει επίσης, ότι η *RASSF1A* είναι απαραίτητη για την πρόληψη του κατακερματισμού του Golgi και τη διασπορά των καρκινικών κυττάρων, αλλά και την διατήρηση της κυτταρικής πολικότητας.⁽⁷³⁾

Η Foley και η ομάδα της υπέθεσαν ότι η *RASSF1A* θα μπορούσε επίσης να συνδέεται με την ενδοσωμική διακίνηση αλληλεπιδρώντας με τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων 1 (tumor necrosis factor 1, TNF-R1) και δήλωσαν ότι η είσοδος του μπορεί να εξαρτάται από ένα σταθερό δίκτυο μικροσωληνίσκων που επηρεάζονται από την *RASSF1A*.⁽⁷²⁾

Η κυτταρική μετανάστευση, σύμφωνα με τον Jung και τους συνεργάτες του, καταστέλλεται από την *RASSF1A* μέσω της αναστολής της δραστηριότητας της HDAC6 (histone deacetylase 6) και την επαγωγή της ακετυλιωμένης α-τουμπουλίνης, προκαλώντας συνεντόπιση της ακετυλιωμένης α-τουμπουλίνης και της HDAC6 στο κυτόπλασμα. Ουσιαστικά, η *RASSF1A* ρυθμίζει την δραστηριότητα απο-ακετυλίωσης και του κυτταρικού εντοπισμού της HDAC6.⁽⁸³⁾

Όσον αφορά την επιδιόρθωση του DNA, ο Donninger οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της απόκρισης σε βλάβη

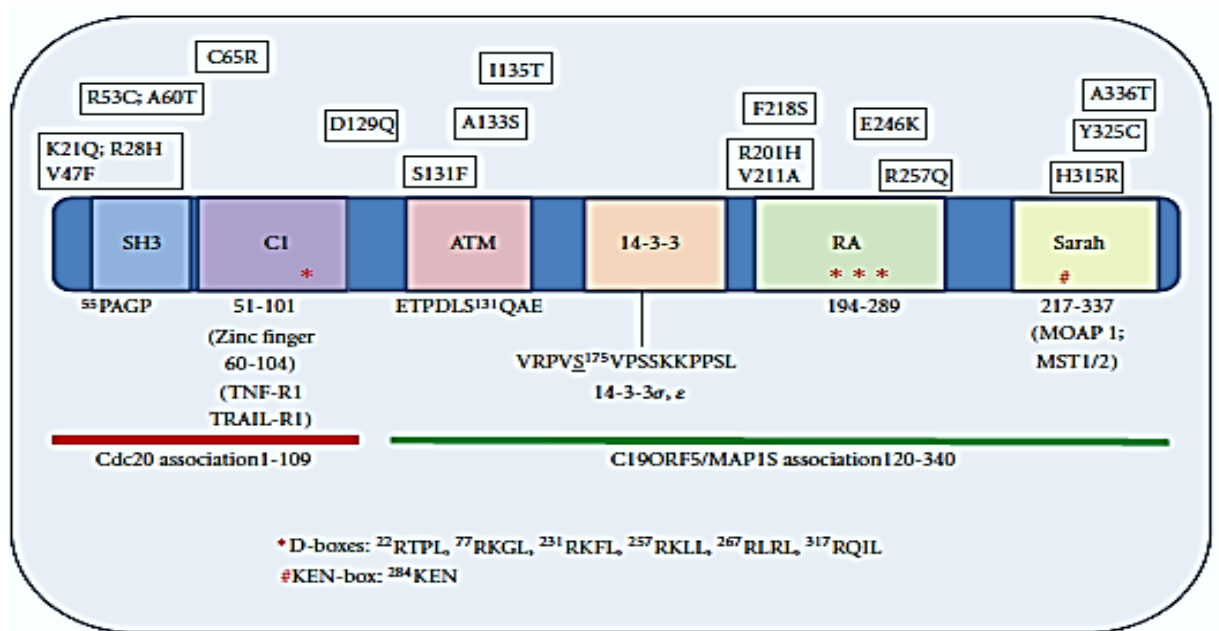
του DNA (DNA damage response, DDR). Σχηματίζει ένα επιδιορθωτικό σύμπλοκο με μια πρωτεΐνη-κλειδί για την επιδιόρθωση, την xeroderma pigmentosum A (XPA). Η XPA απαιτεί την πρόσδεση της RASSF1A για την εκδήλωση της πλήρους δραστηριότητάς της. Επίσης η RASSF1A ρυθμίζει το ρυθμό ακετυλίωσης/απο-ακετυλίωσης άλλων συστατικών του επιδιορθωτικού μηχανισμού, όπως των replication protein A (RPA).⁽⁸⁴⁾ Οι Pefani και O'Neill αναφέρουν ότι η απουσία ή δυσλειτουργία του μονοπατιού RASSF1A/MST2/LATS1/CDK2 έχει ως αποτέλεσμα την μη φωσφορυλίωση του καρβοξυτελικού άκρου του BRCA2 από το CDK2, που συνδέεται με την RAD51 και έτσι τελικώς δεν επιδιορθώνεται το DNA, οδηγώντας σε χρωμοσωμική αστάθεια και κακοήγη μετασχηματισμό.⁽⁸⁵⁾

Από τα ως άνω αναφερόμενα γίνεται αντιληπτή η αιτία που οδήγησε την επιστημονική κοινότητα να χαρακτηρίσει το *RASSF1A* ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο.⁽⁷⁸⁾

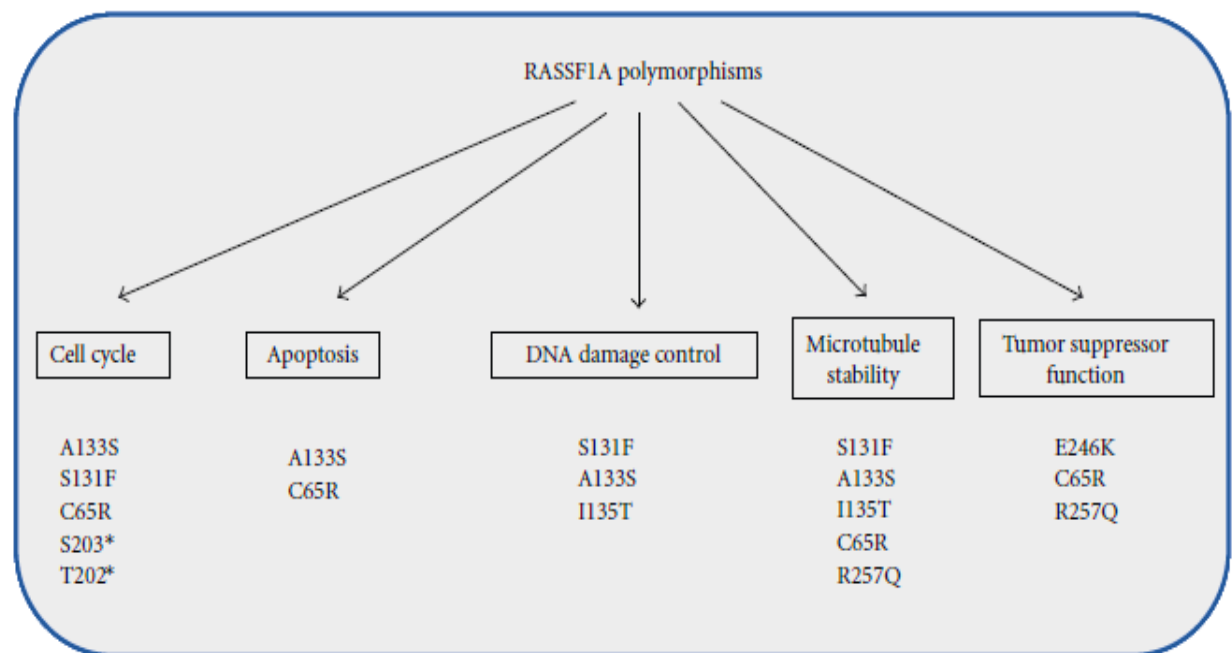
Η ομάδα του Oceandy αναφέρει ότι το γονίδιο *RASSF1A* δρα ανασταλτικά έναντι της καρδιακής υπερτροφίας.⁽⁸⁶⁾

3.4 DNA αλλαγές στο γονίδιο *RASSF1A*

Από τις μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με το γονίδιο *RASSF1A*, έχουν βρεθεί αρκετοί πολυμορφισμοί του σε πολλούς τύπους καρκίνου (πνεύμονα, νεφρών, εγκεφάλου κλπ). Οι μελετητές εικάζουν ότι η επιγενετική σίγασή του επιτελείται σύμφωνα με την θεωρία του Knudson ή οι πολυμορφισμοί αυτοί σε συνδυασμό με την επιγενετική σίγασή του έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια λειτουργίας του. Στα σχήματα 3-5 και 3-6 που ακολουθούν, απεικονίζονται οι πολυμορφισμοί που έχουν ταυτοποιηθεί αναφορικά με την θέση τους και τον βιολογικό ρόλο τους, αντίστοιχα.



Σχήμα 3-5. Οι πολυμορφισμοί του *RASSF1A* και οι θέσεις τους στην αλληλουχία του. ⁽⁸⁷⁾



Σχήμα 3-6. Συσχέτιση πολυμορφισμών με τον βιολογικό ρόλο του *RASSF1A*. Οι S203 και T202 είναι μεταλλάξεις. ⁽⁸⁷⁾

Ο πιο μελετημένος πολυμορφισμός είναι ο A133S, που οδηγεί στην αλλαγή της αλανίνης σε σερίνη στην περιοχή ATM της πρωτεΐνης. Η αλλαγή αυτή επιφέρει μεταβολή στην α-έλικα στη δομή της περιοχής και τελικά διαταραχή της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μη ορθή φωσφορυλίωση της περιοχής κατά την επιδιόρθωση του DNA, τον περιορισμό ενεργοποίησης του μονοπατιού MST/LATS/p73. Επίσης,

βλάπτεται η ικανότητα της πρωτεΐνης να ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη αποκρινόμενη σε παράγοντες καταστροφικούς για το DNA και περιορίζει την δραστικότητα του p53.^(84,88) Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι μειώνεται δραματικά ο εντοπισμός του στους μικροσωληνίσκους, δεν μπορεί να επάγει την ακετυλίωση και να αλληλεπιδράσει με την α και την γ τουμπουλίνη (με την β αλληλεπιδρά) και τελικώς οδηγεί σε αποσταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων. Επίσης μπορεί να προωθήσει την διάσπαση της PARP πρωτεΐνης (poly(ADP-ribose) polymerase).^(87,89) Υπάρχουν αναφορές ότι δεν μπορεί να προκαλέσει την διακοπή του κυτταρικού κύκλου αναστέλλοντας την συσσώρευση της κυκλίνης D1.^(81,89,90) Τέλος, υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες σχετικά με την συσχέτιση αυτού του πολυμορφισμού και τους φορείς μεταλλάξεων στα BRCA1/2 γονίδια, όμως όλες συμφωνούν στο ότι η παρουσία του λειτουργεί υπέρ της εμφάνισης καρκίνου.⁽⁹⁰⁻⁹²⁾

Ο πολυμορφισμός S131F της σερίνης σε τρυπτοφάνη εντοπίζεται και αυτός στην περιοχή ATM. Η μεταβολή αυτή δεν φαίνεται να επηρεάζει την παρουσία του RASSF1A στους μικροσωληνίσκους ή την αλληλεπίδραση με την τουμπουλίνη.^(87,93) Η πολυμορφική S131F RASSF1A δεν έχει την ικανότητα να πραγματοποιεί την δια-ενεργοποίηση του μονοπατιού YAP/p73 στην επιδιόρθωση του DNA και την αναστολή της ανάπτυξης και της έκφρασης της κυκλίνης D1.^(88,94)

Ο πολυμορφισμός C65R βρίσκεται πολύ κοντά στην περιοχή C1. Οδηγεί σε μη τυπικό απεντοπισμό της RASSF1A από τους μικροσωληνίσκους, μερική απενεργοποίηση της απόπτωσης, απώλεια της ικανότητας αλληλεπίδρασης με την γ τουμπουλίνη και προώθησης της σταθερότητάς της, δεν έχει την ικανότητα να προωθήσει την αποτελεσματική διάσπαση PARP παρουσία του TNFα και δεν εμποδίζει την ογκογένεση.^(70,87,89)

Ο πολυμορφισμός E246K εντοπίζεται στην περιοχή RA. Το E246K RASSF1A δεν αλληλεπιδρά με την β τουμπουλίνη, μπορεί να προωθήσει αποτελεσματικά την PARP διάσπαση, διατηρεί τον εντοπισμό του στους μικροσωληνίσκους χάνοντας όμως την κατασταλτική του δράση.^(87,89)

Επίσης, έχουν αναφερθεί μια μετάλλαξη μετατόπισης πλαισίου στο κωδικόνιο 277 και μια παρερμηνεύσιμη στο κωδικόνιο 201.^(65,66)

Οι υπόλοιποι πολυμορφισμοί οδηγούν σε ανάλογα αποτελέσματα με τα όσα αναφέρθηκαν προηγούμενα και περισσότερες πληροφορίες μπορεί κανείς να βρει στη βιβλιογραφία.

3.5 Μεθυλίωση του *RASSF1A* και καρκίνος

Ο Agathanggelou και η ομάδα του το 2001 μελετώντας πρωτογενείς όγκους πνεύμονα για την απώλεια του 3p αλληλίου και τον καθορισμό της κατάστασης της μεθυλίωσης της 5' CpG νησίδας του υποκινητή του *RASSF1A* (σε όγκους πνεύμονα, ωοθηκών και μαστού), βρήκαν ότι το *RASSF1A* απενεργοποιείται επιγενετικά μέσω μεθυλίωσης σε υψηλό ποσοστό στον καρκίνο του πνεύμονα και λιγότερο στον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών. Η εργασία αυτή ήταν η πρώτη που απέδειξε ότι το *RASSF1A* δρα ως κλασσικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο βάσει του μοντέλου των «δύο χτυπημάτων» του Knudson.⁽⁹⁵⁾

Την ίδια χρονιά ο Burbee και η ομάδα του μελέτησαν το *RASSF1A* σε όγκους και καρκινικές σειρές πνεύμονα και μαστού. Τα αποτελέσματά τους ήταν ανάλογα με αυτά της ομάδας του Agathanggelou.⁽⁹⁶⁾

Έκτοτε πολλές ομάδες ασχολήθηκαν με την μεθυλίωση του *RASSF1A*, σε πολλούς τύπους καρκίνου, χρησιμοποιώντας κάθε δυνατό βιολογικό υλικό (ιστό, αίμα, πτύελα, ούρα, περιτοναϊκό υγρό κλπ). Στόχος τους ήταν η ανάλυση μεθυλίωσης με πολλές και διαφορετικές τεχνικές, η κατανόηση του μηχανισμού μεθυλίωσης, η συσχέτισή της με κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα, αλλά και τον εάν και κατά πόσο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η μεθυλίωση του *RASSF1A* ως βιοδείκτης.⁽⁹⁷⁻¹¹⁶⁾

Η ομάδα της Starlard-Davenport δημοσίευσε το 2010 μια εργασία στην οποία μελέτησαν το μηχανισμό μεθυλίωσης του γονιδίου σε αρουραίους ACI κατά την οιστρογόνο-επαγόμενη ογκογένεση στο μαστό. Βρήκαν ότι η μεταγραφική καταστολή του γονιδίου στα αρχικά στάδια της ογκογένεσης συνδέεται με αύξηση της μεθυλίωσης των λυσινών 9 και 27 της H3 ιστόνης, καθώς και της de novo μεθυλίωσης των CpG νησίδων του υποκινητή και του πρώτου εξονίου του γονιδίου.⁽¹¹⁷⁾ Η ομάδα του Zhang μελέτησε τον μηχανισμό μεθυλίωσης στην Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (acute lymphoblastic leukemia, ALL). Βρήκαν ότι το p53 δεσμεύεται στο *RASSF1A*, προσλαμβάνει

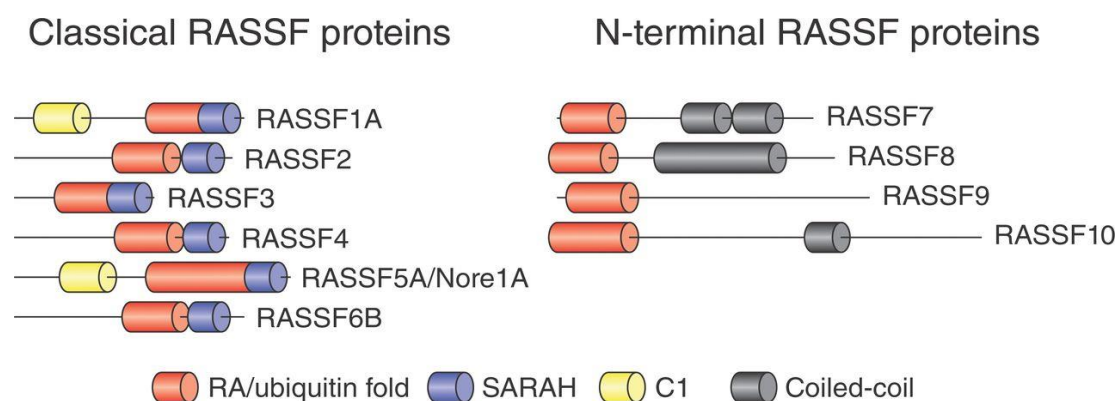
την πρωτεΐνη DAXX (death-associated protein 6) και την DNMT1, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο στην μεθυλίωση του υποκινητή και την απενεργοποίηση του γονιδίου. Επίσης βρήκαν ότι οι αυξομειώσεις των επιπέδων της DAXX συνεισφέρουν αναλογικά στην μεθυλίωση του υποκινητή και ότι η p53/DAXX μεσολάβηση για την μεθυλίωση ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη MDM2 (murine double minute 2).⁽¹¹⁸⁾

Η μεθυλίωση του *RASSF1A* φαίνεται να αποτελεί ιδανικό βιοδείκτη (διαγνωστικό, προγνωστικό, προβλεπτικό) για τον καρκίνο για τρεις κυρίως λόγους. Πρώτον, η μεθυλίωση συμβαίνει σε ένα ευρύ φάσμα τύπων καρκίνου, αλλά και σε μη καρκινογενείς ιστούς παρακείμενους σε όγκους. Η ανίχνευση της μεθυλίωσης μπορεί να πραγματοποιηθεί σε πολλά βιολογικά υλικά σε ιδιαίτερα ευαίσθητες μεθόδους. Δεύτερον, η μεθυλίωση κυμαίνεται από μέτρια προς υψηλά ποσοστά παρέχοντας έτσι μιας υψηλής συχνότητας διαγνωστική κάλυψη. Όσο υψηλότερα είναι τα ποσοστά της μεθυλίωσης τόσο πιο υψηλός είναι ο βαθμός του όγκου, το στάδιο πιο προχωρημένο, η μεταστατική διαδικασία σε εξέλιξη και η πρόγνωση πιο κακή. Τρίτον, πρόκειται για ένα γεγονός που σπάνια παρατηρείται σε υγιείς ιστούς. Η αξία του ως βιοδείκτης έχει κυρίως μελετηθεί σε συνδυασμό και με άλλα γονίδια.^(66,85,115,119-122)

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε ότι ο Kim και οι συνεργάτες του μελέτησαν την υπερμεθυλίωση του γονιδίου στο μητρικό πλάσμα σε κυήσεις με δυσλειτουργία πλακούντα κατά την ενδομητρίως περιορισμένη ανάπτυξη (intrauterine growth restriction, IUGR), την προεκλαμψία (preeclampsia, PE) ή τον πρόδρομο πλακούντα (placental previa, PP), αλλά και το εάν η μεταβολή αυτή μπορεί να ανιχνευθεί πριν την εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων. Μπόρεσαν και ανίχνευσαν την υπερμεθυλίωση πριν την έναρξη των συμπτωμάτων και την θεωρούν ως ένα καλό βιοδείκτη για την πρώιμη ανίχνευση των επιπλοκών ώστε να αποφευχθούν σοβαρά προβλήματα, όπως ο πρόωρος τοκετός, η αποβολή, η αποκόλληση του πλακούντα, η νεφρική ανεπάρκεια, το σύνδρομο HELLP ή ο εμβρυϊκός και μητρικός θάνατος.^(123,124)

3.6 Υπόλοιπα μέλη οικογένειας *RASSF*

Η οικογένεια *RASSF* περιλαμβάνει δέκα πρωτεΐνες (*RASSF1-10*), πολλές από τις οποίες είναι εν δυνάμει καταστολείς των όγκων. Η οικογένεια μπορεί να χωριστεί σε δύο ομάδες, τις κλασσικές ή C-terminal πρωτεΐνες *RASSF* (*RASSF1-6*) και τις N-terminal πρωτεΐνες *RASSF* (*RASSF7-10*). Όλα τα μέλη μοιράζονται τις δομικές περιοχές RA και SARAH (σχήμα 3-7). Οι κλασσικές πρωτεΐνες *RASSF* έχουν συσχετισθεί με μια σειρά βιολογικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης του κυτταρικού θανάτου, τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και τη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων και γενικά θεωρούνται καταστολείς όγκων. Οι N-terminal πρωτεΐνες θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν μια νέα ομάδα τελεστών Ras, με σημαντικές βιολογικές λειτουργίες.⁽⁶⁸⁾



Σχήμα 3-7. Τα μέλη της οικογένειας *RASSF*.⁽⁶⁸⁾

Το *RASSF2* (20p12.1) μεταγράφεται σε δύο κύριες ισομορφές, τις A και C, που στερούνται τις περιοχές C1 και ATM. Σε αντίθεση με τα ισόμορφα *RASSF1A* και *RASSF1C*, είναι πυρηνικές πρωτεΐνες. Το *RASSF2* θεωρείται ένας προ-αποπτωτικός Ras τελεστής που απενεργοποιείται σε ανθρώπινους όγκους μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή, απακετυλίωσης ιστόνης και μερικές φορές απαλοιφή.^(61,63,64,68)

Το *RASSF3* (12q14.2) μετάγραφο είναι παρόν σε πολλούς φυσιολογικούς ιστούς και καρκινικές σειρές. Είναι το μικρότερο μέλος της ομάδας των C-terminal πρωτεϊνών. Αποδείχθηκε πρόσφατα ότι η έκφραση του *RASSF3* επάγει την σταθεροποίηση του p53 με τη διευκόλυνση της ουβικιτινίωσης της MDM2, της E3 λιγάσης του p53. Έτσι, το *RASSF3* μπορεί να ασκήσει

ογκοκατασταλτικά μέσω της p53-εξαρτώμενης απόπτωσης και των μηχανισμών ελέγχου βλαβών του DNA. ^(61,64,66)

Το *RASSF4* (10q11.21) εκφράζεται ευρέως σε φυσιολογικούς ιστούς και η μείωση της έκφρασής του λόγω υπερμεθυλίωση του υποκινητή του ανιχνεύθηκε σε κυτταρικές σειρές όγκων και πρωτογενείς όγκους υποδηλώνοντας ότι θα μπορούσε να δράσει ως καταστολέας όγκου. Εντοπίζεται κυρίως στο κυτοσόλιο αλλά μπορούν να βρεθεί στην πλασματική μεμβράνη όταν είναι ενεργοποιημένο το Ras. ^(61,63,64)

Το *RASSF5* ή *NORE1* (1q32.1) είναι το πιο μελετημένο μέλος, μετά με το *RASSF1A*. Μεταγράφεται σε τουλάχιστον τρεις ισομορφές, μέσω εναλλακτικού ματίσματος και χρήση διαφορεικού υποκινητή, οι οποίες είναι οι *RASSF5A* (*NORE1A*), *RASSF5B* και *RASSF5C* (*NORE1B*). Το *RASSF5* δεσμεύει το ενεργοποιημένο Ras άμεσα και είναι παρόν σε ένα ενδογενές σύμπλοκο με Ras στα κύτταρα. Αποσιωπείται λειτουργικά μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή του. ^(61,64)

Το *RASSF6* (4q13.3) έχει τρεις ισομορφές (A έως C), με διαφορετικά τα πρώτα τους εξώνια. Η πρωτεΐνη συμπεριφέρεται ως καταστολέας όγκων και απενεργοποιείται μέσω επιγενετικών μηχανισμών. Εμπλέκεται σε μηχανισμούς ρύθμισης της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, ίσως έχει ρόλο στην φλεγμονή, μιας και φαίνεται να καταστέλλει το NFκB μονοπάτι. ^(61,63,66)

Το *RASSF7* (11p15.5) έχει τρεις ισομορφές (A έως C), οι οποίες διαφέρουν ως προς το καρβοξυτελικό άκρο και έχουν κοινή την RA περιοχή στο αμινοτελικό τους άκρο. Εκφράζεται σε πολλούς ιστούς και ρυθμίζεται προς τα πάνω σε πολλούς τύπος καρκίνου. Η έκφραση του mRNA του φαίνεται να ενισχύεται κατά τις υποξικές προσβολές. Επάγει την κυτταρική ανάπτυξη μέσω της ρύθμισης του σχηματισμού της ατράκτου προωθώντας την μιτωτική εξέλιξη. ^(63,64,66,68)

Το *RASSF8* (12p12.3) έχει επτά μετάγραφα (A έως G) που περιέχουν μια αμινοτελική περιοχή RA και στερούνται της περιοχής SARAH. Μελέτες δείχνουν ότι ρυθμίζει την ανάπτυξη των όγκων και εμπλέκεται σε διαδικασίες προσκόλλησης κυττάρου-κυττάρου.

Το *RASSF9* (12q21.31) αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική περιοχή του PAM, μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που βρίσκεται σε εκκριτικά κυστίδια των νευρώνων και ενδοκρινών κυττάρων. Η PAM καταλύει την α-αμίδωση βιοδραστικών πεπτιδίων, όπως η οξυτοκίνη και βαζοπρεσίνη. Αυτή η τροποποίηση είναι απαραίτητη για την δραστικότητα αυτών των πεπτιδίων. Η σύνδεση RASSF9-PAM βρέθηκε να συνδέεται με ενδοσώματα ανακύκλωσης.^(63,64,68)

Το *RASSF10* (11p15.2) εκφράζεται σε πολλούς ιστούς και υπερμεθυλίωσή του σχετίζεται με απώλειά του σε πολλούς τύπους καρκίνου. Η προ-αποπτωτική φύση του δείχθηκε να περιλαμβάνει το μονοπάτι σηματοδότησης Wnt/β-κατενίνης. Επιπροσθέτως, μπορεί να παίζει ρόλο στη ρύθμιση της μιτωτικής εξέλιξης λόγω του εντοπισμού του στα κεντροσωμάτια και την σύνδεση των μικροσωληνίσκων.^(63,68)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ *RASSF1*

4.1 Ανάλυση μεθυλίωσης

4.1.1 Εισαγωγή

Οι τεχνικές ανάλυσης μεθυλίωσης, όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 2, είναι πολλές και διαφορετικές. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε το Pyrosequencing, που βασίζεται στην αλληλούχιση του bisulfite converted DNA.

Το 1977 οι Maxam και Gilbert αλλά και ο Sanger παρουσίασαν παράλληλα δύο διαφορετικές τεχνικές αλληλούχισης του DNA. Η τεχνική των Maxam και Gilbert βασίζεται στην αλληλούχιση με χημική διάσπαση ραδιενεργά επισημασμένου DNA στο 5' άκρο και διαχωρισμού των θραυσμάτων με ηλεκτροφόρηση.⁽¹²⁵⁾ Η τεχνική του Sanger βασίζεται στη χρήση φθορίζοντων διδεόξυ νουκλεοτιδίων για τον τερματισμό της σύνθεσης της νέας αλυσίδας του DNA και διαχωρισμό αυτών με ηλεκτροφόρηση.⁽¹²⁶⁾ Και οι δύο αυτές τεχνικές έφεραν επανάσταση, αλλά περισσότερο χρησιμοποιήθηκε και χρησιμοποιείται ακόμη, η μέθοδος Sanger, λόγω της χρήσης φθορίζουσών μορίων και της ευκολίας πραγματοποίησής της, εν σχέση με την πολύπλοκη τεχνική των Maxam και Gilbert.

Από τότε, πολλές ομάδες προσπάθησαν να βελτιώσουν τις τεχνικές αυτές και πλέον έχουμε φτάσει στην 5^{ης} γενιάς αλληλούχιση NGS (Next Generation Sequencing), με χαμηλό κόστος, λιγότερο χρόνο ανάλυσης, πιο ευαίσθητες, αξιόπιστες και εύκολες στην εκτέλεση τεχνικές.

4.1.2 Pyrosequencing

Η μέθοδος του Pyrosequencing είναι μια μέθοδος sequencing by synthesis (SBS, αλληλούχιση κατά τη σύνθεση) που επινόησε ο Ronaghi και οι συνεργάτες του στο Πανεπιστήμιο του Stanford το 1996.⁽¹²⁷⁾ Προκειμένου να αναπτύξουν αυτή τη μέθοδο, βασίστηκαν στις παρατηρήσεις της ομάδας του Nyren ότι ο πολυμερισμός του DNA μπορεί να παρακολουθείται σε

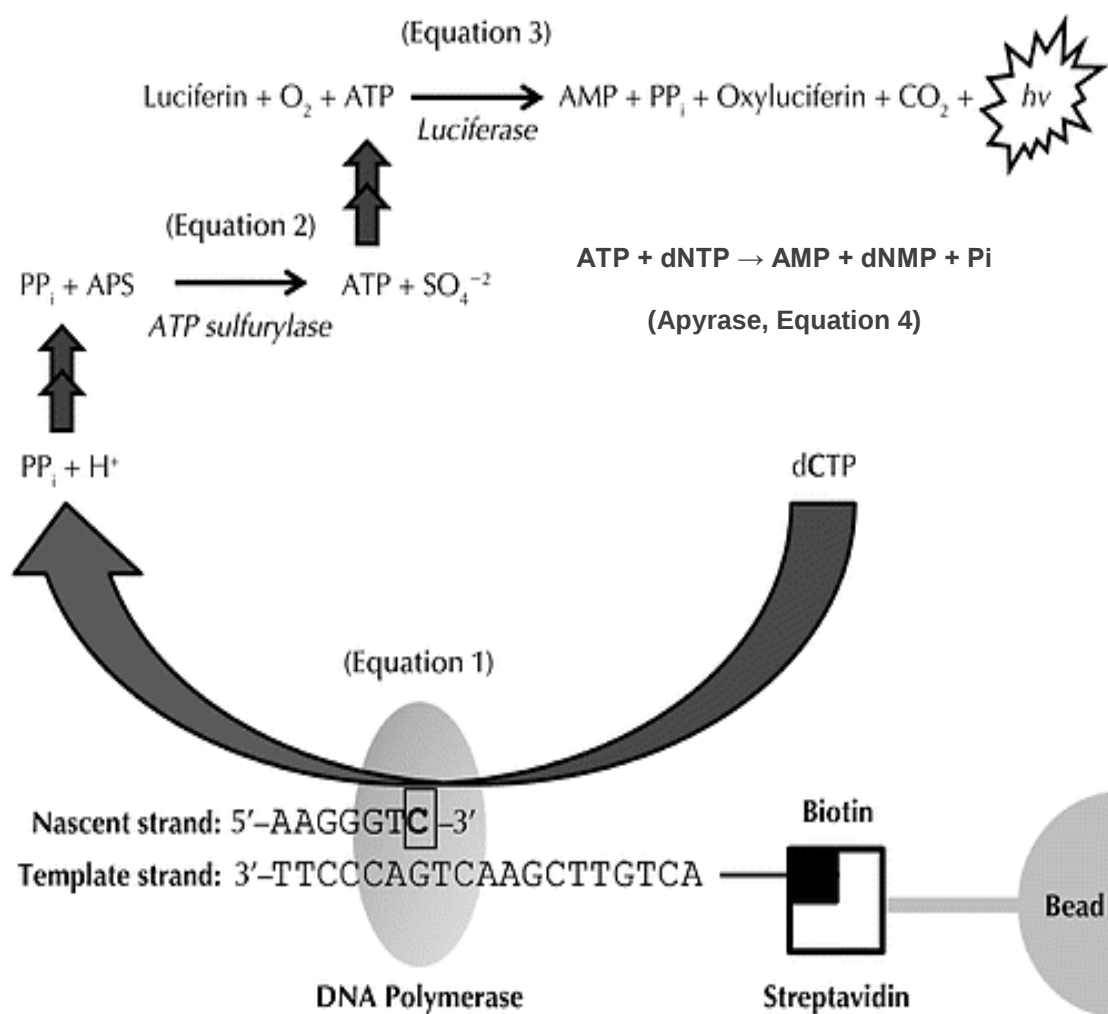
πραγματικό χρόνο με την μέτρηση παραγωγής του πυροφωσφορικού (σύστημα ELIDA) κατά την δράση της DNA πολυμεράσης.⁽¹²⁸⁾

Το Pyrosequencing βασίζεται στην ανίχνευση του απελευθερωμένου πυροφωσφορικού (PPi) κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA. Τα στάδια της τεχνικής περιγράφονται ακολούθως (οι χημικές αντιδράσεις που διέπουν την τεχνική και σχηματικά η τεχνική παρουσιάζονται στο σχήμα 4-1):

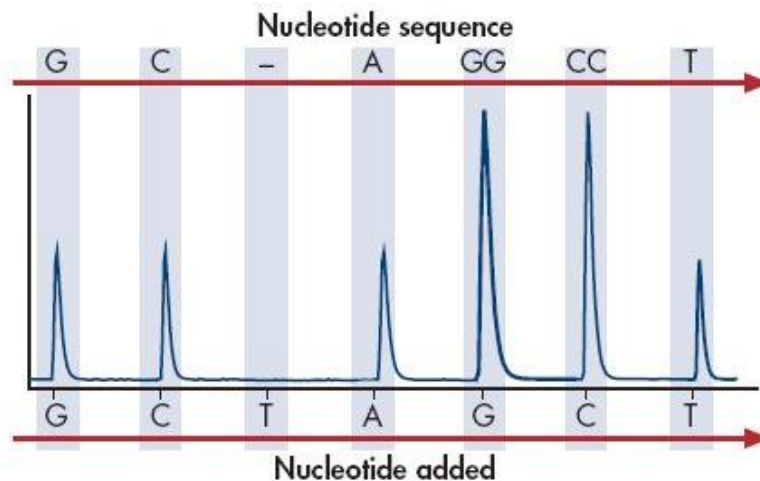
1. Πριν την ανάλυση της περιοχής ενδιαφέροντος, πραγματοποιείται ενίσχυση αυτής με PCR χρησιμοποιώντας βιοτινιλιωμένο ανάστροφο εκκινητή. Αυτό επιτρέπει την σταθερή ακινητοποίηση των προϊόντων της PCR πάνω σε σφαιρίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη μέσω της εξαιρετικά ισχυρής πρόσδεσης αβιδίνης-βιοτίνης. Για την ανάλυση χρησιμοποιείται ο μη-νοηματικός κλώνος (antisense strand) ως εκμαγείο και με αυτό τον τρόπο με το Pyrosequencing παράγεται ο νοηματικός κλώνος (sense sequence). Ακολουθεί έκπλυση των προϊόντων της PCR για την απομάκρυνση περίσσειας αντιδραστηρίων και επώαση με το ενζυμικό σύστημα που χρησιμοποιείται στο Pyrosequencing. Το σύστημα αυτό αποτελείται από τα ένζυμα DNA πολυμεράση (θραύσμα Klenow), ATP σουλφορυλάση, λουσιφεράση και απυράση καθώς και τα υποστρώματα, adenosine 5' phosphosulfate (APS) και λουσιφερίνη.
2. Η προσθήκη των dNTPs γίνεται κυκλικά και με προκαθορισμένη σειρά (ανά 65 περίπου sec). Το πρώτο από τα τέσσερα dNTP προστίθεται στην αντίδραση και η DNA πολυμεράση το ενσωματώνει στην αλυσίδα του DNA εάν είναι συμπληρωματικό με την βάση της αλυσίδας (equation 1 σχήμα 4-1). Κάθε ενσωμάτωση νουκλεοτιδίου συνοδεύεται από απελευθέρωση πυροφωσφορικού (PPi) σε ισογραμμομοριακή ποσότητα με την ποσότητα του ενσωματωμένου νουκλεοτιδίου (3 - 4 sec περίπου).
3. Η ATP σουλφαρυλάση μετατρέπει ποσοτικά το PPi σε ATP παρουσία του APS (equation 2, σχήμα 4-1). Αυτό το ATP οδηγεί στην μετατροπή της λουσιφερίνης σε οξυλουσιφερίνη απελευθερώνοντας ορατό φώς σε ποσότητες ανάλογες με την ποσότητα του ATP (equation 3, σχήμα 4-1). Το φώς που παράγεται (σε λιγότερο από 0,2 sec) από την αντίδραση που καταλύει η λουσιφεράση ανιχνεύεται από μια κάμερα CCD (charge coupled device) και φαίνεται ως κορυφή στο πυρόγραμμα (σχήμα 4-2). Το

ύψος της κάθε κορυφής είναι ανάλογο με των αριθμό των νουκλεοτιδίων που ενσωματώθηκαν.

4. Η απυράση αποδιατάσσει το ATP και τα dNTPs που δεν ενσωματώθηκαν (equation 4, σχήμα 4-1). Αυτό «σβήνει το φώς» και ανανεώνει το διάλυμα της αντίδρασης. Στη συνέχεια προστίθεται το επόμενο dNTP. Καθώς η διαδικασία συνεχίζεται, η συμπληρωματική αλυσίδα του DNA δημιουργείται και η σειρά των νουκλεοτιδίων καθορίζεται από το σήμα των κορυφών στο πυρόγραμμα (σχήμα 5-2). ⁽¹²⁹⁻¹³²⁾



Σχήμα 4-1. Οι χημικές αντιδράσεις και η σχηματική αναπαράσταση του Pyrosequencing. ⁽¹²⁹⁾



Σχήμα 4-2. Το πυρόγραμμα. (<http://www.qiagen.com>)

Κάθε κορυφή στο πυρόγραμμα δείχνει ότι το προστιθέμενο νουκλεοτίδιο όντως έχει ενσωματωθεί στην αλυσίδα, ενώ αν δεν υπάρχει κορυφή σημαίνει ότι δεν ήταν το κατάλληλο για να εισαχθεί στον αυξανόμενο κλώνο. Όσο πιο υψηλή είναι η κορυφή τόσο περισσότερα ίδια νουκλεοτίδια έχουν προστεθεί. Η αύξουσα κλίση της καμπύλης αντιπροσωπεύει την δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης και της ATP σουλφορυλάσης, το ύψος του σήματος δείχνει την δραστηριότητα της λουσιφεράσης και η φθίνουσα κλίση το νουκλεοτίδιο που αποδομείται. ⁽¹³²⁾

Επειδή η dATP αποτελεί υπόστρωμα της λουσιφεράσης και μπορεί να ληφθούν ψευδώς θετικά σήματα για την αδερίνη, αντ'αυτής χρησιμοποιείται η dATP-α-S (deoxyadenosine α-thio triphosphate). Η προσθήκη της dATP-α-S έχει ως αποτέλεσμα να λαμβάνεται υψηλότερη κορυφή, σε σύγκριση με την κορυφή που λαμβάνεται από την προσθήκη της dATP, αλλά το λογισμικό πρόγραμμα που χρησιμοποιείται σε κάθε Pyrosequencer έχει ενσωματωμένη την πληροφορία αυτή. ^(130,131)

Η απομάκρυνση των αντιδραστηρίων, κυρίως των νουκλεοτιδίων, που βρίσκονται σε περίσσεια αποτελεί κρίσιμο στάδιο για την ανάλυση. Η απομάκρυνση γίνεται με δύο τρόπους, ανάλογα με την στρατηγική Pyrosequencing που χρησιμοποιείται. Στην στερεάς φάσης στρατηγική Pyrosequencing χρησιμοποιούνται τα τρία πρώτα ένζυμα (δεν χρησιμοποιείται απυράση) και πριν την προσθήκη νέου dNTP γίνεται έκπλυση. Στην υγρής φάσης στρατηγική Pyrosequencing, χρησιμοποιούνται

και τα τέσσερα ένζυμα από την αρχή (και η απυράση). Η χρήση του αποικοδομητικού ενζύμου της απυράσης είναι καθοριστική. Ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις δρα καταλυτικά και σταθεροποιεί την έναρξη δίχως διακυμάνσεις στην διαδικασία της αλληλούχησης. ⁽¹³²⁾

4.1.3 Ανάλυση μεθυλίωσης με Pyrosequencing

Το Bisulfite Pyrosequencing (BS) είναι SBS μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεθυλιωμένων CpGs. Πριν την ενίσχυση του επιθυμητού κλώνου, το DNA υφίσταται τροποποίηση με όξινο θειώδες νάτριο ώστε οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες να μετατραπούν σε ουρακίλες. Μετά την ενίσχυση, οι ουρακίλες ενισχύονται ως θυμίνες ενώ οι 5mCs θα παραμείνουν ως κυτοσίνες. Με τον τρόπο αυτό διακρίνονται τα μεθυλιωμένα CpGs από τα μη μεθυλιωμένα. Το προϊόν (dsDNA, double stranded DNA) που λαμβάνεται μετά την PCR είναι ανώμαλο σε δύο απόψεις: περιέχει μόνο τρεις τύπους νουκλεοτιδίων σε κάθε κλώνο (A, G, T έναντι A, C, T) και κάθε σκέλος έχει μία περίσσεια ενός νουκλεοτιδίου (T ή A, αντίστοιχα). Το ποσοστό της μεθυλίωσης (%) σε κάθε CpG θέση προσδιορίζεται από την αναλογία θυμίνης/κυτοσίνης+θυμίνης. ⁽¹³³⁻¹³⁶⁾

4.1.4 Εφαρμογές και πλεονεκτήματα Pyrosequencing

Με την έλευση του Pyrosequencing εμφανίστηκαν νέες δυνατότητες ανάλυσης του DNA, καθώς είναι η κατάλληλη μέθοδος τόσο για την αλληλούχηση όσο και για την επανααλληλούχηση του DNA σε τεχνικές μαζικής παράλληλης αλληλούχησης. ⁽¹²⁹⁾

Χρησιμοποιείται σε πολλές εφαρμογές όπως την γονοτύπηση SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) και την ανίχνευση μεταλλάξεων (γνωστών και αγνώστων), την ταυτοποίηση βακτηρίων, ιών και μυκήτων, τον καθορισμό δύσκολων δευτεροταγών δομών, την ανίχνευση μεθυλίωσης του DNA, την αλληλούχηση EST (expressed sequence tags) cDNA βιβλιοθηκών, την εύρεση σύντομων διαδοχικών επαναλήψεων (short tandem repeats), τον καθορισμό των HLA αλληλίων, την RNA αλληλούχηση, αλλά και την αλληλούχηση του συνόλου των εξονίων ή/και ολόκληρου του γονιδιώματος, πχ στον NGS αναλυτή 454 της Roche. ^(130,132,137-140)

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αναφέρονται στον πίνακα 4-1.

Πίνακας 4-1. Πλεονεκτήματα Pyrosequencing. ⁽¹³²⁾

Δεν απαιτούνται επισημασμένοι εκκινητές ή άλλα μόρια και ηλεκτροφόρηση
Γρήγορη (~ 1 ημέρα)
Υψηλής απόδοσης
Η αλληλουχία μπορεί να έχει μήκος έως και 500 bp
Απεριόριστος αριθμός δειγμάτων
Εύκολη ενσωμάτωση σε PCR πρωτόκολλα
Αυξημένη ευαισθησία (5-10%) εν σχέση με το Bisulfite Sequencing (15-20%)
Κατάλληλη για αλληλούχιση βραχέων εκτάσεων DNA (πχ έως 500 βάσεις), λόγω της γρήγορης και σε πραγματικό χρόνο ανάγνωσης των αποτελεσμάτων και με χαμηλό κόστος εν σχέση με άλλες μεθόδους
Παράγει σήμα αλληλουχίας αμέσως μετά τον εκκινητή και τα δεδομένα είναι απλά
Η προετοιμασία των δειγμάτων και μονόκλωνων DNA είναι σχετικά γρήγορη
Ποσοτική ανάλυση σημαντικού αριθμού CpGs

4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

4.2.1 Επισκόπηση μεθόδου

Την δεκαετία του 1980 ο Mullis και οι συνεργάτες του αναφέρουν μια μέθοδο με την οποία κατάφεραν και πολλαπλασίασαν γενετικό υλικό in vitro. ^(141,142)

Το 1993 ο Mullis έλαβε το Νόμπελ Χημείας για την ανάπτυξη της PCR μεθόδου.

Η PCR είναι μια μέθοδος αποτελεσματική για την *in vitro* παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων DNA. Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία που μας ενδιαφέρει και πρόκειται να ενισχυθεί. Οι παράγοντες που επιδρούν στην επιτυχημένη έκβαση μιας PCR είναι:

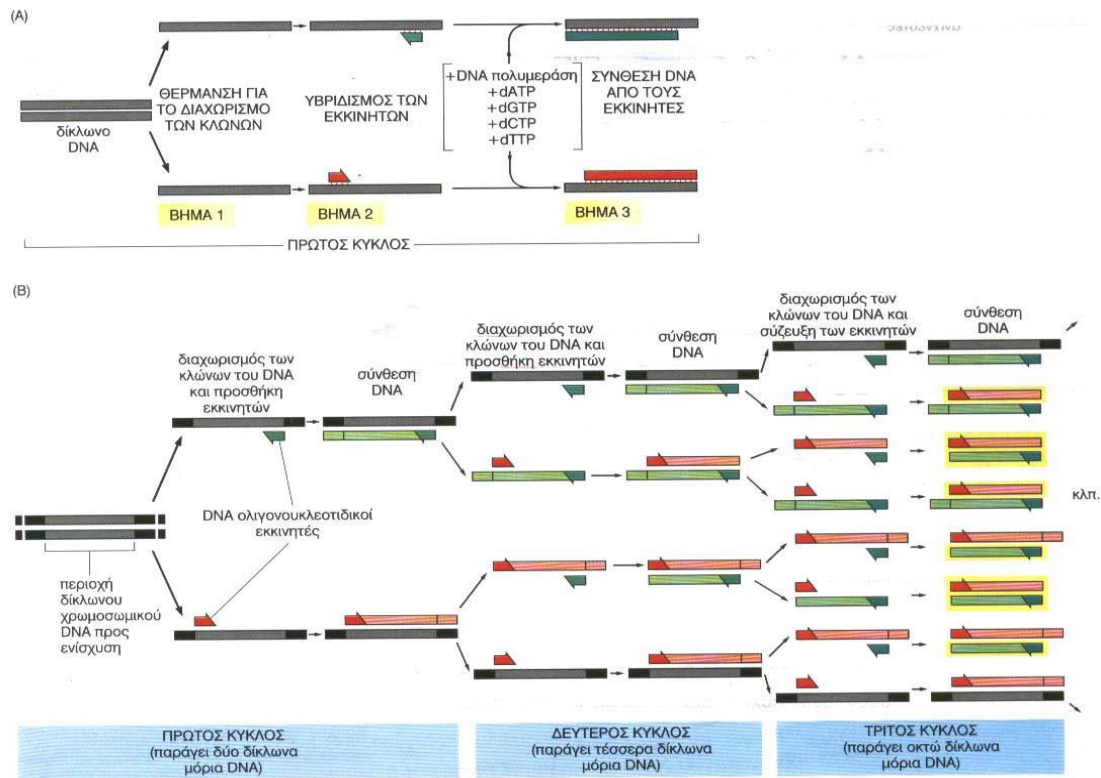
- Οι συνθετικοί νουκλεοτιδικοί εκκινητές (μήκους ~20 νουκλεοτιδίων ο καθένας, εκκινητές). Οι εκκινητές είναι συμπληρωματικοί συγκεκριμένων περιοχών και στις δυο αλυσίδες έτσι ώστε να περικλείεται ανάμεσα τους η επιθυμητή περιοχή DNA. Μετά τον υβριδισμό στο DNA στόχο έχουν τα 3' –OH άκρα αντικριστά μεταξύ τους.
- Η θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών.
- Μια αλληλουχία στόχος, δείγματος DNA, που βρίσκεται μεταξύ του ζεύγους των εκκινητών και μπορεί να έχουν μήκος 100-3500 bp.
- Η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Taq), ώστε να αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη του DNA.
- Η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου Mg^{2+} .
- Η παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος και αντιδραστήριων που δρουν ενισχυτικά ή ανασταλτικά.
- Η συγκέντρωση των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP ή αλλιώς dNTPs).
- Ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης.

Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για την σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλωνα μόρια μπορούν να παραχθούν με απλό τρόπο από δίκλωνα μόρια του DNA, όταν θερμαινόμενα σε υψηλές θερμοκρασίες αποδιατάσσονται. Η DNA πολυμεράση απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Επομένως το σημείο έναρξης της σύνθεσης του DNA καθορίζεται από τους χρησιμοποιούμενους εκκινητές, που συνδέονται με την μήτρα σε αυτά ακριβώς τα σημεία. Έτσι με την κατάλληλη επιλογή εκκινητών μπορούμε να κατευθύνουμε τη DNA πολυμεράση να συνθέσει συγκεκριμένη περιοχή του DNA.

Μία τυπική διαδικασία PCR περιέχει έναν αριθμό επαναλαμβανόμενων κυκλικών διαδικασιών, για τον πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Κάθε κύκλος περιέχει τρία βήματα (σχήμα 4-3):

- 1^ο βήμα / Αποδιάταξη εκμαγείου (template denaturation). Το πρώτο στάδιο είναι η θερμική αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας στόχου, που επιτυγχάνεται αυξάνοντας τη θερμοκρασία στο δοχείο αντίδρασης στους 94-95°C. Σε αυτήν τη θερμοκρασία, λύνονται οι δεσμοί υδρογόνου που κρατούν τις δύο αλυσίδες του μορίου και το δίκλωνο DNA μεταπίπτει σε μονόκλωνο DNA. Η πλήρης αποδιάταξη είναι πολύ σημαντική, ειδικά αν το εκμαγείο έχει υψηλό ποσοστό βάσεων GC (GC %) ή αν υπάρχουν δευτεροταγείς δομές.
- 2^ο βήμα / Υβριδισμός εκκινητών (primer annealing). Η θερμοκρασία του μίγματος σταδιακά κατεβαίνει μέχρι την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m), η οποία ποικίλει ανάλογα με τις ακολουθίες τους. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου οι εκκινητές σχηματίζουν ζεύγη βάσεων με τις συμπληρωματικές περιοχές του DNA στόχου.
- 3^ο βήμα / Επιμήκυνση αλυσίδας (chain elongation). Η θερμοκρασία αυξάνεται στη βέλτιστη θερμοκρασία για την καταλυτική δράση της πολυμεράσης (συνήθως 72°C). Η πολυμεράση καταλύει τη σύνθεση του DNA με επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5'-3', χρησιμοποιώντας τα δεοξυριβονουκλεοτίδια που βρίσκονται στο διάλυμα και έχοντας ως καλούπι τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Ο χρόνος επώασης ποικίλει ανάλογα με το μήκος του τμήματος στόχο. Η σύνθεση του DNA αρχίζει στο 3' -OH άκρο κάθε εκκινητή.

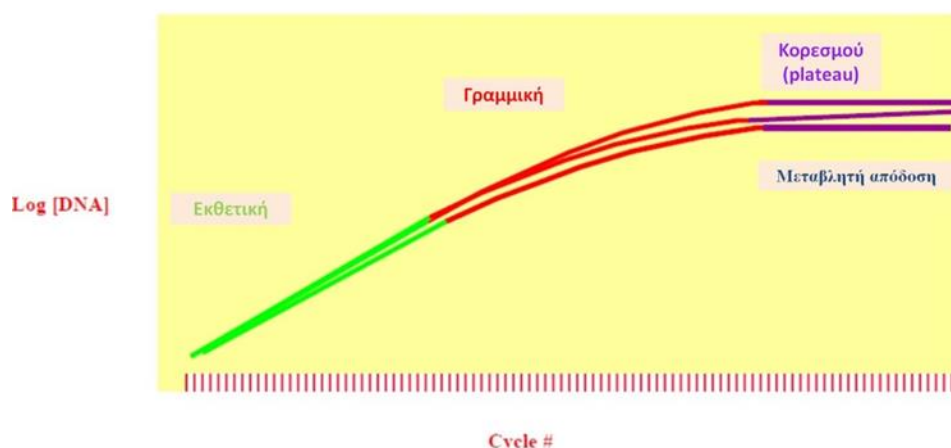
Αυτά τα τρία βήματα επαναλαμβάνονται αρκετές φορές (συνήθως 25 με 40) κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης. Σε κάθε νέο κύκλο, χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο και τα προϊόντα των προηγούμενων. Έτσι, ο αριθμός των αντιγραμμένων αλληλουχιών αυξάνεται εκθετικά (θεωρητικά 2ⁿ). Το κύριο προϊόν της εκθετικής αυτής αντίδρασης είναι ένα δίκλωνο τμήμα DNA του οποίου τα άκρα ορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών και έχει μήκος ίσο με την απόσταση των δύο εκκινητών.



Σχήμα 4-3. Σχηματική αναπαράσταση της PCR. (A) Αναπαράσταση του πρώτου κύκλου της PCR. (B) Αναπαράσταση των τριών πρώτων κύκλων. (<http://panacea.med.uoa.gr>)

Από κινητικής άποψης, μια βασική αντίδραση PCR μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις (σχήμα 4-4):

- **Εκθετική φάση:** Σε κάθε κύκλο συσσωρεύεται διπλασιασμένο προϊόν (υποθέτοντας 100% απόδοση της αντίδρασης). Η αντίδραση είναι πολύ ειδική και ακριβής. Η εκθετική ενίσχυση πραγματοποιείται επειδή όλα τα αντιδραστήρια είναι φρέσκα και διαθέσιμα και η κινητική της αντίδρασης ωθεί την αντίδραση προς το διπλασιασμό των προϊόντων.
- **Γραμμική φάση (υψηλή μεταβλητότητα):** Τα συστατικά της αντίδρασης έχουν αρχίσει να καταναλώνονται, η αντίδραση επιβραδύνεται και τα προϊόντα αρχίζουν να αποικοδομούνται.
- **Φάση κορεσμού - Plateau:** Η αντίδραση έχει σταματήσει, δεν παράγονται άλλα προϊόντα και αν μείνει αρκετό διάστημα σε αυτή τη φάση, τα PCR προϊόντα θα αρχίσουν να αποικοδομούνται. Η φάση κορεσμού είναι το σημείο όπου γίνεται συνήθως η μέτρηση/ανίχνευση της παραδοσιακής PCR, επίσης γνωστή ως ανίχνευση τελικού σημείου (end-point).



Σχήμα 4-4. Η κινητική της PCR. (www.lifetechnologies.com)

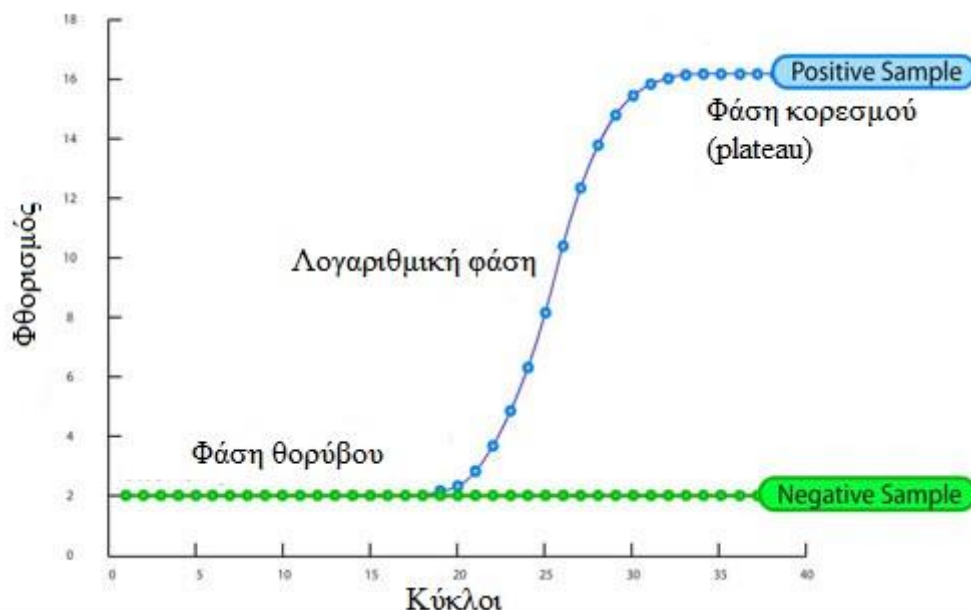
4.2.2 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time qPCR)

Η real-time qPCR ακολουθεί τις αρχές της συμβατικής PCR με την διαφορά ότι το πολλαπλασιαζόμενο DNA ανιχνεύεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σε «πραγματικό χρόνο», συνδυάζοντας έτσι ενίσχυση και ανίχνευση σε ένα μόνο βήμα. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας μια ποικιλία από διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ιχνηθέτηση του παραγόμενου προϊόντος, μετράται η ένταση του παραγόμενου φθορισμού και, τελικά, η συγκέντρωση συσχετίζεται με την ένταση του φθορισμού. Οι δυο κοινές μέθοδοι ανίχνευσης των προϊόντων είναι:

1. Μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται στην διπλή έλικα του DNA, όπως οι SYBR Green, LC Green, Eva Green, Cyto9.
2. Ειδικές αλληλουχίες DNA ανιχνευτών οι οποίοι αποτελούνται από ολιγονουκλεοτίδια επισημασμένα με φθορίζουσα ουσία η οποία επιτρέπει την ανίχνευση μόνο μετά από υβριδισμό του ανιχνευτή με την συμπληρωματική του αλληλουχία, όπως οι ανιχνευτές υδρόλυσης διπλής χρωστικής τύπου TaqMan, οι ανιχνευτές υβριδισμού (hybridization probes), οι μοριακοί φάροι (molecular beacons) κλπ

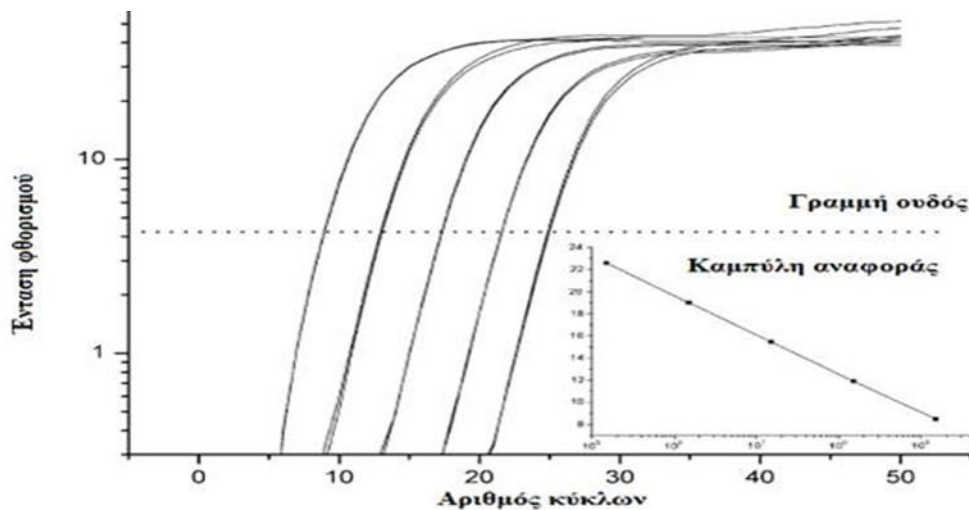
Η real-time qPCR αποτελείται από τρεις φάσεις: την πρώιμη φάση υποβάθρου ή φάση θορύβου, την εκθετική φάση ή λογαριθμική φάση και την φάση κορεσμού (σχήμα 4-5). Σε κάθε αντίδραση real-time PCR χρησιμοποιούμε πάντα έναν θετικό μάρτυρα (positive control) για να

βεβαιώνεται η ορθότητα της αντίδρασης και ένα αρνητικό μάρτυρα (negative control) για να βεβαιώνεται η καθαρότητα των αντιδραστηρίων. ^(143,144)



Σχήμα 4-5. Η κινητική της real-time qPCR. ^(www.abbottmolecular.com)

Η ανίχνευση γίνεται στην λογαριθμική φάση, όπου το λαμβανόμενο σήμα αυξάνει ευθέως ανάλογα με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος. Ο κύκλος όπου αρχίζει η λογαριθμική φάση υπολογίζεται με κατάλληλο λογισμικό, ορίζεται από το σημείο τομής C_p (Crossing point) ή C_q (quantification cycle), σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες MIQE, και είναι αντιστρόφως ανάλογο της αρχικής ποσότητας DNA ή cDNA που υπήρχε στα δείγματα. Όσο μικρότερο είναι το C_q τόσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα του γενετικού υλικού. Χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα με γνωστές συγκεντρώσεις κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς, η οποία εκφράζει την σχέση της συγκέντρωσης ($\log C$) ως προς τα σημεία τομής C_q . Με βάση την κλίση της ευθείας (slope) και την εξίσωση $E = 10^{-1/\text{κλίση}}$ μπορεί να γίνει ο υπολογισμός της απόδοσης της αντίδρασης (E). Με βάση την κλίση και το σημείο τομής με τον άξονα Y (intercept) μπορεί να ληφθεί η εξίσωση βαθμονόμησης της μεθόδου και να εξακολουθήσει η ποσοτικοποίηση αγνώστων δειγμάτων (σχήμα 4-6). ^(143,145,146)



Σχήμα 4-6 Καμπύλη βαθμονόμησης qPCR. ⁽¹⁴⁶⁾

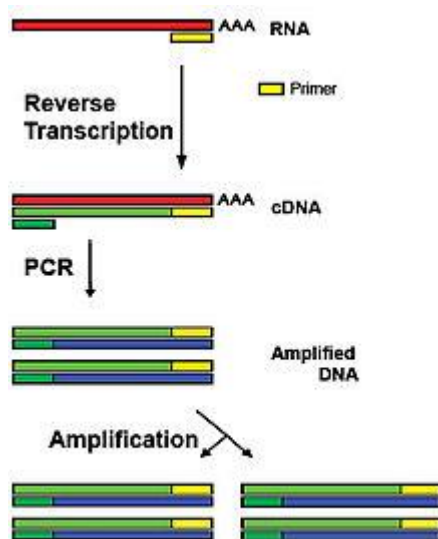
Υπάρχουν δύο μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού:

1. Ο απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός, όπου η συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου εκφράζεται ως απόλυτη τιμή, η οποία καθορίζεται με την βοήθεια διαγράμματος βαθμονόμησης με πρότυπα διαλύματα κεκαθαρμένα και ποσοτικοποιημένα (PCR amplicons). Μπορεί να γίνει με καμπύλη βαθμονόμησης (χρήση προτύπων διαλυμάτων) ή με καμπύλη βαθμονόμησης και χρήση εσωτερικού προτύπου.
2. Ο σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός, όπου η συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου εκφράζεται σε σχέση με την συγκέντρωση ενός γονιδίου αναφοράς (reference gene). Στην περίπτωση αυτή η καμπύλη βαθμονόμησης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης γονιδίου-στόχου και του γονιδίου αναφοράς, μπορεί να γίνει με κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης ή με χρήση βαθμονομητή. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται βαθμονομητής, για κάθε άγνωστο δείγμα και τον βαθμονομητή προσδιορίζεται η σχετική ποσότητα του γονιδίου-στόχου και ενός γονιδίου αναφοράς. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο λόγος (τιμή γονιδίου-στόχου/τιμή γονιδίου αναφοράς) στο άγνωστο δείγμα προς τον λόγο (τιμή γονιδίου-στόχου/τιμή γονιδίου αναφοράς) στο βαθμονομητή ή με τη $2^{-\Delta\Delta Cq}$ μέθοδο. ^(147,148)

Η real-time qPCR χρησιμοποιείται και για την ανίχνευση αλλαγών στο DNA όταν μετά την ενίσχυση παρουσία ειδικών χρωστικών ή ανιχνευτών, ακολουθεί ανάλυση καμπυλών τήξης (melting curve analysis).

4.2.3 Αντίστροφης μεταγραφής ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (reverse transcription qPCR, RT-qPCR)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση (ποιοτική ή ποσοτική) της γονιδιακής έκφρασης μέσω της δημιουργίας συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA) από απομονωθέν RNA, με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Ακολούθως ενισχύεται το παραχθέν cDNA με οποιαδήποτε από τις μεθόδους PCR (σχήμα 4-7).^(149,150)



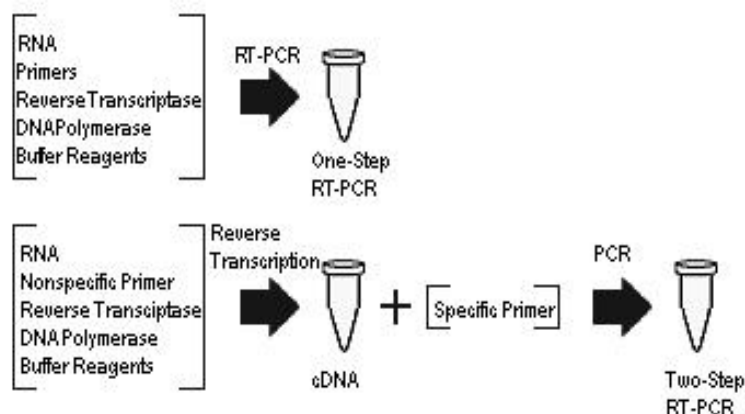
Σχήμα 4-7. Αναπαράσταση RT-PCR. (<https://en.wikipedia.org>)

Η χρήση της RT-PCR για την ανίχνευση του RNA έχει φέρει επανάσταση στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης καθώς:

- Κατέστησε θεωρητικά δυνατή την ανίχνευση των μεταγράφων σχεδόν κάθε γονιδίου.⁽¹⁵¹⁾
- Ενεργοποίησε την ενίσχυση του δείγματος και εξάλειψε την ανάγκη για άφθονη πρώτη ύλη που αντιμετώπιζει κανείς στη northern blot ανάλυση.^(152,153)
- Επέφερε ανοχή στην αποικοδόμηση του RNA μετά την πρόσδεση των εκκινητές στο RNA.⁽¹⁵²⁾

Η ενίσχυση για την ποσοτικοποίηση μπορεί να επιτευχθεί σε ένα ή δύο στάδια. Στην αντίδραση ενός σταδίου (One-Step RT-PCR) παράγεται το cDNA και ενισχύεται με PCR στον ίδιο σωλήνα, καθώς περιέχει όλα τα αντιδραστήρια. Στην αντίδραση δύο σταδίων (Two-step RT-PCR), αρχικά

παράγεται το cDNA και είτε αποθηκεύεται στους -20°C είτε μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και ενισχύεται ακολούθως (σχήμα 4-8).⁽¹⁴⁵⁾



Σχήμα 4-8. One-step και Two-step RT-PCR. (<https://upload.wikimedia.org>)

Η ποσοτικοποίηση μπορεί να γίνει με την μέθοδο του τελικού σταδίου ή σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR). Στην τελικού σταδίου ποσοτικοποίηση το προϊόν ανιχνεύεται με ραδιοϊχνηθέτηση, χρώση gel αγαρόζης με βρωμιούχο αιθίδιο ή άλλες χρωστικές και ποσοτικοποιείται με χρήση της σχετικής, της ανταγωνιστικής ή της συγκριτικής μεθόδου.^(147,148,154) Στην Real-time RT-qPCR η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των προϊόντων γίνεται με SYBR Green, ανιχνευτές τύπου TaqMan, μοριακούς φάρους ή σκορπιούς (Scorpions).⁽¹⁵⁵⁾

Η real-time RT-qPCR έχει χρησιμοποιηθεί σε ερευνητικές μελέτες για την εκτίμηση της έκφρασης βακτηριακών γονιδίων, του ιικού φορτίου RNA ιών, για την εκτίμηση της κατάστασης ασθενών με καρκίνο ή για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Επίσης χρησιμοποιείται για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών.⁽¹⁵⁰⁾

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Δείγματα ασθενών.

Ογδόντα ένας ιστοί μαστού από γυναίκες ασθενείς με καρκίνο του μαστού και τέσσερις φυσιολογικοί ιστοί μαστού από γυναίκες με καλοήθειες ή μετά από πλαστική χειρουργική συλλέχτηκαν από το Παθολογοανατομικό εργαστήριο του Ευγενιδείου Νοσοκομείου (υπεύθυνος Επίκουρος Καθηγητής Ν. Γούτας) κατά κύριο λόγο από κατοίκους από την ευρύτερη περιοχή των Αθηνών κατά την περίοδο 2007-2011. Τα κύρια κριτήρια ήταν η διαθεσιμότητα του υλικού, η περιεκτικότητα του υλικού σε καρκινικά κύτταρα σε ποσοστό >70% στην ταχεία βιοψία και η έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών (το οικογενειακό ιστορικό δεν χρησιμοποιήθηκε ως κριτήριο για την επιλογή των ασθενών στη μελέτη). Η μελέτη εγκρίθηκε και από την επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας καθώς και από το επιστημονικό συμβούλιο του Ευγενιδείου Νοσοκομείου. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε σταθεροποιητικό υλικό RNA Later (Ambion, ΗΠΑ) για δύο μέρες τουλάχιστον στους 4°C και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η απομόνωση του ολικού RNA και DNA.

Ο ιστολογικός τύπος και ο βαθμός διαφοροποίησης αποδόθηκαν σύμφωνα με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας και τα τροποποιημένα κριτήρια των Bloom - Richardson. Καταγράφηκαν επίσης τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών (ηλικία, μέγεθος όγκου, λεμφαδενική διήθηση, μεταστάσεις). Εξετάστηκαν με ανοσοϊστοχημεία οι υποδοχείς οιστρογόνων, προγεστερόνης και η υπερέκφραση του HER2. Στην περίπτωση που η τιμή για το HER2 ήταν ενδιάμεση (δηλαδή 2+) εξεταζόταν στη συνέχεια και με τη μέθοδο CISH για να αποδοθεί θετική ή αρνητική τιμή.

5.2 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του ολικού DNA χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin® Genomic DNA from Tissue kit (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία) το οποίο

βασίζεται στην ειδική σύνθεση της μεμβράνης της στήλης που περιέχει οξείδιο του πυριτίου (silica membrane).

Το NucleoSpin® Genomic DNA from Tissue kit επιτρέπει την απομόνωση καθαρού DNA με αναλογία A260/A280 1,7 έως 1,9. Το απομονωμένο DNA είναι έτοιμο προς χρήση για εφαρμογές PCR, κλπ. Το κλασικό πρωτόκολλο επιτρέπει τον καθαρισμό έως 35 µg ολικού DNA ανά NucleoSpin® στήλη από 25 mg ιστού.

5.2.1 Αντιδραστήρια / αναλώσιμα υλικά / εξοπλισμός

- Υγρό άζωτο
- Ρυθμιστικό διάλυμα T1 (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- NucleoSpin® στήλες (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα B3 (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνάση K (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης για την πρωτεΐνάση K (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα B3 (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Αιθανόλη 100 % (Scharlab, Ισπανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα BW (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα B5 (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης BE (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Επωαστήρας σωληναρίων (Grant, Ηνωμένο Βασίλειο)
- Συσκευή Vortex (Fisher, ΗΠΑ)
- Μικροφυγόκεντρος Minispin plus (Eppendorf, Γερμανία)
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5 mL

5.2.2 Πειραματική πορεία

Η πειραματική πορεία απομόνωσης του ολικού DNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ακόλουθη:

- 1) Προετοιμασία δείγματος: απομακρύνεται το διάλυμα RNeasy® και ~25 mg ιστού κονιορτοποιούνται πλήρως σε γουδί με την προσθήκη υγρού αζώτου. Ο κονιορτοποιημένος ιστός μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5 mL.

- 2) Κυτταρική λύση: προστίθενται 180 μL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης T1 και 25 μL πρωτεΐνάση K (που έχει ήδη διαλυθεί στο ρυθμιστικό της διάλυμα) στον κονιορτοποιημένο ιστό, ακολουθεί έντονη ανάδευση και επωάζεται στους 56°C για 1-3 ώρες μέχρι να γίνει διάφανο.
- 3) Ρύθμιση συνθηκών πρόσδεσης του DNA: προστίθενται 210 μL αιθανόλης 100 % στο μίγμα με επακόλουθη έντονη ανάδευση.
- 4) Πρόσδεση του DNA: το μείγμα προστίθεται στην NucleoSpin® στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 min στα $11.000\times g$
- 5) Εκλύσεις και στέγνωμα της μεμβράνης πυριτίου:
 - 1η έκπλυση: Προστίθενται 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης BW στην NucleoSpin® στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1min στα $11.000\times g$. Το διήθημα απορρίπτεται.
 - 2η έκπλυση: Προστίθενται 600 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης B5 στην NucleoSpin® στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1min στα $11.000\times g$. Το διήθημα απορρίπτεται. Η NucleoSpin® στήλη φυγοκεντρείται για 1min χωρίς την προσθήκη κανενός διαλύματος προκειμένου να μην μείνουν υπολείματα αιθανόλης.
- 6) Έκλυση υψηλής καθαρότητας DNA: προστίθενται 100 μL διαλύματος έκλυσης BE στην NucleoSpin® στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 min στα $11.000\times g$. Το DNA εκλύεται με το διάλυμα μέσα στο νέο σωληνάριο και φυλάσσεται στους -20°C για μακρύ χρονικό διάστημα. Από το τελικό διάλυμα του DNA χρησιμοποιείται 1 μL για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του.

5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού DNA

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA έγινε φθορισμομετρικά από τον αναλυτή Qubit Fluorimeter της εταιρείας Invitrogen, Thermo Fisher (ΗΠΑ), χρησιμοποιώντας το Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit (σχήμα 5-1). Το Kit αυτό μπορεί να μετρήσει ποσοτικά γενωμικό DNA, ιικό dsDNA καθώς και PCR προϊόντα. Η ποσότητα του δείγματος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι από 1 έως 20 μL , ενώ τα όρια ανίχνευσης είναι 10 pg/ μL . Η πειραματική διαδικασία μπορεί να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου ($22-28^{\circ}\text{C}$) ενώ η φωτοσταθερότητα των αντιδραστηρίων είναι υψηλή. Στην παρούσα μελέτη

χρησιμοποιήθηκαν 1 μL μείγματος σε σωληνάρια PCR των 0,5 ml, με καινούρια βαθμονόμηση για κάθε χρήση του.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA γίνεται με βάση την καμπύλη αλγορίθμου χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 0 ng/ml και 100 ng/ml. Το Qubit® fluorometer δίνει τις τιμές των συγκεντρώσεων είτε σε $\mu\text{g/ml}$ είτε σε ng/ml. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης χρησιμοποιείται η σχέση :

$$C = \text{QF value} \times (200) / n$$

Όπου QF value= η τιμή που δίνεται στον αναλυτή και

n = ο αριθμός των μL του δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν.



Σχήμα 5-1. Φωτογραφία Qubit® φθορισμομέτρου.

5.3.1 Αντιδραστήρια/ υλικά/ εξοπλισμός

- Πιπέτες (Thermo Fisher, ΗΠΑ) των 10 μL και 200 μL
- Ρύγχη των 10 μL και 200 μL
- Σωληνάρια των 500 μL
- Αντιδραστήρια dsDNA BR βαθμονομητής 1 (0 ng/ μL), ds DNA BR βαθμονομητής 2 (100 ng/ μL), ρυθμιστικό διάλυμα DNA BR και ds DNA BR αντιδραστήριο (παρέχονται από το Quant-iT ds DNA BR Assay Kit, Q32850)
- Συσκευή Vortex (Fisher, ΗΠΑ)

5.3.2 Πειραματική πορεία

Αρχικά αφήνουμε όλα τα διαλύματα να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου.

- 1) Προστίθενται $190 \times n$ (n = αριθμός δειγμάτων) μL αντιδραστηρίου ds DNA BR και 10 μL αντιδραστηρίου ds DNA BR αντιδραστηρίου σε σωληνάριο erpendorf.
- 2) Από το παραπάνω διάλυμα λαμβάνονται 199 μL για κάθε δείγμα, τοποθετούνται σε νέο σωληνάριο erpendorfs και προστίθεται 1 μL δείγματος DNA.
- 3) Ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος και τοποθέτηση στο φθορισμόμετρο.

5.4 Δημιουργία πλήρως μεθυλιωμένου και αμεθυλίωτου δείγματος ελέγχου– Αντίδραση μεθυλοτρανσφεράσης (*M.SssI*)

Χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας δείγμα ελέγχου placental DNA που αραιώθηκε σε τελική συγκέντρωση 100 ng/ μL .

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε placental DNA (που είναι απαλλαγμένο από μεθυλίωση) συγκέντρωσης 200 ng/ μL το οποίο μεθυλιώθηκε πλήρως με το ένζυμο CpG μεθυλοτρανσφεράση (*MSssI*) σε τελική συγκέντρωση 100 ng/ μL .

5.4.1 Αντιδραστήρια / υλικά / εξοπλισμός

- 10X NEB buffer 2
- S-αδενοσυλομεθειονίνη (SAM)
- *M.SssI* (CpG μεθυλοτρανσφεράση, 20 U)
- Θερμικός κυκλοποιητής GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- Πλακουντιδιακό DNA

5.4.2 Πειραματική πορεία

- Σε 25 μL αμεθυλίωτου DNA (5 μg) προστέθηκαν 1 μL SAM, 5 μL , NEB2 (10X), 1 μL *M.SssI* (20 U/ μL) και 18 μL ddH₂O
- Επώαση για 1 h στους 37°C
- Προσθήκη 1 μL SAM
- Ολονύκτια επώαση στους 37°C για πλήρη μεθυλίωση
- Επώαση για 15 min στους 65°C για θερμική αδρανοποίηση του ενζύμου

- Αποθήκευση στους -20°C

5.4.3 Καμπύλη των δειγμάτων ελέγχου

Η καμπύλη των μεθυλιωμένων δειγμάτων ελέγχου δημιουργήθηκε με διαδοχικές αραιώσεις, όπως φαίνεται στον πίνακα 5-1.

Πίνακας 5-1. Διαδοχικές αραιώσεις για την δημιουργία των δειγμάτων ελέγχου.

Ποσοστό μεθυλίωσης	Διαδοχικές αραιώσεις	Μη μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου σε μL
80%	62,5 μL πλήρως μεθυλιωμένου δείγματος	12,5
40%	30 μL 80% μεθυλιωμένου δείγματος	30
20%	30 μL 40% μεθυλιωμένου δείγματος	30
10%	30 μL 20% μεθυλιωμένου δείγματος	30
5%	30 μL 10% μεθυλιωμένου δείγματος	30
2,5%	30 μL 5% μεθυλιωμένου δείγματος	30
1,25%	30 μL 2,5% μεθυλιωμένου δείγματος	30
0,62%	30 μL 1,25% μεθυλιωμένου δείγματος	30
0,36%	30 μL 0,62% μεθυλιωμένου δείγματος	30
Unmethylated (0,16%)	30 μL 0,32% μεθυλιωμένου δείγματος (πρακτικά 0%)	30

5.5 Αντίδραση μετατροπής του μεθυλιωμένου DNA με όξινοθειώδες νάτριο (Sodium Bisulfite Conversion)

Το στάδιο αυτό είναι απαραίτητο ώστε να μπορέσουμε να μελετήσουμε την μεθυλίωση του υποκινητή του *RASSF1A*. Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει την επεξεργασία του μεθυλιωμένου DNA με όξινοθειώδες νάτριο που οδηγεί στην μετατροπή των βάσεων της μη μεθυλιωμένης κυτοσίνης σε ουρακίλη, ενώ οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες παραμένουν ανεπηρέαστες.

Με την ενίσχυση μέσω PCR, οι ουρακίλες εκλαμβάνονται ως θυμίνη ενώ οι μεθυλοκυτοσίνες εκλαμβάνονται κανονικά ως κυτοσίνη. Το αποτέλεσμα είναι ότι μετά την επεξεργασία με όξινοθειώδες νάτριο οι δύο αλυσίδες του DNA δεν είναι πλέον συμπληρωματικές. Η προκύπτουσα ακολουθία του DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της μεθυλίωσης στο αρχικό, μη επεξεργασμένο με όξινοθειώδες νάτριο, DNA. Στην παρούσα εργασία η μετατροπή του DNA έγινε με το EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo, ΗΠΑ).

5.5.1 Αντιδραστήρια / υλικά / εξοπλισμός

- Πιπέτες των 1000 μL , 20 μL , 10 μL
- Ρύγχη με φίλτρο 1000 μL , 20 μL , 10 μL
- Θερμικός κυκλοποιητής GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- Φυγόκεντρος
- EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo, ΗΠΑ)

5.5.2 Πειραματική πορεία

Πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου απαιτείται η παρασκευή του αντιδραστηρίου μετατροπής CT. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit για κάθε φιαλίδιο με αντιδραστήριο CT χρειάζονται 900 μL H_2O , 300 μL M-Dilution buffer (Zymo, ΗΠΑ) και 50 μL M-Dissolving buffer (Zymo, ΗΠΑ) τα οποία ανακινούνται για 10 min. Είναι σημαντικό για την μέγιστη απόδοση του αντιδραστηρίου το νερό να είναι προθερμασμένο και τα διαλύματα να προστεθούν ακριβώς με την σειρά που αναγράφονται στο EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo, ΗΠΑ). Η διαδικασία είναι η ακόλουθη:

- Προστίθενται 130 μL διαλύματος του αντιδραστηρίου CT σε 20 μL του δείγματος DNA (1 μg) και αναδεύονται καλά.
- Τοποθετούνται τα δείγματα σε θερμικό κυκλοποιητή και επωάζονται στους 98°C για 10 min, στους 64°C για 2,5 ώρες και στους 4°C για ∞ .
- Προστίθενται 600 μL M-Binding Buffer (Zymo, ΗΠΑ) σε κάθε σωληνάριο αντίδρασης, αναμιγνύονται καλά και στην συνέχεια μεταφέρονται στην Zymo-Spin IC (Zymo, ΗΠΑ) στήλη.
- Φυγοκεντρείται η στήλη στα 14.000x g για 1 min και απορρίπτεται το διήθημα.
- Προστίθενται 200 μL M-Wash buffer (Zymo, ΗΠΑ) στην στήλη, φυγοκεντρείται στα 14.000x g για 1 min και απορρίπτεται το διήθημα.
- Προστίθενται 200 μL M-Desulphonation Buffer (Zymo, ΗΠΑ) στην στήλη και επωάζεται για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση φυγοκεντρείται στα 14.000 x g για 1 min και απορρίπτεται το διήθημα.
- Προστίθενται 400 μL M-Wash buffer (Zymo, ΗΠΑ) στην στήλη, φυγοκεντρείται στα 14.000 x g για 1 min και απορρίπτεται το διήθημα.

- Προστίθενται 400 μL M-Wash buffer (Zymo, ΗΠΑ) στην στήλη, φυγοκεντρείται στα 14.000 x g για 4 min και απορρίπτεται το διήθημα.
- Τοποθετείται η στήλη σ' ένα σωληνάριο των 1,5 ml, προστίθενται 50 μL TE Buffer (Zymo, ΗΠΑ) απευθείας στο φίλτρο της στήλης και φυγοκεντρείται στα 14.000 x g για 1 min.
- Αποθηκεύεται το διήθημα, το οποίο είναι το δείγμα μας, στους -80°C και απορρίπτεται η στήλη.

5.6 PCR για τον πρώτο υποκινητή του *RASSF1*

Προκειμένου να εχισχυθεί για να μελετηθεί ως προς την μεθυλίωση, με Pyrosequencing, ο πρώτος υποκινητής του *RASSF1*, πραγματοποιήθηκε PCR με το HotStartTaq Plus kit της Qiagen. Το προϊόν που λαμβάνεται είναι 117 bp. Στους ακόλουθους πίνακες αναγράφονται τα συστατικά και οι συνθήκες της PCR καθώς και οι ακολουθίες των εκκινητών.

Πίνακας 5-2. Συστατικά της PCR αντίδρασης για την ενίσχυση του πρώτου υποκινητή του *RASSF1* γονιδίου.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος	Τελική συγκέντρωση
ddH ₂ O	20,65 μL	
CoralLoad 10X buffer	3,00 μL	1X
dNTPs (5 μM)	1,20 μL	200 μM
Μίγμα εκκινητών (6 μM)	1,00 μL	0,2 μM
HotStart Πολυμεράση	0,15 μL	0,01X
Converted DNA	4,00 μL	1 μg
Σύνολο	30,00	

Πίνακας 5-3. Συνθήκες της PCR αντίδρασης για τον πρώτο υποκινητή του *RASSF1* γονιδίου.

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική Αποδιάταξη	95 $^{\circ}\text{C}$	5 min	
Αποδιάταξη	95 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	40
Υβριδοποίηση	48 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	
Επέκταση	72 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	
Τελική επέκταση	72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	
Ψύξη	6 $^{\circ}\text{C}$		

Πίνακας 5-4. Αλληλουχία εκκινητών για την ενίσχυση του πρώτου υποκινητή του *RASSF1* γονιδίου.

Εκκινητής	Αλληλουχία	bp
RASSF1methF	AGTATAGTAAAGTTGGTTTTAGAAA	26
RASSF1methR	CCCTTCCTTCCTCCTT	17

5.7 Ανάλυση μεθυλίωσης με την μέθοδο Pyrosequencing

Η ανάλυση μεθυλίωσης με Pyrosequencing πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Αναπληρωτή Καθηγητή Τριαντάφυλλου Λιλόγλου στο Πανεπιστήμιο του Liverpool (Dept. Of Molecular and Clinical Cancer Medicine) στον αναλυτή PyroMark Q96.

5.7.1 Αντιδραστήρια / υλικά / εξοπλισμός

- PyroMark Q96 (Qiagen, Γερμανία)
- Κατάλληλος εκκινητής αλληλούχησης (Eurofins MWG Operon, Αγγλία)
- Ρύγχη 1000μL, 200μL

Πίνακας 5-5. Αλληλουχία εκκινητή αλληλούχησης για τον πρώτο υποκινητή του *RASSF1* γονιδίου.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Bp
RASSF1methPSEQ	AAGTTGGTTTTTAGAAATA	19

5.7.2 Πειραματική πορεία

- Ακίνητοποίηση των PCR προϊόντων: στα PCR προϊόντα του κάθε δείγματος προστίθενται 50 μL PyroMark Binding Buffer (Qiagen, Γερμανία), 2 μL Streptavidin Sepharose High Performance Beads (Qiagen, Γερμανία) και 18 μL ddH₂O. Αναδεύονται καλά και αφήνονται στην ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ολοκληρωθεί η προετοιμασία του μηχανήματος (περίπου 10min). Ακολουθούν στάδια καθαρισμού των δειγμάτων με την ειδική αντλία καθαρισμού που φαίνεται στο σχήμα 5-2.



Σχήμα 5-2. Σύστημα προετοιμασίας δειγμάτων για Pyrosequencing.

- Διαχωρισμός των αλυσίδων DNA και απελευθέρωση των δειγμάτων στο PyroMark πλακίδιο:
 - Στάδιο 1: διαλύονται 1,5 μL από τον εκκινητή αλληλούχησης (100 μM) σε 43,5 PyroMark Annealing Buffer (Qiagen, Γερμανία) για κάθε αντίδραση PCR και τοποθετούνται στο PyroMark πλακίδιο.
 - Στάδιο 2: πληρώνεται το σύστημα έκπλυσης με τα αντίστοιχα διαλύματα που φαίνονται στο παραπάνω σχήμα προσέχοντας ώστε η στάθμη του NaOH να είναι λίγο πιο χαμηλά από την στάθμη του tris-Acetate ώστε να μην μείνουν σταγονίδια NaOH πάνω στα ρύγχη και χαλάσουν το pH της αντίδρασης.
 - Στάδιο 3: ανοίγεται ο διακόπτης της αντλίας και ξεπλένονται τα ρύγχη με τα φίλτρα στο ddH₂O.
 - Στάδιο 4: έχοντας το κενό ανοιχτό τοποθετούνται τα ρύγχη μέσα στο διάλυμα των PCR αντιδράσεων με τα σφαιρίδια και για περίπου 15 sec προσέχοντας να μην ακουμπήσουν στο πυθμένα του πλακιδίου. Έτσι προσροφούνται τα σφαιρίδια και συγκρατούνται από την μεμβράνη των ρυγχών από την οποία δεν μπορούν να περάσουν καθώς το μέγεθός τους είναι μεγαλύτερο από τους πόρους της.
 - Στάδιο 5: έχοντας ακόμα το κενό ανοιχτό τοποθετούνται τα ρύγχη στο διάλυμα 70% EtOH μέχρι να περάσει όλο μέσα από τα ρύγχη.
 - Στάδιο 6: συνεχίζουμε με το κενό ανοιχτό και τοποθετούνται τα ρύγχη στο διάλυμα αποδιάταξης NaOH στο οποίο απομακρύνονται οι αλυσίδες DNA οι οποίες δεν έχουν προσδεθεί στα σφαιρίδια, και αφήνονται για 5 sec.
 - Στάδιο 7: συνεχίζουμε με το κενό ανοιχτό και τοποθετούνται τα ρύγχη στο διάλυμα Tris-Acetate για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα NaOH, έτσι ώστε να μην επηρεαστεί το pH της αντίδρασής μας, και τα αφήνονται για 5 sec.
 - Στάδιο 8: ευθυγραμμίζονται τα ρύγχη με τις θέσεις του πιάτου όπου έχει επικαλυφθεί το διάλυμα με τον εκκινητή αλληλούχησης και απενεργοποιείται το κενό τοποθετώντας αμέσως μέσα στα πηγαδάκια τα ρύγχη και ανακατεύοντας καλά ώστε να απελευθερωθούν τα σφαιρίδια με τα προϊόντα μας.

- Στάδιο 9: απομακρύνονται τα ρύγχη από το πιάτο αντίδρασης και τοποθετούνται στο ddH₂O ανοίγοντας πάλι την αντλία κενού προκειμένου να εκπλυθούν.
- Στάδιο 10: τοποθετείται το πιάτο με τα σφαιρίδια στο οποίο είναι προσκολλημένα τα προϊόντα της αντίδρασης σε μια προθερμασμένη πλάκα στους 80°C για 2 min και μετά αφήνονται να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min.
- Στάδιο 11: τα δείγματα είναι έτοιμα και τοποθετούνται στον PyroMark Q96 αναλυτή (Qiagen, Γερμανία) προς ανάλυση.

5.8 Απομόνωση του RNA

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τους ιστούς χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin® RNA/Protein kit (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία) το οποίο βασίζεται στην ειδική σύνθεση της μεμβράνης της στήλης που περιέχει οξείδιο του πυριτίου (silica membrane). Το οξείδιο του πυριτίου μπορεί να προσδέσει εκλεκτικά το RNA κατά αντιστρεπτό τρόπο ανάλογα με την ιονική σύνθεση του υδάτινου περιβάλλοντος.

Το NucleoSpin® RNA/Protein kit επιτρέπει την απομόνωση καθαρού RNA με αναλογία A260/A280 που υπερβαίνει το 1,9. Το απομονωθέν RNA είναι έτοιμο προς χρήση για εφαρμογές όπως η RT-PCR. Το κλασικό πρωτόκολλο επιτρέπει τον καθαρισμό έως 70 µg ολικού RNA (>200 nt) ανά NucleoSpin® RNA/Protein στήλη από 30 mg ιστού.

5.8.1 Αντιδραστήρια / υλικά / εξοπλισμός

- Υγρό άζωτο
- Ρυθμιστικό διάλυμα RP1 (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (AppliChem, Γερμανία)
- NucleoSpin® φίλτρα (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- NucleoSpin® RNA στήλες (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα MDB (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Λυοφιλιωμένη rDNάση (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης για rDNάση (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)

- Ρυθμιστικό διάλυμα RA2 (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα RA3 (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- RNase-free H₂O (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Διάλυμα αιθανόλης 70 % από αιθανόλη 100 % (Scharlab, Ισπανία)
- Επωαστήρας σωληναρίων (Grant, Ηνωμένο Βασίλειο)
- Συσκευή Vortex (Fisher, ΗΠΑ)
- Μικροφυγόκεντρος Minispin plus (Eppendorf, Γερμανία)
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5 mL

5.8.2 Πειραματική πορεία

Η πειραματική πορεία απομόνωσης του ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ακόλουθη:

- 1) Προετοιμασία δείγματος: απομακρύνεται το διάλυμα RNeasy® και ~30 mg ιστού κονιορτοποιούνται πλήρως σε γουδί με την προσθήκη υγρού αζώτου. Ο κονιορτοποιημένος ιστός μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5 mL.
- 2) Κυτταρική λύση: προστίθενται 350 µL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης RP1 και 3,5 µL β-μερκαπτοαιθανόλη στον κονιορτοποιημένο ιστό και ακολουθεί έντονη ανάδευση.
- 3) Διήθηση του διαλύματος: το διάλυμα μεταφέρεται στο NucleoSpin® φίλτρο και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 min στα 11.000× g.
- 4) Ρύθμιση συνθηκών πρόσδεσης του RNA: το NucleoSpin® φίλτρο απορρίπτεται και προστίθενται 350 µL διαλύματος αιθανόλης 70 % στο διήθημα με επακόλουθη έντονη ανάδευση.
- 5) Πρόσδεση του RNA: το διήθημα φορτώνεται στην NucleoSpin® RNA στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 30 sec στα 11.000× g (Το DNA και το RNA είναι προσδεδεμένα στην μεμβράνη πυριτίου, ενώ οι πρωτεΐνες βρίσκονται στο διήθημα, επομένως σε κάποια δείγματα που θέλουμε να απομονώσουμε και τις πρωτεΐνες τους, το διήθημα φυλάσσεται για περαιτέρω επεξεργασία).
- 6) Αφαλάτωση της μεμβράνης πυριτίου: προστίθενται 350 µL ρυθμιστικού διαλύματος αφαλάτωσης της μεμβράνης MDB και ακολουθεί

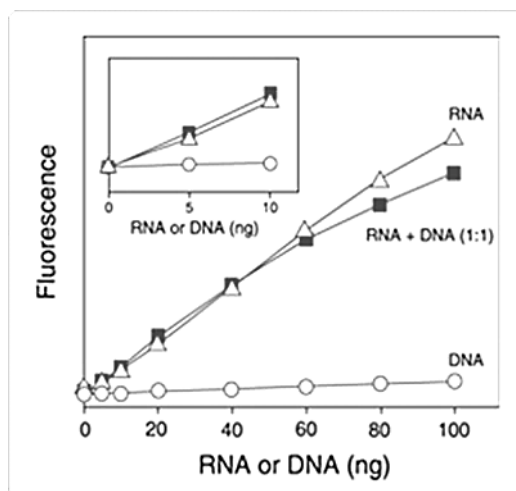
φυγοκέντρωση για 1 min στα 11.000× g ώστε να στεγνώσει η μεμβράνη. Το διήθημα απορρίπτεται.

- 7) Πέψη και απομάκρυνση του DNA: αρχικά προετοιμάζεται το μείγμα αντίδρασης της rDNάσης με την ανάμειξη 10 μL ανασυσταθήσας rDNάσης με 90 μL ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης για την rDNάση και αναδεύονται καλά. Έπειτα, προστίθενται 95 μL μείγματος αντίδρασης rDNάσης απευθείας πάνω στο κέντρο της μεμβράνης πυριτίου της NucleoSpin® RNA/Protein στήλης. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
- 8) Εκπλύσεις και στέγνωμα της μεμβράνης πυριτίου
- 1η έκπλυση: προστίθενται 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης RA2 στην NucleoSpin® RNA/Protein στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 30 sec στα 11.000× g. Το διήθημα απορρίπτεται.
 - 2η έκπλυση: προστίθενται 600 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης RA3 στην NucleoSpin® RNA/Protein στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 30 sec στα 11.000× g. Το διήθημα απορρίπτεται.
 - 3η έκπλυση: προστίθενται 250 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης RA3 στην NucleoSpin® RNA/Protein στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 2 min στα 11.000× g ώστε να στεγνώσει τελείως η μεμβράνη. Το διήθημα απορρίπτεται και η NucleoSpin® RNA/Protein στήλη τοποθετείται σε νέο RNase-free σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5 mL.
- 9) Έκλυση υψηλής καθαρότητας RNA: προστίθενται 60 μL RNase-free H₂O στην NucleoSpin® RNA/Protein στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 min στα 11.000×g. Το RNA εκλύεται με το υδάτινο διάλυμα μέσα στο νέο σωληνάριο. Το διήθημα επανατοποθετείται στην NucleoSpin® RNA/Protein στήλη και ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρωση για 2 min στα 11.000×g προκειμένου να παραχθεί RNA υψηλής απόδοσης και συγκέντρωσης. Τελικά, το RNA εκλύεται με το υδάτινο διάλυμα μέσα στο σωληνάριο και φυλάσσεται είτε στους -20 °C για σύντομο χρονικό διάστημα είτε στους -80 °C για μακρύ χρονικό διάστημα. Από το τελικό υδατικό διάλυμα του RNA χρησιμοποιείται 1 μL για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής του.

5.9 Ποσοτικός προσδιορισμός RNA

Η συγκέντρωση του RNA υπολογίζεται με μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στο φθορισμόμετρο Qubit® (Thermo Fisher, ΗΠΑ).

Η ποσοτικοποίηση του RNA επιτυγχάνεται με την χρήση ουσίας που φθορίζει κατά την εκλεκτική πρόσδεση σε RNA και η οποία παρέχεται με το Quant-iT™ RNA Assay Kit (Thermo Fisher, ΗΠΑ). Η χρωστική αυτή εκπέμπει ακτινοβολία κατόπιν διέγερσης με κατάλληλο μήκος κύματος ανάλογα με το εάν η χρωστική είναι ελεύθερη ή προσδεσμένη σε μόρια RNA. Η μέτρηση πρότυπων διαλυμάτων – βαθμονομητών τα οποία παρέχονται με το kit, επιτρέπει τον αυτοματοποιημένο σχεδιασμό καμπύλης βαθμονόμησης με βάση την οποία γίνεται η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης. Η δοκιμασία είναι ιδιαίτερα εκλεκτική για το RNA έναντι του δίκλωνου DNA και στην περιοχή από 5 έως 100 ng, το σήμα φθορισμού είναι γραμμικά ανάλογο της συγκέντρωσης του RNA (Σχήμα 5-3). Η πειραματική διαδικασία μπορεί να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου (22 με 28 °C) ενώ η φωτοσταθερότητα των αντιδραστηρίων είναι ιδιαίτερα υψηλή.



Σχήμα 5-3. Η RNA εκλεκτικότητα και ευαισθησία του Quant-iT™ RNA Assay Kit. (<http://www.lifetechnologies.com/>)

Πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής σε σχέση με τη μέτρηση της απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV ακτινοβολία) (όπως για παράδειγμα στο ευρέως χρησιμοποιούμενο φωτόμετρο NanoDrop) αποτελεί η εκλεκτικότητα των μετρήσεων που επιτρέπει διάκριση μεταξύ DNA και RNA, όταν αυτά συνυπάρχουν, σε ένα δείγμα. Όμως, δεν είναι εφικτός ο έλεγχος της καθαρότητας του RNA στο προς μέτρηση δείγμα. Η ακρίβεια της μεθόδου

στην ποσοτικοποίηση δειγμάτων με χαμηλές συγκεντρώσεις συνίσταται ακόμη και σε επίπεδα των 250 pg/μL.

5.9.1 Αντιδραστήρια / υλικά / εξοπλισμός

- Ρυθμιστικό διάλυμα για RNA Quant-iT™ (Thermo Fisher, ΗΠΑ)
- Φθορίζον αντιδραστήριο για RNA Quant-iT™ (Thermo Fisher, ΗΠΑ)
- Πρότυπο διάλυμα #1, 0 ng/μL (Thermo Fisher, ΗΠΑ)
- Πρότυπο διάλυμα #2, 10 ng/μL (Thermo Fisher, ΗΠΑ)
- Φθορισμόμετρο Qubit® (Thermo Fisher, ΗΠΑ)
- Συσκευή Vortex (Fisher, ΗΠΑ)
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf 0,5 mL

5.9.2 Πειραματική πορεία

Η πειραματική πορεία μέτρησης της συγκέντρωσης του RNA των δειγμάτων με το φθορισμόμετρο Qubit® είναι η εξής:

- Αρχικά, εξασφαλίζεται ότι όλα τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αναμειγνύονται (199 × n) μL ρυθμιστικού διαλύματος Quant-iT™ με (1 × n) μL φθορίζοντος αντιδραστηρίου Quant-iT™ (όπου n = ο αριθμός των πρότυπων διαλυμάτων και των δειγμάτων) με καλή ανάδευση. Το διάλυμα εργασίας είναι έτοιμο.
- Από το διάλυμα εργασίας μοιράζονται 199 μL σε νέο σωληνάριο τύπου Eppendorf 0,5 mL για κάθε άγνωστο δείγμα και 190 μL σε νέο σωληνάριο τύπου Eppendorf 0,5 mL για καθένα από τα 2 πρότυπα διαλύματα.
- Για κάθε άγνωστο δείγμα προστίθεται 1 μL από το δείγμα σε κάθε σωληνάριο και αναγράφεται ο αριθμός/κωδικός του δείγματος. Για κάθε πρότυπο διάλυμα προστίθενται 10 μL από το καθένα στο αντίστοιχο σωληνάριο.
- Έπειτα, όλα τα σωληνάρια αναδεύονται καλά και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min.
- Ακολουθεί η δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης με διαδοχική τοποθέτηση και μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων στο φθορισμόμετρο Qubit® και στην συνέχεια τοποθετούνται και μετρώνται διαδοχικά τα διαλύματα των άγνωστων δειγμάτων.

- Ο υπολογισμός της τελικής συγκέντρωσης του RNA στα άγνωστα δείγματα ολοκληρώνεται αφού συνυπολογιστεί στην τιμή που δίνει το φθορισμόμετρο Qubit® η αραίωση των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, η τελική τιμή της συγκέντρωσης του RNA δίνεται από τον τύπο:

$$C_{\text{δείγματος}} (\text{ng}/\mu\text{L}) = \text{QF τιμή} \times (200/x)$$

όπου QF είναι η τιμή της συγκέντρωσης που μετρά το φθορισμόμετρο Qubit® σε ng/μL και

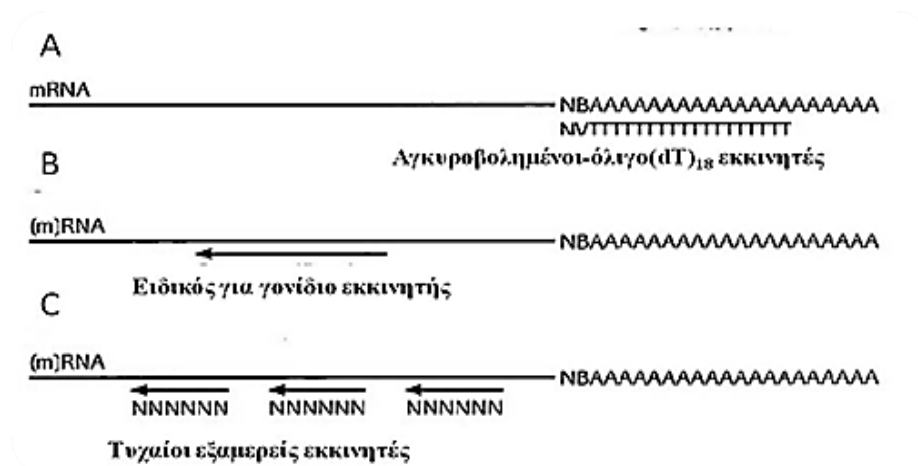
x είναι το μL του δείγματος RNA που χρησιμοποιήθηκαν.

Άρα, για την παραπάνω πειραματική διαδικασία η τιμή της συγκέντρωσης που δίνεται από το φθορισμόμετρο Qubit® πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή αραίωσης 200.

5.10 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η αντίστροφη μεταγραφή του RNA προς συμπληρωματικό DNA (cDNA) πραγματοποιείται με το Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Γερμανία).

Το Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit παρέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια για τη σύνθεση του μονόκλωνου cDNA από RNA (αντίστροφη πολυμεράση, μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων). Γενικά, ανάλογα με τον τύπο της ανάλυσης όπου θα χρησιμοποιηθεί το cDNA στη συνέχεια, χρησιμοποιούνται τρία διαφορετικά συστήματα εκκινητών στην σύνθεση του cDNA (σχήμα 5-4). Στο kit περιλαμβάνονται οι τυχαίοι εξαμερείς εκκινητές (random hexamer primers) και οι αγκυροβολημένοι-όλιγο(dT)₁₈ εκκινητές (anchored-oligo(dT)₁₈ primers). Οι τελευταίοι είναι σχεδιασμένοι να προσδένονται στην αρχή της πολύ(A) ουράς του κάθε mRNA παράγοντας cDNA πλήρους ακολουθίας, ενώ η χρήση των τυχαίων εξαμερών εκκινητών παρέχει τη δυνατότητα αντιπροσώπευσης όλων των τύπων RNA του κυττάρου στο νεοσυντιθέμενο cDNA. Ο τρίτος τρόπος χρησιμοποιείται στην RT-PCR ενός σταδίου (με ειδικό για το γονίδιο εκκινητή). Στην πειραματική διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω προτιμήθηκε η χρήση των τυχαίων εξαμερών εκκινητών.



Σχήμα 5-4. Επισκόπηση των τριών διαφορετικών συστημάτων εκκινήτων κατά τη σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA. (www.roche-applied-science.com)

5.10.1 Αντιδραστήρια / υλικά / εξοπλισμός

- Nuclease-free PCR σωληνάρια τύπου Eppendorf 0,2 mL
- Τυχαιοί εξαμερείς εκκινητές (Roche Applied Science, Γερμανία)
- H₂O (PCR-grade) (Roche Applied Science, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης Transcriptor 5× (Roche Applied Science, Γερμανία)
- Αναστολέας RNAσών (Roche Applied Science, Γερμανία)
- Μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (Roche Applied Science, Γερμανία)
- Αντίστροφη μεταγραφάση Transcriptor (Roche Applied Science, Γερμανία)
- Θερμικός κυκλοποιητής Primus 25 (MWG-Biotech, Γερμανία)
- Μικροφυγόκεντρος Minispin plus (Eppendorf, Γερμανία)

5.10.2 Πειραματική πορεία

Για την σύνθεση του cDNA των δειγμάτων RNA πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη πειραματική διαδικασία δύο βημάτων/αντιδράσεων.

- 1^ο βήμα / αντίδραση: σε ένα nuclease-free PCR σωληνάριο τύπου Eppendorf 0,2 mL προετοιμάζεται το μείγμα εκμαγείου RNA-εκκινητή για κάθε αντίδραση (αντίδραση = δείγμα) τελικού όγκου 20 μL, προσθέτοντας τα αντιδραστήρια που αναφέρονται στον πίνακα 5-6. Το μείγμα επωάζεται στους 65°C για 10 min προκειμένου να αποδιαταχθεί το RNA και ακολουθεί άμεση τοποθέτησή του στον πάγο. Με τη διαδικασία αυτή, θέρμανσης και ψύξης, καταστρέφεται η δευτεροταγής δομή του RNA η οποία ενδέχεται να εμποδίζει την έναρξη της σύνθεσης του cDNA.

Πίνακας 5-6. Συστατικά μίγματος εκμαγείου RNA-εκκινητή κατά τη σύνθεση του cDNA.

Αντιδραστήριο (αρχική συγκέντρωση)	Όγκος αντιδραστηρίου	Τελική συγκέντρωση
RNA δείγματος (ή 2 μL RNA δείγματος ελέγχου του kit - 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Μεταβλητός έως 11,00 μL	3 μg (100 ng)
Τυχαίοι εξαμερείς εκκινητές (600 pmol/ μL)	2,00 μL	60 μM
H ₂ O (PCR-grade)	Μεταβλητός μέχρι τελικού όγκου 13,00 μL	
Συνολικός όγκος	13,00 μL	

- 2^ο βήμα / αντίδραση: προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα της αντίδρασης σε τελικό όγκο 7 μL , το οποίο περιλαμβάνει τα αντιδραστήρια που αναφέρονται στον πίνακα 5-7 και προστίθεται στο αρχικό μείγμα. Αφού αναδευτεί καλά το δεύτερο μείγμα με πιπέτα, φυγοκεντρείται σύντομα και στη συνέχεια επωάζεται στους 25°C για 10 min και στους 50°C για 60 min ώστε να υβριδοποιηθούν οι τυχαίοι εκκινητές με το εκμαγείο RNA και να δράσει η αντίστροφη μεταγραφάση Transcriptor. Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής τερματίζεται με επώαση του δείγματος στους 85°C για 5 min καθώς απενεργοποιείται η αντίστροφη μεταγραφάση και αποδιατάσσονται τα υβρίδια RNA/cDNA. Το cDNA φυλάσσεται στους -20°C.

Πίνακας 5-7. Συστατικά που περιέχονται στο δεύτερο μίγμα της σύνθεσης του cDNA.

Αντιδραστήρια (αρχική συγκέντρωση)	Προστιθέμενος όγκος	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης Transcriptor 5×	4,00 μL	1x (MgCl ₂ 8 mM)
Αναστολέας RNασών (40 U/ μL)	0,50 μL	20 U/ μL
Μείγμα dNTPs (10 mM έκαστο)	2,00 μL	1 mM έκαστο
Αντίστροφη μεταγραφάση Transcriptor (20 U/ μL)	0,50 μL	10 U
Συνολικός όγκος	7,00 μL	

Κατά τη σύνθεση του cDNA από το RNA των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα ελέγχου. Το ένα δείγμα ελέγχου περιείχε το RNA αναφοράς (control RNA του kit), το ένα δείγμα ελέγχου δεν περιείχε καθόλου RNA και το τρίτο δείγμα ελέγχου δεν περιείχε αντίστροφη μεταγραφάση Transcriptor. Οι

αντίστοιχοι όγκοι που έλειπαν συμπληρώθηκαν με επιπλέον H₂O στην κάθε αντίδραση.

5.10.3 PCR ελέγχου παραχθέντος cDNA

Προκειμένου να ελεγχθεί η ποιότητα του παραχθέντος cDNA, πραγματοποιήθηκε PCR ελέγχου για το γονίδιο αναφοράς PBGD (PorphobilinoGen Deaminase – Απαμινάση του πορφυροχολινογόνου) με μείγμα εκκινητών που παρέχονται από το Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του cDNA. Το συγκεκριμένο γονίδιο ανήκει στην ομάδα των γονιδίων αναφοράς σταθερής έκφρασης (reference genes), τα οποία δεν παρουσιάζουν σημαντική διακύμανση στην έκφραση. Οι εκκινητές για το γονίδιο PBGD οριοθετούν μια περιοχή 151 bp εντός του γονιδίου. Στην αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκε η GoTaq® Flexi DNA Πολυμεράση (Promega, ΗΠΑ). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση, οι προστιθέμενοι όγκοι καθώς και οι τελικές συγκεντρώσεις τους φαίνονται στον πίνακα 5-8.

Πίνακας 5-8. Συστατικά της PCR αντίδρασης για το γονίδιο αναφοράς PBGD.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα 5× Green GoTaq® Flexi	5,00 µL	1×
Διάλυμα MgCl ₂ (25 mM)	3,00 µL	3 mM
Μίγμα dNTPs (10 mM έκαστο)	2,50 µL	0,2 mM έκαστο
Μείγμα εκκινητών (5 µM)	1,00 µL	0,2 µM
GoTaq® DNA Πολυμεράση (5 U/µL)	0,20 µL	0,04 U/µL
cDNA δείγματος / αναφοράς	1,50 µL	
ddH ₂ O	11,80 µL	
Συνολικός όγκος	25,00 µL	

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Primus 25 με το θερμοκρασιακό κυκλικό πρωτόκολλο που προτείνεται από το kit και δίδεται στον πίνακα 5-9.

Πίνακας 5-9. Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο αναφοράς PBGD.

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min	
Αποδιάταξη	95 °C	10 sec	35
Υβριδοποίηση	50 °C	20 sec	
Επέκταση	72 °C	30 sec	
Τελική επέκταση	72 °C	7 min	
Ψύξη	4 °C		

Σε κάθε πείραμα μαζί με τα δείγματα προς μελέτη συμπεριλήφθησαν και τα δείγματα έλεγχου κατά την σύνθεση του cDNA αλλά και ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου για την αντίδραση της PCR (τυφλό δείγμα – blank) το οποίο δεν περιείχε DNA.

Προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα των RNA δειγμάτων κατά την σύνθεση του cDNA, στα μισά δείγματα πραγματοποιήθηκε συμβατική PCR αντίδραση για το γονίδιο αναφοράς της ακτίνης με εκκινητές που παρουσιάζονται στον πίνακα 5-10. Τα cDNA που είναι ελεύθερα από προσμίξεις γενωμικού DNA παράγουν PCR προϊόν 587 bp (και όχι ένα επιπλέον προϊόν 1122 bp που είναι ενδεικτικό της παρουσίας γενωμικού DNA). Όλα τα cDNA δείγματα φυλάσσονται στους -20 °C.

Στη μελέτη δεν πραγματοποιήθηκε έλεγχος της παρουσίας αναστολέων στα δείγματα με χρήση της δοκιμασίας SPUD ούτε έλεγχος ακεραιότητας του RNA μέσω της δοκιμασίας λόγου 3'/5'.⁽¹⁵⁷⁾

Πίνακας 5-10. Αλληλουχία εκκινητών για το γονίδιο αναφοράς της ακτίνης.

Εκκινητής	Αλληλουχία
Πρόσθιος	5'-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3'
Ανάστροφος	5'-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3'

5.11 Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων

5.11.1 Αντιδραστήρια / υλικά / εξοπλισμός

- Tris (AppliChem, Γερμανία)
- Βορικό οξύ (SIGMA, ΗΠΑ)
- EDTA (AppliChem, Γερμανία)

- Αγαρόζη low EEO (AppliChem, Γερμανία)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) (10 mg/mL - Invitrogen, ΗΠΑ)
- Δείκτης μοριακών βαρών DNA PCR Marker (300 ng/μL) (New England BioLabs, ΗΠΑ)
- Εργαστηριακός ηλεκτρονικός ζυγός (Oma BC, Ιταλία)
- Φούρνος μικροκυμάτων (BLUESKY, Ιαπωνία)
- Ηλεκτροφορητική συσκευή 40-0708 (PEQLAB TECHNOLOGIE, Γερμανία)
- Ηλεκτροφορητική συσκευή Hu13 (Scie-plas, Ηνωμένο Βασίλειο)
- Τροφοδοτικό EPS 301 (Amersham Biosciences, Ηνωμένο Βασίλειο)
- Τράπεζα UV ακτινοβολίας (Vilber Lourmat, Γαλλία)
- Ψηφιακή κάμερα PowerShot A2200 (Canon, ΗΠΑ)
- PhotoDoc-It™ Imaging System (UVP, ΗΠΑ)

5.11.2 Πειραματική Πορεία

Τα προϊόντα της PCR ελέγχονται και ταυτοποιούνται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή TBE αγαρόζης 2 % w/v. Η πηκτή αγαρόζης 2 % w/v παρασκευάζεται προσθέτοντας 0,8 g αγαρόζη low EEO σε 40 mL διαλύματος 0,5× TBE και επακόλουθη θέρμανση του διαλύματος έως ότου γίνει διαυγές. Στη συνέχεια, προστίθενται 40 μL αραιωμένου διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (500 μg/ml) και το διάλυμα ανακατεύεται καλά. Στη συνέχεια, το διάλυμα τοποθετείται σε κατάλληλο προετοιμασμένο εκμαγείο (με προσαρμοσμένα χτένια) και αφήνεται να ψυχθεί. Μόλις, η πηκτή αγαρόζης είναι έτοιμη ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων προς ταυτοποίηση.

10 μL PCR προϊόντος αναμιγνύονται με 2 μL διαλύματος χρωστικής και τοποθετούνται στα πηγαδάκια του πηκτώματος αγαρόζης. Η ηλεκτροφορητική συσκευή ρυθμίζεται σε συνεχή τάση 120 V για περίπου 25 min όπου το αρνητικά φορτισμένο DNA κινείται προς την άνοδο. Παράλληλα με τα δείγματα γίνεται ηλεκτροφόρηση δείκτη μοριακών βαρών, πχ DNA PCR Marker (NEB, ΗΠΑ), για τον υπολογισμό του μεγέθους των PCR προϊόντων. Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα παρατηρείται σε τράπεζα UV ακτινοβολίας στα 302-366 nm όπου το βρωμιούχο αιθίδιο εκπέμπει ακτινοβολία φθορισμού και οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές. Η φωτογράφιση των προϊόντων γίνεται με ψηφιακή κάμερα η οποία είναι

ενσωματωμένη σε PhotoDoc-It™ Imaging System και τα αποτελέσματα αποθηκεύονται σε H/Y. Η επεξεργασία της εικόνας γίνεται σε format .tiff με την χρήση του ειδικού λογισμικού προγράμματος Kodak Digital Science 1D (Eastman Kodak Company, ΗΠΑ).

5.12 Ανάλυση έκφρασης γονιδίου *RASSF1* με real-time qPCR.

Ο αρχικός σχεδιασμός ήταν να πραγματοποιηθεί η ανάλυση της έκφρασης του *RASSF1* με real-time RT-qPCR με SYBR Green I στον θερμικό κυκλοποιητή LightCycler 1.5 (Roche, Γερμανία). Για λόγους που θα αναφερθούν στο κεφάλαιο 6, η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε τελικά στον θερμικό κυκλοποιητή Rotor-Gene Q (Qiagen, Γερμανία)

5.12.1 Αρχικός σχεδιασμός στον θερμικό κυκλοποιητή LightCycler 1.5

5.12.1.1 In silico μελέτη και σχεδιασμός εκκινητών

Οι προδιαγραφές που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχεδιασμό των εκκινητών ήταν:

- 1) το PCR προϊόν του γονιδίου αναφοράς (β 2-μικροσφαιρίνη) που θα χρησιμοποιήσουμε στην μελέτη έκφρασης έχει μήκος 99 bp (το πρωτόκολλο έχει αναπτυχθεί από το ACTC Lab του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ)
- 2) τη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών της β 2-μικροσφαιρίνης κατά την PCR είναι 58°C
- 3) το ότι πρέπει να υπάρχει ίδια ή παρόμοια απόδοση (efficiency) μεταξύ των πρωτοκόλλων του γονιδίου αναφοράς και του γονιδίου στόχου κατά την ποσοτικοποίηση.

Αρχικά σχεδιάστηκαν εκκινητές που να υβριδίζονται στα εξόνια 5 και 6 (πίνακας 5-11) και ελήφθησαν από την Invitrogen (ΗΠΑ). Ο πρόσθιος εκκινητής (forward primer) υβριδίζεται εντός του 5^{ου} εξονίου, ο ανάστροφος εκκινητής (reverse primer) στο σημείο συρραφής των εξονίων 5 και 6 (exon junction) και το προϊόν που ενισχύεται έχει μήκος 122 bp (σχήμα 5-5). Για τον σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα Primer 3+ και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες που αναγράφονται στην εργασία των Thornton και Basu. ⁽¹⁵⁸⁾

Πίνακας 5-11. Χαρακτηριστικά εκκινητών Invitrogen.

Εκκινητής	Αλληλουχία	T _m	cDNA	Μήκος
Πρόσθιος	5'-TGCGGAAGCTGTTGGATG-3'	62,0°C	898-916	18 bp
Ανάστροφος	5'-CTTCCGCAGGGTCAAGTGG-3'	62,0°C	1001-1019	19 bp



Σχήμα 5-5. Η θέση των εκκινητών Invitrogen στο mRNA του *RASSF1* γονιδίου.

Από τα παραληφθέντα δοχεία που περιείχαν λυοφιλωμένους τους εκκινητές, έγινε ανασύσταση για την παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης (stock primers), σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή για τελική συγκέντρωση 100 μM. Από τα διαλύματα παρακαταθήκης έγινε εκ νέου αραίωση για τελική συγκέντρωση διαλυμάτων εργασίας (working primers) 20 pmol/μL. Όλα τα δοχεία φυλάχθηκαν στους -20°C.

Προκειμένου να ελεγχθούν οι εκκινητές Invitrogen, προχωρήσαμε σε πραγματοποίηση συμβατικής PCR στο θερμικό κυκλοποιητή Primus 25, χρησιμοποιώντας διαφορετικά ενζυμικά συστήματα και θερμοκρασίες στο

πρωτόκολλο. Στους πίνακες 5-12 και 5-13 Παρουσιάζονται ενδεικτικά τα συστατικά και το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της PCR.

Πίνακας 5-12. Συστατικά συμβατικής PCR για την δοκιμή των εκκινητών Invitrogen του *RASSF1* γονιδίου.

Αντιδραστήριο (αρχική συγκέντρωση)	Προσπιθέμενος όγκος	Τελική συγκέντρωση
ddH ₂ O	6,50 µL	
GoTaq® Flexi Buffer (5x)	4,00 µL	1x
Διάλυμα MgCl ₂ (25mM)	2,40 µL	3 mM
Buffer Q (5X)	4,00 µL	1x
Διάλυμα dNTPs (10mM έκαστο)	0,40 µL	0,2 mM
Πρόσθιος εκκινητής (20 pmol/µL)	0,25 µL	0,25 pmol/µL
Ανάστροφος εκκινητής (20 pmol/µL)	0,25 µL	0,25 pmol/µL
GoTaq® Flexi DNA Polymerase (5 U/µL)	0,20 µL	0,05 U/µL
cDNA δείγματος ή γενωμικό DNA	2,00 µL	
Συνολικός όγκος	20,00 µL	

Πίνακας 5-13. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα συμβατικής PCR για την δοκιμή των εκκινητών Invitrogen του *RASSF1* γονιδίου.

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια	Αριθμός κύκλων
Αρχική Αποδιάταξη	95 °C	10 min	
Αποδιάταξη	95 °C	30 sec	40
Υβριδοποίηση	58 °C	30 sec	
Επέκταση	72 °C	30 sec	
Ψύξη	8 °C	8 hours	2

Λόγω τεχνικών προβλημάτων, τα οποία αναφέρονται λεπτομερώς στην παράγραφο 6.4, αποφασίστηκε η προμήθεια νέου ζεύγους εκκινητών. Κάνοντας χρήση του προγράμματος εύρεσης και επιλογής εκκινητών BLAST, το οποίο χρησιμοποιεί το λογισμικό Primer3+ και του λογισμικού προγράμματος CLC Workbench 4 για την στοίχιση (alignment) των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου *RASSF1*, καταλήξαμε στα ακόλουθα:

- ✓ ο πρόσθιος εκκινητής να υβριδίζεται στο σημείο συρραφής των εξονίων 1 και 2
- ✓ ο ανάστροφος εκκινητής να υβριδίζεται στο σημείο συρραφής των εξονίων 2 και 3 (σχήμα 5-5).



Σχήμα 5-6. Οι θέσεις των εκκινητών IDT στο mRNA του *RASSF1* γονιδίου.

Τα χαρακτηριστικά των εκκινητών που επιλέχθηκαν και προμηθεύτηκαν από την Integrated DNA Technologies (IDT, ΗΠΑ) δίδονται στον πίνακα 5-14. Οι εκκινητές ενισχύουν περιοχή μήκους 118 bp.

Πίνακας 5-14. Χαρακτηριστικά εκκινητών IDT.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Tm	cDNA	Μήκος
Πρόσθιος	5'-GCGCATTGCAAGTTCACC-3'	61,4°C	378-396	18 bp
Ανάστροφος	5'-GCTCGTCCACGTTCGTGTC-3'	62,9°C	495-476	19 bp

Από τα παραληφθέντα δοχεία που περιείχαν λυοφιλωμένους τους εκκινητές, έγινε ανασύσταση για την παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης (stock primers), σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή για τελική συγκέντρωση 100μM. Από τα διαλύματα παρακαταθήκης έγινε εκ νέου αραίωση για τελική συγκέντρωση διαλυμάτων εργασίας (working primers) 20 pmol/μL. Όλα τα δοχεία φυλάχθηκαν στους -20°C.

Προκειμένου να ελεγχθούν οι εκκινητές IDT, προχωρήσαμε σε πραγματοποίηση συμβατικής PCR στον θερμικό κυκλοποιητή Primus 25. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορα πρωτόκολλα, με διαφορετικά ένζυμα και αντιδραστήρια και έγιναν βελτιστοποιήσεις των συνθηκών όπου τελικά την υψηλότερη καθαρότητα στα PCR προϊόντα, όπως αυτά εμφανίστηκαν σε gel αγαρόζης 2%, την είχαμε με τα συστατικά και το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο που περιγράφεται στους πίνακες 5-15 και 5-16, αντίστοιχα.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το GoTaq® Flexi DNA Polymerase kit (Promega, ΗΠΑ). Επίσης, στο διάλυμα εργασίας (master mix) προστέθηκε το αντιδραστήριο Q (Qiagen), ιδανικό για high GC amplicons, καθώς με τη χρήση του υπήρξε περισσότερη ευκρίνεια (πιο καθαρές και έντονες μπάντες κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%). Ως δείγματα χρησιμοποιήθηκαν cDNAs ασθενών με καρκίνο του μαστού και γενωμικό DNA. Γενωμικό DNA χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να διασφαλιστεί ότι δεν λαμβάνεται προϊόν με τους συγκεκριμένους εκκινητές από γενωμικό DNA, στην περίπτωση που το mRNA έχει επιμολυνθεί.

Πίνακας 5-15. Αντιδραστήρια συμβατικής PCR για την δοκιμή των εκκινητών IDT του *RASSF1* γονίδιο.

Αντιδραστήριο (αρχική συγκέντρωση)	Προστιθέμενος όγκος	Τελική συγκέντρωση
ddH ₂ O	6,50 μ L	
GoTaq® Flexi Buffer (5x)	4,00 μ L	1x
Διάλυμα MgCl ₂ (25mM)	2,40 μ L	3 mM
Buffer Q (5X)	4,00 μ L	1x
Διάλυμα dNTPs (10mM έκαστο)	0,40 μ L	0,2 mM
Πρόσθιος εκκινητής (20 pmol/ μ L)	0,25 μ L	0,25 pmol/ μ L
Ανάστροφος εκκινητής (20 pmol/ μ L)	0,25 μ L	0,25 pmol/ μ L
GoTaq® Flexi DNA Polymerase (5 U/ μ L)	0,20 μ L	0,05 U/ μ L
cDNA δείγματος ή γενωμικό DNA	2,00 μ L	
Συνολικός όγκος	20,00 μ L	

Πίνακας 5-16. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα συμβατικής PCR για την δοκιμή των εκκινητών Invitrogen του *RASSF1* γονιδίου.

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια	Αριθμός κύκλων
Αρχική Αποδιάταξη	95 °C	10 min	
Αποδιάταξη	95 °C	30 sec	35
Υβριδοποίηση	62 °C	30 sec	
Επέκταση	72 °C	30 sec	
Ψύξη	8 °C	8 hours	2

5.12.2 Θερμικός κυκλοποιητής Rotor-Gene Q.

5.12.2.1 Χαρακτηριστικά του θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene Q.

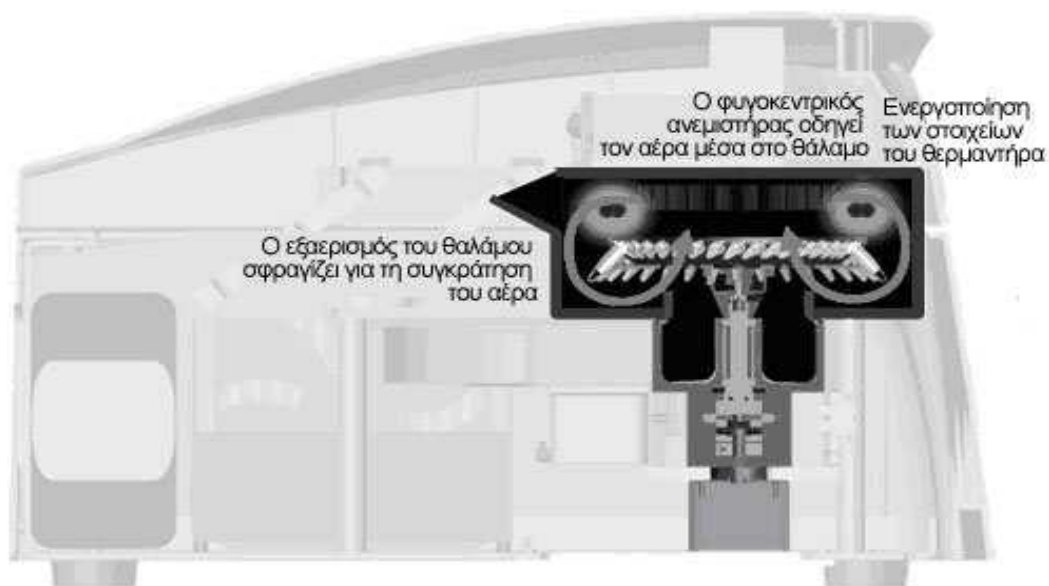
Το Rotor-Gene Q (σχήμα 5-7) είναι ένα καινοτόμο όργανο που παρέχει τη δυνατότητα για υψηλής ακρίβειας qPCR αντιδράσεις και είναι απολύτως κατάλληλο για *in vitro* διαγνωστικές εφαρμογές σε συνδυασμό με τα κιτ της QIAGEN που φέρουν σήμανση CE-IVD.



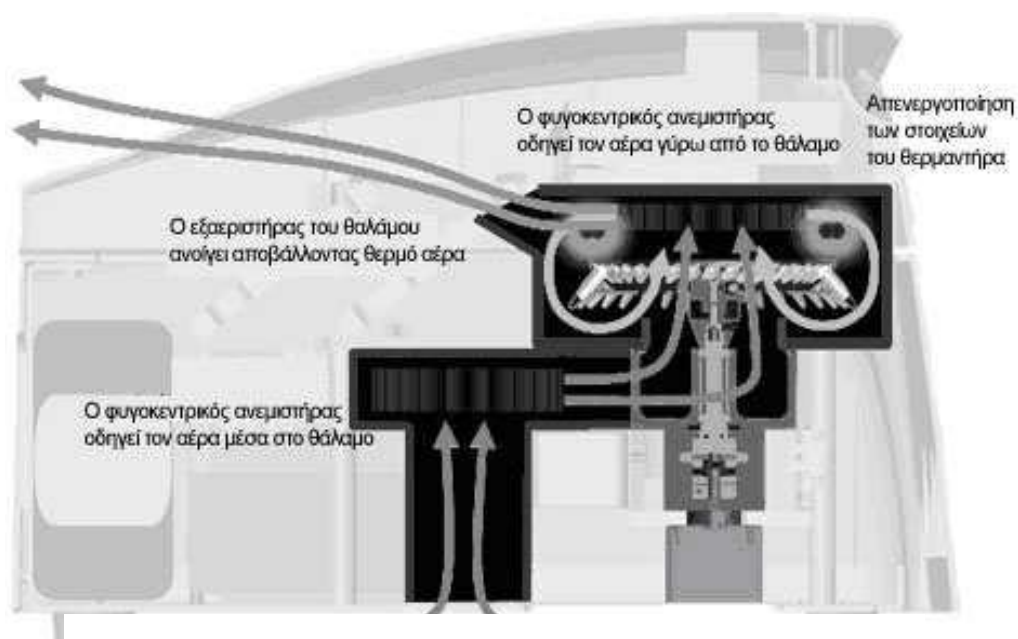
Σχήμα 5-7. Ο θερμικός κυκλοποιητής Rotor-Gene Q.

Το Rotor-Gene Q χρησιμοποιεί έναν εξελιγμένο σχεδιασμό θέρμανσης (σχήμα 5-8) και ψύξης (σχήμα 5-9) για να επιτύχει τις βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης. Τα δείγματα θερμαίνονται και ψύχονται σε χαμηλής μάζας αέρα κλίβανο. Η θέρμανση επιτυγχάνεται από ένα στοιχείο νικελίου-χρωμίου στο καπάκι. Ο θάλαμος ψύχεται από την εξαέρωση μέσω της οροφής του θαλάμου ενώ αέρας σε θερμοκρασία περιβάλλοντος εμφυσείται μέσω της βάσης.

Η μοναδική περιστροφική μορφή του εξασφαλίζει βέλτιστη θερμική και οπτική ομοιομορφία ανάμεσα στα δείγματα, η οποία είναι σημαντική για την ακριβή και αξιόπιστη ανάλυση. Τα δείγματα περιστρέφονται συνεχώς στις 400 rpm κατά τη διάρκεια της κυκλοποίησης. Η φυγοκέντρωση εμποδίζει τη συμπύκνωση και αφαιρεί τις φυσαλίδες αέρα, αλλά δεν συμπιέζει το DNA. Επιπλέον, τα δείγματα δεν χρειάζεται να φυγοκεντρηθούν πριν από την έναρξη της κυκλοποίησης.



Σχήμα 5-8. Το σύστημα θέρμανσης του θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene Q.



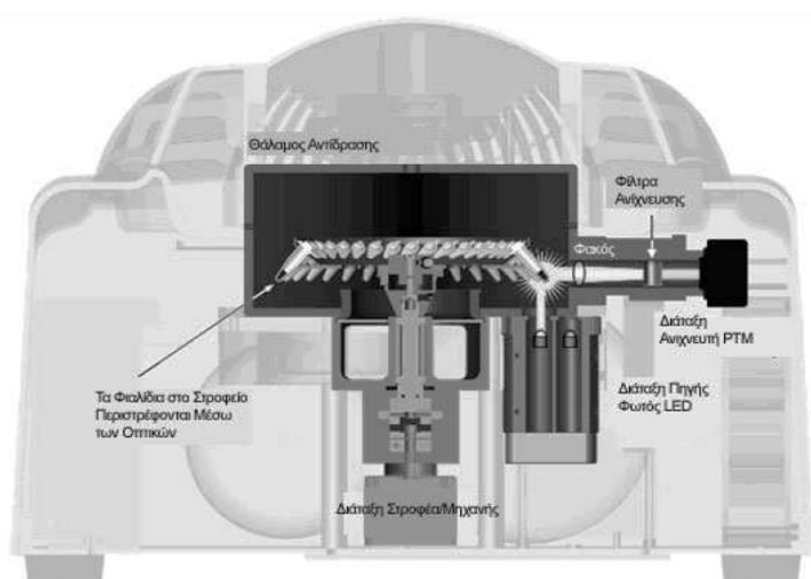
Σχήμα 5-9. Το σύστημα ψύξης του θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene Q.

Με επιλογή έως 6 πηγών διέγερσης και 6 φίλτρων ανίχνευσης (σχήμα 5-10) συνδυασμένων με μία σύντομη σταθερή οπτική διαδρομή, το Rotor Gene Q μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλαπλές PCR αντιδράσεις, διασφαλίζοντας ελάχιστη μεταβλητότητα φθορισμού ανάμεσα στα δείγματα και εξαλείφοντας την ανάγκη για βαθμονόμηση ή αντιστάθμιση.

Κανάλι	Διέγερση (nm)	Ανίχνευση (nm)	Παραδείγματα φθορισμών που ανιχνεύθηκαν
Μπλε	365±20	460±20	Marina Blue®, Edans Bothell Blue, Alexa Fluor® 350, AMCA-X, ATTO 390
Πράσινο	470±10	510±5	FAM®, SYBR® Green I, Fluorescein, EvaGreen®, Alexa Fluor 488
Κίτρινο	530±5	557±5	JOE™, VIC®, HEX, TET™, CAL Fluor® Gold 540, Yakima Yellow®
Πορτοκαλί	585±5	610±5	ROX™, CAL Fluor Red 610, Cy®3.5, Texas Red®, Alexa Fluor 568
Κόκκινο	625±10	660±10	Cy5, Quasar® 670, LightCycler® Red640, Alexa Fluor 633
Βυσσινί	680±5	712 high pass	Quasar 705, LightCycler Red705, Alexa Fluor 680
Υψηλής διακριτικής ικανότητας καμπύλη τήξης (HRM)	460±20	510±5	SYBR Green I, SYTO®9, LC Green®, LC Green Plus+, EvaGreen

Σχήμα 5-10. Διαθέσιμα κανάλια θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene Q.

Τα δείγματα διεγείρονται από τον πυθμένα του θαλάμου από μία δίοδο που εκπέμπει φως. Ενέργεια μεταδίδεται μέσω των λεπτών τοιχωμάτων στη βάση του περιέκτη. Ο εκπνευόμενος φθορισμός διέρχεται μέσω φίλτρων ακτινοβολίας στις πλευρές του θαλάμου και στη συνέχεια συλλέγεται από ένα φωτοπολλαπλασιαστή (σχήμα 5-11). Η σταθερή οπτική διαδρομή διασφαλίζει συνεχή διέγερση για κάθε δείγμα, που σημαίνει ότι δεν υπάρχει ανάγκη χρήσης αδρανούς χρωστικής ουσίας αναφοράς.



Σχήμα 5-11. Απεικόνιση οπτικού συστήματος του θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene Q.

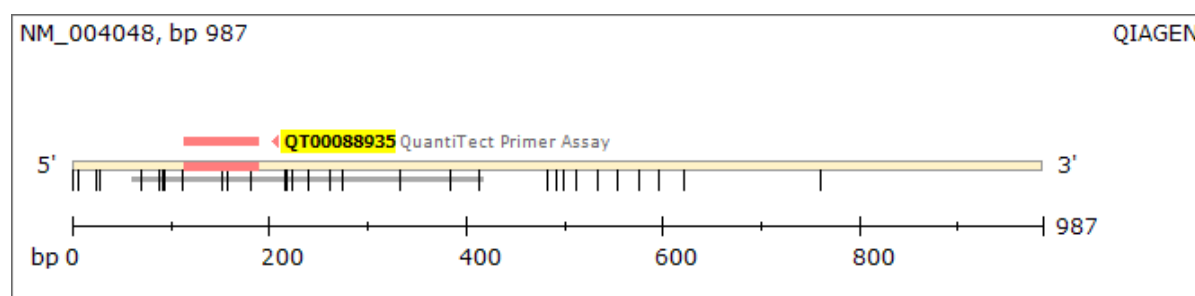
Ο θερμικός κυκλοποιητής Rotor-Gene Q συνοδεύεται από δυο φορείς υποδοχέων. Ο φορέας των 36 θέσεων (κόκκινος δακτύλιος) μπορεί να φέρει σωληνάρια 0,2 ml και σε κάθε σωληνάριο μπορούν να πραγματοποιηθούν αντιδράσεις από 20–50 µL. Ο φορέας των 72 θέσεων (μπλε δακτύλιος) μπορεί να φέρει σωληνάρια 0,1 ml και σε κάθε σωληνάριο μπορούν να πραγματοποιηθούν αντιδράσεις από 10–50 µL.

5.12.2.2 Μελέτη έκφρασης του *RASSF1* γονιδίου

Για την μελέτη έκφρασης του *RASSF1* γονιδίου χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς η β2-μικροσφαιρίνη. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση και μελέτη της έκφρασης του *RASSF1* γονιδίου στα δείγματα των ασθενών ελήφθησαν από την Qiagen. Έχουν σχεδιασθεί από την εν λόγω εταιρεία και τα χαρακτηριστικά τους δίδονται ακολούθως στα σχήματα 5-12 και 5-13, όπως εμφανίζονται στην επίσημη ιστοσελίδα αυτής (www.qiagen.com).

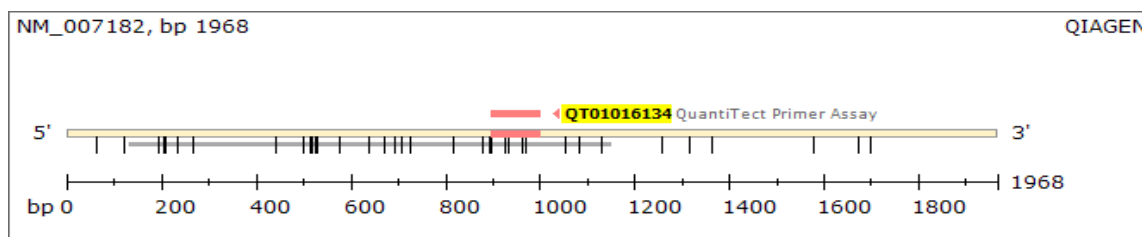
Για την ανασύσταση των λυοφιλωμένων εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν 1000 µL διαλύματος TE, pH 8,0.

Οι εκκινητές της β2-μικροσφαιρίνης (NM_004048) υβριδίζονται στα εξόνια 1 και 2 και το προϊόν που ενισχύεται αναμένεται να έχει μήκος 98 bp (σχήμα 5-12).



Σχήμα 5-12. Η περιοχή ενίσχυσης του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης. (www.qiagen.com/gr/shop/pcr/real-time-pcr-enzymes-and-kits/two-step-qrt-pcr/quantitect-primer-assays?catno=QT00088935#geneglobe)

Οι εκκινητές του *RASSF1* υβριδίζονται στα εξόνια 3 και 4 και το προϊόν που ενισχύεται αναμένεται να έχει μήκος 121 bp (σχήμα 5-13). Σημειώνεται πως οι εκκινητές αυτοί δεν στοχεύουν ειδικά στο *RASSF1A*, αλλά χρησιμοποιούνται και για τα υπόλοιπα μετάγραφα του *RASSF1*.



Σχήμα 5-13. Η περιοχή ενίσχυσης του *RASSF1* γονιδίου. (<https://www.qiagen.com/gr/shop/pcr/real-time-pcr-enzymes-and-kits/two-step-qrt-pcr/quantitect-primer-assays?catno=QT01016134#geneglobe>)

Για την μελέτη έκφρασης χρησιμοποιήθηκε το Rotor-Gene SYBR Green PCR kit της Qiagen. Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή και δεν απαιτήθηκε περαιτέρω διερεύνηση ή μεταβολή των συστατικών και των συνθηκών της αντίδρασης, με εξαίρεση την αλλαγή των κύκλων της PCR αντίδρασης σε 45. Το Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix περιέχει HotStarTaq Plus DNA πολυμεράση, Tris·Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, MgCl₂, αντιδραστήριο Q και άλλα πρόσθετα που ενισχύουν την αντίδραση, dNTPs και τη χρωστική SYBR Green I.

Τα συστατικά της PCR αντίδρασης και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα ήταν ίδια και για τα δύο γονίδια. Άλλωστε, για την σχετική ποσοτικοποίηση του *RASSF1A* γονιδίου και για κάθε ένα δείγμα μελετούνταν/ενισχύονταν παράλληλα και στην ίδια πειραματική διαδικασία (ίδιο run) και το γονίδιο της β2-μικροσφαιρίνης. Οι ίδιες συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν και για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς για κάθε γονίδιο.

Πίνακας 5-17. Συστατικά της PCR αντίδρασης για την μελέτη έκφρασης του *RASSF1* γονιδίου.

Αντιδραστήρια (αρχική συγκέντρωση)	Προστιθέμενος	Τελική
ddH ₂ O	9,0 μL	
Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix	12,5 μL	1X
Εκκινητές (10 pmol/μL)	2,5 μL	1 pmol/μL
Converted DNA	1,0 μL	
Σύνολο	25,0 μL	

Πίνακας 5-18. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα της PCR αντίδρασης για την μελέτη έκφρασης του *RASSF1* γονιδίου.

Βήμα	Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια	Αριθμός κύκλων
Αρχική Αποδιάταξη	95 °C	5 min	45
Αποδιάταξη	95 °C	5 sec	
Υβριδοποίηση / επέκταση	60 °C	10 sec	
Τελική επέκταση	72 °C	7 min	
Στάδιο προ τήξης	60 °C	90 sec	
Τήξη	60-95 °C, 1°C / βήμα	5 sec/ βήμα	

5.12.3 Καθαρισμός PCR προϊόντων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς

Για την παρασκευή των προτύπων δειγμάτων του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης και του *RASSF1* γονιδίου, έγινε ένωση πολλών PCR προϊόντων και στη συνέχεια καθαρισμός του πυκνού αυτού βαθμονομητή με το PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen/Thermo Fisher) και ακολούθησε μέτρηση της συγκέντρωσης στο Qubit. Τέλος έγιναν διαδοχικές αραιώσεις 1:10 μέχρι θεωρητικά μηδενικής συγκεντρώσεως.

5.12.3.1 Αντιδραστήρια / υλικά / εξοπλισμός

- Ισοπροπανόλη 100% (Scharlab, Ισπανία)
- Αιθανόλη 96-100 % (Scharlab, Ισπανία)
- Αποστειρωμένο νερό (pH>7)
- Μικροφυγόκεντρος Minispin plus (Eppendorf, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα σύνδεσης B2 (Invitrogen/ Thermo Fisher)
- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης W1 (Invitrogen/ Thermo Fisher)
- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης E1 (Invitrogen/ Thermo Fisher)
- PureLink στήλες, φίλτρα και σωληνάκια έκλουσης (Invitrogen/ Thermo Fisher)
- Σωληνάκια συλλογής τύπου eppendorf

5.12.3.2 Πειραματική πορεία καθαρισμού

Πρόσδεση DNA

- 1) Ανάμειξη 50 μl PCR προϊόντων με 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος σύνδεσης B2 με ισοπροπανόλη
- 2) Μεταφορά μείγματος σε PureLink στήλη και φυγοκέντρωση για 1 min στα 10.000× g
- 3) Απορρίπτεται το υγρό του σωληναρίου συλλογής

Έκπλυση DNA

- 1) Προστίθενται 650 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης W1
- 2) Φυγοκέντρωση για 1 min στα 10.000× g
- 3) Απορρίπτεται το υγρό του σωληναρίου συλλογής
- 4) Φυγοκέντρωση για 3 min στα 14.000× g
- 5) Απόρριψη του σωληναρίου συλλογής

Έκλυση DNA

- 1) Τοποθετείται η στήλη εντός PureLink σωληναρίων έκλυσης
- 2) Προστίθενται 50 μ l ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης E1
- 3) Επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου
- 4) Φυγοκέντρηση για 2 min στα 14.000 $\times$ g
- 5) Το σωληνάριο έκλυσης περιέχει το DNA

5.12.4 Υπολογισμός της συγκέντρωσης των προτύπων δειγμάτων

Ο βαθμονομητής του γονιδίου της β 2-μικροσφαιρίνης περιέχει τμήμα DNA 98 bp του mRNA του γονιδίου και το μοριακό βάρος του μπορεί να υπολογιστεί από το γινόμενο (όπου το 660 είναι το μέσο μοριακό βάρος ενός ζεύγους βάσεων DNA):

$$MB = 98 \times 660 \Rightarrow MB = 64680$$

Γνωρίζουμε όμως ότι 1 mole μιας ουσίας περιέχει $6,023 \times 10^{23}$ μόρια. Η συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος που μετρήθηκε με το φθορισμόμετρο Qubit® είναι ίση με 5,71 ng/ μ L. Επομένως, η συγκέντρωση του διαλύματος σε αντίγραφα/ μ L υπολογίζεται γνωρίζοντας ότι σε 1 mole ουσίας περιέχονται $6,023 \times 10^{23}$ μόρια (αντίγραφα DNA) άρα έχουν μάζα 64680 g (64×10^9 ng).

Άρα, αναλογικά προκύπτει ότι το πυκνό διάλυμα περιέχει $5,32 \times 10^{10}$ αντίγραφα/ μ L.

Ο βαθμονομητής του *RASSF1* γονιδίου περιέχει τμήμα DNA 121 bp του mRNA του γονιδίου και το μοριακό βάρος του μπορεί να υπολογιστεί από το γινόμενο:

$$MB = 121 \times 660 \Rightarrow MB = 79860$$

Η συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος που μετρήθηκε με το φθορισμόμετρο Qubit® είναι ίση με 4,89 ng/ μ L. Επομένως, η συγκέντρωση του διαλύματος σε αντίγραφα/ μ L υπολογίζεται γνωρίζοντας ότι σε 1 mole ουσίας περιέχονται $6,023 \times 10^{23}$ μόρια (αντίγραφα DNA) άρα έχουν μάζα 79860 g (79×10^9 ng).

Άρα, αναλογικά προκύπτει ότι το πυκνό διάλυμα περιέχει $3,69 \times 10^{10}$ αντίγραφα/ μ L.

5.12.5 Μαθηματική ανάλυση της μελέτης έκφρασης του γονιδίου *RASSF1A* και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Υπολογίσθηκαν η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση (SD) και ο συντελεστής διακύμανσης (CV%) των προτύπων διαλυμάτων και για την τομή, την κλίση και την απόδοση της real-time qPCR τα στοιχεία ενδιάμεσης αναπαραγωγιμότητας και επαναληψιμότητας της μεθόδου (runs σε διαφορετικές ημέρες).

Για την μαθηματική ανάλυση της μελέτης έκφρασης του γονιδίου *RASSF1A* χρησιμοποιήθηκε η απλοποιημένη μορφή της μεθόδου $2^{-\Delta\Delta C_T}$, όπως περιγράφεται από τους Livak και Schmittgen.^(155, 156) Η σχετική έκφραση του γονιδίου *RASSF1A*, εν σχέση με την έκφραση του γονιδίου της $\beta 2$ -μικροσφαιρίνης, εκφράζεται ως ένας αριθμός, για τον υπολογισμό του οποίου χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος μαθηματικός τύπος:

$$RQ = 2^{-\Delta C_T},$$

όπου RQ είναι το ποσό της σχετικής έκφρασης,

$$\Delta C_T = C_{T(RASSF1A)} - C_{T(\beta 2\text{-μικροσφαιρίνης})},$$

και C_T είναι ο κύκλος στον οποίο ανιχνεύεται προϊόν και δίδεται από το λογισμικό πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή Rotor-Gene Q.

Στη συνέχεια το RQ πολλαπλασιάστηκε επί 1000 για να μπορεί να αξιολογηθεί καλύτερα και έτσι εισήχθηκε στο στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 21.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε περιγραφική στατιστική ανάλυση των κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των ιστών και των ασθενών και ακολούθησε ο έλεγχος της κανονικότητας των ποσοτικών μεταβλητών με τις δοκιμασίες Kolmogorov-Smirnov.

Στη συνέχεια, τα δεδομένα αξιολογήθηκαν μέσω δισδιάστατων πινάκων συνάφειας (cross-tabulation or contingency table). Ο έλεγχος της ύπαρξης ή όχι ανεξαρτησίας μεταξύ των κατηγορικών μεταβλητών ελέγχθηκε με τη δοκιμασία Pearson χ^2 ή την δοκιμασία Fisher's exact. Για τις συνεχείς παραμέτρους που ακολουθούν την κανονική κατανομή εφαρμόστηκε η παραμετρική δοκιμασία t-test για την σύγκριση των μέσων όρων, ενώ για

εκείνες που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή εφαρμόστηκε η μη-παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney για την σύγκριση των διαμέσων τιμών μεταξύ δυο μεταβλητών, αντίστοιχα. Ακόμη, οι συντελεστές συσχέτισης Pearson και Spearman χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθεί η ισχύς της συσχέτισης μεταξύ των συνεχών μεταβλητών (με παραμετρικό ή μη-παραμετρικό τρόπο, αναλόγως της κανονικότητάς τους).

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν η Γραμμική Παλινδρόμηση (Linear Regression) για την συσχέτιση των συνεχών μεταβλητών που μετρήθηκαν, δηλαδή τον βαθμό της μεθυλίωσης και την mRNA έκφραση. Επίσης έγινε Διωνυμική Λογαριθμιστική Παλινδρόμηση (Binary Logistic Regression) με σκοπό την εύρεση μοντέλου που να συσχετίζει την λεμφαδενική διήθηση ή τη μετάσταση με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών και τα μετρούμενα αποτελέσματα της διατριβής αυτής (βαθμός μεθυλίωσης και έκφρασης μεταγράφου *RASSF1A*).

Τέλος, στις ασθενείς όπου υπήρχαν δεδομένα follow-up αναφορικά με τη μετάσταση, πραγματοποιήθηκε ανάλυση επιβίωσης προκειμένου να εξετασθεί εάν η μετάσταση των ασθενών σχετίζεται με το βαθμό μεθυλίωσης και την έκφραση του *RASSF1* μεταγράφου.

Όλα τα παρατηρηθέντα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας (p -value) ήταν two-sided και η στάθμη εμπιστοσύνης ορίστηκε στο 0,05.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία, απομονώθηκε DNA και ολικό RNA από 81 ιστούς καρκίνου του μαστού και 4 φυσιολογικούς ιστούς (χωρίς κακοήθεια) από το Ευγενίδειο Θεραπευτήριο και πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός DNA και RNA φθορισμομετρικά με το φθορισμόμετρο Qubit®. Στον πίνακα 6-1 φαίνονται τα κλινικά και ιστοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Η μεταβλητή ιστοπαθολογοανατομικός τύπος ομαδοποιήθηκε σε τρεις ομάδες: φυσιολογικοί ιστοί (NORMAL), καρκινώματα καλής πρόγνωσης και καρκινώματα κακής πρόγνωσης προς διευκόλυνση των μετέπειτα στατιστικών αναλύσεων. Στα καρκινώματα κακής πρόγνωσης, που αποτελούσαν το 80% των δειγμάτων, συμπεριλήφθηκαν το πορογενές (IDC) και το Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors (MPNST), ενώ στα καρκινώματα καλλίτερης πρόγνωσης, το λοβιακό καρκίνωμα (ILC), το μικτό καρκίνωμα (IDC & ILC, MIX), το βλεννώδες καρκίνωμα (MUC), το θηλώδες καρκίνωμα (PAP), το λοβιακό καρκίνωμα σπάνιου τύπου (LOBRARE), το ενδοτορικό καρκίνωμα (DCIS) και το μεταπλαστικό καρκίνωμα (MET). Η ηλικία χωρίστηκε σε δύο ομάδες, όπου στην πρώτη εντάχθηκαν οι ασθενείς <50 ετών και στη δεύτερη οι ασθενείς >50 ετών. Ο βαθμός διαφοροποίησης ομαδοποιήθηκε σε δύο κατηγορίες, καθώς υπήρχαν λίγα δείγματα με Grade I: την I (ενώθηκαν οι βαθμοί I και II) και την II (βαθμός III). Ακόμη, η έκφραση των ορμονικών υποδοχέων κατηγοριοποιήθηκε είτε ως θετική (με αποτέλεσμα IHC 2+ έως 3+) είτε ως αρνητική (με αποτέλεσμα IHC 0 έως 1). Η ενίσχυση του ογκογονιδίου HER2 ομαδοποιήθηκε σε θετική (3 ή 2 με FISH+) και σε αρνητική (0 έως 2 ή 2 με FISH-). Στον πίνακα 6-2 παρουσιάζεται η συγκέντρωση του DNA και του ολικού RNA για κάθε δείγμα. Στα περισσότερα των δειγμάτων έγινε προσπάθεια να παραχθεί cDNA από 3 µg RNA (ειδάλως από 0,5µg RNA).

Πίνακας 6-1. Κλινικά και ιστοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο του μαστού.

ID	Age	Size	Ιστοπαθολογοανατομικός τύπος	Lymph Node	Grade	ER	PGR	HER2 ενίσχυση	Μετάσταση
T2	56	1,5	NORMAL	-	-	-	-	-	-
T3	70	3,0	ILC	Θετικό	II	3	1	1	OXI
T4	58	1,5	IDC	Θετικό	II	2	1	0	OXI
T7	76	3,5	IDC	Αρνητικό	II	3	2	0	-
T9	-	1,3	IDC	Θετικό	II	3	2	0	OXI
T10	58	1,8	IDC	Θετικό	I	3	2	0	OXI
T11	47	1,5	IDC	Θετικό	II	3	3	3	OXI
T12	-	3,0	IDC	Αρνητικό	III	0	0	2	OXI
T13	-	2,2	MUC	Θετικό		2	2	0	OXI
T16	-	1,5	IDC	Θετικό	II	1	1	0	OXI
T17	-	-	IDC		III	1	2	0	NAI
T18	-	2,2	IDC	Αρνητικό	III	0	0	2	OXI
T19	-	-	MIX	-	-	-	-	-	-
T28	-	1,5	IDC	Αρνητικό	II	3	1	1	OXI
T31	-	2,0	IDC	Αρνητικό	II	3	2	1	OXI
T32	38	1,5	NORMAL	-	-	-	-	-	-
T34	-	-	NORMAL	-	-	-	-	-	-
T35	-	3,0	IDC	Αρνητικό	III	1	0	1	OXI
T36	72	4,0	LOBRARE	Θετικό	III	3	3	1	OXI
T37	57	2,0	IDC	Αρνητικό	II	0	0	2	OXI
T39	65	5,5	ILC	Θετικό	II	2	2	2	OXI
T40	45	1,8	MIX	Αρνητικό	III	2	2	2	OXI
T42	69	1,3	IDC	Θετικό	II	3	3	2	OXI
T43	62	3,0	IDC	Θετικό	II	2	0	1	OXI
T44	76	2,3	IDC	Θετικό	II	2	2	2	OXI
T46	72	1,8	IDC	Θετικό	II	3	1	2	OXI
T48	60	1,6	IDC	Αρνητικό	III	1	0	2	NAI
T49	65	2,2	IDC	Αρνητικό	II	3	2	3	NAI
T50	40	1,0	IDC	Θετικό	II	3	2	2	-
T51	64	2,0	IDC	Θετικό	II	3	1	2	OXI
T52	50	2,5	IDC	Αρνητικό	III	2	1	2	OXI
T53	80	3,0	IDC	Αρνητικό	II	3	2	2	-
T54	45	5,0	DCIS	Αρνητικό	-	1	0	1	OXI
T55	50	2,0	IDC	Θετικό	II	3	2	2	-
T56	66	2,0	PAP	Θετικό	-	3	2	2	-
T57	42	1,8	IDC	Θετικό	III	0	0	2	OXI

T58	71	3,0	IDC	Αρνητικό	II	1	0	2	OXI
T59	56	1,6	IDC	Θετικό	II	3	0	2	OXI
T61	65	3,0	IDC	Θετικό	III	3	1	2	OXI
T63	69	1,0	PAP	Θετικό	-	3	2	2	OXI
T64	40	2,5	PAP	Θετικό	II	0	0	0	-
T65	59	1,5	IDC	Θετικό	II	3	3	2	-
T66	64	1,5	PAP	Θετικό	-	3	0	1	NAI
T68	54	2,0	IDC	Θετικό	III	3	3	2	OXI
T69	-	3,5	IDC	Θετικό	III	2	1	2	-
T70	47	1,5	IDC	-	II	3	1	2	NAI
T71	83	1,8	IDC	Αρνητικό	II	1	1	2	OXI
T72	49	1,8	IDC	Αρνητικό	II	3	1	2	OXI
T73	72	1,0	PAP	Θετικό	-	3	1	1	OXI
T74	68	2,5	IDC	Θετικό	II	3	1	2	-
T75	56	1,3	IDC	Θετικό	II	3	2	2	OXI
T76	39	1,0	IDC	Θετικό	II	3	2	2	-
T77	50	1,3	IDC	Θετικό	I	2	2	0	OXI
T78	42	1,6	IDC	Θετικό	II	2	2	2	-
T79		1,3	IDC	Θετικό	II	3	1	2	OXI
T80	51	1,3	MIX	Θετικό	II	3	1	1	OXI
T81	59	2,5	MUC	Θετικό	II	3	0	1	NAI
T82	29	2,2	IDC	Θετικό	II	2	1	2	-
T87	48	1,2	IDC	Θετικό	II	0	0	1	-
T88	45	1,5	MET	-	-	0	0	1	-
T89	45	3,5	ILC	Αρνητικό	II	3	3	1	OXI
T91	74	1,5	IDC	Θετικό	III	3	1	2	-
T92	62	1,3	IDC	Αρνητικό	II	0	0	0	OXI
T93	52	1,0	IDC	-	III	3	2	2	NAI
T94	67	1,0	IDC	Θετικό	II	3	2	1	OXI
T95	47	2,5	IDC	Θετικό	III	1	0	1	OXI
T98	64	2,0	IDC	Αρνητικό	II	0	0	1	-
T100	60	3,0	MPNST	-	II				NAI
T101	75	1,5	IDC	Θετικό	II	0	0	1	OXI
T102	45	2,0	IDC	Θετικό	II	3	2	1	NAI
T103	68	2,0	IDC	-	I	3	3	0	-
T104	55	1,4	IDC	Θετικό	II	3	3	1	-
T105	48	1,6	IDC	Θετικό	II	2	2	3	-
T106	36	2,2	IDC	Αρνητικό	III	3	0	2	-
T108	63	1,6	IDC	Αρνητικό	II	0	0	2	-
T109	-	1,0	IDC	Θετικό	II	3	3	0	-
T110	-	1,5	IDC	Θετικό	II	3	2	2	OXI

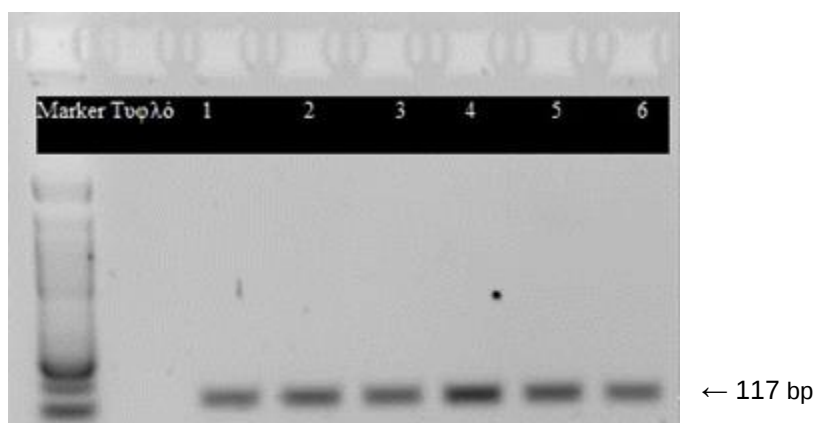
T111	62	1,7	IDC	Θετικό	II	3	2	2	-
T112	62	3,5	IDC	Αρνητικό	II	3	2	1	-
T116	81	2,8	IDC	Θετικό	II	3	3	2	-
T121	35	-	NORMAL	-	-	-	-	-	-
T128	51	1,8	ILC	Αρνητικό	III	3	3	2	OXI
T131	43	1,8	IDC	Θετικό	II	3	0	0	OXI
T132	47	3,5	ILC	Αρνητικό	II	2	2	1	OXI
T142	39	1,5	IDC	Θετικό	II	3	3	3	OXI

Πίνακας 6-2. Ποσοτικός προσδιορισμός DNA και RNA δειγμάτων.

ID	DNA (ng/μL)	RNA (ng/μL)	ID	DNA (ng/μL)	RNA (ng/μL)	ID	DNA (ng/μL)	RNA (ng/μL)	ID	DNA (ng/μL)	RNA (ng/μL)
T2	98,4	1200	T42	46,2	8,54	T69	36,6	36,8	T98	46,2	197,6
T3	174	20	T43	118,5	5,36	T70	47,2	102	T100	74,2	154,8
T4	300	800	T44	431,4	65	T71	15,58	78,6	T101	57	2,8
T7	2,57	1100	T46	267,4	17,34	T72	92,2	492	T102	128,4	114,8
T9	94,5	100	T48	564,1	39,6	T73	236	66,6	T103	75	107,5
T10	172	60	T49	325,4	64	T74	55,4	38,4	T104	196,3	1,7
T11	227	50	T50	123,6	51,8	T75	70	10,72	T105	365,5	191,2
T12	271	2400	T51	135,6	95,6	T76	31,8	120	T106	296,6	408,2
T13	10,7	40	T52	84,2	108	T77	130,8	106	T108	225,2	107,8
T16	600	5	T53	143,6	174	T78	80,4	42	T109	200,1	24,2
T17	73,5	120	T54	128,2	35,2	T79	99,8	62,6	T110	190	11,5
T18	396	300	T55	183,6	39,2	T80	98,4	41,4	T111	79,5	131,7
T19	121	150	T56	67,8	16,58	T81	78,8	71,2	T112	295,11	123
T28	6,67	98	T57	51	110	T82	169,00	56,8	T116	102,2	116,9
T31	126	200	T58	21,2	102	T87	75,6	138	T121	134,7	108,8
T32	7,37	87	T59	194,4	60,8	T88	102,6	102	T128	282,3	81,4
T34	54,3	62	T61	120,6	128	T89	240	174	T131	183,5	36,6
T35	89,1	51	T63	19,34	88	T91	68,6	57,2	T132	159,2	14,8
T36	396,1	191,9	T64	130,2	64,4	T92	27,4	74,8	T142	193,2	75,7
T37	348,9	21,3	T65	29,4	80,6	T93	38,2	116			
T39	78,4	9	T66	64	1	T94	32	25,2			
T40	199,9	74,3	T68	86,4	27,6	T95	50,8	14,66			

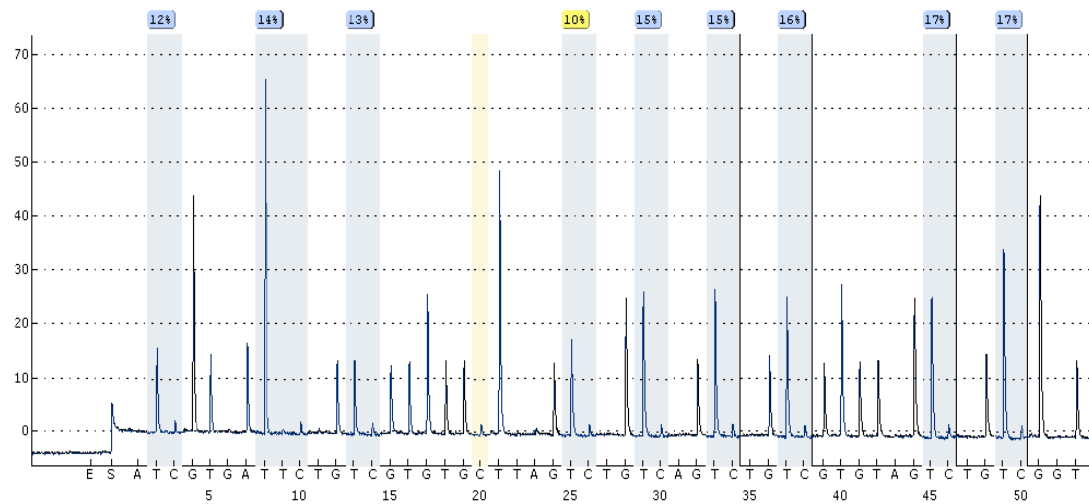
6.2 Ανίχνευση μεθυλίωσης του πρώτου υποκινητή του *RASSF1* γονιδίου

Πριν την ανίχνευση της μεθυλίωσης πραγματοποιήθηκε PCR και ελέγχθηκαν τα προϊόντα για το σωστό μέγεθος και την καθαρότητα της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης 2%. Στο σχήμα 6-1 φαίνονται ενδεικτικά οι αντιδράσεις μερικών δειγμάτων.



Σχήμα 6-1. Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης με προϊόντα από PCR αντιδράσεις για την ανίχνευση επιγενετικών τροποποιήσεων στον πρώτο υποκινητή του *RASSF1* γονιδίου.

Στην συνέχεια τα δείγματα έπειτα από την κατάλληλη προεργασία εισήχθησαν στον αναλυτή PyroMark Q96 προς ανάλυση. Κατά την ανάλυση υπήρχε εσωτερικός έλεγχος για την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης μετατροπής των δειγμάτων με όξινο θειώδες νάτριο. Αναλύθηκαν συνολικά 9 CpG δινουκλεοτίδια στον υποκινητή του γονιδίου *RASSF1A*. Στα 85 συνολικά δείγματα ανιχνεύθηκαν διαφορετικά ποσοστά μεθυλίωσης. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιείται ο μέσος όρος της μεθυλίωσης των 9 CpG δινουκλεοτιδίων ως τελικό ποσοστό μεθυλίωσης. Στα σχήματα που ακολουθούν δίδονται τα πυρογράμματα δύο συνθετικών προτύπων διαλυμάτων (standards) καθώς και ενός υπο- και ενός υπερ- μεθυλιωμένου δείγματος. Οι μπλε στήλες αντιπροσωπεύουν τα CpG δινουκλεοτίδια που εξετάστηκαν, ενώ με τις κίτρινες στήλες παρουσιάζονται οι δυο κυτοσίνες εκτός CpG περιοχών που εξετάστηκαν προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της μετατροπής του DNA με θειώδες νάτριο. Το λογισμικό πρόγραμμα δίνει με ακρίβεια δύο δεκαδικών το ποσοστό μεθυλίωσης, αλλά στα πυρογράμματα εμφανίζεται ακέραιος αριθμός.

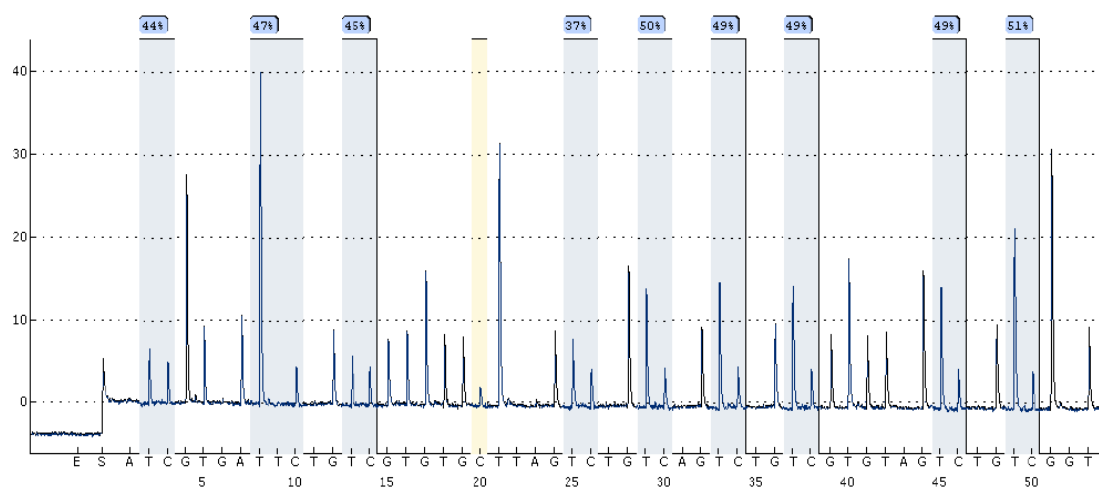


Sequence to analyze:

YGGGTATTTTGYGTGGTGTTTTGYGGTYGTGYGTGTGGTYGTTTGGGGTGGGGTGTGAGGAGGGGA

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Quality	Passed	Passed	Passed	Check	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Meth (%)	12	14	13	10	15	15	16	17	17

Σχήμα 6-2. Πυρόγραμμα μη μεθυλιωμένου συνθετικού δείγματος (μέσος όρος μεθυλίωσης 14%).

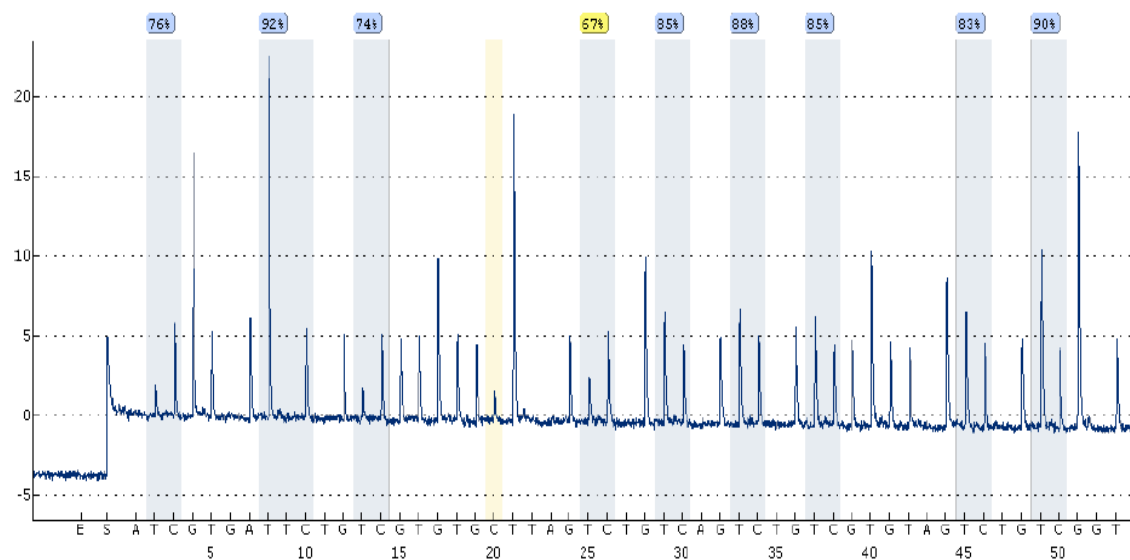


Sequence to analyze:

YGGGTATTTTGYGTGGTGTTTTGYGGTYGTGYGTGTGGTYGTTTGGGGTGGGGTGTGAGGAGGGGA

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Meth (%)	44	47	45	37	50	49	49	49	51

Σχήμα 6-3. Πυρόγραμμα 40% μεθυλιωμένου συνθετικού δείγματος (μέσος όρος μεθυλίωσης 47%).

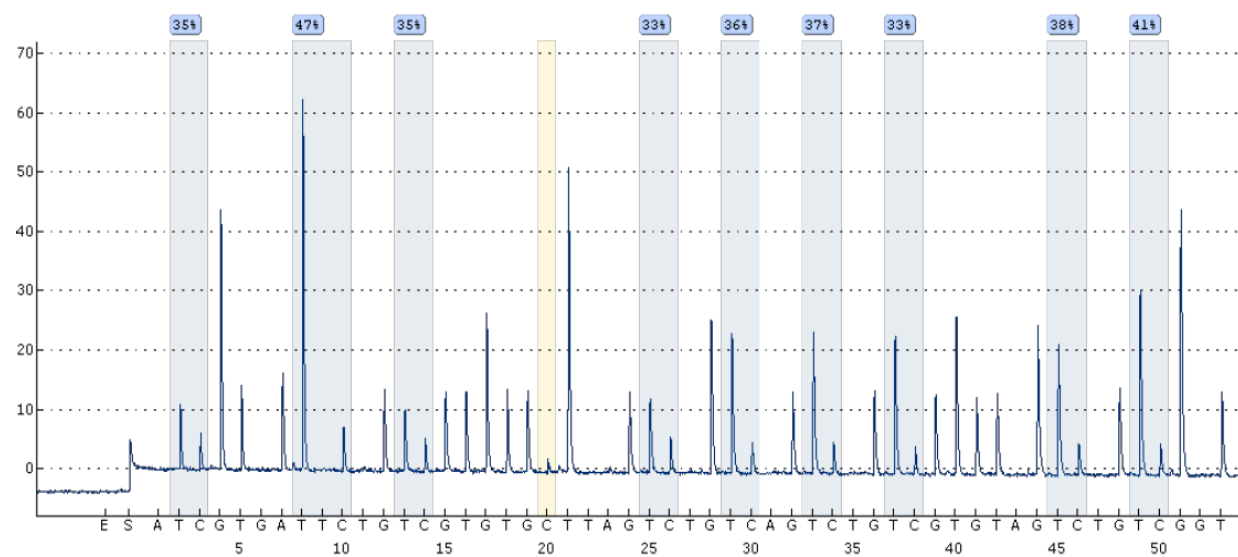


Sequence to analyze:

YGGGTATTTT~~Y~~GYGTGGTGT~~TTT~~GYGGT~~Y~~GT~~Y~~GT~~Y~~GTTGTGGT~~Y~~GTT~~Y~~GGGGTGGGGTGTGAGGAGGGGA

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Quality	Passed	Passed	Passed	Check	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Meth (%)	76	92	74	67	85	88	85	83	90

Σχήμα 6-4. Πυρόγραμμα υπερ-μεθυλιωμένου δείγματος ασθενούς (μέσος όρος μεθυλίωσης 82%).



Sequence to analyze:

YGGGTATTTT~~Y~~GYGTGGTGT~~TTT~~GYGGT~~Y~~GT~~Y~~GT~~Y~~GTTGTGGT~~Y~~GTT~~Y~~GGGGTGGGGTGTGAGGAGGGGA

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed
Meth (%)	35	47	35	33	36	37	33	38	41

Σχήμα 6-5. Πυρόγραμμα υπο-μεθυλιωμένου δείγματος ασθενούς (μέσος όρος μεθυλίωσης 37%).

Στον πίνακα 6-3 αναφέρονται τα ποσοστά μεθυλίωσης (μέσος όρος της μεθυλίωσης των 9 CpG δινουκλεοτιδίων) του *RASSF1* γονιδίου όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Υπολογίστηκαν ο μέσος όρος (31,21) και η τυπική απόκλιση (12,94) των φυσιολογικών δειγμάτων προκειμένου να οριστεί το όριο σύμφωνα με το οποίο ένα δείγμα θα θεωρηθεί υπο- ή υπερ-μεθυλιωμένο. Το όριο αυτό ορίστηκε στο 57,09 (μέσος όρος φυσιολογικών + 2* τυπική απόκλιση). Το όριο αυτό είναι λίγο πάνω από το μέσο όρο (45,01) και τη διάμεσο (45,39) των μετρήσεων.

Με το σκεπτικό αυτό, από τα 81 δείγματα ασθενών χαρακτηρίστηκαν ως υπο-μεθυλιωμένα τα 59 (72,8%), ενώ ως υπερ-μεθυλιωμένα τα 22 (27,2%).

Πίνακας 6-3. Ποσοστά *RASSF1* μεθυλίωσης δειγμάτων. Με πράσινο σημειώνονται τα φυσιολογικά, με μπλε τα υπο- και με κόκκινο τα υπερ- μεθυλιωμένα δείγματα.

ID	Ποσοστό μεθυλίωσης	ID	Ποσοστό μεθυλίωσης	ID	Ποσοστό μεθυλίωσης	ID	Ποσοστό μεθυλίωσης
T2	27,76	T42	46,20	T69	42,62	T98	17,85
T3	49,57	T43	49,49	T70	36,26	T100	20,43
T4	23,77	T44	62,52	T71	49,18	T101	32,22
T7	56,86	T46	84,44	T72	34,65	T102	61,58
T9	30,08	T48	70,24	T73	22,05	T103	39,96
T10	30,17	T49	16,92	T74	68,89	T104	74,69
T11	56,66	T50	69,43	T75	20,33	T105	47,55
T12	26,94	T51	47,59	T76	41,96	T106	82,24
T13	31,99	T52	53,64	T77	57,65	T108	67,19
T16	27,82	T53	72,40	T78	54,12	T109	73,97
T17	52,98	T54	34,23	T79	19,61	T110	43,53
T18	48,49	T55	13,98	T80	46,18	T111	46,17
T19	62,85	T56	26,06	T81	21,74	T112	72,41
T28	47,34	T57	23,64	T82	37,05	T116	55,78
T31	19,62	T58	44,46	T87	43,95	T121	34,52
T32	78,44	T59	55,05	T88	21,08	T128	59,18
T34	15,79	T61	55,88	T89	39,67	T131	81,13
T35	15,76	T63	30,77	T91	26,59	T132	59,51
T36	76,75	T64	17,39	T92	16,31	T142	90,05
T37	19,92	T65	45,40	T93	62,43		
T39	42,01	T66	86,95	T94	68,78		
T40	19,97	T68	48,23	T95	13,29		

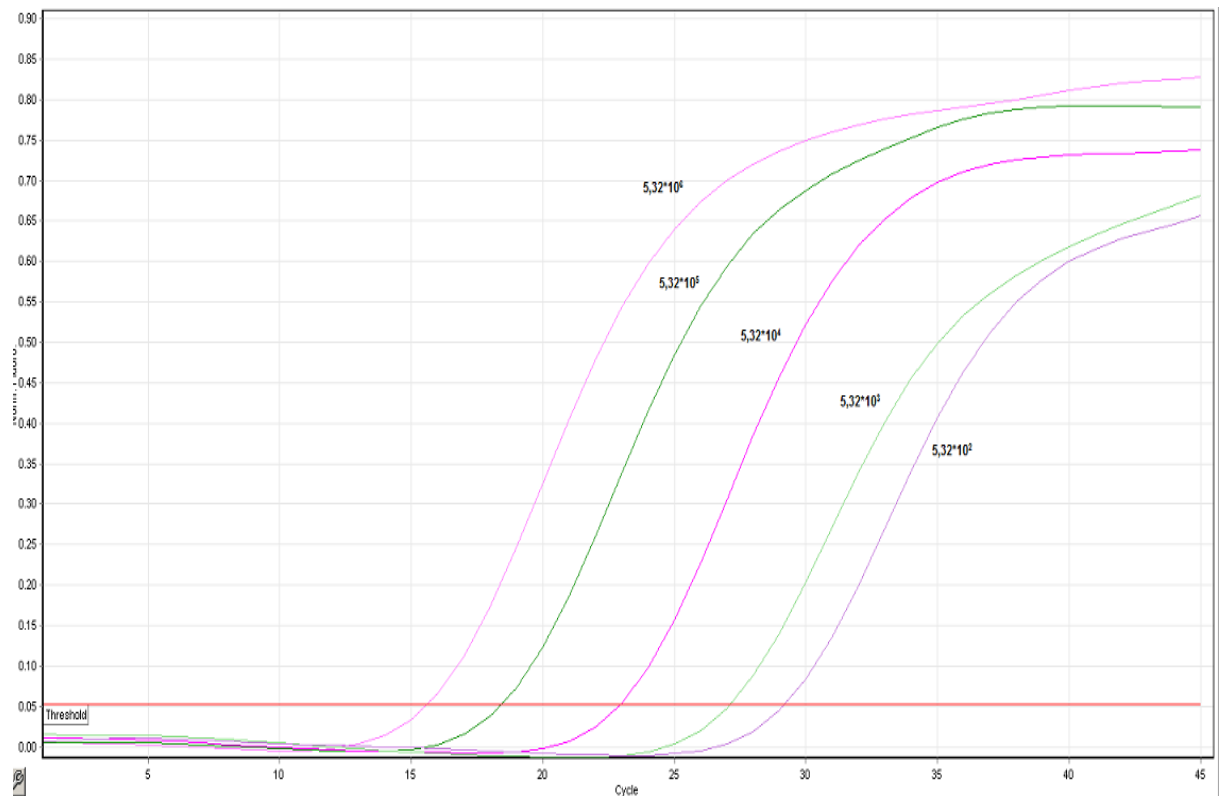
6.3 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς RT-qPCR των γονιδίων της β2-μικροσφαιρίνης και του *RASSF1A*.

Η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς των γονιδίων της β2-μικροσφαιρίνης και του *RASSF1* πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν στην παράγραφο 5.12.2.2 της παρούσης εργασίας. Για κάθε γονίδιο πραγματοποιήθηκε καμπύλη βαθμονόμησης σε τρεις διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες και κάθε φορά οι διαδοχικές αραιώσεις των προτύπων δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εις τριπλούν.

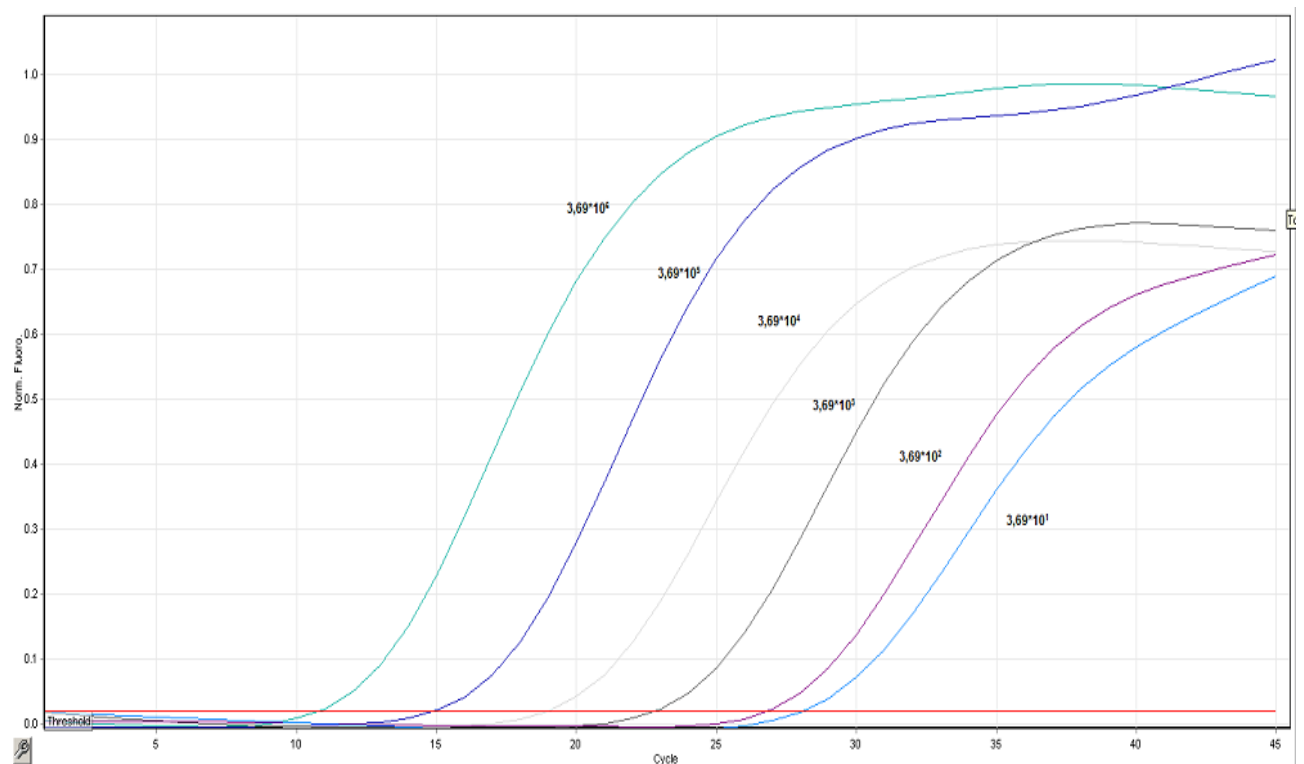
Ακολούθως δίδονται οι συγκεντρώσεις των προτύπων δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τις καμπύλες αναφοράς στον πίνακα 6-4, ενδεικτικά γραφήματα δύο καμπυλών στα σχήματα 6-6 και 6-7 και η επικύρωση των αναλυτικών χαρακτηριστικών της μεθόδου (ενδιάμεση αναπαραγωγικότητα και επαναληψιμότητα) για κάθε γονίδιο, στους πίνακες 6-5 και 6-6.

Πίνακας 6-4. Συγκεντρώσεις προτύπων διαλυμάτων (βαθμονομητών).

A/A προτύπου	Αντίγραφα β2-μικροσφαιρίνης	Αντίγραφα <i>RASSF1A</i>
1 (πυκνό)	$5,32 \cdot 10^{10}$	$3,69 \cdot 10^{10}$
2	$5,32 \cdot 10^9$	$3,69 \cdot 10^9$
3	$5,32 \cdot 10^8$	$3,69 \cdot 10^8$
4	$5,32 \cdot 10^7$	$3,69 \cdot 10^7$
5	$5,32 \cdot 10^6$	$3,69 \cdot 10^6$
6	$5,32 \cdot 10^5$	$3,69 \cdot 10^5$
7	$5,32 \cdot 10^4$	$3,69 \cdot 10^4$
8	$5,32 \cdot 10^3$	$3,69 \cdot 10^3$
9	$5,32 \cdot 10^2$	$3,69 \cdot 10^2$
10	$5,32 \cdot 10^1$	$3,69 \cdot 10^1$
11	$5,32 \cdot 10^0$	$3,69 \cdot 10^0$
12	$5,32 \cdot 10^{-1}$	$3,69 \cdot 10^{-1}$



Σχήμα 6-6. Καμπύλη αναφοράς του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης.



Σχήμα 6-7. Καμπύλη αναφοράς του *RASSF1A* γονιδίου.

Πίνακας 6-5. Στατιστικά στοιχεία επαναληψιμότητας και ενδιάμεσης αναπαραγωγιμότητας καμπύλης αναφοράς του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης.

Ενδιάμεση αναπαραγωγιμότητα				Επαναληψιμότητα		
Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	Συντελεστής διακύμανσης (CV%)	A/A προτύπου	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	Συντελεστής διακύμανσης (CV%)
			5	12,47	0,36	2,87
15,10	1,85	12,26	6	17,40	1,56	8,98
18,79	1,35	7,16	7	20,31	1,44	7,10
22,83	1,38	6,05	8	24,67	1,29	5,22
			9	28,70	1,47	5,12
-3,39	0,24	7,14	κλίση	-3,53	0,10	2,76
35,57	3,00	5,97	απόδοση	0,92	0,04	3,88
0,98	0,10	10,10	τομή	37,15	0,99	2,68

Πίνακας 6-6. Στατιστικά στοιχεία επαναληψιμότητας και ενδιάμεσης αναπαραγωγιμότητας καμπύλης αναφοράς του *RASSF1* γονιδίου.

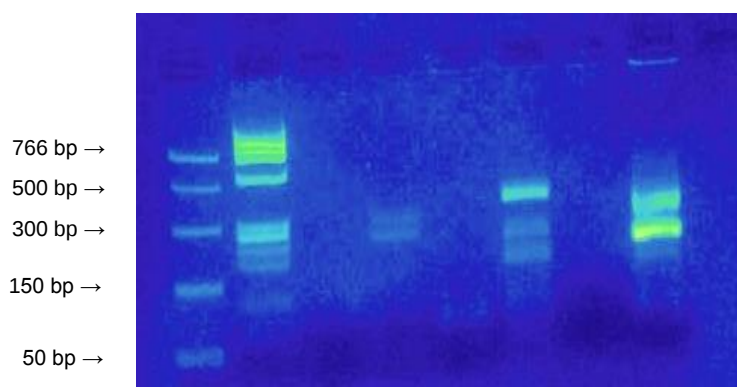
Ενδιάμεση αναπαραγωγιμότητα				Επαναληψιμότητα		
Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	Συντελεστής διακύμανσης (CV%)	A/A προτύπου	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	Συντελεστής διακύμανσης (CV%)
			5	11,50	0,64	5,58
16,25	0,07	0,41	6	16,49	0,89	5,37
19,67	0,10	0,52	7	19,76	1,11	5,60
24,17	0,37	1,54	8	23,60	0,74	3,13
			9	27,55	0,84	3,05
			10	27,85	1,01	3,63
-3,24	0,13	4,08	κλίση	-3,07	0,29	9,43
34,79	0,51	1,48	απόδοση	1,12	0,15	13,83
1,04	0,06	6,15	τομή	34,02	0,59	1,74

6.4 Αποτελέσματα αρχικού σχεδιασμό εκκινήτων για την μελέτη έκφρασης του *RASSF1* γονιδίου

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 5.12.1.1, έγινε ένας αρχικός σχεδιασμός εκκινήτων για την μελέτη έκφρασης του *RASSF1* γονιδίου.

Προκειμένου να ελεγχθούν οι εκκινήτες Invitrogen, που στοχεύουν μεταξύ των εξονίων 5 και 6, πραγματοποιήθηκε συμβατική PCR στον θερμικό κυκλοποιητή Primus 25. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορα πρωτόκολλα, με διαφορετικά ένζυμα και αντιδραστήρια και έγιναν βελτιστοποιήσεις των

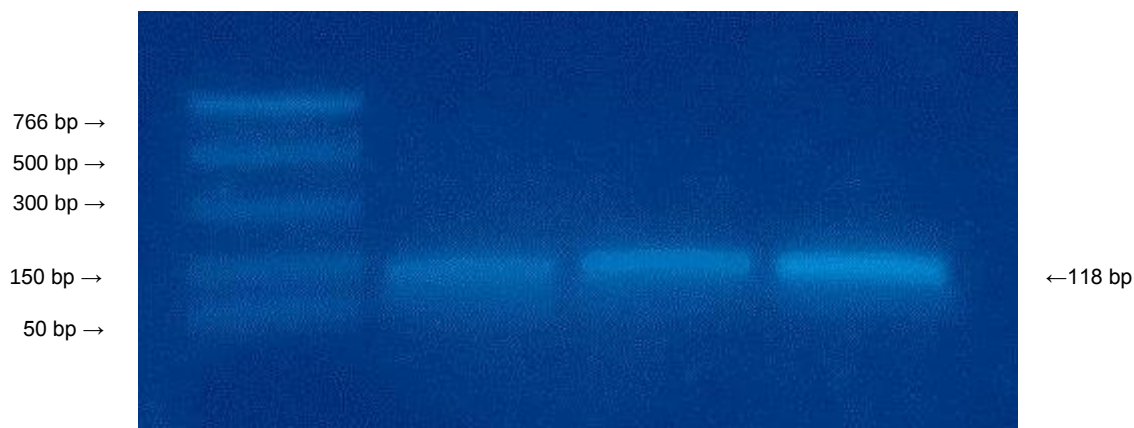
συνθηκών προκειμένου να ληφθούν καθαρές μπάντες στην ηλεκτροφόρηση (με gel αгарόζης 2%). Ως δείγματα χρησιμοποιήθηκαν cDNAs ασθενών με καρκίνο του μαστού. Κανένα από τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήσαμε δεν είχε το επιθυμητό αποτέλεσμα, αντίθετα ελήφθησαν εικόνες με πολλαπλές μπάντες, όπως αυτή του σχήματος 6-8.



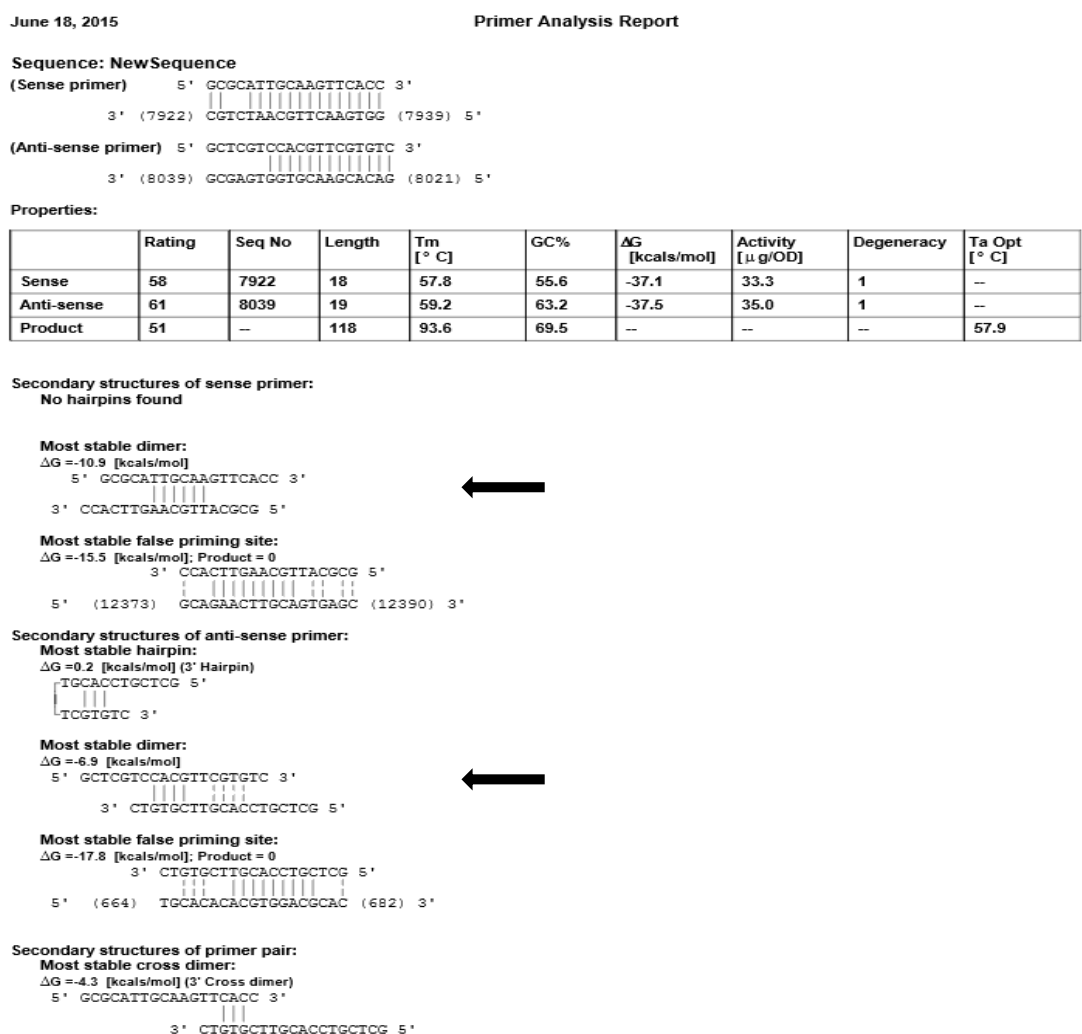
Σχήμα 6-8. Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων με τους εκκινητές της Invitrogen. Κατά σειρά από αριστερά εμφανίζονται ο δείκτης μοριακών βαρών PCR marker και δείγματα cDNA.

Έγινε η υπόθεση ότι αυτά τα προϊόντα λαμβάνονται λόγω της υψηλής ομολογίας μεταξύ των μεταγράφων του *RASSF1* (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι) και των διαφορετικών σε μέγεθος προϊόντων (πλέον του επιθυμητού) που προκύπτουν από τα διαφορετικά μετάγραφα. Λόγω αυτών των αποτελεσμάτων επανασχεδιάστηκε η μέθοδος με εκκινητές μεταξύ των εξονίων 1 έως 4, σύμφωνα και με βιβλιογραφικές αναφορές άλλων ερευνητικών ομάδων

Για τον έλεγχο των εκκινητών IDT, μετά από την διαδικασία που πραγματοποιήθηκε, έγινε ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε αгарόζη. Τα αποτελέσματα των προσπαθειών αυτών έδειξαν ότι λαμβάνεται προϊόν, αναλόγου μεγέθους με το επιθυμητό από το cDNA προϊόν, ωστόσο λαμβάνεται ανάλογο προϊόν και με τον πολλαπλασιασμό του γενωμικού DNA (σχήμα 6-9). Θέλοντας να ελεγχθεί η υπόθεση εάν αυτό είναι δυνατό και δεν ήταν αποτέλεσμα λάθος χειρισμών, πραγματοποιήθηκε *in silico* μελέτη με το πρόγραμμα Primer Premier και διαπιστώθηκε ότι αν και δεν είναι θερμοδυναμικό σταθερό το προϊόν θα μπορούσε να σχηματισθεί από εσφαλμένη υβριδοποίηση (*false priming*) των εκκινητών, παρόλα αυτά σχηματίζεται (σχήμα 6-10).



Σχήμα 6-9. Εικόνα ηλεκτροφόρησης αгарόζης για την qPCR με τους εκκινητές της IDT. Κατά σειρά από αριστερά προς τα δεξιά εμφανίζονται ο δείκτης μοριακών βαρών PCR marker, 2 δείγματα cDNA και το γενωμικό DNA.



Σχήμα 6-10. Αναφορά προγράμματος Primer Premier για τους εκκινητές IDT στο γενωμικό DNA για το *RASSF1*. (Τα βέλη δείχνουν τα μη θερμοδυναμικώς σταθερά πιθανά προϊόντα που προέρχονται από εσφαλμένη υβριδοποίηση των εκκινητών)

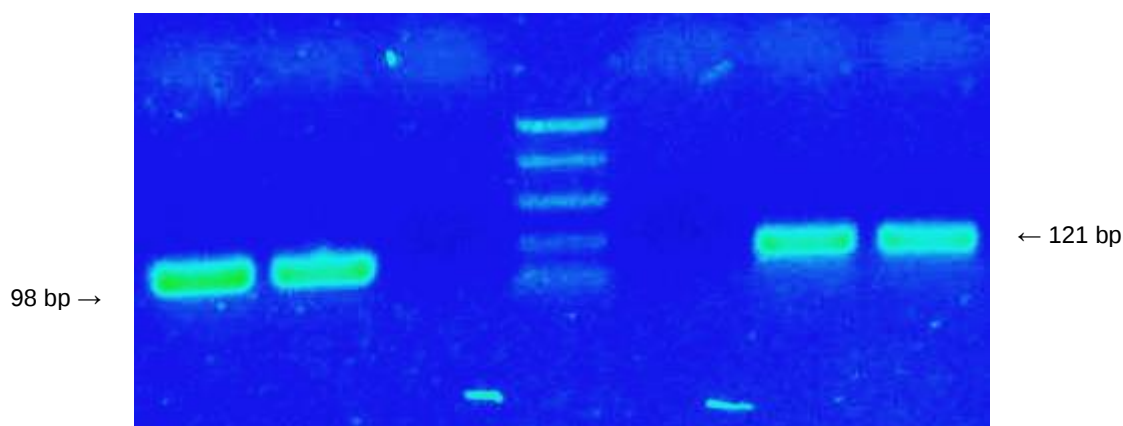
Για αυτούς τους λόγους αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε άλλους προτυποποιημένους εκκινητές, όπως αυτούς της Qiagen.

6.5 Μελέτη έκφρασης *RASSF1* γονιδίου στον θερμικό κυκλοποιητή Rotor-Gene Q

Η μελέτη έκφρασης του *RASSF1* γονιδίου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν στην παράγραφο 5.12.2.2 της παρούσης εργασίας. Σημειώνεται πως για κάθε ένα δείγμα ενισχύθηκαν τόσο το γονίδιο αναφοράς της $\beta 2$ -μικροσφαιρίνης όσο και το *RASSF1A* γονίδιο στην ίδια πειραματική διαδικασία (ίδιο run), προκειμένου να υπολογιστεί η σχετική έκφραση του *RASSF1* γονιδίου σύμφωνα με τον απλοποιημένο τύπο $RQ = 2^{-\Delta Ct}$ της μεθόδου ποσοτικοποίησης των Livak και Schmittgen. ^(148,149)

Για την θερμοκρασία τήξης του PCR προϊόντος για το γονίδιο της $\beta 2$ -μικροσφαιρίνης υπολογίσθηκαν, για όλα τα δείγματα ο μέσος όρος ($80,5^{\circ}\text{C}$), η τυπική απόκλιση (0,2) και ο συντελεστής διακύμανσης (0,2). Για την θερμοκρασία τήξης του PCR προϊόντος του *RASSF1* γονιδίου αντίστοιχα υπολογίσθηκαν ο μέσος όρος ($87,4^{\circ}\text{C}$), η τυπική απόκλιση (0,2) και ο συντελεστής διακύμανσης (0,3).

Προκειμένου να ελεγχθούν και τα PCR προϊόντα που λαμβάνονται κατά την μελέτη έκφρασης, χρησιμοποιήθηκαν ενδεικτικά δυο από αυτά για να εμφανιστούν σε gel αγαρόζης 2%. Στο σχήμα 6-11 φαίνεται η εικόνα του ηλεκτροφόρηματος.



Σχήμα 6-11. Εικόνα ηλεκτροφόρησης για τον έλεγχο των PCR προϊόντων της real-time qPCR. Στη μέση είναι ο δείκτης μοριακών βαρών PCR marker, αριστερά τα PCR προϊόντα της $\beta 2$ -μικροσφαιρίνης και δεξιά του *RASSF1*.

Στον πίνακα 6-7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης έκφρασης. Καθώς τα φυσιολογικά δείγματα δεν δίνουν μια σαφή εικόνα, υπολογίστηκε η διάμεσος των τιμών έκφρασης ($RQ \cdot 1000$) των δειγμάτων (2,27) προκειμένου να διαχωρισθούν είτε σε υπο- είτε σε υπερ- εκφρασμένα δείγματα.

Ο μέσος όρος των τιμών έκφρασης ($RQ \cdot 1000$) είναι 4,45, η ελάχιστη τιμή 0,03, η μέγιστη τιμή 63,37 και το εύρος 63,34.

Από τα 81 δείγματα ασθενών τα 40 (49,4%) χαρακτηρίστηκαν ως υπερ-εκφραζόμενα, ενώ τα 41 (50,6%) χαρακτηρίστηκαν ως υπο-εκφραζόμενα.

Πίνακας 6-7. Σχετική mRNA έκφραση του *RASSF1* γονιδίου σε σχέση με την β2-μικροσφαιρίνη. Με πράσινο σημειώνονται τα φυσιολογικά, με μπλε τα υπο- και με κόκκινο τα υπερ- εκφρασμένα δείγματα.

ID	RQ	RQ*1000	ID	RQ	RQ*1000	ID	RQ	RQ*1000	ID	RQ	RQ*1000
T2	0,027776334	27,78	T42	0,001288582	1,29	T69	0,002243551	2,24	T98	4,59365E-05	0,05
T3	0,007041019	7,04	T43	0,002290693	2,29	T70	0,000282395	0,28	T100	0,000734984	0,73
T4	0,003670011	3,67	T44	0,002228054	2,23	T71	0,014082038	14,08	T101	0,001665303	1,67
T7	0,00537321	5,37	T46	0,007704943	7,70	T72	0,00144973	1,45	T102	0,002036066	2,04
T9	0,008728806	8,73	T48	0,000549345	0,55	T73	0,001459814	1,46	T103	0,000618045	0,62
T10	0,011280697	11,28	T49	0,005262631	5,26	T74	0,002472181	2,47	T104	0,063372467	63,37
T11	0,01286861	12,87	T50	0,001886594	1,89	T75	0,003400588	3,40	T105	0,000440064	0,44
T12	0,005758864	5,76	T51	0,003239529	3,24	T76	0,006848482	6,85	T106	0,001642376	1,64
T13	0,004304317	4,30	T52	0,007139308	7,14	T77	0,004456108	4,46	T108	0,000280444	0,28
T16	0,007041019	7,04	T53	0,003330605	3,33	T78	0,002879432	2,88	T109	0,000923884	0,92
T17	0,005839255	5,84	T54	0,000755647	0,76	T79	0,006087223	6,09	T110	0,000227791	0,23
T18	0,011438169	11,44	T55	0,000530632	0,53	T80	0,009685216	9,69	T111	0,000653285	0,65
T19	0,004677651	4,68	T56	0,000676323	0,68	T81	0,013139006	13,14	T112	0,0119239	11,92
T28	0,01159784	11,60	T57	2,82772E-05	0,03	T82	0,001400347	1,40	T116	0,000553166	0,55
T31	0,003107564	3,11	T58	0,012174447	12,17	T87	0,003670011	3,67	T121	0,000137336	0,14
T32	0,007041019	7,04	T59	0,00026902	0,27	T88	0,001480192	1,48	T128	0,000359929	0,36
T34	0,001953125	1,95	T61	0,001185737	1,19	T89	0,008200912	8,20	T131	0,000639841	0,64
T35	0,000109256	0,11	T63	0,000129928	0,13	T91	0,000892414	0,89	T132	0,000495097	0,50
T36	0,001480192	1,48	T64	0,002212664	2,21	T92	0,002705292	2,71	T142	0,000498541	0,50
T37	0,002064488	2,06	T65	0,008728806	8,73	T93	0,000798732	0,80			
T39	0,003424241	3,42	T66	0,001653799	1,65	T94	0,0008269	0,83			
T40	0,001712121	1,71	T68	0,005839255	5,84	T95	0,002421304	2,42			

6.6 Στατιστική ανάλυση πειραματικών αποτελεσμάτων

6.6.1 Περιγραφική στατιστική ανάλυση

Στον πίνακα 6-8 παρατίθενται η περιγραφική στατιστική ανάλυση (μέσος όρος, διάμεσος, μέγιστο, ελάχιστο, συντελεστής διακύμανσης) για τα ποσοτικά κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνου του μαστού (n=81). Στον πίνακα 6-9 παρατίθενται τα αντίστοιχα στοιχεία για τα ποιοτικά δεδομένα, ομαδοποιημένα σε 2 κατηγορίες. Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι για ορισμένες ασθενείς δεν υπήρχαν όλα τα δεδομένα.

Πίνακας 6-8. Περιγραφική στατιστική ανάλυση ποσοτικών κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των ασθενών.

Ποσοτικά δεδομένα	N	Median	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Ηλικία (AGE)	67	58,00	29	83	57,48	12,34
Παρακολούθηση (followupmonths)	52	45,50	9	225	55,10	40,72
Μεθυλίωση (RASSF1METH)	81	45,39	13,29	86,95	45,01	19,83
Έκφραση (RQ1000)	81	2,24	,03	63,37	4,45	7,57
Μέγεθος όγκου (SIZE)	79	1,80	1,0	5,5	2,07	,89

Πίνακας 6-9. Περιγραφική στατιστική ανάλυση ποιοτικών (ομαδοποιημένων) κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των ασθενών.

Κλινικά χαρακτηριστικά	N (%)	Κλινικά χαρακτηριστικά	N (%)
Ηλικιακή ομάδα (age group)		ER (ER group)	
≤50 έτη	24 (35,3)	Αρνητικό	19 (24,1)
>50 έτη	44 (64,7)	Θετικό	60 (75,9)
Μέγεθος όγκου (size group)		PR (PR group)	
≤2,0 cm	52 (65,8)	Αρνητικό	40 (50,6)
>2,0 cm	27 (34,2)	Θετικό	39 (49,4)
Ιστοπαθολογικός τύπος (diagnosis group)		HER2 (HER2 group)	
Πορογενές διηθητικό	62 (76,5)	Αρνητικό	73 (94,8)
Καλύτερης πρόγνωσης και λοιπά	19 (23,5)	Θετικό	4 (5,2)
Λεμφαδένες (node)		RASSF1A μεθυλίωση (RASSF1 meth group)	
Αρνητικοί	49 (66,2)	χαμηλή (<57,09)	59 (72,8)
Θετικοί	25 (33,8)	Υψηλή (>57,09)	22 (27,2)
Μετάσταση (metastasis)		Έκφραση (RQ group)	
Αρνητικοί	45 (83,3)	χαμηλή (<2,27)	41 (50,6)

Θετικοί	9 (16,7)	υψηλή (>2,27)	40 (49,4)
Βαθμός (grade)			
1-2	56 (76,7)		
3	17 (23,3)		

Από τον ανωτέρω πίνακα βλέπουμε ότι η πλειοψηφία των ασθενών:

- ✓ ήταν πάνω από 50 ετών (64,7%)
- ✓ είχε σχετικά μικρό μέγεθος όγκου (65,8%)
- ✓ είχε ως ιστοπαθολογικό τύπο τον πορογενή διηθητικό τύπο (76,5%)
- ✓ είχε αρνητικούς λεμφαδένες (66,2%)
- ✓ δεν παρουσίασε μετάσταση (83,3%)
- ✓ ήταν βαθμού I και II (76,7%)
- ✓ είχε θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς (75,9%)
- ✓ είχε αρνητικούς υποδοχείς προγεστερόνης (50,6%)
- ✓ είχε αρνητικό τον HER2 υποδοχέα (94,8%) και
- ✓ είχαν χαμηλά τα επίπεδα μεθυλίωσης του *RASSF1A* (72,8%).

Εάν εξαιρεθεί το ποσοστό θετικότητας του HER2 υποδοχέα, η ομάδα των ασθενών είναι αρκετά αντιπροσωπευτική των γυναικών ασθενών της Μητροπολιτικής περιοχής των Αθηνών (που γενικά έχουν καλή ιατρική περίθαλψη και παρακολουθήση). Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνο μια ασθενής είχε αμφοτερόπλευρη εμφάνιση καρκίνου του μαστού και η έκφραση του *RASSF1* γονιδίου ήταν ισοσταθμισμένη (εξ'ορισμού).

6.6.2 Έλεγχος κανονικότητας δεδομένων

Από τον έλεγχο της κανονικότητας των ποσοτικών μεταβλητών στα δείγματα των ασθενών, ελήφθησαν τα ακόλουθα αποτελέσματα (πίνακας 6-10).

Πίνακας 6-10. Έλεγχος κανονικότητας ποσοτικών μεταβλητών.

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ηλικία (AGE)	,088	67	,200*	,981	67	,416
Μέγεθος (SIZE)	,193	67	,000	,863	67	,000
Μεθυλίωση (RASSF1METH)	,094	67	,200*	,962	67	,039

Έκφραση (RQ1000)	,300	67	,000	,435	67	,000
*. This is a lower bound of the true significance.						
a. Lilliefors Significance Correction						

Εφόσον τα δεδομένα είναι περισσότερα από 50, λαμβάνουμε υπόψιν το Kolmogorov-Smirnov test για τον έλεγχο της κανονικότητας των ποσοτικών μεταβλητών (επιθυμητό $p > 0,05$). Συμπεραίνουμε ότι η ηλικία των ασθενών ($p = 0,200$) και η μεθυλίωση ($p = 0,200$) του *RASSF1* γονιδίου ακολουθούν την κανονική κατανομή.

6.6.3 Συσχέτιση ποσοτικών παραμέτρων.

Καθώς οι ποσοτικές παράμετροι ακολουθούν κανονική κατανομή, εξετάστηκαν πιθανές συσχετίσεις κατά Pearson (και όχι κατά Spearman) και ελήφθησαν τα ακόλουθα αποτελέσματα.

Πίνακας 6-11. Πίνακας συσχετίσεων ποσοτικών δεδομένων.

Correlations					
		RASSF1METH	RQ1000	AGE	SIZE
Μεθυλίωση (RASSF1METH)	Pearson Correlation	1	.138	.198	.116
	Sig. (2-tailed)		.207	.101	.299
	N	85	85	70	82
Έκφραση (RQ1000)	Pearson Correlation	.138	1	.044	-.053
	Sig. (2-tailed)	.207		.718	.637
	N	85	85	70	82
Ηλικία (AGE)	Pearson Correlation	.198	.044	1	.165
	Sig. (2-tailed)	.101	.718		.175
	N	70	70	70	69
Μέγεθος (SIZE)	Pearson Correlation	.116	-.053	.165	1
	Sig. (2-tailed)	.299	.637	.175	
	N	82	82	69	82

Από τον ανωτέρω πίνακα παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει καμμία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των ποσοτικών μεταβλητών (επιθυμητό $p < 0,05$). Σημαντική είναι η παρατήρηση ότι αυτό ισχύει και μεταξύ μεθυλίωσης-έκφρασης ($p = 0,207$), αποτέλεσμα που έρχεται σε αντίθεση με την βιβλιογραφία.

6.6.4 Σύγκριση ποσοστών στις ποιοτικές μεταβλητές

Ο έλεγχος της ύπαρξης ή όχι ανεξαρτησίας μεταξύ των κατηγορικών μεταβλητών ελέγχθηκε με τη δοκιμασία Pearson χ^2 ή την δοκιμασία Fisher's exact. Στον ακόλουθο πίνακα 6-12 φαίνονται συνοπτικά τα αποτελέσματα.

Πίνακας 6-12. Πίνακας ελέγχου ανεξαρτησίας παραμέτρων.

	RASSF1 Μεθυλίωση			Έκφραση (RQ*1000)		
Κλινικά χαρακτηριστικά	Low n(%)	High n (%)	Pearson χ^2 or Fisher's exact p-value	Low n(%)	High n (%)	Pearson χ^2 or Fisher's exact p-value
Ηλικιακή ομάδα, n (%)			0,126			0,323
≤50 έτη	20 (83,3)	4 (16,7)		15 (62,5)	9 (37,5)	
>50 έτη	29 (65,9)	15 (34,1)		22 (50,0)	25 (50,0)	
Μέγεθος όγκου, n (%)			0,328			0,339
≤2,0 cm	40 (76,9)	12 (23,1)		29 (55,8)	23 (44,2)	
>2,0 cm	18 (66,7)	9 (33,3)		12 (44,4)	15 (55,6)	
Ιστοπαθολογικός τύπος, n (%)			0,925			0,211
Πορογενές διηθητικό	45 (72,6)	17 (27,4)		29 (46,8)	33 (53,2)	
Λοβιακό διηθητικό και υπόλοιπα	14 (73,7)	5 (26,3)		12 (63,2)	7 (36,8)	
Λεμφαδένες, n (%)			0,073			0,120
Αρνητικοί	39 (79,6)	10 (20,4)		27 (55,1)	22 (44,9)	
Θετικοί	15 (60,0)	10 (40,0)		9 (36,0)	16 (64,0)	
Μετάσταση, n (%)			0,117			0,275
Αρνητικοί	36 (80,0)	9 (20,0)		19 (42,2)	26 (57,8)	
Θετικοί	5 (55,6)	4 (44,4)		6 (66,7)	3 (33,3)	
Βαθμός, n (%)			0,683			0,305
1-2	40 (71,4)	16 (28,6)		25 (44,6)	31 (55,4)	
3	13 (76,5)	4 (23,5)		10 (58,8)	7 (41,2)	
ER, n (%)			0,016			0,744
Αρνητικό	18 (94,7)	1 (5,3)		9 (47,4)	10 (52,6)	
Θετικό	40 (66,7)	20 (33,3)		31 (51,7)	29 (48,3)	
PR, n (%)			0,064			0,909
Αρνητικό	33 (82,5)	7 (17,5)		20 (50,0)	20 (50,0)	
Θετικό	25 (64,1)	14 (35,9)		20 (51,3)	19 (48,7)	
HER2, n (%)			1,000			1,000
Αρνητικό	53 (72,6)	20 (27,4)		38 (52,1)	35 (47,9)	
Θετικό	3 (75,0)	1 (25,0)		2 (50,0)	2 (50,0)	

Από τον ανωτέρω πίνακα βλέπουμε ότι μόνο μεταξύ ER κατάστασης και μεθυλίωσης υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ($p=0,016$), που σημαίνει ότι οι δυο αυτές παράμετροι δεν είναι μεταξύ τους ανεξάρτητες. Οριακά χαρακτηρίζονται ως ανεξάρτητες οι παράμετροι της μεθυλίωσης και της λεμφαδενικής κατάστασης ($p=0,073$), καθώς και οι παράμετροι της μεθυλίωσης και της κατάστασης των PR υποδοχέων ($p=0,064$).

6.6.5 t-test και Mann - Whitney

Για τον έλεγχο της διαφοράς των μέσων όρων και των διαμέσων της μεθυλίωσης και της έκφρασης εν σχέσει με τις υπόλοιπες παραμέτρους, πραγματοποιήθηκε t-test και Mann-Whitney, αντίστοιχα.

Πίνακας 6-13. t-test RASSF1 μεθυλίωσης.

Independent Samples Test						
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
Age group	Equal variances assumed	14,081	,000	-1,534	66	,130
	Equal variances not assumed			-1,655	38,661	,106
Size group	Equal variances assumed	2,393	,126	-,972	77	,334
	Equal variances not assumed			-,935	33,056	,357
Node	Equal variances assumed	4,790	,032	-1,810	72	,074
	Equal variances not assumed			-1,707	30,596	,098
Diagnosis group	Equal variances assumed	,036	,851	,093	79	,926
	Equal variances not assumed			,093	37,695	,926
Grade	Equal variances assumed	,704	,404	,403	71	,688
	Equal variances not assumed			,414	36,103	,682
ER group	Equal variances assumed	52,662	,000	-2,476	77	,015
	Equal variances not assumed			-3,385	71,901	,001
PR group	Equal variances assumed	3,189	,078	-1,868	77	,066
	Equal variances not assumed			-1,898	36,564	,066
HER2 group	Equal variances assumed	,043	,836	,103	75	,918

	Equal variances not assumed			,105	37,324	,917
Metastasis	Equal variances assumed	7,892	,007	-1,573	52	,122
	Equal variances not assumed			-1,300	15,784	,212

Πίνακας 6-14. Mann-Whitney test RASSF1 μεθυλίωσης

Test Statistics ^a								
	Age group	Size group	Node	Diagnosis group	Grade	ER group	PR group	HER2 group
Mann-Whitney U	373,500	537,000	420,000	642,500	506,000	449,000	465,500	584,500
Wilcoxon W	1598,500	2248,000	1905,000	895,500	716,000	2160,000	2176,500	815,500
Z	-1,519	-,973	-1,783	-,094	-,405	-2,398	-1,839	-,104
Asymp. Sig. (2-tailed)	,129	,331	,075	,925	,685	,016	,066	,917
a. Grouping Variable: RASSF1GroupMETH								

Πίνακας 6-15. t-test mRNA έκφρασης.

Independent Samples Test						
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
Age group	Equal variances assumed	3,785	,056	-,981	66	,330
	Equal variances not assumed			-,988	65,294	,327
Size group	Equal variances assumed	3,320	,072	-,949	77	,346
	Equal variances not assumed			-,946	75,322	,347
Node	Equal variances assumed	8,786	,004	-1,559	72	,123
	Equal variances not assumed			-1,565	71,594	,122
Diagnosis group	Equal variances assumed	6,439	,013	1,246	79	,216
	Equal variances not assumed			1,249	77,185	,215
Grade	Equal variances assumed	4,173	,045	1,018	71	,312
	Equal variances not assumed			1,012	67,275	,315
ER group	Equal variances assumed	,416	,521	,323	77	,748
	Equal variances not assumed			,322	76,618	,748
PR group	Equal variances assumed	,026	,873	,113	77	,911

	Equal variances not assumed			,113	76,949	,911
HER2 group	Equal variances assumed	,025	,875	-,079	75	,937
	Equal variances not assumed			-,079	73,990	,937
Metastasis	Equal variances assumed	7,674	,008	1,340	52	,186
	Equal variances not assumed			1,307	42,551	,198

Πίνακας 6-16. Mann-Whitney test mRNA έκφρασης.

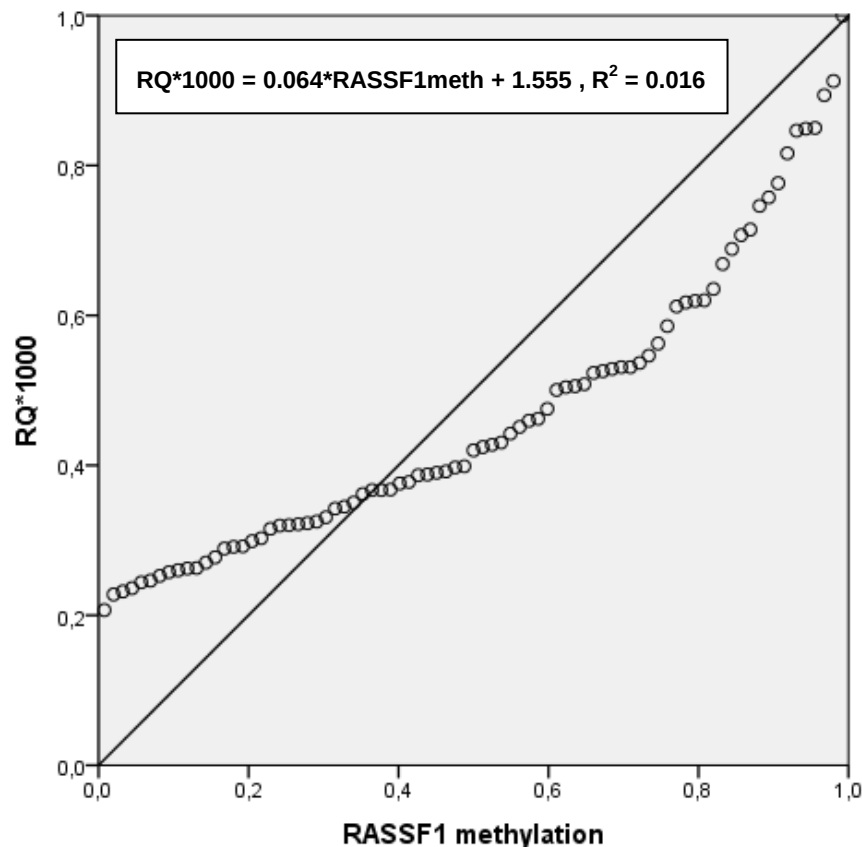
Test Statistics ^a								
	Age group	Size group	Node	Diagnosis group	Grade	ER group	PR group	HER2 group
Mann-Whitney U	507,500	699,500	567,000	723,500	597,500	755,500	770,000	737,000
Wilcoxon W	1210,500	1560,500	1233,000	1543,500	1338,500	1535,500	1550,000	1557,000
Z	-,982	-,949	-1,544	-1,242	-1,018	-,325	-,113	-,080
Asymp. Sig. (2-tailed)	,326	,342	,122	,214	,309	,746	,910	,937
a. Grouping Variable: RQGROUP								

Από τους ανωτέρω πίνακες παρατηρήθηκε ότι μόνο μεταξύ μεθυλίωσης και ER κατάστασης υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων των τιμών των μεταβλητών. Για να επιλεγθεί το κατάλληλο και πιο έγκυρο test (t-test ή Mann-Whitney), ελέγχθηκε η κανονικότητα της κατανομής της μεθυλίωσης τόσο στις ER+, όσο και στις ER- ασθενείς και βρέθηκε ότι η μεθυλίωση ακολουθεί την κανονική κατανομή και στις δύο περιπτώσεις. Κατά σύμπτωση, επιλέχθηκε το t-test. Σύμφωνα με αυτό, υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p=0,001$) του μέσου όρου της μεθυλίωσης τόσο στα υπο-μεθυλιωμένα όσο και στα υπερ-μεθυλιωμένα δείγματα ασθενών ανάλογα με την κατάσταση των ER υποδοχέων, με στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Ο μέσος όρος της μεθυλίωσης στα ER- δείγματα είναι 31,19 με $SD=15,62$, ενώ στα ER+ είναι 49,50 με $SD=19,00$. Αυτό συνεπάγεται ότι οι ER+ ασθενείς έχουν υψηλότερα ποσοστά μεθυλίωσης.

Από τα υπόλοιπα στατιστικά tests δεν υπήρξαν άλλες σημαντικές παρατηρήσεις.

6.6.6 Γραμμική παλινδρόμηση (Linear Regression)

Αναζητώντας ένα μοντέλο που θα επιτρέψει της πρόβλεψη της έκφρασης του *RASSF1* γονιδίου από την μεθυλίωσή του, εκτελέσθηκε γραμμική παλινδρόμηση.



Σχήμα 6-12. Γραφική παράσταση και εξίσωση γραμμικής παλινδρόμησης έκφρασης - μεθυλίωσης.

Από το ανωτέρω γράφημα, είναι σαφές ότι δεν υπάρχει ένα μοντέλο που θα επέτρεπε την πρόβλεψη της έκφρασης από την μεθυλίωση του *RASSF1* γονιδίου.

6.6.7 Διωνυμική Λογαριθμιστική Παλινδρόμηση (Binary Logistic Regression)

Μέσω της διωνυμικής λογαριθμιστικής παλινδρόμησης εξετάσθηκε το εάν και κατά πόσο εξαρτώνται δίτιμες κρίσιμες παράμετροι, όπως η λεμφαδενική διήθηση και η μετάσταση από τις υπόλοιπες παραμέτρους (ποιοτικές ή ποσοτικές). Στον πίνακα 6-17 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ανάλυσης για την λεμφαδενική διήθηση και στον πίνακα 6-18 για την μετάσταση.

Πίνακας 6-17. Αποτέλεσμα διωνυμικής λογαριθμικής παλινδρόμησης για τη λεμφαδενική διήθηση.

Variables in the Equation									
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step 1 ^a	Size group	,140	,689	,041	1	,839	1,150	,298	4,440
	GRADE	1,242	,793	2,451	1	,117	3,462	,731	16,394
	ER group	-2,469	,926	7,116	1	,008	,085	,014	,519
	PR group	,538	,807	,444	1	,505	1,712	,352	8,333
	HER2 group	,055	1,532	,001	1	,971	1,057	,053	21,271
	RASSF1 meth group	2,074	,754	7,575	1	,006	7,959	1,817	34,863
	RQ group	1,371	,692	3,930	1	,047	3,941	1,016	15,290
	Constant	-2,155	1,301	2,742	1	,098	,116		

Από τον πίνακα 6-17 παρατηρούμε ότι στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις της λεμφαδενικής διήθησης υπάρχουν με το ER group ($p=0,008$ με RR 0,085, C.I. 0,14-0,519), το RASSF1 meth group ($p=0,006$ με RR 7,959, C.I. 1,817-34,863) και το RQ group ($p=0,047$ με RR 3,941, C.I. 1,016-15,290) με στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Αυτό σημαίνει ότι η πιθανότητα λεμφαδενικής διήθησης αυξάνεται με την παρουσία αρνητικών ER υποδοχέων, το ποσοστό της *RASSF1* μεθυλίωσης και το επίπεδο έκφρασης του *RASSF1*.

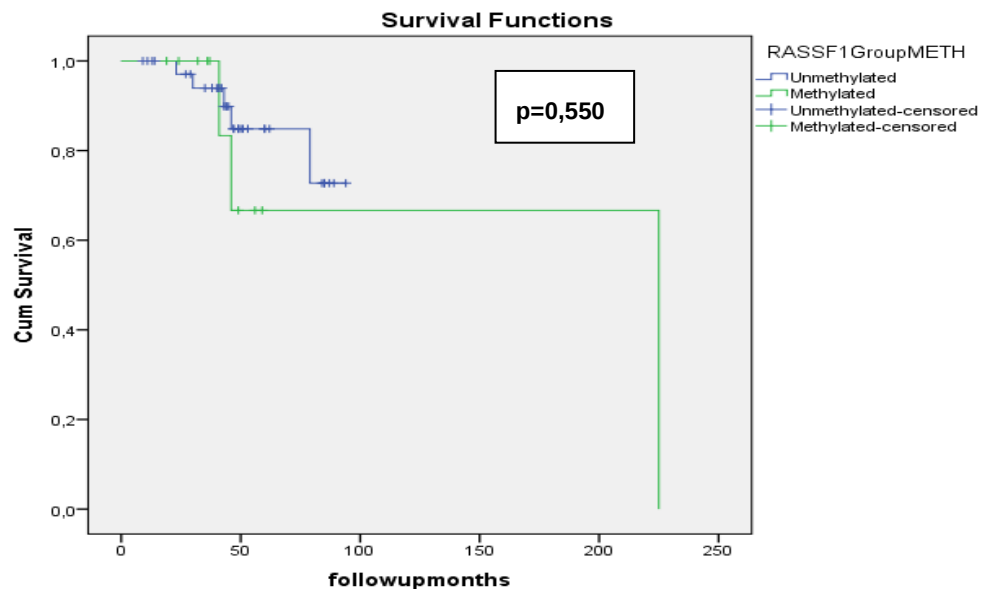
Πίνακας 6-18. Αποτέλεσμα διωνυμικής λογιστικής παλινδρόμησης για την μετάσταση.

Variables in the Equation									
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step 1 ^a	Sizegroup	-,011	1,098	,000	1	,992	,989	,115	8,509
	ERgroup	,324	1,500	,047	1	,829	1,383	,073	26,138
	PRgroup	-1,229	1,334	,848	1	,357	,293	,021	4,001
	HER2group	2,427	1,732	1,964	1	,161	11,324	,380	337,259
	RASSF1methgroup	1,449	1,172	1,527	1	,216	4,259	,428	42,388
	RQgroup	-1,075	1,111	,936	1	,333	,341	,039	3,013
	GRADE	,658	1,209	,296	1	,586	1,931	,181	20,641
	Constant	-2,704	2,283	1,404	1	,236	,067		

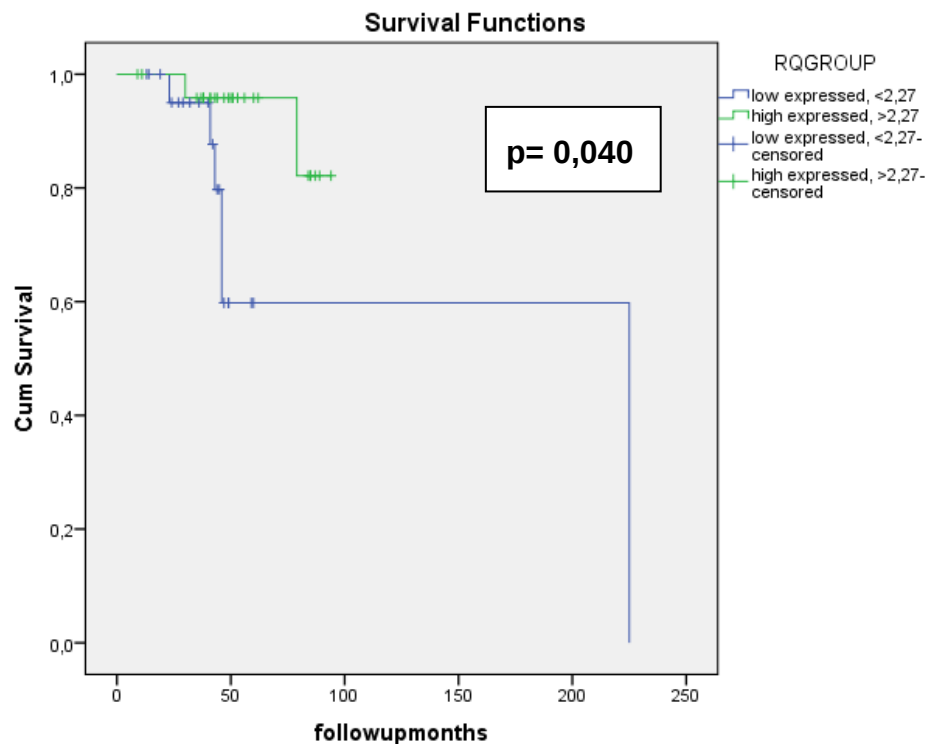
Για την μετάσταση δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με κάποια από τις παραμέτρους.

6.6.8 Ανάλυση επιβίωσης

Από την ανάλυση επιβίωσης (Kaplan-Meier) μεταξύ μετάστασης και μεθυλίωσης ($p=0,550$) δεν υπάρχει στατιστική σημαντικότητα. Όμως, μεταξύ μετάστασης και έκφρασης ($p= 0,040$) υπάρχει, που σημαίνει ότι οι ασθενείς με υπερ-έκφραση του *RASSF1* γονιδίου μεθίστανται συχνότερα.



Σχήμα 6-13. Διάγραμμα ανάλυσης επιβίωσης μετάστασης-μεθυλίωσης.



Σχήμα 6-14. Διάγραμμα ανάλυσης επιβίωσης μετάστασης-έκφρασης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ο καρκίνος του μαστού είναι η δεύτερη πιο κοινή μορφή καρκίνου στον κόσμο και, με μεγάλη διαφορά, ο πιο συχνός καρκίνος στις γυναίκες, με εκτιμώμενες 1.670.000 νέες περιπτώσεις καρκίνου που διαγνώστηκαν το 2012 (25% όλων των καρκίνων). Είναι ο πιο συχνός καρκίνος στις γυναίκες με ελαφρώς περισσότερες περιπτώσεις στις λιγότερο ανεπτυγμένες (883.000) από ό,τι στις πιο ανεπτυγμένες χώρες (794.000). Ο καρκίνος του μαστού θεωρείται ως η πέμπτη αιτία θανάτου από καρκίνο συνολικά (522.000 θάνατοι). Είναι η πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες στις λιγότερο αναπτυγμένες χώρες (324.000 θάνατοι, 14,3% του συνόλου), ενώ είναι η δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις πιο ανεπτυγμένες χώρες (198.000 θάνατοι, 15,4%), μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. (www.who.int/cancer/en)

Η ανακάλυψη νέων βιοδεικτών για τον καρκίνο του μαστού, που θα συμβάλλουν στην πρόληψη, την έγκαιρη και πρώιμη διάγνωση της νόσου, αλλά και στην εξατομικευμένη θεραπεία, είναι επιτακτική. Οι βιοδείκτες αυτοί θα πρέπει να ενσωματωθούν στην ρουτίνα ενός εργαστηρίου και να ανήκουν στο πρόγραμμα προληπτικής και υγειονομικής περίθαλψης κάθε χώρας. Το ιδανικό βιολογικό υλικό μπορεί να είναι το αίμα, ως μη επεμβατικό, αλλά και ο ιστός όταν αφαιρείται (αν και απαιτεί επίπονη διαδικασία λήψης για τον ασθενή). Οι νέες τεχνικές που αναπτύσσονται θα συμβάλλουν τα μέγιστα στην προσπάθεια που καταβάλλει η επιστημονική κοινότητα σε αυτό τον τομέα. Οι βιοδείκτες, που αποτελούν αντικείμενο ερευνών πολλών επιστημονικών ομάδων, μπορεί να είναι πρωτεΐνες, υποδοχείς, αντιγόνα, ογκογονίδια, ογκοκατασταλικά γονίδια, miRNAs και ένζυμα, που εμπλέκονται σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια.

Το ογκοκαταστατικό *RASSF1* γονίδιο, ανήκει σε αυτά και από το 2000 έως τώρα έχει αποτελέσει αντικείμενο ερευνών σε πολλούς τύπους καρκίνου. Η μεθυλίωσή του έχει αποδείξει την αξία της ως βιοδείκτης σε βιολογικά υγρά που αξιολογούνται στον καρκίνο του πνεύμονα.⁽¹⁵⁸⁾ Η υπερ-μεθυλίωση της

CpG νησίδας του υποκινητή ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, όπως το *RASSF1*, μπορεί να προκαλέσει αποσιώπηση αυτού και να οδηγήσει στην παύση της λειτουργίας του. Έχει μελετηθεί και στον καρκίνο του μαστού ως προς την μεθυλίωση αλλά και την έκφρασή του.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η ανάπτυξη και η επικύρωση καινοτόμων και αξιόπιστων μεθόδων για την μελέτη της DNA μεθυλίωσης του πρώτου υποκινητή του *RASSF1* (από τον οποίο μεταγράφεται το κυριότερο μετάγραφό του, το *RASSF1A*) και της mRNA έκφρασής του. Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια συσχέτισης της μεθυλίωσης με την mRNA έκφραση του *RASSF1* καθώς και συσχετίσεις των ανωτέρω μετρήσεων με τα κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα και την επιβίωση των ασθενών. Το υλικό που αναλύθηκε είναι 81 ιστοί ασθενών με καρκίνο του μαστού και 4 ιστοί γυναικών χωρίς κακοήθειες, που εμποτίσθηκαν με κατάλληλο για απομονώσεις DNA / RNA σταθεροποιητικό υλικό (RNA Later).

Το δείγμα των ασθενών ήταν αντιπροσωπευτικό των ασθενών με καρκίνο μαστού στην περιοχή της Αθήνας και δεν επιλέχθηκε με βάση το οικογενειακό ιστορικό, αλλά τη διαθεσιμότητα του υλικού και την ύπαρξη >70% καρκινικών κυττάρων στην ταχεία βιοψία. Η πλειοψηφία των ασθενών ήταν πάνω από 50 ετών (64,7%), είχε σχετικά μικρό μέγεθος όγκου (65,8%), είχε ως ιστοπαθολογοανατομικό τύπο το πορογενές διηθητικό (76,5%), είχε αρνητικούς λεμφαδένες (66,2%), δεν παρουσίασε μετάσταση (83,3%), είχε βαθμό διαφοροποίησης I και II (76,7%), είχε θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς (75,9%) και είχε αρνητικό τον HER2 υποδοχέα (94,8%). Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνο μια ασθενής είχε αμφοτερόπλευρη εμφάνιση καρκίνου του μαστού.

Αξίζει να σημειωθεί ότι είχε ελεγχθεί η ποιότητα των κλινικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ως προς την κακοήθειά τους σε προηγούμενη μελέτη, όπου εκτελέστηκε LINE-1 δοκιμασία μεθυλίωσης με Pyrosequencing και βρέθηκε ότι τα δείγματα που προέρχονταν από καρκινικό ιστό ήταν υπο-μεθυλιωμένα ενώ τα φυσιολογικά ήταν υπερ-μεθυλιωμένα.⁽¹⁵⁹⁾ Το LINE-1 είναι ένα ρετροτρανσποζόνιο, το οποίο αναμένεται να είναι υπο-μεθυλιωμένο στην πλειοψηφία των καρκινικών ιστών, ενώ πρέπει οπωσδήποτε να είναι υπερ-

μεθυλιωμένο στα φυσιολογικά.⁽¹⁶⁰⁾ Με τον τρόπο αυτό αποκλείστηκαν τρία φυσιολογικά δείγματα, ως ύποπτα για κακοήθεια.

Από την εργασία της ομάδας του Agathangelou το 2001, που πρώτοι απέδειξαν ότι το *RASSF1A* δρα ως κλασσικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο βάσει του μοντέλου των «δύο χτυπημάτων» του Knudson, πολλοί ακόμα ασχολήθηκαν και μελέτησαν την μεθυλίωση του *RASSF1* γονιδίου. Η πλειονότητα των ομάδων αυτών στόχευσε τον πρώτο υποκινητή και χρησιμοποίησε ως μέθοδο ανίχνευσης της μεθυλίωσης την μέθοδο MSP ή παραλλαγές αυτής, όπως QM-MSP και MethyLight, ανιχνεύοντας δηλαδή ποιοτικά την μεθυλίωση.^(95-106, 108-116) Ο Xu και η ομάδα του χρησιμοποίησαν ως τεχνική ανάλυσης μεθυλίωσης το Pyrosequencing, μελετώντας όμως μόνο τέσσερα GC δινουκλεοτίδια στον υποκινητή του *RASSF1*.⁽¹⁰⁷⁾

Η ανίχνευση της μεθυλίωσης του πρώτου υποκινητή του *RASSF1* γονιδίου (που αφορά το *RASSF1A* μετάγραφο) στην εργασία αυτή έγινε με την μέθοδο του Pyrosequencing, στον αναλυτή PyroMark Q96. Η μέθοδος αυτή είναι αξιόπιστη, καινοτόμος, ταχεία, ευαίσθητη και προσφέρει ποσοτικά και όχι μόνο ποιοτικά δεδομένα. Στη μέθοδο αυτή αναλύονται συνολικά 9 CpG δινουκλεοτίδια σε 117 bp της 1^{ης} CpG νησίδας του *RASSF1* γονιδίου που καταλαμβάνει όλο το μήκος του πρώτου υποκινητή του *RASSF1* γονιδίου και από τον οποίο μεταγράφεται και το *RASSF1A* (όπως και τα D, E, F, G και H μετάγραφα). Η μεθυλίωση δίδεται ως ποσοστό ανά CpG δινουκλεοτίδιο και ως τελικό ποσοστό μεθυλίωσης χρησιμοποιείται ο μέσος όρος της μεθυλίωσης των 9 CpG δινουκλεοτιδίων που αναλύονται. Η μέθοδος αυτή επικυρώθηκε με τη χρήση συνθετικών προτύπων δειγμάτων, με διαφορετικά ποσοστά μεθυλίωσης (καταδεικνύοντας όμως ένα μικρό συστηματικό σφάλμα μεθυλίωσης).

Προκειμένου να οριστεί το όριο σύμφωνα με το οποίο ένα δείγμα θα θεωρηθεί υπο- ή υπερ- μεθυλιωμένο και με δεδομένο ότι βρέθηκε background μεθυλίωσης και στα φυσιολογικά δείγματα, υπολογίσθηκαν ο μέσος όρος μεθυλίωσης (31,21%) και η τυπική απόκλιση (12,94) και ορίστηκε ως όριο το 57,09% (ως ο μέσος όρος φυσιολογικών + 2*τυπικές αποκλίσεις). Το όριο αυτό είναι λίγο πάνω από το μέσο όρο (45,01%) και τη διάμεσο (45,39%) των μετρήσεων. Με τον τρόπο αυτό, από τα συνολικά 81 δείγματα ασθενών,

χαρακτηρίστηκαν ως υπο-μεθυλιωμένα τα 59 (72,8%) ενώ ως υπερ-μεθυλιωμένα τα 22 (27,2%).

Από την στατιστική ανάλυση προέκυψε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά του μέσου όρου της μεθυλίωσης ανάλογα με την κατάσταση των ER υποδοχέων, με στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Ο μέσος όρος της μεθυλίωσης στα ER- δείγματα είναι 31,19 με SD=15,62, ενώ στα ER+ είναι 49,50 με SD=19,00 (t-test, $p=0,001$). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται με το χωρισμό σε ομάδες και έλεγχο χ^2 ($p=0,016$). Ακόμα, οριακά συσχετίζονται η RASSF1 υπερ-μεθυλίωση με τη θετικότητα των PR υποδοχέων (Pearson χ^2 , $p=0,06$) και τη λεμφαδενική διήθηση (Pearson χ^2 , $p=0,07$). Από την ανάλυση επιβίωσης δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση μετάστασης στις ασθενείς εν σχέσει με το ποσοστό μεθυλίωσης.

Οι περιορισμοί της μελέτης αναφορικά με την μεθυλίωση αφορούν

- την ύπαρξη background μεθυλίωσης στα φυσιολογικά δείγματα και την αδυναμία ορισμού ενός ξεκάθολου ορίου πάνω από το οποίο κυριαρχεί η υπερ-μεθυλίωση
- την διαθεσιμότητα τεσσάρων μόνο φυσιολογικών δειγμάτων για να έχει μεγαλύτερη στατιστική αξία το ανωτέρω όριο, και
- το γεγονός ότι δεν εξετάσθηκε η μεθυλίωση στον δεύτερο υποκινητή. Ο δεύτερος υποκινητής του *RASSF1* γονιδίου βρίσκεται εντός της 2^{ης} CpG νησίδας του, περιέχει συνολικά 139 CpG δινουκλεοτίδια και από αυτόν μεταγράφονται τα *RASSF1B* και *RASSF1C* mRNA.

Στη συνέχεια, για τη μελέτη της mRNA έκφρασης του *RASSF1* γονιδίου, χρησιμοποιήθηκε η real-time qPCR, στον θερμικό κυκλοποιητή Rotor-Gene Q με το Rotor-Gene SYBR Green PCR kit και το κατάλληλο Primer kit Assay της Qiagen (προτυποποιημένοι εκκινητές). Με το Primer kit Assay ανιχνεύονται όλα τα μετάγραφα του *RASSF1* γονιδίου, καθώς δεν κατέσκει δυνατό να αναπτυχθεί με τα διαθέσιμα μέσα (SYBR Green) ξεχωριστή μέθοδος για το *RASSF1A* ή τουλάχιστον για ορισμένα μόνο μετάγραφα, παρά τις δύο προσπάθειες που έγιναν. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της $\beta 2$ -μικροσφαιρίνης. Η μέθοδος επικυρώθηκε βάσει των στοιχείων επαναληψιμότητας και ενδιάμεσης αναπαραγωγιμότητας που προέκυψαν από

τις καμπύλες αναφοράς για κάθε ένα γονίδιο. Το PCR προϊόν που προκύπτει από το *RASSF1* γονίδιο έχει μήκος 121 bp και T_m 87,5°C (SD=0,3).

Ως μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η $2^{-\Delta Ct}$ των Livak και Schmittgen ($RQ = 2^{-\Delta Ct}$, όπου RQ η έκφραση) και οι τιμές έκφρασης πολλαπλασιάστηκαν επί 1000. Υπολογίστηκε η διάμεσος των τιμών έκφρασης των δειγμάτων (2,27) προκειμένου να διαχωρισθούν είτε σε υπο- είτε σε υπερ- εκφρασμένα δείγματα. Από τα 81 δείγματα ασθενών τα 40 (49,4%) χαρακτηρίστηκαν ως υπερ-εκφραζόμενα, ενώ τα 41 (50,6%) χαρακτηρίστηκαν ως υπο-εκφραζόμενα.

Από την στατιστική ανάλυση δεν προέκυψε καμμία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της mRNA έκφρασης του *RASSF1* γονιδίου με κάποια από τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους. Μόνο από την ανάλυση επιβίωσης προέκυψε ότι μεταξύ εμφάνισης μετάστασης και mRNA υπερ-έκφρασης του *RASSF1* γονιδίου υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ($p=0,040$).

Κατά την μελέτη της mRNA έκφρασης του *RASSF1* γονιδίου υπήρξαν ορισμένοι περιορισμοί. Όπως προαναφέρθηκε, το χρησιμοποιούμενο Primer kit Assay ανιχνεύει όλα τα μετάγραφα του *RASSF1* γονιδίου. Τα μετάγραφα του *RASSF1* γονιδίου εμφανίζουν υψηλή ομολογία (όπως φαίνεται και στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι) και πιθανόν να μην είναι δυνατή η εύρεση κατάλληλων εκκινήτων για ένα και μόνο μετάγραφο, με το SYBR Green ως μέσο ανίχνευσης. Με το kit αυτό ανιχνεύεται και το *RASSF1C* μετάγραφο, το οποίο μεταγράφεται από τον δεύτερο υποκινητή του *RASSF1* και, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το *RASSF1C* μετάγραφο φαίνεται να έχει αντίθετη λειτουργία από το *RASSF1A* και η έκφρασή τους ρυθμίζεται ανάποδα. Όταν το *RASSF1A* υποεκφράζεται, το *RASSF1C* υπερεκφράζεται.⁽⁷⁸⁾ Η χρωστική που χρησιμοποιείται, το SYBR Green I, είναι μη ειδική για το επιθυμητό PCR προϊόν (*RASSF1A*), με αποτέλεσμα να μπορούν να ανιχνευθούν και άλλα PCR προϊόντα από τα άλλα μετάγραφα. Επίσης, η περιοχή είναι G/C rich και αυτό δυσχεραίνει το σχεδιασμό και τον ακριβή πολλαπλασιασμό στην αντίδραση PCR.

Μια σημαντική παρατήρηση της εργασίας αυτής είναι ότι μεταξύ των μετρήσεων που έγιναν στη διατριβή αυτή, δηλαδή της μεθυλίωσης του πρώτου υποκινητή του *RASSF1* γονιδίου και της mRNA έκφρασης αυτού δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική αρνητική συσχέτιση ($p=0,207$), σε αντίθεση με το αναμενόμενο ή με βιβλιογραφικά δεδομένα. Το εύρημα αυτό ενισχύθηκε με την αδυναμία εύρεσης ενός μοντέλου γραμμικής παλινδρόμησης, βάσει του οποίου θα μπορούσε να υπολογισθεί η έκφραση από την μεθυλίωση. Βάσει αυτού, είναι πιθανό να μην απαιτείται μόνο η υπερ-μεθυλίωση του πρώτου αλλά και του δεύτερου υποκινητή του *RASSF1* γονιδίου ή να χρειάζονται και άλλες επιγενετικές τροποποιήσεις (πχ ακετυλίωση, miRNA ρύθμιση) ώστε να παύσει η έκφραση και η λειτουργία του. Ίσως, εάν ήταν γνωστή η κατάσταση της μεθυλίωσης και του δεύτερου υποκινητή, να εξαγόταν ασφαλέστερα συμπεράσματα.

Επιπροσθέτως, από την λογαριθμιστική παλινδρόμηση για τις κρίσιμες παραμέτρους της λεμφαδενικής διήθησης και της μετάστασης, όπου χρησιμοποιήθηκαν οι δυο μετρήσεις της διατριβής και οι υπόλοιποι προγνωστικοί παράγοντες, βρέθηκε ότι η πιθανότητα λεμφαδενικής διήθησης αυξάνεται με την παρουσία αρνητικών ER υποδοχέων, αναμενόμενο βάσει των προηγούμενων t και χ^2 test ($p=0,008$ με RR 0,08, C.I. 0,14-0,52), το ποσοστό της *RASSF1* μεθυλίωσης ($p=0,006$ με RR 7,96, C.I. 1,82-34,86) και το επίπεδο έκφρασης του *RASSF1* ($p=0,047$ με RR 3,94, C.I. 1,02-15,29). Το τελευταίο αντικρουόμενο και απροσδόκητο δεδομένο μπορεί να οδηγήσει στην υπόθεση ότι αυξάνεται η έκφραση κάποιου άλλου μεταγράφου, εκτός του A, και το οποίο αυξάνει την ολική *RASSF1* έκφραση οδηγώντας στην κακή εξέλιξη της λεμφαδενικής διήθησης. Για την μετάσταση όμως δεν βρέθηκαν ανάλογα δεδομένα.

Συμπερασματικά, αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος ανίχνευσης μεθυλίωσης του πρώτου υποκινητή του *RASSF1* γονιδίου, η οποία θα μπορούσε μελλοντικά να επεκταθεί με ανάλογα αξιόπιστο τρόπο και στον δεύτερο υποκινητή του *RASSF1* γονιδίου, ώστε να υπάρχει μια συνολική εικόνα της ενεργότητας των υποκινητών του γονιδίου. Όσον αφορά την μελέτη έκφρασης, ένας νέος σχεδιασμός της μεθόδου με χρήση probes ειδικών για όλα τα *RASSF1* μεταγγραφα σε συνδυασμό με ειδικά αντισώματα για την ανίχνευση των

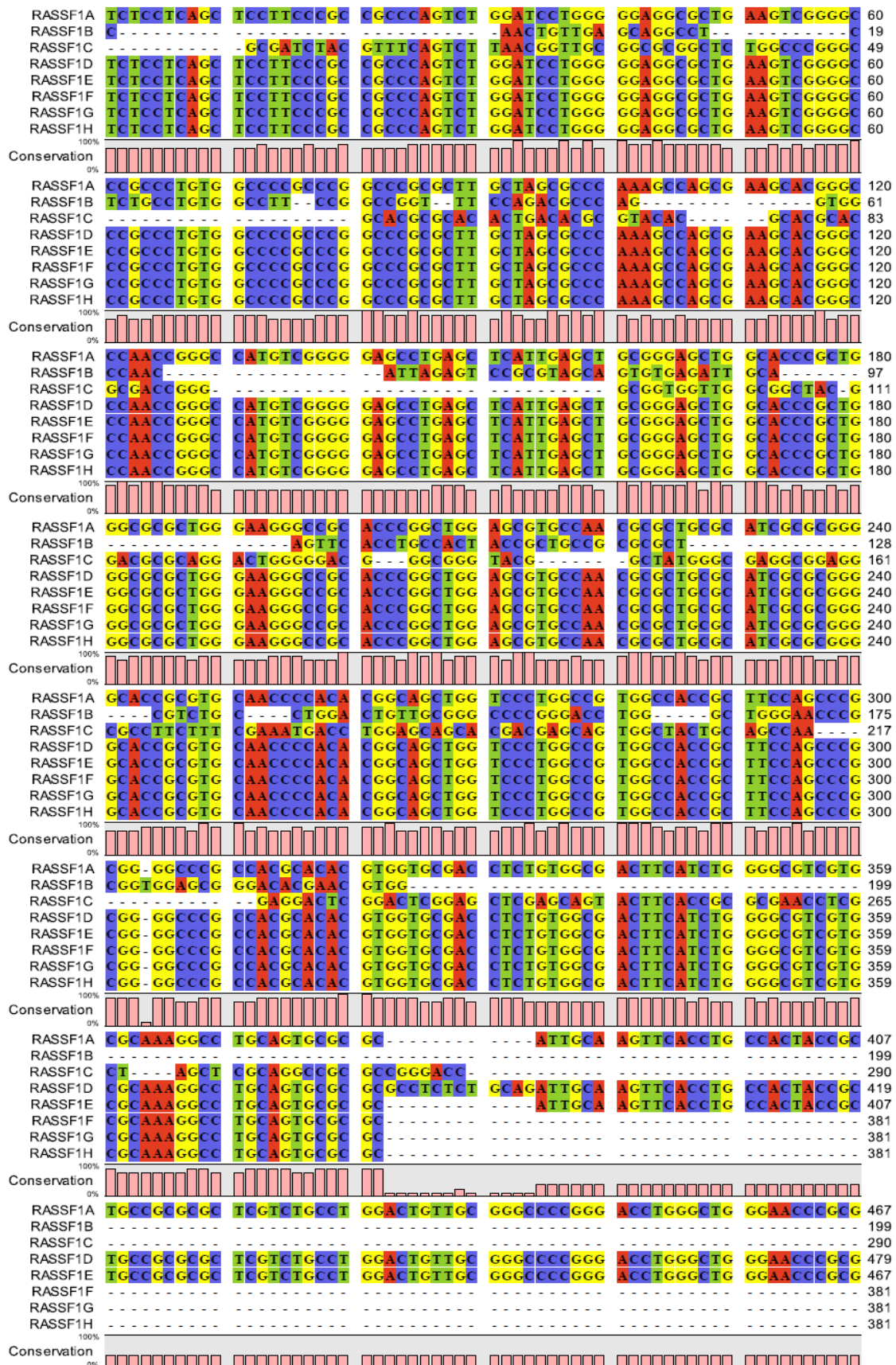
διαφόρων πρωτεϊνικών ισομορφών και πιο ειδικά του RASSF1A απευθείας στον ιστό (με IHC ή Western Blot), θα μπορέσουν να εξειδικεύσουν την μελέτη αυτή, ξεπερνώντας τα υπάρχοντα προβλήματα και να προσφέρουν επιπρόσθετα χρήσιμα προβλεπτικά και προγνωστικά εργαλεία για την παρακολούθηση και θεραπεία των ασθενών με καρκίνο μαστού. Εάν αποδειχθεί κάτι τέτοιο, θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν σε πολυπαραμετρικά panel έκφρασης βιοδεικτών (όπως πχ το Oncotype, το MammaPrint κλπ) στον ιστό ή/και το περιφερικό αίμα αργότερα.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

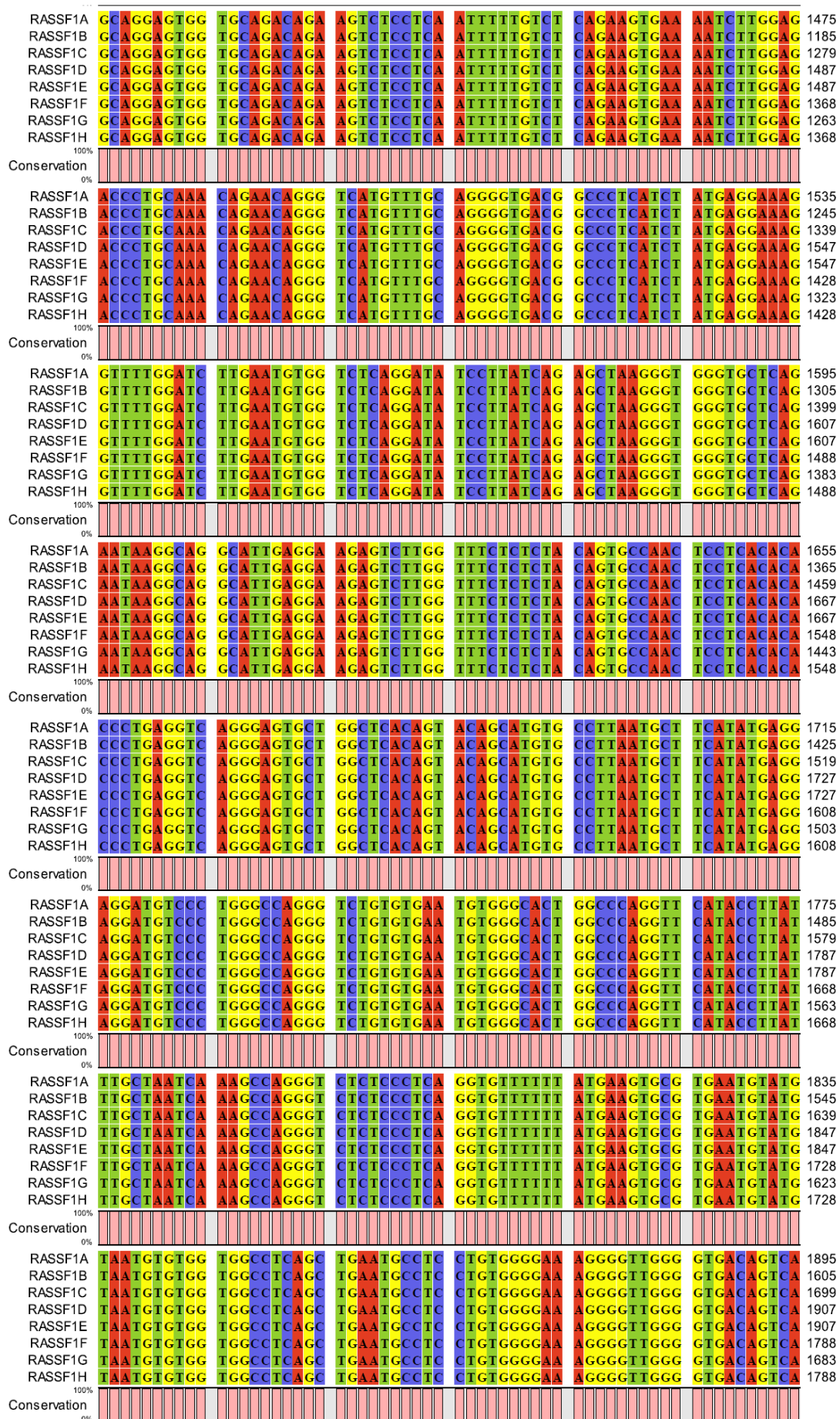
5mC	5-methylcytosin / 5-μεθυλοκυτοσίνη
AJCC	American Join Committee of Cancer / Μεικτή Αμερικανική επιτροπή για τον καρκίνο
ATM	Ataxia telagectasia mutant
c DNA	Complementary DNA / Συμπληρωματικό DNA
C19ORF5	Chromosome 19 open reading frame 5
cfDNA	Cell free DNA / DNA ελεύθερο κυττάρου
Cp	Crossing point
Cq	Quantification cycle / Κύκλος ποσοτικοποίησης
CTCs	Circulating tumor cells / Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα
CV	Coefficient of Variation / Συντελεστής διακύμανσης
DAG	Diacylglycerol / Διακυλογλυκερόλη
DCIS	Ductal carcinoma In situ / Πορογενές Καρκίνωμα In situ
dCTP	Deoxycytidine triphosphate / Τριφωσφορική δεοξυκυτρίνη
DDA	DNA damage response / Ανταπόκριση στην καταστροφή του DNA
DMNTs	DNA methyltransferases / DNA μεθυλοτρανσφεράσες
dTTP	Deoxythymidine triphosphate / Τριφωσφορική δεοξυθυμίνη
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMT	Epithelial-to-mesenchymal tramsition / Επιθηλιακή-μεσεγγηματική μετάβαση
ER	Estrogen receptor / Υποδοχέας οιστρογόνων
FISH	Fluoresence in situ hibridization / In situ υβριδισμός φθορισμού
HDAC	Histone deacetylase / Αποακετυλάση ιστόνης
HER2	Human epidermal receptor protein 2 / Υποδοχέας ανθρώπινης επιδερμικής πρωτεΐνης
HMT	Histone methyltransfarase / Μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
IDC	Invasive ductal carcinoma / Πορογενές διηθητικό καρκίνωμα
IHC	Immunohistochemistry / Ανοσοϊστοχημεία
ILC	Invasive lobular carcinoma / Λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα
LCIS	Lobular carcinoma In situ / Λοβιακό Καρκίνωμα In situ
LOH	Loss of heterozygosity / Απώλεια της ετεροζυγωτίας
MAP	Microtubule associated proteins / Πρωτεΐνες συσχετιζόμενες με τους μικροσωλινίσκους
MAP-1	Modulator of aroptosis 1 / Ρυθμιστής της απόπτωσης 1

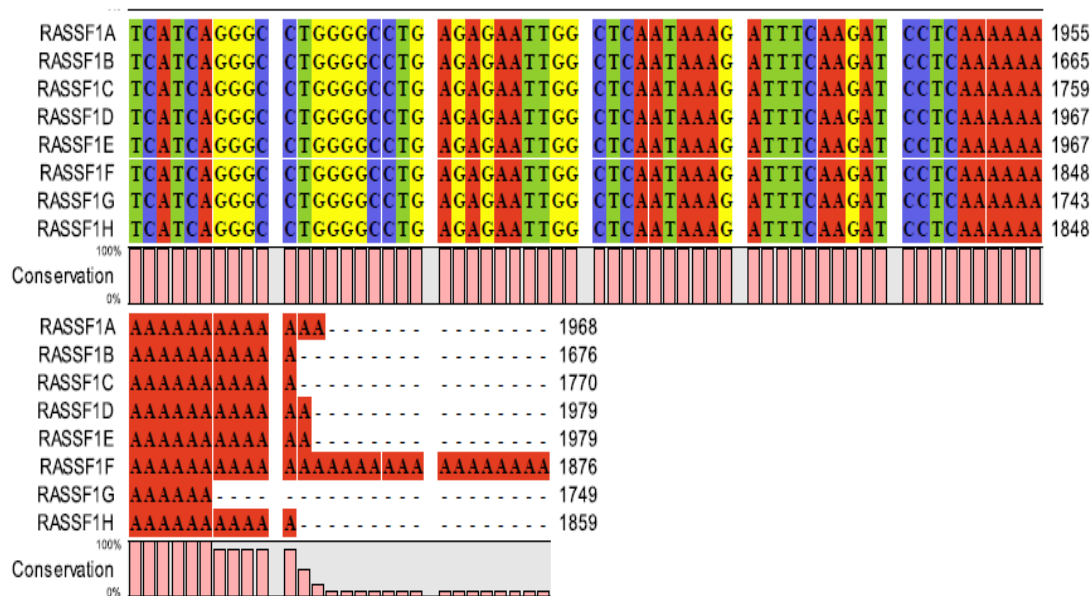
MeCP	Methyl-DNA binding proteins / Μεθυλοδεσμευτικές πρωτεΐνες DNA
MIN	Microsatellite instability / Μικροδορυφορική αστάθεια
MS -q FRET	Methylation specific quantum dot fluorescence resonance energy transfer /
MSP	Methylation-Specific PCR / PCR ειδική για μεθυλίωση
MST-1	Mammalian sterile 20-like kinase 1
NST	Non specific type / Μη ειδικού τύπου
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen / Πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιασμού
PCR	Polymerase chain reaction / Αλυσιδωτή αντιδραση πολυμεράσης
PR	Progesterone receptor / Υποδοχέας προγεστερόνης
qMSP	Quantitative Methylation-Specific PCR / Ποσοτική PCR ειδική για μεθυλίωση
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction / Ποσοτική αλυσιδωτή αντιδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής
RASSF1	Rass association domain family 1 / Συσχετιζομενη με τον Rass τομέα οικογένεια 1
RASSF1	Ras association / Συσχέτιση με τον Ras
RCC1	RAN guanine nucleotide exchange factor / RAN παράγοντας γουανιδίνης ανταλλαγής νουκλεοτιδίων
RPA	Replication protein A / Πρωτεΐνη αντιγραφής A
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction / Αλυσιδωτή αντιδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής
SAM	S-adenosylmethionine / S-αδενοσυλομεθειονίνη
SARAH	Salvador - Rass - Hippo
SBS	Sequencing by synthesis / Αλληλούχιση κατά τη σύνθεση
SD	Standard Deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TBE	Tris/Borate/EDTA
Tm	melting Temperature
TNF-R1	Tumor necrosis factor receptor 1/ Υποδοχέας παράγοντα νέκρωσης 1
TNM	Tumor Node Metastasis / Όγκος Λεμφαδένες Μετάσταση
UICC	Union for International Cancer Control / Ένωση για τον διεθνή έλεγχο του καρκίνου
XPA	Xeroderma pigmentosum A
dsDNA	double stranded DNA

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι









ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Κελλάρτζης Δ. και λοιποί, Ανατομία, φυσιολογική διάπλαση και διαταραχές ανάπτυξης των μαστών, Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογία, 21(2):115-121, 2009
2. Frick H. et al, Γενική ανατομία, Ειδική ανατομία Ι, Επιστημονικές Εκδόσεις Γρ. Παρισιάνου, 2^η έκδοση, Αθήνα 1985
3. Snell R.S., Κλινική Ανατομική, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 1992
4. Μαρινάκη Ι.Ε., Νύκταρη Π.Α., Καρκίνος του μαστού. Μία σύγχρονη ματιά στην αιτιολογία και ειδικότερα στη συσχέτισή του με την κατανάλωση αλκοόλ, Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Διατροφής-Διαιτολογίας, ΑΤΕΙ Κρήτης, 2008
5. Guyton & Hall, Ιατρική Φυσιολογία, 9^η έκδοση, τόμος 2^{ος}, Επιστημονικές Εκδόσεις Γρ. Παρισιάνου, 1998
6. Robbins et al, Παθολογοανατομική βάση της νόσου, 6^η έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε.
7. Robbins & Cotran, Παθολογοανατομική βάση των νοσημάτων με στοιχεία παθογένειας, 7^η έκδοση, Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2008
8. Hanahan D. Weinberg R.A., The Hallmarks of cancer, Cell, 2000;100:57–70
9. Hanahan D, Weinberg RA, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, Cell, 2011;144(5):646-74
10. Osborne C, Wilson P, Tripathy D, Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications, The Oncologist, 2004;9:361-77
11. Yoo JS, Jones PA, Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin?, Cancer Cell, 2012;22(1):9-20
12. Knudson AJ, Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971;68(4):820-23
13. Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C et al, Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes, Pharmaceutical Research, 2008;25(9):2097-116
14. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS et al, Environmental and chemical carcinogenesis, Seminars in Cancer Biology, 2004;14:473–86
15. Davoodi SH, Malek-Shahabi T, Malekshahi-Moghadam A et al, Obesity as an Important Risk Factor for Certain Types of Cancer. Iran J Cancer Prev. 2013; 6(4):186-94
16. McGuire A, Brown JAL, Malone C et al, Effects of Age on the Detection and Management of Breast Cancer, Cancers, 2015 908-29.
17. Poupouridou N, Kroupis C, Hereditary breast cancer: beyond BRCA genetic analysis; PALB2 emerges, Clin Chem Lab Med 2012;50(3):423–434
18. Weigel MT, Dowsett M, Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction, Endocrine-Related Cancer (2010) 17 245-62
19. Ross JS, Symmans WF, Pusztai L et al, Breast Cancer Biomarkers, Advances in Clinical Chemistry, Vol. 40

20. Ross JS, LinetteJP, Stec JP et al, Breast cancer biomarkers and molecular medicine, *Expert Rev. Mol. Diagn.* (2003) 3, 573-85
21. Banin Hirata BK, Oda JM, Losi Guembarovski R et al, Molecular Markers for Breast Cancer: Prediction on Tumor Behavior, *Disease Markers* 2014, ID 513158
22. Pavlidou A, Kroupis C, Dimas K, Association of survivin splice variants with prognosis and treatment of breast cancer., *World J Clin Oncol* 2014; 5(5): 883-94
23. McGuire A, Brown JAL, Kerin MJ, Metastatic breast cancer: the potetial of miRNA for diagnosis and treatment monitoring, *Cancer Metastasis Rev* (2015) 34:145–155
24. Lang JE, Wecsler JS, Press MF et al, Molecular Markers for Breast Cancer Diagnosis, Prognosis and Targeted Therapy, *Journal of Surgical Oncology* (2015);111:81–90
25. Lianidou ES, Mavroudis D, Sotiropoulou G et al, What's new on circulating tumor cells? A meeting report., *Breast Cancer Research* (2010)12:307.
26. Lianidou ES, Mavroudis D, Georgoulis V, Clinical challenges in the molecular characterization of circulating tumour cells in breast cancer, *British Journal of Cancer* (2013) 108, 2426-32.
27. Van de Vijver MJ, Molecular tests as prognostic factors in breast cancer, *Virchows Arch* (2014) 464:283–91
28. Tian S, Roepman P, Vant Veer LJ et al, Biological Functions of the Genes in the Mammaprint Breast Cancer Profile Reflect the Hallmarks of Cancer, *Biomarker Insights* 2010:5, 129–38
29. Van't Veer LJ, Dai H, Van de Vijver MJ et al, Gene Expression Profiling Predicts Clinical Outcome of Breast Cancer, *Nature* (2002), Vol. 415, 530-36
30. Paik S, Shak S, Tang G et al, A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer, *N Engl J Med* 2004;351:2817-26
31. Kittaneh M, Montero AJ, Cluck S, Molecular Profiling for Breast Cancer: A Comprehensive Review, *Biomarkers Cancer*, 2013:5 61–70
32. Metzger-Filho O, Catteau A, Michiels S et al, Genomic Grade Index (GGI): Feasibility in Routine Practice and Impact on Treatment Decisions in Early Breast Cancer, *Plos One* (2013) 8(8): e66848
33. Metzger-Filho O, Ignatiadis M, Sotiriou C, Genomic Grade Index: An important tool for assessing breast cancer tumor grade and prognosis *Crit Rev Oncol Hematol.* 2011; 77: 20–29.
34. Arpino G, Generali D, Sapino A et al, Gene expression profiling in breast cancer: A clinical perspective, *The Breast* 22 (2013) 109-120.
35. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S et al, Gene Expression Profiling in Breast Cancer: Understanding the Molecular Basis of Histologic Grade To Improve Prognosis, *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(4):262-72.
36. Ring BZ, Seitz RS, Beck R et al, Novel Prognostic Immunohistochemical Biomarker Panel for Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer, *J Clin Oncol* (2006) 24:3039-3047.
37. Muller BM, Keil E, Lehman A et al, The EndoPredict Gene-Expression Assay in Clinical Practice – Performance and Impact on Clinical Decisions. *Plos One* 8(6): e68252 (2013)

38. Perou CM, Børresen-Dale A-L, Systems Biology and Genomics of Breast Cancer, Cold Spring Harb Perspect Biol 2011;3:a003293
39. Parker JS, Mullis M, Cheang MCU et al, Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes, J Clin Oncol (2009) 27:1160-1167
40. Καραβιτάκης Ε., Επιγενετικοί μηχανισμοί και η σημασία τους στην παιδιατρική, Επίκαιρα Θέματα II, Παιδιατρική Θεραπευτική Ενημέρωση, 2010
41. Costello JF, Plass C, Methylation matters, J Med Genet (2001);38:285-303
42. Μπενετάτος Λ., Η κυτταρική διαφοροποίηση και η γονιδιακή μεθυλίωση στις αιματολογικές κακοήθειες, Διδακτορική Διατριβή, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2010
43. Robertson KD, Jones PA, DNA methylation: past,present and future directions, Carcinogenesis (2000) vol.21 no.3 461-467.
44. Singal R, Ginder GD, DNA methylation., Blood (1999);93:4059-70.
45. Baylin SB, DNA methylation and gene silencing in cancer, Nat Clin Pr Oncol (2005) 2 , S4-S11
46. Cross SH, Bird AP, CpG islands and genes., Current Opinion in Genetics and Development 1995;5:309-14.
47. Bird A, DNA methylation patterns and epigenetic memory, Genes & Development (2002) 16: 6-21
48. Pfeifer GP, Kadam S, Jin S-G, 5-hydroxymethylcytosine and its potential roles in development and cancer., Epigenetics & Chromatin (2013);6:10.
49. Song C-X, Yi C, He C, Mapping recently identified nucleotide variants in the genome and transcriptome, Nat Biotechnol (2012);30:1107-16.
50. Harrison A, Parle-McDermott A, DNA methylation: a timeline of methods and applications, Front.Gene.(2011) 2:74
51. Frommer M, McDonald LE, Millar DS et al, A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands, Proc Natl Acad Sci, 1992;89:1827-31
52. Liu ZM, Maekawa M, Polymerase chain reaction-based methods of DNA methylation analysis, Anal Biochem 317 (2003) 259–265
53. Shanmuganathan R, Basheer NB, Amirthalingam L et al, Conventional and Nanotechniques for DNA Methylation Profiling, J Mol Diagn 2013, 15:17-26
54. Shames DS, Minna JD, Gazdar AF, Methods for detecting DNA methylation in tumors: From bench to bedside, Cancer Letters 251 (2007) 187–198
55. Ammerpohl O, Martín-Subero JI, Richter J et al, Hunting for the 5th base: Techniques for analyzing DNA methylation, Biochimica et Biophysica Acta 1790 (2009) 847–862
56. Zuo T, Tycko B, Liu T-M et al, Methods in DNA methylation profiling, Epigenomics 2009 1(2): 331–345.
57. Dahl C, Guldberg P, High-Resolution Melting for Assessing DNA Methylation, Clinical Chemistry 53, No. 11 2007
58. Bailey VJ, Keeley BP, Razani CR et al, DNA methylation detection using MS-qFRET, a quantum dot-based nanoassay, Methods 52 (2010) 237–241.

59. Yamagata K, DNA methylation profiling using live-cell imaging, *Methods* 52 (2010) 259–266
60. Rauch TA, Pfeifer GP, DNA methylation profiling using the methylated-CpG island recovery assay (MIRA), *Methods* 52 (2010) 213–217
61. Donninger H, Vos MD, Clark GJ, The RASSF1A tumor suppressor, *J Cell Sci.* 2007;120, 3163-3172
62. Dammann R, Li C, Yoon J-H et al, Epigenetic inactivation of RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3, *Nat Genet* 2000;25(3):315-9
63. Volodko N, Gordon M, Salla M et al, RASSF tumor suppressor gene family: Biological functions and regulation, *FEBS Letters* 588 (2014) 2671–2684
64. Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH, The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization, *Biochim Biophys Acta.* 2009;1796(2):114-28
65. Agathangelou A, Cooper WN, Latif F, Role of the Ras-Association Domain Family 1 Tumor Suppressor Gene in Human Cancers, *Cancer Res* 2005;65:3497-3508
66. Van der Weyden L, Adams DJ, The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumorigenesis, *Biochim Biophys Acta* 2007;1776(1):58-85
67. Hesson LB, Cooper WN, Latif F, Evaluation of the 3p21.3 tumour-suppressor gene cluster, *Oncogene* (2007) 26, 7283–7301
68. Sherwood V, Recino A, Jeffries A et al, The N-terminal RASSF family: a new group of Ras-association-domain containing proteins, with emerging links to cancer formation, *Biochem. J.* (2010) 425, 303–311
69. Avruch J, Xavier R, Bardeesy N et al, Rassf Family of Tumor Suppressor Polypeptides, *J Biol Chem.* 2009;284(17):11001-5
70. Gordon M, Baksh S, RASSF1A: Not a prototypical Ras effector, *Small GTPases.* 2011 May-Jun; 2(3): 148–157
71. Avruch J, Xavier R, Bardeesy N et al, Rassf Family of Tumor Suppressor Polypeptides, *J Biol Chem.* 2009;284(17):11001-5
72. Foley CJ, Freedman H, Choo SL et al, Dynamics of RASSF1A/MOAP-1 Association with Death Receptors, *Mol Cell Biol.* 2008;28(14):4520-35
73. Arnette C, Efimova N, Zhu X et al, Microtubule segment stabilization by RASSF1A is required for proper microtubule dynamics and Golgi integrity, *Mol Biol Cell.* 2014;25(6):800-10
74. Fausti F, Di Agostino S, Sacconi A et al, Hippo and rassf1a Pathways: A Growing Affair, *Mol Biol Int.* 2012;2012:307628
75. Donninger H, Clark JA, Monaghan MG et al, Cell Cycle Restriction Is More Important Than Apoptosis Induction for RASSF1A Protein Tumor Suppression, *J Biol Chem.* 2014; 289(45): 31287–31295
76. Ram RR, Mendiratta S, Bodemann BO et al, RASSF1A Inactivation Unleashes a Tumor Suppressor/Oncogene Cascade with Context-Dependent Consequences on Cell Cycle Progression, *Mol Cell Biol.* 2014;34(12): 2350–2358
77. Dittfeld C, Richter AM, Steinmann K et al, The SARAH Domain of RASSF1A and Its Tumor Suppressor Function, *Mol Biol Int.* 2012:196715.

78. Reeves ME, Firek M, Chen S-T et al, The RASSF1 Gene and the Opposing Effects of the RASSF1A and RASSF1C Isoforms on Cell Proliferation and Apoptosis, *Mol Biol Int.* 2013; 2013: 145096.
79. Thaler S, Hanhel PS, Schad A et al, RASSF1A Mediates p^{21Cip1/Waf1}-Dependent Cell Cycle Arrest and Senescence through Modulation of the Raf-MEK-ERK Pathway and Inhibition of Akt, *Cancer Res* 2009; 69: (5).
80. Vos MD, Dallol A, Eckfeld K et al, The RASSF1A tumor suppressor activates Bax via MOAP-1, *J Biol Chem* 2006;281(8):4557-63
81. Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T et al, The RASSF1A Tumor Suppressor Blocks Cell Cycle Progression and Inhibits Cyclin D1 Accumulation, *Mol Cell Bio* 2002 4309–4318
82. Dallol A, Hesson L, Matallanas D et al, RAN GTPase Is a RASSF1A Effector Involved in Controlling Microtubule Organization, *Curr Biol* 2009;1227–1232
83. Jung HY, Jung JS, Whang YM et al, RASSF1A Suppresses Cell Migration through Inactivation of HDAC6 and Increase of Acetylated α -Tubulin, *Cancer Res Treat* 2013;45(2):134-144
84. Donninger H, Clark J, Rinaldo F et al, The RASSF1A Tumor Suppressor Regulates XPA-Mediated DNA Repair, *Mol Cell Biol* 2015;35: 277-87
85. Pefani DE, O'Neill E, Safeguarding genome stability: RASSF1A tumor suppressor regulates BRCA2 at stalled forks, *Cell Cycle* 2015 3;14(11):1624-30.
86. Oceandy D, Pickard A, Prehar S et al, Tumor suppressor Ras-association domain family 1 isoform A is a novel regulator of cardiac hypertrophy, *Circulation* 2009;120(7):607-16.
87. Gordon M, El-Kalla M, Baksh S, RASSF1 Polymorphisms in Cancer, *Mol Biol Int* 2012;2012:365213.
88. Yee KS, Grochola L, Hamilton G et al, A RASSF1A polymorphism restricts p53/p73 activation and associates with poor survival and accelerated age of onset of soft tissue sarcoma., *Cancer Res* 2012 72; 2206
89. El-Kalla M, Onyskiw C, Baksh S, Functional importance of RASSF1A microtubule localization and polymorphisms, *Oncogene* (2010) 29, 5729–40
90. Bayram S, Association between RASSF1A Ala133Ser Polymorphism and Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis Involving 8,892 Subjects, *Asian Pacific J Cancer Prev* 2004;15 (8), 3691-8
91. Gao B, Xie X-J, Huang C et al, RASSF1A Polymorphism A133S Is Associated with Early Onset Breast Cancer in BRCA1/2 Mutation Carriers, *Cancer Res* 2008;68(1): 22–25.
92. Bergqvist J, Latif A, Roberts SA et al, RASSF1A polymorphism in familial breast cancer, *Familial Cancer* 2010;9(3):263-5
93. Vos MD, Martinez A, Elam C et al, A Role for the RASSF1A Tumor Suppressor in the Regulation of Tubulin Polymerization and Genomic Stability, *Cancer Res* 2004 64; 4244
94. Hamilton G, Yee KS, Scrace S et al, ATM Regulates a RASSF1A-Dependent DNA Damage Response, *Curr Biol* 2009;(19)23:2020-25
95. Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP et al, Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours, *Oncogene* 2001;20, 1509-18

- 96.** Burbee BG, Forgas E, Zochbauer-Muller S et al, Epigenetic Inactivation of RASSF1A in Lung and Breast Cancers and Malignant Phenotype Suppression, *J Natl Cancer Inst* 2001;93:691-9.
- 97.** Saelee P, Wongkham S, Chariyalertsak S et al, RASSF1A promoter hypermethylation as a prognostic marker for Hepatocellular Carcinoma, *Asian Pasific J Cancer Prev* 2010;11(6):1677-81
- 98.** Sebova K, Zmetakova I, Bella V et al, RASSF1A and CDH1 hypermethylation as potential epimarkers in breast cancer, *Cancer Biomarkers* 10 (2011/2012) 13–26
- 99.** Kajabova V, Smolkova B, Zmetakova I et al, RASSF1A Promoter Methylation Levels Positively Correlate with Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer Patients, *Translational Oncology* (2013) 6, 297–304
- 100.** Hagrass HA, Pasha HF, Shaheen MA et al, Methylation status and protein expression of RASSF1A in breast cancer patients, *Mol Biol Rep* (2014) 41:57-65
- 101.** Fackler MJ, McVeigh M, Mehrotra J et al, Quantitative Multiplex Methylation-Specific PCR Assay for the Detection of Promoter Hypermethylation in Multiple Genes in Breast Cancer, *Cancer Res* 2004;64: 4442–52
- 102.** Dammann R, Yang G, Pfeifer GP, Hypermethylation of the CpG Island of Ras Association Domain Family 1A (RASSF1A), a Putative Tumor Suppressor Gene from the 3p21.3 Locus, Occurs in a Large Percentage of Human Breast Cancers, *Cancer Res* 2001;61:3105–09
- 103.** Agostini M, Enzo MV, Bedin C et al, Circulating cell-free DNA: A promising marker for regional lymphonode metastasis in breast cancer patients, *Cancer Biomarkers* 2011-2012;11: 89-98
- 104.** Kloten V, Becker B, Winner K et al, Promoter hypermethylation of the tumor suppressor genes ITIH5, DKK3, and RASSF1A as novel biomarkers for blood-based breast cancer screening, *Breast Cancer Research* 2013, 15:R4
- 105.** Dulaimi E, Hillinck J, Ibanez de Caceres I et al, Tumor Suppressor Gene Promoter Hypermethylation in Serum of Breast Cancer Patients, *Clin Cancer Res* 2004;10:6189–93
- 106.** Shukla S, Mirza S, Sharma D et al, Detection of RASSF1A and RARb Hypermethylation in Serum DNA from Breast Cancer Patients, *Epigenetics* 2006;1:2, 88-93 2006
- 107.** Xu J, Shetty PB, Feng W et al, Methylation of HIN-1, RASSF1A, RIL and CDH13 in breast cancer is associated with clinical characteristics, but only RASSF1A methylation is associated with outcome, *BMC Cancer* 2012, 12:243
- 108.** Buhmeida A, Merdad A, El-Maghrabi J et al, RASSF1A Methylation is Predictive of Poor Prognosis in Female Breast Cancer in a Background of Overall Low Methylation Frequency, *Anticancer Research* 2011;31:2975-82
- 109.** Li Y, Wei Q, Cao F, Expression and promoter methylation of the RASSF1A gene in sporadic breast cancers in Chinese women, *Oncol Rep* 2008;19:1149-53
- 110.** Stuopelytė K, Daniūnaitė K, Laurinavičienė A et al, High-Resolution Melting-Based Quantitative Analysis of RASSF1 Methylation in Breast Cancer, *Medicina (Kaunas)* 2013;49(2):78-83

- 111.** Teodoridis JM, Hall J, Marsh S et al, CpG Island Methylation of DNA Damage Response Genes in Advanced Ovarian Cancer, *Cancer Res*, 2005; 65(19): 8961-7
- 112.** Lorente A, Mueller W, Urdangarín E et al, Detection of methylation in promoter sequences by melting curve analysis-based semi quantitative real time PCR, *BMC Cancer* 2008, 8:61
- 113.** Pinto R, Pilato B, Ottini L et al, Different Methylation and MicroRNA Expression Pattern in Male and Female Familial Breast Cancer, *J Cell Physiol* 2012;228:1264–69
- 114.** Alvarez C, Tapia T, Cornejo V et al, Silencing of Tumor Suppressor Genes RASSF1A, SLIT2, and WIF1 by Promoter Hypermethylation in Hereditary Breast Cancer, *Mol Carcinog* 2013;52(13):475-87
- 115.** Kioulafa M, Kaklamanis L, Mavroudis D et al, Prognostic significance of RASSF1A promoter methylation in operable breast cancer, *Clin Biochem* (2009) 970–975
- 116.** Dreijerink K, Braga E, Kuzmin I et al, The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(13): 7504–09
- 117.** Starlard-Davenport A, Tryndyak VP, James SR et al, Mechanisms of epigenetic silencing of the Rassf1a gene during estrogen-induced breast carcinogenesis in ACI rats, *Carcinogenesis* 2010;31(3): 376 – 381
- 118.** Zhang H, He J, Li J et al, Methylation of RASSF1A gene promoter is regulated by p53 and DAXX, *FASEB* 2013: 232–42
- 119.** Hesson LB, Cooper WN, Latif F, The role of RASSF1A methylation in cancer, *Disease Markers* 2007;23:73–87
- 120.** Dammann R, Schagdarsurengin U, Seidel C et al, The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update, *Histol Histopath* 2005;20: 645-663
- 121.** Jiang Y, Cui L, Chen W et al, The Prognostic Role of RASSF1A Promoter Methylation in Breast Cancer: A Meta-Analysis of Published Data, *Plos One*. 2012;7(5): e36780.
- 122.** Sharma G, Mirza S, Yang Y-H et al, Prognostic relevance of promoter hypermethylation of multiple genes in breast cancer patients, *Cellular Oncology* 2009;31(6):487-500
- 123.** Kim MJ, Kim SY, Park SY et al, Association of fetal-derived hypermethylated RASSF1A concentration in placenta-mediated pregnancy complications, *Placenta* 2013(34) 57–61
- 124.** Papantoniou N, Bagiokos V, Aggianitopoulos K et al, RASSF1A in maternal plasma as a molecular marker of preeclampsia, *Prenatal Diagnosis* 2013;33(7):682-7.
- 125.** Maxam AM, Gilbert W., A new method for sequencing DNA, *Proc Natl Acad Sci USA* 1977(74) 560–64
- 126.** Sanger F, Nicklen S, Coulson AR, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci USA* 1977(74) 5463–67
- 127.** Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B et al, Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release, *Anal Biochem* 1996;242: 84–89
- 128.** Nyren P, Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity, *Anal Biochem* 1987;167(2):235-8.

- 129.** Ronaghi M, Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing, *Genome Res* 2001;11: 3-11
- 130.** Ahmadian A, Ehn M, Hober S, Pyrosequencing: History, biochemistry and future, *Clin Chim Acta* 2006;363(1–2):83–94
- 131.** Harrington GT, Lin EI, Olson MT et al, Fundamentals of Pyrosequencing, *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137:1296–1303.
- 132.** Fakruddin MD, Chowdhury A, Hossain MN et al, Pyrosequencing: principles and applications, *Life Science Molecular Biology* 2012;2(2):65-76
- 133.** Carr IM, Valleley MA, Cordery SF et al, Sequence analysis and editing for bisulphite genomic sequencing projects, *Nucleic Acids Res* 2007;35(10): e79
- 134.** Patterson K, Molloy L, Qu W et al, DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis, *J Vis Exp* 2011; (56): 3170.
- 135.** Bassil CF, Huang Z, Murphy SK, Bisulfite pyrosequencing, *Methods in Molecular Biology* 2013;1049:95-107.
- 136.** Tost J, Gut IG, DNA methylation analysis by pyrosequencing, *Nature Protocols* 2007;2265 - 75
- 137.** Marsh S, Pyrosequencing Applications, *Methods in Molecular Biology*, 2007;373:15-23
- 138.** Langaee T, Ronaghi M, Genetic variation analyses by Pyrosequencing, *Mutation Research* 2005 (573) 96–102
- 139.** Voelkerding KV, et al, Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics, *Clin Chem* 2009;55(4):641-58
- 140.** Yadav NK, Shukla P, Omer A et al, Next Generation Sequencing: Potential and Application in Drug Discovery, *Scientific World Journal* 2014;2014:802437
- 141.** Mullis K, Faloona F, Scharf S et al, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51(1):263-73.
- 142.** Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science* 1985;230(4732):1350-4.
- 143.** Wong ML, Medrano JF, Real-time pcr for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005;39:75-85.
- 144.** Mackay IM, Arden KE, Nitcher A, Real-time pcr in virology. *Nucleic Acids Research* 2002;30:1292-305.
- 145.** Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M et al, The real-time polymerase chain reaction, *Mol Aspects Med* 2006;27(2-3): 95–125
- 146.** Bustin, SA, Benes V, Garson JA et al., The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55(4): 611-22.
- 147.** Livak KJ, Schmittgen TD, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method, *Methods* 2001(25) 402–8
- 148.** Schmittgen TD, Livak K., Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nat Prot* 2008;3:1101-08
- 149.** Freeman WN, Walker SJ, Vrana KE, Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential, *BioTechniques* 1999;26:112-25

- 150.** Sanders R, Mason DJ, Foy CA, Considerations for accurate gene expression measurement by reverse transcription quantitative PCR when analyzing clinical samples, *Anal Bioanal Chem* 2014;406:6471–83
- 151.** Deepak SA, Kottapalli KR, Rakwal R et al, Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes, *Curr Genom* 2007;8:234-51
- 152.** Bustin SA, Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems, *J Mol Endocrinol* 2002;29:23–39
- 153.** Souazé F, Ntoudou-Thomé A, Tran CY et al, Quantitative RT-PCR: limits and accuracy, *Biotechniques* 1996;21(2):280-5.
- 154.** Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AB et al, Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time Methods, *Anal Biochem* 2000;285:194-204
- 155.** Bustin SA, Benes V, Nolan T et al, Quantitative real-time RT-PCR – a perspective, *J Mol Endocrinol* 2005;34:597–601
- 156.** Nolan T, Hands RE, Ogunkolade W et al, SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations., *Anal Biochem* 2006;351(2):308-10
- 157.** Thornton B, Basu C, Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software, *Biochem Mol Biol Educ* 2011;39(2):145–54
- 158.** Markopoulou S, Nikolaidis G, Liloglou T, DNA methylation biomarkers in biological fluids for early detection of respiratory tract cancer, *Clin Chem Lab Med* 2012;50(10):1723–1731
- 159.** Poumpouridou N. et al, Development and validation of molecular methodologies to assess PALB2 expression in sporadic breast cancer, *Clinical Biochemistry* 49 (2016) 253–259
- 160.** Daskalos A, Nikolaidis G, Xinarianos G et al, Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer, *Int. J. Cancer*: 124, 81–87 (2009)