



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΛΥΣΗΣ
ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΥΨΗΛΗΣ-ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΛΥΣΗ
ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΤΗΞΗΣ DNA (HRMA) ΚΑΙ ARMS - PCR**

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΣΧΙΖΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

2011

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΣΧΙΖΑ

A.M.: 72918

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α.

Γεωργία Σωτηροπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Πατρών

Χρήστος Κρούπης, Επίκουρος Καθηγητής, Ε.Κ.Π.Α

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 25/11/2011

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό είναι συνδεδεμένες με τη βιολογία του καρκίνου και συνεπώς η ανίχνευσή τους αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά σημεία του συγκεκριμένου ερευνητικού πεδίου.

Στην παρούσα εργασία, έγινε προσπάθεια ανάπτυξης μιας μεθόδου ανίχνευσης μεταλλάξεων υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας, επιλέγοντας από ένα ευρύ φάσμα μεθοδολογιών που είναι αυτή τη στιγμή διαθέσιμες στη διεθνή βιβλιογραφία. Απώτερος στόχος είναι η ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA*, το οποίο έχει εμπλακεί γενικά στην καρκινογένεση και ιδιαίτερος στον καρκίνο του μαστού.

Σε πρώτη φάση ελέχθηκαν δείγματα γενωμικού DNA από κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, δείγματα cDNA καθώς και δείγματα cell free DNA από υγιείς αιμοδότες (24, 20, 12, αντίστοιχα), από ασθενείς με καρκίνο του μαστού με διάγνωση μετάστασης (34, 10, 45, αντίστοιχα), καθώς και ασθενείς με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και προ επικουρικής θεραπείας (60, 56, 25, αντίστοιχα). Η μεθοδολογία του χρησιμοποιήθηκε είχε απαπυχθεί στο εργαστήριό μας και βασίζεται στην ανάλυση υψηλής διακριτικότητας καμπυλών τήξεως (HRMA)¹. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα δείγματα cell free DNA το 20% των ασθενών με μετάσταση και το 12% των ασθενών προ επικουρικής θεραπείας έφεραν τη μετάλλαξη στο εξόνιο 20. Επίσης, στα δείγματα γενωμικού DNA από κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα το 3% των ασθενών με καρκίνο του μαστού προ επικουρικής θεραπείας έφεραν τη μετάλλαξη αυτή. Αντίθετα, στα δείγματα cDNA δε βρέθηκε θετικό αποτέλεσμα σε καμία κατηγορία δειγμάτων.

Στη συνέχεια αναπτύχθηκε η μεθοδολογία της ARMS-PCR και συμπληρωματικά ο συνδυασμός της με την ανάλυση καμπυλών τήξεως HRMA παρουσία προϊόντος εσωτερικού ελέγχου, εκτελώντας αντίδραση Real-time PCR. Μετά την απαραίτητη βελτιστοποίηση των δύο μεθοδολογιών, αξιολογήθηκε η ορθότητα των αποτελεσμάτων τους με εφαρμογή σε δείγματα DNA από ιστούς παραφίνης τα οποία είχαν ελεγχθεί με την τεχνολογία του DNA Sequencing. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η ευαισθησία των δύο μεθόδων με την εφαρμογή τους σε μία σειρά μειγμάτων φυσιολογικού και μεταλλαγμένου αλληλίου σε διαφορετικά ποσοστά.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ανάλυση μεταλλάξεων

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: *PIK3CA*, HRMA, ARMS-PCR, CTCs, cfDNA

ABSTRACT

Mutations in DNA are associated with the biology of cancer and therefore their detection is one of the most important issues in this cancer research.

In the present study, an attempt was made to choose a method for the detection of mutations, characterized by high sensitivity and specificity, among a wide range of methodologies that are currently available in literature. The next step was to detect mutations in *PIK3CA* gene which has been implicated in carcinogenesis in general and particularly in breast cancer.

First, samples of genomic DNA (gDNA) isolated from circulating tumor cells (CTC), samples of cDNA and samples of cell free DNA (cfDNA) were tested for the presence of the mutation in exon 20 of the *PIK3CA* gene. These samples were isolated from peripheral blood of patients with operable breast cancer (60, 56, 25, respectively), patients with metastatic breast cancer (34, 10, 45, respectively) and healthy donors (24, 20, 12, respectively). The methodology used, was previously developed in our laboratory and is based on High Resolution Melting Analysis (HRMA)¹. In cfDNA this method detected *PIK3CA* mutations in exon 20 in 20% of samples of patients with metastatic breast cancer as well as in 12% of samples of patients with operable breast cancer. Additionally, *PIK3CA* mutation on exon 20 was detected in 3% of samples of gDNA isolated from CTCs in patients with operable cancer. No mutation was detected in all samples of cDNA.

We then developed two new methodologies based on ARMS-PCR and ARMS-HRMA in order to detect mutations in very low percentages. The application of ARMS-PCR and additionally its combination with HRMA in the presence of an internal control was selected. After the optimization of all steps, the methodologies were evaluated in terms of accuracy by applying them in DNA isolated from FFPE samples, which were previously analyzed by DNA Sequencing. ARMS-PCR and ARMS-PCR-HRMA were evaluated in terms of sensitivity by using a number of mixtures of normal and mutant allele at different rates.

SUBJECT AREA: Mutation analysis

KEYWORDS: *PIK3CA*, HRMA, ARMS-PCR, CTCs, cfDNA

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	1
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ.....	1
1.1 Η βιολογία του καρκίνου ¹	1
1.2 Μεταλλάξεις και καρκίνος.....	3
1.2.1 Εισαγωγή	3
1.2.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ²	4
1.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ	6
1.3.1 Τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό	8
1.3.1.1 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism, Ανάλυση με βάση τον πολυμορφισμό της διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA) ²	8
1.3.1.2 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με κλίση αποδιατακτικού) ² ..	9
1.3.1.3 TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση θερμοκρασίας)	10
1.3.1.4 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPs, Ανίχνευση μεταλλάξεων με χρήση περιοριστικών ενζύμων)	10
1.3.2 Τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στον προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων	12
1.3.2.1 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων του DNA – Maxam & Gilbert Sequencing, Sanger Sequencing	12
1.3.2.2 Pyrosequencing (Αλληλούχηση DNA σε πραγματικό χρόνο).....	15
1.3.2.3 Next Generation Sequencing – Sequencing νέας γενιάς	18
1.3.3 Τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην αντίδραση της PCR	25
1.3.3.1 Quantitative PCR (qPCR, Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου με χρήση ανιχνευτών υβριδισμού)	25
1.3.3.2 Peptide Nucleic Acids (PNAs, Πεπτιδικά Νουκλεϊκά Οξέα) Locked Nucleic Acids (LNAs, «Κλειδωμένα» Νουκλεϊκά Οξέα)	33
1.3.3.3 Αλληλοειδική ενίσχυση PCR (Allele – Specific Amplification, ASA).....	37
1.3.3.4 Ασύμμετρη PCR με χρήση ανιχνευτών υβριδισμού (Asymmetric PCR with unlabeled probes)	40
1.3.3.5 COLD-PCR (Co-amplification at Lower Temperature, Συν-ενίσχυση σε χαμηλότερη θερμοκρασία αποδιάταξης-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)	41
1.3.4 PTT (Protein Truncation Test, Δοκιμασία πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης) ⁸⁶	47
1.3.5 ASO (allele-specific oligonucleotides) Hybridization - Υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια ²	48
1.3.6 D-HPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography, Αποδιατακτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης).....	48
1.3.7 Φασματομετρία Μάζας με Ιοντισμό Εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας σε συνδυασμό με ανιχνευτή χρόνου πτήσης (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)	48

1.3.8 Μικροσυστοιχίες Ολιγονουκλεοτιδίων DNA (DNA Microarrays).....	50
1.3.9 Υψηλής διακριτικότητας ανάλυση καμπυλών τήξεως (High Resolution Melting Curve Analysis).....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	55
2.1 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ PIK3CA ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	55
2.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	55
2.1.2 Κινάση της 3-φωσφατιδύλοϊνοσιτόλης (PI3K).....	55
2.1.3 Απορρύθμιση του μονοπατιού PI3K και καρκίνος	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	61
ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ PIK3CA ΣΕ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	61
3.1.1 Εισαγωγή.....	61
3.1.2 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Circulating Tumor Cells, CTCs) και μετάσταση	65
3.1.3 Μεταλλάξεις στα CTCs.....	66
3.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ PIK3CA	68
3.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	68
3.2.2 Σάρωση του γονιδίου PIK3CA για ανίχνευση μεταλλάξεων με DNA Sequencing.....	69
3.2.3 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο PIK3CA με SSCP και DHPLC. ¹³³	69
3.2.4 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο PIK3CA με τη μέθοδο της ARMS-PCR σε συνδυασμό με ανιχνευτές «Σκορπιούς». ^{71,134}	70
3.2.5 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο PIK3CA με ανάλυση καμπυλών τήξεως υψηλής διακριτικότητας (HRMA) ^{135,136}	71
3.2.6 Ανάλυση μεταλλάξεων στο γονίδιο PIK3CA με τη μέθοδο SNaPshot (Πολλαπλή PCR με ανιχνευτές SNaPshot) ¹³⁹	72
3.3 Σκοπός της παρούσας εργασίας	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	77
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	77
4.1 ΠΡΟΤΥΠΑ ΥΛΙΚΑ	77
4.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	77
4.2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA	77
4.2.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΙΣΤΩΝ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ	77
4.2.3 ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ DNA ΑΠΟ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	78
4.2.4 ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ CELL FREE DNA (CFDNA)	78
4.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ cDNA ΑΠΟ ΤΑ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	78
4.3.1 Κλινικά δείγματα ιστών παραφίνης.....	78
4.3.2 Απομόνωση DNA από κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα	80

4.3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ CELL FREE DNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	81
4.4 ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ	81
4.4.1 Πειραματική πορεία.....	82
4.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	82
4.5.1 Αρχή μεθόδου.....	82
4.5.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (<i>real-time PCR, qPCR</i>)	84
4.5.2.1 Εισαγωγή.....	84
4.5.2.2 Οργανολογία <i>real-time PCR</i>	85
4.6 ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΤΗΞΕΩΣ (HIGH RESOLUTION MELTING CURVE ANALYSIS)	86
4.6.1 Οργανολογία.....	87
4.6.2 Παράμετροι που επηρεάζουν τη διακριτικότητα.....	88
4.6.3 Επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	88
4.7 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης	91
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	93
Υψηλής διακριτικότητας ανάλυση καμπυλών τήξεως (HRMA)	93
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	93
5.2 <i>IN SILICO</i> ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	93
5.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΟ ΕΞΟΝΙΟ 20 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>PIK3CA</i>	95
5.4 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΕΞΟΝΙΟ 20 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>PIK3CA</i> ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	97
5.4.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ 3140 A>G ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ CTCs.....	97
5.4.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ 3140 A>G ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ cDNA ΠΟΥ ΣΥΝΤΕΘΗΚΑΝ ΑΠΟ mRNA ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΕ ΑΠΟ CTCs.....	103
5.4.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ 3140 A>G ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ CELL FREE DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ.....	105
5.5 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ 3140 A>G ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	111
5.5.1 ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΗΣ PI3K ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ ΜΕ HERCEPTIN ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	112
5.5.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	113
5.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	116
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	119
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM POLYMERASE CHAIN REACTION (ARMS-PCR)	119
6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	119
6.2 AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM PCR (ARMS-PCR).....	119
6.3 <i>IN SILICO</i> ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ARMS-PCR	124
6.4 Συνθήκες ARMS-PCR για το εξόνιο 20 του γονιδίου <i>PIK3CA</i>	125

6.5 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ, ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ARMS-PCR	127
6.5.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	127
6.5.2 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΤΗΣ ARMS-PCR ΓΙΑ ΤΟ ΕΞΟΝΙΟ 20 ΤΟΥ <i>PIK3CA</i>	127
6.5.3 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ARMS-PCR ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΓΝΩΣΤΩΝ, ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΙΣΤΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΕ BLOCK ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ	129
6.5.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ARMS-PCR ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΜΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ (T47D/A17)	131
6.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	132
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	133
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ARMS-PCR ΜΕ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΤΗΞΕΩΣ (HRMA)	133
7.1 ARMS-PCR ΜΕ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ HRMA	133
7.2 <i>IN SILICO</i> ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	136
7.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR ΚΑΙ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΤΗΞΕΩΣ	138
7.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΤΗΞΕΩΣ	140
7.4 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΤΗΣ ARMS-PCR ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΤΟ HRMA	141
7.5 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ARMS-PCR ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΤΟ HRMA ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΓΝΩΣΤΩΝ, ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΙΣΤΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΕ BLOCK ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ	148
7.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ARMS-PCR ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΤΟ HRMA ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΜΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ (T47D/A17)	149
7.7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	150
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	157
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	161
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	163

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1 Θεωρητική απεικόνιση ανάλυσης SSCP (αριστερά). Τυπικό ηλεκτροφόρημα SSCP (δεξιά). Φυσιολογικό δείγμα, ομοζυγωτικό μεταλλαγμένο και ετεροζυγωτικό μεταλλαγμένο.....	9
Σχήμα 1.2 Αρχή μεθόδου DGGE για φυσιολογικό δείγμα, ομοζυγωτικό μεταλλαγμένο και ετεροζυγωτικό μεταλλαγμένο (αριστερά) και τυπικό ηλεκτροφόρημα DGGE (δεξιά).....	10
Σχήμα 1.3 Αρχή μεθόδου ανάλυσης RFLPs.	11
Σχήμα 1.4 Αρχή της χημικής μεθόδου DNA sequencing κατά Maxam & Gilbert.....	13
Σχήμα 1.5 Αρχή ενζυμικής μεθόδου DNA sequencing κατά Sanger.....	14
Σχήμα 1.6 Αρχή μεθόδου Pyrosequencing.....	16
Σχήμα 1.7 Αριθμός δημοσιεύσεων στο PubMed για τις πιο σημαντικές μεθόδους ανάλυσης DNA και για την τεχνολογία του Next generation sequencing.....	19
Σχήμα 1.8 Μία από τις πλατφόρμες κυκλικών συστοιχιών (αναλυτής Roche/454) για την ενίσχυση μονόκλωνων αντιγράφων DNA από μία βιβλιοθήκη τμημάτων με τη βοήθεια σφαιριδίων αγαρόζης.....	20
Σχήμα 1.9 Αρχή μεθόδου SBH.	23
Σχήμα 1.10 Φαινόμενο FRET: Φάσματα διέγερσης και εκπομπής φθορισμού ενός ζεύγους χρωστικών (δότη και δέκτη)	26
Σχήμα 1.11 Ζεύγος ανιχνευτών υβριδισμού DNA ως σύστημα ανίχνευσης, βάσει του φαινομένου FRET, στην PCR πραγματικού χρόνου.	27
Σχήμα 1.12 Αρχή συστήματος ανίχνευσης με ανιχνευτές υδρόλυσης.....	28
Σχήμα 1.13 Δομή Μοριακού Φάρου και αρχή συστήματος ανίχνευσης με Μοριακούς Φάρους.	30
Σχήμα 1.14 Μηχανισμός ανίχνευσης με «Σκορπιούς».....	31
Σχήμα 1.15 Γονοτύπηση με χρήση εκκινητών Snapback και χρωστικής LC Green Plus...32	
Σχήμα 1.16 Δομή PNA και σύγκριση δομών μεταξύ PNA, DNA και πρωτεΐνης.	34
Σχήμα 1.17 Ο ρόλος των ανιχνευτών PNA στην επιλεκτική ενίσχυση των μεταλλαγμένων αλληλίων κατά την αντίδραση της PCR.	35
Σχήμα 1.18 Σύγκριση δομής LNA και DNA.....	35

Σχήμα 1.19 Περιγραφή μεθόδου WTB-PCR με LNAs.....	36
Σχήμα 1.20 Βασική αρχή των μεθόδων που βασίζονται στην αλληλοειδική ενίσχυση.	38
Σχήμα 1.21 Χαρακτηριστικά γραφήματα Real-time PCR και οι παραγόμενες καμπύλες τήξης, ως αποτέλεσμα συμμετρικής και ασύμμετρης PCR, παρουσία ενός μη- επισημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου-ιχνηθέτη και της φθορίζουσας χρωστικής LCGreen..	41
Σχήμα 1.22 Περιγραφή σταδίων “full” COLD-PCR. ⁷⁷	44
Σχήμα 1.23 Περιγραφή σταδίων “fast” COLD-PCR. ⁷⁷	45
Σχήμα 1.25 Στάδια διαδικασίας μεθόδου MALDI.	49
Σχήμα 1.26 Βασικές αρχές μιας χαρακτηριστικής καμπύλης HRM.	52
Σχήμα 1.27 Χαρακτηριστική καμπύλη HRM, όπου φαίνεται ο διαχωρισμός ομόζυγων και ετερόζυγων δειγμάτων, καθώς και η διάκριση φυσιολογικού και μεταλλαγμένου ομόζυγου δείγματος.	53
Σχήμα 2.1 Α. Η αντίδραση που καταλύεται από την PI3K (PIP ₂ : 4,5-διφωσφορική, PIP ₃ : 3,4,5-τριφωσφορική, PI:φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη). Β. Η PI3K ενεργοποιείται με τη δέσμευση στον υποδοχέα RTK, ο οποίος ενεργοποιεί τη λειτουργική υπομονάδα (p85) στο να δεσμεύσει την καταλυτική υπομονάδα p110α (PIK3CA). Αυτό καταλήγει σε μια ποικιλία καθοδικών αλυσιδωτών σημάτων, που οδηγούν στην κυτταρική επιβίωση, απόπτωση, μετασχηματισμό.	56
Σχήμα 2.2 Ενεργοποίηση PKB από το ενεργό σύμπλεγμα PI3K.	57
Σχήμα 2.3 Το μονοπάτι PI3K-PTEN.	58
Σχήμα 2.4 Περιγραφή του PI3CA και των λειτουργικών περιοχών του με τις πιο συχνά εμφανιζόμενες μεταλλάξεις.	60
Σχήμα 3.1 Ο μεταστατικός καταρράκτης.	62
Σχήμα 3.2 Το γραμμικό μοντέλο εξέλιξης του καρκίνου.	63
Σχήμα 3.3 Το μοντέλο της παράλληλης εξέλιξης.	64
Σχήμα 4.1 Α: Πειραματική πορεία απομόνωσης των CTCs με τη μέθοδο της φικόλης και της θετικής επιλογής μέσω αντισώματος έναντι του Ep-CAM. Β: Πειραματική διαδικασία απομόνωσης γενωμικού DNA από CTCs με χρήση Trizol.....	80
Σχήμα 4.2. Σχηματική παράσταση της PCR	83

Σχήμα 4.3. Παρακολούθηση των τριών φάσεων της qPCR και σύγκριση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης της συμβατικής αντίδρασης PCR σε αντίστοιχο αριθμό κύκλων.....	84
Σχήμα 4.4 Φάσμα φθορισμού των LCGreen Plus και SYBR Green I.	90
Σχήμα 4.5 Ανακατανομή των χρωστικών ουσιών παρεμβολής στο DNA κατά τη διάρκεια της αποδιάταξης του DNA.....	91
Σχήμα 5.1 Η αλληλουχία του εξονίου 20 με τις πλησιέστερες αλληλουχίες ιντρονίων.....	94
Σχήμα 5.2 Το σηματοδοτικό μονοπάτι του HER2 και η σύνδεσή του με το μονοπάτι PI3K/PTEN	112
Σχήμα 6.1 Αρχή μεθόδου ARMS-PCR.....	121
Σχήμα 6.2 Εφαρμογή ARMS-PCR.....	123
Σχήμα 6.3 Η αλληλουχία του εξονίου 20 με τις πλησιέστερες αλληλουχίες ιντρονίων.....	124
Σχήμα 7.1 ARMS-HRMA.....	135
Σχήμα 7.2 Η αλληλουχία του εξονίου 20 με τις πλησιέστερες αλληλουχίες ιντρονίων. ...	137

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 4.1. Τυπικό καταγράφημα φάσματος απορρόφησης DNA στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop	82
Εικόνα 4.2. α) Τοποθέτηση δείγματος στο NanoDrop, β) Θέση βραχίονα κατά την απορρόφηση, γ) Καθαρισμός της θέσης μετά τη μέτρηση.	82
Εικόνα 4.3 Το όργανο LightCycler της εταιρείας Roche και σχηματική παράσταση της οργανολογίας του.....	85
Εικόνα 4.4 Το όργανο HR-1. (Idaho Technology Inc, Utah, USA)	87
Εικόνα 5.1 Καταγραφήματα καμπυλών τήξεως Α.δειγμάτων υγιών αιμοδοτών Β.δειγμάτων ασθενών με καρκίνο του μαστού με διάγνωση μετάστασης.....	101
Εικόνα 5.1Γ Καταγραφήματα καμπυλών τήξεως δειγμάτων ασθενών με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας.	102
Εικόνα 5.2 Καταγράφημα διαφοράς φθορισμού όπου παρουσιάζονται τα δύο μεταλλαγμένα δείγματα. Στη βάση με γκρί χρώμα παρουσιάζονται τα φυσιολογικά δείγματα.....	102
Εικόνα 5.3 Καταγράφημα καμπυλών τήξεως όπου όλες οι κατηγορίες δειγμάτων (υγιείς, μεταστατικοί και προ επικουρικής θεραπείας) δε φέρουν τη μετάλλαξη στο εξόνιο 20 του <i>PIK3CA</i>	105
Εικόνα 5.4 Καταγράφημα καμπυλών τήξεως δειγμάτων cell free DNA υγιών αιμοδοτών	108
Εικόνα 5.5 Καταγραφήματα καμπυλών τήξεως μεταλλαγμένων δειγμάτων cell free DNA ασθενών μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας	108
Εικόνα 5.6 Καταγράφημα διαφοράς φθορισμού όπου παρουσιάζονται τα τρία μεταλλαγμένα δείγματα. Στη βάση με γκρί χρώμα παρουσιάζονται τα φυσιολογικά δείγματα.....	109
Εικόνα 5.7 Καταγραφήματα καμπυλών τήξεως μεταλλαγμένων δειγμάτων cell free DNA ασθενών με διάγνωση μετάστασης.....	110
Εικόνα 5.8 Καταγράφημα διαφοράς φθορισμού όπου παρουσιάζονται τα εννέα μεταλλαγμένα δείγματα από ασθενείς με μετάσταση. Στη βάση με γκρί χρώμα παρουσιάζονται τα φυσιολογικά δείγματα.....	111
Εικόνα 5.9 Καταγράφημα καμπυλών τήξεως δειγμάτων από ιστούς παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού.....	114

Εικόνα 5.10 Καταγράφημα διαφοράς φθορισμού δειγμάτων από ιστούς παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού.....	114
Εικόνα 6.1 Α. Καμπύλες ενίσχυσης PCR για $T_{an}=58^{\circ}C$. Μαύρο-Κόκκινο=A17 και Πράσινο-Ροζ=T47D, Β. Καμπύλες ενίσχυσης PCR για $T_{an}=60^{\circ}C$. Πράσινο=A17 και Κόκκινο=T47D, Γ. Καμπύλες ενίσχυσης PCR για $T_{an}=63^{\circ}C$. Μαύρο=A17 και Πράσινο-Ροζ=T47D	129
Εικόνα 6.2 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της ARMS-PCR. Παρουσιάζονται το θετικό και αρνητικό πρότυπο καθώς και δύο φυσιολογικά και δύο μεταλλαγμένα δείγματα	130
Εικόνα 6.3 Καταγράφημα αντίδρασης ARMS-PCR. Καθορισμός ορίου λήψης απόφασης (cut-off) και προσδιορισμός ευαισθησίας της συγκεκριμένης μεθοδολογίας.	131
Εικόνα 7.2 Γράφημα καμπυλών τήξεως προϊόντων αντίδρασης PCR με διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινητών	142
Εικόνα 7.3 Γραφήματα καμπυλών τήξεως προϊόντων αντίδρασης PCR με δύο στάδια ενίσχυσης.....	145
Εικόνα 7.4 Γραφήματα καμπυλών τήξεως προϊόντων αντίδρασης PCR με τρία στάδια ενίσχυσης. Με πράσινο και πορτοκαλί παρουσιάζονται τα προϊόντα της PCR με συγκεντρώσεις εκκινητών 0,15μM και 0,3μM, ενώ με καφέ και μώβ τα προϊόντα της PCR με συγκεντρώσεις εκκινητών 0,2μM και 0,3 μM.	147
Εικόνα 7.5 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR. Δύο προϊόντα, 70bp και 50bp για το πρότυπο που φέρει τη μετάλλαξη και ένα προϊόν 70bp για το φυσιολογικό πρότυπο.	148
Εικόνα 7.6 Γράφημα καμπυλών τήξεως όπου διαχωρίζονται οι καμπύλες των φυσιολογικών δειγμάτων από αυτές των μεταλλαγμένων.....	149
Εικόνα 7.7 Γράφημα καμπυλών τήξεως για προσδιορισμό της ευαισθησίας της μεθόδου ARMS-PCR με εσωτερικό πρότυπο σε συνδυασμό με HRMA.	150

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1 Συνοπτικός πίνακας μεθόδων ανίχνευσης μεταλλάξεων	7
Πίνακας 5.1 Χαρακτηριστικά εκκινητών Real-time PCR.....	95
Πίνακας 5.2 Συστατικά αντίδρασης PCR για εξόνιο 20 του <i>PIK3CA</i>	95
Πίνακας 5.3 Συνθήκες PCR για το εξόνιο 20 του <i>PIK3CA</i>	96
Πίνακας 5.4 Συνθήκες ανάκτησης καμπυλών τήξεως	96
Πίνακας 5.5 Ανάλυση δειγμάτων γενωμικού DNA από CTCs υγιών αιμοδοτών	98
Πίνακας 5.6 Ανάλυση δειγμάτων γενωμικού DNA από CTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού με διάγνωση μετάστασης	99
Πίνακας 5.7 Ανάλυση δειγμάτων γενωμικού DNA από CTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας	100
Πίνακας 5.8 Ανάλυση δειγμάτων cDNA από CTCs υγιών αιμοδοτών.....	103
Πίνακας 5.9 Ανάλυση δειγμάτων cDNA από CTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού με διάγνωση μετάστασης.....	103
Πίνακας 5.10 Ανάλυση δειγμάτων cDNA από CTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας.....	104
Πίνακας 5.11 Ανάλυση δειγμάτων cell free DNA από περιφερικό αίμα υγιών αιμοδοτών	106
Πίνακας 5.12 Ανάλυση δειγμάτων cell free DNA από περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας	106
Πίνακας 5.13 Ανάλυση δειγμάτων cell free DNA από περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού και διάγνωση μετάστασης	107
Πίνακας 5.14 Ανάλυση δειγμάτων ιστών παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού ..	113
Πίνακας 5.15 Ανάλυση δειγμάτων ιστών παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού (2008)	115
Πίνακας 6.1 Χαρακτηριστικά εκκινητών για την ARMS-PCR του <i>PIK3CA</i>	125
Πίνακας 6.2 Συστατικά της αντίδρασης ARMS-PCR για το <i>PIK3CA</i>	125
Πίνακας 6.3 Συνθήκες ARMS-PCR για το εξόνιο 20 του γονιδίου <i>PIK3CA</i>	126
Πίνακας 6.4 Συνθήκες ανάκτησης καμπυλών τήξεως για το γονίδιο <i>PIK3CA</i>	126

Πίνακας 7.1 Χαρακτηριστικά εκκινητών για την ARMS-PCR με εσωτερικό πρότυπο για το <i>PIK3CA</i>	138
Πίνακας 7.2 Συστατικά της αντίδρασης ARMS-PCR με εσωτερικό πρότυπο για το <i>PIK3CA</i>	138
Πίνακας 7.3 Συνθήκες ARMS-PCR με εσωτερικό πρότυπο για το εξόνιο 20 του <i>PIK3CA</i>	139
Πίνακας 7.5 Βελτιστοποίηση συγκεντρώσεων εκκινητών για ARMS-PCR με εσωτερικό πρότυπο	142
Πίνακας 7.6 Βελτιστοποιήσεις πρωτοκόλλου ARMS-PCR με εσωτερικό πρότυπο με δύο στάδια ενίσχυσης	144
Πίνακας 7.7 Βελτιστοποιήσεις πρωτοκόλλου ARMS-PCR με εσωτερικό πρότυπο με τρία στάδια ενίσχυσης	146

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία διπλώματος ειδίκευσης στην Κλινική Χημεία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, στο Τμήμα Χημείας του Ε.Κ.Π.Α.

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Ευρύκλεια Λιανίδου για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την ερευνητική μου εργασία ειδίκευσης στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας. Την ευχαριστώ για τις συμβουλές της και την καθοδήγηση, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής. Παρά τις δυσκολίες της φετινής χρονιάς, μου παρείχε ό,τι χρειαζόμουν για την εκτέλεση των πειραμάτων και την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Θα ήταν παράλειψή μου να μην αναφέρω και να μην την ευχαριστήσω για την ευκαιρία που μου έδωσε να ξελιχθώ περαιτέρω, ανοίγοντας μου νέους ορίζοντες μετά την ολοκλήρωση αυτού του μεταπτυχιακού προγράμματος...Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την Κα Γ. Σωτηροπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Πατρών και τον Κ Χ.Κρούπη, Επίκουρο Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, για τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις.

Θα ήθελα στη συνέχεια να ευχαριστήσω τη διδάκτορα Αρετή Στρατή για τα δείγματα που μου διέθεσε, για τις πολύτιμες συμβουλές της, για τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, καθώς και για το ενδιαφέρον και τη συμπαράσταση κατά το διάστημα της παραμονής μου στο εργαστήριο. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διδάκτορα Αθηνά Μάρκου και την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Χειμωνίδου για το ενδιαφέρον τους και το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ ακόμα το Λάμπρο Δημητρακόπουλο γιατί ήταν αυτός που ανέλαβε από την πρώτη μου μέρα στο εργαστήριο, να με κατατοπίσει σχετικά με τη λειτουργία του εργαστηρίου και να μου δώσει τις πρώτες συμβουλές.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες Ιωάννα Σουρβίνου και Κλειώ Παρίση και τη Σοφία Φάρκωνα για το τόσο ευχάριστο κλίμα στο γραφείο, για το ενδιαφέρον τους, τη βοήθειά τους και για τις ατελείωτες συζητήσεις επιστημονικού περιεχομένου και μη...Οι διάλογοι θα μείνουν ανεξίτηλοι... Θα ήθελα να ευχαριστήσω ειδικά την Κλειώ για την υποστήριξή της...τεχνολογική, επιστημονική και φυσικά ψυχολογική...

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Μυρτώ Ρίζου, την Κωνσταντίνα Τζίκα και τη Σοφία Φάρκωνα, τρεις ανθρώπους ξεχωριστούς με τους οποίους περάσαμε πολύ ωραία αυτά τα δύο χρόνια, μοιραστήκαμε πολλά και γελάσαμε πολύ..τους εύχομαι ό,τι καλύτερο..

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

1.1 Η βιολογία του καρκίνου²

Η φύση του καρκίνου υποδεικνύει μία νόσο χάους, όπου παρατηρείται αποσυντονισμός της υπάρχουσας βιολογικής τάξης μέσα στον οργανισμό. Πιο ειδικά, οι διαταραχές που συνοδεύουν τη νόσο φαίνεται να πηγάζουν απευθείας από δυσλειτουργία των μηχανισμών ελέγχου, που είναι υπεύθυνοι για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στην πραγματικότητα, υπάρχουν πολλές ευκαιρίες μία τέτοια διαταραχή να επηρεάσει σημαντικά τις λειτουργίες του οργανισμού. Τα περισσότερα από τα 10^{13} κύτταρα που αποτελούν τον ανθρώπινο οργανισμό συνεχίζουν να μεταφέρουν τη γενετική πληροφορία που ευθύνεται για τη δημιουργία τους, και ίσως μελλοντικά τους επιτρέψει να πολλαπλασιαστούν για μία ακόμη φορά. Αυτό δικαιολογεί το γεγονός ότι, ο κίνδυνος του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού είναι σημαντικός για την επιβίωση των οργανισμών.

Στην πραγματικότητα, ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου είναι πολύ μεγαλύτερος από το 10^{13} μέγεθος του κυτταρικού πληθυσμού, αφού ο αριθμός αυτός αποτελεί ένα μέσο όρο του κυτταρικού πληθυσμού ενός ενήλικου ατόμου. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ζωής είναι κατά μέσο όρο 10^{16} , γεγονός που αποδεικνύει ότι πραγματοποιείται τεράστιος αριθμός κυτταρικών κύκλων - συμπεριλαμβανομένου του θανάτου και της αντικατάστασης (περίπου 10^7 κύκλοι / δευτερόλεπτο). Κάθε φορά που σχηματίζεται ένα νέο κύτταρο μέσω της πολύπλοκης διαδικασίας της κυτταρικής ανάπτυξης και διαίρεσης, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να συμβεί λάθος. Ως εκ τούτου, η πιθανότητα να επιτευχθεί μια τέτοια καταστροφή με αποτέλεσμα το σχηματισμό καρκινικών κυττάρων είναι πολύ μεγάλη.

Από τη στιγμή που μια φυσιολογική βιολογική λειτουργία του κυττάρου μπορεί να δημιουργήσει αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου, θα ήταν αναμενόμενο οι ανθρώπινοι πληθυσμοί να βιώνουν τέτοια περιστατικά με παρόμοια συχνότητα. Ωστόσο, κατά την εξέταση των ποσοστών εμφάνισης καρκίνου, γίνεται αμέσως αντιληπτό ότι οι πιθανότητες εκδήλωσης διαφορετικών τύπων καρκίνου διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών αυτών.

Κάποια είδη καρκίνου σχετίζονται με την παρουσία όγκων που σχηματίζονται τυχαία ή οφείλονται σε αναπόφευκτα ατυχήματα κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, και

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR συνεπώς εμφανίζονται με παρόμοια συχνότητα μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών. Παρ' όλα αυτά, στην ανάπτυξη κάποιων τύπων καρκίνου παρεμβαίνουν συγκεκριμένοι παράγοντες και αυξάνουν αισθητά τον αριθμό των περιστατικών σε συγκεκριμένες ομάδες ατόμων. Οι δύο προφανείς παράγοντες που συντελούν σε αυτό είναι η κληρονομικότητα και το περιβάλλον. Διαφορετικοί πληθυσμοί μπορεί να φέρουν καρκινο-ευαίσθητα αλληλόμορφα σε πολύ διαφορετικές συχνότητες, ενώ παράλληλα το περιβάλλον διαβίωσης συντελεί σημαντικά στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου.

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι οι όγκοι, στα περισσότερα είδη καρκίνων, δεν προέρχονται από το εξωτερικό περιβάλλον αλλά πηγάζουν από τους ίδιους τους φυσιολογικούς ιστούς. Επιπλέον αποδείχθηκε ότι έχουν την ικανότητα να μετακινούνται μέσα στα όρια του ανθρώπινου οργανισμού, με αποτέλεσμα να γίνονται ανιχνεύσιμοι όγκοι σε διαφορετικά σημεία και συνήθως αρκετά απομακρυσμένοι από την αρχική καρκινική εστία. Αυτό φανερώνει την τάση τους να διασπείρονται και να σχηματίζουν νέες αποικίες καρκινικών κυττάρων (μετάσταση).

Με την ιστοπαθολογική ανάλυση κατέστη δυνατή η κατανόηση της σχέσης μεταξύ της κλινικής συμπεριφοράς του όγκου και των μικροσκοπικών χαρακτηριστικών του. Πιο σημαντικά είναι τα κριτήρια με βάση τα οποία οι διάφοροι όγκοι κατατάσσονται σε μία από τις δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το βαθμό επιθετικής ανάπτυξης. Αυτοί που αναπτύσσονται τοπικά, χωρίς να εισβάλουν σε γειτονικούς ιστούς χαρακτηρίζονται ως **καλοήθεις (benign)**, ενώ αυτοί που έχουν την τάση να εισβάλουν σε γειτονικούς ιστούς και είναι υπεύθυνοι για τη δημιουργία μετάστασης ονομάζονται **κακοήθεις (malignant)**. Παράλληλα, οι διάφοροι καρκινικοί όγκοι μπορούν να διαχωριστούν με βάση την προέλευσή τους. Αν ο όγκος σχηματίζεται από κύτταρα που προέρχονται από ένα κοινό προγονικό κύτταρο, τότε χαρακτηρίζεται ως **μονοκλωνικός (monoclonal)**. Εναλλακτικά, αν η μάζα του όγκου αποτελείται από μία σειρά γενετικά διαφοροποιημένων κυτταρικών υποπληθυσμών, που δεν παρέχουν καμία ένδειξη κοινής προέλευσης, τότε ο όγκος χαρακτηρίζεται ως **πολυκλωνικός (polyclonal)**.

1.2 Μεταλλάξεις και καρκίνος

1.2.1 Εισαγωγή

Οι μεταλλάξεις είναι μόνιμες αλλαγές ή αλλοιώσεις στο γενετικό υλικό ενός κυττάρου, οι οποίες επηρεάζουν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός ή περισσότερων γονιδίων. Οι περισσότερες είναι επιβλαβείς, εφόσον δεν επιδιορθωθούν. Ευτυχώς, όμως, οι περισσότερες από τις προαναφερθείσες μεταλλάξεις δεν εκδηλώνονται, αφού το αντισταθμιστικό γονίδιο του ομόλογου (ή αλληλόμορφου) χρωμοσώματος είναι φυσιολογικό, ενώ για την εκδήλωση κάποιας γενετικής ασθένειας είναι απαραίτητο να υπάρχει μετάλλαξη και στα δύο ομόλογα χρωμοσώματα στο συγκεκριμένο γονίδιο από το οποίο εξαρτάται η ασθένεια.

Πολλές από αυτές τις μεταλλάξεις των γονιδίων συνδέθηκαν από νωρίς με την ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνου, και για το λόγο αυτό η ανάπτυξη τεχνικών για την ανίχνευση αυτών των μεταλλάξεων στο DNA εγκαίρως έγινε απαραίτητη. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα για την ανάλυση και την ταυτοποίηση μεταλλάξεων είναι ποικίλες και βασίζονται σε πολλές διαφορετικές αρχές. Οι πρώτες απόπειρες έγιναν με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων και η εμφάνιση του αποτελέσματος γινόταν με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό και την τεχνική της **αποτύπωσης (blotting)**. Γρήγορα όμως, φάνηκε η αδυναμία αυτής της προσέγγισης αφού όλες οι αλλαγές στην αλληλουχία του DNA δεν οδηγούν κατ' ανάγκη και σε αλλαγή κάποιας θέσης πρόσδεσης περιοριστικού ενζύμου – κάτι που οδήγησε σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Γι' αυτό αναπτύχθηκαν νέες τεχνικές που στηρίζονται σε άλλες ιδιότητες του γενετικού υλικού.

Οι τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων μπορούν να χωρισθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, αναλόγως με το αν μπορούν να προσδιορίσουν γνωστές ή να ανιχνεύσουν άγνωστες μεταλλάξεις. Εάν είναι γνωστό το φάσμα των μεταλλάξεων, τότε θα χρησιμοποιηθούν τεχνικές που μπορούν να «στοχεύσουν» συγκεκριμένες μεταλλάξεις (τεχνικές σάρωσης), ενώ σε αντίθετη περίπτωση θα χρησιμοποιηθούν τεχνικές που μπορούν να προσδιορίσουν οποιαδήποτε μετάλλαξη.³

Την τελευταία δεκαετία, η ανάγκη για ανίχνευση αλληλουχιών γονιδίων που περιέχουν μεταλλάξεις, παρουσία περίσσειας της φυσιολογικής αλληλουχίας, συναντάται πολύ συχνά στη γενετική του καρκίνου. Τα κλινικά δείγματα που προέρχονται από τον ίδιο τον όγκο (βιοψίες), τις περισσότερες φορές συνιστούν ανομοιογενή μείγματα διαφόρων τύπων κυττάρων, κύτταρα του στρώματος και καρκινικά κύτταρα, που περιλαμβάνουν ένα μεγάλο εύρος μεταλλάξεων.

Μία πρόκληση κατά την ανάπτυξη κλινικών και διαγνωστικών εφαρμογών, είναι η ικανότητα ανίχνευσης, κλινικώς σημαντικών μεταλλάξεων και αλληλίων που εμφανίζονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις μέσα σε ένα δείγμα. Η δυνατότητα διάκρισης μεταλλάξεων είναι σημαντική για πολλούς λόγους, αλλά ιδιαίτερος γι' αυτούς που ακολουθούν: (α) η έγκαιρη ανίχνευση του όγκου με ανάλυση δειγμάτων ιστών ή σωματικών υγρών (πλάσμα και ορός), (β) η εκτίμηση της υπολειμματικής νόσου μετά τη χειρουργική επέμβαση, (γ) σταδιοποίηση της νόσου και καθορισμός μοριακού προφίλ του όγκου για πρόγνωση ή καθορισμό εξατομικευμένης θεραπείας και (δ) ο έλεγχος και η παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου (ύφεση/υποτροπή). Η αποδοτική ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων που σχετίζονται με τον καρκίνο εξαρτάται σημαντικά από την ειδικότητα των τεχνικών και των μεθόδων που χρησιμοποιούνται. Η ανίχνευση και η ταυτοποίηση μεταλλάξεων σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια απαιτούν ανάλυση προ-καρκινικών ή καρκινικών ιστών, σωματικών υγρών, καθώς και DNA που απελευθερώνεται από τα κύτταρα και κυκλοφορεί στο αίμα.⁴

Τα τελευταία χρόνια, μετά τη συσχέτιση των **κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (Circulating Tumour Cells, CTCs)** και του **ελεύθερου κυττάρων DNA (cell-free DNA, cfDNA)** με τον καρκίνο και τη μετάσταση, το ενδιαφέρον στράφηκε προς την ανάπτυξη μεθοδολογιών και τεχνικών βελτιωμένης ειδικότητας και ευαισθησίας. Μεταλλαγμένο DNA που σχετίζεται με τον όγκο, έχει φανεί ότι είναι παρόν τόσο στα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα στο αίμα, όσο και σε τμήματα DNA ελεύθερα στο πλάσμα. Η εξακρίβωση της παρουσίας σπάνιων μεταλλάξεων, που συνδέονται με τον όγκο, στο αίμα θα ήταν ο καλύτερος δείκτης μέτρησης της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και της πρώιμης υποτροπής.⁵ Άρα, στόχος των νέων μεθόδων είναι η ικανότητα ανίχνευσης σωματικών μεταλλάξεων στο DNA σε δείγματα όπου τα μεταλλαγμένα αλληλία βρίσκονται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση σε σύγκριση με τα φυσιολογικά.⁶

1.2.2 Κατηγορίες μεταλλάξεων³

Ως **μετάλλαξη (mutation)** ορίζεται μία μόνιμη αλλαγή ή αλλοίωση στο γενετικό υλικό ενός κυττάρου, η οποία επηρεάζει τη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός ή περισσότερων γονιδίων. Η κατάταξη όλων αυτών των μεταλλάξεων μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Έτσι, μία αρχική κατάταξη θα μπορούσε να γίνει σύμφωνα με το είδος της βάσης που αντικαθιστά και αντικαθίσταται κάθε φορά. Κατ' αυτόν τον τρόπο, αναφέρονται:

- **Μεταλλάξεις μετάπτωσης (transition)**, όπου μία πουρίνη (αδενίνη A ή γουανίνη G) αντικαθίσταται από μία άλλη πουρίνη ή μία πυριμιδίνη (θυμίνη T ή κυτοσίνη C) αντικαθίσταται από μία άλλη πυριμιδίνη.
- **Μεταλλάξεις μεταστροφής (transversion)** όπου μία πουρίνη αντικαθίσταται από μία πυριμιδίνη ή το αντίστροφο.
- Μία δεύτερη και ίσως περισσότερο γνωστή κατάταξη γίνεται βάσει του μεγέθους του γενετικού υλικού που υφίσταται μετάλλαξη.
- Μεταλλάξεις που προκαλούν μεγάλες αναδιατάξεις στο μόριο του DNA, όπως **ελλείμματα (deletions)** ή **προσθήκες (insertions)** μεγάλων τμημάτων DNA.
- **Σημειακές μεταλλάξεις (point mutations)**, όπου μία μόνο βάση είναι αυτή που υφίσταται την «αλλοίωση».

Με τη σειρά τους τώρα οι σημειακές μεταλλάξεις, ως και οι πιο διαδεδομένες, χωρίζονται στις:

- Μεταλλάξεις με λάθος νόημα ή παρανοηματικές (missense), δηλαδή μεταλλάξεις όπου η αλλαγή της βάσης οδηγεί κατά τη μετάφραση σε αντικατάσταση ενός αμινοξέος από άλλο.
- Μεταλλάξεις χωρίς νόημα ή μη νοηματικές (nonsense), δηλαδή μεταλλάξεις όπου η αλλαγή βάσης οδηγεί κατά τη μετάφραση στη δημιουργία ενός εκ των τριών **κωδικονίων λήξης (stop codon)** της πρωτεϊνσύνθεσης (UAA, UAG, UGA), και εξαιτίας αυτού, δημιουργούνται ακρωτηριασμένες πρωτεΐνες με μικρότερο μέγεθος και μειωμένη λειτουργικότητα (**truncated protein**).
- Μεταλλάξεις αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης (frameshift), στις οποίες υπάρχει προσθήκη ή έλλειμμα ενός ή περισσότερων νουκλεοτιδίων -χωρίς όμως ο αριθμός των προστιθέμενων ή αφαιρούμενων νουκλεοτιδίων να είναι πολλαπλάσιο του 3 - με αποτέλεσμα να αλλάζει το πλαίσιο ανάγνωσης και να δημιουργείται εντελώς διαφορετική πρωτεΐνη. Η πρωτεϊνσύνθεση συνεχίζεται μέχρι την εύρεση κωδικονίου λήξης και η πρωτεΐνη μπορεί να είναι οποιοδήποτε μεγέθους σε σχέση με τη φυσιολογική. Αυτές οι μεταλλάξεις χαρακτηρίζονται και ως παθογνωμικές.
- Σιωπηρές (silent) μεταλλάξεις, δηλαδή μεταλλάξεις στις οποίες έχει αντικατασταθεί το τρίτο νουκλεοτίδιο κάποιου κωδικονίου και λόγω του εκφυλισμού του γενετικού κώδικα, η μετάλλαξη αυτή δε συνεπάγεται την αλλαγή κάποιου αμινοξέος κατά τη μετάφραση. Οι μεταλλάξεις αυτές καλούνται και **σημειακοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs)**, είναι πολύ συχνές – αναφέρεται ότι

στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν τέτοιες διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο αλληλίων κάθε 1:250 έως 1:300 βάσεις.

- Μεταλλάξεις στις συντηρητικές αλληλουχίες ματίσματος (splicing) ιντρονίων, δηλαδή μεταλλάξεις που επηρεάζουν την ωρίμανση του mRNA παρεμποδίζοντας τη σωστή αποκοπή των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα ιντρόνια και την επανασυγκόλληση των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα εξόνια.
- Μεταλλάξεις στους υποκινητές (promoter) των γονιδίων όπου συνήθως εντοπίζονται σε θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων, με αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας μεταγραφής αυτού του γονιδίου.
- Μεταλλάξεις στις μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες (ιντρόνια) των γονιδίων, με φυσική απόρροια τη μειωμένη ικανότητα πρωτεϊνοσύνθεσης.

Οι μεταλλάξεις, θα μπορούσαν επιπροσθέτως να χωρισθούν στις **κληρονομούμενες (hereditary)** και στις **επίκτητες ή αυθόρμητες (acquired or spontaneous)**. Οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις είναι αυτές που μεταβιβάζονται από γενιά σε γενιά, γιατί βρίσκονται στο γενετικό υλικό των γαμετικών κυττάρων, ενώ οι επίκτητες ή αυθόρμητες είναι το αποτέλεσμα τυχαίων λαθών στην αντιγραφή του DNA, συναντώνται στα σωματικά κύτταρα και δε μεταβιβάζονται από γενιά σε γενιά. Οι **σωματικές μεταλλάξεις (somatic mutations)** συνήθως υπάρχουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα παρουσία υψηλών επιπέδων φυσιολογικών αλληλουχιών «**φυσικού τύπου**» (**wild-type**) που λειτουργούν σαν υπόβαθρο. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη μεθόδων με μεγαλύτερη ευαισθησία συγκριτικά με αυτές που χρησιμοποιούνται για ανάλυση μεταλλάξεων στη γαμετική σειρά (**germline mutations**).

1.3 Τεχνικές Ανάλυσης Μεταλλάξεων

Ακολούθως, αναλύονται εκτενέστερα μερικές από τις γνωστότερες και πλέον καθιερωμένες τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων που χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα. Αρχικά δίνεται ο **πίνακας 1.1**, όπου καταγράφονται συνοπτικά οι τεχνικές αυτές.

Πίνακας 1.1 Συνοπτικός πίνακας μεθόδων ανίχνευσης μεταλλάξεων

Μέθοδος ανίχνευσης μεταλλάξεων	Γνωστές Μεταλλάξεις	Άγνωστες Μεταλλάξεις
DNA Sequencing	+	+
Αλληλούχηση DNA σε πραγματικό χρόνο (Pyrosequencing)	+	+
Sequencing νέας γενιάς (NGS)	+	+
Co-amplification at Lower Temperature (COLD-PCR)	+	+
	“fast” COLD-PCR	“full” COLD-PCR
Φασματομετρία Μάζας (MALDI-TOF MS)	+	+
Μικροσυστοιχίες Ολιγονουκλεοτιδίων DNA (DNA Microarrays)	+	+
Υψηλής διακριτικότητας ανάλυση καμπυλών τήξεως (HRMA)	+	+
Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	-	+
Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)	-	+
Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE)	-	+
Protein Truncation Test (PTT)	-	+
Denaturing High Performance Liquid Chromatography (D-HPLC)	-	+
Ανίχνευση μεταλλάξεων με χρήση περιοριστικών ενζύμων (RFLPs)	+	-
Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου με χρήση ανιχνευτών υβριδισμού (RT-qPCR)	+	-
Πεπτιδικά Νουκλεϊκά Οξέα (PNAs)/«Κλειδωμένα» Νουκλεϊκά Οξέα (LNAs)	+	-
Αλληλοειδική ενίσχυση PCR (ASA-PCR)	+	-
Ασύμμετρη PCR με χρήση ανιχνευτών υβριδισμού	+	-
Allele-specific oligonucleotides (ASO)	+	-

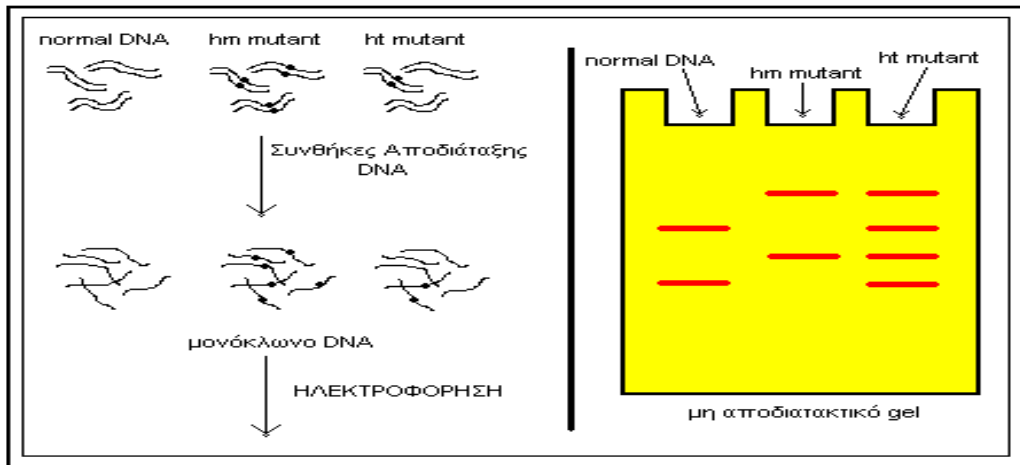
1.3.1 Τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό

1.3.1.1 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism, Ανάλυση με βάση τον πολυμορφισμό της διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA)³

Η ανάλυση **SSCP** ή αλλιώς **SSCA (Single Strand Conformation Analysis)** είναι μία τεχνική απλή και σχετικά γρήγορη για την ανίχνευση άγνωστων μεταλλάξεων. Βασίζεται στην ιδιότητα που έχει το **μονόκλωνο DNA (ssDNA - single stranded DNA)** να σχηματίζει δευτεροταγείς δομές. Οι δευτεροταγείς δομές του μονόκλωνου DNA οφείλονται σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βάσεων της αλληλουχίας του. Η αλλαγή μιας μόνο βάσης (σημειακή μετάλλαξη) ενδέχεται να δώσει μία διαφορετική δευτεροταγή δομή άρα και διαμόρφωση από αυτήν του φυσιολογικού μορίου. Ομοίως, και ο συμπληρωματικός του κλώνος διαμορφώνεται διαφορετικά. Κατά αυτόν τον τρόπο, η ηλεκτροφόρηση ακόμα κι ενός φυσιολογικού μορίου -υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες, όπου αυτό παραμένει μονόκλωνο- θα δώσει τουλάχιστον δύο ζώνες. Η παρουσία των περισσοτέρων των δύο ζωνών εξηγείται από το γεγονός ότι μια οποιαδήποτε αλληλουχία DNA μπορεί να αποκτήσει παραπάνω από μία σταθερές διαμορφώσεις. Κατά την ηλεκτροφόρηση δείγματος που φέρει μία σημειακή μετάλλαξη παρατηρούνται δύο ή τέσσερις ζώνες (τουλάχιστον όσον αφορά τις κύριες) αναλόγως αν πρόκειται για ομοζυγώτη ή ετεροζυγώτη αντιστοιχώς. **(Σχήμα 1.1)**

Αν και θεωρητικά, οποιαδήποτε σημειακή μετάλλαξη μπορεί να ανιχνευθεί με την τεχνική της SSCP εντούτοις, υπάρχουν περιπτώσεις, όπου η τεχνική SSCP δίνει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Αυτό μπορεί να συμβεί εάν η μετάλλαξη βρίσκεται σε τέτοια θέση πάνω στην ελεγχόμενη περιοχή του DNA, που η προκαλούμενη μεταβολή στη διαμόρφωσή του είναι από ασήμαντη έως μηδενική. Επίσης, αν το μέγεθος της περιοχής DNA που ελέγχεται είναι μεγαλύτερο των 200-300 bp, τότε μία σημειακή μετάλλαξη δεν μπορεί να επιφέρει δραστική αλλαγή στη δευτεροταγή δομή του DNA.⁷

Το βασικότερο πλεονέκτημα της μεθόδου SSCP, είναι κυρίως η ευκολία που παρουσιάζει καθ' όλη τη διαδικασία εκτέλεσης του πειράματος ενώ το κύριο μειονέκτημα της SSCP είναι η έλλειψη ευαισθησίας, η οποία οφείλεται στην αδυναμία της τεχνικής να ανιχνεύει κάποιες μεταλλάξεις, ιδίως όταν δεν πληρούνται οι προϋποθέσεις που προαναφέρθηκαν.



Σχήμα 1.1 Θεωρητική απεικόνιση ανάλυσης SSCP (αριστερά). Τυπικό ηλεκτροφόρημα SSCP (δεξιά). Φυσιολογικό δείγμα, ομοζυγωτικό μεταλλαγμένο και ετεροζυγωτικό μεταλλαγμένο.³

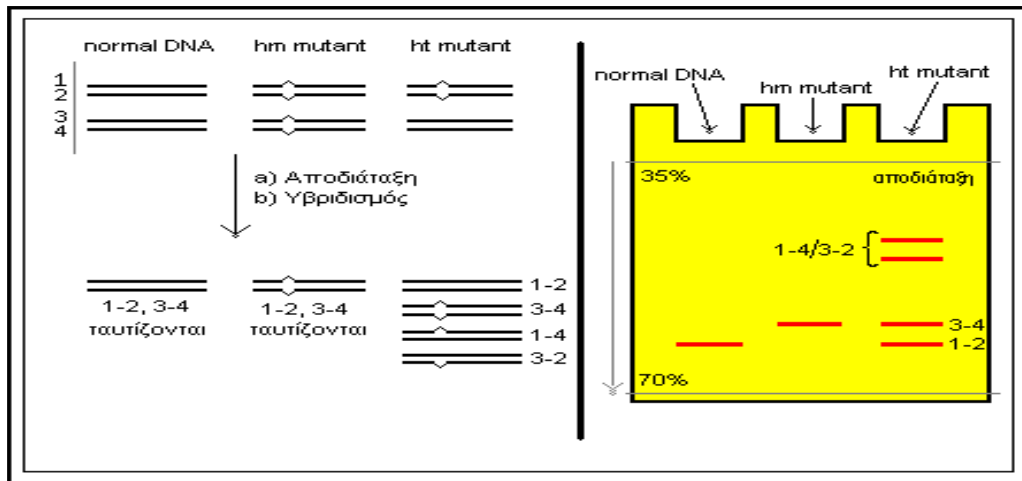
1.3.1.2 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με κλίση αποδιατακτικού)³

Ο διαχωρισμός με την DGGE βασίζεται στη διαφορά κινητικότητας που έχει μία νουκλεοτιδική αλληλουχία σε σχέση με μία άλλη, όταν κινείται σε πηκτή που περιέχει (μία δεδομένη) βαθμίδωση σε αποδιατακτικό.

Κατά την ηλεκτροφόρηση ενός δείγματος DNA σε πηκτή με κλίση αποδιατακτικού, η αρχική ηλεκτροφορητική κινητικότητα είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού βάρους του DNA. Όμως, καθώς το δείγμα DNA μετακινείται σε περιοχές διαρκώς αυξανόμενης συγκέντρωσης αποδιατακτικού, επέρχεται σταδιακά μερική τήξη/αποδιάταξη κάποιας περιοχής DNA του δείγματος, η οποία έχει τη μικρότερη **θερμοκρασία τήξης (melting temperature, T_m)**. Η T_m μιας κύριας περιοχής εξαρτάται από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και διαφοροποιείται σημαντικά ακόμα και με την αλλαγή μίας μόνο βάσης. Έτσι, το μόριο DNA μερικώς αποδιαταγμένο έχει μειωμένη κινητικότητα και μπορεί πλέον να ακινητοποιηθεί, αφού η διακλαδιζόμενη δομή που παρουσιάζει στο σημείο τήξης, του απαγορεύει να κινηθεί διαμέσου του πλέγματος της πηκτής.

Σε μια ανάλυση DGGE, για φυσιολογικά άτομα και για ομοζυγώτες αναμένεται μια ζώνη. Για ετεροζυγώτες διαχωρίζονται τέσσερις ζώνες, οι οποίες προκύπτουν από την ανάμειξη του φυσιολογικού με το μεταλλαγμένο γονίδιο. (Σχήμα 1.2)

Η DGGE πλεονεκτεί ως μέθοδος ανάλυσης σημειακών μεταλλάξεων λόγω της υψηλής της ευαισθησίας (μέχρι και 100%).⁷ Βασικότερο μειονέκτημα της τεχνικής DGGE, είναι η ανάγκη παρασκευής πηκτών με βαθμίδωση στη συγκέντρωση του αποδιατακτικού.



Σχήμα 1.2 Αρχή μεθόδου DGGE για φυσιολογικό δείγμα, ομοζυγωτικό μεταλλαγμένο και ετεροζυγωτικό μεταλλαγμένο (αριστερά) και τυπικό ηλεκτροφόρημα DGGE (δεξιά).³

1.3.1.3 TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση θερμοκρασίας)

Η μέθοδος TGGE αποτελεί μια παραλλαγή της μεθόδου DGGE, καθώς αντί της χρήσης βαθμίδωσης συγκέντρωσης χημικών αποδιατακτικών, χρησιμοποιείται βαθμίδωση θερμοκρασίας.⁸ Αν και η αρχή της μεθόδου αυτής είναι ίδια με εκείνη της DGGE, παρουσιάζει επιπροσθέτως το μεγάλο πλεονέκτημα της αποφυγής παρασκευής πηκτών βαθμίδωσης συγκέντρωσης αποδιατακτικού. Αποτελείται από εξειδικευμένη οργανολογία διατήρησης της θερμοκρασίας σε διαφορετικές τιμές πάνω στην ίδια πηκτή, γεγονός που ανεβάζει κατά πολύ το κόστος της συσκευής. Επίσης, είναι αναγκαία η χρησιμοποίηση ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών πλούσιων σε γουανίνη και κυτοσίνη (**GC-clamps**), κάτι το οποίο ισχύει και για τη DGGE.⁹

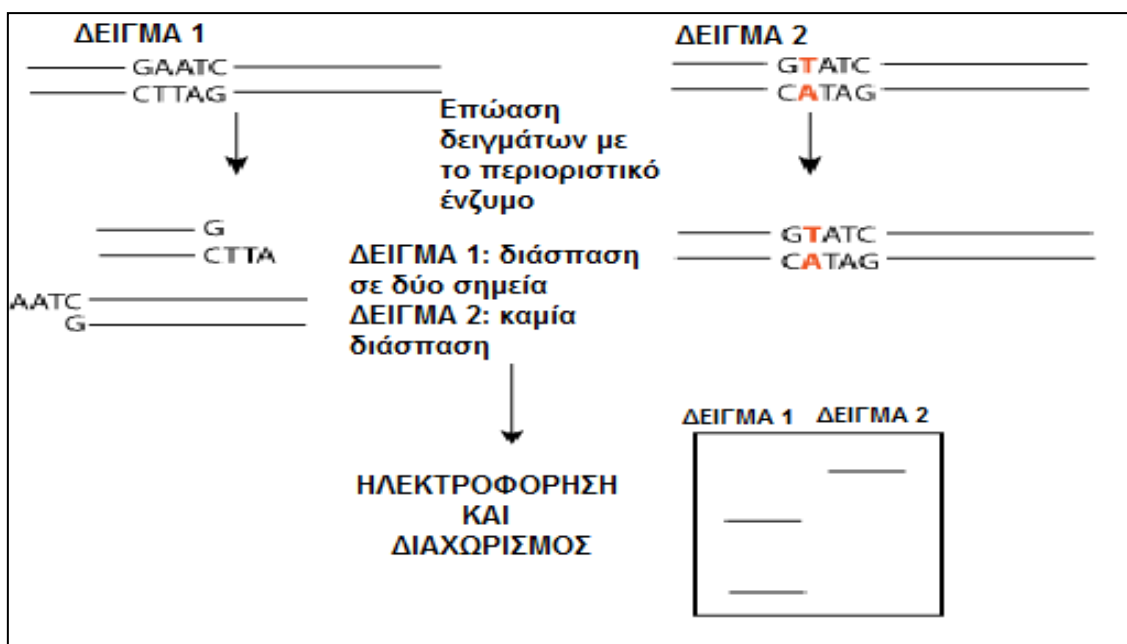
1.3.1.4 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPs, Ανίχνευση μεταλλάξεων με χρήση περιοριστικών ενζύμων)

Η τεχνική RFLPs ήταν από τις πρώτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση DNA τόσο στη Μοριακή Διαγνωστική, όσο και στη Γενετική. Σήμερα, η χρήση της δεν είναι τόσο ευρεία όσο στο παρελθόν, λόγω της ανακάλυψης νέων τεχνικών, πιο απλών, γρήγορων και ευαίσθητων. Η χρήση περιοριστικών ενζύμων και η εμφάνιση του αποτελέσματος με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό και την τεχνική της αποτύπωσης ήταν από τις πρώτες προσεγγίσεις για την ανίχνευση μεταλλάξεων.

Η βασική τεχνική για την ανίχνευση RFLPs περιλαμβάνει τον τεμαχισμό του δίκλωνου DNA από ένα περιοριστικό ένζυμο, το οποίο έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει και να

Χριστίνα Σχίζα 10

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR «κόβει» το DNA σε συγκεκριμένο σημείο της αλληλουχίας με μία διαδικασία που ονομάζεται ενζυμική πέψη. Το περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποιείται κάθε φορά μπορεί να αναγνωρίζει και να «κόβει» είτε τη μεταλλαγμένη αλληλουχία DNA στο σημείο της μετάλλαξης, είτε τη φυσιολογική αφήνοντας την άλλη ανεπηρέαστη. Υπάρχουν επίσης περιοριστικά ένζυμα που αναγνωρίζουν και «κόβουν» την αλληλουχία σε σημεία όπου υπάρχει μη συμπληρωματικό ζεύγος βάσεων, ανιχνεύοντας έτσι άγνωστες μεταλλάξεις ή πολυμορφισμούς. Στη συνέχεια, τα τμήματα DNA που προκύπτουν μετά την ενζυμική πέψη διαχωρίζονται και ταυτοποιείται το μέγεθός τους με D-HPLC ή με απλή ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης όπου η διάκριση γίνεται με βάση το μέγεθος των τμημάτων του DNA (αριθμός ζευγών βάσεων). (Σχήμα 1.3) Μια συμβατική PCR προηγείται όλης της παραπάνω διαδικασίας με σκοπό την ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA που περιέχει τη μετάλλαξη. Τα προϊόντα της PCR θα υποστούν ενζυμική πέψη με περιοριστικό ένζυμο και στη συνέχεια ανάλυση των RFLPs.



Σχήμα 1.3 Αρχή μεθόδου ανάλυσης RFLPs.

Παρ' όλη τη σχετική έλλειψη ευαισθησίας, η ανάλυση των RFLPs είναι απλή στην εκτέλεση και σχετικά χαμηλού κόστους και γι' αυτό το λόγο αναφέρεται ως χρήσιμη σαν τεχνική «σάρωσης».¹⁰

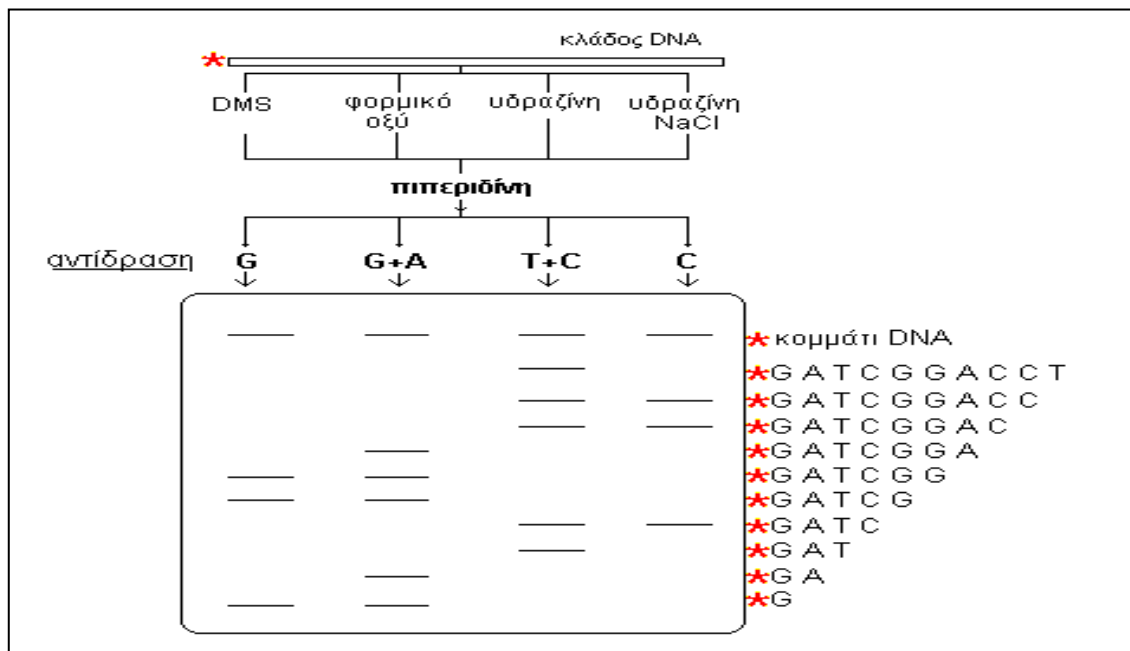
1.3.2 Τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στον προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων

1.3.2.1 Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων του DNA – Maxam & Gilbert Sequencing, Sanger Sequencing

Με τον όρο αυτό, έχει καθιερωθεί η τεχνική προσδιορισμού της αλληλουχίας των βάσεων δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων (DNA) και γενικότερα των νουκλεϊκών οξέων (δηλαδή και RNA). Ένας σημαντικός σταθμός στην ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων έγινε το 1977 όταν περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Maxam & Gilbert¹¹ μια μέθοδος ανάλυσης της αλληλουχίας του DNA με χημική αποικοδόμηση των βάσεων. Αργότερα το ίδιο έτος, προτάθηκε από τον Sanger και τους συνεργάτες του¹² μια ενζυμική μέθοδος για την ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας βασιζόμενη στον πρόωρο τερματισμό της νουκλεϊκής σύνθεσης. Σήμερα, οι δύο αυτές μέθοδοι έχουν υποστεί αρκετές τροποποιήσεις (δημιουργία διάφορων πρωτοκόλλων), οι βασικές τους αρχές όμως εξακολουθούν να παραμένουν αναλλοίωτες. Όλα τα σύγχρονα αυτοματοποιημένα μηχανήματα ανάλυσης του DNA (**DNA sequencers**) στηρίζονται κυρίως στην εφαρμογή της μεθόδου του Sanger.

Η μέθοδος των Maxam & Gilbert βασίζεται στην ιδιότητα ορισμένων χημικών ενώσεων, όπως η υδραζίνη, το διμεθυλοθειικό (DMS) ή το φορμικό οξύ, να μπορούν να τροποποιήσουν τις βάσεις του DNA εντός του μορίου αυτού.¹¹ Το DNA που προορίζεται για ανάλυση/ανάγνωση, επισημαίνεται με κάποιο ραδιοϊσότοπο σε ένα από τα 3',5' άκρα του, και ακολούθως με τη βοήθεια των προαναφερθέντων χημικών ενώσεων, τροποποιείται σε τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις -σε κάθε μία εκ των οποίων χρησιμοποιείται ένα από τα παραπάνω αντιδραστήρια- σε συγκεκριμένη βάση για κάθε αντίδραση. Ακολούθως προστίθεται το αντιδραστήριο πιπεριδίνη, το οποίο καταλύει το σπάσιμο του φωσφοδιεστερικού δεσμού στο σημείο της τροποποιημένης βάσης. Ακολουθεί ο διαχωρισμός των παραγόμενων προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε ειδική πηκτή πολυακρυλαμίδιου μεγάλης διαχωριστικής ικανότητας και κατόπιν αυτοραδιογραφία σε φιλμ. Με αυτό τον τρόπο, εμφανίζονται ολιγονουκλεοτιδικά προϊόντα τα οποία έχουν ως αρχή το επισημασμένο άκρο και τερματίζουν σε όλες τις δυνατές ανά είδος βάσεις σε κάθε μία από τις τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις. (**Σχήμα 1.4**) Η μέθοδος των Maxam & Gilbert παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες από πλευράς εκτέλεσης, ενώ τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι τοξικά και ασταθή. Παρ' όλα αυτά όμως, παρουσιάζει και κάποια πλεονεκτήματα συγκριτικά με τη μέθοδο του Sanger: α) δε χρειάζεται να προηγηθεί αντίδραση PCR έτσι ώστε να ενισχυθεί η αλληλουχία που πρόκειται να αναλυθεί β)

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR αναλύει απευθείας τμήματα γενωμικού DNA, χωρίς να απαιτείται ενζυμική ενίσχυση κατά την οποία ενδέχεται να συμβούν λάθη γ) η πιθανότητα να συμβούν λάθη λόγω δευτεροταγών δομών της αλληλουχίας που αναλύεται είναι πολύ περιορισμένη.¹³

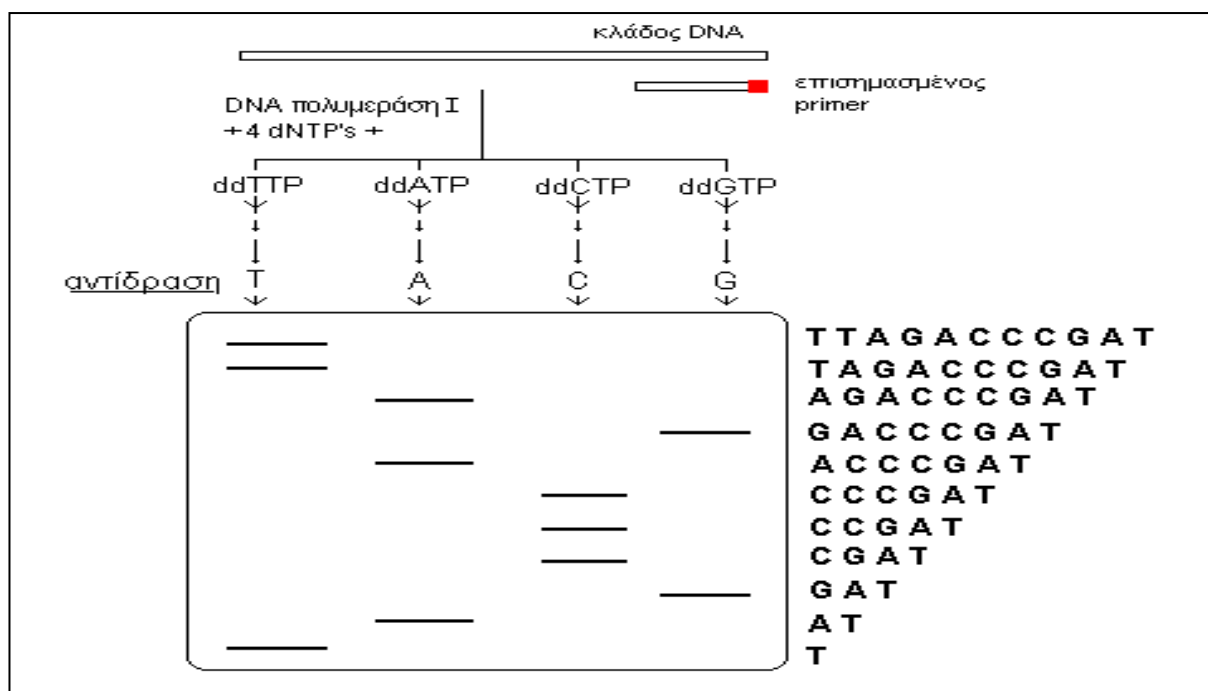


Σχήμα 1.4 Αρχή της χημικής μεθόδου DNA sequencing κατά Maxam & Gilbert.³

Η μέθοδος των Maxam και Gilbert έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες περιπτώσεις όπως : α) η αλληλούχηση γενωμικού DNA με παράλληλη εξαγωγή πληροφοριών σχετικά με τη μεθυλίωση του DNA καθώς και τη δομή της χρωματίνης¹⁴ β) η ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων¹⁵ γ) η επιβεβαίωση της αλληλουχίας συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων ή περιοχών DNA με δομές φουρκέτας ή θηλιάς.¹⁶

Η τεχνική του Sequencing κατά Sanger είναι μία διαδικασία με την οποία επιτυγχάνεται η αλληλούχηση τμημάτων DNA που συνήθως είναι προϊόντα μιας αντίδρασης PCR που έχει προηγηθεί. Βασίζεται στην παρουσία στο μείγμα της αντίδρασης **δι-δεοξυνουκλεοτιδίων (di-deoxynucleotide, ddNTPs)** και των τεσσάρων αζωτούχων βάσεων (A, T, G, C), τα οποία όταν τοποθετηθούν στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα από τη DNA-πολυμεράση, τότε η σύνθεση της νέας αλυσίδας διακόπτεται και το συγκεκριμένο δι-δεοξυνουκλεοτίδιο σηματοδοτεί τον τερματισμό της αλυσίδας. Αυτό συμβαίνει διότι, τα δι-δεοξυνουκλεοτίδια στερούνται επιπλέον και της υδροξυλομάδας στην 3' θέση του δακτυλίου της δεοξυριβόζης. Λόγω της έλλειψης αυτής της υδροξυλομάδας, αφού η πολυμεράση τοποθετήσει αυτό το δι-δεοξυνουκλεοτίδιο στην αλυσίδα που συντίθεται, δεν μπορεί πια να τοποθετηθεί άλλο νουκλεοτίδιο στη συνέχεια γιατί δεν είναι εφικτό να σχηματιστεί ο

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ των νουκλεοτιδίων. Ο σχηματισμός του φωσφοδιεστερικού δεσμού απαιτεί την παρουσία μιας 3'-υδροξυλομάδας από το ήδη υπάρχον –τελευταίο- νουκλεοτίδιο και μιας 5'-φωσφορικής ομάδας από το «επόμενο» νουκλεοτίδιο που θα τοποθετηθεί στην αλυσίδα. Πραγματοποιούνται τέσσερις σειρές τέτοιων αντιδράσεων όπου στην καθεμία χρησιμοποιείται ένα από τα τέσσερα δι-δεοξυνουκλεοτίδια. Μετά το τέλος όλης της διαδικασίας προκύπτουν τμήματα DNA των οποίων το μέγεθος εξαρτάται από το σημείο όπου τοποθετήθηκε το δι-δεοξυνουκλεοτίδιο. Τα τμήματα αυτά αναλύονται με ηλεκτροφόρηση κατά την οποία επιβεβαιώνεται το μήκος τους.¹²(**Σχήμα 1.5**) Οι πληροφορίες αυτές συνδυάζονται και προκύπτει η πλήρης αλληλουχία των αζωτούχων βάσεων στο τμήμα του DNA που μας ενδιαφέρει. Έτσι μπορούμε να ανιχνεύσουμε αν σε κάποια θέση υπάρχει μετάλλαξη ή αν πρόκειται για φυσιολογικό DNA.



Σχήμα 1.5 Αρχή ενζυμικής μεθόδου DNA sequencing κατά Sanger³

Παρά το γεγονός ότι, η μέθοδος του Sanger για DNA sequencing είναι ο πιο αξιόπιστος τρόπος για τον ακριβή προσδιορισμό της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων ενός τμήματος DNA και έχει χαρακτηριστεί ως το «χρυσό πρότυπο» μεταξύ όλων των μεθόδων ανίχνευσης μεταλλάξεων, δυστυχώς χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλή ευαισθησία που κυμαίνεται περίπου στο 5-20%. Αυτό σημαίνει ότι η μέθοδος αυτή δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση μεταλλάξεων σε αλληλία που βρίσκονται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση μέσα

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR στο δείγμα και παρουσία περίσσειας φυσιολογικών αλληλίων. Υπάρχει δηλαδή κίνδυνος πολλά δείγματα που φέρουν τη μετάλλαξη να χαρακτηριστούν ως φυσιολογικά (ψευδώς αρνητικά).

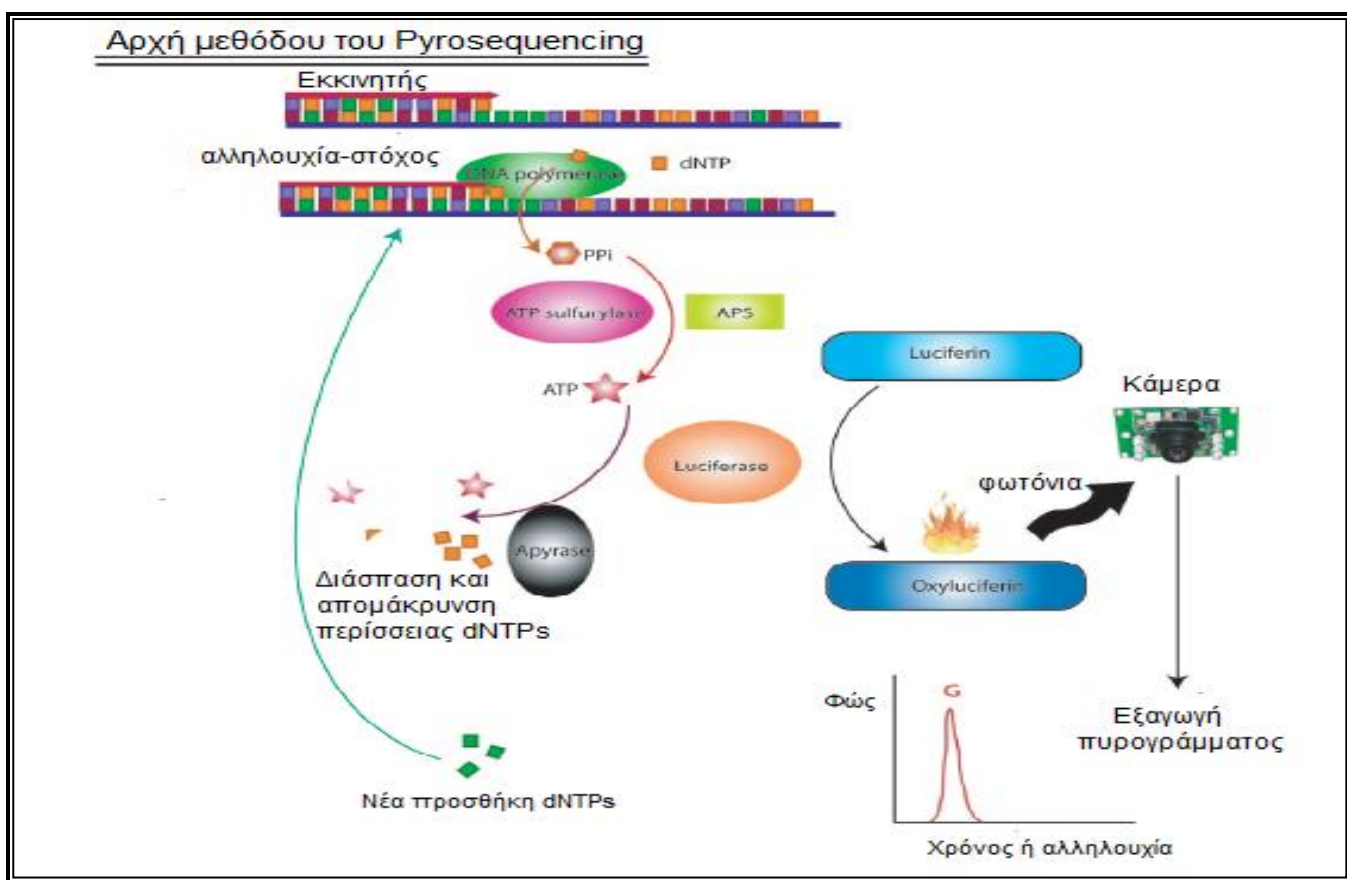
Κατά την ανάλυση μεταλλάξεων με τη χρήση αυτόματου DNA sequencer, οι σημειακές μεταλλάξεις φαίνονται σα δύο αλληλοεπικαλυπτόμενες κορυφές -εξαιτίας της ύπαρξης και του φυσιολογικού νουκλεοτιδίου στο αλληλόμορφο γονίδιο. Για μεταλλάξεις που προκαλούν αλλαγή στο πλαίσιο ανάγνωσης (προσθήκες ή απαλοιφές), υπάρχει εμφάνιση διπλών κορυφών από το σημείο της αλλαγής και μέχρι το τέλος του γραφήματος. Οι διπλές κορυφές είναι ισοϋψείς μόνο σε περίπτωση ετεροζυγωτίας, δηλαδή σε περίπτωση που η μετάλλαξη υπάρχει στο ένα από τα δύο αλληλόμορφα γονίδια (και συνεπώς στο 50% όλων των μορίων DNA). Με αυτόν το τρόπο, παρουσιάζονται οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις.¹⁷

1.3.2.2 Pyrosequencing (Αλληλούχηση DNA σε πραγματικό χρόνο)

Το Pyrosequencing είναι μια μέθοδος αλληλούχησης DNA πραγματικού χρόνου (Real-time DNA-sequencing) που βασίζεται στην ανίχνευση πυροφωσφορικού (PPi) που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης πολυμερισμού του DNA.^{18,19,20} Επιπλέον, βασίζεται στην αρχή της **αλληλούχησης μέσω σύνθεσης (sequencing by synthesis)**. Διαφέρει από το Sequencing κατά Sanger στο ότι βασίζεται στην ανίχνευση πυροφωσφορικού (PPi) που απελευθερώνεται κατά την ενσωμάτωση των νουκλεοτιδίων, και όχι στον τερματισμό της αλυσίδας λόγω παρουσίας δι-δεοξυνουλεοτιδίου. Η αλληλούχηση μέσω σύνθεσης περιλαμβάνει τη διαδικασία της ενζυμικής σύνθεσης μιας συμπληρωματικής αλυσίδας του μονόκλωνου DNA του οποίου θέλουμε να προσδιορίσουμε την αλληλουχία των βάσεων.

Η μέθοδος στηρίζεται στον έλεγχο της δράσης της DNA-πολυμεράσης μέσω ενός ενζύμου του οποίου το υπόστρωμα εκπέμπει χημειοφωταύγεια μετά το πέρας της αντίδρασης. Ουσιαστικά, ελέγχεται ποιο νουκλεοτίδιο, δηλαδή ποια βάση, προστίθεται σε κάθε στάδιο της σύνθεσης. Το υπόστρωμα DNA είναι συνήθως ακινητοποιημένο και τα διαλύματα των νουκλεοτιδίων που φέρουν τις αζωτούχες βάσεις (A, T, C, G) προστίθενται διαδοχικά και απομακρύνονται από το μείγμα της αντίδρασης. Φως παράγεται και ανιχνεύεται σε σήμα μόνο όταν ένα νουκλεοτίδιο ενσωματωθεί στην αλυσίδα που συντίθεται, απελευθερώνοντας πυροφωσφορικό στοιχειομετρικά. Στο μείγμα της αντίδρασης υπάρχουν, εκτός της DNA-πολυμεράσης, κάποια επιπλέον ένζυμα που δρουν μόνο όταν

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR βρεθεί το κατάλληλο υπόστρωμα, όπως αναφέρεται στη συνέχεια. Με την προσθήκη του νουκλεοτιδίου και την απελευθέρωση του PPI ενεργοποιείται το ένζυμο **σουλφουρυλάση του ATP (ATP sulfurylase)** που μετατρέπει το PPI ποσοτικά σε ATP. Το ATP που παράγεται ενεργοποιεί το ένζυμο **λουσιφεράση (luciferase)** που καταλύει τη μετατροπή της **λουσιφερίνης (luciferine)** σε **οξυ-λουσιφερίνη (oxyluciferine)**, η οποία συνοδεύεται από εκπομπή φωτός έντασης ανάλογης της ποσότητας του ATP. Το φως ανιχνεύεται και αναλύεται με το κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα. Τα νουκλεοτίδια που δεν ενσωματώθηκαν, διασπώνται και η αντίδραση επαναλαμβάνεται με νέα προσθήκη νουκλεοτιδίων.²¹ (Σχήμα 1.6)



Σχήμα 1.6 Αρχή μεθόδου Pyrosequencing. Προσθήκη νουκλεοτιδίου και απελευθέρωση πυροφωσφορικού PPI. Καταλυτική μετατροπή PPI σε ATP και καταλυτική δράση λουσιφεράσης προς παραγωγή φωτός. Λήψη καταγραφήματος Pyrosequencing (Πυρόγραμμα) και προσδιορισμός αλληλουχίας νουκλεοτιδίων.¹⁰

Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες εξελίξεις, υπάρχουν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις- παραλλαγές της τεχνικής του Pyrosequencing: α) το **Pyrosequencing στερεής φάσης (solid-phase sequencing)**²⁰ και β) το **Pyrosequencing υγρής φάσης (liquid-phase sequencing)**.²² Το Pyrosequencing στερεής φάσης (μίγμα τριών ενζύμων) απαιτεί ένα

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR

στάδιο έκπλυσης της αλληλουχίας, μεταξύ των σταδίων προσθήκης των νουκλεοτιδίων, έτσι ώστε να απομακρύνονται τα dNTPs που δε χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το ATP που παράγεται από την αντίδραση που καταλύει η σουλφουρυλάση. Επιπλέον, στη συγκεκριμένη προσέγγιση, η αλληλουχία DNA θα πρέπει να είναι ακινητοποιημένη σε κάποια στερεή επιφάνεια, όπως μαγνητικά σφαιρίδια, έτσι ώστε να αποφεύγεται η μείωση του σήματος λόγω απωλειών. Στο Pyrosequencing υγρής φάσης (μείγμα τεσσάρων ενζύμων) προστίθεται ένα επιπλέον ένζυμο, συνήθως η **απυράση (apyrase)**, που διασπά τα νουκλεοτίδια που δε χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση, καθώς και το ATP που παράγεται κατά τη διάρκεια αυτής. Έτσι δε χρειάζεται να μεσολαβούν τα στάδια των εκπλύσεων που αναφέρονται παραπάνω.

Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η τεχνική του Pyrosequencing είναι τα παρακάτω:²¹

1. Είναι μια τεχνική που μας απαλλάσσει από τη χρήση ιχνηθετημένων εκκινητών, ιχνηθετημένων νουκλεοτιδίων, καθώς και από τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης.
2. Η ανίχνευση γίνεται σε πραγματικό χρόνο και η διάρκεια κάθε κύκλου αντίδρασης είναι περίπου 2min.
3. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης δεν απαιτούνται ειδικές συνθήκες, αλλά θερμοκρασία δωματίου και φυσιολογικό pH.
4. Είναι μέθοδος χαμηλού κόστους συγκριτικά με τις άλλες παραδοσιακές μεθόδους αλληλούχησης.²³
5. Μπορεί να προσαρμοστεί και να εφαρμοστεί εύκολα για πολλαπλή επεξεργασία δειγμάτων (multiplexed sample processing).
6. Με τη μέθοδο αυτή υπάρχει δυνατότητα αλληλούχησης αλυσίδων μικρού μήκους, διατηρώντας υψηλό το λόγο σήματος/θορύβου ακόμα και μετά από 40 κύκλους.²²

Από την άλλη πλευρά, η μέθοδος παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα:²¹

1. Στο Pyrosequencing στερεής φάσης, η ανάγκη για πολλαπλές εκπλύσεις μετά από κάθε προσθήκη νουκλεοτιδίων, οδηγεί στη μείωση του σήματος, λόγω απώλειας του υποστρώματος DNA.²⁰
2. Στο Pyrosequencing υγρής φάσης, η δράση της απυράσης μειώνεται στους τελευταίους κύκλους της αντίδρασης εξαιτίας της συσσώρευσης ενδιάμεσων προϊόντων.²² Έχει παρατηρηθεί μη-ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ της απυράσης και του DNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της αποδιατακτικής της δραστηριότητας.²⁴

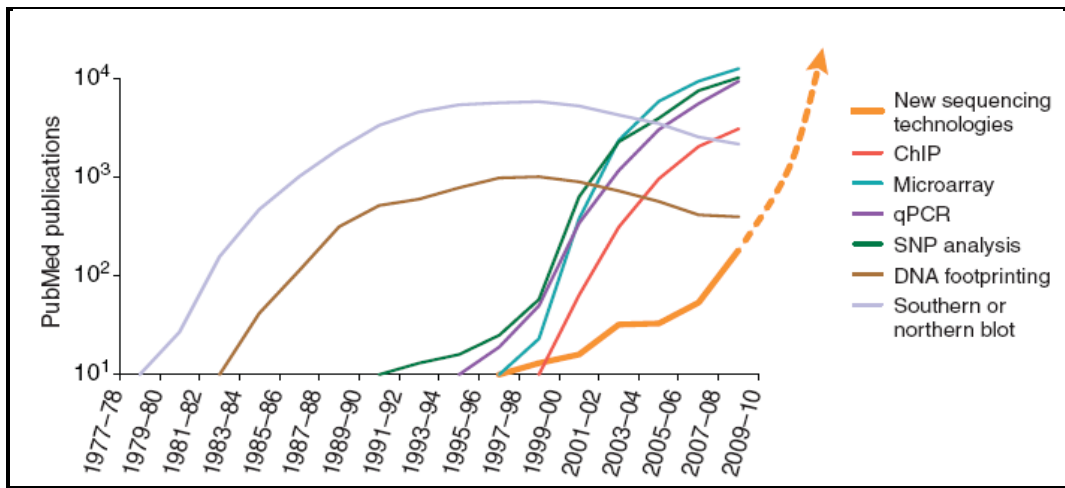
3. Είναι δύσκολο να προσδιοριστεί με ακρίβεια ο σωστός αριθμός των νουκλεοτιδίων που ενσωματώνονται στις ομο-πολυμερικές περιοχές, λόγω της μη γραμμικής απόκρισης σήματος που ακολουθεί την ενσωμάτωση περισσότερων από πέντε ίδιων γειτονικών νουκλεοτιδίων. Έχει επίσης παρατηρηθεί, ότι αυτή η επίδραση είναι λιγότερο σαφής στην περίπτωση που τα νουκλεοτίδια συνθέτουν περιοχές με γουανίνη και κυτοσίνη (G, C).²⁵
4. Υπάρχει η πιθανότητα επιμόλυνσης του μίγματος της αντίδρασης με PPI, γεγονός που μειώνει σημαντικά το λόγο σήματος/θορού, εξαιτίας της αύξησης του σήματος υποβάθρου.
5. Η αξιοπιστία της ενσωμάτωσης των σωστών νουκλεοτιδίων από την DNA-πολυμεράση είναι σχετικά χαμηλή, από τη στιγμή που η συγκεκριμένη πολυμεράση δεν έχει δράση εξωνουκλεάσης. Επιπλέον, απαιτείται η χρήση πολυμεράσης με δυνατότητα ταχείας ενσωμάτωσης νουκλεοτιδίων στη νέα αλυσίδα (υψηλή ταχύτητα πολυμερισμού).²⁵
6. Τέλος, η λανθασμένη υβριδοποίηση των εκκινητών μειώνει την ένταση του σήματος, εξαιτίας της απώλειας του DNA από το μείγμα της αντίδρασης, λόγω των εκπλύσεων ή της διάσπασης από την απυράση.

Οι κυριότερες εφαρμογές της μεθόδου του Pyrosequencing περιλαμβάνουν αναλύσεις δευτεροταγών δομών, όπως **δομές φουρκέτας (hairpin)**²⁵, ανάλυση πολυμορφισμών SNPs^{26,27,28}, ανίχνευση μεταλλάξεων²⁹ καθώς και *de novo* αλληλούχηση μικρού και μεσαίου μήκους αλυσίδων.³⁰ Συγκεκριμένα για την ανίχνευση μεταλλάξεων, η μέθοδος του Pyrosequencing μπορεί να εξασφαλίσει ευαισθησία περίπου 10%. Παρουσιάζει δηλαδή, βελτιωμένη ευαισθησία σε σύγκριση με τις ήδη καθιερωμένες μεθόδους Sequencing.

1.3.2.3 Next Generation Sequencing – Sequencing νέας γενιάς

Με τον όρο **Next Generation Sequencing (NGS)** περιγράφονται οι ταχύτερες και φθηνότερες τεχνολογίες ανάλυσης αλληλουχίας DNA οι οποίες καθιστούν δυνατή τη λήψη πληροφοριών για τη γενωμική αλληλουχία σε ένα επίπεδο που ήταν παλιότερα αδιανόητο.³¹ Το περιοδικό Nature ανακήρυξε το Next generation Sequencing ως τη μέθοδο της χρονιάς για το έτος 2007³² (**Σχήμα 1.7**). Οι νέες τεχνολογίες γενετικής ανάλυσης δεν είναι μόνο ευέλικτες, αλλά χαρακτηρίζονται και από ικανοποιητικές αποδόσεις και αρκετά χαμηλό κόστος ώστε να επεξεργάζονται το μεγάλο αριθμό των δειγμάτων που απαιτούνται για να ληφθούν στατιστικώς σημαντικές πληροφορίες.

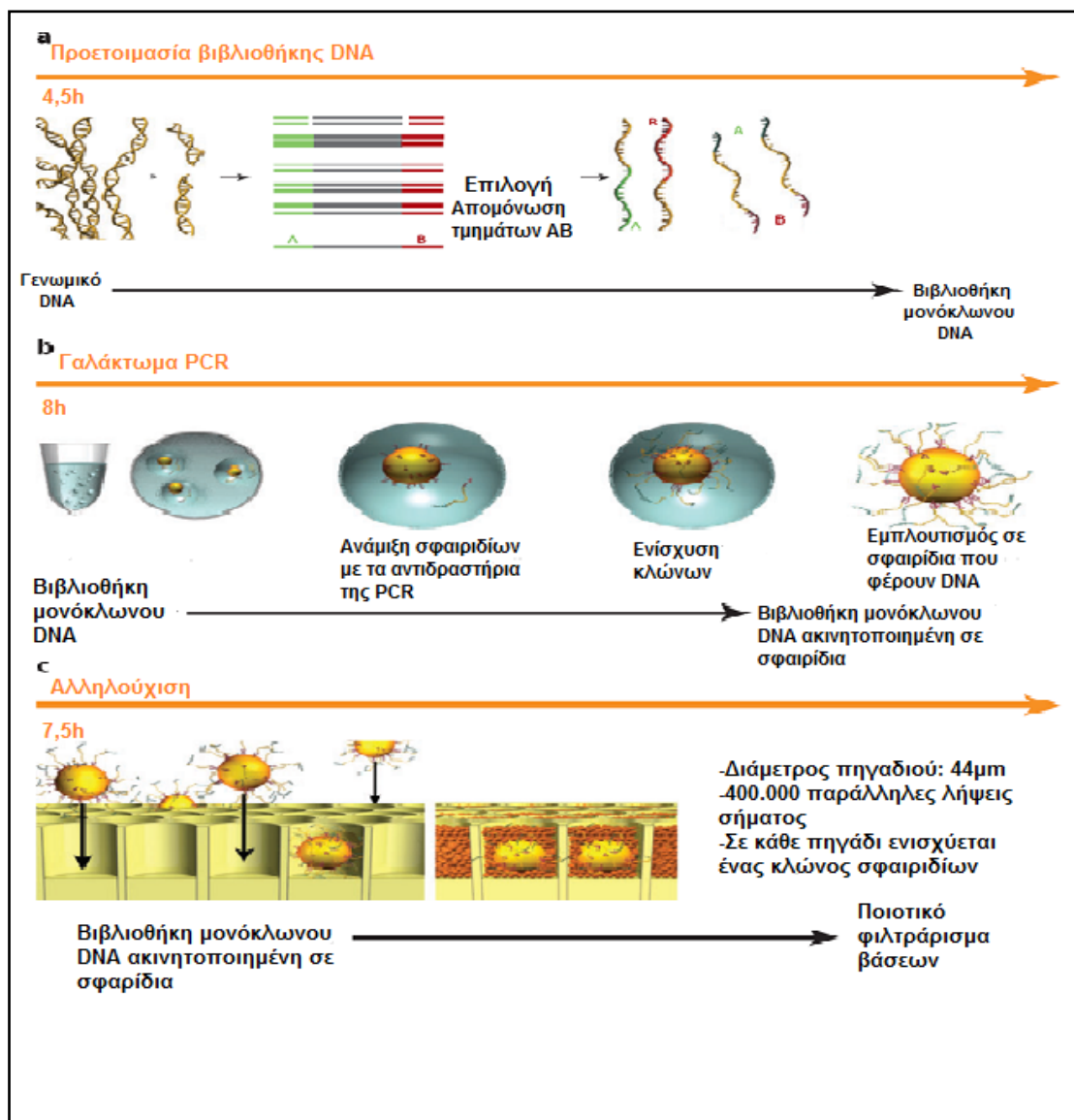
Η πληροφορία που προκύπτει από το NGS τροφοδοτεί ένα παγκόσμιο υπολογιστικό σύστημα που λειτουργεί χάρη σε μεγάλους παροχείς βιοπληροφορικών υπηρεσιών. Η πληροφορία αυτή αποτελεί τη βάση για εκτενέστερες σειρές ερμηνείας, όπως η ομαδοποίηση σε πλήρη γονιδιώματα, ο σχολιασμός της δομής γονιδίων καθώς και η χαρτογράφηση ως προς ήδη γνωστά πρότυπα γονιδιώματα και μεταγραφήματα προκειμένου για ποσοτική ανάλυση έκφρασης. Η βάση δεδομένων στην οποία καταχωρείται σε Ευρωπαϊκό επίπεδο η πληροφορία που προκύπτει από το NGS είναι η ENA (European Nucleotide Archive).³³



Σχήμα 1.7 Αριθμός δημοσιεύσεων στο PubMed για τις πιο σημαντικές μεθόδους ανάλυσης DNA και για την τεχνολογία του Next generation sequencing.³⁴

Οι εναλλακτικές στρατηγικές του Next Generation DNA sequencing μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 4 επιμέρους κατηγορίες: α) μικροηλεκτροφορητικές μεθόδους, β) sequencing με υβριδισμό, γ) με παρατήρηση μορίων σε πραγματικό χρόνο και δ) με sequencing κυκλικών συστοιχιών.³⁵ Η πλέον διαδεδομένη μέθοδος NGS είναι αυτή των κυκλικών συστοιχιών. (Σχήμα 1.8) Αρχικά θρυμματίζεται το γενωμικό DNA και σε κάθε τμήμα που προκύπτει συνδέονται κοινά άκρα και στη συνέχεια εφαρμόζεται ένα από τα αρκετά πρωτόκολλα που έχει σαν αποτέλεσμα να δημιουργείται μια συστοιχία από εκατομμύρια ακινητοποιημένες αποικίες προϊόντων PCR. Κάθε αποικία αποτελείται από πολλά αντίγραφα ενός μόνο από τα αρχικά τμήματα DNA. Καθώς όλες οι αποικίες είναι ακινητοποιημένες πάνω σε μία επίπεδη συστοιχία, το μείγμα αντιδραστηρίων, που έχει όγκο της τάξεως του μικρόλιτρου (π.χ. για υβριδοποίηση των εκκινητών και ακολούθως για την ενζυμική επέκτασή τους), μπορεί να προστεθεί έτσι ώστε να χειριστούμε όλα τα χαρακτηριστικά των συστοιχιών ταυτόχρονα. Παρομοίως, η ανίχνευση των φθορισμοφόρων -που βασίζεται σε απεικονιστικές μεθόδους- που ενσωματώνονται σε Χριστίνα Σχίζα 19

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR κάθε επιμήκυνση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εξαχθούν οι πληροφορίες για την αλληλουχία σε όλες τις αποικίες παράλληλα. Διαδοχικές επαναλήψεις ενζυμικής δράσης και απεικόνισης χρησιμοποιούνται για να δημιουργήσουν την ανάγνωση της αλληλουχίας για κάθε αποικία της συστοιχίας.³⁵



Σχήμα 1.8 Μία από τις πλατφόρμες κυκλικών συστοιχιών (αναλυτής Roche/454) για την ενίσχυση μονόκλωνων αντιγράφων DNA από μία βιβλιοθήκη τμημάτων με τη βοήθεια σφαιριδίων αγαρόζης. Ένα μείγμα τμημάτων DNA με σφαιρίδια αγαρόζης που περιέχει συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια με τα άκρα των τμημάτων αυτών σε αναλογία 1:1 τοποθετείται σε κάψα με έντονο vortex σε υδατικά μικύλλια που περιέχουν αντιδραστήρια PCR περιλουσμένα με λάδι. Στη συνέχεια με τη βοήθεια πιπέτας τοποθετούνται σε μια πλάκα που διαθέτει 96 μικρο-κυψελίδες για την ενίσχυση PCR. Τα σφαιρίδια τελικά αποκτούν ένα εκατομμύριο αντίγραφα του αρχικού μονόκλωνου τμήματος, τα οποία παρέχουν αρκετή ένταση σήματος κατά την αντίδραση του pyrosequencing που ακολουθεί και ανιχνεύει και καταγράφει τα γεγονότα ενσωμάτωσης των νουκλεοτιδίων.³⁶

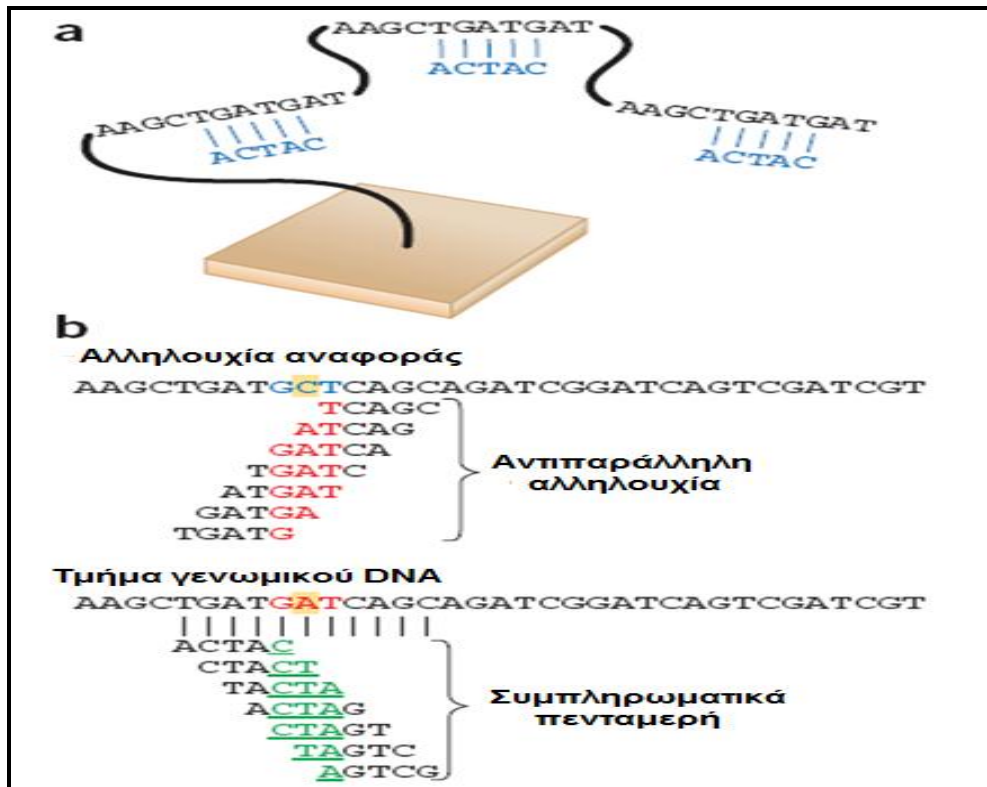
Τρεις πλατφόρμες κυκλικών συστοιχιών για μαζικά παράλληλη συλλογή πληροφοριών από DNA sequencing βρίσκονται σε ευρεία χρήση: Ο αναλυτής Roche/454 FLX, ο αναλυτής Illumina/Solexa Genome Analyzer, και ο αναλυτής Applied Biosystems SOLiD™ System. Κάθε πλατφόρμα ενσωματώνει μια περίπλοκη αλληλεπίδραση ενζυμολογίας, χημείας, οπτικής υψηλής ανάλυσης, και μηχανικής υλικού και λογισμικού. Αυτά τα όργανα επιτρέπουν υψηλή βελτίωση της προετοιμασίας των δειγμάτων πριν το DNA sequencing, κάτι που παρέχει σημαντική μείωση του απαιτούμενου χρόνου και την ελάχιστη απαίτηση σε βοηθητικό εξοπλισμό σε σύγκριση με τις υψηλής αυτοματοποίησης, πολυσταδιακές σωληνώσεις που απαιτούνται για sequencing υψηλής απόδοσης που βασίζεται στη δημιουργία κλώνων. Η κάθε τεχνολογία στοχεύει στο να ενισχύσει μονόκλινα τμήματα μιας βιβλιοθήκης και στα ενισχυμένα προϊόντα να εκτελέσει αντιδράσεις sequencing. Με την παρουσία αλληλουχιών-προσαρμοστών, τα μόρια μπορούν να ενισχυθούν εκλεκτικά μέσω της PCR, οπότε δεν απαιτείται το βήμα της δημιουργίας βακτηριακού κλώνου για να ενισχυθούν τα τμήματα του γενωμικού DNA σε ένα βακτηριακό ενδιάμεσο όπως επιτελείται σε παραδοσιακές προσεγγίσεις του sequencing.³⁶

Τρία είναι τα κυριότερα πλεονεκτήματα των τεχνικών κυκλικών συστοιχιών : α) η in vitro κατασκευή της βιβλιοθήκης, ακολουθούμενη από in vitro ενίσχυση των κλώνων, ώστε να παραχθούν οι αποικίες παρακάμπτει αρκετές δυσχέρειες που δεν επιτρέπουν την παράλληλη ανάλυση με τη συμβατική μέθοδο, β) το sequencing που βασίζεται στις συστοιχίες επιτρέπει σε μεγαλύτερο βαθμό την παράλληλη ανάλυση σε σχέση με το συμβατικό sequencing των τριχοειδών. Καθώς το μέγεθος των αποικιών μπορεί να είναι της τάξης του ενός μικρομέτρου, εκατοντάδες εκατομμυρίων αποικιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν παράλληλα για το διάβασμα της αλληλουχίας σε μία μικρή επιφάνεια και γ) επειδή οι αποικίες είναι ακινητοποιημένες σε μια επίπεδη επιφάνεια, μπορούν να προσεγγιστούν από τα ένζυμα από μικρό όγκο αντιδραστηρίων. Συλλογικά, όλα αυτά μεταφράζονται σε δραματικά μικρότερο κόστος για την προετοιμασία του DNA sequencing.³⁵

Όμως από την άλλη πλευρά δεν παύουν να υπάρχουν και ορισμένα μειονεκτήματα. Τα πλέον σημαντικά από αυτά συνιστούν το μέγεθος του πλαισίου ανάγνωσης (για όλες τις νέες πλατφόρμες, τα μεγέθη αυτά παραμένουν πολύ μικρότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα του συμβατικού sequencing), καθώς και η ακρίβεια (κατά μέσο όρο, οι νέες πλατφόρμες είναι τουλάχιστον δέκα φορές λιγότερο ακριβείς σε σχέση με τις πλατφόρμες τύπου Sanger).³⁵

Η δεύτερη πιο συχνά εφαρμοζόμενη κατηγορία NGS είναι αυτή του **Sequencing με υβριδισμό (Sequence-by-hybridization, SBH)**. Το sequencing με υβριδισμό σε συνδυασμό με τη δράση της λιγάσης, δημιούργησε νέες πλατφόρμες εφαρμογών, οι οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες, όπως ο αναλυτής Applied Biosystems SOLiD™ System. Η μέθοδος αυτή πληροί τις προϋποθέσεις για απλότητα, δυνατότητα παράλληλων αναλύσεων και προσαρμογή σε όσο το δυνατό μικρότερο μέγεθος. Είναι γρήγορη, ακριβής και με μικρότερο κόστος. Σε αυτή τη μέθοδο ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές υβριδοποιούνται διαδοχικά σε δείγμα γενωμικού DNA που βρίσκεται ακινητοποιημένο σε τμήματα των 200 bp πάνω σε γυάλινη επιφάνεια.³⁷ Όταν ολόκληρο το γονιδίωμα κάποιου είδους είναι πλέον γνωστό, η εύρεση της αλληλουχίας του DNA κάποιου μεμονωμένου ατόμου καθίσταται απλή γιατί τα αποτελέσματα από το sequencing συγκρίνονται απευθείας με το γονιδίωμα αναφοράς. Κατά το sequencing με υβριδισμό ανιχνεύονται στο δείγμα DNA πολλές μικρές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, οι οποίες υβριδοποιούνται στο γενωμικό DNA και σχηματίζουν τέλεια διμερή. Αυτές οι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες στη συνέχεια συγκρίνονται με το γονιδίωμα αναφοράς με τη βοήθεια κατάλληλων αλγορίθμων, έτσι ώστε να βρεθούν τα μεγαλύτερα κομμάτια που ταιριάζουν απόλυτα. Βασιζόμενοι στην ανάλυση του πλήρους φάσματος εκπομπής των μερικώς επικαλυπτόμενων τμημάτων DNA και στις πέντε διαφορετικές συνδέσεις που αναγνωρίζουν τη θέση κάθε βάσης, η πληροφορία που εξάγεται συγκρίνεται με το γονιδίωμα αναφοράς ώστε να βρεθούν οι ομοιότητες και οι διαφορές. Η επιτυχία στην εύρεση αλλαγών σε μόνο μία βάση αγγίζει ποσοστό της τάξεως του 97,3 %, ποσοστό που καθιστά την SBH ιδανική μέθοδο για την ανίχνευση SNPs, ή μεταλλάξεων σε κωδικεύοντα ή μη εξόνια, που αποτελούν σχεδόν το 2% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Στο **σχήμα 1.9** παρουσιάζεται η αρχή λειτουργίας της μεθόδου SBH.

Η SBH είναι μια πολύ καλή μέθοδος για την εύρεση της αλληλουχίας και σύγκρισή της με την αλληλουχία αναφοράς, αλλά μπορεί να συναντήσει κανείς δυσκολίες όταν ανιχνεύονται μακριές αλληλουχίες, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ή μη αναμενόμενες προσθήκες.³⁷



Σχήμα 1.9 Αρχή μεθόδου SBH. a) Αποτελέσματα της κυκλικής ενίσχυσης σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πανομοιότυπων τμημάτων DNA μήκους 200 bp που βρίσκονται ακινητοποιημένα σε ειδικά σφαιρίδια πάνω σε γυάλινη επιφάνεια. Η SBH βασίζεται στο διαδοχικό υβριδισμό διαφορετικών πενταμερών. Εδώ απεικονίζεται ένας γύρος υβριδισμού που περιλαμβάνει το πενταμερές 3'-ACTAC-5'. b) Ανίχνευση σημειακής μετάλλαξης στην τρινουκλεοτιδική αλληλουχία GCT (με μπλε στην αλληλουχία αναφοράς), η οποία έχει αλλάξει σε GAT (με κόκκινο) σε ένα τμήμα γενωμικού DNA, με SBH. Η αλλαγή της βάσης αυτής εξάγεται από πέντε ανεξάρτητες αντιδράσεις υβριδισμού (υπογραμμίζονται με πράσινο) χρησιμοποιώντας αντιπαράλληλες πενταμερείς αλληλουχίες που ανιχνεύονται από τον διαδοχικό υβριδισμό και εικόνες που λαμβάνονται κατά τη διαδικασία της SBH. Η αλληλουχία που εξάγεται για την τριπλέτα απεικονίζεται με κόκκινα γράμματα.³⁷

Οι εφαρμογές τις οποίες μπορεί να βρει η νέα τεχνολογία του NGS είναι πάρα πολλές και ολοένα και εφαρμόζεται σε καινούρια πεδία. Τα πεδία στα οποία βρίσκει μεγαλύτερο ενδιαφέρον και εφαρμογή η νέα αυτή τεχνολογία είναι τα ακόλουθα:

- **Εφαρμογή του NGS στην ανάλυση επιγενετικών τροποποιήσεων ιστονών και DNA:** Οι δυο κυριότεροι τύποι επιγενετικής τροποποίησης που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων είναι η μεθυλίωση του DNA και οι μεταμεταγραφικές τροποποιήσεις των ιστονών. Οι τεχνολογίες του NGS προσφέρουν τη δυναμική για την ουσιαστική επιτάχυνση της επιγενετικής έρευνας.³⁸
- **Έκφραση γονιδίων βρίσκοντας την αλληλουχία του μεταγραφώματος:** Η έκφραση του mRNA έχει μετρηθεί με προσεγγίσεις που βασίζονται στις

μικροσυστοιχίες ή την ποσοτική PCR, με την τελευταία να είναι η πιο αποτελεσματική και φθηνή για την μελέτη της έκφρασης γονιδίων που αφορούν όλο το φάσμα του γονιδιώματος. Η νέα γενιά οργάνων NGS, των οποίων η λειτουργία βασίζεται στις κυκλικές συστοιχίες, προσφέρει γρήγορο και φθινό αποτέλεσμα με τη βοήθεια προσεγγίσεων, όπως η συμβατική σύνθεση cDNA.³⁶

- **Ανακαλύπτοντας τα μη-κωδικεύοντα RNA:** Ένα από τα πλέον ενδιαφέροντα πεδία της βιολογικής έρευνας τα πρόσφατα χρόνια είναι η ανακάλυψη και η λειτουργική ανάλυση των **μη-κωδικεύοντων RNA (non-coding RNA, ncRNA)** συστημάτων σε διάφορους οργανισμούς. Η ανακάλυψη των μη-κωδικεύοντων RNA επιτυγχάνεται καλύτερα με το sequencing επειδή η εξελικτική ποικιλότητα των αλληλουχιών των γονιδίων που κωδικεύουν τα ncRNA, δυσκολεύει την πρόβλεψη της παρουσίας τους σε ένα γονιδίωμα με υψηλή βεβαιότητα μόνο με υπολογιστικές μεθόδους. Οι μοναδικές δομές των ώριμων ncRNA θέτουν δυσκολίες στη μετατροπή τους με βιβλιοθήκες του NGS, αλλά παρ' όλα αυτά έχει ήδη επιτευχθεί αξιοσημείωτη πρόοδος όσον αφορά το χαρακτηρισμό αυτών των μορίων. Επειδή η πληροφορία που εξάγεται από τις πλατφόρμες του NGS είναι ποσοτική, ο χαρακτηρισμός των ncRNA θα περιλαμβάνει την ανίχνευση αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης, οι οποίες συσχετίζονται με αλλαγές σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, με την αρχή και την πρόοδο ασθενειών, και πιθανότατα με την αρχή και σοβαρότητα πολύπλοκων ασθενειών.³⁶
- **Στοχευμένη αλληλούχηση γενωμικού DNA:** Η αλληλούχηση υποπεριοχών γενωμικού DNA ή συγκεκριμένων ομάδων γονιδίων χρησιμοποιείται συχνά για την ανίχνευση πολυμορφισμών ή μεταλλάξεων σε γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία ανάπτυξης του καρκίνου.^{39,40}

Η εισαγωγή και ευρεία διαθεσιμότητα του Next Generation Sequencing έχει φέρει μία εποχή κατά την οποία η χρήση του DNA sequencing θα καταστεί καθολική για μια ευρεία ποικιλία ερευνητικών εργασιών. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η ιστορική εξέλιξη από τη μορφολογική στη μοριακή ανάλυση του καρκίνου έχει οδηγήσει σε βελτιστοποίηση της διαγνωσης, της πρόγνωσης, καθώς και της θεραπείας. Με τη χρήση των τεχνικών του NGS οι ερευνητές είναι σε θέση να διερευνήσουν τη σχέση μεταξύ των γενετικών μεταλλάξεων που εντοπίζονται στο γονιδίωμα ασθενών με καρκίνο, συγκρίνοντάς το με το γονιδίωμα φυσιολογικών ατόμων σε τεράστιο αριθμό δειγμάτων. Αυτή η πληρότητα των δεδομένων (δηλαδή η ανάπτυξη ενός πλήρους καταλόγου όπου θα καταγράφονται όλες οι διαφοροποιήσεις μεταξύ εκατοντάδων γονιδιωμάτων) θα δίνει τη δυνατότητα του μοριακού

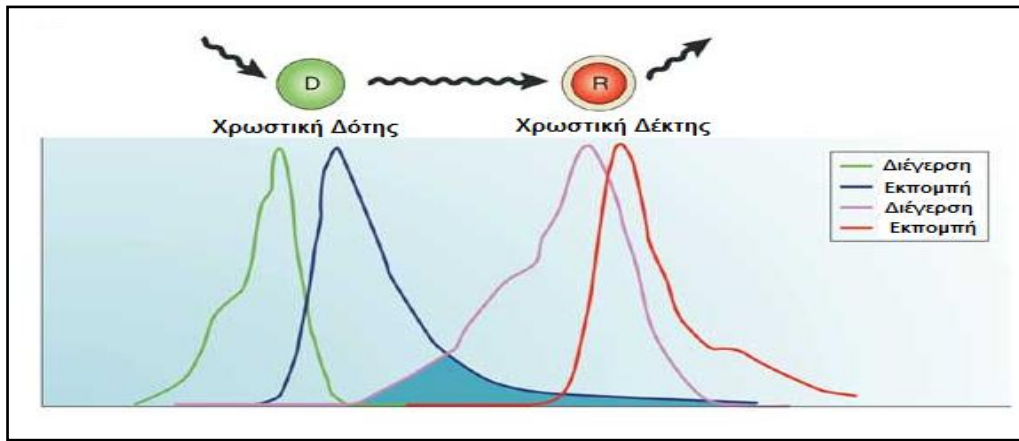
Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR καθορισμού του κάθε καρκινικού υπότυπου ανάλογα με το είδος των μεταλλάξεων και την επιρροή τους στα διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Αυτό ακολούθως θα συμβάλει στην ανακάλυψη νέων διαγνωστικών και προγνωστικών δεικτών, που θα βοηθήσουν στη έγκαιρη διάγνωση και στη βελτίωση της απόδοσης της εξατομικευμένης θεραπείας, περιορίζοντας παράλληλα τις περιπτώσεις αντίστασης στα φάρμακα και ελαχιστοποιώντας τις πιθανές παρενέργειες.⁴¹ Ο στόχος της Διεθνούς Κοινοπραξίας Γονιδιώματος Καρκίνου (**International Cancer Genome Consortium, ICGC**, <http://www.icgc.org/>) είναι ο συντονισμός διεθνών προσπαθειών για ελαχιστοποίηση της πλεονάζουσας έρευνας και η καθιέρωση ενιαίων προτύπων για τη διευκόλυνση της ενοποίησης των δεδομένων. Τα 20.000 καρκινικά γονιδιώματα, που έχουν ταυτοποιηθεί με τη χρήση του NGS, διαμοιράζονται μεταξύ 50 καρκινικών τύπων και υποτύπων, έτσι ώστε κάθε τύπος καρκίνου να μπορεί να αλληλουχηθεί με σκοπό τον εντοπισμό σημαντικών υποκείμενων παραλλαγών. Αυτό θα αποτελέσει το θεμέλιο για την πλήρη κατανόηση των μηχανισμών της ογκογένεσης και την εξέλιξη της εξατομικευμένης θεραπείας.⁴¹

1.3.3 Τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην αντίδραση της PCR

1.3.3.1 Quantitative PCR (qPCR, Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου με χρήση ανιχνευτών υβριδισμού)

Η PCR σε πραγματικό χρόνο βασίζεται στην ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και την καταγραφή του φθορισμού που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, ο οποίος και αποτελεί το δείκτη παραγωγής αντιγράφων σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Μια qPCR αποτελείται από τρεις φάσεις: α) την πρώιμη **φάση «υποβάθρου»** ή **φάση «θορύβου» (background phase)**, β) την **εκθετική φάση ή λογαριθμική φάση (log phase)** και γ) τη **φάση «κορεσμού» (plateau)**.

Η PCR σε πραγματικό χρόνο δίνει τη δυνατότητα επιλογής μεταξύ διαφόρων συστημάτων ανίχνευσης. Τα συστήματα αυτά είναι το SYBR Green και το LC Green, οι ανιχνευτές υβριδισμού DNA, οι ανιχνευτές υδρόλυσης (hydrolysis probes τύπου TaqMan), οι **«μοριακοί φάροι» (Molecular Beacons)** και τα **μόρια «σκορπιοί» (scorpions)**. Όλα τα συστήματα, πλην του SYBR Green και του LC Green, βασίζονται στο **φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας με φθορισμό (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)**. (Σχήμα 1.10) Στη συνέχεια, αναλύεται καθένα από τα συστήματα αυτά.

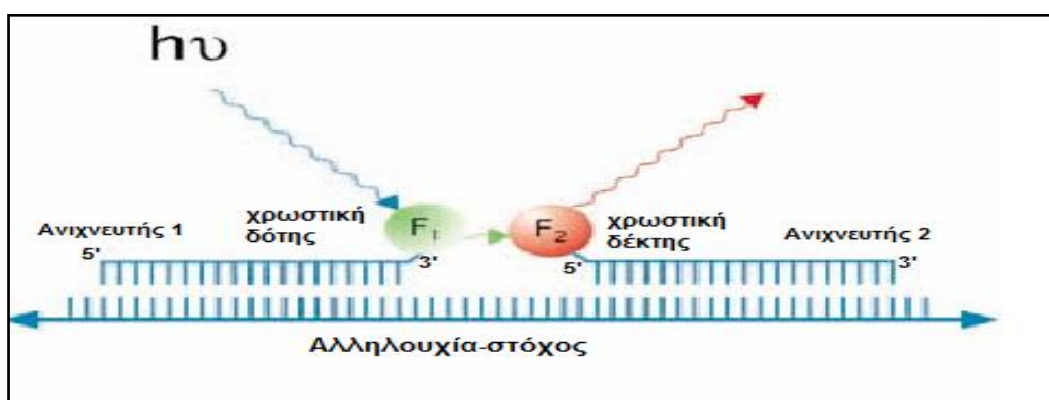


Σχήμα 1.10 Φαινόμενο FRET: Φάσματα διέγερσης και εκπομπής φθορισμού ενός ζεύγους χρωστικών (δότη και δέκτη)⁴²

- SYBR Green και LC Green:** Είναι δύο χρωστικές που προσδένονται στη διπλή έλικα του DNA (dsDNA) και χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό ολικού DNA. Μετά τον υβριδισμό των εκκινητών και τη σύνθεση δίκλωνου DNA κατά την PCR, μερικά μόρια χρωστικής μπορούν να δεσμευτούν στη διπλή έλικα του DNA. Αποτέλεσμα της δέσμευσης αυτής είναι η μεγάλη αύξηση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας από τα μόρια της χρωστικής. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα αλλά ταυτόχρονα και μειονέκτημα του συστήματος είναι ότι οι χρωστικές αυτές συνδέονται σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA. Το γεγονός αυτό αποτελεί πλεονέκτημα, γιατί δεν απαιτείται σχεδιασμός και βελτιστοποίηση των ανιχνευτών DNA. Ταυτόχρονα όμως, αποτελεί και μειονέκτημα, αφού το ειδικό προϊόν, τα μη ειδικά προϊόντα και τα διμερή των εκκινητών που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, ανιχνεύονται εξίσου καλά με τις συγκεκριμένες χρωστικές.

- Ανιχνευτές υβριδισμού DNA (Hybridization Probes):** Οι ανιχνευτές αυτοί είναι ειδικά σχεδιασμένοι έναντι της αλληλουχίας-στόχου, και επιτρέπουν την ανίχνευση ενός μόνο προϊόντος. Οι δύο ανιχνευτές σχεδιάζονται έτσι ώστε να υβριδοποιούνται ο ένας δίπλα στον άλλο, στο προϊόν της αντίδρασης PCR. Το 3' άκρο του ενός ανιχνευτή είναι επισημασμένο με μία χρωστική (φλουορεσκεΐνη), η οποία δρα ως δότη στο φαινόμενο FRET. Το 5' άκρο του δεύτερου ανιχνευτή είναι επισημασμένο με μία χρωστική-δέκτη (LC-Red 640 ή 705). (Σχήμα 1.11) Η πρώτη χρωστική διεγείρεται από πηγή ακτινοβολίας που υπάρχει μέσα στο όργανο και στη συνέχεια εκπέμπει ακτινοβολία σε λίγο μεγαλύτερο μήκος κύματος. Όταν οι δύο χρωστικές βρεθούν κοντά, η εκπεμπόμενη ακτινοβολία διεγείρει τη δεύτερη χρωστική, που βρίσκεται συνδεδεμένη στο γειτονικό ανιχνευτή, και το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης είναι η εκπομπή φθορισμού σε ακόμα μεγαλύτερο μήκος κύματος. Η αλληλουχία των δύο ολιγονουκλεοτιδίων που φέρουν τις χρωστικές πρέπει να επιλέγεται κατάλληλα, έτσι ώστε να υβριδοποιούνται σε συγκεκριμένη θέση στην

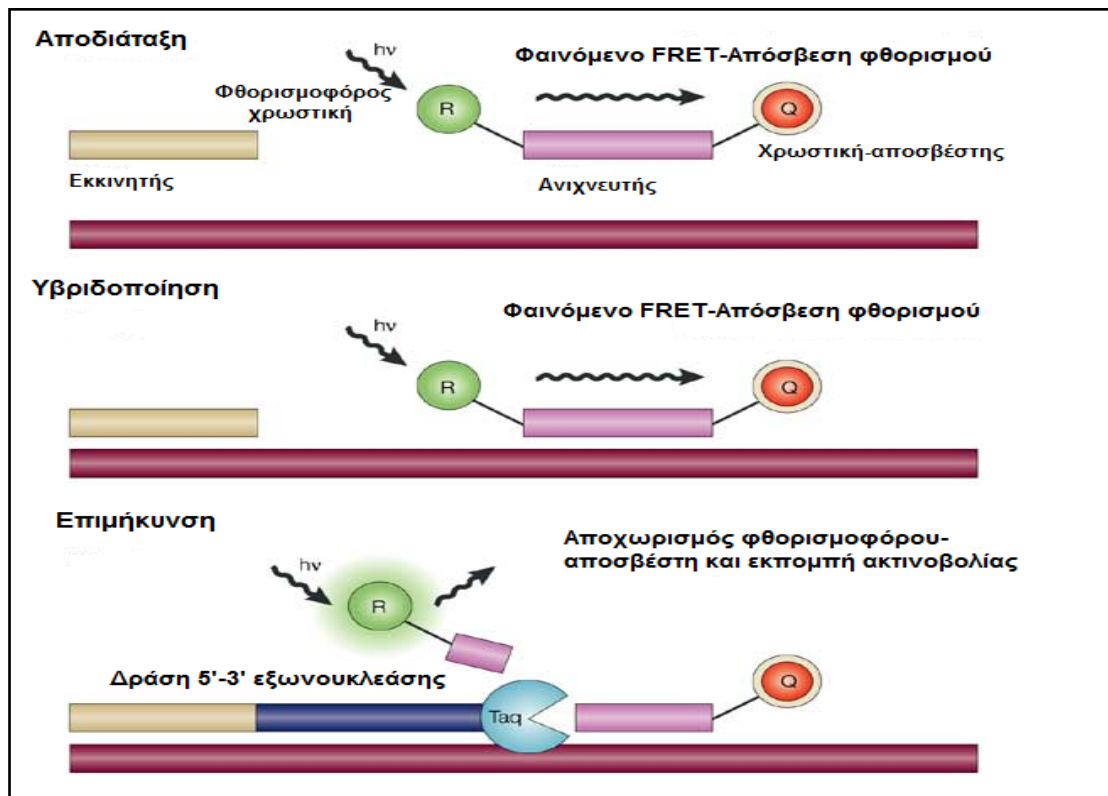
Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR ενισχυμένη αλληλουχία του DNA και σε διάταξη «κεφαλή –ουρά» για την αποτελεσματική μεταφορά ενέργειας μεταξύ των δύο χρωστικών. Η αυξανόμενη ποσότητα του μετρούμενου φθορισμού με την εξέλιξη της αντίδρασης είναι ανάλογη με την αυξανόμενη ποσότητα του παραγόμενου DNA. Η χρησιμοποίηση των DNA ανιχνευτών είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και στις περιπτώσεις που τα προς προσδιορισμό δείγματα περιέχουν μικρό αριθμό προσδιοριζόμενων μορίων. Η μέθοδος αυτή απαιτεί τον υβριδισμό και των δύο ολιγονουκλεοτιδίων για να παραχθεί σήμα, κι έτσι, τα παραπροϊόντα, όπως και τα διμερή εκκινητών, δεν ανιχνεύονται και, συνεπώς, δεν παρεμβάλλονται στα αποτελέσματα. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα για ταυτόχρονη ανίχνευση δύο διαφορετικών αλληλουχιών-στόχων μέσα στο ίδιο δείγμα, που είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανίχνευση συγκεκριμένων γνωστών μεταλλάξεων.



Σχήμα 1.11 Ζεύγος ανιχνευτών υβριδισμού DNA ως σύστημα ανίχνευσης, βάσει του φαινομένου FRET, στην PCR πραγματικού χρόνου. (www.roche-applied-science.com)

- **Ανιχνευτές υδρόλυσης (Hydrolysis Probes ή Taqman Probes):** Οι ανιχνευτές αυτοί υβριδοποιούνται στην προσδιοριζόμενη αλληλουχία DNA μεταξύ του πρόσθιου και του ανάστροφου εκκινητή, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR. Συνήθως αποτελούνται από 20-24 βάσεις και φέρουν μία φθορισμοφόρο χρωστική στο 5' άκρο και χρωστική-αποσβέστη στο 3' άκρο. Το 3' άκρο μπορεί να είναι προστατευμένο με φωσφορική ομάδα, αμινομάδα ή κάποια άλλη βάση που χρησιμοποιείται για προστασία. Οι ανιχνευτές Taqman παράγουν σήμα φθορισμού μέσω της δράσης της Taq πολυμεράσης. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, η πολυμεράση δρώντας ως 5'-3' εξωνουκλεάση υδρολύει τον ανιχνευτή. Ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης, οι δύο χρωστικές αποχωρίζονται από τον ανιχνευτή. Εφόσον το φθορισμοφόρο μόριο δε βρίσκεται πια κοντά στο μόριο-αποσβέστη, η ενέργεια φθορισμού του δεν απορροφάται, μέσω του φαινομένου FRET, και είναι, κατά συνέπεια ανιχνεύσιμη. (Σχήμα 1.12) Ο παραγόμενος

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR
φθορισμός μπορεί να μετρηθεί και είναι ευθέως ανάλογος προς την ποσότητα της προσδιοριζόμενης αλληλουχίας DNA, η οποία ενισχύεται μέσω της αντίδρασης PCR.



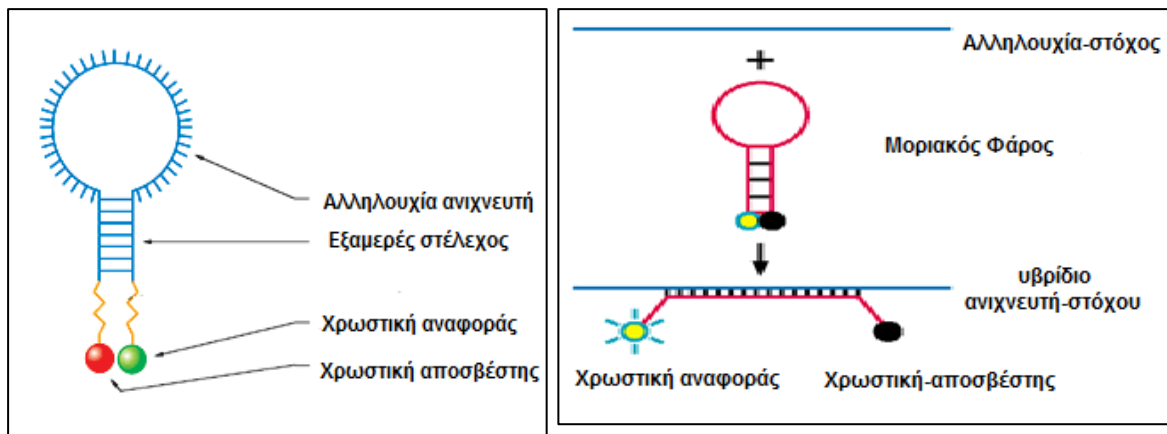
Σχήμα 1.12 Αρχή συστήματος ανίχνευσης με ανιχνευτές υδρόλυσης.⁴²

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη σωστή εφαρμογή της μεθόδου είναι η σωστή επιλογή του ολιγονουκλεοτιδίου που θα χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής, έτσι ώστε να έχει το κατάλληλο σημείο τήξης. Η θερμοκρασία τήξης του ανιχνευτή πρέπει να είναι υψηλότερη από εκείνη του πρόσθιου εκκινητή, έτσι ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα ο πρόσθιος εκκινητής να ξεκινήσει τη διαδικασία επιμήκυνσης πριν προλάβει ο ανιχνευτής να υβριδοποιηθεί στο προϊόν της PCR. Το μεγάλο πλεονέκτημα των ανιχνευτών τύπου TaqMan είναι το γεγονός ότι απαιτείται ειδικός υβριδισμός μεταξύ του ανιχνευτή και του προσδιοριζόμενου γονιδίου για να παραχθεί σήμα φθορισμού. Με τον τρόπο αυτό, ενίσχυση μη ειδικού προϊόντος οφειλόμενη σε λανθασμένο υβριδισμό των εκκινητών ή σε διμερή των εκκινητών δεν παράγει σήμα φθορισμού. Ένα άλλο πλεονέκτημα του συστήματος είναι η δυνατότητα επισήμανσης των ανιχνευτών με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές, των οποίων τα σήματα διαφοροποιούνται. Η χρήση πολλαπλών χρωστικών με διαφορετικά μήκη κύματος εκπομπής δίνει τη δυνατότητα για πολλαπλούς προσδιορισμούς με αυτό το σύστημα ανίχνευσης. Επίσης υπάρχει η δυνατότητα σχεδιασμού των ανιχνευτών έτσι ώστε να είναι

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR συμπληρωματικοί και να υβριδοποιούνται ο καθένας με τη μεταλλαγμένη αλληλουχία και όχι με τη φυσιολογική.

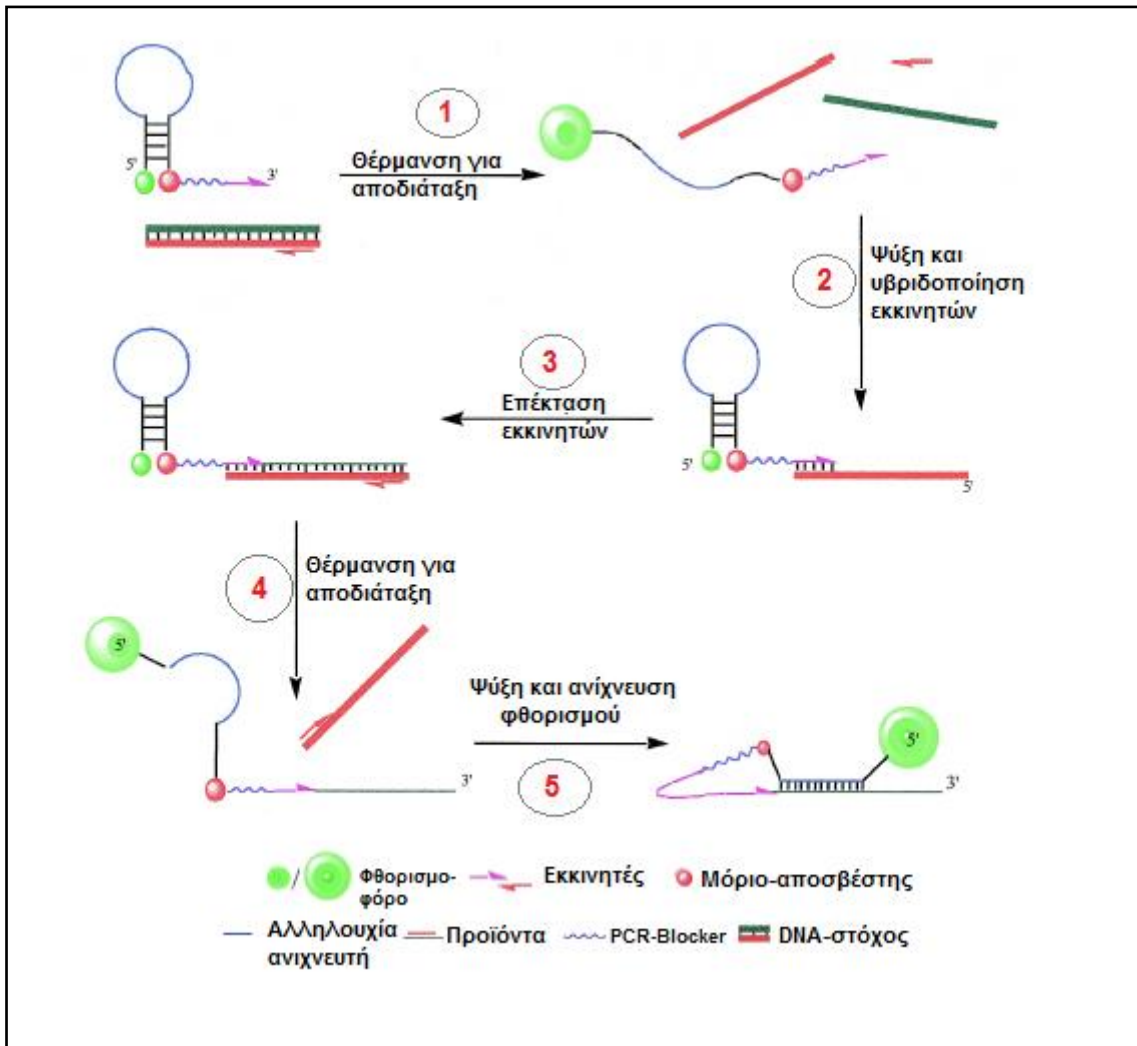
- **«Μοριακοί φάροι» (Molecular Beacons):** Είναι ανιχνευτές που αποτελούνται από μικρά τμήματα ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία εκπέμπουν φθορισμό όταν συνδεθούν με την αλληλουχία-στόχο RNA ή DNA. Η αλληλουχία κάθε μορίου πρέπει να επιλεγεί έτσι ώστε να ανιχνεύει το προς προσδιορισμό προϊόν της αντίδρασης PCR. Το ένα άκρο του μορίου αποτελείται από μικρό αριθμό βάσεων DNA οι οποίες είναι συμπληρωματικές με τις αντίστοιχες βάσεις του άλλου άκρου. Αυτή η δομή δίνει τη δυνατότητα στο μόριο να διπλώνεται και να σχηματίζει **δομή «φουρκέτας» (hairpin structure)**. Στα δύο άκρα του μορίου, αντιδιαμετρικά, βρίσκονται προσκολλημένες δύο φθορίζουσες χρωστικές, μία χρωστική αναφοράς και μία χρωστική-αποσβέστης, αντίστοιχα. (**σχήμα 1.13**) Όταν το μόριο αναδιπλώνεται και σχηματίζει τη δομή «φουρκέτας» στο κέντρο του σχηματίζεται μια θηλιά. Η θηλιά αυτή αποτελείται από βάσεις που είναι συμπληρωματικές προς τον έναν κλώνο του προϊόντος-στόχου της αντίδρασης PCR που πρόκειται να ανιχνευτεί και να μετρηθεί ποσοτικά. Όσο το μόριο παραμένει διπλωμένο, οι δύο φθορίζουσες χρωστικές βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους, και λόγω του φαινομένου FRET δεν ανιχνεύεται φθορισμός. Ο τρόπος δράσης των μορίων αυτών είναι ο εξής: Τα νεοσυντιθέμενα προϊόντα της PCR αποδιατάσσονται σε υψηλές θερμοκρασίες. Στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώνεται για τον επόμενο κύκλο του υβριδισμού των εκκινητών. Στο σημείο αυτό οι ανιχνευτές μπορούν να υβριδοποιηθούν στην κατάλληλη αλληλουχία DNA. Μόλις η θηλιά υβριδοποιηθεί στην αλληλουχία-στόχο, τότε αποδιατάσσεται η δομή «φουρκέτας» και απομακρύνονται οι δύο χρωστικές. Κατά συνέπεια, παράγεται σήμα φθορισμού, το οποίο αυξάνει γραμμικά με την αύξηση του προϊόντος της αντίδρασης. Οι ανιχνευτές αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε πολλαπλές PCR, δηλαδή περισσότερα προϊόντα να ανιχνευτούν στην ίδια αντίδραση. Για κάθε μία προσδιοριζόμενη αλληλουχία χρησιμοποιείται διαφορετική φθορίζουσα χρωστική και τα παραγόμενα σήματα διαβάζονται σε διαφορετικά μήκη κύματος. Μοριακοί ανιχνευτές με διαφορετικές χρωστικές, εξειδικευμένοι για τα φυσιολογικά και τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα, σχεδιάζονται κατάλληλα. Αν η προσδιοριζόμενη ενισχυμένη αλληλουχία προέρχεται από φυσιολογικό DNA λαμβάνεται σήμα φθορισμού διαφορετικό από αυτό που λαμβάνεται όταν το σήμα προέρχεται από αλληλουχία μεταλλαγμένου DNA. Σε

περίπτωση δείγματος από ετερόζυγο άτομο, λαμβάνεται τόσο το σήμα της φυσιολογικής αλληλουχίας όσο και το σήμα της μεταλλαγμένης αλληλουχίας.



Σχήμα 1.13 Δομή Μοριακού Φάρου και αρχή συστήματος ανίχνευσης με Μοριακούς Φάρους. (<http://www.eurogentec.com/applications/molecular-beacons.html>, <http://www.ebiotrade.com>)

- «Σκορπιοί» (**Scorpions**): Είναι διλειτουργικά μόρια που περιέχουν έναν εκκινητή για αντίδραση PCR συνδεδεμένο με μία αλληλουχία ανιχνευτή.⁴³ Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, ο εκκινητής επεκτείνεται για να σχηματίσει το νέο προϊόν, και ο ανιχνευτής, που περιέχει μια αλληλουχία απόλυτα συμπληρωματική με την ειδική αλληλουχία στο PCR προϊόν, προσδένεται στο στόχο του και παράγεται σήμα φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη του προϊόντος που παράγεται κατά την αντίδραση. Πιο αναλυτικά, ο ανιχνευτής «σκορπιός» αποτελείται από έναν ειδικό ανιχνευτή που σχηματίζει μία διαμόρφωση «φουρκέτας» με συμπληρωματικά τα 5' και 3' άκρα του. Το φθορισμοφόρο συνδέεται στο 5' άκρο και ένα μόριο-αποσβέστης βρίσκεται στο 3' άκρο της «φουρκέτας». Η «θηλιά» αυτή συνδέεται με το 5' άκρο του εκκινητή μέσω μιας αλληλουχίας (PCR blocker) που παρεμποδίζει τη μη ειδική ενίσχυση του ανιχνευτή. Μετά την επέκταση του εκκινητή, η ειδική αλληλουχία του ανιχνευτή έχει τη δυνατότητα να υβριδοποιηθεί στη συμπληρωματική της αλληλουχία που βρίσκεται στον ίδιο κλώνο DNA. Αυτός ο υβριδισμός προκαλεί τη διάνοιξη της «φουρκέτας» και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της απόσβεσης του φθορισμού από το μόριο αποσβέστη. Αυτό προκαλεί αύξηση του σήματος που ανιχνεύεται. (Σχήμα 1.14)



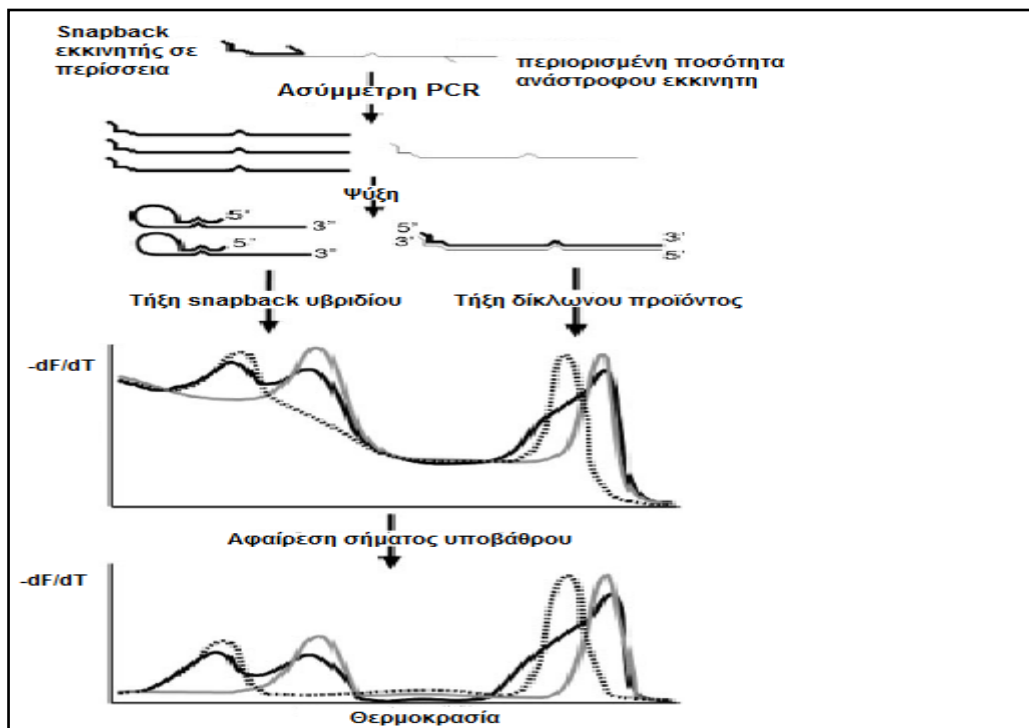
Σχήμα 1.14 Μηχανισμός ανίχνευσης με «Σκορπιούς» 1. Αρχική αποδιάταξη DNA και δομή ανιχνευτή 2. Υβριδισμός εκκινήτη-Σκορπιού στην αλληλουχία-στόχο 3. Επέκταση εκκινήτη και σχηματισμός δίκλωνου DNA 4. Αποδιάταξη του δίκλωνου προϊόντος 5. Ψύξη και υβριδισμός του ανιχνευτή-Σκορπιού στην αλληλουχία-στόχο.⁴⁴

Η αλληλουχία-blocker παρεμποδίζει τη διάνοιξη της «φουρκέτας» απουσία της αλληλουχίας-στόχου. Κάτι τέτοιο θα οδηγούσε σε ανίχνευση μη ειδικών PCR προϊόντων, όπως διμερή εκκινήτων ή προϊόντα από μη ειδικό (λανθασμένο) υβριδισμό των εκκινήτων κατά την αντίδραση της PCR.

Συγκρινόμενοι με τους μοριακούς «φάρους» και τους ανιχνευτές τύπου TaqMan, οι σκορπιοί δίνουν ένα πιο ισχυρό σήμα και δρουν πιο γρήγορα, αφού βρίσκονται πολύ κοντά στην αλληλουχία-στόχο τους. Ο συνδυασμός εκκινήτη-ανιχνευτή σε ένα μόριο καθιστά την εκτέλεση πολλαπλής PCR, για ανίχνευση περισσότερων του ενός αλληλίων, πιο εύκολη μειώνοντας την πιθανότητα ψευδών αποτελεσμάτων.⁴⁴

- Μία τελευταία κατηγορία ανιχνευτών υβριδισμού είναι οι **"Snapback"**. Ο μηχανισμός δράσης τους προσομοιάζει με αυτό των Σκορπιών, αλλά σημαντική διαφορά τους είναι ότι δε φέρουν κάποιο είδος ιχνηθέτη στο μόριό τους. Αντίθετα, είναι μη ιχνηθετημένοι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές που συνδυάζονται με την ανάλυση καμπυλών τήξης δίκλωνων μορίων DNA.

Οι "Snapback" εκκινητές είναι διλειτουργικοί, όπως και οι «Σκορπιοί». Αποτελούνται από το τμήμα του εκκινητή, που είναι σχεδιασμένος συμπληρωματικός με την αλληλουχία-στόχο, και στο 5' άκρο τους περιέχουν μία «ουρά» που είναι συμπληρωματική με το ίδιο το προϊόν που προκύπτει από την επέκτασή τους κατά την αντίδραση της PCR. Αυτό συνεπάγεται ότι, μετά το τέλος της αντίδρασης θα έχουν παραχθεί τα δίκλινα προϊόντα από τους εκκινητές, αλλά και ένα υβρίδιο του «ανιχνευτή-ουρά» με τη συμπληρωματική αλληλουχία που βρίσκεται πάνω στον ίδιο κλώνο DNA. Τις περισσότερες φορές χρησιμοποιείται η αρχή της ασύμμετρης PCR με σκοπό να ευνοηθεί ο σχηματισμός της φουρκέτας του υβριδίου και όχι του δίκλωνου προϊόντος. Για το λόγο αυτό ο "Snapback" εκκινητής προστίθεται στο μίγμα της αντίδρασης σε περίσσεια, ενώ αντίθετα ο άλλος εκκινητής σε περιορισμένη συγκέντρωση. Τελικά, παράγονται μονόκλωνες αλυσίδες σε περίσσεια, που κατά τη διάρκεια της ψύξης σχηματίζουν και δίκλινα προϊόντα και ενδομοριακές δομές φουρκέτας. (Σχήμα 1.15)



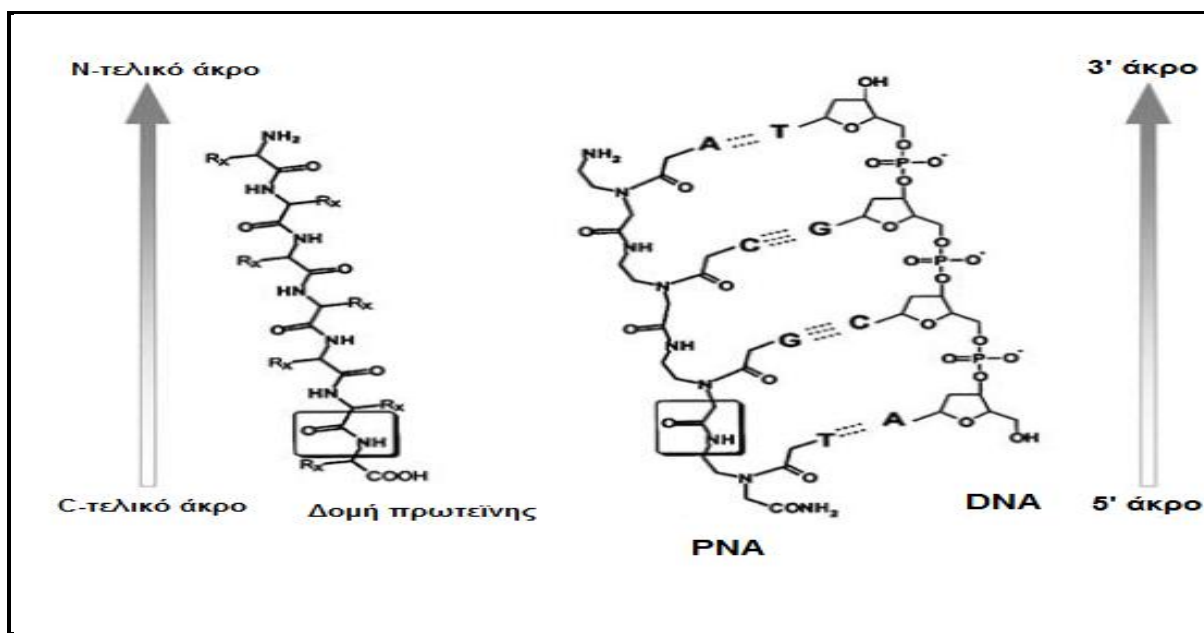
Σχήμα 1.15 Γονοτύπηση με χρήση εκκινητών Snapback και χρωστικής LC Green Plus. Παρατηρείται η κορυφή του δίκλωνου προϊόντος (σε μεγαλύτερο T_m) και η κορυφή του ανιχνευτή με την αλληλουχία-στόχο (σε μικρότερο T_m)⁴⁵

Έχει παρατηρηθεί ότι, όσο μικρότερη σε μέγεθος είναι η «φουρκέτα» που σχηματίζεται, τόσο πιο σταθερή είναι η δομή αυτή. Επιπλέον, οι “Snapback” εκκινητές έχουν την ικανότητα να διαχωρίζουν αλληλουχίες που διαφέρουν μεταξύ τους σε ένα και μόνο ζεύγος βάσεων. Άρα, αποτελούν μία ενδιαφέρουσα προσέγγιση για μία απλή, closed-tube και χωρίς ιχνηθετημένους ανιχνευτές και εκκινητές μέθοδο, που δεν απαιτεί την εκτέλεση PCR πραγματικού χρόνου, αλλά συμβατικής PCR και στη συνέχεια ανάκτηση καμπυλών τήξεως.⁴⁵

1.3.3.2 Peptide Nucleic Acids (PNAs, Πεπτιδικά Νουκλεϊκά Οξέα) Locked Nucleic Acids (LNAs, «Κλειδωμένα» Νουκλεϊκά Οξέα)

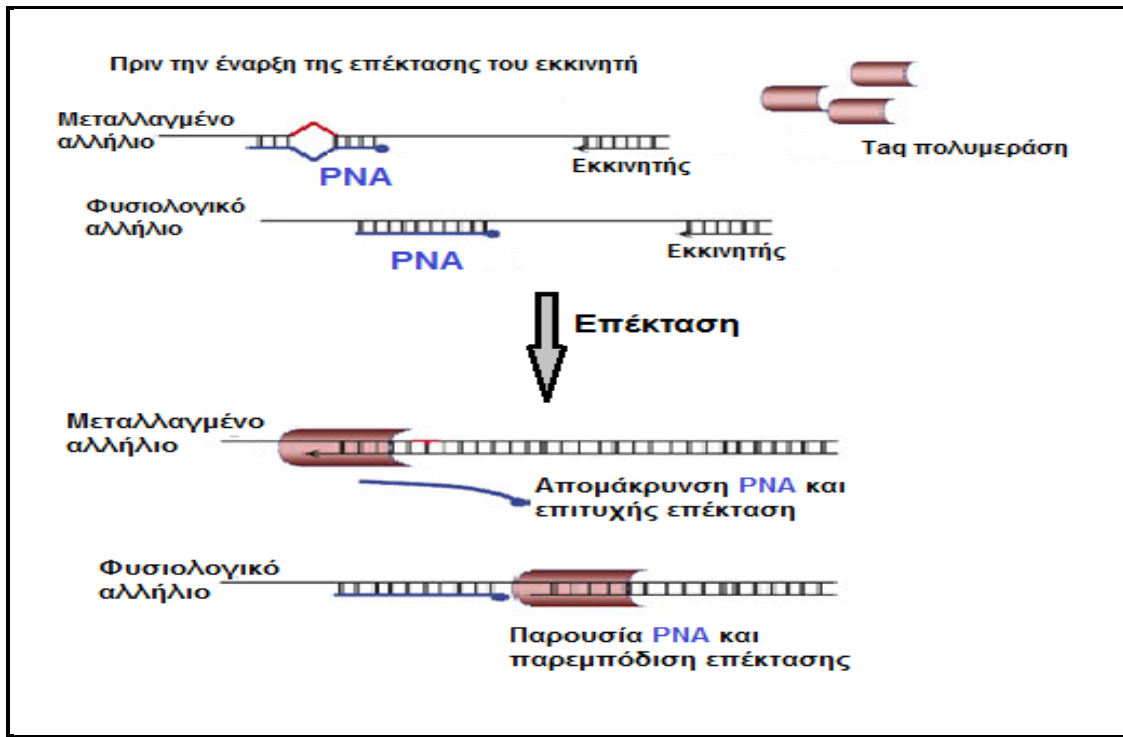
Τα PNAs και τα LNAs είναι ένα είδος ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση της PCR. Πρόκειται για μία τεχνική που χρησιμοποιεί φυσικές μοριακές ρυθμίσεις για επίτευξη ειδικότητας.

Τα PNAs είναι συνθετικά μιμητικά μόρια του DNA. (**Σχήμα 1.16**) Η πρώτη αναφορά στη βιβλιογραφία ήταν από την ομάδα του Nielsen το 1991.⁴⁶ Είναι συνθετικά ανάλογα του DNA στα οποία ο φωσφοδιεστερικός σκελετός έχει αντικατασταθεί από επαναλαμβανόμενες μονάδες N-(αμινοαιθυλ)-γλυκίνης στις οποίες είναι συνδεδεμένες οι αζωτούχες βάσεις. Αυτός ο συνθετικός σκελετός προσφέρει στα PNAs μοναδικά χαρακτηριστικά υβριδισμού. Αντίθετα από τους κλώνους του DNA ή του RNA, τα PNAs δε φέρουν φορτίο και συνεπώς δεν υπάρχουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις κατά τον υβριδισμό τους με τις αλληλουχίες-στόχους. Αυτό προσδίδει ιδιαίτερη σταθερότητα στα διμερή PNA-DNA και PNA-RNA. Η σταθερότητα αυτή αντικατοπτρίζεται και στις αυξημένες θερμοκρασίες τήξης των διμερών αυτών.⁴⁷ Επιπλέον, ο υβριδισμός των PNAs δεν επηρεάζεται από την ιοντική ισχύ των μιγμάτων στα οποία βρίσκονται, αλλά ούτε και από τη δράση των νουκλεασών ή των πρωτεασών.⁴⁸ Επίσης δεν αναγνωρίζονται από τις πολυμεράσες και δεν μπορούν να λειτουργήσουν ως εκκινητές και να επεκταθούν. Τέλος, ο υβριδισμός PNA-DNA επηρεάζεται σημαντικά από μη συμπληρωματικά ζεύγη βάσεων κατά μήκος του υβριδίου, συγκριτικά με τα υβρίδια DNA-DNA.^{49,50}



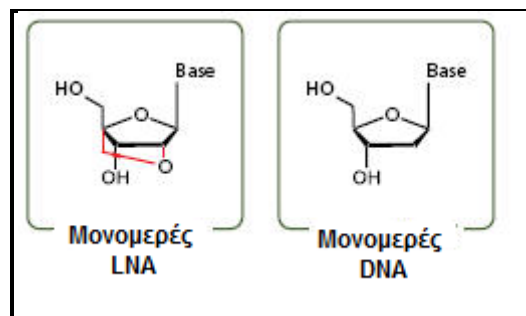
Σχήμα 1.16 Δομή PNA και σύγκριση δομών μεταξύ PNA, DNA και πρωτεΐνης.⁵¹

Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά κάνουν τα PNAs πολύ χρήσιμα εργαλεία κατά την αντίδραση της PCR για επιλεκτική ενίσχυση ενός αλληλίου και παρεμπόδισης ενίσχυσης του άλλου. Όπως αναφέρθηκε, οι ανιχνευτές PNA δεν επηρεάζονται από τη δράση της πολυμεράσης, αλλά έχουν τη δυνατότητα να εμποδίσουν την επέκταση του εκκινητή καθώς συνδέονται με την αλληλουχία-στόχο και ανταγωνίζονται τους εκκινητές.⁵² Η μεγάλη συγγένεια των PNAs με τις αλληλουχίες του DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων μέσω της αντίδρασης της PCR. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται «PNA directed PCR clamping» και χρησιμοποιεί τα PNAs για να παρεμποδίσει την ενίσχυση ειδικών στόχων μέσω άμεσου ανταγωνισμού μεταξύ των PNA ανιχνευτών και των εκκινητών.⁵³ Ο σχηματισμός του υβριδίου PNA-DNA εμποδίζει τον υβριδισμό του εκκινητή και το σχηματισμό του PCR προϊόντος. (Σχήμα 1.17) Η διαδικασία αυτή έχει πολλές δυνατότητες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων καθώς και απομόνωση γονιδίων.⁵⁴ Τέλος, υπάρχει δυνατότητα ιχνηθέτησης των PNAs με βιοτίνη ή φθορισμοφόρα έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν σε αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου.



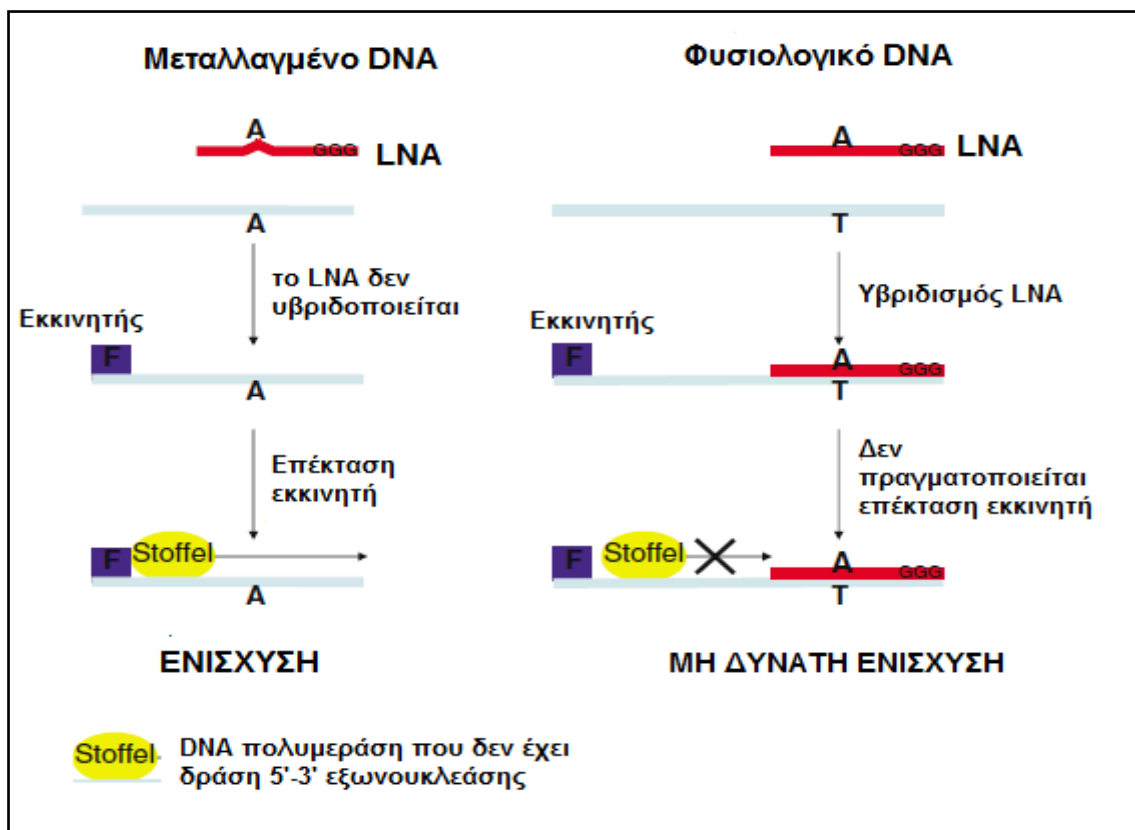
Σχήμα 1.17 Ο ρόλος των ανιχνευτών PNA στην επιλεκτική ενίσχυση των μεταλλαγμένων αλληλίων κατά την αντίδραση της PCR.⁵⁵

Τα LNAs είναι και αυτά ανάλογα του DNA στο μόριο των οποίων υπάρχει μια γέφυρα μεθυλενίου μεταξύ των οξυγόνων στις θέσεις 2' και 4' του δακτυλίου.⁵⁶ Αυτή η δικυκλική δομή «κλειδώνει» το δακτύλιο της ριβόζης και αυξάνει κατά πολύ τη θερμοκρασία τήξεως.⁵⁷ (Σχήμα 1.18) Τα ολιγονουκλεοτίδια LNA συνδέονται με την αλληλουχία-στόχο με βάση τους κανόνες συμπληρωματικότητας. Η συγγένεια και η σταθερότητα της σύνδεσης είναι πολύ μεγαλύτερη συγκριτικά με τα απλά νουκλεοτίδια. Η θερμοκρασία τήξεως των υβριδίων LNA-DNA είναι σημαντικά μεγαλύτερη και μπορεί να μειωθεί 20-30°C σε περίπτωση παρουσίας ενός μόνο μη συμπληρωματικού ζεύγους βάσεων κατά μήκος του υβριδίου.⁵⁸



Σχήμα 1.18 Σύγκριση δομής LNA και DNA. (<http://www.sigmbioblogs.com>)

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR. Αυτού του είδους οι ανιχνευτές χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις PCR με παρεμπόδιση της ενίσχυσης του φυσιολογικού αλληλίου (**Wild-Type Blocking PCR, WTB-PCR**). (**Σχήμα 1.19**) Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μεταλλαγμένων αλληλίων παρουσία περίσσειας φυσιολογικών αλληλίων. Η WTB-PCR χρησιμοποιεί τα ολιγονουκλεοτίδια LNA, τα οποία δεν έχουν τη δυνατότητα επέκτασης από τη DNA πολυμεράση (λόγω μη συμπληρωματικού 3' άκρου με την αλληλουχία-στόχο), για να μπλοκάρει την ενίσχυση του φυσιολογικού αλληλίου κατά τη διάρκεια της PCR. Έτσι, ενισχύεται μόνο το μεταλλαγμένο αλληλίο, το οποίο δεν επηρεάζεται από την παρουσία του LNA. Για να πραγματοποιηθεί με επιτυχία η παραπάνω διαδικασία θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί DNA πολυμεράση, η οποία δε θα έχει δράση 5'-3' εξωνουκλεάσης. Σε αυτή την περίπτωση το ολιγονουκλεοτίδιο LNA υδρολύεται από την πολυμεράση και το φυσιολογικό αλληλίο αφήνεται ελεύθερο για ενίσχυση.



Σχήμα 1.19 Περιγραφή μεθόδου WTB-PCR με LNAs. Επιλεκτική ενίσχυση της μεταλλαγμένης αλληλουχίας.⁵⁶

Η φυσιολογική αλληλουχία είναι πλήρως συμπληρωματική με το ολιγονουκλεοτίδιο LNA και το συγκεκριμένο υβρίδιο έχει πολύ υψηλή θερμοκρασία τήξεως. Αντίθετα, η μεταλλαγμένη αλληλουχία έχει ένα μη συμπληρωματικό ζεύγος βάσεων με το LNA και

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR συνεπώς το υβρίδιο αυτό έχει πολύ χαμηλότερο σημείο τήξεως και είναι ασταθές. Έτσι τελικά επιτρέπεται μόνο η ενίσχυση του μεταλλαγμένου αλληλίου.⁵⁶

Η μέθοδος της WTB-PCR θα μπορούσε να παρομοιαστεί με την **PCR αλληλοειδικής ενίσχυσης (Allele-Specific PCR, ASPCR)**, αφού ενισχύεται η μεταλλαγμένη αλληλουχία και όχι η φυσιολογική. Η μέθοδος WTB-PCR πλεονεκτεί της δεύτερης σε δύο σημεία: α) Η WTB-PCR μπορεί να ανιχνεύσει κάθε είδους μετάλλαξη που μπορεί να υπάρχει στη συγκεκριμένη αλληλουχία-στόχο που μελετάται. Το μόνο αλλήλιο που δεν ενισχύεται είναι το φυσιολογικό, όλα τα άλλα ενισχύονται κανονικά. Αντίθετα, στην ASPCR χρησιμοποιείται αλληλοειδικός εκκινητής για συγκεκριμένη μετάλλαξη. β) Η WTB-PCR δεν επηρεάζεται από το ποσοστό σφάλματος της πολυμεράσης, που οδηγεί σε λάθη κατά την επέκταση και ψευδή αποτελέσματα.

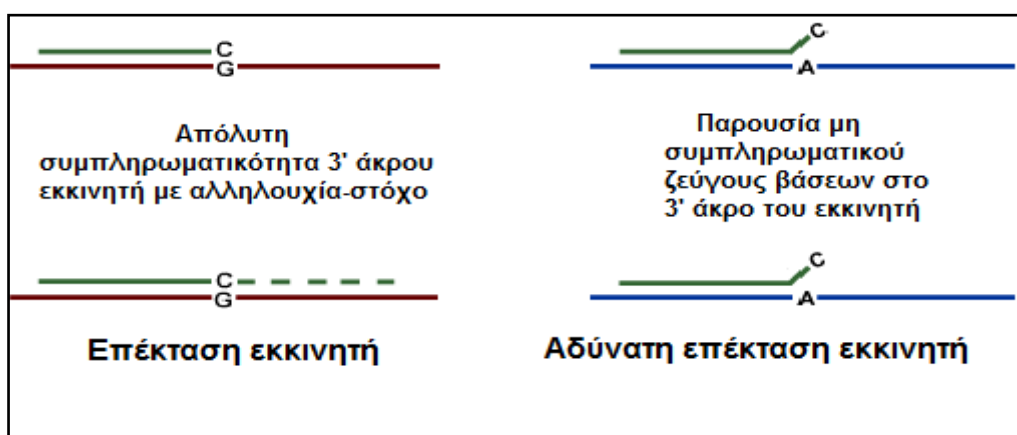
Τέλος, έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία συνδυασμός της WTB-PCR με αλληλοειδικό εκκινητή. Με τον τρόπο αυτό, περιορίζεται η ενίσχυση του φυσιολογικού αλληλίου και ενισχύεται ειδικά το μεταλλαγμένο αλλήλιο. Έτσι αυξάνεται κατά πολύ η ειδικότητα και η ευαισθησία του προσδιορισμού.⁵⁹

1.3.3.3 Αλληλοειδική ενίσχυση PCR (Allele – Specific Amplification, ASA)

Μία άλλη κατηγορία μεθοδολογιών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων είναι αυτές που βασίζονται στην αλληλοειδική ενίσχυση κατά την αντίδραση της PCR (Allele-Specific Amplification, ASA). **(Σχήμα 1.20)** Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε δύο παράλληλες αντιδράσεις. Στην πρώτη αντίδραση, ο εκκινητής είναι συμπληρωματικός και υβριδοποιείται μόνο στη φυσιολογική αλληλουχία, ενώ στη δεύτερη αντίδραση, ο εκκινητής είναι συμπληρωματικός με την αλληλουχία που περιέχει τη μετάλλαξη ή τον πολυμορφισμό που μελετάται. Θεωρώντας δεδομένο το γεγονός ότι, η επέκταση των εκκινητών συμβαίνει μόνο όταν αυτοί είναι απόλυτα συμπληρωματικοί με την αλληλουχία-στόχο, μόνο ένα αλλήλιο θα ενισχύεται κάθε φορά (το φυσιολογικό ή το μεταλλαγμένο).

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε στα τέλη της δεκαετίας του '80 ανεξάρτητα από δύο διαφορετικές εργαστηριακές ομάδες και δύο διαφορετικές προσεγγίσεις περιγράφησαν παράλληλα. Η πρώτη προσέγγιση βασίζεται στην απουσία της επέκτασης των εκκινητών λόγω της ύπαρξης μη συμπληρωματικού ζεύγους βάσεων με την αλληλουχία-στόχο στο 3' άκρο τους. Από αυτό το συμπέρασμα προέκυψαν μία σειρά μεθόδων όπως: **amplification refractory mutation system (ARMS)**⁶⁰, **allele-specific PCR (ASPCR)**⁶¹ και **PCR**

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR **amplification of specific alleles (PASA)**⁶². Η δεύτερη προσέγγιση βασίζεται στην ύπαρξη μη συμπληρωματικού ζεύγους βάσεων μεταξύ εκκινητή και αλληλουχίας-στόχου, αλλά αυτή τη φορά εσωτερικά και όχι στο 3' άκρο. Η παρουσία τέτοιου είδους μη συμπληρωματικού ζεύγους βάσεων εμποδίζει γενικότερα την υβριδοποίηση του εκκινητή στην αλληλουχία-στόχο. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην παραπάνω αρχή είναι: **competitive oligonucleotide priming (COP)**⁶³ και **color complementation assay (CCA)**⁶⁴. Στο επόμενο κεφάλαιο θα αναλυθεί εκτενώς η μεθοδολογία της ARMS-PCR, που είναι και η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.



Σχήμα 1.20 Βασική αρχή των μεθόδων που βασίζονται στην αλληλοειδική ενίσχυση.

Θεωρώντας την περίπτωση μιας ομόζυγης κατάστασης, αναμένεται ενίσχυση και λήψη PCR προϊόντος μόνο κατά τη χρήση του ενός ζεύγους εκκινητών, του ειδικού για τη φυσιολογική ή τη μεταλλαγμένη αλληλουχία. Εσωτερικά πρότυπα πρέπει να χρησιμοποιούνται για να αποκλείεται η πιθανότητα ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος, κυρίως σε περιπτώσεις ετεροζυγωτίας. Κατά την ανάπτυξη μεθοδολογίας πολλαπλής PCR, ένα θετικό σήμα καταγράφεται για κάθε αντίδραση, επιτρέποντας την ταυτόχρονη ανίχνευση περισσότερων διαφορετικών αλληλίων, όπως έγινε για τη διάγνωση της κυστικής ίνωσης.⁶⁵ Ένα μειονέκτημα του αρχικού πρωτοκόλλου των μεθόδων αυτών είναι η εκτέλεση δύο διαφορετικών αντιδράσεων παράλληλα. Η ετερόζυγη και η ομόζυγη κατάσταση μπορούν τώρα να διαφοροποιηθούν πραγματοποιώντας μία αντίδραση, όπου διαφορετικά αλληλία ενισχύονται από εκκινητές ιχνηθετημένους με διαφορετικά φθορισμοφόρα μόρια.^{64,66} Έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία αλληλοειδική αντίδραση PCR με χρήση τεσσάρων εκκινητών, όπου διαφορετικά αλληλία μπορούν να διαχωριστούν ορίζοντας δύο διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού για κάθε ζεύγος εκκινητών.⁶⁷

Ανάλογα με τις συνθήκες του προσδιορισμού καθώς και το είδος του μη συμπληρωματικού ζεύγους βάσεων μεταξύ του εκκινητή και της αλληλουχίας-στόχου, μπορεί να συμβεί ή όχι λανθασμένη επέκταση του 3' άκρου του εκκινητή. Αναφέρεται ότι η απόδοση της αντίδρασης PCR μειώνεται περίπου εκατό φορές όταν υπάρχει μη συμπληρωματικότητα του τύπου A:G, G:A ή C:C και περίπου είκοσι φορές για μη συμπληρωματικότητα του τύπου A:A. Η επέκταση των εκκινητών ήταν εφικτή σε όλες τις άλλες περιπτώσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι, μη συμπληρωματικά ζεύγη βάσεων στο 3' άκρο του εκκινητή μεταξύ της T με G, C ή T παρουσίαζαν πολύ μικρή επίδραση στην απόδοση της PCR.⁶⁸ Αυτό, βέβαια μπορεί να περιοριστεί ή να αποφευχθεί όταν χρησιμοποιούνται κατάλληλοι εκκινητές και εφαρμόζονται κατάλληλες συνθήκες. Η ειδικότητα της επέκτασης των εκκινητών μπορεί να βελτιωθεί με κατάλληλη ρύθμιση των πειραματικών συνθηκών της αντίδρασης.^{62,69} Η ειδικότητα της αντίδρασης επηρεάζεται από τις συγκεντρώσεις των ιόντων μαγνησίου (Mg^{+2}), των εκκινητών, των δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), του DNA-στόχου και του ενζύμου της πολυμεράσης. Επιπλέον, μία πιο αξιόπιστη παρεμπόδιση της επέκτασης των εκκινητών επιτυγχάνεται με την εισαγωγή περισσότερων μη συμπληρωματικών ζευγών βάσεων μεταξύ εκκινητή και αλληλουχίας-στόχου.⁶⁵ Τέλος, η ειδικότητα της μεθόδου επηρεάζεται ισχυρά από το λόγο του μεταλλαγμένου προς το φυσιολογικό DNA που υπάρχει στο δείγμα.

Η ταυτοποίηση της ομόζυγης ή ετερόζυγης κατάστασης είναι η βασική εφαρμογή των παραπάνω μοθοδολογιών, καθώς χαρακτηρίζονται από αξιοπιστία και ευελιξία κατά την εκτέλεσή τους. Η ειδικότητα είναι πιο κρίσιμη όταν ο λόγος των μεταλλαγμένων προς τα φυσιολογικά αλλήλια είναι μειωμένος. Η ανίχνευση περιορισμένου αριθμού καρκινικών κυττάρων που φέρουν τη μετάλλαξη παρουσία μεγάλου αριθμού φυσιολογικών κυττάρων έχει καταγραφεί αρκετές φορές στη βιβλιογραφία.⁷⁰

Η πιθανότητα ψευδώς θετικού ή αρνητικού αποτελέσματος είναι το πιο σημαντικό στοιχείο περιορισμού των παραπάνω μεθόδων. Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται σε επιμόλυνση ή σε λανθασμένη επέκταση των εκκινητών. Για να αποφύγουμε τα ψευδή αποτελέσματα θα πρέπει οι συνθήκες της αντίδρασης να βελτιστοποιούνται και η συγκέντρωση του DNA-στόχου σε κάθε δείγμα θα πρέπει να είναι καθορισμένη και ελεγχόμενη με ακρίβεια.⁷

Για τις περισσότερες από τις μεθόδους που αναφέρθηκαν παραπάνω, η ταυτοποίηση των προϊόντων γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης που βασίζεται στο διαχωρισμό με βάση το μέγεθος των προϊόντων. Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται ιχνηθετημένοι εκκινητές, η πραγματοποίηση ηλεκτροφόρησης δεν είναι απαραίτητη.⁶⁴ Επιπλέον υπάρχει

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR

δυνατότητα εκτέλεσης αλληλοειδικής αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου στην οποία γίνεται χρήση αλληλοειδικών εκκινητών και η ανίχνευση και ταυτοποίηση των προϊόντων πραγματοποιείται με ανιχνευτές υβριδισμού^{71,72}, όπως αυτοί αναλύθηκαν στο **υποκεφάλαιο 1.3.3.1**, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου και καθιστώντας δυνατή την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών διαφορετικών μεταλλάξεων, ακόμα και σε δύο ή περισσότερα διαφορετικά γονίδια.^{73,74}

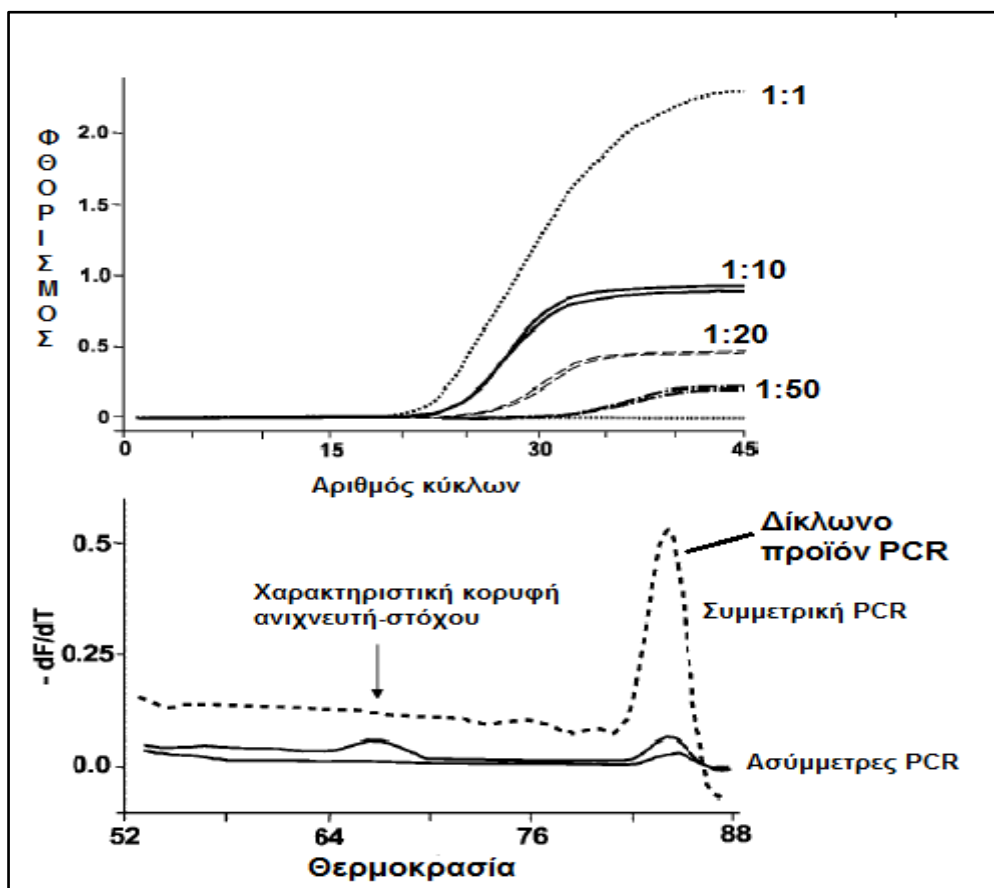
1.3.3.4 Ασύμμετρη PCR με χρήση ανιχνευτών υβριδισμού (Asymmetric PCR with unlabeled probes)

Ακόμα μία παραλλαγή της PCR αποτελεί η ασύμμετρη PCR. Η κύρια διαφορά της από τη συνήθη PCR είναι ότι χρησιμοποιούνται άνισες συγκεντρώσεις των δύο εκκινητών. Στους πρώτους κύκλους, το περισσότερο προϊόν που παράγεται είναι δίκλωνο, καθώς ο εκκινητής που βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση εξαντλείται, στους επόμενους κύκλους παράγεται πλεόνασμα της μιας αλυσίδας και έτσι συσσωρεύεται μονόκλωνο DNA. Έτσι λοιπόν ενισχύεται περισσότερο ο ένας από τους δύο κλώνους του επιθυμητού τμήματος DNA. Εκμεταλλευόμενοι το παραπάνω, αν ενισχύσουμε την αλυσίδα του DNA που φέρει τη μετάλλαξη και χρησιμοποιήσουμε ανιχνευτές υβριδισμού, θα έχουμε περίσσεια του διμερούς της ενισχυμένης αλυσίδας με το συμπληρωματικό ανιχνευτή της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα διαφορά στην ένταση φθορισμού μεταξύ των δύο αλυσίδων με τους ανιχνευτές τους, και έτσι με ανάλυση καμπυλών τήξης διακρίνονται ευκολότερα τα φυσιολογικά και τα μεταλλαγμένα δείγματα DNA (παρατηρείται μεγαλύτερη διαφορά ΔT_m από ότι στη «συμμετρική-κανονική» PCR. (**Σχήμα 1.21**))

Η ευαισθησία της τεχνικής είναι ιδιαίτερα υψηλή λόγω της ειδικότητας και της ευαισθησίας των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται, όμως με τη χρήση της ασύμμετρης PCR αυτή αυξάνεται ακόμα περισσότερο.

Πιο συγκεκριμένα, όταν οι συγκεντρώσεις των εκκινητών είναι ίσες, το σήμα φθορισμού εμφανίζεται νωρίς και φτάνει σε υψηλότερες τιμές πλατώ από ότι αν διαφέρουν. Όταν παραχθεί σε περίσσεια μία αλυσίδα συμπληρωματική ως προς έναν ολιγονουκλεοτιδικό ανιχνευτή, εμφανίζεται μια κορυφή του διμερούς αυτού (χαρακτηριστική), η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για γονοτύπηση. Το ύψος των κορυφών εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ανιχνευτή και το μήκος του προϊόντος της PCR. Προϊόντα PCR με μεγάλο μήκος εξαφανίζουν την κορυφή ανιχνευτή-στόχου και η ασύμμετρη ενίσχυση είναι

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR απαραίτητη. Μειώνοντας το μήκος των PCR προϊόντων (<100bp) αυξάνεται η ευαισθησία και η ασύμμετρη PCR δεν είναι πλέον απαραίτητη.^{75,76}



Σχήμα 1.21 Χαρακτηριστικά γραφήματα Real-time PCR και οι παραγόμενες καμπύλες τήξης, ως αποτέλεσμα συμμετρικής και ασύμμετρης PCR, παρουσία ενός μη-επισημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου-ιχνηθέτη και της φθορίζουσας χρωστικής LCGreen.⁷⁵

1.3.3.5 COLD-PCR (Co-amplification at Lower Temperature, Συν-ενίσχυση σε χαμηλότερη θερμοκρασία αποδιάταξης-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)

Η πρώτη αναφορά στη βιβλιογραφία για την COLD-PCR έγινε το 2008 από την ερευνητική ομάδα του Dr. Mike Makrigiorgos στο Dana Farber Cancer Institute του Πανεπιστημίου του Harvard. Στόχος ήταν η βελτίωση της ευαισθησίας στην ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια που σχετίζονται άμεσα με τον καρκίνο, όπως το *p53*, το *KRAS* και το *EGFR* σε μελέτες γονοτύπησης.⁷⁷ Η COLD-PCR έδωσε τη δυνατότητα ενίσχυσης και απομόνωσης των μεταλλαγμένων αλληλίων.

Η COLD-PCR είναι μία νέα παραλλαγή της κλασικής τεχνικής της PCR που ενισχύει ειδικά και επιλεκτικά μία μετάλλαξη ή γενικότερα ένα μεταλλαγμένο αλληλίο που βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση μέσα σε ένα μείγμα με περίσσεια φυσιολογικών αλληλίων,

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR ανεξάρτητα από το είδος της μετάλλαξης ή τη θέση της μέσα στην αλληλουχία. Η ενίσχυση του γενωμικού DNA με την COLD-PCR παράγει προϊόντα που περιέχουν υψηλά ποσοστά του μεταλλαγμένου αλληλίου και έτσι επιτυγχάνεται η ανίχνευσή του. Αντικαθιστώντας την απλή συμβατική PCR με την COLD-PCR επιτυγχάνουμε αύξηση της ευαισθησίας στην ανίχνευση μεταλλάξεων έως και εκατό φορές, χρησιμοποιώντας στη συνέχεια μία από τις τεχνικές ταυτοποίησης της ύπαρξης της μετάλλαξης, όπως το Sequencing, το Pyrosequencing, η D-HPLC και το HRMA.⁷⁷

Ακόμα και ένα μοναδικό μη συμπληρωματικό ζεύγος αζωτούχων βάσεων οπουδήποτε κατά μήκος της αλληλουχίας του δίκλωνου DNA, έχει σαν αποτέλεσμα τη μικρή αλλά προβλεπόμενη αλλαγή στην T_m της αλληλουχίας αυτής.^{78,79} Η μεταβολή στη θερμοκρασία τήξης της αλληλουχίας εξαρτάται τόσο από τη θέση όπου βρίσκεται το μη συμπληρωματικό ζεύγος βάσεων κατά μήκος της αλληλουχίας, όσο και από το περιεχόμενο της εν λόγω αλληλουχίας σε αζωτούχες βάσεις γενικότερα. Έχει παρατηρηθεί ότι η μεταβολή στη θερμοκρασία τήξης μια αλληλουχίας μπορεί να κυμαίνεται από 0.2-1.5 °C για αλληλουχίες μήκους 200 ζευγών βάσεων (200bp) ή και μεγαλύτερες.^{78,79} Επίσης, για κάθε αλληλουχία DNA υπάρχει μια **κρίσιμη θερμοκρασία αποδιάταξης (critical denaturation temperature, T_c)** η οποία είναι μικρότερη της θερμοκρασίας τήξης του, και κάτω από την οποία η απόδοση της PCR μειώνεται απότομα. Η κρίσιμη θερμοκρασία αποδιάταξης εξαρτάται αυστηρά από την αλληλουχία του DNA που εξετάζεται κάθε φορά. Τμήματα DNA που διαφέρουν μεταξύ τους σε ένα και μόνο νουκλεοτίδιο παρουσιάζουν διαφορετική απόδοση ενίσχυσης στην PCR, όταν ορίζεται ως θερμοκρασία αποδιάταξης κατά τη διάρκεια της PCR η κρίσιμη θερμοκρασία αποδιάταξης T_c . Αυτή η παρατήρηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά την PCR με σκοπό την επιλεκτική ενίσχυση των αλληλίων που βρίσκονται σε μικρή αναλογία και διαφέρουν το ένα από το άλλο σε ένα ή περισσότερα νουκλεοτίδια σε οποιαδήποτε θέση κατά μήκος της αλληλουχίας.

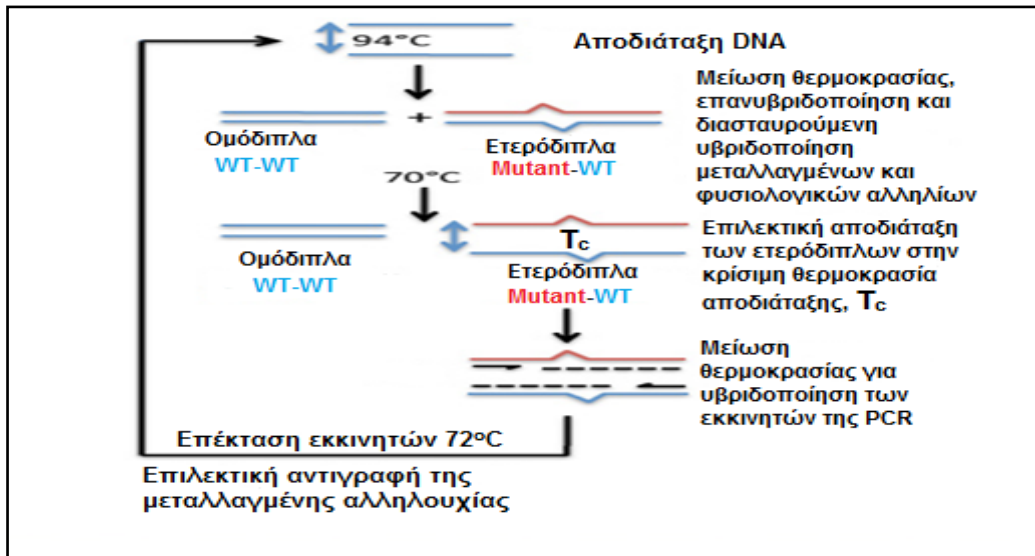
Στην COLD-PCR, χρησιμοποιείται μία ενδιάμεση θερμοκρασία υβριδοποίησης κατά τη διάρκεια των κύκλων της PCR η οποία επιτρέπει τη **διασταυρούμενη υβριδοποίηση (cross-hybridization)** των μεταλλαγμένων και των φυσιολογικών αλληλίων και έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό **ετερόδιπλων (heteroduplexes)**. Τα ετερόδιπλα αυτά τήκονται σε χαμηλότερη θερμοκρασία σε σύγκριση με τα **ομόδιπλα (homoduplexes)** λόγω του μη συμπληρωματικού ζεύγους βάσεων. Στη συνέχεια, τα ετερόδιπλα αποδιατάσσονται και ενισχύονται επιλεκτικά στη θερμοκρασία T_c , ενώ τα ομόδιπλα παραμένουν δίκλινα και ενισχύονται με χαμηλή απόδοση κατά τη διάρκεια της PCR.

Ορίζοντας ως θερμοκρασία αποδιάταξης της COLD-PCR τη θερμοκρασία T_c , μεταλλάξεις σε οποιαδήποτε θέση κατά μήκος της αλληλουχίας ενισχύονται και εμπλουτίζονται. Η COLD-PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί και να εφαρμοστεί σε δύο παραλλαγές, την “full” COLD-PCR και την “fast” COLD-PCR, ανάλογα με το τι θέλουμε να επιτύχουμε. Με την “full” COLD-PCR επιτυγχάνεται η ενίσχυση και η ανίχνευση όλων των μεταλλάξεων, γνωστών και άγνωστων, που μπορεί να υπάρχουν κατά μήκος μιας αλληλουχίας. Με την “fast” COLD-PCR επιτυγχάνεται η μέγιστη ενίσχυση και εμπλουτισμός του δείγματος σε συγκεκριμένη γνωστή μετάλλαξη στην αλληλουχία που μελετάται.

Ο εμπλουτισμός του δείγματος σε μεταλλαγμένα αλληλία με χρήση της COLD-PCR είναι πιο αποδοτικός όταν τα προϊόντα που ενισχύονται είναι σχετικά μικρού μήκους (<200bp). Αυτό συμβαίνει επειδή, η παρουσία ενός και μόνο μη συμπληρωματικού ζεύγους βάσεων σε ένα μικρό τμήμα DNA προκαλεί μεγαλύτερο αντίκτυπο στη μεταβολή της θερμοκρασίας τήξης.⁷⁷

Η “full” COLD-PCR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση όλων των πιθανών μεταλλάξεων που μπορεί να υπάρχουν στην αλληλουχία που ενισχύεται κατά τη διάρκεια της PCR. Έτσι, χρησιμοποιώντας την “full” COLD-PCR μπορούν να ενισχυθούν αλληλουχίες που περιέχουν μεταλλάξεις που αυξάνουν τη θερμοκρασία τήξης του προϊόντος, μεταλλάξεις που διατηρούν τη θερμοκρασία τήξης του προϊόντος ή μεταλλάξεις που μειώνουν τη θερμοκρασία τήξης του προϊόντος. Πειραματικά αποδείχτηκε ότι όλες οι παραπάνω αντικαταστάσεις μπορούν να ενισχυθούν εξίσου κατά τη διάρκεια της “full” COLD-PCR.

Η διαδικασία που ακολουθείται κατά την “full” COLD-PCR είναι η εξής: Αρχικά, πραγματοποιείται ένας αριθμός κύκλων της απλής συμβατικής PCR, έτσι ώστε να σχηματιστεί ένας αριθμός αντιγράφων τόσο από το φυσιολογικό όσο και από το μεταλλαγμένο γενωμικό DNA, το οποίο θα λειτουργήσει σαν DNA-στόχος στα επόμενα στάδια της αντίδρασης. Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται σε αυτό το πρώτο στάδιο εξαρτάται από την αρχική ποσότητα γενωμικού DNA που προστίθεται σε κάθε αντίδραση και μπορεί να είναι 5-25 κύκλοι. Στη συνέχεια ακολουθεί το πρόγραμμα της “full” COLD-PCR. **(Σχήμα 1.22)**



Σχήμα 1.22 Περιγραφή σταδίων “full” COLD-PCR.⁷⁷

Τα καθοριστικά στάδια από τα οποία κρίνεται και η επιτυχία της μεθόδου είναι δύο. Το πρώτο είναι το στάδιο του διασταυρούμενου υβριδισμού κατά το οποίο τα μονόκλινα τμήματα DNA, που έχουν προκύψει από το στάδιο της θέρμανσης και αποδιάταξης, επαναυβριδοποιούνται προς σχηματισμό δίκλωνων μορίων. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η διασταυρούμενη υβριδοποίηση των φυσιολογικών αλληλίων με τα μεταλλαγμένα και ο σχηματισμός των ετερόδιπλων μορίων DNA. Επειδή τα μεταλλαγμένα αλληλία βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση μέσα σε κάθε δείγμα, στο τέλος αυτού του σταδίου το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών θα καταλήξει να είναι μέρος ενός ετερόδιπλου μορίου, δηλαδή ενός δίκλωνου μορίου DNA που θα χαρακτηρίζεται από ένα μη συμπληρωματικό ζεύγος βάσεων. Τελικά έχουν σχηματιστεί δύο ομάδες δίκλωνων μορίων, τα ομόδιπλα και τα ετερόδιπλα, που διαφέρουν μόνο σε ένα νουκλεοτίδιο. Η διαφορά αυτή αντικατοπτρίζεται στην T_m τους. Τα ετερόδιπλα έχουν λίγο χαμηλότερη θερμοκρασία τήξης από τα ομόδιπλα εξαιτίας του ενός μη συμπληρωματικού ζεύγους βάσεων. Το δεύτερο καθοριστικής σημασίας στάδιο είναι αυτό στο οποίο χρησιμοποιείται η T_c . Στη θερμοκρασία αυτή αποδιατάσσονται μόνο τα ετερόδιπλα, ενώ τα ομόδιπλα μόρια παραμένουν δίκλινα. Έτσι, αποδιατάσσονται μόνο τα δίκλινα μόρια που φέρουν το μεταλλαγμένο αλληλίο. Η T_c προσδιορίζεται πειραματικά.⁷⁷ Επειδή αυτή η κρίσιμη θερμοκρασία αποδιάταξης επαναλαμβάνεται σε κάθε κύκλο της PCR, ο διαφορικός εμπλουτισμός των αλληλίων που περιέχουν τη μετάλλαξη αυξάνεται εκθετικά και έχει σαν αποτέλεσμα τη μεγάλη διαφορά στη γενική απόδοση της ενίσχυσης μεταξύ των μεταλλαγμένων και των φυσιολογικών αλληλίων στο τέλος της PCR.

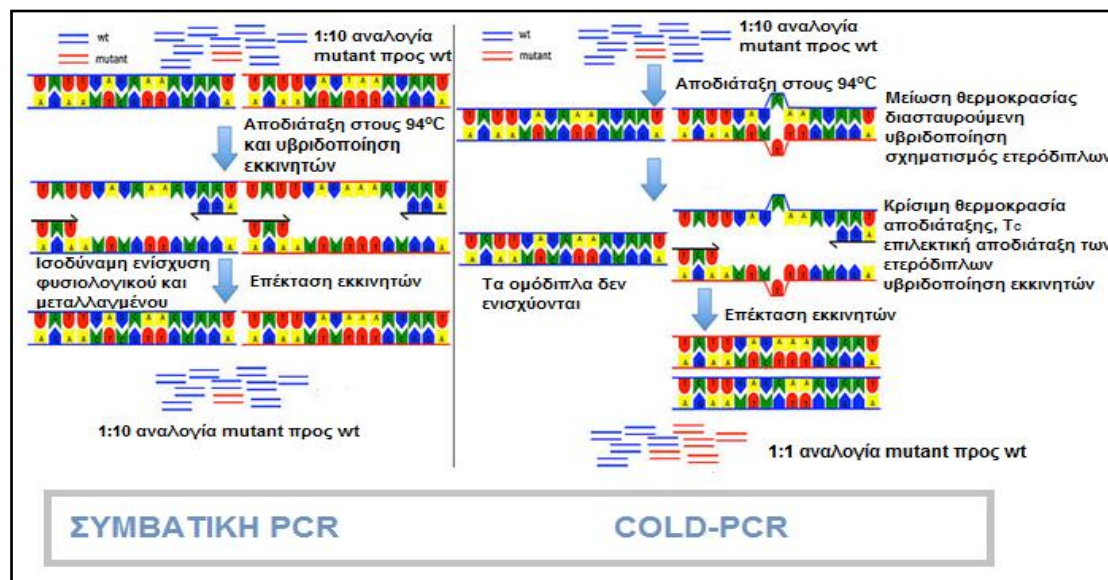
Η “fast” COLD-PCR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μεταλλάξεων που έχουν σαν αποτέλεσμα τη μείωση της θερμοκρασίας τήξης της αλληλουχίας που ενισχύεται κατά τη διάρκεια της PCR. Η διαδικασία που ακολουθείται, έχει αρκετές ομοιότητες με αυτήν της “full” COLD-PCR, αλλά είναι πιο απλή και πιο σύντομη. Χρησιμοποιείται μόνο για ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων, αλλά μέσω αυτής επιτυγχάνεται ο μέγιστος εμπλουτισμός ενός δείγματος στο μεταλλαγμένο αλληλίο, κάτι που δε συμβαίνει στην “full” COLD-PCR. Ο εμπλουτισμός του δείγματος με το μεταλλαγμένο αλληλίο επιτυγχάνεται χωρίς να είναι απαραίτητη η πραγματοποίηση του ενδιάμεσου σταδίου, όπου λαμβάνει χώρα η διασταυρούμενη υβριδοποίηση των φυσιολογικών αλληλίων με τα μεταλλαγμένα προς σχηματισμό των ετερόδιπλων μορίων DNA. Έτσι, εκτελείται μια σχετικά πιο σύντομη PCR, η οποία διαφέρει από τη συμβατική στο ότι επιλέγεται ως θερμοκρασία αποδιάταξης του δίκλωνου DNA η T_c , και όχι η συνηθισμένη θερμοκρασία αποδιάταξης των 92-96°C. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια με αυτή της “full” COLD-PCR, χωρίς όμως το ενδιάμεσο στάδιο του διασταυρούμενου υβριδισμού. (Σχήμα 1.23) Καθοριστικό στάδιο έδω είναι αυτό όπου χρησιμοποιείται η θερμοκρασία αποδιάταξης. Η θερμοκρασία αποδιάταξης του δίκλωνου DNA ρυθμίζεται στην T_c , χωρίς να προηγηθεί η πολύ έντονη θέρμανση στους 94°C για να αποδιαταχθούν όλα τα δίκλινα μόρια DNA. Έτσι, εξ αρχής προωθείται επιλεκτικά μόνο η αποδιάταξη των μεταλλαγμένων αλληλουχιών. Αντίθετα, οι φυσιολογικές αλληλουχίες παραμένουν στη δίκλινη μορφή τους.



Σχήμα 1.23 Περιγραφή σταδίων “fast” COLD-PCR.⁷⁷

Συγκρίνοντας τη συμβατική PCR με την COLD-PCR εξάγουμε τα παρακάτω συμπεράσματα: Η COLD-PCR είναι μια παραλλαγή της κλασικής PCR που έχει σα στόχο την επιλεκτική ενίσχυση των μεταλλαγμένων αλληλίων και τον περιορισμό της ενίσχυσης

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR των φυσιολογικών αλληλίων σε ένα δείγμα. Η συμβατική PCR έχει τη δυνατότητα να ενισχύει τα φυσιολογικά αλλήλια (σε περίσσεια στο δείγμα) και τα μεταλλαγμένα αλλήλια (σε χαμηλή συγκέντρωση στο δείγμα) με την ίδια απόδοση, περιορίζοντας έτσι κατά πολύ την ικανότητα ανίχνευσης του μεταλλαγμένου αλληλίου παρουσία του φυσιολογικού. (Σχήμα 1.24)



Σχήμα 1.24 Συγκριτική παρουσίαση Συμβατικής PCR και COLD-PCR.

Συνοπτικά, τα πλεονεκτήματα της COLD-PCR είναι τα παρακάτω:

1. Είναι μία μέθοδος ενός σταδίου (Single-step method) που έχει την ικανότητα να ενισχύει επιλεκτικά γνωστές και άγνωστες μεταλλάξεις σε αλλήλια που βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση μέσα στο δείγμα, ανεξάρτητα από το είδος και τη θέση της μετάλλαξης.
2. Δεν απαιτούνται επιπλέον αντιδραστήρια ή ειδική οργανολογία. Έτσι, το κόστος της δε διαφέρει από αυτό της συμβατικής PCR.
3. Παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία στην ανίχνευση μεταλλάξεων, ειδικά σε δείγματα όπου η παρουσία του μεταλλαγμένου αλληλίου επισκιάζεται από την παρουσία περίσσειας φυσιολογικών.
4. Ο χρόνος που απαιτείται για την εκτέλεσή της είναι περίπου ίδιος με αυτόν της συμβατικής PCR.

Τέλος, κάποια μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι:

1. Η βέλτιστη T_c πρέπει να υπολογίζεται για κάθε αλληλουχία και να προστίθεται σαν επιπλέον στάδιο στο πρόγραμμα της PCR.

2. Τις περισσότερες φορές είναι απαραίτητη η ρύθμιση της θερμοκρασίας με ακρίβεια $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ κατά τη διάρκεια της PCR.
3. Η χρήση της περιορίζεται στην ανάλυση αλληλουχιών μέγιστου μήκους 200bp, αφού σε μεγαλύτερες αλληλουχίες η αλλαγή σε ένα και μόνο νουκλεοτίδιο δεν επηρεάζει αισθητά τη θερμοκρασία τήξης της αλληλουχίας.
4. Η COLD-PCR είναι ευαίσθητη σε λάθη που οφείλονται στη δράση της πολυμεράσης κατά τη διάρκεια της επέκτασης των εκκινητών. Η τοποθέτηση ενός λάθους νουκλεοτιδίου στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα θα δημιουργήσει ένα «σπάνιο» αλλήλιο το οποίο θα συνεχίσει να ενισχύεται καθ' όλη τη διάρκεια της COLD-PCR.

Η COLD-PCR είναι μία καινούρια μέθοδος ανίχνευσης μεταλλάξεων που μπορεί να εξασφαλίσει υψηλή ευαισθησία. Για το λόγο αυτό στο άμεσο μέλλον θα αντικαταστήσει τη συμβατική PCR. Ήδη έχουν γίνει πολλές μελέτες στις οποίες η COLD-PCR συνδυάζεται με άλλες τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων με σκοπό την επίτευξη μέγιστης ευαισθησίας.^{77,80,81,82,83,84,85,86}

1.3.4 PTT (Protein Truncation Test, Δοκιμασία πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης)⁸⁷

Η PTT ανιχνεύει γρήγορα και αξιόπιστα μη νοηματικές μεταλλάξεις, καθώς και μεταλλάξεις που αλλάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης, διαταράσσουν τη μετάφραση και καταλήγουν σε κωδικόνιο λήξης με αποτέλεσμα την παραγωγή συντημημένης μη λειτουργικής ακρωτηριασμένης πρωτεΐνης.

Η PTT αποτελεί μια *in vitro*, *de novo* πρωτεϊνική σύνθεση από ένα ενισχυμένο τμήμα ενός γονιδίου. Τα στάδια μιας ανάλυσης PTT περιλαμβάνουν: α) απομόνωση DNA ή RNA, β) PCR ή Real Time-PCR και ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη, γ) *in vitro* μεταγραφή και μετάφραση και δ) ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανίχνευση σήματος.

Η PTT μπορεί να εφαρμοσθεί σε σχετικά μεγάλο τμήμα γενετικού υλικού (μέχρι 2 kb) εν αντιθέσει με τις πιο κλασσικές μεθόδους που εφαρμόζονται σε μικρότερα τμήματα DNA όπως το SSCP που ιδανικά χρησιμοποιεί τμήματα 200-300 βάσεων και το DGGE που ιδανικά χρησιμοποιεί τμήματα 400-500 βάσεων. Εάν το προς εξέταση γονίδιο περιέχει μεγάλα εξόνια (π.χ. *APC*, *BRCA1/2* κ.λπ.) τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί γενωμικό DNA και η μέθοδος PTT εφαρμόζεται σε αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα αυτών των εξονίων διαφορετικά εάν το προς εξέταση γονίδιο έχει πολλά μικρά εξόνια (π.χ. *DMD*, *ATM*,

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR (*hMSH2* κ.λπ.) τότε απομονώνεται ολικό RNA ή mRNA και χρησιμοποιείται η αντίστροφη μεταγραφή (**reverse transcription, RT**) για να παραχθεί cDNA αντίγραφο.

1.3.5 ASO (allele-specific oligonucleotides) Hybridization - Υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια³

Ο υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια είναι μία τεχνική ανάλυσης γνωστών σημειακών μεταλλάξεων. Βασίζεται στο γεγονός ότι τα ολιγονουκλεοτιδικά μόρια -που σε αυτήν την περίπτωση είναι οι **ανιχνευτές (probes)**- υβριδίζονται μόνο με αλληλουχίες που παρουσιάζουν απόλυτη συμπληρωματικότητα, ενώ η παρουσία μίας και μόνο μη συμπληρωματικής βάσης αποτρέπει τον υβριδισμό (κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες). Για την ανίχνευση μιας δεδομένης μετάλλαξης απαιτούνται δύο ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, μία συμπληρωματική για το φυσιολογικό μόριο DNA και μία συμπληρωματική για το μεταλλαγμένο. Για την εκτέλεση της ανάλυσης με υβριδισμό ASO, προηγείται η αντίδραση PCR -για εκθετική ενίσχυση του DNA των δειγμάτων.

1.3.6 D-HPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography, Αποδιατακτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης)

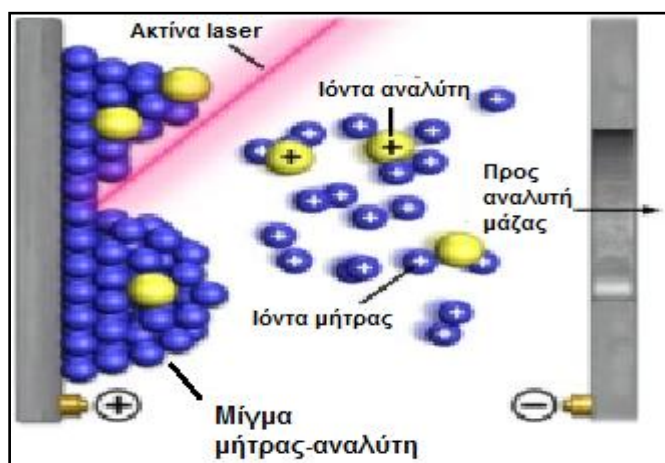
Είναι μια παραλλαγή της ήδη καταξιωμένης τεχνικής HPLC. Συγκεκριμένα, μετά την PCR τα προϊόντα αποδιατάσσονται θερμικά στους 95°C και τα ετεροδιμερή επανασηματίζονται όταν η θερμοκρασία του δείγματος ελαττωθεί στους 65°C. Στη συνέχεια το δείγμα εισάγεται σε αλκυλιωμένη μη πορώδη στήλη πυριτίου και εκλούεται μέσα σε λίγα λεπτά με βαθμίδωση διαλύματος ακετονιτριλίου. Η θερμοκρασία στη στήλη επιλέγεται να είναι 1-2 βαθμούς κάτω του υπολογιζόμενου T_m . Τα ετεροδιμερή εκλούνται σε μικρότερο χρόνο από τα ομοδιμερή. Έτσι, η εμφάνιση περισσοτέρων της μιας κορυφής στο γράφημα της απορρόφησης στα 254nm καταδεικνύει την ύπαρξη μετάλλαξης.⁸⁸

1.3.7 Φασματομετρία Μάζας με Ιοντισμό Εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας σε συνδυασμό με ανιχνευτή χρόνου πτήσης (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)

Η **Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS)** έχει θεωρηθεί ως μία μέθοδος που επιτρέπει την αλληλούχηση εκατοντάδων βάσεων σε μερικά μόνο δευτερόλεπτα. Η

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR
MALDI-TOF MS είναι πιο κατάλληλη παραλλαγή της φασματομετρίας μάζας για αλληλούχηση DNA.⁸⁹

Αρχικά, το δείγμα κρυσταλλοποιείται με μία ουσία-μήτρα (αρωματική αμίνη ή καρβοξυλικό οξύ) που έχει την ιδιότητα να απορροφά ενέργεια. Το μείγμα του δείγματος με τη μήτρα ακτινοβολείται με έναν παλμό laser, τέτοιου μήκους κύματος ώστε η απορρόφηση από τη μήτρα να είναι μέγιστη. Η μήτρα εξατμίζεται και συγχρόνως απελευθερώνονται μόρια δείγματος. Μέσω αντιδράσεων ανταλλαγής πρωτονίων, μεταξύ μήτρας και δείγματος, η μήτρα ιονίζει το δείγμα και κάποιες φορές προκαλεί διάσπαση των μορίων του δείγματος. Στη συνέχεια, τα ιόντα του δείγματος επιταχύνονται μέσα σε ένα θάλαμο ιοντισμού, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Κατά μήκος αυτού του θαλάμου, τα ιόντα του δείγματος «ταξιδεύουν» σε σωλήνα κενού γνωστού μήκους και διαχωρίζονται με βάση το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z ratio). (Σχήμα 1.25) Η μέθοδος MALDI συνδέεται με έναν αναλυτή **χρόνου πτήσεως (Time-of-flight, TOF)**, ο οποίος μετρά το χρόνο που χρειάζεται κάθε σωματίδιο για να διανύσει αυτήν την απόσταση. Η ταχύτητα με την οποία κινείται το κάθε ιόν εξαρτάται από το λόγο της μάζας του προς το φορτίο του. Ο χρόνος πτήσης εξαρτάται από το λόγο m/z και αυτό συνεπάγεται ότι τα πιο βαριά σωματίδια έχουν και χαμηλότερες ταχύτητες. Παρ' όλα αυτά, ακόμα και τα μεγαλύτερα μόρια χρειάζονται μόνο μερικά μ seconds για να φτάσουν στον ανιχνευτή, καθιστώντας τη MALDI-TOF μία πολύ ελκυστική, υψηλής απόδοσης τεχνική για αλληλούχηση DNA. Για το λόγο αυτό, από το 1990, άρχισαν να αναφέρονται στη βιβλιογραφία εργασίες που χρησιμοποιούσαν τη μέθοδο της MALDI-TOF για αλληλούχηση DNA.⁹⁰



Σχήμα 1.25 Στάδια διαδικασίας μεθόδου MALDI.

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου MALDI-TOF MS είναι τα παρακάτω: α) είναι μέθοδος που προσδιορίζει τη μάζα μορίων DNA, συνεπώς προσφέρει μεγάλο βαθμό

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR ελευθερίας σε κάθε ερευνητή για σχεδιασμό νέων αναλύσεων, β) υπάρχει δυνατότητα να αναλυθούν ταυτόχρονα πολλά δείγματα, έως και 3.840 τη φορά, γ) για την εκτέλεση της μεθόδου απαιτείται μικρός όγκος δείγματος, περίπου 15nL αναλύτη και έτσι επιτυγχάνεται υψηλή αποδοτικότητα κόστους.

Εξαιτίας της υψηλής της ευαισθησίας και της ικανότητάς της για ποσοτικοποίηση, η MALDI-TOF είναι κατάλληλη για κλινική διαγνωστική χρήση και ανίχνευση πολυμορφισμών και μεταλλάξεων. Το όριο ευαισθησίας της μεθόδου για ανίχνευση μεταλλάξεων, που βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα μέσα στο δείγμα, είναι περίπου 5-10%. Υψηλής απόδοσης τεχνολογίες γονοτύπησης όπως η MALDI-TOF έχουν προταθεί για την ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων σε κλινικά δείγματα.⁹¹

1.3.8 Μικροσυστοιχίες Ολιγονουκλεοτιδίων DNA (DNA Microarrays)

Η τεχνολογία αυτή αποτελεί σήμερα ένα από τα πλέον δυνατά και ευέλικτα αναλυτικά μεθοδολογικά εργαλεία στο χώρο της έρευνας.⁹² Βασίζεται στον υβριδισμό ιχνηθετημένου RNA ή DNA του δείγματος προς εξέταση με συμπληρωματικά μόρια DNA ακινητοποιημένα σε συγκεκριμένα σημεία επάνω σε μία σταθερή επιφάνεια. Ο υβριδισμός ενός αγνώστου δείγματος σε μία συστοιχία αποτελεί ως εκ τούτου μία παράλληλη και ταυτόχρονη αναζήτηση κάθε μορίου για τον αντίστοιχο συμπληρωματικό του κλώνο, με βάση τους νόμους της μοριακής αναγνώρισης των συμπληρωματικών αλληλουχιών DNA. Η κύρια χρησιμότητα των μικροσυστοιχιών ολιγονουκλεοτιδίων δεν είναι η de novo εύρεση της αλληλουχίας ενός δείγματος DNA, αλλά η σάρωση του δείγματος προκειμένου να εντοπιστούν μεταλλάξεις ή SNPs. Όσον αφορά την ανάλυση μεταλλάξεων, είναι δυνατός ο σχεδιασμός των ανιχνευτών ώστε να εντοπίζουν συγκεκριμένες γνωστές μεταλλάξεις.

Οι τεχνολογίες των DNA μικροσυστοιχιών διακρίνονται με βάση το μήκος των θραυσμάτων του DNA τα οποία είναι ακινητοποιημένα, τη μέθοδο ακινητοποίησης, τη χημεία και τον τρόπο σύνδεσης του DNA, καθώς και τη μέθοδο υβριδοποίησης και ανίχνευσης. Οι μορφές DNA που χρησιμοποιούνται προς ακινητοποίηση συνήθως διαφέρουν μόνο στο μήκος των νουκλεϊκών οξέων από τα οποία αποτελούνται: η μία μορφή φέρει σχετικά μεγάλα σε μήκος ολιγονουκλεοτίδια (συνήθως μεγαλύτερα από 100nt) και είναι κατάλληλη για μελέτη έκφρασης γονιδίων, ενώ η άλλη φέρει μικρά σε μήκος ολιγονουκλεοτίδια (μέχρι 25nt) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για εύρεση της αλληλουχίας DNA.

Η χρήση γυάλινης επιφάνειας για ακινητοποίηση καθώς και φθορίζουσών ουσιών για την ιχνηθέτηση του άγνωστου δείγματος παράλληλα με την ανάπτυξη νέας τεχνολογίας για τη

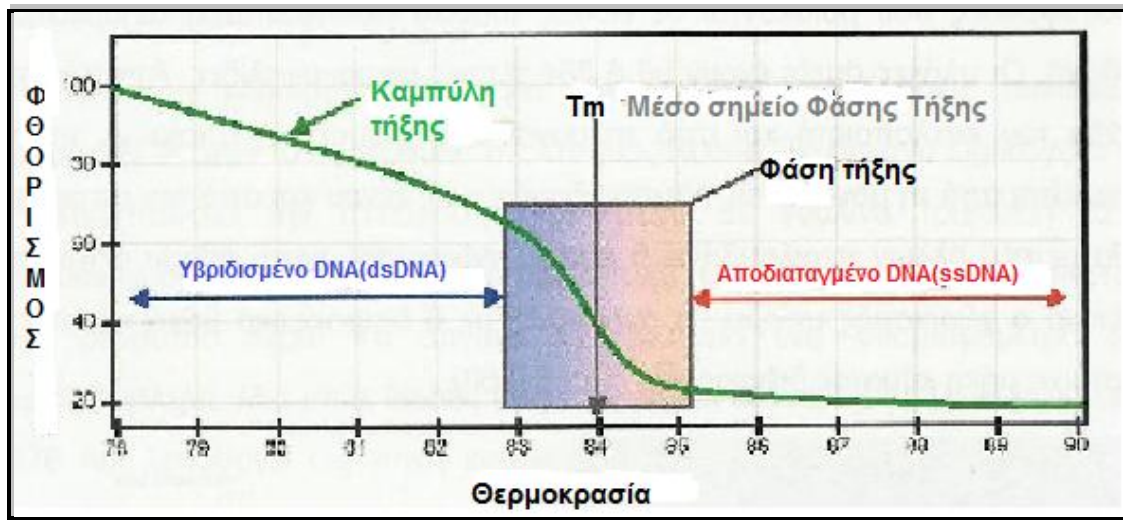
Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR σύνθεση και ακινητοποίηση νουκλεϊκών οξέων σε γυάλινα πλακίδια σε πολύ μεγάλη πυκνότητα, επέτρεψαν την ελαχιστοποίηση του μεγέθους των συστοιχιών με την παράλληλη αύξηση της πειραματικής απόδοσης και του πληροφοριακού περιεχομένου.³

1.3.9 Υψηλής διακριτικότητας ανάλυση καμπυλών τήξεως (High Resolution Melting Curve Analysis)

Μία πρόσφατη καινοτομία, που πρωτοεισήχθηκε με σκοπό την ανάλυση μεταλλάξεων το 1997 και δεν απαιτεί το διαχωρισμό των προϊόντων της PCR σε πηκτές ή στήλες, βασίζεται στην ανάλυση των καμπυλών τήξης των προϊόντων PCR, με ειδικά όργανα υψηλής διακριτικής ικανότητας. Η ανάλυση με καμπύλες τήξης είναι μια γρήγορη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων, αλλά και τον έλεγχο ύπαρξης νέων, άγνωστων μεταλλάξεων σε δείγματα.⁹³ Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη ενός φθορίζοντος μορίου στο μείγμα της αντίδρασης της PCR και στη συνέχεια λήψη των καμπυλών τήξης των προϊόντων. Φαίνεται λοιπόν ότι η ποιότητα και η ακρίβεια των καμπυλών τήξης είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την απόδοση, την ειδικότητα και την ευαισθησία της αντίδρασης της PCR που προηγείται, καθώς και από το όργανο και τη φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιείται.⁹⁴

Η τήξη είναι μια χαρακτηριστική, θεμελιώδης ιδιότητα του DNA. Όταν η διπλή έλικα θερμαίνεται, οι δύο κλώνοι αποχωρίζονται. Κάθε δίκλωνο DNA έχει μια χαρακτηριστική θερμοκρασία τήξης (T_m), η οποία προσδιορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία το 50% του DNA γίνεται μονόκλωνο ή προτιμότερα η θερμοκρασία όπου χάνεται η μισή ελικοειδής μορφή (**Σχήμα 1.26**).

Το T_m ενός δίκλωνου μορίου DNA είναι ένα χαρακτηριστικό μέγεθος για τη συγκεκριμένη αλληλουχία, αλλά είναι μόνο ένα μέρος της πληροφορίας που λαμβάνουμε τελικά από την ανάλυση των καμπυλών τήξης. Οι πιο σημαντικές πληροφορίες προκύπτουν από την ίδια τη μορφή της καμπύλης.⁹⁵



Σχήμα 1.26 Βασικές αρχές μιας χαρακτηριστικής καμπύλης HRM. Με πράσινο η μετάβαση από τον υψηλό φθορισμό της αρχικής φάσης με υβριδισμένα μόρια, μέσω της δραστηρικής μείωσης φθορισμού της φάσης τήξης στη φάση αποδιάταξης. Ο φθορισμός μειώνεται καθώς η παρεμβαλλόμενη χρωστική ουσία στο DNA απελευθερώνεται από το δίκλωνο DNA όταν αυτό αποδιατάσσεται. Το μεσαίο σημείο της φάσης τήξης, στο οποίο το ποσοστό μεταβολής του σήματος τήξης είναι μέγιστο, καθορίζει τη θερμοκρασία της τήξης (T_m).⁹⁶

Αυτές οι T_m διαφέρουν ανάλογα με τις εξής παραμέτρους: α) το μήκος του δίκλωνου DNA, β) το βαθμό περιεχομένου βάσεων γουανίνης και κυτοσίνης, GC (η T_m είναι υψηλότερη όσο πιο πλούσιο το μόριο του DNA σε GC λόγω των τριών δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ τους), γ) την αλληλουχία και δ) το βαθμό συμπληρωματικότητας μεταξύ των κλώνων.^{3,97}

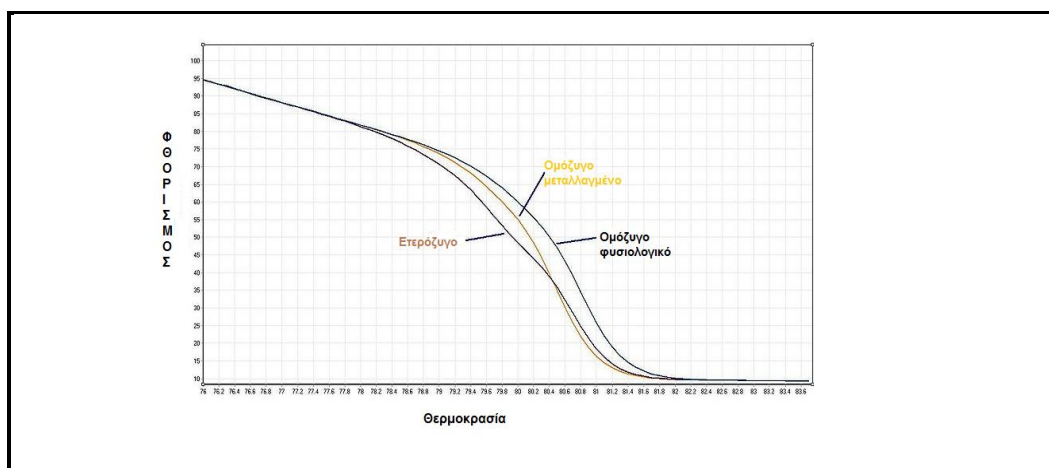
Η ανάλυση με καμπύλες τήξης στηρίζεται στην προσθήκη επισημασμένων ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων-ιχνηθετών ή μορίων που φθορίζουν όταν δεσμεύονται με δίκλωνο DNA, κατά την αντίδραση της PCR. Μετά την αντίδραση, μια καμπύλη τήξης παράγεται από τη θέρμανση του ενισχυμένου προϊόντος της PCR παρουσία του ιχνηθέτη ή της χρωστικής, κατά την οποία προκύπτουν μεταβολές στα σήματα φθορισμού όταν το προϊόν PCR αποδιατάσσεται ή «τήκεται» και ο ιχνηθέτης αποδεσμεύεται από το προϊόν της PCR, με αποτέλεσμα μια σημαντική μείωση της έντασης του φθορισμού.

Κάποιες από αυτές τις μεθόδους δεν απαιτούν εξειδικευμένους ιχνηθέτες για κάθε εφαρμογή, αφού μπορούν να χρησιμοποιηθούν ουσίες που φθορίζουν παρουσία δίκλωνου DNA, όπως οι χρωστικές SYBR Green I, LC Green και LC Green Plus. Αυτές οι χρωστικές έχουν την ιδιότητα να δεσμεύονται στο δίκλωνο (υβριδισμένο) DNA και ενόσω το μόριο είναι δίκλωνο, φθορίζουν έντονα. Αντίθετα κατά την αποδιάταξη του DNA, αποβάλλονται ενώ ταυτόχρονα ο φθορισμός τους μειώνεται σημαντικά. Αυτή η μέθοδος

Χριστίνα Σχίζα 52

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR δεν απαιτεί ιχνηθέτες ή ακριβή οργανολογία γενικότερα, ενώ ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει για την απλότητά της, ιδιαίτερα στο στάδιο της βελτιστοποίησης των συνθηκών. Αυτοί είναι και οι βασικότεροι λόγοι για τους οποίους η χρήση φθορίζουσών χρωστικών όλο και αυξάνεται. Συγκεκριμένα, δεν απαιτείται PCR σε πραγματικό χρόνο ή για συγκεκριμένο αλληλόμορφο, ούτε εξειδικευμένοι ιχνηθέτες, αλλά μόνο δύο εκκινητές, ένας απλός θερμικός κυκλοποιητής PCR και ένα όργανο τήξης. Σήμερα, για την ανάκτηση των καμπυλών τήξης, χρησιμοποιούνται κυρίως αυτές οι χρωστικές.

Το μεγαλύτερο επίτευγμα της ανάλυσης καμπυλών τήξης είναι η δυνατότητα διαχωρισμού μεταξύ ομόζυγων και ετερόζυγων δειγμάτων, καθώς και η διαφοροποίηση μεταξύ ομάδας ομόζυγων δειγμάτων και ομάδας ετερόζυγων δειγμάτων (**Σχήμα 1.27**). Τα δείγματα που συμπεριλαμβάνονται στην κατηγορία των ετερόζυγων χαρακτηρίζονται από την παρουσία ετερόδιπλων δίκλωνων προϊόντων DNA που οφείλονται στην ενίσχυση δύο διαφορετικών αλληλίων κατά τη διάρκεια της PCR. Αντίθετα, τα δείγματα που συμπεριλαμβάνονται στην κατηγορία των ομόζυγων χαρακτηρίζονται από την παρουσία ομόδιπλων προϊόντων DNA που οφείλονται στην ενίσχυση δύο όμοιων αλληλίων κατά τη διάρκεια της PCR.



Σχήμα 1.27 Χαρακτηριστική καμπύλη HRM, όπου φαίνεται ο διαχωρισμός ομόζυγων και ετερόζυγων δειγμάτων, καθώς και η διάκριση φυσιολογικού και μεταλλαγμένου ομόζυγου δείγματος.⁹⁶

Τα ετερόζυγα δείγματα διακρίνονται από τα αντίστοιχα ομόζυγα λόγω της διαφορετικής μορφής της καμπύλης τήξης τους.⁹⁸ Τα ετερόζυγα δείγματα διακρίνονται μεταξύ τους όχι τόσο από την T_m , αλλά από τη μορφή των καμπυλών τήξης. Αντίθετα, τα ομόζυγα δείγματα διακρίνονται μεταξύ τους μόνο με βάση την T_m . Θα πρέπει να σημειωθεί πως η διάκριση μεταξύ ομόζυγων δειγμάτων είναι σχετικώς δύσκολη. Γι' αυτό πολλές φορές καταφεύγουμε στην ανάμειξη των ομόζυγων μεταλλαγμένων δειγμάτων με φυσιολογικό DNA, με σκοπό το σχηματισμό ετερόδιπλων και τη διευκόλυνση της ανίχνευσής τους.⁹⁵

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR
Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι, όσο μικρότερο σε μήκος είναι το προϊόν, τόσο καλύτερη και ακριβής είναι η διάκριση μεταξύ των δειγμάτων, ομόζυγων και ετερόζυγων.⁹³

Η εξέλιξη της τεχνολογίας του HRM και η ενσωμάτωσή της στην τεχνολογία της PCR σε πραγματικό χρόνο, καθώς και το γεγονός ότι δεν απαιτείται καποιος ιδιαίτερος χειρισμός του δείγματος μετά την PCR σε σύγκριση με τις άλλες τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων, έχει κάνει την ανάλυση των καμπυλών τήξης μέρος κάθε πρωτοκόλλου PCR. Εύκολα προστίθεται στο πρόγραμμα της PCR και ένα τελευταίο στάδιο για λήψη καμπυλών τήξης. Έτσι, άμεσα και γρήγορα γίνεται μία πρώτη εκτίμηση σχετικά με το αν ενισχύθηκε το επιθυμητό προϊόν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης της PCR, καθώς και η παρουσία παραπροϊόντων.⁹⁵

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ PIK3CA ΚΑΙ Η ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

2.1.1 Εισαγωγή

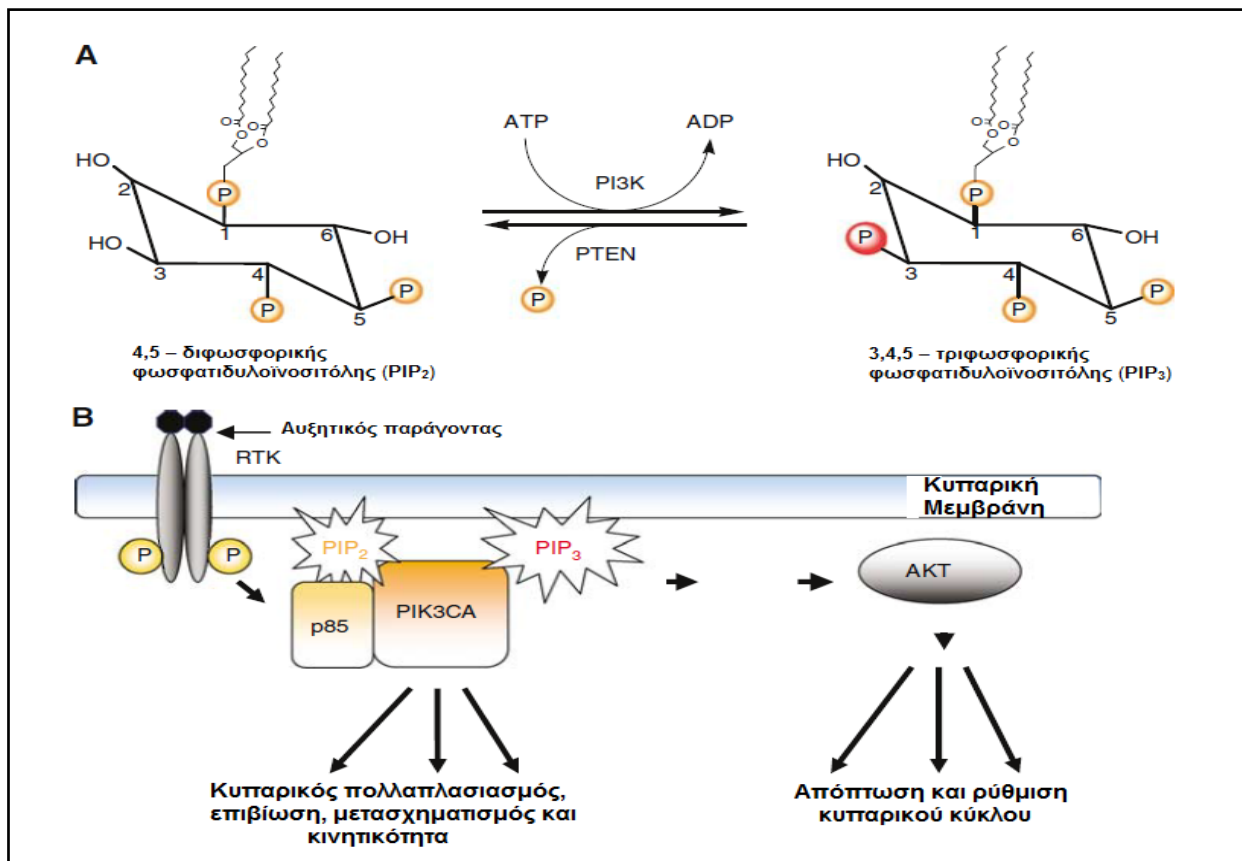
Ο καρκίνος είναι μια γενετική ασθένεια που οφείλεται σε τροποποιήσεις στον έλεγχο ή στη δραστηριότητα γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση και οδηγούν σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Αυτά τα γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο κατατάσσονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, που έχουν διαφορετική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών κυττάρων και κάποιες φορές η παρουσία μεταλλάξεων σε αυτά επηρεάζει σημαντικά την καρκινογένεση. Τα **ογκοκατασταλτικά γονίδια (tumor suppressor genes)** συνήθως καταστέλλουν την κυτταρική αύξηση και είναι απενεργοποιημένα στον καρκίνο. Αντίθετα τα **ογκογονίδια (oncogenes)**, όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες, που φυσιολογικά διεγείρουν την κυτταρική αύξηση είναι υπερενεργοποιημένα.² Στην κατηγορία των ογκογονιδίων που υπερενεργοποιούνται στον καρκίνο είναι και αυτό της **κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)**. Το μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει η PI3K έχει εμπλακεί στην καρκινογένεση και έχει αποδειχτεί ο καθοριστικός ρόλος της καταλυτικής υπομονάδας της PI3K, PIK3CA, σε διάφορους τύπους καρκίνου. Στη συνέχεια αναφέρονται κάποια βασικά χαρακτηριστικά της ομάδας των PI3K, το σηματοδοτικό μονοπάτι στο οποίο συμμετέχουν, καθώς και η απορρύθμιση αυτού στον καρκίνο.

2.1.2 Κινάση της 3-φωσφατιδύλοϊνοσιτόλης (PI3K)

Οι PI3K είναι ετεροδιμερείς λιπιδικές κινάσες, που συντίθενται από καταλυτικές και λειτουργικές υπομονάδες, κωδικοποιούμενες από διαφορετικά γονίδια και εναλλακτικό μάτισμα. Οι PI3K είναι σημαντικοί ρυθμιστές της κυτταρικής ανάπτυξης, του μετασχηματισμού, της απόπτωσης, της επιβίωσης και της κινητικότητας.^{99,100,101} Η οικογένεια των ενζύμων PI3K είναι οργανωμένη σε τρεις κύριες τάξεις (I, II και III) και ποικιλία υποομάδων, που κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την πρωτοταγή δομή τους, την εξειδίκευση υποστρώματος και τη ρυθμιστική τους ικανότητα.¹⁰²

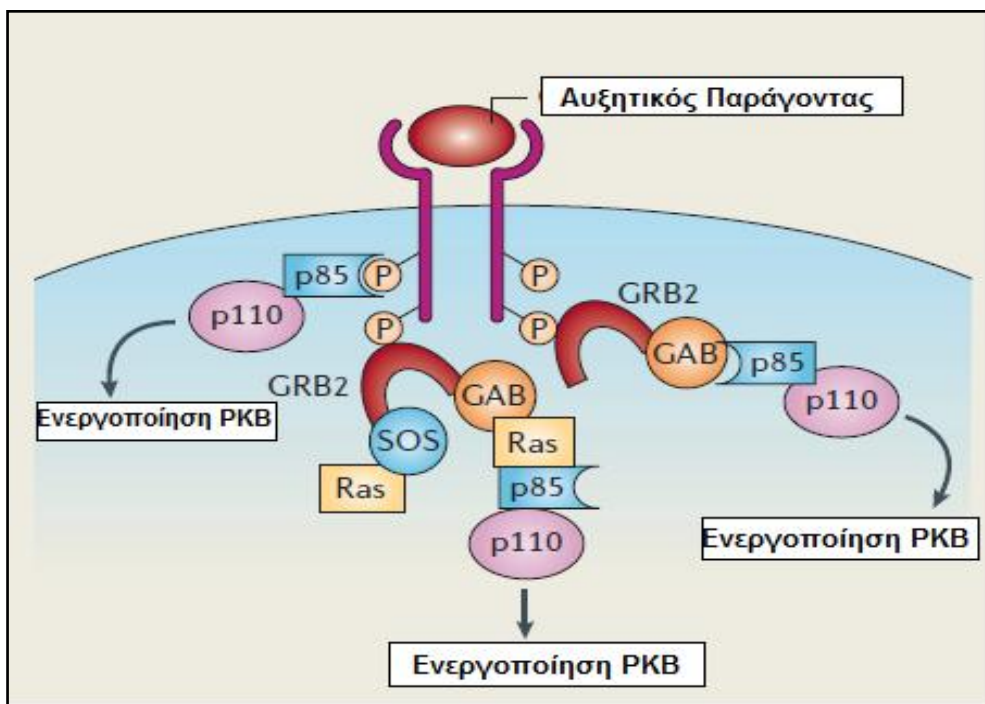
Στο πλαίσιο της ρύθμισης της κυτταρικής διαίρεσης και της καρκινογένεσης, οι πιο σημαντικές πρωτεΐνες της οικογένειας PI3K είναι αυτές που ανήκουν στην ομάδα IA, η καταλυτική υπομονάδα p110a και η ρυθμιστική υπομονάδα p85. Σε κύτταρα στη φάση ηρεμίας, η ρυθμιστική υπομονάδα p85 διατηρεί την p110a καταλυτική υπομονάδα σε κατάσταση μειωμένης δραστηριότητας. Υπό την επίδραση **αυξητικών παραγόντων**

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR (**growth factors**), η SH2 περιοχή (**Rous-sarcoma (src) oncogene homology-2 domain**) της υπομονάδας p85 συνδέεται με τη φωσφορυλιωμένη τυροσίνη στον **υποδοχέα τυροσινικής κινάσης (Receptor Tyrosine Kinase, RTK)**. Αυτή η σύνδεση καταστέλλει την παρεμπόδιση της p110a υπομονάδας και μεσολαβεί στην πρόσληψη της υπομονάδας στην κυτταρική μεμβράνη.¹⁰³ Η ενεργοποίηση της PI3K έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της **4,5 – διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIP₂)** σε **3,4,5 – τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP₃)** (Σχήμα 2.1A). Η ενεργοποίηση του PI3K από τον ενεργοποιημένο RTK, οδηγεί με την παραγωγή του PIP₃ σε πληθώρα καθοδικών μονοπατιών που ρυθμίζουν ένα σημαντικό αριθμό κυτταρικών λειτουργιών συμπεριλαμβανομένων και αυτών που εμπλέκονται στην δημιουργία και ανάπτυξη όγκων¹⁰⁴ (Σχήμα 2.1B).



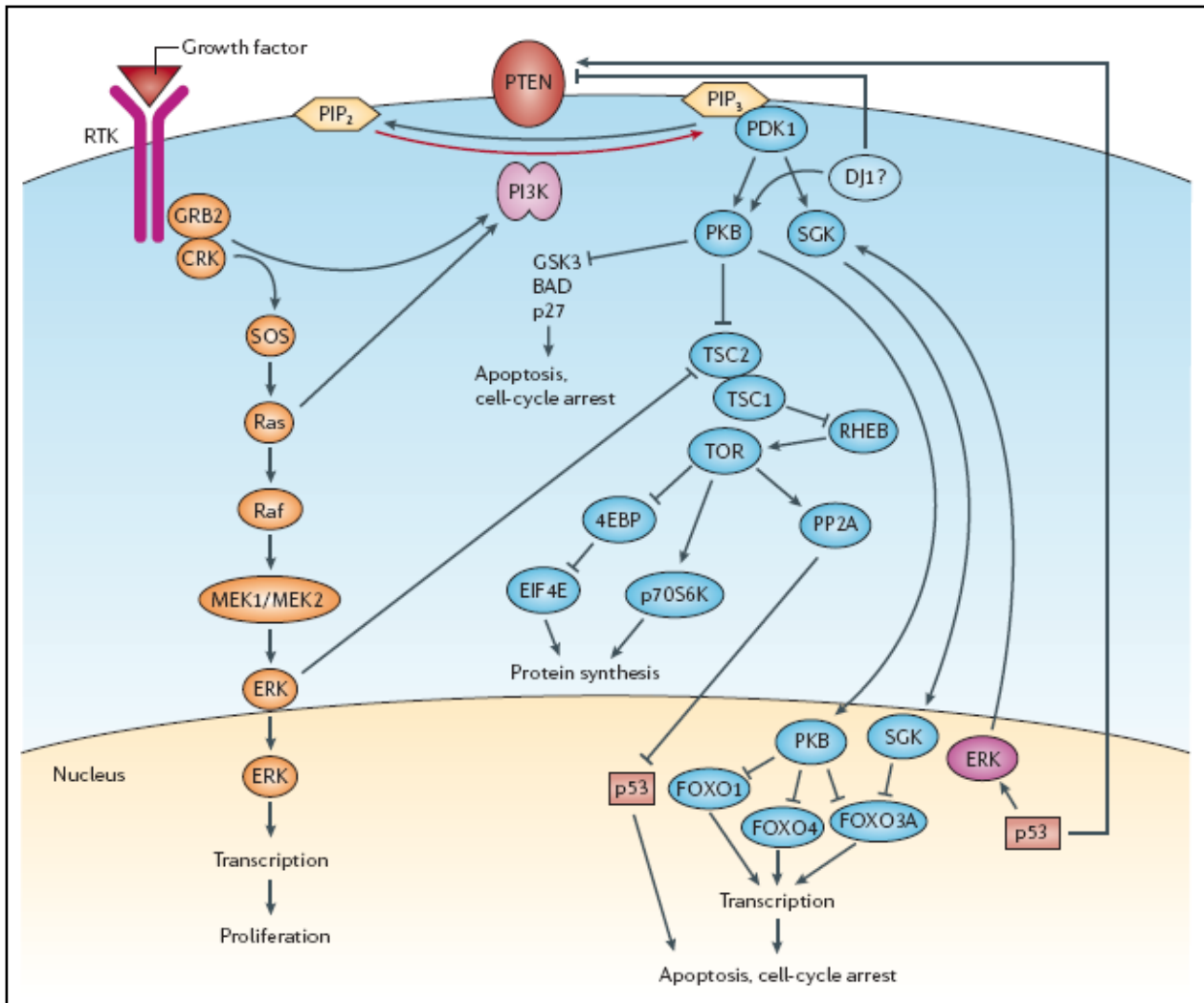
Σχήμα 2.1 A. Η αντίδραση που καταλύεται από την PI3K (PIP₂: 4,5-διφωσφορική, PIP₃: 3,4,5-τριφωσφορική, PI:φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη). B. Η PI3K ενεργοποιείται με τη δέσμευση στον υποδοχέα RTK, ο οποίος ενεργοποιεί τη λειτουργική υπομονάδα (p85) στο να δεσμεύσει την καταλυτική υπομονάδα p110a (PIK3CA). Αυτό καταλήγει σε μια ποικιλία καθοδικών αλυσιδωτών σημάτων, που οδηγούν στην κυτταρική επιβίωση, απόπτωση, μετασχηματισμό.¹⁰⁴

Η παραγωγή PIP_3 οδηγεί στην ενεργοποίηση πρωτεϊνών, όπως η **πρωτεϊνική κινάση Β (PKB/Akt)** και η **εξαρτώμενη από τη φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη κινάση 1 (phosphatidylinositol-dependent kinase 1, PDK-1)** (Σχήμα 2.2). Από τη στιγμή που ενεργοποιείται το σύμπλεγμα PKB/Akt, φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί πρωτεΐνες-στόχους που σχετίζονται με διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως: ο κυτταρικός κύκλος, η επιβίωση, ο μεταβολισμός, η πρωτεϊνοσύνθεση, η μεταγραφή και η κινητικότητα του κυττάρου.^{105,106} Το PIP_3 αποτελεί επίσης υπόστρωμα για την πρωτεΐνη **PTEN (ομολόγου της φωσφατάσης και τενσίνης, phosphatase and tensin homolog)**, η οποία αποφωσφορυλιώνει το PIP_3 προς PIP_2 και για το λόγο αυτό είναι αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού του PI3K και λειτουργεί σαν ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη.¹⁰⁷ Σε διάφορους τύπους καρκίνου, το *PTEN* είναι συνήθως μεταλλαγμένο ή υποεκφράζεται με αποτέλεσμα να οδηγεί σε συστηματική ενεργοποίηση του μονοπατιού του PI3K.^{108,109}



Σχήμα 2.2 Ενεργοποίηση PKB από το ενεργό σύμπλεγμα PI3K.¹¹⁰

Στη συνέχεια στο **Σχήμα 2.3** παρουσιάζεται συνοπτικά το μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει το PI3K. Τα πιο σημαντικά σημεία αυτού του περίπλοκου μονοπατιού είναι τα εξής:¹¹⁰



Σχήμα 2.3 Το μονοπάτι PI3K-PTEN. Συνοπτικά, ο πυρήνας του μονοπατιού του PI3K (με μπλε χρώμα) ξεκινάει με την ενεργοποίηση του PI3K από τον RTK. Η ενεργοποίηση του PI3K φωσφορυλιώνει και μετατρέπει το PIP₂ σε PIP₃, το οποίο στρατολογεί και ενεργοποιεί την PDK1. Η PDK1 στην συνέχεια φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την AKT(ή PKB, όπως παρουσιάζεται και στο διάγραμμα), η οποία αναστέλλει τις λειτουργίες των μεταγραφικών παραγόντων FOXO (οι οποίοι είναι μεσολαβητές της απόπτωσης και της εισόδου στον κυτταρικό κύκλο), οδηγώντας σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη της φωσφατάσης με ομολογία τενσίνης, PTEN, ρυθμίζει ανταγωνιστικά προς το PI3K αποφωσφορυλιώνοντας το PIP₃, μετατρέποντάς το πίσω σε PIP₂. Το μονοπάτι του Ras (πορτοκαλί χρώμα) μπορεί να διεγερθεί από μια ομάδα RTKs που ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες. Το Ras μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι του PI3K τόσο άμεσα όσο και έμμεσα. Η κατάσταση ενεργοποίησης της p53 μπορεί επίσης να επηρεάσει το τελικό αποτέλεσμα του μονοπατιού του PI3K αλληλεπιδρώντας με τον, ρυθμιζόμενο από το PKB, παράγοντα FOXO και με την εξωκυτταρικώς ρυθμιζόμενη κινάση 1 (ERK1) και ERK2. Επίσης, στο διάγραμμα αυτό παρουσιάζονται και άλλα μέλη που συμπεριλαμβάνονται στο μονοπάτι του PI3K.¹¹⁰

- Η πρωτεΐνη PTEN δρα ουσιαστικά ανταγωνιστικά ως προς την PI3K. Όταν το ένζυμο PTEN λειτουργεί κατάλληλα, ενεργεί ως τμήμα ενός χημικού μονοπατιού

που στέλνει σήματα παύσης του κυτταρικού κύκλου και υποβάλλει τα κύτταρα σε απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) όταν αυτό χρειάζεται.

- Το ένζυμο PI3K ενεργοποιείται από μια ποικιλία μηχανισμών (όπως από το μονοπάτι του RAS, της P53, είτε ρυθμιστές όπως το DJ1). Αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί στη δημιουργία ενός δευτέρου αγγελιοφόρου, της PIP₃. Η PIP₃ στη συνέχεια στρατολογεί την PDK1 και την AKT, ή διαφορετικά PKB, μια πρωτεΐνη κλειδί στην κυτταρική επιβίωση, και στη συνέχεια η PDK1 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την AKT. Η AKT αποτελείται από πολλές ισομορφές. Το τελικό αποτέλεσμα από την ενεργοποίηση όλων των ισομορφών της AKT είναι η αποφυγή της απόπτωσης και ο αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, γεγονότα που ευνοούν την ογκογένεση.
- Αρκετά άμεσα υποστρώματα της φωσφορυλίωσης του AKT έχουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Αυτά τα υποστρώματα συμπεριλαμβάνουν τον αναστολέα του κυτταρικού κύκλου **p27**, τον παράγοντα **FOXO (forkhead box transcription factor)**, την κινάση της σύνθεσης του γλυκογόνου **GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3)**, την κινάση **SGK1 (serum- and glucocorticoid-induced kinase 1)** και το σύμπλεγμα του **TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2)**.

2.1.3 Απορρύθμιση του μονοπατιού PI3K και καρκίνος

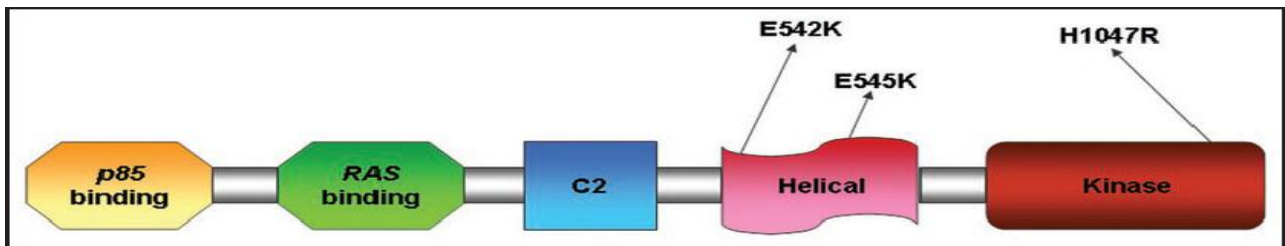
Η απορρύθμιση του μονοπατιού του PI3K έχει εμπλακεί άμεσα σε διάφορα είδη καρκίνων. Οι πιο γνωστές γενετικές αλλαγές του μονοπατιού αυτού είναι η απώλεια της δράσης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *PTEN* και οι σημειακές μεταλλάξεις στο *PI3K*. Με τη χρήση αυτοματοποιημένων τεχνολογιών προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA, αποδείχθηκε ότι τα γονίδια της οικογένειας PI3K είναι όντως μεταλλαγμένα στον καρκίνο. Στις μελέτες αυτές έγινε ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων που σχετίζονται ειδικά με την καρκινογένεση σε διάφορα γονίδια τυροσινικών φωσφατασών, καθώς και τυροσινικών κινασών, όπως το γονίδιο *PIK3CA*.¹¹¹

Το *PIK3CA* είναι ένα γονίδιο μήκους 34kb που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3q26.3 και αποτελείται από 20 εξόνια, τα οποία κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη μεγέθους 124kDa. Η πρώτη αναφορά για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο *PIK3CA* σε καρκινικά δείγματα έγινε από την ερευνητική ομάδα του Samuels και των συνεργατών του.¹¹² Στη συγκεκριμένη μελέτη αναλύθηκε η αλληλουχία οκτώ γονιδίων της οικογένειας των PI3K και ανακαλύφθηκε ότι το *PIK3CA* ήταν το μόνο της οικογένειας που έφερε σωματικές μεταλλάξεις.

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR

Οι μεταλλάξεις στο *PIK3CA* είναι σωματικές, καρκινοειδικές και ετερόζυγες και μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με την περιοχή του γονιδίου στο οποίο βρίσκονται: η περιοχή σύνδεσης ABD (**adaptor-binding domain**), η περιοχή C2, η περιοχή της έλικας (**helical domain**) και η περιοχή με την καταλυτική δράση (**catalytic domain**).

Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων (“hotspot” mutations) βρίσκεται σε τρία σημεία κατά μήκος του γονιδίου: στο εξόνιο 9, στην περιοχή της έλικας, στις θέσεις E542 και E545 και στο εξόνιο 20, στην περιοχή με δράση κινάσης, στη θέση H1047.¹¹¹ (Σχήμα 2.4)



Σχήμα 2.4 Περιγραφή του *PI3CA* και των λειτουργικών περιοχών του με τις πιο συχνά εμφανιζόμενες μεταλλάξεις.¹¹¹

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *PIK3CA* ΣΕ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

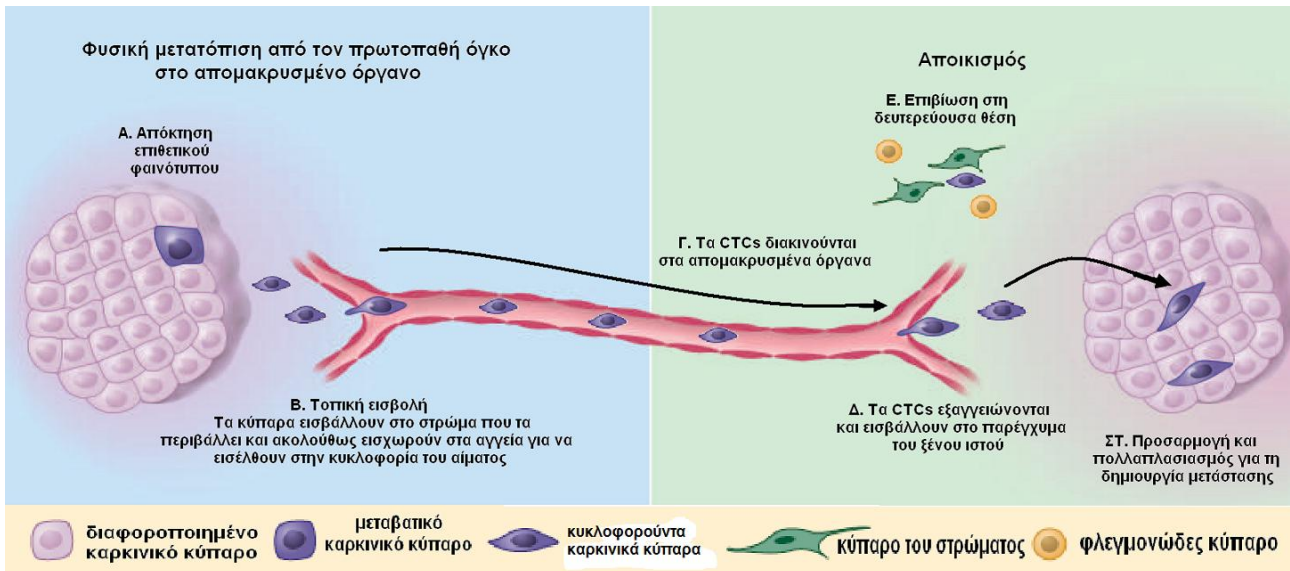
3.1.1 Εισαγωγή

Η μετάσταση είναι υπεύθυνη για το 90% περίπου της θνησιμότητας που συνδέεται με τον καρκίνο, αλλά παρ' όλα αυτά παραμένει ένα στοιχείο της παθογένεσης του καρκίνου που δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Κατά την εξέλιξη της μετάστασης, ένα καρκινικό κύτταρο από τον πρωτοπαθή όγκο εκτελεί τα παρακάτω βήματα:

- Εισβάλλει τοπικά στον περιβάλλοντα ιστό
- Εισέρχεται στο μικροαγγειακό σύστημα της λέμφου αλλά και στο κυκλοφορικό
- Επιβιώνει και μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας σε μακρινούς ιστούς
- Εξέρχεται από τα αγγεία
- Επιβιώνει στο μικροπεριβάλλον του νέου απομακρυσμένου ιστού, και τέλος
- Προσαρμόζεται στο «ξένο» μικροπεριβάλλον έτσι ώστε να διευκολύνεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός που θα οδηγήσει στο σχηματισμό του δευτεροπαθούς όγκου (**δημιουργία αποικίας, *colonization***).¹¹³

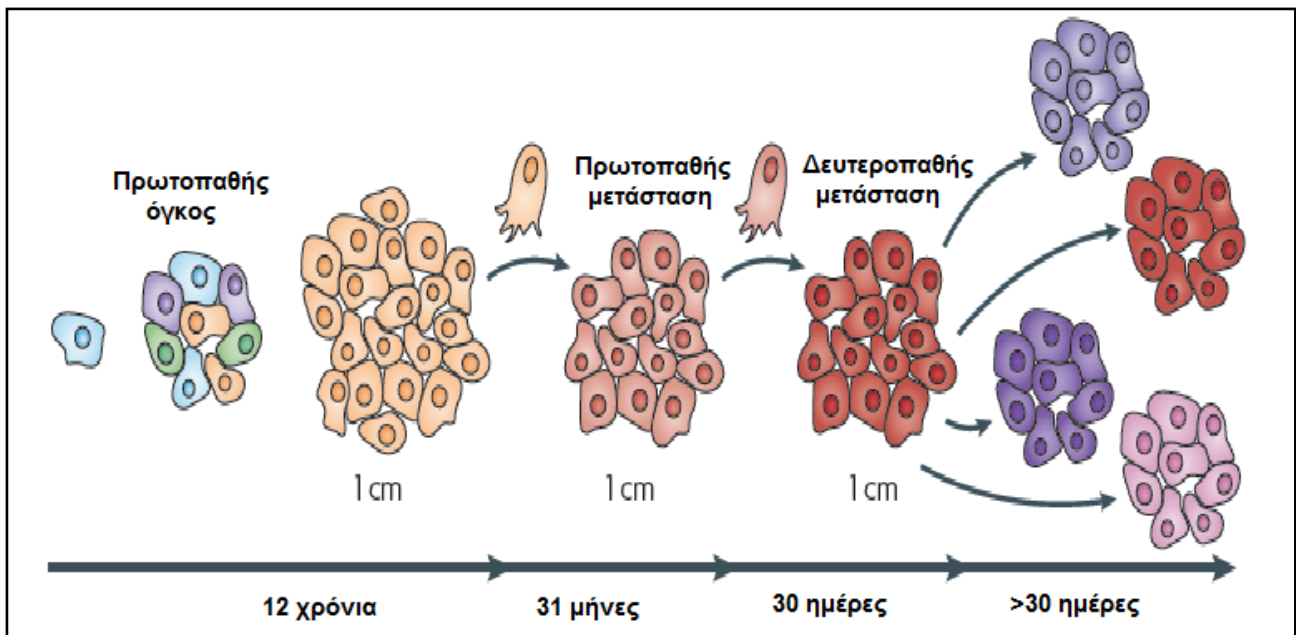
Αυτός ο περίπλοκος μεταστατικός καταρράκτης μπορεί να οργανωθεί σε δύο επιμέρους φάσεις: α. στη μεταφορά καρκινικών κυττάρων από το σημείο όπου υπάρχει ο πρωτοπαθής όγκος στο μικροπεριβάλλον του απομακρυσμένου ιστού και β. στη δημιουργία αποικίας.¹¹⁴ (**Σχήμα 3.1**)

Ο τρόπος με τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα εγκαταλείπουν τον πρωτοπαθή όγκο έχει γίνει στο μεγαλύτερο μέρος του κατανοητός, ενώ η δεύτερη φάση της δημιουργίας της αποικίας περιλαμβάνει περίπλοκες αλληλεπιδράσεις, που απαιτούν αρκετά ακόμα χρόνια ερευνητικής προσπάθειας, έτσι ώστε να γίνουν πλήρως κατανοητά. Η κατανόηση των μηχανισμών της πρώτης φάσης είναι σημαντική για την αποτροπή της μετάστασης σε ασθενείς που έχουν διαγνωσθεί με πρώιμο καρκίνο, ενώ η κατανόηση των μηχανισμών της δημιουργίας της αποικίας θα οδηγήσει στην ανακάλυψη στοχευμένων θεραπειών σε ασθενείς οι οποίοι έχουν ήδη εμφανίσει μετάσταση.



Σχήμα 3.1 Ο μεταστατικός καταρράκτης. Η μετάσταση μπορεί να απεικονισθεί σε μια διαδικασία που πραγματοποιείται σε δύο φάσεις: α. φυσική μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο σε ένα απομακρυσμένο όργανο και β. δημιουργία αποικίας των καρκινικών κυττάρων μέσα στο όργανο αυτό. Α. Τα καρκινικά κύτταρα εντός του όγκου αποκτούν έναν επιθετικό φαινότυπο. Β. Τα καρκινικά κύτταρα εισβάλλουν στο γειτονικό ιστό και προσπαθούν να προσεγγίσουν τα αγγεία μέσω των οποίων εισέρχονται στην κυκλοφορία. Γ. Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα ταξιδεύουν μέσω του κυκλοφορικού συστήματος ως κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) και εμφανίζουν την ικανότητα επιβίωσης χωρίς να είναι προσκολλημένα σε κάποιο ιστό (anchorage-independent) Δ. Όταν φτάσουν στο όργανο, εξέρχονται από την κυκλοφορία και εισβάλλουν στους ιστούς. Ε. Στο σημείο αυτό τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να διαφύγουν από την ανοσιακή απόκριση και να επιβιώσουν. ΣΤ. Για να αναπτυχθεί μία ενεργή μικρομετάσταση, τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον και να ξεκινήσει ο πολλαπλασιασμός τους.¹¹⁴

Η συστηματική εξέλιξη του καρκίνου και της μετάστασης βασίζονται σε δύο επιμέρους μοντέλα.¹¹⁵ Το γραμμικό μοντέλο εξέλιξης του καρκίνου (**linear progression model**) αναπτύχθηκε από τον Leslie Fould το 1954 με αφορμή την περιγραφή της σταδιακής εξέλιξης των μορφολογικών ανωμαλιών που συνοδεύουν τον καρκίνο. Η συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών αλλαγών συνδέθηκε τελικά με την εξέλιξη αυτής της διαδικασίας. Επιγραμματικά, το μοντέλο αυτό υποστηρίζει ότι τα καρκινικά κύτταρα που αποτελούν τον πρωτοπαθή όγκο, υποβάλλονται σε διαδοχικά στάδια γενετικών τροποποιήσεων και επιλογής των πιο ανθεκτικών εξ αυτών. Ύστερα από έναν σημαντικό αριθμό τέτοιων σταδίων τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα αυτόνομου πολλαπλασιασμού, σχηματίζοντας κλώνους καρκινικών κυττάρων από τους οποίους διαφεύγουν καρκινικά κύτταρα με στόχο τη δημιουργία μιας δεύτερης εστίας. Η τελική εξάπλωση των πλήρως κακοηθών κυττάρων καθορίζει και το μέγεθος του όγκου. (**Σχήμα 3.2**)

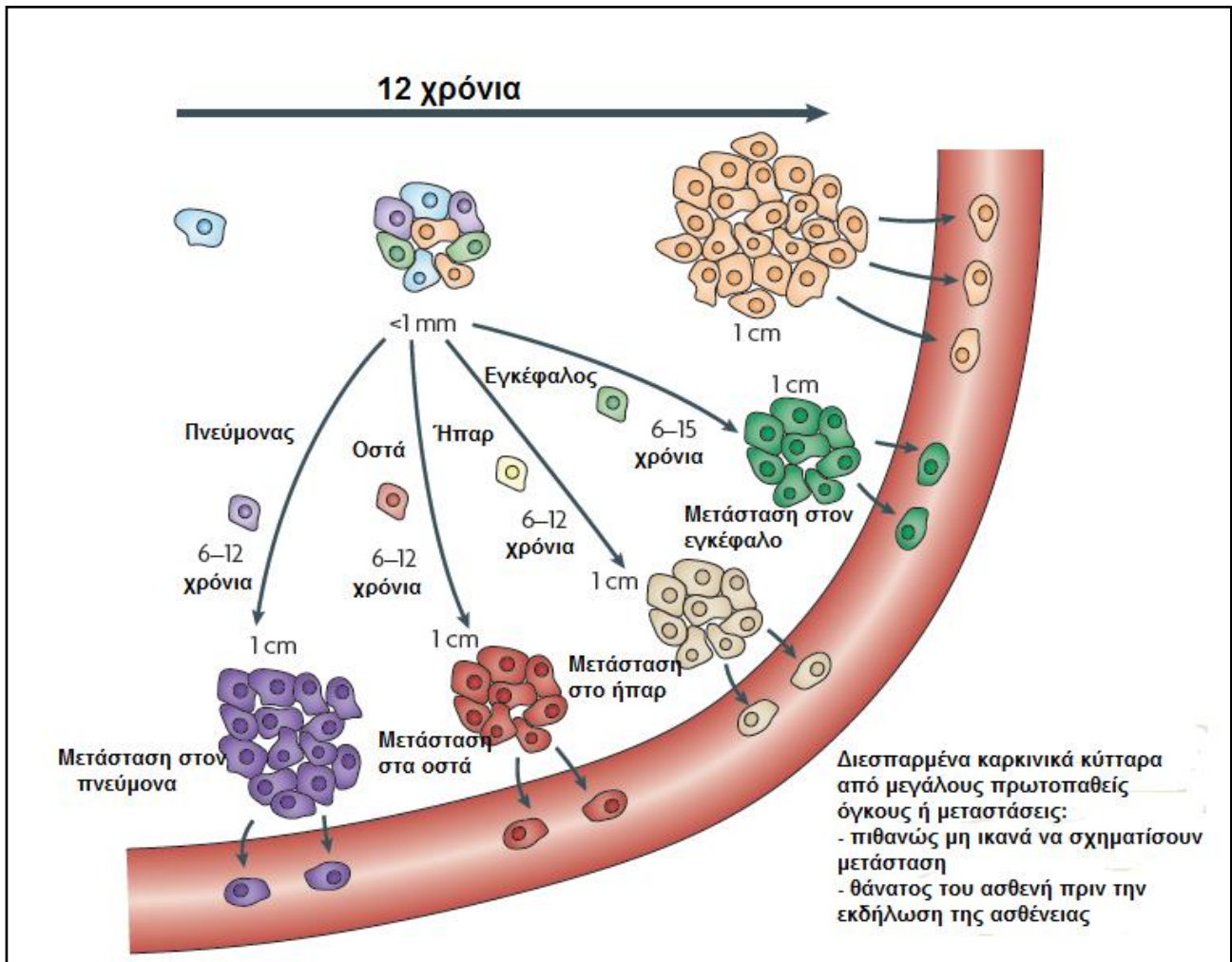


Σχήμα 3.2 Το γραμμικό μοντέλο εξέλιξης του καρκίνου. Κατά τη διάρκεια της τοπικής εξέλιξης του όγκου, επιλέγονται τα πιο επιθετικά καρκινικά κύτταρα και ξεκινά η διαδικασία της διαφυγής τους. Στους πρωτοπαθείς όγκους, καθώς και στις πρωτοπαθείς και δευτεροπαθείς μεταστάσεις, τα κύτταρα καθίστανται όλο και πιο κακοήθη, με αποκορύφωμα μια σειρά αλυσιδωτών μεταστάσεων που οδηγούν στο θάνατο.¹¹⁵

Ως εκ τούτου, το γραμμικό μοντέλο εξέλιξης αποτελείται από τρία βασικά σημεία-κλειδιά: πρώτον, τη διάδοση των πλήρως κακοηθών κυττάρων, τα οποία – σε δεύτερη φάση – προκύπτουν ως επί το πλείστον σε προχωρημένο στάδιο και, τρίτον επιτρέπουν τη δημιουργία μετάστασης από μία ήδη υπάρχουσα.

Το δεύτερο μοντέλο που επικρατεί είναι αυτό της παράλληλης εξέλιξης (**parallel progression model**), το οποίο χρονολογείται από τη δεκαετία του 1950 σε μια προσπάθεια ποσοτικοποίησης του ρυθμού ανάπτυξης των ανθρώπινων καρκίνων. Οι μελέτες αυτές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι, η διαδικασία δημιουργίας της μετάστασης ξεκινά πολύ πριν γίνουν εμφανή τα συμπτώματά της, ακόμα και πριν διαγνωσθεί ο πρωτοπαθής όγκος. Η παράλληλη εξέλιξη δε θέτει υπό αμφισβήτηση τους γενικούς μηχανισμούς ανάπτυξης του καρκίνου, όπως η κλωνικότητα και η συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών τροποποιήσεων. Ωστόσο, το μοντέλο αυτό δεν τοποθετεί κατ' ανάγκη την έναρξη σχηματισμού της μετάστασης μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού του πρωτοπαθούς όγκου. (Σχήμα 3.3) Επιπλέον, η διάδοση των καρκινικών κυττάρων, που βρίσκονται ακόμα σε εξέλιξη, μπορεί να οδηγήσει στην επιλογή και εξαπλώση κυττάρων που προσαρμόζονται στο συγκεκριμένο μικροπεριβάλλον. Ως εκ τούτου, λόγω της ανάγκης για επιλογή καθώς και της γενετικής αστάθειας των καρκινικών κυττάρων, η

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR παράλληλη εξέλιξη προβλέπει ότι υπάρχει μεγαλύτερη ανισότητα μεταξύ των κυττάρων που θα δημιουργήσουν τη μετάσταση με αυτά που αποτελούν τον πρωτοπαθή όγκο.



Σχήμα 3.3 Το μοντέλο της παράλληλης εξέλιξης. Η διαφυγή των καρκινικών κυττάρων ξεκινά όταν η διάμετρος του όγκου είναι 1-4 mm. Η μετάσταση σε διαφορετικά όργανα συμβαίνει παράλληλα και αναπτύσσεται σε διάστημα 6 ετών (χρόνος διπλασιασμού του καρκινικού όγκου δύο φορές πιο γρήγορος από αυτόν του πρωτοπαθούς όγκου) έως 12 ετών (χρόνος διπλασιασμού του πρωτοπαθούς όγκου ίδιος με αυτόν της μετάστασης). Τα καρκινικά κύτταρα που τρέφονται από τον πρωτοπαθή όγκο τη στιγμή της διάγνωσης ή οι διάφορες μεταστάσεις δε θα οδηγήσουν στο θάνατο και ίσως δεν καταφέρουν να αναπτυχθούν. Στο μοντέλο αυτό κύματα καρκινικών κυττάρων διαφεύγουν, πριν ακόμα διαγνωσθεί η πρωτοπαθής καρκινική εστία, με δυνατότητα παράλληλης εξέλιξης σε διαφορετικούς ιστούς με διαφορετικό ρυθμό σε κάθε περίπτωση.¹¹⁵

Τέλος, από το μοντέλο της παράλληλης εξέλιξης προκύπτουν τρεις πιθανές προβλέψεις: Η πρώτη αφορά την παράλληλη και ανεξάρτητη συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών τροποποιήσεων τόσο στον πρωτοπαθή όγκο, όσο και στη μετάσταση. Η δεύτερη προκύπτει από την παράλληλη και ανεξάρτητη προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων με άμεση συνέπεια τη δημιουργία μετάστασης, και η τρίτη αφορά την εξέλιξη των μεταστατικών κυττάρων που διαφεύγουν από την πρωτοπαθή εστία σε διαφορετικές Χριστίνα Σχίζα 64

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR χρονικές στιγμές. Επειδή, στην παράλληλη εξέλιξη, τα καρκινικά κύτταρα-ιδρυτές της μετάστασης έχουν ήδη διαφύγει στην κυκλοφορία πολύ πριν τη διάγνωση της νόσου, υπάρχει αρκετός χρόνος για πολλαπλά κύματα διάδοσης και συνεχούς εξάπλωσης των κυττάρων αυτών.

3.1.2 Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (Circulating Tumor Cells, CTCs) και μετάσταση

Στο αίμα των ασθενών με καρκίνο έχουν ανιχνευθεί και ταυτοποιηθεί κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, ένα μέρος των οποίων βρίσκεται στη φάση μεταφοράς από τον πρωτοπαθή όγκο προς πιθανά σημεία μετάστασης. Τα CTCs προσφέρουν την προοπτική της κατανόησης του τρόπου με τον οποίο τα κύτταρα επιβιώνουν όσο βρίσκονται στην κυκλοφορία. Είναι σημαντικό ότι η παρουσία των CTCs σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα μετάστασης καθώς και μειωμένο χρόνο υποτροπής. Μακροπρόθεσμα, από την κατανόηση της δράσης των CTCs μπορεί να προκύψουν χρήσιμοι διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες.¹¹⁶ Το αν αυτά τα κύτταρα αποκαλύψουν κάτι σημαντικό για τους μηχανισμούς της μετάστασης είναι υπό μελέτη. Η ανίχνευση μεγάλου αριθμού CTCs μπορεί να δείχνει την επιθετικότητα του καρκίνου αλλά ταυτόχρονα δρα σα συνδετικός κρίκος μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και της μετάστασης. Οι γνώσεις μας για τα CTCs και ο ρόλος τους στη δημιουργία της μετάστασης είναι ακόμα ελλιπείς λόγω των τεχνικών δυσκολιών που προκύπτουν εξαιτίας της ευαισθησίας της ανίχνευσης τόσο σπάνιων κυττάρων.

Τα CTCs έχουν διάμετρο (20-30μm) που δεν τους επιτρέπει να διέρχονται από τα τριχοειδή αγγεία, όπως αυτά του πνεύμονα.¹¹⁷ Άρα θα περίμενε κανείς πως μέσα σε λίγα λεπτά από την απελευθέρωσή τους από τον πρωτοπαθή όγκο στην κυκλοφορία, τα κύτταρα αυτά θα παγιδευόταν στα τριχοειδή αγγεία κατά την πρώτη διόδό τους από την καρδιά. Έτσι μόνο μικρά ή φυσικά εύπλαστα CTCs μπορούν να διαφύγουν της πνευμονικής μικροκυκλοφορίας και να συσσωρευτούν σε σταθερές συγκεντρώσεις στο αίμα. Ειδικό επιθηλιακό δείκτης στην επιφάνεια των κυττάρων αυτών χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανίχνευσή τους.^{118,119,120} Αυτό παρουσιάζει ένα πιθανό πρόβλημα, διότι υπάρχει η πιθανότητα τα κύτταρα του όγκου που έχουν ήδη διέλθει μερικώς ή πλήρως από το στάδιο της EMT, να μην μπορούν πια να ανιχνευθούν από τα ειδικά επιθηλιακά αντιγόνα στην επιφάνειά τους. Ο εμπλουτισμός και η ανίχνευση των CTCs μέσω απομάκρυνσης των κυττάρων του αιμοποιητικού (με χρήση αντισωμάτων ειδικών για το CD45) είναι ένας τρόπος αντιμετώπισης των παραπάνω δυσκολιών.¹¹⁹

Παρ' όλη την πολυπλοκότητα, η ικανότητα απομόνωσης των CTCs από την κυκλοφορία είναι ένα ισχυρό εργαλείο στη μελέτη της μετανάστευσης των **καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Cancer Stem Cells, CSCs)**. Επιπλέον, προσφέρουν την προοπτική της δημιουργίας μιας πολύ χρήσιμης και μη επεμβατικής διαγνωστικής παραμέτρου: παρακολουθώντας τις συγκεντρώσεις των CTCs σε ασθενείς με καρκίνο, θα είναι εφικτό να ελέγχεται ανά πάσα στιγμή η αποδοτικότητα της θεραπείας για μείωση του μεγέθους του όγκου από τον οποίο προέρχονται τα CTCs. Από τη στιγμή που θα φτάσουν στα τριχοειδή που περιβάλλουν το νέο ιστό, τα CTCs εξέρχονται και εισβάλλουν στο παρέγχυμα του ιστού, ή εναλλακτικά πολλαπλασιάζονται στο εσωτερικό των τριχοειδών και τελικά πραγματοποιείται ρήξη αυτών και διαφυγή των CTCs στον ιστό.^{121,122} Ήδη έχει εγκριθεί πρόσφατα από το FDA η εξέταση ανίχνευσης και προσδιορισμού του αριθμού των CTCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού, του προστάτη και του παχέος εντέρου.¹¹⁸

3.1.3 Μεταλλάξεις στα CTCs

Τα CTCs είναι κύτταρα που χαρακτηρίζονται από υψηλή ετερογένεια και ο μοριακός τους χαρακτηρισμός είναι σημαντικός, όχι μόνο για την επιβεβαίωση της προέλευσής τους, αλλά και για την παρακολούθηση των αλλαγών που συμβαίνουν κατά της εξέλιξη του όγκου, με σκοπό την ανακάλυψη διαγνωστικών ή θεραπευτικών στόχων. Ο περιορισμένος αριθμός αυτών των κυττάρων καθιστά την ανίχνευσή τους δύσκολη τεχνικώς και αναλυτικώς. Πρόσφατες τεχνικές εξελίξεις στην ανίχνευση και το χαρακτηρισμό των CTCs περιλαμβάνουν αντιδράσεις ποσοτικής PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR), μεθόδους που βασίζονται στην απεικόνιση καθώς και συσκευές η λειτουργία των οποίων βασίζεται σε μικροφίλτρα. Τα CTCs αποτελούν ένα νέο, πολλά υποσχόμενο διαγνωστικό πεδίο για παρακολούθηση της νόσου καθώς και της αποδοτικότητας της θεραπείας. Θα μπορούσε να πει κανείς πως η ανάλυσή τους θα παίξει το ρόλο της «υγρής βιοψίας». Η έρευνα τώρα έχει στραφεί στην ανίχνευση νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών βιοδεικτών που παράγονται από τα κύτταρα αυτά, έτσι ώστε να γίνει κατανοητή η βιολογία του καρκίνου και της μετάστασης.¹²³

Η τεχνολογία από την οποία προήλθε το μεγαλύτερο μέρος των κλινικών δεδομένων για τη συσχέτιση των CTCs με τον καρκίνο του μαστού είναι αυτή του CellSearch (Veridex, USA).¹²⁴ Βασίζεται στο συνδυασμό της ανοσοϊστοχημείας και του ανοσοφθορισμού, χρησιμοποιώντας ειδικούς δείκτες για τα CTCs, όπως οι κυτταροκερατίνες (CK-8, CK-18, CK-19). Η τεχνολογία αυτή έχει εγκριθεί από το FDA και είναι ένας αξιόπιστος τρόπος προσδιορισμού του αριθμού των CTCs σε ολικό αίμα.

Η εναλλακτική προσέγγιση για τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs περιλαμβάνει την εκτέλεση RT-qPCR, αφού προηγηθεί απομόνωση ολικού RNA, για τη μελέτη της έκφρασης κάποιων γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο και τη μετάσταση. Η μεθοδολογία αυτή παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και αντισταθμίζει έτσι τις δυσκολίες που προκύπτουν λόγω του μικρού αριθμού των κυττάρων αυτών στο αίμα. Αρχικά προσδιορίστηκε ο αριθμός των μεταγράφων της CK-19^{125,126}, και στη συνέχεια ακολούθησε ο έλεγχος της έκφρασης περισσότερων γονιδίων (*HER-2*, *Mammaglobin*) σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού.¹²⁷ Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα των μοριακών μεθόδων είναι η ευελιξία και η δυνατότητα εκτέλεσης πολλαπλής PCR για ταυτόχρονο έλεγχο έκφρασης περισσότερων γονιδίων, μειώνοντας το κόστος, τον χρόνο και την ποσότητα του δείγματος που απαιτείται. Η ανίχνευση ειδικών υποτύπων των CTCs, που βασίζεται στην έκφραση διαφορετικών γονιδίων μπορεί να προσφέρει πληροφορίες τόσο για τη βιολογία της μετάστασης, όσο και για την εξέλιξη της εξατομικευμένης θεραπείας.¹¹⁸

Μέχρι στιγμής ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs έχει περιοριστεί στο επίπεδο της μεταγραφής και του προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, αλλά μπορεί να αποτελέσει μία σημαντική μη επεμβατική στρατηγική ελέγχου της εξέλιξης του όγκου κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Έχει πραγματοποιηθεί μόνο μία επιτυχημένη προσπάθεια για ανίχνευση μεταλλάξεων σε επίπεδο DNA, από γενετικό υλικό που έχει απομονωθεί από CTCs.¹²⁸ Αυτό συμβαίνει διότι, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο αριθμός των CTCs στο ολικό αίμα είναι πολύ μικρός και ανάλογα χαμηλή είναι και η συγκέντρωση του DNA που λαμβάνεται μετά την απομόνωση. Άρα απαιτείται η ανάπτυξη μιας μεθόδου που θα χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, και θα είναι σε θέση να ανιχνεύσει πολύ μικρό αριθμό μεταλλαγμένων αλληλίων παρουσία πολλών φυσιολογικών. Αυτό είναι ένα πολύ δύσκολο εγχείρημα, αλλά η πραγματοποίησή του θα έχει σημαντικά αποτελέσματα στον πλήρη χαρακτηρισμό των CTCs καθώς και στην εξέλιξη της θεραπείας κατά του καρκίνου μέσω της ανακάλυψης νέων βιοδεικτών με προγνωστική και διαγνωστική σημασία.

Η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα ανέπτυξε αρχικά μία νέα συσκευή απομόνωσης των CTCs από περιφερικό αίμα. Πρόκειται για μια «πλατφόρμα ανίχνευσης CTCs», CTC-chip, η λειτουργία της οποίας βασίζεται στην παρουσία αντισωμάτων έναντι των επιθηλιακών κυττάρων. Με χρήση του CTC-chip υπάρχει πια η δυνατότητα απομόνωσης υψηλής καθαρότητας CTCs, ποσοτικοποίησης καθώς και ανάλυσής τους.¹²⁹ Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια ανίχνευσης μεταλλάξεων στο γονίδιο *EGFR* με εφαρμογή της μεθόδου **SARMS (Scorpion Amplification Refractory Mutation System)**, που βασίζεται στη

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR

χρήση ανιχνευτών «Σκορπιών», δηλαδή διλειπουργικών μορίων που περιέχουν έναν εκκινητή για αντίδραση PCR συνδεδεμένο με μία αλληλουχία ανιχνευτή, όπως περιγράφεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 1.3.3.1. Η μέθοδος εφαρμόστηκε αρχικά σε δείγματα ιστών FFPEs, όπου παρατηρήθηκε ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, 96% και 100% αντίστοιχα. Μετά τον έλεγχο της ορθότητας των αποτελεσμάτων της μεθόδου, αυτή εφαρμόστηκε σε δείγματα cfDNA καθώς και DNA από CTCs. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκεκριμένη μεθοδολογία, συνδυάζοντας το CTC-chip με την SARMS-PCR, χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και είναι κατάλληλη για ανίχνευση μεταλλάξεων σε σπάνιους κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως είναι τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, κάτι που δεν είναι εφικτό με τεχνικές που βασίζονται στο sequencing. Τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι η αναπτυχθείσα μεθοδολογία μπορεί να εφαρμοστεί για την ανίχνευση μεταλλάξεων και σε άλλα γονίδια που σχετίζονται τόσο με τον καρκίνο, όσο και με την αποτελεσματικότητα της θεραπείας.

3.2 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA*

3.2.1 Εισαγωγή

Σωματικές μεταλλάξεις του γονιδίου *PIK3CA* έχουν ανιχνευτεί με διάφορα είδη καρκίνου, και η παρουσία τους έχει συσχετιστεί με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία. Τρεις είναι οι πιο συχνές μεταλλάξεις του γονιδίου και βρίσκονται στο εξόνιο 9 (c.1624G>A(E542K), c.1633G>A(E545K)) και στο εξόνιο 20 (c. 3140A>G(H1047R)). Οι μεταλλάξεις αυτές καλύπτουν περίπου το 90% των μεταλλάξεων που έχουν καταγραφεί στη βάση δεδομένων COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer Database, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>). Η παρουσία αυτών των μεταλλάξεων σε δείγματα όγκων έχει προταθεί σε θετικός προγνωστικός δείκτης¹³⁰, καθώς και δείκτης πρόβλεψης ανταπόκρισης στη θεραπεία.¹³¹

Από τη στιγμή που οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις συσχετίστηκαν με την καρκινογένεση, έγιναν, και γίνονται ακόμα, προσπάθειες ανάπτυξης και εφαρμογής μεθόδων για την ανίχνευσή τους σε δείγματα ιστών **ακίνητοποιημένων σε block παραφίνης (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPEs)**, σε ελεύθερο DNA (cell free DNA, cfDNA) στο αίμα, καθώς και σε φρέσκους ιστούς που έχουν ληφθεί κατά τη χειρουργική επέμβαση ασθενών, που έχουν διαγνωστεί με κάποιο είδος καρκίνου. Οι τεχνικές δυσκολίες που προκύπτουν κατά την ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης μεταλλάξεων, οφείλονται κυρίως στον περιορισμένο αριθμό μεταλλαγμένων αλληλουχιών που λαμβάνονται κατά τη βιοψία. Επιπλέον, το DNA που απομονώνεται τελικά από αυτά τα κύτταρα είναι συνήθως χαμηλής

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR ποιότητας και κατακερματισμένο. Για το λόγο αυτό, έχει καταστεί αναγκαία η ανάπτυξη μεθόδων που χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, έτσι ώστε να ανιχνεύονται τα μεταλλαγμένα αλληλία που βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις και παρουσία περίσσειας φυσιολογικών αλληλίων στο δείγμα. Στη συνέχεια αναφέρονται οι μέθοδοι που έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των παραπάνω μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA*, όπως αυτές έχουν καταγραφεί στη βιβλιογραφία.

3.2.2 Σάρωση του γονιδίου *PIK3CA* για ανίχνευση μεταλλάξεων με DNA Sequencing.

Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA* ήταν το DNA Sequencing. Η αρχή στην οποία βασίζεται η τεχνολογία του Sequencing έχει αναλυθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο (1.3.2.1). Η μέθοδος του Sequencing χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την πλήρη αλληλούχηση του γονιδίου και στη συνέχεια για σάρωση όλης της αλληλουχίας και ταυτοποίηση όλων των πιθανών μεταλλάξεων, όχι μόνο αυτών που συναντάμε πιο συχνά, και η παρουσία τους έχει συνδεθεί με την καρκινογένεση. Με τη μέθοδο αυτή ελέγχθηκε μεγάλος αριθμός δειγμάτων ασθενών με διάφορους τύπους καρκίνου και έγινε συσχέτιση του είδους της μετάλλαξης με τον τύπο του καρκίνου. Βρέθηκε ότι το 40% των περιπτώσεων με καρκίνο του μαστού εμφάνισαν κάποια από τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA*.^{112,132,133}

Σε μελέτες ευαισθησίας που πραγματοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη μέθοδο έδειξαν πως τα όρια ευαισθησίας είναι περίπου 15-20% μεταλλαγμένης αλληλουχίας παρουσία γενωμικού DNA. Άρα, παρά το γεγονός ότι η μέθοδος του DNA Sequencing θεωρείται το «Χρυσό Πρότυπο» στην ανίχνευση μεταλλάξεων, δεν είναι κατάλληλη για ανίχνευση μεταλλάξεων σε δείγματα όπου τα μεταλλαγμένα αλληλία βρίσκονται σε πολύ χαμηλή αναλογία ως προς τα φυσιολογικά.

3.2.3 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA* με SSCP και DHPLC.¹³⁴

Σχεδόν παράλληλα με την εφαρμογή της μεθόδου του Sequencing, χρησιμοποιήθηκαν και οι μέθοδοι SSCP και DHPLC για την επίτευξη μεγαλύτερης ευαισθησίας στην ανάλυση μεταλλάξεων. Οι δύο αυτές μέθοδοι έχουν αναλυθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο (1.3.1.1, 1.3.6 αντιστοίχως). Έγινε σάρωση ολόκληρου του γονιδίου, και των 20 εξονίων, για ανίχνευση όλων των πιθανών δευτεροταγών δομών που οφείλονται σε διαφορετικές σημειακές μεταλλάξεις και πολυμορφισμούς. Η ανάλυση με SSCP χρησιμοποιήθηκε σε πρώτη φάση για ανίχνευση μεταλλάξεων σε μία σειρά δειγμάτων, επειδή συνδυάζει

Χριστίνα Σχίζα 69

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR ικανοποιητική ευαισθησία και δυνατότητα ανίχνευσης μεταλλάξεων παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων φυσιολογικών αλληλουχιών, κάτι που δεν ισχύει για τη μέθοδο του Sequencing.

Για επίτευξη ακόμα μεγαλύτερης ευαισθησίας, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος DHPLC για ανίχνευση των μεταλλάξεων των εξονίων 9 και 20. Με βάση την αρχή της DHPLC τα ετερόδιπλα μόρια DNA αποδιατάσσονται πρώτα και εκκλύονται νωρίτερα από τη στήλη σε σχέση με τα ομόδιπλα μόρια DNA. Τα αποτελέσματα της DHPLC επιβεβαίωσαν τα προηγούμενα αποτελέσματα της SSCP.

3.2.4 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA* με τη μέθοδο της ARMS-PCR σε συνδυασμό με ανιχνευτές «Σκορπιούς».^{72,135}

Στην προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδου υψηλής ευαισθησίας για ανίχνευση μεταλλάξεων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ARMS-PCR σε συνδυασμό με ανιχνευτές «Σκορπιούς». Η βασική αρχή της ARMS-PCR και της λειτουργίας των «Σκορπιών» αναφέρονται στο προηγούμενο κεφάλαιο, **1.3.3.3** και **1.3.3.1**, αντιστοίχως. Τόσο η ARMS-PCR, όσο και οι «Σκορπιοί» εξασφαλίζουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στις αναλύσεις που χρησιμοποιούνται.

Στη συγκεκριμένη εργασία^{72,135} πραγματοποιήθηκε πολλαπλή PCR για ταυτόχρονη ανίχνευση των δύο πιο συχνών μεταλλάξεων στα εξόνια 9 και 20. Κάθε αντίδραση γινόταν παρουσία των δύο αλληλοειδικών εκκινητών, ένας για κάθε μετάλλαξη, και δύο εκκινητών-ανιχνευτών «Σκορπιών». Για να περιοριστεί η πιθανότητα ψευδών αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε και ένας εκκινητής ελέγχου με τον αντίστοιχο εκκινητή-ανιχνευτή «Σκορπιό». Για να οριστεί η ειδικότητα των αντιδράσεων αυτών και να αποφευχθεί η λήψη μη ειδικών προϊόντων από τους αλληλοειδικούς εκκινητές, τέθηκε ένα **όριο λήψης απόφασης (cut-off)** με βάση τη διαφορά των κύκλων ενίσχυσης του προϊόντος-ελέγχου και του ειδικού προϊόντος της ARMS-PCR. Έτσι τέθηκε ένα όριο στο $\Delta C_t = C_{t\text{μεταλλαγμένου}} - C_{t\text{προϊόντος ελέγχου}}$, που για το εξόνιο 9 ήταν οι εννέα κύκλοι, ενώ για το εξόνιο 20 οι δώδεκα κύκλοι. Όποιο προϊόν ενισχυόταν σε μεγαλύτερο κύκλο δε γινόταν δεκτό ως ειδικό προϊόν της αντίδρασης.

Η μελέτη της ευαισθησίας της μεθόδου έδειξε ότι η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει 5 αντίγραφα μεταλλαγμένου DNA (0,1% του συνολικού DNA) για το εξόνιο 20 και 5 αντίγραφα μεταλλαγμένου DNA (1% του συνολικού DNA) για το εξόνιο 9.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα DNA από φρέσκους ιστούς⁷², αλλά και σε δείγματα ιστών FFPEs με τα αντίστοιχα δείγματα cfDNA.¹³⁵ Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών έδειξαν την παρουσία μεταλλάξεων τόσο στα δείγματα των ιστών, όσο και στο cfDNA. Αξίζει μάλιστα να σημειωθεί ότι ήταν η πρώτη φορά που ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις του *PIK3CA* σε cfDNA, καθώς και ότι υπήρχε 95% συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων για παρουσία μετάλλαξης στο *PIK3CA*, στο DNA των ιστών και του cfDNA. Η παρουσία μεταλλάξεων στο cfDNA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης.

Παρατηρούμε ότι με τη συγκεκριμένη μέθοδο η ευαισθησία και η ειδικότητα της ανάλυσης αυξήθηκαν σημαντικά. Το μόνο μειονέκτημά της είναι η αδυναμία ανίχνευσης όλων των πιθανών μεταλλάξεων στην αλληλουχία-στόχο, αφού κάθε φορά χρησιμοποιείται ειδικός εκκινητής για κάθε είδος μετάλλαξης.

3.2.5 Ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA* με ανάλυση καμπυλών τήξεως υψηλής διακριτικότητας (HRMA)^{136,1}

Η είσοδος της τεχνικής ανάλυσης καμπυλών τήξεως με υψηλή διακριτικότητα το 2003⁹³ συνοδεύτηκε από μία σειρά βελτιώσεων στην ανίχνευση μεταλλάξεων στο DNA. Πρόκειται για μια απλή, γρήγορη και χαμηλού κόστους τεχνική, χωρίς ανιχνευτές υβριδισμού. Χαρακτηρίζεται από υψηλή διαγνωστική ευαισθησία στην ανίχνευση και διάκριση μεταλλαγμένων και φυσιολογικών δειγμάτων, καθώς και ομόζυγων και ετερόζυγων.

Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής HRMA έγιναν εμφανή πολύ γρήγορα και η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε και χρησιμοποιείται για γρήγορη και αξιόπιστη ανίχνευση γνωστών και άγνωστων μεταλλάξεων σε πολλά γονίδια που έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο. Μεταξύ των γονιδίων αυτών είναι και το *PIK3CA*. Η πρώτη απόπειρα έγινε το 2008¹³⁶, όταν χρησιμοποιήθηκε η τεχνική αυτή για ταυτόχρονη ανίχνευση μεταλλάξεων σε τρία γονίδια που έχει βρεθεί ότι συνδέονται με την καρκινογένεση, το *PIK3CA*, το *KRAS* και το *BRAF*. Σχεδιάστηκαν εκκινητές για ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου για κάθε γονίδιο και μετά την ενίσχυση έγινε ανάκτηση καμπυλών τήξεως για διάκριση φυσιολογικών και ετερόζυγων ή ομόζυγων μεταλλαγμένων δειγμάτων. Η μέθοδος αυτή έχει την ικανότητα να ανιχνεύει οποιαδήποτε μετάλλαξη ή πολυμορφισμό κατά μήκος της αλληλουχίας-στόχου. Οποιαδήποτε διαφοροποίηση από τη φυσιολογική αλληλουχία θα γίνεται εμφανής από τη διαφορά στη μορφή της καμπύλης τήξεως καθώς και της T_m του κάθε προϊόντος.

Με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο η ευαισθησία της μεθόδου είναι αρκετά καλή, αφού μπορεί να ανιχνεύσει τουλάχιστον 5% μεταλλαγμένα αλληλία παρουσία περίσσειας φυσιολογικών και στα δύο εξόνια (9 και 20) του γονιδίου.¹³⁶

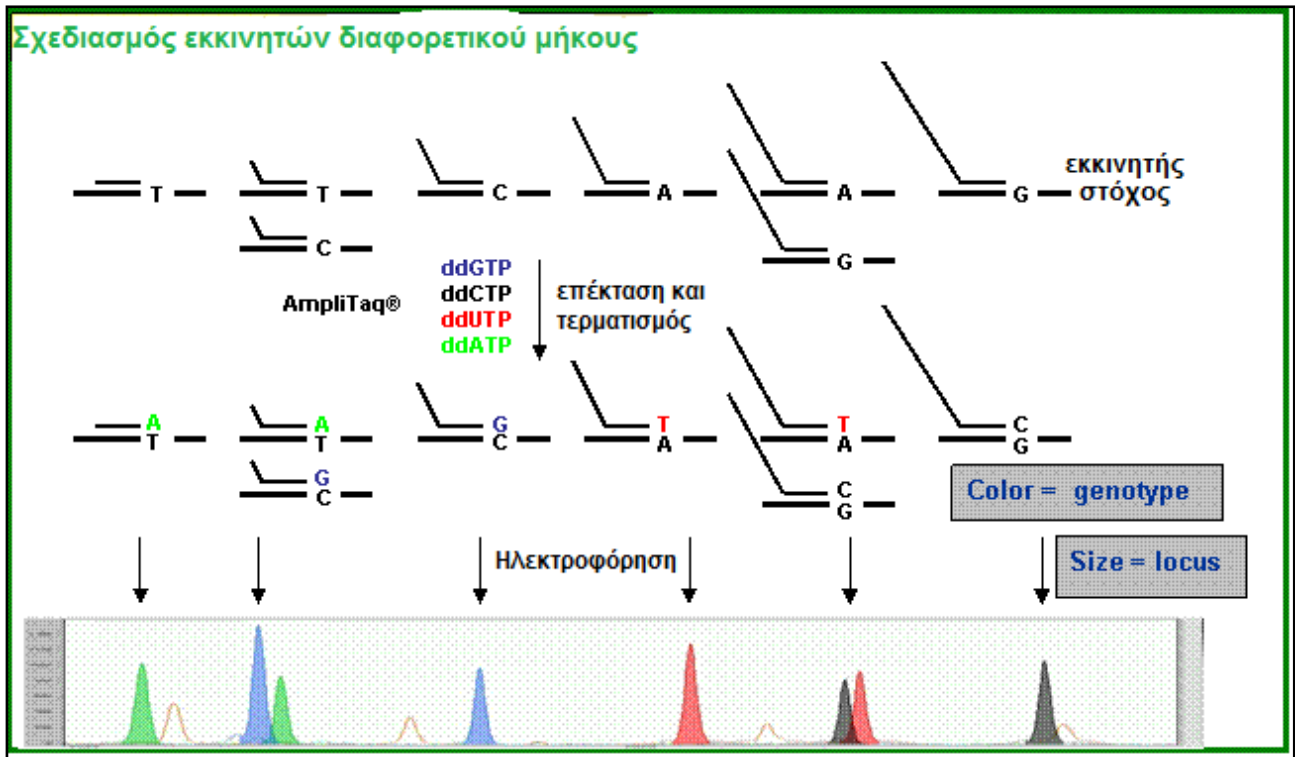
Η δεύτερη εργασία μελέτης των μεταλλάξεων του *PIK3CA* με ανάλυση καμπυλών τήξεως έγινε από ομάδα τη δική μας ερευνητική ομάδα και συγκεκριμένα στα πλαίσια της διατριβής Ειδίκευσης στην Κλινική Χημεία του Πάναγιώτη Βορκά.¹ Γνωρίζοντας τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης, αλλά και εκμεταλλευόμενοι το γεγονός ότι η ανάλυση καμπυλών τήξεως προϊόντων μικρού μεγέθους (<100bp) παρουσιάζει μεγαλύτερη αναλυτική ευαισθησία συγκριτικά με την ανάλυση καμπυλών τήξεως προϊόντων μεγάλου μήκους^{137,138}, επαναλάβαμε την ενίσχυση και ανάλυση καμπυλών τήξεως των αλληλουχιών-στόχων. Αυτή τη φορά σχεδιάσαμε εκκινητές που ενισχύουν μία μικρότερη αλληλουχία, 92bp για το εξόνιο 9 και 70bp για το εξόνιο 20. Και στις δύο αλληλουχίες η θέση της μετάλλαξης ήταν περίπου στο κέντρο του προϊόντος. Επιπλέον σχεδιάσαμε εκκινητές που ενισχύουν ολόκληρα τα εξόνια 9 και 20 με μήκος 261bp και 352bp, αντίστοιχα, έτσι ώστε να γίνει σύγκριση της ευαισθησίας της μεθόδου για ανάλυση καμπυλών μικρού και μεγάλου μήκους.

Πραγματικά, μετά από βελτιστοποιήσεις και μελέτη της ευαισθησίας ανίχνευσης των μεταλλάξεων στα δύο εξόνια, εξήχθη ως συμπέρασμα ότι: αναλύοντας τις καμπύλες τήξεως των μικρών προϊόντων, η ευαισθησία της μεθόδου κυμαινόταν στο 2% για το προϊόν 92bp του εξονίου 9 και στο 1% για το προϊόν 70bp για το εξόνιο 20. Αντίθετα, η ανάλυση των καμπυλών τήξεως των μεγαλύτερων προϊόντων παρουσίαζε μικρότερα ποσοστά ευαισθησίας, 5% για το προϊόν 261bp του εξονίου 9 και 10% για το προϊόν 352bp του εξονίου 20.

3.2.6 Ανάλυση μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA* με τη μέθοδο SNaPshot (Πολλαπλή PCR με ανιχνευτές SNaPshot)¹³⁹

Η μέθοδος SNaPshot συνδυάζει την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου με μία αντίδραση PCR και στη συνέχεια την επέκταση ενός ειδικού εκκινητή-ανιχνευτή κατά ένα νουκλεοτίδιο. Πιο αναλυτικά, η μέθοδος αυτή βασίζεται στην **επέκταση κατά μία βάση (single-base extension)**, δηλαδή κάθε ανιχνευτής SNaPshot υβριδοποιείται με τη συμπληρωματική του αλληλουχία. Η αλληλουχία του ανιχνευτή σταματά ακριβώς μία θέση πριν τη θέση της πιθανής μετάλλαξης. Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθενται ddNTPs, ιχνηθετημένα με διαφορετική χρωστική το καθένα, και το ένζυμο Taq πολυμεράση. Η

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR πολυμεράση καταλύει την επέκταση του ανιχνευτή κατά μία βάση, τοποθετώντας το συμπληρωματικό ddNTP στο 3' άκρο. Η ανίχνευση της κάθε χρωστικής δηλώνει ποιο ddNTP τοποθετείται σε κάθε θέση και ταυτοποιεί αν και τι είδους μετάλλαξη υπάρχει σε κάθε θέση. (Σχήμα 3.4)



Σχήμα 3.4 Περιγραφή αρχής μεθόδου της πολλαπλής PCR με ανιχνευτές SNaPshot.

Στη συγκεκριμένη εργασία, ενισχύθηκαν με ξεχωριστές αντιδράσεις PCR οι αλληλουχίες-στόχοι με όλες τις πιθανές μεταλλάξεις (c.1624G>A(E542K), c.1633G>A(E545K) για το εξόνιο 9 και c. 3140A>G(H1047R) για το εξόνιο 20). Τα προϊόντα των αντιδράσεων καθαρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε μείγμα όλων των παραπάνω καθαρών προϊόντων μαζί με τους ανιχνευτές-SNaPshot για κάθε αλληλουχία. Η παρουσία ή όχι της μετάλλαξης σε κάθε εξόνιο διαπιστώνεται από το χρώμα της κορυφής στο διάγραμμα που προκύπτει από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Η μελέτη της ευαισθησίας της μεθόδου SNaPshot έδειξε ότι η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει το μεταλλαγμένο DNA όταν αυτό βρίσκεται σε ποσοστό 5-10% του συνολικού DNA του δείγματος.

Η μέθοδος SNaPshot είναι μία μέθοδος με σχετικά καλή ειδικότητα και ευαισθησία για ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων και μπορεί να ανιχνεύσει ταυτόχρονα μέχρι δέκα διαφορετικές μεταλλάξεις, αλλά το υψηλό της κόστος και τα πολλά στάδια που απαιτούνται για τη λήψη του τελικού αποτελέσματος, δεν την καθιστούν και τόσο χρηστική, ούτε κατάλληλη για την εφαρμογή που μας ενδιαφέρει, λόγω μη-ικανοποιητικής ευαισθησίας.

3.3 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Στην παρούσα εργασία ο στόχος ήταν η επιλογή μιας μεθόδου ανίχνευσης μεταλλάξεων υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας, έτσι ώστε αυτή να εφαρμοστεί με επιτυχία σε δείγματα DNA που έχουν απομονωθεί από CTCs καθώς και σε cell free DNA. Απώτερος στόχος μας ήταν η ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA*, το οποίο όπως αναφέρθηκε έχει εμπλακεί γενικά στην καρκινογένεση και ιδιαιτέρως στον καρκίνο του μαστού. Ο έλεγχος για την παρουσία της μετάλλαξης σε δείγματα των παραπάνω κατηγοριών πραγματοποιήθηκε με ανάλυση καμπυλών τήξης HRMA, μιας μεθόδου που είχε ήδη αναπτυχθεί στο εργαστήριό μας και δημοσιεύτηκε σε διεθνές περιοδικό.¹ Η ανίχνευση μεταλλάξεων στα CTCs είναι μια νέα προσέγγιση, αφού οι περισσότερες ερευνητικές ομάδες ασχολούνται κυρίως με τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων στα CTCs και όχι με τη παρουσία μεταλλάξεων. Η πρόκληση της προσέγγισης αυτής έγκειται στο γεγονός ότι η ποσότητα του γενετικού υλικού που έχουμε στη διάθεσή μας μετά τη διαδικασία της απομόνωσης είναι πολύ μικρή και ακόμα μικρότερη είναι η συγκέντρωση των μεταλλαγμένων αλληλίων, τα οποία συνυπάρχουν με περίσσεια φυσιολογικών. Επιπρόσθετα, η ανίχνευση μεταλλάξεων σε cell free DNA θα είναι αρκετά χρήσιμη και σημαντική, αφού τα επίπεδά του είναι υψηλά σε άτομα που έχουν διαγνωσθεί με καρκίνο σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα.

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια ανάπτυξης και βελτιστοποίησης κάποιας νέας μεθοδολογίας υψηλής ευαισθησίας που θα μπορούσε να εφαρμοστεί μελλοντικά για ανίχνευση μεταλλάξεων στα ίδια δείγματα. Λαμβάνοντας υπ' όψιν όλες τις μεθοδολογίες που αναφέρονταν ήδη στη βιβλιογραφία για ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA* αλλά και γενικότερα σε γονίδια, καθώς και το δεδομένο ότι σκοπός μας είναι η εφαρμογή της νέας μεθοδολογίας σε δείγματα DNA από CTCs και cell free DNA, επιλέξαμε μία μέθοδο απλή στην εκτέλεση, χαμηλού κόστους, ταχεία, η οποία δεν απαιτεί επιπλέον αντιδραστήρια ή οργανολογία. Παρατηρώντας από τη βιβλιογραφία ότι η ARMS-PCR σε συνδυασμό με ανιχνευτές «Σκορπιούς» ήταν η πιο ευαίσθητη μέθοδος, αποφασίσαμε να κατευθυνθούμε προς αυτή την προσέγγιση. Θέλοντας να μειώσουμε το κόστος και την πολυπλοκότητα της μεθόδου, αποφασίσαμε να σχεδιάσουμε ένα πρωτόκολλο που θα βασίζεται στην αρχή της ARMS-PCR, χωρίς όμως τη χρήση ανιχνευτών υβριδισμού. Η ανίχνευση των προϊόντων έγινε με χρωστική LC Green Plus κατά την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου με PCR πραγματικού χρόνου. Στη συνέχεια, περιγράφεται αναλυτικά η αρχή μεθόδου και ο σχεδιασμός της ARMS-PCR.

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR

Ακολουθώντας, συνδυάσαμε την ARMS-PCR με εσωτερικό πρότυπο προϊόν με την ανάλυση καμπυλών τήξης (HRMA) για να ενισχύσουμε και να ταυτοποιήσουμε τα προϊόντα της αντίδρασης. Το κοινό προϊόν για μεταλλαγμένα και φυσιολογικά αλληλία έχει μεγαλύτερο μήκος και εμπεριέχει το αλληλοειδικό προϊόν που έχει μικρότερο μήκος. Οι θερμοκρασίες τήξης των δύο προϊόντων πρέπει να διαφέρουν έτσι ώστε οι κορυφές τους να μπορούν να διαχωρίζονται εύκολα στο καταγράφημα. Επειδή και με τις δύο αντιδράσεις που γίνονται παράλληλα ενισχύεται κοινή αλληλουχία ο αλληλοειδικός εκκινητής έχει τη δυνατότητα να στοχεύει και να υβριδοποιείται τόσο απευθείας στο γενωμικό DNA, όσο και στα προϊόντα που προκύπτουν από το μη ειδικό εκκινητή. Αντικαθιστώντας την ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης με την ανάλυση των καμπυλών τήξης μπορούμε σε λιγότερο χρόνο, χωρίς επιπλέον αντιδραστήρια και ειδική μεταχείριση των προϊόντων μετά το τέλος της PCR να ταυτοποιήσουμε τα προϊόντα με βάση την T_m τους. Είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι η υψηλής διακριτικότητας ανάλυση καμπυλών τήξης είναι εν γένει μια ευαίσθητη μέθοδος για ανίχνευση μεταλλάξεων (ευαισθησία της τάξεως του 1% έως 5%)^{1,96} και κατ' επέκταση εξασφαλίζει μεγαλύτερη ευαισθησία σε συνδυασμό με τη συγκεκριμένη μέθοδο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Πρότυπα υλικά

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μαστική καρκινική σειρά T47D (προσφορά του καθηγητή κ. Ε. Διαμαντή, Πανεπιστημίου του Τορόντο, Καναδάς), ως θετικός μάρτυρας, ετερόζυγος για τη μετάλλαξη στο εξόνιο 20 του γονιδίου *PIK3CA*. Επίσης χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά A17 ως αρνητικό δείγμα ελέγχου.

4.2 Κλινικά δείγματα

4.2.1 Δείγματα ελέγχου γενωμικού DNA

Ως δείγματα ελέγχου για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση των νέων μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ιστών ακινητοποιημένα σε block παραφίνης, τα οποία είχαν ήδη μελετηθεί σε προηγούμενη εργασία, όπου είχε επιβεβαιωθεί η παρουσία ή όχι της συγκεκριμένης μετάλλαξης στο εξόνιο 20 του *PIK3CA* με τις τεχνικές του HRMA και του DNA Sequencing.⁹⁶ Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα (δύο από καρκινικούς ιστούς και ένα από ινοαδένωμα) στα οποία είχε επιβεβαιωθεί η ύπαρξη της συγκεκριμένης μετάλλαξης και έξι δείγματα από φυσιολογικούς ιστούς, στα οποία δεν υπήρχε η μετάλλαξη.

4.2.2 Κλινικά δείγματα ιστών παραφίνης

Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκαν 31 δείγματα γενωμικού DNA από ιστούς παραφίνης που είχαν ληφθεί από ασθενείς με καρκίνο του μαστού από το νοσοκομείο «Έλενα Βενιζέλου», καθώς και από το Εργαστήριο Βιολογίας Καρκίνου της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Ο έλεγχος αυτών των δειγμάτων για την παρουσία ή όχι της μετάλλαξης στο γονίδιο *PIK3CA* πραγματοποιήθηκε με ανάλυση καμπυλών τήξης HRMA στα πλαίσια της μελέτης που διενεργείται από το εργαστήριό μας σε συνεργασία με το εργαστήριο του Πανεπιστημίου της Κρήτης, και αφορά στον έλεγχο της συσχέτισης του μονοπατιού *PIK3CA-PTEN* με την ανταπόκριση ασθενών με καρκίνο του μαστού στη θεραπευτική αγωγή με *Herceptin*. Στη μελέτη αυτή, η οποία θα αναλυθεί σε επόμενο κεφάλαιο, συμπεριλαμβάνονται 75 ακόμα δείγματα DNA από ιστούς παραφίνης, τα οποία είχαν αναλυθεί στα πλαίσια της Διατριβής Ειδίκευσης του Π. Βορκά.⁹⁶

4.2.3 Κλινικά δείγματα DNA από κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος (20 mL) που ελήφθησαν από 60 ασθενείς με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας (adjuvant), 34 δείγματα από ασθενείς με διαγνωσμένη μετάσταση και 24 δείγματα από υγιείς αιμοδότες. Τα δείγματα των ασθενών προήλθαν από τα νοσοκομεία «Ιασώ General» και «Έλενα Βενιζέλου», μετά την έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών, ενώ τα δείγματα περιφερικού αίματος των υγιών αιμοδοτών προήλθαν από το Περιφερικό Νοσοκομείο Πατησίων «Αγ. Ανάργυροι» και «Έλενα Βενιζέλου».

Από τα παραπάνω δείγματα πραγματοποιήθηκε ακολούθως απομόνωση mRNA από τα CTCs και σύνθεση cDNA το οποίο μελετήθηκε για 56 ασθενείς με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας (adjuvant), από 11 ασθενείς με διαγνωσμένη μετάσταση και από 20 υγιείς αιμοδότες στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της Αρετής Στρατή, στο Εργαστήριό μας.

4.2.4 Κλινικά δείγματα cell free DNA (cfDNA)

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκαν δείγματα cfDNA από περιφερικό αίμα από 25 ασθενείς με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας (adjuvant), 45 δείγματα από ασθενείς με διαγνωσμένη μετάσταση και 12 δείγματα από υγιείς αιμοδότες. Τα δείγματα των ασθενών προήλθαν επίσης από τα νοσοκομεία «Ιασώ General» και «Έλενα Βενιζέλου», ενώ τα δείγματα περιφερικού αίματος των υγιών αιμοδοτών προήλθαν από το Περιφερικό Νοσοκομείο Πατησίων «Αγ. Ανάργυροι» και «Έλενα Βενιζέλου».

4.3 Διαδικασία απομόνωσης DNA και σύνθεσης cDNA από τα κλινικά δείγματα

4.3.1 Κλινικά δείγματα ιστών παραφίνης

Η απομόνωση του γενωμικού DNA από τους ιστούς παραφίνης των ασθενών έγινε με το High Pure PCR Template Preparation (Roche Applied Science, Mannheim, Germany).

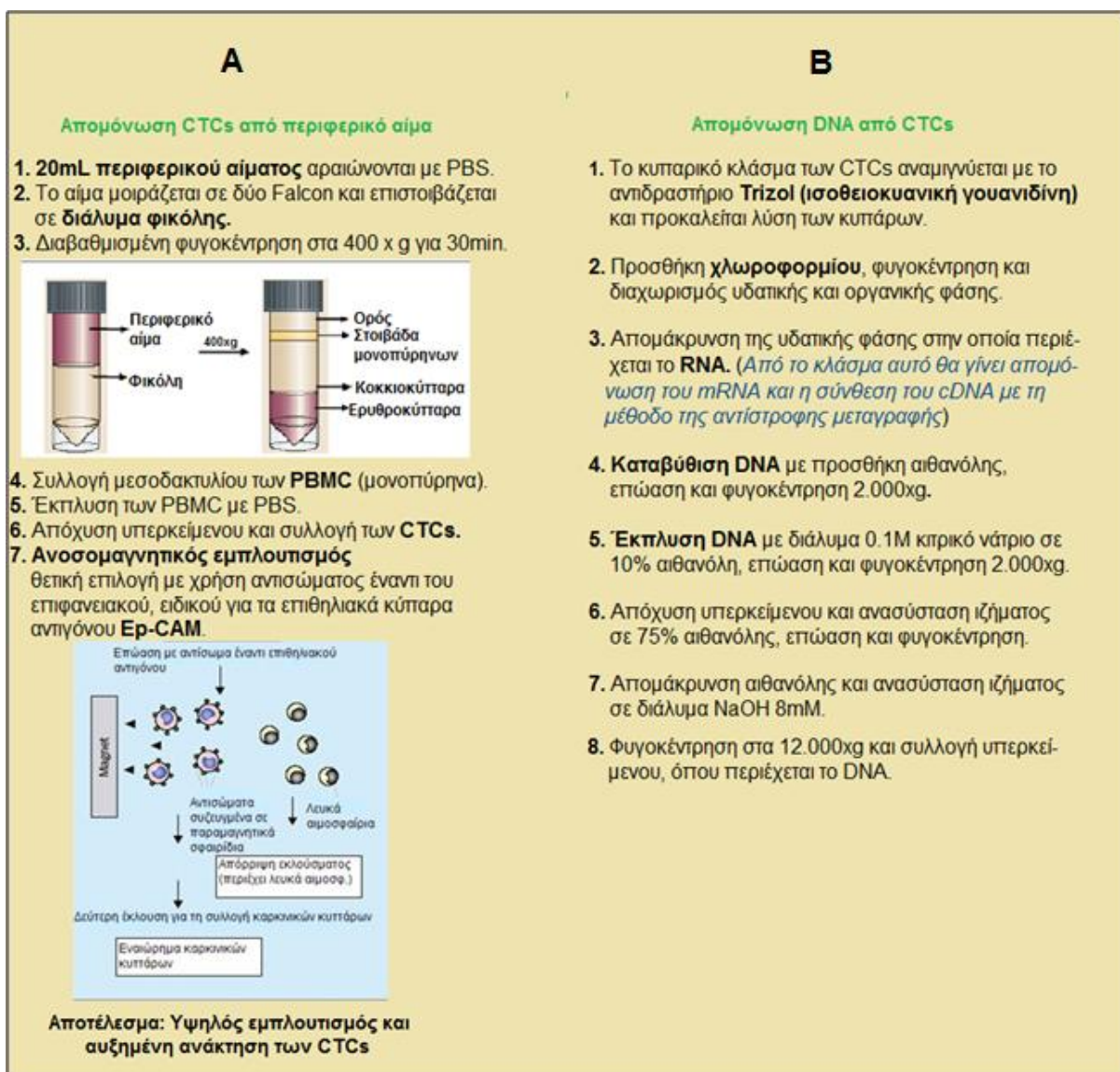
Η πειραματική πορεία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Σε ένα καθαρό σωληνάριο τύπου erpendorf των 1,5ml προσθήκη 25-50mg ιστού σε παραφίνη
2. Εμβάπτιση σε ξυλόλιο και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30min

3. Εμβάπτιση διαδοχικά σε αιθανόλη 100%, 80%, 60%, 40% και τελικά σε απεσταγμένο νερό
4. Προσθήκη 200μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης του ιστού
5. Προσθήκη 40μl ανασυσταμένης πρωτεϊνάσης K και ανάμιξη των περιεχομένων του σωληναρίου
6. Ολονύχτια επώαση του σωληναρίου σε υδατόλουτρο στους 37°C
7. Προσθήκη 20μl διαλύματος ανασυσταμένης πρωτεϊνάσης K
8. Επώαση του σωληναρίου για 1h στους 55°C, όπου πραγματοποιείται η λύση του ιστού
9. Προσθήκη 200μl ρυθμιστικού διαλύματος σύνδεσης και καλή ανάμιξη
10. Επώαση του σωληναρίου για 10min στους 72°C
11. Προσθήκη 100μl ισοπροπανόλης και ανάμιξη
12. Μεταφορά του περιεχομένου του σωληναρίου σε μικροστήλη συνδεδεμένη με σωληνάριο συλλογής
13. Φυγοκέντρηση στα 8000g για 1min και απόρριψη του σωληναρίου συλλογής με το διήθημα
14. Σύνδεση της μικροστήλης με νέο σωληνάριο συλλογής και προσθήκη 500μl ρυθμιστικού διαλύματος απομάκρυνσης αναστολέων
15. Φυγοκέντρηση στα 8000g για 1min και απόρριψη του σωληναρίου συλλογής με το διήθημα
16. Σύνδεση της μικροστήλης με νέο σωληνάριο συλλογής και προσθήκη 500μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης
17. Φυγοκέντρηση στα 8000g για 1min και απόρριψη του σωληναρίου συλλογής με το διήθημα
18. Προσθήκη εκ νέου 500μl διαλύματος έκπλυσης στη μικροστήλη
19. Φυγοκέντρηση στα 8000g για 1min
20. Νέα φυγοκέντρηση στα 13000g για 10s και απόρριψη του σωληναρίου συλλογής με το διήθημα
21. Τοποθέτηση της μικροστήλης σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf των 1,5ml
22. Προσθήκη 200μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης στη μικροστήλη, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 70°C
23. Φυγοκέντρηση στα 8000g για 1min, οπότε στο σωληνάριο συλλέγεται το DNA

4.3.2 Απομόνωση DNA από κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα

Η απομόνωση, αρχικά, των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων CTCs από το περιφερικό αίμα των ασθενών και των υγιών αιμοδοτών, και στη συνέχεια του γενωμικού DNA από τα κύτταρα αυτά, πραγματοποιήθηκε από τη Δρ. Αρετή Στρατή στα πλαίσια της Διδακτορικής της Διατριβής στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας. Στα πλαίσια της ίδιας διατριβής πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των αντίστοιχων cDNA μέσω της αντίστροφης μεταγραφής, μετά από την απομόνωση του κλάσματος του mRNA από τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα. Στο **Σχήμα 4.1** παρουσιάζεται συνοπτικά η διαδικασία της απομόνωσης των CTCs από το περιφερικό αίμα και στη συνέχεια η απομόνωση γενωμικού DNA.



Σχήμα 4.1 A: Πειραματική πορεία απομόνωσης των CTCs με τη μέθοδο της φικόλης και της θετικής επιλογής μέσω αντισώματος έναντι του Ep-CAM. **B:** Πειραματική διαδικασία απομόνωσης γενωμικού DNA από CTCs με χρήση Trizol.

4.3.3 Απομόνωση cell free DNA από δείγματα περιφερικού αίματος

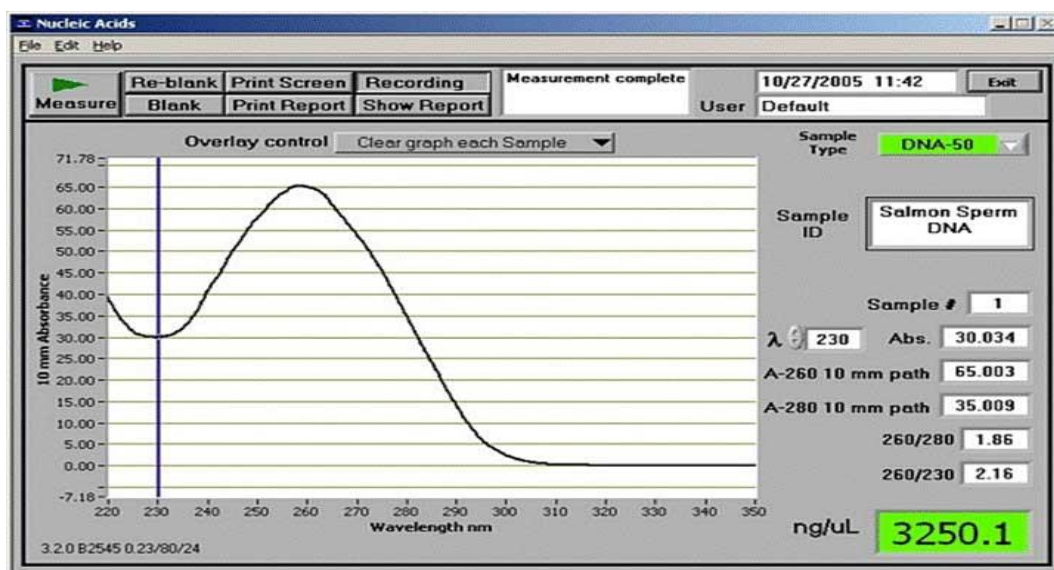
Η απομόνωση του cell free DNA από περιφερικού αίματος ασθενών και υγιών αιμοδοτών πραγματοποιήθηκε από την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Χειμωνίδου στα πλαίσια της εκπόνησης της Διδακτορικής της Διατριβής στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας. Παρακάτω παρουσιάζεται συνοπτικά η πειραματική διαδικασία απομόνωσης cfDNA περιφερικού αίματος.

1. 200μL ορού αναμιγνύονται με διάλυμα εργασίας και Πρωτεΐνωση Κ.
2. Επώαση στους 72°C για 10min.
3. Προσθήκη 100μL ρυθμιστικού διαλύματος σύνδεσης και πολύ καλή ανάμιξη.
4. Μεταφορά του μίγματος σε μικροστήλες και φυγοκέντρηση στα 8.000xg για 1min.
5. Απόρριψη διηθήματος και σύνδεσης στήλης με νέο σωληνάριο συλλογής.
6. Προσθήκη 500μL ρυθμιστικού διαλύματος απομάκρυνσης αναστολέων και φυγοκέντρηση στα 8.000xg για 1min.
7. Απόρριψη διηθήματος, προσθήκη 450μL ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης και φυγοκέντρηση στα 8.000xg για 1min.
8. Επανάληψη έκπλυσης και προσθήκη 50μL ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης.
9. Φυγοκέντρηση στα 8.000xg για 1min και παραλαβή cell free DNA.

4.4 Φωτομετρικός προσδιορισμός του DNA και έλεγχος καθαρότητας

Το Nanodrop-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA) είναι ένα φασματοφωτόμετρο (220-750nm) που απαιτεί 1μL δείγματος για να μετρήσει με υψηλή ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα. Έτσι καταργείται η χρήση των κυψελίδων, επιτρέποντας γρήγορο καθαρισμό του οργάνου από δείγμα σε δείγμα. Επίσης έχει την ικανότητα να μετράει υψηλές συγκεντρώσεις δειγμάτων, χωρίς να χρειάζεται αραιώση (50X μεγαλύτερη συγκέντρωση από ότι ένα κλασικό φασματοφωτόμετρο). Το δείγμα συγκρατείται στη θέση μέτρησης μεταξύ των άκρων δύο οπτικών ινών μέσω επιφανειακής τάσης, αντικαθιστώντας τη χρήση κυψελίδων και επιτρέποντας το γρήγορο καθαρισμό του οργάνου από δείγμα σε δείγμα, ενώ η μέτρηση διαρκεί 10 s με το δείγμα να μπορεί να επανακτηθεί. Ο λόγος των απορροφήσεων που λαμβάνονται στα 260nm και στα 280nm (A_{260}/A_{280}) παρέχει μία εκτίμηση της καθαρότητας του DNA. Το δείγμα γίνεται αποδεκτό ως «καθαρό» όταν έχει αναλογία ~1,8. Αν η αναλογία είναι μικρότερη σε κάθε περίπτωση, μπορεί να υποδεικνύει την παρουσία πρωτεϊνών, φαινολών ή άλλων ουσιών που

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR απορροφούν ισχυρά στα 280nm. Ένα χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης του DNA φαίνεται στην **Εικόνα 4.1**.



Εικόνα 4.1. Τυπικό καταγράφημα φάσματος απορρόφησης DNA στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop

4.4.1 Πειραματική πορεία

Τοποθετείται 1,0 μL δείγματος στην κατάλληλη θέση (**Εικόνα 4.2α**) το οποίο λόγω επιφανειακής τάσης παραμένει εκεί (**Εικόνα 4.2.β**). Ακολούθως γίνεται μέτρηση της απορρόφησης και ποσοτικοποίηση του δείγματος (**Εικόνα 4.1**). Στη συνέχεια η θέση καθαρίζεται με H_2O (**Εικόνα 4.2.γ**) και το όργανο είναι έτοιμο για επόμενη μέτρηση.

α)

β)

γ)



απορρόφηση, γ)

Καθαρισμός της θέσης μετά τη μέτρηση.

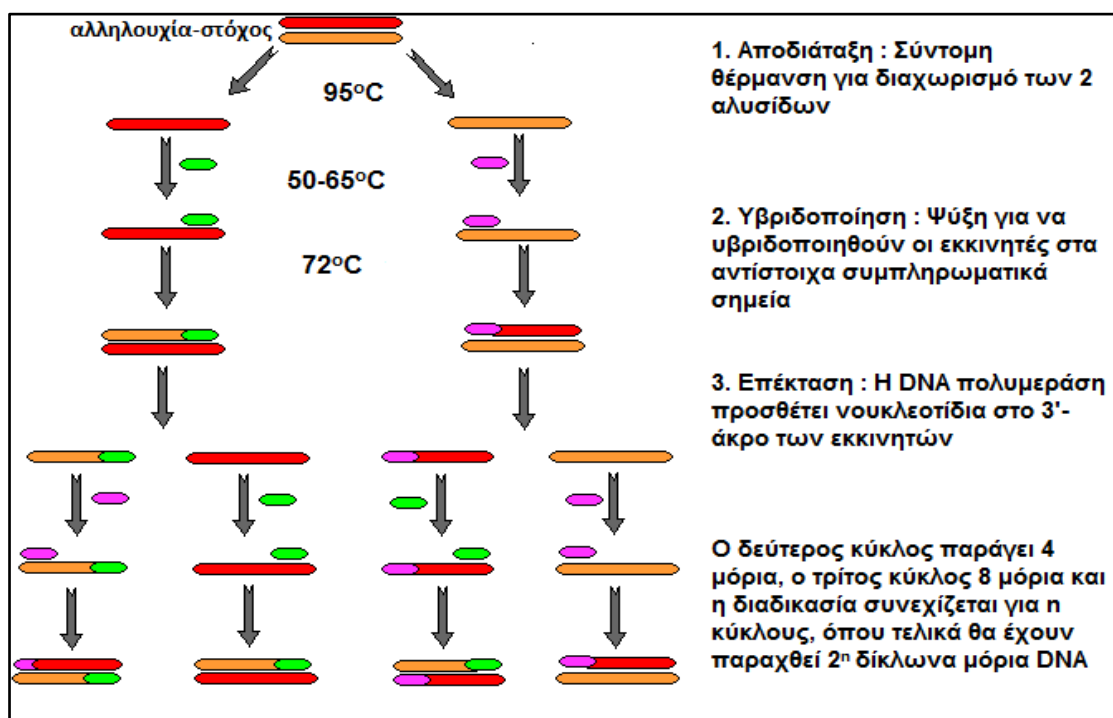
4.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

4.5.1 Αρχή μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια μέθοδος για την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Το αρχικό υλικό είναι ένα δίκλωνο μόριο DNA. Με την

PCR μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, υπό την προϋπόθεση πως είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία ώστε να σχεδιαστούν οι κατάλληλοι εκκινητές (συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 18 – 30 βάσεων). Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, καθορίζουν δηλαδή τα άκρα της περιοχής που θα πολλαπλασιαστεί.

Η PCR βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών απλών αντιδράσεων οι οποίες διαφέρουν ως προς τη θερμοκρασία και το χρόνο (**Σχήμα 4.2**). Οι αλυσίδες αποχωρίζονται με θέρμανση του μείγματος της αντίδρασης (μεταξύ 92°C και 96°C), το οποίο στη συνέχεια ψύχεται (50-65°C) ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν στις συμπληρωματικές περιοχές, που βρίσκονται γύρω από την περιοχή-στόχο. Ο σχεδιασμός των εκκινητών αποτελεί το πλέον σημαντικό στάδιο για μια επιτυχή αντίδραση PCR. Η Taq πολυμεράση συνθέτει νέες αλυσίδες, συμπληρωματικές προς τις μητρικές οι οποίες προεκτείνονται πέρα από τη θέση δέσμευσης του εκκινητή στη νέα αλυσίδα. Το μείγμα της αντίδρασης θερμαίνεται ξανά. Τόσο οι αρχικές όσο και οι νέες αλυσίδες αποχωρίζονται πάλι και έτσι τώρα είναι διαθέσιμες 4 θέσεις δέσμευσης των εκκινητών. Η πολυμεράση συνθέτει νέες συμπληρωματικές αλυσίδες, το μήκος των οποίων περιορίζεται στην αλληλουχία-στόχο. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται, παράγοντας δίκλινα τμήματα DNA που είναι όμοια με την αλληλουχία-στόχο. Η ίδια διαδικασία συνεχίζεται με εκθετική ενίσχυση της περιοχής του DNA-στόχου. Μετά από n κύκλους έχουν παραχθεί θεωρητικά 2^n δίκλινα μόρια DNA.³



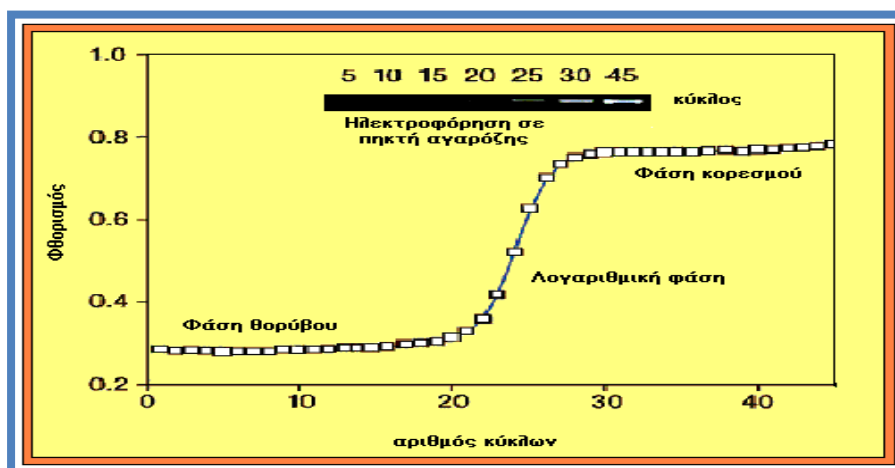
Σχήμα 4.2. Σχηματική παράσταση της PCR

4.5.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR, qPCR)

4.5.2.1 Εισαγωγή

Η PCR σε πραγματικό χρόνο βασίζεται στην καταγραφή του φθορισμού που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, ο οποίος και αποτελεί το δείκτη παραγωγής αντιγράφων σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Μια qPCR αποτελείται από τρεις φάσεις: α) τη φάση θορύβου, β) την εκθετική ή λογαριθμική φάση και γ) τη φάση κορεσμού (Σχήμα 4.3). Η φάση θορύβου διαρκεί έως ότου το σήμα του προϊόντος της PCR να είναι μεγαλύτερο από το σήμα υποβάθρου του συστήματος. Η φάση της εκθετικής ανάπτυξης ξεκινά μόλις συσσωρευτεί επαρκής ποσότητα προϊόντος έτσι ώστε να είναι ανιχνεύσιμο πάνω από το θόρυβο. Λόγω της παραγωγής πολύ μεγάλου αριθμού αντιγράφων, της μείωσης της διαθέσιμης ποσότητας των αντιδραστηρίων ή της συσσώρευσης πυροφωσφορικών, κάποια στιγμή το προϊόν της PCR παύει να παράγεται εκθετικά και η αντίδραση εισέρχεται στη φάση κορεσμού.

Κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης η ενίσχυση του προϊόντος περιγράφεται από τη σχέση: $N=N_0(1+E)^n$, όπου: N η ποσότητα του προϊόντος, N_0 η αρχική ποσότητα του DNA-στόχου, n ο αριθμός των κύκλων της PCR και E η μέση απόδοση της αντίδρασης PCR για κάθε κύκλο. Η απόδοση εξαρτάται σημαντικά από τις πειραματικές συνθήκες, καθώς μεταβολές σε παράγοντες όπως η συγκέντρωση των αντιδραστηρίων, η θερμοκρασία και ο χρόνος επηρεάζουν την απόδοση της αντίδρασης.



Σχήμα 4.3. Παρακολούθηση των τριών φάσεων της qPCR και σύγκριση με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης της συμβατικής αντίδρασης PCR σε αντίστοιχο αριθμό κύκλων.

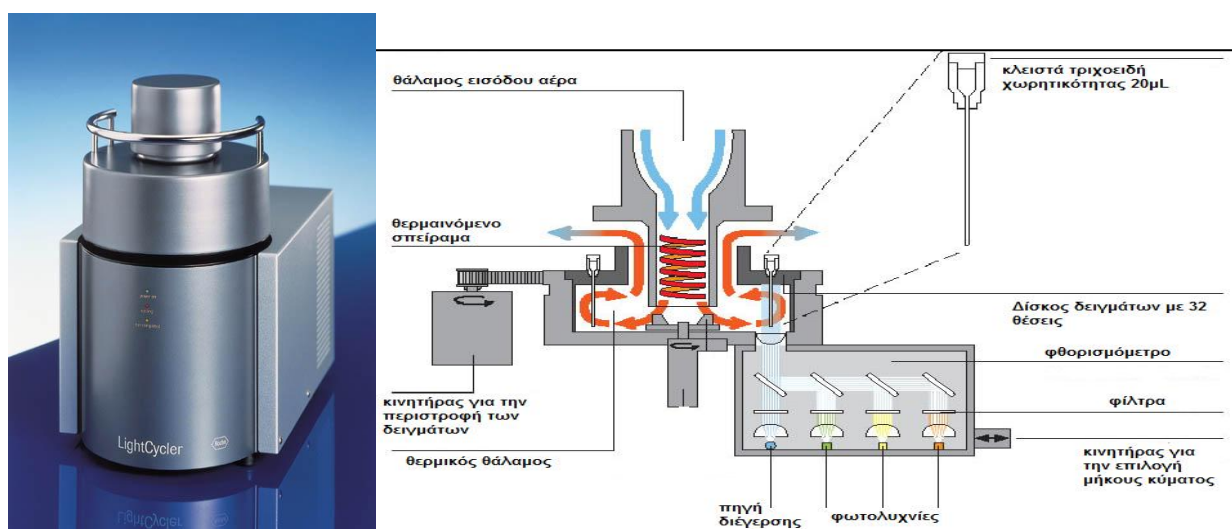
Στην qPCR, οι τιμές του φθορισμού καταγράφονται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου και αντιπροσωπεύουν το ποσό του προϊόντος που έχει ενισχυθεί μέχρι εκείνο το σημείο της

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR αντίδρασης. Όσο περισσότερη αρχική ποσότητα γενετικού υλικού είναι παρούσα κατά την έναρξη της αντίδρασης, τόσο μικρότερος αριθμός κύκλων θα απαιτείται για να οδηγηθεί η αντίδραση στο σημείο στο οποίο το σήμα φθορισμού καταγράφεται ως στατιστικώς σημαντικά αυξημένο σε σχέση με το σήμα υποβάθρου.

Στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε χρησιμοποιήθηκε χρωστική φθορισμού δέσμησης του dsDNA (LC Green Plus). Το λαμβανόμενο σήμα αυξάνει ευθέως ανάλογα με την ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR.

4.5.2.2 Οργανολογία real-time PCR

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για όλες τις βελτιστοποιήσεις συνθηκών της αντίδρασης PCR ήταν το LightCycler της εταιρείας Roche. Το όργανο LightCycler (**Εικόνα 4.3**) πραγματοποιεί την αντίδραση PCR μέσα σε γυάλινα τριχοειδή τα οποία τοποθετούνται σε ένα περιστρεφόμενο δίσκο, ενώ η θέρμανση και η ψύξη γίνονται με τη βοήθεια ρεύματος αέρα. Το όργανο χρησιμοποιεί τρία διαφορετικά φίλτρα. Μια μπλε δίοδος (**Light Emission Diode, LED**), με μέγιστη εκπομπή στα 470nm λειτουργεί ως πηγή ενέργειας για τη διέγερση των δειγμάτων, ενώ ο φθορισμός ανιχνεύεται στα 530nm, 640nm και 710nm. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, ένας κατάλληλος κινητήρας περιστρέφει κυκλικά το δίσκο με τα δείγματα, έτσι ώστε το άκρο κάθε τριχοειδούς να τοποθετείται ακριβώς στο εστιακό σημείο της φθορισμομετρικής οπτικής.



Εικόνα 4.3 Το όργανο LightCycler της εταιρείας Roche και σχηματική παράσταση της οργανολογίας του.

Για την παρακολούθηση της αντίδρασης PCR ενώ αυτή εξελίσσεται, οι διάφορες πληροφορίες μεταφέρονται από και προς έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή, μέσω κατάλληλης σύνδεσης. Ο χρήστης εισάγει τα δεδομένα μέσω του υπολογιστή στο κατάλληλο πειραματικό πρωτόκολλο και στη συνέχεια, ο υπολογιστής μεταφέρει τις πληροφορίες στο όργανο. Επίσης, ο υπολογιστής καταγράφει τις θερμοκρασίες και τα σήματα φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και τέλος επεξεργάζεται τα αποτελέσματα με τη βοήθεια αναλυτικών προγραμμάτων (LightCycler Operator 's Manual version 3.5, Roche Molecular biochemicals, 1999).

4.6 Υψηλής διακριτικότητας ανάλυση καμπυλών τήξεως (High Resolution Melting Curve Analysis)

Η ανάλυση με καμπύλες τήξης είναι μια γρήγορη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων, αλλά και τον έλεγχο ύπαρξης νέων, άγνωστων μεταλλάξεων σε δείγματα.⁹³ Η μέθοδος έχει αναλυθεί εκτενώς σε προηγούμενο υποκεφάλαιο της παρούσας εργασίας (1.3.9). Εδώ θα γίνει μία αναφορά των βασικών χαρακτηριστικών της μεθόδου και θα δοθεί περισσότερη έμφαση στην οργανολογία και στην επεξεργασία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Η τήξη είναι χαρακτηριστική ιδιότητα του δίκλωνου DNA. Κάθε δίκλωνο μόριο DNA έχει μια χαρακτηριστική T_m , στην οποία το 50% γίνεται μονόκλωνο, χάνει δηλαδή τη μισή ελικοειδή του μορφή. Κάθε αλληλουχία έχει χαρακτηριστική για αυτήν T_m , καθώς και μορφή καμπύλης.⁹⁵ Αυτές οι T_m διαφέρουν ανάλογα με τις εξής παραμέτρους: α) το μήκος του δίκλωνου DNA, β) το βαθμό περιεχομένου βάσεων γουανίνης και κυτοσίνης, GC (η T_m είναι υψηλότερη όσο πιο πλούσιο το μόριο του DNA σε GC λόγω των τριών δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ τους), γ) την αλληλουχία και δ) των βαθμών συμπληρωματικότητας μεταξύ των κλώνων.^{3,97}

Τα ετερόζυγα δείγματα διακρίνονται από τα αντίστοιχα ομόζυγα λόγω της διαφορετικής μορφής της καμπύλης τήξης τους.⁹⁸ Τα ετερόζυγα δείγματα διακρίνονται μεταξύ τους κυρίως από τη μορφή των καμπυλών τήξης. Αντίθετα, τα ομόζυγα δείγματα διακρίνονται μεταξύ τους μόνο με βάση τη T_m .⁹⁵ Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι, όσο μικρότερο σε μήκος είναι το προϊόν, τόσο καλύτερη και ακριβής είναι η διάκριση μεταξύ των δειγμάτων, ομόζυγων και ετερόζυγων.⁹³

Η εξέλιξη της τεχνολογίας του HRM και η ενσωμάτωσή της στην τεχνολογία της Real-time PCR με χρήση μια απλής χρωστικής, όπως το LC Green και το SYBR Green, έχει κάνει τη Χριστίνα Σχίζα

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR συγκεκριμένη μεθοδολογία μία απλή, αξιόπιστη και εύκολη στην εκτέλεση επιλογή για ανίχνευση μεταλλάξεων σε επίπεδο ρουτίνας. Τα όργανα υψηλής διακριτικής ικανότητας μπορούν να λαμβάνουν αξιόπιστα σήματα φθορισμού ακόμα και ανά 0,002°C. Έχουν την ικανότητα να ανακτήσουν μέχρι 50 σημεία σήματος για κάθε βαθμό Κελσίου.

4.6.1 Οργανολογία

Αρχικά για την ανάλυση HRM χρησιμοποιήθηκε το real-time PCR όργανο LightCycler της Roche. Παρόμοια διάταξη έχουν σχεδόν όλα τα όργανα που χρησιμοποιούνται για HRM ανάλυση, με μικρές παραλλαγές. Τα όργανα της real-time PCR, αν και χρησιμοποιούνται για ανάλυση τήξης, στην ουσία θεωρούνται ως πρόδρομα των HRM οργάνων στην ανάλυση με καμπύλες τήξης. Σήμερα, υπάρχουν στο εμπόριο όργανα υψηλής διακριτικότητας ανάλυσης καμπυλών τήξης, στηριζόμενα στην οργανολογική δομή των κυκλοποιητών. Το πρώτο που κυκλοφόρησε ήταν το HR-1 (Idaho Technology, Salt Lake City, USA) και είναι αποκλειστικά για HRM ανάλυση, ενώ πιο πρόσφατα είναι το LightScanner (Idaho Technology), το Rotor-Gene 6000 (Corbett Research), και το LightCycler 480 (Roche Diagnostics).

Το HR-1 (Idaho Technology Inc, Utah, USA)(**Εικόνα 4.4**), έχει σχεδιαστεί αποκλειστικά για HRM ανάλυση. Είναι όργανο που δέχεται έναν τριχοειδή σωλήνα δείγματος. Έχει επίσης διαφορά στον τρόπο μετάδοσης της θερμότητας σε σχέση με τα περισσότερα όργανα που χρησιμοποιούνται για HRM ανάλυση. Η θέρμανση επιτυγχάνεται με διαβίβαση ρεύματος μέσω ενός καλωδίου που τυλίγεται γύρω από έναν κύλινδρο αργιλίου και περιβάλλει τον τριχοειδή γυάλινο σωλήνα. Χρησιμοποιεί τον ανεμιστήρα μόνο για την ψύξη του τριχοειδούς. Παράλληλα, όπως και όλα τα όργανα έχει αισθητήρες για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας με ακρίβεια.⁷⁵



Εικόνα 4.4 Το όργανο HR-1. (Idaho Technology Inc, Utah, USA)

4.6.2 Παράμετροι που επηρεάζουν τη διακριτικότητα

Υπάρχουν πολλές παράμετροι που επηρεάζουν την υψηλή ευκρίνεια ενός οργάνου, καθορίζοντας έτσι την ορθότητα και την ακρίβειά του, οι οποίοι είναι η θερμική ομοιογένεια, ο θερμοκρασιακός έλεγχος, η ανάκτηση δεδομένων θερμοκρασίας και φθορισμού, η πυκνότητα δεδομένων (σημεία/°C), η ένταση θορύβου, ο ρυθμός τήξης, ο χρόνος ολοκλήρωσης και η μετατροπή του σήματος από αναλογικό σε ψηφιακό.^{97,75}

4.6.3 Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η ανάλυση τήξεως εκμεταλλεύεται τις αλλαγές που προκύπτουν στην καμπύλη τήξεως. Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να προκύψει με δύο τρόπους: α) αλλαγές στο σχήμα της καμπύλης τήξης και β) διαφορά στο σημείο τήξης T_m .

Για τη διαφοροποίηση αυτή τα μόρια DNA χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Όταν ένα μόριο δίκλωνου DNA είναι πλήρως συμπληρωματικό ως προς τις βάσεις των δύο κλώνων του, είναι ομόδιπλο, ενώ όταν δύο υβριδισμένοι κλώνοι, αλληλόμορφοι, δεν είναι πλήρως συμπληρωματικοί, αλλά σχηματίζουν ένα δίκλωνο μόριο, διαφέροντας μεταξύ τους σε μία ή περισσότερες βάσεις, τότε το δίκλωνο αυτό μόριο, ονομάζεται ετερόδιπλο.

Η διαφορά μεταξύ των καμπυλών τήξης δεν είναι πάντοτε διακριτή. Για να γίνει εμφανής η διαφορά μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων απαιτείται επεξεργασία των αποτελεσμάτων, που περιλαμβάνει μία ή περισσότερες από τις εξής διαδικασίες:

- Σχεδόν πάντοτε **κανονικοποίηση (normalization)** των καμπυλών τήξεως θέτοντας το μέγιστο φθορισμό ως το 100% και τον ελάχιστο στο 0% σε κάθε καμπύλη.
- **Καμπύλες θερμοκρασιακής-μετατόπισης (temperature-shifted ή temperature-overlay curves)**, επιθέτοντας τις κανονικοποιημένες καμπύλες σε χαμηλού ποσοστού φθορισμό. Η θερμοκρασιακή-μετατόπιση, δηλαδή, γίνεται σε επίπεδο επεξεργασίας αποτελεσμάτων και αποδίδει μια καινούρια σειρά από καμπύλες. Έχει σκοπό να ενισχύσει οπτικά τη δυνατότητα διάκρισης και σύγκρισης των ετεροζυγωτών από τους ομοζυγώτες και πολλές φορές και μεταξύ τους σε μελέτες γονοτύπησης. Συνηθίζεται η επιλογή της μετατόπισης να είναι σε περιοχή μέχρι το 5% του φθορισμού, αναπόφευκτα όμως σε όργανα χαμηλότερης ποιότητας δεδομένων, χρειάζεται μια περιοχή μέχρι 20%. Τίποτα δεν απαγορεύει, παρ' όλ' αυτά, η μετατόπιση να γίνει σε υψηλότερα ποσοστά φθορισμού, με στόχο πάντα την πιο άνετη και εύκολη οπτική διάκριση των καμπυλών του κάθε προϊόντος.

- Κατασκευή της **καμπύλης πρώτης παραγώγου** του λαμβανόμενος σήματος φθορισμού [-dF/dT].
- **Καμπύλες διαφοράς φθορισμού (fluorescence difference curves)** από την καμπύλη «wild type», που υπολογίζεται αφαιρώντας την κάθε ανακτηθείσα καμπύλη – τη μέση τιμή της – από τη μέση τιμή της καμπύλης «φυσικού τύπου». Χρησιμοποιείται πλέον ευρύτατα στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε μελέτες γονοτύπησης.⁹⁷

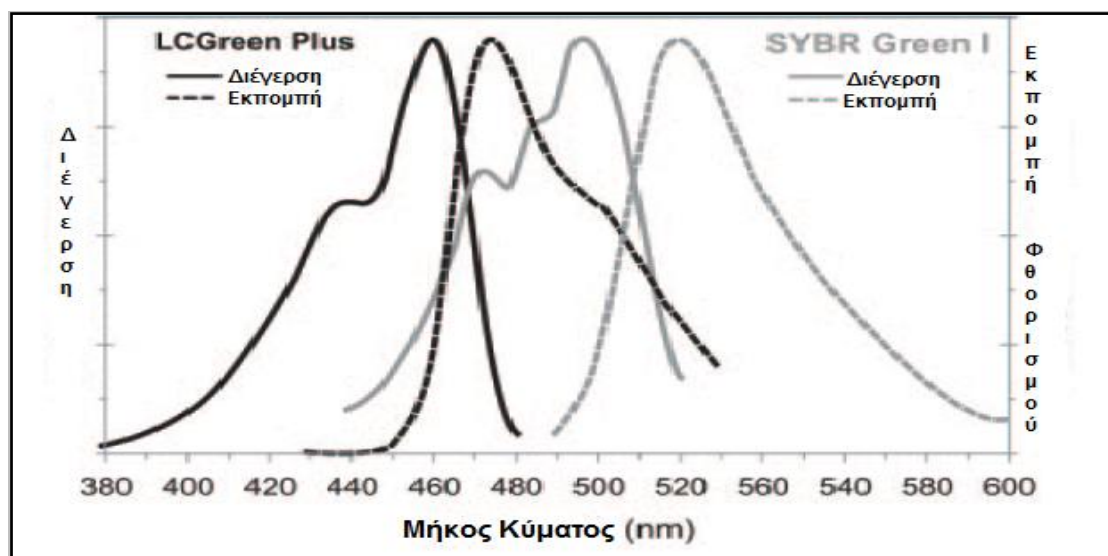
Οι καμπύλες τήξης είναι δυνατόν να επηρεαστούν από τους εξής παράγοντες: τη συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος, το pH, την ιονική ισχύ, μεταβολές στη συγκέντρωση Mg^{+2} , το είδος της χρωστικής, τη συγκέντρωση της χρωστικής, το ρυθμό θέρμανσης, το ρυθμό ψύξης του δείγματος, το μήκος του προϊόντος PCR που αναλύεται και το ποσοστό wild-type προς μεταλλαγμένο στο δείγμα, στη διάκριση των ετεροζυγωτών. Γι' αυτό και κρίνεται απαραίτητη η μελέτη βελτιστοποίησης της κάθε μεθόδου.⁹⁶

4.6.4 Χρήση χρωστικών

Οι κύριες φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση καμπυλών τήξεως είναι το SYBR Green I και το LC Green, αν και υπάρχει ένας πολύ μεγαλύτερος αριθμός χρωστικών. Πρέπει επίσης να διευκρινίσουμε ότι στο εμπόριο κυκλοφορούν οι χρωστικές LC Green I και LC Green Plus, για τις οποίες αναφέρεται ότι έχουν ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά με μόνη διαφορά το υψηλότερο σήμα φθορισμού του LC Green Plus.¹⁴⁰ Οι χρωστικές αυτές δε χρησιμοποιούνται μόνο για προσδιορισμό καμπύλης τήξεως, αλλά και για παρακολούθηση των προϊόντων σε PCR πραγματικού χρόνου.

Η χρωστική του LC Green παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 440-470nm και μέγιστη εκπομπή στα 470-520nm, ενώ το SYBR Green I στα 480-510nm και 510-540nm αντίστοιχα (**Σχήμα 4.4**). Η φθορίζουσα χρωστική, έχει την ικανότητα να προσδένεται στη διπλή έλικα του DNA. Θεωρείται ότι εισέρχεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου μορίου και με τη σύνδεσή του σε αυτό, ο φθορισμός του αυξάνει μέχρι 100 φορές. Η ποσότητα χρωστικής που προσδένεται στο νεοσυντιθέμενο dsDNA, είναι ανάλογη του σήματος φθορισμού, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα τόσο για ποσοτική όσο και ποιοτική ανάλυση. Κατά την αποδιάταξη του dsDNA, όπως συμβαίνει στην περίπτωση ανάλυσης καμπυλών τήξεως, η ένταση του φθορισμού μειώνεται, αφού τα μόρια αποδεσμεύονται από το DNA. Έτσι, μπορούμε να μετρήσουμε την ένταση φθορισμού στο τέλος της επέκτασης των εκκινήτων κάθε κύκλου PCR, όπως γίνεται στην PCR πραγματικού χρόνου, αλλά και μετά την ολοκλήρωσή της σε όργανα ανάλυσης καμπυλών τήξης. Η μέθοδος αυτή μπορεί να

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR ξεπεράσει το εμπόδιο του ειδικά επισημασμένου με φθορίζουσα ουσία, ανιχνευτή, καθορίζοντας έτσι την ειδικότητά της αποκλειστικά από την αλληλουχία των εκκινητών. Η έλλειψη ειδικότητας στη δέσμευση, στο δίκλωνο DNA των χρωστικών αυτών, είναι ένα μειονέκτημα, αλλά παράλληλα και πλεονέκτημα. Τα διμερή των εκκινητών, αλλά και των μη ειδικών προϊόντων, ανιχνεύονται, χρησιμοποιώντας τις χρωστικές αυτές, αν και από την άλλη μεριά δεν χρειάζονται εξειδικευμένα μόρια ή ολιγονουκλεοτίδια για την επισήμανση του παραγόμενου DNA. Στην περίπτωση των διμερών των εκκινητών, κατάλληλη βελτιστοποίηση των συνθηκών, έτσι ώστε να μην παραμένουν διμερή τους μετά το πέρας των κύκλων της PCR, μπορεί να άρει το μειονέκτημα αυτό. Επίσης, και η κατάλληλη επιλογή της ακολουθίας που θα χρησιμοποιηθεί ως εκκινητής παίζει πολύ σημαντικό ρόλο, αφού με την ανάλυση τήξεως, τα διμερή των εκκινητών εάν επιλεγθούν κατάλληλα, θα αποδιαταχθούν σε σημαντικά χαμηλότερη θερμοκρασία, έτσι που να μην παρεμποδίζουν την ανάλυση.⁹⁶

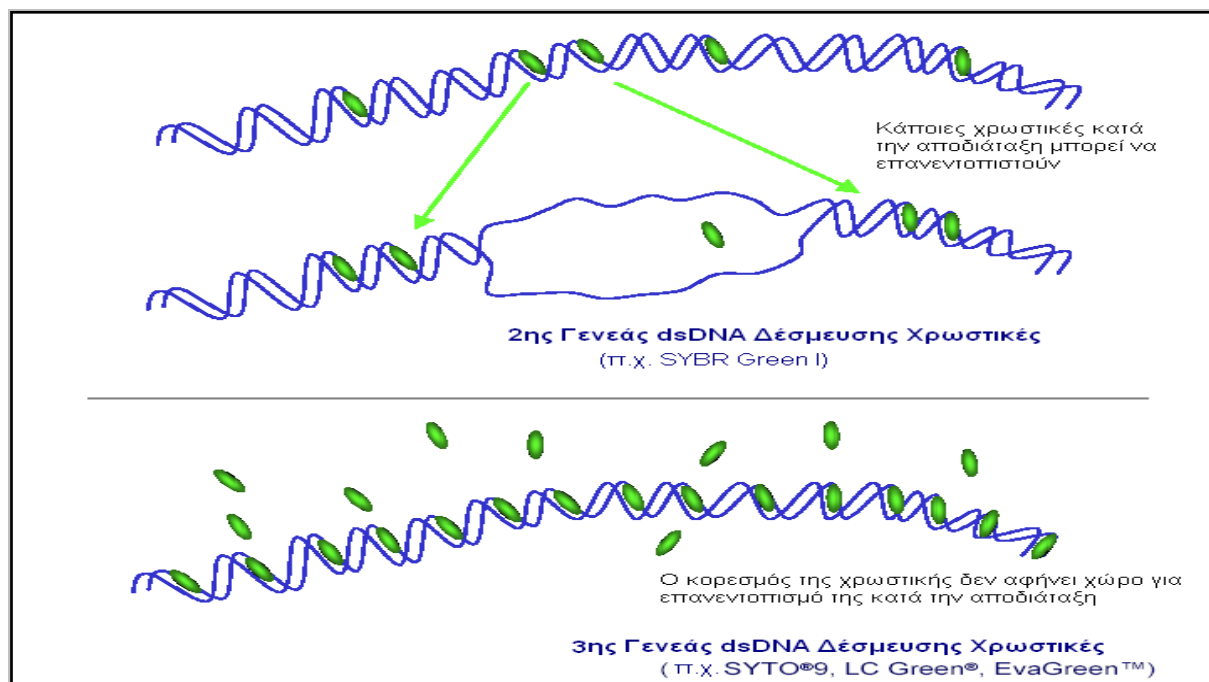


Σχήμα 4.4 Φάσμα φθορισμού των LCGreen Plus και SYBR Green I.⁹⁷

Έχει όμως παρατηρηθεί ότι η χρωστική SYBR Green I δίνει ένα αδρό χαρακτηρισμό των όσων είχαν ενισχυθεί, εμποδίζοντας πολλές φορές τη διάκριση ετερόδιπλων και ομόδιπλων αλληλουχιών. Η πιθανότερη εξήγηση σ' αυτό, είναι ότι κατά τη διάρκεια της τήξης, το SYBR Green I αποδεσμεύεται από χαμηλού σημείου τήξης δίκλωνες περιοχές, για να δεσμευτεί με υψηλότερου σημείου τήξεως περιοχές (Σχήμα 4.5), αλλά και από αποδιαταγμένο ssDNA σε dsDNA που δεν έχει ακόμα πλήρως αποδιαταχτεί. Έτσι, αλλοιώνεται η καταγραφή της πραγματικής πορείας της μετάβασης. Ως αποτέλεσμα, το SYBR Green I αδυνατεί να δώσει υψηλό σήμα σε μόρια dsDNA που τήκονται σε χαμηλές θερμοκρασίες, αφού όπως παρατηρούμε οι χαμηλής θερμοκρασίας κορυφές είναι πολύ

Χριστίνα Σχίζα 90

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR μικρές. Επίσης, δεν μπορεί να χαρακτηριστεί η καμπύλη τήξεως σύμφωνα με τα πραγματικά δεδομένα της θερμικής τους σταθερότητας, δηλαδή δε θα είναι εμφανής η οποιαδήποτε σταδιακή αποδιάταξη του δίκλωνου DNA που θα μπορούσε να χαρακτηρίσει την καμπύλη αυτή. Αντίθετα, το LCGreen δεν παρουσιάζει ανακατανομή κατά την τήξη του κι έτσι αναγνωρίζει καλύτερα τις χαμηλότερου σημείου τήξεως μεταβάσεις. Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι το SYBR Green I προτιμάται για είδη που τήκονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες.⁹³



Σχήμα 4.5 Ανακατανομή των χρωστικών ουσιών παρεμβολής στο DNA κατά τη διάρκεια της αποδιάταξης του DNA.⁹⁶

Οι φθορίζουσες χρωστικές 3^{ης} γενιάς, δεν έχουν ιδιαίτερα ανασταλτική δράση στην PCR, κάτι που σημαίνει ότι μια υψηλότερη συγκέντρωση της χρωστικής ουσίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Η υψηλότερη συγκέντρωση χρωστικών ουσιών αυξάνει τα επίπεδα κορεσμού του δίκλωνου DNA με τα μόρια των χρωστικών ουσιών. Ο κορεσμός θεωρείται ότι μειώνει τα φαινόμενα ανακατανομής χρωστικών ουσιών κατά τη διάρκεια της αποδιάταξης του DNA, αυξάνοντας τη διακριτικότητα της ανάλυσης καμπυλών τήξεως.^{1 96}

4.7 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Αρχικά, παρασκευάζεται πηκτή αγαρόζης 2% (w/v), η οποία περιέχει 2,0g αγαρόζη (Sigma, USA), σε 100mL ρυθμιστικού διαλύματος TAE 0,5X (0,5X: διάλυμα αραιωμένο κατά 0,5 φορές) (2M Tris, 1M οξικό οξύ, 50mM EDTA, pH 7,6), στην οποία προστίθεται 3μL από 5μg/μL βρωμιούχο αιθίδιο. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται παρουσία ρυθμιστικού

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE 0,5X, υπό σταθερή τάση 100V (συσκευή ηλεκτροφόρησης Biorad) για περίπου 20-25 min. Παράλληλα με τα δείγματα γίνεται ηλεκτροφόρηση διαλύματος του **δείκτη μοριακών βαρών DNA (molecular weight marker)** [50bp DNA-ladder, extended], για τον υπολογισμό του μεγέθους των προϊόντων της PCR. Οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές λόγω της εκπομπής ακτινοβολίας φθορισμού από το βρωμιούχο αιθίδιο ύστερα από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας στα 312 nm. Η πηκτή φωτογραφίζεται με φιλμ Polaroid ή καταγράφεται το σχήμα της σε αρχείο υπολογιστή.

Ψηφιακή φωτογράφιση

Η φωτογράφιση των προϊόντων της ηλεκτροφόρησης έγινε με χρήση ψηφιακής κάμερας, η οποία είναι συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή, οπότε είναι δυνατή η επεξεργασία της με χρήση ειδικού λογισμικού προγράμματος (gel analyser program). Το σύστημα αυτό, αν και οικονομικό, παρέχει εικόνες χαμηλότερης ευκρίνειας σε σχέση με την κλασική φωτογράφιση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Ανάλυση της μετάλλαξης 3140 A>G στο εξόνιο 20 του *PIK3CA* σε κλινικά δείγματα καρκίνου μαστού με υψηλής διακριτικότητας ανάλυση καμπυλών τήξεως (HRMA)

5.1 Εισαγωγή

Η ανάλυση με καμπύλες τήξης περιγράφηκε εκτενώς σε προηγούμενο κεφάλαιο. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία έχει αναπτυχθεί σε προηγούμενη ερευνητική εργασία^{1,96} και χρησιμοποιείται στο εργαστήριό μας τόσο για ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο, όσο και για τη μελέτη της μεθυλίωσης γονιδίων.

Η ανάπτυξη της μεθόδου ανάλυσης καμπύλων τήξης¹, πραγματοποιήθηκε έχοντας σαν στόχο την εφαρμογή της για την ανίχνευση της μετάλλαξης 3140A>G στο εξόνιο 20 του γονιδίου *PIK3CA*. Αποδείχθηκε ότι, η υψηλής-διακριτικότητας ανάλυση καμπύλων τήξης είναι μια τεχνική, η οποία παρέχει ταχύτητα στην ανίχνευση μεταλλάξεων. Παράλληλα, επιτρέπει τη χρήση φθορίζουσων χρωστικών ουσιών, ενώ αποφεύγεται η χρήση επισημασμένων ανιχνευτών υβριδισμού (probes), κάνοντας την τεχνική αυτή οικονομική και απλή στην ανάπτυξη της μεθοδολογίας. Επίσης, η τεχνική αυτή, συνδυαζόμενη με ανίχνευση μεταλλάξεων σε μικρού μεγέθους PCR προϊόντα, παρέχει υψηλή ευαισθησία, κάτι που απαιτείται στην ανίχνευση μεταλλάξεων και ιδιαίτερα σε σωματικές μεταλλάξεις, όπου κύτταρα του καρκινικού ιστού μπορεί να συνυπάρχουν με κύτταρα από τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό.

Το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε στην ερευνητική εργασία του Π. Βορκά χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία για ανίχνευση μεταλλάξεων σε μια σειρά δειγμάτων DNA που απομονώθηκαν από κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, σε δείγματα DNA από ιστούς ακινητοποιημένους σε παραφίνη, σε δείγματα cell free DNA, καθώς και σε δείγματα cDNA. Η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται στο 1% περίπου, δηλαδή μπορεί να ανιχνεύσει την παρουσία ενός μεταλλαγμένου αλληλίου παρουσία εκατό φυσιολογικών.

5.2 *In silico* σχεδιασμός εκκινητών

Ως *in silico* μελέτη ονομάζουμε την υπολογιστική μελέτη που γίνεται με σκοπό τον καλύτερο σχεδιασμό της μεθόδου. Για το σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα Primer Premier 5.0 (Primer Biosoft International, USA). Τα κριτήρια που πρέπει να πληροί γενικά ένα ζεύγος εκκινητών συνοψίζονται παρακάτω:³

- Η πιο σημαντική περιοχή για ειδική ενίσχυση είναι η 3' περιοχή του εκκινητή, λόγω του ότι η ενίσχυση ξεκινά από την περιοχή αυτή. Γενικά, αυτά τα άκρα πρέπει να μη σχηματίζουν δευτεροταγείς και παλινδρομικές δομές, να μην περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενες και εκφυλισμένες αλληλουχίες.
- Οι αλληλουχίες των δύο εκκινητών δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους, ιδιαίτερα στο 3' άκρο τους, έτσι ώστε να μη σχηματίζονται διμερή εκκινητών.
- Συνιστάται οι δύο εκκινητές να χαρακτηρίζονται από ανάλογη περιεκτικότητα σε βάσεις GC και με T_m όμοιες.
- Η περιεκτικότητα των εκκινητών σε βάσεις GC πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 40% και 70%.
- Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι πάντοτε υψηλής καθαρότητας.
- Η αλληλουχία-στόχος είναι προτιμότερο να είναι μια «ισορροπημένη» περιοχή, δηλαδή να περιλαμβάνει ίσες αναλογίες των τεσσάρων βάσεων A, T, G, C και να μην είναι συμπληρωματική με τον εαυτό της, μονότονη ή επαναλαμβανόμενη.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών για την ανίχνευση της συγκεκριμένης μετάλλαξης πραγματοποιήθηκε από το Βορκά Π. με βάση τα παραπάνω κριτήρια. Η αλληλουχία του γενωμικού DNA, όπως αυτή λαμβάνεται από τη GeneBank, παρουσιάζεται στο **Σχήμα 5.1**. Η περιοχή που ενισχύεται καλύπτει τμήμα του εξονίου 20 και το προϊόν έχει μήκος 70bp. Η μετάλλαξη που ανιχνεύεται είναι η μετατροπή της αδενίνης (A) σε γουανίνη (G) στη θέση 3140.

```
acattctagtggggtaaagggaatcaaaagatggttgtaagagaagtgagagaggaatgctatTTTTTTatag
ctttgtctacgaaagcctctctaattttgtgacatttgagcaagacctgaagggtattaacatcatttgctcc
aaactgaccaaactgttcttattacttatagGTTTCAGGAGATGTGTTACAAGGCTTATCTAGCTATTCGACA
GCATGCCAATCTCTTCATAAATCTTTTCTCAATGATGCTTGGCTCTGGAATGCCAGAACTACAATCTTTTGAT
GACATTGCATACATTTCGAAAGACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGCAAAGAGGCTTTGGAGTATTTTCATGAAAC
AAATGAATGATGCACATTCATGGTGGCTGGACAACAAAATGGATTGGATCTTCCACACAATTAACAGCATG
CATTGAACTGAAAAGATAACTGAGAAAATGAAAGCTCACTCTGGATTCCACACTGCACTGTTAAATAACTCTCA
GCAGGCAAAGACCATTGCATAGGAATTGCACAATCCATGAACAGCATTAGAATTTACAGCAAGAACAGAAAT
AAAATACTATATAAATTTAAATAATGTAAACGCAAACAGGGTTTGATAGCACTTAAACTAGTTCATTTCAAAT
TAAGCTTTTAGAATAATGCGCAATTTTCATGTTATGCCTTAAGTCCAAAAGGTAACCTTTGAAGATTGTTTGTA
TCTTTTTTTAAAAAACAAAACAAAACAAAATCCCCAAAATATATAGAAATGATGGAGAAGGaaaagt
```

Σχήμα 5.1 Η αλληλουχία του εξονίου 20 με τις πλησιέστερες αλληλουχίες ιντρονίων. Με μαύρα κεφαλαία γράμματα παρουσιάζεται το εξόνιο και με πράσινο η μη μεταφραζόμενη περιοχή του. Με μικρά γράμματα τα ιντρόνια και 5' μη μεταγραφόμενη περιοχή, με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται η μετάλλαξη. Ο ανάστροφος εκκινητής παρουσιάζεται με γαλάζιο και ο πρόσθιος εκκινητής με μωβ.

5.3 Συνθήκες Real-time PCR για το εξόνιο 20 του γονιδίου *PIK3CA*

Στον **πίνακα 5.1** παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για το συγκεκριμένο γονίδιο.

Πίνακας 5.1 Χαρακτηριστικά εκκινητών Real-time PCR

Εκκινητής	Αλληλουχία 5'-3'	Nt	T _m	Προϊόν
Πρόσθιος (20P70F)	GAGGCTTTGGAGTATTTTCAT	20	51.2°C	70bp
Ανάστροφος (20P70R)	AATCCATTTTTGTTGTCCAG	20	52.5°C	

Στον **πίνακα 5.2** παρουσιάζονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για το εξόνιο 20 του γονιδίου *PIK3CA*.

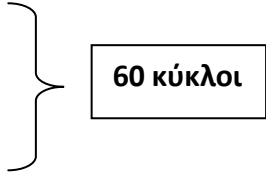
Πίνακας 5.2 Συστατικά αντίδρασης PCR για εξόνιο 20 του *PIK3CA*

Αντιδραστήρια	C Αρχική	Όγκος (μL)	C Τελική
Πρόσθιος εκκινητής	10 μM	0,3	0,3μM
Ανάστροφος εκκινητής	10 μM	0,3	0,3μM
dNTPs	10 mM	0,4	0,4mM
MgCl ₂	25 mM	1,2	3,0mM
BSA	10 μg/μL	0,15	0.15μg/μL
PCR ρυθμιστικό διάλυμα	5x	2,0	1x
Ταq πολυμεράση (Promega)	5 U/μL	0,1	0.05U/μL
LCGreen Plus	10x	1,0	1x
H ₂ O	-	3,55	-
Δείγμα DNA	25 ng/μL	1,0	2,5ng/μL
Συνολικός Όγκος		10	

Στον **πίνακα 5.3** παρουσιάζονται οι συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 5.3 Συνθήκες PCR για το εξόνιο 20 του PIK3CA

Στάδιο PCR	PIK3CA εξόνιο 20
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C/ 2min
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C/ 10 sec
Υβριδοποίηση των εκκινητών στο DNA	59°C/ 15 sec
Επέκταση εκκινητών	72°C/ 20 sec



60 κύκλοι

Για επιβεβαίωση ότι η παραπάνω αντίδραση PCR μας δίνει το επιθυμητό προϊόν χωρίς την παρουσία άλλων παραπροϊόντων, προστίθεται στο τέλος της αντίδρασης ένα επιπλέον στάδιο ανάκτησης καμπυλών τήξης. Γνωρίζουμε από τις αναφορές του Primer Premier πως η θερμοκρασία τήξης του επιθυμητού προϊόντος είναι περίπου 78,5°C. Οποιαδήποτε άλλη μετάβαση αποδεικνύει την ύπαρξη παραπροϊόντος. Στον **πίνακα 5.4** παρουσιάζονται οι συνθήκες ανάκτησης καμπυλών τήξεως που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 5.4 Συνθήκες ανάκτησης καμπυλών τήξεως

Πρόγραμμα	PIK3CA εξόνιο 20
Ρυθμός τήξης	0,01°C/ sec, 50αν/ °C
Θερμοκρασία έναρξης ανάκτησης	70°C
Θερμοκρασία λήξης	82°C
Θερμοκρασία ψύξης	60°C

5.4 Εφαρμογή μεθοδολογίας για ανάλυση μεταλλάξεων στο εξόνιο 20 του γονιδίου *PIK3CA* σε κλινικά δείγματα

Η παραπάνω μεθοδολογία, που όπως αναφέρθηκε παρουσιάζει ευαισθησία της τάξεως του 1% για ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 20 του *PIK3CA*¹, χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο κλινικών δειγμάτων ασθενών με καρκίνο του μαστού. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας εξετάστηκαν δείγματα DNA των κατηγοριών που ακολουθούν:

- 118 δείγματα DNA που απομονώθηκαν από κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) ασθενών με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας (adjuvant), ασθενών με διαγνωσμένη μετάσταση, καθώς και υγιών αιμοδοτών.
- 86 δείγματα cDNA που συντέθηκαν από mRNA που απομονώθηκε από CTCs περιφερικού αίματος ασθενών με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας (adjuvant), ασθενών με διαγνωσμένη μετάσταση, καθώς και υγιών αιμοδοτών.
- 82 δείγματα cell free DNA που απομονώθηκαν από πλάσμα περιφερικού αίματος ασθενών με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας (adjuvant), ασθενών με διαγνωσμένη μετάσταση, καθώς και υγιών αιμοδοτών.

5.4.1 Ανίχνευση μετάλλαξης 3140 A>G σε δείγματα γενωμικού DNA από CTCs

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος (20 mL) που ελήφθησαν από 60 ασθενείς με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας (adjuvant), 34 δείγματα από ασθενείς με διαγνωσμένη μετάσταση και 24 δείγματα από υγιείς αιμοδότες. Τα δείγματα και να αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στους πίνακες 5.5, 5.6 και 5.7.

Πίνακας 5.5 Ανάλυση δειγμάτων γενωμικού DNA από CTCs υγιών αιμοδοτών

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G		α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G
1	12N	-		13	24N	-
2	13N	-		14	25N	-
3	14N	-		15	26N	-
4	15N	-		16	27N	-
5	16N	-		17	28N	-
6	17N	-		18	30N	-
7	18N	-		19	31N	-
8	19N	-		20	33N	-
9	20N	-		21	34N	-
10	21N	-		22	35N	-
11	22N	-		23	36N	-
12	23N	-		24	37N	-
ΣΥΝΟΛΟ: 0 μεταλλαγμένα δείγματα/24 δείγματα υγιών						
ΠΟΣΟΣΤΟ 0%						

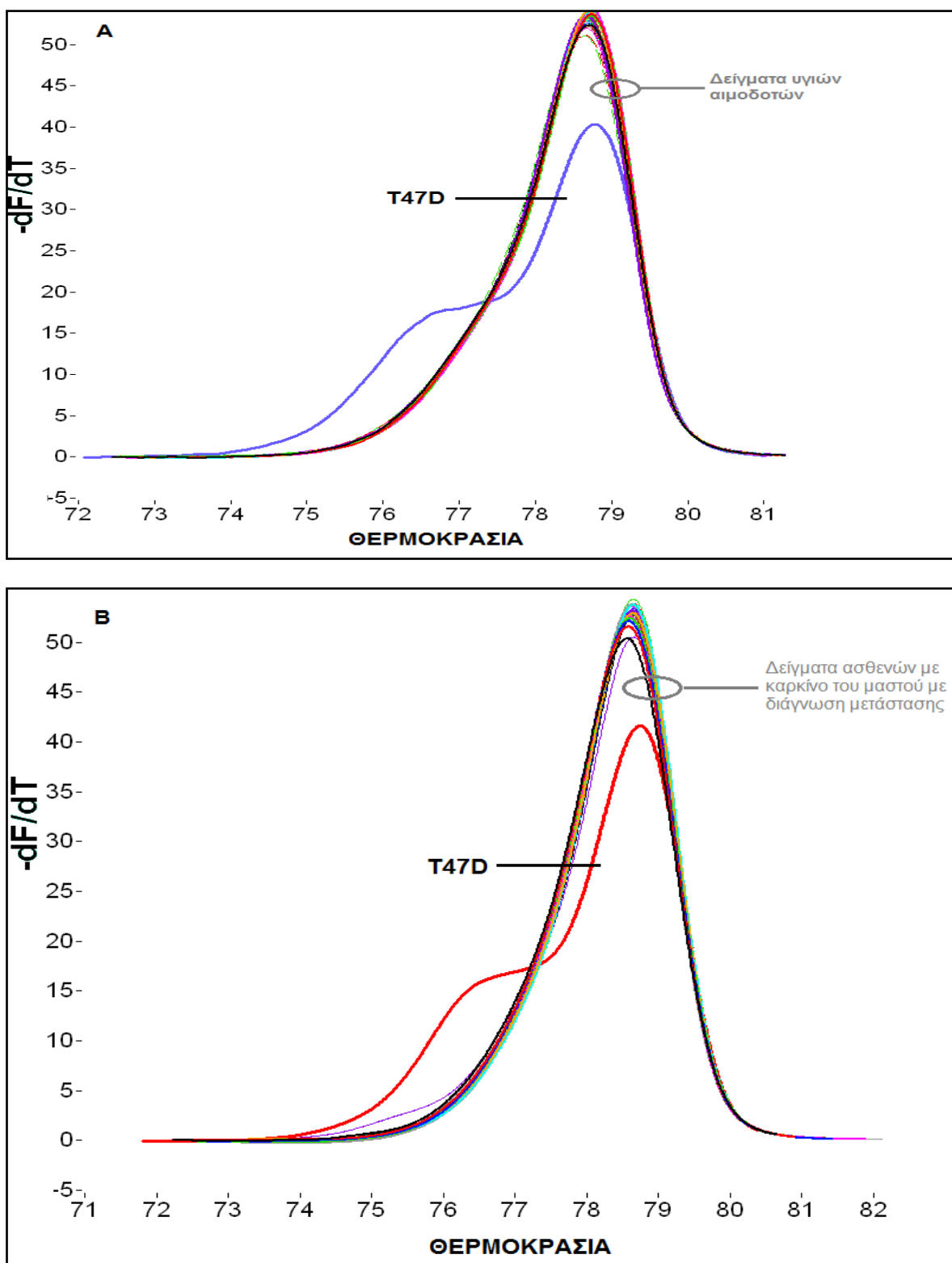
Πίνακας 5.6 Ανάλυση δειγμάτων γενωμικού DNA από CTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού με διάγνωση μετάστασης

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G		α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G
1	MET14	-		18	MET41	-
2	MET17	-		19	MET42	-
3	MET24	-		20	MET43	-
4	MET25	-		21	MET44	-
5	MET26	-		22	MET46	-
6	MET27	-		23	MET47	-
7	MET28	-		24	MET48	-
8	MET31	-		25	MET49	-
9	MET32	-		26	MET50	-
10	MET33	-		27	MET51	-
11	MET34	-		28	MET52	-
12	MET35	-		29	MET53	-
13	MET36	-		30	MET54	-
14	MET37	-		31	MET55	-
15	MET38	-		32	MET56	-
16	MET39	-		33	MET57	-
17	MET40	-		34	MET58	-
ΣΥΝΟΛΟ: 0 μεταλλαγμένα δείγματα /34 δείγματα ασθενών με μετάσταση						
ΠΟΣΟΣΤΟ: 0%						

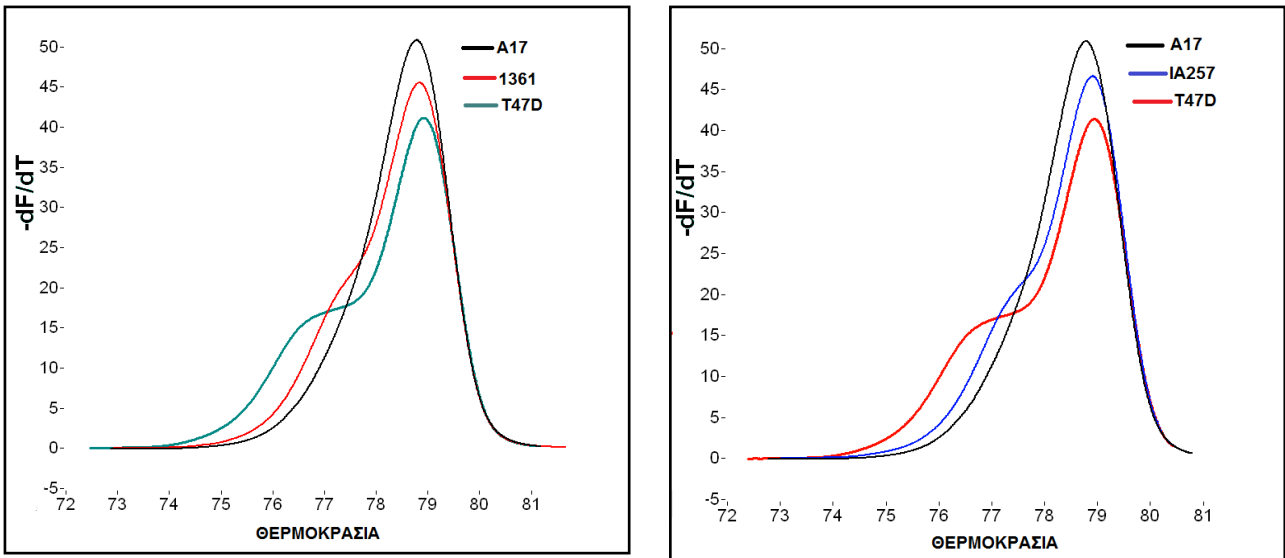
Πίνακας 5.7 Ανάλυση δειγμάτων γενωμικού DNA από CTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G		α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G
1	IA285	-		31	1417	-
2	IA287	-		32	1355	-
3	IA290	-		33	1356	-
4	IA293	-		34	1369	-
5	IA294	-		35	IA283	-
6	IA295	-		36	IA289	-
7	1320	-		37	1325	-
8	1323	-		38	1341	-
9	1332	-		39	1353	-
10	1337	-		40	1367	-
11	1340	-		41	1368	-
12	IA299	-		42	1370	-
13	IA260	-		43	1371	-
14	1361	+		44	1372	-
15	IA257	+		45	1373	-
16	IA258	-		46	1375	-
17	IA259	-		47	1387	-
18	IA261	-		48	1389	-
19	IA262	-		49	1396	-
20	IA263	-		50	1394	-
21	IA265	-		51	1393	-
22	IA269	-		52	1374	-
23	IA270	-		53	1397	-
24	IA276	-		54	1400	-
25	IA277	-		55	1401	-
26	IA278	-		56	1403	-
27	IA279	-		57	1408	-
28	IA280	-		58	1409	-
29	IA284	-		59	1416	-
30	1314	-		60	1352	-
ΣΥΝΟΛΟ: 2 μεταλλαγμένα δείγματα /60 δείγματα ασθενών προ χημειοθεραπείας						
ΠΟΣΟΣΤΟ: 3%						

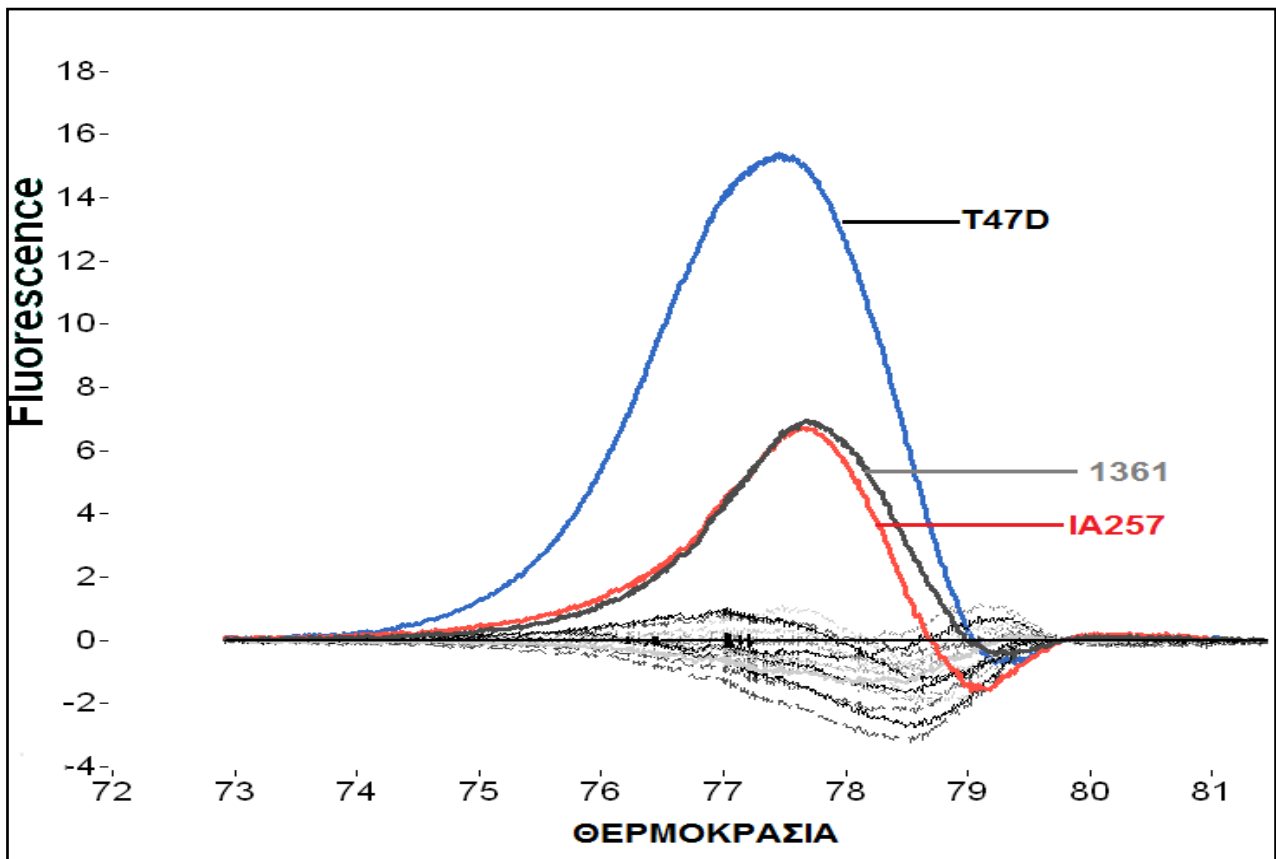
Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR
Ακολουθούν κάποια χαρακτηριστικά καταγραφίματα ανάλυσης καμπυλών τήξεων, όπου παρουσιάζονται τα φυσιολογικά (Εικόνα 5.1Α, 5.1Β) και τα μεταλλαγμένα δείγματα (Εικόνα 5.1Γ, Εικόνα 5.2).



Εικόνα 5.1 Καταγραφίματα καμπυλών τήξεως Α.δειγμάτων υγιών αιμοδοτών Β.δειγμάτων ασθενών με καρκίνο του μαστού με διάγνωση μετάστασης. T47D: θετικός μάρτυρας



Εικόνα 5.1Γ Καταγραφήματα καμπυλών τήξεως δειγμάτων ασθενών με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας.



Εικόνα 5.2 Καταγράφημα διαφοράς φθορισμού όπου παρουσιάζονται τα δύο μεταλλαγμένα δείγματα. Στη βάση με γκρι χρώμα παρουσιάζονται τα φυσιολογικά δείγματα.

5.4.2 Ανίχνευση μετάλλαξης 3140 A>G σε δείγματα cDNA που συντέθηκαν από mRNA που απομονώθηκε από CTCs

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δείγματα cDNA που συντέθηκαν από mRNA που απομονώθηκε από CTCs περιφερικού αίματος 56 ασθενών με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας (adjuvant), 10 ασθενών με διαγνωσμένη μετάσταση, καθώς και 20 υγιών αιμοδοτών. Τα δείγματα και να αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στους πίνακες 5.8, 5.9 και 5.10.

Πίνακας 5.8 Ανάλυση δειγμάτων cDNA από CTCs υγιών αιμοδοτών

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G		α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G
1	17N	-		11	28N	-
2	18N	-		12	29N	-
3	19N	-		13	30N	-
4	21N	-		14	31N	-
5	22N	-		15	32N	-
6	23N	-		16	33N	-
7	24N	-		17	34N	-
8	25N	-		18	35N	-
9	26N	-		19	36N	-
10	27N	-		20	37N	-
ΣΥΝΟΛΟ: 0 μεταλλαγμένα δείγματα /20 δείγματα υγιών αιμοδοτών						
ΠΟΣΟΣΤΟ: 0%						

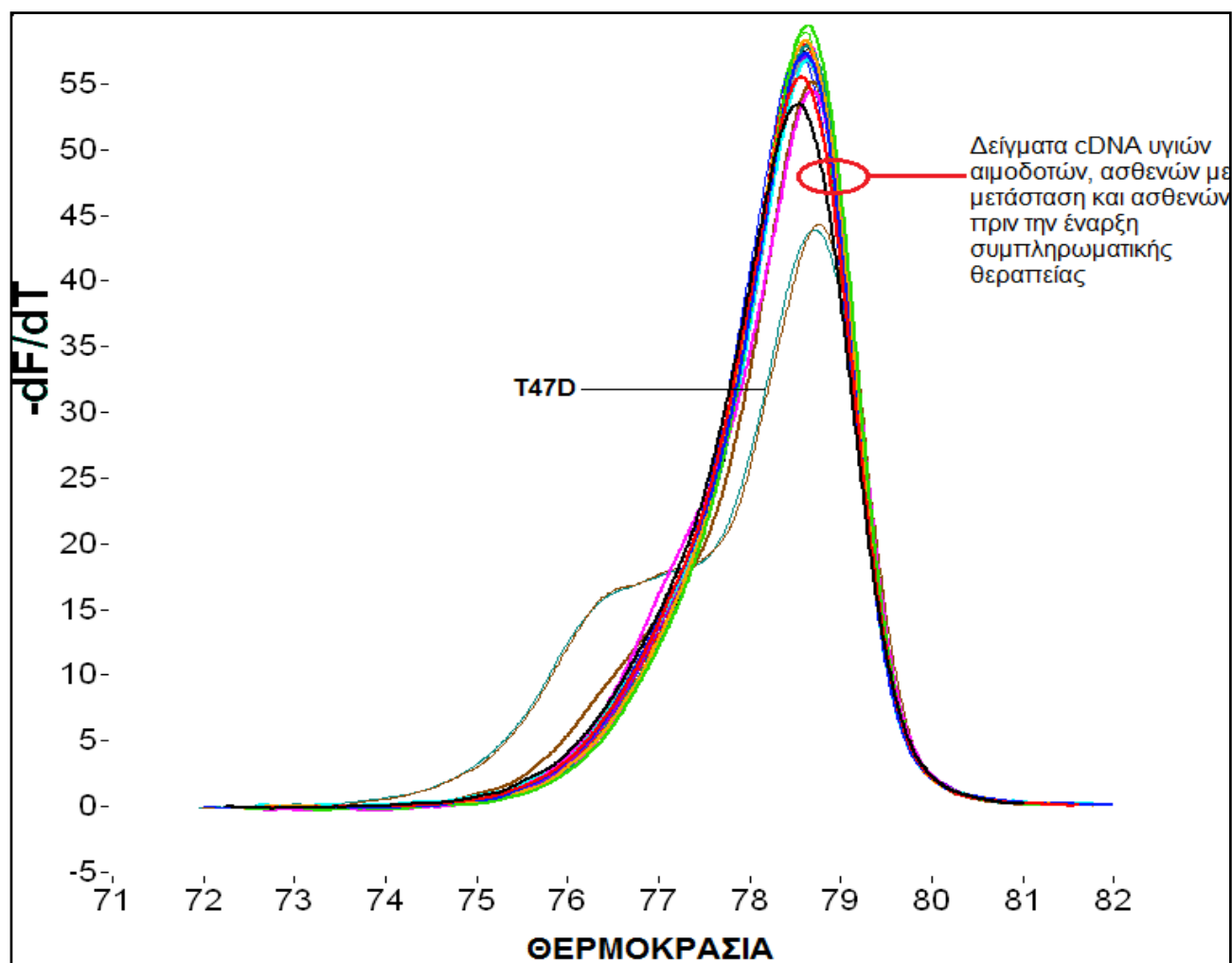
Πίνακας 5.9 Ανάλυση δειγμάτων cDNA από CTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού με διάγνωση μετάστασης

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G		α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G
1	MET37	-		6	MET42	-
2	MET38	-		7	MET43	-
3	MET39	-		8	MET44	-
4	MET40	-		9	MET45	-
5	MET42	-		10	MET46	-
ΣΥΝΟΛΟ: 0 μεταλλαγμένα δείγματα /10 δείγματα ασθενών με διάγνωση μετάστασης						
ΠΟΣΟΣΤΟ: 0%						

Πίνακας 5.10 Ανάλυση δειγμάτων cDNA από CTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G		α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G
1	1416	-		29	1361	-
2	1417	-		30	IA257	-
3	IA259	-		31	IA258	-
4	1320	-		32	IA294	-
5	IA261	-		33	1409	-
6	IA262	-		34	IA299	-
7	IA263	-		35	1353	-
8	1323	-		36	1355	-
9	IA269	-		37	1356	-
10	IA270	-		38	1367	-
11	1325	-		39	1368	-
12	IA277	-		40	1370	-
13	IA278	-		41	1371	-
14	IA279	-		42	1372	-
15	IA280	-		43	1373	-
16	IA283	-		44	1375	-
17	IA284	-		45	1387	-
18	IA285	-		46	1389	-
19	IA287	-		47	1369	-
20	IA289	-		48	1374	-
21	IA290	-		49	1393	-
22	IA293	-		50	1394	-
23	IA295	-		51	1396	-
24	1314	-		52	1397	-
25	1332	-		53	1400	-
26	1337	-		54	1401	-
27	1340	-		55	1403	-
28	1341	-		56	1408	-
ΣΥΝΟΛΟ: 0 μεταλλαγμένα δείγματα /56 δείγματα ασθενών προ χημειοθεραπείας						
ΠΟΣΟΣΤΟ: 0%						

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR. Ακολουθεί χαρακτηριστικό καταγράφημα ανάλυσης καμπυλών τήξεων, όπου παρουσιάζονται τα φυσιολογικά δείγματα, τα μεταστατικά και δείγματα ασθενών με καρκίνο του μαστού πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας. (Εικόνα 5.3).



Εικόνα 5.3 Καταγράφημα καμπυλών τήξεως όπου όλες οι κατηγορίες δειγμάτων (υγιείς, μεταστατικοί και προ επικουρικής θεραπείας) δε φέρουν τη μετάλλαξη στο εξόνιο 20 του *PIK3CA*

5.4.3 Ανίχνευση μετάλλαξης 3140 A>G σε δείγματα cell free DNA από περιφερικό αίμα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δείγματα cell free DNA που απομονώθηκαν από το περιφερικό αίμα 25 ασθενών με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας (adjuvant), 45 ασθενών με διαγνωσμένη μετάσταση, καθώς και 12 υγιών αιμοδοτών. Τα δείγματα και τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στους πίνακες 5.11, 5.12 και 5.13.

Πίνακας 5.11 Ανάλυση δειγμάτων cell free DNA από περιφερικό αίμα υγιών αιμοδοτών

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G		α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G
1	18N	-		7	32N	-
2	19N	-		8	33N	-
3	20N	-		9	34N	-
4	21N	-		10	35N	-
5	22N	-		11	36N	-
6	31N	-		12	37N	-
ΣΥΝΟΛΟ: 0 μεταλλαγμένα δείγματα /12 δείγματα υγιών αιμοδοτών						
ΠΟΣΟΣΤΟ: 0%						

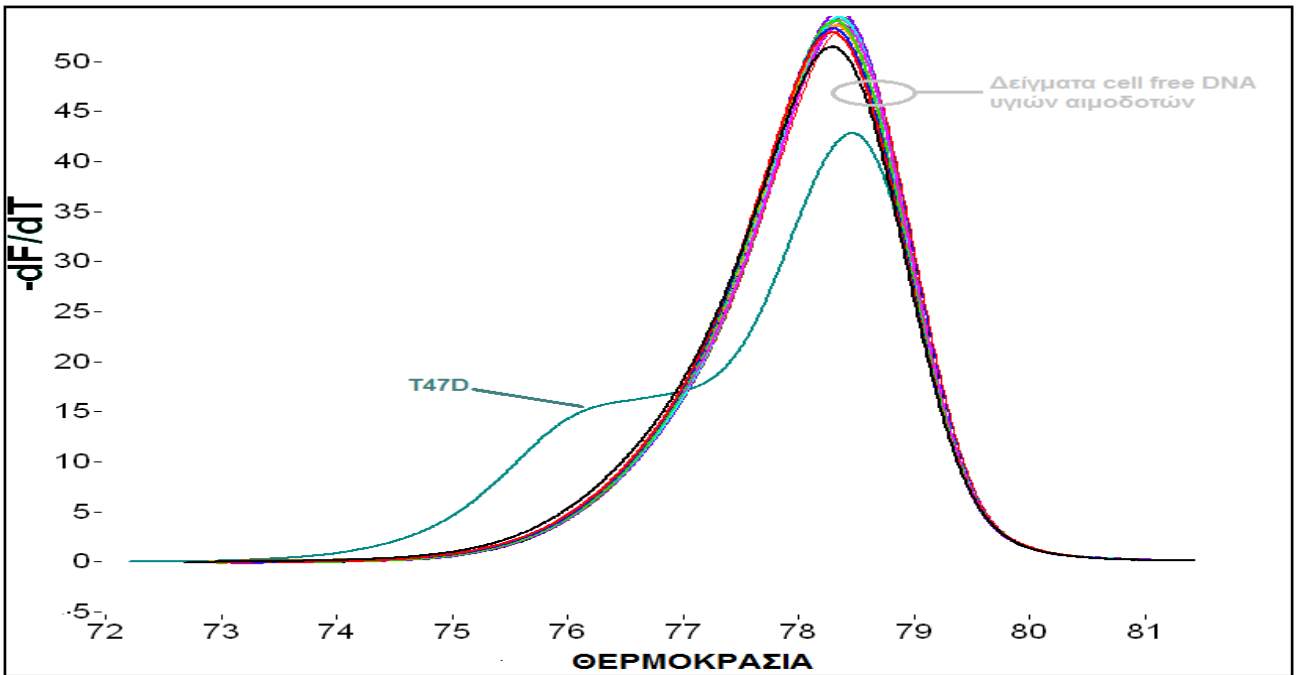
Πίνακας 5.12 Ανάλυση δειγμάτων cell free DNA από περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G		α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G
1	240B	-		14	265B	-
2	241B	-		15	266B	+
3	242B	-		16	267B	-
4	243B	-		17	270B	-
5	244B	-		18	271B	-
6	245B	-		19	272B	-
7	248B	-		20	273B	-
8	249B	-		21	274B	+
9	252B	-		22	275B	-
10	255B	-		23	276B	-
11	256B	-		24	279B	+
12	258B	-		25	280B	-
13	260B	-				
ΣΥΝΟΛΟ: 3 μεταλλαγμένα δείγματα /25 δείγματα ασθενών προ χημειοθεραπείας						
ΠΟΣΟΣΤΟ: 12%						

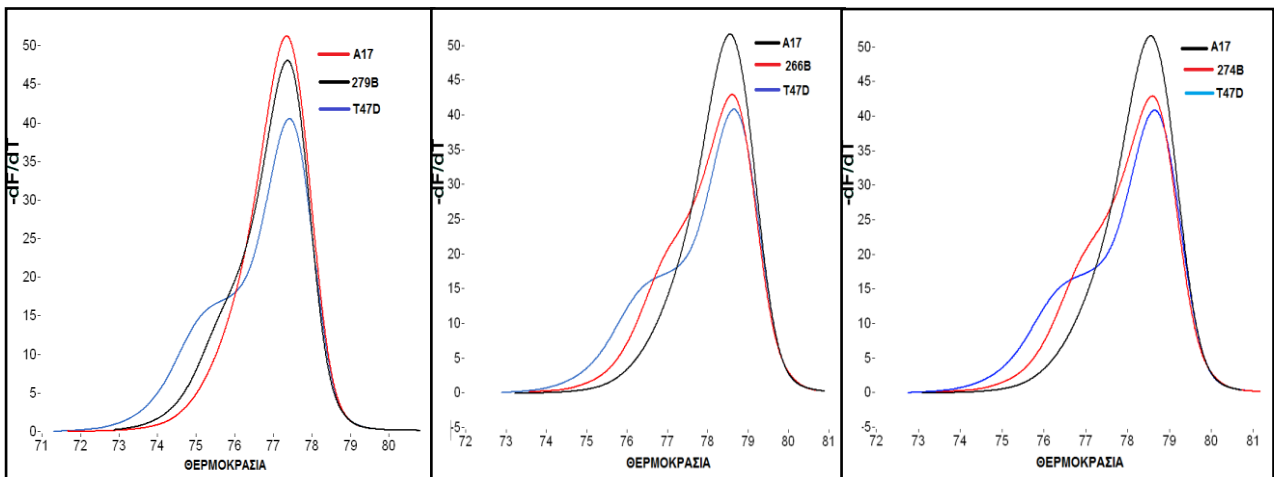
Πίνακας 5.13 Ανάλυση δειγμάτων cell free DNA από περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού και διάγνωση μετάστασης

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G		α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G
1	281B	-		24	304B	-
2	282B	-		25	305B	+
3	283B	-		26	306B	-
4	284B	-		27	307B	+
5	285B	-		28	308B	+
6	286B	-		29	309B	-
7	287B	-		30	310B	-
8	288B	-		31	311B	+
9	289B	-		32	312B	-
10	290B	-		33	313B	-
11	291B	-		34	314B	-
12	292B	-		35	315B	-
13	293B	-		36	316B	-
14	294B	-		37	317B	-
15	295B	+		38	318B	-
16	296B	-		39	319B	-
17	297B	-		40	320B	-
18	298B	+		41	321B	-
19	299B	+		42	322B	-
20	300B	-		43	323B	-
21	301B	+		44	324B	-
22	302B	+		45	325B	-
23	303B	-				
ΣΥΝΟΛΟ: 9 μεταλλαγμένα δείγματα /45 δείγματα ασθενών με μετάσταση						
ΠΟΣΟΣΤΟ: 20%						

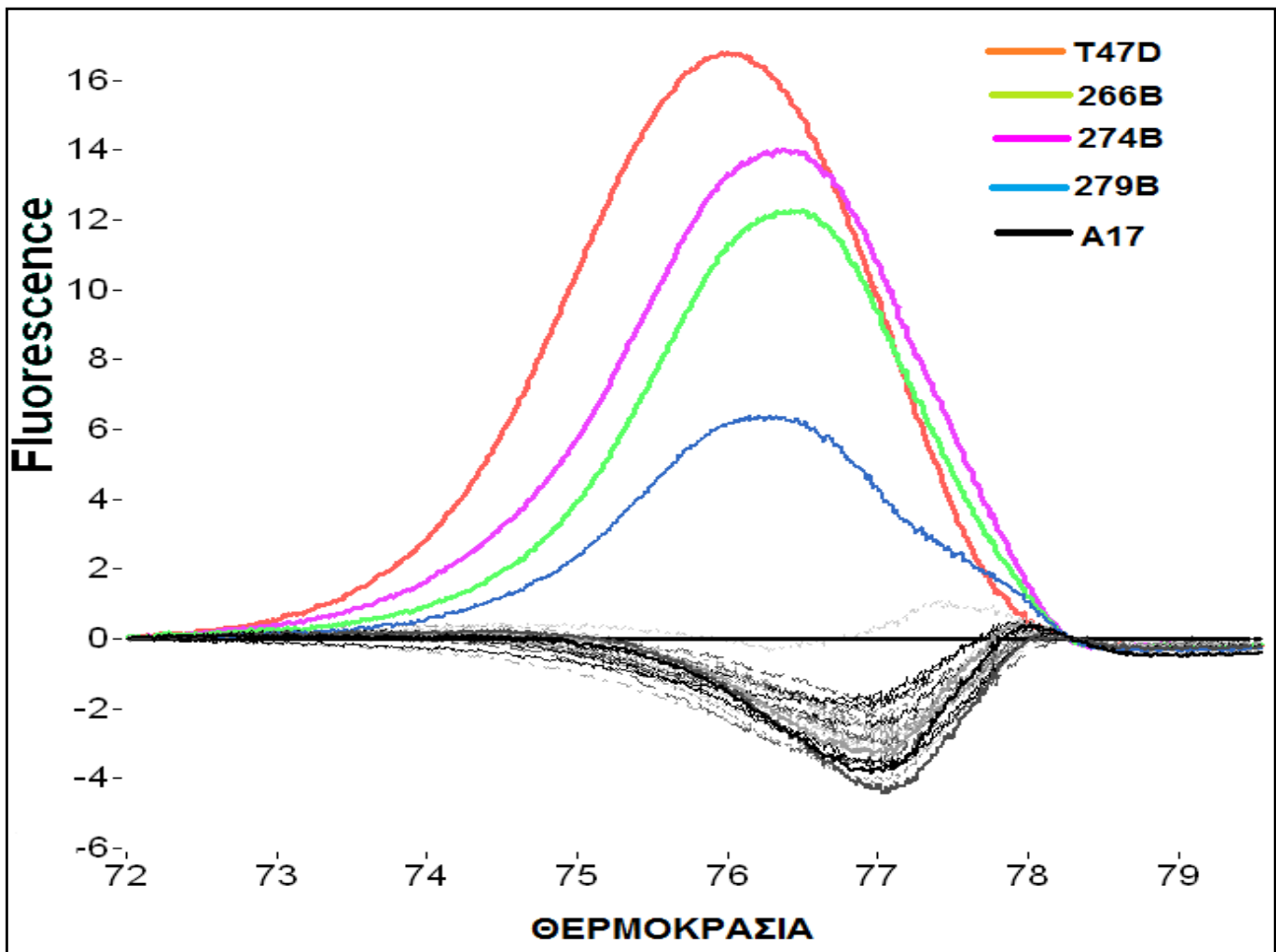
Ακολουθούν κάποια χαρακτηριστικά καταγραφήματα ανάλυσης καμπυλών τήξεων, όπου παρουσιάζονται τα φυσιολογικά (**Εικόνα 5.4**) και τα μεταλλαγμένα δείγματα, ασθενών μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας (**Εικόνα 5.5, Εικόνα 5.6**) και ασθενών με μετάσταση (**Εικόνα 5.7, Εικόνα 5.8**).



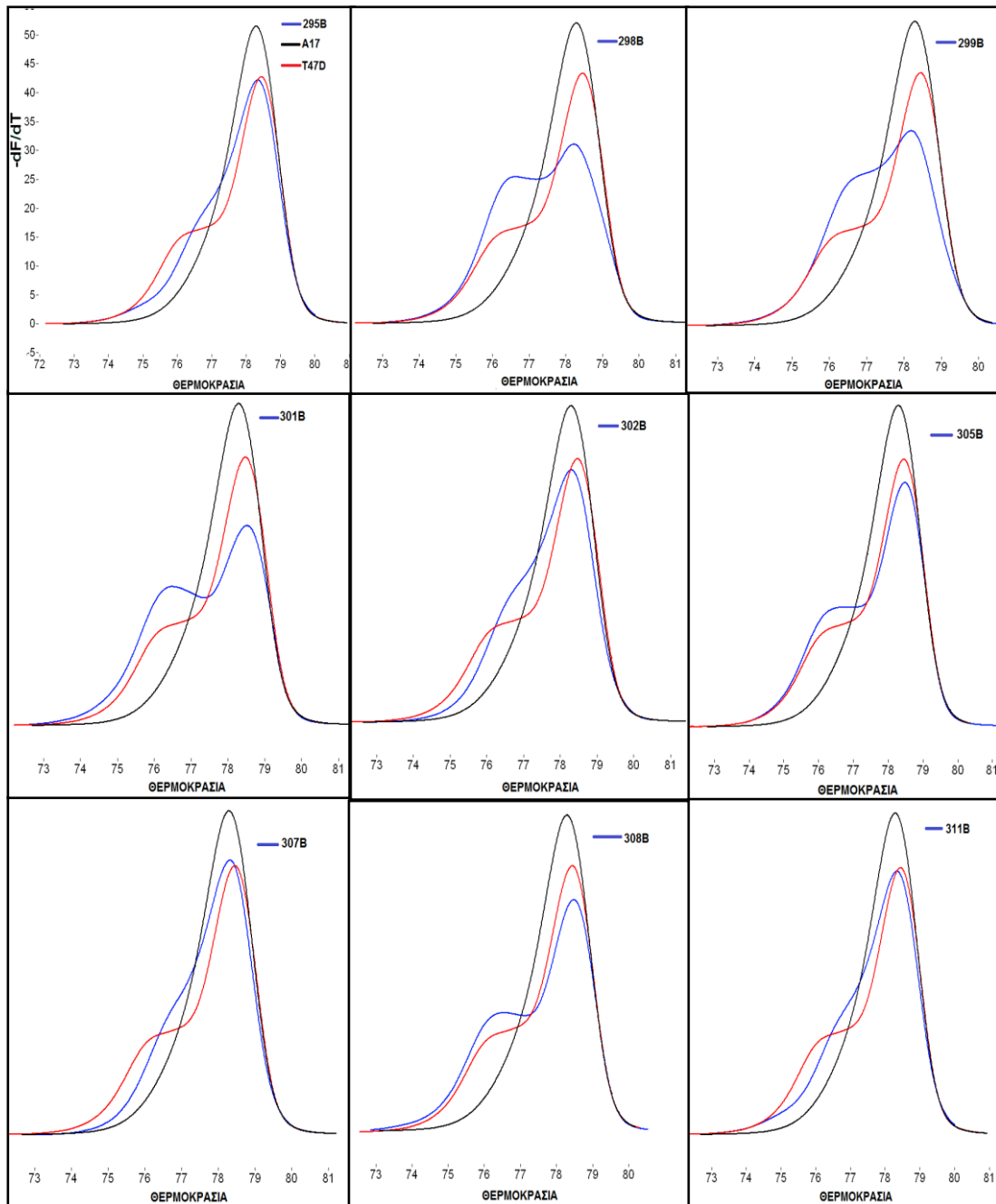
Εικόνα 5.4 Καταγράφημα καμπυλών τήξεως δειγμάτων cell free DNA υγιών αιμοδοτών



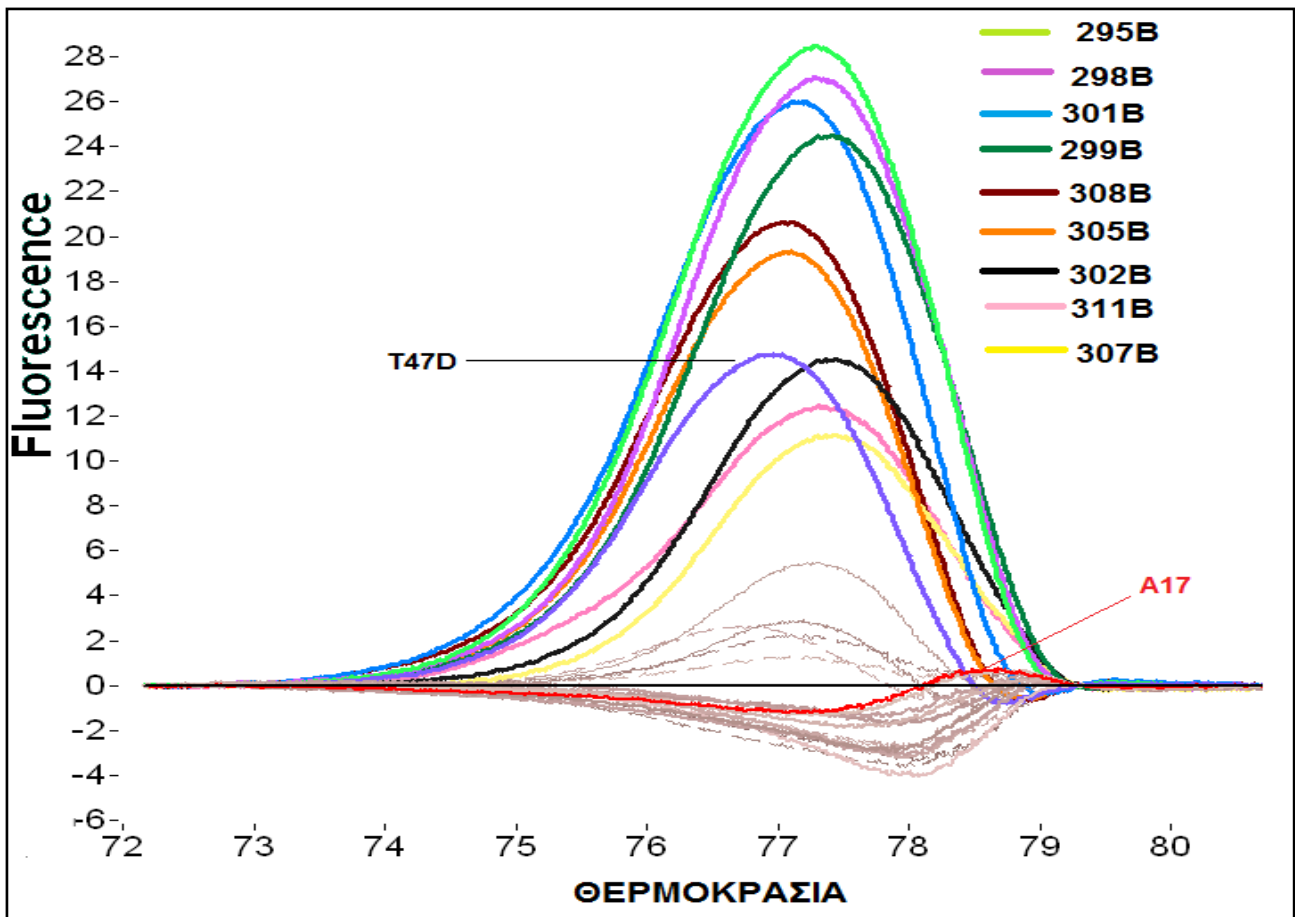
Εικόνα 5.5 Καταγραφήματα καμπυλών τήξεως μεταλλαγμένων δειγμάτων cell free DNA ασθενών μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας



Εικόνα 5.6 Καταγράφημα διαφοράς φθορισμού όπου παρουσιάζονται τα τρία μεταλλαγμένα δείγματα. Στη βάση με γκρι χρώμα παρουσιάζονται τα φυσιολογικά δείγματα.



Εικόνα 5.7 Καταγραφήματα καμπυλών τήξεως μεταλλαγμένων δειγμάτων cell free DNA ασθενών με διάγνωση μετάστασης



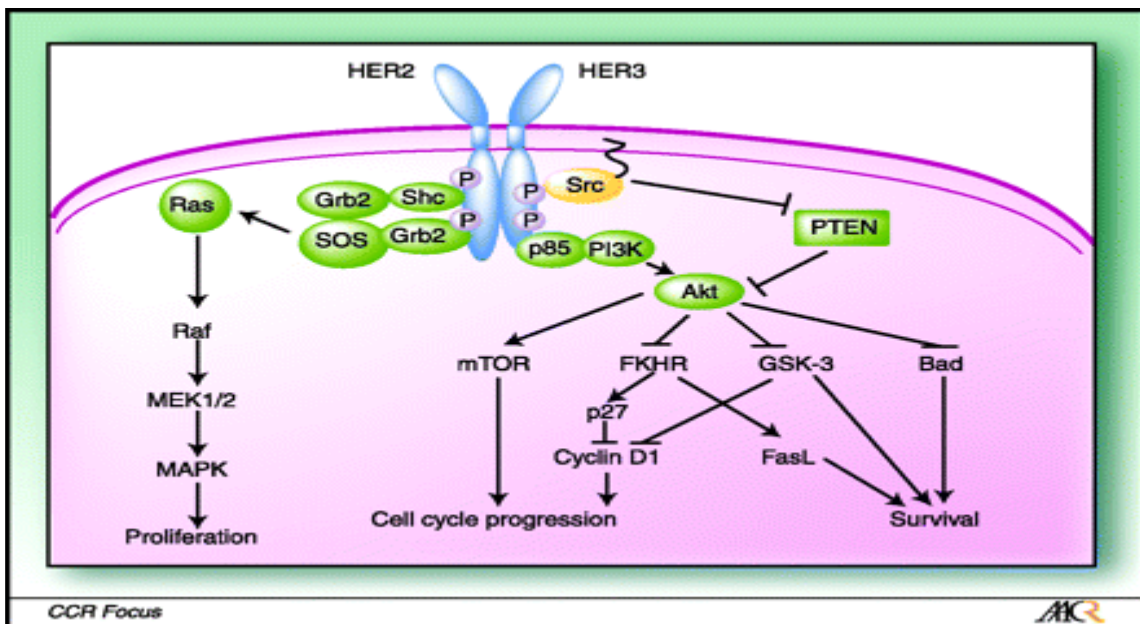
Εικόνα 5.8 Καταγράφημα διαφοράς φθορισμού όπου παρουσιάζονται τα εννέα μεταλλαγμένα δείγματα από ασθενείς με μετάσταση. Στη βάση με γκρι χρώμα παρουσιάζονται τα φυσιολογικά δείγματα.

5.5 Ανίχνευση μετάλλαξης 3140 A>G σε δείγματα γενωμικού DNA από ιστούς παραφίνης από ασθενείς με καρκίνο του μαστού

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε έλεγχος 31 δειγμάτων από ιστούς παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού για την παρουσία ή όχι της μετάλλαξης στο εξόνιο 20 του γονιδίου *PIK3CA*. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με ανάλυση καμπυλών τήξης HRMA στα πλαίσια της μελέτης που διενεργείται από το εργαστήριό μας σε συνεργασία με το εργαστήριο του Πανεπιστημίου της Κρήτης, και αφορά στον έλεγχο της συσχέτισης του μονοπατιού *PIK3CA-PTEN* με την ανταπόκριση ασθενών με καρκίνο του μαστού στη θεραπευτική αγωγή με *Herceptin*. Οι παραπάνω ασθενείς έχουν διαγνωσθεί με καρκίνο του μαστού, έχουν λάβει θεραπευτική αγωγή με *Herceptin* και γνωρίζουμε την ανταπόκριση που έδειξαν στη θεραπεία αυτή, καθώς και όλα τα κλινικά τους στοιχεία.

5.5.1 Εμπλοκή του μονοπατιού της PI3K στην αντίσταση στη θεραπευτική αγωγή με Herceptin ασθενών με καρκίνο του μαστού

Η θεραπεία με Herceptin χρησιμοποιείται σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού που υπερεκφράζουν το **HER2** (υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2, **Human Epidermal growth factor Receptor 2**), ένα υποδοχέα κινάσης της τυροσίνης. (Σχήμα 5.2) Το Herceptin είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1 που δεσμεύεται στην εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα HER2. Έχει προταθεί ότι το Herceptin δρα είτε αναστέλλοντας τη δράση του μονοπατιού PI3K/AKT, είτε με αναστολή της δράσης του HER2 υποδοχέα¹⁴¹, είτε με αύξηση της ενεργότητας της φωσφατάσης PTEN¹⁴². Σήμερα, είναι γενικώς άγνωστο το γιατί περίπου μισοί από τους ασθενείς που εκφράζουν τον HER2 κυτταρικό υποδοχέα δεν ανταποκρίνονται σε θεραπεία με το φάρμακο Herceptin. Μελέτες που δημοσιεύτηκαν τα τελευταία χρόνια εμπλέκουν το μονοπάτι PI3K/PTEN στην αντίσταση στο Herceptin. Έχει παρουσιαστεί ότι απώλεια της λειτουργίας της φωσφατάσης PTEN προκαλεί αντίσταση στη θεραπεία με Herceptin¹⁴², ενώ πιο πρόσφατες εργασίες εμπλέκουν το μονοπάτι PI3K/PTEN είτε με απώλεια της λειτουργίας της φωσφατάσης είτε με μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA*¹⁴³. Βλέπουμε λοιπόν πόσο σημαντικό είναι για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία η ανίχνευση των μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA*.



Σχήμα 5.2 Το σηματοδοτικό μονοπάτι του HER2 και η σύνδεσή του με το μονοπάτι PI3K/PTEN

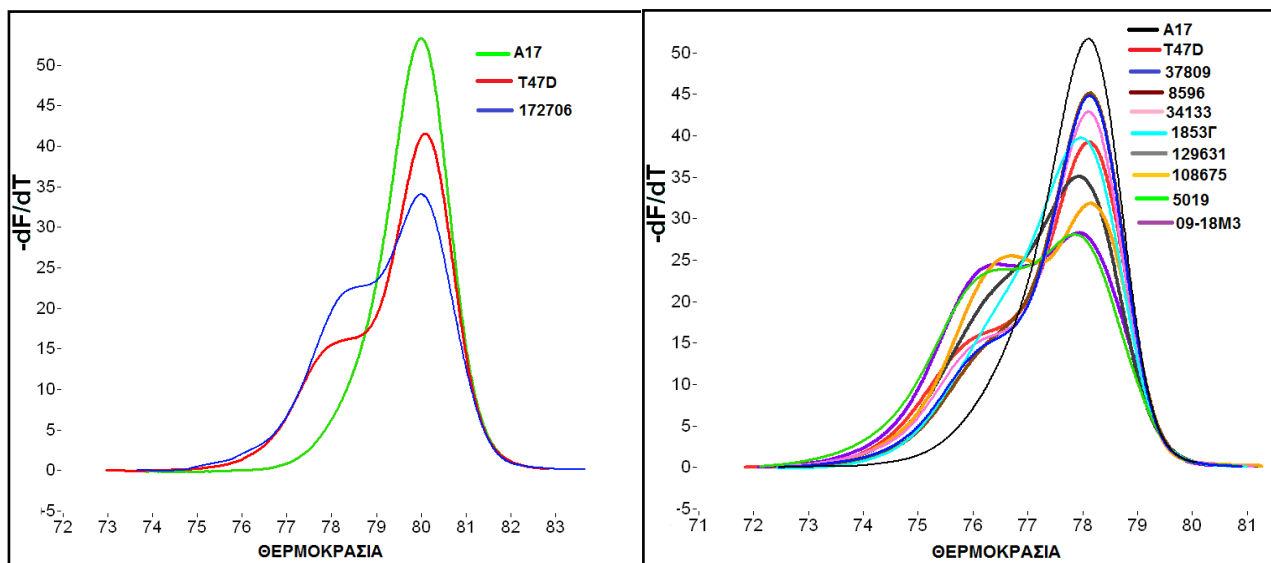
5.5.2 Αποτελέσματα

Στον Πίνακα 5.14 που ακολουθεί καταγράφονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης των παραπάνω δειγμάτων.

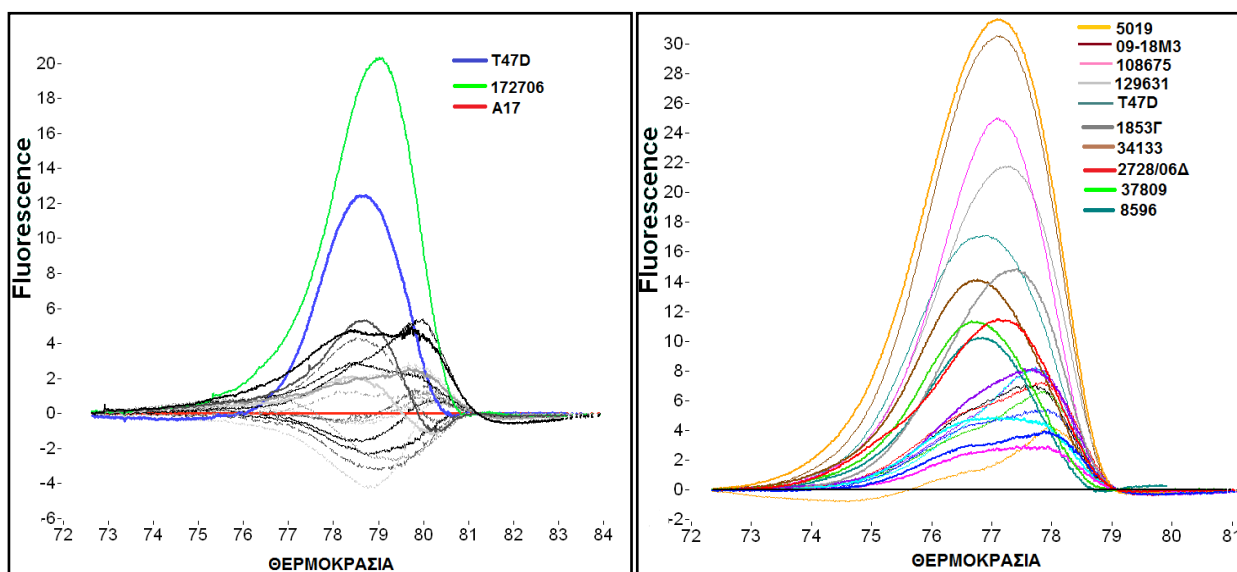
Πίνακας 5.14 Ανάλυση δειγμάτων ιστών παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G		α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G
1	2728/06Δ	+		17	129631	+
2	37702	-		18	1199	-
3	37809	+		19	09-18M3	+
4	5019	+		20	5198/02	-
5	518/10	-		21	139551	-
6	1853Γ	+		22	158370	-
7	3572/08	-		23	172706	+
8	34133	+		24	182339	-
9	8596	+		25	201307	-
10	204086	-		26	199900	-
11	110682	-		27	160065	-
12	772/06	-		28	193576	-
13	101177	-		29	159115	-
14	83044B	-		30	180643	-
15	108675	+		31	189326	-
16	128800	-				
ΣΥΝΟΛΟ: 10 μεταλλαγμένα δείγματα /31 δείγματα ιστών ασθενών με καρκίνο μαστού						
ΠΟΣΟΣΤΟ: 32%						

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR. Ακολουθούν κάποια χαρακτηριστικά καταγραφόμενα ανάλυσης καμπυλών τήξεων, όπου παρουσιάζονται τα φυσιολογικά και τα μεταλλαγμένα δείγματα, ασθενών με καρκίνο του μαστού. (Εικόνα 5.9, Εικόνα 5.10)



Εικόνα 5.9 Καταγράφημα καμπυλών τήξεως δειγμάτων από ιστούς παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού



Εικόνα 5.10 Καταγράφημα διαφοράς φθορισμού δειγμάτων από ιστούς παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης είχαν ελεγχθεί στο παρελθόν, κατά την εκπόνηση της ερευνητικής εργασίας του Βορκά Π, 75 ακόμα δείγματα ιστών παραφίνης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης συνοψίζονται στον Πίνακα 5.15 που ακολουθεί.

Πίνακας 5.15 Ανάλυση δειγμάτων ιστών παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού (2008)

α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G		α/α	Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη 3140 A>G
1	H13	-		39	H1	-
2	H24	+		40	H49	-
3	H42	-		41	H47	+
4	H43	+		42	H65	-
5	H71	-		43	H9	-
6	H23	+		44	H7	-
7	H12	+		45	H58	-
8	H10	+		46	H39	-
9	H50	+		47	H51	-
10	H67	+ (3136G>A)		48	H6	-
11	H26	-		49	H3	-
12	H57	+		50	H46	-
13	H17	-		51	H19	-
14	H36	-		52	H66	-
15	H68	-		53	H35	-
16	H22	-		54	H59	-
17	H2	+		55	H52	-
18	H18	+		56	H73	-
19	H34	-		57	H32	+
20	H53	+		58	H31	+
21	H69	-		59	H60	-
22	H25	+		60	H63	-
23	H4	-		61	H40	+
24	H38	-		62	H44	-
25	H74	+		63	H45	-
26	H33	+		64	H37	-
27	H56	-		65	H16	-
28	H41	-		66	H14	-
29	H62	-		67	H15	-
30	H55	-		68	H5	-
31	H54	-		69	H72	-
32	H61	+ (A>T)		70	H20	-
33	H64	-		71	H75	-
34	H28	+		72	H48	-
35	H27	+		73	H29	-
36	H8	+		74	H30	+
37	H70	+		75	H21	-
38	H11	+				
ΣΥΝΟΛΟ: 23 μεταλλαγμένα δείγματα/75 δείγματα ιστών ασθενών με καρκίνο μαστού						
ΠΟΣΟΣΤΟ: 30%						

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα των δύο πινάκων καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα: Χρησιμοποιώντας την μέθοδο ανάλυσης καμπυλών τήξεως (HRMA) ελέγξαμε συνολικά 106 δείγματα DNA από ιστούς παραφίνης ασθενών με καρκίνο του μαστού. Από τα 106 δείγματα βρέθηκε ότι 33 από αυτά φέρουν τη μετάλλαξη 3140 A>G στο εξόνιο 20 του γονιδίου *PIK3CA*. Δηλαδή το ποσοστό εμφάνισης της μετάλλαξης είναι 31%.

Στο επόμενο στάδιο θα πραγματοποιηθεί μελέτη των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης PTEN με ανοσοϊστοχημεία για τη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών. Οι ασθενείς αυτοί έχουν ήδη λάβει τη θεραπεία με το Herceptin και γνωρίζουμε και την ανταπόκριση τους σε αυτή. Η ολοκλήρωση τόσο της μελέτης παρουσίας μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA*, όσο και της μελέτης των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης PTEN θα συμβάλει στη συσχέτιση του μονοπατιού PI3K/PTEN με την ανταπόκριση στη θεραπεία με Herceptin ασθενών με καρκίνο του μαστού που υπερεκφράζουν το HER2.

5.6 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό έγινε καταγραφή και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν μετά από ανάλυση τριών διαφορετικών κατηγοριών δειγμάτων DNA με ανάλυση καμπυλών τήξεως (HRMA). Η μέθοδος αναπτύχθηκε σε προηγούμενη ερευνητική εργασία και εφαρμόστηκε τώρα με επιτυχία σε δείγματα DNA που απομονώθηκαν από ιστούς ασθενών με καρκίνου του μαστού. Η εφαρμογή αυτή συνεχίστηκε και στην παρούσα εργασία, όπου ελέγχθηκαν 31 δείγματα ιστών. Παρατηρούμε ότι η συγκεκριμένη μέθοδος έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει την παρουσία της μετάλλαξης στα δείγματα DNA από ιστούς και τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν το αυξημένο ποσοστό εμφάνισης της μετάλλαξης 3140A>G στο γονίδιο *PIK3CA* σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (31%).

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης έγινε εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα DNA που απομονώθηκαν από CTC, σε δείγματα cDNA που συντέθηκαν από mRNA που απομονώθηκε από CTC, καθώς και σε δείγματα cell free DNA. Ελέγχθηκαν τρεις ομάδες ατόμων: υγιείς αιμοδότες (για να επιβεβαιωθεί ότι η μέθοδος δε δίνει ψευδώς θετικά αποτελέσματα), ασθενείς με καρκίνο του μαστού οι οποίοι έχουν διαγνωσθεί με μετάσταση και τέλος ασθενείς με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας. Στις τρεις κατηγορίες δειγμάτων από υγιείς αιμοδότες δεν βρέθηκε η συγκεκριμένη μετάλλαξη, όπως ήταν αναμενόμενο. Στις τρεις κατηγορίες δειγμάτων από ασθενείς με καρκίνο του μαστού με διάγνωση μετάστασης, βρέθηκε η συγκεκριμένη μετάλλαξη σε ποσοστό 20% μόνο σε δείγματα cell free DNA, ενώ δε βρέθηκε μετάλλαξη στο γενωμικό DNA και στο cDNA από CTCs. Τέλος, στις τρεις κατηγορίες δειγμάτων από ασθενείς με καρκίνο του μαστού μετά το χειρουργείο και πριν

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας, βρέθηκε η συγκεκριμένη μετάλλαξη σε ποσοστό 12% σε δείγματα cell free DNA και 3% σε δείγματα γενωμικού DNA από CTCs.

Φαίνεται, λοιπόν, ότι η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει μεταλλάξεις στο γονίδιο PIK3CA τόσο σε δείγματα cell free DNA, όσο και σε δείγματα γενωμικού DNA από CTCs ασθενών με καρκίνο του μαστού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ARMS-PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ 3140 A>G ΤΟΥ *PIK3CA* ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

6.1 Εισαγωγή

Μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις που έχουν να αντιμετωπίσουν σήμερα τα μοριακά διαγνωστικά εργαστήρια είναι η ανίχνευση μεταλλάξεων σε δείγματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε καρκινικά κύτταρα που φέρουν τη μετάλλαξη, παρουσία φυσιολογικών κυττάρων. Το γεγονός ότι το όριο ανίχνευσης μεταλλάξεων κυμαίνεται περίπου στο 5-20% για τη μέθοδο του Sequencing, που θεωρείται το «χρυσό πρότυπο» καθιστά αναγκαία την εφαρμογή στρατηγικών για τον εμπλουτισμό των δειγμάτων με μεταλλαγμένες αλληλουχίες, έτσι ώστε να είναι πιο εύκολα ανιχνεύσιμες.¹⁴⁴

Οι σωματικές μεταλλάξεις συνήθως υπάρχουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα παρουσία υψηλών επιπέδων φυσιολογικών αλληλουχιών wild-type που λειτουργούν σαν υπόβαθρο. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη μεθόδων με μεγαλύτερη ευαισθησία συγκριτικά με αυτές που χρησιμοποιούνται για ανάλυση μεταλλάξεων στη γαμετική σειρά.

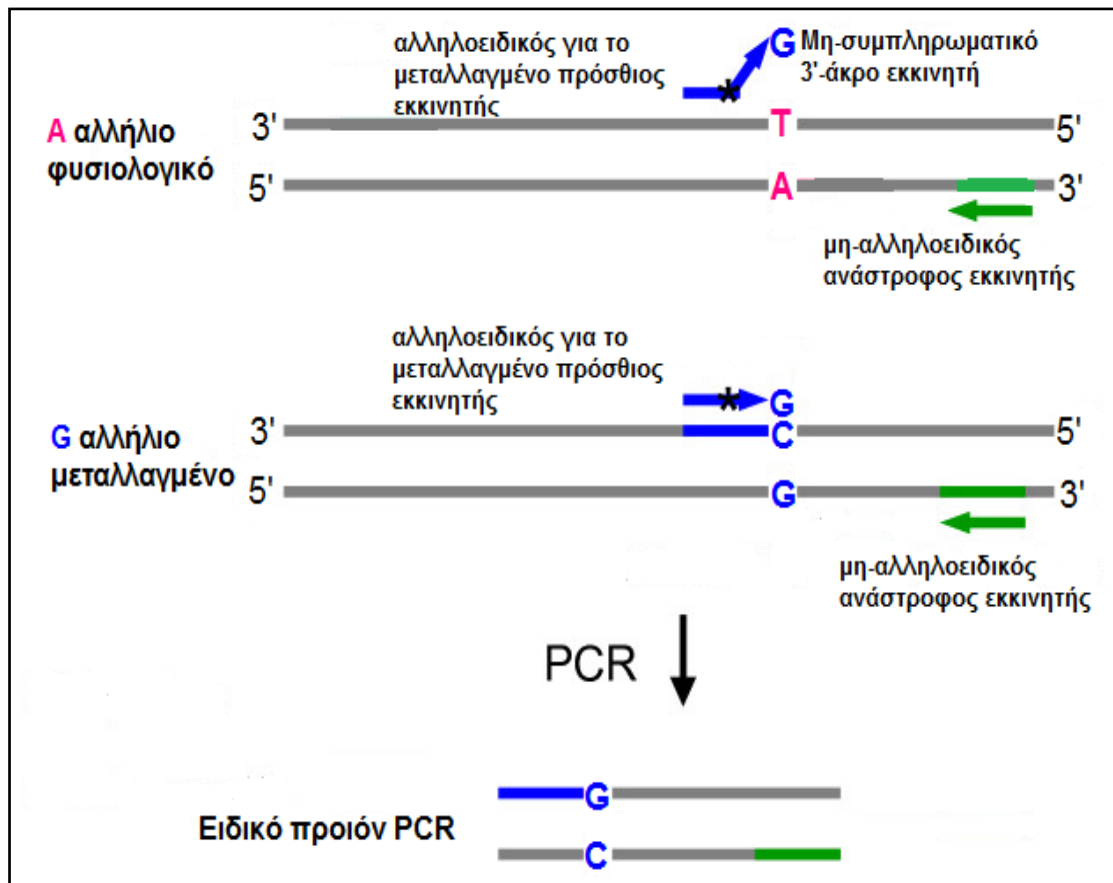
6.2 Amplification Refractory Mutation System PCR (ARMS-PCR)

Η μεθοδολογία της ARMS-PCR αποσκοπεί στην ανίχνευση μεταλλάξεων στο DNA με τη χρήση **αλληλοειδικού εκκινητή (allele-specific primer)** για την επιλεκτική ενίσχυση του μεταλλαγμένου αλληλίου.

Για πρώτη φορά παρουσιάστηκε στη βιβλιογραφία το 1989 από τους Newton et al⁶⁰, ως μία νέα μέθοδος που χαρακτηρίζεται από απλότητα και υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, η οποία έχει την ικανότητα να απομονώνει χαμηλά επίπεδα μεταλλαγμένων αλληλίων παρουσία περίσσειας φυσιολογικού DNA. Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να αποτελέσει τη μέθοδο επιλογής για την ανίχνευση μεταλλάξεων σε πολλές διαγνωστικές και ερευνητικές εφαρμογές. Ακολουθώντας μια αντίδραση ARMS-PCR, η παρουσία ή απουσία προϊόντος έχει διαγνωστική σημασία για την παρουσία ή απουσία του αλληλίου-στόχο. Αυτό συμβαίνει διότι, με τη συγκεκριμένη μέθοδο παρατηρείται ενίσχυση μόνο παρουσία της ειδικής μετάλλαξης που μελετάται σε κάθε περίπτωση και σε γνωστή θέση. Η επιβεβαίωση της λήψης του σωστού και επιθυμητού προϊόντος γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης, όπου προσδιορίζεται το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης και

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR ελέγχεται η παρουσία παραπροϊόντων. Άρα, η ARMS-PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση μεταλλαγμένων και φυσιολογικών δειγμάτων, χωρίς να απαιτείται ο συνδυασμός της με κάποια άλλη τεχνική ανίχνευσης μεταλλάξεων (HRMA, RFLPs, Sequencing, Pyrosequencing), όπως συμβαίνει με τη Real-time PCR με μη αλληλοειδικό εκκινητή. Επιπλέον, μπορεί ξεκάθαρα να διακρίνει ετεροζυγώτες και ομοζυγώτες και για τα δύο αλληλία για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη μετά την ηλεκτροφόρηση.

Η αρχή στην οποία στηρίζεται η μεθοδολογία αυτή είναι ότι ολιγονουκλεοτίδια με ένα μη-συμπληρωματικό κατάλοιπο στο 3'-άκρο τους δεν μπορούν να λειτουργήσουν ως εκκινητές στην αντίδραση της PCR κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες. Η επέκταση των εκκινητών κατά τη διάρκεια της PCR είναι αποτελεσματική και αποδοτική όταν η αζωτούχος βάση του νουκλεοτιδίου στο 3'-άκρο του εκκινητή είναι συμπληρωματική με την αντίστοιχη βάση στην αλληλουχία-στόχο που πρόκειται να ενισχυθεί. Αντίθετα, η επέκταση των εκκινητών είναι λιγότερο αποτελεσματική ή ακόμα και ανύπαρκτη όταν το 3'-άκρο του εκκινητή έχει μια μη συμπληρωματική βάση με την αλληλουχία-στόχο. Έτσι, η σύνθεση του αλληλοειδικού εκκινητή μπορεί να γίνει με βάση το φυσιολογικό ή το μεταλλαγμένο αλληλίο. Ο ειδικός εκκινητής για το φυσιολογικό αλληλίο (**wild-type specific primer**) επιτρέπει την ενίσχυση του φυσιολογικού αλληλίου και καταστέλλει την ενίσχυση του μεταλλαγμένου αλληλίου. Αντίστοιχα, ο ειδικός εκκινητής για το μεταλλαγμένο αλληλίο (**mutant specific primer**) επιτρέπει την ενίσχυση του μεταλλαγμένου αλληλίου και καταστέλλει την ενίσχυση του φυσιολογικού. Τις περισσότερες φορές οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικοί με το αλληλίο που φέρει τη μετάλλαξη που μελετάμε σε κάθε περίπτωση, και συνεπώς να παράγεται προϊόν μόνο παρουσία της μετάλλαξης (**Σχήμα 6.1**).



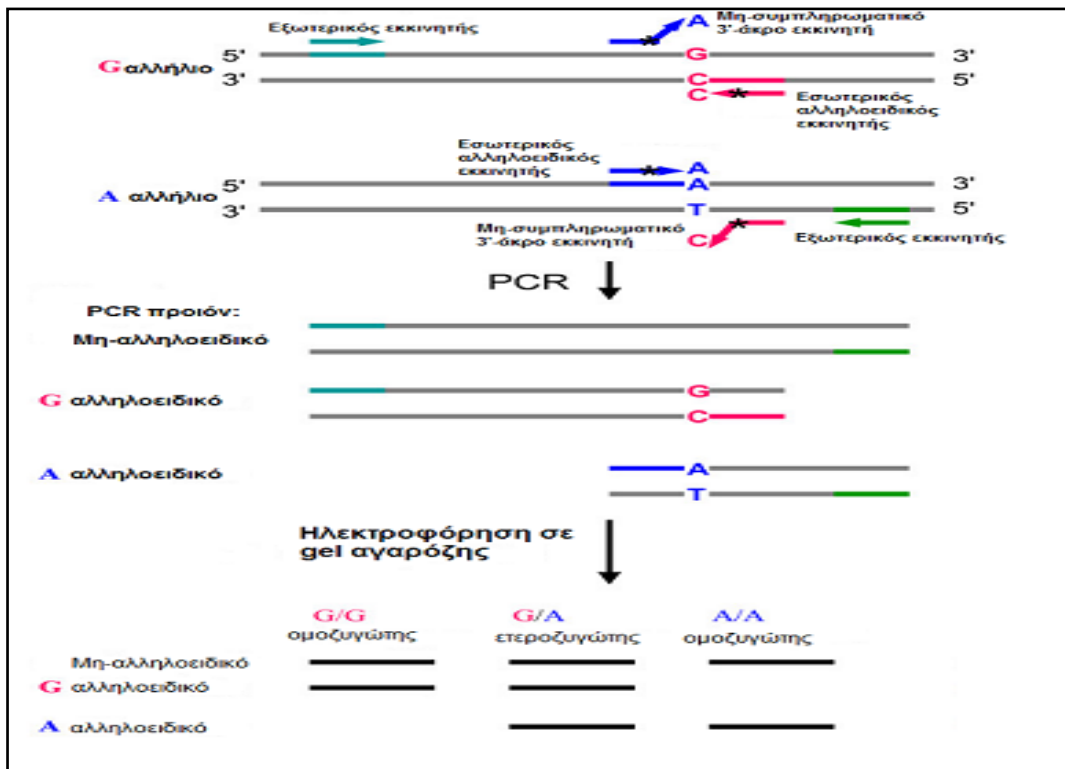
Σχήμα 6.1 Αρχή μεθόδου ARMS-PCR. Με χρήση πρόσθιου εκκινητή ειδικού για τη μετάλλαξη επιτυγχάνεται η ενίσχυση μόνο του μεταλλαγμένου αλληλίου κατά τη διάρκεια της PCR. Η ύπαρξη μη-συμπληρωματικού 3'-άκρου με τη φυσιολογική αλληλουχία-στόχο οδηγεί σε μη αποτελεσματική ή μη εφικτή ενίσχυση. Τελικά προκύπτει μόνο ένα, ειδικό προϊόν. Με αστερίσκο (*) συμβολίζεται το δεύτερο μη-συμπληρωματικό ζεύγος βάσεων δύο ή τρεις θέσεις αριστερά από το 3'-άκρο του εκκινητή.¹⁴⁵

Η επιλεκτική ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου που είναι συμπληρωματική με το 3'-άκρο του εκκινητή συγκριτικά με την αλληλουχία που έχει μη-συμπληρωματικό 3'-άκρο με τον εκκινητή οφείλεται στη δράση της Taq-πολυμεράσης. Απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχή εκτέλεση της ARMS-PCR είναι η απουσία της επιδιορθωτικής δραστηριότητας 3'-εξωνουκλεάσης της Taq-πολυμεράσης. Η έλλειψη αυτής της δράσης της πολυμεράσης έχει επιβεβαιωθεί.^{146,147} Συνέπεια αυτής της έλλειψης είναι η μη εφικτή επιδιόρθωση της μη-συμπληρωματικής βάσης στο 3'-άκρο και αδύνατη επέκταση του εκκινητή.

Το ποσοστό επιτυχίας της ARMS-PCR, δηλαδή η ειδικότητα και η ευαισθησία της μεθόδου είναι δυνατόν να επηρεαστούν από διάφορους παράγοντες. Υπάρχει πιθανότητα ο αλληλοειδικός εκκινητής να επεκταθεί παρ' όλο που μπορεί να υπάρχει μη συμπληρωματικό 3'-άκρο με την αλληλουχία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη λήψη μη ειδικού

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR προϊόντος ή ακόμα και τη λήψη ψευδώς θετικού αποτελέσματος. Η ειδικότητα της μεθόδου μπορεί να βελτιωθεί με μείωση της συγκέντρωσης των dNTPs, της συγκέντρωσης των ιόντων μαγνησίου (Mg^{+2}) ή των εκκινητών στο μίγμα της αντίδρασης. Ένας απλούστερος τρόπος αύξησης της ειδικότητας είναι η αύξηση της θερμοκρασίας στα στάδια της υβριδοποίησης και της επέκτασης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης της PCR. Οι «αυστηρές» συνθήκες της αντίδρασης της PCR είναι συνήθως απαραίτητο στοιχείο για μια επιτυχημένη ARMS-PCR με υψηλή ειδικότητα. Αντίστροφα, η αύξηση της συγκέντρωσης των παραπάνω αντιδραστηρίων ή η μείωση της θερμοκρασίας υβριδοποίησης και επέκτασης των εκκινητών θα έχει αντίθετα αποτελέσματα, δηλαδή μείωση ειδικότητας και λήψη παραπροϊόντων και ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.⁶⁰

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, συνήθως σχεδιάζουμε τον αλληλοειδικό εκκινητή ώστε το 3'-άκρο του να είναι συμπληρωματικό με τη μεταλλαγμένη αλληλουχία-στόχο και μη συμπληρωματικό με τη φυσιολογική αλληλουχία. Στην περίπτωση αυτή στο τέλος της αντίδρασης της PCR ανάλογα με το αν θα ληφθεί ειδικό προϊόν ή όχι είναι δυνατός ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε μεταλλαγμένα και φυσιολογικά. Δεν υπάρχει όμως η δυνατότητα να γνωρίζουμε αν ένα μεταλλαγμένο δείγμα προέρχεται από ομοζυγώτη ή ετεροζυγώτη για τη μετάλλαξη, ή αν πρόκειται για ομοζυγώτη φυσιολογικό. Για να επιτευχθεί κάτι τέτοιο θα πρέπει να συμπεριληφθεί στο μείγμα της αντίδρασης τόσο ειδικός εκκινητής για το φυσιολογικό αλληλίο, όσο και ειδικός εκκινητής για το μεταλλαγμένο αλληλίο. Θεωρητικά, ο κάθε εκκινητής θα δώσει ειδικό PCR προϊόν, είτε μεταλλαγμένο, είτε φυσιολογικό. Ο διαχωρισμός και η επιβεβαίωση του φυσιολογικού ή του ομοζυγώτη/ετεροζυγώτη μεταλλαγμένου γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης (**Σχήμα 6.2**). Είναι ευνόητο πως η παρουσία περισσότερων του ενός ζευγών εκκινητών απαιτεί πιο επίπονη διαδικασία βελτιστοποιήσεων έτσι ώστε ο κάθε εκκινητής να επεκτείνεται και να δίνει PCR προϊόν μόνο με την ειδική αλληλουχία-στόχο. Πρέπει δηλαδή οι συνθήκες της αντίδρασης να είναι αυστηρές, ώστε να αποφεύγονται τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα.



Σχήμα 6.2 Εφαρμογή ARMS-PCR. Χρήση ειδικών εκκινητών για τα δύο αλληλία και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης με σκοπό το διαχωρισμό των ομοζυγωτών από τους ετεροζυγώτες. Με αστερίσκο (*) συμβολίζεται το δεύτερο μη-συμπληρωματικό ζεύγος βάσεων δύο ή τρεις θέσεις αριστερά από το 3'-άκρο του εκκινητή.¹⁴⁵

Η ARMS-PCR είναι μία τεχνική που επιτρέπει το λεπτομερή έλεγχο οποιασδήποτε γνωστής σημειακής μετάλλαξης ή πολυμορφισμού. Απαιτεί τη χρήση αλληλοειδικού εκκινητή και συνεπώς ο αρχικός σχεδιασμός αποσκοπεί στη λήψη ενός και μόνο ειδικού προϊόντος. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως, ένα μόνο μη-συμπληρωματικό ζεύγος βάσεων στο 3'-άκρο μεταξύ του εκκινητή και της αλληλουχίας-στόχου δεν μπορεί να αποτρέψει την ενίσχυση, δηλαδή το σχηματισμό μη ειδικού προϊόντος και τη λήψη ψευδώς θετικού αποτελέσματος. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να ξεπεραστεί εισάγοντας ένα ή περισσότερα μη συμπληρωματικά ζεύγη βάσεων μεταξύ εκκινητή και αλληλουχίας-στόχου κοντά στο 3'-άκρο όπου προσδένεται η πολυμεράση.^{60,148,149,150} Έτσι το υβρίδιο του ειδικού εκκινητή με τη μη συμπληρωματική αλληλουχία καθίσταται πιο ασταθές και δεν επεκτείνεται. Το επιπλέον μη-συμπληρωματικό ζεύγος βάσεων εισάγεται συνήθως δύο ή τρεις θέσεις αριστερά από το 3'-άκρο του εκκινητή. Η θέση καθώς και το είδος του μη-συμπληρωματικού ζεύγους βάσεων δεν είναι σε κάθε περίπτωση τα ίδια, αλλά προσδιορίζονται πειραματικώς.¹⁵¹

6.3 *In silico* σχεδιασμός εκκινητών για ARMS-PCR για τη μετάλλαξη 3140 A>G στο PIK3CA

Τα γενικά κριτήρια σχεδιασμού των εκκινητών αναφέρονται στο προηγούμενο κεφάλαιο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, όπου εκτελείται αντίδραση ARMS-PCR, ένας από τους δύο εκκινητές, είτε ο πρόσθιος, είτε ο ανάστροφος, σχεδιάζονται να είναι αλληλοειδικοί, να ενισχύουν δηλαδή μόνο το φυσιολογικό ή μόνο το μεταλλαγμένο αλληλίο. Στη συγκεκριμένη μελέτη ο σχεδιασμός έγινε ως εξής: ο πρόσθιος εκκινητής σχεδιάστηκε έτσι ώστε το 3'-άκρο του να είναι συμπληρωματικό με το μεταλλαγμένο αλληλίο, εκκινητής ειδικός για το μεταλλαγμένο (**mutant specific primer**), ενώ ο ανάστροφος εκκινητής δεν είχε κάποιου είδους ειδικότητα. Όπως είχε αναφερθεί και παραπάνω, για να επιτευχθεί καλύτερη ειδικότητα, έγινε εισαγωγή και ενός δεύτερου μη-συμπληρωματικού ζεύγους βάσεων τρεις θέσεις αριστερά από το 3'-άκρο του εκκινητή. Έτσι, ο πρόσθιος εκκινητής έχει ένα μη-συμπληρωματικό ζεύγος βάσεων με την αλληλουχία-στόχο τρία νουκλεοτίδια αριστερά από το 3'-άκρο, ενώ ο ίδιος εκκινητής έχει δύο μη-συμπληρωματικά ζεύγη βάσεων με την φυσιολογική αλληλουχία-στόχο. Αυτό καθιστά το υβρίδιο του εκκινητή με το φυσιολογικό αλληλίο ασταθές και αποτρέπει την επέκτασή του και το σχηματισμό προϊόντος.

Η αλληλουχία του γονιδίου που περιέχει τη μετάλλαξη καθώς και η θέση των εκκινητών παρουσιάζονται στο **Σχήμα 6.3**.

```

acattctagtggggtaaaggggaatcaaaagatggttgtaagagaagtgagagaggaatgctatTTTTTTatag
ctttgtctacgaaagcctctctaattttgtgacatttgagcaaaagacctgaagggtattaacatcatttgctcc
aaactgaccaaactgttcttattacttatagGTTTCAGGAGATGTGTTACAAGCCTTATCTAGCTATTCGACA
GCATGCCAAATCTCTTTCATAAATCTTTTCTCAATGATGCTTGGCTCTGGAATGCCAGAACTACAATCTTTTGAT
GACATTGCATACATTCGAAAGACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGCAAGAGGCCTTGGAGTATTTTCAT GAAAC
AAATGAATGATGCAC ATCATGGTGGCTGGACAACAAAATGGATTGGATCTTCCACACAATTAACAGCATG
CATTGAACTGAAAAGATAACTGAGAAAATGAAAGCTCACCTCTGGATTCCACACTGCACGTTAATAACTCTCA
GCAGGCAAAGACCCGATTGCATAGGAATTGCACAATCCATGAACAGCATTAGAATTTACAGCAAGAACAGAAAT
AAAATACTATATAAATTTAAATAATGTAAACGCAAACAGGGTTTGATAGCACTTAAACTAGTTCATTTCAAAT
TAAGCTTTAGAATAATGCGCAATTTTCATGTTATGCCTTAAGTCCAAAAGGTAAACTTTGAAGATTGTTTGTA
TCTTTTTTTAAAAACAACAACAACAATCCCCAAAATATATAGAAATGATGGAGAAGGaaaaagt
    
```

Σχήμα 6.3 Η αλληλουχία του εξονίου 20 με τις πλησιέστερες αλληλουχίες ιντρονίων. Με μαύρα κεφαλαία γράμματα παρουσιάζεται το εξόνιο και με πράσινο η μη μεταφραζόμενη περιοχή του. Με μικρά γράμματα τα ιντρόνια και 5' μη μεταγραφόμενη περιοχή, με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται η μετάλλαξη. Οι εκκινητές για το προϊόν 50bp με κίτρινο.

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR

Η περιοχή που ενισχύεται καλύπτει τμήμα του εξόνιου 20 του γονιδίου *PIK3CA* και το προϊόν που προκύπτει έχει μήκος 50bp. Η μετάλλαξη που ανιχνεύεται είναι η μετατροπή της αδενίνης (A) σε γουανίνη (G) στη θέση 3140. Άρα, το φυσιολογικό αλληλίο φέρει τη βάση αδενίνη, ενώ το μεταλλαγμένο αλληλίο φέρει τη βάση γουανίνη.

6.4 Συνθήκες ARMS-PCR για τη μετάλλαξη 3140 A>G στο εξόνιο 20 του γονιδίου *PIK3CA*

Στον **πίνακα 6.1** παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για το συγκεκριμένο γονίδιο.

Πίνακας 6.1 Χαρακτηριστικά εκκινητών για την ARMS-PCR για τη μετάλλαξη 3140 A>G στο εξόνιο 20 του *PIK3CA*

Εκκινητής	Αλληλουχία 5'-3'	Nt	T _m	Προϊόν
Πρόσθιος	GAAACAAATGAATGATG<u>T</u>AC<u>G</u>	21	50.7°C	50bp
Ανάστροφος	AATCCATTTTTGTTGTCCAG	20	52.5°C	

Στον **πίνακα 6.2** παρουσιάζονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για το *PIK3CA*.

Πίνακας 6.2 Συστατικά της αντίδρασης ARMS-PCR για τη μετάλλαξη 3140 A>G στο εξόνιο 20 του *PIK3CA*

Αντιδραστήρια	C Αρχική	Όγκος (μL)	C Τελική
Πρόσθιος εκκινητής	10 μM	0,3	0,3μM
Ανάστροφος εκκινητής	10 μM	0,3	0,3μM
dNTPs	10 mM	0,4	0,4mM
MgCl ₂	25 mM	1,2	3,0mM
BSA	10 μg/μL	0,15	0.15μg/μL
PCR ρυθμιστικό διάλυμα	5x	2,0	1x
Taq πολυμεράση(Promega)	5 U/μL	0,1	0.05U/μL
LCGreen Plus	10x	1,0	1x
H ₂ O	-	3,55	-
Δείγμα DNA	25 ng/μL	1,0	2,5ng/μL
Συνολικός Όγκος		10	

Στον **πίνακα 6.3** παρουσιάζονται οι συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 6.3 Συνθήκες ARMS-PCR για τη μετάλλαξη 3140 A>G στο εξόνιο 20 του γονιδίου *PIK3CA*

Στάδιο PCR	PIK3CA εξόνιο 20
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C/ 2min
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C/ 10 sec
Υβριδοποίηση των εκκινητών στο DNA	63°C/ 15 sec
Επέκταση εκκινητών	72°C/ 20 sec

} **60 κύκλοι**

Για να έχουμε μια επιπλέον επιβεβαίωση, εκτός αυτής της ηλεκτροφόρησης, ότι η παραπάνω αντίδραση PCR θα μας δώσει το επιθυμητό προϊόν χωρίς την παρουσία άλλων παραπροϊόντων, προσθέσαμε στο τέλος της αντίδρασης ένα επιπλέον στάδιο ανάκτησης καμπυλών τήξης. Γνωρίζουμε από τις αναφορές του Primer Premier πως η θερμοκρασία τήξης του επιθυμητού προϊόντος είναι περίπου 75°C. Οποιαδήποτε άλλη μετάβαση αποδεικνύει την ύπαρξη παραπροϊόντος και απαιτεί την περαιτέρω βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου. Στον **πίνακα 6.4** παρουσιάζονται οι συνθήκες ανάκτησης καμπυλών τήξης που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 6.4 Συνθήκες ανάκτησης καμπυλών τήξεως για το γονίδιο *PIK3CA*

Πρόγραμμα	PIK3CA εξόνιο 20
Ρυθμός τήξης	0,2°C/ sec
Θερμοκρασία έναρξης ανάκτησης	60 °C
Θερμοκρασία λήξης	95 °C
Θερμοκρασία ψύξης	40°C

6.5 Βελτιστοποίηση, επιβεβαίωση και μελέτη ευαισθησίας της μεθόδου ARMS-PCR για τη μετάλλαξη 3140 A>G στο εξόνιο 20 του *PIK3CA*

6.5.1 Παρασκευή προτύπων δειγμάτων

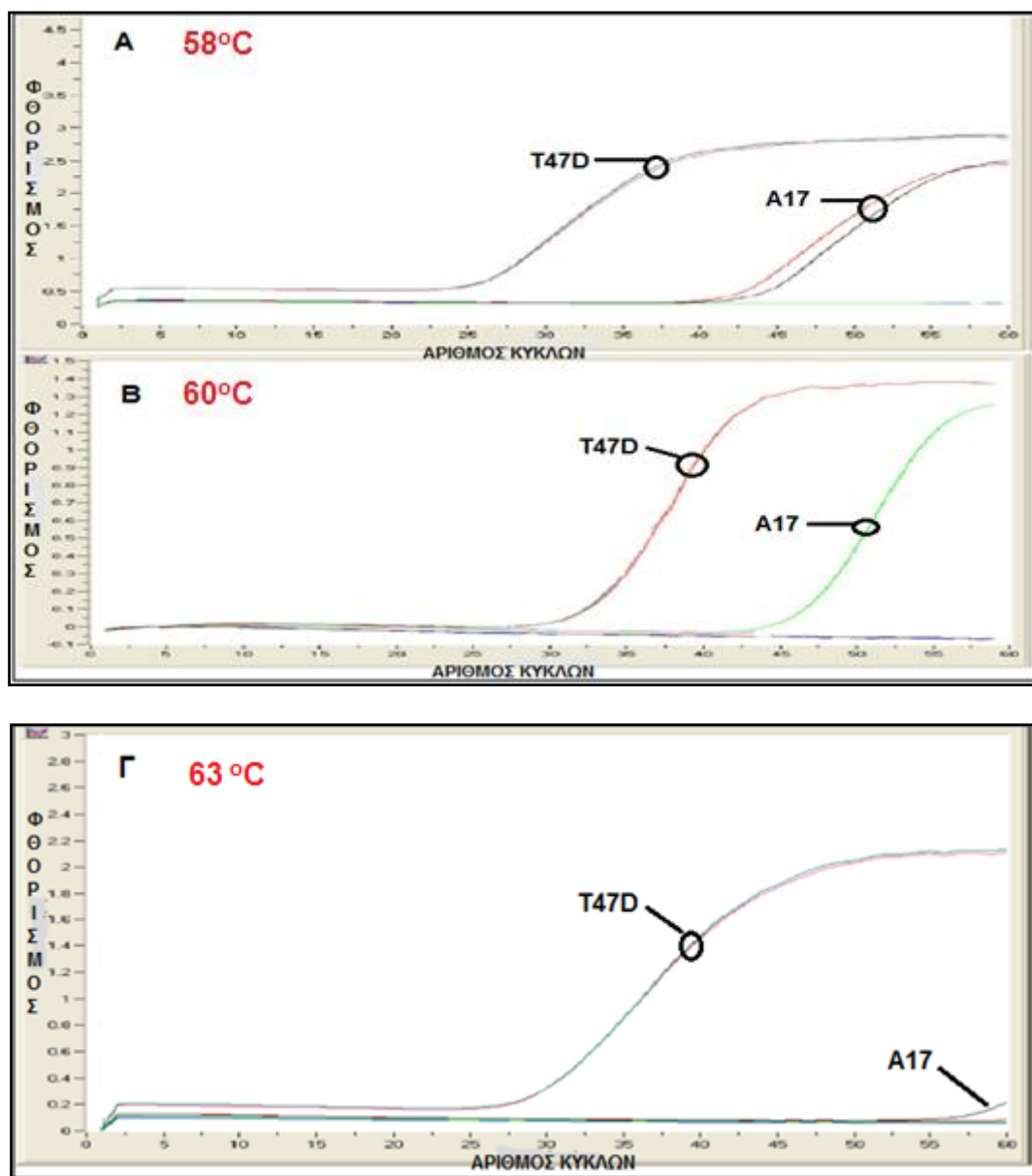
Για την ανάπτυξη των μεθοδολογιών της ARMS-PCR και της HRMA σε συνδυασμό με το HRMA χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω πρότυπα δείγματα: η μαστική καρκινική σειρά T47D, που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας (mutant control) που φέρει την υπό μελέτη μετάλλαξη, και η κυτταρική σειρά A17, που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας (wild-type control) που φέρει τη φυσιολογική αλληλουχία. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε μια σειρά δειγμάτων ιστών ακινητοποιημένων σε block παραφίνης, μεταλλαγμένων και φυσιολογικών, για την επικύρωση της μεθόδου πριν την εφαρμογή της στα κλινικά δείγματα. Για τη μελέτη ευαισθησίας της μεθόδου παρασκευάστηκαν τα ποσοστιαία πρότυπα με κατάλληλες αναμίξεις του θετικού μάρτυρα T47D ετερόζυγου για τη μετάλλαξη και του αρνητικού μάρτυρα A17. Τα ποσοστιαία πρότυπα που παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,2%, 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 100% T47D και 100% A17.

6.5.2 Βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών της ARMS-PCR για τη μετάλλαξη 3140 A>G στο εξόνιο 20 του *PIK3CA*

Όπως είναι γνωστό, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών (T_{an}) παίζει σημαντικό ρόλο στην ειδικότητα της αντίδρασης της PCR και στη λήψη του ειδικού προϊόντος, χωρίς την παράλληλη ενίσχυση παραπροϊόντων. Επιπλέον, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών καθορίζει και την ευαισθησία της αντίδρασης, καθώς διαμορφώνει τον κύκλο ενίσχυσης της αλληλουχίας-στόχου (**Cq**). Αναλυτικότερα, σε χαμηλές θερμοκρασίες υβριδισμού των εκκινητών ευνοείται ο σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος, και μάλιστα σε σχετικά μικρό Cq (ανάλογα με την αρχική ποσότητα δείγματος στο μείγμα της αντίδρασης), αλλά συγχρόνως ευνοείται ιδιαίτερα και ο σχηματισμός παραπροϊόντων. Άρα, οι χαμηλές θερμοκρασίες υβριδισμού αυξάνουν την ευαισθησία και περιορίζουν την ειδικότητα του προσδιορισμού. Αντίθετα, σε υψηλές θερμοκρασίες υβριδισμού των εκκινητών περιορίζονται οι πιθανότητες σχηματισμού παραπροϊόντων, αλλά αυξάνονται και οι κύκλοι ενίσχυσης. Αυξάνεται, δηλαδή η ειδικότητα, αλλά μειώνεται αισθητά η ευαισθησία της μεθόδου. Συνεπώς θα πρέπει να βρεθεί η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών που οδηγεί σε επιλεκτική ενίσχυση του ειδικού προϊόντος. Πρέπει δηλαδή η

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR
θερμοκρασία που θα επιλεγεί να επιφέρει το βέλτιστο συνδυασμό ευαισθησίας και ειδικότητας.

Στη συγκεκριμένη μέθοδο της ARMS-PCR καθοριστικό στοιχείο του επιτυχημένου αποτελέσματος είναι η ειδικότητα, από τη στιγμή που αυτή θα καθορίσει ποιο δείγμα είναι φυσιολογικό και ποιο μεταλλαγμένο. Σκοπός είναι ο αλληλοειδικός εκκινητής να υβριδοποιηθεί και να ενισχύσει μόνο τα μεταλλαγμένα αλληλία, όπως προβλέπει και η *in silico* μελέτη. Οι θεωρητικές T_m των εκκινητών, όπως αυτές προβλέπονται από το Primer Premier είναι $50,7^\circ\text{C}$ για τον αλληλοειδικό πρόσθιο εκκινητή και $52,5^\circ\text{C}$ για τον ανάστροφο εκκινητή. Επειδή στοχεύουμε σε υψηλή ειδικότητα, ξεκινήσαμε με $T_{an}=58^\circ\text{C}$, που είναι υψηλότερη θερμοκρασία από την T_m και των δύο εκκινητών. Παρατηρήθηκε ενίσχυση και του φυσιολογικού και του μεταλλαγμένου δείγματος ελέγχου, τα προϊόντα των οποίων ανιχνεύτηκαν περίπου με 15 κύκλους διαφορά. Η ευαισθησία ήταν αρκετά καλή, αλλά πραγματοποιήθηκε και δεύτερο πείραμα στους 60°C με σκοπό τη βελτίωση της ειδικότητας της αντίδρασης. Και πάλι όμως παρατηρήθηκε ενίσχυση τόσο του φυσιολογικού, όσο και του μεταλλαγμένου πρότυπου δείγματος με την ίδια περίπου διαφορά στους κύκλους όπως και στο προηγούμενο πείραμα. Τελικά η βέλτιστη T_{an} ήταν οι 63°C όπου ενισχύθηκε μόνο το μεταλλαγμένο πρότυπο και καθόλου το φυσιολογικό με μεγάλη ευαισθησία. Όλες οι παραπάνω καμπύλες ενίσχυσης της PCR απεικονίζονται στην **Εικόνα 6.1**. Για να εξαντλήσουμε όλες τις πιθανές επιλογές, πραγματοποιήσαμε ένα τελευταίο πείραμα με $T_{an}=65^\circ\text{C}$. Όπως αποδείχθηκε όμως, η θερμοκρασία αυτή ήταν πολύ υψηλή και ενώ ικανοποιούσε τις απαιτήσεις σε ειδικότητα, είχε πολύ χαμηλή ευαισθησία. Για την επιβεβαίωση αφενός ότι το προϊόν της PCR ήταν το αναμενόμενο και αφετέρου ότι το ζεύγος των εκκινητών ήταν ειδικό για τη συγκεκριμένη αλληλουχία, έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτική αгарόζης. Τόσο η ηλεκτροφόρηση, όσο και η ανάκτηση καμπύλων τήξης, σαν τελευταίο επιπλέον στάδιο της αντίδρασης, αποδεικνύουν το σχηματισμό ενός προϊόντος μήκους 50bp.

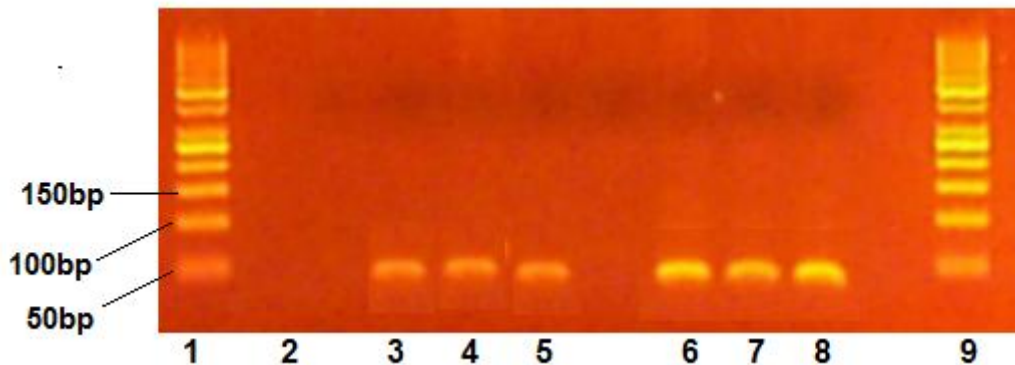


Εικόνα 6.1 Μελέτη επίδρασης θερμοκρασίας υβριδισμού εκκινήτων στην αντίδραση της ARMS-PCR
Α. Καμπύλες ενίσχυσης PCR για $T_{an}=58^{\circ}\text{C}$. Μαύρο-Κόκκινο=A17 και Πράσινο-Ροζ=T47D, Β. Καμπύλες ενίσχυσης PCR για $T_{an}=60^{\circ}\text{C}$. Πράσινο=A17 και Κόκκινο=T47D, Γ. Καμπύλες ενίσχυσης PCR για $T_{an}=63^{\circ}\text{C}$. Μαύρο=A17 και Πράσινο-Ροζ=T47D

6.5.3 Επιβεβαίωση πρωτοκόλλου ARMS-PCR με χρήση γνωστών, μεταλλαγμένων και φυσιολογικών δειγμάτων ιστών ακινητοποιημένων σε block παραφίνης

Για την επικύρωση του παραπάνω πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ιστών ακινητοποιημένων σε block παραφίνης που είχαν μελετηθεί σε προηγούμενη ερευνητική εργασία.⁹⁶ Χρησιμοποιήθηκαν ενδεικτικά δύο φυσιολογικά και δύο μεταλλαγμένα δείγματα και φυσικά τα δύο πρότυπα δείγματα (T47D και A17) που χρησιμοποιήθηκαν στις βελτιστοποιήσεις. Μετά το τέλος της διαδικασίας παρατηρήθηκε ότι: τα μεταλλαγμένα

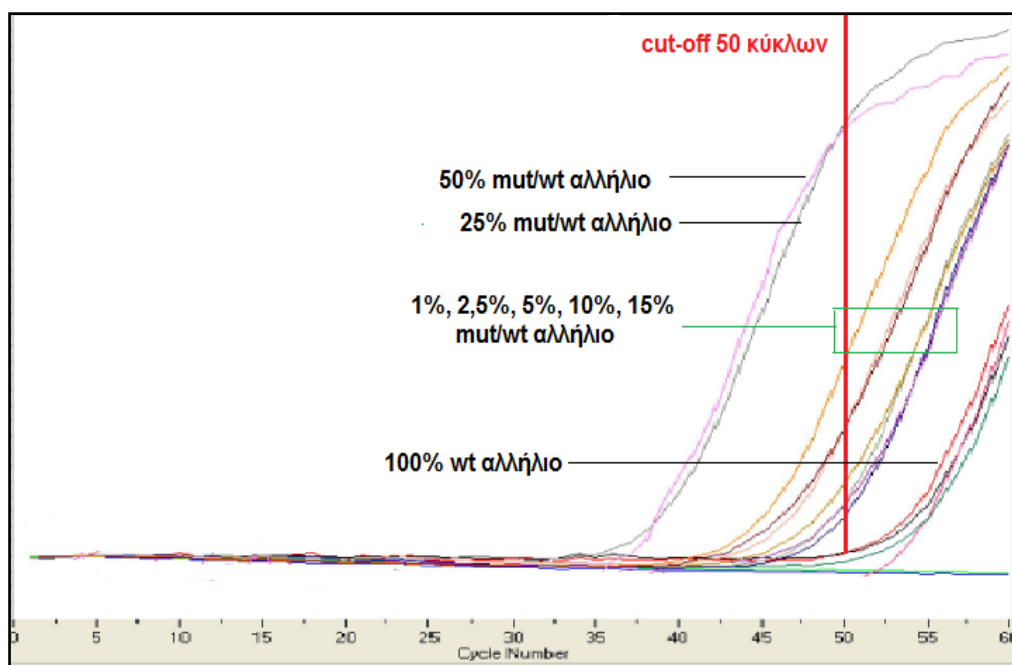
Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR δείγματα ενισχύθηκαν και έδωσαν προϊόν, αλλά το ίδιο συνέβη και με τα φυσιολογικά σε πολύ μεγαλύτερο κύκλο. Το παραπάνω αποτέλεσμα μας οδήγησε στο συμπέρασμα πως είναι ανάγκη, προκειμένου να αποφύγουμε τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, να καταφύγουμε στον προσδιορισμό ενός ορίου λήψης απόφασης (**cut-off**) και με βάση αυτό να διαχωρίζουμε τα μεταλλαγμένα δείγματα από τα φυσιολογικά. Για το σκοπό αυτό επαναλάβαμε την εκτέλεση του πρωτοκόλλου χρησιμοποιώντας, αυτή τη φορά, τα ίδια πρότυπα δείγματα (T47D και A17), τα τρία μεταλλαγμένα δείγματα ιστών παραφίνης, καθώς και έξι φυσιολογικά δείγματα ιστών. Τα αποτελέσματα της PCR έδειξαν ότι, ένα ασφαλές όριο λήψης απόφασης είναι οι 50 κύκλοι. Παρατηρήθηκε ότι μετά τους 50 κύκλους άρχιζαν να ενισχύονται κάποια φυσιολογικά δείγματα και να δίνουν ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Ορίζοντας λοιπόν ως cut-off τους 50 κύκλους πετυχαίνουμε βέλτιστη ειδικότητα της μεθόδου. Παράλληλα όμως έχουμε κάποιες απώλειες ως προς την ευαισθησία, διότι το ένα μεταλλαγμένο δείγμα ενισχύεται σε κύκλο μεγαλύτερο του 50. Παρ' όλα αυτά, αποφασίσαμε να δεχτούμε το συγκεκριμένο cut-off, θεωρώντας την ειδικότητα της μεθόδου πιο σημαντική στην παρούσα φάση. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτική αγαρόζη. (Εικόνα 6.2)



Εικόνα 6.2 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της ARMS-PCR 60 κύκλων. 1) και 9) Δείκτης μοριακών βαρών 2)NC 3)A17 4) και 5)φυσιολογικά δείγματα ιστών παραφίνης 6) και 7) μεταλλαγμένα δείγματα ιστών παραφίνης 8) T47D

6.5.4 Μελέτη αναλυτικής ευαισθησίας της μεθόδου ARMS-PCR με χρήση προτύπων μιγμάτων μεταλλαγμένου δείγματος σε φυσιολογικό (T47D/A17)

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο, για τον έλεγχο και τον προσδιορισμό της αναλυτικής ευαισθησίας της μεθόδου παρασκευάστηκαν τα ποσοστιαία πρότυπα με κατάλληλες αναμίξεις του θετικού μάρτυρα T47D, ετερόζυγου για τη μετάλλαξη, και του αρνητικού μάρτυρα A17. Τα ποσοστιαία πρότυπα που παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,2%, 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 100% T47D (ετερόζυγο) και 100% A17. Τα παραπάνω μείγματα μεταλλαγμένου δείγματος σε φυσιολογικό χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου της ARMS-PCR όπως αυτό διαμορφώθηκε και μετά τον ορισμό των 50 κύκλων ως κατώτερο όριο λήψης απόφασης. Στόχος μας ήταν να προσδιορίσουμε το ελάχιστο ποσοστό μεταλλαγμένου, που μπορεί να ανιχνευθεί με την μέθοδο που μελετάμε, παρουσία περίσσειας φυσιολογικού. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές, έτσι ώστε να είμαστε βέβαιοι για τα αποτελέσματα. Το τελικό συμπέρασμα ήταν ότι με την ARMS-PCR και το συγκεκριμένο πρωτόκολλο μπορούμε να ανιχνεύσουμε με βεβαιότητα ποσοστό 1% μεταλλαγμένου παρουσία φυσιολογικού. (Εικόνα 6.3)



Εικόνα 6.3 Καταγράφημα αντίδρασης ARMS-PCR. Καθορισμός ορίου λήψης απόφασης (cut-off) και προσδιορισμός ευαισθησίας της συγκεκριμένης μεθοδολογίας.

6.6 Συμπεράσματα

Κατά την ανάπτυξη της συγκεκριμένης μεθοδολογίας ARMS-PCR για ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA*, παρατηρήθηκε ότι δεν ήταν δυνατόν να ανασταλεί πλήρως η ενίσχυση του φυσιολογικού αλληλίου, λόγω του τύπου του μη-συμπληρωματικού ζεύγους αζωτούχων βάσεων (**G:T**) στο 3' άκρο του εκκινητή με τη φυσιολογική αλληλουχία. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την υβριδοποίηση του εκκινητή και στο φυσιολογικό αλλήλιο με συνέπεια την επέκτασή του με αρκετά μικρότερη απόδοση σε σχέση με την ενίσχυση του μεταλλαγμένου αλληλίου. Καταλήξαμε, λοιπόν, στον καθορισμό ενός ορίου λήψης απόφασης (cut-off) έτσι ώστε να μπορούμε να διαχωρίσουμε τα μεταλλαγμένα δείγματα από τα φυσιολογικά. Η παραδοχή αυτή περιόρισε την ευαισθησία της μεθόδου, αλλά εξασφάλισε την ειδικότητά της, αποκλείοντας τη λήψη ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Τελικά η ευαισθησία της μεθόδου διαμορφώθηκε στο 1%, χωρίς όμως να εφαρμοστεί σε κλινικά δείγματα ώστε να έχουμε μια πλήρη εικόνα της απόδοσής της στην πράξη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ARMS-HRMA ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ 3140 A>G ΣΤΟ ΕΞΟΝΙΟ 20 ΤΟΥ *PIK3CA*

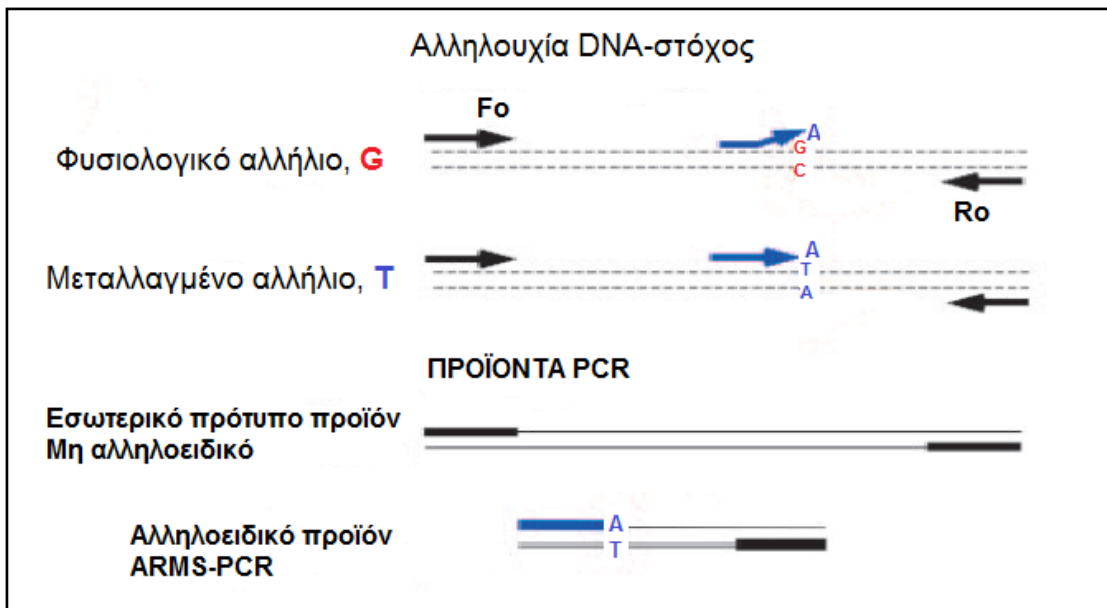
7.1 ARMS-PCR με εσωτερικό πρότυπο σε συνδυασμό με HRMA

Μετά την ανάπτυξη της μεθοδολογίας της ARMS-PCR θέσαμε ως στόχο να εξασφαλίσουμε με κάποιο τρόπο ότι τα αποτελέσματα που λαμβάνουμε με τη μέθοδο αυτή είναι με απόλυτη βεβαιότητα αληθώς θετικά ή αληθώς αρνητικά και ότι δεν υπάρχει καμία πιθανότητα λήψης ψευδούς αποτελέσματος. Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, η ARMS-PCR είναι μια μέθοδος που χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία στην ανίχνευση μεταλλάξεων συγκριτικά με την κλασική PCR ή με άλλες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον ίδιο σκοπό.^{60,71,72,73,74,152,153,154} Παρατηρήσαμε λοιπόν, ανατρέχοντας στη βιβλιογραφία,^{60,71,72,74,152,153} πως στις περισσότερες περιπτώσεις όπου η ανίχνευση των μεταλλάξεων γίνεται μέσω της ARMS-PCR, χρησιμοποιείται ένα «εσωτερικό πρότυπο» (**internal control**) που έχει σα στόχο να εξασφαλίσει ότι η αντίδραση PCR που πραγματοποιείται είναι επιτυχής και η έλλειψη ειδικού προϊόντος από την ARMS-PCR δεν οφείλεται σε εξωγενείς παράγοντες (αντιδραστήρια, θερμοκρασιακό πρόγραμμα, κακή ποιότητα δείγματος), αλλά στο γεγονός ότι απουσιάζει το συγκεκριμένο αλληλίο από το δείγμα. Έχει αναφερθεί χαρακτηριστικά⁶⁰ ότι σε περιπτώσεις όπου πραγματοποιήθηκε ARMS-PCR με αλληλοειδικό εκκινητή που δεν παρουσίαζε απόλυτη ειδικότητα, παρατηρήθηκε λανθασμένη διάγνωση λόγω της απουσίας του εσωτερικού προτύπου. Με τη χρήση της ARMS-PCR με εσωτερικό πρότυπο έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς η ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια που εμπλέκονται στους μηχανισμούς εκδήλωσης διαφόρων τύπων καρκίνου, όπως το **KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)**^{71,74,152}, το **BRAF (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)**^{74,154}, το **JAK2 (Janus kinase 2)**¹⁵³ και το **PIK3CA (phosphatidylinositol 3-kinase)**⁷². Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις η φιλοσοφία του σχεδιασμού της ARMS-PCR με χρήση εσωτερικού προτύπου έχει ως εξής:

- Χρησιμοποιείται ένα ζεύγος εκκινητών με το οποίο θα πραγματοποιηθεί η ARMS-PCR. Από το ζεύγος αυτό, ο ένας εκκινητής θα είναι αλληλοειδικός, και όπως αναφέρθηκε παραπάνω, συνήθως ο αλληλοειδικός εκκινητής είναι συμπληρωματικός με την αλληλουχία που φέρει τη μετάλλαξη, ενώ έχει ένα μη συμπληρωματικό ζεύγος βάσεων στο

3' άκρο του με τη φυσιολογική αλληλουχία (mutant specific). Από την επέκταση των εκκινητών αυτών προκύπτει προϊόν συγκεκριμένου μήκους (bp) μόνο από τα δείγματα που φέρουν ένα (ετερόζυγοι) ή δύο (ομόζυγοι) μεταλλαγμένα αλληλία.

- Χρησιμοποιείται ένα δεύτερο ζεύγος εκκινητών (**internal control primers**) που ενισχύει ένα δεύτερο προϊόν. Οι εκκινητές αυτοί δεν παρουσιάζουν κάποια αλληλοειδικότητα, αλλά είναι κοινοί και ενισχύουν εξίσου και τα φυσιολογικά και τα μεταλλαγμένα αλληλία. Από την επέκταση των εκκινητών αυτών προκύπτει ένα προϊόν κοινό για όλα τα δείγματα, που χαρακτηρίζεται ως «εσωτερικό πρότυπο προϊόν» (**internal control product**), και είναι πάντα μεγαλύτερου μήκος από αυτό της ARMS-PCR (**Σχήμα 7.1**). Η χρήση αυτού του δεύτερου ζεύγους εκκινητών εξυπηρετεί πολλαπλούς σκοπούς: α) το εσωτερικό πρότυπο προϊόν αντικατοπτρίζει την ποιότητα και την ποσότητα του DNA που περιέχεται σε κάθε δείγμα προς ανάλυση, ανάλογα με τον κύκλο ενίσχυσης (C_q) και επιπλέον εξισώνει την ένταση του θορύβου σε όλες τις αντιδράσεις.⁷¹ β) η παρουσία του εσωτερικού πρότυπου προϊόντος επιβεβαιώνει ότι η απουσία ενίσχυσης κατά τη διάρκεια της ARMS-PCR δεν οφείλεται στην παρουσία παρεμποδιζουσών ουσιών στο μείγμα της αντίδρασης ή σε πρόβλημα κάποιου εκ των αντιδραστηρίων, αλλά στην απουσία του προς ενίσχυση αλληλίου, εκμηδενίζοντας έτσι την πιθανότητα ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος.⁷⁴ γ) αν το ζεύγος των εκκινητών ελέγχου ενισχύει μια μεγαλύτερη αλληλουχία στην οποία υπάρχει η μετάλλαξη, δηλαδή αν η αλληλουχία αυτή εμπεριέχει το ειδικό προϊόν της ARMS-PCR, τότε οι εκκινητές της ARMS-PCR μπορούν να χρησιμοποιήσουν το μεγαλύτερο προϊόν σα στόχο, να υβριδοποιηθούν σε αυτό και στη συνέχεια να επεκταθούν με αποτέλεσμα το σχηματισμό του μικρότερου ARMS-προϊόντος. Αυτό αυτομάτως θα συνέβαλε στη βελτίωση της ευαισθησίας της μεθόδου, ιδιαίτερα στην περίπτωση που το δείγμα περιείχε μικρό ποσοστό μεταλλαγμένων αλληλίων. Βέβαια υπάρχουν και περιπτώσεις όπου το εσωτερικό πρότυπο προϊόν δε βρίσκεται στην ίδια περιοχή με το προϊόν της ARMS-PCR, αλλά χρησιμοποιούνται εκκινητές που ενισχύουν περιοχή άλλου γονιδίου^{60,152}, ή περιοχή που βρίσκεται στα ιντρόνια που παρεμβάλλονται των εξονίων του γονιδίου που μελετάται^{152,153} ή ακόμα και στις δύο παραπάνω περιοχές.⁷⁴



Σχήμα 7.1 ARMS-HRMA. Με μαύρο χρώμα παρουσιάζονται οι κοινός εκκινητές και για τα δύο αλληλία και με μπλε ο αλληλοειδικός εκκινητής για το μεταλλαγμένο αλληλίο.

Σε αυτό το σημείο είναι εύλογο το ερώτημα, πώς μπορεί να επιτευχθεί βελτίωση της ευαισθησίας της μεθόδου από τη στιγμή που στο μείγμα της αντίδρασης συνυπάρχουν δύο ζεύγη εκκινητών που τις περισσότερες φορές στοχεύουν στην ίδια αλληλουχία, ή γενικότερα στην ίδια αρχική ποσότητα DNA που υπάρχει μέσα στο δείγμα. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των εκκινητών είναι μεγάλος και συνήθως ευνοούνται οι μη αλληλοειδικοί εκκινητές, οι οποίοι με μεγαλύτεροι ευκολία υβριδοποιούνται σε όλα τα αλληλία. Υπάρχει περίπτωση, ειδικά όταν οι εκκινητές εσωτερικού ελέγχου ενισχύουν αλληλουχία άλλου γονιδίου, οι μη αλληλοειδικοί εκκινητές να «καταναλώσουν» όλη την αρχική ποσότητα DNA καθώς και τα αντιδραστήρια του μείγματος της αντίδρασης και συνεπώς να μην προλάβουν οι αλληλοειδικοί εκκινητές να υβριδοποιηθούν και να επεκταθούν. Κάτι τέτοιο θα μείωνε πολύ την ευαισθησία και ίσως οδηγούσε και σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Για να αποφευχθεί ή έστω να περιοριστεί ο ανταγωνισμός μεταξύ των εκκινητών χρειάζεται να γίνουν πειράματα βελτιστοποίησης των συγκεντρώσεων των εκκινητών, έτσι ώστε να ευνοείται περισσότερο ο σχηματισμός του αλληλοειδικού προϊόντος. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι χρήσιμο να μειώνονται οι συγκεντρώσεις των κοινών εκκινητών και να αυξάνεται η συγκέντρωση του αλληλοειδικού εκκινητή. Επίσης ωφελεί η αύξηση του αριθμού των κύκλων της αντίδρασης, έτσι ώστε να υπάρχει το χρονικό περιθώριο να παραχθεί ικανοποιητική ποσότητα από όλα τα επιθυμητά προϊόντα.¹⁵³

Η ταυτοποίηση των προϊόντων που προκύπτουν από την παραπάνω πολλαπλή αντίδραση γίνεται τις περισσότερες φορές με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Κατά Χριστίνα Σχίζα

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR την *in silico* μελέτη της αντίδρασης της μεθόδου φροντίζουμε έτσι ώστε οι δύο αλληλουχίες που ενισχύονται να έχουν διαφορετικό μήκος, έτσι ώστε τα προϊόντα που θα προκύψουν να έχουν διαφορετικό μέγεθος και να διαχωρίζονται στην πηκτή. Όπως αναφέραμε και νωρίτερα, συνήθως το εσωτερικό πρότυπο προϊόν έχει μεγαλύτερο μέγεθος, ενώ το αλληλοειδικό προϊόν της ARMS-PCR έχει μικρότερο μήκος. Συνεπώς θα πρέπει σε όλα τα δείγματα, ανεξάρτητα αν είναι φυσιολογικά ή μεταλλαγμένα, να διακρίνεται στην πηκτή το κοινό προϊόν ελέγχου, και μόνο στα δείγματα που φέρουν τη μετάλλαξη να διακρίνεται το αλληλοειδικό προϊόν. Μπορεί επίσης να γίνει ποσοτικοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης με χρήση ανιχνευτών υβριδισμού τύπου TaqMan, Σκορπιούς ή Μοριακούς Φάρους, όπως αναλύθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο.

Στη συγκεκριμένη εργασία συνδυάσαμε την ARMS-PCR με εσωτερικό πρότυπο προϊόν με HRMA για να ενισχύσουμε και να ταυτοποιήσουμε τα προϊόντα της αντίδρασης. Το κοινό προϊόν έχει μήκος 70bp και εμπεριέχει το αλληλοειδικό προϊόν που έχει μήκος 50bp. Οι θερμοκρασίες τήξης των δύο προϊόντων είναι 78°C και 75°C αντίστοιχα, άρα οι κορυφές τους μπορούν να διαχωρίζονται εύκολα στο καταγράφημα. Στα μεταλλαγμένα δείγματα αναμένονται δύο κορυφές, μια για το κοινό προϊόν ελέγχου ($T_m=78^\circ\text{C}$) και μια δεύτερη για το ειδικό προϊόν ($T_m=75^\circ\text{C}$).

7.2 *In silico* σχεδιασμός εκκινητών ARMS-HRMA για τη μετάλλαξη 3140 A>G στο εξόνιο 20 του *PIK3CA*

Οι γενικές οδηγίες για τον *in silico* σχεδιασμό των εκκινητών αναφέρθηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο, όπου καταγράφονται αναλυτικά όλα τα χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτουν οι εκκινητές έτσι ώστε η αντίδραση της PCR να έχει τα βέλτιστα αποτελέσματα. Στο κεφάλαιο 6 αναλύεται και το σκεπτικό με το οποίο σχεδιάστηκαν οι εκκινητές για την απλή ARMS-PCR, τόσο ο πρόσθιος αλληλοειδικός εκκινητής, όσο και ο ανάστροφος και παρατίθενται οι αναφορές του Primer Premier με όλα τα χαρακτηριστικά τους (μήκος, T_m , πιθανά διμερή).

Στη συγκεκριμένη μεθοδολογία χρησιμοποιείται το ίδιο ζεύγος εκκινητών για την ARMS-PCR και ένα επιπλέον ζεύγος εκκινητών, που υβριδοποιείται στην ίδια περίπου περιοχή, και είναι κοινό για τα φυσιολογικά και τα μεταλλαγμένα αλληλία. Το προϊόν που προκύπτει από το δεύτερο ζεύγος εκκινητών αναμένεται να σχηματίζεται ανεξάρτητα αν το δείγμα είναι φυσιολογικό ή μεταλλαγμένο, ώστε να λειτουργεί ως επιβεβαίωση της επιτυχημένης αντίδρασης της PCR. Ο ανάστροφος εκκινητής (20P70R), που είναι και μη ειδικός για

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR κάπιο συγκεκριμένο αλληλίο είναι κοινός και για τα δύο ζεύγη. Αυτό που διαφέρει είναι ο πρόσθιος εκκινητής. Στο ένα ζεύγος ο πρόσθιος εκκινητής (PIK_ARMS_EX20_3140) είναι ειδικός για τη μετάλλαξη και σε συνδυασμό με τον ανάστροφο δίνει προϊόν 50bp μόνο κατά την ύπαρξη του μεταλλαγμένου αλληλίου στο δείγμα (όπως αναφέρεται στην ανάπτυξη της μεθοδολογίας της ARMS-PCR). Στο δεύτερο ζεύγος ο πρόσθιος εκκινητής (20P70F) είναι εξίσου ειδικός και για τα δύο αλληλία και σε συνδυασμό με τον ανάστροφο δίνει προϊόν 70bp σε όλα τα δείγματα. Το δεύτερο ζεύγος εκκινητών έχει χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενη διπλωματική εργασία, το συγκεκριμένο πρωτόκολλο έχει βελτιστοποιηθεί και χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της συγκεκριμένης μετάλλαξης στο εξόνιο 20 του γονιδίου *PIK3CA*.⁹⁶

Η αλληλουχία του γονιδίου που περιέχει τη μετάλλαξη καθώς και η θέση των εκκινητών παρουσιάζονται στο **Σχήμα 7.2**.

```

acattctagtggggtaaagggaaatcaaaagatggttgtaagagaagtgagagaggaatgctatTTTTTTatag
ctttgtctacgaaagcctctctaattttgtgacatttgagcaaagacctgaagggtattaacatcatttgctcc
aaactgaccaaactggttcttattacttatagGTTTCAGGAGATGTGTTACAAGGCTTATCTAGCTATTTCGACA
GCATGCCAATCTCTTCATAAATCTTTTCTCAATGATGCTTGGCTCTGGAATGCCAGAACTACAATCTTTTGAT
GACATTGCATACATTTCGAAAGACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGCAAAGAGGCTTTGGAGTATTTTCATGAAAC
AAATGAATGATGCAC ATCATGGTGGCTGGACAACAAAATGGATTGGATCTTCCACACAATTAACAGCATG
CATTTGAACTGAAAAGATAACTGAGAAAATGAAAGCTCACTCTGGATTCCACACTGCACTGTTAATAACTCTCA
GCAGGCAAAGACCGATTGCATAGGAATTGCACAATCCATGAACAGCATTAGAATTTACAGCAAGAACAGAAAT
AAAATACTATATAATTTAAATAATGTAAACGCAAACAGGGTTTGATAGCACTTAAACTAGTTTCATTTCAAAAT
TAAGCTTTAGAATAATGCGCAATTTTCATGTTATGCCTTAAGTCCAAAAGGTAAACTTTGAAGATTGTTTGTA
TCTTTTTTTTAAAAAACAAAACAAAACAAAATCCCCAAAATATATAGAAATGATGGAGAAGGaaaaagt

```

Σχήμα 7.2 Η αλληλουχία του εξονίου 20 με τις πλησιέστερες αλληλουχίες ιντρονίων. Με μαύρα κεφαλαία γράμματα παρουσιάζεται το εξόνιο και με πράσινο η μη μεταφραζόμενη περιοχή του. Με μικρά γράμματα τα ιντρόνια και 5' μη μεταγραφόμενη περιοχή, με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται η μετάλλαξη. Ο κοινός ανάστροφος εκκινητής παρουσιάζεται με γαλάζιο, ο πρόσθιος εκκινητής, ο ειδικός για τη μετάλλαξη με κίτρινο χρώμα και ο πρόσθιος εκκινητής, ο κοινός και για τα δύο αλληλία με μωβ.

7.3 Συνθήκες PCR και ανάκτησης καμπυλών τήξεως

Στον **πίνακα 7.1** παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για το συγκεκριμένο γονίδιο.

Πίνακας 7.1 Χαρακτηριστικά εκκινητών για την ARMS-HRMA για το *PIK3CA*

Εκκινητής	Αλληλουχία 5'-3'	Nt	T _m	Προϊόν
Πρόσθιος (ARMS)	GAAACAAATGAATGATG<u>TACG</u>	21	50.7°C	50bp
Ανάστροφος (20P70R)	AATCCATTTTTGTTGTCCAG	20	52.5°C	
Πρόσθιος (20P70F)	GAGGCTTTGGAGTATTTCAT	20	51.2°C	70bp
Ανάστροφος (20P70R)	AATCCATTTTTGTTGTCCAG	20	52.5°C	

Στον **πίνακα 7.2** παρουσιάζονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο *PIK3CA*.

Πίνακας 7.2 Συστατικά της αντίδρασης ARMS-HRMA για το *PIK3CA*

Αντιδραστήρια	C Αρχική	Όγκος (μL)	C Τελική
Πρόσθιος εκκινητής	10 μM	0,3	0,3μM
Ανάστροφος εκκινητής	10 μM	0,3	0,3μM
Πρόσθιος εκκινητής	10 μM	0,15	0,15μM
Ανάστροφος εκκινητής	10 μM	0,15	0,15μM
dNTPs	10 mM	0,4	0,4mM
MgCl ₂	25 mM	1,2	3mM
BSA	10 μg/μL	0,15	0,15μg/μL
PCR ρυθμιστικό διάλυμα	5x	2,0	1x
Ταq πολυμεράση(Promega)	5 U/μL	0,1	0,05U/μL
LCGreen Plus	10x	1,0	1x
H ₂ O	-	3,15	-
Δείγμα DNA	25 ng/μL	1,0	2,5ng/μL
Συνολικός όγκος		10	

Στον **πίνακα 7.3** παρουσιάζονται οι συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 7.3 Συνθήκες ARMS-HRMA για το εξόνιο 20 του PIK3CA

Στάδιο PCR	PIK3CA εξόνιο 20	
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C/ 2min	1 ^ο στάδιο ενίσχυσης 15 κύκλοι
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C/ 10sec	
Υβριδοποίηση των εκκινητών στο DNA	59°C/ 15sec	
Επέκταση εκκινητών	72°C/ 20sec	2 ^ο στάδιο ενίσχυσης 30 κύκλοι
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C/ 10sec	
Υβριδοποίηση των εκκινητών στο DNA	63°C/ 15sec	
Επέκταση εκκινητών	72°C/ 20sec	3 ^ο στάδιο ενίσχυσης 15 κύκλοι
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C/ 10sec	
Υβριδοποίηση των εκκινητών στο DNA	65°C/ 15sec	
Επέκταση εκκινητών	72°C/ 20sec	

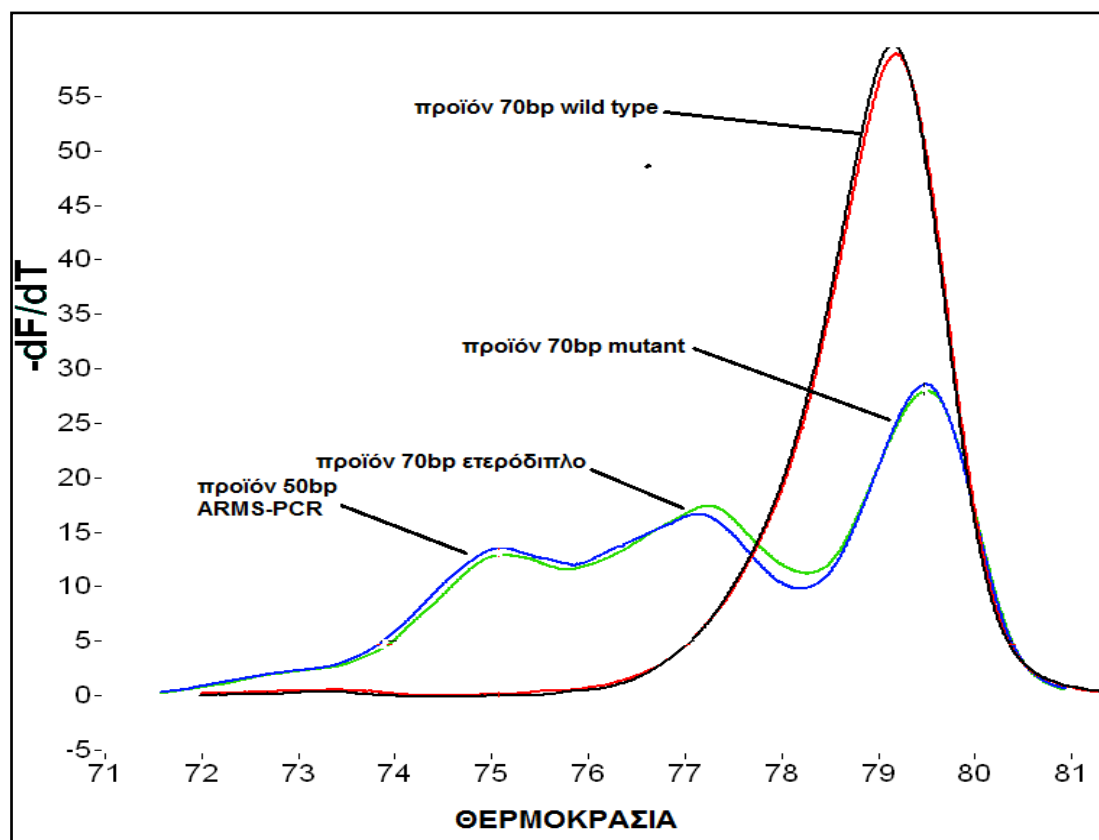
Στη συνέχεια, στον **πίνακα 7.4**, ακολουθεί η ανάκτηση των καμπυλών τήξεως των προϊόντων της παραπάνω αντίδρασης PCR με χρήση του οργάνου HR-1.

Πίνακας 7.4 Πρόγραμμα ανάκτησης καμπυλών τήξεως

Πρόγραμμα	PIK3CA εξόνιο 20
Ρυθμός τήξης	0,01°C/ sec, 50αν/ °C
Θερμοκρασία έναρξης ανάκτησης	70°C
Θερμοκρασία λήξης	82°C
Θερμοκρασία ψύξης	60°C

7.3 Ανάλυση και αξιολόγηση καμπυλών τήξεως

Ο αριθμός και η ένταση των κορυφών κάθε δείγματος θα μας βοηθήσουν να ταυτοποιήσουμε τα προϊόντα που έχουν παραχθεί με βάση την T_m τους και στη συνέχεια να χαρακτηρίσουμε τα δείγματα αυτά ως φυσιολογικά ή μεταλλαγμένα. Η λήψη των καμπυλών τήξεως μας προσφέρει με μεγαλύτερη ακρίβεια και ευκολία την επιβεβαίωση ότι, από την PCR παράχθηκαν μόνο τα επιθυμητά προϊόντα και όχι κάποιο παραπροϊόν, χωρίς να χρειάζεται να πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση, που απαιτεί χρόνο και επιπλέον αντιδραστήρια, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Γνωρίζουμε από τις αναφορές του Primer Premier πως η θερμοκρασία τήξης των επιθυμητών προϊόντων είναι περίπου 75°C για το προϊόν της ARMS-PCR (50bp) και 79°C για το προϊόν ελέγχου (70bp). Οποιαδήποτε άλλη μετάβαση αποδεικνύει την ύπαρξη παραπροϊόντος και απαιτεί την περαιτέρω βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου. Κατά την εκτέλεση του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου αναμένεται να παρατηρηθεί σε όλα τα δείγματα η κορυφή του προϊόντος των 70bp με $T_m=79^\circ\text{C}$, που αποδεικνύει ότι η PCR είναι επιτυχής σε όλα τα δείγματα, ανεξαρτήτως αν αυτά φέρουν την υπό μελέτη μετάλλαξη ή όχι. Η παρουσία μιας επιπλέον κορυφής θα αποδεικνύει αυτομάτως την ύπαρξη του ειδικού προϊόντος των 50bp με $T_m=75^\circ\text{C}$, που προκύπτει από την επέκταση του εκκινητή, που είναι ειδικός για τη μετάλλαξη, όταν αυτός συναντήσει στο δείγμα το μεταλλαγμένο αλληλίο. Άρα, η παρατήρηση δύο κορυφών από τα δύο προϊόντα της αντίδρασης, μας οδηγεί να συμπεράνουμε δύο πράγματα: αφενός-λόγω της ύπαρξης του κοινού, μη ειδικού προϊόντος των 70bp- ότι η παρουσία ή η απουσία του ειδικού προϊόντος του αλληλοειδικού εκκινητή οφείλεται στην παρουσία ή στην απουσία του μεταλλαγμένου αλληλίου και όχι σε κάποιο σφάλμα κατά την εκτέλεση της PCR και αφετέρου ότι η παρουσία του ειδικού προϊόντος ταυτίζεται με την παρουσία του μεταλλαγμένου αλληλίου. **(Εικόνα 7.1)** Η διαφορά στα T_m μεταξύ ομόδιπλου φυσιολογικού ($T_m=79^\circ\text{C}$) και ομόδιπλου μεταλλαγμένου ($T_m=79,5^\circ\text{C}$) οφείλεται στην παρουσία ζεύγους **A:T** και **G:C**, αντίστοιχα.



Εικόνα 7.1 Χαρακτηριστικό γράφημα καμπυλών τήξης μετά την πραγματοποίηση αντίδρασης PCR με τα δύο ζεύγη εκκινητών. Με κόκκινο και μαύρο παρουσιάζονται οι καμπύλες τήξεως του φυσιολογικού δείγματος και με πράσινο και μπλε οι καμπύλες τήξεως του μεταλλαγμένου.

7.4 Βελτιστοποίηση συγκεντρώσεων και θερμοκρασίας υβριδισμού εκκινητών της ARMS-PCR σε συνδυασμό με το HRMA

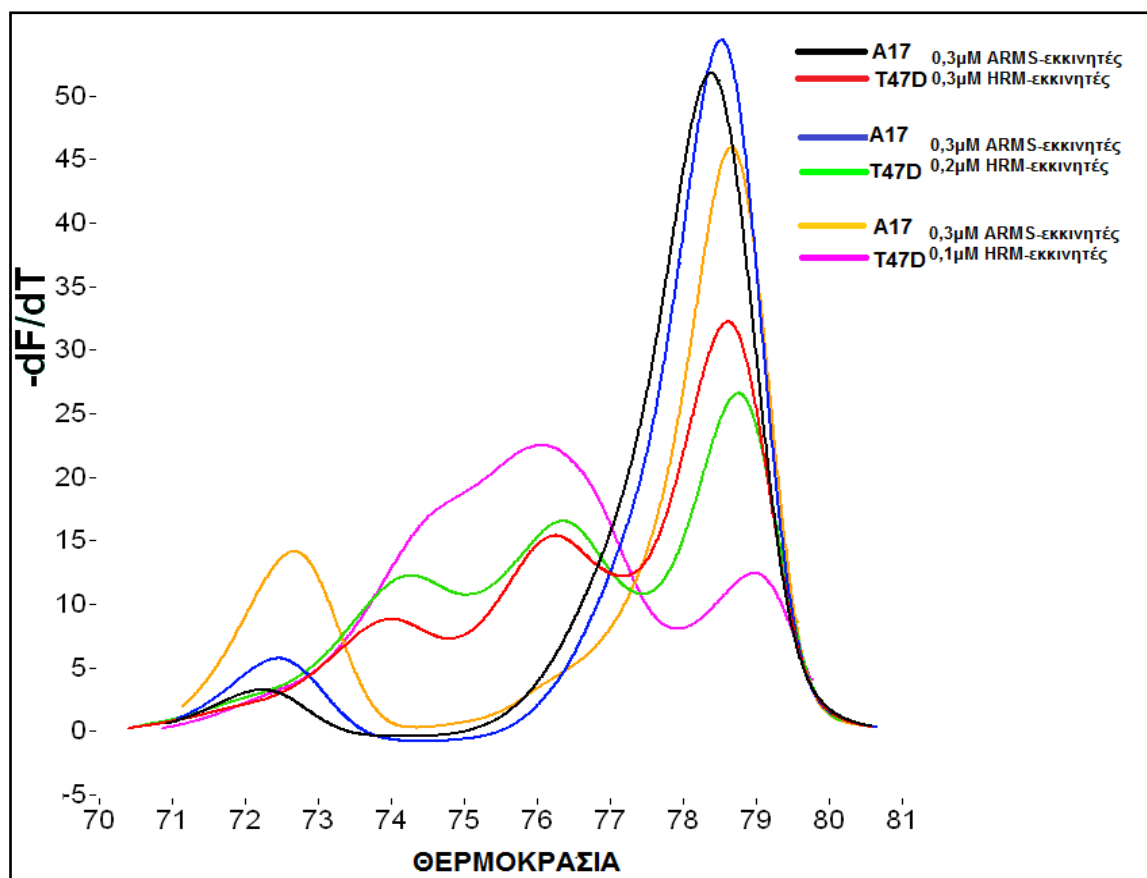
Κατά την ανάπτυξη της συγκεκριμένης μεθοδολογίας, όπου συνυπάρχουν στην αντίδραση της PCR δύο ζεύγη εκκινητών –με κοινό τον ανάστροφο εκκινητή, χρειάστηκε αρχικά να προσδιορίσουμε πειραματικά το βέλτιστο συνδυασμό συγκεντρώσεων των τριών εκκινητών στο μείγμα της αντίδρασης, έτσι ώστε να είναι εξίσου επιτυχής και η αντίδραση της ARMS-PCR, αλλά και ο σχηματισμός του προϊόντος ελέγχου από το μη αλληλοειδικό ζεύγος εκκινητών. Στόχος μας είναι, αφενός η λήψη ικανοποιητικής ποσότητας από το προϊόν ελέγχου τόσο από το φυσιολογικό όσο και από το μεταλλαγμένο μάρτυρα, και αφετέρου η εξειδικευμένη ενίσχυση των μεταλλαγμένων αλληλίων και η λήψη του ειδικού προϊόντος της ARMS-PCR.

Σε πρώτη φάση έγιναν έλεγχος των παρακάτω συνδυασμών συγκεντρώσεων ARMS-εκκινητών και HRM-εκκινητών, όπως φαίνεται στον **πίνακα 7.5**.

Πίνακας 7.5 Βελτιστοποίηση συγκεντρώσεων εκκινητών για ARMS-HRMA

Τελική συγκέντρωση ARMS-εκκινητών	Τελική συγκέντρωση HRM-εκκινητών
0,3μM	0,3μM
0,3μM	0,2μM
0,3μM	0,1μM

Στη συγκεκριμένη περίπτωση η αντίδραση PCR που πραγματοποιήθηκε περιελάμβανε ένα στάδιο ενίσχυσης 60 κύκλων και η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών ήταν $T_{an}=63^{\circ}\text{C}$. Η επιλογή αυτής της T_{an} έγινε με βάση τα δύο ανεξάρτητα πρωτόκολλα της ARMS-PCR και της HRM-PCR. Η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού για τους ARMS-εκκινητές είναι 63°C , στην οποία ελέγχθηκε η ειδικότητα και η ευαισθησία της μεθόδου σε προηγούμενο κεφάλαιο. Η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού των HRM-εκκινητών είναι 59°C , αλλά και στους 63°C δρούν ειδικά με λίγο μικρότερη ευαισθησία. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 7.2**.



Εικόνα 7.2 Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης εκκινητών στην ARMS-HRMA

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR

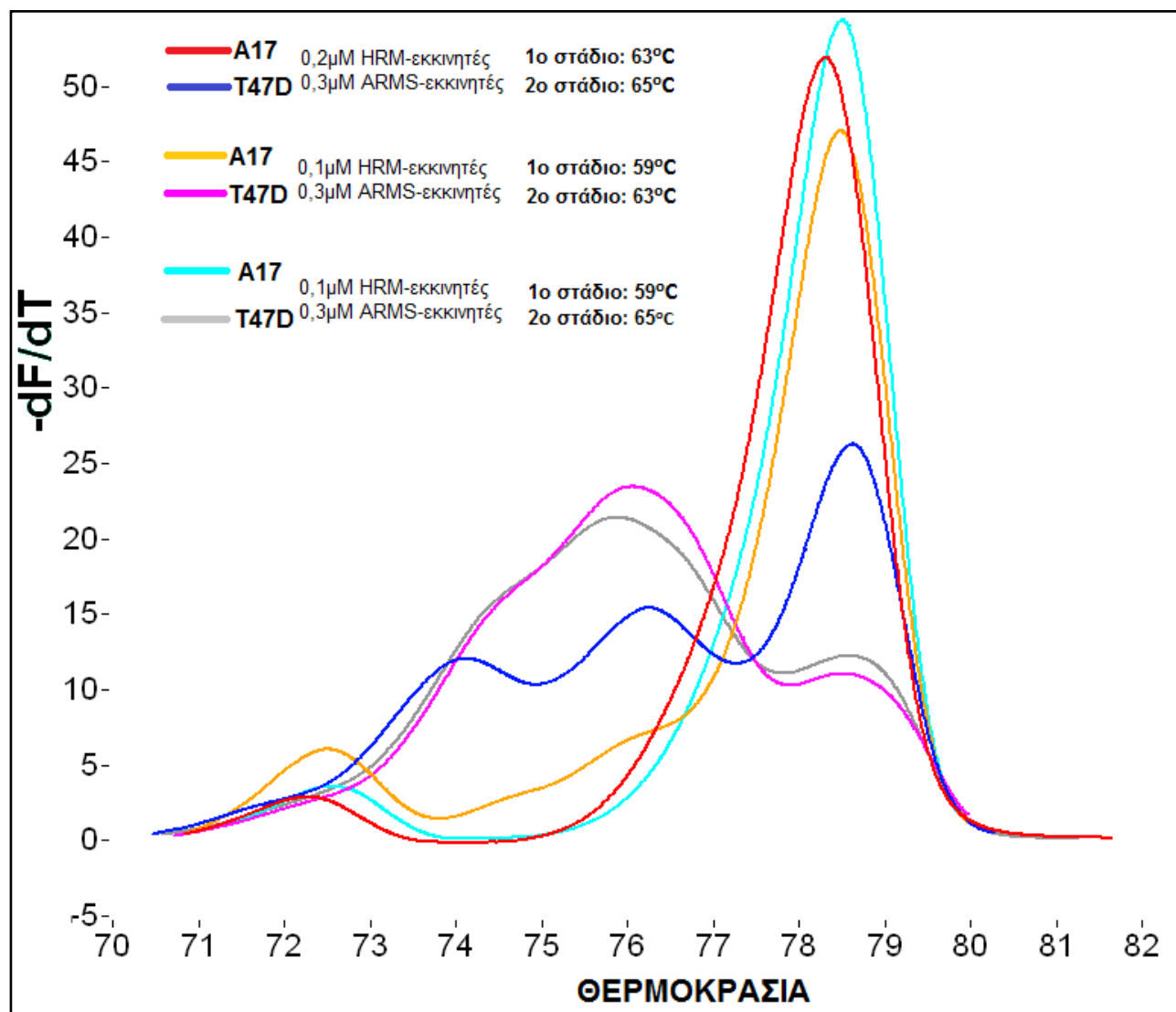
Παρατηρούμε ότι ο καλύτερος συνδυασμός συγκεντρώσεων των δύο ζευγών εκκινητών είναι αυτός με 0,3μM ARMS-εκκινητών και 0,2μM HRM-εκκινητών. Στη συγκεκριμένη περίπτωση οι κορυφές είναι πιο ευδιάκριτες και παρατηρείται ελάχιστα αυξημένη ευαισθησία, λόγω υψηλότερης κορυφής του ARMS-προϊόντος με $T_m=75^{\circ}\text{C}$.

Παράλληλα, στα πλαίσια των βελτιστοποιήσεων του πρωτοκόλλου αυτού, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με δύο και τρία στάδια ενίσχυσης, έτσι ώστε να επιτύχουμε τις καλύτερες συνθήκες για κάθε ζεύγος εκκινητών, χωρίς να οδηγηθούμε σε λήψη μη ειδικών προϊόντων. Τα πειράματα αυτά παρουσιάζονται στον **πίνακα 7.6**.

Πίνακας 7.6 Βελτιστοποιήσεις συγκέντρωσης εκκινητών και θερμοκρασίας για το πρωτόκολλο της ARMS-HRMA με δύο στάδια ενίσχυσης

Συγκέντρωση εκκινητών	T _{an} 1 ^{ου} σταδίου ενίσχυσης /αριθμός κύκλων	T _{an} 2 ^{ου} σταδίου ενίσχυσης /αριθμός κύκλων	Στόχος	Σχόλια
ARMS 0,3μM HRM 0,2μM	63°C /30 κύκλοι	65°C /40 κύκλοι	Αρχικά παράλληλη ενίσχυση και των δύο προϊόντων και στη συνέχεια αυστηρές συνθήκες για ενίσχυση του ARMS-προϊόντος χωρίς λήψη παραπροϊόντων	Διαχωρισμός mut από wt χωρίς ιδιαίτερη βελτίωση ευαισθησίας
ARMS 0,3μM HRM 0,1μM (μείωση συγκέντρωσης HRM-εκκινητών για αποφυγή παραπροϊόντων και γρήγορη εξάντλησή τους)	59°C /15 κύκλοι	63°C /45 κύκλοι	Αρχικά βέλτιστη T _{an} για HRM-εκκινητές και μείωση συγκέντρωσής τους για αποφυγή λήψης παραπροϊόντων και στη συνέχεια T _{an} για παράλληλη ενίσχυση και των δύο προϊόντων	Μη ευδιάκριτες κορυφές για κάθε προϊόν και λήψη μη ειδικών προϊόντων λόγω ελαστικών συνθηκών της αντίδρασης
ARMS 0,3μM HRM 0,1μM	59°C /10 κύκλοι	65°C /50 κύκλοι	Αρχικά βέλτιστες συνθήκες για HRM-εκκινητές για 10 κύκλους με στόχος το σχηματισμό μικρού αριθμού αντιγράφων και στη συνέχεια αυστηρές συνθήκες για λήψη μόνο ειδικών προϊόντων	Μη ευδιάκριτες κορυφές των προϊόντων και μείωση ευαισθησίας

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 7.3**.



Εικόνα 7.3 Γραφήματα καμπυλών τήξεως προϊόντων αντίδρασης PCR με δύο στάδια ενίσχυσης

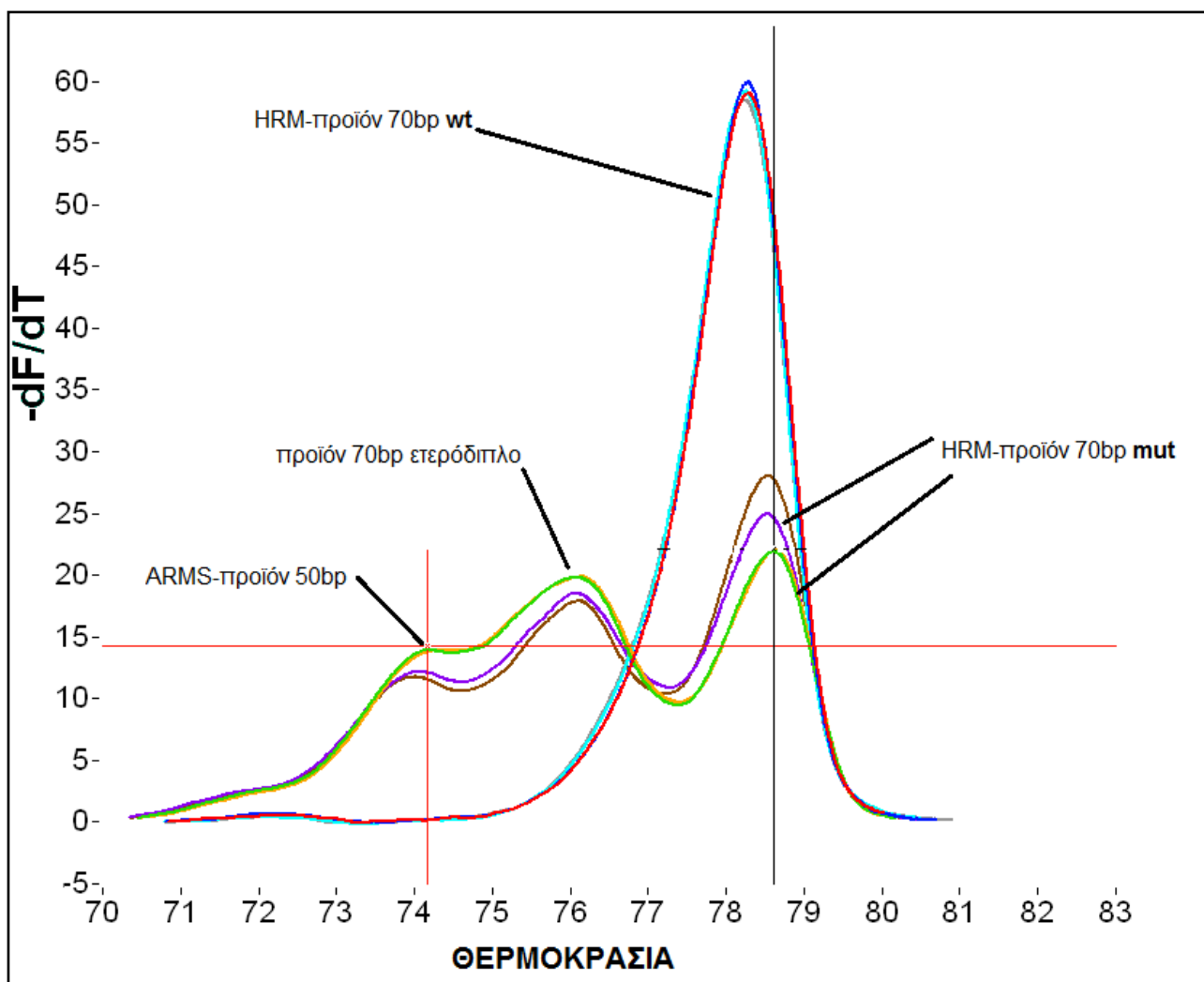
Από τα παραπάνω γραφήματα συμπεραίνουμε ότι το πρωτόκολλο που περιλαμβάνει συγκεντρώσεις εκκινητών 0,3μM για ARMS και 0,2μM για HRM δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με τα άλλα δύο πρωτόκολλα.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με τρία στάδια ενίσχυσης, έτσι ώστε σε κάθε στάδιο να επιτυγχάνεται συγκεκριμένος στόχος, με απώτερο σκοπό την επίτευξη καλύτερης ειδικότητας και ευαισθησίας. Τα πειράματα αυτά παρουσιάζονται στον **πίνακα 7.7**.

Πίνακας 7.7 Βελτιστοποιήσεις συγκέντρωσης εκκινητών και θερμοκρασίας για το πρωτόκολλο της ARMS-HRMA με τρία στάδια ενίσχυσης

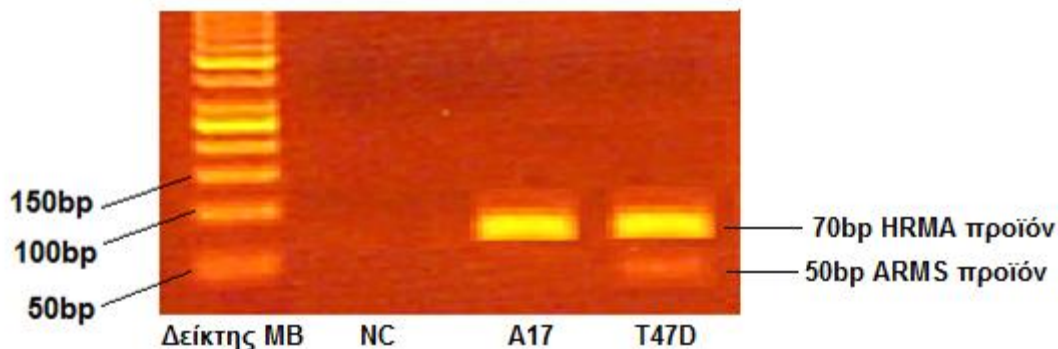
Συγκέντρωση εκκινητών	T _{an} 1 ^{ου} σταδίου ενίσχυσης /αριθμός κύκλων	T _{an} 2 ^{ου} σταδίου ενίσχυσης /αριθμός κύκλων	T _{an} 3 ^{ου} σταδίου ενίσχυσης /αριθμός κύκλων	Στόχος	Σχόλια
ARMS 0,3μM HRM 0,2μM	59°C 15 κύκλοι (σχηματισμός αντιγράφων 70bp)	63°C 30 κύκλοι (παράλληλη ενίσχυση και των δύο προϊόντων και σταδιακή εξάντληση των HRM-εκκινητών)	65°C 15 κύκλοι (αυστηρές συνθήκες ενίσχυσης του προϊόντος 50bp χρησιμοποιώντας τα αντίγραφα των 70bp σαν στόχο)	Η T _{an} και ο αριθμός κύκλων κάθε σταδίου ενίσχυσης έχει σαν στόχο την επίτευξη μέγιστης ειδικότητας και τη βελτίωση της ευαισθησίας	Ευδιάκριτες κορυφές των δύο προϊόντων και σαφής διαχωρισμός mut από wt
ARMS 0,3μM HRM 0,15μM (μείωση συγκέντρωσης HRM-εκκινητών για γρήγορη εξάντλησή τους και αύξηση ευαισθησίας)	59°C 15 κύκλοι (σχηματισμός αντιγράφων 70bp)	63°C 30 κύκλοι (παράλληλη ενίσχυση και των δύο προϊόντων και σταδιακή εξάντληση των HRM-εκκινητών)	65°C 15 κύκλοι (αυστηρές συνθήκες ενίσχυσης του προϊόντος 50bp χρησιμοποιώντας τα αντίγραφα των 70bp σαν στόχο)	Όμοια με παραπάνω και επιπλέον, γρηγορότερη εξάντληση των HRM-εκκινητών και περισσότερος διαθέσιμος χρόνος για ενίσχυση του ARMS-προϊόντος	Ευδιάκριτες κορυφές των δύο προϊόντων, σαφής διαχωρισμός mut από wt και αύξηση ευαισθησίας (υψηλότερη κορυφή ARMS-προϊόντος)

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 7.4**.



Εικόνα 7.4 Γραφήματα καμπυλών τήξεως προϊόντων αντίδρασης PCR με τρία στάδια ενίσχυσης. Με πράσινο και πορτοκαλί παρουσιάζονται τα προϊόντα της PCR με συγκεντρώσεις εκκινητών 0,15μM και 0,3μM, ενώ με καφέ και μώβ τα προϊόντα της PCR με συγκεντρώσεις εκκινητών 0,2μM και 0,3 μM.

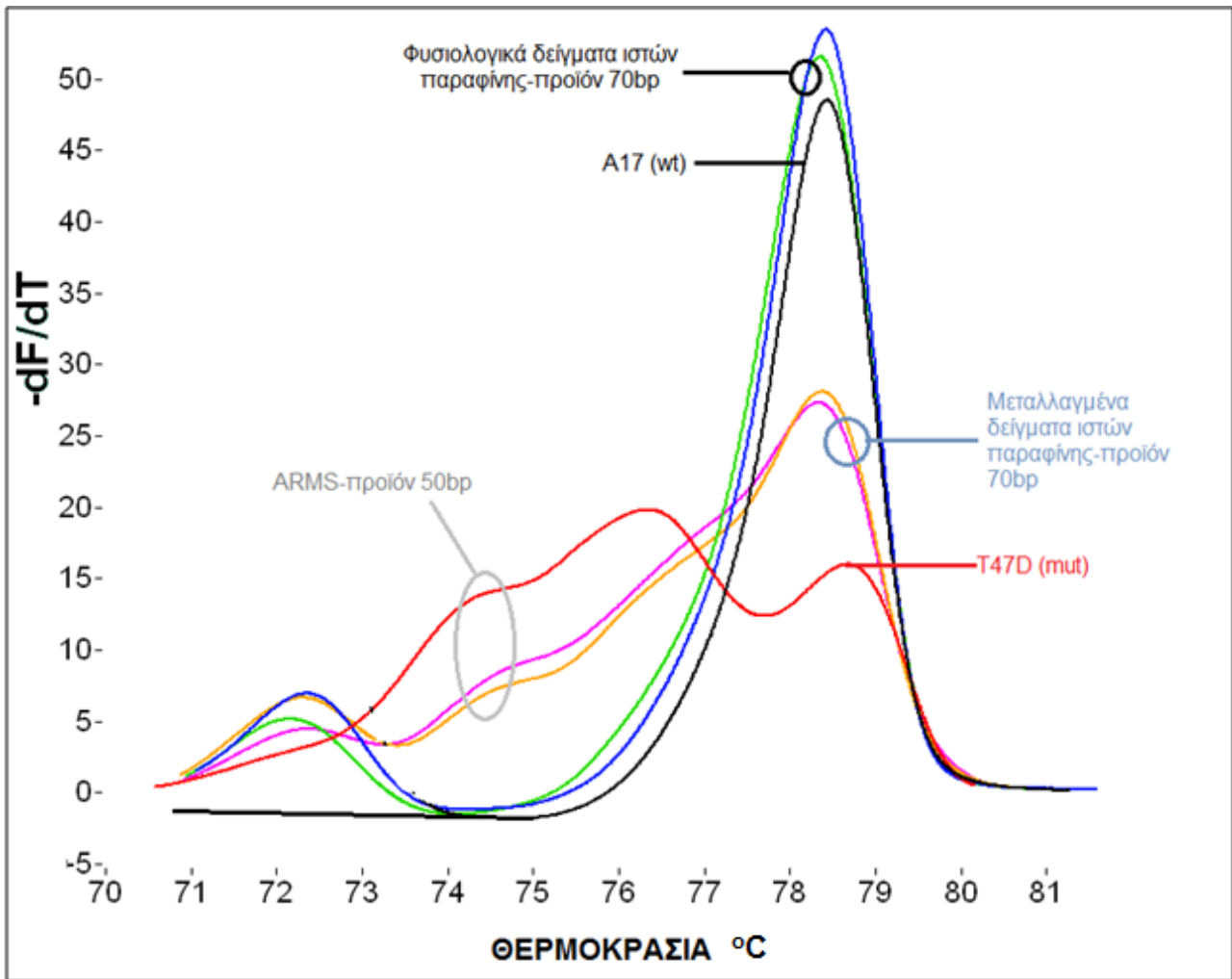
Συγκρίνοντας όλα τα παραπάνω γραφήματα και τα αντίστοιχα πρωτόκολλα από τα οποία προέκυψαν καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι ο καλύτερος συνδυασμός συγκεντρώσεων εκκινητών είναι 0,3μM ARMS-εκκινητές και 0,15μM HRM-εκκινητές. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα είναι αυτό με το τριπλό στάδιο ενίσχυσης στην αντίδραση της PCR, αφού όπως παρατηρείται υπάρχει σαφής διάκριση του μεταλλαγμένου μάρτυρα από το φυσιολογικό και επιπλέον σχηματίζεται περισσότερο ARMS-προϊόν (αυξημένη ευαισθησία), που είναι αυτό που τελικά χαρακτηρίζει ένα δείγμα μεταλλαγμένο ή όχι. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης. (Εικόνα 7.5)



Εικόνα 7.5 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR. Δύο προϊόντα, 70bp και 50bp για το πρότυπο που φέρει τη μετάλλαξη και ένα προϊόν 70bp για το φυσιολογικό πρότυπο.

7.5 Επιβεβαίωση πρωτοκόλλου ARMS-PCR σε συνδυασμό με το HRMA με χρήση γνωστών, μεταλλαγμένων και φυσιολογικών δειγμάτων ιστών ακινητοποιημένων σε block παραφίνης

Για την επικύρωση του παραπάνω πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ιστών ακινητοποιημένων σε block παραφίνης που είχαν μελετηθεί σε προηγούμενη ερευνητική εργασία.⁹⁶ Χρησιμοποιήθηκαν ενδεικτικά δύο φυσιολογικά και δύο μεταλλαγμένα δείγματα και φυσικά τα δύο πρότυπα δείγματα (T47D και A17) που χρησιμοποιήθηκαν στις βελτιστοποιήσεις. Το γράφημα των καμπυλών τήξεως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 7.6**.



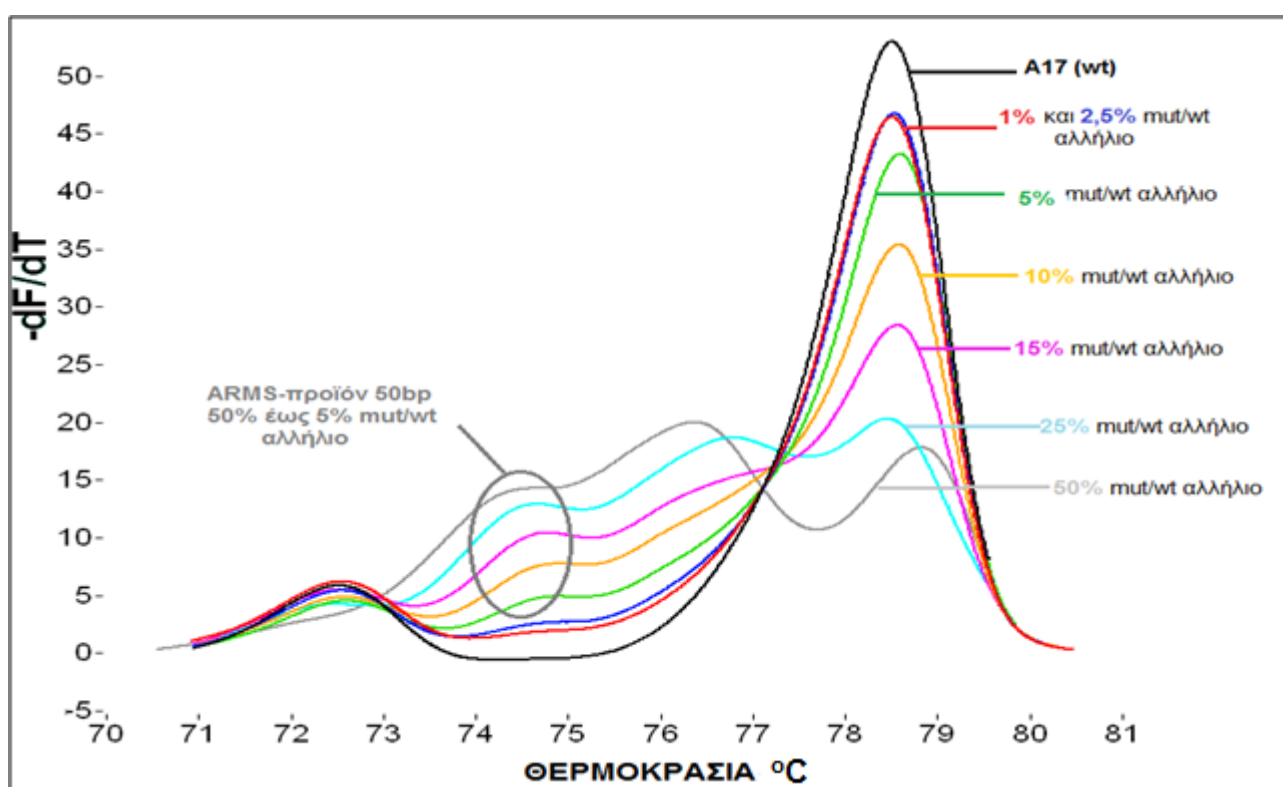
Εικόνα 7.6 Γράφημα καμπυλών τήξεως όπου διαχωρίζονται οι καμπύλες των φυσιολογικών δειγμάτων από αυτές των μεταλλαγμένων.

Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, στο οποίο καταλήξαμε μετά τις βελτιστοποιήσεις, μπορούμε να διαχωρίζουμε τα φυσιολογικά δείγματα από τα μεταλλαγμένα βασιζόμενοι στις καμπύλες τήξεως. Η παρουσία του μη ειδικού προϊόντος ($T_m=72^{\circ}\text{C}$) που εμφανίζεται τυχαία και όχι σε κάθε εκτέλεση του πρωτοκόλλου δεν μας εμποδίζει να διαχωρίσουμε τα προϊόντα με βάση τα T_m τους.

7.6 Μελέτη αναλυτικής ευαισθησίας της μεθόδου ARMS-HRMA με χρήση προτύπων μιγμάτων μεταλλαγμένου δείγματος σε φυσιολογικό (T47D/A17)

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, για τον έλεγχο και τον προσδιορισμό της αναλυτικής ευαισθησίας των μεθόδων που αναπτύχθηκαν παρασκευάστηκαν τα ποσοστιαία πρότυπα με κατάλληλες αναμίξεις του θετικού μάρτυρα T47D, ετερόζυγου για τη μετάλλαξη, και του αρνητικού μάρτυρα A17. Τα ποσοστιαία πρότυπα που παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,2%, 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 50%,

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR 100% T47D(ετερόζυγο) και 100% A17. Τα παραπάνω μείγματα μεταλλαγμένου δείγματος σε φυσιολογικό χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου της ARMS-PCR με εσωτερικό πρότυπο σε συνδυασμό με HRMA, όπως αυτό διαμορφώθηκε μετά την ολοκλήρωση των βελτιστοποιήσεων. Στόχος μας ήταν να προσδιορίσουμε το ελάχιστο ποσοστό μεταλλαγμένου, που μπορεί να ανιχνευθεί με την μέθοδο που μελετάμε, παρουσία περίσσειας φυσιολογικού. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές, έτσι ώστε να είμαστε βέβαιοι για τα αποτελέσματα. Το τελικό συμπέρασμα ήταν ότι με την ARMS-PCR σε συνδυασμό με το HRMA και το συγκεκριμένο πρωτόκολλο μπορούμε να ανιχνεύσουμε με βεβαιότητα ποσοστό 5% μεταλλαγμένου παρουσία φυσιολογικού.(Εικόνα 7.7)



Εικόνα 7.7 Γράφημα καμπυλών τήξεως για προσδιορισμό της ευαισθησίας της μεθόδου ARMS-PCR με εσωτερικό πρότυπο σε συνδυασμό με HRMA.

7.7 Συμπεράσματα

Η ARMS-PCR σε συνδυασμό με τη HRMA είναι μία μεθοδολογία που συνδυάζει την αλληλοειδική ενίσχυση με την ανάλυση καμπυλών τήξεως. Στη μέθοδο που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν παράλληλα μία αντίδραση ARMS-PCR, όπου ενισχύεται επιλεκτικά το μεταλλαγμένο αλληλίο, και μια αντίδραση HRMA που ενισχύει μία κοινή αλληλουχία τόσο στο μεταλλαγμένο όσο και στο φυσιολογικό αλληλίο. Για την

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR επίτευξη αυτού του σκοπού χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών στην ίδια αντίδραση PCR από την επέκταση των οποίων προκύπτουν δύο προϊόντα διαφορετικού μήκους, 50bp και 70bp. Η ανίχνευση και η ταυτοποίηση των προϊόντων αυτών θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, όπου τα προϊόντα θα διαχωρίζονταν με βάση το μήκος τους. Παρ' όλα αυτά επιλέξαμε το HRMA, γνωρίζοντας ότι η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται σε επίπεδα κάτω του 5% και επιπλέον επειδή δεν απαιτείται καποιος ιδιαίτερος χειρισμός του δείγματος μετά την PCR σε σύγκριση με την ηλεκτροφόρηση.

Η χρήση του δεύτερου ζεύγους εκκινητών, κοινού για τα δύο αλληλία, έχει πραγματοποιηθεί και σε άλλες μελέτες ανίχνευσης μεταλλάξεων, έχοντας σαν στόχο κυρίως την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ARMS-PCR. Η χρήση τους σχετίζεται με τον έλεγχο της ποιότητας και της ποσότητας του DNA, και γι αυτό το λόγο συνήθως οι εκκινητές αυτοί ενισχύουν μη-κοινή αλληλουχία με αυτή που ενισχύεται στην αντίδραση της ARMS-PCR από τον αλληλοειδικό εκκινητή (αλληλουχία σε διαφορετικό εξόνιο του ίδιου γονιδίου, ή ακόμα και σε διαφορετικό γονίδιο).

Στη μεθοδολογία που αναπτύξαμε, τα δύο ζεύγη εκκινητών ενισχύουν αλληλουχία που βρίσκεται στην ίδια περιοχή και περιλαμβάνει τη μετάλλαξη. Με τον τρόπο αυτό επιτύχαμε διπλό στόχο. Αφενός ελέγξαμε την ποιότητα και την ποσότητα του DNA στο μίγμα της αντίδρασης, όπως γινόταν και σε άλλες μελέτες μέχρι τώρα. Αφετέρου, το προϊόν από την επέκταση των κοινών εκκινητών μπορεί να χρησιμεύσει σαν αλληλουχία-στόχος για τον αλληλοειδικό εκκινητή, η επέκταση του οποίου θα δώσει το ειδικό προϊόν της ARMS-PCR. Επιπλέον, μπορούμε ταυτόχρονα με δύο τρόπους να εξακριβώσουμε την ύπαρξη ή όχι της μετάλλαξης. Πρώτον, με την παρουσία ή όχι του ειδικού ARMS-προϊόντος και δεύτερον με τη μορφή της καμπύλης και την παρουσία κορυφής ετερόδιπλων προϊόντων από την επέκταση του κοινού ζεύγους εκκινητών. Βελτιστοποιώντας το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, έτσι ώστε εξασφαλίσουμε βέλτιστες συνθήκες επέκτασης και για τα δύο ζεύγη εκκινητών, χωρίς να παραβλέψουμε την ειδικότητα, καταφέραμε να επιτύχουμε ευαισθησία της τάξεως του 5%. Τα επίπεδα αυτά της ευαισθησίας μπορεί να μην είναι αρκετά για την εφαρμογή της μεθόδου για ανίχνευση αλληλίων σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση, αλλά η μέθοδος θα μπορούσε να εφαρμοσθεί επιτυχώς για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 20 του *PIK3CA* σε δείγματα DNA από ιστούς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το *PIK3CA* είναι ένα από τα γονίδια που παρουσιάζουν μεταλλάξεις με υψηλή συχνότητα σε διάφορα είδη καρκίνου. Ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων στο *PIK3CA* συναντάται σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Για το λόγο αυτό πολλές ερευνητικές ομάδες ασχολούνται με την ανίχνευση και τη σημασία των μεταλλάξεων αυτών στον καρκίνο. Οι σωματικές μεταλλάξεις παρουσιάζονται σε αυξημένα ποσοστά σε τρία σημεία στο γονίδιο του *PIK3CA* και με σειρά μειούμενης συχνότητας είναι οι: H1047R (3140A>G, εξόνιο 20), E545K (1633G>A, εξόνιο 9) και E542K (1624G>A, εξόνιο 9). Παρατηρούμε λοιπόν, ότι οι μεταλλάξεις στο εξόνιο 20 κυριαρχούν, αλλά και τα τρία είδη μεταλλάξεων που προαναφέρθηκαν συμβάλλουν στην αύξηση της ενεργότητας της κινάσης, με αποτέλεσμα το *PIK3CA* να δρα ως ογκογονίδιο και να απορρυθμίζει όλα τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει. Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα δείγματα τα οποία έφεραν μία από τις παραπάνω μεταλλάξεις ήταν ετερόζυγα για τη μετάλλαξη αυτή. Η μελέτη των μεταλλάξεων στο *PIK3CA* απέκτησε ακόμα μεγαλύτερη σημασία όταν το μονοπάτι στο οποίο εμπλέκεται συσχετίστηκε με την ανταπόκριση στη θεραπεία των ασθενών με καρκίνο του μαστού. Ιδιαίτερη συσχέτιση παρουσιάζεται σε ασθενείς που υπερεκφράζουν τον HER2 υποδοχέα και λαμβάνουν θεραπεία με το φάρμακο Herceptin. Μεγάλο μέρος των ασθενών που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία παρουσιάζουν αντίσταση στη θεραπεία, ενώ ταυτόχρονα φέρουν κάποια από τις τρεις πιο συχνές σωματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA* που οδηγούν στην ενεργοποίησή του. Η αντίσταση στη συγκεκριμένη θεραπεία μπορεί να οφείλεται επίσης και σε απώλεια της λειτουργίας της φωσφατάσης PTEN.

Η παρούσα εργασία χωρίζεται σε δύο μέρη: Στο πρώτο μέρος εφαρμόσαμε μία μέθοδο που είχε ήδη αναπτυχθεί στο εργαστήριό μας, και βασίζεται στην ανάλυση καμπυλών τήξεως HRMA σε μία σειρά δειγμάτων από ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει ήδη εφαρμοστεί στο πλαίσιο της διατριβής ειδίκευσης του Π. Βορκά για ανίχνευση μεταλλάξεων σε 75 δείγματα DNA από ιστούς παραφίνης (FFPEs) ασθενών με καρκίνο μαστού που υπεβλήθησαν σε θεραπεία με το φάρμακο Herceptin. Βρέθηκε ότι το 30% των δειγμάτων έφερε τη μετάλλαξη στο εξόνιο 20. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας η μέθοδος HRMA εφαρμόστηκε σε άλλα 31 δείγματα ιστών παραφίνης FFPEs της ίδιας ομάδας ασθενών. Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της

Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR ανάλυσης των δειγμάτων ιστών καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι 33/106 ασθενείς (31%) έφεραν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Τα αποτελέσματα αυτά θα συμπεριληφθούν σε μελέτη που βρίσκεται σε εξέλιξη και αφορά στον έλεγχο ύπαρξης συσχέτισης της παρουσίας μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIK3CA* και στον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης της φωσφατάσης PTEN σε ασθενείς που έχουν λάβει θεραπεία με Herceptin και γνωρίζουμε την ανταπόκρισή τους σε αυτή.

Στην συνέχεια επεκτείναμε την εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα cell free DNA, σε δείγματα γενωμικού DNA από κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), καθώς και σε δείγματα cDNA από mRNA που απομονώθηκε από CTCs. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 9/45 (20%) των δειγμάτων cell free DNA ασθενών με επιβεβαιωμένη μετάσταση καθώς και 3/25 (12%) των δειγμάτων cell free DNA ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο μαστού προ χημειοθεραπείας έφεραν τη μετάλλαξη 3140A>G στο εξόνιο 20 του *PIK3CA*. Το cell free DNA προέρχεται από κύτταρα που έχουν υποστεί απόπτωση, και τα επίπεδά του έχουν βρεθεί αυξημένα σε ασθενείς με καρκίνο. Άρα η ανίχνευση μεταλλάξεων στο cell free DNA ασθενών με καρκίνο του μαστού θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης που θα επιτρέπει την κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση την ανταπόκρισή τους σε θεραπείες όπου εμπλέκεται το μονοπάτι του PI3K. Επιπλέον, αν επιβεβαιωθεί ότι τα αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων DNA ιστών συμπίπτουν με αυτά της ανάλυσης cell free DNA, τότε δε θα απαιτείται η επίπονη διαδικασία της βιοψίας για να λάβουμε πληροφορίες για τον όγκο, αλλά μία απλή αιμοληψία θα είναι αρκετή για να προβλέψει την ανταπόκριση στη θεραπεία και την εξέλιξη της νόσου. Η εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα γενωμικού DNA από CTCs ασθενών με χειρουργήσιμο καρκίνο του μαστού έδειξε ότι 2/60 (3%) των ασθενών μετά το χειρουργείο και πριν την έναρξη συμπληρωματικής θεραπείας έφερε τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Η μετάλλαξη δε βρέθηκε σε δείγματα γενωμικού DNA από CTCs ασθενών με επιβεβαιωμένη μετάσταση. Η ανίχνευση μεταλλάξεων στα CTCs θα μπορούσε να είναι μία εύκολη, μη επεμβατική μέθοδος πρόβλεψης και παρακολούθησης της ανταπόκρισης στη θεραπεία και της εξέλιξης της νόσου. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs είναι σημαντικός όχι μόνο για την επιβεβαίωση της προέλευσής τους, αλλά και για την παρακολούθηση των αλλαγών που συμβαίνουν κατά την εξέλιξη του όγκου, με σκοπό την ανακάλυψη διαγνωστικών και θεραπευτικών στόχων. Ο περιορισμένος αριθμός αυτών των κυττάρων και κατ' επέκταση και της ποσότητας του DNA που απομονώνεται από αυτά, καθιστά την ανίχνευση μεταλλάξεων δύσκολη. Απαιτούνται δηλαδή μέθοδοι ανάλυσης μεταλλάξεων πολύ υψηλής ευαισθησίας.

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας εργασίας αναπτύχθηκαν δύο μέθοδοι για ανίχνευση μεταλλάξεων στο εξόνιο 20 του *PIK3CA*. Αρχικά αναπτύξαμε μεθοδολογία ARMS-PCR, που βασίζεται στην αλληλοειδική ενίσχυση με χρήση ειδικών εκκινητών. Μετά τις απαραίτητες βελτιστοποιήσεις καταλήξαμε σε ένα πρωτόκολλο, όπου ο διαχωρισμός φυσιολογικών και μεταλλαγμένων δειγμάτων γίνεται με βάση το cut-off των 50 κύκλων που ορίστηκε μετά από πειραματική επιβεβαίωση. Με βάση πειράματα ευαισθησίας, όπου παρασκευάστηκαν πρότυπα δείγματα με γνωστή αναλογία μεταλλαγμένου προς φυσιολογικό δείγμα, βρήκαμε ότι η μέθοδος έχει ευαισθησία 1%. Η ορθότητα των αποτελεσμάτων της ARMS-PCR επιβεβαιώθηκε με εφαρμογή του πρωτοκόλλου σε δείγματα ιστών παραφίνης ασθενών με καρκίνο μαστού, τα οποία είχαν αναλυθεί για την παρουσία μεταλλάξεων στο εξόνιο 20 του *PIK3CA* με DNA Sequencing.

Η δεύτερη μέθοδος που αναπτύξαμε βασίστηκε στο συνδυασμό της ARMS-PCR με το HRMA και την παρουσία προϊόντος εσωτερικού ελέγχου. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ενίσχυση δύο προϊόντων (το ένα αντιστοιχεί σε ARMS-PCR και το άλλο σε HRMA), με χρήση δύο ζευγών εκκινητών, η ταυτοποίηση των οποίων γίνεται με ανάλυση καμπυλών τήξεως. Τα δύο ζεύγη εκκινητών ενισχύουν αλληλουχία σε κοινή περιοχή του εξονίου 20 και συμπεριλαμβάνουν τη μετάλλαξη. Ο διαχωρισμός των φυσιολογικών δειγμάτων από τα μεταλλαγμένα γίνεται με βάση τον αριθμό των προϊόντων και τις καμπύλες τήξεώς τους. Μετά από βελτιστοποιήσεις καταλήξαμε στο τελικό πρωτόκολλο όπου συνδυάζεται ο βέλτιστος συνδυασμός συγκεντρώσεων των δύο ζευγών εκκινητών με τις βέλτιστες συνθήκες εκτέλεσης της αντίδρασης της PCR, έτσι ώστε να λαμβάνονται μόνο ειδικά προϊόντα. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 5% και η ορθότητά της επιβεβαιώθηκε επίσης με εφαρμογή του πρωτοκόλλου σε δείγματα ιστών παραφίνης ασθενών με καρκίνο μαστού, τα οποία είχαν αναλυθεί με DNA Sequencing.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Ακολουθούν οι αναφορές από το Primer Premier για το πρωτόκολλο της ARMS-PCR:

- Εκκινητές με το μεταλλαγμένο αλληλίο

Sequence: NewSequence

(Sense primer) 5' GAAACAAATGAATGATGTACG 3'
 3' (184) CTTTGTTTACTTACTACGTGC (204) 5'

(Anti-sense primer) 5' AATCCATTTTGTGTCCAG 3'
 3' (233) TTAGGTAARAAACACAGGTC (214) 5'

Properties:

	Rating	Seq No	Length	Tm [° C]	GC%	ΔG [kcal/mol]	Activity [μg/OD]	Degeneracy	Ta Opt [° C]
Sense	92	184	21	50.7	33.3	-35.3	29.3	1	--
Anti-sense	78	233	20	52.5	35.0	-36.0	32.9	1	--
Product	71	--	50	75.5	40.0	--	--	--	43.1

Secondary structures of sense primer:

1. Most stable hairpin:
 ΔG = -0.1 [kcal/mol] (3' Hairpin)
 GTAAACAAAG 5'
 | | |
 ATGATGTACG 3'

1. Most stable dimer:
 ΔG = -4.6 [kcal/mol] (3' Dimer)
 5' GAAACAAATGAATGATGTACG 3'
 | | | |
 3' GCATGTAGTAAGTAAACAAAG 5'

2. ΔG = -4.3 [kcal/mol] (3' Dimer)
 5' GAAACAAATGAATGATGTACG 3'
 | | | |
 3' GCATGTAGTAAGTAAACAAAG 5'

No false priming sites found

Secondary structures of anti-sense primer:
No hairpins found

No dimers found

1. Most stable false priming site:
 ΔG = -14.5 [kcal/mol]; Product = 406
 3' GACCTGTTGTTTTTACCTAA 5'
 | | | | | | | | | |
 5' (570) AAACAAACAAAAATCCCCA (589) 3'

Secondary structures of primer pair:

1. Most stable cross dimer:
 ΔG = -9.1 [kcal/mol]
 5' GAAACAAATGAATGATGTACG 3'
 | | | | | | | | | |
 3' GACCTGTTGTTTTTACCTAA 5'

2. ΔG = -7.3 [kcal/mol]
 5' GAAACAAATGAATGATGTACG 3'
 | | | | | | | | | |
 3' GACCTGTTGTTTTTACCTAA 5'

3. ΔG = -5.4 [kcal/mol]
 5' GAAACAAATGAATGATGTACG 3'
 | | | | | | | | | |
 3' GACCTGTTGTTTTTACCTAA 5'

4. ΔG = -5.2 [kcal/mol]
 5' GAAACAAATGAATGATGTACG 3'
 | | | | | | | | | |
 3' GACCTGTTGTTTTTACCTAA 5'

- Εκκινητές με το φυσιολογικό αλληλίο

Sequence: NewSequence

(Sense primer) 5' GAAACAAATGAATGATGTACG 3'
 |||
 3' (184) CTTTGTACTACTACTACGTGT (204) 5'

(Anti-sense primer) 5' AATCCATTTTGTGTCCAG 3'
 |||
 3' (233) TTAGTAAAAACACAGTC (214) 5'

Properties:

	Rating	Seq No	Length	Tm [° C]	GC%	ΔG [kcal/mol]	Activity [μg/OD]	Degeneracy	Ta Opt [° C]
Sense	92	184	21	50.7	33.3	-35.3	29.3	1	--
Anti-sense	78	233	20	52.5	35.0	-36.0	32.9	1	--
Product	71	--	50	74.7	38.0	--	--	--	42.5

Secondary structures of sense primer:

1. **Most stable hairpin:**
 ΔG = -0.1 [kcal/mol] (3' Hairpin)
 5' GTAAACAAAG 5'
 |||
 3' ATGATGTACG 3'

1. **Most stable dimer:**
 ΔG = -4.6 [kcal/mol] (3' Dimer)
 5' GAAACAAATGAATGATGTACG 3'
 |||
 3' GCATGTAGTAAGTAAACAAAG 5'

2. ΔG = -4.3 [kcal/mol] (3' Dimer)
 5' GAAACAAATGAATGATGTACG 3'
 |||
 3' GCATGTAGTAAGTAAACAAAG 5'

No false priming sites found

Secondary structures of anti-sense primer:
No hairpins found

No dimers found

1. **Most stable false priming site:**
 ΔG = -14.5 [kcal/mol]; Product = 406
 3' GACCTGTTGTTTTTACCTAA 5'
 |||
 5' (570) AAACAAAACAAAAATCCCCA (589) 3'

Secondary structures of primer pair:

1. **Most stable cross dimer:**
 ΔG = -9.1 [kcal/mol]
 5' GAAACAAATGAATGATGTACG 3'
 |||
 3' GACCTGTTGTTTTTACCTAA 5'

2. ΔG = -7.3 [kcal/mol]
 5' GAAACAAATGAATGATGTACG 3'
 |||
 3' GACCTGTTGTTTTTACCTAA 5'

3. ΔG = -5.4 [kcal/mol]
 5' GAAACAAATGAATGATGTACG 3'
 |||
 3' GACCTGTTGTTTTTACCTAA 5'

4. ΔG = -5.2 [kcal/mol]
 5' GAAACAAATGAATGATGTACG 3'
 |||
 3' GACCTGTTGTTTTTACCTAA 5'

Ακολουθούν οι αναφορές από το Primer Premier για ζεύγος εκκινητών **20P70F-20P70R**:

Sequence: NewSequence

(Sense primer) 5' GAGGCTTTGGAGTATTTTCAT 3'
 3' (164) CTCGAAACCTCATAAAGTA (183) 5'

(Anti-sense primer) 5' AATCCATTTTGTGTCCAG 3'
 3' (233) TTAGGTAAAAACAACAGGTC (214) 5'

Properties:

	Rating	Seq No	Length	Tm [° C]	GC%	ΔG [kcal/mol]	Activity [μg/OD]	Degeneracy	Ta Opt [° C]
Sense	83	164	20	51.2	40.0	-35.7	32.2	1	--
Anti-sense	78	233	20	52.5	35.0	-36.0	32.9	1	--
Product	68	--	70	77.9	38.6	--	--	--	44.9

Secondary structures of sense primer:
No hairpins found

No dimers found

1. Most stable false priming site:
 ΔG = -11.4 [kcal/mol] (3' False priming site); Product = 0
 5' GAGGCTTTGGAGTATTTTCAT 3'
 3' (488) TCTTATTACGCGTTAAAGTA (507) 5'

2. ΔG = -9.9 [kcal/mol] (3' False priming site); Product = 0
 3' TACTTTATGAGGTTTCGGAG 5'
 5' (182) ATGAAACAAATGAATGATGC (201) 3'

3. ΔG = -9.9 [kcal/mol] (3' False priming site); Product = 0
 3' TACTTTATGAGGTTTCGGAG 5'
 5' (288) ATGAAAGCTCACTCTGGATT (307) 3'

Secondary structures of anti-sense primer:
No hairpins found

No dimers found

1. Most stable false priming site:
 ΔG = -14.5 [kcal/mol]; Product = 426
 3' GACCTGTTGTTTTTACCTAA 5'
 5' (570) AAACAAAACAAAATCCCCA (589) 3'

Secondary structures of primer pair:

1. Most stable cross dimer:
 ΔG = -7.6 [kcal/mol] (3' Cross dimer)
 5' GAGGCTTTGGAGTATTTTCAT 3'
 3' GACCTGTTGTTTTTACCTAA 5'

2. ΔG = -6.6 [kcal/mol]
 5' GAGGCTTTGGAGTATTTTCAT 3'
 3' GACCTGTTGTTTTTACCTAA 5'

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

αγγλικός όρος	ελληνικός όρος
acquired or spontaneous mutation	επίκτητη ή αυθόρμητη μετάλλαξη
allele-specific primer	αλληλοειδικός εκκινητής
apyrase	απυράση
asymmetric PCR	ασύμμετρη PCR
ATP sulfurylase	σουλφουρυλάση του ATP
background phase	φάση «υποβάθρου» ή φάση «θορύβου»
benign	καλοήθης
blotting	αποτύπωση
catalytic domain	περιοχή με καταλυτική δράση
colonization	δημιουργία αποικίας
cross-hybridization	διασταυρούμενη υβριδοποίηση
cut-off	όριο λήψης απόφασης
deletion	έλλειμμα
DNA Microarrays	Μικροσυστοιχίες Ολιγονουκλεοτιδίων DNA
DNA sequencer	αυτοματοποιημένο μηχάνημα ανάλυσης DNA
Double-Dye Oligonucleotide Probe/Taqman	ανιχνευτής DNA διπλής χρωστικής
fluorescence difference curve	καμπύλη διαφοράς φθορισμού
frameshift	πλαίσιο ανάγνωσης
germline mutation	μετάλλαξη γαμετικής σειράς
growth factor	αυξητικός παράγοντας
hairpin	δομή φουρκέτας
helical domain	περιοχή έλικας
hereditary mutation	κληρονομούμενη μετάλλαξη
heteroduplex	ετερόδιπλο
homoduplex	ομόδιπλο
hybridization probe	ανιχνευτής υβριδισμού DNA
insertion	προσθήκη
internal control	εσωτερικό πρότυπο
internal control primers	εσωτερικοί εκκινητές ελέγχου
internal control product	εσωτερικό πρότυπο προϊόν
linear progression model	γραμμικό μοντέλο εξέλιξης
liquid-phase sequencing	Pyrosequencing υγρής φάσης
log phase	εκθετική φάση ή λογαριθμική φάση
luciferase	λουσιφεράση

luciferine	λουσιφερίνη
malignant	κακοήθης
missense mutation	παρानοηματική μετάλλαξη
Molecular Beacons	«μοριακοί φάροι»
molecular weight marker	δείκτης μοριακών βαρών DNA
monoclonal	μονοκλωνικός
mutant specific primer	εκκινητής ειδικός για μετάλλαξη
mutation	μετάλλαξη
nonsense mutation	μη νοηματική μετάλλαξη
normalization	κανονικοποίηση
oncogene	ογκογονίδιο
oxyluciferine	οξυ-λουσιφερίνη
Parallel progression model	μοντέλο παράλληλης εξέλιξης
PCR blocker	παρεμποδιστής PCR
plateau	φάση «κορεσμού»
point mutation	σημειακή μετάλλαξη
polyclonal	πολυκλωνικός
probe	ανιχνευτής
promoter	υποκινητής
scorpion	μόριο «σκορπιός»
sequencing by synthesis	αλληλούχιση μέσω σύνθεσης
Silent mutation	σιωπηρή μετάλλαξη
single-base extension	επέκταση κατά μία βάση
snapback	ανιχνευτής τύπου snapback
solid-phase sequencing	Pyrosequencing στερεής φάσης
somatic mutation	σωματική μετάλλαξη
splicing	Μάτισμα
stop codon	κωδικόνιο λήξης
temperature-shifted/overlay curve	Καμπύλη θερμοκρασιακής-μετατόπισης
transition mutation	μετάλλαξη μετάπτωσης
transversion mutation	μεταλλάξεις μεταστροφής
truncated protein	ακρωτηριασμένη πρωτεΐνη
tumor suppressor gene	ογκοκατασταλτικό γονίδιο
wild-type	«φυσικού τύπου»
wild-type specific primer	εκκινητής ειδικός για φυσιολογικό

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

ABD	Adaptor-Binding Domain
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
ASA	Allele – Specific Amplification
ASO	Allele-Specific Oligonucleotides
ASPCR	Allele-Specific PCR
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BSA	Bovine serum albumin
CCA	Color Complementation Assay
cfDNA	cell-free DNA
CK-19	CytoKeratin-19
COLD-PCR	Co-amplification at Lower Temperature
COP	Competitive Oligonucleotide Priming
Cq	Cycle of Quantification
CSCs	Cancer Stem Cells
CTCs	Circulating Tumour Cells
ddNTP	Dideoxy nucleoside triphosphates
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
D-HPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
DMS	Dimethyl sulfide
dNTPs	Deoxy nucleoside triphosphates
EMT	Epithelial-to-Mesenchymal Transition
EMT-TFs	EMT-inducing Transcription Factors
FFPEs	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
FOXO	forkhead box transcription factor
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HER-2	Human Epidermal growth factor Receptor-2
HRMA	High Resolution Melting Analysis
ICGC	International Cancer Genome Consortium
JAK2	Janus kinase 2
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LED	Light Emission Diode
LNAs	Locked Nucleic Acids
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass

ncRNA	non-coding RNA
NGS	Next Generation Sequencing
PASA	PCR Amplification of Specific Alleles
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Sodium perborate
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDK-1	Phosphatidylinositol-Dependent Kinase 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
PKB/Akt	protein kinase B
PNA s	Peptide Nucleic Acids
PPi	Pyrophosphate
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PTT	Protein Truncation Test
Q-RT PCR	Quantitative-Real time PCR
RFLP s	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT	Reverse Transcription
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
SBH	Sequence-by-hybridization
SGK1	Serum-and Glucocorticoid-induced Kinase 1
SH2	Rous-sarcoma (src) oncogene homology-2 domain
SNP s	Single Nucleotide Polymorphisms
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
ssDNA	single stranded DNA
T_c	Critical denaturation Temperature
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
T_m	melting temperature
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2
WTB-PCR	Wild-Type Blocking PCR
ENA	European Nucleotide Archive
T_{an}	annealing temperature

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. P.A. Vorkas, N. Poumpouridou et al. *PIK3CA hotspot mutation scanning by a novel and highly sensitive high-resolution small amplicon melting analysis method*. J Mol Diagn, 12(5),2010, 697-704.
2. Weinberg R.A. *The biology of cancer*. 2007.
3. Ε.Σ. Λιανίδου. *Τεχνικές Μοριακής Διαγνωστικής*. Αθήνα, 2009.
4. C.A. Milbury, J. Li, και G.M. Makrigiorgos. *COLD-PCR-enhanced high-resolution melting enables rapid and selective identification of low-level unknown mutations*. Clin Chem, 55(12),2009, 2130-2143.
5. C.H. Chen, J.M. Lai et al. *VEGFA upregulates FLJ10540 and modulates migration and invasion of lung cancer via PI3K/AKT pathway*. PLoS One, 4(4),2009, e5052.
6. C.A. Milbury, J. Li, και G.M. Makrigiorgos. *PCR-based methods for the enrichment of minority alleles and mutations*. Clin Chem, 55(4),2009, 632-640.
7. P. Nollau και C. Wagener. *Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment*. IFCC Scientific Division, Committee on Molecular Biology Techniques. Clin Chem, 43(7),1997, 1114-1128.
8. R.M. Wartell, S.H. Hosseini, και C.P. Moran, Jr. *Detecting base pair substitutions in DNA fragments by temperature-gradient gel electrophoresis*. Nucleic Acids Res, 18(9),1990, 2699-2705.
9. R.M. Myers, S.G. Fischer et al. *Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis*. Nucleic Acids Res, 13(9),1985, 3111-3129.
10. D.P. Steensma. *JAK2 V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility: a paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology*. J Mol Diagn, 8(4),2006, 397-411.
11. A.M. Maxam και W. Gilbert. *A new method for sequencing DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 74(2),1977, 560-564.
12. F. Sanger, S. Nicklen, και A.R. Coulson. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 74(12),1977, 5463-5467.

13. E.J. Boland, A. Pillai et al. *Automation of the Maxam-Gilbert chemical sequencing reactions*. *Biotechniques*, 16(6),1994, 1088-5.
14. G.M. Church και W. Gilbert. *Genomic sequencing*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(7),1984, 1991-1995.
15. S. Ferraboli, R. Negri et al. *One-lane chemical sequencing of 3'-fluorescent-labeled DNA*. *Anal Biochem*, 214(2),1993, 566-570.
16. D.L.&K.M.A. Ornstein. *Sequencing DNA using ³⁵S-labeling : a troubleshooting guide*, *BioTechniques*. 1985.
17. Τσιάγκας Γ. *Ανάλυση μεταλλάξεων στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο BRCA1, Διατριβή Ειδίκευσης στην Αναλυτική Χημεία, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών*. 2001.
18. P. Nyren και A. Lundin. *Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis*. *Anal Biochem*, 151(2),1985, 504-509.
19. E.D. Hyman. *A new method of sequencing DNA*. *Anal Biochem*, 174(2),1988, 423-436.
20. M. Ronaghi, S. Karamohamed et al. *Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release*. *Anal Biochem*, 242(1),1996, 84-89.
21. L.T. Franca, E. Carrilho, και T.B. Kist. *A review of DNA sequencing techniques*. *Q Rev Biophys*, 35(2),2002, 169-200.
22. M. Ronaghi, M. Uhlen, και P. Nyren. *A sequencing method based on real-time pyrophosphate*. *Science*, 281(5375),1998, 363, 365.
23. M. Ronaghi. *Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing*. *Genome Res*, 11(1),2001, 3-11.
24. M. Ronaghi. *Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein*. *Anal Biochem*, 286(2),2000, 282-288.
25. M. Ronaghi, M. Nygren et al. *Analyses of secondary structures in DNA by pyrosequencing*. *Anal Biochem*, 267(1),1999, 65-71.
26. A. Ahmadian, J. Lundeberg et al. *Analysis of the p53 tumor suppressor gene by pyrosequencing*. *Biotechniques*, 28(1),2000, 140-147.
27. A. Alderborn, A. Kristofferson, και U. Hammerling. *Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing*. *Genome Res*, 10(8),2000, 1249-1258.

28. T. Nordstrom, M. Ronaghi et al. *Direct analysis of single-nucleotide polymorphism on double-stranded DNA by pyrosequencing*. Biotechnol Appl Biochem, 31 (Pt 2)(2000, 107-112.
29. C.A. Garcia, A. Ahmadian et al. *Mutation detection by pyrosequencing: sequencing of exons 5-8 of the p53 tumor suppressor gene*. Gene, 253(2),2000, 249-257.
30. T. Nordstrom, K. Nourizad et al. *Method enabling pyrosequencing on double-stranded DNA*. Anal Biochem, 282(2),2000, 186-193.
31. *Next-generation genome, Editorial*. Nat Methods, 5(12),2008, 989.
32. S.C. Schuster. *Next-generation sequencing transforms today's biology*. Nat Methods, 5(1),2008, 16-18.
33. G. Cochrane, R. Akhtar et al. *Petabyte-scale innovations at the European Nucleotide Archive*. Nucleic Acids Res, 37(Database issue),2009, D19-D25.
34. A. Kahvejian, J. Quackenbush, και J.F. Thompson. *What would you do if you could sequence everything?* Nat Biotechnol, 26(10),2008, 1125-1133.
35. J. Shendure και H. Ji. *Next-generation DNA sequencing*. Nat Biotechnol, 26(10),2008, 1135-1145.
36. E.R. Mardis. *Next-generation DNA sequencing methods*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 9(2008, 387-402.
37. P.M. Lizardi. *Next-generation sequencing-by-hybridization*. Nat Biotechnol, 26(6),2008, 649-650.
38. O. Morozova και M.A. Marra. *Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics*. Genomics, 92(5),2008, 255-264.
39. M. Yeager, N. Xiao et al. *Comprehensive resequence analysis of a 136 kb region of human chromosome 8q24 associated with prostate and colon cancers*. Hum Genet, 124(2),2008, 161-170.
40. L. Ding, G. Getz et al. *Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma*. Nature, 455(7216),2008, 1069-1075.
41. E.P. Diamandis. *Next-generation sequencing: a new revolution in molecular diagnostics?* Clin Chem, 55(12),2009, 2088-2092.
42. W.H. Koch. *Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays*. Nat Rev Drug Discov, 3(9),2004, 749-761.

43. D. Whitcombe, J. Theaker et al. *Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence*. Nat Biotechnol, 17(8),1999, 804-807.
44. N. Thelwell, S. Millington et al. *Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection*. Nucleic Acids Res, 28(19),2000, 3752-3761.
45. L. Zhou, R.J. Errigo et al. *Snapback primer genotyping with saturating DNA dye and melting analysis*. Clin Chem, 54(10),2008, 1648-1656.
46. P.E. Nielsen, M. Egholm et al. *Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide*. Science, 254(5037),1991, 1497-1500.
47. K.K. Jensen, H. Orum et al. *Kinetics for hybridization of peptide nucleic acids (PNA) with DNA and RNA studied with the BIAcore technique*. Biochemistry, 36(16),1997, 5072-5077.
48. V. Demidov, M.D. Frank-Kamenetskii et al. *Sequence selective double strand DNA cleavage by peptide nucleic acid (PNA) targeting using nuclease S1*. Nucleic Acids Res, 21(9),1993, 2103-2107.
49. P.E. Nielsen και M. Egholm. *An introduction to peptide nucleic acid*. Curr Issues Mol Biol, 1(1-2),1999, 89-104.
50. U. Giesen, W. Kleider et al. *A formula for thermal stability (T_m) prediction of PNA/DNA duplexes*. Nucleic Acids Res, 26(21),1998, 5004-5006.
51. F. Pellestor και P. Paulasova. *The peptide nucleic acids, efficient tools for molecular diagnosis (Review)*. Int J Mol Med, 13(4),2004, 521-525.
52. P.E. Nielsen, M. Egholm et al. *Peptide nucleic acids (PNAs): potential antisense and anti-gene agents*. Anticancer Drug Des, 8(1),1993, 53-63.
53. H. Orum, P.E. Nielsen et al. *Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping*. Nucleic Acids Res, 21(23),1993, 5332-5336.
54. O. Cochet, E. Martin et al. *Selective PCR amplification of functional immunoglobulin light chain from hybridoma containing the aberrant MOPC 21-derived V kappa by PNA-mediated PCR clamping*. Biotechniques, 26(5),1999, 818-20, 822.
55. C.C. Chiou, J.D. Luo, και T.L. Chen. *Single-tube reaction using peptide nucleic acid as both PCR clamp and sensor probe for the detection of rare mutations*. Nat Protoc, 1(6),2006, 2604-2612.

56. P.L. Dominguez και M.S. Kolodney. *Wild-type blocking polymerase chain reaction for detection of single nucleotide minority mutations from clinical specimens*. *Oncogene*, 24(45),2005, 6830-6834.
57. D. Latorra, K. Arar, και J.M. Hurley. *Design considerations and effects of LNA in PCR primers*. *Mol Cell Probes*, 17(5),2003, 253-259.
58. P. Mouritzen, A.T. Nielsen et al. *Single nucleotide polymorphism genotyping using locked nucleic acid (LNA)*. *Expert Rev Mol Diagn*, 3(1),2003, 27-38.
59. R.P. Oldenburg, M.S. Liu, και M.S. Kolodney. *Selective amplification of rare mutations using locked nucleic acid oligonucleotides that competitively inhibit primer binding to wild-type DNA*. *J Invest Dermatol*, 128(2),2008, 398-402.
60. C.R. Newton, L.E. Heptinstall et al. *Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assessment in cystic fibrosis*. *Lancet*, 2(8678-8679),1989, 1481-1483.
61. D.Y. Wu, L. Ugozzoli et al. *Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(8),1989, 2757-2760.
62. S.S. Sommer, J.D. Cassady et al. *A novel method for detecting point mutations or polymorphisms and its application to population screening for carriers of phenylketonuria*. *Mayo Clin Proc*, 64(11),1989, 1361-1372.
63. R.A. Gibbs, P.N. Nguyen, και C.T. Caskey. *Detection of single DNA base differences by competitive oligonucleotide priming*. *Nucleic Acids Res*, 17(7),1989, 2437-2448.
64. F.F. Chehab και Y.W. Kan. *Detection of specific DNA sequences by fluorescence amplification: a color complementation assay*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(23),1989, 9178-9182.
65. R.M. Ferrie, M.J. Schwarz et al. *Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene*. *Am J Hum Genet*, 51(2),1992, 251-262.
66. G.L. Kropp, S. Fucharoen, και S.H. Embury. *Asymmetrically primed selective amplification/temperature shift fluorescence polymerase chain reaction to detect the hemoglobin Constant Spring mutation*. *Blood*, 78(1),1991, 26-29.
67. S. Ye, S. Humphries, και F. Green. *Allele specific amplification by tetra-primer PCR*. *Nucleic Acids Res*, 20(5),1992, 1152.

68. S. Kwok, D.E. Kellogg et al. *Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies*. Nucleic Acids Res, 18(4),1990, 999-1005.
69. C.D. Bottema και S.S. Sommer. *PCR amplification of specific alleles: rapid detection of known mutations and polymorphisms*. Mutat Res, 288(1),1993, 93-102.
70. P. Stork, M. Loda et al. *Detection of K-ras mutations in pancreatic and hepatic neoplasms by non-isotopic mismatched polymerase chain reaction*. Oncogene, 6(5),1991, 857-862.
71. S.J. Clayton, F.M. Scott et al. *K-ras point mutation detection in lung cancer: comparison of two approaches to somatic mutation detection using ARMS allele-specific amplification*. Clin Chem, 46(12),2000, 1929-1938.
72. R.E. Board, N.J. Thelwell et al. *Multiplexed assays for detection of mutations in PIK3CA*. Clin Chem, 54(4),2008, 757-760.
73. I. Baris και E. Battaloglu. *A multiplexed ARMS-PCR approach for the detection of common MECP2 mutations*. Genet Test Mol Biomarkers, 13(1),2009, 19-22.
74. A.H. Lang, H. Drexel et al. *Optimized allele-specific real-time PCR assays for the detection of common mutations in KRAS and BRAF*. J Mol Diagn, 13(1),2011, 23-28.
75. L. Zhou, A.N. Myers et al. *Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye*. Clin Chem, 50(8),2004, 1328-1335.
76. L.K. De, I. Coene et al. *Genotyping of frequent BRCA1/2 SNPs with unlabeled probes: a supplement to HRMCA mutation scanning, allowing the strong reduction of sequencing burden*. J Mol Diagn, 11(5),2009, 415-419.
77. J. Li, L. Wang et al. *Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing*. Nat Med, 14(5),2008, 579-584.
78. R.H. Lipsky, C.M. Mazzanti et al. *DNA melting analysis for detection of single nucleotide polymorphisms*. Clin Chem, 47(4),2001, 635-644.
79. M. Liew, R. Pryor et al. *Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons*. Clin Chem, 50(7),2004, 1156-1164.
80. J. Li, C.A. Milbury et al. *Two-round coamplification at lower denaturation temperature-PCR (COLD-PCR)-based sanger sequencing identifies a novel spectrum of low-level mutations in lung adenocarcinoma*. Hum Mutat, 30(11),2009, 1583-1590.

81. J. Li, L. Wang et al. *Coamplification at lower denaturation temperature-PCR increases mutation-detection selectivity of TaqMan-based real-time PCR*. Clin Chem, 55(4),2009, 748-756.
82. Z. Zuo, S.S. Chen et al. *Application of COLD-PCR for improved detection of KRAS mutations in clinical samples*. Mod Pathol, 22(8),2009, 1023-1031.
83. C.A. Milbury, C.C. Chen et al. *Multiplex amplification coupled with COLD-PCR and high resolution melting enables identification of low-abundance mutations in cancer samples with low DNA content*. J Mol Diagn, 13(2),2011, 220-232.
84. I. Mancini, C. Santucci et al. *The use of COLD-PCR and high-resolution melting analysis improves the limit of detection of KRAS and BRAF mutations in colorectal cancer*. J Mol Diagn, 12(5),2010, 705-711.
85. C.C. Pritchard, L. Akagi et al. *COLD-PCR enhanced melting curve analysis improves diagnostic accuracy for KRAS mutations in colorectal carcinoma*. BMC Clin Pathol, 10(2010), 6.
86. S. Galbiati, A. Brisci et al. *Full COLD-PCR protocol for noninvasive prenatal diagnosis of genetic diseases*. Clin Chem, 57(1),2011, 136-138.
87. A. Ladopoulou, C. Kroupis et al. *Germ line BRCA1 & BRCA2 mutations in Greek breast/ovarian cancer families: 5382insC is the most frequent mutation observed*. Cancer Lett, 185(1),2002, 61-70.
88. P.A. Underhill, L. Jin et al. *Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography*. Genome Res, 7(10),1997, 996-1005.
89. M. Karas και F. Hillenkamp. *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem, 60(20),1988, 2299-2301.
90. B. Spengler, Y. Pan et al. *Molecular weight determination of underivatized oligodeoxyribonucleotides by positive-ion matrix-assisted ultraviolet laser-desorption mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 4(4),1990, 99-102.
91. R.K. Thomas, A.C. Baker et al. *High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer*. Nat Genet, 39(3),2007, 347-351.
92. E.M. Southern. *DNA microarrays. History and overview*. Methods Mol Biol, 170(2001, 1-15.

93. C.T. Wittwer, G.H. Reed et al. *High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen*. Clin Chem, 49(6 Pt 1),2003, 853-860.

94. C.T. Wittwer. *High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations*. Hum Mutat, 30(6),2009, 857-859.

95. Stephen Bustin. *The PCR Revolution, Basic Technologies and Applications*. 2009.

96. Βορκάς Π. *Ανάπτυξη και κλινική αξιολόγηση μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων με υψηλής-διακριτικότητας ανάλυση καμπυλών τήξης DNA και φθορισμομετρική ανίχνευση, Διπλωματική εργασία, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στην Κλινική Χημεία, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ*. 2008.

97. M.G. Herrmann, J.D. Durtschi et al. *Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes*. Clin Chem, 52(3),2006, 494-503.

98. M. Erali και C.T. Wittwer. *High resolution melting analysis for gene scanning*. Methods, 50(4),2010, 250-261.

99. S. Volinia, I. Hiles et al. *Molecular cloning, cDNA sequence, and chromosomal localization of the human phosphatidylinositol 3-kinase p110 alpha (PIK3CA) gene*. Genomics, 24(3),1994, 472-477.

100. D.A. Fruman, R.E. Meyers, και L.C. Cantley. *Phosphoinositide kinases*. Annu Rev Biochem, 67(1998, 481-507.

101. L.C. Cantley. *The phosphoinositide 3-kinase pathway*. Science, 296(5573),2002, 1655-1657.

102. I. Vivanco και C.L. Sawyers. *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. Nat Rev Cancer, 2(7),2002, 489-501.

103. A.G. Bader, S. Kang, και P.K. Vogt. *Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 103(5),2006, 1475-1479.

104. B. Karakas, K.E. Bachman, και B.H. Park. *Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers*. Br J Cancer, 94(4),2006, 455-459.

105. D.P. Brazil, J. Park, και B.A. Hemmings. *PKB binding proteins. Getting in on the Akt*. Cell, 111(3),2002, 293-303.

106. M. Yoeli-Lerner και A. Toker. *Akt/PKB signaling in cancer: a function in cell motility and invasion*. Cell Cycle, 5(6),2006, 603-605.

- Ανάπτυξη και εφαρμογές ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων που βασίζονται στην HRMA και ARMS - PCR
107. F. Vazquez και P. Devreotes. *Regulation of PTEN function as a PIP3 gatekeeper through membrane interaction*. Cell Cycle, 5(14),2006, 1523-1527.
 108. L. Simpson και R. Parsons. *PTEN: life as a tumor suppressor*. Exp Cell Res, 264(1),2001, 29-41.
 109. N.R. Leslie και C.P. Downes. *PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it*. Biochem J, 382(Pt 1),2004, 1-11.
 110. M. Cully, H. You et al. *Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis*. Nat Rev Cancer, 6(3),2006, 184-192.
 111. G. Ligresti, L. Militello et al. *PIK3CA mutations in human solid tumors: role in sensitivity to various therapeutic approaches*. Cell Cycle, 8(9),2009, 1352-1358.
 112. Y. Samuels, Z. Wang et al. *High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers*. Science, 304(5670),2004, 554.
 113. D. Hanahan και R.A. Weinberg. *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 144(5),2011, 646-674.
 114. C.L. Chaffer και R.A. Weinberg. *A perspective on cancer cell metastasis*. Science, 331(6024),2011, 1559-1564.
 115. C.A. Klein. *Parallel progression of primary tumours and metastases*. Nat Rev Cancer, 9(4),2009, 302-312.
 116. K. Pantel, C. Alix-Panabieres, και S. Riethdorf. *Cancer micrometastases*. Nat Rev Clin Oncol, 6(6),2009, 339-351.
 117. A.F. Chambers, A.C. Groom, και I.C. MacDonald. *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer, 2(8),2002, 563-572.
 118. E.S. Lianidou και A. Markou. *Review: Circulating tumor cells as emerging tumor biomarkers in breast cancer*. Clin Chem Lab Med, 2011.
 119. K. Pantel, R.H. Brakenhoff, και B. Brandt. *Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells*. Nat Rev Cancer, 8(5),2008, 329-340.
 120. M. Mego, S.A. Mani, και M. Cristofanilli. *Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications*. Nat Rev Clin Oncol, 7(12),2010, 693-701.
 121. S. Ito, H. Nakanishi et al. *Real-time observation of micrometastasis formation in the living mouse liver using a green fluorescent protein gene-tagged rat tongue carcinoma cell line*. Int J Cancer, 93(2),2001, 212-217.

122. E. Sahai. *Illuminating the metastatic process*. Nat Rev Cancer, 7(10),2007, 737-749.
123. E.P. Diamandis, K. Pantel et al. *Circulating Cancer Cells and Their Clinical Applications*. Clin Chem, 2011.
124. M. Cristofanilli, G.T. Budd et al. *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. N Engl J Med, 351(8),2004, 781-791.
125. A. Stathopoulou, A. Gizi et al. *Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system*. Clin Cancer Res, 9(14),2003, 5145-5151.
126. A. Stathopoulou, M. Ntoulia et al. *A highly specific real-time RT-PCR method for the quantitative determination of CK-19 mRNA positive cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer*. Int J Cancer, 119(7),2006, 1654-1659.
127. M. Ignatiadis, G. Kallergi et al. *Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer*. Clin Cancer Res, 14(9),2008, 2593-2600.
128. S. Maheswaran, L.V. Sequist et al. *Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells*. N Engl J Med, 359(4),2008, 366-377.
129. S. Nagrath, L.V. Sequist et al. *Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology*. Nature, 450(7173),2007, 1235-1239.
130. N. Maruyama, Y. Miyoshi et al. *Clinicopathologic analysis of breast cancers with PIK3CA mutations in Japanese women*. Clin Cancer Res, 13(2 Pt 1),2007, 408-414.
131. G. Perez-Tenorio, L. Alkhorji et al. *PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer*. Clin Cancer Res, 13(12),2007, 3577-3584.
132. K.E. Bachman, P. Argani et al. *The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers*. Cancer Biol Ther, 3(8),2004, 772-775.
133. G. Wu, M. Xing et al. *Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer*. Breast Cancer Res, 7(5),2005, R609-R616.
134. I.G. Campbell, S.E. Russell et al. *Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer*. Cancer Res, 64(21),2004, 7678-7681.

135. R.E. Board, A.M. Wardley et al. *Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 120(2),2010, 461-467.
136. L. Simi, N. Pratesi et al. *High-resolution melting analysis for rapid detection of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutations in colorectal cancer*. Am J Clin Pathol, 130(2),2008, 247-253.
137. M. Krypuy, G.M. Newnham et al. *High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer*. BMC Cancer, 6 2006, 295.
138. P.A. Vorkas, K. Christopoulos et al. *Mutation scanning of exon 20 of the BRCA1 gene by high-resolution melting curve analysis*. Clin Biochem, 43(1-2),2010, 178-185.
139. C.D. Hurst, T.C. Zuiverloon et al. *A SNaPshot assay for the rapid and simple detection of four common hotspot codon mutations in the PIK3CA gene*. BMC Res Notes, 2(2009), 66.
140. M.T. Seipp, D. Pattison et al. *Quadruplex genotyping of F5, F2, and MTHFR variants in a single closed tube by high-resolution amplicon melting*. Clin Chem, 54(1),2008, 108-115.
141. F.M. Yakes, W. Chinratanalab et al. *Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt 1s required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action*. Cancer Res, 62(14),2002, 4132-4141.
142. Y. Nagata, K.H. Lan et al. *PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients*. Cancer Cell, 6(2),2004, 117-127.
143. K. Berns, H.M. Horlings et al. *A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer*. Cancer Cell, 12(4),2007, 395-402.
144. R. Luthra και Z. Zuo. *COLD-PCR finds hot application in mutation analysis*. Clin Chem, 55(12),2009, 2077-2078.
145. S. Ye, S. Dhillon et al. *An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms*. Nucleic Acids Res, 29(17),2001, E88-E88.
146. A. Chien, D.B. Edgar, και J.M. Trela. *Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus*. J Bacteriol, 127(3),1976, 1550-1557.

147. K.R. Tindall και T.A. Kunkel. *Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase*. *Biochemistry*, 27(16),1988, 6008-6013.
148. R.W. Chiu, M.F. Murphy et al. *Determination of RhD zygosity: comparison of a double amplification refractory mutation system approach and a multiplex real-time quantitative PCR approach*. *Clin Chem*, 47(4),2001, 667-672.
149. G.G. Donohoe, A. Salomaki et al. *Rapid identification of apolipoprotein E genotypes by multiplex amplification refractory mutation system PCR and capillary gel electrophoresis*. *Clin Chem*, 45(1),1999, 143-146.
150. C. Bathelier, T. Champenois, και G. Lucotte. *ARMS test for diagnosis of factor V Leiden mutation and allele frequencies in France*. *Mol Cell Probes*, 12(2),1998, 121-123.
151. C. Christopherson, J. Sninsky, και S. Kwok. *The effects of internal primer-template mismatches on RT-PCR: HIV-1 model studies*. *Nucleic Acids Res*, 25(3),1997, 654-658.
152. J.C. Fox, J. England et al. *The detection of K-ras mutations in colorectal cancer using the amplification-refractory mutation system*. *Br J Cancer*, 77(8),1998, 1267-1274.
153. Q. Chen, P. Lu et al. *Amplification refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders*. *J Mol Diagn*, 9(2),2007, 272-276.
154. A. Jarry, D. Masson et al. *Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E*. *Mol Cell Probes*, 18(5),2004, 349-352.