



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

**ΝΕΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ
ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ
ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΟ ΜΑΣΤΟ ΚΑΙ ΣΤΟ ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΧΑΤΖΗΔΑΚΗ ΜΑΡΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc

Αθήνα, 2023



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

**ΝΕΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ
ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ
ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΟ ΜΑΣΤΟ ΚΑΙ ΣΤΟ ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΧΑΤΖΗΔΑΚΗ ΜΑΡΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc

Αθήνα, 2023

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ι. ΛΟΥΚΑΣ	ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΕΚΠΑ	Επιβλέπων- Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής
Ι. ΝΤΟΤΣΙΚΑΣ	ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΕΚΠΑ	Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής
Γ. ΠΑΤΡΙΝΟΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ	Μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής
ΕΙΡ. ΠΑΝΤΕΡΗ	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΕΚΠΑ	
Ε. ΓΚΙΚΑΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΕΚΠΑ	
Ν. ΔΡΑΚΟΥΛΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΕΚΠΑ	
Ε. ΚΑΡΑΛΗΣ	ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΕΚΠΑ	

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Φαρμακευτικής του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών του συγγραφέα» (Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Τμήμα Φαρμακευτικής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, σε συνεργασία με το διαγνωστικό εργαστήριο Neoscreen ΕΠΕ.

Θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Λουκά Ιωάννη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τη βοήθεια που μου προσέφερε και για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την παρούσα Διδακτορική Διατριβή.

Ιδιαίτερα, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ντότσικα Ιωάννη για τη σημαντική και ουσιαστική βοήθειά που μου προσέφερε με τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής.

Θα ήθελα, επιπλέον, να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Πατρινό, μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, για την συμβολή του στην αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

Ακόμα, ευχαριστώ πολύ το εργαστήριο Neoscreen ΕΠΕ ως προς την συλλογή και παροχή των δειγμάτων και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την υπέροχη συνεργασία και ιδιαιτέρως την επιστημονική υπεύθυνο του εργαστηρίου κ. Θώδη Γεωργία για την πολύτιμη επιστημονική της καθοδήγηση και τις εύστοχες παρατηρήσεις, προκειμένου να ολοκληρωθεί η παρούσα Διδακτορική Διατριβή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια η οποία για εμένα ήταν πολύτιμη.

Στους γονείς μου,

ABSTRACT

Breast cancer is the second most common type of cancer in the female population, while ovarian cancer ranks sixth. The disease is inherited in an autosomal dominant manner. BRCA1 & BRCA2 gene mutations account for 5-10% of clinical cases of breast and/or ovarian cancer. With the evaluation made regarding the mutations in the Greek population and the detection of pathogenic mutations in genes other than BRCA1 and BRCA2 we conclude that the mutation gene panel examination is very important. the most useful tool for the detection of as many mutations as possible, but also for the detection of large deletions or duplications, is WGS, where the analysis of CNVs can also be carried out. This additional information may help in the early diagnosis of breast cancer and subsequently in its better prognosis. The aim of the present study , regarding breast cancer, was to evaluate the techniques and their results so as to use the most suitable ones for immediate diagnosis and better prognosis.

In the colon, the change in the methylation pattern is observed in the early stages of cancer and is directly linked to the onset of the disease. Early detection of polyps reduces the risk of metastases through their subsequent removal, while the diagnosis of colon cancer at an early asymptomatic stage ensures a greater chance of successful treatment. Early detection of polyps reduces the risk of metastases through their subsequent removal, while the diagnosis of colon cancer at an early asymptomatic stage ensures a greater chance of successful treatment. Therefore, it was deemed necessary to develop a non-invasive screening method for suspicious cases. The method is based on the evaluation of the epigenetic marker of methylation in epithelial cells that have been excreted with the feces. Specifically, the methylation levels of three genomic regions of DNA extracted from epithelial cells are determined. Feces appear to be the sample of choice for non-invasive colon cancer screening as DNA (ctDNA) is derived directly from tumor tissue and/or precancerous lesions. The method was evaluated and it is very important that it seems to be able to detect even very small lesions (polyps). In conclusion, it is a method that can contribute to the early diagnosis and therefore to the good prognosis of colon cancer.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το δεύτερο σε συχνότητα τύπο καρκίνου στο γυναικείο πληθυσμό, ενώ ο καρκίνος των ωοθηκών καταλαμβάνει την έκτη θέση. Η νόσος κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων *BRCA1* & *BRCA2* ερμηνεύουν το 5-10% των κλινικών περιστατικών καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών. Με την αξιολόγηση που έγινε σχετικά με τις μεταλλάξεις στον Ελληνικό πληθυσμό και την ανίχνευση παθογόνων μεταλλάξεων και σε άλλα γονίδια εκτός από το *BRCA1* και *BRCA2* συμπεραίνουμε ότι είναι πολύ σημαντική η εξέταση πάνελ γονιδίου μεταλλάξεων. Το χρησιμότερο εργαλείο βέβαια και για την ανίχνευση όσο το δυνατό περισσότερων μεταλλάξεων αλλά και για την ανίχνευση μεγάλων απαιριών ή διπλασιασμών είναι το WGS όπου μπορεί να πραγματοποιηθεί και η ανάλυση των CNVs. Οι επιπλέον αυτές πληροφορίες μπορεί να βοηθήσουν στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του μαστού και επομένως στην καλύτερη πρόγνωση αυτού. Ο στόχος της παρούσας μελέτης, σχετικά με τον καρκίνο του μαστού, ήταν η αξιολόγηση των τεχνικών και των αποτελεσμάτων τους και εφαρμογή των καταλληλότερων για άμεση διάγνωση και καλύτερη πρόγνωση.

Στο παχύ έντερο η αλλαγή του προτύπου μεθυλίωσης παρατηρείται στα πρώιμα στάδια του καρκίνου και συνδέεται άμεσα με την έναρξη της νόσου. Η έγκαιρη ανίχνευση των πολυπόδων μειώνει τον κίνδυνο εξαλλαγής μέσω της επακόλουθης αφαίρεσής τους, ενώ η διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου σε πρώιμο ασυμπτωματικό στάδιο διασφαλίζει μεγαλύτερη πιθανότητα επιτυχούς θεραπευτικής αντιμετώπισης. Η έγκαιρη ανίχνευση των πολυπόδων μειώνει τον κίνδυνο εξαλλαγής μέσω της επακόλουθης αφαίρεσής τους, ενώ η διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου σε πρώιμο ασυμπτωματικό στάδιο διασφαλίζει μεγαλύτερη πιθανότητα επιτυχούς θεραπευτικής αντιμετώπισης. Επομένως κρίθηκε αναγκαία η ανάπτυξη μιας μεθόδου μη επεμβατικού τεστ διαλογής ύποπτων περιστατικών (screening). Η μέθοδος βασίζεται στην αξιολόγηση του επιγενετικού δείκτη της μεθυλίωσης σε επιθηλιακά κύτταρα τα οποία έχουν αποβληθεί με τα κόπρανα. Συγκεκριμένα προσδιορίζονται τα επίπεδα μεθυλίωσης τριών γενωμικών περιοχών του DNA που εξάγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα. Τα κόπρανα φαίνεται ότι αποτελούν το δείγμα επιλογής για τον μη επεμβατικό προσυμπτωματικό έλεγχο καρκίνου του παχέος εντέρου καθώς το DNA (ctDNA) προέρχεται απευθείας από τον ιστό του του όγκου ή/και προκαρκινικών αλλοιώσεων. Η μέθοδος αξιολογήθηκε και είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι φαίνεται πως μπορεί να ανιχνεύει ακόμα και τις πολύ μικρές αλλοιώσεις (πολύποδες). Φυσικά χρειάζεται περαιτέρω αξιολόγηση με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

Συμπερασματικά, είναι μία μέθοδος που μπορεί να συνεισφέρει στην πρώιμη διάγνωση και συνεπώς και στην καλή πρόγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1.....	18
ΚΑΡΚΙΝΟΣ – ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗΣ.....	18
1.1. Εισαγωγή.....	18
1.2. Ορισμοί.....	18
1.3. Κυτταρικός κύκλος και καρκίνος.....	19
1.4. Αιτίες καρκινογένεσης.....	21
1.5. Μηχανισμοί απόκρισης στις βλάβες του DNA στην καρκινογένεση.....	22
1.5.1. Εισαγωγή.....	22
1.5.2. Πρωτο-ογκογονίδια – Ογκογονίδια.....	22
1.5.3. Ογκοκατασταλτικά γονίδια.....	23
1.5.4. Γονίδια επιδιόρθωσης DNA.....	24
1.6. Μεταλλάξεις στα κύτταρα.....	25
1.6.1. Εισαγωγή.....	25
1.6.2. Γονιδιακές μεταλλάξεις.....	25
1.6.3.1 Γενετικές μεταλλάξεις.....	26
1.6.3.2. Κατηγορίες γενετικών μεταλλάξεων με βάση το μηχανισμό που τις προκαλεί..	26
1.6.3.3. Τύποι μεταλλάξεων σε επίπεδο πρωτεϊνών.....	27
1.7. Επιγενετική.....	30
1.7.1. Εισαγωγή – Ιστορική αναδρομή.....	30
1.7.2. Επιγενετικοί μηχανισμοί.....	32
1.7.3. Μεθυλίωση του DNA.....	34
1.7.3.1 Μηχανισμός μεθυλίωσης.....	34
1.7.3.2. CpG νησίδες.....	36
1.7.3.3. Μεθυλίωση και καρκίνος.....	38
Κεφάλαιο 2.....	39
ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ.....	39
2.1.1. Εισαγωγή.....	39
2.1.2. Διάγνωση-Πρόγνωση καρκίνου του μαστού.....	39
2.1.3. Θεραπεία καρκίνου του μαστού.....	41
2.1.4 Τεχνικές γονιδιακού ελέγχου μεταλλάξεων που συσχετίζονται με τον καρκίνο του	

μαστού.....	41
2.2. Κληρονομούμενος Καρκίνος του Μαστού (Σύνδρομο Μαστού-Ωοθηκών-Hereditary Breast & Ovarian Cancer syndrome, HBOC).....	42
2.3. Τα γονίδια BRCA1, BRCA2.....	42
2.4. Γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας.....	44
2.5. Σκοπός παρούσας διατριβής σχετικά με τον καρκίνο του μαστού.....	45
Κεφάλαιο 3.....	46
ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	46
3.1. Εισαγωγή.....	46
3.2. Τεχνικές ανίχνευσης αλλοιώσεων στο παχύ έντερο.....	46
Κεφάλαιο 4.....	50
ΥΛΙΚΑ, ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	50
4.1.1. Βιολογικά δείγματα	50
4.2. Εξοπλισμός.....	50
4.2.1 ΠΛΑΤΦΟΡΜΑ MiSeq (ILLUMINA).....	51
4.2.2 Light Cyclor 480 Real Time PCR (Roche).....	52
4.2.3. Γενετικός αναλυτής ABI3130 XL.....	53
4.2.4. Φυγόκεντρος.....	53
4.2.5. Αναλυτικός ζυγός.....	53
4.2.6. Πιπέττες.....	53
4.2.7. Ανακίνηση-Ανάμιξη.....	54
4.2.8. pHμετρο.....	54
4.2.9. Dry bath incubator.....	54
4.2.10. Φωτόμετρο nanodrop1000.....	54
4.2.11. Φωτόμετρο Qubit.....	55
4.2.12. Λογισμικά αναλύσεων.....	55
4.2.13. Διαλύτες-Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα	55
Κεφάλαιο 5.....	56
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....	56

5.1 Απομόνωση DNA από βιολογικά δείγματα με τη μέθοδο NucleoSpin Tissue, Macherey-Nagel.....	56
5.1.1.Εισαγωγή	56
5.1.2. Μέθοδος.....	57
5.1.3. Αξιολόγηση συγκέντρωσης DNA.....	58
5.1.4. Επικύρωση μεθόδου.....	58
5.2. Απομόνωση DNA από δείγματα κοπράνων	59
5.2.1 Εισαγωγή.....	57
5.2.2 Μέθοδος.....	60
5.2.3 Αξιολόγηση μεθόδου.....	61
5.2.4 Επικύρωση μεθόδου.....	61

Κεφάλαιο 6.....62

6.1. Διαγνωστική δοκιμασία ταυτόχρονης ανίχνευσης μεταλλάξεων στα γονίδια BRCA1, BRCA2 σχετιζόμενα με τον καρκίνο του μαστού, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της μαζικής παράλληλης αλληλούχισης νέας γενιάς με το BRCA1,2 Accel-Amplicon™ Panel	62
6.1.1. Εισαγωγή.....	62
6.1.2. ΜΕΘΟΔΟΣ Accel-Amplicon Panel.....	64
6.1.2.1. Διαδικασία PCR	64
6.1.2.2. 1° SRI STEP & INDEXING STEP Accel-Amplicon Panels.....	65
6.1.2.3. 2° SRI STEP Accel-Amplicon Panels.....	67
6.1.3. Ποσοτικοποίηδη βιβλιοθηκών.....	68
6.1.4. Φόρτωμα στο MiSeq χρησιμοποιώντας το Reagent kit στους Illumina.....	70
6.1.5. ΑΝΑΛΥΣΗ – Αξιολόγηση & ερμηνεία αποτελεσμάτων.....	70
6.1.6. Επικύρωση μεθόδου.....	72
6.2. Διαγνωστική δοκιμασία ταυτόχρονης ανίχνευσης μεταλλάξεων σε 94 γονίδια σχετιζόμενα με τον κληρονομικό καρκίνο χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της μαζικής παράλληλης αλληλούχισης νέας γενιάς με τη μέθοδο Trusight Cancer Illumina.....	76
6.2.1. Εισαγωγή.....	76
6.2.2. Μέθοδος.....	78
6.2.3. Βιοπληροφορική ανάλυση.....	85
6.2.4. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ.....	86

6.2.5. Περιορισμοί μεθόδου.....	86
6.3. Εκτεταμένος έλεγχος φορείας μεταλλάξεων σε 160 γονίδια που έχουν συσχετισθεί με προδιάθεση για διαφόρους τύπους καρκίνου με Whole Exome Sequencing (WES).....	88
6.4. Έλεγχος ολόκληρου του γονιδιώματος με Whole Genome Sequencing (WGS).....	93
6.5. Ανίχνευση σημειακών παραλλαγών μέσω αλληλουχίας κατά Sanger για επιβεβαίωση ευρημάτων.....	93
6.6. Πολλαπλή ενίσχυση τμημάτων DNA εξαρτώμενη από τη σύνδεση ιχνηθετών (MLPA).....	94

Κεφάλαιο 7.....94

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟΥ ΤΕΣΤ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΥΠΟΠΤΩΝ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ (SCREENING)

7.1. Εισαγωγή.....	94
7.2. Χημική τροποποίηση DNA με όξινο θειώδες νάτριο (Bisulfite Conversion).....	94
7.2.1. Εισαγωγή.....	95
7.2.2. Μέθοδος.....	95
7.2.2.1. Προετοιμασία αντιδραστηρίων.....	95
7.2.2.2. Πρωτόκολλο EZ DNA methylation direct kit.....	96
7.3. Μέθοδος ανίχνευσης μεθυλίωσης παχέος εντέρου.....	98
7.3.1. Επιλογή γονιδίων για ανίχνευση μεθυλίωσης παχέος εντέρου.....	98
7.3.2 Μέθοδος qPCR για τον προσδιορισμό της μεθυλίωσης των γονιδίων SDC2, ADHFE1 και PPP2R5C που συσχετίζονται με τον καρκίνο του παχέος εντέρου. multiple fluorescent PCR technology to detect the methylation status of the target genes.	99
7.3.3. Αξιολόγηση αποτελεσμάτων.....	99
7.3.4 Αξιολόγηση πιστότητας μεθόδου.....	99

Κεφάλαιο 8.....	101
------------------------	------------

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΑΠΟ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ 2 ΓΟΝΙΔΙΩΝ, ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΟΥ WHOLE GENOME SEQUENCING.

8.1 Εισαγωγή- Αποτελέσματα.....	102
---------------------------------	-----

8.2 Συζήτηση.....	106
-------------------	-----

Κεφάλαιο 9.....	108
------------------------	------------

ΠΡΩΙΜΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....108

9.1. Εισαγωγή.....	108
--------------------	-----

9.2. Αποτελέσματα.....	109
------------------------	-----

9.3. Συζήτηση.....	110
--------------------	-----

Κεφάλαιο 10

ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	116
-----------------------------	-----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	117
--------------------------	------------

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	128
--------------------------	------------

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1 πιθανότητα εκδήλωσης καρκίνου.....	43
Πίνακας 6.1: Συνθήκες αντίδρασης PCR	62
Πίνακας 6.2.: Πρόγραμμα PCR.....	63
Πίνακας 6.3: Συνθήκες αντίδρασης indexing step.....	64
Πίνακας 6.4: Συνθήκες αντίδρασης indexing step.....	65
Πίνακας 6.5: Συνθήκες αντίδρασης NEB QUBIT.....	66
Πίνακας 6.6: Πρόγραμμα NEB QUBIT.....	66
Πίνακας 6.7.: Ποιοτικά κριτήρια αξιολόγησης MiSeq run.....	68
Πίνακας 6.8: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ BRCA RUN.....	69
Πίνακας 6.9.: Αναπαραγωγιμότητα μεθόδου.....	70
Πίνακας 6.11.: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ BRCA RUN.....	71
Πίνακας 6.12.: Αναπαραγωγιμότητα μεθόδου.....	72
Πίνακας 6.13.: Ορθότητα μεθόδου.....	74
Πίνακας 6.14 Λίστα 94 γονιδίων.....	85
Πίνακας 7.2.2: Συνθήκες αντίδρασης Bisulfite conver.....	85
Πίνακας 9.3: Συνθήκες αντίδρασης.....	88
Πίνακας 9.4: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας.....	89
Πίνακας 9.5: Αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας.....	89

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Καρκινικά κύτταρα – Μετάσταση κακοήθους νεοπλάσματος.....	19
Εικόνα 1.3: Σχηματική απεικόνιση κυτταρικού κύκλου	20
Εικόνα 1.6.1: Μεταλλάξεις με λάθος νόημα (missense mutations).....	28
Εικόνα 1.6.2: Μετάλλαξη αντικατάστασης Μη νοηματική (Nonsense).....	29
Εικόνα 1.6.3: Μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου (Frameshift mutations)	30
Εικόνα 1.7.1.: Μηχανισμοί επιγενετικής.....	33
Εικόνα 2.1.: Καρκίνος στο μαστό.....	39
Εικόνα 2.2: Στάδια καρκίνου του μαστού.....	40
Εικόνα 4.1: Πλατφόρμα MiSeq	51
Εικόνα 4.2 : Light Cyclor 480 Real Time PCR.....	52
Εικόνα 4.3. : Γενετικός αναλυτής ABI3130 XL.....	53
Εικόνα 5.1.: Αρχικά υλικά απομόνωσης.....	56
Εικόνα 5.2.: Στάδια απομόνωσης με στηλίτσα.....	57
Εικόνα 6.1 : Accel-Amplicon <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> Panel.....	62
Εικόνα 6.2: Στάδια μεθόδου Accel-Amplicon Panel.....	64
Εικόνα 6.3: Πλήρης κάλυψη των γονιδίων (Complete coverage)	71
Εικόνα 6.4: Υψηλής ομοιομορφίας κάλυψη (High coverage uniformity)	71
Εικόνα 6.5: Ανάλυση μεταλλάξεων του Cor24 στο Next Gene.....	75
Εικόνα 6.6: Ανάλυση μεταλλάξεων του Cor25 στο Next Gene.....	75

Εικόνα 6.7.: Capture Workflow.....	78
Εικόνα 6.8.: VCF annotation.....	88
Εικόνα 6.9: 160 γονίδια που έχουν συσχετισθεί με καρκίνο.....	89-92
Εικόνα 8.1: ΠΑΘΟΓΟΝΕΣ/ ΠΙΘΑΝΟΣ ΠΑΘΟΓΟΝΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ PANEL ΓΟΝΙΔΙΩΝ (94, 160 GENES).....	103
Εικόνα 8.2: Ποσοστά μεταλλάξεων ανά κατηγορία γονιδίων.....	106

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1

ΚΑΡΚΙΝΟΣ – ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗΣ

1.1. Εισαγωγή

Ο όρος «καρκίνος» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 400 π.Χ. από τον Έλληνα ιατρό Ιπποκράτη για να περιγράψει τους κακοήθεις όγκους. Ο Ιπποκράτης ήταν ο πρώτος που παρατήρησε τη νόσο και προσπάθησε να την περιγράψει. Την ονόμασε καρκίνο παρομοιάζοντας μορφολογικά τη νόσο με την εικόνα του κάβουρα. Στη συνέχεια μεταφράστηκε από τον Αυρήλιο Κορνήλιο Κέλσο, λατίνο συγγραφέα και μελετητή της αρχαίας Ελληνικής Ιατρικής, στο λατινικό όρο «cancer», ο οποίος χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα. [1]

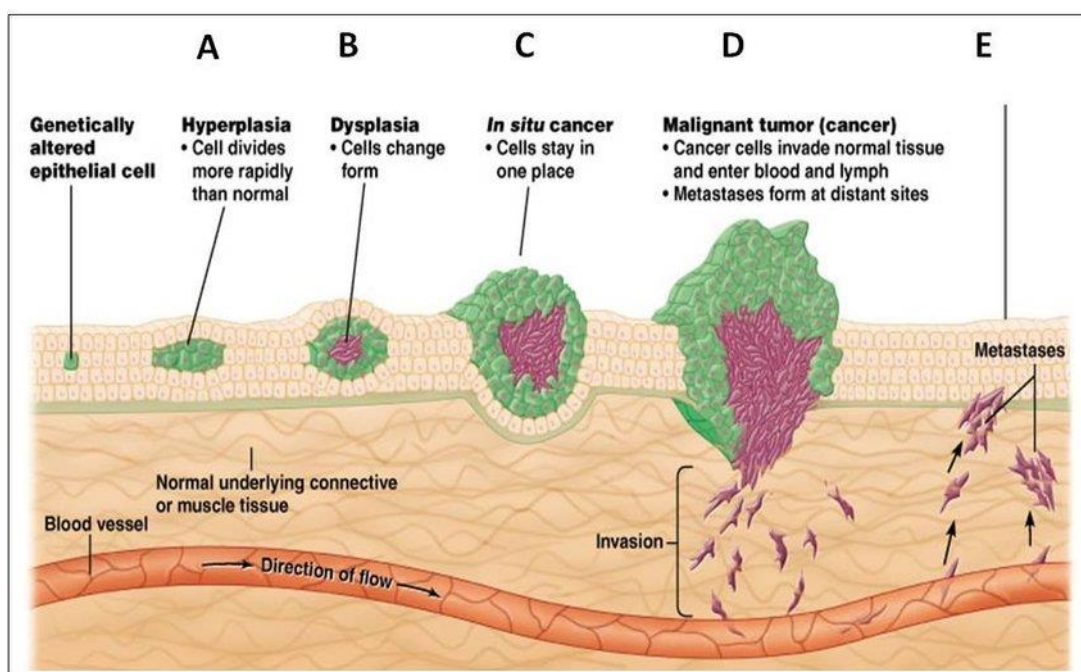
Η νόσος του καρκίνου είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες. Οι στατιστικές δείχνουν ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Συνήθως προσβάλλει ανθρώπους μεγάλης ηλικίας, υπάρχουν όμως και μορφές καρκίνου που εμφανίζονται σε νεαρής ηλικίας άτομα, ακόμη και σε παιδιά. Παρόλο που είναι η δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου στον κόσμο, τα ποσοστά επιβίωσης βελτιώνονται για πολλούς τύπους καρκίνου, χάρη στη βελτίωση της ανίχνευσής του και της θεραπείας του.

1.2. Ορισμοί

Ο όρος «καρκίνος» είναι ένας γενικός όρος για μια μεγάλη ομάδα ασθενειών των κυττάρων που έχουν σχέση με την αφύσικη κυτταρική ανάπτυξη και μπορεί να επηρεάσουν οποιοδήποτε μέρος του σώματος. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα στο σώμα μας, τα οποία αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με έναν αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο, τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν διότι συνεχίζουν να διαιρούνται ανεξέλεγκτα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας μάζας κυττάρων πέρα από τα συνηθισμένα όριά τους που ονομάζεται νεοπλασία. Επομένως, με τον όρο νεοπλασία αναφερόμαστε στην παθολογική αύξηση ενός ιστού. Το νεόπλασμα αποτελεί ανώμαλη μάζα ιστού ως αποτέλεσμα παθολογικού κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ο οποίος επάγεται από αλληλουχία μεταλλάξεων που επιδρούν σε ένα κύτταρο και τους απογόνους του. Τα νεοπλάσματα διακρίνονται σε καλοήγη και κακοήγη. Τα καλοήγη συνήθως έχουν βραδύ ρυθμό αύξησης δεν εξαπλώνονται σε άλλα όργανα του σώματος και δεν προκαλούν κάποια πάθηση, αν και πολλές φορές μπορεί να δημιουργούν πρόβλημα στον ασθενή λόγω του μεγέθους ή του

σημείου στο οποίο βρίσκονται. Τα κακοήγη νεοπλάσματα αποτελούνται από κύτταρα ατελώς διαφοροποιημένα, που παρουσιάζουν απροσδόκητες λειτουργίες και ταχύ ρυθμό αύξησης και πολλαπλασιασμού. Το χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητα διήθησης και καταστροφής των παρακείμενων ανατομικών δομών και η εγκατάστασή τους σε απομακρυσμένες εστίες (μετάσταση), προκαλώντας δυνητικά το θάνατο.

Για να χαρακτηριστεί ένα νεόπλασμα ως καρκίνος θα πρέπει να είναι κακοήθες, δηλαδή να έχει ανεξέλεγκτη αύξηση και την ιδιότητα να διεισδύει και να καταστρέφει τον φυσιολογικό ιστό του σώματος και να μπορεί να διηθεί τα γειτονικά όργανα και να μεταθίσταται μέσω των λεμφαγγείων σε πιο απομακρυσμένες περιοχές (μεταστάσεις) (Εικόνα 1.1). Οι ευρέως διαδεδομένες μεταστάσεις είναι η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο.



Εικόνα 1.1: Καρκινικά κύτταρα – Μετάσταση κακοήθους νεοπλάσματος

Τέλος, με τον όρο όγκο υποδηλώνεται οποιαδήποτε διόγκωση, πρακτικά όμως είναι συνώνυμος με το νεόπλασμα. [2-5]

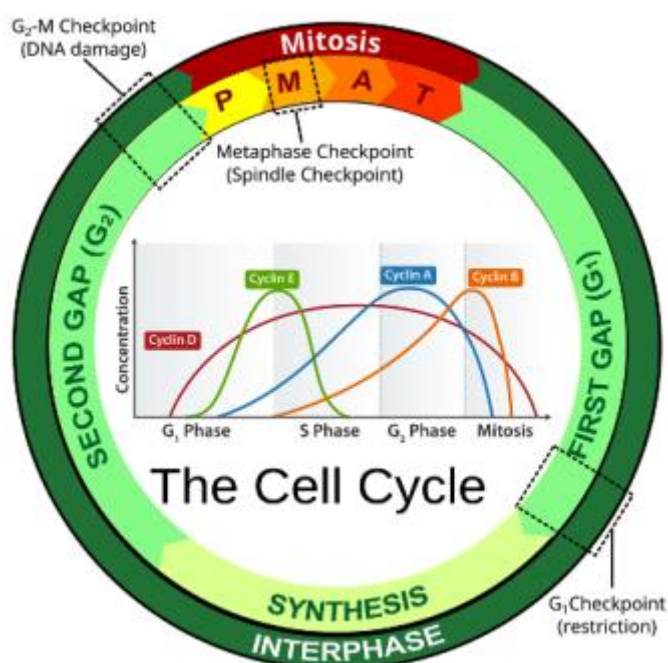
1.3. Κυτταρικός κύκλος και καρκίνος

Κυτταρικός κύκλος ονομάζεται η χρονική περίοδος που διαρκεί από το τέλος μιας κυτταρικής διαίρεσης μέχρι το τέλος της επόμενης. Ο φυσιολογικός κυτταρικός κύκλος είναι μία

απόλυτα ελεγχόμενη και αυστηρή διαδοχή γεγονότων που ακολουθεί ένα κύτταρο προκειμένου να πολλαπλασιασθεί. Ο κυτταρικός κύκλος περιλαμβάνει τη μεσόφαση και τη μίτωση.

Η μεσόφαση περιλαμβάνει τη φάση G₁, τη φάση S κατά την οποία συντίθεται το DNA και τη φάση G₂ η οποία αρχίζει μετά το τέλος της S φάσης και διαρκεί μέχρι να τελειώσει η κυτταρική διαίρεση. Κατά τη διαδικασία της μίτωσης διαιρείται ο πυρήνας και στη συνέχεια το κυτταρόπλασμα. Στο τέλος της φάσης της μίτωσης προκύπτουν δύο πανομοιότυπα κύτταρα τα οποία εισέρχονται στη φάση G₁ κλείνοντας τον κύκλο. Όταν το κύτταρο μετά τη μίτωση δεν οδηγηθεί στη σύνθεση του DNA, αλλά στην ηρεμία τότε λέγεται ότι βρίσκεται στη φάση G₀. Τα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να μεταπέσουν από τη φάση G₀ στη G₁ οποιαδήποτε χρονική στιγμή, αν δεχτούν τα κατάλληλα ερεθίσματα.

Η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από ειδικές πρωτεΐνες τις κυκλίνες οι οποίες ενεργοποιούνται όταν δημιουργήσουν σύμπλοκο με τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες. Το σύμπλοκο αυτό δρα στη μετάβαση από τη G₁ στην S, από τη G₂ στη M και από τη μετάφραση στην ανάφαση. Αυτά τα τρία σημεία είναι πολύ σημαντικά γιατί σε αυτά το κύτταρο ελέγχει αν το κυτταρικό περιβάλλον είναι ευνοϊκό, αν η αντιγραφή του DNA έχει γίνει πιστά και αν το κύτταρο έχει την κατάλληλη μάζα ώστε να προχωρήσει στην επόμενη φάση. (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: Σχηματική απεικόνιση κυτταρικού κύκλου

Τα φυσιολογικά κύτταρα επιτελούν ένα συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων και 'στη συνέχεια αποπίπτουν. Όταν όμως υπάρχει διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρικά καταστροφή προκύπτουν τα καρκινικά κύτταρα. Στην καρκινογένεση έχει παρατηρηθεί ότι παίζει ρόλο η διαταραχή των ρυθμιστικών μηχανισμών όπως η μεγάλη παραγωγή των αυξητικών παραγόντων και η έλλειψη κατασταλτικών παραγόντων. Επιπλέον, η κινητική των καρκινικών κυττάρων έχει σχέση με τη φυσική πορεία του όγκου, γιαυτό και είναι πολύ σημαντική για τη θεραπεία. Σημαντικό ρόλο έχει και ο ρυθμός ανάπτυξης του όγκου, ο οποίος συσχετίζεται με τη βιολογική επιθετικότητα και την ικανότητα μετάστασης αυτού. Τέλος έχει παρατηρηθεί ότι το κύτταρο ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται έχει διαφορά στην ευαισθησία που παρουσιάζει στην ακτινοβολεία και στη χημειοθεραπεία.

Τα βασικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων είναι ότι αντιστέκονται στην απόπτωση, πολλαπλασιάζονται παρουσία ή μη αυξητικών παραγόντων, δεν λαμβάνουν υπόψη τα σήματα που σταματούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ανθίστανται στο μηχανισμό γήρανσης, κάνουν μεταστάσεις, δημιουργούν αγγεία για την αιμάτωσή του. [6]

1.4. Αιτίες καρκινογένεσης

Το DNA αποτελεί στόχο ενδογενών και εξωγενών παραγόντων. Καθημερινά συμβαίνουν $10^4 - 10^6$ βλάβες στο DNA κάθε κυττάρου λόγω ενδογενών διεργασιών. Οι ενδογενείς βλάβες στο DNA προκαλούνται κατά τη διάρκεια των κυτταρικών διαδικασιών και συγκεκριμένα της αντιγραφής και του μεταβολισμού. Μπορεί να οφείλονται σε λάθη κατά την αντιγραφή του DNA, αυθόρμητη απαμίνωση βάσεων, αβασικές θέσεις, οξείδωση DNA και μεθυλίωση του DNA.

Η επίδραση εξωγενών παραγόντων αυξάνει ακόμα περισσότερο τον αριθμό των βλαβών. Το 85% των καρκίνων προκαλούνται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, ενώ οι υπόλοιποι από κληρονομική προδιάθεση [7] .

Οι εξωτερικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να είναι διάφοροι λοιμώδεις παράγοντες, το κάπνισμα (στοματική κοιλότητα, φάρυγγας, λάρυγγας, οισοφάγος, πάγκρεας, ουροδόχος κύστη και 90% καρκίνων πνεύμονα), το αλκοόλ (στοματοφάρυγγας πλην χείλους, λάρυγγας, οισοφάγος, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα), η διατροφή (παχέος εντέρου, προστάτη, μαστού), η παχυσαρκία, η ηλικία, το αναπαραγωγικό ιστορικό, η

ακτινοβολία και οι καρκινογόνες ουσίες. Το αποτέλεσμα επίδρασης των εξωτερικών παραγόντων μπορεί να είναι η παραγωγή προϊόντων UV ακτινοβολίας-διμερή πυριμιδίνης, ενδοκλωνικών διασυνδέσεων (Intrastand crosslinks), διακλωνικών διασυνδέσεων (Interstand crosslinks), μονόκλωνων σχάσεων DNA (single strand breaks, SSBs), αμφίκλωνων/ δίκλωνων σχάσεων DNA (double strand breaks, DSBs), η αλκυλίωση DNA, η ομοιοπολική σύνδεση ογκωδών μορίων. [8-14]

Φυσικά, σε κάποιες περιπτώσεις ο καρκίνος μπορεί να οφείλεται σε συνδυασμό ενδογενών και εξωτερικών παραγόντων.

1.5. Μηχανισμοί απόκρισης στις βλάβες του DNA στην καρκινογένεση

1.5.1 Εισαγωγή

Η καρκινογένεση είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία σε φαινοτυπικό και γονιδιακό επίπεδο. Το εναρκτήριο γεγονός της καρκινογένεσης προκαλείται από μία μη θανατηφόρα γενετική βλάβη. Συγκεκριμένα, τρεις αρχικές κατηγορίες φυσιολογικών γονιδίων αποτελούν τον πρωταρχικό στόχο της γενετικής βλάβης: τα πρωτοογκογονίδια, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα γονίδια που ρυθμίζουν την απόπτωση. Επιπρόσθετα, υπάρχει και η κατηγορία γονιδίων που αφορά τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA. Ο καρκίνος είναι το αποτέλεσμα ενεργοποίησης πρωτοογκογονιδίων σε ογκογονίδια και η απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών και επιδιορθωτικών γονιδίων. [15]

1.5.2 Πρωτο-ογκογονίδια - Ογκογονίδια

Τα πρωτο-ογκογονίδια είναι γονίδια που κανονικά βοηθούν τα κύτταρα να αναπτυχθούν και να διαιρούνται για να δημιουργήσουν νέα κύτταρα ή για να βοηθήσουν τα κύτταρα να παραμείνουν ζωντανά. Όταν ένα πρωτο-ογκογονίδιο μεταλλάσσεται ή υπάρχουν πάρα πολλά αντίγραφα του, μπορεί να ενεργοποιηθεί σε στιγμή που δε θα έπρεπε και ονομάζεται πλέον ογκογονίδιο. [16-18] Όταν συμβεί αυτό, το κύτταρο μπορεί να αρχίσει να αναπτύσσεται ανεξέλεγκτα, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο. Τα ογκογονίδια μπορούν να ενεργοποιηθούν στα κύτταρα με διαφορετικούς τρόπους:

Α) Γονιδιακές παραλλαγές/μεταλλάξεις: Μερικοί άνθρωποι έχουν διαφορές στον «κώδικα» των γονιδίων τους που μπορεί να προκαλέσουν την συνεχή ενεργοποίηση ενός ογκογονιδίου. Αυτοί οι τύποι γονιδιακών αλλαγών μπορούν να κληρονομηθούν από έναν

γονέα ή μπορεί να συμβούν κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου, όταν γίνει ένα λάθος κατά την αντιγραφή του γονιδίου κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης.

Β) Επιγενετικές αλλαγές: Τα κύτταρα συνήθως έχουν τρόπους ενεργοποίησης ή απενεργοποίησης γονιδίων που δεν συνεπάγονται αλλαγές στα ίδια τα γονίδια. Αντίθετα, διαφορετικές χημικές ομάδες μπορούν να συνδεθούν σε γενετικό υλικό (DNA ή RNA) που επηρεάζουν το αν ένα γονίδιο είναι ενεργοποιημένο. Αυτοί οι τύποι επιγενετικών αλλαγών μπορεί μερικές φορές να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση ενός ογκογονιδίου. Για περισσότερα σχετικά με τις επιγενετικές αλλαγές, ανατρέξτε στην ενότητα Γονιδιακές αλλαγές και καρκίνος.

Γ) Χρωμοσωμικές αναδιατάξεις: Τα χρωμοσώματα είναι μακριές έλικες DNA σε κάθε κύτταρο που περιέχουν τα γονίδιά του. Μερικές φορές όταν ένα κύτταρο διαιρείται, η αλληλουχία του DNA σε ένα χρωμόσωμα μπορεί να αλλάξει. Αυτό μπορεί να βάλει ένα γονίδιο που λειτουργεί ως ένας τύπος διακόπτη «on» δίπλα σε ένα πρωτο-ογκογονίδιο, διατηρώντας αυτό το γονίδιο ενεργοποιημένο ακόμα και όταν δεν θα έπρεπε. Αυτό το νέο ογκογονίδιο μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα το κύτταρο να αναπτυχθεί εκτός ελέγχου.

Δ) Γονιδιακός διπλασιασμός: Ορισμένα κύτταρα έχουν επιπλέον αντίγραφα ενός γονιδίου, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε υπερβολική παραγωγή μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Ένας μικρός αριθμός οικογενειακών καρκινικών συνδρόμων συνδέεται με μια κληρονομική αλλαγή σε ένα ογκογονίδιο. Αυτοί οι τύποι αλλαγών μπορεί μερικές φορές να είναι το πρώτο βήμα στο να γίνει ένα κύτταρο καρκινικό κύτταρο. Αλλά οι περισσότερες αλλαγές που αφορούν ογκογονίδια αποκτώνται κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου, αντί να κληρονομούνται.

1.5.3 Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι φυσιολογικά γονίδια που επιβραδύνουν την κυτταρική διαίρεση ή λένε στα κύτταρα να πεθάνουν την κατάλληλη στιγμή (μια διαδικασία γνωστή ως απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος). Όταν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια δεν λειτουργούν σωστά, τα κύτταρα μπορεί να αναπτυχθούν ανεξέλεγκτα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο. Όταν κάτι λειτουργήσει λάθος με ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, όπως μια παθολόγο παραλλαγή (μετάλλαξη) που το εμποδίζει να λειτουργεί, η κυτταρική διαίρεση μπορεί να βγει εκτός ελέγχου.

Κληρονομικές αλλαγές στα ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν βρεθεί σε ορισμένα οικογενειακά καρκινικά σύνδρομα. Προκαλούν την εμφάνιση ορισμένων τύπων καρκίνου σε οικογένειες. Όμως, οι περισσότερες μεταλλάξεις ογκοκατασταλτικών γονιδίων αποκτώνται κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου και δεν κληρονομούνται.

Για παράδειγμα, το TP53 είναι ένα σημαντικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53, η οποία βοηθά στη διατήρηση της κυτταρικής διαίρεσης υπό έλεγχο. Οι κληρονομικές αλλαγές στο γονίδιο TP53 μπορεί να οδηγήσουν σε σύνδρομο Li-Fraumeni. Τα μέλη της οικογένειας με αυτό το σύνδρομο έχουν αυξημένο κίνδυνο για διάφορους τύπους καρκίνου, επειδή όλα τα κύτταρά τους έχουν αυτήν την αλλαγή γονιδίου TP53.

Οι αλλαγές στο γονίδιο TP53 είναι επίσης πολύ συχνές στα καρκινικά κύτταρα σε άτομα χωρίς κληρονομικό καρκινικό σύνδρομο. Αυτές οι αλλαγές TP53 αποκτώνται κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου. Αυτές οι αλλαγές μπορούν να βοηθήσουν τα καρκινικά κύτταρα να αναπτυχθούν, αλλά βρίσκονται μόνο στα καρκινικά κύτταρα, όχι σε άλλα κύτταρα του σώματος, επομένως δεν μπορούν να μεταδοθούν στα παιδιά ενός ατόμου.

1.5.4 Γονίδια επιδιόρθωσης DNA

Όταν ένα κύτταρο διαιρείται για να δημιουργήσει νέα κύτταρα, χρειάζεται να δημιουργήσει ένα νέο αντίγραφο όλου του DNA του. Αυτή είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και μερικές φορές οδηγεί σε λάθη στο DNA. Τα γονίδια που είναι γνωστά ως γονίδια επισκευής DNA λειτουργούν όπως ένα άτομο που επισκευάζει ένα αυτοκίνητο. Βοηθούν στη διόρθωση λαθών στο DNA ή αν δεν μπορούν να τα διορθώσουν, ενεργοποιούν το κύτταρο να πεθάνει, έτσι ώστε τα λάθη να μην μπορούν να προκαλέσουν περαιτέρω προβλήματα.

Όταν κάτι δε λειτουργήσει σωστά με ένα από αυτά τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, μπορεί να επιτρέψει τη συσσώρευση περισσότερων λαθών μέσα στο κύτταρο. Μερικά από αυτά μπορεί να επηρεάσουν άλλα γονίδια, τα οποία θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανεξέλεγκτη ανάπτυξη του κυττάρου.

Όπως και με άλλους τύπους γονιδιακών αλλαγών, οι αλλαγές στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA μπορούν είτε να κληρονομηθούν από έναν γονέα είτε να αποκτηθούν κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου.

Παραδείγματα γονιδίων επιδιόρθωσης DNA περιλαμβάνουν τα γονίδια BRCA1 και BRCA2. Τα άτομα που κληρονομούν μια παθογόνο παραλλαγή (μετάλλαξη) σε ένα από αυτά τα γονίδια έχουν υψηλότερο κίνδυνο ορισμένων τύπων καρκίνου, ιδιαίτερα του

καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών στις γυναίκες. (οικογενειακά καρκινικά σύνδρομα.) Αλλά αλλαγές σε αυτά τα γονίδια παρατηρούνται επίσης μερικές φορές σε κύτταρα όγκου σε άτομα που δεν κληρονόμησαν μία από αυτές τις μεταλλάξεις. [19,20,21]

1.6. Μεταλλάξεις στα κύτταρα

1.6.1. Εισαγωγή

Σήμερα, οι περισσότεροι επιστήμονες θεωρούν τον όρο «μετάλλαξη» ως περιγραφή μιας αλλαγής σε ένα μεμονωμένο γονίδιο, και πιο συγκεκριμένα ως κάποια μικρή αλλαγή του DNA αυτού του γονιδίου, συγκεκριμένα ως μία υποκατάσταση νουκλεοτιδίου. Η ιδέα της μετάλλαξης έχει αλλάξει σημαντικά από τις προμεντελιανές έννοιες της γενιάς του Δαρβίνου, οι οποίοι θεωρούσαν τις «κυμαινόμενες παραλλαγές» ως την πρώτη ύλη πάνω στην οποία έδρασε η εξέλιξη, στο σημερινό γονιδιωματικό πλαίσιο μεταλλάξεων. Από τη γενιά του Δαρβίνου στη Γονιδιωματική διερευνά έξι γενιές μεταλλάξεων, παρέχοντας το υπόβαθρο —τους ανθρώπους και τις ιδέες— για αυτό το βιολογικό ταξίδι. Μετά από τη διατύπωση του Δαρβίνου και του Φράνσις Γκάλτον σχετικά με την έννοια της μετάλλαξης, τα πειράματα του Γκρέγκορ Μέντελ οδήγησαν στο συμπέρασμα ενός ασυνεχούς μοντέλου εξέλιξης λόγω μεταλλάξεων. Επιπλέον, οι κυτταρολογικές έρευνες οδήγησαν στη χρωμοσωμική θεωρία της κληρονομικότητας της κλασικής Γενετικής με βάση την οποία υπάρχουν τυχαίες μεταλλάξεις στα γονίδια.

Η ερμηνεία του γονιδίου ως DNA και η αποκρυπτογράφηση του γενετικού κώδικα οδήγησαν στη συνέχεια σε μοριακές ερμηνείες της μετάλλαξης, οι οποίες επηρέασαν την εξελικτική βιολογία, τη γενετική πληθυσμού, την εμπορική ανάπτυξη φυτών και ζώων και την ανθρώπινη γενετική. Οι ορισμοί των γενεών αλλά και οι εκτιμήσεις των μεταλλάξεων έχουν ανταποκριθεί στις τεχνολογίες που προστέθηκαν στην επιστήμη και στα πειράματα που αφθονούσαν με τις έρευνες κάθε διαδοχικής γενιάς. [22]

1.6.2. Γονιδιακές μεταλλάξεις

Οι γονιδιακές μεταλλάξεις συμβαίνουν σε διάφορα επίπεδα και χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες.

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι γενετικές μεταλλάξεις οι οποίες είναι οι αλλαγές που συμβαίνουν σε επίπεδο μορίων, ειδικότερα στο DNA. Γι' αυτό, επηρεάζουν μία ή

περισσότερες αζωτούχες βάσεις. Αυτές είναι οι μονάδες που απαρτίζουν τα στελέχη του DNA.

Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι γονιδιωματικές, αριθμητικές, ή καρυοτυπικές μεταλλάξεις, οι οποίες συμβαίνουν σε γονιδιωματικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, συμβαίνουν όταν υπάρχει ένα επιπλέον χρωμόσωμα ή όταν λείπει κάποιο. Κάθε άνθρωπος έχει 46 ζεύγη χρωμοσωμάτων. Έτσι, άνθρωποι με διαφορετικό αριθμό έχουν μια μετάλλαξη τέτοιου τύπου.

Η τρίτη κατηγορία μεταλλάξεων αποτελείται από τις δομικές μεταλλάξεις ή μεταλλάξεις σε χρωμοσώματα οι οποίες συμβαίνουν σε επίπεδο χρωμοσωμάτων. [23]

1.6.3.1 Γενετικές μεταλλάξεις

Οι γενετικές μεταλλάξεις αναφέρονται στις αλλαγές στον αριθμό ή στην αλληλουχία των βάσεων του DNA. Υπάρχει αλλαγή βάσεων και στις δύο αλυσίδες του DNA και δε μπορούν να αναγνωριστούν γιατί δεν υπάρχει σημείο σύγκρισης στη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA και συνεπώς δε μπορούν να επιδιορθωθούν.

Οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να εμφανιστούν για διάφορους λόγους. Ένα μικρό ποσοστό αποτελούν οι γενετικές μεταλλάξεις κληρονομούμενες από τους γονείς, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό μεταλλάξεων αποτελούνται από μεταλλάξεις γονιδίων που εμφανίζονται μετά τη γέννησή είτε λόγω των εξωτερικών παραγόντων είτε κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, όπου περιστασιακά, ένα λάθος μπορεί να μην εντοπιστεί και να μεταλλάξει ένα κύτταρο σε καρκινικό. Οι κληρονομούμενες γενετικές μεταλλάξεις και εκείνες που αποκτούνται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου, δρουν κάποιες φορές συνδυαστικά ώστε να προκληθεί ο καρκίνος.

Για παράδειγμα, αν κάποιος έχει κληρονομήσει μια γενετική μετάλλαξη που προδιαθέτει την ανάπτυξη καρκίνου, αυτό δεν σημαίνει ότι είναι σίγουρο ότι θα νοσήσει. Μπορεί να χρειαστεί μία ή περισσότερες άλλες γονιδιακές μεταλλάξεις οι οποίες θα προκαλέσουν καρκίνο. Δεν είναι σαφές πόσες μεταλλάξεις πρέπει να συσσωρεύονται για να σχηματιστεί ο καρκίνος. [24-25-26]

1.6.3.2. Κατηγορίες γενετικών μεταλλάξεων με βάση το μηχανισμό που τις προκαλεί

Οι γενετικές μεταλλάξεις επηρεάζουν τη χημική σύνθεση του γονιδίου, δηλαδή υπάρχει μια αλλοίωση στη νουκλεοτιδική ακολουθία του DNA που φτιάχνει αυτό το γονίδιο. Με τη

σειρά τους, αυτές οι μεταλλάξεις διαφέρουν ανάλογα με τον μηχανισμό που τις προκάλεσε. Οι γενετικές μεταλλάξεις χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με την αλλοίωση που προκαλούν στις αλυσίδες του DNA. απαρτίζουν το DNA των ζωντανών όντων:

A) Μετάλλαξη αντικατάστασης (point mutation) όπου υπάρχει ανταλλαγή μιας αζωτούχας βάσης για μια άλλη. Συμβαίνει κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αναπαραγωγής όπου οι μηχανισμοί αποτυγχάνουν και τοποθετούν λάθος βάση στο στέλεχος του DNA. Οι αντικαταστάσεις συνήθως δεν είναι επιβλαβείς εκτός αν σχηματιστεί κωδικόνιο ή επηρεαστεί ένα αμινοξύ από ένα ενεργό κέντρο μιας πρωτεΐνης. Ένα παράδειγμα μιας ασθένειας που προκαλεί αυτός ο τύπος μετάλλαξης είναι η δρεπανοκυτταρική αναιμία.

B) Μετάλλαξη Εισαγωγής (insertion) η οποία προκαλείται όταν προστίθεται μια επιπλέον βάση με αποτέλεσμα να αλλάζει εντελώς η αλυσίδα του αμινοξέος.

Γ) Μετάλλαξη διαγραφής (deletion) Σε αντίθεση με τα παραπάνω, σε αυτόν τον τύπο μετάλλαξης, μένει εκτός μία βάση. Η διαγραφή, όπως και η εισαγωγή είναι πιο σοβαρές από την αντικατάσταση καθώς αλλάζουν εντελώς την αλυσίδα αμινοξέος. Κατά συνέπεια, το μήνυμα που θα πρέπει να μεταδώσει το DNA κωδικοποιείται λανθασμένα.

Δ) Μετάλλαξη μετατόπισης, η οποία αναφέρεται στην αλλαγή της θέσης ενός τμήματος του DNA. Με άλλα λόγια, ένα κομμάτι του μορίου σπάει και δένεται με κάποιο άλλο. Αυτή η μετατόπιση προκαλεί την εμφάνιση νέας τριπλέτας αζωτούχας βάσης. Αυτό αλλάζει το μήνυμα που πρέπει να κωδικοποιηθεί, όπως η διαγραφή ή η εισαγωγή. [27-28-29]

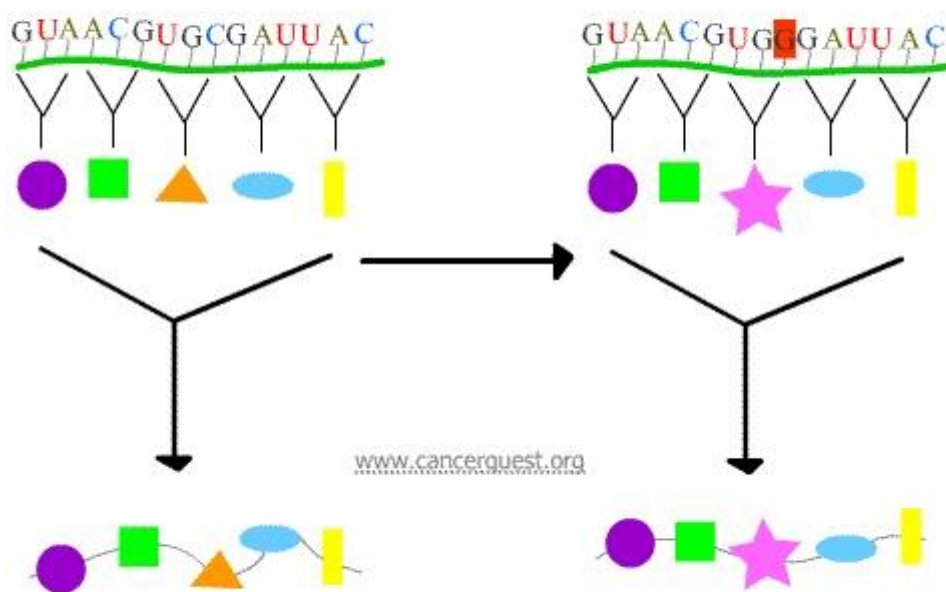
1.6.3.3. Τύποι μεταλλάξεων σε επίπεδο πρωτεϊνών

Ανάλογα με την επίδραση στην πρωτεΐνη οι σημειακές μεταλλάξεις μπορεί να είναι:

A) Σιωπηλές μεταλλάξεις – συνώνυμες μεταλλάξεις (silent mutations - synonymous mutations). Εκφυλισμένος γενετικός κώδικας. Ιδίως η τρίτη βάση δεν είναι τόσο σημαντική. Δεν επηρεάζεται η πρωτεΐνη – δεν υπάρχει φαινότυπος.

B) Μεταλλάξεις με λάθος νόημα (missense mutations). (Εικόνα 1.6.1) Ένα αμινοξύ αντικαθίσταται από άλλο. Ανάλογα με τη μετάλλαξη, το αμινοξύ και τη θέση στη δομή της πρωτεΐνης, μπορεί να έχουν ασήμαντες μέχρι σοβαρές συνέπειες – παράδειγμα: αιμοσφαιρίνη S, δρεπανοκυτταρική αιμοσφαιρίνη, στο γονίδιο της β σφαιρίνης ένα κωδικόνιο GAG (glutamic acid) μετατρέπεται σε GUG (valine). Το γλουταμικό είναι

υδρόφιλο αμινοξύ με φορτίο -1 ενώ ή βαλίνη είναι υδρόφοβο αμινοξύ → δρεπανοκύτταρα σε συνθήκες χαμηλού οξυγόνου Τύποι μεταλλάξεων σε επίπεδο πρωτεϊνών (συνέχεια)

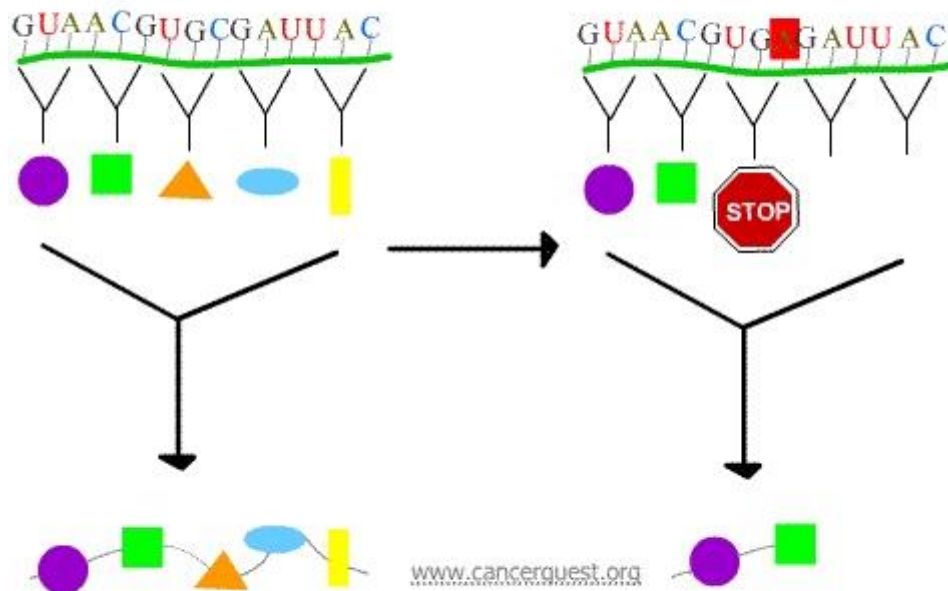


Εικόνα 1.6.1: Μεταλλάξεις με λάθος νόημα (missense mutations).

Γ) Μεταλλάξεις χωρίς νόημα (Nonsense mutations). (Εικόνα 1.6.2) Ένα αμινοξύ μετατρέπεται σε κωδικόνιο λήξης με αποτέλεσμα ο πρόωρος τερματισμός της πρωτεΐνης. Ο φαινότυπος εξαρτάται από την πρωτεΐνη και τη θέση της μετάλλαξης – παράδειγμα: σφαιρίνη β McKees Rock. Φυσιολογική αιμοσφαιρίνη → 146 αμινοξέα. Με τη μετάλλαξη αυτή το κωδικόνιο 145 UAU (tyrosine) μεταλλάσσεται σε UAA (stop). Η τελική πρωτεΐνη είναι 143 αμινοξέα. Κλινικά → υπερπαραγωγή ερυθροκυττάρων – πηχτό αίμα.

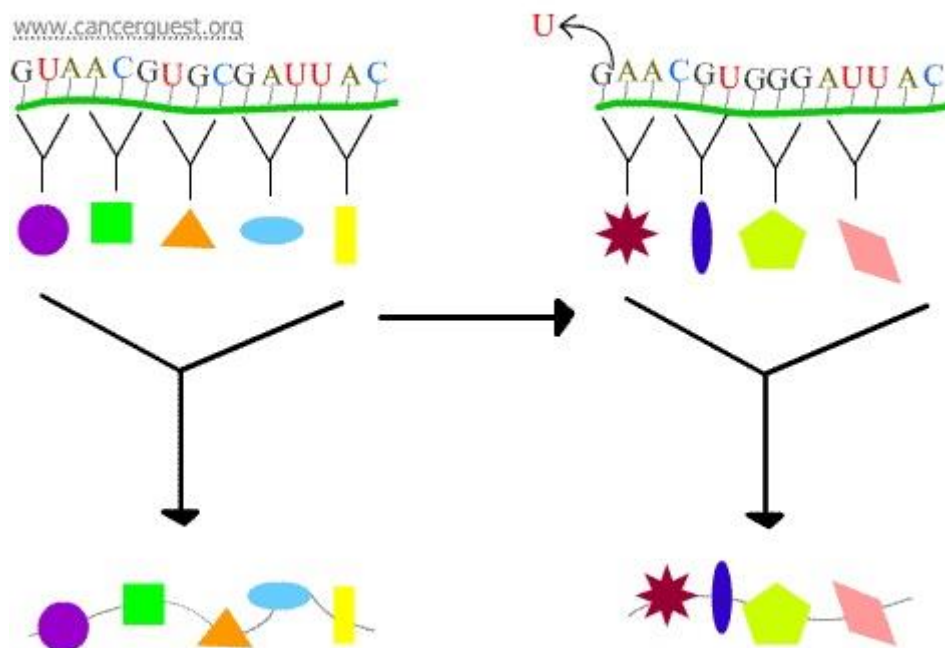
Δ) Μεταλλάξεις sense (το αντίθετο του nonsense). Ένα κωδικόνιο λήξης μετατρέπεται σε κωδικόνιο για αμινοξύ. Συνήθως η μετάφραση στα ματάει λίγο αργότερα (το DNA σε μη κωδικοποιούσες περιοχές περιλαμβάνει κατά μέσο όρο 3 stop codons) – παράδειγμα: αιμοσφαιρίνη α Constant Spring. Η αιμοσφαιρίνη α είναι 141 αμινοξέα. Με αυτή τη

μετάλλαξη το κωδικόνιο λήξης UAA μετατρέπεται σε CAA (glutamine). Η τελική πρωτεΐνη είναι 31 αμινοξέα μεγαλύτερη → θαλασσαιμία.



Εικόνα 1.6.2: Μετάλλαξη αντικατάστασης Μη νοηματική (Nonsense)

Ε) Μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου (Frameshift mutations) (Εικόνα 1.6.3). Προσθήκη ή έλλειψη μερικών ή πολλών ζευγών βάσεων. Η μετάφραση γίνεται ανά ομάδες τριών νουκλεοτιδίων. Αν προστεθούν ή αφαιρεθούν ένα ή δύο νουκλεοτίδια, αλλάζουν αυτές οι ομάδες (μετατοπίζεται το πλαίσιο ανάγνωσης). Όλα τα αμινοξέα μετά τη μετάλλαξη είναι διαφορετικά από το αναμενόμενο. Συχνά εμφανίζεται σύντομα ένα κωδικόνιο λήξης. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι συνήθως μη λειτουργικές.



Εικόνα 1.6.3: Μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου (Frameshift mutations)

ΣΤ) Μεταλλάξεις σε περιοχές που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνη. Μεταλλάξεις στον επαγωγέα μπορούν να καταλήξουν σε μη μεταγραφή ή μειωμένη μεταγραφή της πρωτεΐνης. Μεταλλάξεις στα όρια εξονίων – ιντρονίων μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την κατακράτηση ενός ιντρονίου ή την απώλεια ενός εξονίου. Μεταλλάξεις σε κρυφά εξόνια που υπάρχουν μέσα σε ιντρόνια, μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα την προσθήκη καινούριων εξονίων στην πρωτεΐνη [30-31]

1.7. Επιγενετική

1.7.1. Εισαγωγή – Ιστορική αναδρομή

Με τον όρο επιγενετική χαρακτηρίζεται η μελέτη του συνόλου των διεργασιών που μεταβάλλουν τη γονιδιακή έκφραση χωρίς καμία τροποποίηση στην αλληλουχία του DNA.

Όλες οι αναπτυξιακές διαταραχές του οργανισμού ρυθμίζονται σε μεγάλο βαθμό από επιγενετικές, οι οποίες είναι σημαντικές για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των φυσιολογικών κυττάρων.

Τον όρο αυτό τον χρησιμοποίησε για πρώτη φορά το 1942 ο Conrad Hal Waddington το 1942 για να περιγράψει την αιτιώδη αλληλεπίδραση ανάμεσα στα γονίδια και τα προϊόντα τους, η οποία φέρνει το φαινότυπο σε λειτουργία. [32]. Κάποια από τα έργα του ίδιου του Waddington παρείχαν παραδείγματα διαταραχών του επιγενετικού τοπίου, όπως η σύντομη θέρμανση της νύμφης *Drosophila* για να προκληθεί ένα συγκεκριμένο ελάττωμα στο ενήλικο φτερό [33]. Κλασικά παραδείγματα επιγενετικών διαταραχών περιελάμβαναν την κλωνική κληρονομικότητα που παρατηρήθηκε στη διαφοροποίηση θέσης-επίδρασης της *Drosophila* (PEV) [34] και τα πορτοκαλί και μαύρα μπαλώματα που παρατηρήθηκαν στη γούνα των γατών με τσίχλα [35]. Οι επιγενετικές διαταραχές περιελάμβαναν επίσης παραβιάσεις της σταθερής μεντελικής κληρονομικότητας στον αραβόσιτο που ονομάζεται «παραμετάλλαξη», όπου ένα αλληλόμορφο μετασχηματίζεται κληρονομικά σε διπλοειδή ετεροζυγότη για να δώσει απογόνους που μοιάζουν με αυτούς του εναλλακτικού αλληλόμορφου [36]. Αυτά τα παραδείγματα διαταραχών του τοπίου της χρωματίνης και άλλα παρόμοια που παρατηρήθηκαν σε διάφορους ευκαρυώτες έχουν εμπνεύσει πολλούς ερευνητές να εξερευνήσουν τους υποκείμενους μοριακούς μηχανισμούς τους. Από αυτή την ιστορική προοπτική, το πεδίο της επιγενετικής είναι η μελέτη της κυτταρικής μνήμης που ανιχνεύεται φαινοτυπικά από κληρονομούμενες μιτωτικές ή μειωτικές διαταραχές.

Αυτά τα κλασικά παραδείγματα επιγενετικών διαταραχών προϋπήρχαν της γέννησης της μοριακής βιολογίας, η οποία εισήγαγε μια μάλλον διαφορετική έννοια της επιγενετικής από αυτή του Waddington. Καθώς το DNA είναι φορέας γενετικής πληροφορίας και η επιγενετική σημαίνει κυριολεκτικά «πάνω» γενετική, η επιγενετική πληροφορία θα είναι αυτή που διατηρείται από «μη-DNA συστατικά των χρωμοσωμάτων» [37]. Κατά συνέπεια, ο όρος επιγενετική έχει χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει τη δράση των πρωτεϊνών που μεσολαβούν και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων.

Η ταχεία πρόοδος στην κατανόηση της έκφρασης των γονιδίων στις δεκαετίες του 1950 και του 1960 οδήγησε στην άποψη της επιγενετικής ως συνώνυμης με τη μελέτη των χρωμοσωμικών πρωτεϊνών και συμπλεγμάτων που εμπλέκονται στη ρύθμιση των γονιδίων [38]. Με αυτόν τον τρόπο, τα επιγενετικά φαινόμενα περιελάμβαναν τη δέσμευση γενικών και ειδικών για την αλληλουχία μεταγραφικών παραγόντων που καθοδηγούν την έναρξη της μεταγραφής από πολυμεράσες RNA. Ο ρόλος των παραγόντων μεταγραφής στον έλεγχο του επιγενετικού τοπίου και στη διαμεσολάβηση της κυτταρικής μνήμης επιβεβαιώθηκε

αργότερα από επιδείξεις ότι οι κύριοι ρυθμιστικοί παράγοντες μεταγραφής όπως ο MyoD [39] και οι παράγοντες Yamanaka [40] θα μπορούσαν να ξεκινήσουν διακόπτες στο κύτταρο. μοίρα.

Ωστόσο, το επιγενετικό τοπίο περιλαμβάνει τάξεις μεγέθους περισσότερες μονάδες χρωμοσώματος παρά γονιδιακές μεταγραφικές μονάδες, μόνο ένα μικρό μέρος των οποίων έχει εξελιχθεί για γονιδιακή ρύθμιση κατά την ανάπτυξη. Τα μεταφερόμενα στοιχεία και τα υπολείμμά τους καταλαμβάνουν σχεδόν το μισό του DNA μας και τεράστιες μη γονιδιακές εκτάσεις βρίσκονται γύρω από τα κεντρομερή και τα τελομερή. Η πρόληψη της μη προγραμματισμένης μεταγραφής σε αυτές τις περιοχές είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της ακεραιότητας του επιγενετικού τοπίου. Η σίγαση αυτών των στοιχείων σε πολλά ζώα και φυτά προκαλείται από τη μεθυλίωση του DNA, που διατηρείται επιγενετικά από τη μεθυλτρανσφεράση DNA DNMT1, η οποία μεθυλιώνει αποτελεσματικά ημι-μεθυλιωμένα δινουκλεοτίδια CG πίσω από το πιρούνι αντιγραφής [41]. Η ανακάλυψη των νουκλεοσωμάτων στις αρχές της δεκαετίας του 1970 και η περιφερειακή διαφοροποίησή τους από τροποποιήσεις ιστόνης και παραλλαγές, οδήγησαν στη συνειδητοποίηση ότι τα νουκλεοσώματα και οι μηχανές που τα εναποθέτουν, τα τροποποιούν και τα αναδιαμορφώνουν είναι κεντρικοί παράγοντες στην επιγενετική ρύθμιση [42]. Για παράδειγμα, το κλασικό επιγενετικό φαινόμενο του PEV είναι πλέον κατανοητό ότι είναι η «εξάπλωση» πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη χρωματίνη με τη μεσολάβηση της μεθυλίωσης της λυσίνης-9 στην ιστόνη H3 και από τη δέσμευση της HP1 και άλλων πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ετεροχρωματίνη [43]. Καθώς μαθαίνουμε περισσότερα για τη ρύθμιση της χρωματίνης, καταλάβαμε καλύτερα τη σημασία των συνενεργοποιητών και συν-κατασταλτών που δρουν μέσω των νουκλεοσωμάτων για να ρυθμίσουν το επιγενετικό τοπίο. Έτσι, κατά τη διάρκεια των δεκαετιών από τότε που ο Waddington εισήγαγε για πρώτη φορά το επιγενετικό τοπίο, οι επιγενετικές μελέτες και οι «επιγονιδιωματικές» τεχνολογίες αντιπροσωπεύουν ένα συνεκτικό πεδίο γενετικής έρευνας που είναι κεντρικό για την κατανόηση της κυτταρικής βιολογίας και ανάπτυξης. [44]

1.7.2. Επιγενετικοί μηχανισμοί

Η επιγενετική κατάσταση του γονιδιώματος (επιγονιδίωμα) μεταβάλλεται δυναμικά στα κύτταρα των διάφορων ιστών, σε αντίθεση με την ακολουθία του DNA, που παραμένει σταθερή, και χρησιμοποιώντας ένα μεγάλο αριθμό ενζύμων σε συντονισμό μεταξύ τους, ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων και διαμορφώνει διαφορετικούς φαινοτύπους σε

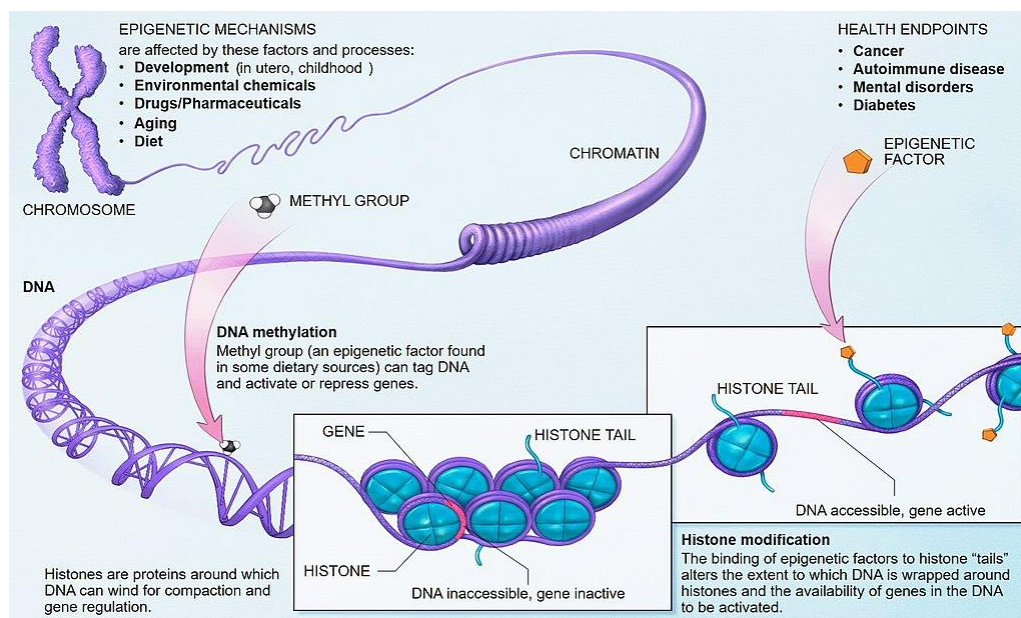
διαφορετικά κύτταρα. Οι κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί που διαμορφώνουν την επιγενετική κατάσταση του γονιδιώματος (Εικόνα 1.7.1) περιλαμβάνουν:

A) Τη μεθυλίωση του DNA, η οποία εμπλέκεται στην αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης

B) Τις τροποποιήσεις των ιστονών, οι οποίες επιφέρουν αλλαγές στη δομή της χρωματίνης μέσω ακετυλίωσης ή μεθυλίωσης

Γ) Αλλαγές στην έκφραση του RNA. Τα micro-RNAs τα οποία θεωρούνται υπεύθυνα για την αποσιώπηση της έκφρασης των γονιδίων. [45, 46]

Οποιαδήποτε απορρύθμιση στους τρεις μηχανισμούς μπορεί να οδηγήσει σε ακατάλληλη έκφραση γονιδίων και να αναπτυχθεί καρκίνος ή κάποια άλλη επιγενετική ασθένεια



Εικόνα 1.7.1.: Μηχανισμοί επιγενετικής

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες και διαδικασίες όπως η ανάπτυξη κατά την εμβρυική και την παιδική ηλικία, περιβαλλοντικές συνθήκες, χημικές ουσίες, φάρμακα και φαρμακευτικά προϊόντα, γήρανση και διατροφή.

Όλοι αυτοί οι παράγοντες και οι διεργασίες της επιγενετικής μπορούν να επηρεάσουν την υγεία των ανθρώπων και πιθανόν να οδηγήσουν σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, οι αυτοάνοσες ασθένειες, οι ψυχικές διαταραχές ή ο διαβήτης.

1.7.3. Μεθυλίωση του DNA.

Η μεθυλίωση του DNA είναι ένα θεμελιώδες επιγενετικό σημάδι που διέπει την έκφραση των γονιδίων και την οργάνωση της χρωματίνης, παρέχοντας έτσι ένα παράθυρο στην κυτταρική ταυτότητα και στις αναπτυξιακές διαδικασίες [47]. Τα τρέχοντα σύνολα δεδομένων τυπικά περιλαμβάνουν μόνο ένα κλάσμα θέσεων μεθυλίωσης και συχνά βασίζονται είτε σε κυτταρικές σειρές που υπέστησαν τεράστιες αλλαγές στην καλλιέργεια είτε σε ιστούς που περιέχουν μη καθορισμένα μείγματα κυττάρων [48,49,50].

Οι τόποι μοναδικά μη μεθυλιωμένοι σε έναν μεμονωμένο τύπο κυττάρου συχνά βρίσκονται σε μεταγραφικούς ενισχυτές και περιέχουν θέσεις δέσμευσης DNA για ειδικούς για ιστούς μεταγραφικούς ρυθμιστές. Οι μοναδικά υπερμεθυλιωμένοι τόποι είναι σπάνιοι και εμπλουτίζονται για τις νησίδες CpG, τους στόχους Polycomb και τις θέσεις δέσμευσης CTCF, υποδηλώνοντας έναν νέο ρόλο στη διαμόρφωση του βρόγχου χρωματίνης ειδικού τύπου κυττάρου. Ο άτλαντας παρέχει μια βασική πηγή για τη μελέτη της γονιδιακής ρύθμισης και των γενετικών παραλλαγών που σχετίζονται με ασθένειες, καθώς και έναν πλούτο δυνητικών βιοδεικτών ειδικών για ιστούς για χρήση σε υγρές βιοψίες.

Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο η ίδια αλληλουχία DNA ερμηνεύεται διαφορετικά σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων είναι μια θεμελιώδης πρόκληση της βιολογίας. Η γονιδιακή έκφραση, η προσβασιμότητα στο DNA και η συσκευασία χρωματίνης είναι καθιερωμένοι βασικοί καθοριστικοί παράγοντες του κυτταρικού φαινοτύπου. Κάτω από αυτά βρίσκεται η μεθυλίωση του DNA, ένα σταθερό επιγενετικό σημάδι που στηρίζει τη δια βίου διατήρηση της κυτταρικής ταυτότητας. [51]

1.7.3.1 Μηχανισμός μεθυλίωσης

Η μεθυλίωση του DNA είναι ένας επιγενετικός μηχανισμός που περιλαμβάνει τη μεταφορά μιας ομάδας μεθυλίου στη θέση C5 της κυτοσίνης για να σχηματιστεί η 5-μεθυλκυτοσίνη. Η μεθυλίωση του DNA ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων στρατολογώντας πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη γονιδιακή καταστολή ή αναστέλλοντας τη δέσμευση μεταγραφικών παραγόντων στο DNA. Κατά την ανάπτυξη, το πρότυπο της μεθυλίωσης του DNA στο γονιδίωμα αλλάζει ως αποτέλεσμα μιας δυναμικής διαδικασίας που περιλαμβάνει τόσο de novo μεθυλίωση DNA όσο και απομεθυλίωση. Κατά συνέπεια, τα διαφοροποιημένα κύτταρα αναπτύσσουν ένα σταθερό και μοναδικό μοτίβο μεθυλίωσης DNA που ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίου ειδικού ιστού.

Η μεθυλίωση αποτελεί ένα σημαντικό επιγενετικό μηχανισμό. Ιστορικά, η μεθυλίωση του DNA ανακαλύφθηκε σε θηλαστικά μόλις το DNA αναγνωρίστηκε ως το γενετικό υλικό

[52]. Το 1948, ο Rollin Hotchkiss ανακάλυψε για πρώτη φορά τροποποιημένη κυτοσίνη σε ένα παρασκεύασμα θύμου μόσχου χρησιμοποιώντας χρωματογραφία. Ο Hotchkiss [53] υπέθεσε ότι αυτό το κλάσμα ήταν 5-μεθυλοκυτοσίνη (5 mC) επειδή διαχωρίστηκε από την κυτοσίνη με τρόπο παρόμοιο με τον τρόπο που η θυμίνη (επίσης γνωστή ως μεθυλουρακίλη) διαχωρίστηκε από την ουρακίλη, και πρότεινε περαιτέρω ότι υπήρχε αυτή η τροποποιημένη κυτοσίνη. φυσικά στο DNA. Αν και πολλοί ερευνητές πίστευαν ότι η μεθυλίωση του DNA μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων, μόνο στη δεκαετία του 1980 αρκετές μελέτες απέδειξαν ότι η μεθυλίωση του DNA εμπλέκεται στη ρύθμιση των γονιδίων και στη διαφοροποίηση των κυττάρων [54]. Είναι πλέον ευρέως αναγνωρισμένο ότι η μεθυλίωση του DNA, σε συνεννόηση με άλλους ρυθμιστές, είναι ένας σημαντικός επιγενετικός παράγοντας που επηρεάζει τις γονιδιακές δραστηριότητες.

Η μεθυλίωση του DNA καταλύεται από μια οικογένεια μεθυλτρανσφερασών DNA (Dnmts) που μεταφέρουν μια μεθυλική ομάδα από S-αδενυλ μεθειονίνη (SAM) στον πέμπτο άνθρακα ενός υπολείμματος κυτοσίνης για να σχηματίσουν 5 mC. Τα Dnmt3a και Dnmt3b μπορούν να δημιουργήσουν ένα νέο μοτίβο μεθυλίωσης σε μη τροποποιημένο DNA και επομένως είναι γνωστά ως *de novo* Dnmt. Από την άλλη πλευρά, το Dnmt1 λειτουργεί κατά την αντιγραφή του DNA για να αντιγράψει το πρότυπο μεθυλίωσης του DNA από τον γονικό κλώνο DNA στον νεοσυντιθέμενο θυγατρικό κλώνο. Και τα τρία Dnmts εμπλέκονται εκτενώς στην ανάπτυξη ενός εμβρύου. Όταν τα κύτταρα φτάσουν στην τελική διαφοροποίηση, η έκφραση Dnmt μειώνεται πολύ. Αυτό φαίνεται να υποδηλώνει ότι το πρότυπο μεθυλίωσης του DNA στα μεταμιτωτικά κύτταρα είναι σταθερό. Ωστόσο, οι μεταμιτωτικοί νευρώνες στον εγκέφαλο των ώριμων θηλαστικών εξακολουθούν να εκφράζουν σημαντικά επίπεδα Dnmts, αυξάνοντας την πιθανότητα ότι οι Dnmts και η μεθυλίωση του DNA μπορεί να διαδραματίσουν νέο ρόλο στον εγκέφαλο [55].

Αν και ο εγκέφαλος περιέχει μερικά από τα υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης DNA από οποιονδήποτε ιστό στο σώμα, τα 5 mC αντιπροσωπεύουν μόνο το ~ 1% των νουκλεϊκών οξέων στο ανθρώπινο γονιδίωμα [56]. Η πλειονότητα της μεθυλίωσης του DNA συμβαίνει σε κυτοσίνες που προηγούνται ενός νουκλεοτιδίου γουανίνης ή των θέσεων CpG. Συνολικά, τα γονιδιώματα των θηλαστικών έχουν εξαντληθεί από θέσεις CpG που μπορεί να προκύψουν από το μεταλλαξιογόνο δυναμικό των 5 mC που μπορεί να απαμινωθεί σε θυμίνη [57]. Οι υπόλοιπες θέσεις CpG απλώνονται σε όλο το γονιδίωμα όπου μεθυλιώνονται σε μεγάλο βαθμό με εξαίρεση τα νησιά CpG [58]. Είναι ενδιαφέρον ότι υπάρχουν ενδείξεις μη-CpG μεθυλίωσης σε εμβρυικά βλαστοκύτταρα ποντικού και ανθρώπου, ωστόσο αυτή η μεθυλίωση χάνεται σε ώριμους ιστούς [59]. Η πιο ενδελεχής

ανάλυση του μετωπιαίου φλοιού του ποντικού αποκάλυψε πρόσφατα ότι αν και η πλειονότητα της μεθυλίωσης συμβαίνει εντός των θέσεων CpG, υπάρχει ένα σημαντικό ποσοστό μεθυλιωμένων μη CpG θέσεων [60]. Λόγω της πρόσφατης ανακάλυψής του, ο ρόλος της μεθυλίωσης χωρίς CpG είναι ακόμα ασαφής.

Η μεθυλίωση του DNA είναι απαραίτητη για την αποσιώπηση των ρετροϊκών στοιχείων, τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων ειδικά για τον ιστό, τη γονιδιωματική αποτύπωση και την αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X. Είναι σημαντικό ότι η μεθυλίωση του DNA σε διαφορετικές γονιδιωματικές περιοχές μπορεί να ασκήσει διαφορετικές επιρροές στις γονιδιακές δραστηριότητες με βάση την υποκείμενη γενετική αλληλουχία. Στις επόμενες ενότητες, θα αναλύσουμε περαιτέρω τον ρόλο της μεθυλίωσης του DNA σε διαφορετικές γονιδιωματικές περιοχές.

1.7.3.2. CpG νησίδες

Οι νησίδες CpG είναι τμήματα DNA μήκους περίπου 1000 ζευγών βάσεων που έχουν υψηλότερη πυκνότητα CpG από το υπόλοιπο γονιδίωμα, αλλά συχνά δεν είναι μεθυλιωμένα. Η πλειονότητα των προαγωγέων γονιδίων, περίπου το 70%, βρίσκεται εντός των νησιών CpG [61]. Ειδικότερα, οι υποκινητές για τα γονίδια της οικιακής φροντίδας είναι συχνά ενσωματωμένοι στα νησιά CpG [62]. Τα νησιά CpG, ειδικά εκείνα που σχετίζονται με προαγωγείς, διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό μεταξύ ποντικών και ανθρώπων [63]. Η θέση και η διατήρηση των νησιών CpG καθ' όλη τη διάρκεια της εξέλιξης υποδηλώνει ότι αυτές οι περιοχές έχουν λειτουργική σημασία.

Φαίνεται ότι οι νησίδες CpG έχουν συντηρηθεί εξελικτικά για να προάγουν την έκφραση γονιδίων ρυθμίζοντας τη δομή της χρωματίνης και τη δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα. Το DNA τυλίγεται τακτικά γύρω από πρωτεΐνες ιστόνης σχηματίζοντας μικρά, συσκευασμένα τμήματα που ονομάζονται νουκλεοσώματα. Όσο πιο στενά συνδέεται με τις πρωτεΐνες ιστόνης το DNA, τόσο λιγότερο επιτρεπτό είναι για γονιδιακή έκφραση. Ένα από τα κοινά χαρακτηριστικά των νησιών CpG είναι ότι περιέχουν λιγότερα νουκλεοσώματα από άλλα τμήματα DNA.[64] Τα λίγα νουκλεοσώματα με τα οποία συνδέονται οι νησίδες CpG περιέχουν συχνά ιστόνες με τροποποιήσεις που εμπλέκονται στην ενίσχυση της γονιδιακής έκφρασης [65]. Αν και περίπου το 50% των νησιών CpG περιέχουν γνωστές θέσεις έναρξης μεταγραφής, οι νησίδες CpG συχνά στερούνται κοινών στοιχείων προαγωγέα όπως τα κουτιά TATA [66]. Καθώς πολλές θέσεις δέσμευσης μεταγραφικού παράγοντα είναι πλούσιες σε GC, οι νησίδες CpG είναι πιθανό να ενισχύσουν τη δέσμευση σε θέσεις

έναρξης μεταγραφής. Παρά την έλλειψη κοινών στοιχείων προαγωγέα, οι νησίδες CpG ενισχύουν την προσβασιμότητα του DNA και προάγουν τη δέσμευση μεταγραφικού παράγοντα.

Η μεθυλίωση των νησίδων CpG οδηγεί σε σταθερή σίγαση της γονιδιακής έκφρασης [67]. Κατά τη γαμετογένεση και την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, τα νησιά CpG υφίστανται διαφορική μεθυλίωση [68]. Η ικανότητα της μεθυλίωσης να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων μέσω των νησίδων CpG είναι ιδιαίτερα σημαντική για την καθιέρωση της αποτύπωσης [69]. Τα αποτυπωμένα γονίδια εκφράζονται μόνο από ένα από τα δύο κληρονομικά γονικά χρωμοσώματα και η έκφρασή τους καθορίζεται από τον γονέα κληρονομικότητας. Πέρα από τα αποτυπωμένα γονίδια, η μεθυλίωση του DNA των νησίδων CpG ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων κατά την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση [70]. Καθώς οι νησίδες CpG σχετίζονται με τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, θα ήταν αναμενόμενο ότι οι νησίδες CpG ενδέχεται να εμφανίζουν μοτίβα μεθυλίωσης DNA ειδικά για τον ιστό. Αν και τα νησιά CpG σε ενδογονιδιακές και γονιδιακές περιοχές του σώματος μπορεί να έχουν ιστο-ειδικά μοτίβα μεθυλίωσης, τα νησιά CpG που σχετίζονται με θέσεις έναρξης μεταγραφής σπάνια εμφανίζουν πρότυπα μεθυλίωσης ειδικά για ιστούς. Αντίθετα, οι περιοχές που ονομάζονται ακτές νησίδων CpG, που βρίσκονται σε απόσταση έως και 2 kb από τα νησιά CpG, έχουν εξαιρετικά διατηρημένα μοτίβα ειδικής για τον ιστό μεθυλίωσης. Όπως και τα νησιά CpG, η μεθυλίωση των ακτών CpG συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με μειωμένη γονιδιακή έκφραση [71].

Ο ρόλος των νησίδων CpG στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης εξακολουθεί να αποκαλύπτεται. Η μεθυλίωση των νησίδων CpG μπορεί να επηρεάσει τη δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα, να στρατολογήσει κατασταλτικές πρωτεΐνες δέσμευσης μεθυλίου και να αποσιωπήσει σταθερά την έκφραση γονιδίου. Ωστόσο, οι νησίδες CpG, ειδικά εκείνες που σχετίζονται με γονιδιακούς προαγωγείς, σπάνια μεθυλιώνονται. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να προσδιοριστεί σε ποιο βαθμό η μεθυλίωση του DNA των νησίδων CpG ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων.

Η μεθυλίωση των νησίδων CpG οδηγεί σε σταθερή σίγαση της γονιδιακής έκφρασης [72]. Κατά τη γαμετογένεση και την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, τα νησιά CpG υφίστανται διαφορική μεθυλίωση [73]. Η ικανότητα της μεθυλίωσης να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων μέσω των νησίδων CpG είναι ιδιαίτερα σημαντική για την καθιέρωση της αποτύπωσης [74]. Τα αποτυπωμένα γονίδια εκφράζονται μόνο από ένα από τα δύο κληρονομικά γονικά χρωμοσώματα και η έκφρασή τους καθορίζεται από τον γονέα κληρονομικότητας. Πέρα από τα αποτυπωμένα γονίδια, η μεθυλίωση του DNA των νησίδων CpG ρυθμίζει την

έκφραση των γονιδίων κατά την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση [75]. Καθώς οι νησίδες CpG σχετίζονται με τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, θα ήταν αναμενόμενο ότι οι νησίδες CpG ενδέχεται να εμφανίζουν μοτίβα μεθυλίωσης DNA ειδικά για τον ιστό. Αν και τα νησιά CpG σε ενδογονιδιακές και γονιδιακές περιοχές του σώματος μπορεί να έχουν ιστο-ειδικά μοτίβα μεθυλίωσης, τα νησιά CpG που σχετίζονται με θέσεις έναρξης μεταγραφής σπάνια εμφανίζουν πρότυπα μεθυλίωσης ειδικά για ιστούς [76]. Αντίθετα, οι περιοχές που ονομάζονται ακτές νησίδων CpG, που βρίσκονται σε απόσταση έως και 2 kb από τα νησιά CpG, έχουν εξαιρετικά διατηρημένα μοτίβα ειδικής για τον ιστό μεθυλίωσης. Όπως και τα νησιά CpG, η μεθυλίωση των ακτών CpG συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με μειωμένη γονιδιακή έκφραση [77].

Ο ρόλος των νησίδων CpG στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης εξακολουθεί να αποκαλύπτεται. Η μεθυλίωση των νησίδων CpG μπορεί να επηρεάσει τη δέσμευση του μεταγραφικού παράγοντα, να στρατολογήσει κατασταλτικές πρωτεΐνες δέσμευσης μεθυλίου και να αποσιωπήσει σταθερά την έκφραση γονιδίου. Ωστόσο, οι νησίδες CpG, ειδικά εκείνες που σχετίζονται με γονιδιακούς προαγωγείς, σπάνια μεθυλιώνονται. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να προσδιοριστεί σε ποιο βαθμό η μεθυλίωση του DNA των νησίδων CpG ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων.

1.7.3.4. Μεθυλίωση και καρκίνος

Ο καρκίνος ήταν η πρώτη ανθρώπινη ασθένεια που συνδέθηκε με την επιγενετική. Μελέτες την δεκαετία του 1980 που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας πρωτεύοντες ιστούς ανθρώπινου όγκου, διαπίστωσαν ότι τα γονίδια των καρκινικών κυττάρων του ορθού ήταν ουσιαστικά υπομεθυλιωμένα σε σύγκριση με αυτά των φυσιολογικών ιστών. Η υπομεθυλίωση του DNA μπορεί να ενεργοποιήσει τα ογκογονίδια και να ξεκινήσει την αστάθεια του χρωμοσώματος ενώ η υπερμεθυλίωση του DNA αρχίζει τη σίγαση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Μια συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών σφαλμάτων μπορεί να μετασχηματίσει ένα φυσιολογικό κύτταρο σε ένα επεμβατικό ή μεταστατικό κύτταρο όγκου. Επιπρόσθετα, τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA μπορεί να προκαλέσουν μη φυσιολογική έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο.

Τα γενικά πρότυπα τροποποίησης ιστόνης επίσης συσχετίζονται με καρκίνους όπως ο καρκίνος του προστάτη, του μαστού και του παγκρέατος. Στη συνέχεια, οι επιγενετικές αλλαγές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για τη μοριακή διάγνωση του πρώιμου καρκίνου [78] .

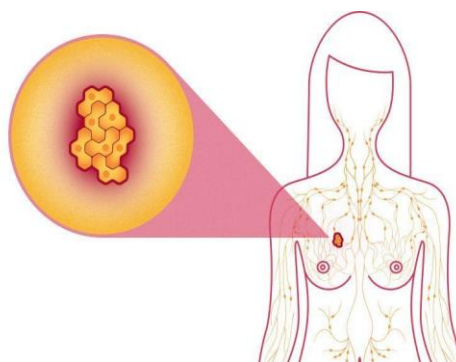
Τα καλύτερα μελετημένα επιγενετικά γεγονότα που διαμορφώνουν το επιγονιδίωμα ενός κυττάρου είναι η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και το κύκλωμα ανατροφοδότησης και προώθησης των microRNA. Συνολικά, αυτές οι διαδικασίες επηρεάζουν τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης και σταθερότητας μεταγραφής, επηρεάζουν την προσβασιμότητα του DNA και τη συμπύκνωση της χρωματίνης, ρυθμίζουν την ακεραιότητα και τη λειτουργία του γονιδιώματος και διατηρούν την υψηλή πυρηνική οργάνωση με τρόπο που καθορίζει την πιθανότητα ανάπτυξης παθολογίας στα κύτταρα [79, 80].

Κεφάλαιο 2

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ

2.1. 1. Εισαγωγή

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια ασθένεια στην οποία κακοήθη (καρκινικά) κύτταρα εμφανίζονται στους ιστούς του μαστού. (Εικόνα 2.1) Πρόκειται για τη μορφή καρκίνου που διαγιγνώσκεται συχνότερα και αφορά κατά συντριπτική πλειονότητα το γυναικείο πληθυσμό. Τα τελευταία χρόνια, τα ποσοστά επιβίωσης γυναικών που έχουν διαγνωσθεί με τη συγκεκριμένη μορφή καρκίνου έχουν αυξηθεί και ο αριθμός των θανάτων που σχετίζονται με την ασθένεια μειώνεται σταθερά. Το γεγονός αυτό οφείλεται κατά μεγάλο ποσοστό στις σύγχρονες διαγνωστικές τεχνικές, την ενημέρωση και την αύξηση της ευαισθητοποίησης του γυναικείου πληθυσμού για τη νόσο.



Εικόνα 2.1.: Καρκίνος στο μαστό

2. 1. 2. Διάγνωση και πρόγνωση καρκίνου του μαστού

Ο μαστός είναι ένα όργανο σύνθετο στη διαγνωστική του προσέγγιση. Η πλειοψηφία των γυναικών θα παρουσιάσουν κάποιο εύρημα ή κάποιο πρόβλημα στο μαστό στη

διάρκεια της ζωής τους, αλλά μόνο περίπου μία στις 10 θα αναπτύξει σε κάποια χρονική στιγμή καρκίνο.

Για την καλή πρόγνωση του καρκίνου του μαστού είναι σημαντικότερο να διαγνωσθεί και να αντιμετωπισθεί εγκαίρως.

Η ομαδοποίηση των ασθενών δυσκολεύει την πρόγνωση, αλλά υπολογίζεται ότι η μέση πενταετής επιβίωση είναι 70% . Συγκεκριμένα έχει πολύ μεγάλη σημασία το στάδιο του καρκίνου του μαστού στο οποίο βρίσκεται ο ασθενής. (Εικόνα 2.2)



Εικόνα 2.2: Στάδια καρκίνου του μαστού

Στο στάδιο 0 και στο στάδιο 1, τα καρκινικά κύτταρα βρίσκονται μόνο εντός των πόρων και δεν έχουν εξαπλωθεί στους γύρω ιστούς και η πενταετής επιβίωση είναι 100%. Στο στάδιο 2 η πενταετής επιβίωση είναι 93%, ενώ στο στάδιο 3 είναι 73%. Στο στάδιο 4 όπου υπάρχουν μεταστάσεις σε άλλα όργανα η πενταετής επιβίωση είναι μόνο 20%.

Η έγκαιρη διάγνωση είναι το σημαντικότερο όπλο που διαθέτουμε κατά του καρκίνου του μαστού σήμερα. Για την επίτευξη αυτού του στόχου συνιστώνται τα εξής:

1. Μία μαστογραφία αναφοράς στα 35
2. Αυτοεξέταση μία φορά το μήνα
3. Μαστογραφία μία φορά το χρόνο μετά τα 40 (ή υπερηχογράφημα σε περίπτωση πυκνού μαστού)
4. Κλινική εξέταση από ειδικό χειρουργό μία φορά το χρόνο μετά τα 40 (μετά τη μαστογραφία)

Η έγκαιρη διάγνωση μπορεί να οδηγήσει στην διατήρηση του μαστού και στην ίαση στις περισσότερες των περιπτώσεων.

Σε νέες γυναίκες το υπερηχογράφημα είναι η καταλληλότερη εξέταση, επειδή ο μαστός τους είναι πυκνός και η μαστογραφία δεν παρέχει επαρκείς πληροφορίες. Επίσης, σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας με πυκνό μαστό πρέπει να γίνεται υπερηχογράφημα. Σε μεγάλα κέντρα, όπου υπάρχει εμπειρία, χρησιμοποιείται επίσης η μαγνητική τομογραφία, όπου υπάρχει ένδειξη. Σε γυναίκες υψηλού κινδύνου πρέπει ο χειρουργός να συστήσει μία εξατομικευμένη διαδικασία που μπορεί να περιλαμβάνει πιο συχνούς ελέγχους ή κάποιο γονιδιακό έλεγχο. Με τις προαναφερθείσες εξετάσεις είμαστε σε θέση να ανιχνεύσουμε σχεδόν το σύνολο των καρκίνων του μαστού.

Όταν υπάρχει ψηλαφητό εύρημα ή όταν υπάρχει οποιαδήποτε υποψία κακοήθειας πρέπει η βλάβη να "ταυτοποιηθεί", δηλαδή να γίνει βιοψία. Σε κάποιες περιπτώσεις όχι και τόσο ύποπτων βλαβών και σε συνάρτηση με την ηλικία της ασθενούς μπορεί να επιλέξει κανείς να παρακολουθήσει την βλάβη.

2.1.3. Θεραπεία καρκίνου του μαστού

Η θεραπεία του καρκίνου του μαστού είναι η χειρουργική αντιμετώπιση κατά την οποία γίνεται και μοριακός έλεγχος της βιοψίας. Με βάση τις γονιδιακές εξετάσεις που πραγματοποιούνται αρχικά μπορεί να εκτιμηθεί ο κίνδυνος υποτροπής (πρόγνωση). Αυτό γίνεται με τη συσχέτιση των γονιδίων με επιθετικότερες μορφές καρκίνου και το διαχωρισμό των ατόμων που μπορούν να οφεληθούν από τη χημειοθεραπεία. Επιπλέον, μπορεί να γίνει η εξειδίκευση της θεραπείας ανάλογα με τη γονιδιακή ταυτότητα του ασθενούς. Στοχευμένες θεραπείες επιδρούν σε ειδικές γονιδιακές αλλαγές που εκφράζονται σε συγκεκριμένους υπότυπους μαστού, ενώ νεότερα φάρμακα και θεραπείες αναπτύσσονται συνεχώς.

2.1.4 Τεχνικές γονιδιακού ελέγχου μεταλλάξεων που συσχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού:

A) Ο πλήρης έλεγχος των γονιδίων *BRCA1*, *BRCA2* και η ανίχνευση της μετάλλαξης c.1100delC του γονιδίου *CHEK2*.

B) Έλεγχος πάνελ γονιδίων, οι παραλλαγές στα οποία έχουν συσχετισθεί με το καρκίνο μαστού ωοθηκών

Γ) Έλεγχος ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing)

Λόγω του μεγάλου ποσοστού εμφάνισης του καρκίνου μαστού- ωοθηκών είναι πολύ σημαντική η εκτίμηση συχνότητας μεταλλάξεων του Ελληνικού πληθυσμού ώστε να υπάρχει έγκαιρη διάγνωση και καλύτερη πρόγνωση της νόσου.

2.2. Κληρονομούμενος Καρκίνος του Μαστού (Σύνδρομο Μαστού-Ωοθηκών-Hereditary Breast & Ovarian Cancer syndrome, HBOC)

Είναι γνωστά 26 γονίδια, υψηλής και χαμηλής διεισδυτικότητας, με κυριότερα τα *BRCA1* & *BRCA2*, τα οποία έχουν συσχετιστεί με την προδιάθεση εκδήλωσης καρκίνου του μαστού ή/και ωοθηκών, δηλαδή άτομα τα οποία φέρουν μια παθογόνο μετάλλαξη σε κάποιο από αυτά έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό. Για παράδειγμα, μια γυναίκα που έχει κληρονομήσει μετάλλαξη στα γονίδια *BRCA1/2* διατρέχει πολύ υψηλό κίνδυνο όσον αφορά στην εκδήλωση καρκίνου του μαστού (60-85%) και για καρκίνο των ωοθηκών (20-40%). Άτομα με ισχυρές ενδείξεις ότι ανήκουν σε κατηγορία υψηλού κινδύνου, είναι εκείνα τα οποία έχουν εκδηλώσει καρκίνο σε νεαρή ηλικία (<40 ετών) ή/και έχουν σχετικό οικογενειακό ιστορικό. δηλαδή συγγενείς εξ αίματος, που διαγνώστηκαν με καρκίνο.

Γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας: Τα άτομα τα οποία φέρουν παθογόνους μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια έχουν υψηλή πιθανότητα εκδήλωσης του παθολογικού φαινότυπου με τον οποίο έχουν συσχετιστεί τα εν λόγω γονίδια συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό.

Γονίδια χαμηλής διεισδυτικότητας: Τα άτομα τα οποία φέρουν παθογόνους μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια έχουν σχετικά αυξημένη πιθανότητα εκδήλωσης του παθολογικού φαινότυπου με τον οποίο έχουν συσχετιστεί τα εν λόγω γονίδια συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό. [81-82]

2.3. Τα γονίδια *BRCA1*, *BRCA2*

Τα γονίδια *BRCA* (Breast Cancer 1 : *BRCA1*, OMIM#113705 & Breast Cancer 2: *BRCA2*, OMIM#600185) είναι ογκοκατασταλτικά γονίδια. Όταν λειτουργούν φυσιολογικά, τα γονίδια αυτά, εμποδίζουν την δημιουργία καρκινικών κυττάρων. Δεν επιτρέπουν στα κύτταρα του μαστού, της ωοθήκης αλλά και σε άλλους τύπους κυττάρων να αυξάνονται πολύ γρήγορα, και με ανεξέλεγκτο τρόπο ώστε να εξελιχθούν σε καρκίνο. [83-84]

Μερικές φορές παρουσιάζονται ορισμένες αλλαγές ή “μεταλλάξεις” στα γονίδια *BRCA*. Πολλές από αυτές τις μεταλλάξεις είναι ακίνδυνες και δεν δημιουργούν πρόβλημα. Σε

κάποιες περιπτώσεις όμως οι μεταλλάξεις μπορεί να επηρεάσουν την φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου. Τα κύτταρα τότε είναι πιο πιθανό να αρχίζουν να διαιρούνται και να πολλαπλασιάζονται γρήγορα και να εξελιχθούν σε καρκινικά. [85]

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το δεύτερο σε συχνότητα τύπο καρκίνου στο γυναικείο πληθυσμό, ενώ ο καρκίνος των ωοθηκών καταλαμβάνει την έκτη θέση. Η νόσος κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων *BRCA1* & *BRCA2* ερμηνεύουν το 5-10% των κλινικών περιστατικών καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών.

Τα άτομα τα οποία φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* & *BRCA2* έχουν έως και 80% πιθανότητα εκδήλωσης καρκίνου του μαστού και ως 40% εκδήλωσης καρκίνου ωοθηκών μέχρι την ηλικία των 70 ετών. Φαίνεται, επίσης, να αυξάνουν την πιθανότητα εκδήλωσης καρκίνου του παγκρέατος. (Πίνακας 2.1)

Πίνακας 2.1 πιθανότητα εκδήλωσης καρκίνου

Cancer Type	General Population Risk	Risk for Malignancy	
		<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>
Breast	12%	46%-87%	38%-84%
Second primary breast	2% within 5 years	21.1% within 10 yrs 83% by age 70	10.8% within 10 yrs 62% by age 70
Ovarian	1%-2%	39%-63%	16.5%-27%
Male breast	0.1%	1.2%	Up to 8.9%
Prostate	6% through age 69	8.6% by age 65	15% by age 65 20% lifetime
Pancreatic	0.50%	1%-3%	2%-7%
Melanoma (cutaneous & ocular)	1.6%		Elevated Risk

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι γυναίκες με μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA1*, και ιδιαίτερα εκείνες με κλινικώς αρνητικούς λεμφαδένες, φαίνεται να έχουν χειρότερη πρόγνωση ως προς τις πιθανότητες επιβίωσης συγκριτικά με γυναίκες που φέρουν μεταλλάξεις στο *BRCA2* και γυναίκες αρνητικές για την παρουσία μεταλλάξεων και στα δύο γονίδια (*BRCA1* & *BRCA2*). Συγκεκριμένα το κλινικό στάδιο στο οποίο αντιστοιχεί ο όγκος κατά τη διάγνυσή του δεν φαίνεται να επηρεάζει τις πιθανότητες επιβίωσης των φορέων *BRCA1* μεταλλάξεων. Κατά συνέπεια κρίνεται απαραίτητη η έγκαιρη ανίχνευση αυτών ώστε να ληφθούν άμεσα από τον ασθενή σε συνεργασία με τον κλινικό ιατρό όλα τα δυνατά προληπτικά μέτρα.

Μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1*, *BRCA2* έχουν συσχετιστεί επιπλέον με την απόκριση στη θεραπεία και τη χρήση στοχευμένης θεραπείας (αναστολείς *PARP* όπως *olaparib*). [86-88]

Με τη τεχνολογία του της μαζικής αλληλούχησης σε Next-Generation Sequencing πλατφόρμες σε συνδυασμό με την ανίχνευση της παρουσίας τυχόν απαλοιφών / ενθέσεων μεγάλου μεγέθους χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του MLPA επιτυγχάνεται η πλήρης ταυτοποίηση της αλληλουχίας και των δύο γονιδίων. Η αναλυτική ευαισθησία και ειδικότητα των μεθόδων massive parallel sequencing & MLPA ανέρχεται στο 95% & 98%, αντίστοιχα. Ο χαρακτηρισμός των ανιχνευθέντων μεταλλάξεων διεξάγεται με βάση τα τρέχοντα επιστημονικά δεδομένα. Νέες και περισσότερες πληροφορίες για την αιτιολογική συσχέτιση γονιδίων και παθογόνων μεταλλάξεων με νόσους ανακλύπουν κάθε χρόνο ως εκ τούτου οι μεταλλάξεις ερμηνεύονται εκ νέου βάσει ενημερωμένης ροής εργασιών χαρακτηρισμού των ανιχνευθέντων μεταλλάξεων. [89-90]

2.4. Γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας

1. Μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* & *BRCA2* (Breast Cancer 1 & Breast Cancer 2) προδιαθέτουν για την εκδήλωση καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών. Η νόσος κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Τα άτομα τα οποία φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* & *BRCA2* έχουν έως και 80% πιθανότητα εκδήλωσης καρκίνου του μαστού και ως 40% εκδήλωσης καρκίνου ωοθηκών μέχρι την ηλικία των 70 ετών.

2. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *PTEN* ευθύνονται για το σύνδρομο του Cowden καθώς και για παρόμοιες κλινικές καταστάσεις με το σύνδρομο του Cowden. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολλαπλών αμαρτωμάτων και αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ορισμένων τύπων καρκίνου, συγκεκριμένα καρκίνου του μαστού, του

θυρεοειδούς, του ενδομητρίου και του εγκεφάλου. Τα άτομα τα οποία φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *PTEN* έχουν έως και 85% πιθανότητα εκδήλωσης καρκίνου του μαστού, με μέση ηλικία διάγνωσης μεταξύ 38 και 46 ετών, και ως 35% πιθανότητα εκδήλωσης καρκίνου του θυρεοειδούς. Η πιθανότητα εκδήλωσης καρκίνου του ενδομητρίου προσεγγίζει το 28%.

3. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53* ευθύνονται για το σύνδρομο Li Fraumeni. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από *αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ορισμένων τύπων καρκίνου, συγκεκριμένα καρκίνου του μαστού, σαρκωμάτων και λευχαιμίας*. Εκτιμάται ότι το 50% των νεοπλασμάτων που απαντώνται στα πλαίσια του συνδρόμου Li Fraumeni εκδηλώνονται μέχρι την ηλικία των 30 ετών, με μέση ηλικία διάγνωσης τα 25έτη. Να σημειωθεί ότι ασθενείς με ηλικία διάγνωσης καρκίνου του μαστού περί τα 30 έτη & αρνητικές για την παρουσία παθογόνου μετάλλαξης στα γονίδια *BRCA1* & *BRCA2* έχουν 4-8% πιθανότητα να φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο *TP53*.

4. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *CDH1* ευθύνονται για το σύνδρομο καρκίνου στομάχου διαχύτου τύπου & λοβιακού καρκίνου μαστού. Τα άτομα τα οποία φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *CDH1* έχουν έως και 80% πιθανότητα εκδήλωσης γαστρικού καρκίνου, ενώ οι γυναίκες έχουν, επίσης, 39-52% πιθανότητα εκδήλωσης λοβιακού καρκίνου μαστού. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ο καρκίνος εκδηλώνεται πριν την ηλικία των 40 ετών.

5. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *STK11* ευθύνονται για το σύνδρομο Peutz-Jeghers, γνωστό και ως σύνδρομο αμαρτώδους πολυποδίασης. Τα άτομα τα οποία φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *STK11* έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ορισμένων τύπων καρκίνου, συγκεκριμένα καρκίνου του μαστού, ωοθηκών, παχέος εντέρου, λεπτού εντέρου, παγκρέατος, θυρεοειδούς, πνευμόνων. [91-100]

2.5. Σκοπός παρούσας διατριβής σχετικά με τον καρκίνο του μαστού

Με το γονιδιακό έλεγχο για προδιάθεση καρκίνου του μαστού, με την ανίχνευση δηλαδή μεταλλάξεων (ειδικών αλλαγών σε γονίδια, χρωμοσώματα ή πρωτεΐνες) σε κληρονομούμενα γονίδια μπορεί να επιτευχθεί η πρόβλεψη ασθένειας, η αναγνώριση κληρονομικού καρκίνου και να γίνει σωστή καθοδήγηση της περίθαλψης του ασθενούς.

Σκοπός της παρούσας διατριβής σχετικά με τον καρκίνο του μαστού είναι η αξιολόγηση των τεχνικών και των αποτελεσμάτων τους και εφαρμογή των καταλληλότερων για άμεση διάγνωση και καλύτερη πρόγνωση.

Κεφάλαιο 3

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

3.1.Εισαγωγή

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι από τους πιο συχνούς καρκίνους και αποτελεί μείζον πρόβλημα υγείας. Προσβάλλει συχνότερα άτομα της ηλικίας των 40 ετών. Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί αύξηση των περιστατικών και σε ασθενείς νεότερης ηλικίας.

Στο 50% των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, ο καρκίνος διαγιγνώσκεται στο αριστερό παχύ έντερο και στο 25% στο δεξί. Στο 4-5% των ασθενών υπάρχει ταυτόχρονα και άλλος καρκίνος σε άλλο σημείο του παχέος εντέρου τη στιγμή της διάγνωσης. Η πλειονότητα των καρκίνων οφείλεται σε προϋπάρχοντες αδενωματώδεις πολύποδες.

3.2. Τεχνικές ανίχνευσης αλλοιώσεων στο παχύ έντερο

Μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές ανίχνευσης αλλοιώσεων στο παχύ έντερο είναι η μέθοδος της κολονοσκόπησης. Όμως, εν γένει έχει αναφερθεί ότι η εξέταση της κολονοσκόπησης είναι τεχνικά δύσκολη σε ποσοστό έως και 10% και μπορεί να μην καταστεί εφικτή η ολοκλήρωσή της λόγω κακής προετοιμασίας, πόνου ή ανεπαρκούς καταστολής, ελικοειδούς παχέος εντέρου, εκκολπωματίτιδας, παρουσία αποφρακτικής μάζας και στένωσης εντέρου, ενώ σε ηλικιωμένους ασθενείς το αντίστοιχο ποσοστό μπορεί να φθάνει έως και 33%. [101, 102, 103]

Η Ειδική Ομάδα Προληπτικών Υπηρεσιών των ΗΠΑ (Task Force) συνιστά στους ενήλικες ηλικίας 45 έως 75 ετών να υποβάλλονται σε έλεγχο για καρκίνο του παχέος εντέρου. Η απόφαση να γίνει προσυμπτωματικός έλεγχος μεταξύ 76 και 85 ετών θα πρέπει να λαμβάνεται σε ατομική βάση. Τα άτομα που διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο να προσβληθούν από καρκίνο του παχέος εντέρου θα πρέπει να μιλήσουν με τον γιατρό τους για το πότε θα ξεκινήσουν τον προσυμπτωματικό έλεγχο, ποια εξέταση είναι κατάλληλη για αυτούς και πόσο συχνά να υποβάλλονται σε εξέταση.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρκετές προληπτικές εξετάσεις για την εύρεση πολύποδων ή καρκίνου του παχέος εντέρου. Η Task Force περιγράφει τις ακόλουθες στρατηγικές προσυμπτωματικού ελέγχου για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Είναι σημαντικό βέβαια ότι εάν το αποτέλεσμα της δοκιμής σας είναι θετικό ή μη φυσιολογικό σε

ορισμένες δοκιμασίες προσυμπτωματικού ελέγχου (δοκιμές κοπράνων, εύκαμπτη σιγμοειδοσκόπηση και κολονογράφημα CT), απαιτείται κολονοσκόπηση για να ολοκληρωθεί η διαδικασία προσυμπτωματικού ελέγχου. Μιλήστε με το γιατρό σας για το ποια εξέταση είναι κατάλληλη για εσάς.

Το τεστ κρυφού αίματος με βάση το γκουαϊάκ (gFOBT) χρησιμοποιεί τη χημική ουσία γκουαϊάκ για την ανίχνευση αίματος στα κόπρανα. Γίνεται μια φορά το χρόνο. Για αυτό το τεστ, λαμβάνετε ένα κιτ δοκιμής από τον πάροχο υγειονομικής περίθαλψης. Στο σπίτι, χρησιμοποιείτε ένα ραβδί ή βούρτσα για να αποκτήσετε μια μικρή ποσότητα σκαμνιού. Επιστρέφετε το κιτ εξέτασης στον γιατρό ή σε ένα εργαστήριο, όπου τα δείγματα κοπράνων ελέγχονται για την παρουσία αίματος.

Η ανοσοχημική εξέταση κοπράνων (FIT) χρησιμοποιεί αντισώματα για την ανίχνευση αίματος στα κόπρανα. Γίνεται επίσης μία φορά το χρόνο με τον ίδιο τρόπο όπως ένα gFOBT. Το τεστ FIT-DNA (αναφέρεται επίσης ως τεστ DNA κοπράνων) συνδυάζει το FIT με ένα τεστ που ανιχνεύει αλλοιωμένο DNA στα κόπρανα. Για αυτό το τεστ, συλλέγετε μια ολόκληρη κίνηση του εντέρου και τη στέλνετε σε εργαστήριο, όπου ελέγχεται για αλλοιωμένο DNA και για παρουσία αίματος. Γίνεται μία φορά κάθε τρία χρόνια.

Ευέλικτη Σιγμοειδοσκόπηση: Για αυτό το τεστ, ο γιατρός βάζει έναν κοντό, λεπτό, εύκαμπτο, φωτισμένο σωλήνα στο ορθό σας. Ο γιατρός ελέγχει για πολύποδες ή καρκίνο στο εσωτερικό του ορθού και στο κάτω τρίτο του παχέος εντέρου.

Η κολονοσκόπηση είναι παρόμοια με την εύκαμπτη σιγμοειδοσκόπηση, εκτός από το ότι ο γιατρός χρησιμοποιεί έναν μακρύτερο, λεπτό, εύκαμπτο, φωτισμένο σωλήνα για να ελέγξει για πολύποδες ή καρκίνο στο εσωτερικό του ορθού και σε ολόκληρο το κόλον. Κατά τη διάρκεια της εξέτασης, ο γιατρός μπορεί να βρει και να αφαιρέσει τους περισσότερους πολύποδες και ορισμένους καρκίνους. Η κολονοσκόπηση χρησιμοποιείται επίσης ως τεστ παρακολούθησης εάν διαπιστωθεί οτιδήποτε ασυνήθιστο κατά τη διάρκεια μιας από τις άλλες εξετάσεις προσυμπτωματικού ελέγχου.

Αξονική κολονογραφία (εικονική κολονοσκόπηση): Η κολονογραφία υπολογιστικής τομογραφίας (CT), που ονομάζεται επίσης εικονική κολονοσκόπηση, χρησιμοποιεί ακτίνες X και υπολογιστές για να παράγει εικόνες ολόκληρου του παχέος εντέρου, οι οποίες εμφανίζονται σε μια οθόνη υπολογιστή για να τις αναλύσει ο γιατρός.

Το προσωπικό ή οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του παχέος εντέρου ή ορθοκολικού πολύποδα, εάν υπάρχει λάτσιο γενετικό σύνδρομο όπως οικογενής αδενωματοώδης πολύποδα (FAP) ή κληρονομικός μη πολύποδας ορθοκολικός καρκίνος (σύνδρομο Lynch), θα βοηθήσει το γιατρό να δει ποια είναι η καλύτερη εξέταση για κάθε ασθενή.

Οι κατευθυντήριες οδηγίες των οργανισμών NCCN [104] και ACC (American Cancer Society) [105] συνιστούν την υποβολή σε τεστ κοπράνων υψηλής ευαισθησίας, σε ενήλικες ηλικίας ≥ 45 ετών με κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου του παχέος εντέρου που αντιστοιχεί στο μέσο όρο, ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

Η έγκαιρη ανίχνευση των πολυπόδων μειώνει τον κίνδυνο εξαλλαγής μέσω της επακόλουθης αφαίρεσής τους, ενώ η διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου σε πρώιμο ασυμπτωματικό στάδιο διασφαλίζει μεγαλύτερη πιθανότητα επιτυχούς θεραπευτικής αντιμετώπισης.

Επομένως, κρίθηκε σημαντική η ανάπτυξη μεθόδου διαλογής δειγμάτων η οποία στηρίζεται στη μεθυλίωση και η αξιολόγησή της.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 4

ΥΛΙΚΑ, ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1.1 Βιολογικά δείγματα

Για να πραγματοποιηθεί αυτή η μελέτη, σχετικά με τον καρκίνο του μαστού έγινε συλλογή δειγμάτων αίματος ή κυττάρων παρειάς από 1232 άτομα. Τα άτομα αυτά ήταν είτε εξεταζόμενοι για προδιάθεση για τον καρκίνο του μαστού-ωοθηκών είτε έπασχαν από αυτόν. (mixed cohort).

Για να πραγματοποιηθεί η μελέτη σχετικά με τον καρκίνο του παχέος εντέρου έγινε συλλογή δειγμάτων κοπράνων από 30 άτομα τα οποία ήταν εξεταζόμενοι για προδιάθεση σχετικά με τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Επιπλέον έγινε συλλογή από 30 άτομα ώστε να αξιολογηθεί η μέθοδος που αναπτύχθηκε.

4.2. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

4.2.1. ΠΛΑΤΦΟΡΜΑ MiSeq (ILLUMINA)

Η πλατφόρμα MiSeq (Εικόνα 6.2.1) χρησιμοποιήθηκε για τη μαζική παράλληλη αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS) για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδια BRCA1, BRCA2 και για την ανίχνευση 94 σημειακών μεταλλάξεων που συσχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού (TruSight Cancer panel).



Εικόνα 4.1: Πλατφόρμα MiSeq

Η πλατφόρμα αυτή συνδυάζει την αποδεδειγμένη τεχνολογία αλληλούχησης μέσω τεχνολογίας σύνθεσης (SBS) και πρωτόκολλα με τα οποία η ανάλυση μπορεί να έχει ολοκληρωθεί σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα (8-24 ώρες). Η δημιουργία συμπλεγμάτων (clusters), η αλληλούχηση και η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιούνται όλα μέσα στο μηχάνημα.

Για να ξεκινήσει το run η τελική βιβλιοθήκη που περιλαμβάνει το σύνολο των βιβλιοθηκών των δειγμάτων που θα αναλυθούν φορτώνεται σε μία «προγεμισμένη κασέτα αντιδραστηρίων» (MiSeq Reagent cartridge).

Το ενσωματωμένο λογισμικό ανάλυσης εκτελεί ανάλυση δεδομένων στο όργανο σε πραγματικό χρόνο κατά τη διάρκεια της αλληλούχησης. Επιπλέον υπάρχει ενσωματωμένο λογισμικό δευτερεύουσας ανάλυσης (MiSeq Reporter) το οποίο επεξεργάζεται τα δεδομένα από την ανάλυση πραγματικού χρόνου. [107]

4.2.2 Light Cyclcr 480 Real Time PCR (Roche)

Για την ανίχνευση μεθυλίωσης των επιλεγμένων γονιδίων στο παχύ έντερο με τη μέθοδο Real Time PCR χρησιμοποιήθηκε το Light Cyclcr 480 Real Time PCR.



Εικόνα 4.2. : Light Cyclcr 480 Real Time PCR

Το μηχάνημα αυτό χρησιμοποιείται ευρέως για ακριβή ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση νουκλεικών οξέων και γονοτύπηση. Προσφέρει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης 380 δειγμάτων σε χρόνο κάτω των 2 ωρών.

Όλες οι συσκευές της Real time PCR συνδιάζουν την τεχνολογία της συμβατικής PCR για την παραγωγή/ πολλαπλασιασμό προϊόντων με συστήματα για παραγωγή, ανίχνευση και ανάλυση του φθορίζων σήματος που παράγεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Η μεγαλύτερη διαφορά που υπάρχει ανάμεσα στις διάφορες συσκευές είναι το λογισμικό που διαθέτει η κάθε συσκευή για την ανάλυση των δεδομένων και το σύστημα ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης χρωστικής φθορισμού. [108]

4.2.3. Γενετικός αναλυτής ABI3130 XL

Στο μηχάνημα αυτό (Εικόνα 6.3.) πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση μέσω τριχοειδούς (Sanger analysis, Fragment analysis). [109]



Εικόνα 6.3. : Γενετικός αναλυτής ABI3130 XL

4.2.4 Φυγόκεντρος

Για τις διάφορες φυγοκεντρήσεις χρησιμοποιήθηκε φυγόκεντρος Eppendorf 5810 R, με προσαρμοζόμενη κεφαλή για τη φυγοκέντρωση περιεκτών eppendorf χωρητικότητας 2 mL και πλακών 96-θέσεων. Το εύρος ρύθμισης θερμοκρασίας και ταχύτητας φυγοκέντρωσης, κυμαίνεται μεταξύ 9-40 °C και 200-14000 rpm, αντίστοιχα.

4.2.5 Αναλυτικός ζυγός

Για τις ζυγίσεις προτύπων ουσιών και αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκε αναλυτικός ζυγός KERN 770-12 με ακρίβεια ανάγνωσης τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και ελάχιστο και μέγιστο όριο ζύγισης 1 mg και 120 g αντίστοιχα.

4.2.6 Πιπέττες

Για την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων, την προετοιμασία των δειγμάτων προς ανάλυση και για την ολοκλήρωση της πειραματικής διεργασίας χρησιμοποιήθηκαν

ρυθμιζόμενες πιπέτες Gilson 1-10 μL , 2-20 μL , 10- 100 μL , 20- 200 μL , 100-1.000 μL , πολυκάναλες (8 καναλιών) πιπέτες 0,5-10ul , 20-200ul, 50-300 μL , επαναληπτική πιπέτα και πολυκάναλη ηλεκτρονική πιπέτα 2-50 μL (INTEGRA VOYAGER Adjustable Spacing Electronic Pipette). [110]

4.2.7 Ανακίνηση-Ανάμιξη

Για την ανάμιξη διαλυμάτων εντός περιεκτών erpendorf και την ανακίνηση πλακών 96-θέσεων χρησιμοποιήθηκε αναμικτήρας Vortex. Για την ανάμιξη διαλυτών καθώς επίσης και για την περαιτέρω διάλυση κάποιων ουσιών χρησιμοποιήθηκε λουτρό υπερήχων.

4.2.8 pHμετρο

Για τη ρύθμιση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος ($\text{K}_3\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ pH=6,0) χρησιμοποιήθηκε pHμετρο της εταιρείας OAKTON (pH 1100 series) το οποίο διαθέτει ηλεκτρόδιο υάλου Eutech. Για τη βαθμονόμησή του χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα με $\text{pH}=4,00\pm0,001$ και $\text{pH}=7,00\pm0,001$ της εταιρείας Reagon.

4.2.9. Dry bath incubator

Για την επώαση διαλυμάτων μέσα σε σωληνάρια του 1,5 mL χρησιμοποιήθηκε dry bath incubator. Το μηχάνημα αυτό προσφέρει τη δυνατότητα πολύ μεγάλης ακρίβειας της θερμοκρασίας ανά πάσα στιγμή και τη δυνατότητα ρύθμισης των λεπτών στα οποία θα διαρκέσει η επώαση.

4.2.10. Φωτόμετρο nanodrop1000

Με το Nanodrop πραγματοποιείται ο έλεγχος της ποιότητας, καθαρότητας και συγκέντρωσης των νουκλεικών οξέων. Είναι ένα φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου υπεριώδους-ορατού UV/Vis το οποίο λειτουργεί με βάση ειδικό σύστημα συγκράτησης του δείγματος ανάμεσα σε δύο επιφάνειες βασισμένο στην επιφανειακή τάση, χωρίς τη χρήση κυψελίδων. Η απαιτούμενη ποσότητα δείγματος είναι πολύ μικρή (1-2 μl) και το δείγμα χρησιμοποιείται χωρίς καμία προηγούμενη αραίωση. Όπως και στα άλλα φασματοφωτόμετρα, μετρίεται η απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm και στα 280 nm. Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του δείγματος (λόγος $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) παρουσιάζονται αυτόματα στην οθόνη του υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το σύστημα.

Ως πηγή ακτινοβολίας χρησιμοποιείται λυχνία ξένου. Το σύστημα συγκράτησης του δείγματος αποτελείται από δύο επιφάνειες που φέρουν οπτικές ίνες και καθορίζουν αυτόματα την απόσταση μεταξύ τους. Αυτή η διάταξη επιτρέπει την ακριβή μέτρηση διαλυμάτων με μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων, από 2 ng/μl έως 4000 ng/μl. [111]

4.2.11 Φωτόμετρο Qubit

Έλεγχος της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων καθώς επίσης και των βιβλιοθηκών που έχουν προκύψει από τη διαδικασία του NGS.

4.2.12 Λογισμικά αναλύσεων

Η ανάλυση παράλληλης αλληλούχισης νέας γενιάς (BRCA1, BRCA2 & 94 genes of Trusight Cancer) έγινε με το Software “Next Gene” .

Η ανάλυση αλληλούχισης Sanger για την επιβεβαίωση ύπαρξης σημειακών μεταλλάξεων έγινε με το Software “Mutation Surveyor”

Η ανάλυση ανίχνευσης μεγάλων γονιδιωματικών αναδιατάξεων (απαλοιφές / διπλασιασμοί ≥ 1 εξόνια) των γονιδίων *BRCA1* & *BRCA2* μέσω πολλαπλής ενίσχυσης τμημάτων DNA εξαρτώμενη από τη σύνδεση ιχνηθετών (MLPA) χρησιμοποιώντας τα προϊόντα P002-C2 & P045-B3, MRC-Holland , αντιστοίχως έγινε με το Software ‘Gene marker’.

4.2.13 Διαλύτες-Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Η αιθανόλη που χρησιμοποιήθηκε στους καθαρισμούς του NGS , αλλά και για την Παρασκευή των Wash buffers της απομόνωσης είχε ≥ 99.8 % ποσοστό καθαρότητας από την εταιρία Merck. Τα διαλύματα NaOH και Tris-HCl /Tween που χρησιμοποιούνται για το φόρτωμα του MiSeq και την ποσοτικοποίηση των βιβλιοθηκών του NGS παρασκευάστηκαν από χημικές ουσίες της εταιρίας Sigma Aldrich. Όλες οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Το νερό ήταν βαθμού καθαρότητας HPLC, όπως και το υδροχλώριο το οποίο ήταν της εταιρείας Sigma Aldrich.

Κεφάλαιο 5

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

5.1 Απομόνωση DNA από βιολογικά δείγματα με τη μέθοδο NucleoSpin Tissue, Macherey-Nagel.

5.1.1.Εισαγωγή

Η παρούσα διαδικασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό την απομόνωση γενετικού υλικού (DNA) από τα βιολογικά δείγματα ολικού αίματος, σίελου, κυττάρων παρειάς (buccal swab) (Εικόνα 5.1) για τον προσδιορισμό σημειακών μεταλλάξεων καρκίνου του μαστού.



Εικόνα 5.1.: Αρχικά υλικά απομόνωσης

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την γρήγορη και αποτελεσματική απομόνωση υψηλής καθαρότητας και ποιότητας γενετικού υλικού το οποίο μπορεί εν συνεχεία να χρησιμοποιηθεί σε μοριακές αναλύσεις. Η υψηλή καθαρότητα και ποιότητα του DNA την καθιστά ιδανική για πειραματικές διεργασίες όπως το NGS και το WGS. Η απομόνωση γίνεται με τη χρήση στηλών σιλικόνης στις οποίες προσδένονται τα νουκλεϊκά οξέα και έκλουση του καθαρού DNA κατόπιν διαδοχικών πλύσεων της μεμβράνης.

Η διαδικασία περιλαμβάνει 7 στάδια όπως αυτά περιγράφονται στο αρχείο αναφοράς (User Manual Nucleospin Tissue) της Macherey-Nagel: α) προετοιμασία δείγματος (για δείγματα σάλιου, κολπικών υγρών κ.α. Τα δείγματα ολικού αίματος δεν χρειάζονται προετοιμασία), β) λύση δείγματος, γ) κατακρήμνιση του DNA, δ) πλύση της μεμβράνης σιλικόνης, ε) στέγνωμα μεμβράνης σιλικόνης και στ) έκλουση του καθαρού DNA, ζ) μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA.



Εικόνα 5.2.: Στάδια απομόνωσης με στηλίτσα

5.1.2 Μέθοδος

Η διαδικασία της απομόνωσης πραγματοποιείται σε ειδικό απαγωγό (hood) ο οποίος απολυμαίνεται προηγουμένως με UV. Ακολουθείται το πρωτόκολλο όπως αυτό περιγράφεται στο αρχείο αναφοράς (User Manual Nucleospin Tissue) της Macherey-Nagel το οποίο παρατίθεται εν συντομία παρακάτω [112]:

Απομονωση απο δειγμα αιματος

1. Για κάθε δείγμα σημειώνονται Eppendorf tubes 1,5 μ L με τον κωδικό του δείγματος (2tubes/δειγμα)
(Χρησιμοποιείται το ένα από τα δύο tubes ενώ το δεύτερο θα χρησιμοποιηθεί στο τέλος για την έκλυση του καθαρού DNA)
2. Μεταφορά 230 μ L δείγματος στο ένα tube
3. Προσθήκη 25 μ L Proteinase K και 200 μ L Buffer B3
4. Έντονο vortex για ~10-20sec και επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 5min
5. Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάζονται ξανά στους 70C για 30min
6. Προσθήκη 230 μ L αιθανόλη 100% σε κάθε δείγμα και vortex
7. Για κάθε δείγμα σημειώνεται μια στήλη και σε αυτή μεταφέρονται 600 μ L από το δείγμα
8. Φυγοκεντρηση της στήλης στα 11.000xg για 1min

Πραγματοποίηση πλύσεων της στήλης

Πλυσιμο στηλης –μεμβρανής σιλικονης

1η πλύση

1. Προσθήκη 500 μ L Buffer BW

2. Φυγοκέντρωση της στήλης στα 11.000xg για 1min
Απόρριψη του υγρού που περνάει από τη στήλη

2η πλύση

1. Προσθήκη 600 μ L Buffer B5
2. Φυγοκέντρωση της στήλης στα 11.000xg για 3min
Απόρριψη του υγρού που περνάει από τη στήλη
Στέγνωμα μεμβράνης σιλικόνης
1. Φυγοκέντρωση της στήλης στα 11.000xg για 2min

Έκλουση καθαρού DNA

1. Η στήλη μεταφέρεται στο αντίστοιχο, καθαρό Eppendorf (2o tube)
2. Προσθήκη 80 μ L Buffer BE το οποίο έχει προηγουμένως προθερμανθεί στους 70°C
3. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3min
4. Φυγοκέντρωση της στήλης στα 11.000xg για 1min
5. Απόρριψη της στήλης και στο tube έχει εκλουστεί το καθαρό πλέον DNA

5.1.3 Αξιολόγηση συγκέντρωσης DNA

Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία της απομόνωσης τα δείγματα DNA φωτομετρούνται στο Nanodrop και αξιολογείται η συγκέντρωση και η καθαρότητά τους. Η καθαρότητα του DNA (ποσοστό 260/280) θα πρέπει να είναι περίπου ίση με ~1,8. Ο δεύτερος δείκτης καθαρότητας του DNA (ποσοστό 260/230) θα πρέπει να είναι περίπου ίσος με ~2,0-2,2 [ε]

Για το NGS και το WGS ιδανικά οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να είναι ≥ 50 ng/uL.

5.1.4 Επικύρωση μεθόδου

Διεξήχθη έλεγχος ικανότητας της μεθόδου όσον αφορά την αναπαραγωγικότητα & επαναλαψιμότητα αυτής.

Διενεργήθηκαν οι παρακάτω πειραματικές διαδικασίες:

A)Επαναληψιμότητα

Ένα δείγμα (με κωδικό 42115) απομονώθηκε την ίδια ημέρα εις διπλούν στα πλαίσια της ίδιας πειραματικής διαδικασίας.

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	260/280	260/230
42115 1	MX	10-08-20	1:23 PM	53.53	1.93	2.47
42115 2	MX	10-08-20	1:23 PM	53	1.9	2.45

B)Αναπαραγωγιμότητα

Έγινε εκ νέου απομόνωση του δείγματος 42115 στις 27/08/2020

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	260/280	260/230
42115_bl_new	SA	27-08-20	12:21 PM	53.15	1.89	2.32

Και στις δύο περιπτώσεις τα αποτελέσματα ήταν εξαιρετικά και οι τιμές των συγκεντρώσεων και της καθαρότητας OD (260/280 και 260/230) δεν έδειξαν σημαντικές αποκλίσεις.

5.2 Απομόνωση DNA από δείγματα κοπράνων

5.2.1 Εισαγωγή

Η απομόνωση DNA από δείγματα κοπράνων αποτελεί μία πρόκληση επειδή πολλές διαφορετικές δυσμενείς ουσίες μπορεί να συνεκχυλιστούν και να έχουν ανασταλτική επίδραση στην όποια πειραματική διεργασία ακολουθήσει. Επιπλέον, το DNA που θα προκύψει μπορεί να είναι πολύ αραιωμένο και να περιλαμβάνει DNA ανθρώπινης αλλά και βακτηριακής προέλευσης. [113]

Η συλλογή των κοπράνων είναι πολύ απλή με τη χρήση ειδικού κιτ συλλογής, το οποίο μπορεί να το χρησιμοποιήσει ο καθένας για αυτολήψη, στο οποίο εμπεριέχεται ένα πλαστικό φιαλίδιο των 50mL όπου θα τοποθετηθούν τα κόπρανα.

5.2.2 Μέθοδος

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ένα lysis buffer με τη βοήθεια του οποίου θα απελευθερωθεί το DNA από το δείγμα κοπράνων. Στη συνέχεια, το απελευθερωμένο DNA προσδένεται σε μαγνητικά σφαιρίδια (beads) και προσδένεται στο μαγνητικό υλικό. Το δεσμευμένο στα μαγνητικά σφαιρίδια DNA, στη συνέχεια καθαρίζεται με Wash Buffer. Τέλος το dna εκλούεται από τα μαγνητικά σφαιρίδια και συλλέγεται. Για την απομόνωση αρκούν μόνο 200 μ L κοπράνων.

Τα βήματα που ακολουθούνται για την απομόνωση είναι τα εξής:

1. Προσθήκη 25 μ L lysis buffer σε ένα 1.5 ml tube.
2. Προσθήκη 200 μ L δείγματος κοπράνων στο ίδιο tube, έντονη ανάδευση
3. Προσθήκη 50 μ L lysis buffer στο tube, έντονη ανάδευση για 10 λεπτά μέχρι το δείγμα να είναι ομογενές.
4. Φυγοκέντρηση στα 12,000 rpm για 1 λεπτό
5. Σε ένα καινούριο tube προσθήκη 40 μ L πρωτεϊνάσης K
6. Μεταφορά 200 μ L υπερκείμενου (από το βήμα 4) στο tube με την πρωτεϊνάση.
7. Προσθήκη 200 μ L of Binding Buffer στο tube, σύντομη όχι πολύ έντονη ανάδευση
8. Επώαση στους 70°C για 20 λεπτά.
9. Μετά την επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
10. Σε νέο tube, προσθήκη 300 μ L καθαρής αιθανόλης και 20 μ L μαγνητικών σφαιριδίων, ανάδευση
11. Προσθήκη 320 μ L από το βήμα 10 στο δείγμα (βήμα 9), απαλή ανάδευση
12. Ανακίνηση σε μέτρια ένταση για 5 λεπτά ώστε να προσδεθεί το DNA στα μαγνητικά σφαιρίδια
13. Σύντομη ανάδευση και απόρριψη της υγρής φάσης , αφού πρώτα τοποθετηθεί στο μαγνήτη για 2 λεπτά.
14. Απομάκρυνση του tube από το μαγνήτη και προσθήκη 500 μ L of Wash Buffer, ανάδευση για 1 λεπτό
15. Σύντομη φυγοκέντρηση, τοποθέτηση στο μαγνήτη για 2 λεπτά, απόρριψη της τγρής φάσης.
16. Απομάκρυνση του tube από το μαγνήτη και προσθήκη 1 mL Wash buffer., ανάδευση.

17. Σύντομη φυγοκέντρηση , τοποθέτηση στο μαγνήτη για 2 λεπτά, απόρριψη της τγρής φάσης.
18. Επανάληψη των βημάτων 16-17
19. Αφήνουμε το tube στο μαγνήτη και ανοίγουμε το καπάκι ώστε να στεγνώσει για 3 λεπτά.
20. Απομάκρυνση του tube από το μαγνήτη, προσθήκη 100 μ L Elution buffer, ανάδευση για 3 λεπτά.
21. Σύντομη φυγοκέντρηση ώστε να γίνει η συλλογή της υγρής φάσης σε καινούριο tube, μετά την τοποθέτηση στο μαγνήτη για 2 λεπτά. 23.
22. Αποθήκευση του δείγματος cfDNA στους 4 °C ή στους -20 °C or -80 °C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

5.2.3 Αξιολόγηση μεθόδου

Η συγκέντρωση του απομονωμένου DNA, η οποία εξαρτάται από τη σύσταση του δείγματος και τις συνθήκες αποθήκευσής του, μετρήθηκε στο Qubit και πρέπει να είναι περίπου 5 - 100 μ g DNA.

5.2.4 Επικύρωση μεθόδου

Διεξήχθη έλεγχος ικανότητας της μεθόδου όσον αφορά την αναπαραγωγιμότητα & επαναλαψιμότητα αυτής.

Διενεργήθηκαν οι παρακάτω πειραματικές διαδικασίες:

A)Επαναληψιμότητα

Ένα δείγμα (με κωδικό 5) απομονώθηκε την ίδια ημέρα εις διπλούν στα πλαίσια της ίδιας πειραματικής διαδικασίας.

Sample ID	User ID	Date	Time	Ng/ μ l
5_1	MX	26/09/2022	15:23 PM	70,8
5_2	MX	26/09/2022	15:23 PM	70,1

B)Αναπαραγωγιμότητα

Έγινε εκ νέου απομόνωση του δείγματος 5 στις 04/10/2022

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul
5_new	SA	04-10-22	11:18 PM	72,0

Και στις δύο περιπτώσεις τα αποτελέσματα ήταν εξαιρετικά και οι τιμές δεν έδειξαν σημαντικές αποκλίσεις.

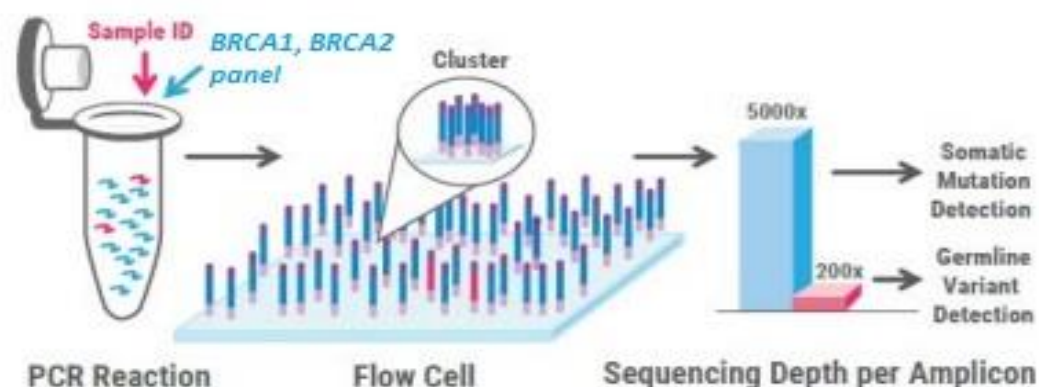
Κεφάλαιο 6

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΕ ΠΟΛΛΑΠΛΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΑΖΙΚΗΣ ΠΑΡΑΛΛΗΛΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ (NGS) ΣΕ ΠΛΑΤΦΟΡΜΑ MiSeq (ILLUMINA).

6.1 Διαγνωστική δοκιμασία ταυτόχρονης ανίχνευσης μεταλλάξεων στα γονίδια BRCA1, BRCA2 σχετιζόμενα με τον καρκίνο του μαστού, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της μαζικής παράλληλης αλληλούχησης νέας γενιάς με το BRCA1,2 Accel-Amplicon™ Panel.

6.1.1. Εισαγωγή

Η παρούσα εξέταση γίνεται σε δείγματα DNA τα οποία προέρχονται από αίμα EDTA tubes . Αφορά τον έλεγχο βιολογικών δειγμάτων για την πιθανή παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδια που αφορούν συγκεκριμένη κλινική ενότητα και συγκεκριμένα την προδιάθεση για καρκίνο του μαστού (Accel-Amplicon *BRCA1*, *BRCA2* Panel). (Εικόνα 6.1)



Εικόνα 6.1 : Accel-Amplicon *BRCA1*, *BRCA2* Panel

Διενεργείται άμεση ταυτοποίηση της πλήρους κωδικοποιούσας περιοχής των γονιδίων που αναφέρονται στο panel με τη μέθοδο στους μαζικής παράλληλης αλληλούχησης, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση τόσο γνωστών όσο και «πρωτότυπων» (novel) μεταλλάξεων (σημειακών, απαλοιφές/ενθέσεις μικρού μεγέθους) καθώς και την ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων αν αυξήσουμε το «βάθος διαβάσματος» (αυξημένο αριθμό reads).

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει επτά στάδια (Εικόνα 6.2) :

α) απομόνωση DNA Τα δείγματα που αφορούν την ανίχνευση γαμετικών μεταλλάξεων από ολικό αίμα ή κύτταρα παρειάς θεωρούνται αποδεκτά όταν έχουν συγκέντρωση ≥ 35 ng/mL και καθαρότητα OD260/280:1,8-1,9 & OD260/230:1,8-2,2. Ο προσδιορισμός συγκέντρωσης του δείγματος διεξάγεται αρχικά με χρήση του Nanodrop (συγκέντρωση και OD), ακολουθεί αραίωση στα 15-24ng/ul.

β) διαδικασία MULTIPLEX PCR

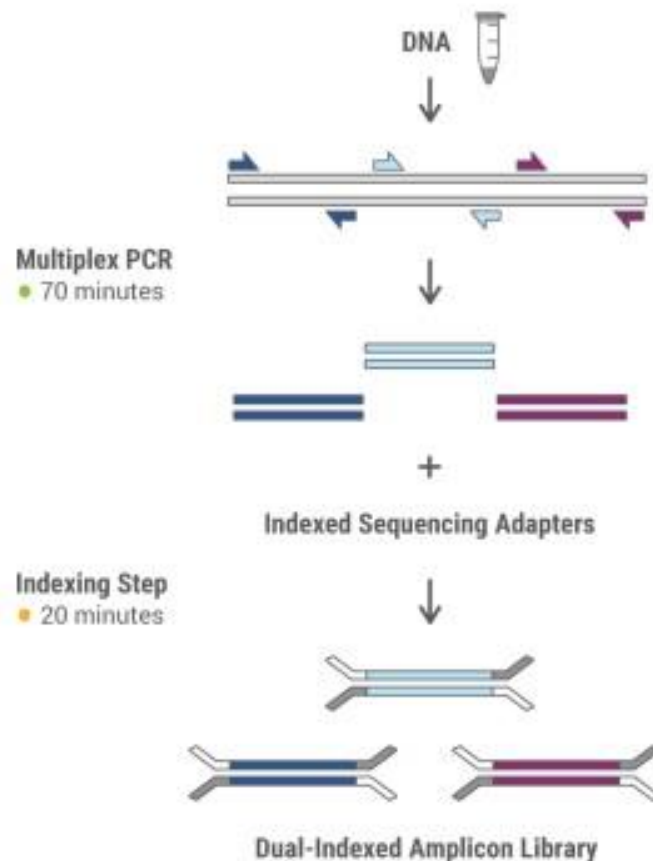
γ) διαδικασία καθαρισμού MULTIPLEX PCR αναφερόμενη ως SRI STEP 1

δ) διαδικασία εισαγωγής «κωδικών» (indices) στις βιβλιοθήκες που αντιστοιχούν στα δείγματα DNA (που έχουν παρασκευαστεί ανά δείγμα) αναφερόμενη ως INDEXING STEP

ε) διαδικασία καθαρισμού των προϊόντων του INDEXING STEP αναφερόμενη ως SRI STEP 2

στ) ποσοτικοποίηση βιβλιοθηκών στο Qubit με τη χρήση NEB Taq 2X Master Mix σύμφωνα με προτεινόμενο πρωτόκολλο από τον κατασκευαστή

ζ) Φόρτωση στο MiSeq χρησιμοποιώντας τα Reagent kits της Illumina, MiSeq V2-300, ακολουθώντας στους σχετικές οδηγίες των Accel Amplicon panels & της Illumina.



Εικόνα 6.2: Στάδια μεθόδου Accel-Amplicon Panel

6.1.2 ΜΕΘΟΔΟΣ Accel-Amplicon Panel

6.1.2.1. Διαδικασία PCR

Ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) διεξάγεται στον πάγκο PCR (χώρος «ελεύθερος» αμπλικονίων) on ice.
 2. Ξεπαγώνουμε τα αντιδραστήρια τα οποία περιλαμβάνονται στο Accel Amplicon Panel kit box ½ (Reagent G1, το οποίο αντιστοιχεί στο εξειδικευμένο primer set ανα panel, Reagent G2 & Enzyme G3*) on ice τα οποία ακολούθως υποβάλλονται σε σύντομη ανάδευση (vortex για 10-20 sec) & spin.
- * τα ένζυμα θα πρέπει να παραμένουν στον πάγο για τουλάχιστον 10 min πριν τη χρήση στους ώστε να μεγιστοποιείται η απόδοσή στους σύμφωνα με στους οδηγίες του κατασκευαστή.
3. Οι συνθήκες στους αντίδρασης παρατίθενται στον Πίνακα 6.1.

Πίνακας 6.1: Συνθήκες αντίδρασης PCR

Component	Volume x 1 BRCA (ul)
REAGENT G1	2,0
REAGENT G2	3,0
ENZYME G3	15,0
Total	20
ADD Genomic DNA (10-25ng)	10 **
FINAL Total	30

** η ρύθμιση του όγκου διεξάγεται με τη χρήση του pre-PCR TE, το οποίο περιλαμβάνεται στο kit

4. Βεβαιώνουμε ότι η πλάκα έχει «σφραγιστεί» στους αποφυγή εξάτμισης, ακολουθεί σύντομη ανάδευση (vortex) και φυγοκέντρωση για 10-20 δευτερόλεπτα (spin), ώστε να κατακαθίσουν τυχόν σταγονίδια που παρέμειναν στα τοιχώματα των wells.

5. Επιλέγουμε το κατάλληλο πρόγραμμα Πίνακας_6.2 για τη συγκεκριμένη αντίδραση σε οποιονδήποτε θερμικό κυκλοποιητή που αναφέρεται στην ενότητα, το ξεκινάμε και μόλις ο κυκλοποιητής πλησιάσει τη θερμοκρασία αποδιάταξης του 1^{ου} βήματος, τοποθετούμε στους αντιδράσεις.

Πίνακας_6.2.: Πρόγραμμα PCR

Θερμοκρασία °C	Χρόνος	Αριθμός Κύκλων
98° C	30 sec	1
98° C	10 sec	4 κύκλοι
63° C	5 min	
65° C	1 min	
98° C	10 sec	23 κύκλοι
64° C	1 min	
65° C	1 min	
4° C	Άμεση μετάβαση στο επόμενο βήμα ή άμεση αποθήκευση στους -20° C	1

6.1.2.2. 1^ο SRI STEP & INDEXING STEP Accel-Amplicon Panels

Ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

Λόγω του γεγονότος ότι τα Indexing mixes θα πρέπει να προστεθούν άμεσα στα «καθαρισμένα» προϊόντα στους multiplex PCR του 8.1.2.1 βήματος, παρασκευάζουμε πρώτα αυτά πριν προβούμε στο πρώτο βήμα καθαρισμού με AgenCourt XL AmPure beads.

1. Επιλογή των μοναδικών συνδυασμών Index D50X + Index D7XX για κάθε δείγμα (βιβλιοθήκη) ώστε να επιτευχθεί ο καλύτερος δυνατός συνδυασμός κωδικοποίησης των υπό έλεγχο δειγμάτων με τη βοήθεια του “sample sheet” του Illumina Experiment Manager. Κάθε φορά που ανοίγεται ένα καινούριο kit, παρασκευάζεται ένα plate με τους 96 διαφορετικούς συνδυασμούς των indexes, το οποίο επαρκεί για 2-3 runs.

2. Ξεπαγώνουμε τα αντιδραστήρια τα οποία περιλαμβάνονται στο Accel Amplicon Panel kit box 2/2 (BUFFER Y1, ENZYME Y2, ENZYME Y3, ENZYME Y4 * & INDICES D5/D7) on ice τα οποία ακολούθως υποβάλλονται σε σύντομη ανάδευση (vortex για 10-20 sec) & spin.

* τα ένζυμα θα πρέπει να παραμένουν στον πάγο για τουλάχιστον 10 min πριν τη χρήση στους ώστε να μεγιστοποιείται η απόδοσή τους σύμφωνα με τους οδηγίες του κατασκευαστή.

3. Οι συνθήκες της αντίδρασης που αφορούν το INDEXING STEP παρατίθενται στον Πίνακα 6.3. Τα Indexing master mixes φυλλάσσονται στον πάγο έως ότου ολοκληρωθεί το 1^ο SRI STEP.

Πίνακας 6.3: Συνθήκες αντίδρασης indexing step

Component	Volume x 1 BRCA 1,2 (ul)
BUFFER Y1	15,5μL
ENZYME Y2	0,5μL
ENZYME Y3	0,5μL
ENZYME Y4	1,0μL
Total	17,5μL

4. Βεβαιώνουμε ότι το διάλυμα των beads «έχει λάβει» θερμοκρασία δωματίου & είναι πλήρως ομογενοποιημένο πριν τη χρήση.
5. Προσθέτουμε 36ul BRCA από το διάλυμα των beads (αναλογία 1:2) σε κάθε αντίδραση των 30ul & ανακατεύουμε με χρήση του vortex.
6. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 min. Spin 1min.
7. Τοποθέτηση στον μαγνήτη για ~5min ή έως ότου το διάλυμα γίνει διαυγές (ώστε τα beads να έχουν πλήρως προσκολληθεί από τον μαγνήτη).
8. Απομάκρυνση υπερκείμενου (μπορούν να παραμείνουν ~5ul αυτού).
9. «Ξεπλένουμε» τα beads με 80% αιθανόλης (η οποία έχει παρασκευαστεί στη διάρκεια των παραπάνω βημάτων, ώστε να είναι «φρέσκια»). Συγκεκριμένα, όσο το plate στους είναι πάνω στο μαγνήτη προσθέτουμε 100ul 80% αιθανόλη σε κάθε well, επώαση σε RT για 30sec & ακολουθως απομάκρυνση αιθανόλης. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές.
10. Spin 1 min & απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιθανόλης από των πάτο των wells.
11. Πάνω στο μαγνήτη αφήνουμε το plate σε RT ώστε να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης αλλά προσοχή να μην «ξεραθούν» τα beads pellets.
12. Άμεσα προσθέτουμε σε κάθε well τον μοναδικό συνδυασμό των indices (5 μl Index D50X + 10 μl Index D7XX) από το παγωμένο indexing master mix.
13. Επαναδιάλυση των beads pellets στα παραπάνω μέσω ήπιου vortex.
14. Βεβαιώνουμε ότι πλάκα έχει «σφραγιστεί» στους αποφυγή εξάτμισης και επιλέγουμε το κατάλληλο πρόγραμμα (Πίνακας 6.4) για τη συγκεκριμένη αντίδραση στο θερμικό κυκλοποιητή EQ201, το ξεκινάμε και μόλις ο κυκλοποιητής πλησιάσει τη θερμοκρασία αποδιάταξης τοποθετούμε στους αντιδράσεις.

Πίνακας 6.4: Συνθήκες αντίδρασης indexing step

Θερμοκρασία °C	Χρόνος	Αριθμός Κύκλων
37° C	60 min**	1

*Σημείωση: LID HEATING OFF

** ο χρόνος επώασης έχει επεκταθεί στα 60 min για την αύξηση της απόδοσης της τελικής συγκέντρωσης των βιβλιοθηκών

6.1.2.3 2° SRI STEP Accel-Amplicon Panels

Ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Βεβαιώνουμε ότι το διάλυμα PEG NaCl (το οποίο περιλαμβάνεται στο kit) «έχει λάβει» θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση.
2. Προσθέτουμε 42.5ul από το διάλυμα PEG NaCl (αναλογία 0.85) σε κάθε αντίδραση των ~50ul & ανακατεύουμε με χρήση του vortex.
3. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 min. Spin 1min.
4. Τοποθέτηση στον μαγνήτη για ~5min ή έως ότου το διάλυμα γίνει διαυγές (ώστε τα beads να έχουν πλήρως προσκολληθεί από τον μαγνήτη).
5. Απομάκρυνση υπερκειμένου (μπορούν να παραμείνουν ~5ul αυτού).
6. «Ξεπλένουμε» τα beads με 80% αιθανόλης (η οποία έχει παρασκευαστεί στη διάρκεια των παραπάνω βημάτων, ώστε να είναι «φρέσκια»). Συγκεκριμένα, όσο το plate στους είναι πάνω στο μαγνήτη προσθέτουμε 100 ul 80% αιθανόλη σε κάθε well, επώαση σε RT για 30sec & ακολούθως απομάκρυνση αιθανόλης. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές.
7. Spin 1 min & απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιθανόλης από των πάτο των wells.
8. Πάνω στο μαγνήτη αφήνουμε το plate σε RT ώστε να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης αλλά προσοχή να μην «ξεραθούν» τα beads pellets.
9. Επαναδιαλύουμε τα beads pellets σε 12.5 ul post-TE (το οποίο περιλαμβάνεται στο kit) με vortex, spin 1 min.
10. Τοποθέτηση στον μαγνήτη για ~3min ή έως ότου το διάλυμα γίνει διαυγές (ώστε τα beads να έχουν πλήρως προσκολληθεί από τον μαγνήτη).
11. Μεταφορά υπερκειμένου (το οποίο περιέχει στους βιβλιοθήκες στους) σε καινούριο plate (ΠΡΟΣΟΧΗ να μην μεταφέρουμε beads).

6.1.3. Ποσοτικοποίηση Βιβλιοθηκών με Qubit (NEB Taq 2X Master Mix) σε όλες τις βιβλιοθήκες που προέρχονται από Germline DNA.

Ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Ξεπαγώνουμε τα αντιδραστήρια NEB Taq 2X Master Mix, P5 and P7 primer mix (6μM) , τα οποία ακολούθως υποβάλλονται σε σύντομη ανάδευση (vortex για 10-20 sec) & spin.
2. Οι συνθήκες στους αντίδρασης παρατίθενται στον Πίνακα 6.5.

Πίνακας 6.5: Συνθήκες αντίδρασης

POST PCR TE BUFFER	5,0 μL
--------------------	--------

P5/P7 6μM pr.mix	2,5μL
NEB Taq 2x Master Mix	12,5μL
20 μL mix + 5 μL SPPI from step2 eluate	

3. Βεβαιώνουμε ότι η πλάκα έχει «σφραγιστεί» στους αποφυγή εξάτμισης, ακολουθεί σύντομη ανάδευση (vortex) και φυγοκέντρωση για 10-20 δευτερόλεπτα (spin), ώστε να κατακαθίσουν τυχόν σταγονίδια που παρέμειναν στα τοιχώματα των wells.

4. Επιλέγουμε το κατάλληλο πρόγραμμα (πίνακας 6.6) για τη συγκεκριμένη αντίδραση στο θερμικό κυκλοποιητή, το ξεκινάμε και μόλις ο κυκλοποιητής πλησιάσει τη θερμοκρασία αποδιάταξης του 1^{ου} βήματος, τοποθετούμε στους αντιδράσεις.

Πίνακας 6.6: Πρόγραμμα NEB QUBIT

Θερμοκρασία °C	Χρόνος	Αριθμός Κύκλων
95° C	30 sec	1
95° C	20 sec	4 κύκλοι
60° C	30 sec	
68° C	1 min	
4° C		1

5.Βεβαιώνουμε ότι το διάλυμα των beads «έχει λάβει» θερμοκρασία δωματίου & είναι πλήρως ομογενοποιημένο πριν τη χρήση.

6. Προσθέτουμε 25 ul από το διάλυμα των beads (αναλογία 1:2) σε κάθε αντίδραση των 50ul & ανακατεύουμε με χρήση του vortex.

7. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 min. Spin 1min.

8. Τοποθέτηση στον μαγνήτη για ~5min ή έως ότου το διάλυμα γίνει διαυγές (ώστε τα beads να έχουν πλήρως προσκολληθεί από τον μαγνήτη).

9. Απομάκρυνση υπερκειμένου (μπορούν να παραμείνουν ~5ul αυτού).

10. «Ξεπλένουμε» τα beads με 80% αιθανόλης (η οποία έχει παρασκευαστεί στη διάρκεια των παραπάνω βημάτων, ώστε να είναι «φρέσκια»). Συγκεκριμένα, όσο το plate στους είναι πάνω στο μαγνήτη προσθέτουμε 200ul 80% αιθανόλη σε κάθε well, επώαση σε RT για 30sec & ακολουθως απομάκρυνση αιθανόλης. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές.

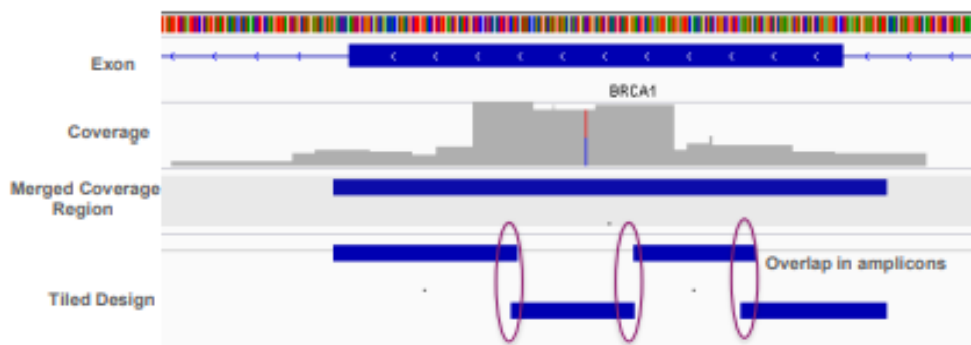
11. Spin 1 min & απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιθανόλης από των πάτο των wells.
 12. Πάνω στο μαγνήτη αφήνουμε το plate σε RT ώστε να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης αλλά προσοχή να μην «ξεραθούν» τα beads pellets.
 13. Επαναδιαλύουμε τα beads pellets σε 12.5 ul post-TE (το οποίο περιλαμβάνεται στο kit) με vortex, spin 1 min.
 14. Τοποθέτηση στον μαγνήτη για ~3min ή έως ότου το διάλυμα γίνει διαυγές (ώστε τα beads να έχουν πλήρως προσκολληθεί από τον μαγνήτη).
 15. Μεταφορά υπερκλειμένου (το οποίο περιέχει στους βιβλιοθήκες στους) σε καινούριο plate (ΠΡΟΣΟΧΗ να μην μεταφέρουμε beads).
- Ποσοτικοποίηση των βιβλιοθηκών με Qubit σύμφωνα με στους οδηγίες του κατασκευαστή.

6.1.4 Φόρτωμα στο MiSeq χρησιμοποιώντας το Reagent kit στους Illumina

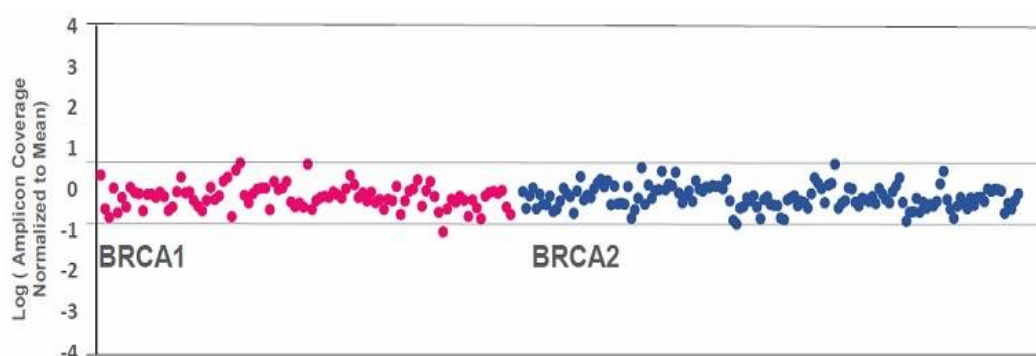
Ανάμιξη βιβλιοθηκών (δειγμάτων) ώστε να έχει το καθένα 14nM τελική συγκέντρωση & λαμβάνοντας υπόψη την επιθυμητή κάλυψη ανά panel και προσθήκη 1% PhiX Illumina control. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση ανίχνευσης γαμετικών μεταλλάξεων είναι επιθυμητή η επίτευξη average coverage 20X, για την ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων σε ιστό 5000X. Τοποθέτηση στην προσδιορισμένη θέση του Reagent kit κατόπιν ξεπαγώματος αυτού σε RT για 4h.

6.1.5 ΑΝΑΛΥΣΗ – Αξιολόγηση & ερμηνεία αποτελεσμάτων

Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι ότι έχουμε πλήρη κάλυψη των γονιδίων (*Complete coverage*) (Εικόνα 6.3) και υψηλής ομοιομορφίας κάλυψη (*High coverage uniformity*). (Εικόνα 6.4)



Εικόνα 6.3: Πλήρης κάλυψη των γονιδίων (*Complete coverage*)



Εικόνα 6.4: Υψηλής ομοιομορφίας κάλυψη (*High coverage uniformity*)

Η αξιολόγηση και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων γίνεται με την εξαγωγή των FastQ αρχείων & τον έλεγχο των ποιοτικών παραμέτρων του “run” μέσω του αντίστοιχου προγράμματος του MiSeq (βλέπε Πίνακα 6.7.-ποιοτικών κριτηρίων MiSeq run). Αν οι ποιοτικές παράμετροι είναι αποδεκτές, προβαίνουμε σε περαιτέρω ανάλυση των αρχείων με ένα προγράμματα ανάλυσης δεδομένων μαζικής παράλληλης αλληλούχισης (Next Gene).

Πίνακας 6.7 Ποιοτικά κριτήρια αξιολόγησης MiSeq run

Cluster density	Up to 1200 (v2 chemistry) ¹
Clusters passing filter (PF%)	≥75% ²
≥Q30	≥80%*

¹Σημείωση το cluster density επιτρέπουμε σαν εργαστήριο να φτάνει μέχρι το ~1400 k/mm²

Η Illumina εγγυάται ότι στα 1200 k/mm² θα πληρούνται τα ποιοτικά κριτήρια MiSeq run. Σαν εργαστήριο από τα runs μας έχουμε παρατηρήσει ότι στα 1400 k/mm² δεν παρουσιάζεται overcluster, το Q30 είναι αποδεκτό όπως και τα δεδομένα βαθμού κάλυψης (coverage- βλ. πίνακα 17 των ποιοτικών κριτηρίων αποδοχής δειγμάτων κατόπιν ανάλυσης). Συνεπώς λαμβάνουμε το ρίσκο να συμβεί overcluster καθώς θεωρούμε ότι μας δίνονται περισσότερα data.

Τα runs στα οποία το cluster passing filter είναι κάτω από 75% έχει θεσπιστεί εξονυχιστικός έλεγχος κάθε δείγματος για την πλήρωση κριτηρίων βαθμού κάλυψης. Αν δεν πληροί τα κριτήρια η διαδικασία αλληλούχησης επαναλαμβάνεται.

Τα δείγματα με ευρήματα, δηλαδή ανίχνευση παθογόνου ή πιθανώς παθογόνου μετάλλαξης, υποβάλλονται εκ νέου σε εξαγωγή γενετικού υλικού από δεύτερο ανεξάρτητο δείγμα και ακολούθως υποβάλλονται σε αλληλούχηση κατά Sanger της γενωμικής περιοχής όπου εντοπίζεται η παθογόνος/πιθανώς παθογόνος μετάλλαξη προς επιβεβαίωση των ευρημάτων. Σε περίπτωση μη ανίχνευσης παθογόνων μεταλλάξεων στα πλαίσια ενός run, υποβάλλονται στην παραπάνω διαδικασία τυχαία δείγματα που φέρουν ήπιες μεταλλάξεις. Ως εκ τούτου επιβεβαιώνεται η ορθότητα της γονοτύπησης (δεν έλαβε χώρα sample mix up & δεν υπάρχει συστηματική επιμόλυνση) στα πλαίσια του εκάστοτε NGS run.

6.1.6. Επικύρωση μεθόδου

Αξιολόγηση ικανότητας ορθής γονοτύπησης καθώς και επίτευξης του ορίου ανίχνευσης που αναφέρει ο κατασκευαστής του υπό έλεγχο panel, Accel-Amplicon™ BRCA1, BRCA2 Panel.

Όσον αφορά την ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε gDNA, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα γνωστού γονοτύπου από την εταιρεία (<https://catalog.coriell.org/>), τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 6.10.

Πίνακας 6.10: Δείγματα Coriell

ID Δείγματος	Γονότυπος (HGVS nomenclature)
NA13715*2=COR28	ετερόζυγο: 5382insC (BRCA1 x20)
NA14634*1=COR30	ετερόζυγο: 4184del4 (BRCA1 x11)
NA14094*1=COR38	ετερόζυγο: 1294del40 (codons 392-405) (BRCA1 x11)

Συνεπώς, διεξήχθη το run το οποίο περιελάμβανε 3 Coriell δείγματα & 4 «πραγματικά» δείγματα και είχε ως στόχο να επιβεβαιώσει

- i) την ακρίβεια δηλ. την ικανότητα ορθής γονοτύπησης του Accel-Amplicon™ BRCA1, BRCA2 Panel
- ii) την επίτευξη των προδιαγραφών που θέτει ο κατασκευαστής στο χώρο του εργαστηρίου μας : “on target percentage” >95%

Οι παραπάνω στόχοι επετεύχθησαν με 100% επιτυχία.

- i) Οι γονότυποι όλων των «γνωστών» δειγμάτων επιβεβαιώθηκαν (πίνακας 6.11.).

Πίνακας 6.11.: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ SWIFT BRCA RUN

ΔΕΙΓΜΑ	Aligned reads (%)	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ (ως προς την παρουσία παθογόνου μετάλλαξης)
COR28	98.776%	ετερόζυγο: NM_007298.3: c.1954_1955insC
COR30	99.449%	ετερόζυγο: NM_007298.3: c.788-434_788-431delTCAA
COR38	96.764%	ετερόζυγο: NM_007298.3: c.787+388_787+427del40
28786	99.348%	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
28824	99.333%	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
28889	99.039%	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
28967	99.156%	ΑΡΝΗΤΙΚΟ

- ii) Οι προδιαγραφές του κατασκευαστή όσον αφορά την παράμετρο “on target percentage” >95% επετεύχθησαν όπως φαίνεται στον πίνακα 18.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ-ΟΡΘΟΤΗΤΑ: Για καθαρά ποιοτικές δοκιμές απαιτείται ανάλυση των αρνητικών και θετικών δειγμάτων από διαφορετικούς αναλυτές και σε έξι (6) διαφορετικές ημέρες.

Πίνακας 6.12.: Αναπαραγωγιμότητα μεθόδου

ΔΕΙΓΜΑ ΤΑ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΒΑΣΕΙ 1 ^Η ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 30/08/2021 RUN COMPLETED	2 ^Η 14/09/2021 RUN COMPLETE D	3 ^Η 07/10/2021 RUN COMPLETE D ANALYST A	4 ^Η 07/10/2021 RUN COMPLETE D ANALYST B	5 ^Η 17/10/2021 RUN COMPLETE D ANALYST A	6 ^Η 17/10/2021 RUN COMPLETE D ANALYST B
--------------	---	--	---	---	---	---

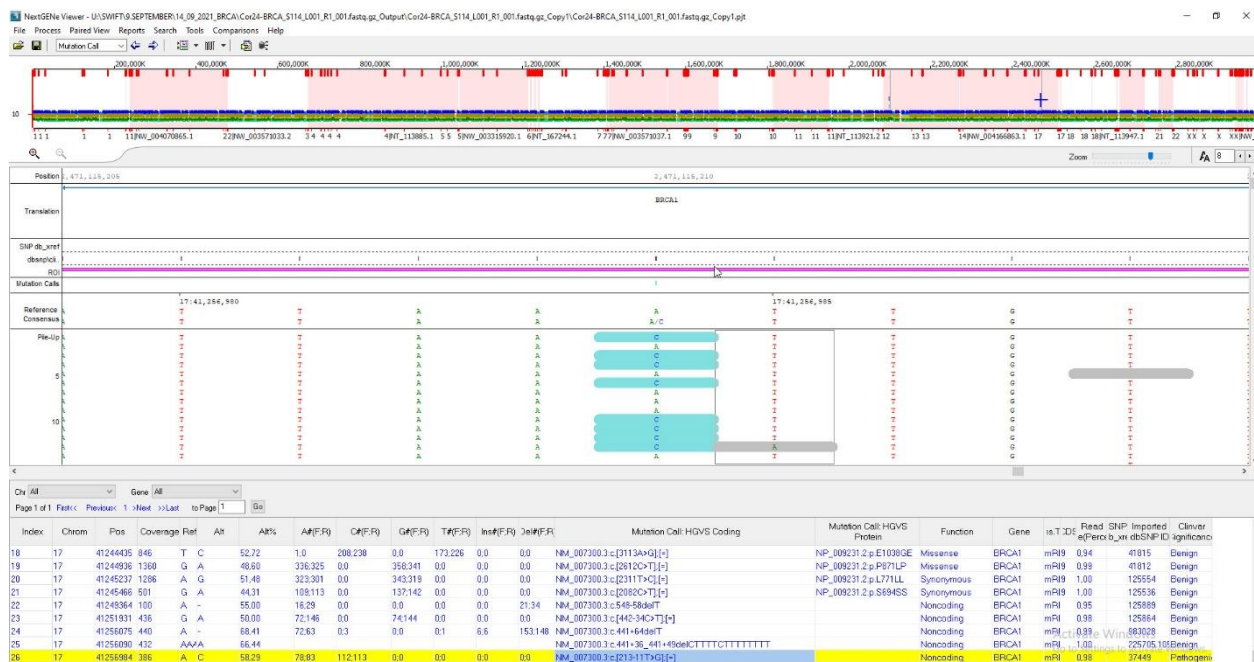
83397-BRCA	HET c.4327C>T (p.Arg1443Ter) of the BRCA1 gene (NM_007300.4)	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ
83527-BRCA	HET c.5576_5579 delTTAA (p.Ile1859LysfsTer3) of the BRCA2 gene (NM_000059.4)	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ
83526-BRCA	HET c.7180A>T (p.Arg2394Ter) of the BRCA2 gene (NM_000059.4)	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ
83134-BRCA	Δεν ανιχνεύθηκε παθογόνος μετάλλαξη	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ
83133-BRCA	Δεν ανιχνεύθηκε παθογόνος μετάλλαξη	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΕ Ο ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ MUTANT ALLELE FREQUENCY ΣΤΟ ΕΥΡΟΣ 40-50% ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ

Πίνακας 6.13.: Ορθότητα μεθόδου

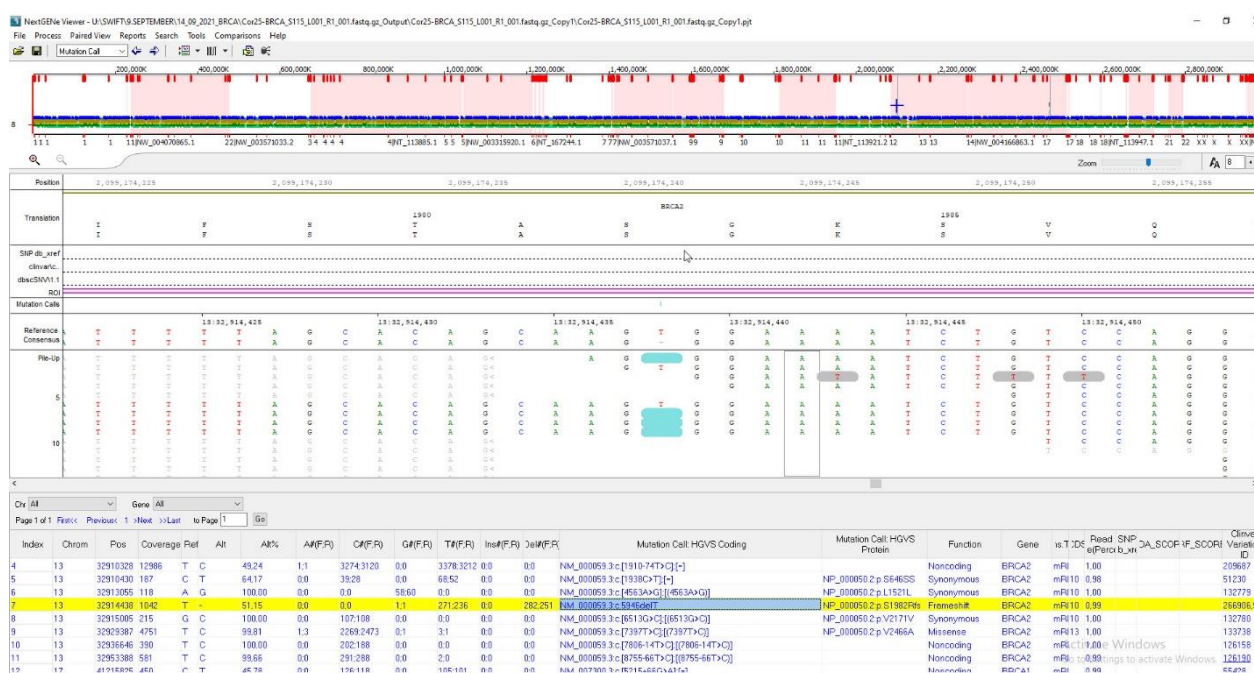
Ορθότητα (trueness):

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ ΒΑΣΕΙ CORRIEL BANK	RUN
Cor24-BRCA	BRCA1 332-11T>G HET (AF:51%)	8-10/9/2021
Cor25-BRCA	BRCA2 6174delT HET (AF:58%)	8-10/9/2021

Cor24-BRCA



Εικόνα 6.5: Ανάλυση μεταλλάξεων του Cor24



Εικόνα 6.6: Ανάλυση μεταλλάξεων του Cor25

6.2. Διαγνωστική δοκιμασία ταυτόχρονης ανίχνευσης μεταλλάξεων σε 94 γονίδια σχετιζόμενα με τον κληρονομικό καρκίνο χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της μαζικής παράλληλης αλληλούχισης νέας γενιάς με τη μέθοδο Trusight Cancer Illumina.

6.2.1. Εισαγωγή

Η πειραματική διεργασία ξεκινάει με την εκχύλιση ολικού γενωμικού DNA από το προσκομισθέν δείγμα ολικού αίματος με χρήση NucleoSpin® Tissue kit (Macherey & Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια ενισχύονται οι περιοχές του επιλεγμένου πίνακα γονιδίων (TruSight Cancer gene panel) προς αλληλούχιση σε πλατφόρμα "Next Generation Sequencing" MiSeq (Illumina) (94 γονίδια και 284 SNPs) (Πίνακας 6.1) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ
AIP	Pituitary adenoma, familial isolated	AD
ALK	Neuroblastoma	AD
APC	Gardner syndrome, Desmoid disease, hereditary, Familial adenomatous polyposis	AD
ATM	Breast cancer, Ataxia-Telangiectasia	AD/AR
BAP1	Tumor predisposition syndrome	AD
BLM	Bloom syndrome	AR
BMPR1A	Polyposis, juvenile intestinal	AD
BRCA1	Pancreatic cancer, Breast-ovarian cancer, familial	AD
BRCA2	Fanconi anemia, Medulloblastoma, Glioma susceptibility, Pancreatic cancer, Wilms tumor, Breast-ovarian cancer, familial	AD/AR
BRIP1	Fanconi anemia, Breast cancer	AD/AR
BUB1B	Mosaic variegated aneuploidy syndrome, Premature chromatid separation trait	AD/AR
CDC73	Carcinoma, parathyroid, Hyperparathyroidism, Hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome	AD
CDH1	CDH1-related cancer, Blepharochelodonic syndrome 1	AD
CDK4	Melanoma, cutaneous malignant	AD
CDKN1C	Beckwith-Wiedemann syndrome, IMAGE syndrome	AD
CDKN2A	Melanoma, familial, Melanoma-pancreatic cancer syndrome	AD
CEBPA	Acute myeloid leukemia, familial	AD
CEP57	Mosaic variegated aneuploidy syndrome	AR
CHEK2	Li-Fraumeni syndrome	AD/AR
CYLD	Spiegler-Brooke syndrome, Trichoepithelioma, multiple, Cylindromatosis	AD
DDB2	Xeroderma pigmentosum	AR
DICER1	DICER1 syndrome	AD
DIS3L2	Perlman syndrome	AR
EGFR	Lung cancer, familial, susceptibility to, Inflammatory skin and bowel disease, neonatal, Acute myeloid leukemia, familial	AD/AR
EPCAM	Diarrhea 5, with tufting enteropathy, congenital, Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis	AD/AR
ERCC2	Xeroderma pigmentosum, Trichothiodystrophy, photosensitive, Cerebrooculofacioskeletal syndrome 2	AR
ERCC3	Xeroderma pigmentosum, Trichothiodystrophy, photosensitive	AR
ERCC4	Fanconi anemia, Xeroderma pigmentosum, XFE progeroid syndrome	AR
ERCC5	Xeroderma pigmentosum, Xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome	AR
EXT1	Multiple cartilaginous exostoses 1	AD
EXT2	Multiple cartilaginous exostoses 2	AD
EZH2	Weaver syndrome	AD
FANCA	Fanconi anemia	AR
FANCB	Fanconi anemia	XL

FANCC	Fanconi anemia	AR
FANCD2	Fanconi anemia	AR
FANCE	Fanconi anemia	AR
FANCF	Fanconia anemia	AR
FANCG	Fanconi anemia	AR
FANCI	Fanconi anemia	AR
FANCL	Fanconi anemia	AR
FANCM	Fanconi anemia	AR
FH	Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer	AD/AR
FLCN	Birt-Hogg-Dube syndrome, Pneumothorax, primary spontaneous	AD
GATA2	Myelodysplastic syndrome, Chronic neutropenia associated with monocytopenia, evolving to myelodysplasia and acute myeloid leukemia, Acute myeloid leukemia, Emberger syndrome, Immunodeficiency	AD
GPC3	Simpson-Golabi-Behmel syndrome	XL
HNF1A	Maturity onset diabetes of the young, Renal cell carcinoma, nonpapillary clear cell, Liver adenomatosis	AD
HRAS	Costello syndrome, Congenital myopathy with excess of muscle spindles	AD
KIT	Gastrointestinal stromal tumor, Piebaldism	AD
MAX	Pheochromocytoma	AD
MEN1	Hyperparathyroidism, familial primary, Multiple endocrine neoplasia	AD
MET	Deafness, Renal cell carcinoma, papillary, Osteofibrous dysplasia, susceptibility to	AD/AR
MLH1	Muir-Torre syndrome, Endometrial cancer, Mismatch repair cancer syndrome, Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis	AD/AR
MSH2	Muir-Torre syndrome, Endometrial cancer, Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis,, Mismatch repair cancer syndrome	AD/AR
MSH6	Endometrial cancer, Mismatch repair cancer syndrome, Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis	AD/AR
MUTYH	Familial adenomatous polyposis,, Colorectal adenomatous polyposis, with pilomatricomas	AR
NBN	Breast cancer, Nijmegen breakage syndrome	AD/AR
NF1	Watson syndrome, Neurofibromatosis, Neurofibromatosis-Noonan syndrome	AD
NF2	Schwannomatosis, Neurofibromatosis	AD
NSD1	Sotos syndrome, Weaver syndrome, Beckwith-Wiedemann syndrome	AD
PALB2	Fanconi anemia, Pancreatic cancer, Breast cancer	AD/AR
PHOX2B	Central hypoventilation syndrome, congenital, Neuroblastoma, susceptibility to, Neuroblastoma with Hirschsprung disease	AD
PMS1	Hereditary nonpolyposis colon cancer	AD/AR
PMS2	Mismatch repair cancer syndrome, Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis	AD/AR
PRF1	Lymphoma, non-Hodgkin, Aplastic anemia, adult-onset, Hemophagocytic lymphohistiocytosis	AR
PRKAR1A	Myxoma, intracardiac, Acrodysostosis, Pigmented nodular adrenocortical disease, Carney complex	AD
PTCH1	Basal cell nevus syndrome	AD
PTEN	Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome, Lhermitte-Duclos syndrome, Cowden syndrome	AD
RAD51C	Fanconi anemia, Breast-ovarian cancer, familial	AD/AR
RAD51D	Ovarian cancer, familial	AD
RB1	Retinoblastoma	AD
RECQL4	Baller-Gerold syndrome, RAPADILINO syndrome, Rothmund-Thomson syndrome	AR
RET	Hirschsprung disease, Central hypoventilation syndrome, congenital, Pheochromocytoma, Medullary thyroid carcinoma, Multiple endocrine neoplasia	AD/AR
RHBDF2	Tylosis with esophageal cancer	AD
RUNX1	Platelet disorder, familial, with associated myeloid malignancy	AD
SBDS	Aplastic anemia, Shwachman-Diamond syndrome, Severe spondylometaphyseal dysplasia	AD/AR
SDHAF2	Paragangliomas	AD
SDHB	Paraganglioma and gastric stromal sarcoma, Pheochromocytoma, Gastrointestinal stromal tumor, Paragangliomas, Cowden-like syndrome	AD
SDHC	Paraganglioma and gastric stromal sarcoma, Gastrointestinal stromal tumor, Paragangliomas	AD
SDHD	Paraganglioma and gastric stromal sarcoma, Pheochromocytoma, Paragangliomas, Carcinoid tumors, intestinal, Cowden syndrome, Mitochondrial complex II deficiency	AD
SLX4	Fanconi anemia	AR
SMAD4	Juvenile polyposis/hereditary hemorrhagic telangiectasia syndrome, Polyposis, juvenile intestinal, Myhre dysplasia, Hereditary hemorrhagic telangiectasia	AD

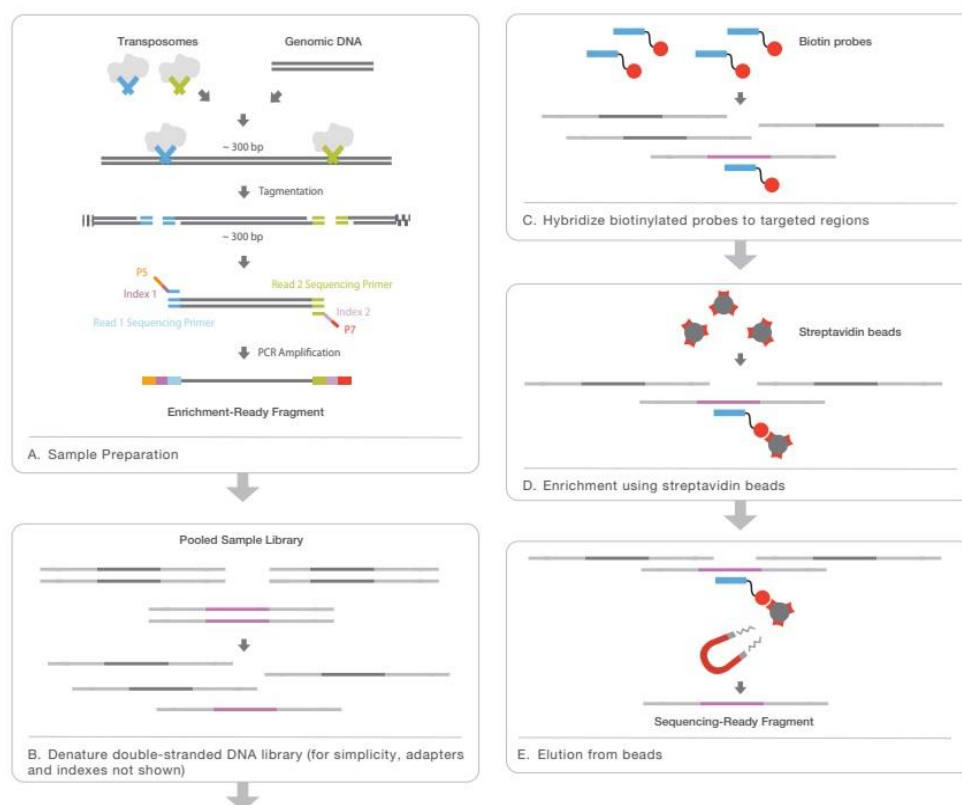
SMARCB1	Schwannomatosis, Rhabdoid tumor predisposition syndrome, Coffin-Siris syndrome 3	AD
STK11	Peutz-Jeghers syndrome	AD
SUFU	Medulloblastoma, Basal cell nevus syndrome	AD
TMEM127	Pheochromocytoma	AD
TP53	Colorectal cancer, Li-Fraumeni syndrome, Ependymoma, intracranial, Choroid plexus papilloma, Breast cancer, familial, Adrenocortical carcinoma, Osteogenic sarcoma, Hepatoblastoma, Non-Hodgkin lymphoma	AD
TSC1	Lymphangiomyomatosis, Tuberous sclerosis	AD
TSC2	Lymphangiomyomatosis, Tuberous sclerosis	AD
VHL	Erythrocytosis, familial, Pheochromocytoma	AD/AR
WRN	Werner syndrome	AR
WT1	Denys-Drash syndrome, Frasier syndrome, Wilms tumor, Nephrotic syndrome, type 4	AD
XPA	Xeroderma pigmentosum	AR
XPC	Xeroderma pigmentosum	AR

Πίνακας 6.1.: Λίστα 94 γονιδίων (AD: Autosomal Dominant, AR: Autosomal Recessive, XL: X-Linked

)

6.2.2 Μέθοδος

Η μέθοδος περιλαμβάνει την ενίσχυση των περιοχών των γονιδίων του πάνελ προς αλληλούχιση (Capture Workflow, Trusight cancer panel). (Εικόνα 6.7)



Εικόνα 6.7.: Capture Workflow

1. Τήξη του γενωμικού DNA

- Ποσοτικοποίηση του DNA χρησιμοποιώντας το Qubit.

- Σε μία καινούρια πλάκα προσθέτουμε τα παρακάτω:
Normalized gDNA (5 μ l των 5 λ /γ)
TD (12.5 μ l) ήπια ανάδευση 3-5times, στιγμιαία φυγοκέντρηση
TDE1 (7.5 μ l) ήπια ανάδευση 3-5times, στιγμιαία φυγοκέντρηση
- Ανακίνηση στα at 1800 για 1 λεπτό
- Φυγοκέντρηση στα 280 $\times$ g για ένα λεπτό
- Τοποθέτηση στους 58°C για 10 λεπτά (microheating system) με κλειστό το καπάκι, αφού πρώτα έχει προθερμανθεί στους 58°C
- Προσθήκη 7.5 μ l ST
- Ανακίνηση στα at 1800 για 1 λεπτό
- Φυγοκέντρηση στα 280 $\times$ g για ένα λεπτό
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 λεπτά

2.Clean up Tagmented DNA

- Προσθήκη 32.5 μ l SPB (FALCON 15ML)
- Ανακίνηση στα at 1800 για 1 λεπτό
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 8 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στα 280 $\times$ g για ένα λεπτό
- Τοποθέτηση σε μαγνήτη για περίπου 2 λεπτά (μέχρι το υπερκείμενο να είναι καθαρό)
- Απόρριψη υπερκείμενου
- Πλύσεις 2 φορές με 150 μ L αιθανόλη 80%
- αφαίρεση εναπωμείαντος αιθανόλης με μία πιπέτα 2-20 μ L
- Στέγνωμα των μαγνητικών σφαιριδίων πάνω στο μαγνήτη για 10 λεπτά
- Απομάκρυνση από τον μαγνήτη
- Προσθήκη 12.5 μ l RSB
- Ανακίνηση στα 1800 rpm για 1 λεπτό

- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στα 280 × g για ένα λεπτό
- Τοποθέτηση στο μαγνήτη μέχρι να καθαρίσει το υπερκείμενο
- Μεταφορά 10 μl υπερκειμένου σε καινούρια wells (5μl+5μl)

3. Amplify Tagmented DNA

- Προσθήκη 2,5 μl από το Index adapter 1 (σε όλα τα δείγματα 5.01)
- Προσθήκη 2,5 μl από το Index adapter 2 (πχ 7.01, 7.02) (κάθε δείγμα θα πρέπει να έχει ένα μοναδικό συνδυασμό 5-7)
- Προσθήκη 10 μl NLM
- Ανακίνηση στα 1200 rpm για 1 λεπτό
- Φυγοκέντρηση στα 280 × g για ένα λεπτό
- Τοποθέτηση στο θερμικό κυκλοποιητή στο «NLM AMP program»
PROGRAM/REACT VOL. =25/COV. TEMP=100/ 26'

SAFE STOPPING POINT (-25°C to -15°C for up to 14 days)

4. Clean Up Amplified DNA

- Φυγοκέντρηση στα 280 × g για ένα λεπτό
- Προσθήκη 45 μl SPB (FALCON 15ML)
- Ανακίνηση στα 1800 rpm για 1 λεπτό
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 minutes
- Φυγοκέντρηση στα 280 × g για ένα λεπτό
- Τοποθέτηση στο μαγνήτη μέχρι το υπερκείμενο να είναι καθαρό
- Απορρίψη του υπερκειμένου
- Πλύση 2 φορές με 150 μl 80% αιθανόλη
- Χρήση μιας πιπέτας 2- 20 μl για την απομάκρυνση της αιθανόλη

- Στέγνωμα στο μαγνήτη για 10 λεπτά
- Προσθήκη 14 μ l RSB
- Ανακίνηση στα 1800 rpm για 1 λεπτό
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στα $280 \times g$ για ένα λεπτό
- Τοποθέτηση στο μαγνήτη μέχρι το υπερκείμενο να είναι καθαρό
- Μεταφορά 12,5 μ l υπερκειμένου (6.25+6.25)
- Ποσοτικοποίηση των βιβλιοθηκών με Qubit (1 μ l δείγματος + 9 μ l RSB)
(STOCK~50, για να έχω 500ng, 500/stock)

5. Hybridize Probes (2ND DAY)

- Συνδυασμός 500 ng από κάθε βιβλιοθήκη. Για συνολικό όγκο μικρότερο από < 20 μ l, συμπληρώνουμε μέχρι τα 20 μ L RSB
- Προσθήκη σε καινούρια πλάκα: DNA library pool (20 μ l), EHB (25 μ l), CSO (5 μ l) -TCO (Trusight Cancer Oligos)
- Ανακίνηση στα 1200rpm για 1 λεπτό
- Φυγοκέντρηση στα $280 \times g$ για ένα λεπτό
- Τοποθέτηση στο θερμικό κυκλοποιητή (NRC HYB program, 2h VOL=50 COV TEMP=100°C), όπου θα πρέπει να μείνει στους 58°C για 90min-24h

6. Capture Hybridized Probes

- Φυγοκέντρηση στα $280 \times g$ για ένα λεπτό
- Προσθήκη 125 μ l SMB (2ml tube)
- Ανακίνηση στα 1200 rpm για 5 λεπτά
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 25 λεπτά (EWS)
- Φυγοκέντρηση στα $280 \times g$ για ένα λεπτό

- Τοποθέτηση στο μαγνήτη μέχρι το υπερκείμενο να είναι καθαρό
- Απόρριψη υπερκειμένου
- Απομάκρυνση από τον μαγνήτη
- Πλύση 2 2 φορές με 100 μ l EWS (ΚΛΙΒΑΝΟΣ)
- Προσθήκη 13 μ l (14.25 μ l EE1 και 0,75 μ l 2 N NaOH αφού πρώτα τα αναμείξουμε μεταξύ τους, ανάδευση)
- Ανακίνηση στα 1800 rpm για 2 λεπτά
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στα 280 $\times$ g για ένα λεπτό
- Τοποθέτηση στο μαγνήτη μέχρι το υπερκείμενο να είναι καθαρό
- Μεταφορά 11 μ l υπερκειμένου (5.5+5.5)
- Προσθήκη 2 μ l ET2
- Ανακίνηση στα 1200 rpm για 1 λεπτό
- Φυγοκέντρηση στα 280 $\times$ g για ένα λεπτό
SAFE STOPPING POINT (-25°C to -15°C for up to 7 days).

7. Perform Second Hybridization

- Προσθήκη RSB (7.5 μ l), EHB (25 μ l), CSO (5 μ l)
- Ανακίνηση στα 1200 rpm για 1 λεπτό
- Φυγοκέντρηση στα 280 $\times$ g για ένα λεπτό
- Τοποθέτηση στο θερμικό κυκλοποιητή (NRC HYB) , όπου θα πρέπει να παραμείνει στους 58°C το λιγότερο για 16 ώρες μέχρι και 24 ώρες (VOL=50 μ l, COV. TEMP=100°C)

8. Perform Second Capture 3RD DAY

- Φυγοκέντρηση στα 280 $\times$ g για ένα λεπτό
- Προσθήκη 125 μ l SMB (2ml tube)

- Ανακίνηση στα 1200 rpm για 5 λεπτά
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 25 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στα $280 \times g$ για ένα λεπτό
- Τοποθέτηση στο μαγνήτη μέχρι το υπερκείμενο να είναι καθαρό
- Απόρριψη υπερκειμένου
- Απομάκρυνση από τον μαγνήτη
- Πλύση 2 φορές με 100 μ l EWS.
- Προσθήκη 13 μ l (14.25 μ l EE1 και 0.75 μ l 2 N NaOH, αφού πρώτα έχουν αναμιχθεί)
- Ανακίνηση στα 1800 rpm για 2 λεπτά
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στα $280 \times g$ για ένα λεπτό
- Τοποθέτηση στο μαγνήτη μέχρι το υπερκείμενο να είναι καθαρό
- Μεταφορά 11 μ l υπερκειμένου (5.5+5.5)
- Προσθήκη 2 μ l ET2.
- Ανακίνηση στα 1800 rpm για 1 λεπτό
- Φυγοκέντρηση στα $280 \times g$ για ένα λεπτό

9. Clean Up Captured Library

- Προσθήκη 22.5 μ l SPB (FALCON 15ML)
- Ανακίνηση στα 1800 rpm για 1 λεπτό
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στα $280 \times g$ για ένα λεπτό
- Τοποθέτηση στο μαγνήτη μέχρι το υπερκείμενο να είναι καθαρό

- Απόρριψη του υπερκειμένου
- Πλύση 2 φορές με 150 μl 80% αιθανόλη
- Χρήση μιας πιπέτας 2- 20 μl για την απομάκρυνση της αιθανόλη
- Στέγνωμα στο μαγνήτη για 10 λεπτά
- Προσθήκη 14 μl RSB.
- Ανακίνηση στα 1800 rpm για 1 λεπτό
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στα 280 × g για ένα λεπτό
- Τοποθέτηση στο μαγνήτη μέχρι το υπερκείμενο να είναι καθαρό
- Μεταφορά 13 μl υπερκειμένου (6.25+6.25)

SAFE STOPPING POINT (-25°C to -15°C for up to 7 days)

10. Amplify Enriched Library

- Προσθήκη 2.5 μl PPC
- Προσθήκη 10 μl NEM
- Ανακίνηση στα 1200 rpm για 1 λεπτό
- Φυγοκέντρηση στα 280 × g για ένα λεπτό
- Τοποθέτηση σε θερμικό κυκλοποιητή (NEM AMP12)

SAFE STOPPING POINT (2°C to 8°C for up to 2 days)

11. Clean Up Amplified Enriched Library

- Φυγοκέντρηση στα 280 × g για ένα λεπτό
- Προσθήκη 45 μl SPB (FALCON 15ML)
- Ανακίνηση στα 1800 rpm για 1 λεπτό
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά

- Φυγοκέντρωση στα 280 × g για ένα λεπτό
- Τοποθέτηση στο μαγνήτη μέχρι το υπερκείμενο να είναι καθαρό
- Απόρριψη του υπερκειμένου
- Πλύση 2 φορές με 150 μl 80% αιθανόλη
- Χρήση μιας πιπέτας 2- 20 μl για την απομάκρυνση της αιθανόλη
- Στέγνωμα στο μαγνήτη για 10 λεπτά
- Προσθήκη 16 μl RSB.
- Ανακίνηση στα 1800 rpm για 1 λεπτό
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά
- Φυγοκέντρωση στα 280 × g για ένα λεπτό,
- Τοποθέτηση στο μαγνήτη μέχρι το υπερκείμενο να είναι καθαρό
- Μεταφορά 14 μl υπερκειμένου (7+7με πολύ προσοχή!)

SAFE STOPPING POINT (-25°C to -15°C for up to 7 days.)

Check Enriched Libraries - Loading

- Ποσοτικοποίηση με Qubit, αφού πρώτα κάνω μία αραίωση 1:10 της βιβλιοθήκης με διάλυμα RSB.
- Φόρτωση στο MiSeq χρησιμοποιώντας το Reagent kit της Illumina

6.2.3 Βιοπληροφορική ανάλυση

Διεξήχθη “Pre-Alignment QC” διαδικασία η οποία περιλαμβάνει απομάκρυνση των νουκλεοτιδίων με χαμηλή βαθμολογία "(Phred <30. Phred> 30 εξασφαλίζει ότι η πιθανότητα αναγνώρισης λανθασμένης βάσης είναι <1/1000, δηλ.> 99,9% είναι σωστή).

Τα ανεπεξέργαστα δεδομένα της αλληλούχησης ευθυγραμμίστηκαν με την αλληλουχία αναφοράς του ανθρώπινου γονιδιώματος (GRCh37) χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Burrows-Wheeler Aligner (BWA-MEM) και προέκυψαν BAM files. Στη συνέχεια ακολούθησε διαδικασία “Post-alignment QC” & “Coverage Analysis”. Έγινε ανίχνευση

των μεταλλάξεων (υποκαταστάσεις βάσεων & απαλοιφές/ενθέσεις μικρού αριθμού βάσεων) με χρήση του αλγόριθμου Genomic Analysis Tool (GATK).

Η ανάλυση των ανεπεξέργαστων δεδομένων του MLPA διεξήχθη χρησιμοποιώντας το Coffalyser.Net, το οποίο είναι ελεύθερα προσβάσιμο (πάροχος MRC Holland).

6.2.4. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

Οι μεταλλάξεις που ανισχεύθηκαν, χαρακτηρίστηκαν και έγινε διαλογή τους χρησιμοποιώντας τη ροή εργασίας «Neoscreen analysis», υιοθετώντας τις κατευθυντήριες οδηγίες του ACMG. Οι κατευθυντήριες οδηγίες του ACMG περιλαμβάνουν τα παρακάτω κριτήρια για το χαρακτηρισμό των μεταλλάξεων: τη σύγκριση με τον κατάλογο των μεταλλάξεων του γενικού πληθυσμού από τη βάση δεδομένων gnomAD (περιλαμβάνει δεδομένα από την αλληλούχιση 123.136 κωδικοποιουσών περιοχών), τα δεδομένα του 1000 Genomes Project Consortium στα πλαίσια του οποίου έχουν ελεγχθεί 2.500 γονιδιώματα, τα κλινικά δεδομένα που έχουν υποβληθεί στη βάση δεδομένων NCBI Clinvar όσον αφορά την παθογένεια της μετάλλαξης, καθώς και στις βάσεις συλλογής δεδομένων για μεταλλάξεις INVITAE, LOVD & BIC, την ετυμολογία της βάσεως δεδομένων Varsome και πολλαπλές γραμμές υπολογιστικών εργαλείων σχετικά με την αξιολόγηση του βαθμού συντήρησης και της πιθανής λειτουργικής επίδρασης της εκάστοτε μετάλλαξης στην παραγόμενη πρωτεΐνη. Στην περίπτωση ανίχνευσης παρανοηματικών μεταλλάξεων διεξάγεται επιπλέον *in silico* ανάλυση με τη χρήση των εργαλείων “dbNSFP”.

Η τελική αναφορά του αποτελέσματος έγινε χρησιμοποιώντας την ονοματολογία HGVS (<http://varnomen.hgvs.org/>).

6.2.5. Περιορισμοί μεθόδου

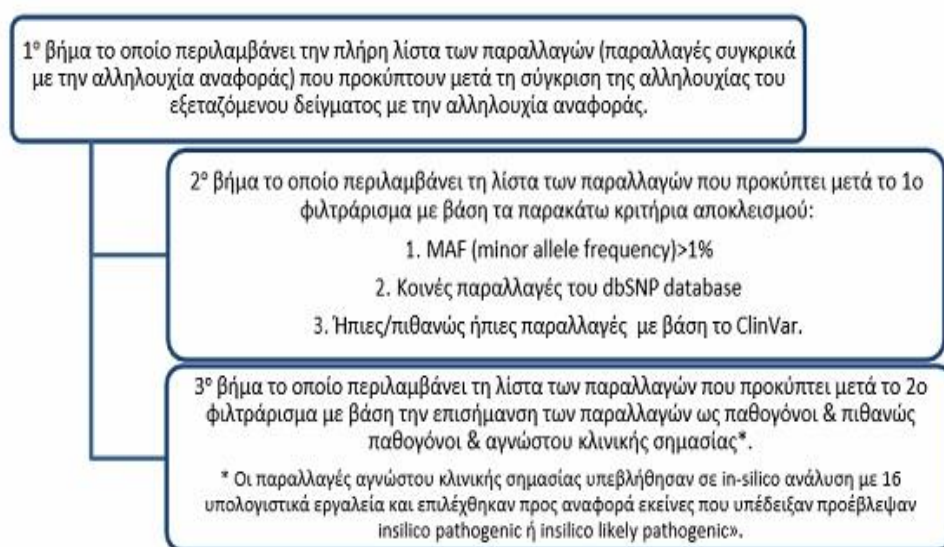
1. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η δοκιμή περιορίζεται σε συγκεκριμένο αριθμό γονιδίων (94) και δεν περιλαμβάνει όλες τις μη κωδικοποιούσες και ιντρονικές περιοχές.
2. Αυτή η αναφορά περιλαμβάνει μόνο μεταλλάξεις που πληρούν ένα επίπεδο πιθανής αιτιολογικής σχέσης με τη νόσο ή συμβάλλουν στην παθογένεση.
3. Συγκεκριμένες κατηγορίες μεταλλάξεων δεν καλύπτονται με την τεχνολογία της μαζικής παράλληλης αλληλούχισης (NGS), όπως προσδιορισμός αριθμού τρι-

νουκλεοτιδικών επαναλήψεων, αλλαγών αριθμού αντιγράφων των υπό έλεγχο γονιδίων (copy number alterations), μεταθέσεων και συγχωνεύσεων γονιδίων (fusion) ή άλλων σύνθετων δομικών αναδιατάξεων.

4. Δεν είναι δυνατή η ανίχνευση νουκλεοτιδικών αλλαγών ή απαλοιφών/ενθέσεων σε ρυθμιστικές ή ιντρονικές περιοχές.
5. Είναι δυνατή η ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων μόνο στα γονίδια BRCA1 & BRCA2 και στα εξόνια 1 & 9 του γονιδίου CHEK2 όπως αναφέρεται στην πειραματική μεθοδολογία.
6. Σε σπάνιες περιπτώσεις ενδέχεται να μην ανιχνευθεί μια παραλλαγή της αλληλουχίας λόγω πιθανής παρουσίας νουκλεοτιδικής αλλαγής στην περιοχή υβριδισμού των εκκινητών.
7. Ο χαρακτηρισμός των ανιχνευθέντων μεταλλάξεων διεξάγεται με βάση τα τρέχοντα επιστημονικά δεδομένα. Νέες και περισσότερες πληροφορίες για την αιτιολογική συσχέτιση γονιδίων και παθογόνων μεταλλάξεων με νόσους ανακύπτουν κάθε χρόνο ως εκ τούτου συνιστάται οι μεταλλάξεις να ερμηνεύονται εκ νέου βάσει ενημερωμένης ροής εργασιών χαρακτηρισμού των ανιχνευθέντων μεταλλάξεων.
8. Η δοκιμή αυτή δεν έχει εγκριθεί από κάποιο οργανισμό (FDA ή ΕΟΦ).
9. Η αναλυτική ευαισθησία και ειδικότητα των μεθόδων massive parallel sequencing & MLPA ανέρχεται στο 95% & 98%, αντίστοιχα.

6.3. Εκτεταμένος έλεγχος φορέας μεταλλάξεων σε 160 γονίδια που έχουν συσχετισθεί με προδιάθεση για διαφόρους τύπους καρκίνου με Whole Exome Sequencing (WES)

Κατά τη μέθοδο αυτή γίνεται άμεση σύγκριση γονιδιώματος εξεταζόμενου δείγματος με ανθρώπινη αλληλουχία αναφοράς (hg38). Η βιοπληροφορική ροή ανάλυσης περιλαμβάνει τη μετατροπή των FAST-Q αρχείων σε VCF και στη συνέχεια γίνεται ανάλυση των VCF αρχείων με βάση την παρακάτω ροή εργασιών. (Εικόνα 6.8)



Εικόνα 6.8.: VCF annotation

Τα 160 γονίδια φαίνονται στην εικόνα 6.9

Gene	Associated phenotypes
AIP	Pituitary adenoma, familial isolated
ALK	Neuroblastoma
ANKRD26	Thrombocytopenia
APC	Gardner syndrome, Desmoid disease, hereditary, Familial adenomatous polyposis
ATM	Breast cancer, Ataxia-Telangiectasia
AXIN2	Oligodontia-colorectal cancer syndrome, Oligodontia, isolated
BAP1	Tumor predisposition syndrome, Neurodevelopmental disorder
BARD1	Breast cancer
BLM	Bloom syndrome
BMPR1A*	Polyposis, juvenile intestinal
BRAF*	LEOPARD syndrome, Noonan syndrome, Cardiofaciocutaneous syndrome
BRCA1*	Pancreatic cancer, Breast-ovarian cancer, familial, Fanconi anemia
BRCA2	Fanconi anemia, Medulloblastoma, Glioma susceptibility, Pancreatic cancer, Wilms tumor, Breast-ovarian cancer, familial
BRIP1	Fanconi anemia, Breast cancer
BUB1B	Mosaic variegated aneuploidy syndrome, Premature chromatid separation trait
CBL	Noonan syndrome-like disorder with or without juvenile myelomonocytic leukemia
CD70	Primary immunodeficiency
CDC73	Carcinoma, parathyroid, Hyperparathyroidism, Hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome
CDH1	CDH1-related cancer, Blepharochelodontic syndrome 1
CDK4	Melanoma, cutaneous malignant
CDKN1B	Multiple endocrine neoplasia
CDKN1C	Beckwith-Wiedemann syndrome, IMAGE syndrome
CDKN2A	Melanoma, familial, Melanoma-pancreatic cancer syndrome
CEBPA	Acute myeloid leukemia, familial
CEP57	Mosaic variegated aneuploidy syndrome
CHEK2*	Breast cancer, susceptibility to
CTNNA1	Macular dystrophy, patterned 2
CYLD	Spiegler-Brooke syndrome, Trichoepithelioma, multiple, Cylindromatosis
DDB2	Xeroderma pigmentosum
DDX41	Familial myeloproliferative/lymphoproliferative neoplasms, multiple types, susceptibility to
DICER1*	DICER1 syndrome
DIS3L2*	Perlman syndrome
DKC1	Hoyeraal-Hreidarsson syndrome, Dyskeratosis congenita
EFL1*	Shwachman-Diamond syndrome
EGFR	Lung cancer, familial, susceptibility to, Inflammatory skin and bowel disease, neonatal, Acute myeloid leukemia, familial
ELANE	Neutropenia
EPCAM	Diarrhea 5, with tufting enteropathy, congenital, Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis
ERCC1	Cerebrooculofacioskeletal syndrome 4
ERCC2	Xeroderma pigmentosum, Trichothiodystrophy, photosensitive, Cerebrooculofacioskeletal syndrome 2
ERCC3	Xeroderma pigmentosum, Trichothiodystrophy, photosensitive
ERCC4	Fanconi anemia, Xeroderma pigmentosum, XFE progeroid syndrome
ERCC5	Xeroderma pigmentosum, Xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome
ETV6	Thrombocytopenia 5

Gene	Associated phenotypes
EXO1	Lynch syndrome
EXT1	Multiple cartilagenious exostoses 1
EXT2	Multiple cartilagenious exostoses 2, Seizures, scoliosis, and macrocephaly syndrome
EZH2	Weaver syndrome
FAM111B*	Hereditary Fibrosing Poikiloderma with Tendon Contracture, Myopathy, and Pulmonary Fibrosis, Lung cancer, familial, susceptibility to
FANCA	Fanconi anemia
FANCB	Fanconi anemia
FANCC	Fanconi anemia
FANCD2*	Fanconi anemia
FANCE	Fanconi anemia
FANCF	Fanconi anemia
FANCG	Fanconi anemia
FANCI	Fanconi anemia
FANCL	Fanconi anemia
FANCM	Fanconi anemia
FH	Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer, Fumarase deficiency
FLCN	Birt-Hogg-Dube syndrome, Pneumothorax, primary spontaneous
GALNT12	Colorectal cancer, susceptibility to, 1, Inflammatory bowel disease
GATA2	Myelodysplastic syndrome, Chronic neutropenia associated with monocytopenia, evolving to myelodysplasia and acute myeloid leukemia, Acute myeloid leukemia, Emberger syndrome, Immunodeficiency
GPC3	Simpson-Golabi-Behmel syndrome
GPR101	Pituitary adenoma, growth hormone secreting, 2
GREM1	Hereditary mixed polyposis syndrome
HAVCR2	
HNF1A	Maturity onset diabetes of the young, Renal cell carcinoma, nonpapillary clear cell, Liver adenomatosis
HOXB13	Familial prostate cancer
HRAS	Costello syndrome, Congenital myopathy with excess of muscle spindles
IKZF1	Immunodeficiency, common variable, 13
KIF1B	Pheochromocytoma, Neuroblastoma, Charcot-Marie-Tooth disease, type 2A1
KIT	Gastrointestinal stromal tumor, Piebaldism
KITLG	Hyperpigmentation with or without hypopigmentation, familial progressive, Skin/hair/eye pigmentation, variation in, 7
KRAS*	Noonan syndrome, Cardiofaciocutaneous syndrome
LZTR1	Schwannomatosis, Noonan syndrome
MAP2K1	Cardiofaciocutaneous syndrome
MAP2K2	Cardiofaciocutaneous syndrome
MAX	Pheochromocytoma
MEN1	Hyperparathyroidism, familial primary, Multiple endocrine neoplasia
MET	Deafness, Renal cell carcinoma, papillary, Osteofibrous dysplasia, susceptibility to
MITF	Tietz albinism-deafness syndrome, Waardenburg syndrome, Coloboma, osteopetrosis, microphthalmia, macrocephaly, albinism, and deafness (COMMAD)
MLH1	Muir-Torre syndrome, Endometrial cancer, Mismatch repair cancer syndrome, Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis
MLH3	Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis, Endometrial carcinoma
MRE11A	Ataxia-telangiectasia-like disorder-1
MSH2	Muir-Torre syndrome, Endometrial cancer, Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis, Mismatch repair cancer syndrome
MSH3	Endometrial carcinoma, Colorectal adenomatous polyposis, autosomal recessive, with pilomatricomas

Gene	Associated phenotypes
MSH6	Endometrial cancer, Mismatch repair cancer syndrome, Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis
MUTYH	Familial adenomatous polyposis,, Colorectal adenomatous polyposis, with pilomatricomas
NBN	Breast cancer, Nijmegen breakage syndrome
NF1*	Watson syndrome, Neurofibromatosis, Neurofibromatosis-Noonan syndrome
NF2	Schwannomatosis, Neurofibromatosis
NRAS	Noonan syndrome
NSD1	Sotos syndrome, Weaver syndrome, Beckwith-Wiedemann syndrome
NSUN2	Dubowitz syndrome, Non-syndromic intellectual disability
NTHL1	Familial adenomatous polyposis 3
PALB2	Fanconi anemia, Pancreatic cancer, Breast cancer
PAX5	Pre-B cell acute lymphoblastic leukemia
PDGFRA#	Gastrointestinal stromal tumor
PHOX2B	Central hypoventilation syndrome, congenital, Neuroblastoma, susceptibility to, Neuroblastoma with Hirschsprung disease
PMS1#	Hereditary nonpolyposis colon cancer
PMS2*	Mismatch repair cancer syndrome, Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis
POLD1	Colorectal cancer, Mandibular hypoplasia, deafness, progeroid features, and lipodystrophy syndrome, Idiopathic bronchiectasis, Immunodeficiency
POLE	Colorectal cancer, Facial dysmorphism, immunodeficiency, livedo, and short stature syndrome (FILS syndrome)
POLH*	Xeroderma pigmentosum, variant type
POT1	Glioma susceptibility 9, Melanoma, cutaneous malignant, susceptibility to 10
PPM1D	Hereditary breast cancer
PRF1	Lymphoma, non-Hodgkin, Aplastic anemia, adult-onset, Hemophagocytic lymphohistiocytosis
PRKAR1A	Myxoma, intracardiac, Acrodysostosis, Pigmented nodular adrenocortical disease, Carney complex
PTCH1	Basal cell nevus syndrome
PTEN*	Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome, Lhermitte-Duclos syndrome, Cowden syndrome
PTPN11	Noonan syndrome, Metachondromatosis
RAD50	Breast cancer, Nijmegen breakage syndrome-like disorder
RAD51C	Fanconi anemia, Breast-ovarian cancer, familial
RAD51D	Breast-ovarian cancer, familial
RAF1	LEOPARD syndrome, Noonan syndrome, Dilated cardiomyopathy (DCM)
RASA2	Noonan syndrome
RB1	Retinoblastoma
RECQL*	Breast cancer
RECQL4	Baller-Gerold syndrome, RAPADILINO syndrome, Rothmund-Thomson syndrome
REST	Fibromatosis, gingival, 5
RET	Hirschsprung disease, Central hypoventilation syndrome, congenital, Pheochromocytoma, Medullary thyroid carcinoma, Multiple endocrine neoplasia
RHBDF2	Tylosis with esophageal cancer
RIT1	Noonan syndrome
RPS20	Colorectal cancer
RRAS	Noonan-syndrome like phenotype
RUNX1	Platelet disorder, familial, with associated myeloid malignancy
SAMD9	Mirage syndrome, Tumoral calcinosis, normophosphatemic
SAMD9L	Ataxia-pancytopenia syndrome

Gene	Associated phenotypes
SBDS*	Aplastic anemia, Shwachman-Diamond syndrome, Severe spondylometaphyseal dysplasia
SDHA*	Leigh syndrome/Mitochondrial respiratory chain complex II deficiency, Gastrointestinal stromal tumor, Parangliomas, Dilated cardiomyopathy (DCM), Cardiomyopathy, dilated, 1GG
SDHAF2	Parangliomas
SDHB	Paranglioma and gastric stromal sarcoma, Pheochromocytoma, Gastrointestinal stromal tumor, Parangliomas, Cowden-like syndrome
SDHC	Paranglioma and gastric stromal sarcoma, Gastrointestinal stromal tumor, Parangliomas
SDHD#	Paranglioma and gastric stromal sarcoma, Pheochromocytoma, Parangliomas, Carcinoid tumors, intestinal, Cowden syndrome, Mitochondrial complex II deficiency
SHOC2	Noonan-like syndrome with loose anagen hair
SLX4	Fanconi anemia
SMAD4	Juvenile polyposis/hereditary hemorrhagic telangiectasia syndrome, Polyposis, juvenile intestinal, Myhre dysplasia, Hereditary hemorrhagic telangiectasia
SMARCA4	Rhabdoid tumor predisposition syndrome
SMARCB1	Schwannomatosis, Rhabdoid tumor predisposition syndrome, Coffin-Siris syndrome 3
SMARCE1	Coffin-Siris syndrome
SOS1	Noonan syndrome
SOS2	Noonan syndrome 9
SPRED1	Legius syndrome
SRP72*	Bone marrow failure syndrome 1
STK11	Peutz-Jeghers syndrome
SUFU	Medulloblastoma, Basal cell nevus syndrome
TERC	Aplastic anemia, Pulmonary fibrosis and/or bone marrow failure, telomere-related, Dyskeratosis congenita
TERT	Aplastic anemia, Pulmonary fibrosis and/or bone marrow failure, telomere-related, Dyskeratosis congenita
TINF2	Revesz syndrome, Dyskeratosis congenita
TMEM127	Pheochromocytoma
TP53	Colorectal cancer, Li-Fraumeni syndrome, Ependymoma, intracranial, Choroid plexus papilloma, Breast cancer, familial, Adrenocortical carcinoma, Osteogenic sarcoma, Hepatoblastoma, Non-Hodgkin lymphoma
TRIP13	Mosaic variegated aneuploidy syndrome 3
TSC1	Lymphangioleiomyomatosis, Tuberous sclerosis
TSC2	Lymphangioleiomyomatosis, Tuberous sclerosis
VHL	Erythrocytosis, familial, Pheochromocytoma, Von Hippel-Lindau disease
WRN*	Werner syndrome
WT1	Denys-Drash syndrome, Frasier syndrome, Wilms tumor, Nephrotic syndrome, type 4
XPA	Xeroderma pigmentosum
XPC	Xeroderma pigmentosum
XRCC2	Hereditary breast cancer

Εικόνα 6.9: 160 γονίδια που έχουν συσχετισθεί με καρκίνο

Οι περιορισμοί του WES είναι ότι δεν πραγματοποιείται ταυτοποίηση:

-Μεγάλων και ισοζυγισμένων χρωμοσωμικών δομικών αναδιατάξεων (π.χ. αναστροφές, μεταθέσεις, τρισωμίες, τριπλοειδίες)

-Μωσαϊκισμού σε χαμηλό ποσοστό

-Δεν είναι δυνατή η ανίχνευση μεγάλων γονιδιακών αναδιατάξεων στα γονίδια *BRCA1* & *BRCA2* και στα εξόνια 1 & 9 του γονιδίου *CHEK2*. (MLPA)

6.4. Έλεγχος ολόκληρου του γονιδιώματος με Whole Genome Sequencing (WGS)

Ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος για την πιθανή παρουσία παθογόνων σημειακών παραλλαγών (υποκαταστάσεις βάσεων & απαλοιφές/ενθέσεις μικρού αριθμού βάσεων) καθώς και ανάλυση των παραλλαγών του αριθμού των αντιγράφων (CNVs). Πλήρης αλληλούχιση όλου του γονιδιώματος με Μαζικής Παράλληλης Αλληλούχισης (NGS)

Κατά την εξέταση αυτή αναφέρονται:

- Οι παθογόνες (pathogenic) και πιθανά παθογόνες (likely pathogenic) γενετικές παραλλαγές (σημειακές παραλλαγές, CNVs) που σχετίζονται με την κλινική εικόνα του/της εξεταζόμενου/ης.
- Οι παραλλαγές άγνωστης κλινικής σημασίας (VUS) που ενδέχεται να σχετίζονται με την αιτία παραπομπής και έχουν παθογόνο πρόβλεψη από την πλειονότητα των εργαλείων βιοπληροφορικής ανάλυσης (*in silico*).
- Οι παθογόνες/πιθανά παθογόνες εσωνικές παραλλαγές.
- Οι εσωνικές παραλλαγές VUS όταν εντοπίζονται σε γονίδια αυτοσωμικής υπολειπόμενης κληρονομικότητας όπου έχει βρεθεί μία παθογόνος/πιθανά παθογόνος παραλλαγή.

6.5. Ανίχνευση σημειακών παραλλαγών μέσω αλληλουχίας κατά Sanger για επιβεβαίωση ευρημάτων

Ανίχνευση σημειακών παραλλαγών (υποκαταστάσεις βάσεων & ελλείψεις/ενθέσεις μικρού αριθμού βάσεων) μέσω ταυτοποίησης της αλληλουχίας των αντίστοιχων εξονίων συμπεριλαμβανομένων των ορίων ιντρονίων-εξονίων. Ανίχνευση τόσο γνωστών και «πρωτότυπων» (novel) μεταλλάξεων

6.6. Πολλαπλή ενίσχυση τμημάτων DNA εξαρτώμενη από τη σύνδεση ιχνηθετών (MLPA)

Ανίχνευση μεγάλων γονιδιωματικών αναδιατάξεων (απαλοιφές / διπλασιασμοί ≥ 1 εξόνια) των γονιδίων μέσω πολλαπλής ενίσχυσης τμημάτων DNA εξαρτώμενη από τη σύνθεση ιχνηθετών (MLPA).

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα P002-D1 BRCA1 και P045-D1 BRCA2, CHEK2 (c.1100delC, απαλειφές/ διπλασιασμοί εξόνιο 1, εξόνιο 9)

Κεφάλαιο 7

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΟΥ ΤΕΣΤ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΥΠΟΠΤΩΝ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ (SCREENING)

7.1.Εισαγωγή

Πρόκειται για μη επεμβατικό έλεγχο που βασίζεται στην αξιολόγηση επιγενετικών δεικτών σε επιθηλιακά κύτταρα τα οποία έχουν αποβληθεί με τα κόπρανα. Συγκεκριμένα, προσδιορίζονται τα επίπεδα μεθυλίωσης τριών γενωμικών περιοχών του DNA που εξάγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα.

Τα κόπρανα φαίνεται ότι αποτελούν το δείγμα επιλογής για τον μη επεμβατικό προσυμπτωματικό έλεγχο καρκίνου του παχέος εντέρου καθώς το DNA (ctDNA) προέρχεται απευθείας από τον ιστό του του όγκου ή/και προκαρκινικών αλλοιώσεων.

7.2. Χημική τροποποίηση DNA με όξινο θειώδες νάτριο (Bisulfite Conversion)

7.2.1. Εισαγωγή

Για την ανίχνευση της μεθυλίωσης είναι απαραίτητη η μετατροπή των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών (C) σε ουρακίλες (U). Οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες παραμένουν ανεπηρέαστες, οπότε μπορούν να προσδιοριστούν και το τελικό προϊόν είναι μονόκλωνο. [131]

Η επιλογή του “Bisulfite Conversion kit” έγινε με βάση αξιολογήσεις της βιβλιογραφίας των kit που υπάρχουν στο εμπόριο. Παρόλο, που μπορεί να είναι διαφορετικά τα κριτήρια επιλογής kit ανάλογα με την πειραματική διεργασία, το σημαντικότερο για την ανίχνευση της μεθυλίωσης είναι το ποσοστό μετατροπής μετατροπής μη μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες. [132-133] Το EZ DNA Methylation-Direct Kit της Zymoresearch, το οποίο επιλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε έχει δείξει ότι έχει το πιο μεγάλο ποσοστό το οποίο ανέρχεται στο 99,9%.

Επιπλέον μπορεί να δουλέψει ακόμα και με πολύ μικρή ποσότητα DNA της τάξεως των 50pg. Για βέλτιστα αποτελέσματα οι οδηγίες του kit προτείνουν να πραγματοποιηθεί η διαδικασία με 200ng-500ng. (Η ποσότητα DNA που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι 50pg-2μg) [134-136]

7.2.2 Μέθοδος

7.2.2.1. Προετοιμασία αντιδραστηρίων

A) Proteinase K: Προσθήκη 260 μl (D5020) or 1040 μl (D5021) Proteinase K Storage Buffer στο tube της πρωτεϊνάσης k. Ανάδευση ώστε να διαλυθεί εντελώς και αποθήκευση στους -20 °C. B) CT Conversion Reagent: Προσθήκη 790 μl oM-Solubilization Buffer και 300 μl M-Dilution Buffer σε ένα tube CT Conversion Reagent, ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχόμενη ανάδευση 10 λεπτών. Προσθήκη 160 μl M-Reaction Buffer και ανάδευση άλλο ένα λεπτό. (κάθε μπουκαλάκι επαρκεί για 10 διαφορετικές DNA αντιδράσεις. Επειδή είναι φωτοευαίσθητο θα πρέπει να εκτεθεί στο φως όσο λιγότερο γίνεται. Για καλύτερα αποτελέσματα θα πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την παρασκευή του, αλλιώς μπορεί να αποθηκευθεί για μία νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου, για μία εβδομάδα στο ψυγείο 4°C και μέχρι και για ένα μήνα στους -20°C. Το αποθηκευμένο CT αντιδραστήριο πριν τη χρήση θα πρέπει να θερμανθεί στους 37°C

Γ)M-Wash Buffer: Προσθήκη 24 ml 100% αιθανόλης στο μπουκάλι που περιέχει 6 ml M-Wash Buffer μη διαλυμένο (D5020) ή 96 ml of 100% αιθανόλης στο μπουκάλι 24 ml M-Wash Buffer μη διαλυμένο (D5021) before use.

7.2.2.2. Πρωτόκολλο EZ DNA methylation direct kit

Χρησιμοποιήθηκε το απομονωμένο από τα κόπρανα DNA και συγκεκριμένα περίπου 300 ng DNA από κάθε δείγμα, τα οποία υποβλήθηκαν σε χημική τροποποίηση DNA με όξινο θειώδες νάτριο με το EZ DNA methylation direct kit.

Συγκεκριμένα , σε ένα PCR tube προστέθηκαν 10 µl Digestion Buffer (2X), 1 µl Sample (300ng/ul), 1 µl M Proteinase K, 8 µl H₂O (20 µl Total Volume) και 130 µl of CT Conversion Reagent solution. Έγινε ανάδευση του δείγματος και σύντομη φυγοκέντρηση ώστε να αποκλεισθεί η πιθανότητα να έχουν απομείνει σταγονίδια στο καπάκι του tube. Στη συνέχεια, τα tubes τοποθετήθηκαν σε ένα θερμικό κυκλοποιητή όπου πραγματοποιήθηκε η παρακάτω αντίδραση. (Πίνακας 7.2.2)

Πίνακας 7.2.2: Συνθήκες αντίδρασης Bisulfite conversion

98°C	8 minutes
64°C	3.5 hours
4°C storage	up to 20 hours (optional)

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης:

-Προσθήκη α) 600 µl of M-Binding Buffer και β) του προϊόντος της αντίδρασης σε μία στήλη Zymo-Spin™ IC τοποθετώντας από κάτω και ένα collection tube. Ανάδευση πάνω κάτω αρκετές φορές ,αφού κλεισθεί καλά το καπάκι.

-Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (>10,000 x g) για 30 δευτερόλεπτα

-Απόρριψη του υγρού που συλλέχθηκε

-Προσθήκη 100 µl of M-Wash Buffer στη στηλίτσα

-Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (>10,000 x g) για 30 δευτερόλεπτα

-Προσθήκη 200 µl of M-Desulphonation Buffer στη στηλίτσα

- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (20-30°C) για 15-20 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (>10,000 x g) για 30 δευτερόλεπτα
- Προσθήκη 200 µl of M-Wash Buffer στη στηλίτσα.
- Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (>10,000 x g) για 30 δευτερόλεπτα
- Προσθήκη 200 µl of M-Wash Buffer στη στηλίτσα.
- Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (>10,000 x g) για 30 δευτερόλεπτα
- Τοποθέτηση της στήλης σε ένα 1,5ml tube.
- Προσθήκη 10 µl MEIution Buffer στη μεμβράνη της στήλης.
- Φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (>10,000 x g) για 30 δευτερόλεπτα, ώστε να επιτευχθεί η έκλυση του DNA

Το DNA είναι έτοιμο για περαιτέρω ανάλυση ή μπορεί να αποθηκευθεί στους -20°C για σύντομο χρονικό διάστημα αποθήκευσης ή στους -70°C για βραχυπρόθεσμη. Με βάση τις οδηγίες του kit συστήνεται η χρήση 1-4 µl DNA για κάθε PCR, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και 10 1-4 µl αν είναι απαραίτητο. [116]

7.3 Μέθοδος ανίχνευσης μεθυλίωσης παχέος εντέρου

7.3.1 Επιλογή γονιδίων για ανίχνευση μεθυλίωσης παχέος εντέρου

Αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων SDC2, ADHFE1 και PPP2R5C έχουν συσχετιστεί με την παρουσία προκαρκινικών αλλοιώσεων και καρκίνου του παχέος εντέρου. Τα παραπάνω γονίδια επιλέχθηκαν, ως οι βέλτιστοι βιοδείκτες με κριτήριο το βαθμό ευαισθησίας και ειδικότητας ανίχνευσης προκαρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων του παχέος εντέρου με βάση τη βιβλιογραφία.

Συγκεκριμένα, το γονίδιο SDC2, σε πρόσφατες δημοσιεύσεις [117, 118, 119] έδειξε ευαισθησία έως και 87% και ειδικότητα έως και 97% για την πρώιμη ανίχνευση του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Σχετικά με το γονίδιο ADHFE1, παλαιότερες δημοσιεύσεις ([120, 121, 122] έχουν δείξει ότι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του επάγει την μείωση των επιπέδων έκφρασής του και κατ'επέκταση συμβάλλει στην εξέλιξη της ογκογένεσης μέσω της ρύθμισης σηματοδοτικών μονοπατιών που αφορούν τον κυτταρικό μεταβολισμό, τη διαδικασία αντιγραφής του DNA και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Πρόσφατη δημοσίευση μελέτης του επιγονιδιώματος δειγμάτων ιστού καρκίνου του παχέος εντέρου και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού [123] ανέδειξε τη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου ADHFE1 ως σημαντικού παράγοντα για τη διαφοροποίηση του φυσιολογικού ιστού του παχέος εντέρου σε καρκινικό και ως εκ τούτου σε βιοδείκτη για τη διάγνωση του καρκίνου παχέος εντέρου (CRC).

Πρόσφατη δημοσίευση [124, 125] αναδεικνύει τη χρησιμότητα του προσδιορισμού των βιοδεικτών μεθυλίωσης SDC2, ADHFE1 και PPP2R5C καθώς η συνδυαστική εφαρμογή τους επέτρεψε την ορθή «αναγνώριση» περιστατικών CRC με βαθμό ευαισθησίας 84,6% και ειδικότητας 92,4% σε δείγματα κοπράνων ενώ παρουσίασε υψηλότερο βαθμό ευαισθησίας από την μεμονωμένη ανοσοϊστοχητική δοκιμασία FIT σε κόπρανα όσον αφορά την ανίχνευση προχωρημένων προκαρκινικών αλλοιώσεων.

Τέλος επιλέχθηκε το GAPDH για να χρησιμοποιηθεί σαν εσωτερικό κοντρόλ της πειραματικής διεργασίας. [126]

7.3.2 Μέθοδος qPCR για τον προσδιορισμό της μεθυλίωσης των γονιδίων SDC2, ADHFE1 και PPP2R5C που συσχετίζονται με τον καρκίνο του παχέος εντέρου. multiple fluorescent PCR technology to detect the methylation status of the target genes.

Ο σχεδιασμός εκκινητών και ανιχνευτών μπορεί να γίνει για πλήρως μεθυλιωμένα και καθόλου μεθυλιωμένα αλληλουχία (πάντα όσον αφορά τη μεθυλίωση των κυτοσινών). Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα να σχεδιαστεί μια αντίδραση όπου τα σημεία CpG δεν καλύπτονται ούτε από εκκινητές ούτε από τον ανιχνευτή και τα δεδομένα που θα προκύψουν από την ενίσχυση να χρησιμοποιηθούν ως σημείο αναφοράς για την MSP ποσοτική ανάλυση της ίδιας αλληλουχίας [127]

Τα “bisulfited” DNA χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση η οποία έγινε με βάση τις παρακάτω συνθήκες (Πίνακας) και στη συνέχεια φορτώθηκε στο μηχάνημα Real-time PCR επιλέγοντας το σωστό πρόγραμμα.

PCR MIX I (ul) περιλαμβάνει όλους τους primers και probes	6.6
PCR MIX II (ul) DNA polymerase, reaction buffer, and dNTPs	4.4
BisDNA specimens/ positiveC/negativeC	9.0
Total (ul) <u>11ul mmix +9 ul DNA</u>	20.0

Πίνακας 7.3: Συνθήκες αντίδρασης

7.3.3. Αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Το πείραμα έχει σχεδιασθεί με τέτοιο τρόπο ώστε κάθε γονίδιο να αντιστοιχεί σε διαφορετικό μήκος κύματος. Συγκεκριμένα, το γονίδιο *ADHFEI* αντιστοιχεί στο FAM (465-510) και για να είναι μεθυλιωμένο το δείγμα θα πρέπει $Ct \leq 39$ $\Delta Ct \leq 5$, ο γονίδιο *SDC2* αντιστοιχεί στο VIC (533-580) και για να είναι μεθυλιωμένο θα πρέπει $Ct \leq 39$ $\Delta Ct \leq 8$, το γονίδιο *PPP2R5C* αντιστοιχεί στο Cy5 (618-660) και για να είναι μεθυλιωμένο θα πρέπει $Ct \leq 39$ $\Delta Ct \leq 7$ και το γονίδιο *GAPDH* αντιστοιχεί στο ROX (533-610) όπου επηδεί δρα σαν εσωτερικό control περιμένουμε τα δείγματα όλα να έχουν $Ct \leq 39$ σαν ένδειξη ότι έχει δουλέψει η αντίδραση.

<i>ADHFEI</i> FAM 465-510			<i>SDC2</i> VIC 533-580			<i>PPP2R5C</i> Cy5 618-660			<i>GAPDH</i> ROX 533-610	
Ct	ΔCt	METHYLATED $Ct \leq 39$ $\Delta Ct \leq 5$	Ct	ΔCt	METHYLATED $Ct \leq 39$ $\Delta Ct \leq 8$	Ct	ΔCt	METHYLATED $Ct \leq 39$ $\Delta Ct \leq 7$	Ct	Internal control $Ct \leq 39$

ΔCt =difference between Ct values for the target and the internal control gene(GAPDH)

7.3.4 Αξιολόγηση πιστότητας μεθόδου

A) Επαναληψιμότητα: Σε ένα run μπήκε 2 φορές το ίδιο δείγμα και έδωσε το ίδιο αποτέλεσμα και παραπλήσιες τιμές.

27/9/2022	ADHFEI FAM 465-510			SDC2 VIC 533-580			PPP2R5C Cy5 618-660			GAPDH ROX 533-610	
	Ct	ΔCt	RESULT FOR ADHFEI <i>Ct≤39</i> <i>ΔCt≤5</i>	Ct	ΔCt	RESULT FOR SDC2 <i>Ct≤39</i> <i>ΔCt≤8</i>	Ct	ΔCt	RESULT FOR PPP2R5C <i>Ct≤39</i> <i>ΔCt≤7</i>	Ct	Ct≤39
SAMPLES											
3a	-	-	NEGATIVE	37,01	3,99	POSITIVE	-	-	NEGATIVE	33,02	≤39
3a	-	-	NEGATIVE	36,4	3,52	POSITIVE	-	-	NEGATIVE	32,88	≤39

Πίνακας 7.4: Αποτελέσματα επαναληψιμότητας

B) Αναπαραγωγιμότητα: Σε ένα άλλο run μπήκε το ίδιο δείγμα το οποίο απομονώθηκε εκ νέου από άλλο αναλυτή και έδωσε το ίδιο αποτέλεσμα και παραπλήσιες τιμές.

30/9/2022	ADHFEI FAM 465-510			SDC2 VIC 533-580			PPP2R5C Cy5 618-660			GAPDH ROX 533-610	
	Ct	ΔCt	RESULT FOR ADHFEI <i>Ct≤39</i> <i>ΔCt≤5</i>	Ct	ΔCt	RESULT FOR SDC2 <i>Ct≤39</i> <i>ΔCt≤8</i>	Ct	ΔCt	RESULT FOR PPP2R5C <i>Ct≤39</i> <i>ΔCt≤7</i>	Ct	Ct≤39
SAMPLES											
3β	-	-	NEGATIVE	35,9	3,89	POSITIVE	-	-	NEGATIVE	32,01	≤39

Πίνακας 7.5: Αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας

Κεφάλαιο 8

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΑΠΟ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ 2 ΓΟΝΙΔΙΩΝ, ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΟΥ WHOLE GENOME SEQUENCING

8.1 Εισαγωγή- Αποτελέσματα

Πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος βιολογικών δειγμάτων DNA, τα οποία προέρχονται από ολικό αίμα, για την πιθανή παρουσία μεταλλάξεων σε γονίδια που έχουν συσχετισθεί με προδιάθεση εκδήλωσης καρκίνου (*BRCA* & Cancer Extra panels).

ΤΕΧΝΙΚΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ/ /ΠΙΘΑΝΩΣ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ
<i>BRCA1, BRCA2 (NGS)</i>	1099	67 BRCA1 54 BRCA2
<i>94 cancer predisposition genes (NGS)</i>	236	10 BRCA1 9 BRCA2 15 (OTHER GENES)
<i>160 cancer predisposition genes (WES)</i>	217	16 BRCA1 11 BRCA2 33 (OTHER GENES)

SANGER	ΌΛΑ ΤΑ ΘΕΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΣΗΜΕΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΑΝ	
MLPA	1552 ΔΕΙΓΜΑΤΑ BRCA1, BRCA2 + 2 ΓΙΑ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ WGS	23 positive samples

WGS	50 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΙΧΑΝ ΜΠΕΙ ΚΑΙ ΣΕ WES	- ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΑΝ ΟΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΟΥ WES +ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΣΕ ΙΝΤΡΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ BRCA1: c.5468-40T>A 2 CNVs α) BRCA1 POS EXONS 3-7 HET DEL ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕ MLPA BRCA1-P002-D1
------------	-----------------------------------	---

		β) MLH1 POS EXONS 13-16 HET DEL ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕ MLPA MLH1/MLH2-P003 <i>(Lynch syndrome, NO OTHER MUTATIONS DETECTED)</i>
--	--	---

Ο στόχος της παρούσας εργασίας σε σχέση με το καρκίνο του μαστού – ωοθηκών είναι η αξιολόγηση καταλληλότερης τεχνικής για καλλύτερη διάγνωση και πρόγνωση.

Έγινε σύγκριση δυνατοτήτων των δύο πρωτοκόλλων «Next Generation Sequencing» για γονίδια που συσχετίζονται με τον καρκίνο μαστού και ωοθηκών και παράλληλη σύγκριση με το Whole Exome Sequencing, το οποίο όχι απλά μπορεί να ανιχνεύει τις μεταλλάξεις αλλά επιπρόσθετα ανιχνεύει μεγάλα κομμάτια απαιειφών ή διπλασιασμών (CNVs)

Η δυνατότητα ενδεδειγμένου ελέγχου πολλαπλών γονιδίων στην περίπτωση των BRCA & Cancer Extra panels μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην ταυτοποίηση μεγαλύτερου αριθμού μη σποραδικών περιστατικών και κατ'επέκταση, ανάλογα με το γονίδιο (σύνδρομο) το οποίο εμπλέκεται, να χρησιμοποιηθεί από τον κλινικό ιατρό το αντίστοιχο πρωτόκολλο ιατρικής επιτήρησης.

Οι παθογόνες και πιθανός παθογόνες παραλλαγές που ανιχνεύθηκαν φαίνονται στην εικόνα 8.1.

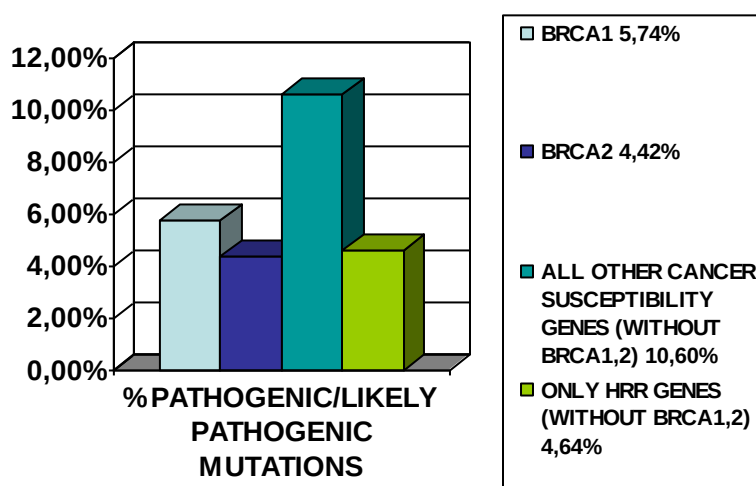
Εικόνα 8.1 ΠΑΘΟΓΟΝΕΣ/ ΠΙΘΑΝΟΣ ΠΑΘΟΓΟΝΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ PANEL ΓΟΝΙΔΙΩΝ (94, 160 GENES)

Gene	Variant	DbSNP_ID	Genotype	Classification (Varsome)
ATM (NM_000051.3) HRR GENE	c.7327C>T (p.Arg2443Ter)	rs121434220	Heterozygous	Pathogenic/ Likely
ATM (NM_000051.4) HRR GENE	c.6095G>A (p.Arg2032Lys)	rs139770721	Heterozygous	Pathogenic
APC (NM_000038.6)	c.3927_3931delAAA GA (p.Glu1309AspfsTer4)	rs121913224	Heterozygous	Pathogenic
BARD1 (ENST00000260947.9) HRR GENE	c.320T>C (p.Leu107Pro)	rs1553624732	Heterozygous	Likely Pathogenic / (VUS)
BLM (NM_000057.4)	c.1642C>T (p.Gln548Ter)	rs200389141	Heterozygous	Pathogenic
CDH1 (NM_004360.5)	c.1565+1G>A	rs587780113	Heterozygous	Pathogenic
CDKN2A (ENST00000304494.10)	c.71G>C (p.Arg24Pro)	rs104894097	Heterozygous	Pathogenic
CHEK2 (NM_007194.4) (3 samples) HRR GENE	c.470T>C (p.Ile157Thr)	rs17879961	Heterozygous	Pathogenic
CHEK2 (NM_007194.4) HRR GENE	c.1100delC (p.Thr367MetfsTer1)	rs555607708	Heterozygous	Pathogenic
CHEK2 (NM_007194.4) HRR GENE	c.190G>A (p.Glu64Lys)	rs56399857	Heterozygous	Pathogenic / (VUS)
CHEK2 (NM_007194.4) HRR GENE	c.502T>A (p.Phe168Ile) 40.58%	-	Heterozygous	Pathogenic / (VUS)
CHEK2 (NM_007194.4) HRR GENE	c.599T>C (p.Ile200Thr)	rs17879961	Heterozygous	Likely Pathogenic
CHEK2 (NM_007194.4) (2 samples) HRR GENE	c.793-1G>A	rs730881687	Heterozygous	Pathogenic
ERCC2 (NM_000400.4)	c.557G>A (p.Arg186His)	-	Heterozygous	Likely Pathogenic
ERCC2 (NM_000400.4)	c.2164C>T (p.Arg722Trp)	rs121913026	Heterozygous	Pathogenic
ERCC3 (NM_000122.2) (2 samples)	c.1421dupA (p.Asp474GlufsTer2)	rs587778281	Heterozygous	Pathogenic

Gene	Variant	DbSNP_ID	Genotype	Classification (Varsome)
ERCC4 (NM_005236.3)	c.409C>G (p.His137Asp)	-	Heterozygous	Pathogenic /(VUS)
FANCA (NM_000135.4) HRR GENE	c.3349A>G (p.Arg1117Gly)	rs587781376	Heterozygous	Pathogenic
FANCA (NM_000135.4) HRR GENE	c.3788_3790delTCT (p.Phe1263del)	rs397507553	Heterozygous	Pathogenic
FANCC (NM_000136.3)	c.455dup (p.Asn152fs)	rs774170058	Heterozygous	Pathogenic
FANCC (NM_000136.3)	c.844-1G>C	rs774209201	Heterozygous	Pathogenic
FANCI (NM_001113378.1)	c.1597C>T (p.R533X)	rs1347292940	Heterozygous	Pathogenic
FANCM (NM_020937.4)	c.3975T>G (p.Tyr1325Ter)	rs1030580842	Heterozygous	Likely Pathogenic
FANCM (NM_020937.4)	c.5101C>T (p.Gln1701Ter)	rs147021911	Heterozygous	Pathogenic
MEN1 (NM_000244.3)	c.1474T>C (p.Ser492Pro)	rs1554085046	Heterozygous	Pathogenic /(VUS)
MLH1 (ENST00000231790.8) HRR GENE	c.91_92delGCinsTG (p.Ala31Cys)	rs63749994	Heterozygous	Likely Pathogenic
MLH1 (ENST00000231790.8) HRR GENE	c.1154G>A (p.Arg352His)	rs63750430	Heterozygous	Likely Pathogenic
MLH1 (ENST00000231790.8) HRR GENE	c.1731G>A (p.Ser577=)	rs63751657	Heterozygous	Pathogenic
MSH2 (ENST00000233146.7)	c.1847C>G (p.Pro616Arg)	rs587779965	Heterozygous	Likely Pathogenic
MSH2 (NM_000251.3)	c.2588dupA (p.Tyr863Ter)	rs1553370435	Heterozygous	Pathogenic
MUTYH (ENST00000456914.7)	c.1143_1144dupGG (p.Glu382GlyfsTer43)	rs587780078	Heterozygous	Pathogenic
MUTYH (NM_001128425.2) (2 samples)	c.1187G>A (p.Gly396Asp)	rs36053993	Heterozygous	Pathogenic

Gene	Variant	DbSNP_ID	Genotype	Classification (Varsome)
MUTYH (NM_001128425.2)	c.734G>A (p.Arg245His)	rs140342925	Heterozygous	Pathogenic/ Likely Pathogenic
MUTYH (NM_001128425.2)	c.721C>T (p.Arg241Trp)	rs34126013	Heterozygous	Pathogenic
PALB2 (NM_024675.3) HRR GENE	c.172_175delTTGT (p.Gln60Argfs*7)	rs180177143	Heterozygous	Pathogenic
PALB2 (NM_024675.3) HRR GENE	c.1381_1387delAGT GAAA/	-	Heterozygous	Pathogenic
PTEN (NM_000314.8)	c.112C>T (p.Pro38Ser)	rs587780004	Heterozygous	Likely Pathogenic
RAD50 (NM_005732.4)	c.326_329delCAGA (p.Thr109AsnfsTer20)	rs587780155	Heterozygous	Pathogenic
RAD51C (NM_058216.2) HRR GENE	c.577C>T (p.Arg193Ter)	rs200293302	Heterozygous	Pathogenic
RAD51D (NM_133629.3) HRR GENE	c.1A>T (p.Met1Leu)	rs561425038	Heterozygous	Likely Pathogenic
RET (NM_020975.6)	c.2372A>T (p.Tyr791Phe)	rs77724903	Heterozygous	Pathogenic
SDHA (NM_004168.4)	c.1151C>G (p.Ser384Ter)	rs151170408	Heterozygous	Pathogenic
SDHD (ENST00000375549.8)	c.337_340delGACT (p.Asp113Metfs Ter21)	rs587776648	Heterozygous	Pathogenic
TP53 (ENST00000269305.4)	c.570delT (p.Pro191LeufsTer56)	-	Heterozygous	Likely Pathogenic

Στην εικόνα 8.2 φαίνονται τα ποσοστά των μεταλλάξεων που βρέθηκαν οι οποίες συσχετίζονται με προδιάθεση καρκίνου μαστού-ωθηκών. Επομένως φαίνεται ότι όσο πιο εκτεταμένο πάνελ εφαρμοσθεί τόσο πιο πλήρη εικόνα θα έχουμε για τον ασθενή.



Εικόνα 8.2: Ποσοστά μεταλλάξεων ανά κατηγορία γονιδίων

8.2 Συζήτηση

Η παρουσία μεταλλάξεων σε γονίδια επιπλέον των BRCA1 και BRCA2 δείχνει πόσο σημαντικός είναι ο έλεγχος με πάνελ γονιδίων ή ο έλεγχος του WGS.

Το WGS προσφέρει πλεονεκτήματα στην διάγνωση του καρκίνου και την στοχευμένη θεραπεία του. Η γονοτύπωση καρκινικών κυττάρων με WGS έχει δώσει πληροφορίες σχετικά με το γενετικό υπόβαθρο διαφόρων τύπων, η οποία συνέβαλε στον σχεδιασμό μια θεραπείας αυξάνοντας τα ποσοστά επιβίωσης.

Σε μια περίπτωση το WGS σε μια 39-χρονη, η οποία έπασχε απο οξεία μυελογενή λευχαιμία, έδειξε ένα σπάνιο γενετικό λάθος. Το αποτέλεσμα αυτό έκανε τους γιατρούς να αλλάξουν το θεραπευτικό σχήμα σε στοχευμένη χημειοθεραπεία αντι για για μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων. [128]

Σε μια άλλη περίπτωση, το WGS σε μια γυναίκα η οποία πέθανε στα 42 της χρόνια μετά την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού και στον ωοθηκών και στην συνέχεια λευχαιμία επέτρεψε την ταυτοποίηση μιας νέας μετάλλαξης σε ένα γονίδιο το οποίο σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου. Οι συγγενείς της ασθενούς ενημερώθηκαν για τα ευρήματα και συστήθηκε γενετική συμβουλευτική και έλεγχος για τα παιδιά της ασθενούς, τα οποία έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε μικρή ηλικία σε περίπτωση που έχουν κληρονομήσει την μετάλλαξη. [129]

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το δεύτερο σε συχνότητα τύπο καρκίνου στο γυναικείο πληθυσμό, ενώ ο καρκίνος των ωοθηκών καταλαμβάνει την έκτη θέση. Η νόσος κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων *BRCA1* & *BRCA2* ερμηνεύουν το 5-10% των κλινικών περιστατικών καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών. Με την αξιολόγηση που έγινε σχετικά με τις μεταλλάξεις στον Ελληνικό πληθυσμό και την ανίχνευση παθογόνων μεταλλάξεων και σε άλλα γονίδια εκτός από το *BRCA1* και *BRCA2* συμπεραίνουμε ότι είναι πολύ σημαντική η εξέταση πάνελ γονιδίου μεταλλάξεων. Το χρησιμότερο εργαλείο βέβαια και για την ανίχνευση όσο το δυνατό περισσότερων μεταλλάξεων αλλά και για την ανίχνευση μεγάλων απαιριών ή διπλασιασμών είναι το WGS όπου μπορεί να πραγματοποιηθεί και η ανάλυση των CNVs. Οι επιπλέον αυτές πληροφορίες μπορεί να βοηθήσουν στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του μαστού και επομένως στην καλύτερη πρόγνωση αυτού. Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ακριβώς αυτός, δηλαδή να αποδείξει ότι για την πιο έγκυρη διάγνωση και πρόγνωση του καρκίνου του μαστού θα πρέπει να γίνεται ένας ευρύτερος έλεγχος και όχι μόνο στα γονίδια *BRCA1,2*.

Συμπερασματικά, η συνεισφορά ανάλυσης γονιδίων σχετιζόμενα με όλους τους τύπους καρκίνων και όχι μόνο του καρκίνου μαστού-ωοθηκών οδηγεί σε καλύτερη πρόγνωση. Η μοναδική τεχνική με την οποία μπορούν να ελεγχθούν ταυτόχρονα όλων των ειδών οι παραλλαγές είναι το Whole Genome Sequencing.

Τα γονίδια που μπορεί να βρεθεί να έχουν παραλλαγές μπορεί να μην έχουν αξιολογηθεί ακόμα σε σχέση με τον καρκίνο μαστού –ωοθηκών, όμως γίνονται συνεχώς καινούριες έρευνες και προστίθενται ολοένα και περισσότερα γονίδια, οπότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί η πληροφορία στο μέλλον.

Ήδη 4 νέα γονίδια σχετίζονται πλέον με προδιάθεση καρκίνου μαστού: *LZTR1*, *ATR*, *BARD1*, *CDKN2A* μετά από μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2023. [137]

Όλα τα ευρήματα και τα γονίδια που συσχετίζονται με καρκίνο ισχύουν με τα μέχρι στιγμής στοιχεία της διεθνούς βιβλιογραφίας και των διεθνών βάσεων μεταλλάξεων με κλινικό χαρακτήρα (ClinVar, OMIM) αντίστοιχα, τα οποία ενημερώνονται συνεχώς.

Δεν αποκλείεται το γεγονός σε μελλοντική βιοπληροφορική ανάλυση να προκύψουν νέα ή διαφορετικά δεδομένα ή νέα κλινικά στοιχεία του εξεταζομένου να βοηθήσουν στην ανάλυση

ΠΡΟΤΑΣΗ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΝΕΑΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΥΤΕΡΗ ΠΡΟΓΝΩΣΗ:
Whole Genome Sequencing :

Μόνο με μία εξέταση παρέχεται στον ασθενή η πληροφορία για όλο το γονιδίωμα και επιπλέον για τις παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (CNVs).

Κεφάλαιο 9

ΠΡΩΙΜΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

9.1 Εισαγωγή

Το μη φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της καρκινογένεσης, και συσχετίζεται με διατάραξη των επιπέδων έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η υπερμεθυλίωση μπορεί να είναι από τις πρωταρχικές αλλαγές που πυροδοτούν την ογκογένεση.

Η έγκαιρη ανίχνευση των πολυπόδων μειώνει τον κίνδυνο εξαλλαγής μέσω της επακόλουθης αφαίρεσής τους, ενώ η διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου σε πρώιμο ασυμπτωματικό στάδιο διασφαλίζει μεγαλύτερη πιθανότητα επιτυχούς θεραπευτικής αντιμετώπισης.

Άτομα τα οποία πληρούν ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω κριτήρια μπορούν να ωφεληθούν από μία γρήγορη και αξιόπιστη μη επεμβατική δοκιμασία διαλογής για την επακόλουθη υποβολή στην επεμβατική μέθοδο της κολονοσκόπησης:

1. ηλικία >40 ετών,

2. χρόνια νόσο εντέρου,
3. οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του γαστρεντερικού συστήματος,
4. μακροχρόνια αυξημένη κατανάλωση κόκκινου κρέατος,
5. παχυσαρκία,
6. υπερκατανάλωση αλκοόλ
7. κάπνισμα σε μακροχρόνια βάση.

Επίσης μπορούν να ωφεληθούν άτομα τα οποία δεν κρίνονται επιλέξιμα για υποβολή στην επεμβατική διαδικασία της κολονοσκόπησης λόγω της παρουσίας συννοσηροτήτων ή λήψης φαρμακευτικής αγωγής όπως αντιπηκτικά.

Εν γένει έχει αναφερθεί ότι η εξέταση της κολονοσκόπησης είναι τεχνικά δύσκολη σε ποσοστό έως και 10% και μπορεί να μην καταστεί εφικτή η ολοκλήρωσή της λόγω κακής προετοιμασίας, πόνου ή ανεπαρκούς καταστολής, ελικοειδούς παχέος εντέρου, εκκολπωματίτιδας, παρουσία αποφρακτικής μάζας και στένωσης εντέρου, ενώ σε ηλικιωμένους ασθενείς το αντίστοιχο ποσοστό μπορεί να φθάνει έως και 33%.

Οι κατευθυντήριες οδηγίες των οργανισμών NCCN (NCCN Guidelines Version 2.2021—Colorectal Cancer Screening. [accessed on 6 September 2021]) και ACC (American Cancer Society) συνιστούν την υποβολή σε τεστ κοπράνων υψηλής ευαισθησίας, σε ενήλικες ηλικίας ≥ 45 ετών με κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου του παχέος εντέρου που αντιστοιχεί στο μέσο όρο, ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

Η έγκαιρη ανίχνευση των πολυπόδων μειώνει τον κίνδυνο εξαλλαγής μέσω της επακόλουθης αφαίρεσής τους, ενώ η διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου σε πρώιμο ασυμπτωματικό στάδιο διασφαλίζει μεγαλύτερη πιθανότητα επιτυχούς θεραπευτικής αντιμετώπισης.

Επομένως, κρίθηκε σημαντική η ανάπτυξη ενός εργαλείου διαλογής ύποπτων περιστατικών που βοηθά στην έγκαιρη διάγνωση ώστε μόνο αν είναι θετικό το αποτέλεσμα να πρέπει να γίνεται κολονοσκόπηση για επιβεβαίωση των ευρημάτων.

Η δοκιμασία διαλογής ύποπτων περιστατικών για καρκίνο του παχέος εντέρου που αναπτύχθηκε, αξιολογήθηκε σε 30 δείγματα με διαγνωσμένο καρκίνο παχέος εντέρου (δείγματα 31-60) και σε 30 δείγματα κοπράνων υγιών ατόμων χωρίς κλινικό ή οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του παχέος εντέρου (δείγματα 1-30) με ηλικιακό εύρος 45-65 έτη τα οποία μόλις είχαν υποβληθεί ή υποβλήθηκαν μετέπειτα σε προληπτική κολonosκόπηση. Ως θετικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα που πάσχει από καρκίνο του παχέος εντέρου και ως αρνητικό ένα δείγμα από ένα υγιές άτομο με καθαρό αποτέλεσμα κολonosκόπησης.

9.2 Αποτελέσματα

A) Τα αποτελέσματα δειγμάτων με διαγνωσμένο καρκίνο παχέος εντέρου παρουσιάζονται στον πίνακα

Πίνακας δειγμάτων με διαγνωσμένο καρκίνο παχέος εντέρου

	ADHFEI FAM 465-510			SDC2 VIC 533-580			PPP2R5C Cy5 618-660			GAPDH ROX 533-610	
	Ct	ΔCt	RESULT FOR ADHFEI Ct≤39 ΔCt≤5	Ct	ΔCt	RESULT FOR SDC2 Ct≤39 ΔCt≤8	Ct	ΔCt	RESULT FOR PPP2R5C Ct≤39 ΔCt≤7	Ct	Ct≤39
SAMPLES											
31	33,7	4,06	POSITIVE	-	-	NEGATIVE	31	1,36	POSITIVE	29,64	✓
32	33,61	3,29	POSITIVE	34,62	4,3	POSITIVE	-	-	NEGATIVE	30,32	✓
33	-	-	NEGATIVE	37,01	12	POSITIVE	30,05	5,03	POSITIVE	25,02	✓
34	-	-	POSITIVE	36,4	7,19	POSITIVE	32,42	3,21	POSITIVE	29,21	✓
35	30,52	1,5	POSITIVE	35,9	6,88	POSITIVE	31,54	2,52	POSITIVE	29,02	✓
36	42,46	14,51	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	30,49	2,54	POSITIVE	27,95	✓
37	42,6	17,13	NEGATIVE	31	5,53	POSITIVE	29,52	4,05	POSITIVE	25,47	✓
38	31,85	3,92	POSITIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	27,93	✓

39	25,73	1,91	POSITIVE	26,59	2,77	POSITIVE	26,57	2,75	POSITIVE	23,82	√
40	24,95	2,24	POSITIVE	25,85	3,14	POSITIVE	26,26	3,55	POSITIVE	22,71	√
41	27,89	3,16	POSITIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	24,73	√
42	25,86	2,88	POSITIVE	29,92	6,94	POSITIVE	26,76	3,78	POSITIVE	22,98	√
43	-	-	NEGATIVE	33,1	3,54	POSITIVE	-	-	NEGATIVE	29,56	√
44	34,33	3,33	POSITIVE	32,69	1,69	POSITIVE	-	-	NEGATIVE	31	√
45	33,21	4,21	POSITIVE	34,65	5,65	POSITIVE	33,63	4,63	POSITIVE	29	√
46	32,33	3,41	POSITIVE	30,59	1,67	POSITIVE	30,66	1,74	POSITIVE	28,92	√
47	26,44	4	POSITIVE	26,58	4,14	POSITIVE	25,44	3	POSITIVE	22,44	√
48	28,95	3,62	POSITIVE	29,63	4,3	POSITIVE	28,33	3	POSITIVE	25,33	√
49	26,32	1,96	POSITIVE	-	-	NEGATIVE	26,65	2,29	POSITIVE	24,36	√
50	-	-	NEGATIVE	32,22	6,8	POSITIVE	28,55	3,13	POSITIVE	25,42	√
51	29,24	2,5	POSITIVE	31,48	4,74	POSITIVE	29,46	2,72	POSITIVE	26,74	√
52	30,05	1,63	POSITIVE	30,52	2,1	POSITIVE	30,52	2,1	POSITIVE	28,42	√
53	28,56	3,2	POSITIVE	32,5	7,14	POSITIVE	28,58	3,22	POSITIVE	25,36	√
54	29,45	5,45	POSITIVE	-	-	NEGATIVE	26,53	2,53	POSITIVE	24	√
55	29,85	3,61	POSITIVE	31,05	4,81	POSITIVE	29,55	3,31	POSITIVE	26,24	√
56	31,02	1,7	POSITIVE	32,28	2,96	POSITIVE	42	12,7	NEGATIVE	29,32	√
57	30	2,5	POSITIVE	29,44	1,94	POSITIVE	44	16,5	NEGATIVE	27,5	√
58	30,44	3,78	POSITIVE	27,32	0,66	POSITIVE	-	-	NEGATIVE	26,66	√
59	26,32	2,88	POSITIVE	28,4	4,96	POSITIVE	26,52	3,08	POSITIVE	23,44	√
60	25,65	4,06	POSITIVE	35,42	13,8	POSITIVE	25,65	4,06	POSITIVE	21,59	√
pos C	30,52	1,67	POSITIVE ok√	31,32	2,47	POSITIVE ok√	29,59	0,74	POSITIVE ok√	28,85	√

neg C	-	-	NEGATIVE ok ✓	-	-	NEGATIVE ok ✓	-	-	NEGATIVE ok ✓	29,27	✓
NTC	-	-		-	-		-	-		-	-

ΔCt=difference between Ct values for the target and the internal control gene(GAPDH)

Β)Τα αποτελέσματα δειγμάτων υγείων ατόμων κοπράνων υγίων ατόμων χωρίς κλινικό ή οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του παχέος εντέρου με ηλικιακό εύρος 45-65 έτη τα οποία μόλις είχαν υποβληθεί ή υποβλήθηκαν μετέπειτα σε προληπτική κολonosκόπηση παρουσιάζονται στον πίνακα

Πίνακας δειγμάτων υγείων ατόμων κοπράνων υγίων ατόμων τα οποία μόλις είχαν υποβληθεί ή υποβλήθηκαν μετέπειτα σε προληπτική κολonosκόπηση

	ADHFEI FAM 465-510			SDC2 VIC 533-580			PPP2R5C Cy5 618-660			GAPDH ROX 533-610			
	Ct	ΔCt	RESULT FOR ADHFEI Ct≤39 ΔCt≤5	Ct	ΔCt	RESULT FOR SDC2 Ct≤39 ΔCt≤8	Ct	ΔCt	RESULT FOR PPP2R5C Ct≤39 ΔCt≤7	Ct	Ct≤39	RESULT	ΚΟΛΟΝΟ - ΣΚΟΠΗΣΗ
SAMPLES													
1	34,7	4,06	POSITIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	30,64	✓	HIGH RISK	✓ ΠΟΛΥΠΟΔΑΣ
2	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	35,96	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
3a	-	-	NEGATIVE	37,01	3,99	POSITIVE	-	-	NEGATIVE	33,02	✓	HIGH RISK	✓ 2 ΚΑΛΟΗΘΕΙΣ ΠΟΛΥΠΟΔΕΣ
3a	-	-	NEGATIVE	36,4	3,52	POSITIVE	-	-	NEGATIVE	32,88	✓		
3b	-	-	NEGATIVE	35,9	3,89	POSITIVE	-	-	NEGATIVE	32,01	✓		
4	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	27,95	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
5	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	31,47	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
6	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	27,93	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
7	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	23,82	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ

8	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	22,71	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
9	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	24,73	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
10	-	-	NEGATIVE	29,92	6,94	POSITIVE	-	-	NEGATIVE	22,98	✓	HIGH RISK	✓ ΠΟΛΥΠΟΔΑΣ
11	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	32	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
12	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	37,21	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
13	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	30,51	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
14	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	29,4	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
15	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	27,36	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
16	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	28,42	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
17	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	27,94	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
18	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	26,5	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
19	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	28,64	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
20	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	29,87	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
21	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	28,35	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
22	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	30,02	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
23	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	29,45	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
24	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	26,54	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
25	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	24,48	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
26	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	29,32	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
27	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	27,4	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
28	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	26,88	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
29	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	28,91	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ
30	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	-	-	NEGATIVE	27,34	✓	LOW RISK	✓ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ

pos C	30,2	3,72	POSITI VE ok✓	31,32	4,8	POSITI VE ok✓	29,6	3,07	POSITI VE ok✓	26,52	✓
neg C	-	-	NEGATI VE ok✓	-	-	NEGATI VE ok✓	-	-	NEGATI VE ok✓	29,27	✓
NT C	-	-		-	-		-	-		-	-
ΔCt=difference between Ct values for the target and the internal control gene(GAPDH)											

9.3 Συζήτηση

Η δοκιμασία διαλογής ύποπτων περιστατικών για καρκίνο του παχέος εντέρου που αναπτύχθηκε, αξιολογήθηκε σε 50 δείγματα με διαγνωσμένο καρκίνο παχέος εντέρου και σε 40 δείγματα κοπράνων υγιών ατόμων χωρίς κλινικό ή οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του παχέος εντέρου με ηλικιακό εύρος 45-65 έτη τα οποία μόλις είχαν υποβληθεί ή υποβλήθηκαν μετέπειτα σε προληπτική κολonosκόπηση.

Οι βιοδείκτες παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης σε όλα τα περιστατικά διαγνωσμένου καρκίνου του παχέος εντέρου, γεγονός που επιβεβαιώνει τη συσχέτιση των προς έλεγχο δεικτών με τη διαδικασία ογκογένεσης του παχέος εντέρου

Τρία εκ των 30 δειγμάτων της ομάδας προληπτικού ελέγχου κατατάχθηκαν στην ομάδα

υψηλού κινδύνου καθώς ο βιοδείκτης ADHFEI στο ένα και ο SDC2 στα άλλα δύο έδειξε αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης.

Οι ασθενείς 1 και 10 όταν έκαναν τη λήψη των κοπράνων τον ίδιο μήνα έκαναν κολonosκόπηση και είχαν πολύποδες οι οποίοι αφαιρέθηκαν

Στον ασθενή 3, η μετέπειτα κολonosκόπηση , η οποία έγινε δύο μήνες μετά, κατέδειξε την παρουσία δύο άμισχων πολυπόδων μεγέθους 0,6- 0,8εκ. (έναντι ειλεοτυφλικής βαλβίδας) και 20εκ. (από αιμοροϊδικό δακτύλιο) οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν καλοήθεις.

Οι παραπάνω περιπτώσεις αποτελούν ένδειξη του υψηλού βαθμού ευαισθησίας όσον αφορά την ανίχνευση πρώιμων αλλοιώσεων της προτεινόμενης δοκιμασίας.

Στο παχύ έντερο η αλλαγή του προτύπου μεθυλίωσης παρατηρείται στα πρώιμα στάδια του καρκίνου και συνδέεται άμεσα με την έναρξη της νόσου. Η έγκαιρη ανίχνευση

των πολυπόδων μειώνει τον κίνδυνο εξαλλαγής μέσω της επακόλουθης αφαίρεσής τους, ενώ η διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου σε πρώιμο ασυμπτωματικό στάδιο διασφαλίζει μεγαλύτερη πιθανότητα επιτυχούς θεραπευτικής αντιμετώπισης. Η έγκαιρη ανίχνευση των πολυπόδων μειώνει τον κίνδυνο εξαλλαγής μέσω της επακόλουθης αφαίρεσής τους, ενώ η διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου σε πρώιμο ασυμπτωματικό στάδιο διασφαλίζει μεγαλύτερη πιθανότητα επιτυχούς θεραπευτικής αντιμετώπισης. Επομένως κρίθηκε αναγκαία η ανάπτυξη μιας μεθόδου μη επεμβατικού τεστ διαλογής ύποπτων περιστατικών (screening) Η μέθοδος βασίζεται στην αξιολόγηση του επιγενετικού δείκτη της μεθυλίωσης σε επιθηλιακά κύτταρα τα οποία έχουν αποβληθεί με τα κόπρανα. Συγκεκριμένα προσδιορίζονται τα επίπεδα μεθυλίωσης τριών γενωμικών περιοχών του DNA που εξάγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα. Τα κόπρανα φαίνεται ότι αποτελούν το δείγμα επιλογής για τον μη επεμβατικό προσυμπτωματικό έλεγχο καρκίνου του παχέος εντέρου καθώς το DNA (ctDNA) προέρχεται απευθείας από τον ιστό του του όγκου ή/και προκαρκινικών αλλοιώσεων. Η μέθοδος αξιολογήθηκε και είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι φαίνεται πως μπορεί να ανιχνεύει ακόμα και τις πολύ μικρές αλλοιώσεις (πολύποδες). Συμπερασματικά, είναι μία μέθοδος που μπορεί να συνεισφέρει στην πρώιμη διάγνωση και συνεπώς και στην καλή πρόγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Κεφάλαιο 10

ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

A) ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ

ΠΡΟΤΑΣΗ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΝΕΑΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΥΤΕΡΗ ΠΡΟΓΝΩΣΗ: Whole Genome Sequencing (WGS)

- 1ος καρκίνος στο γυναικείο πληθυσμό και είναι πολύ σημαντικό να υπάρχουν εξετάσεις που να δίνουν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες αφού οι έρευνες αναπτύσσονται συνεχώς και τα γονίδια που συσχετίζονται με αυτόν αυξάνονται.
- WGS που μας δείνει την πληροφορία για όλο το γονιδίωμα και επιπλέον τις ιντρονικές περιοχές και τα CNVs τα οποία δε δίνει το WES. ♦ Μέθοδος επιλογής.
- Το κόστος μειώνεται συνεχώς
- Υπάρχει η δυνατότητα επαναξιολόγησης (“reanalysis”) των αποτελεσμάτων

B) ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

ΠΡΟΤΑΣΗ ΝΕΑΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΥΤΕΡΗ ΠΡΟΓΝΩΣΗ:

Εφαρμογή μεθόδου μη επεμβατικού τεστ διαλογής ύποπτων περιστατικών(screening) με βάση τη μεθυλίωση

- 3ος παγκοσμίως στο γενικό πληθυσμό.
- Η μεθυλίωση είναι ένας πολύ σημαντικός δείκτης ειδικά στα πρώιμα στάδια.
- Οι δυσκολίες της κολονοσκόπησης που προαναφέρθηκαν είναι πολλές και έχουν ως αποτέλεσμα πολλοί άνθρωποι ακόμα και να την αποφεύγουν μη ακολουθώντας τις οδηγίες των γιατρών
- Η έγκαιρη ανίχνευση των πολυπόδων μειώνει τον κίνδυνο εξαλλαγής μέσω της επακόλουθης αφαίρεσής τους, ενώ η διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου σε πρώιμο ασυμπτωματικό στάδιο διασφαλίζει μεγαλύτερη πιθανότητα επιτυχούς θεραπευτικής αντιμετώπισης.
- Από τη στιγμή που ανιχνευθεί ο πολύποδας σε αρχικό στάδιο η ίαση μπορεί να επιτευχθεί κατά 90%.

Συμπερασματικά, θα πρέπει να γίνεται η εφαρμογή νέων τεχνολογιών και η παρακολούθηση νέων ερευνών που εξελίσσονται συνεχώς και από τα εργαστήρια αλλά και από τους ιατρούς ώστε να επιτυγχάνεται με τη χρήση τους καλύτερη διάγνωση και πρόγνωση σε κάθε είδους καρκίνο για κάθε ασθενή. Αν μπορεί να σωθεί έστω και μία ζωή από κάποια νέα έρευνα ή τεχνική είναι επιτυχία!



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αθανάτου, Ε.Κ., 2002. Παθολογική και χειρουργική κλινική νοσηλευτική. Έκδοση ΣΤ'. Αθήνα
2. Hausman, D.M. 2019. What Is Cancer? *Perspectives in Biology and Medicine* 62(4), 778-784.
3. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
4. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
5. Kanwal, Shahzina, 2013. *Effect of O-GlcNAcylation on tamoxifen sensitivity in breast cancer derived MCF-7 cells*. IC UM3 (UMR 8104 / U1016) - Institut Cochin
6. Mercadante AA, Kasi A. Genetics, 2023. Cancer Cell Cycle Phases. Treasure Island (FL): StatPearls
7. Vinay Kumar MBBS MD FRCPATH, Abul K. Abbas MBBS, Jon C. Aster MD PhD, Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease (Robbins Pathology) 9th Edition
8. Nowell PC, Hungerford DA. ,1960. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. J Natl Cancer Inst. 25: 85-100.
9. Rowley JD. , 1973. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining." Nature. 243: 290-293.
10. Mehta P, Smith-Bindman R. , 2011. Airport Full-Body Screening: What Is the Risk? Arch Intern Med.
11. Ozasa K, Shimizu Y, Sakata R, Sugiyama H, Grant EJ, Soda M, Kasagi F, Suyama A., 2011. RISK OF CANCER AND NON-CANCER DISEASES IN THE ATOMIC BOMB SURVIVORS. Radiat Prot Dosimetry.
12. Cardis E, Hatch M. , 2011. The Chernobyl accident--an epidemiological perspective. Clin Oncol (R Coll Radiol). 2011;23(4):251–260.
13. Fazel R, Krumholz HM, Wang Y, Ross JS, Chen J, Ting HH, Shah ND, Nasir K, Einstein AJ, Nallamothu BK. , 2009. Exposure to low-dose ionizing radiation from medical imaging procedures. N Engl J Med. 2009 Aug 27;361(9):849-57.
14. Bagshaw M. , 2007. Cosmic radiation in commercial aviation. Travel Med Infect Dis. 2008 May;6(3):125-7.
15. Arun K. Kashyap, Sumit K. Dubey, 2022. CHAPTER 5 - Molecular mechanisms in cancer development, Understanding Cancer, Academic Press, Pages 79-90

16. Kang DH., 2022. Oxidative Stress, DNA damage and breast cancer. *AACN Clin Issues*. 13:540-549
17. Athar M. , 2002. Oxidative stress and experimental carcinogenesis. *Indian J. Exp. Biol.*. 40:656-667
18. Marnett LJ., 2002. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. 181-182:219-222
19. National Cancer Institute, 2021. What Is Cancer?, accessed at <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> on April 6, 2022.
20. National Library of Medicine, 2020. How Genes Work. Accessed at <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/howgeneswork/> on April 6, 2022.
21. The BT, Fearon ER., 2020. Chapter 14: Genetic and Epigenetic Alterations in Cancer. In: Niederhuber JE, Armitage JO, Doroshow JH, Kastan MB, Tepper JE, eds. *Abeloff's Clinical Oncology*. 6th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier
22. Nair V. , 2008. Retrovirus-induced oncogenesis and safety of retroviral vectors. *Curr Opin Mol Ther.*;10(5):431-8.
23. Elof Axel Carlson, 2011. *Mutation: The History of an Idea from Darwin to Genomics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press

24. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) represented by National Cancer Institute [<http://seer.cancer.gov>]
25. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Westervelt P, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Ding L, Mardis ER, Wilson RK et al., 2012. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*
26. Brégeon D, Doetsch PW. , 2011. Transcriptional mutagenesis: causes and involvement in tumour development. *Nature Rev Cancer*. 2011 Mar;11(3):218-27.
27. Brégeon D, Doetsch PW, 2011. Transcriptional mutagenesis: causes and involvement in tumour development. *Nat Rev Cancer*. 2011 Mar;11(3):218-27
28. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijerbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. "Creation of human tumour cells with defined genetic elements." *Nature* 400: 464-468
29. D. Brégeon, P.W. Doetsch, 2011. Transcriptional mutagenesis: causes and involvement in tumour development, *Nature Reviews Cancer* volume 11, pages218–227
30. Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., & Reece, J. B. (2017). *Campbell Biology* (11th ed.). Pearson

31. <https://cancerquest.org/cancer-biology/mutation>
32. Waddington, C. H. (2012). The epigenotype. *Int. J. Epidemiol.* 41, 10–13.
33. Waddington, C. H. (1957). *The strategy of the genes*. London: Geo Allen and Unwin.
34. Muller, H. J. (1930). Types of visible variations induced by x-rays in drosophila. *J. Genet.* 22, 299–334.
35. Kalantry, S. (2011). Recent advances in x-chromosome inactivation. *J. Cell. physiology* 226, 1714–1718.
36. Hollick, J. B., Dorweiler, J. E., and Chandler, V. L. (1997). Paramutation and related allelic interactions. *Trends Genet.* 13, 302–308. doi:10.1016/s0168-9525(97)01184-0
37. Haig, D. (2004). The (dual) origin of epigenetics. *Cold Spring Harb. symposia quantitative Biol.* 69, 67–70.
38. Ptashne, M. (2004). *A genetic switch*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
39. Tapscott, S. J., Davis, R. L., Thayer, M. J., Cheng, P. F., Weintraub, H., and Lassar, A. B. (1988). MyoD1: A nuclear phosphoprotein requiring a myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science* 242, 405–411.
40. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126, 663–676.
41. Holliday, R. (1996). “DNA methylation in eukaryotes: 20 years on,” in *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. Editors V. E. A. Russo, R. A. Martienssen, and A. D. Riggs (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), 5–27.
42. Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.
43. Grewal, S. I. S., and Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.* 8, 35–46.
44. St. Henikoff, 2023. The epigenetic landscape: An evolving concept
45. <https://el.wikipedia.org/wiki/Επιγενετική>
46. N. M. Al Aboud; C. Tupper; I Jialal., 2023. Genetics, Epigenetic Mechanism
47. Dor, Y. & Cedar, H., 2018. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *Lancet* **392**, 777–786
48. Ziller, M. J. et al. , 2013. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* **500**, 477–481

49. Cancer Genome Atlas Research Network., 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061–1068
50. Kundaje, A. et al. , 2015.Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* **518**, 317–330.
51. Loyfer, N., Magenheim, J., Peretz, A. *et al.* A DNA methylation atlas of normal human cell types. *Nature* **613**, 355–364
52. Avery OT, Macleod CM, McCarty M (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type lii. *J Exp Med* 79: 137–158.
53. Hotchkiss RD (1948). The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem* 175: 315–332. Discovered 5-methylcytosine in the mammalian genome.
54. Holliday R, Pugh JE (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187: 226–232.
55. Goto K, Numata M, Komura JI, Ono T, Bestor TH, Kondo H (1994). Expression of DNA methyltransferase gene in mature and immature neurons as well as proliferating cells in mice. *Differentiation* 56: 39–44. Identified DNA methyltransferase mRNA in postmitotic neurons and suggested that DNA methylation served a unique function in neurons.
56. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y et al (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324: 930–935. The first study to demonstrate the role of Tet enzymes in conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine, thus leading to recent studies of the DNA demethylation mechanism in the mammalian system.
57. Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W (1978). Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 274: 775–780Coulondre et al, 1978; Bird, 1980
58. Bird AP (1980). DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* 8: 1499–1504.
59. Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R (2000). Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA

- methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5237–5242. First study to demonstrate the presence of non-CG methylation in mammalian cells.
60. Xie W, Barr CL, Kim A, Yue F, Lee AY, Eubanks J et al (2012). Base-resolution analyses of sequence and parent-of-origin dependent DNA methylation in the mouse genome. *Cell* 148: 816–831. Recent article that identified significant levels of non-CpG DNA methylation in the murine frontal cortex
 61. Fouse SD, Shen Y, Pellegrini M, Cole S, Meissner A, Van Neste L et al (2008). Promoter CpG methylation contributes to ES cell gene regulation in parallel with Oct4/Nanog, PcG complex, and histone H3 K4/K27 trimethylation. *Cell Stem Cell* 2: 160–169.
 62. Gardiner-Garden M, Frommer M (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196: 261–282
 63. Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr AR, James KD, Turner DJ et al (2010). Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet* 6: e1001134.
 64. Ramirez-Carrozzi VR, Braas D, Bhatt DM, Cheng CS, Hong C, Doty KR et al (2009). A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. *Cell* 138: 114–128
 65. (Tazi J, Bird A (1990). Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell* 60: 909–920.
 66. Tazi and Bird, 1990· Mikkelsen et al, 2007)
 67. Carninci P, Sandelin A, Lenhard B, Katayama S, Shimokawa K, Ponjavic J et al (2006). Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet* 38: 626–635.
 68. Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8905–8909.
 69. Casparly T, Cleary MA, Baker CC, Guan XJ, Tilghman SM (1998). Multiple mechanisms regulate imprinting of the mouse distal chromosome 7 gene cluster. *Mol Cell Biol* 18: 3466–3474.
 70. Zwart R, Sleutels F, Wutz A, Schinkel AH, Barlow DP (2001). Bidirectional action of the Igf2r imprint control element on upstream and downstream imprinted genes. *Genes Dev* 15: 2361–2366.

71. (Shen et al, 2007; Weber et al, 2007; Fouse et al, 2008; Mohn et al, 2008; Meissner et al, 2008)
72. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P et al (2009). The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* 41: 178–186.
73. Mohn F, Weber M, Rebhan M, Roloff TC, Richter J, Stadler MB et al (2008). Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell* 30: 755–766.
74. Wutz A, Smrzka OW, Schweifer N, Schellander K, Wagner EF, Barlow DP (1997). Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island. *Nature* 389: 745–749.
75. (Shen et al, 2007; Weber et al, 2007; Fouse et al, 2008; Mohn et al, 2008; Meissner et al, 2008)
76. (Rakyan et al, 2004; Eckhardt et al, 2006; Meissner et al, 2008; Illingworth et al, 2010, Maunakea et al, 2010)
77. (Irizarry et al, 2009)
78. Esteller, M. Epigenetic changes in cancer. *F1000 Biol. Rep.* 3
79. Zhang, G. & Pradhan, S. Mammalian epigenetic mechanisms. *IUBMB Life* 66, 240–256 (2014).
80. Dabin, J., Fortuny, A. & Polo, S. E. Epigenome Maintenance in Response to DNA Damage. *Mol. Cell* 62, 712–727 (2016).
81. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. Nielsen FC et al *Nat Rev Cancer*. 2016 Sep;16(9):599-612. doi: 10.1038/nrc.2016.72. Epub 2016 Aug 12.
82. Contribution of large genomic BRCA1 alterations to early-onset breast cancer selected for family history and tumour morphology: a report from The Breast Cancer Family Registry. Smith LD et al. *Breast Cancer Res*. 2011 Jan 31;13(1): R14.
83. Breast Cancer Information Core: <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>
84. Genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2: A literature review. Ewald IP et al. *Genet Mol Biol*. 2009 Jul;32(3):437-46.
85. Trusight Cancer: <https://emea.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-cancer.html>

86. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), Copyright® 1966-2012. World Wide Web URL: <http://omim.org>
87. ACMG Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants. Genet Med. 2015 May;17(5):405-23..
88. PolyPhen: Adzhubei IA, et al. Nat Methods. 2010;7(4):248-249. genetics.bwh.harvard.edu/pph2
89. SIFT: Ng PC & Henikoff S. Hum Genet. 2006;7:61-80. <http://sift.jcvi.org>
90. Exome Aggregation Consortium (ExAC), Cambridge, MA. Available from: <http://exac.broadinstitute.org>
91. Genome Aggregation Database (gnomAD), Cambridge, MA. Available from: <http://gnomad.broadinstitute.org>
92. Genetics Home Reference: <https://ghr.nlm.nih.gov/>
93. ClinVita: <http://clinvitae.invitae.com/>
94. ClinVar: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
95. Ovarian Cancer in Hereditary Cancer Susceptibility Syndromes. Nakonechny QB et al Surg Pathol Clin. 2016 Jun;9(2):189-99. doi: 10.1016/j.path.2016.01.003. Epub 2016 Apr 11
96. The genetic prediction of risk for gynecologic cancers. Randall LM, Pothuri B. Gynecol Oncol. 2016 Apr;141(1):10-6. doi: 10.1016/j.ygyno.2016.03.007.
97. Managing patients at genetic risk of breast cancer. Pederson HJ et al, Cleve Clin J Med. 2016 Mar;83(3):199-206. doi: 10.3949/ccjm.83a.14057.
98. The relative contribution of point mutations and genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2 in high-risk breast cancer families. Palma MD, et al. Cancer Res. 2008 Sep 1;68(17):7006-14.
99. Identification of a novel BRCA1 large genomic rearrangement in a Spanish breast/ovarian cancer family. Palanca Suela S et al. Breast Cancer Res Treat. 2008 Nov;112(1):63-7. Epub 2007 Dec 1.
100. MRC Holland: <http://www.mrc-holland.com>
101. Brahmania M, Park J, Svarta S, Tong J, Kwok R, Enns R, 2012. Incomplete colonoscopy: maximizing completion rates of gastroenterologists. Gastroenterol (9):589-92.
102. Foliente RL, Chang AC, Youssef AI, Ford LJ, Condon SC, Chen YK Am J Gastroenterol, 1966. Endoscopic cecal perforation: mechanisms of injury. :705-8.

103. https://www.cdc.gov/cancer/colorectal/basic_info/screening/tests.htmrates of gastroenterologists.
104. Can J Gastroenterol (9):589-92.
105. (NCCN Guidelines Version2.2021—Colorectal Cancer Screening
106. <https://www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer.html>
107. https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq-system-guide-for-local-run-manager-15027617-05.pdf
108. <https://sequencing.roche.com/us/en/products/group/lightcycler-480-ii.html>
109. <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/technical-resources/technical-reference-library/capillary-electrophoresis-instruments-support-center/3130-3130xl-genetic-analyzers-support.html>
110. <https://www.integra-biosciences.com/japan/en/electronic-pipettes/voyager>
111. T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pub
112. <https://www.mn-net.com/nucleospin-tissue-mini-kit-for-dna-from-cells-and-tissue-740952.50>
113. Søren Persson, Richard F. de Boer, Anna M.D. Kooistra-Smid, Katharina E.P. Olsen, 2011. Five commercial DNA extraction systems tested and compared on a stool sample collection, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, Volume 69, Issue 3, Pages 240-244
114. <https://swiftbiosci.com/accel-amplicon-brca1-brca2-pa>
115. <https://swiftbiosci.com> Protocol for optional PCR on Accel Amplicon Libraries for compatibility with qubit fluorometric and bioanalyzer quantification methods
116. Frommer M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992; 89(5): 1827-1831.
117. Liang Ma^{#1}, Geng Qin^{#2}, Fei Gai³, Yongwei Jiang¹, Zhan Huang³, Hui Yang¹, Shukun Yao², Shiyu Du⁴, Yongtong Cao⁵. 2017. A novel method for early detection of colorectal cancer based on detection of methylation of two fragments of syndecan-2 (SDC2) in stool DNA
118. Yuan Y, Qu B, Yan J, Wang H, Yin L, Han Q., 2015. Diagnostic value of aberrant gene methylation in stool samples for colorectal cancer or adenomas: a meta-analysis. Panminerva Med. Jun;57(2):55-64. Epub 2014 Sep 26
119. Screening for Breast Cancer: U.S. Preventive Services Task Force. Recommendation Statement Ann Intern Med. 2009;151:716-726.

120. Stephen W Duffy, Tony Hsiu-Hsi Chen, Robert A Smith, Amy MingFang Yen & Laszlo Tabar., 2013. Real and artificial controversies in breast cancer screening. *Breast Cancer Manage*
121. The Royal College of Radiologists. Guidance on screening and symptomatic breast imaging. 3rd edition, 2013. Ref No BFCR (13)5.
122. 124, Brahmania M, Park J, Svarta S, Tong J, Kwok R, Enns R, 2012. Incomplete colonoscopy: maximizing completion rates of gastroenterologists. *Can J Gastroenterol* 2012 Sep;26(9):589-92.
123. Karssemeijer N, Bluekens AM, Beijerinck D, et al., 2009. Breast cancer screening results 5 years after introduction of digital mammography in a population-based screening program. *Radiology*;253:353–358
124. Perry N, Broeders M, deWolf C et al. , 2006. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis, 4th edition. Luxembourg: European Commission Office for Official Publications of the European Communities.
125. Dupont, Cathérine; Armant, D. Randall; Brenner, Carol A. (2009-9). «Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective». *Seminars in reproductive medicine* 27 (5): 351–357
126. Reik, Wolf (2007-05). «Stability and flexibility
127. "WHO Disease and injury country estimates". *World Health Organization*. 2009. Retrieved Nov 11, 2009.
128. Wilcox N, et al. (17/8/2023). Exome sequencing identifies breast cancer susceptibility genes and defines the contribution of coding variants to breast cancer risk. *Nature Genetics*
129. <http://genome.wustl.edu/articles/detail/decoding-cancer-patients-genomes-is-a-powerful-diagnostic-tool/>)
130. <https://www.breastsurgeons.org/docs/statements/Consensus-Guideline-on-Genetic-Testing-for-Hereditary-Breast-Cancer.pdf>
131. Fuso A, Ferraguti G, Scarpa S, Ferrer I, Lucarelli M. , 2015. Disclosing bias in bisulfite assay: MethPrimers underestimate high DNA methylation Chiariotti L, editor. *PLoS One*. Public Library of Science
132. Genereux DP, Johnson WC, Burden AF, Stöger R, Laird CD. 2008. Errors in the bisulfite conversion of DNA: Modulating inappropriate- and failed-conversion frequencies. *Nucleic Acids Res*

133. Wojdacz TK, Dobrovic A, Hansen LL. , 2008.Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc.* Nature Publishing Group; 3: 1903–1908
134. Ehrich M, et al. *Nuc. Acids Res.* 2007; 35 (5): e29 2. Kaneda M, et al. *Nature.* 2004; 429: 900-903 3. Zhang F, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104 (11): 4395-4400. 4. Oda M, et al. *Genes & Dev.* 2006; 20: 3382-3394. 5. England RPM, et al. *Nature Meth.* 2005; 2: 1-2.
135. https://files.zymoresearch.com/protocols/_d5020_d5021_ez_dna_methylation-direct_kit.pdf
136. Emily Eva Holmes,^{#1} Maria Jung,^{#1} Sebastian Meller,¹ Annette Leisse,¹ Verena Sailer,¹ Julie Zech,² Martina Mengdehl,² Leif-Alexander Garbe,² Barbara Uhl,¹ Glen Kristiansen,^{#1} and Dimo Dietrich¹ , *Zhuang Zuo, 2014. Performance Evaluation of Kits for Bisulfite-Conversion of DNA from Tissues, Cell Lines, FFPE Tissues, Aspirates, Lavages, Effusions, Plasma, Serum, and Urine, *PLoS One.* 2014; 9(4)
137. Naomi Wilcox, Martine Dumont, Anna González-Neira, Sara Carvalho, Charles Joly Beauparlant, Marco Crotti, Craig Luccarini, Penny Soucy, Stéphane Dubois, Rocio Nuñez-Torres, Guillermo Pita, Eugene J. Gardner, Joe Dennis, M. Rosario Alonso, Nuria Álvarez, Caroline Baynes, Annie Claude Collin-Deschesnes, Sylvie Desjardins, Heiko Becher, Sabine Behrens, Manjeet K. Bolla, Jose E. Castelao, Jenny Chang-Claude, Sten Cornelissen, Thilo Dörk, Christoph Engel, Manuela Gago-Dominguez, Pascal Guénel, Andreas Hadjisavvas, Eric Hahnen, Mikael Hartman, Belén Herráez, SGBCC Investigators, Audrey Jung, Renske Keeman, Marion Kiechle, Jingmei Li, Maria A. Loizidou, Michael Lush, Kyriaki Michailidou, Mihalís I. Panayiotidis, Xueling Sim, Soo Hwang Teo, Jonathan P. Tyrer, Lizet E. van der Kolk, Cecilia Wahlström, Qin Wang, John R. B. Perry, Javier Benitez, Marjanka K. Schmidt, Rita K. Schmutzler, Paul D. P. Pharoah, Arnaud Droit, Alison M. Dunning, Anders Kvist, Peter Devilee, Douglas F. Easton & Jacques Simard, 2023, Exome sequencing identifies breast cancer susceptibility genes and defines the contribution of coding variants to breast cancer risk, *Nature Genetics* volume 55, pages1435–1439 (2023)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Preliminary results for non-invasive DNA Methylation test for colorectal cancer (CRC) screening (ΥΠΟ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ)

M. Chatzidaki ^{1,2}, G. Thodi ¹, K. Kentepozidis³, Y. Dotsikas ², Y. L. Loukas ^{1,2}

¹ Neoscreen, Ltd. , Voreiou Hpeirou 1-3, Athens, Greece

² Department of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, Greece

³ Department of Medical Oncology, 251 General Air Force Hospital, Athens, Greece

2. Estimation of frequency of pathogenic variants in cancer susceptibility genes including Homologous Recombination Repair (HRR) genes in an eastern European patients' cohort (ΥΠΟ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ)

M. Chatzidaki ^{1,2}, G. Thodi ¹, E. Molou ¹, Y. Dotsikas², Y. L. Loukas ^{1,2 *}

¹ Neoscreen, Ltd. , Voreiou Hpeirou 1-3, Athens, Greece

² Department of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, Greece