



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ XI (A1) ΣΕ
ΑΝΕΥΡΙΣΜΑΤΑ ΑΝΙΟΥΣΗΣ ΑΟΡΤΗΣ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ
ΤΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΩΝ**

**ΤΑΤΙΑΝΑ ΡΙΖΟΥ
Α.Μ 1113201200100**

Επιβλέπων : Καθηγητής Ανδρέας Σκορίλας, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Επιστημονικός Υπεύθυνος : Χρήστος Κρούπης, Επ. Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας - Μοριακής Διαγνωστικής, Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2016

Περιεχόμενα

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή

1.1 Τα ανευρύσματα αορτής

- 1.1.1 Ανευρύσματα αορτής- Ταξινόμηση
- 1.1.2 Αίτια εμφάνισης ανευρυσμάτων αορτής
- 1.1.3 Κοιλιακά αορτικά ανευρίσματα
- 1.1.4 Αορτική ρήξη
- 1.1.5 Παράγοντες κινδύνου
- 1.1.6 Παθοφυσιολογία
- 1.1.7 Διαχείριση
- 1.1.8 Ιατρική αντιμετώπιση
- 1.1.9 Χειρουργική επέμβαση

1.2 Αναπνευστικό Σύστημα & Πνεύμονες

1.3 Ο καρκίνος του πνεύμονα

- 1.3.1 Βιολογία του καρκίνου του πνεύμονα
- 1.3.2 Ταξινόμηση
 - 1.3.2.1 Μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (NSCLC)
 - 1.3.2.2 Μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (SCLC)
 - 1.3.2.3 Άλλοι τύποι
- 1.3.3 Μετάσταση
- 1.3.4 Σημεία και συμπτώματα
- 1.3.5 Αίτια
 - 1.3.5.1 Κάπνισμα
 - 1.3.5.2 Ραδόνιο αέριο
 - 1.3.5.3 Αμίαντος
 - 1.3.5.4 Ατμοσφαιρική ρύπανση
 - 1.3.5.5 Γενετική
- 1.3.6 Διάγνωση
- 1.3.7 Σταδιοποίηση
- 1.3.8 Ο καρκίνος του πνεύμονα & Στατιστικά στοιχεία

1.4 Κολλαγόνο XI (α1)

1.4.1 Η εξωκυττάρια ουσία

1.4.2 Γενικά χαρακτηριστικά κολλαγόνων

1.4.3 Τα ινώδη κολλαγόνα

1.4.4 Βιοσύνθεση των κολλαγόνων

1.4.5 Το κολλαγόνο XI

1.4.6 Το γονίδιο *COL11A1*

1.4.7 Οι ισομορφές του γονιδίου *COL11A1*

1.5 Μοριακές μέθοδοι ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης- Real-time qPCR

1.5.1 Σχεδιασμός εκκινητών και ανιχνευτών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Δείγμα μελέτης

2.2 Μέθοδοι για την παρασκευή cDNA

2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA

2.2.1.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

2.2.1.2 Πειραματική πορεία

2.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού RNA

2.2.2.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

2.2.2.2 Πειραματική πορεία

2.2.3 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

2.2.3.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

2.2.3.2 Πειραματική πορεία

2.3 Αντιδράσεις Real-time qPCR στο LightCycler

2.3.1 Ανίχνευση έκφρασης γενικού μεταγράφου *COL11A1* με real-time qPCR

2.3.1.1 Πειραματική πορεία

2.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της ισομορφής C του *COL11A1*

2.3.2.1 Πειραματική πορεία

2.3.3 Καμπύλη βαθμονόμησης

2.3.4 Βελτιστοποιήσεις μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού

2.4 Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης

2.4.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

2.4.2 Παρασκευή διαλυμάτων

2.4.3 Πειραματική Πορεία ηλεκτροφόρησης

2.5 Πιστοποίηση PCR προϊόντων: Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

2.5.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

2.5.2 Πειραματική πορεία

2.6 Πιστοποίηση PCR προϊόντων: Ανάλυση της αλληλουχίας του DNA

2.6.1 Καθαρισμός των PCR προϊόντων

2.6.1.1 Αντιδραστήρια / Υλικά

2.6.1.2 Πειραματική Πορεία

2.6.2 Αντίδραση θερμικών κύκλων

2.6.3 Καθαρισμός των προϊόντων της αντίδρασης των θερμικών κύκλων

2.6.3.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

2.6.3.2 Πειραματική πορεία

2.6.4 Ανάλυση αλληλουχίας του DNA

2.6.4.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

2.6.4.2 Πειραματική πορεία

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Αποτελέσματα

3.1 Παρασκευή standards και καμπύλες βαθμονόμησης

3.1.1 Καμπύλη βαθμονόμησης για το γενικό μετάγραφο του *COL11A1*

3.1.2 Καμπύλη βαθμονόμησης για την ισομορφία C

3.2 Επιβεβαίωση PCR προϊόντος με ηλεκτροφόρηση σε gel

3.2.1 Επιβεβαίωση PCR προϊόντος για το γενικό μετάγραφο του *COL11A1*

3.2.2 Επιβεβαίωση PCR προϊόντος για την ισομορφία C

3.3 Επιβεβαίωση ισομορφίας C μέσω DNA sequencing

3.4 Επιβεβαίωση του γενικού μετάγραφου του *COL11A1* μέσω πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

3.5 3.5 Βελτιστοποιήσεις μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού του γενικού *COL11A1* μεταγράφου και της ισομορφίας C

3.5.1 Βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας υβριδισμού εκκινήτων της αντίδρασης

3.5.2 Βελτιστοποίηση της τελικής συγκέντρωσης των ανιχνευτών

3.5.3 Βελτιστοποίηση της τελικής συγκέντρωσης των ιόντων MgCl₂

3.5.4 Βελτιστοποίηση την παραγωγής των προϊόντων με τη χρήση DMSO

3.5.5 Βελτιστοποίηση του αριθμού των κύκλων της αντίδρασης

3.6 Ποσοτικός προσδιορισμός του γενικού μετάγραφου του *COL11A1* στα δείγματα της ανιούσης αορτής

3.6.1 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού RNA και σύνθεση του cDNA

3.6.2 real-time qPCR αντιδράσεις για το γενικό μετάγραφο του γονιδίου *COL11A1* και των ισομορφιών του στα δείγματα των ανευρισμάτων ανιούσης αορτής

3.6.2.1 PCR αντίδραση για γενική ανίχνευση του *COL11A1* mRNA

3.6.2.2 real-time qPCR αντίδραση για ανίχνευση των ισομορφιών A και E του γονιδίου *COL11A1*

3.7 Ποσοτικός προσδιορισμός του γενικού μετάγραφου του *COL11A1* στα του καρκίνου του πνεύμονα

3.7.1 Κλινικοπαθολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά δείγματος μελέτης

3.7.2 real-time qPCR αντιδράσεις για το γονίδιο *COL11A1* στα δείγματα του καρκίνου του πνεύμονα

3.7.2.1 real-time PCR αντίδραση για γενική ανίχνευση του *COL11A1* mRNA

3.7.2.2 real-time qPCR αντίδραση για ανίχνευση των ισομορφών A και E του γονιδίου *COL11A1*

3.7.2.3 real-time PCR αντίδραση για ανίχνευση ισομορφής C του γονιδίου *COL11A1*

3.8 Συνολικά αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού για τα δείγματα του καρκίνου του πνεύμονα και στατιστική ανάλυση μέσω του SPSS software

3.8.1 Περιγραφική στατιστική: Εύρεση μέσου, διάμεσου, μέγιστης και ελάχιστης τιμής για τις ισομορφές A και E

3.8.2 Εφαρμογή τεστ χ^2 ως κριτήριο συσχέτισης ποιοτικών χαρακτηριστικών

3.8.3 Εφαρμογή t-test μεταξύ ποσοτικών χαρακτηριστικών

3.8.4 Έλεγχος κανονικότητας-συσχέτιση- γραμμική παλινδρόμηση

3.8.5 Λογαριθμική ανάλυση (Logistic regression)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Συμπεράσματα- συζήτηση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Βιβλιογραφία

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Επίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο.

Πίνακας 1.2 Διάφοροι τύποι κολλαγόνων και οι οικογένειες στις οποίες αυτά ανήκουν.

Πίνακας 1.3 *Accession numbers* των ισομορφών του γονιδίου *COL11A1*.

Πίνακας 2.1 Συστατικά μίγματος εκμαγείου RNA-εκκινητή κατά τη σύνθεση του cDNA.

Πίνακας 2.2 Συστατικά που περιέχονται στο δεύτερο μίγμα της σύνθεσης του cDNA.

Πίνακας 2.3 Αλληλουχία και χαρακτηριστικά των εκκινητών *COL11A1 F* και *COL11A1 R*.

Πίνακας 2.4 Αλληλουχία και χαρακτηριστικά των ανιχνευτών για το γενικό *COL11A1* μετάγραφο.

Πίνακας 2.5 Συστατικά της Real-time qPCR αντίδρασης για το γενικό *COL11A1* μετάγραφο.

Πίνακας 2.6 Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο Real-time qPCR για το γενικό *COL11A1* μετάγραφο.

Πίνακας 2.7 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα καμπύλης τήξης για το γενικό *COL11A1* μετάγραφο.

Πίνακας 2.8 Επεξηγηματικός πίνακας των εξονίων που περιέχονται στις *COL11A1* ισομορφές A, B, C και E και θέσεις των εκκινητών που σχεδιάστηκαν.

Πίνακας 2.9 Αλληλουχία και χαρακτηριστικά των εκκινητών για την *COL11A1* ισομορφή C.

Πίνακας 2.10 Αλληλουχία και χαρακτηριστικά των ανιχνευτών για την *COL11A1* ισομορφή C.

Πίνακας 2.11 Συστατικά της Real-time qPCR αντίδρασης για την *COL11A1* ισομορφή C.

Πίνακας 2.12 Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο Real-time qPCR για την *COL11A1* ισομορφή C.

Πίνακας 2.13 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα καμπύλης τήξης για όλες τις *COL11A1* ισομορφές.

Πίνακας 2.14 Αντιδραστήρια ενζυμικής πέψης.

Πίνακας 2.15 Συστατικά της αντίδρασης των θερμικών κύκλων.

Πίνακας 3.1: Μέτρηση συγκέντρωσης RNA δειγμάτων.

Πίνακας 3.2: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών.

Πίνακας 3.3: Συνολικά αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού γενικού *COLL1A1* και των ισομορφών του A, E και C σε αντίγραφα ανά μL .

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Στο σχήμα Α παρουσιάζεται μια φυσιολογική αορτή. Στο σχήμα Β παρουσιάζεται ένα θωρακικό αορτικό ανεύρυσμα (το οποίο βρίσκεται πίσω από την καρδιά). Στο σχήμα Γ παρουσιάζεται ένα κοιλιακό αορτικό ανεύρυσμα κάτω από τις αρτηρίες που τροφοδοτούν τους νεφρούς.

Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση κοιλιακών αορτικών ανευρυσμάτων (3-4 εκ.).

Εικόνα 1.3: Κοιλιακό αορτικό ανεύρυσμα διαμέτρου 6.5 εκ. με 3.0 εκ. αυλό.

Εικόνα 1.4: Κλάδοι αναπνευστικής ζώνης και ζώνης αγωγής και αριθμός σωληνώσεων.

Εικόνα 1.5: Αναλυτική απεικόνιση του ανθρώπινου αναπνευστικού συστήματος.

Εικόνα 1.6: Τμήματα των πνευμόνων.

Εικόνα 1.7: Σε τρισδιάστατη αξονική τομογραφία διακρίνεται όγκος στον πνεύμονα (βέλος).

Εικόνα 1.8: Μικρογραφία πλακώδους καρκινώματος, που αποτελεί τύπο μη μικροκυτταρικού καρκινώματος, (FNA specimen, Pap stain).

Εικόνα 1.9: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (μικροσκοπική όψη πυρήνα από βιοψία).

Εικόνα 1.10: NIH γράφημα που δείχνει πώς μια γενική αύξηση των πωλήσεων των προϊόντων καπνού στις ΗΠΑ στις τέσσερις πρώτες δεκαετίες του 20ού αιώνα (τσιγάρα ανά άτομο ανά έτος) οδήγησε σε αντίστοιχη ραγδαία αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα 20 χρόνια μετά κατά τη διάρκεια του 1930, '40 και '50 (θάνατοι από καρκίνο του πνεύμονα ανά 100.000 ανδρικού πληθυσμού ανά έτος).

Εικόνα 1.11: Ακτινογραφία θώρακος που απεικονίζει έναν καρκινικό όγκο στον αριστερό πνεύμονα.

Εικόνα 1.12: Αξονική τομογραφία που απεικονίζει έναν καρκινικό όγκο στον αριστερό πνεύμονα.

Εικόνα 1.13: Στατιστικά στοιχεία για τον καρκίνο του πνεύμονα.

Εικόνα 1.14: Ποιοτικά στοιχεία για τον καρκίνο του πνεύμονα στους άνδρες ανά τον κόσμο.

Εικόνα 1.15: Ποιοτικά στοιχεία για τον καρκίνο του πνεύμονα στις γυναίκες ανά τον κόσμο.

Εικόνα 1.16: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της εξωκυττάριας ουσίας.

Εικόνα 1.17: Μοριακή δομή των ινωδών κολλαγόνων με τις διάφορες υποπεριοχές καθώς και τις θέσεις διάσπασης για τις N-και C-κολλαγενάσες (παρουσιάζεται το μόριο του κολλαγόνου I).

Εικόνα 1.18: Η τριπλή έλικα του κολλαγόνου και η δομή της.

Εικόνα 1.19: Σχηματική αναπαράσταση της υπερμοριακής συναρμολόγησης των ινιδίων κολλαγόνου στην χαρακτηριστική κλιμακωτή (quarter-staggered) μορφή. Τα μονομερή έχουν μήκος 300 nm και τα κενά χωρίζουν τα διαδοχικά μονομερή προκαλώντας την χαρακτηριστική εμφάνιση του ινώδους κολλαγόνου στο υπερδομικό επίπεδο.

Εικόνα 1.20: Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης των ινωδών κολλαγόνων.

Εικόνα 1.21: Σχηματική αναπαράσταση των αλυσίδων του κολλαγόνου XI.

Εικόνα 1.22: Σχηματική απεικόνιση της αμινο-τελικής περιοχής (amino-terminal domain - NTD) της α1 (XI) αλυσίδας.

Εικόνα 1.23: Η γενωμική θέση του ανθρώπινου γονιδίου COL11A1.

Εικόνα 1.24: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των mRNA των ισομορφών A, B, C και E του γονιδίου COL11A1.

Εικόνα 1.25: Τα στάδια μιας PCR αντίδρασης.

Εικόνα 1.26: Οι φάσεις μιας PCR αντίδρασης.

Εικόνα 1.27: Οι φάσεις της Real-time qPCR.

Εικόνα 1.28: Real-time qPCR καμπύλη βαθμονόμησης.

Εικόνα 2.1: Το φθορισμόμετρο Qubit®.

Εικόνα 2.2: Η RNA εκλεκτικότητα και ευαισθησία του Quant-iT™ RNA Assay Kit.

Εικόνα 2.3: Επισκόπηση των τριών διαφορετικών συστημάτων εκκινητών κατά τη σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA.

Εικόνα 2.4: Σχηματική παράσταση της οργανολογίας του LightCycler 1.5.

Εικόνα 2.5: Μέγιστο απορρόφησης και εκπομπής των χρωστικών που χρησιμοποιούνται στο όργανο LightCycler 1.

Εικόνα 2.6: Σχετική θέση των εκκινητών COL11A1 F και COL11A1 R στην κωδική περιοχή του γονιδίου COL11A1.

Εικόνα 2.7: Στοιχίση των αλληλουχιών mRNA των ισομορφών A, B, C και E μέσω του προγράμματος CLC Sequence Viewer 6.

Εικόνα 2.8: Δείκτης μοριακών βαρών DNA PCR Marker.

Εικόνα 2.9: Δείκτης μοριακών βαρών 1kb Plus DNA Ladder.

Εικόνα 2.10: Αλληλουχία αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου HaeIII.

Εικόνα 2.11: Αλληλουχία αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου MnlI.

Εικόνα 2.12: Σχηματική αναπαράσταση των σημείων τομής των ενζύμων HaeIII και MnlI στο PCR προϊόν για το COL11A1. Με πράσινη / αναπαριστάνεται το σημείο κοπής για το ένζυμο HaeIII ενώ με κόκκινη / για το ένζυμο MnlI.

Εικόνα 2.13: Αρχή ενζυμικής μεθόδου DNA sequencing κατά Sanger.

Εικόνα 3.1: Πρότυπη καμπύλη για το γενικό μετάγραφο του COL11A1.

Εικόνα 3.2: Ανάλυση της πρότυπης καμπύλης του γενικού μεταγράφου του COL11A1.

Εικόνα 3.3: Σημείο τήξης γενικού μεταγράφου COL11A1.

Εικόνα 3.4: Πρότυπη καμπύλη για την ισομορφία C.

Εικόνα 3.5: Ανάλυση της πρότυπης καμπύλης της ισομορφίας C.

Εικόνα 3.6: Σημείο τήξης ισομορφίας C.

Εικόνα 3.7: Ηλεκτροφόρηση των standards του γενικού μεταγράφου του COL11A1.

Εικόνα 3.8: Ηλεκτροφόρηση των standards της ισομορφίας C.

Εικόνα 3.9: Αλληλούχηση DNA της ισομορφίας C.

Εικόνα 3.10: Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων για περιοχή του γονιδίου COL11A1.

Εικόνα 3.11: Καμπύλη διαφορετικών συγκεντρώσεων MgCl₂.

Εικόνα 3.12: Χρήση DMSO στην ανίχνευση της ισομορφίας C.

Εικόνα 3.13: Σημείο τήξης για την ισομορφία C έπειτα από χρήση DMSO.

Εικόνα 3.14: Real-time qPCR ισομορφίας A για τα δείγματα των ανευρισμάτων της αορτής. Όλα τα δείγματα είναι αρνητικά, εκτός από τα standards.

Εικόνα 3.15: Ηλεκτροφόρηση ανεπιτυχούς PCR σε πηκτή αγαρόζης 2% για την ισομορφία A.

Εικόνα 3.15A: Ηλεκτροφόρηση ανεπιτυχούς PCR σε πηκτή αγαρόζης 2% για την ισομορφία A.

Εικόνα 3.16: Real-time qPCR για την ισομορφία E για τα δείγματα των ανευρισμάτων της αορτής.

Εικόνα 3.17: Ηλεκτροφόρηση ανεπιτυχούς PCR σε πηκτή αγαρόζης 2% για την ισομορφία E.

Εικόνα 3.18: real-time qPCR για το γενικό μετάγραφο του COL11A1.

Εικόνα 3.19: real-time PCR για την ισομορφία A.

Εικόνα 3.20: real-time PCR για την ισομορφία A.

Εικόνα 3.21: real-time PCR για την ισομορφία E.

Εικόνα 3.22: real-time PCR για την ισομορφία E.

Εικόνα 3.22A: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων για την ισομορφία A (πάνω σειρά) και E (κάτω σειρά)

Εικόνα 3.23: Ποσοτικός προσδιορισμός ισομορφίας C στα δείγματα καρκίνου του πνεύμονα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή

1.1 Τα ανευρύσματα αορτής

Ανεύρυσμα είναι μια ανώμαλη διόγκωση στο τοίχωμα μίας αρτηρίας. Πιο συγκεκριμένα αποτελεί μία μεγέθυνση (διαστολή) της αορτής σε μεγαλύτερο από 1,5 φορές το κανονικό μέγεθος [1]. Κανονικά, τα τοιχώματα των αρτηριών είναι παχιά και μυώδη, επιτρέποντάς τους να αντέχουν ένα μεγάλο ποσό πίεσης. Περιστασιακά, εντούτοις, μια αδύναμη περιοχή αναπτύσσεται στο τοίχωμα μίας αρτηρίας. Αυτό επιτρέπει η πίεση εντός της αρτηρίας να την ωθήσει προς τα έξω, δημιουργώντας ένα εξόγκωμα που ονομάζεται "ανεύρυσμα." Ένα αορτικό ανεύρυσμα συνήθως δεν προκαλεί κανένα σύμπτωμα εκτός εάν διαρρηγνύεται [2]. Περιστασιακά, μπορεί να υπάρχει κοιλιακός πόνος, πόνος στην πλάτη, ή πόνος στο πόδι [3].

1.1.1 Ανευρύσματα αορτής- Ταξινόμηση

Τα ανευρύσματα μπορούν να σχηματιστούν σε οποιοδήποτε αιμοφόρο αγγείο, αλλά πιο συχνά εμφανίζονται στην αορτή (ανεύρυσμα αορτής). Η αορτή είναι η μεγαλύτερη αρτηρία στο σώμα. Μεταφέρει το αίμα από την καρδιά στο υπόλοιπο σώμα. Ανευρύσματα αορτής μπορεί να συμβούν σε δύο κύρια μέρη:

- Κοιλιακά ανευρύσματα αορτής συμβαίνουν στο τμήμα της αορτής που περνάει μέσα από τη μέση προς χαμηλή κοιλιακή χώρα.
- Θωρακικά ανευρύσματα αορτής συμβαίνουν στην αορτή καθώς περνά μέσω της κοιλότητας του στήθους. Αυτές είναι λιγότερο συχνές από ότι τα κοιλιακά ανευρύσματα.
- Θωρακοκοιλιακά ανευρύσματα αορτής αφορούν τόσο την θωρακική και κοιλιακή αορτή.

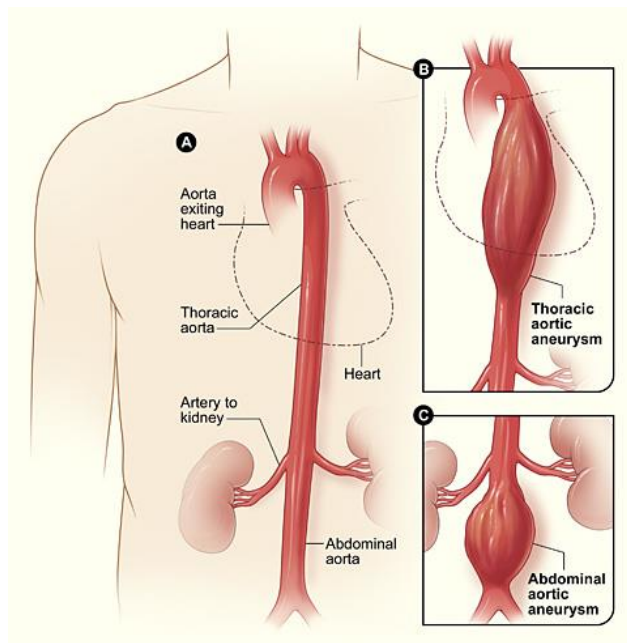
Μικρά ανευρύσματα δεν αποτελούν γενικά απειλή. Ωστόσο, τα ανευρύσματα αυξάνουν τον κίνδυνο για:

- Σχηματισμό αθηρωτικής πλάκας από την πλευρά του ανευρίσματος. Το γεγονός αυτό προκαλεί περαιτέρω αποδυνάμωση του τοιχώματος της αρτηρίας.
- Σχηματισμό θρόμβου αίματος με κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου.
- Αύξηση στο μέγεθος του ανευρίσματος, με αποτέλεσμα να πιέζονται άλλα όργανα. Αυτό το γεγονός συνήθως προκαλεί πόνο.
- Ρήξη ανευρίσματος. Επειδή το τοίχωμα της αρτηρίας λεπταίνει σε αυτό το σημείο, είναι εύθραυστη και μπορεί να σπάσει κάτω από την πίεση. Η ρήξη ενός ανευρίσματος της αορτής είναι μια καταστροφική, απειλητική για τη ζωή εκδήλωση.

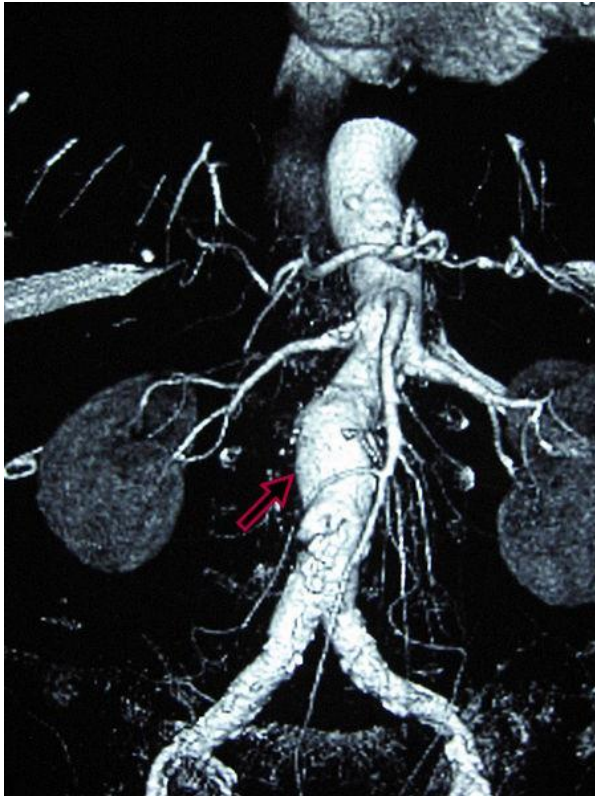
1.1.2 Αίτια εμφάνισης ανευρυσμάτων αορτής

Ανευρύσματα αορτής μπορεί να προκληθούν από:

- Αθηροσκλήρωση ή σκλήρυνση των αρτηριών, η οποία αποδυναμώνει αρτηριακά τοιχώματα
- Υπέρταση (υψηλή αρτηριακή πίεση)
- Τοπικό τραυματισμό της αρτηρίας
- Γήρανση
- Σύνδρομο Marfan



Εικόνα 1.1: Στο σχήμα A παρουσιάζεται μια φυσιολογική αορτή. Στο σχήμα B παρουσιάζεται ένα θωρακικό αορτικό ανεύρυσμα (το οποίο βρίσκεται πίσω από την καρδιά). Στο σχήμα Γ παρουσιάζεται ένα κοιλιακό αορτικό ανεύρυσμα κάτω από τις αρτηρίες που τροφοδοτούν τους νεφρούς.



Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση κοιλιακών αορτικών ανευρυσμάτων (3-4 εκ.).

1.1.3 Κοιλιακά αορτικά ανευρίσματα

Τα κοιλιακά αορτικά ανευρύσματα (ΑΑΑ) είναι πιο συνήθη από τα θωρακικά. Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω της μείωσης της ελαστικής (της κύριας εξωκντάριας πρωτεΐνης, που είναι παρούσα στο τοίχωμα της αορτής) στην κοιλιακή αρτηρία, συγκριτικά με την θωρακική. Επιπρόσθετα, η κοιλιακή αορτή δεν διαθέτει vasa vasorum, η οποία προμηθεύει τα τοιχώματα των αγγείων με θρεπτικά συστατικά. Τα περισσότερα κοιλιακά αορτικά ανευρύσματα αποτελούν «πραγματικά» ανευρύσματα, καθώς εμπλέκονται και οι τρεις στιβάδες τους (tunica intima, tunica media, tunica adventitia). Ο επιπολασμός των κοιλιακών αορτικών ανευρυσμάτων αυξάνεται με την ηλικία, με μία μέση ηλικία διάγνωσης στα 65-70 έτη. Τα κοιλιακά αορτικά ανευρύσματα έχουν αποδοθεί στην αθηροσκλήρωση, ωστόσο και άλλοι παράγοντες εμπλέκονται στον σχηματισμό τους. Η ρήξη του ανευρύσματος σχετίζεται με τη διάμετρό του: όταν φτάσει τα 5 εκατοστά, ο ετήσιος κίνδυνος ρήξης μπορεί να υπερβαίνει τους κινδύνους της χειρουργικής αποκατάστασης για έναν ασθενή μέσου όρου κινδύνου. Ο κίνδυνος ρήξης σχετίζεται επίσης και με το σχήμα του ανευρύσματος. Τα «ατρακτοειδή» ανευρύσματα θεωρούνται λιγότερο επιρρεπή σε ρήξη από τα σφαιρικού τύπου (μικρότερα, βολβώδη). Τα τελευταία ασκούν μεγαλύτερη πίεση στο τοίχωμα του ανευρύσματος σε συγκεκριμένη θέση. Πριν τη ρήξη, ένα κοιλιακό αορτικό ανεύρυσμα μπορεί να παρουσιαστεί ως μία μεγάλη, παλλόμενη μάζα πάνω από τον ομφαλό και ένα φύσημα μπορεί να ακουστεί από την ταραχώδη ροή του ανευρύσματος. Δυστυχώς, όμως, η ρήξη μπορεί να είναι η πρώτη

ένδειξη του κοιλιακού αορτικού ανευρύσματος. Μόλις συμβεί η ρήξη του ανευρύσματος, παρουσιάζονται κλασικά συμπτώματα κοιλιακού άλγους.

Η διάγνωση ενός ανευρύσματος κοιλιακής αορτής μπορεί να επιβεβαιωθεί παρά την κλίνη με τη χρήση υπερήχων. Ρήξη μπορεί να υποδεικνύεται επίσης από την παρουσία ελεύθερου υγρού στην κοιλιακή χώρα . Μια ενισχυμένης αντίθεσης κοιλιακή αξονική τομογραφία είναι η καλύτερη εξέταση για τη διάγνωση του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής.

Μόνο το 10-25% των ασθενών επιβιώνουν της ρήξης λόγω της μεγάλης προ- και μετεγχειρητικής θνησιμότητας. Ετήσια θνησιμότητα από ρήξη ανευρύσματος στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι περίπου 15.000 ασθενείς. Οι περισσότεροι είναι λόγω κοιλιακών αορτικών ανευρυσμάτων, με τα θωρακικά και τα θωρακοκοιλιακά να αποτελούν το 1% έως 4 % του συνολικού αριθμού.

1.1.4 Αορτική ρήξη

Ένα ανεύρυσμα αορτής μπορεί να διαρραγεί από την αδυναμία του τοιχώματος. Αορτική ρήξη είναι μια χειρουργική πράξη έκτακτης ανάγκης, και έχει υψηλή θνησιμότητα ακόμη και με άμεση θεραπεία. Η εισαγωγή το Σαββατοκύριακο για ρήξη αορτικού ανευρύσματος σχετίζεται με αυξημένη θνησιμότητα σε σύγκριση με την εισαγωγή σε μια εργάσιμη μέρα, και αυτό είναι πιθανό οφείλεται σε διάφορους παράγοντες συμπεριλαμβανομένης της καθυστέρησης στην έγκαιρη χειρουργική επέμβαση [4].

1.1.5 Παράγοντες κινδύνου

- Ηλικία
- Στεφανιαία νόσος
- Υπέρταση
- Loeys - Dietz Σύνδρομο
- Υπερχοληστερολαιμία
- Υπερομοκυστεϊναιμία
- Αυξημένη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
- Κάπνισμα
- Περιφερική αγγειακή νόσος
- Σύνδρομο Marfan
- Ehlers - Danlos τύπου IV
- Πρόβλημα στην διγλώχινια μητροειδή βαλβίδα
- Σύφιλη
- IgG4 συσχετιζόμενη ασθένεια

1.1.6 Παθοφυσιολογία



Εικόνα 1.3: Κοιλιακό αορτικό ανεύρυσμα διαμέτρου 6.5 εκ. με 3.0 εκ. αυλό.

Ένα αορτικό ανεύρυσμα μπορεί να προκύψει ως αποτέλεσμα τραύματος, μόλυνσης, ή συνηθέστερα, από μία ενδογενή ανωμαλία στα συστατικά ελαστίνης και κολλαγόνου του αορτικού τοιχώματος. Ορισμένα γενετικά σύνδρομα (Marfan , Elher - Danlos και άλλα) που σχετίζονται με ανευρύσματα της κοιλιακής αορτής, και τα δύο ανευρίσματα θωρακικής και κοιλιακής αορτής έχει αποδειχθεί ότι εμπεριέχουν μια ισχυρή γενετική συνιστώσα στην αιτιολογία τους [5].

1.1.7 Διαχείριση

Η χειρουργική (ανοιχτή ή ενδαγγειακή) είναι η οριστική θεραπεία ενός ανευρύσματος αορτής. Φαρμακευτική αντιμετώπιση συνήθως προορίζεται για μικρότερα ανευρύσματα ή για τους ηλικιωμένους, αδύναμους ασθενείς, όπου οι κίνδυνοι της χειρουργικής αποκατάστασης υπερβαίνουν τους κινδύνους της μη – λειτουργικής θεραπείας (παρατήρηση μόνο).

1.1.8 Ιατρική αντιμετώπιση

Η ιατρική αντιμετώπιση περιλαμβάνει αυστηρό έλεγχο αρτηριακής πίεσης. Αυτό δε θεραπεύει το αορτικό ανεύρυσμα αυτό καθ' αυτό, αλλά ο έλεγχος της υπέρτασης εντός αυστηρών παραμέτρων αρτηριακής πίεσης μπορεί να μειώσουν τον ρυθμό διαστολής του αορτικού ανευρύσματος.

Η ιατρική αντιμετώπιση των ασθενών με ανευρύσματα της κοιλιακής αορτής, που είτε πρόκειται για ανευρύσματα μικρού μεγέθους είτε για αδύναμους ασθενείς, συνεπάγεται τη διακοπή του καπνίσματος, τον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης, τη χρήση στατινών και περιστασιακά β-αναστολέων. Οι μελέτες Ultrasound λαμβάνονται σε τακτική βάση (κάθε 6-12 μήνες) ώστε να παρακολουθείται το μέγεθος του ανευρύσματος.

Η οριστική θεραπεία για ένα ανεύρυσμα αορτής μπορεί να είναι χειρουργική ή ενδαγγειακή αποκατάσταση. Ο προσδιορισμός της χειρουργικής επέμβασης είναι πολύπλοκος και καθορίζεται ανά περίπτωση. Ο κίνδυνος ρήξης ανeurύσματος σταθμίζεται έναντι του κινδύνου της χειρουργικής διαδικασίας. Η διάμετρος του ανeurύσματος, ο ρυθμός ανάπτυξης, η παρουσία ή απουσία του Marfan συνδρόμου, του Ehlers-Danlos συνδρόμου ή παρόμοιων διαταραχών του συνδετικού ιστού, και άλλες νοσηρότητες είναι όλοι σημαντικοί παράγοντες στη συνολική θεραπεία.

1.1.9 Χειρουργική επέμβαση

Οι αποφάσεις σχετικά με την επιδιόρθωση ενός αορτικού ανeurύσματος βασίζονται στην ισορροπία μεταξύ του κινδύνου ρήξης ανeurύσματος χωρίς θεραπεία έναντι των κινδύνων της ίδιας της θεραπείας. Για παράδειγμα, ένα μικρό ανeurύσμα σε έναν ηλικιωμένο ασθενή με σοβαρή καρδιαγγειακή νόσο, δεν θα πρέπει να διορθωθεί. Η πιθανότητα του μικρού ανeurύσματος ρήξης επισκιάζεται από τον κίνδυνο των καρδιακών επιπλοκών από τη διαδικασία για την διόρθωση του ανeurύσματος.

Μια ανοικτή χειρουργική επέμβαση περιλαμβάνει τυπικά την έκθεση του τμήματος της αορτής που έχει διασταλεί και την εισαγωγή ενός συνθετικού (Dacron ή Gore-Tex) μόσχευματος (σωλήνα). Μόλις το μόσχευμα ράβεται μέσα στο εγγύς (προς το κεφάλι του ασθενούς) και άπω (προς το πόδι του ασθενούς) τμήμα της αορτής, ο σάκος ανeurύσματος κλείνει γύρω από το μόσχευμα. Εναλλακτικά, η αναστόμωση μπορεί να πραγματοποιηθεί με επεκτάσιμες συσκευές, μια απλούστερη και ταχύτερη διαδικασία [6, 7].

Η αορτή και οι διακλαδώσεις των αρτηριών της είναι συσφιγμένες κατά τη διάρκεια ανοικτής χειρουργικής επέμβασης. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή παροχή αίματος στον νωτιαίο μυελό, οδηγώντας σε παραπληγία, κατά την επισκευή του θωρακικού ανeurύσματος. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό αποστράγγισης, όταν πραγματοποιείται σε έμπειρα κέντρα, μειώνει τον κίνδυνο ισχαιμικής βλάβης του νωτιαίου μυελού με την αύξηση της πίεσης αιμάτωσης του νωτιαίου μυελού. [8, 9]

Ο κίνδυνος της χειρουργικής επέμβασης είναι διττός. Πρώτον, πρέπει να ληφθούν υπόψη τα προβλήματα που προκύπτουν κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά την χειρουργική επέμβαση και δεύτερον, η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας, κοινώς εάν η διαδικασία προστατεύει αποτελεσματικά τον ασθενή από τη μακροχρόνια ρήξη ανeurύσματος. Αυτά τα ζητήματα χρήζουν μεγάλης σημασίας και θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όταν πρέπει να παρθεί απόφαση μεταξύ δύο διαφορετικών θεραπευτικών επιλογών. Μια λιγότερο επεμβατική διαδικασία (όπως η ενδαγγειακή αποκατάσταση ανeurύσματος με μπαλονάκι ή stent) μπορεί να συνδέεται με λιγότερο βραχυπρόθεσμους κινδύνους για τον ασθενή (λιγότερες επιπλοκές), αλλά δευτερογενείς διαδικασίες μπορεί να είναι απαραίτητες για μακροπρόθεσμη παρακολούθηση.

1.1.10 Ενδαγγειακή αποκατάσταση ανευρύσματος

Ενδοαγγειακή θεραπεία της αορτής είναι μια ελάχιστα επεμβατική εναλλακτική λύση για να ανοίξει την επισκευή χειρουργική επέμβαση. Περιλαμβάνει τοποθέτηση ενός ενδο-αγγειακής ενδοπρόθεσης μέσω μικρών τομών στην κορυφή του κάθε άκρου μέσα στην αορτή.

Σε σύγκριση με ανοικτή χειρουργική επέμβαση, η ενδαγγειακή αποκατάσταση έχει χαμηλότερο κίνδυνο θανάτου σε σύντομο χρονικό διάστημα και βραχύτερη παραμονή στο νοσοκομείο, αλλά δεν μπορεί πάντα να αποτελεί επιλογή [2, 10, 11]. Δεν φαίνεται να υπάρχει διαφορά στην μακροπρόθεσμα αποτελέσματα μεταξύ των δύο διαδικασιών [12]. Μετά από ενδαγγειακή αποκατάσταση, διαδικασίες επανάληψης είναι πιο πιθανό να χρειαστούν [13].

1.2 Αναπνευστικό Σύστημα & Πνεύμονες

Στον άνθρωπο, το αναπνευστικό σύστημα περιλαμβάνει τους πνεύμονες, το σύνολο των αεραγωγών που οδηγούν στους πνεύμονες και τις δομές του θώρακα που είναι απαραίτητες για την μετακίνηση του αέρα μέσα και έξω από τους πνεύμονες.

Υπάρχουν δύο πνεύμονες, ο δεξιός και ο αριστερός, ο καθένας από τους οποίους διαιρείται σε λοβούς. Οι πνεύμονες αποτελούνται κατά κύριο λόγο από μικρούς σάκους που περιέχουν αέρα, τις κυψελίδες, οι οποίες, σε έναν ενήλικο, ανέρχονται περίπου σε 300 εκατομμύρια. Στις κυψελίδες εντοπίζεται η ανταλλαγή των αερίων με το αίμα. Οι αεραγωγοί είναι σωλήνες μέσα από τους οποίους ο αέρας διακινείται μεταξύ του περιβάλλοντος και των κυψελίδων. Κατά την αναπνοή εισέρχεται αέρας, είτε μέσω της μύτης (συχνότερα) είτε μέσω του στόματος στο φάρυγγα, που αποτελεί κοινή οδό διέλευσης του αέρα και της τροφής. Ο φάρυγγας συνεχίζεται με δύο οδούς, τον οισοφάγο μέσω του οποίου η τροφή καταλήγει στο στομάχο και το λάρυγγα που αποτελεί τμήμα των αεραγωγών. Στο λάρυγγα βρίσκονται οι φωνητικές χορδές, δύο πτυχές ελαστικού ιστού που διατείνονται οριζόντια κατά μήκος του αυλού του. Η ροή αέρα διαμέσου των φωνητικών χορδών προκαλεί τη δόνησή τους, με αποτέλεσμα την παραγωγή ήχων. Η μύτη, το στόμα, ο φάρυγγας και ο λάρυγγας αποτελούν τους ανώτερους αεραγωγούς. Ο λάρυγγας καταλήγει σε έναν επιμήκη σωλήνα την τραχεία, η οποία με τη σειρά της διακλαδίζεται σε δύο βρόγχους, ο καθένας από τους οποίους εισέρχεται στον αντίστοιχο πνεύμονα. Μέσα στους πνεύμονες εντοπίζονται περισσότερες από 20 γενεές διακλαδώσεων του βρογχικού δέντρου, η καθεμία από τις οποίες καταλήγει σε στενότερους, βραχύτερους και πολυπληθέστερους αεραγωγούς.

	Ονόματα κλάδων	Αριθμός σωληνώσεων ανά διακλάδωση
Ζώνη αγωγής	Τραχεία	1
	Βρόγχοι	2
		4
		8
	Βρογχιόλια	16
		32
Τελικά βρογχιόλια	6×10^4	
Αναπνευστική ζώνη	Αναπνευστικά βρογχιόλια	5×10^5
		Κυψελιδικοί πόροι
	Κυψελιδικοί σάκοι	

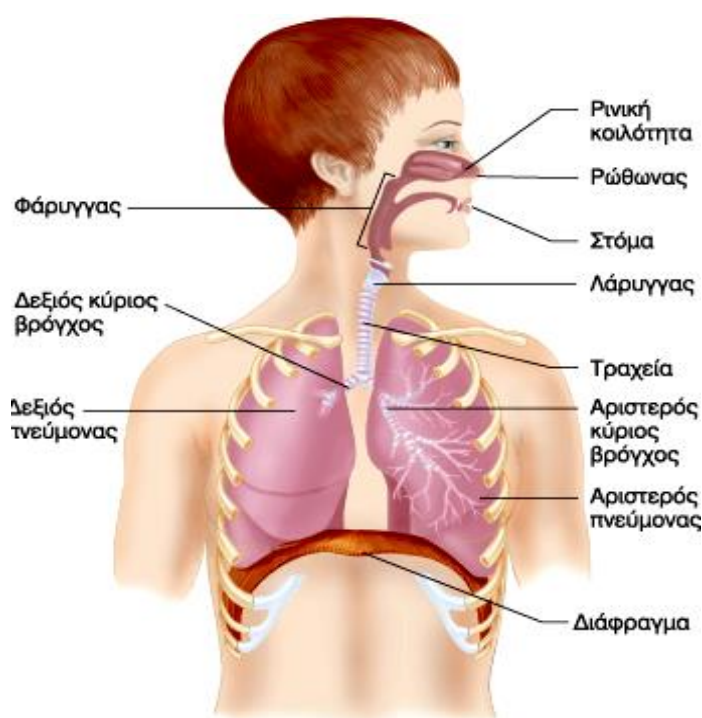
Εικόνα 1.4: Κλάδοι αναπνευστικής ζώνης και ζώνης αγωγής και αριθμός σωληνώσεων.

Τα τοιχώματα της τραχείας και των βρόγχων περιέχουν χόνδρο, που τους παρέχει το κυλινδρικό τους σχήμα και στήριξη. Οι πρώτες διακλαδώσεις των αεραγωγών που δεν περιέχουν χόνδρο λέγονται βραγχιόλια. Οι κυψελίδες αρχίζουν να εμφανίζονται στα αναπνευστικά βραγχιόλια, προσκολλημένα στα τοιχώματά τους. Ο αριθμός των κυψελίδων αυξάνεται στους κυψελιδικούς πόρους και οι αεραγωγοί καταλήγουν τελικά σε συναθροίσεις που αποτελούνται αποκλειστικά από κυψελίδες. Οι αεραγωγοί, όπως και τα αιμοφόρα αγγεία, περιβάλλονται από λείους μύες, που με τη σύσπαση και χάλασή τους μεταβάλλουν τη διάμετρο των αεραγωγών. Οι αεραγωγοί μετά το λάρυγγα μπορούν να διαιρεθούν σε δύο ζώνες: η ζώνη αγωγής που εκτείνεται από την κορυφή της τραχείας έως την αρχή των αναπνευστικών βρογχιολίων. Στη ζώνη αυτή δεν υπάρχουν κυψελίδες και δεν γίνεται ανταλλαγή αερίων. Η αναπνευστική ζώνη που εκτείνεται πέρα από τα αναπνευστικά βρογχιόλια, περιέχει κυψελίδες και αποτελεί τη θέση όπου συντελείται η ανταλλαγή των αερίων με το αίμα.

Συνοπτικά, ο ρόλος της ζώνης αγωγής είναι:

- προστασία (βλεφαρίδες, αδένες που εκκρίνουν βλέννα, φαγοκύτταρα)
- θέρμανση και ύγρανση αέρα
- ρύθμιση ποσού αέρα που φτάνει στις κυψελίδες

Αντίθετα, ο ρόλος της αναπνευστικής ζώνης είναι η ανταλλαγή μεταξύ αίματος και αέρα.

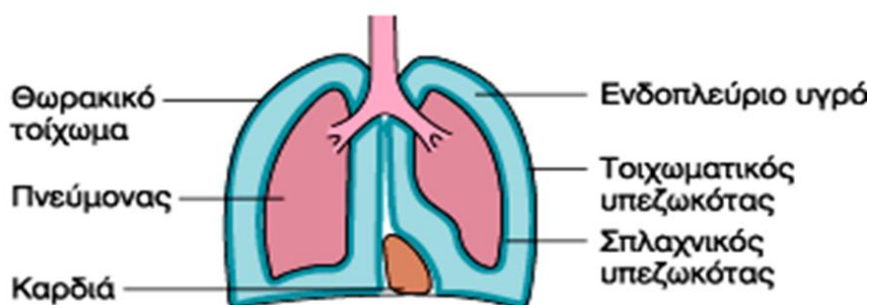


Εικόνα 1.5: Αναλυτική απεικόνιση του ανθρώπινου αναπνευστικού συστήματος.

Η επιφάνεια του επιθηλίου των αεραγωγών, μέχρι το τέλος των αναπνευστικών βρογχιολίων, περιλαμβάνει κροσσούς που εμφανίζουν συνεχή κίνηση προς το φάρυγγα. Περιέχει επίσης αδένες και μεμονωμένα επιθηλιακά κύτταρα που εκκρίνουν βλέννα. Οι ουσίες που αποτελούνται από σωματίδια, όπως η σκόνη που περιέχεται στον εισπνεόμενο αέρα, προσκολλώνται στη βλέννα που μεταφέρεται αργά και σταθερά από τους κροσσούς προς το φάρυγγα, όπου κατόπιν καταπίνεται. Αυτός ο μηχανισμός μετακίνησης της βλέννας είναι σημαντικός για τη διατήρηση καθαρών πνευμόνων από σωματιδιακές ουσίες και από τα ποικίλα βακτήρια που εισέρχονται στο σώμα με τα σωματίδια της σκόνης. Η δραστηριότητα των κροσσών μπορεί να ανασταλεί από πολλούς βλαπτικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, το κάπνισμα ενός μόνο τσιγάρου ακινητοποιεί τους κροσσούς για αρκετές ώρες. Οι πνεύμονες, όπως και η καρδιά, εντοπίζονται στο θώρακα, το τμήμα του σώματος που περιλαμβάνεται μεταξύ του τραχήλου και της κοιλίας. Ο θώρακας είναι ένα κλειστό διαμέρισμα που συνδέεται με τον τράχηλο με μυς και συνδετικό ιστό και διαχωρίζεται πλήρως από

την κοιλία με ένα σκελετικό μυ, το διάφραγμα, που έχει σχήμα θόλου. Το τοίχωμα του θώρακα σχηματίζεται από τη σπονδυλική στήλη, τις πλευρές, το στήθος και από αρκετές ομάδες μυών που βρίσκονται μεταξύ των πλευρών (μεσοπλεύριοι μύες). Το θωρακικό τοίχωμα περιέχει επίσης μεγάλες ποσότητες ελαστικού συνδετικού ιστού.

Ο κάθε πνεύμονας περιβάλλεται από ένα κλειστό σάκο, τον υπερζωκοτικό σάκο, που αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα κυττάρων που λέγεται υπερζωκότας. Οι δύο υπερζωκοτικοί σάκοι βρίσκονται εκατέρωθεν της μέσης γραμμής και είναι πλήρως ανεξάρτητοι ο ένας από τον άλλο. Η επιφάνεια του υπερζωκότα που καλύπτει τον πνεύμονα (ο σπλαχνικός υπερζωκότας) συνδέεται στενά με τον πνεύμονα με συνδετικό ιστό. Ανάλογα, η εξωτερική στιβάδα (ο τοιχωματικός υπερζωκότας) προσκολλάται και επενδύει το εσωτερικό τοίχωμα του θώρακα και το διάφραγμα. Οι δύο στιβάδες του υπερζωκότα σε κάθε σάκο βρίσκονται τόσο κοντά, που ουσιαστικά έρχονται σχεδόν πάντοτε σε επαφή κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αλλά δεν συνέχονται μεταξύ τους. Αντίθετα, διαχωρίζονται από ένα πολύ λεπτό στρώμα ενδοπλεύριου (υπερζωκοτικού) υγρού, το οποίο έχει συνολικό όγκο μόλις λίγα ml. Το ενδοπλεύριο υγρό επαλείφει πλήρως τους πνεύμονες και λιπαίνει τις επιφάνειες του υπερζωκότα, ώστε να μπορούν να ολισθαίνουν η μία πάνω στην άλλη κατά τη διάρκεια της αναπνοής. Τέλος κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής αναπνοής, η ενδοπλεύριος πίεση (Pip) που λέγεται επίσης ενδουπερζωκοτική ή ενδοθωρακική πίεση, προκαλείται κίνηση των πνευμόνων και του θωρακικού τοιχώματος προς τα μέσα ή προς τα έξω.



Εικόνα 1.6: Τμήματα των πνευμόνων.

1.3 Ο καρκίνος του πνεύμονα

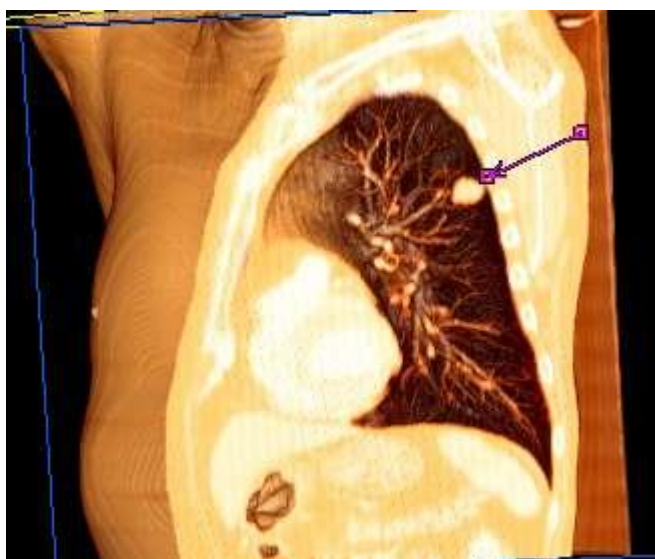
1.3.1 Βιολογία του καρκίνου του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των κυττάρων στους ιστούς του πνεύμονα. Εάν δε θεραπευθεί, ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός μπορεί να εξαπλωθεί και πέραν του πνεύμονα με μια διαδικασία που ονομάζεται μετάσταση σε κοντινό ιστό και, τελικά, σε άλλα απομακρυσμένα μέρη του σώματος. Οι περισσότεροι καρκίνοι που ξεκινούν στον πνεύμονα, γνωστοί ως πρωτογενείς καρκίνοι του πνεύμονα, είναι καρκινώματα που

προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα. Οι κύριοι τύποι καρκίνου του πνεύμονα είναι το μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (small cell lung carcinoma, SCLC), που ονομάζεται επίσης καρκίνος κυττάρων βρώμης, και το μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (non small cell carcinoma, NSCLC). Η πιο κοινή αιτία του καρκίνου του πνεύμονα είναι η μακροχρόνια έκθεση στον καπνό, η οποία προκαλεί το 80-90% των καρκίνων του πνεύμονα. Οι μη καπνιστές αντιστοιχούν στο 10-15% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα, [14] που συχνά αποδίδεται σε ένα συνδυασμό γενετικών παραγόντων, [15] στο αέριο ραδόνιο, [15] στον αμιάντο, [16] την ατμοσφαιρική ρύπανση και το παθητικό κάπνισμα.

Τα πιο συχνά συμπτώματα είναι ο βήχας (συμπεριλαμβανομένης της αιμόπτυσης), η απώλεια βάρους και η δυσκολία στην αναπνοή. Ο καρκίνος του πνεύμονα μπορεί να παρατηρηθεί σε ακτινογραφία θώρακος και σε αξονική τομογραφία (CT scan). Η διάγνωση επιβεβαιώνεται με βιοψία. Αυτό γίνεται συνήθως με βρογχοσκόπηση ή CT-καθοδηγούμενη βιοψία. Η θεραπεία και η πρόγνωση εξαρτώνται από τον ιστολογικό τύπο του καρκίνου, το στάδιο (βαθμό εξάπλωσης), και γενικά την ευημερία του ασθενούς, που μετράται με το τεστ κοπώσεως. Οι κοινές θεραπείες περιλαμβάνουν χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία, βιολογική θεραπεία και ακτινοθεραπεία. Το καρκίνωμα NSCLC μερικές φορές αντιμετωπίζεται με χειρουργική επέμβαση, ενώ το SCLC συνήθως ανταποκρίνεται καλύτερα στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία.

Η επιβίωση εξαρτάται από το στάδιο, τη γενική υγεία και άλλους παράγοντες. Συνολικά, μόνο το 15% των ανθρώπων στις Ηνωμένες Πολιτείες που διαγιγνώσκονται με καρκίνο του πνεύμονα επιβιώνει για πέντε έτη μετά την διάγνωση [17] Παγκοσμίως, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η πιο κοινή αιτία καρκίνου που σχετίζεται με το θάνατο σε άνδρες και γυναίκες και είναι υπεύθυνη για 1.380.000 θανάτους ετησίως από το 2008 [18].



Εικόνα 1.7: Σε τρισδιάστατη αξονική τομογραφία διακρίνεται όγκος στον πνεύμονα (βέλος).

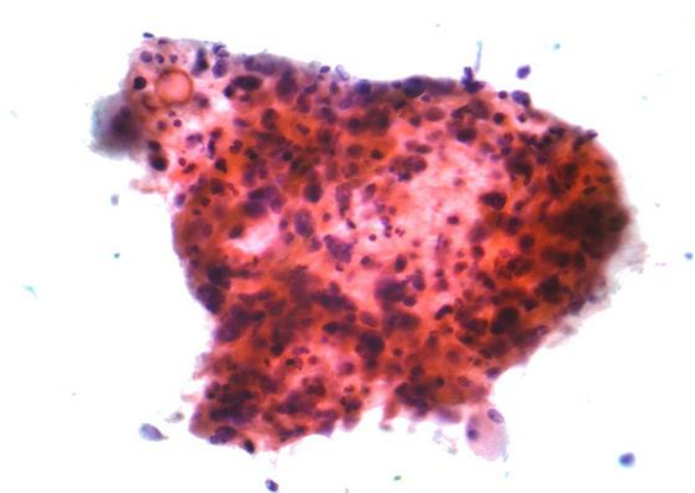
1.3.2 Ταξινόμηση

Πίνακας 1.1: Επίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο.

Ιστολογικός τύπος	Εμφάνιση (ανά 100,000 ανά έτη)
Όλοι οι τύποι	66.9
Αδενοκαρκίνωμα	22.1
Καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων	14.4
Μικροκυτταρικού τύπου καρκίνωμα	9.8

Οι καρκίνοι του πνεύμονα ταξινομούνται σύμφωνα με τον ιστολογικό τύπο. Η ταξινόμηση αυτή έχει σημαντικές συνέπειες στην κλινική διαχείριση και την πρόγνωση της νόσου. Η συντριπτική πλειοψηφία των καρκίνων του πνεύμονα είναι καρκινώματα-κακοήθειες που προκύπτουν από επιθηλιακά κύτταρα. Τα καρκινώματα του πνεύμονα κατηγοριοποιούνται από το μέγεθος και την εμφάνιση των κακοηθών κυττάρων που μπορούν να παρατηρηθούν από παθολογοανατόμο με μικροσκόπηση. Οι δύο ευρείες κατηγορίες είναι το μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα και το μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα.

1.3.2.1 Μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (NSCLC)



Εικόνα 1.8: Μικρογραφία πλακώδους καρκινώματος, που αποτελεί τύπο μη μικροκυτταρικού καρκινώματος, (FNA specimen, Pap stain).

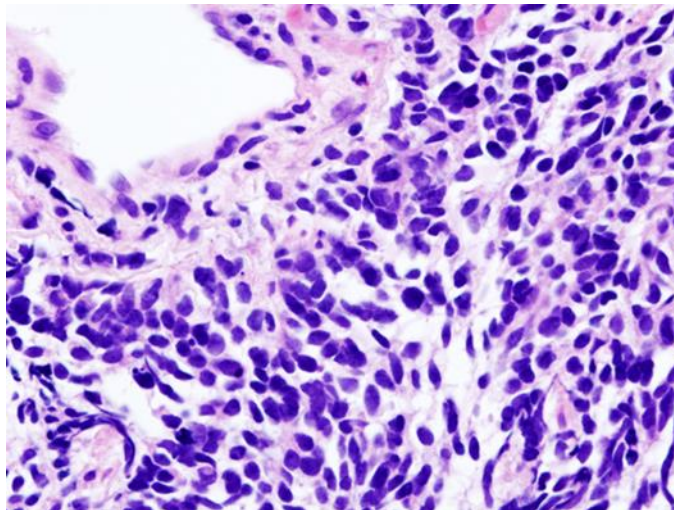
Οι τρεις κύριες υποκατηγορίες του NSCLC είναι το αδενοκαρκίνωμα, το καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα και των μεγαλοκυττάρων του πνεύμονα.

Σχεδόν το 40% των καρκίνων του πνεύμονα είναι το αδενοκαρκίνωμα, που συνήθως προέρχεται από περιφερικούς ιστούς των πνευμόνων. Οι περισσότερες περιπτώσεις του αδενοκαρκινώματος σχετίζονται με το κάπνισμα. Ωστόσο, μεταξύ των ατόμων που έχουν καπνίσει λιγότερα από 100 τσιγάρα στη διάρκεια της ζωής τους («μη καπνιστές»), το αδενοκαρκίνωμα είναι η πιο κοινή μορφή καρκίνου του πνεύμονα [19]. Ένας άλλος τύπος αδενοκαρκινώματος, το βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα, είναι πιο κοινό σε γυναίκες μη καπνίστριες και μπορεί να έχει διαφορετικές αποκρίσεις στη θεραπεία [19].

Το καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων αποτελεί περίπου το 30% των καρκίνων του πνεύμονα. Συνήθως συμβαίνει κοντά σε μεγάλους αεραγωγούς. Μια κοίλη κοιλότητα που σχετίζεται με νέκρωση βρίσκεται συνήθως στο κέντρο του όγκου.

Περίπου το 9% των καρκίνων του πνεύμονα είναι καρκίνωμα των μεγάλων κυττάρων. Ονομάζεται έτσι επειδή τα καρκινικά κύτταρα είναι μεγάλα, με περίσσεια κυτταροπλάσματος, μεγάλους πυρήνες και εμφανείς πυρηνίσκους.

1.3.2.2 Μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (SCLC)



Εικόνα 1.9: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (μικροσκοπική όψη πυρήνα από βιοψία).

Σε μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (SCLC), τα κύτταρα περιέχουν πυκνούς νευροεκκριτικούς κόκκους (κυστίδια που περιέχουν νευροενδοκρινικές ορμόνες), που συσχετίζουν τον όγκο με ενδοκρινικό / παρανεοπλασματικό σύνδρομο [20]. Οι περισσότερες περιπτώσεις προκύπτουν στους μεγάλους αεραγωγούς (πρωτογενείς και δευτερογενείς βρόγχοι) [17]. Αυτοί οι καρκίνοι αναπτύσσονται γρήγορα και

εξαπλώνονται νωρίς στην πορεία της νόσου. Εξήντα με εβδομήντα τοις εκατό έχουν μεταστατική ιδιότητα κατά την εξέλιξη. Αυτός ο τύπος καρκίνου του πνεύμονα συνδέεται στενά με το κάπνισμα.

1.3.2.3 Άλλοι τύποι

Οι τέσσερις κύριοι ιστολογικές τύποι καρκινωμάτων αναγνωρίζονται, αν και ορισμένοι καρκίνοι μπορούν να περιέχουν συνδυασμό των διαφόρων τύπων. Σπάνιοι τύποι καρκίνου περιλαμβάνουν αδενικούς όγκους και αδιαφοροποίητα καρκινώματα.

1.3.3 Μετάσταση

Ο πνεύμονας είναι μια κοινή θέση μετάστασης των όγκων από άλλα μέρη του σώματος. Οι δευτεροπαθείς καρκίνοι ταξινομούνται από την περιοχή καταγωγής π.χ., ο καρκίνος του μαστού που έχει εξαπλωθεί στον πνεύμονα ονομάζεται μεταστατικός καρκίνος του μαστού. Οι μεταστάσεις συχνά έχουν μια χαρακτηριστική στρόγγυλη εμφάνιση στην ακτινογραφία θώρακος [21].

Οι ίδιοι οι πρωτοπαθείς καρκίνοι των πνευμόνων ευρέως προκαλούν μεταστάσεις στον εγκέφαλο, τα οστά, το συκώτι, και τα επινεφρίδια. Η ανοσοχρώση της βιοψίας είναι συχνά χρήσιμη για να προσδιοριστεί η αρχική πηγή [22].

1.3.4 Σημεία και συμπτώματα

Τα συμπτώματα και σημεία που μπορεί να υποδηλώνουν καρκίνο του πνεύμονα περιλαμβάνουν:

- βήχα
- απώλεια βάρους
- δύσπνοια (δυσκολία στην αναπνοή)
- πόνος στο στήθος
- αιμόπτυση (βήχας με αίμα)
- πόνος στα οστά
- πυρετός
- κούραση, κόπωση
- απόφραξη άνω κοίλης φλέβας
- δυσφαγία (δυσκολία στην κατάποση)
- συριγμό

Αν ο καρκίνος αναπτύσσεται στους αεραγωγούς, μπορεί να εμποδίσει τη ροή του αέρα, προκαλώντας αναπνευστικά προβλήματα. Η απόφραξη μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση των εκκρίσεων πίσω από την απόφραξη και να προδιαθέτει σε πνευμονία.

Ανάλογα με τον τύπο του όγκου, τα λεγόμενα παρανεοπλασματικά φαινόμενα μπορούν αρχικά να προσελκύσουν την προσοχή στην ασθένεια [23]. Στην

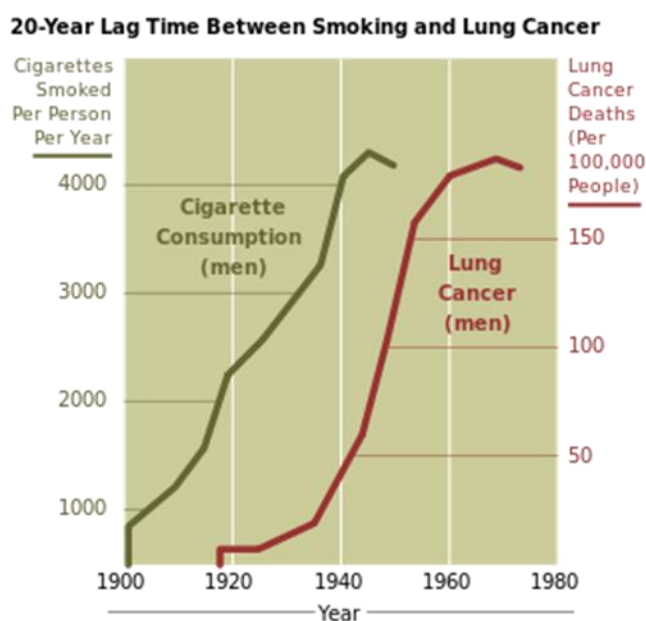
περίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα, αυτά τα φαινόμενα μπορεί να περιλαμβάνουν το σύνδρομο μυασθένειας Lambert-Eaton (μυϊκή αδυναμία λόγω αυτοαντισωμάτων), την υπερασβεστιαμία, ή το σύνδρομο ακατάλληλης αντιδιουρητικής ορμόνης (SIADH). Οι όγκοι στην κορυφή του πνεύμονα, γνωστοί ως όγκοι Pancoast, μπορούν να εισβάλλουν στο τοπικό τμήμα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, γεγονός που οδηγεί σε σύνδρομο Horner, καθώς και σε βλάβη στο βραχιόνιο πλέγμα.

Πολλά από τα συμπτώματα του καρκίνου του πνεύμονα (ανορεξία, απώλεια βάρους, πυρετός, κούραση) δεν είναι συγκεκριμένα. Σε πολλούς ασθενείς, ο καρκίνος έχει ήδη εξαπλωθεί πέρα από την αρχική θέση τη στιγμή που αυτοί εμφανίζουν συμπτώματα και ζητούν ιατρική βοήθεια. Κοινές θέσεις μετάστασης περιλαμβάνουν τον εγκέφαλο, τα οστά, τα επινεφρίδια, την ετερόπλευρη θέση (απέναντι) του πνεύμονα, το ήπαρ, το περικάρδιο και τους νεφρούς. Περίπου 10% των ατόμων με καρκίνο του πνεύμονα δεν έχουν συμπτώματα κατά τη διάγνωση. Αυτοί οι καρκίνοι βρίσκονται συμπτωματικά σε μια ακτινογραφία θώρακα ρουτίνας [17].

1.3.5 Αίτια

Ο καρκίνος αναπτύσσεται κατόπιν γενετικών βλαβών στο DNA είτε σωματικών είτε κληρονομήσιμων (ή και των δύο). Αυτή η γενετική βλάβη επηρεάζει τις κανονικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) και την επιδιόρθωση του DNA. Καθώς όλο και περισσότερες βλάβες συσσωρεύονται, ο κίνδυνος για καρκίνο αυξάνει.

1.3.5.1 Κάπνισμα



Εικόνα 1.10: ΝΙΗ γράφημα που δείχνει πώς μια γενική αύξηση των πωλήσεων των προϊόντων καπνού στις ΗΠΑ στις τέσσερις πρώτες δεκαετίες του 20ού αιώνα (τσιγάρα ανά άτομο ανά έτος) οδήγησε σε αντίστοιχη ραγδαία αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα 20 χρόνια μετά κατά τη διάρκεια του 1930, '40 και '50 (θάνατοι από καρκίνο του πνεύμονα ανά 100.000 ανδρικού πληθυσμού ανά έτος).

Το κάπνισμα, ιδιαίτερα των τσιγάρων, είναι μακράν ο κύριος συντελεστής του καρκίνου του πνεύμονα [24]. Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει πάνω από 60 γνωστές καρκινογόνες ουσίες [25], συμπεριλαμβανομένων των ραδιοϊσοτόπων από τη σειρά διάσπασης του ραδονίου, της νιτροζαμίνης και του βενζοπυρενίου. Επιπλέον, η νικοτίνη φαίνεται να καταστέλλει την ανοσολογική απάντηση στις κακοήθειες νεοπλασίες του εκτεθειμένου ιστού [26]. Στον ανεπτυγμένο κόσμο, το 90% των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα στους άνδρες κατά τη διάρκεια του έτους 2000 αποδόθηκε στο κάπνισμα (70% για τις γυναίκες). Το κάπνισμα ευθύνεται για το 80-90% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα.

Το παθητικό κάπνισμα -η εισπνοή καπνού από κάπνισμα κάποιου άλλου- είναι μια από τις αιτίες καρκίνου του πνεύμονα σε μη καπνιστές. Ως παθητικός καπνιστής μπορεί να χαρακτηριστεί κάποιος που ζει ή εργάζεται με έναν καπνιστή. Μελέτες από τις ΗΠΑ [15], την Ευρώπη [27], το Ηνωμένο Βασίλειο [28], και την Αυστραλία έδειξαν σταθερά ένα σημαντικό αυξημένο κίνδυνο μεταξύ εκείνων που εκτίθενται σε παθητικό κάπνισμα [29]. Εκείνοι που ζουν με κάποιον που καπνίζει παρουσιάζουν αύξηση του κινδύνου της τάξης του 20-30%, ενώ εκείνοι που εργάζονται σε περιβάλλον με παθητικό καπνό παρουσιάζουν αύξηση του κινδύνου της τάξης του 16-19%. Οι έρευνες για τον παράπλευρο καπνό δείχνουν ότι είναι πιο επικίνδυνος από τον άμεσο καπνό [30]. Το παθητικό κάπνισμα προκαλεί περίπου 3.400 θανάτους από καρκίνο του πνεύμονα κάθε χρόνο στις ΗΠΑ [15].

1.3.5.2 Ραδόνιο αέριο

Το ραδόνιο είναι ένα άχρωμο και άοσμο αέριο που παράγεται από τη διάσπαση του ραδιενεργού ραδονίου, το οποίο με τη σειρά του είναι προϊόν της διάσπασης του ουρανίου, που βρίσκεται στο φλοιό της γης. Τα προϊόντα αποσύνθεσης της ακτινοβολίας ιονίζουν γενετικό υλικό προκαλώντας μεταλλάξεις που μερικές φορές μετατρέπονται σε καρκινικές. Το ραδόνιο είναι η δεύτερη πιο συχνή αιτία του καρκίνου του πνεύμονα στις ΗΠΑ μετά το κάπνισμα [15]. Ο κίνδυνος αυξάνεται 8-16% για κάθε αύξηση 100 Bq/ m³στη συγκέντρωση του ραδονίου [22]. Τα επίπεδα του αερίου ραδονίου διαφέρουν ανάλογα με τον τόπο και τη σύνθεση του υποκείμενου εδάφους και των βράχων. Για παράδειγμα, σε περιοχές όπως η Κορνούαλη στο Ηνωμένο Βασίλειο (η οποία έχει ως υπέδαφος γρανίτη) το ραδόνιο αέριο είναι ένα σημαντικό πρόβλημα και τα κτίρια πρέπει να εξαερίζονται με ανεμιστήρες για να μειώσουν τις συγκεντρώσεις του ραδονίου. Η Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών εκτιμά ότι ένα στα 15

σπίτια στις ΗΠΑ έχει επίπεδα ραδονίου πάνω από τη συνιστώμενη κατευθυντήρια γραμμή των 4 pCi/L (148 Bq/m³).

1.3.5.3 Αμίαντος

Ο αμίαντος μπορεί να προκαλέσει διάφορες ασθένειες των πνευμόνων, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου των πνευμόνων. Το κάπνισμα και ο αμίαντος έχουν συνεργειακή επίδραση στον σχηματισμό του καρκίνου των πνευμόνων [16]. Ο αμίαντος μπορεί επίσης να προκαλέσει καρκίνο των πλευρών, αποκαλούμενος ως μεσοθηλίωμα (το οποίο είναι διαφορετικό από τον καρκίνο των πνευμόνων).

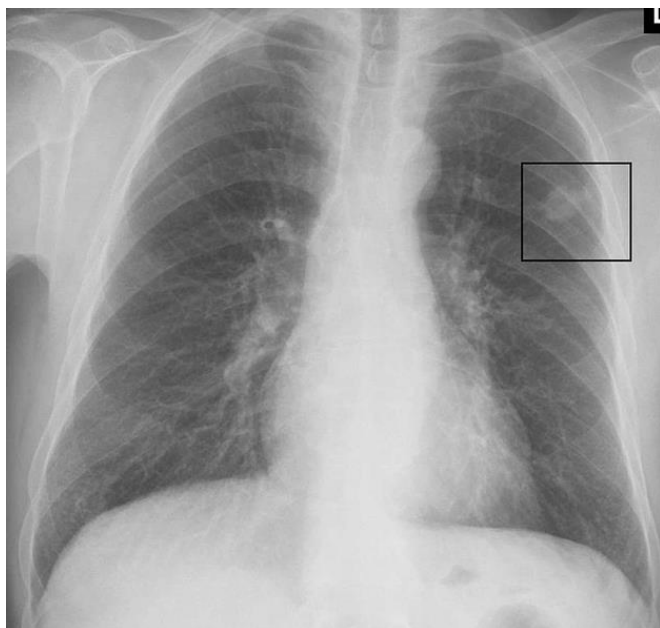
1.3.5.4 Ατμοσφαιρική ρύπανση

Η υπαίθρια ατμοσφαιρική ρύπανση έχει μικρή επίδραση στην αύξηση του κινδύνου για καρκίνο των πνευμόνων. Μικροσωματίδια και ψεκασμοί θείου, τα οποία μπορούν να εκλύονται από τα καυσαέρια των μέσων μεταφοράς, σχετίζονται με έναν ελαφρώς αυξημένο κίνδυνο [31]. Όσον αφορά το διοξείδιο του αζώτου, μια οριακή αύξηση κατά 10 μέρη στο δεσεκατομμύριο ppm αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο των πνευμόνων κατά 14% [32]. Το 1-2% των περιπτώσεων καρκίνου των πνευμόνων υπολογίζεται ότι οφείλονται στην υπαίθρια ατμοσφαιρική ρύπανση.

1.3.5.5 Γενετική

Μερικοί άνθρωποι έχουν γενετική προδιάθεση για καρκίνο των πνευμόνων. Σε συγγενείς ατόμων με καρκίνο των πνευμόνων, ο κίνδυνος αυξάνεται 2,4 φορές. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται σε γενετικούς πολυμορφισμούς και μεταλλάξεις.

1.3.6 Διάγνωση



Εικόνα 1.11: Ακτινογραφία θώρακος που απεικονίζει έναν καρκινικό όγκο στον αριστερό πνεύμονα.

Η εκτέλεση ακτινογραφίας θώρακος είναι ένα από τα πρώτα βήματα έρευνας, εάν ένας ασθενής δηλώσει συμπτώματα που μπορεί να υποδηλώνουν καρκίνο του πνεύμονα. Αυτό μπορεί να αποκαλύψει μια προφανή μάζα, τη διεύρυνση του μεσοθωρακίου (ενδεικτικό εξάπλωσης στους εκεί λεμφαδένες), ατελεκτασία (κατάρρευση), ενοποίηση (πνευμονία), ή υπεζωκοτική εκροή. Η CT απεικόνιση χρησιμοποιείται συνήθως για να παρέχει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον τύπο και την έκταση της ασθένειας. Βρογχοσκόπηση ή CT-καθοδηγούμενη βιοψία χρησιμοποιείται συχνά για δοκιμή του όγκου για ιστοπαθολογία [17].



Εικόνα 1.12: Αξονική τομογραφία που απεικονίζει έναν καρκινικό όγκο στον αριστερό πνεύμονα.

Ο καρκίνος του πνεύμονα εμφανίζεται συχνά ως μονήρης πνευμονικός όζος σε μια ακτινογραφία θώρακος. Ωστόσο, η διαφορική διάγνωση είναι ευρεία. Πολλές άλλες ασθένειες μπορούν επίσης να δώσουν αυτή την εμφάνιση, όπως η φυματίωση, λοιμώξεις από μύκητες, μεταστατικός καρκίνος, ή η πνευμονία. Λιγότερο συχνές αιτίες ενός μονήρους πνευμονικού όζου περιλαμβάνουν αμαρτώματα, βρογχογενείς κύστες, αδενώματα, αρτηριοφλεβική δυσπλασία, πνευμονική κατάσχεση, ρευματοειδή οζίδια, κοκκιωμάτωση Wegener, ή λέμφωμα. Ο καρκίνος του πνεύμονα μπορεί επίσης να είναι ένα τυχαίο εύρημα, ως μονήρης πνευμονικός όζος σε μια ακτινογραφία θώρακος ή αξονική τομογραφία που λαμβάνονται για άσχετο λόγο. Η οριστική διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα βασίζεται στην ιστολογική εξέταση του ύποπτου ιστού στο πλαίσιο των κλινικών και ακτινολογικών ευρημάτων.

1.3.7 Σταδιοποίηση

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα είναι η αξιολόγηση του βαθμού εξάπλωσης του καρκίνου από την αρχική του προέλευση. Είναι ένας από τους

παράγοντες που επηρεάζουν την πρόγνωση και πιθανή θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα.

Η αρχική εκτίμηση της σταδιοποίησης του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC) χρησιμοποιεί την ταξινόμηση TNM (Tumor Node Metastasis). Αυτή βασίζεται στο μέγεθος του πρωτογενούς όγκου, την λεμφαδενική διήθηση, και τις μακρινές μεταστάσεις. Μετά από αυτό, χρησιμοποιώντας τα αρχικά TNM, μια ομάδα που το στάδιο κυμαίνεται από τον καρκίνο στα κόπρανα, μέσα από τα στάδια 0, IA (ένα-A), IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB και IV (τέσσερα). Αυτή η ομάδα σταδιοποίησης βοηθά για την επιλογή της θεραπείας και για την εκτίμηση της πρόγνωσης [33]. Μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (SCLC) παραδοσιακά χαρακτηρίζεται ως «περιορισμένο στάδιο» (που περιορίζεται στο μισό του στήθους και στο πλαίσιο ενός ενιαίου ανεκτού τομέα ακτινοθεραπείας) ή «διευρυμένου σταδίου» (πιο διαδεδομένη ασθένεια). Ωστόσο, η ταξινόμηση και η ομαδοποίηση TNM είναι χρήσιμα στην εκτίμηση της πρόγνωσης.

Για τόσο το μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα των πνευμόνων όσο και το μικροκυτταρικό καρκίνωμα, οι δύο γενικοί τύποι της αξιολόγησης της σταδιοποίησης είναι η κλινική σταδιοποίηση και η χειρουργική σταδιοποίηση. Η κλινική σταδιοποίηση εκτελείται πριν από την επικείμενη χειρουργική επέμβαση. Βασίζεται στα αποτελέσματα των μελετών απεικόνισης (όπως η αξονική τομογραφία και η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων) και τα αποτελέσματα βιοψίας. Η χειρουργική σταδιοποίηση αξιολογείται είτε ενδο- είτε μετεγχειρητικά, και βασίζεται στα συνδυασμένα αποτελέσματα των χειρουργικών και κλινικών ευρημάτων, συμπεριλαμβανομένης της χειρουργικής δειγματοληψίας των θωρακικών λεμφαδένων.

1.3.8 Ο καρκίνος του πνεύμονα & Στατιστικά στοιχεία

Παγκοσμίως, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η πιο κοινή μορφή καρκίνου τόσο από άποψη συχνότητας όσο από άποψη θνησιμότητας. Το 2008, υπήρχαν 1,61 εκατομμύρια νέα κρούσματα, και 1,38 εκατομμύρια θάνατοι που οφείλονται στον καρκίνο του πνεύμονα. Τα υψηλότερα ποσοστά είναι σε Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική [18]. Το τμήμα του πληθυσμού που είναι πιθανότερο να αναπτύξει καρκίνο του πνεύμονα είναι οι άνθρωποι άνω των 50 ετών που έχουν ιστορικό καπνίσματος. Σε αντίθεση με το ποσοστό θνησιμότητας στους άνδρες, το οποίο άρχισε να μειώνεται πάνω από 20 χρόνια πριν, τα ποσοστά θνησιμότητας στις γυναίκες από καρκίνο των πνευμόνων έχουν αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες, και μόλις πρόσφατα άρχισαν να σταθεροποιούνται. Στις ΗΠΑ, ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα είναι 8% στους άνδρες και 6% στις γυναίκες [34].

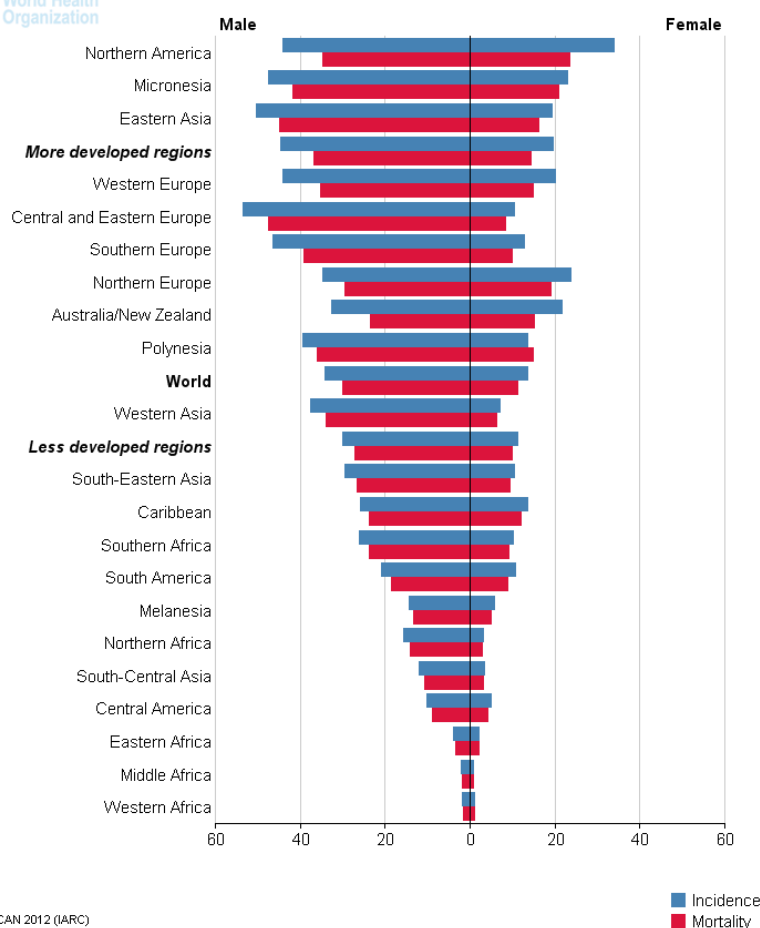
Η Ανατολική Ευρώπη έχει την υψηλότερη θνησιμότητα του καρκίνου των πνευμόνων μεταξύ των ανδρών, ενώ η βόρεια Ευρώπη και οι ΗΠΑ έχουν την υψηλότερη θνησιμότητα μεταξύ των γυναικών. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, οι μαύροι άνδρες και

γυναίκες έχουν την υψηλότερη συχνότητα. Η συχνότητα του καρκίνου του πνεύμονα είναι σήμερα μικρότερη στις αναπτυσσόμενες χώρες. Με την αύξηση του καπνίσματος στις αναπτυσσόμενες χώρες, η συχνότητα αναμένεται να αυξηθεί κατά τα επόμενα χρόνια, κυρίως στην Κίνα και την Ινδία.

Πιο αναλυτικά, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization) για το 2012, και για τα δύο φύλα ισχύει ότι:

- Το υψηλότερο ποσοστό των περιστατικών του καρκίνου του πνεύμονα κατέχει η Ουγγαρία, ακολουθούμενη από την Σερβία και τη Βόρεια Κορέα.
- Περίπου 58% των περιστατικών του καρκίνου του πνεύμονα εμφανίζεται σε λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες.
- Το υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα εμφανίζεται στην Βόρεια Αμερική και Ευρώπη, ενώ το χαμηλότερο στην Αφρική, στην Λατινική Αμερική και στην Καραϊβική.

International Agency for Research on Cancer



GLOBOCAN 2012 (IARC)

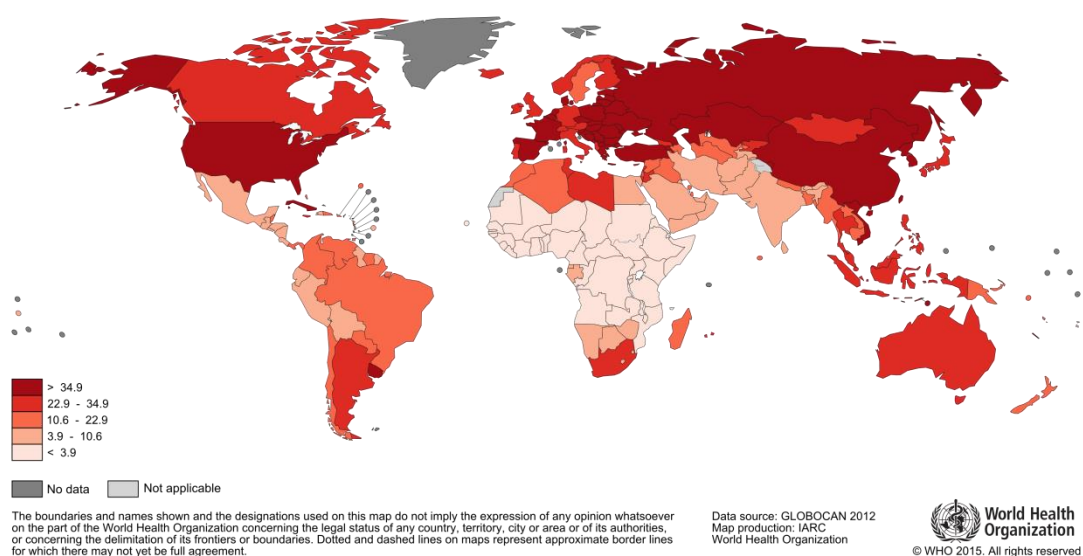
Εικόνα 1.13: Στατιστικά στοιχεία για τον καρκίνο του πνεύμονα.

Πηγή: www.aacr.org

Θεωρείται ο πιο κοινός καρκίνος στους άνδρες παγκοσμίως (1,2 εκατομμύρια, 16,7% των συνολικών περιστατικών καρκίνου) με τα υψηλότερα ποσοστά να εμφανίζονται

στην Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη (53,5 στα 100.000 περιστατικά) και Ανατολική Ασία (50,4 στα 100.000). Πολύ χαμηλά ποσοστά περιστατικών έχουν καταγραφεί στην Μέση και Δυτική Αφρική (2,0 και 1,7 στα 100.000, αντίστοιχα). Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας για το 2012, στους άνδρες ισχύει ότι:

- Το υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας από καρκίνο του πνεύμονα κατέχει η Ουγγαρία, ακολουθούμενη από την Αρμενία και την Π.Γ.Δ.Μ.
- Περίπου το 61% των περιστατικών του καρκίνου του πνεύμονα εμφανίζεται σε λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες.
- Το υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα κατέχει η Ευρώπη και Βόρεια Αμερική, ενώ το χαμηλότερο η Αφρική, η Λατινική Αμερική και η Καραϊβική.



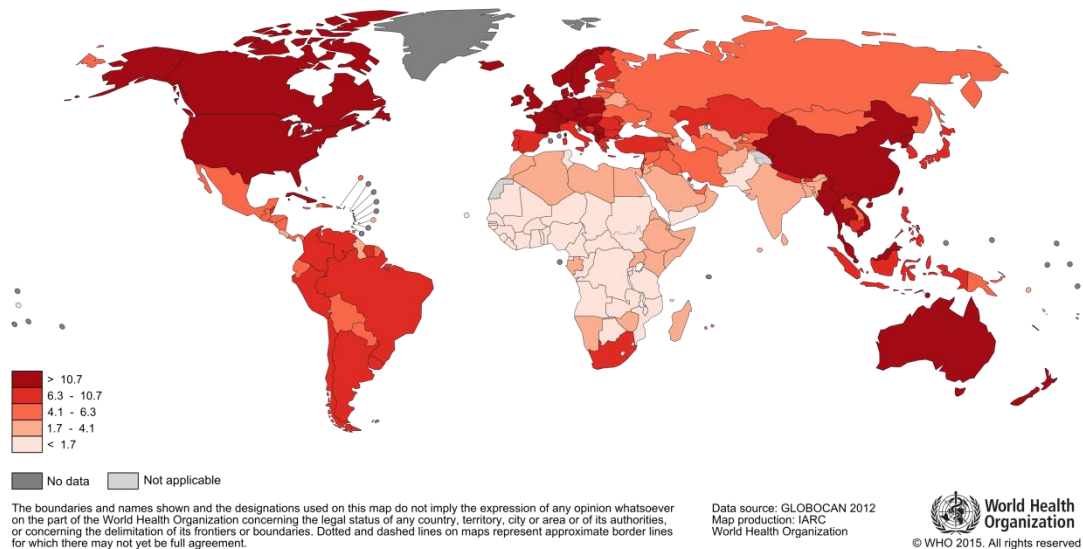
Εικόνα 1.14: Ποιοτικά στοιχεία για τον καρκίνο του πνεύμονα στους άνδρες ανά τον κόσμο.

Στις γυναίκες, τα ποσοστά επίπτωσης είναι γενικότερα χαμηλά και η γεωγραφική κατανομή διαφορετική, αντικατοπτρίζοντας την κατανάλωση καπνού. Τα υψηλότερα ποσοστά εμφανίζονται στη Βόρεια Αμερική και Βόρεια Ευρώπη, σε αντιδιαστολή με τα χαμηλά ποσοστά στην Κεντρική και Μέση Αφρική. Τα υψηλά ποσοστά καρκίνου του πνεύμονα σε γυναίκες στην Ανατολική Ασία χρήζουν ενδιαφέροντος, καθώς η κατανάλωση καπνού σε αυτούς τους πληθυσμούς είναι αρκετά σπάνια. Για έναν στους πέντε θανάτους από καρκίνο, ευθύνεται ο καρκίνος του πνεύμονα, με 1,59 εκατομμύρια θανάτους και ποσοστό 19,4% του συνόλου.

Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας για το 2012, στις γυναίκες ισχύει ότι:

- Η Δανία κατέχει το υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας του καρκίνου του πνεύμονα, ακολουθούμενη από τον Καναδά και τις Η.Π.Α.

- Περίπου 58% των περιστατικών του καρκίνου του πνεύμονα εμφανίζεται σε λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες.
- Το υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα κατέχει η Βόρεια Αμερική και Ωκεανία, ενώ το χαμηλότερο στην Αφρική, Λατινική Αμερική και Καραϊβική.



Εικόνα 1.15: Ποιοτικά στοιχεία για τον καρκίνο του πνεύμονα στις γυναίκες ανά τον κόσμο.

Σύμφωνα με το American Cancer Society, για το 2016, στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, υπολογίζονται:

- Περίπου 224.390 νέες περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα (117.920 στους άνδρες και 106.470 στις γυναίκες)
- Περίπου 158.080 θάνατοι από καρκίνο του πνεύμονα (85.920 στους άνδρες και 72.160 στις γυναίκες).

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την κύρια αιτία θανάτων από καρκίνο, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες; περίπου ένας στους τέσσερις θανάτους από καρκίνο προέρχονται από καρκίνο του πνεύμονα. Κάθε χρόνο, ο αριθμός των ανθρώπων που πεθαίνουν από καρκίνο του πνεύμονα είναι μεγαλύτερος από αυτών που πεθαίνουν από καρκίνους του παχέος εντέρου, μαστού και προστάτη μαζί, ενώ περίπου το 14% όλων των νέων καρκίνων είναι καρκίνοι του πνεύμονα.

Ο καρκίνος του πνεύμονα εμφανίζεται κυρίως σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Περίπου 2 στα 3 άτομα που διαγιγνώσκονται με καρκίνο του πνεύμονα είναι ηλικίας 65 ετών και άνω, ενώ λιγότερο του 2% είναι μικρότερα από 45 ετών. Η μέση ηλικία των ατόμων που διαγιγνώσκονται με καρκίνο του πνεύμονα είναι γύρω στα 70 έτη.

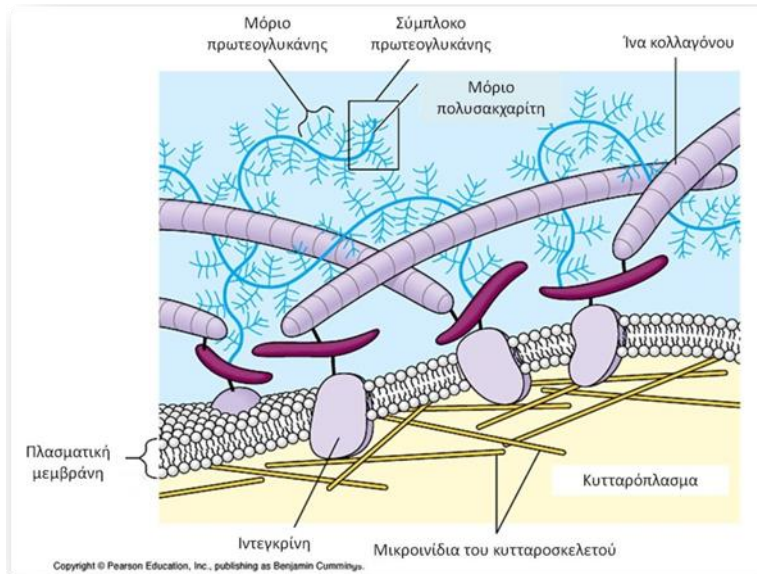
Γενικότερα, η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα είναι περίπου μια στις 14 για τους άνδρες, ενώ 1 στις 17 για τις γυναίκες. Για τους καπνίζοντες, ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος, ενώ για τους μη-καπνίζοντες αρκετά μικρότερος.

Παρά την σοβαρότητα της πρόγνωσης του καρκίνου του πνεύμονα, ορισμένα άτομα με πρώιμα στάδια καρκίνου του πνεύμονα έχουν θεραπευτεί. Περισσότερα από 430.000 ζώντα άτομα σήμερα έχουν διαγνωστεί με καρκίνο του πνεύμονα σε κάποιο στάδιο της ζωής τους.

1.4 Κολλαγόνο XI (α1)

1.4.1 Η εξωκυττάρια ουσία

Η εξωκυττάρια ουσία (ΕΚΟ) είναι ένα δίκτυο αποτελούμενο κυρίως από ινώδεις πρωτεΐνες, όπως το κολλαγόνο (*collagen*), η ελαστίνη (*elastin*), η φιβρονεκτίνη (*fibronectin*), η λαμινίνη (*laminin*), ενσωματωμένες σε ένα ελαστικό πήκτωμα από ανιονικά πολυμερή πρωτεογλυκάνης και το υαλουρονικό οξύ (*hyaluronic acid*), και αποτελεί συστατικό όλων των ιστών των θηλαστικών. Η ΕΚΟ επιτελεί πολλές λειτουργίες πέραν του δομικού της ρόλου. Ως σημαντικό συστατικό του κυτταρικού μικροπεριβάλλοντος, επηρεάζει διάφορες συμπεριφορές των κυττάρων όπως ο πολλαπλασιασμός, η προσκόλληση και η μετανάστευση και ρυθμίζει ακόμη την διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο. Η σύνθεση της ΕΚΟ είναι εξαιρετικά ετερογενής και δυναμική, συνεχώς αναδιαμορφώνεται και επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις μεταλλοπρωτεϊνάσες (*metalloproteinases - MMPs*) της ΕΚΟ και αυξητικούς παράγοντες που προσδένονται σε αυτήν και επηρεάζουν την σύνθεση, το cross-linking και την αποικοδόμηση των συστατικών της. Η αναδιαμόρφωση της ΕΚΟ εμπλέκεται στην ρύθμιση των διαδικασιών της κυτταρικής διαφοροποίησης, όπως η δημιουργία και η συντήρηση των θώκων των βλαστικών κυττάρων, η μορφογένεση των διακλαδώσεων, η αγγειογένεση, η αναδιαμόρφωση των οστών και η επούλωση των πληγών. Αν αλλάξει η δυναμική της ΕΚΟ, μπορεί να οδηγήσει σε απορύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της εισβολής, αποτυχία του κυτταρικού θανάτου και απώλεια της κυτταρικής διαφοροποίησης, με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν παθολογικές διαδικασίες όπως η ίνωση των ιστών και ο καρκίνος. Το κολλαγόνο είναι η πιο άφθονη ινώδης πρωτεΐνη της ΕΚΟ. Στην πραγματικότητα, αποτελεί έως και το 30 % των πρωτεϊνών συνολικά στους πολυκύτταρους οργανισμούς. Το κολλαγόνο παρέχει αντοχή στον εφελκυσμό και αλληλεπιδρά με τις ελαστικές ίνες, που αποτελούνται από ινίδια ελαστίνης και φιβριλλίνης (*fibrillin*), τα οποία παρέχουν στους ιστούς την ικανότητα να επανέρχονται μετά τη διάταση. Άλλες πρωτεΐνες της ΕΚΟ, όπως η φιβρονεκτίνη και η λαμινίνη συμμετέχουν ως σύνδεσμοι ή συνδετικές πρωτεΐνες [35–37].



Εικόνα 1.16: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της εξωκυττάριας ουσίας.

1.4.2 Γενικά χαρακτηριστικά κολλαγόνων

Οι πιο άφθονες πρωτεΐνες της ΕΚΟ είναι μέλη της οικογένειας των κολλαγόνων. Τα κολλαγόνα πιστεύονταν ότι είναι μία ομάδα πρωτεϊνών με χαρακτηριστική μοριακή δομή των οποίων οι ινώδεις δομές συμβάλλουν ως εξωκυττάρια ικριώματα (extracellular scaffolding). Έτσι, αποτελούν το μείζον δομικό στοιχείο όλων των συνδετικών ιστών και επίσης βρίσκονται στον ενδιάμεσο ιστό σχεδόν όλων των οργάνων του παρεγχύματος, συμβάλλοντας στην σταθερότητα ιστών και οργάνων και διατηρώντας την δομική τους ακεραιότητα. Ωστόσο, την τελευταία δεκαετία, η γνώση αυξήθηκε και η υπερικογένεια των κολλαγόνων επεκτάθηκε δραματικά (πίνακας 1.2). Όλα τα μέλη χαρακτηρίζονται από περιοχές (domains) με επαναλήψεις του πλούσιου σε προλίνη (Proline – Pro) τριπεπτιδίου Gly-X-Y οι οποίες εμπλέκονται στον σχηματισμό των τριμερών ελίκων κολλαγόνου. Οι λειτουργίες αυτής της ετερογενούς υπερικογένειας δεν περιορίζονται μόνο στο να παρέχουν δομική στήριξη στην ΕΚΟ, αλλά μια μεγάλη ποικιλία επιπρόσθετων λειτουργικών ρόλων που καθορίζονται από πρόσθετες πρωτεϊνικές περιοχές [38].

Πίνακας 1.2 Διάφοροι τύποι κολλαγόνων και οι οικογένειες στις οποίες αυτά ανήκουν [38].

<i>Τύπος</i>	<i>Μοριακή Σύνδεση</i>	<i>Γονίδια (χρωμοσωμικός εντοπισμός)</i>	<i>Ιστική Κατανομή</i>
<i>Ινώδη κολλαγόνα</i>			
I	[α1(I)] ₂ α2(I)	COL1A1 (17q21.31–q22) COL1A2 (7q22.1)	Οστά, χόριο, τένοντες, σύνδεσμοι, κερατοειδής χιτώνας
II	[α1(II)] ₃	COL2A1 (12q13.11 – q13.2)	Χόνδροι, υαλοειδές σώμα, πηκτοειδής πυρήνας
III	[α1(III)] ₃	COL3A1 (2q31)	Δέρμα, αγγειακά τοιχώματα, δικτυωτές ίνες στους περισσότερους ιστούς (πνεύμονες, ήπαρ, σπλήνα κ.λ.π.)
V	α1(V),α2(V),α3(V)	COL5A1 (9q34.2– q34.3) COL5A2 (2q31) COL5A3 (19p13.2) COL11A1 (1p21)	Πνεύμονες, κερατοειδής χιτώνας, οστά, εμβρυϊκές μεμβράνες - Μαζί με κολλαγόνο τύπου I
XI	α1(XI)α2(XI)α3(XI)	COL11A2 (6p21.3) COL11A3 = COL2A1	Χόνδροι, υαλοειδές σώμα
<i>Κολλαγόνα βασικής μεμβράνης</i>			
IV	[α1(IV)] ₂ α2(IV), α1–α6	COL4A1 (13q34) COL4A2 (13q34) COL4A3 (2q36– q37) COL4A4 (2q36– q37) COL4A5 (Xq22.3) COL4A6 (Xp22.3)	Βασικές μεμβράνες
<i>Μικροϊνώδη Κολλαγόνα</i>			
VI	α1(VI),α2(VI),α3(VI)	COL6A1 (21q22.3) COL6A2 (21q22.3) COL6A3 (2q37)	Εκτεταμένη: χόριο, χόνδροι, πλακούντας, πνεύμονες, αγγειακά τοιχώματα, μεσοσπονδύλιοι δίσκοι
<i>Ινίδια Αγκυροβόλησης</i>			
VII	[α1(VII)] ₃	COL7A1 (3p21.3)	Δέρμα, δερματικοί – επιδερμικοί σύνδεσμοι, στοματικοί βλενογόνοι,

τράχηλος μήτρας

Κολλαγόνα που σχηματίζουν δίκτυα

VIII	[α1(VIII)] ₂ α2(VIII)	COL8A1 (3q12– q13.1) COL8A2 (1p34.3– p32.3)	Ενδοθηλιακά κύτταρα, μεμβράνη του Descemet
X	[α3(X)] ₃	COL10A1 (6q21– q22.3)	Υπερτροφικοί χόνδροι

FACIT κολλαγόνα

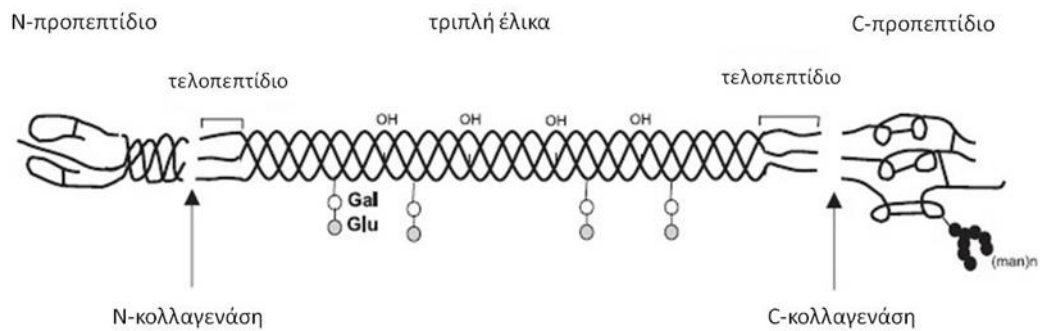
IX	α1(IX)α2(IX)α3(IX)	COL9A1 (6q13) COL9A2 (1p33– p32.2)	Χόνδροι, υαλοειδές υγρό, κερατοειδής χιτώνας
XII	[α1(XII)] ₃	COL12A1 (6q12– q13)	Περιχόνδριο, σύνδεσμοι, τένοντες
XIV	[α1(XIV)] ₃	COL9A1 (8q23)	Χόριο, τένοντες, αγγειακά τοιχώματα, πλακούντας, πνεύμονες, ήπαρ
XIX	[α1(XIX)] ₃	COL19A1 (6q12– q14)	Ανθρώπινο ραβδομυοσάρκωμα
XX	[α1(XX)] ₃	COL20A1 (20q13.33)	Επιθήλιο κερατοειδούς, εμβρυϊκό δέρμα, στερνικοί χόνδροι, τένοντες
XXI	[α1(XXI)] ₃	COL21A1 (6p12.3– 11.2)	Τοιχώματα αιμοφόρων αγγείων

Τύπος	Μοριακή Σύνθεση	Γονίδια (γονιδιωματικός εντοπισμός)	Ιστική Κατανομή
<i>Διαμεμβρανικά κολλαγόνα</i>			
XIII	[α1(XIII)] ₃	COL13A1 (10q22)	Επιδερμίδα, θύλακες τριχών, ενδομύιο, έντερο, χονδροκύτταρα, πνεύμονες, ήπαρ
XVII	[α1(XVII)]λλα ₃	COL17A1 (10q24.3)	Δερματικοί – επιδερμικοί σύνδεσμοι
<i>Άλλα κολλαγόνα</i>			
XV	[α1(XV)] ₃	COL15A1 (9q21– q22)	Ινοβλάστες, κύτταρα λείου μυός, νεφρά, πάγκρεας
XVI	[α1(XVI)] ₃	COL16A1 (1p34)	Ινοβλάστες, άμνιο, κερατινοκύτταρα
XVIII	[α1(XVIII)] ₃	COL18A1 (21q22.3)	Πνεύμονες, ήπαρ

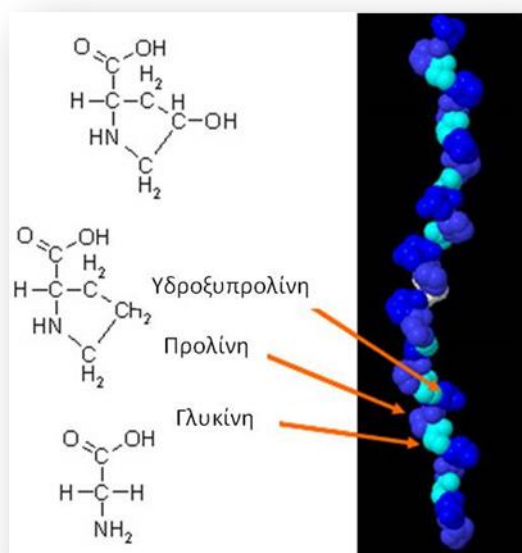
Μέχρι στιγμής, 26 γενετικά διαφορετικοί τύποι κολλαγόνου έχουν περιγραφεί οι οποίοι προέρχονται από τουλάχιστον 40 ανθρώπινα γονίδια [39–41].

Με βάση την δομή τους και την υπερμοριακή οργάνωση τους, τα κολλαγόνα μπορούν να ομαδοποιηθούν στα ινώδη κολλαγόνα (fibrillar ή fibril-forming collagens), στα κολλαγόνα που συνδέονται με ινίδια (fibril-associated collagens with interrupted triple helices - FACIT), στα κολλαγόνα που σχηματίζουν δίκτυα (network-forming collagens), στα ινίδια αγκυροβόλησης (anchoring fibrils), στα διαμεμβρανικά κολλαγόνα (transmembranous collagens), στα κολλαγόνα βασικής μεμβράνης (basement membrane collagens) και σε άλλα με μοναδικές λειτουργίες (πίνακας 1.2). Οι διαφορετικοί τύποι κολλαγόνου χαρακτηρίζονται από σημαντική πολυπλοκότητα και πολυμορφία στη δομή τους, στα μετάγραφα του ματίσματος τους, στην παρουσία πρόσθετων μη ελικοειδών περιοχών, στην συναρμολόγησή τους και στην λειτουργία τους. Η πιο άφθονη και διαδεδομένη οικογένεια κολλαγόνων, με περίπου 90 % του συνολικού κολλαγόνου, αντιπροσωπεύεται από τα ινώδη κολλαγόνα.

Παρά την αρκετά υψηλή δομική ποικιλομορφία μεταξύ των διαφόρων τύπων του κολλαγόνου, όλα τα μέλη της οικογένειας έχουν ένα κοινό χαρακτηριστικό: μια δεξιόστροφη τριπλή έλικα η οποία αποτελείται από τρεις α-αλυσίδες (εικόνα 1.17). Τα κολλαγόνα δύναται να αποτελούνται από τρεις πανομοιότυπες αλυσίδες (ομοτριμερή) όπως τα κολλαγόνα II, III, VII, VIII, X και από δύο ή περισσότερες διαφορετικές αλυσίδες (ετεροτριμερή), όπως οι τύποι I, IV, V, VI, IX, και XI. Κάθε μία από τις τρεις α-αλυσίδες εντός του μορίου σχηματίζει μια εκτεταμένη αριστερόστροφη έλικα με βήμα 18 αμινοξέα ανά στροφή. Οι τρεις α-αλυσίδες υπερελικώνονται μεταξύ τους δεξιόστροφα γύρω από έναν κεντρικό άξονα ώστε να σχηματίσουν την τριπλή έλικα. Η δομική προϋπόθεση για τη συναρμολόγησή τους στην τριπλή έλικα είναι ένα κατάλοιπο γλυκίνης (Glycine – Gly), το μικρότερο αμινοξύ, σε κάθε τρίτη θέση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων που προκύπτουν από την $(\text{Gly-X-Y})_n$ επαναλαμβανόμενη δομή η οποία χαρακτηρίζει τις χαρακτηριστικές για τα κολλαγόνα περιοχές (collagenous domains) όλων των κολλαγόνων. Οι α-αλυσίδες συναρμολογούνται γύρω από έναν κεντρικό άξονα με τέτοιο τρόπο όπου όλα τα κατάλοιπα γλυκίνης τοποθετούνται στο κέντρο της τριπλής έλικας, ενώ οι πιο ογκώδεις πλευρικές αλυσίδες των άλλων αμινοξέων καταλαμβάνουν τις εξωτερικές θέσεις. Αυτό επιτρέπει μια στενή συσκευασία (packaging) κατά μήκος του κεντρικού άξονα του μορίου. Οι θέσεις X και Y συχνά καταλαμβάνονται από κατάλοιπα προλίνης και 4-υδροξυπρολίνης (4 Hydroxyproline - 4Hyp), αντίστοιχα και σπανιότερα από λυσίνη (εικόνα 1.17). Ανάλογα με τον τύπο του κολλαγόνου, συγκεκριμένα κατάλοιπα προλίνης και λυσίνης τροποποιούνται με μεταμεταφραστική ενζυματική υδροξυλίωση. Η παρουσία της 4-υδροξυπρολίνης είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου και συμβάλλει στην σταθερότητα της διαμόρφωσης της τριπλής έλικας [38]. Στα ινώδη κολλαγόνα περίπου το 50 % των προλινών είναι 4-υδροξυλιωμένες.



Εικόνα 1.17: Μοριακή δομή των ινωδών κολλαγόνων με τις διάφορες υποπεριοχές καθώς και τις θέσεις διάσπασης για τις N-και C-κολλαγενάσες (παρουσιάζεται το μόριο του κολλαγόνου I [38]).



Εικόνα 1.18: Η τριπλή έλικα του κολλαγόνου και η δομή της.

Πηγή: <https://chempolymerproject.wikispaces.com/Collagen+-+B-+rgam>

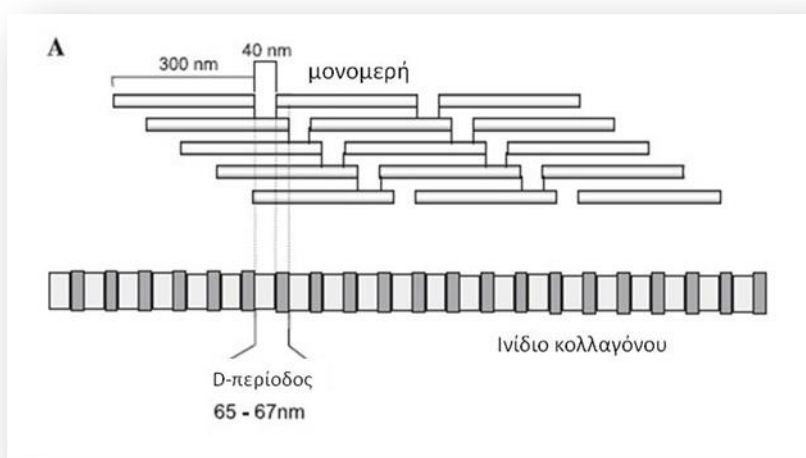
Το μήκος του τριπλού ελικοειδούς τμήματος ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων τύπων κολλαγόνου. Η ελικοειδής Gly-X-Y επανάληψη είναι το επικρατές μοτίβο των ινωδών κολλαγόνων (I, II, III), δημιουργώντας ελικοειδείς περιοχές μήκους 300 nm, οι οποίες αντιστοιχούν σε περίπου 1000 αμινοξέα. Σε άλλους τύπους κολλαγόνου, αυτές οι collagenous περιοχές είναι πολύ μικρότερες ή περιέχουν μη

ελικοειδείς περιοχές τριπλής έλικας. Τα κολλαγόνα VI ή X, για παράδειγμα περιέχουν τριπλές έλικες με περίπου 200 ή 460 αμινοξέα, αντίστοιχα. Αν και η τριπλή έλικα αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό όλων των κολλαγόνων και αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μέρος των ινωδών κολλαγόνων, οι μη χαρακτηριστικές για τα κολλαγόνα (non-collagenous) περιοχές που βρίσκονται κοντά στο κεντρικό ελικοειδές τμήμα είναι επίσης σημαντικά δομικά συστατικά (εικόνα 1.26). Έτσι, το C-προπεπτίδιο (C-propeptide - Cpp), ενίοτε καλείται NC1 περιοχή (NC1 domain), είναι υψηλά συντηρημένο και πιστεύεται ότι παίζει θεμελιώδη ρόλο στην έναρξη του σχηματισμού τριπλής έλικας, ενώ το N-προπεπτίδιο (N-propeptide - Npp) πιστεύεται ότι εμπλέκεται στην ρύθμιση των πρωτογενών ινιδίων. Το N-προπεπτίδιο έχει έναν μικρό συνδέτη (NC2 domain) που συνδέει την κύρια τριπλή έλικα με μία σύντομη ήσσονος σημασίας περιοχή, την περιοχή COL2 και μία μεταβλητή σφαιρική αμινοτελική περιοχή NC3 (NC3 domain). Τα κοντά μη ελικοειδή τελοπεπτίδια (telopeptides - tp) των επεξεργασμένων μονομερών κολλαγόνου εμπλέκονται στην ομοιοπολική διασταυρούμενη σύνδεση (cross-linking) των μορίων κολλαγόνου καθώς και στη σύνδεση με άλλες μοριακές δομές της ΕΚΟ. Τα FACIT κολλαγόνα χαρακτηρίζονται από πολλές non-collagenous περιοχές κατά μήκος της τριπλής έλικας, οι οποίες μπορούν να λειτουργούν ως περιοχές άρθρωσης. Σε άλλα κολλαγόνα, όπως τα κολλαγόνα IV, VI, VII, VIII και X, οι non-collagenous περιοχές εμπλέκονται στο σχηματισμό δικτύων και τη συσσωμάτωση. Σε αντίθεση με την εξαιρετικά συντηρημένη δομή της τριπλής έλικας, οι non-collagenous περιοχές χαρακτηρίζονται από δομική και λειτουργική ποικιλομορφία ανάμεσα στις διάφορες οικογένειες και τύπους των κολλαγόνων. Η διακοπή της τριπλής ελικοειδούς δομής μπορεί να προκαλέσει ενδομοριακή ευελιξία και να επιτρέψει ειδική πρωτεολυτική διάσπαση. Οι εγγενείς τριπλές έλικες χαρακτηρίζονται από αντοχή τους σε πρωτεάσες όπως πεψίνη, θρυψίνη ή χυμοθρυψίνη και μπορούν να αποικοδομούνται μόνο από διαφορετικούς τύπους ειδικών κολλαγενασών (collagenases) (ένζυμα αποικοδόμησης των κολλαγόνων) [38].

1.4.3 Τα ινώδη κολλαγόνα

Τα κλασικά ινώδη κολλαγόνα περιλαμβάνουν τους τύπους I, II, III, V και XI. Η μείζονα περιοχή της τριπλής έλικας (major triple helical domain ή Major Helix - MH) αποτελείται από περισσότερα από 1000 κατάλοιπα και έχει τέλεια επαναλαμβανόμενη Gly-X-Y δομή τριπλέτας. Όλα τα μη ινώδη κολλαγόνα έχουν τουλάχιστον μία ατέλεια ή διακοπή της τριπλής έλικας τους. Το αμινοτελικό άκρο ενός ινώδους κολλαγόνου, το N-προπεπτίδιο, συνήθως περιέχει τουλάχιστον μία μικρά περιοχή τριπλής έλικας, που χαρακτηρίζεται ως ελάσσονα έλικα (minor helix - mh) (εικόνα 1.19). Μόλις η μείζονα τριπλή έλικα σχηματιστεί, το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο υποβάλλονται σε επεξεργασία (απομακρύνονται). Τα επεξεργασμένα ινίδια ευθυγραμμίζονται σε κλιμακωτή (quarter-staggered) διευθέτηση με διάμετρο μεταξύ 25 και 400 nm στο αναπτυσσόμενο ινίδιο κολλαγόνου. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, τα ινίδια αυτά ξεχωρίζουν από το εναλλασσόμενο ανοιχτό και σκοτεινό μοτίβο (banding) τους με περιοδικότητα

περίπου 70 nm (η επονομαζόμενη D-περίοδος) το οποίο προκύπτει από την κλιμακωτή διάταξη των επιμέρους μονομερών κολλαγόνου (εικόνα 1.19) [42].



Εικόνα 1.19: Σχηματική αναπαράσταση της υπερμοριακής συναρμολόγησης των ινιδίων κολλαγόνου στην χαρακτηριστική κλιμακωτή (quarter-staggered) μορφή. Τα μονομερή έχουν μήκος 300 nm και τα κενά χωρίζουν τα διαδοχικά μονομερή προκαλώντας την χαρακτηριστική εμφάνιση του ινώδους κολλαγόνου στο υπερδομικό επίπεδο [38].

1.4.4 Βιοσύνθεση των κολλαγόνων

Η βιοσύνθεση των κολλαγόνων είναι μία διαδικασία πολλών σταδίων, που ξεκινάει από τη μεταγραφή των γονιδίων εντός του πυρήνα μέχρι τη συνάθροιση των ετεροτριμερών του κολλαγόνου σε μεγάλα ινίδια (εικόνα 1.20). Δεδομένου ότι οι περισσότερες από τις γνώσεις μας για αυτούς τους μηχανισμούς βασίζονται στα ινώδη κολλαγόνα, η περιγραφή που ακολουθεί επικεντρώνεται κυρίως σε ένα ινώδες κολλαγόνο. Είναι πιθανό ότι οι βασικοί μηχανισμοί του σχηματισμού και της επεξεργασίας της τριπλής έλικας θα ισχύουν επίσης και για άλλους τύπους κολλαγόνου.

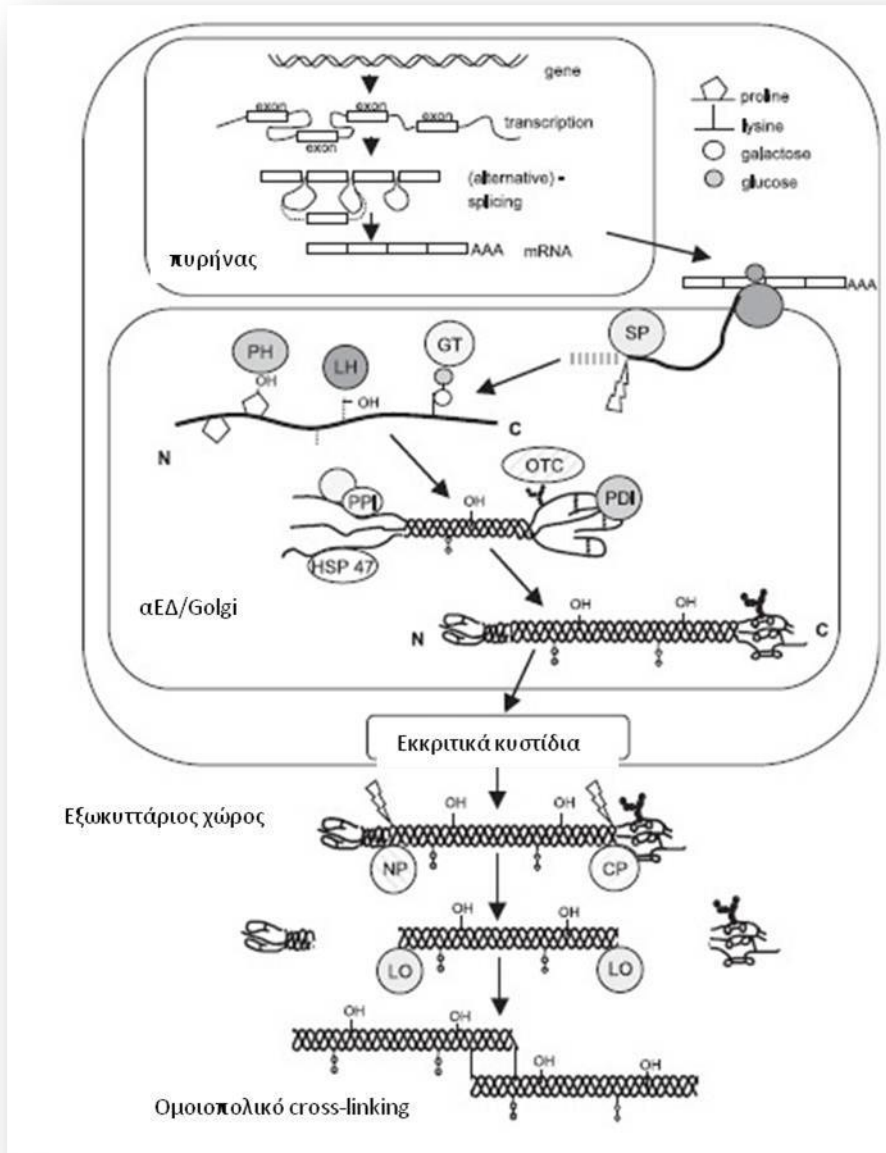
Η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων των κολλαγόνων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του κυττάρου που εκφράζεται κάθε κολλαγόνο, αλλά μπορεί επίσης να ελέγχεται από παράγοντες ανάπτυξης και κυτοκίνες. Τα περισσότερα γονίδια των κολλαγόνων έχουν ένα πολύπλοκο πρότυπο εξονίου-ιντρονίου, που κυμαίνεται από 3 έως 117 εξόνια, με τα mRNA των ιωδών κολλαγόνων να κωδικοποιούνται από περισσότερα από 50 εξόνια. Ως εκ τούτου, σε πολλές περιπτώσεις, μπορούν να ανιχνευθούν διαφορετικά είδη mRNA, τα οποία προκύπτουν είτε από πολλαπλές θέσεις έναρξης της μεταγραφής, είτε μέσω του εναλλακτικού ματίσματος των εξονίων ή συνδυασμού και των δύο. Εκτός από το μάτισμα, σε κάθε προ-mRNA προστίθενται καλύπτρα στο 5' άκρο και

πολυαδενυλιώνεται το 3' άκρο του. Έπειτα, το ώριμο mRNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα και μεταφράζεται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Συνδεδεμένο με τα ριβοσώματα, το mRNA μεταφράζεται σε μόρια προ-προκολλαγόνου τα οποία προεξέχουν μέσα στον αυλό του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου λόγω μιας περιοχής αναγνώρισης σήματος που περιέχουν και η οποία αναγνωρίζεται από αντίστοιχους υποδοχείς.

Μετά την απομάκρυνση του σηματοδοτικού πεπτιδίου, τα μόρια προκολλαγόνου υφίστανται πολλαπλά στάδια μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Η υδροξυλίωση των καταλοίπων προλίνης και λυσίνης καταλύονται από τις prolyl 3-hydroxylase, prolyl 4-hydroxylase και lysyl hydroxylase, αντίστοιχα. Η παρουσία της 4-υδροξυπρολίνης είναι απαραίτητη για την δημιουργία των ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου και επομένως συμβάλλει στην θερμική σταθερότητα της τριπλής έλικας και, ως εκ τούτου, στην ακεραιότητα του μονομερούς και των ινιδίων του κολλαγόνου. Η λειτουργία της 3-υδροξυπρολίνης δεν είναι γνωστή. Τα κατάλοιπα υδροξυλυσίνης είναι σε θέση να σχηματίζουν σταθερά διαμοριακά cross-linking των μορίων κολλαγόνου στα ινίδια και επιπλέον αντιπροσωπεύουν θέσεις για την προσάρτηση υδατανθράκων.

Τα C-προπεπτίδια έχουν βασική λειτουργία στη συναρμολόγηση των τριών α-αλυσίδων προς τριμερή μονομερή κολλαγόνου. Η σφαιρική δομή των C-προπεπτιδίων σταθεροποιείται μέσω ενδοαλυσιδικών δεσμών δισουλφιδίου και μία N-συνδεδεμένη ομάδα υδατάνθρακα προστίθεται από το oligosaccharyl transferase σύμπλοκο. Προτού ολοκληρωθεί ο σχηματισμός της τριπλής έλικας, πραγματοποιείται ευθυγράμμιση των καρβοξυτελικών περιοχών των τριών α-αλυσίδων και ξεκινάει ο σχηματισμός της τριπλής έλικας προχωρώντας προς το αμινοτελικό άκρο. Η αποτελεσματική διαμόρφωση και αναδίπλωση των αλυσίδων προκολλαγόνου εξαρτάται από την παρουσία περαιτέρω ενζύμων όπως η PPI (peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase) και κολλαγόνο-ειδικά chaperones όπως το HSP47 (εικόνα 1.20).

Μετά την επεξεργασία και συναρμολόγηση του προκολλαγόνου, τα μόρια της τριπλής έλικας πακετάρονται εντός του συμπλέγματος Golgi σε εκκριτικά κυστίδια και απελευθερώνονται στον εξωκυτταρικό χώρο. Μετά την έκκριση, τα τριμερή προκολλαγόνου επεξεργάζονται ανάλογα με τον τύπο του κάθε κολλαγόνου. Τα C-προπεπτίδια και N-προπεπτίδια αποσχίζονται με δύο ειδικές πρωτεάσες, τη N-πρωτεϊνάση του προκολλαγόνου και τη C-πρωτεϊνάση του προκολλαγόνου. Αμφότερες οι πρωτεΐνες ανήκουν στην οικογένεια των Zn²⁺-εξαρτώμενων μεταλλοπρωτεϊνών.



Εικόνα 1.20: Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης των ινωδών κολλαγόνων [38].

(SP: signal peptidase, GT: hydroxyllysyl galactosyltransferase και galactosylhydroxyllysyl glucosyltransferase, LH: lysyl hydroxylase, PH: prolyl hydroxylase, OTC: oligosaccharyl transferase complex, PDI: protein disulphide isomerase, PPI: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, NP: procollagen N-proteinase, CP: procollagen C-proteinase, LO: lysyl oxidase, HSP47: heat shock protein 47)

Η συναρμολόγηση ιών κολλαγόνου είναι μια σύνθετη διαδικασία και η τρέχουσα γνώση βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε in vitro πειράματα. Τα ιώδη κολλαγόνα I, II, III, V, XI συσσωματώνονται αυθόρμητα μετά την επεξεργασία των προκολλαγόνων σε διατεταγμένες δομές ιώδεις in vitro. Η ικανότητα για την «αυτο-συναρμολόγηση» φαίνεται ότι κωδικοποιείται στη δομή των κολλαγόνων. Οι υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των μονομερών του κολλαγόνου εμπλέκονται

στην quarter-staggered διευθέτηση των μονομερών κολλαγόνου, τα οποία συσσωματώνονται σε five-stranded ινίδια και στη συνέχεια σε μεγαλύτερες ίνες κολλαγόνου.

Τα ινίδια που σχηματίζονται προσανατολίζονται διαφορετικά στους διαφορετικούς τύπους ιστών. Στους τένοντες, τα ινίδια κολλαγόνο τύπου I ευθυγραμμίζονται παράλληλα μεταξύ τους και σχηματίζουν δεσμίδες ή ίνες, ενώ στο δέρμα ο προσανατολισμός είναι περισσότερο τυχαίος και μοιάζει με τους σχηματισμούς των κολλαγόνων που σχηματίζουν δίκτυα. Επιπλέον, ο σχηματισμός ινιδίων επηρεάζεται από τα προπεπτιδία των μορίων προκολλαγόνου. Η αποκοπή των C-προπεπτιδίων του κολλαγόνου I είναι ένα ουσιαστικό βήμα για τη ρύθμιση του σχηματισμού ινιδίων, αλλά και η λειτουργία των N-προπεπτιδίων σε αυτή τη διαδικασία δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή και μπορεί να διαφέρει μεταξύ των διαφόρων τύπων κολλαγόνου. Έχει προταθεί ότι ίσως να ρυθμίζουν τη διάμετρο των ινιδίων και η απομάκρυνσή τους από το προκολλαγόνο I φαίνεται να επηρεάζει την κανονική μορφολογία των ινιδίων. Η μοριακή διευθέτηση των ινιδίων σταθεροποιείται επιπρόσθετα με τον σχηματισμό ομοιοπολικών cross-links που συμβάλλουν τελικά στη μηχανική ανθεκτικότητα των ινιδίων κολλαγόνου. Η υδροξυλίωση των καταλοίπων λυσίνης στα τελοπεπτιδία είναι ζωτικής σημασίας για τον σχηματισμό των cross-links. Η υδροξυλίωση των καταλοίπων λυσίνης εντός των τελοπεπτιδίων καταλύεται από την εξαρτώμενη από χαλκό lysyl oxidase και όχι από την lysyl hydroxylase που είναι υπεύθυνη για τα κατάλοιπα της έλικας. Η έκταση της υδροξυλίωσης στο τελοπεπτιδία ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων ιστών. Πλήρη υδροξυλίωση των καταλοίπων λυσίνης παρατηρείται στο χόνδρο ενώ μη ανιχνεύσιμη υδροξυλίωση στο δέρμα. Τα ενδομοριακά cross-links είναι βασική προϋπόθεση για τις φυσικές και μηχανικές ιδιότητες των ινιδίων κολλαγόνου και τον σχηματισμό σταθερών δικτύων [43, 44].

1.4.5 Το κολλαγόνο XI

Το κολλαγόνο XI πρωτοαναφέρθηκε στην βιβλιογραφία το 1979 [45]. Το κολλαγόνο XI είναι ένα ελάσσων ινώδες κολλαγόνο το οποίο είναι υπεύθυνο για την σωστή διαμόρφωση των ινών κολλαγόνου, πιθανώς σχηματίζοντας έναν πυρήνα εντός των ινιδίων του κολλαγόνου II [46]. Η πρωτοταγής δομή του κολλαγόνου XI και του κολλαγόνου V είναι εξαιρετικά συντηρημένη τόσο σε επίπεδο γονιδίου όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης και με αποτέλεσμα να έχουν παρόμοιες βιολογικές λειτουργίες. Ειδικότερα, και τα δύο κολλαγόνα είναι ανθεκτικά στις πρωτεάσες και εκπληκτικά ευαίσθητα σε θρυψίνη. Παρά το γεγονός ότι έχουν και τα δύο, θέσεις κυτταρικής προσκόλλησης και θέσεις σύνδεσης της ηπαρίνης που θα μπορούσαν να είναι ζωτικής σημασίας σε διαδικασίες, όπως η ανάπτυξη και η επούλωση των τραυμάτων, αυτά τα δύο κολλαγόνα συνήθως “θάβονται” μέσα στα μείζονα ινίδια κολλαγόνου, όπως το κολλαγόνο II [47].

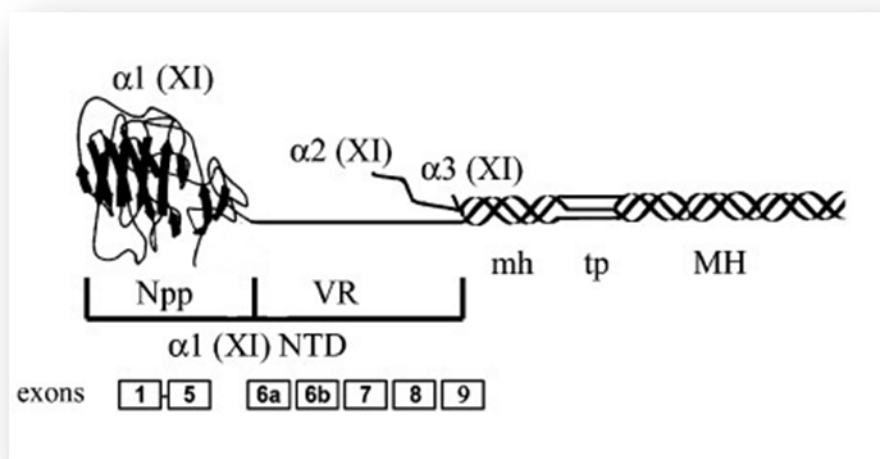
Το κολλαγόνο XI εκφράζεται κυρίως στον αρθρικό χόνδρο και στο υαλώδες υγρό του οφθαλμού. Ωστόσο, η έκφραση του είναι ανιχνεύσιμη σε πολλούς άλλους ανθρώπινους εμβρυϊκούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των οστών [48, 49]. Το

κολλαγόνο XI είναι ετεροτριμερές μόριο, το οποίο αποτελείται από μία άλφα-1 ($\alpha 1$), μία άλφα-2 ($\alpha 2$) και μία άλφα-3 ($\alpha 3$) πολυπεπτιδικές αλυσίδες με αδιάλειπτη συνεχή μείζονα τριπλή έλικα και non-collagenous περιοχές [50]. Η $\alpha 1(XI)$ αλυσίδα (*COL11A1*) και η $\alpha 2(XI)$ αλυσίδα (*Col11a2*) είναι διαφορετικά γονιδιακά προϊόντα, ενώ η $\alpha 3(XI)$ είναι μια υπεργλυκοζυλιωμένη μορφή της $\alpha 1$ αλυσίδας του κολλαγόνου II (*Col2a1*) η οποία αρχικά συντίθεται ως προκολλαγόνο και στη συνέχεια αφαιρούνται από αυτήν πρωτεολυτικά το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο. Ισχύει όμως η εξαίρεση, ότι όταν το κολλαγόνο τύπου XI εκφράζεται στο υαλοειδές σώμα του οφθαλμού, η αλυσίδα *Col2a1* αντικαθίστανται από μία $\alpha 1(V)$ αλυσίδα (*Col5a1*) [47].

Παρόμοια με όλα τα άλλα ινώδη κολλαγόνα, το κολλαγόνο XI αρχικά συντίθεται ως προκολλαγόνο το οποίο ακολούθως υφίστανται πρωτεολυτική επεξεργασία για την απομάκρυνση των N- και C- προπεπτιδίων του. Όμως, η πρωτεολυτική επεξεργασία του κολλαγόνου XI αποτελείται από δύο ξεχωριστά στάδια. Αρχικά, πραγματοποιείται η απομάκρυνση του C-προπεπτιδίου από την προ- $\alpha 1$ (XI) και προ- $\alpha 2$ (XI), παράγοντας μια ενδιάμεση μορφή αυτών των αλυσίδων. Ενώ, η απομάκρυνση του C-προπεπτιδίου από την προ- $\alpha 3$ (XI) αποδίδει την τελική μορφή της, η οποία δεν υποβάλλεται σε περαιτέρω πρωτεολυτική επεξεργασία. Στην συνέχεια, οι ενδιάμεσες αλυσίδες των $\alpha 1$ (XI) και $\alpha 2$ (XI) υφίστανται περαιτέρω επεξεργασία προς την τελική μορφή τους. Μετά από την απομάκρυνση του C-προπεπτιδίου τους και κατ' αναλογία με τα άλλα ινώδη κολλαγόνα, το δεύτερο στάδιο επεξεργασίας περιλαμβάνει την απομάκρυνση του N-προπεπτιδίου [51].

Δομικά, το N-προπεπτιδίο των ινωδών κολλαγόνων περιέχει μια μικρή συνδετική περιοχή που συνδέει το N-προπεπτιδίο με την μείζονα τριπλή έλικα (MH), μία ελάσσονα έλικα (mh) και στις περισσότερες από τις διαφορετικές αλυσίδες, μία αμινο-τελική σφαιρική περιοχή που ονομάζεται συχνά Col1. Οι $\alpha 1$ (XI) και $\alpha 2$ (XI) αλυσίδες περιέχουν ομόλογες non-collagenous αμινο-τελικές δομές που αποτελούνται από δύο ξεχωριστές περιοχές: το N-προπεπτιδίο (Npp) και μία μεταβλητή περιοχή (Variable region - Vr) (εικόνα 1.21 και 1.22). Μαζί, το N-προπεπτιδίο και η μεταβλητή περιοχή συνθέτουν την αμινο-τελική περιοχή (amino-terminal domain - NTD) των αλυσίδων. Η μεταβλητή περιοχή συνδέει το NTD με την ελάσσονα έλικα. Η $\alpha 3$ αλυσίδα του κολλαγόνου XI αποτελεί προϊόν του γονιδίου *COL2A1* και περιέχει μια αμινο-τελική περιοχή που είναι διαφορετική από τις $\alpha 1$ και $\alpha 2$ αλυσίδες. Αν και η NTD της $\alpha 1$ (XI) αλυσίδας βρίσκεται σε στενή σύνδεση με τις $\alpha 2$ (XI) και $\alpha 3$ (XI) αλυσίδες, αμέσως μετά την σύνθεση και έκκριση του τριπλού ελικοειδούς μορίου, το Npp της $\alpha 2$ (XI) αλυσίδας αφαιρείται ταχέως, ενώ η $\alpha 3$ (XI) είναι πολύ μικρή και δεν υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία. Αν και παρόμοια σε δομή με τα N-προπεπτιδία των $\alpha 2$ (XI), $\alpha 1$ (V), και $\alpha 3$ (V) αλυσίδων, η NTD της $\alpha 1$ (XI) συγκρατείται στην επιφάνεια των ινωδών κολλαγόνων με σχετικά μεγάλο χρόνο ημιζωής [103]. Έχει προταθεί, ότι η ρύθμιση του κολλαγόνου II πραγματοποιείται μέσω της NTD της $\alpha 1$ (XI) με παρεμποδίζουσα στερεοχημικά συναρμολόγηση του

κολλαγόνου II, όμως ο ακριβής μηχανισμός είναι ασαφής [46]. Η NTD έχει μία σφαιρική περιοχή που παρουσιάζει ομοιότητες με την θρομβοσπονδίνη 1 (thrombospondin 1) και τις περιοχές LNS (Laminin, Neurexin και Sex hormone binding domains) [52,53]. Τέλος, υπάρχουν δύο θέσεις πρόσδεσης θεικής ηπαράνης εντός της NTD, η μία είναι εντός του N-προπεπτιδίου και μία εντός της μεταβλητής περιοχής. Αυτές φαίνεται ότι παίζουν ρόλο στη λειτουργία του κολλαγόνου XI. Ο εντοπισμός του κολλαγόνου XI εντός της ΕΚΟ μπορεί να εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις με πρωτεογλυκάνες θεικής ηπαράνης [54].

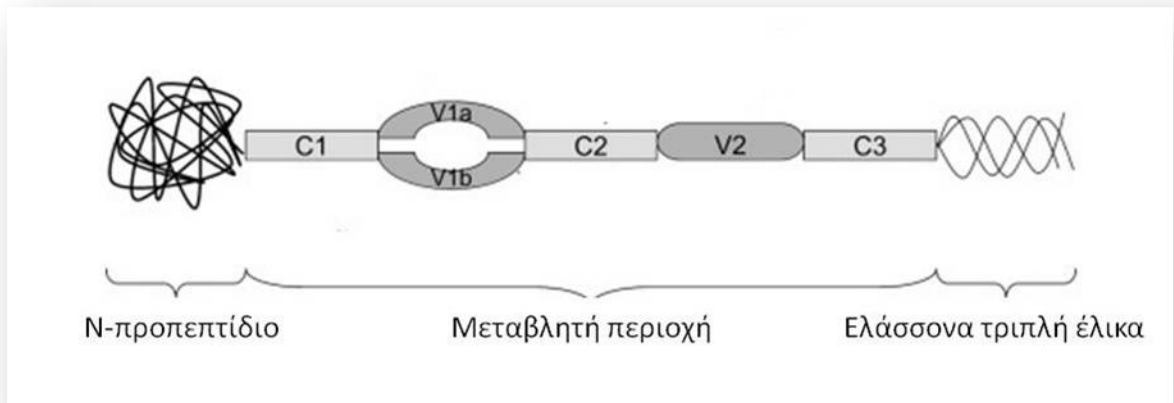


Εικόνα 1.21: Σχηματική αναπαράσταση των αλυσίδων του κολλαγόνου XI.

Η ($\alpha 1$) XI αλυσίδα αποτελείται από το N-προπεπτίδιο (Npp), μία μεταβλητή περιοχή (VR), μια ελάσσονα έλικα (mh), ένα τελοπεπτίδιο (tp) και μια μείζονα έλικα (MH). Η αμινο-τελική περιοχή (NTD) αποτελείται από το Npp και τη VR. Το Npp μεταγράφεται από τα εξόνια 1 έως 5 και η μεταβλητή περιοχή από τα εξόνια 6a, 6b, 7, 8, και 9 [54].

Οι προ- $\alpha 1$ (XI) και προ- $\alpha 2$ (XI) αλυσίδες του κολλαγόνου XI υφίστανται περιορισμένη επεξεργασία in vivo ενώ η μεταβλητή περιοχή τους υπόκεινται σε εναλλακτική επεξεργασία του mRNA. Συγκεκριμένα, το N-προπεπτίδιο της $\alpha 1$ (XI) αλυσίδας κωδικοποιείται από τα εξόνια 1 έως 5. Η μεταβλητή περιοχή εκτείνεται στα εξόνια 6a, 6b, 7, 8, και 9 και υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα στο επίπεδο του mRNA (splice variants), με αποτέλεσμα να κωδικοποιεί αρκετές διαφορετικές βιοχημικά ισομορφές (εικόνα 1.21). Το εναλλακτικό μάτισμα στην μεταβλητή περιοχή μπορεί δυνητικά να επηρεάσει την αλληλεπίδραση των ινωδών κολλαγόνων με άλλα μόρια της ΕΚΟ και πιο συγκεκριμένα με τις γλυκοζαμινογλυκάνες ή το υαλουρονικό οξύ. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην οργάνωση των ινωδών κολλαγόνων στην ΕΚΟ [55]. Από το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA μεταξύ των εξονίων 6a, 6b, 7, και 8, δυνητικά μπορούν να προκύψουν οκτώ διαφορετικές μορφές ματίσματος, που κωδικοποιούν τις

αντίστοιχες πρωτεϊνικές περιοχές p6a (V1a), p6b (V1b), p7 (C2), και p8 (V2) που φαίνονται στην εικόνα 1.22 [56, 57].

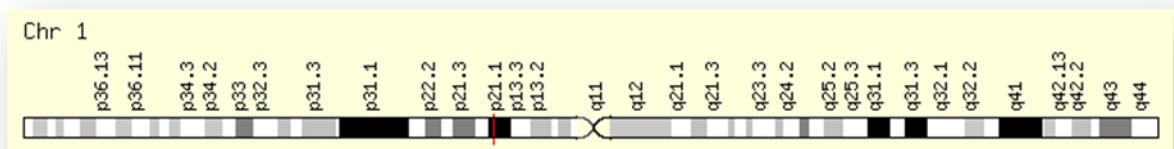


Εικόνα 1.22: Σχηματική απεικόνιση της αμινο-τελικής περιοχής (amino-terminal domain - NTD) της $\alpha 1$ (XI) αλυσίδας [57].

1.4.6 Το γονίδιο *COL11A1*

Η $\alpha 1$ (XI) αλυσίδα του κολλαγόνου τύπου XI (*COL11A1*) κωδικοποιείται από το γονίδιο *COL11A1* (Collagen, Type XI, Alpha 1 gene) επίσης γνωστό ως STL2, COLL6, CO11A1. Μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο έχουν συσχετιστεί με το σύνδρομο Stickler τύπου II [58] και το σύνδρομο Marshall [59]. Ένας μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP) του γονιδίου έχει συνδεθεί επίσης με ευαισθησία στην εμφάνιση κήλης μεσοσπονδύλιου δίσκου [60].

Το ανθρώπινο γονίδιο *COL11A1* εδράζεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 1 στη θέση 21.1 (1p21.1) (εικόνα 1.23) [61]. Το γονίδιο είναι αρκετά συντηρημένο σε άλλους οργανισμούς όπως για παράδειγμα στον χιμπατζή, στον σκύλο και στο ποντίκι.



Εικόνα 1.23: Η γενομική θέση του ανθρώπινου γονιδίου *COL11A1*.

Πηγή: <http://www.genecards.org>

Σήμερα, γνωρίζουμε ότι το γονίδιο *COL11A1* αποτελείται από 67 εξόνια και έχει μήκος 232.030 bp (232 kb). Τα εξόνια αριθμούνται από 1 έως 67 (Πηγή: Gene bank, accession number NG_008033.1).

Στις προηγούμενες μελέτες, η αρίθμηση των εξονίων ακολουθεί τον τρόπο αρίθμησης που προτάθηκε από τους Annunen et al. (1999). Σύμφωνα με τους Annunen et al. [62], τα εξόνια είναι αριθμημένα από 1 έως 67, με τους αριθμούς 6A και 6B (που ονομαζόταν παλαιότερα ΠΑ και ΠΒ) να χρησιμοποιούνται για τα «σημερινά» εξόνια 6 και 7, αντίστοιχα. Το εξόνιο 8 αντιστοιχεί στο «σημερινό» εξόνιο 9 [55]. Δηλαδή τα 67 «σημερινά» εξόνια αντιστοιχούν στα 66 εξόνια της παλαιάς αρίθμησης.

Στην μελέτη μας, χρησιμοποιείται η «σημερινή» αρίθμηση.

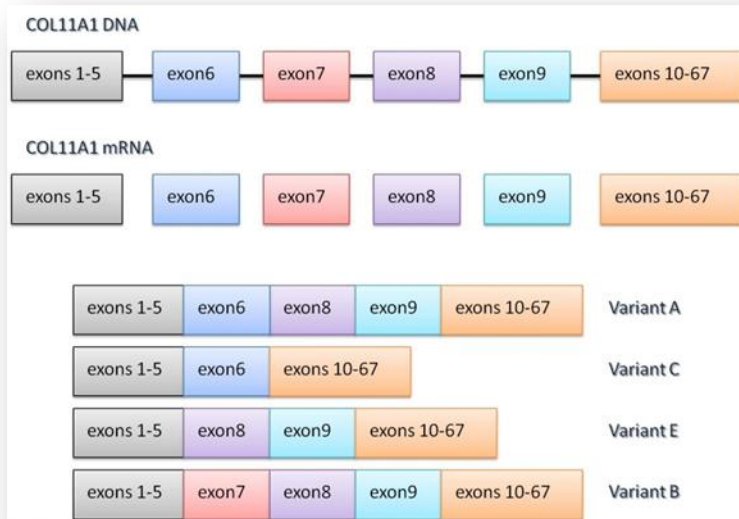
1.4.7 Οι ισομορφές του γονιδίου *COL11A1*

Κατά τη μεταγραφή του γονιδίου *COL11A1* μέσω του εναλλακτικού ματίσματος μπορούν να προκύψουν μέχρι 8 διαφορετικές ισομορφές, όμως περισσότερες πληροφορίες έχουμε για τις 4. Στον πίνακα 1.3 παρουσιάζονται η ονομασία και το accession numbers των 4 αυτών ισομορφών από τη γονιδιακή βάση GeneBank του National Center for Biotechnology Information - NCBI.

Πίνακας 1.3 *Accession numbers* των ισομορφών του γονιδίου *COL11A1*.

<i>Ονομασία αλληλουχίας</i>	<i>Accession number</i>
Ισομορφή A	NM_001854
Ισομορφή B	NM_080629
Ισομορφή C	NM_080630
Ισομορφή E	NM_001190709

Η ισομορφή A έχει μήκος 7.291 bp και αποτελείται τα εξόνια 1 έως 6 και 8 έως 67. Η ισομορφή B έχει μήκος 7.327 bp και περιλαμβάνει τα εξόνια 1 έως 5 και 7 έως 67. Η ισομορφή C έχει μήκος 6.960 bp και αποτελείται από τα εξόνια 1 έως 6 και 10 έως 67 ενώ η ισομορφή E έχει μήκος 7.191 bp και αποτελείται από τα εξόνια 1 έως 5 και 8 έως 67 (εικόνα 1.24).



Εικόνα 1.24: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των mRNA των ισομορφών A, B, C και E του γονιδίου COL11A1 [63].

Η μετάφραση της ισομορφής A παράγει πρωτεϊνική αλυσίδα μήκους 1.806 αμινοξέων (1.806 aa) και μάζας 181.065 Da (181 kDa). Όταν το mRNA της ισομορφής B μεταφράζεται, παράγεται πρωτεϊνική αλυσίδα μήκους 1.818 αμινοξέων (1.818 aa) και μάζας 182.422 Da (182 kDa) ενώ το mRNA της ισομορφής C παράγει πρωτεϊνική αλυσίδα 1.767 αμινοξέων (1.767 aa) και μάζας 176.619 Da (177 kDa), αντίστοιχα. Τέλος, η ισομορφή E παράγει πρωτεΐνη μήκους 1.690 αμινοξέων (1.690 aa) και μάζας 167.752 Da (168 kDa). (Πηγή: UniProtKB/Swiss-Prot)

1.5 Μοριακές μέθοδοι ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης- Real-time qPCR

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR) είναι μια απλή και ευέλικτη τεχνική κατά την οποία γίνεται εκλεκτικός πολλαπλασιασμός DNA αλληλουχιών *in vitro*, χρησιμοποιώντας ελάχιστη αρχική ποσότητα. Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία που μας ενδιαφέρει και πρόκειται να ενισχυθεί. Κατά την αντίδραση χρησιμοποιείται ένα κατάλληλο ζεύγος εκκινητών, τα οποία είναι συνθετικά μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια μήκους 20 με 30 bp με αλληλουχία συμπληρωματική το καθένα για μία από τις αλυσίδες του DNA. Οι εκκινητές αυτοί ουσιαστικά οριοθετούν την αλληλουχία που επιθυμούμε να κλωνοποιήσουμε εκλεκτικά και αποτελούν τα σημεία έναρξης της αντιγραφής. Παρουσία περίσσειας των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ιόντων Mg²⁺ και της κατάλληλης DNA πολυμεράσης επιτυγχάνεται η αντίδραση πολυμερισμού. Το ένζυμο που προτιμάται συνήθως για την PCR είναι η Taq DNA πολυμεράση, η οποία

απομονώνεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Η DNA πολυμεράση αυτή παρουσιάζει μέγιστη ενεργότητα πολυμερισμού στους 72 °C, ενώ είναι παραμένει ενεργή σε ακόμη υψηλότερες θερμοκρασίες (μέχρι 95 °C) για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η τεχνική της PCR βασίζεται στην κυκλική επανάληψη τριών βημάτων (εικόνα 1.25).

- Βήμα 1^ο: Αποδιάταξη εκμαγείου (template denaturation)

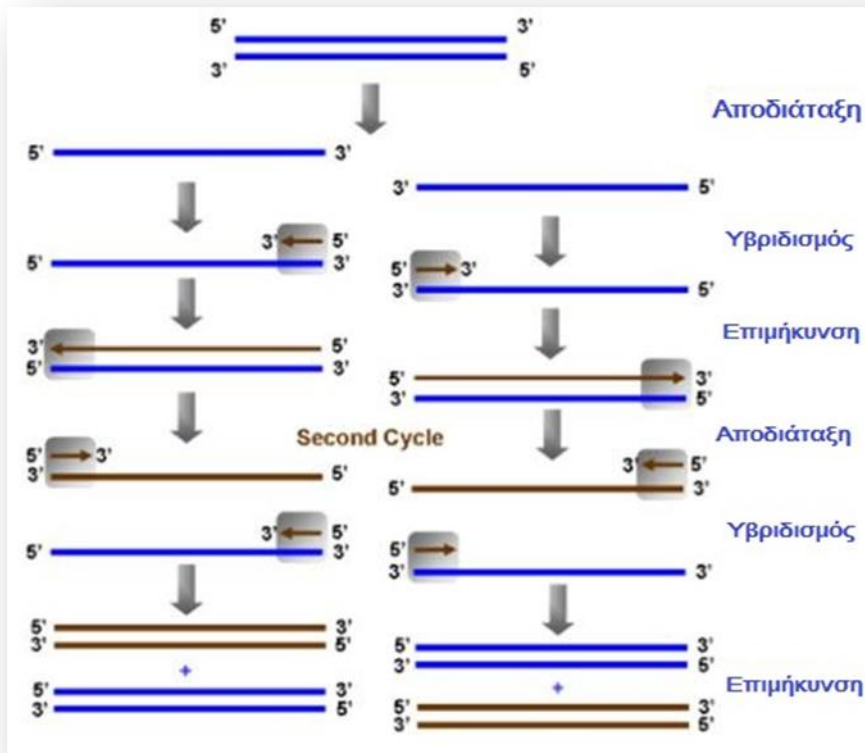
Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση της αντίδρασης στους 92 με 95 °C. Σε αυτήν τη θερμοκρασία, λύνονται οι δεσμοί υδρογόνου που κρατούν τις δύο αλυσίδες του μορίου και το δίκλωνο DNA μεταπίπτει σε μονόκλωνο DNA. Η πλήρης αποδιάταξη είναι πολύ σημαντική, ειδικά αν το εκμαγείο έχει υψηλό ποσοστό βάσεων GC (GC %) ή αν υπάρχουν δευτεροταγείς δομές.

- Βήμα 2^ο: Υβριδισμός εκκινητών (primer annealing)

Η θερμοκρασία της αντίδρασης μειώνεται ώστε να γίνει ο υβριδισμός των εκκινητών στο εκμαγείο, εκατέρωθεν της αλληλουχίας που θα πολλαπλασιαστεί. Η ειδικότητα του υβριδισμού στα σωστά σημεία εξαρτάται από την θερμοκρασία και τα χαρακτηριστικά των εκκινητών. Συνήθως, η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται είναι ~5 °C κάτω από το χαμηλότερο T_m των εκκινητών. Η θερμοκρασία αυτή καθορίζει την ειδικότητα της αντίδρασης.

- Βήμα 3^ο: Επιμήκυνση αλυσίδας (chain elongation)

Η Taq DNA πολυμεράση καταλύει τη σύνθεση του DNA με επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5'-3', χρησιμοποιώντας τα δεοξυριβονουκλεοτίδια που βρίσκονται στο διάλυμα και έχοντας ως καλούπι τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η θερμοκρασία αυτού του βήματος είναι συνήθως 72 °C, όπου π.χ. η Taq DNA πολυμεράση λειτουργεί βέλτιστα.



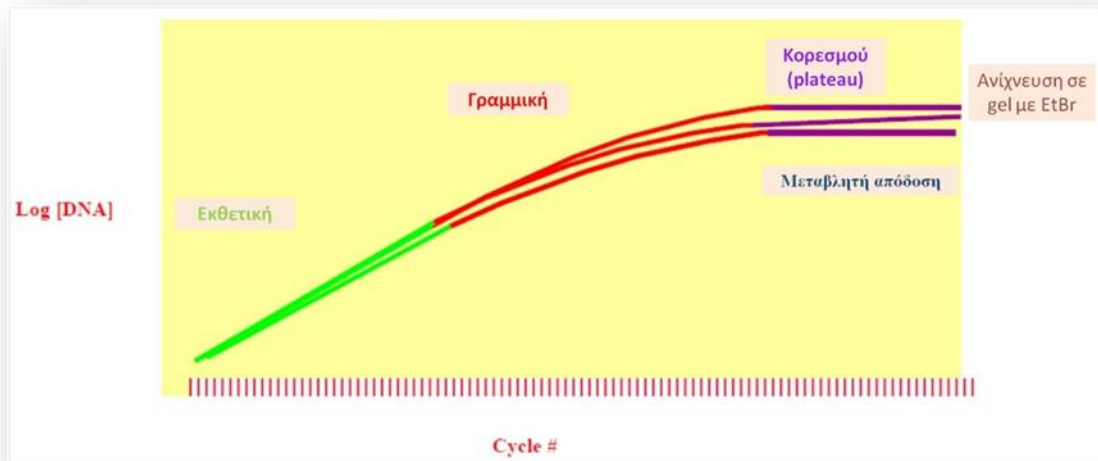
Εικόνα 1.25: Τα στάδια μιας PCR αντίδρασης.

Πηγή: http://molecularhub.blogspot.gr/2011_01_01_archive.html

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

Από κινητικής άποψης, μια βασική αντίδραση PCR μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις (εικόνα 1.26):

- Εκθετική φάση: Σε κάθε κύκλο συσσωρεύεται διπλασιασμένο προϊόν (υποθέτοντας 100 % απόδοση της αντίδρασης). Η αντίδραση είναι πολύ ειδική και ακριβής.
- Γραμμική φάση (υψηλή μεταβλητότητα): Τα συστατικά της αντίδρασης έχουν αρχίσει να καταναλώνονται, η αντίδραση επιβραδύνεται, και τα προϊόντα αρχίζουν να αποικοδομούνται.
- Φάση κορεσμού - Plateau (End-Point: ανίχνευση σε πηκτή για τις παραδοσιακές μεθόδους): Η αντίδραση έχει σταματήσει, δεν παράγονται άλλα προϊόντα και αν μείνει αρκετό διάστημα σε αυτή τη φάση, τα PCR προϊόντα θα αρχίσουν να αποικοδομούνται.



Εικόνα 1.26: Οι φάσεις μιας PCR αντίδρασης.

Πηγή: <http://www.lifetechnologies.com/gr/en/website-overview>

Στην εικόνα 1.26 παρουσιάζονται τρεις επαναλήψεις ενός δείγματος. Κάθε επανάληψη/δείγμα έχει την ίδια ποσότητα DNA. Καθώς η αντίδραση της PCR προχωρεί, τα δείγματα αρχίζουν να ενισχύονται με πολύ ακριβή τρόπο. Η ενίσχυση πραγματοποιείται εκθετικά, δηλαδή σε κάθε κύκλο συμβαίνει διπλασιασμός του προϊόντος – εκθετική φάση. Η εκθετική ενίσχυση πραγματοποιείται επειδή όλα τα αντιδραστήρια είναι φρέσκα και διαθέσιμα, η κινητική της αντίδρασης ωθεί την αντίδραση προς το διπλασιασμό των προϊόντων. Όμως, καθώς προχωρά η αντίδραση, μερικά από τα αντιδραστήρια καταναλώνονται ως αποτέλεσμα της ενίσχυσης. Η αντίδραση αρχίζει να επιβραδύνει και το PCR προϊόν δεν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Αυτή τη γραμμική ενίσχυση μπορεί να τη δει κανείς στη γραμμική φάση της αντίδρασης. Τα τρία δείγματα αρχίζουν να αποκλίνουν κατά τη διάρκεια της γραμμικής φάσης. Τελικά, η αντίδραση αρχίζει να επιβραδύνει και φτάνει σε κορεσμό (plateau). Κάθε δείγμα θα φτάσει σε κορεσμό σε διαφορετικό σημείο, λόγω της διαφορετικής κινητικής κάθε αντίδρασης. Αυτές τις διαφορές μπορεί να τις δει κανείς στη φάση κορεσμού. Η φάση κορεσμού είναι το σημείο όπου γίνεται συνήθως η μέτρηση/ανίχνευση της παραδοσιακής PCR, επίσης γνωστή ως ανίχνευση τελικού σημείου (end-point). Τα τρία πανομοιότυπα δείγματα φαίνεται ότι έχουν διαφορετικές ποσότητες DNA στη φάση κορεσμού. Όμως, δεδομένου ότι τα δείγματα είναι επαναλήψεις του ίδιου δείγματος πρέπει να έχουν ταυτόσημες ποσότητες. Ως εκ τούτου, είναι πιο ακριβείς οι μετρήσεις να γίνονται κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, όπου τα όμοια δείγματα ενισχύονται εκθετικά.

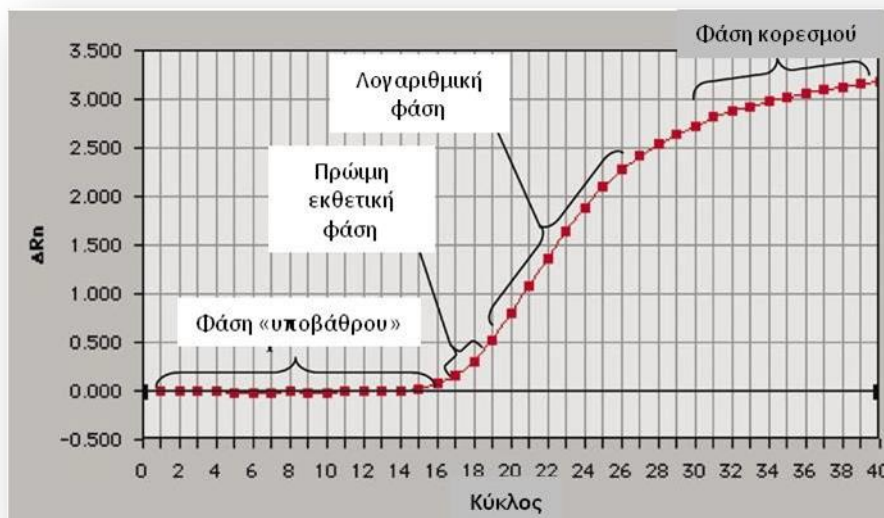
Η έλευση της Real-time qPCR έχει αλλάξει δραματικά το πεδίο της ανάλυσης (μέτρησης) της γονιδιακής έκφρασης. Η Real-time qPCR συλλέγει δεδομένα καθ' όλη τη διαδικασία της PCR, συνδυάζοντας έτσι ενίσχυση και ανίχνευση σε ένα μόνο βήμα. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας μια ποικιλία από διαφορετικές

φθορίζουσες χημείες (ουσίες) όπου η συγκέντρωση του PCR προϊόντος συσχετίζεται με την ένταση του φθορισμού. Οι αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από το σημείο στο χρόνο (ή τον PCR κύκλο), όπου η ενίσχυση του γονιδίου-στόχου ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά. Αυτή η τιμή συνήθως αναφέρεται ως κύκλος κατώφλι (Cycle Threshold - Ct), ο χρόνος δηλαδή κατά τον οποίο η ένταση φθορισμού είναι μεγαλύτερη από τον φθορισμό του υποβάθρου. Κατά συνέπεια, όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του DNA ή του RNA στόχου στο αρχικό υλικό (δείγμα), τόσο πιο γρήγορα μια σημαντική αύξηση στο σήμα φθορισμού θα εμφανιστεί, αποδίδοντας ένα χαμηλότερο Ct.

Υπάρχουν πολλά οφέλη από τη χρήση της Real-time qPCR έναντι άλλων μεθόδων για την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Η Real-time qPCR μπορεί να παράγει ποσοτικά δεδομένα με σύνθετες δυναμικό εύρος μεγέθους 7 έως 8 λογαριθμικών τάξεων και δεν απαιτεί κάποιο χειρισμό μετά την ενίσχυση. Οι δοκιμασίες της Real-time qPCR είναι 10.000 έως 100.000× φορές πιο ευαίσθητες από τις δοκιμασίες προστασίας RNάσης (RNase protection assays), 1000× φορές πιο ευαίσθητες από την υβριδοποίηση στυπώματος κηλίδας (dot blot hybridization) και μπορούν να ανιχνεύσουν ακόμη και ένα μόνο αντίγραφο ενός συγκεκριμένου μεταγραφήματος. Η Real-time qPCR μπορεί επίσης να διακρίνει mRNAs με σχεδόν ταυτόσημες αλληλουχίες, απαιτεί πολύ λιγότερο RNA δείγμα από άλλες μεθόδους ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης και μπορεί να είναι σχετικά υψηλής απόδοσης (high-throughput) με τον κατάλληλο εξοπλισμό. Το σημαντικότερο μειονέκτημα της Real-time qPCR είναι ότι απαιτεί ακριβό εξοπλισμό και αντιδραστήρια. Επιπλέον, λόγω της εξαιρετικά υψηλής ευαισθησίας της, ο σχεδιασμός του πειραματικού θορύβου και η εις βάθος κατανόηση των τεχνικών κανονικοποίησης είναι επιτακτικές ανάγκες για πιο αξιόπιστα και ακριβή συμπεράσματα [64].

Η Real-time qPCR μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις κύριες φάσεις (εικόνα 1.27): την φάση «υποβάθρου» ή φάση «θορύβου» (linear ground phase), την πρώιμη εκθετική φάση (early exponential phase), λογαριθμική φάση (loglinear phase) και τη φάση κορεσμού (plateau phase). Κατά τη διάρκεια της φάσης «υποβάθρου» (συνήθως οι πρώτοι 10 με 15 κύκλοι), η PCR μόλις έχει αρχίσει και η εκπομπή φθορισμού σε κάθε κύκλο δεν είναι μεγαλύτερη από το σήμα του υποβάθρου. Ο φθορισμός υποβάθρου υπολογίζεται αυτή τη στιγμή. Στην πρώιμη εκθετική φάση, η ποσότητα του φθορισμού έχει φθάσει σε ένα όριο, όπου είναι σημαντικά υψηλότερη (συνήθως 10× φορές η τυπική απόκλιση του φθορισμού υποβάθρου) σε σχέση με τα επίπεδα του υποβάθρου. Ο κύκλος κατά τον οποίο συμβαίνει αυτό είναι γνωστό ως κύκλος κατώφλι (Ct) ή σημείο τομής (Crossing point - Cp) ή quantification cycle (Cq) όπως έχει επικρατήσει να αποκαλείται (στις κατευθυντήριες οδηγίες MIQE). Αυτή η τιμή είναι αντιπροσωπευτική του αρχικού αριθμού των αντιγράφων DNA/RNA/cDNA στον αρχικό δείγμα και χρησιμοποιείται για να υπολογιστούν τα πειραματικά αποτελέσματα. Κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης, η PCR φτάνει στη βέλτιστη περίοδο ενίσχυσης με τον πλήρη διπλασιασμό των PCR προϊόντων μετά από κάθε κύκλο σε ιδανικές συνθήκες αντίδρασης. Τέλος, το στάδιο κορεσμού

επιτυγχάνεται όταν τα συστατικά της αντίδρασης μειωθούν και η ένταση του φθορισμού σε αυτή τη φάση δεν είναι πλέον χρήσιμη για τον υπολογισμό των δεδομένων [64].



Εικόνα 1.27: Οι φάσεις της Real-time qPCR [64].

Κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης η ενίσχυση του προϊόντος περιγράφεται από τη σχέση

$$N_n = N_0 \times (E)_n$$

όπου: N_n : η ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου μετά από n κύκλους,

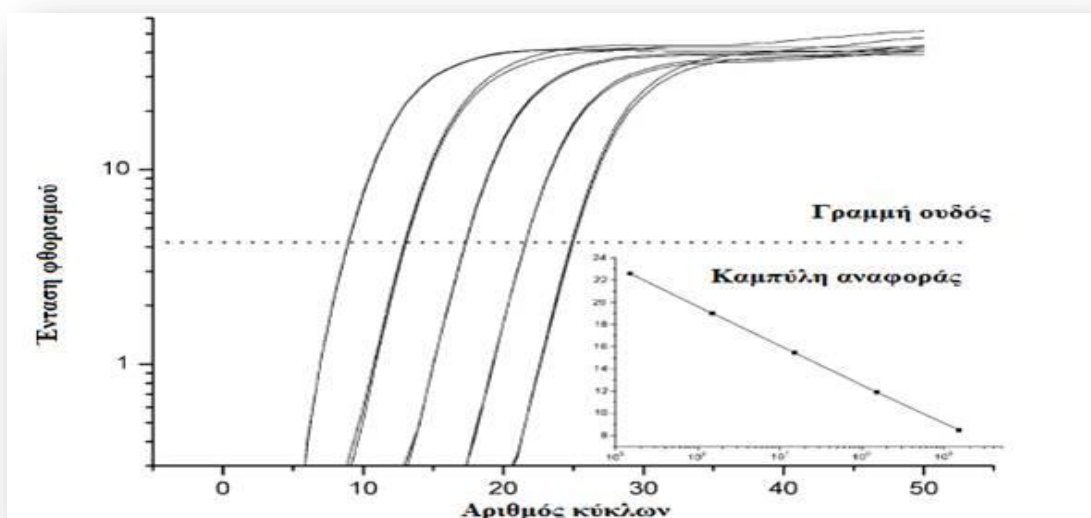
N_0 : η αρχική ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου,

n : ο αριθμός των κύκλων της PCR και

E : η απόδοση της ενίσχυσης.

Η μέγιστη δυνατή απόδοση μίας αντίδρασης PCR είναι 2, όπου κάθε προϊόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο ενώ η ελάχιστη είναι 1, όταν δεν υπάρχει ενίσχυση. Η Real-time qPCR βασίζεται στην καταγραφή του φθορισμού που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, ο οποίος αποτελεί το δείκτη παραγωγής αντιγράφων σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η ανίχνευση, επομένως όπως αναφέρθηκε, γίνεται στη λογαριθμική φάση. Με κατάλληλο λογισμικό υπολογίζεται το C_q με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων. Μικρότερα C_q υποδεικνύουν δείγματα με μεγαλύτερες αρχικές ποσότητες γενετικού υλικού. Εάν χρησιμοποιηθούν πρότυπα με γνωστές συγκεντρώσεις είναι δυνατόν να κατασκευαστεί πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης (*standard curve*) (εικόνα 1.37), η οποία εκφράζει τη σχέση της συγκέντρωσης (λογάριθμος της συγκέντρωσης - $\log C$) ως προς το C_q . Με βάση την κλίση (*slope*) της ευθείας, τον τύπο $E = 10^{-1/κλίση}$ μπορεί να γίνει υπολογισμός της απόδοσης E

(Efficiency) της αντίδρασης καθώς και ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων [64, 65].



Εικόνα 1.28: Real-time qPCR καμπύλη βαθμονόμησης [64].

1.5.1 Σχεδιασμός εκκινητών και ανιχνευτών

Οι εκκινητές για μια αντίδραση Real-time qPCR χρήσιμο είναι να σχεδιάζονται με βάση τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

A. Οι εκκινητές πρέπει να συνδέονται σε διαφορετικά εξόνια ή σε σημεία σύνδεσης εξονίων (exon junctions) για να μην προκύπτουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα, λόγω της ενίσχυσης γενωμικού DNA που μπορεί να υπάρχει στο δείγμα.

B. Η επιλογή των εκκινητών πρέπει γίνεται με βάση το επιθυμητό T_m , το επιθυμητό μικρό μέγεθος προϊόντος και τη περιεκτικότητα σε βάσεις GC. Το βέλτιστο μήκος για τους εκκινητές είναι περίπου 18 με 24 bp και η περιεκτικότητα τους σε βάσεις GC πρέπει να κυμαίνεται γύρω στο 50 %. Το T_m τους δεν θα πρέπει να διαφέρει περισσότερο από 1 με 2 °C, με ελάχιστο και μέγιστο T_m 58 °C και 60 °C αντίστοιχα, όταν χρησιμοποιούνται ανιχνευτές τύπου TaqMan ενώ για ανιχνευτές υβριδισμού και μοριακούς φάρους επιτρέπεται μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών με την προϋπόθεση ότι τα T_m του ζεύγους θα είναι παρόμοια.

C. Γενικά, τα άκρα πρέπει να μη σχηματίζουν δευτεροταγείς και παλίνδρομες δομές καθώς και να μην περιλαμβάνουν πολύ εκφυλισμένες αλληλουχίες. Η πιο

σημαντική περιοχή για ειδική ενίσχυση είναι το 3' άκρο του εκκινητή λόγω του ότι η σύνθεση του DNA γίνεται με κατεύθυνση 5'-3'.

D. Δεν πρέπει να σχηματίζονται διμερή εκκινητών, για αυτό και οι αλληλουχίες των δύο εκκινητών δε πρέπει να είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους, ιδιαίτερα στο 3' άκρο τους [66].

Κατά τον σχεδιασμό των ανιχνευτών χρήσιμο είναι:

A. Το T_m του ανιχνευτή να είναι σημαντικά υψηλότερο (~ 10 °C) από το T_m των εκκινητών, ώστε να εξασφαλιστεί ο υβριδισμός του πριν από τους εκκινητές γιατί οι εκκινητές επεκτείνονται αμέσως μόλις συνδεθούν στην αλληλουχία-στόχο.

B. Η απόσταση μεταξύ των δύο ανιχνευτών να κυμαίνεται 1 με 5 bp, δηλαδή θα πρέπει να βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους, ενώ είναι προτιμότερο η αλληλουχία-στόχος να βρίσκεται κοντά στο 3' άκρο του προϊόντος κοντά στην περιοχή που συνδέεται ο ανάστροφος εκκινητής. Καθώς, ο φθορισμός μετράται κατά το στάδιο του υβριδισμού, αυτή η διάταξη επιτρέπει την πραγματοποίηση της μέτρησης πριν την απομάκρυνση των ανιχνευτών από την DNA πολυμεράση.

C. Οι ανιχνευτές να είναι τροποποιημένοι έτσι ώστε να μην μπορούν να επιμηκυνθούν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR.

D. Οι ανιχνευτές να μην εμφανίζουν διαμοριακή ή ενδομοριακή συμπληρωματικότητα ούτε μεταξύ τους αλλά ούτε και με τους εκκινητές [66].

Πειραματικό Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Δείγμα μελέτης

Στο πρώτο στάδιο της μελέτης, διατέθηκαν 50 ιστοί ανευρυσμάτων ανιούσης αορτής. Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν από την Καρδιοχειρουργική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Αττικών, με υπεύθυνο τον κ. Ι. Τούμπουλη. Τα δείγματα αυτά αποθηκεύτηκαν για δύο μέρες στους 4 °C και στη συνέχεια στους -80 °C, μέχρι να πραγματοποιηθεί η εξαγωγή του ολικού RNA.

Στο δεύτερο στάδιο της μελέτης, που αφορούσε την μελέτη του *COL11A1* στον καρκίνο του πνεύμονα, διατέθηκαν 27 έτοιμα cDNA δείγματα, από το εργαστήριο Μοριακές Αναλύσεις Α.Ε (Αργίριο), με υπεύθυνο τον κ. Σ. Νικολόπουλο, τα οποία συλλέχθηκαν σε σταθεροποιητικό για RNA υγρό. Τα δείγματα αυτά αφορούσαν ασθενείς με γνωστά κλινικοπαθολογικά δεδομένα. 19 από τα δείγματα αυτά αφορούσαν καρκινικούς ιστούς και 8 ήταν από παρακείμενες του καρκίνου περιοχές, control. Τα cDNAs αποθηκεύτηκαν στους -40 °C, έτοιμα προς χρήση.

2.2 Μέθοδοι για την παρασκευή cDNA

2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA από τους ιστούς πραγματοποιήθηκε με τη χρήση προκατασκευασμένων αντιδραστηρίων (*kit*) απομόνωσης με εμπορικά διαθέσιμες στήλες καθώς αποτελεί μια απλή και ταχεία μέθοδο που παράγει προϊόν υψηλής καθαρότητας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το *NucleoSpin[®] RNA/Protein kit* (MACHERY-NAGEL, Γερμανία), το οποίο βασίζεται στην ειδική σύνθεση της μεμβράνης της στήλης που περιέχει οξείδιο του πυριτίου (*silica membrane*). Το οξείδιο του πυριτίου μπορεί να προσδέσει εκλεκτικά το RNA κατά αντιστρεπτό τρόπο ανάλογα με την ιονική σύνθεση του υδάτινου περιβάλλοντος.

Το *NucleoSpin[®] RNA/Protein kit* επιτρέπει την απομόνωση καθαρού RNA με αναλογία A_{260}/A_{280} που υπερβαίνει το 1,9. Το απομονωμένο RNA είναι έτοιμο προς χρήση για εφαρμογές όπως RT-PCR, κ.λπ. Το κλασικό πρωτόκολλο επιτρέπει τον καθαρισμό έως 70 μg ολικού RNA (>200 nt) ανά *NucleoSpin[®] RNA/Protein* στήλη από 30 mg ιστού [67].

2.2.1.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

- Υγρό άζωτο
- Ρυθμιστικό διάλυμα RP1 (MACHERY-NAGEL, Γερμανία)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (AppliChem, Γερμανία)

- *NucleoSpin*[®] φίλτρα (MACHERY-NAGEL, Γερμανία)
- *NucleoSpin*[®] RNA/Protein στήλες (MACHERY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα MDB (MACHERY-NAGEL, Γερμανία)
- Λυοφιλιωμένη rDNάση (MACHERY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης για rDNάση (MACHERY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα RA2 (MACHERY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα RA3 (MACHERY-NAGEL, Γερμανία)
- *RNase-free* H₂O (MACHERY-NAGEL, Γερμανία)
- Διάλυμα αιθανόλης 70 % από αιθανόλη 100 % (Scharlab, Ισπανία)
- Επωαστήρας σωληναρίων (Grant, Ηνωμένο Βασίλειο)
- Συσκευή *Vortex* (Fisher, ΗΠΑ)
- Μικροφυγόκεντρος *Minispin plus* (Eppendorf, Γερμανία)

Σωληνάρια τύπου *Eppendorf* 1,5 mL

2.2.1.2 Πειραματική πορεία

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

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

- Στη συνέχεια, προστίθενται 350 μL ρυθμιστικού διαλύματος αφαλάτωσης της μεμβράνης MDB και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στα $11.000\times g$ ώστε να στεγνώσει η μεμβράνη. Το διήθημα απορρίπτεται.
- *Πέψη και απομάκρυνση του DNA*
 - Αρχικά προετοιμάζεται το μείγμα αντίδρασης της rDNάσης. Αναμειγνύονται 10 μL ανασυσταθέν rDNάση με 90 μL ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης για την rDNάση και αναδεύονται καλά. Έπειτα, προστίθενται 95 μL μείγματος αντίδρασης rDNάσης απευθείας πάνω στο κέντρο της μεμβράνης πυριτίου της *NucleoSpin[®] RNA/Protein* στήλης. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
- *Έκπλυση και στέγνωμα της μεμβράνης πυριτίου*
 - 1^η έκπλυση: Προστίθενται 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης RA2 στην *NucleoSpin[®] RNA/Protein* στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 sec στα $11.000\times g$. Το διήθημα απορρίπτεται.
 - 2^η έκπλυση: Προστίθενται 600 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης RA3 στην *NucleoSpin[®] RNA/Protein* στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 sec στα $11.000\times g$. Το διήθημα απορρίπτεται.
 - 3^η έκπλυση: Προστίθενται 250 μL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης RA3 στην *NucleoSpin[®] RNA/Protein* στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 min στα $11.000\times g$ ώστε να στεγνώσει τελείως η μεμβράνη. Το διήθημα απορρίπτεται και η *NucleoSpin[®] RNA/Protein* στήλη τοποθετείται σε νέο *RNase-free* σωληνάριο τύπου *Eppendorf* 1,5 mL.
- *Έκλυση υψηλής καθαρότητας RNA*
 - Προστίθενται 60 μL *RNase-free* H_2O στην *NucleoSpin[®] RNA/Protein* στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στα $11.000\times g$. Το RNA εκλύεται με το υδάτινο διάλυμα μέσα στο νέο σωληνάριο. Το διήθημα επανατοποθετείται στην *NucleoSpin[®] RNA/Protein* στήλη και ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση για 2 min στα $11.000\times g$ προκειμένου να παραχθεί RNA υψηλής απόδοσης και συγκέντρωσης. Τελικά, το RNA εκλύεται με το υδάτινο διάλυμα μέσα στο σωληνάριο και φυλάσσεται είτε στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$ για σύντομο χρονικό διάστημα είτε στους $-80\text{ }^\circ\text{C}$ για μακρύ χρονικό διάστημα. Από το τελικό υδάτινο διάλυμα του RNA χρησιμοποιείται 1 μL για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του.

2.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού RNA

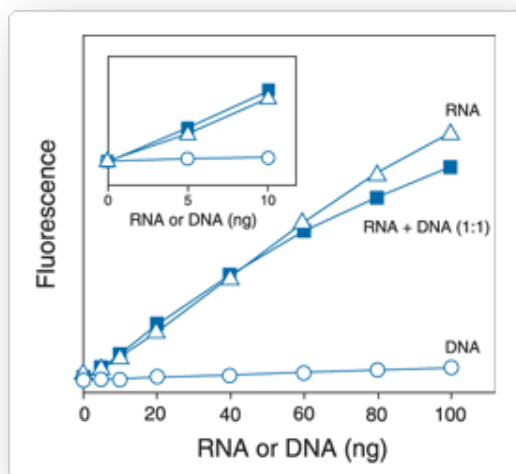
Η συγκέντρωση του RNA υπολογίζεται με μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στο φθορισμόμετρο *Qubit[®]* (Invitrogen, ΗΠΑ) (εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1: Το φθορισμόμετρο Qubit®.

Πηγή: <http://www.lifetechnologies.com/gr/en/home/brands/invitrogen.html>

Η ποσοτικοποίηση του RNA επιτυγχάνεται με την χρήση ουσίας που φθορίζει κατά την εκλεκτική πρόσδεση σε RNA και η οποία παρέχεται με το *Quant-iT™ RNA Assay Kit* (Invitrogen, ΗΠΑ). Η χρωστική αυτή εκπέμπει ακτινοβολία κατόπιν διέγερσης με κατάλληλο μήκος κύματος ανάλογα με το αν η χρωστική είναι ελεύθερη ή προσδεδεμένη σε μόρια RNA. Η μέτρηση πρότυπων διαλυμάτων – βαθμονομητών τα οποία παρέχονται με το *kit*, επιτρέπει τον αυτοματοποιημένο σχεδιασμό καμπύλης βαθμονόμησης με βάση την οποία γίνεται η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης. Η δοκιμασία είναι ιδιαίτερα εκλεκτική για το RNA έναντι του δίκλωνου DNA και στην περιοχή από 5 έως 100 ng, το σήμα φθορισμού είναι γραμμικά ανάλογο της συγκέντρωσης του RNA (εικόνα 2.2). Η πειραματική διαδικασία μπορεί να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου (22 με 28 °C) ενώ η φωτοσταθερότητα των αντιδραστηρίων είναι ιδιαίτερα υψηλή.



Εικόνα 2.2: Η RNA εκλεκτικότητα και ευαισθησία του *Quant-iT™ RNA Assay Kit*.

Πηγή: <http://www.lifetechnologies.com/gr/en/home/brands/invitrogen.html>

Πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής σε σχέση με τη μέτρηση της απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV ακτινοβολία) (όπως για παράδειγμα στο ευρέως

χρησιμοποιούμενο φωτόμετρο *NanoDrop*) αποτελεί η εκλεκτικότητα των μετρήσεων που επιτρέπει διάκριση μεταξύ DNA και RNA, όταν αυτά συνυπάρχουν, σε ένα δείγμα. Όμως, δεν είναι εφικτός ο έλεγχος της καθαρότητας του RNA στο προς μέτρηση δείγμα. Η ακρίβεια της μεθόδου στην ποσοτικοποίηση δειγμάτων με χαμηλές συγκεντρώσεις συνίσταται ακόμη και σε επίπεδα των 250 pg/μL.

2.2.2.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

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

2.2.2.2 Πειραματική πορεία

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

- Αρχικά, εξασφαλίζεται ότι όλα τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στη συνέχεια, αναμειγνύονται (199 × n) μL ρυθμιστικού διαλύματος *Quant-iT*TM με (1 × n) μL φθορίζοντος αντιδραστηρίου *Quant-iT*TM (όπου n = ο αριθμός των πρότυπων διαλυμάτων και των δειγμάτων) με καλή ανάδευση. Το διάλυμα εργασίας είναι έτοιμο.
- Από το διάλυμα εργασίας μοιράζονται 199 μL σε νέο σωληνάριο τύπου *Eppendorf* 0,5 mL για κάθε άγνωστο δείγμα και 190 μL σε νέο σωληνάριο τύπου *Eppendorf* 0,5 mL για καθένα από τα 2 πρότυπα διαλύματα.
- Για κάθε άγνωστο δείγμα προστίθεται 1 μL από το δείγμα σε κάθε σωληνάριο και αναγράφεται ο αριθμός/κωδικός του δείγματος. Για κάθε πρότυπο διάλυμα προστίθενται 10 μL από το καθένα στο αντίστοιχο σωληνάριο.
- Έπειτα, όλα τα σωληνάρια αναδεύονται καλά και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min.
- Ακολουθεί η δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης με διαδοχική τοποθέτηση και διάβασμα των πρότυπων διαλυμάτων στο φθορισμόμετρο *Qubit*[®] και στην συνέχεια τοποθετούνται και διαβάζονται διαδοχικά τα διαλύματα των άγνωστων δειγμάτων.
- Ο υπολογισμός της τελικής συγκέντρωσης του RNA στα άγνωστα δείγματα ολοκληρώνεται αφού συνυπολογιστεί στην τιμή που δίνει το φθορισμόμετρο *Qubit*[®] η αραιώση των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, η τελική τιμή της

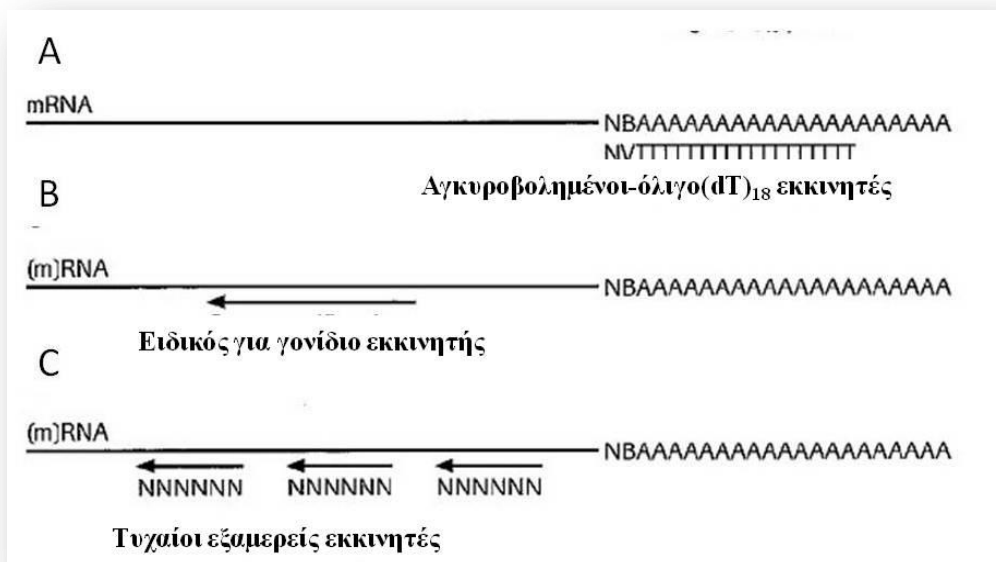
συγκέντρωσης του RNA δίνεται από τον τύπο: $C_{\text{δείγματος}} \text{ (ng/}\mu\text{L)} = \text{QF τιμή} \times (200/x)$

όπου QF είναι η τιμή της συγκέντρωσης που μετρά το φθορισμόμετρο *Qubit*[®] σε ng/μL και x είναι το μL του δείγματος RNA που χρησιμοποιήθηκαν. Άρα, για την παραπάνω πειραματική διαδικασία η τιμή της συγκέντρωσης που δίνεται από το φθορισμόμετρο *Qubit*[®] πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή αραίωσης = 200.

2.2.3 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

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

Το *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* παρέχει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια για τη σύνθεση του μονόκλωνου cDNA από RNA (αντίστροφη πολυμεράση, μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων). Γενικά, ανάλογα με τον τύπο της ανάλυσης όπου θα χρησιμοποιηθεί το cDNA στη συνέχεια, χρησιμοποιούνται τρία διαφορετικά συστήματα εκκινητών στην σύνθεση του cDNA (εικόνα 2.3). Στο *kit* περιλαμβάνονται οι τυχαίοι εξαμερείς εκκινητές (*random hexamer primers*) και οι αγκυροβολημένοι-όλιγο(dT)₁₈ εκκινητές (*anchored-oligo(dT)₁₈ primers*). Οι τελευταίοι είναι σχεδιασμένοι να προσδένονται στην αρχή της πολύ(A) ουράς του κάθε mRNA παράγοντας cDNA πλήρους ακολουθίας ενώ η χρήση των τυχαίων εξαμερών εκκινητών παρέχει τη δυνατότητα αντιπροσώπευσης όλων των τύπων RNA του κυττάρου στο νεοσυντιθέμενο cDNA. Ο τρίτος τρόπος χρησιμοποιείται στην RT-PCR ενός σταδίου. Στην πειραματική διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω προτιμήθηκε η χρήση των τυχαίων εξαμερών εκκινητών.



Εικόνα 2.3: Επισκόπηση των τριών διαφορετικών συστημάτων εκκινήτων κατά τη σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA.

Πηγή: www.roche-applied-science.com

2.2.3.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

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

2.2.3.2 Πειραματική πορεία

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

1^ο βήμα / αντίδραση

- Σε ένα *nuclease-free* PCR σωληνάριο τύπου *Eppendorf* 0,2 mL προετοιμάζεται το μείγμα εκμαγείου RNA-εκκινήτη για κάθε αντίδραση

(αντίδραση = δείγμα) τελικού όγκου 20 μL , προσθέτοντας τα αντιδραστήρια που αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1 Συστατικά μίγματος εκμαγείου RNA-εκκινητή κατά τη σύνθεση του cDNA.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Όγκος αντιδραστηρίου</i>	<i>Τελική συγκέντρωση αντιδραστηρίου</i>
RNA δείγματος (ή 2 μL RNA αναφοράς - 50 ng/ μL)	Μεταβλητός έως 11 μL	3 μg (100 ng)
Τυχαίοι εξαμερείς εκκινητές (600 pmol/ μL)	2 μL	60 μM
H ₂ O (PCR-grade)	Μεταβλητός μέχρι τελικού όγκου 13 μL	
Συνολικός όγκος	13 μL	

- Το μείγμα επωάζεται στους 65 °C για 10 min προκειμένου να αποδιαταχθεί το RNA και ακολουθεί άμεση τοποθέτησή του στον πάγο. Με τη διαδικασία αυτή, θέρμανσης και ψύξης, καταστρέφεται η δευτεροταγής δομή του RNA η οποία ενδέχεται να εμποδίζει την έναρξη της σύνθεσης του cDNA.

2^ο βήμα / αντίδραση

- Στην συνέχεια προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα της αντίδρασης σε τελικό όγκο 7 μL , το οποίο περιλαμβάνει τα αντιδραστήρια που αναφέρονται στον πίνακα 2.2 και προστίθεται στο αρχικό μείγμα.

Πίνακας 2.2 Συστατικά που περιέχονται στο δεύτερο μίγμα της σύνθεσης του cDNA.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Προστιθέμενος όγκος</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης <i>Transcriptor</i> 5 \times	4 μL	1 \times (8 mM MgCl ₂)
Αναστολέας RNασών (40 U/ μL)	0,5 μL	20 U
Μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (10 mM το καθένα)	2 μL	1 mM το καθένα
Αντίστροφη μεταγραφάση <i>Transcriptor</i> (20 U/ μL)	0,5 μL	10 U
Συνολικός όγκος	7 μL	

- Αφού αναδευτεί καλά τα δεύτερο μίγμα με πιπέτα, φυγοκεντρείται σύντομα και στη συνέχεια επωάζεται στους 25 °C για 10 min και στους 50 °C για 60 min ώστε να υβριδοποιηθούν οι τυχαίοι εκκινητές με το εκμαγείο RNA και να δράσει η αντίστροφη μεταγραφάση *Transcriptor*.
- Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής τερματίζεται με επώαση του δείγματος στους 85 °C για 5 min καθώς απενεργοποιείται η αντίστροφη μεταγραφάση και αποδιατάσσονται τα υβρίδια RNA/cDNA. Το cDNA φυλάσσεται στους -20 °C.

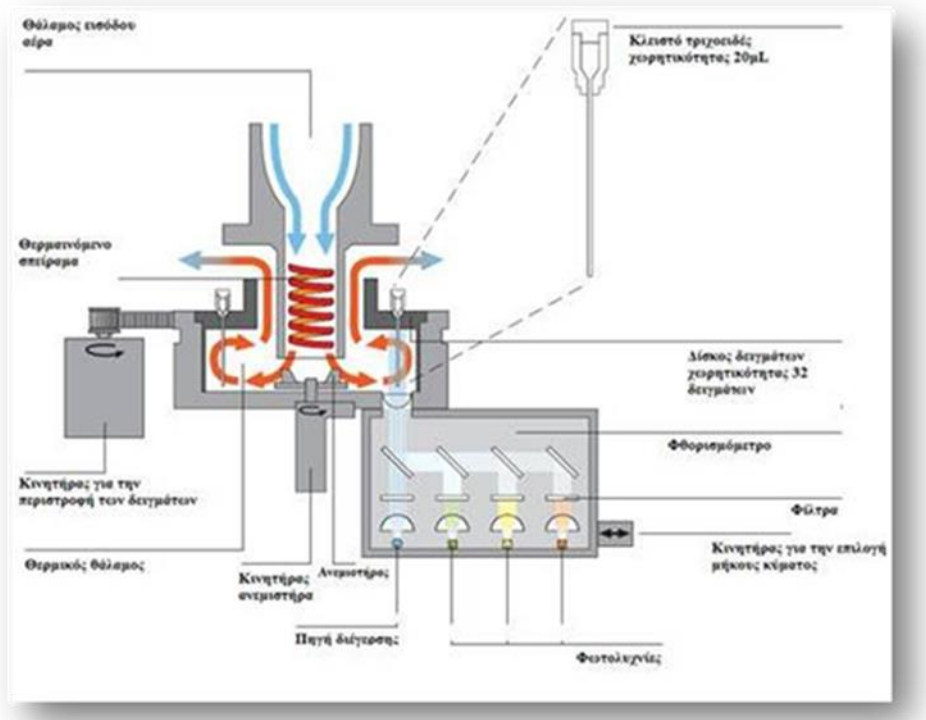
Κατά τη σύνθεση του cDNA από το RNA των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα ελέγχου. Το ένα δείγμα ελέγχου περιείχε το RNA αναφοράς, το ένα δείγμα ελέγχου δεν περιείχε καθόλου RNA και το τρίτο δείγμα ελέγχου δεν περιείχε αντίστροφη μεταγραφάση *Transcriptor*. Οι αντίστοιχοι όγκοι που έλειπαν συμπληρώθηκαν με επιπλέον H₂O στην κάθε αντίδραση.

Όλες οι επωάσεις που αναφέρονται στη παραπάνω πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή *Primus 25* (MWG-Biotech, Γερμανία). Η μονάδα αυτή μπορεί να υποβάλλει τα δείγματα σε κύκλους αλλαγής θερμοκρασίας μεταξύ των 4 έως 105 °C με ρυθμό αλλαγής της θερμοκρασίας 4 °C/sec και είναι εξοπλισμένη με θερμαινόμενο κάλυμμα που προλαμβάνει την εξάτμιση των δειγμάτων σε υψηλές θερμοκρασίες.

2.3 Αντιδράσεις Real-time qPCR στο LightCycler

Όλες οι αντιδράσεις Real-time qPCR και καμπύλες τήξης πραγματοποιήθηκαν στο θερμικό κυκλοποιητή LightCycler 1.5 (Roche, Γερμανία).

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε υάλινα τριχοειδή (capillaries) τα οποία τοποθετούνται σε ένα περιστρεφόμενο δίσκο χωρητικότητας 32 δειγμάτων. Σε αντίθεση με τους συμβατικούς θερμικούς κυκλοποιητές που επιτυγχάνουν τη θέρμανση και ψύξη των δειγμάτων με θερμικά blocks ή με αξιοποίηση του θερμοηλεκτρικού φαινομένου Peltier, στο LightCycler 1.5 οι θερμοκρασιακές αλλαγές επέρχονται με μεγάλη ταχύτητα μέσω ροής αέρα διαμέσου των εξαιρετικά λεπτών υάλινων τριχοειδών. Ο αέρας θερμαίνεται από ένα θερμικό σπείραμα με $\pm 0,3$ °C ακρίβεια στην επιτυγχανόμενη θερμοκρασία, ενώ ένας ανεμιστήρας ανακατανέμει τη ροή του αέρα εντός του θερμικού θαλάμου, ώστε να εξασφαλίζονται ταυτόσημες συνθήκες για όλα τα τριχοειδή του περιστρεφόμενου δίσκου (εικόνα 2.9). Τα τριχοειδή, με χωρητικότητα 20 μ L, διαθέτουν υψηλό λόγο επιφάνειας προς όγκο, επιτρέποντας γρήγορη εξισορρόπηση της θερμοκρασίας μεταξύ αέρα και δείγματος. Έτσι, επιτυγχάνονται γρήγοροι ρυθμοί μεταβολής της θερμοκρασίας που φτάνουν μέχρι και τους 20 °C ανά δευτερόλεπτο και επιτρέπουν την τέλεση μιας PCR αντίδρασης 30 έως 40 κύκλων σε χρονικό διάστημα 20 με 30 λεπτών.



Εικόνα 2.4: Σχηματική παράσταση της οργανολογίας του LightCycler 1.5.

Η οπτική μονάδα του LightCycler 1.5 ανιχνεύει το φθορισμό ανά προγραμματισμένα χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR και κατά συνεχή τρόπο κατά την melting curve analysis. Οι οπτικές ιδιότητες των τριχοειδών τα καθιστούν κατάλληλα για χρήση σαν κυψελίδες για τις φθορισμομετρικές μετρήσεις. Η οπτική μονάδα διαθέτει τρία κανάλια ανίχνευσης που μετρούν το εκπεμπόμενο φως σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος (530 nm, 640 nm και 710 nm) καθώς και μία δίοδο εκπομπής φωτός που δρα ως πηγή διέγερσης. Έτσι, οι κυριότερες φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την επισήμανση των ανιχνευτών DNA στο όργανο LightCycler 1.5 είναι η φλουορεσκεΐνη, η LightCycler-Red 640 (LC-Red 640) και η LightCycler-Red 705 (LC-Red 705) (εικόνα 2.5).

	Κανάλι διέγερσης	Κανάλι εκπομπής		
Φθορίζων μόριο	470 ± 20 nm	1 530 ± 20 nm	2 640 ± 20 nm	3 710 ± 20 nm
Fluorescein	493 nm	525 nm		
SYBR Green I	497 nm	521 nm		
LC-Red 640*	-		640 nm	
LC-Red 705**	-			705 nm

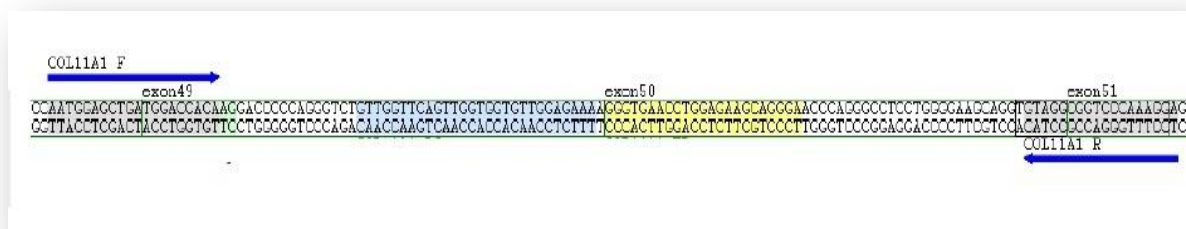
*LC-Red 640 = LightCycler-Red-640-N-hydroxy-succinimide ester (Cat. No. 2 015 161);
 **LC-Red 705 = LightCycler-Red-705-Phosphoramidite (Cat. No. 2 157 594). LC-Red 640 and LC-Red 705 are not excited by the blue LED, but are FRET partners of fluorescein.

Εικόνα 2.5: Μέγιστο απορρόφησης και εκπομπής των χρωστικών που χρησιμοποιούνται στο όργανο LightCycler 1.5.

2.3.1 Ανίχνευση έκφρασης γενικού μεταγράφου *COL11A1* με real-time qPCR

2.3.1.1 Πειραματική πορεία

Για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *COL11A1* αρχικά ενισχύθηκε το “γενικό” μετάγραφο *COL11A1*. Σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές, κοινοί για όλες τις ισομορφές, σε καλά συντηρημένη περιοχή, μέσω του προγράμματος *CLC Sequence Viewer 6* (CLC bio, Δανία). Ο πρόσθιος εκκινητής *COL11A1 F* (TIB MOLBIOL, Γερμανία) προσδένεται στο σημείο σύνδεσης των εξονίων 48 και 49 στην κωδική περιοχή του γονιδίου *COL11A1* και ο ανάστροφος εκκινητής *COL11A1 R* (TIB MOLBIOL, Γερμανία) στο εξόνιο 51 (εικόνα 2.6), παράγοντας PCR προϊόν 132 bp (GC % = 58,3). Επιλέχθηκε να ενισχυθεί μικρή γονιδιακή περιοχή ώστε η αντίδραση να είναι απλή και αποτελεσματική. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν ανιχνευτές υβριδισμού, επισημασμένοι με φλουορεσκεΐνη δότης και LC-Red 640 δέκτης. Η αλληλουχία και τα χαρακτηριστικά των εκκινητών παρουσιάζονται στον πίνακα 2.3. Οι ανιχνευτές υβριδισμού για τα γενικό μετάγραφο του *COL11A1* παρατίθενται στον πίνακα 2.4.



Εικόνα 2.6: Σχετική θέση των εκκινητών *COL11A1 F* και *COL11A1 R* στην κωδική περιοχή του γονιδίου *COL11A1*.

Παρασκευάστηκαν για τον κάθε εκκινητή διαλύματα παρακαταθήκης (*stock solution*) 100 pmol/μL, εν συνεχεία παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας (*work solution*) 20 pmol/μL.

Πίνακας 2.3 Αλληλουχία και χαρακτηριστικά των εκκινητών *COL11A1 F* και *COL11A1 R*.

	<i>Αλληλουχία εκκινητή</i>	<i>GC %</i>	<i>T_m (°C)</i>
Πρόσθιος εκκινητής <i>COL11A1 F</i>	5' AATGGAGCTGATGGACCACA	50	56,9
Ανάστροφος εκκινητής <i>COL11A1 R</i>	5' TCCTTTGGGACCGCCTAC	61,1	57,5

Πίνακας 2.4 Αλληλουχία και χαρακτηριστικά των ανιχνευτών για το γενικό μετάγραφο.

	<i>Αλληλουχία ανιχνευτή</i>	<i>GC %</i>	<i>T_m (°C)</i>
Ανιχνευτής δότης GENERAL <i>COL11A1 FL</i>	5' TCCCTgCTTCTCCAaggTTCACCC--FL	43,3	63,6
Ανιχνευτής δέκτης GENERAL <i>COL11A1 LC</i>	5' LC 640-TTTCTCCAACACCACCAACTgAACCAAC--PH	46,4	66,9

Όλες οι αντιδράσεις της ασύμμετρης Real-time qPCR πραγματοποιήθηκαν με το *LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe kit* (Roche, Γερμανία), το οποίο είναι ένα έτοιμο προς χρήση μείγμα αντίδρασης για PCR ειδικά σχεδιασμένο για αντιδράσεις Real-time qPCR για ανίχνευση με ανιχνευτές υβριδισμού. Χρησιμοποιηθεί τη μεθοδολογία της Hot start PCR η οποία βελτιώνει αισθητά την ειδικότητα και την ευαισθησία της PCR, ελαχιστοποιώντας το σχηματισμό μη-ειδικών προϊόντων κατά την έναρξη της αντίδρασης. Η *FastStart Taq DNA πολυμεράση* αποτελεί χημικά τροποποιημένη μορφή της θερμοσταθερής ανασυνδυασμένης Taq DNA πολυμεράσης, η οποία είναι ανενεργή μέχρι τους 75 °C. Το ένζυμο είναι ενεργό μόνο σε υψηλές θερμοκρασίες, όπου οι εκκινητές δεν μπορούν να προσδεθούν μη-ειδικά.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση, οι προστιθέμενοι όγκοι καθώς και οι τελικές συγκεντρώσεις τους που χρησιμοποιήθηκαν για το γενικό μετάγραφο του *COL11A1* φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα 2.5.

Πίνακας 2.5 Συστατικά της Real-time qPCR αντίδρασης για το γενικό μετάγραφο COL11A1.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Προστιθέμενος όγκος</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
ddH ₂ O	4,8 μL	
Διάλυμα MgCl ₂ (25 mM)	1,2 μL	3 mM
DMSO	0,6 μL	
Πρόσθιος εκκινητής (20 pmol/μL)	0,1 μL	0,6 pmol/μL
Ανάστροφος εκκινητής (20 pmol/μL)	0,3 μL	0,2 pmol/μL
Ανιχνευτής δότης GENERAL COL11A1 FL (3 μM)	1 μL	0,3 μM
Ανιχνευτής δέκτης GENERAL COL11A1 LC (3 μM)	1 μL	0,3 μM
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe 10×	1 μL	1×
cDNA δείγματος / αναφοράς	1 μL	
Συνολικός όγκος	10 μL	

Το θερμοκρασιακό κυκλικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για το γενικό μετάγραφο στον πίνακα 2.6.

Πίνακας 2.6 Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο Real-time qPCR για το γενικό μετάγραφο.

<i>Βήμα</i>	<i>Θερμοκρασία</i>	<i>Χρονική διάρκεια</i>	<i>Ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας</i>	<i>Αριθμός κύκλων</i>
Αρχική Αποδιάταξη	95 °C	10 min		1
Αποδιάταξη	95 °C	10 sec	20 °C/sec	42
Υβριδοποίηση	52 °C	30 sec	20 °C/sec	42
Επέκταση	72 °C	30 sec	20 °C/sec	42
Ψύξη	40 °C	30 sec		

Το θερμοκρασιακό κυκλικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για το γενικό μετάγραφο περιλαμβάνει αρχική αποδιάταξη των κλώνων του DNA στους 95 °C για 10 min, 42 κύκλους με αποδιάταξη των κλώνων στους 95 °C για 10 sec, υβριδισμό των εκκινητών στους 50 °C για 30 sec και επιμήκυνση της αλυσίδας στους 72 °C για 30 sec. Τέλος, ψύξη στους 40 °C για 30 sec.

Σε κάθε πείραμα μαζί με τα δείγματα προς μελέτη συμπεριλήφθηκε ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου για την αντίδραση της Real-time qPCR το οποίο δεν περιείχε DNA καθώς και η καμπύλη βαθμονόμησης προκειμένου να γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός των άγνωστων δειγμάτων.

Σε όλες τις αντιδράσεις της Real-time qPCR, μετά την ενίσχυση πραγματοποιήθηκε πρόγραμμα τήξης κατά το οποίο η θερμοκρασία μετά από αρχική αποδιάταξη στους 95 °C, μειώνεται στους 55 °C και κατόπιν σταδιακά αυξάνεται με παράλληλη συνεχή καταγραφή της έντασης του φθορισμού. Η καμπύλη τήξης, η οποία και σχεδιάζεται

αυτόματα από το όργανο, προκύπτει από τη αρνητική πρώτη παράγωγο της συνάρτησης μεταβολής της έντασης του φθορισμού ως προς τη θερμοκρασία. Ο πίνακας 2.7 συνοψίζει το θερμοκρασιακό πρόγραμμα τήξης που χρησιμοποιήθηκε για το γενικό μετάγραφο:

Πίνακας 2.7 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα καμπύλης τήξης για το γενικό μετάγραφο.

Στάδιο τήξης	ανάλυσης Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια	Ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας
1	95 °C	0 sec	20 °C/sec
2	55 °C	15 sec	20 °C/sec
3	95 °C	0 sec	0,1 °C/sec
Στάδιο ψύξης	40 °C	30 sec	20 °C/sec

Το προϊόν της PCR για το γονίδιο *COL11A1* ελέγχεται και ταυτοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2 % w/v, καθώς και με πέψη από περιοριστικές ενδονουκλεάσες, που επιβεβαίωσαν το αποτέλεσμα, όπως αναλύεται στο επόμενο κεφάλαιο.

2.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της ισομορφής C του *COL11A1*

2.3.2.1 Πειραματική πορεία

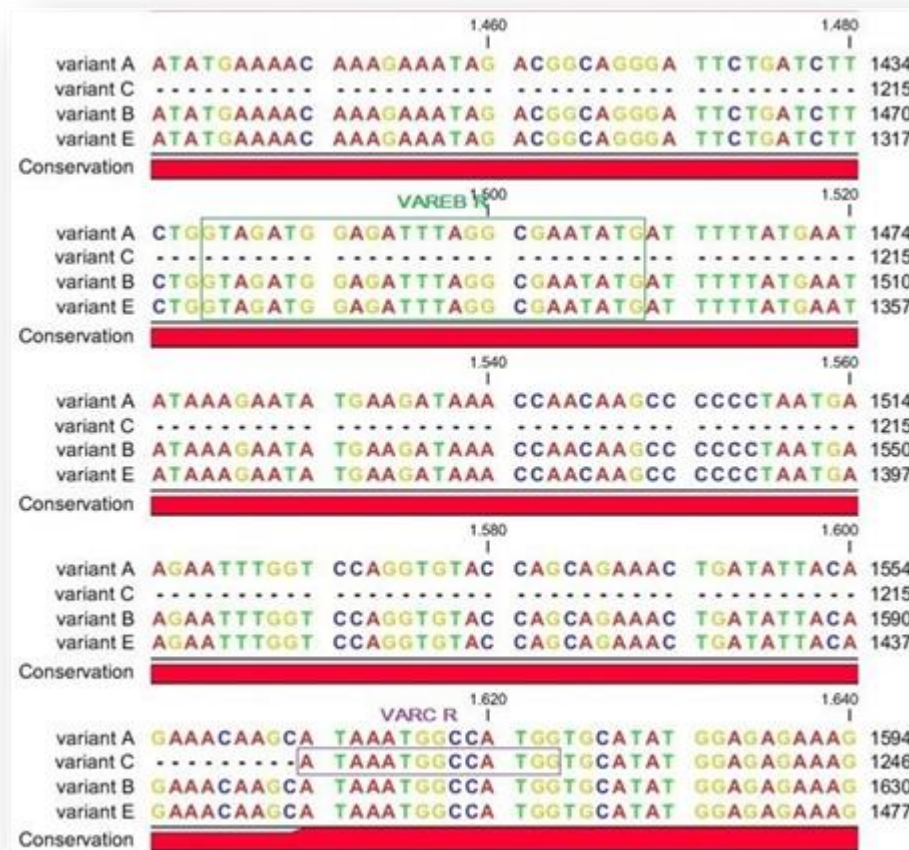
Στην προηγούμενη εργασία [63], ο ποσοτικός προσδιορισμός των ισομορφών A, B, C και E του *COL11A1* σχεδιάστηκε με τη μέθοδο της Real-time qPCR με ανιχνευτές υβριδισμού, καθώς παρουσιάζουν αυξημένη ειδικότητα γιατί α) ελέγχουν και για μια εσωτερική περιοχή περίπου 40 bp του *amplicon* και β) ο φθορισμός παραμένει σταθερός ώστε να εκτελείται η *melting curve analysis* και αξιολόγηση του σημείου T_m . Η ποσοτικοποίηση των μεταγράφων βασίστηκε στη μέθοδο του απόλυτου ποσοτικού προσδιορισμού με κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης με σειριακές αραιώσεις πρότυπων διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ισομορφών του γονιδίου *COL11A1* σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές και ζεύγη ανιχνευτών υβριδισμού (επισημασμένοι με φλουορεσκεΐνη δότης και LC-Red 640 δέκτης) με χρήση του προγράμματος *CLC Sequence Viewer 6* και στοίχισης (*alignment*) των mRNA των 4 ισομορφών προκειμένου να επιλεγούν μη ομόλογες περιοχές για τη πρόσδεση των εκκινητών και των ανιχνευτών (εικόνα 2.7). Η επιλογή των εκκινητών βασίστηκε στην παρουσία ή μη των εξονίων 6, 7, 8 και 9 η οποία διαφοροποιείται στις διαφορετικές ισομορφές με μοναδικό τρόπο.

Η διαφοροποίηση της παρουσίας των συγκεκριμένων εξονίων φαίνεται στον πίνακα 2.8 όπου παρουσιάζονται επίσης οι θέσεις των εκκινητών που σχεδιάστηκαν. Πιο

συγκεκριμένα, σχεδιάστηκε κοινός πρόσθιος εκκινητής VARAC F για τις ισομορφές A και C ο οποίος προσδένεται στο εξόνιο 5. Για την ισομορφή B σχεδιάστηκε ο πρόσθιος εκκινητής VARB F ο οποίος προσδένεται στον εξόνιο 7 που είναι παρών μόνο σε αυτήν την ισομορφή. Ο πρόσθιος εκκινητής VARE F για την ισομορφή E προσδένεται στο σημείο σύνδεσης των εξονίων 5 έως 8 καθώς μόνο στην ισομορφή E απουσιάζουν ταυτόχρονα τα εξόνια 6 και 7. Ο ανάστροφος εκκινητής VARC R για την ισομορφή C σχεδιάστηκε να προσδένεται στο σημείο σύνδεσης των 6 και 10 καθώς μόνο στην ισομορφή C απουσιάζουν ταυτόχρονα τα εξόνια 7 έως 9. Για τις υπόλοιπες ισομορφές χρησιμοποιήθηκε ο κοινός ανάστροφος εκκινητής VAREB R ο οποίος προσδένεται στο σημείο σύνδεσης των εξονίων 8 και 9 που είναι κοινό στις 3 αυτές ισομορφές.

			980		1.000	
variant A	GTTTTT	GAGG	GGGACATTCA	GCAGTTTTTTG	ATCACAGGTTG	1000
variant C	GTTTTT	GAGG	GGGACATTCA	GCAGTTTTTTG	ATCACAGGTTG	1000
variant B	GTTTTT	GAGG	GGGACATTCA	GCAGTTTTTTG	ATCACAGGTTG	1000
variant E	GTTTTT	GAGG	GGGACATTCA	GCAGTTTTTTG	ATCACAGGTTG	1000
Conservation						
			1.020	VARAC F	1.040	
variant A	ATCCCAAGGC	AGCATATGAC	TACTGTGAGC	ATTATAGTCC		1040
variant C	ATCCCAAGGC	AGCATATGAC	TACTGTGAGC	ATTATAGTCC		1040
variant B	ATCCCAAGGC	AGCATATGAC	TACTGTGAGC	ATTATAGTCC		1040
variant E	ATCCCAAGGC	AGCATATGAC	TACTGTGAGC	ATTATAGTCC		1040
Conservation						
			1.060		1.080	
variant A	AGACTGTGAC	TCTTCAGCAC	CCAAGGCTGC	TCAAGCTCAG		1080
variant C	AGACTGTGAC	TCTTCAGCAC	CCAAGGCTGC	TCAAGCTCAG		1080
variant B	AGACTGTGAC	TCTTCAGCAC	CCAAGGCTGC	TCAAGCTCAG		1080
variant E	AGACTGTGAC	TCTTCAGCAC	CCAAGGCTGC	TCAAGCTCAG		1080
Conservation						
			1.100		1.120	
variant A	GAACCTCAGA	TAGATGAGTA	TGCACCAGAG	GATATAATCG		1120
variant C	GAACCTCAGA	TAGATGAGTA	TGCACCAGAG	GATATAATCG		1120
variant B	GAACCTCAGA	TAGATGAG	-----AA	AAAGAAATCC		1110
variant E	GAACCTCAGA	TAGATGAG	-----	-----		1098
Conservation						
	VARE F		1.140	VARAC LC	1.160	
variant A	AATATGACTA	TGAGTA	TGGGGAAGCAGAGT	ATAAAGAGGC		1160
variant C	AATATGACTA	TGAGTA	TGGGGAAGCAGAGT	ATAAAGAGGC		1160
variant B	AATTTCAAAA	AGAAATGAG	GACAGTGGCT	ACTAAATCAA		1150
variant E	-----	-----	-----	-----		1098
Conservation						
			1.180	VARAC F	1.200	
variant A	TGAAAGTSTA	ACAGAGGGAC	CCACT	-----		1185
variant C	TGAAAGTSTA	ACAGAGGGAC	CCACT	-----		1185
variant B	AGGAAAAATC	CAAAAAGTTT	ACACCCCCA	AATCTGAAAA		1190
variant E	-----	-----	-----	-----		1098
Conservation						
			1.220	VARAC FL	1.240	
variant A	-----	-----	-----	CTAACTGAG		1194
variant C	-----	-----	-----	CTAACTGAG		1194
variant B	ATTTTCATCC	AAGAAAGA	AAAGTTATCA	AGCATCAGCA		1230
variant E	-----	-----	-----	-----		1098
Conservation						
			1.260	VARC R	1.280	
variant A	SAGACAATAG	CACAGACGGA	GGCAAACATC	GTTGATGATT		1234
variant C	SAGACAATAG	CACAGACGGA	G	-----		1215
variant B	AAAGCCAAAC	TAGGGGTAAA	GGCAAACATC	GTTGATGATT		1270
variant E	-----	-----	GCAAACATC	GTTGATGATT		1117
Conservation						
			1.300	VARE F	1.320	
variant A	TTCAAGAATA	CAACTATGGA	ACAATGGAAA	GTTACCAGAC		1274
variant C	-----	-----	-----	-----		1215
variant B	TTCAAGAATA	CAACTATGGA	ACAATGGAAA	GTTACCAGAC		1310
variant E	TTCAAGAATA	CAACTATGGA	ACAATGGAAA	GTTACCAGAC		1157
Conservation						
			1.340	VAREB LC	1.360	
variant A	AGAAGCTCCT	AGGCATGTTT	CTGGGACAAA	TGAGCCAAAT		1314
variant C	-----	-----	-----	-----		1215
variant B	ACAAGCTCCT	ASGCATGTTT	CTGGGACAAA	TGAGCAAAT		1350
variant E	AGAAGCTCCT	ASGCATGTTT	CTGGGACAAA	TCAGCAAAT		1197
Conservation						
			1.380	VAREB FL	1.400	
variant A	CCAGTTGAAG	AAATATTTAC	TGAAGAATAT	CTAACGGGAG		1354
variant C	-----	-----	-----	-----		1215
variant B	CCAGTTGAAG	AAATATTTAC	TGAAGAATAT	CTAACGGGAG		1390
variant E	CCAGTTGAAG	AAATATTTAC	TGAAGAATAT	CTAACGGGAG		1237
Conservation						
			1.420		1.440	
variant A	AGGATTATGA	TTCCAGAGG	AAAAATTTCTG	AGGATACACT		1394
variant C	-----	-----	-----	-----		1215
variant B	AGGATTATGA	TTCCAGAGG	AAAAATTTCTG	AGGATACACT		1430
variant E	AGGATTATGA	TTCCAGAGG	AAAAATTTCTG	AGGATACACT		1277



Εικόνα 2.7: Στοιχισή των αλληλουχιών mRNA των ισομορφών A, B, C και E μέσω του προγράμματος CLC Sequence Viewer 6.

Πίνακας 2.8 Επεξηγηματικός πίνακας των εξονίων που περιέχονται στις ισομορφές A, B, C και E και θέσεις των εκκινήτων που σχεδιάστηκαν.

Exon \ Isoform	5	6	7	8	9	10
A	+ VARAC F	+	-	+ VAREB R	+ VAREB R	+
B	+	-	+ VARB F	+ VAREB R	+ VAREB R	+
C	+ VARAC F	+ VARC R	-	-	-	+ VARC R
E	+ VARE F	-	-	+ VARE F VAREB R	+ VAREB R	+

Για την ισομορφή C, σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές (πίνακας 2.9) και ανιχνευτές υβριδισμού, επισημασμένοι με φλουορεσκεΐνη δότης και LC-Red 640 δέκτης, οι οποίοι παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 2.9 Αλληλουχία και χαρακτηριστικά των εκκινητών για την ισομορφή C.

<i>Όνομασία εκκινητή</i>	<i>Αλληλουχία εκκινητή</i>	<i>GC %</i>	<i>T_m (°C)</i>
Πρόσθιος εκκινητής VARAC F	5' TGTGAGCATTATAGTCCAGACTGTGA	42,3	57,1
Ανάστροφος εκκινητής VARC R	5' CCATGGCCATTTATCTCCGT	50	57,5

Η αλληλουχία και τα χαρακτηριστικά των ανιχνευτών για την ισομορφή C παρουσιάζονται στον πίνακα 2.10.

Πίνακας 2.10 Αλληλουχία και χαρακτηριστικά των ανιχνευτών για την ισομορφή C.

	<i>Αλληλουχία ανιχνευτή</i>	<i>GC %</i>	<i>T_m (°C)</i>
Ανιχνευτής δότης VARAC FL	5' TCCTCAGTTACAGTGGGTCCCTCTGTTAC--FL	51,7	64,5
Ανιχνευτής δέκτης VARAC LC	5' LC 640-CTTTCAGCCTCTTTATACTCTGCTTCCCCA--PH	46,7	66,2

Όλοι οι εκκινητές και ανιχνευτές παρασκευάστηκαν από την TIB. Παρασκευάστηκαν για τον κάθε εκκινητή διαλύματα παρακαταθήκης 100 pmol/μL και εν συνεχεία παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας 20 pmol/μL. Οι ανιχνευτές αραιώθηκαν σε τελική συγκέντρωση 3 μM.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ισομορφής C, οι εκκινητές VARAC F και VARC R ενισχύουν περιοχή 206 bp (GC % = 46,1) του mRNA της ισομορφής C. Παρακάτω παρουσιάζεται τα συστατικά της real-time αντίδρασης για την ισομορφή C (πίνακας 2.11).

Πίνακας 2.11 Συστατικά της Real-time qPCR αντίδρασης για την ισομορφή C.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Προστιθέμενος όγκος</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
ddH ₂ O	4,6 μL	
Διάλυμα MgCl ₂ (25 mM)	1,2 μL	3 mM
DMSO	0,6 μL	
Πρόσθιος εκκινητής (20 pmol/μL)	0,3 μL	0,6 pmol/μL
Ανάστροφος εκκινητής	0,1 μL	0,2 pmol/μL

(20 pmol/μL)		
Ανιχνευτής δότης VARAC FL (3μM)	0,6 μL	0,18 μM
Ανιχνευτής δέκτης VARC LC (3 μM)	0,6 μL	0,18 μM
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe 10×	1 μL	1×
cDNA δείγματος / αναφοράς	1 μL	
Συνολικός όγκος	10 μL	

Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο για την ισομορφή C παρουσιάζεται παρακάτω στον πίνακα 2.12.

Πίνακας 2.12 Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο Real-time qPCR για την ισομορφή C.

<i>Βήμα</i>	<i>Θερμοκρασία</i>	<i>Χρονική διάρκεια</i>	<i>Ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας</i>	<i>Αριθμός κύκλων</i>
Αρχική Αποδιάταξη	95 °C	10 min		1
Αποδιάταξη	95 °C	10 sec	20 °C/sec	42
Υβριδοποίηση	52 °C	30 sec	20 °C/sec	42
Επέκταση	72 °C	30 sec	20 °C/sec	42
Ψύξη	40 °C	30 sec		

Επιπλέον η διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού της ισομορφής C, περιελάμβανε και το πρόγραμμα τήξης κατά το οποίο η θερμοκρασία μετά από αρχική αποδιάταξη στους 95 °C, μειώνεται στους 55 °C και κατόπιν σταδιακά αυξάνεται με παράλληλη συνεχή καταγραφή της έντασης του φθορισμού. Η καμπύλη τήξης, η οποία και σχεδιάζεται αυτόματα από το όργανο, προκύπτει από τη αρνητική πρώτη παράγωγο της συνάρτησης μεταβολής της έντασης του φθορισμού ως προς τη θερμοκρασία. Ο πίνακας 2.13 συνοψίζει το θερμοκρασιακό πρόγραμμα τήξης που χρησιμοποιήθηκε για όλες τις ισομορφές:

Πίνακας 2.13 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα καμπύλης τήξης για όλες τις ισομορφές.

<i>Στάδιο ανάλυσης τήξης</i>	<i>Θερμοκρασία</i>	<i>Χρονική διάρκεια</i>	<i>Ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας</i>
1	95 °C	0 sec	20 °C/sec
2	55 °C	15 sec	20 °C/sec
3	85 °C	0 sec	0,1 °C/sec
Στάδιο ψύξης	40 °C	30 sec	20 °C/sec

2.3.3 Καμπύλη βαθμονόμησης

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης για την ποσοτικοποίηση των ισομορφών και του γενικού μεταγράφου προετοιμάστηκαν κατάλληλα πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης αντιγράφων (copies). Όμως, προτού προετοιμαστούν τα πρότυπα διαλύματα, η ειδικότητα των προϊόντων των πρώτων αντιδράσεων Real-time qPCR ελέγχθηκαν και πιστοποιήθηκαν με πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες ή/και ανάλυση της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA (DNA sequencing) [οι μέθοδοι αναλύονται στην επόμενη ενότητα].

Εφόσον, ελέγχθηκε και πιστοποιήθηκε η ειδικότητα των προϊόντων των αντιδράσεων PCR, κατέστη δυνατή η δημιουργία των πρότυπων διαλυμάτων και η κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης που χρησιμοποιήθηκε κατά τον απόλυτο ποσοτικό προσδιορισμό των αντιγράφων των άγνωστων δειγμάτων. Για την προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων γνώστης συγκέντρωσης ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- A. Πραγματοποιήθηκε αντίδραση συμβατικής PCR με πειραματικό πρωτόκολλο και θερμοκρασιακές συνθήκες όπως ακριβώς περιγράφονται στην ανάλυση της αλληλουχίας του DNA. Τα PCR προϊόντα ελέγχθηκαν για το σωστό τους μέγεθος και ταυτοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη 2 % w/v.
- B. Στη συνέχεια, τα PCR προϊόντα από πολλές επαναλήψεις της ίδιας αντίδρασης αναμείχθηκαν για τη δημιουργία ενός πυκνού διαλύματος PCR προϊόντων. Το PCR προϊόν καθαρίστηκε με το *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία) με διαδικασία όμοια με αυτή που περιγράφεται παρακάτω στην ανάλυση της αλληλουχίας του DNA για το ίδιο kit.
- C. Έπειτα, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του DNA στο καθαρισμένο διάλυμα χρησιμοποιώντας το *Quant-iT™ dsDNA Broad-Range Assay Kit* (Invitrogen, ΗΠΑ). Το *Quant-iT™ dsDNA Broad-Range Assay Kit* μπορεί να μετρήσει ποσοτικά γενωμικό DNA, ιικό δίκλωνο DNA καθώς και PCR προϊόντα. Η ποσότητα του δείγματος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι από 1 έως 20 µL, ενώ τα όρια ανίχνευσης είναι 10 pg/µL. Η πειραματική διαδικασία μπορεί να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου (22 έως 28 °C) ενώ η φωτοσταθερότητα των αντιδραστηρίων είναι υψηλή. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA γίνεται με βάση καμπύλη βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 0 ng/mL και 100 ng/mL.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης χρησιμοποιείται η σχέση:

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

Όπου QF value = η τιμή που δίνεται από τον αναλυτή για κάθε δείγμα

n = ο αριθμός των µL του δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν.

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με αυτή του ποσοτικού προσδιορισμού του ολικού RNA με το *Quant-iT™ RNA Assay Kit*.

- D. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο αριθμός των αντιγράφων (cDNA αντίγραφα) των ισομορφών A και E στα πυκνά διαλύματα. Αρχικά, υπολογίστηκε το μοριακό βάρος για την περιοχή της ισομορφής που ενισχύεται με την αντίδραση PCR με τον τύπο:

$$MB = \text{μέγεθος προϊόντος DNA} \times 660$$

Γνωρίζουμε όμως ότι 1 *mole* μιας ουσίας περιέχει $6,023 \times 10^{23}$ μόρια (αντίγραφα) και ισούται με το μοριακό βάρος της ουσίας εκφρασμένο σε g. Επομένως, 1 *mole* μιας ουσίας αντιστοιχεί σε (μέγεθος προϊόντος DNA_{για την ισομορφή} \times 660) g. Έτσι, γνωρίζοντας τη συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος, υπολογίζουμε αναλογικά τα μόρια-αντίγραφα για κάθε ισομορφή.

- E. Ακολουθούν σειριακές διαδοχικές αραιώσεις 1:10 του πυκνού διαλύματος και παρασκευάζεται μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων γνωστού αριθμού αντιγράφων.
- F. Κατασκευάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης [68].

Στο πρωτόκολλο μας για την ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων, εξασφαλίστηκε ότι οι ιστοί είχαν παρόμοιο αρχικό μέγεθος (περίπου 30 mg) και πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση με την ποσότητα του συνολικού RNA (0,5-3 μg) που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση cDNA από όλα τα δείγματα [69].

2.3.4 Βελτιστοποιήσεις μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού

Στην παρούσα εργασία έγιναν πειράματα βελτιστοποίησης των αναλυτικών παραμέτρων της Real-time qPCR για το γενικό μετάγραφο και για την ισομορφή C (καθώς οι ισομορφές A και E είχαν γίνει σε παλαιότερη εργασία της ερευνητικής μας ομάδας) που περιλαμβάνουν τα αντιδραστήρια και τις πειραματικές συνθήκες. Η βελτιστοποίηση των μεθόδων έγινε με ρύθμιση των βασικότερων παραμέτρων κάθε σταδίου. Σε κάθε πείραμα βελτιστοποίησης, όλες οι παράμετροι πλην της ελεγχόμενης διατηρούνταν σταθερές και επιλέγονταν κάθε φορά η τιμή της υπό εξέταση παραμέτρου η οποία προωθούσε τη βελτιστοποίηση της μεθόδου. Στο επόμενο πείραμα γινόταν χρήση των βέλτιστων τιμών που είχαν προκύψει από τα προηγούμενα πειράματα και διερεύνηση της βέλτιστης τιμής μιας άλλης παραμέτρου. Η επιλογή γινόταν πάντα συγκριτικά εντός του ίδιου πειράματος. Κριτήρια για την αποδοχή της βέλτιστης τιμής των παραμέτρων του πειράματος ήταν τα ακόλουθα:

- Η μείωση του αριθμού των κύκλων στα σημεία τομής και η αύξηση της έντασης του φθορισμού για τα πρότυπα διαλύματα.
- Η προσέγγιση στην ιδανική απόδοση $E=2$ και κλίση της καμπύλης $-3,3$.

Η ακολουθούμενη τακτική έχει ως κύριο πλεονέκτημα την ελαχιστοποίηση των απαιτούμενων πειραμάτων προς την επίτευξη της βελτιστοποίησης των αναλυτικών παραμέτρων, όμως μειονεκτεί διότι δεν εξετάζει την πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ των αναλυτικών παραμέτρων.

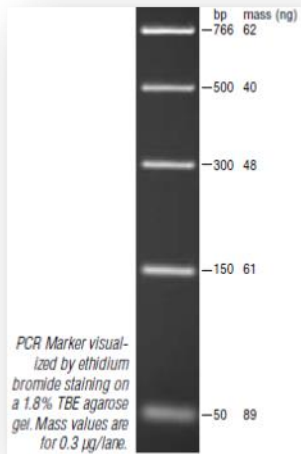
Οι αναλυτικές παράμετροι οι οποίες βελτιστοποιήθηκαν ήταν:

- ✓ Η θερμοκρασία υβριδισμού της αντίδρασης,
- ✓ Η τελική συγκέντρωση των εκκινητών,
- ✓ Η τελική συγκέντρωση των ανιχνευτών,
- ✓ Η τελική συγκέντρωση των ιόντων $MgCl_2$ και
- ✓ Ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης Real-time qPCR.

2.4 Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης

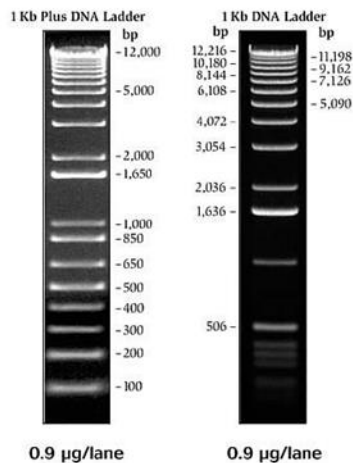
2.4.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

- Tris (AppliChem, Γερμανία)
- Βορικό οξύ (SIGMA, ΗΠΑ)
- EDTA (AppliChem, Γερμανία)
- Αγαρόζη *low* EEO (AppliChem, Γερμανία)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) (10 mg/mL - Invitrogen, ΗΠΑ)
- Κυανούν της βρωμοφαινόλης (SIGMA, ΗΠΑ)
- Φικόλλη (Amersham Biosciences, Ηνωμένο Βασίλειο)
- Δείκτης μοριακών βαρών DNA PCR *Marker* (300 ng/μL) (New England BioLabs, ΗΠΑ) (εικόνα 2.9)
- DNA *Molecular Weight Marker* VIII (Roche Applied Science, Γερμανία) (εικόνα 2.10)
- Εργαστηριακός ηλεκτρονικός ζυγός (Orma BC, Ιταλία)
- Φούρνος μικροκυμάτων (BLUESKY, Ιαπωνία)
- Ηλεκτροφορητική συσκευή 40-0708 (PEQLAB TECHNOLOGIE, Γερμανία)
- Ηλεκτροφορητική συσκευή Hu13 (Scie-plas, Ηνωμένο Βασίλειο)
- Τροφοδοτικό EPS 301 (Amersham Biosciences, Ηνωμένο Βασίλειο)
- Τράπεζα UV ακτινοβολίας (Vilber Lourmat, Γαλλία)
- Ψηφιακή κάμερα *PowerShot* A2200 (Canon, ΗΠΑ)
- *PhotoDoc-It™ Imaging System* (UVP, ΗΠΑ)



Εικόνα 2.9: Δείκτης μοριακών βαρών DNA PCR Marker.

Comparison between 1 Kb Plus DNA Ladder and 1 Kb DNA Ladder. 0.9% agarose gel stained with ethidium bromide



Εικόνα 2.10: Δείκτης μοριακών βαρών 1kb Plus DNA Ladder.

2.4.2 Παρασκευή διαλυμάτων

- ✓ Διάλυμα 0,5 M EDTA, pH 8,0 (18,61 g EDTA + 90 mL ddH₂O, ρύθμιση του pH 8,0 με 2,01 g NaOH + ddH₂O σε τελικό όγκο 100 mL) διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα 5× TBE (Tris/Borate/EDTA) (54 g Tris + 27,5 g Βορικό οξύ + 20 mL 0,5 M EDTA, pH 8,0 + ddH₂O σε τελικό όγκο 1L) διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα 0,5× TBE (Tris/Borate/EDTA) (100 mL ρυθμιστικού διαλύματος 5× TBE + 900 mL ddH₂O) διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- ✓ Διάλυμα κυανού της βρωμοφαινόλης 0,05 % (50 mg κυανού της βρωμοφαινόλης σε 1L ddH₂O) διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Διάλυμα χρωστικής κυανού της βρωμοφαινόλης 6× (0,01 g κυανό της βρωμοφαινόλης + 5 g φικόλλη + 20 mL ddH₂O) διατηρείται στους 4 °C.
- ✓ Αραιωμένο διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5 mg/μL) (250 μL βρωμιούχο αιθίδιο 10 mg/mL + 4750 μL ddH₂O) διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Αραιωμένο διάλυμα δείκτη μοριακών βαρών DNA PCR Marker (50 ng/μL) [80 μL ddH₂O + 20 μL Gel loading Dye (παρέχεται με το δείκτη) + 20 μL δείκτης]

2.4.3 Πειραματική Πορεία ηλεκτροφόρησης

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

10 μL PCR προϊόντος αναμιγνύονται με 2 μL διαλύματος χρωστικής και τοποθετούνται στα πηγαδάκια του πηκτώματος αγαρόζης. Η ηλεκτροφορητική συσκευή ρυθμίζεται σε συνεχή τάση 120 V για περίπου 25 min όπου το αρνητικά φορτισμένο DNA κινείται προς την άνοδο. Παράλληλα με τα δείγματα γίνεται ηλεκτροφόρηση δείκτη μοριακών βαρών DNA PCR *Marker* για τον υπολογισμό του μεγέθους των PCR προϊόντων. Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα παρατηρείται σε τράπεζα UV ακτινοβολίας στα 302-366 nm όπου το βρωμιούχο αιθίδιο εκπέμπει ακτινοβολία φθορισμού και οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές. Η φωτογράφιση των προϊόντων γίνεται με ψηφιακή κάμερα η οποία είναι ενσωματωμένη σε *PhotoDoc-It™ Imaging System* και τα αποτελέσματα αποθηκεύονται σε H/Y. Η επεξεργασία της εικόνας γίνεται σε *format .tiff* με την χρήση του ειδικού λογισμικού προγράμματος *Kodak Digital Science 1D* (Eastman Kodak Company, ΗΠΑ).

2.5 Πιστοποίηση PCR προϊόντων: Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Τα περιοριστικά ένζυμα ή περιοριστικές ενδονουκλεάσες (*restriction enzymes* or *restriction endonucleases*) είναι ένζυμα που χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στη μοριακή γενετική. Η ανακάλυψή τους ήταν καθοριστική για την ανάπτυξη της γενετικής μηχανικής, της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA και σχεδόν όλων

των μοριακών τεχνικών που είναι σε χρήση σήμερα. Σήμερα γνωρίζουμε πάνω από 200 περιοριστικά ένζυμα ωστόσο αναζητούνται συνεχώς νέα καθώς η σημασία των ενζύμων αυτών στη γενετική έρευνα είναι τεράστια. Πρόκειται για ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA (*restriction sites*) και καταλύουν τη διάσπαση της διπλής αλυσίδας του DNA (σε αλληλουχία εντός ή εκτός του σημείου αναγνώρισης) [70].

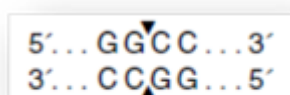
Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα κυρίως βακτηριακής προέλευσης και στην φύση ο ρόλος τους είναι να καταστρέφουν εξωγενές DNA, συνήθως φάγων, που μολύνει το βακτήριο. Υπάρχουν δυο κύριες ομάδες ενζύμων περιορισμού. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα ένζυμα που δημιουργούν κολλώδη μονόκλιωνα άκρα (*sticky ends*). Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει ένζυμα που δημιουργούν μη κολλώδη δίκλιωνα άκρα (*blunt ends*) [70].

Τα περιοριστικά ένζυμα ποικίλουν ως προς τις συνθήκες άριστης δράσης τους. Οι παραλλαγές αυτές αναφέρονται στην θερμοκρασία επώασης και στη σύσταση του διαλύματος επώασης. Τα ρυθμιστικά διαλύματα μέσα στα οποία γίνεται η αντίδραση της επώασης περιέχουν συνήθως ιόντα Mg^{+2} που λειτουργεί ως συμπαραγοντας του ενζύμου, καθώς και ιόντα Na^{+} . Τα συστατικά των διαλυμάτων επώασης πρέπει να είναι καθαρά και απαλλαγμένα από νουκλεάσες. Συνήθως προστίθενται σε αυτά σουλφιδρυλικοί παράγοντες, όπως β-μερκαπτοαιθανόλη τα οποία αναστέλλουν τις νουκλεάσες που ενδεχομένως υπάρχουν. Τα ένζυμα διατηρούνται στους $-20^{\circ}C$ μέσα σε διάλυμα 50 % v/v γλυκερόλης [71].

Για την πιστοποίηση των PCR προϊόντων με την χρήση περιοριστικών ενζύμων επιλέχθηκαν κατάλληλα ένζυμα (*single* ή *dual restriction cutters*) για κάθε PCR προϊόν μέσω του προγράμματος CLC Sequence Viewer 6.

Για την πιστοποίηση του PCR προϊόντος για την γενική ανίχνευση του *COL11A1* mRNA χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα HaeIII και MnlI.

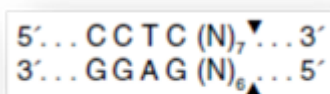
Το ένζυμο HaeIII προέρχεται από ανασυνδυασμένο στέλεχος *E.coli* που φέρει το κλωνοποιημένο γονίδιο HaeIII από το *Haemophilus aegypticus* και δρα βέλτιστα στους $37^{\circ}C$ σε συνδυασμό με το ρυθμιστικό διάλυμα NEB 4. Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου σε δίκλινο DNA φαίνεται στην εικόνα 2.11.



Εικόνα 2.11: Αλληλουχία αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου HaeIII.

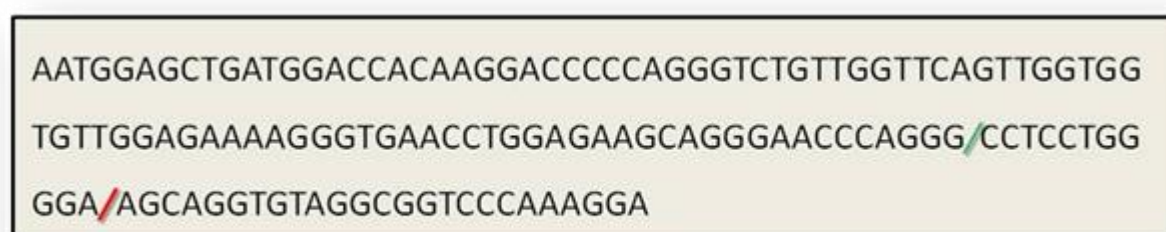
Το ένζυμο MnlI προέρχεται από ανασυνδυασμένο στέλεχος *E.coli* που φέρει το κλωνοποιημένο γονίδιο MnlI από το *Moraxella nonliquefaciens* και δρα βέλτιστα

στους 37 °C σε συνδυασμό με το ρυθμιστικό διάλυμα NEB 4. Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου σε δίκλωνο DNA φαίνεται στην εικόνα 2.12.



Εικόνα 2.12: Αλληλουχία αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου MnlI.

Στην εικόνα 2.13 παρουσιάζονται τα σημεία που αναμένονται να πέψουν το προϊόν της PCR για το COL11A1 τα ένζυμα HaeIII και MnlI.



Εικόνα 2.13: Σχηματική αναπαράσταση των σημείων τομής των ενζύμων HaeIII και MnlI στο PCR προϊόν για το COL11A1. Με πράσινη / αναπαριστάται το σημείο κοπής για το ένζυμο HaeIII ενώ με κόκκινη / για το ένζυμο MnlI.

Από την πέψη του PCR προϊόντος με το ένζυμο HaeIII αναμένεται να προκύψουν δύο ζώνες DNA κατά την ηλεκτροφόρηση 96 bp και 36 bp, αντίστοιχα ενώ με το ένζυμο MnlI αναμένεται να προκύψουν δύο ζώνες DNA κατά την ηλεκτροφόρηση 107 bp και 25 bp, αντίστοιχα.

2.5.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

- Ένζυμο HaeIII (New England BioLabs, ΗΠΑ)
- Ένζυμο MnlI (New England BioLabs, ΗΠΑ)
- Ένζυμο AvaII (New England BioLabs, ΗΠΑ)
- Ένζυμο HinfI (New England BioLabs, ΗΠΑ)
- Ρυθμιστικό διάλυμα NEB 4 10× (New England BioLabs, ΗΠΑ) [50 mM potassium acetate + 20 mM Tris-acetate + 10 mM magnesium acetate + 1 mM DTT, pH 7,9]
- Αγαρόζη NuSieve® 3:1 (FMC, ΗΠΑ)
- Σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5 mL
- Υδατόλουτρο Precision (Thomas Scientific, ΗΠΑ)

2.5.2 Πειραματική πορεία

Κάθε PCR προϊόν προς πιστοποίηση αναμειγνύεται με την αντίστοιχη περιοριστική ενδονουκλεάση σε ένα ξεχωριστό σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5 mL και το ρυθμιστικό διάλυμα NEB 4. Στη συνέχεια, επωάζεται για 2 ώρες σε υδατόλουτρο στους 37 °C. Το πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 15 µL φαίνεται στον πίνακα 2.14.

Πίνακας 2.14 Αντιδραστήρια ενζυμικής πέψης.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Προστιθέμενος όγκος</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
Περιοριστικό ένζυμο	0,5 µL	
Ρυθμιστικό διάλυμα NEB 4 10×	1,5 µL	1×
PCR Προϊόν	13 µL	
Συνολικός όγκος	15 µL	

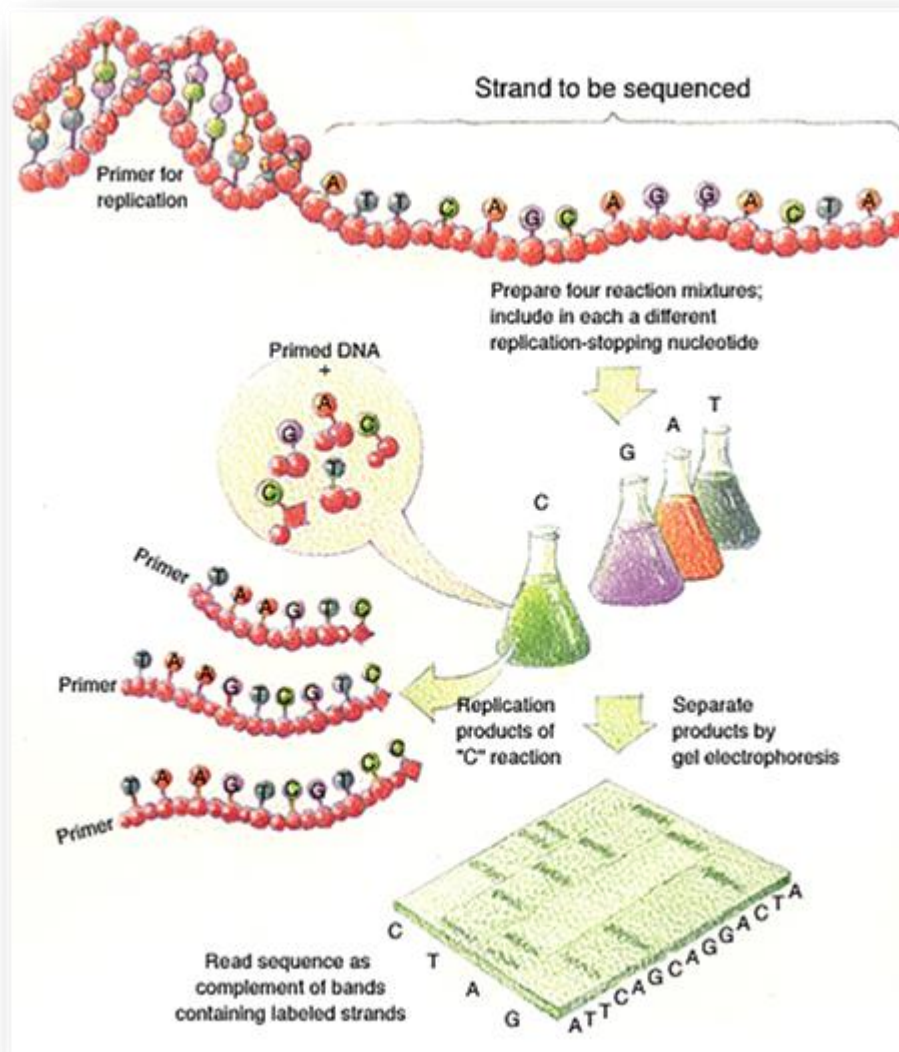
Μετά την επώαση, τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης υψηλής διακριτικής ικανότητας 3 % w/v, η οποία παρασκευάζεται με 1 g αγαρόζη και 0,5 g αγαρόζη NuSieve[®] σε 50 mL 0,5× TBE με προσθήκη 50 µL αραιωμένου βρωμιούχου αιθιδίου. Η ηλεκτροφορητική συσκευή ρυθμίζεται σε συνεχή τάση 120 V για περίπου 40 min οπότε το αρνητικά φορτισμένο DNA κινείται προς την άνοδο.

2.6 Πιστοποίηση PCR προϊόντων: ανάλυση της DNA αλληλουχίας

Με τον όρο ανάλυση της αλληλουχίας του DNA έχει καθιερωθεί η τεχνική προσδιορισμού της αλληλουχίας των βάσεων των δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων αλλά και γενικότερα των νουκλεϊκών οξέων. Ένας σημαντικός σταθμός στην ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων ήταν το 1977 όταν οι *Maxam & Gilbert* περιέγραψαν μια μέθοδο ανάλυσης της αλληλουχίας του DNA με χημική αποικοδόμηση των βάσεων [72]. Αργότερα το ίδιο έτος προτάθηκε από τους *Sanger et al.* μια ενζυμική μέθοδος για την ανάγνωση της αλληλουχίας των δεοξυριβονουκλεοτιδίων [73]. Σήμερα, οι δύο αυτές μέθοδοι έχουν υποστεί αρκετές τροποποιήσεις, οι βασικές τους αρχές όμως εξακολουθούν να παραμένουν αναλλοίωτες. Όλα τα σύγχρονα αυτοματοποιημένα μηχανήματα ανάλυσης της αλληλουχίας του DNA (*DNA sequencers*) στηρίζονται κυρίως στην εφαρμογή της μεθόδου του *Sanger* (εξαιρούνται αυτά της πιο τελευταίας καινοτόμας *Next Generation Sequencing* τεχνολογίας).

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA κατά *Sanger* είναι μία διαδικασία με την οποία επιτυγχάνεται η αλληλούχιση τμημάτων DNA που συνήθως είναι προϊόντα μιας αντίδρασης PCR που έχει προηγηθεί. Βασίζεται στην παρουσία στο μείγμα της αντίδρασης δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και δι-δεοξυριβονουκλεοτιδίων

(ddNTPs). Όταν τοποθετηθούν στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα δι-δεοξυριβονουκλεοτίδια από την DNA πολυμεράση, τότε η σύνθεση της νέας αλυσίδας διακόπτεται και το συγκεκριμένο δι-δεοξυριβονουκλεοτίδιο σηματοδοτεί τον τερματισμό της αλυσίδας. Αυτό συμβαίνει διότι τα δι-δεοξυριβονουκλεοτίδια στερούνται της υδροξυλομάδας στην 3' θέση του δακτυλίου της δεοξυριβόζης. Λόγω της έλλειψης αυτής, αφού η DNA πολυμεράση τοποθετήσει αυτό το δι-δεοξυριβονουκλεοτίδιο στην αλυσίδα που συντίθεται, δεν μπορεί πια να τοποθετηθεί άλλο νουκλεοτίδιο στη συνέχεια γιατί δεν είναι εφικτό να σχηματιστεί ο φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ των δεοξυριβονουκλεοτιδίων και σταματά η επιμήκυνση. 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 δεοξυριβονουκλεοτίδιο που θα τοποθετηθεί στην αλυσίδα. Πραγματοποιούνται τέσσερις σειρές τέτοιων αντιδράσεων όπου στην καθμία χρησιμοποιείται ένα από τα τέσσερα δι-δεοξυριβονουκλεοτίδια. Μετά το τέλος όλης της διαδικασίας προκύπτουν τμήματα DNA των οποίων το μέγεθος εξαρτάται από το σημείο όπου τοποθετήθηκε το δι-δεοξυριβονουκλεοτίδιο. Τα τμήματα αυτά αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υψηλής διακριτικής ικανότητας (τα προϊόντα κάθε αντίδρασης σταματούν σε διαδοχικές θέσεις εντός του πηκτώματος ανάλογα με το μοριακό τους βάρος) και η αλληλουχία του DNA μπορεί να διαβαστεί απ' ευθείας από το πήκτωμα. Είναι πολύ σημαντικό να ρυθμιστεί σωστά η αναλογία dNTP : ddNTP σε κάθε μια από τις τέσσερις αντιδράσεις ώστε η αντίδραση σύνθεσης του συμπληρωματικού κλάδου να τερματίζεται σε ένα από τα ζητούμενα δεοξυριβονουκλεοτίδια της κάθε μίας αντίδρασης, και να μπορούν να σχηματιστούν όλα τα δυνατά προϊόντα ανά αντίδραση για να είναι σωστός ο προσδιορισμός της ελεγχόμενης αλληλουχίας DNA (εικόνα 2.13).



Εικόνα 2.13: Αρχή ενζυμικής μεθόδου DNA sequencing κατά Sanger.

<http://boneslab.bio.ntnu.no/Bi211/Bi211Kap8-03.html>

Η τροποποίηση της μεθόδου *Sanger* με αντικατάσταση της ραδιενεργούς σήμανσης από φθορίζουσες χρωστικές κατέστησε δυνατή την αυτοματοποίηση της ανάλυσης της αλληλουχίας του DNA με ταχύ και αξιόπιστο προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων του DNA με τη χρήση ειδικών αυτοματοποιημένων οργάνων. Σήμερα, έχει αυτοματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση, η ανίχνευση του σήματος και η ανάγνωση της αλληλουχίας. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται αποτελεί τροποποίηση της ενζυμικής μεθόδου του *Sanger*. Σε αυτή την μέθοδο η επισήμανση γίνεται όπως και πριν, δηλαδή οι φθορίζουσες ουσίες εξακολουθούν να βρίσκονται είτε στους εκκινητές, είτε στα ddNTPs (συνηθέστερη η δεύτερη επιλογή).

Το προς ανάλυση δείγμα ενισχύεται αρχικά με συμβατική PCR με κατάλληλους εκκινητές, η οποία ακολουθείται από τη μέθοδο των θερμικών κύκλων (*cycle*

sequencing). Κατά τη μέθοδο των θερμικών κύκλων, το PCR προϊόν αφού προηγουμένως καθαρισθεί με κατάλληλο τρόπο, αντιγράφεται με χρήση της Taq DNA πολυμεράσης παρουσία ενός εκκινητή, dNTPs και επισημασμένων με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές ddNTPs. Κάθε αντίδραση επαναλαμβάνεται για 20 με 35 κύκλους (ανάλογα με το μέγεθος της αναλυόμενης περιοχής). Τα διαφορετικού μεγέθους τμήματα που παράγονται, εισάγονται στη συνέχεια στον αναλυτή DNA, όπου πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή στα οποία διοχετεύεται ειδικό πολυμερές που αναγεννάται μετά το πέρας της αντίδρασης. Εφ' όσον τα φάσματα της εκπομπής των τεσσάρων χρωστικών δεν αλληλεπικαλύπτονται τότε με μια οπή στο τέλος του τριχοειδούς, μια κατάλληλη δέσμη *laser* και έναν ανιχνευτή είναι δυνατόν να ανιχνεύονται τα σήματα φθορισμού που προκύπτουν από τις τέσσερις χρωστικές σε ένα μόνο πέρασμα στο ίδιο τριχοειδές. Τα σήματα αντιστοιχίζονται σε καμπύλες με διαφορετικά χρώματα και στη συνέχεια “μεταφράζονται” σε βάσεις DNA με κατάλληλο λογισμικό [63].

2.6.1 Καθαρισμός των PCR προϊόντων

Τα προϊόντα που προέκυψαν ύστερα από την real-time PCR, συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν. Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων έγινε με το προτυποποιημένο σετ αντιδραστηρίων High Pure PCR Cleanup Micro Kit της Roche Applied Science (Ελβετία). Η μέθοδος βασίζεται στην κατακράτηση του DNA από τις ειδικές στήλες του kit που περιέχουν μεμβράνες πυριτίου. Το DNA απορροφάται στην μεμβράνη παρουσία του διαλύματος πρόσδεσης (Binding Buffer) το οποίο εξασφαλίζει τις απαραίτητες συνθήκες (υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και κατάλληλο pH). Οι προσμίξεις (όπως περίσσεια εκκινητών, άλατα, ένζυμα, μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια, αгарόζη, χρωστικές, βρωμιούχο αιθίδιο) διαπερνούν τη στήλη και απομακρύνονται με εκπλύσεις. Η κάθε στήλη παρέχει αποτελεσματική πρόσδεση PCR προϊόντων μεγέθους μεγαλύτερου των 70 bp. Το DNA μετά την ολοκλήρωση των εκπλύσεων, εκλούεται με 10 ή 20 μl από το διάλυμα έκλουσης.

2.6.1.1 Αντιδραστήρια / Υλικά

- Πιπέτες (Thermo, Fisher USA) των 10 μl, 100 μl, 200 μl και 1000 μl
- Ακρορύγχη με φίλτρο των 10 μl, 200 μl και 1000 μl
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, Thermo Fisher, USA)
- Συσκευή Vortex (Fisher, USA)
- Αποστειρωμένο νερό (BIOSEP A.E, Ελλάδα)
- Σωληνάρια τύπου eppendorfs των 1,5 ml
- Σωληνάρια συλλογής των 2ml (Collection Tubes)
- Στήλες High Pure Micro Filter Tubes
- Διάλυμα πρόσδεσης (Binding Buffer)
- Διάλυμα εκπλύσεων (Washing Buffer)
- Διάλυμα έκλουσης (Elution Buffer)
- Αιθανόλη

2.6.1.2 Πειραματική Πορεία

1. Προστίθεται δις απεσταγμένο ύδωρ στο δείγμα μέχρι τελικού όγκου 100μl
2. Σε κάθε δείγμα (των 100 μl) προστίθεται 400 μl διάλυμα πρόσδεσης, ακολουθεί έντονη ανάδευση και φυγοκέντρωση σε σύντομο διάστημα
3. Εισάγεται μια στήλη High Pure Filter Tube σε ένα σωληνάριο συλλογής. Μεταφέρεται το δείγμα του δεύτερου βήματος στο επάνω μέρος της στήλης και φυγοκεντρείται για 30- 60 sec στα 8000 x g
4. Απορρίπτεται το διήθημα και τοποθετείται η στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο
5. Προστίθεται 400 μl διάλυμα εκπλύσεων στη στήλη και φυγοκεντρείται για 30- 60 sec στα 8000 x g
6. Απορρίπτεται το διήθημα και τοποθετείται η στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο
7. Προστίθεται 300 μl διάλυμα εκπλύσεων στη στήλη και φυγοκεντρείται για 30- 60 sec στα 8000 x g
8. Απορρίπτεται το διήθημα και τοποθετείται η στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο και φυγοκεντρείται στα 17900 x g για ένα επιπλέον λεπτό
9. Απορρίπτεται το σωληνάριο συλλογής με το διήθημα και τοποθετείται η στήλη σε ένα καθαρό eppendorf των 1.5 ml
10. Για την έκλουση του DNA, προστίθενται 20 μl διαλύματος έκλουσης. Φυγοκεντρείται στα 8000 x g για 1 min

2.6.2 Αντίδραση θερμικών κύκλων

Η αντίδραση των θερμικών κύκλων είναι παρόμοια με αυτή της PCR. Τα περισσότερα συστατικά που χρησιμοποιούνται είναι τα ίδια με αυτά της PCR και ακολουθείται η ίδια διαδικασία με θερμικούς κύκλους. Μια σημαντική διαφορά είναι ότι χρησιμοποιείται μόνο ο ένας εκκινητής σε κάθε αντίδραση (είτε ο πρόσθιος, είτε ο ανάστροφος), με αποτέλεσμα η ενίσχυση του προϊόντος να είναι γραμμική και όχι εκθετική. Μια άλλη διαφορά είναι ότι στην αντίδραση χρησιμοποιούνται και δι-δεοξυριβονουκλεοτίδια, τα οποία διακόπτουν την επέκταση του DNA όταν ενσωματωθούν. Επειδή, η αντίδραση των θερμικών κύκλων είναι μια διαδικασία γραμμικής ενίσχυσης είναι λιγότερο επιρρεπής στις επιμολύνσεις, αλλά παρόλα αυτά δεν παύει να απαιτεί στείρες συνθήκες.

Η αντίδραση των θερμικών κύκλων πραγματοποιήθηκε με το *BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, ΗΠΑ). Το *BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* παρέχει όλα τα απαιτούμενα αντιδραστήρια για την αντίδραση θερμικών κύκλων σε ένα έτοιμο προς χρήση μείγμα. Χρειάζεται μόνο να προστεθούν το δείγμα και ο κατάλληλος εκκινητής. Τα αντιδραστήρια που παρέχονται είναι

κατάλληλα για την εκτέλεση αντιδράσεων θερμικών κύκλων που βασίζονται στον φθορισμό είτε σε μονόκλωνο/δίκλωνο DNA δείγμα, είτε σε PCR προϊόντα. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση των θερμικών κύκλων, οι προστιθέμενοι όγκοι και οι τελικές συγκεντρώσεις τους φαίνονται στον *πίνακα 2.15*.

Πίνακας 2.15 Συστατικά της αντίδρασης των θερμικών κύκλων.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Προστιθέμενος όγκος</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
<i>Ready Reaction Premix</i>	1 μL	
<i>Ρυθμιστικό διάλυμα BigDye Sequencing 5\times</i>	2 μL	1 \times
<i>Εκκινητής (5 pmol/ μL)</i>	1 μL	0,5 pmol/ μL
<i>PCR Προϊόν</i>	2 μL	
<i>ddH₂O</i>	4 μL	
<i>Συνολικός όγκος</i>	10 μL	

Το θερμοκρασιακό κυκλικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση των θερμικών κύκλων περιλαμβάνει αρχική αποδιάταξη των κλώνων του DNA στους 96 °C για 1 min, 25 κύκλους με αποδιάταξη των κλώνων στους 96 °C για 10 sec, υβριδισμό των εκκινητών στους 50 °C για 10 sec και επιμήκυνση της αλυσίδας στους 60 °C για 4 min. Τέλος, ψύξη στους 8 °C.

2.6.3 Καθαρισμός των προϊόντων της αντίδρασης των θερμικών κύκλων

Για τον καθαρισμό των προϊόντων της αντίδρασης των θερμικών κύκλων χρησιμοποιήθηκε το *NucleoSEQ[®] kit* (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία). Το *kit* αποτελείται από στήλες *NucleoSEQ[®]*, σχεδιασμένες για τον γρήγορο και αποτελεσματικό καθαρισμό προϊόντων DNA *sequencing*. Περιέχουν πηκτή η οποία παρέχει αξιόπιστη αφαίρεση των μικρότερων μορίων από τα νουκλεϊκά οξέα. Ακαθαρσίες όπως άλατα, περίσσεια χρωστικών, δεοξυριβονουκλεοτίδια, ίχνη οργανικών διαλυτών και εκκινητών συγκρατούνται από τη στήλη ενώ τα νουκλεϊκά οξέα που μας ενδιαφέρουν ανακτούνται με υψηλή απόδοση.

2.6.3.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

- *NucleoSEQ[®]* στήλες (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- ddH₂O (ΒΙΟΣΕΡ Α.Ε, Ελλάδα)
- Σωληνάρια τύπου *Eppendorf* 1,5 mL
- Μικροφυγόκεντρος *Minispin plus* (Eppendorf, Γερμανία)
- Συσκευή *Vortex* (Fisher, ΗΠΑ)

2.6.3.2 Πειραματική πορεία

Η πειραματική πορεία καθαρισμού των προϊόντων της αντίδρασης των θερμικών κύκλων περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- *Προετοιμασία στήλης*
 - Φυγοκεντρείται η *NucleoSEQ*[®] στήλη για 30 sec στα 750× g ώστε να συλλεχθεί στον πυθμένα η πηκτή που βρίσκεται σε σκόνη.
 - Προστίθενται 600 μL ddH₂O και έντονη ανάδευση ώστε να ενυδατωθεί η πηκτή της στήλης.
 - Επωάζεται η στήλη για τουλάχιστον 30 min σε θερμοκρασία δωματίου (ή όλη τη διάρκεια της νύχτας - *overnight* στους 4 °C). Γίνεται ανασύσταση της πηκτής που έχει συγκεντρωθεί στον πάτο της στήλης κάνοντας έντονη ανάδευση. Δεν πρέπει να δημιουργηθούν φυσαλίδες. Αφαιρείται το πόμα που βρίσκεται στον πυθμένα της στήλης.
 - Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 min στα 750× g ώστε να αφαιρεθεί το διάλυμα αποθήκευσης που περισσεύει. Το διήθημα απορρίπτεται.
- *Φόρτωση δείγματος και καθαρισμός*
 - Η στήλη είναι πλέον έτοιμη και φορτώνεται το προϊόν της αντίδρασης των θερμικών κύκλων.
 - Η στήλη τοποθετείται σε νέο σωληνάριο τύπου *Eppendorf* 1,5 mL και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 6 min στα 750× g. Το δείγμα φυλάσσεται στους -20 °C είτε χρησιμοποιείται απευθείας.

2.6.4 Ανάλυση αλληλουχίας του DNA

Η ανάλυση της αλληλουχίας των δειγμάτων έγινε στον γενετικό αναλυτή ABI PRISM[®] 310 (Applied Biosystems, ΗΠΑ). Ο γενετικός αναλυτής ABI PRISM[®] 310 είναι ένα αυτοματοποιημένο όργανο για την ανάλυση κλασμάτων DNA τα οποία είναι επισημασμένα με φθορίζουσες ουσίες, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές.

Τα σωληνάρια στα οποία εισάγεται το δείγμα τοποθετούνται στο δίσκο του δειγματολήπτη που μπορεί να δεχτεί μέχρι 96 δείγματα. Ο δειγματολήπτης φέρνει σε επαφή το ηλεκτρόδιο της καθόδου και το ένα άκρο του τριχοειδούς που γεμίζει με πολυμερές. Το ηλεκτρόδιο της ανόδου και το άλλο άκρο του τριχοειδούς είναι βυθισμένα στο ρυθμιστικό διάλυμα. Το δείγμα εισέρχεται στο τριχοειδές καθώς ρέει το ρεύμα από την κάθοδο προς την άνοδο. Το μικρό χρονικό διάστημα της ηλεκτροφόρησης κατά το οποίο το τριχοειδές και η κάθοδος είναι βυθισμένα μέσα στο δείγμα ονομάζεται ηλεκτροκινητική έγχυση. Το δείγμα δημιουργεί μια στενή ζώνη μέσα στο τριχοειδές κατά την διάρκεια της έγχυσης. Το άκρο του τριχοειδούς κοντά στην κάθοδο είναι τοποθετημένο μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα. Εφαρμόζεται

ξανά το ρεύμα για να συνεχιστεί η ηλεκτροφόρηση. Όταν τα κλάσματα του DNA φτάσουν στο παράθυρο ανίχνευσης του τριχοειδούς, το *laser* διεγείρει τις φθορίζουσες χρωστικές ουσίες. Ο εκπεμπόμενος φθορισμός από τις ουσίες συγκεντρώνεται κάθε δευτερόλεπτο από μία ψυχρή, διπλού φορτίου κάμερα (*Charge-Coupled Device*, CCD) με συγκεκριμένου μήκους κύματος ζώνες (εικονικά φίλτρα) και αποθηκεύεται ως ψηφιακό σήμα στον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος για περαιτέρω επεξεργασία. Το *Sequencing Analysis software* μεταφράζει τα αποτελέσματα, αναγνωρίζοντας τις βάσεις από την ένταση του φθορισμού σε κάθε σημείο.

Το όργανο αυτό χρησιμοποιεί ομάδες εικονικών φίλτρων για να ανιχνεύσει την ένταση του φθορισμού σε τέσσερις μη επικαλυπτόμενες περιοχές πάνω στην κάμερα. Κάθε περιοχή αντιστοιχεί σε ένα φάσμα μηκών κύματος που περιέχει ή είναι κοντά στο μέγιστο της εκπομπής της χρωστικής που χρησιμοποιείται. Αυτή η διαδικασία είναι αντίστοιχη με την χρήση ενός φυσικού φίλτρου που χωρίζει το φως σε διαφορετικά μήκη κύματος. Εν τούτοις, οι ομάδες των φίλτρων ονομάζονται “εικονικά φίλτρα” επειδή το όργανο δεν έχει φυσικά φίλτρα ως εξαρτήματα για να κάνει τον διαχωρισμό. Για παράδειγμα, με την ομάδα εικονικών φίλτρων E το όργανο καταγράφει την ένταση του φωτός σε τέσσερις περιοχές ή “παράθυρα” κεντραρισμένα στα 540 nm, στα 570 nm, στα 595 nm και στα 625 nm. Οι θέσεις των παραθύρων σε κάθε ομάδα εικονικού φίλτρου έχει βελτιστοποιηθεί ώστε να παρέχει το μέγιστο δυνατό διαχωρισμό μεταξύ των κέντρων ανίχνευσης για τις διαφορετικές χρωστικές ενώ διατηρεί καλή ένταση σήματος.

Το *Data Collection Software* κωδικοποιεί την ένταση και το χρώμα από τις τέσσερις περιοχές συγκέντρωσης του φωτός. Αυτές εμφανίζονται σαν μπλε, πράσινες, μαύρες και κόκκινες κορυφές στα ακατέργαστα δεδομένα. Το *Sequencing Analysis Software* χρησιμοποιεί τα ίδια τέσσερα χρώματα για τα αναλυμένα δεδομένα από όλους τους συνδυασμούς των φίλτρων και των χρωστικών. Η έκθεση των χρωμάτων αναπαριστά τη σχετική, όχι την πραγματική, ανίχνευση των μηκών κύματος. Για σταθερότητα, το λογισμικό συμβολίζει πάντα στα αναλυόμενα δεδομένα το A με πράσινο, το C με μπλε, το G με μαύρο και το T με κόκκινο στο ηλεκτροφορογράφημα.

2.6.4.1 Αντιδραστήρια, Αναλώσιμα και Εξοπλισμός

- Υπερκάθαρο Φορμαμίδιο (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- Σωληνάρια τύπου *Eppendorf* 1,5 mL
- Σωληνάρια αντίδρασης 0,2 mL (Corning, ΗΠΑ)
- Επωαστήρας σωληναρίων (Grant, Αγγλία)
- Πολυμερές POP-6 (*Performance Optimized Polymer 6*) (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- Τριχοειδές 47 mm (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- Γενετικός Αναλυτής ABI PRISM[®] 310 (Applied Biosystems, ΗΠΑ)

2.6.4.2 Πειραματική πορεία

Για την ανάλυση της αλληλουχίας ακολουθείται η παρακάτω πορεία:

- Τοποθετείται σε σωληνάριο τύπου *Eppendorf* 1,5 mL 10 μL από το καθαρό προϊόν της αντίδρασης των θερμικών κύκλων και 10 μL υπερκαθαρό φορμαμίδιο.
- Το μείγμα επωάζεται στους 95 °C για 2 min και στην συνέχεια στους 4 °C για άλλα 2 min.
- Τέλος, το μείγμα μεταφέρεται σε σωληνάρια αντίδρασης 0,2 mL και φορτώνεται στον γενετικό αναλυτή ABI PRISM[®] 310.

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν για την ισομορφή C από την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR με τους εκκινητές που σχεδιάσαμε, αναλύθηκαν περαιτέρω με το πρόγραμμα *Chromas Lite* (Technelysium Pty, Αυστραλία) και συγκρίθηκαν μέσω του διαδικτυακού εργαλείου BLAST[®] του NCBI με τις θεωρητικά αναμενόμενες προκειμένου να επιβεβαιωθούν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Αποτελέσματα

3.1 Παρασκευή standards και καμπύλες βαθμονόμησης

3.1.1 Καμπύλη βαθμονόμησης για το γενικό *COL11A1* μετάγραφο

Το πυκνό διάλυμα του γενικού *COL11A1* μεταγράφου περιέχει τμήμα DNA με γνωστό αριθμό βάσεων καθώς έχει ενισχυθεί περιοχή 132 bp του mRNA της ισομορφής άρα έχει γνωστό μοριακό βάρος. Το μοριακό βάρος των 132 bp μπορεί να υπολογιστεί από το γινόμενο:

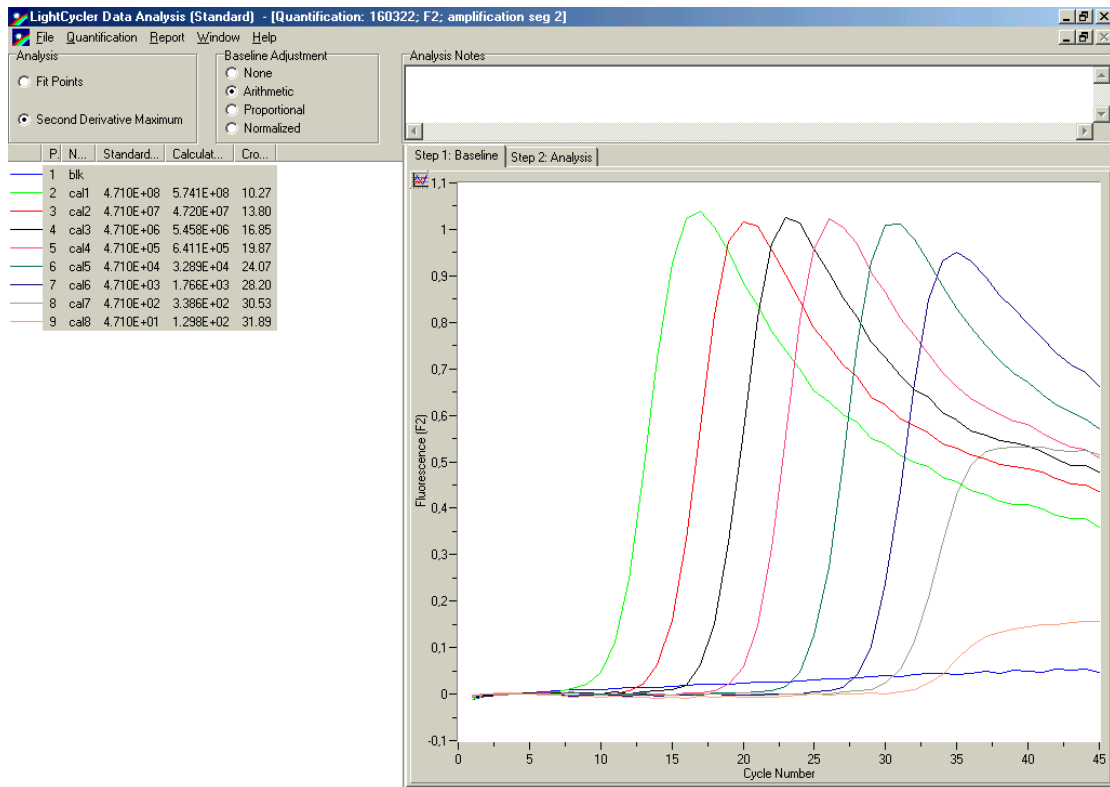
$$MB_A = 132 \times 660 \Rightarrow MB_{\text{general}} = 87.120$$

Γνωρίζουμε όμως ότι 1 *mole* μιας ουσίας περιέχει $6,023 \times 10^{23}$ μόρια. Η συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος για την ισομορφή A που μετρήθηκε με το φθορισμόμετρο *Qubit*[®] είναι ίση με 0,232 ng/μL. Επομένως, η συγκέντρωση του διαλύματος σε αντίγραφα/μL υπολογίζεται γνωρίζοντας ότι σε 1 *mole* ουσίας περιέχονται $6,023 \times 10^{23}$ μόρια (αντίγραφα DNA) άρα έχουν μάζα 87.120 g (87×10^{12} ng).

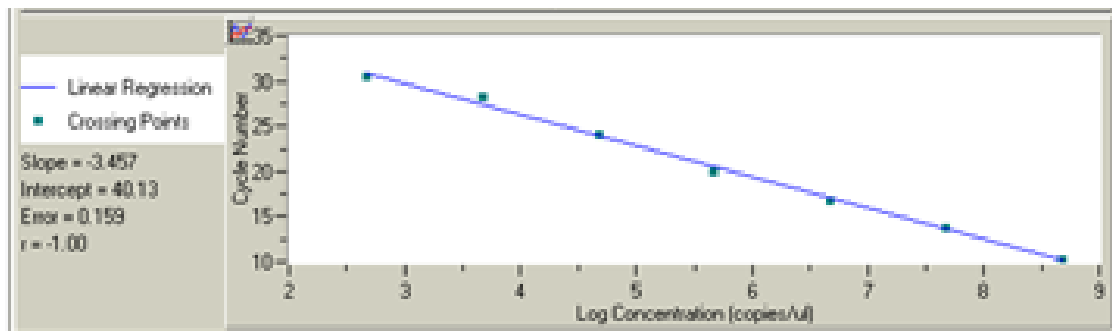
Άρα, αναλογικά προκύπτει ότι το πυκνό διάλυμα για το γενικό μετάγραφο περιέχει $4,7 \times 10^8$ αντίγραφα/μL.

Ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις των πυκνών διαλυμάτων και κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.

Το εύρος των συγκεντρώσεων που συμμετείχαν στην δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης του γενικού μεταγράφου ήταν από 5×10^8 αντίγραφα/μL έως 5×10^1 αντίγραφα/μL. Το εύρος των συγκεντρώσεων που συμμετείχαν στην δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης της ισομορφής C ήταν από 5×10^5 αντίγραφα/μL έως 5×10^1 αντίγραφα/μL (εικόνα 3.1 και 3.2).



Εικόνα 3.1: Πρότυπη καμπύλη για το γενικό μετάγραφο του *COL11A1*.



Εικόνα 3.2: Ανάλυση της πρότυπης καμπύλης του γενικού μεταγράφου του *COL11A1*.

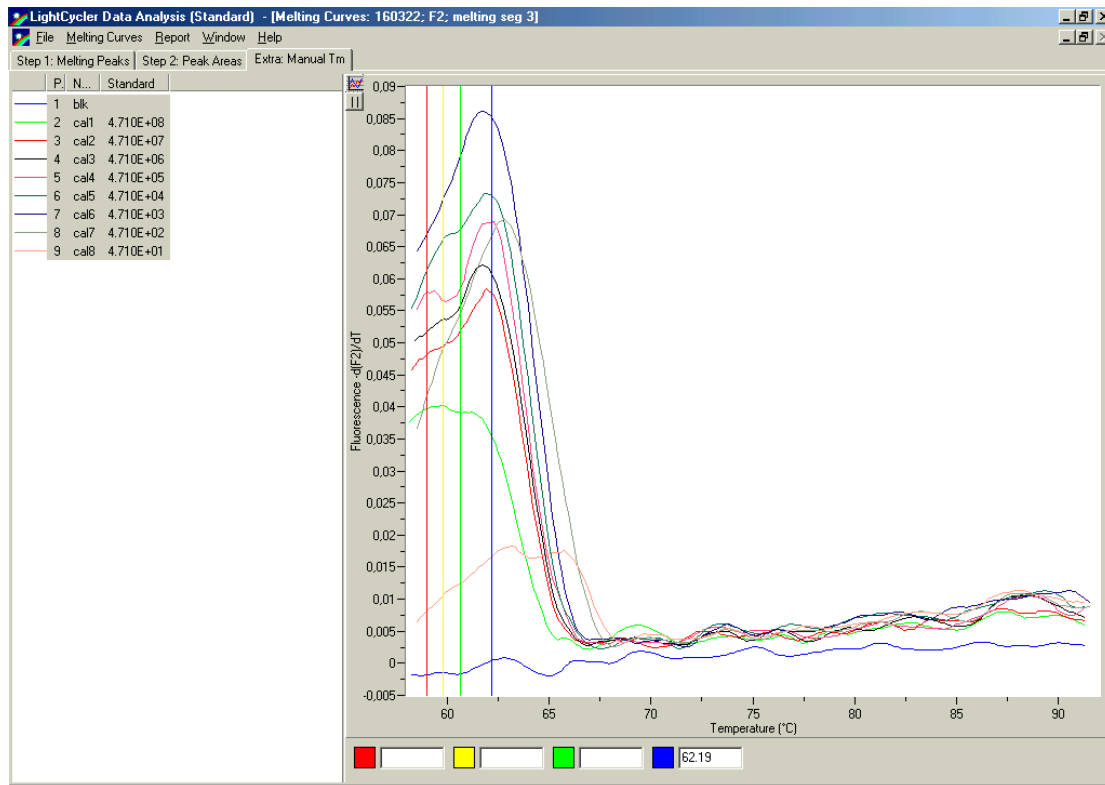
Από την ανάλυση της πρότυπης καμπύλης για το γενικό μετάγραφο του *COL11A1* προκύπτουν τα παρακάτω δεδομένα:

- Slope: 3,457
- Intercept: 40,13
- Error: 0,159
- r= 1,00

Επομένως η καμπύλη που προκύπτει είναι: $\log C_{\text{gen}} = 3,45 (Cq) + 40,13$

Υπολογίζεται η απόδοση (efficiency) της παραπάνω καμπύλης στο 1,95.

Επιπλέον, βρέθηκε το T_m μέσω melting curve analysis για το γενικό μετάγραφο του *COL11A1* στους 62,19°C ($\pm 1,03$).



Εικόνα 3.3: Σημείο τήξης γενικού COL11A1 μεταγράφου.

3.1.2 Καμπύλη βαθμονόμησης για την ισομορφή C

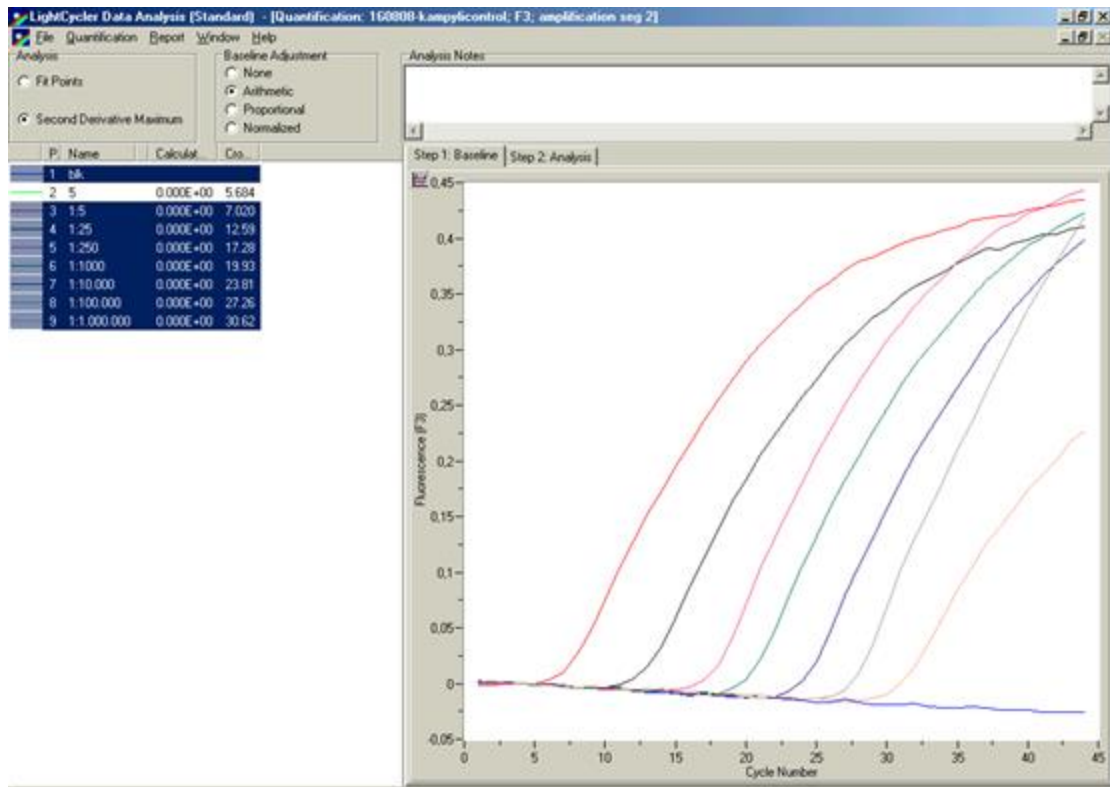
Το πυκνό διάλυμα της ισομορφής C περιέχει τμήμα DNA με γνωστό αριθμό βάσεων καθώς έχει ενισχυθεί περιοχή 259 bp του mRNA της ισομορφής άρα έχει γνωστό μοριακό βάρος. Το μοριακό βάρος των 259 bp μπορεί να υπολογιστεί από το γινόμενο:

$$MB_E = 206 \times 660 \Rightarrow MB_C = 135.960$$

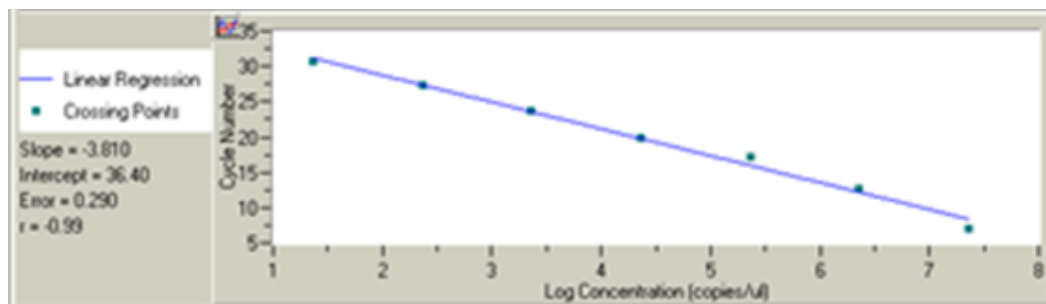
Γνωρίζουμε όμως ότι 1 mole μιας ουσίας περιέχει $6,023 \times 10^{23}$ μόρια. Η συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος για την ισομορφή E που μετρήθηκε με το φθορισμόμετρο Qubit[®] είναι ίση με 0,0535 ng/μL. Επομένως, η συγκέντρωση του διαλύματος σε αντίγραφα/μL υπολογίζεται γνωρίζοντας ότι 1 mole ουσίας περιέχονται $6,023 \times 10^{23}$ μόρια (αντίγραφα DNA) άρα έχουν μάζα 135.960 g (135×10^{12} ng).

Άρα, αναλογικά προκύπτει ότι το πυκνό διάλυμα για την ισομορφή C περιέχει $2,37 \times 10^8$ αντίγραφα/μL.

Για την ισομορφή C κατασκευάστηκε η παρακάτω πρότυπη καμπύλη (εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4: Πρότυπη καμπύλη για την ισομορφή C.



Εικόνα 3.5: Ανάλυση της πρότυπης καμπύλης της ισομορφής C.

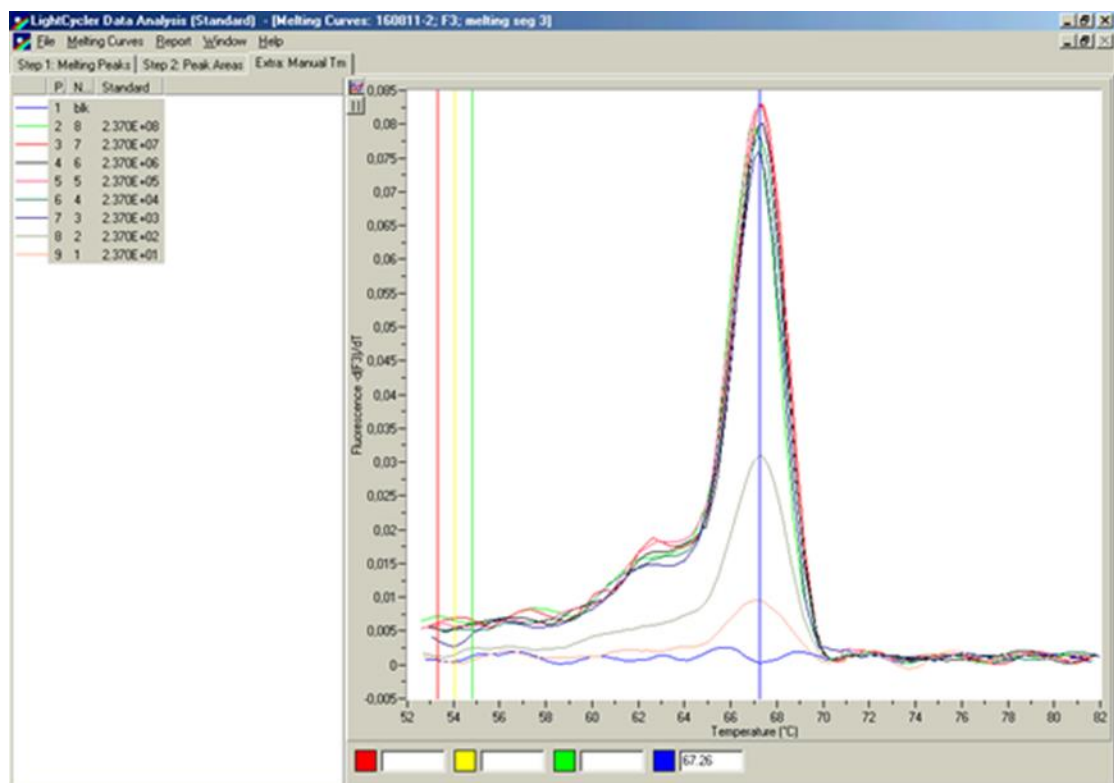
Από την ανάλυση της πρότυπης καμπύλης (εικόνα 3.5) για το C μετάγραφο του *COL11A1* προκύπτουν τα παρακάτω δεδομένα:

- Slope: 3,810
- Intercept: 36,40
- Error: 0,290
- r= 0,93

Επομένως η καμπύλη που προκύπτει είναι: $\log C_{ISOA} = 3,81 (cQ) + 36,40$

Υπολογίζεται η απόδοση της παραπάνω καμπύλης στο 1,83.

Επιπλέον, βρέθηκε το Tm μέσω melting curve analysis για την ισομορφή C στους 67,3°C (±0,15) (εικόνα 3.6).

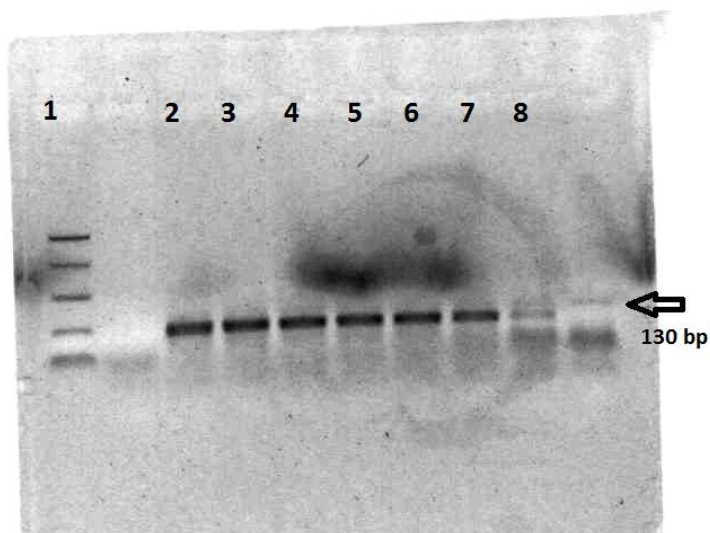


Εικόνα 3.6: Σημείο τήξης ισομορφής C.

3.2 Επιβεβαίωση PCR προϊόντος με ηλεκτροφόρηση σε gel

3.2.1 Επιβεβαίωση PCR προϊόντος για το γενικό μετάγραφο του *COL11A1*

Τα προϊόντα που προέκυπταν από την real-time qPCR αποθηκεύονταν και στη συνέχεια ηλεκτροφορούσαν σε gel αгарόζης 2%, σύμφωνα με τη μέθοδο που παρουσιάστηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Το PCR προϊόν είναι καθαρό χωρίς παραπροϊόντα και έχει το αναμενόμενο μέγεθος.

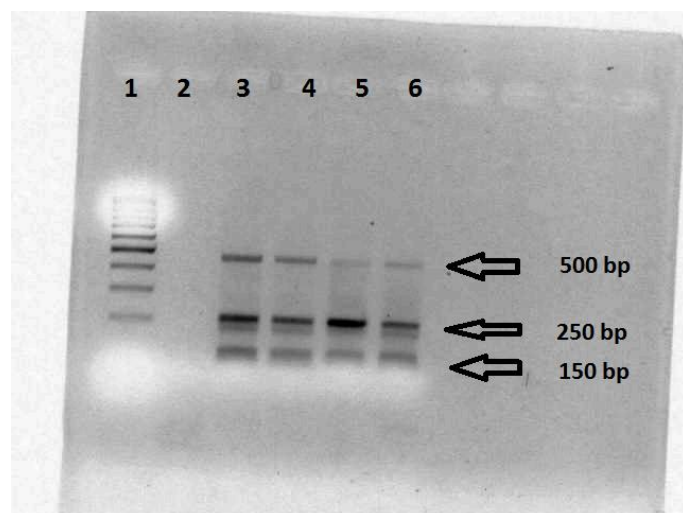


Εικόνα 3.7: Ηλεκτροφόρηση των standards του γενικού μεταγράφου του COL11A1.

Θέση 1: PCR Marker, Θέση 2-8 standards $4,7 \times 10^8$ έως $4,7 \times 10^2$

3.2.2 Επιβεβαίωση PCR προϊόντος για την ισομορφή C

Τα προϊόντα που προέκυπταν από την real-time PCR αποθηκεύονταν και στη συνέχεια ηλεκτροφορούσαν σε gel αγαρόζης 2%, σύμφωνα με τη μέθοδο που παρουσιάστηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο.



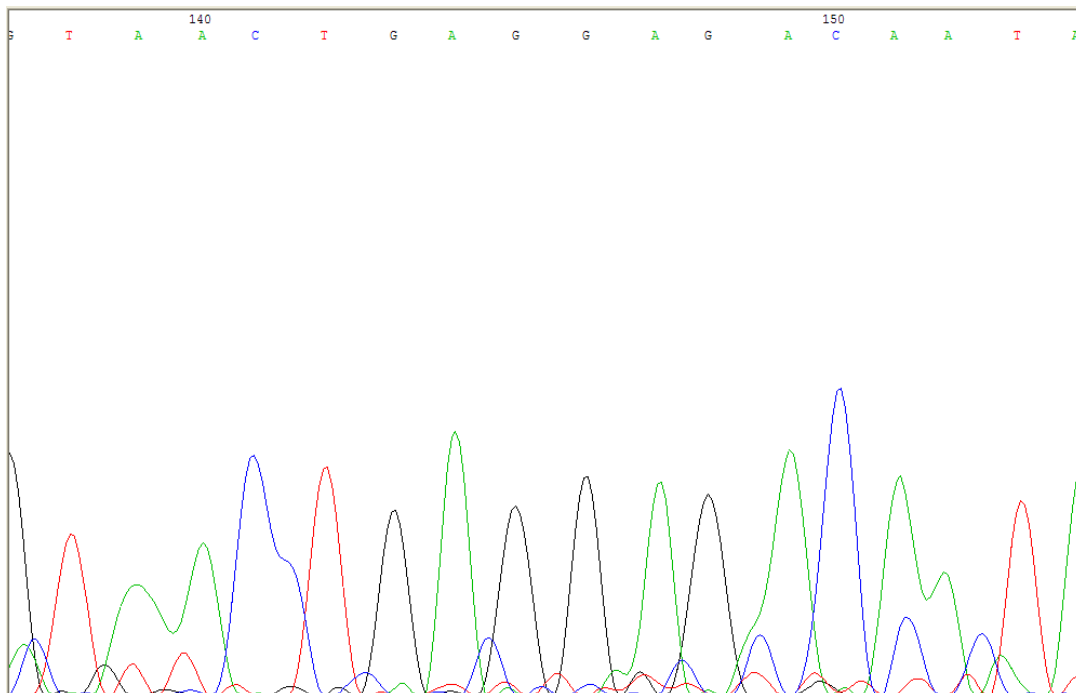
Εικόνα 3.8: Ηλεκτροφόρηση των standards της ισομορφής C.

Θέση 1: 1 kb DNA Ladder marker, Θέση 2: blank, Θέση 3-6: standards $2,3 \times 10^8$ έως $4,7 \times 10^5$

Κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των standards της ισομορφής C, παρατηρήθηκε η δημιουργία τριών μπαντών με μοριακά βάρη, 500, 250 και 150bp. Είναι γνωστό, ότι η ισομορφή C παράγει προϊόν ίσο με 248 bp, επομένως το επιθυμητό προϊόν αφορά την μεσαία μπάντα που δημιουργήθηκε κατά την ηλεκτροφόρηση. Το γεγονός αυτό, επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια και με DNA sequencing, όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια.

3.3 Επιβεβαίωση ισομορφής C μέσω DNA sequencing

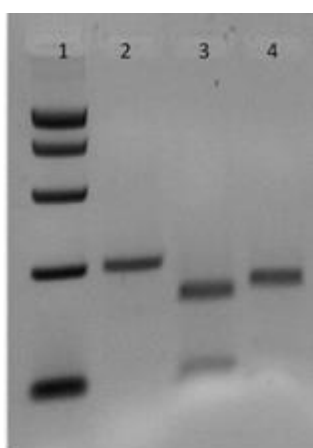
Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, η επιβεβαίωση της ύπαρξης της ισομορφής C πραγματοποιήθηκε μέσω DNA sequencing μετά από gel cut. Πιο συγκεκριμένα, η μία από τις τρεις μπάντες του gel κόπηκαν με νυστέρι υπό τη χρήση χαμηλής (70%) UV ακτινοβολίας. Το κομμάτι αυτό που προέκυψε, τοποθετήθηκε σε eppendorf με ρυθμιστικό διάλυμα. Στη συνέχεια, μετά τον καθαρισμό του προϊόντος από το gel, το προϊόν υπέστη πάλι real-time qPCR και ηλεκτροφόρησης, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι το προϊόν που κόπηκε, απομονώθηκε επιτυχώς. Στην παρακάτω *εικόνα 3.9* παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σύγκρισης των αλληλουχιών του DNA, που προκύψαν από την ανάλυση της αλληλουχίας για τις δύο ισομορφές, με το διαδικτυακό εργαλείο BLAST[®].



Εικόνα 3.9: Αλληλούχηση DNA της ισομορφής C.

3.4 Επιβεβαίωση του γενικού μεταγράφου του *COL11A1* μέσω πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Στην παρακάτω εικόνα 3.10 παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων για το γενικό μετάγραφο και των προϊόντων πέψης του με τα περιοριστικά ένζυμα *HaeIII* και *MnlI*.



Εικόνα 3.10: Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων για περιοχή του γονίδιου *COL11A1*.

Θέση 1: δείκτης μοριακών βαρών PCR Marker, Θέση 2: PCR προϊόν *COL11A1* (132 bp), Θέση 3: προϊόν πέψης με *HaeIII* (96 bp και 36 bp), Θέση 4: προϊόν πέψης με *MnlI* (107 bp και 25 bp).

3.5 Βελτιστοποιήσεις μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού του γενικού *COL11A1* μεταγράφου και της ισομορφής C

3.5.1 Βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας υβριδισμού εκκινητών της αντίδρασης

Για το γενικό *COL11A1* μετάγραφο, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών καθορίστηκε στους 50 °C, ενώ πραγματοποιήθηκε σύγκριση με θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών στους 53°C και 55°C. Ωστόσο, η ένταση του φθορισμού ήταν μεγαλύτερη στους 50 °C.

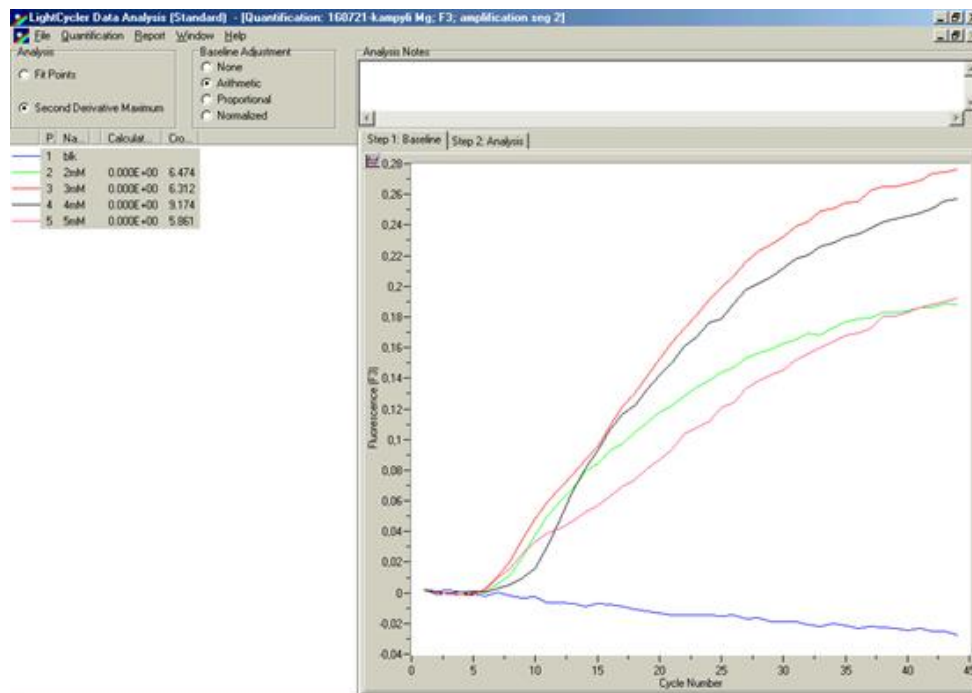
Για την ισομορφή C, η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών καθορίστηκε στους 52 °C ενώ πραγματοποιήθηκε σύγκριση με θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών στους 55 °C. Ωστόσο, η ένταση του φθορισμού ήταν μεγαλύτερη στους 52 °C.

3.5.2 Βελτιστοποίηση της τελικής συγκέντρωσης των ανιχνευτών

Προκειμένου οι μεθοδολογίες του ποσοτικού προσδιορισμού να γίνουν οικονομικά πιο προσιτές, δοκιμάστηκαν διαφορετικές τελικές συγκεντρώσεις των ανιχνευτών. Για το γενικό *COL11A1* μετάγραφο, η τελική συγκέντρωση των ανιχνευτών καθορίστηκε στα 0,5 μM. Για την ισομορφή C, η τελική συγκέντρωση των ανιχνευτών καθορίστηκε στα 0,18 μM.

3.5.3 Βελτιστοποίηση της τελικής συγκέντρωσης των ιόντων MgCl₂

Για την μελέτη της επίδρασης της τελικής συγκέντρωσης των ιόντων MgCl₂ στην αντίδραση της Real-time qPCR κατασκευάστηκαν καμπύλες συγκέντρωσης ιόντων τόσο για το γενικό *COL11A1* μετάγραφο, όσο και για την ισομορφή C. Πιο συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 2mM, 3mM, 4mM, 5mM. Για το γενικό *COL11A1* μετάγραφο βέλτιστη συγκέντρωση ήταν αυτή των 3mM, η οποία χρησιμοποιήθηκε και στα περαιτέρω πειράματα των υπόλοιπων δειγμάτων. Το ίδιο αποτέλεσμα ισχύει και για την ισομορφή C, όπως παρουσιάζεται στην *εικόνα 3.11*.

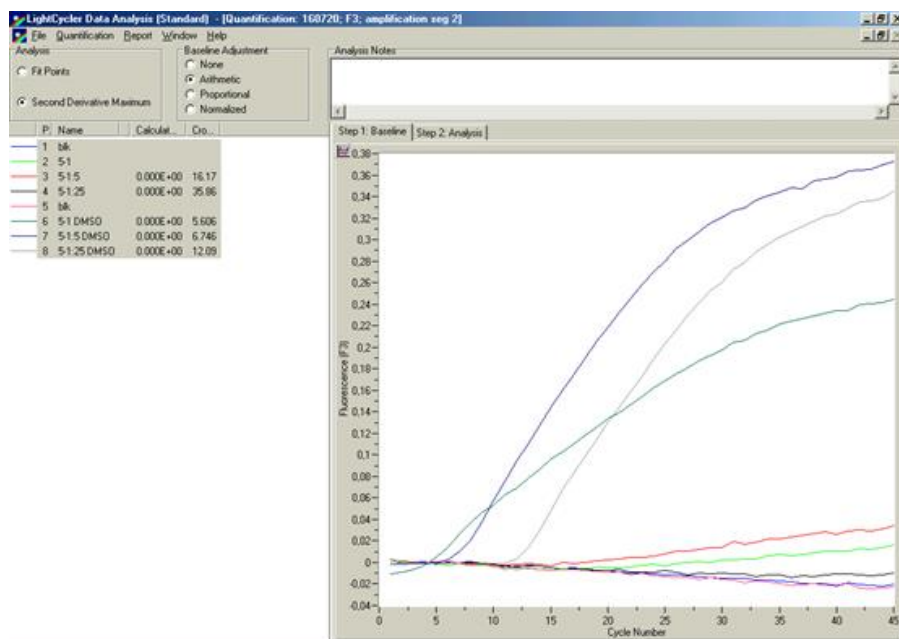


Εικόνα 3.11: Καμπύλη διαφορετικών συγκεντρώσεων $MgCl_2$.

3.5.4 Βελτιστοποίηση την παραγωγής των προϊόντων με τη χρήση DMSO

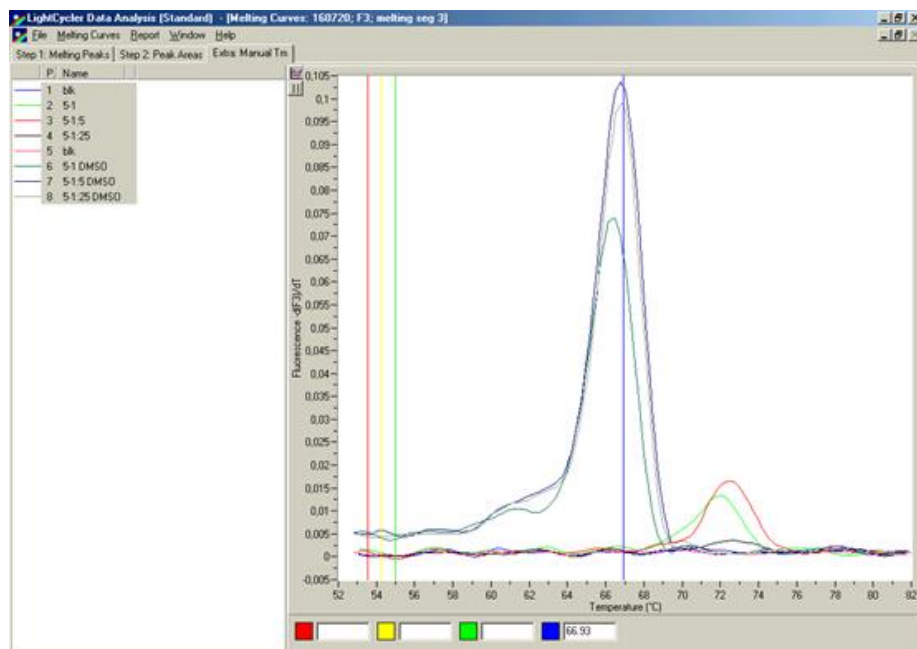
Για το γενικό *COLL1A1* μεταγράφο, δοκιμάστηκε real-time qPCR στις ίδιες συνθήκες, με και χωρίς DMSO. Παρατηρήθηκε ότι με τη χρήση DMSO, η ανίχνευση του προϊόντος του γενικού μεταγράφου ήταν πολύ μικρότερη, από ότι χωρίς την χρήση αυτού. Επομένως, το συγκεκριμένο πρωτόκολλο δεν επωφελήθηκε από την δράση του DMSO.

Κατά την πρώτη απόπειρα ανίχνευσης της ισομορφής C, η εκθετική φάση παρατηρήθηκε στον 40ό κύκλο. Προκειμένου να γίνει ανίχνευση των προϊόντων νωρίτερα, δοκιμάστηκε η χρήση DMSO, που αποτελεί σταθεροποιητικό παράγοντα, η οποία εμφανώς βοήθησε την ανίχνευση τους ακόμα και 10 κύκλους νωρίτερα, όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 3.12: Χρήση DMSO στην ανίχνευση της ισομορφής C.

Παρατηρούμε ότι το σημείο τήξης αλλάζει από τους 72°C στους 67°C, εφόσον μεταβάλλονται και οι συνθήκες του πειράματος.



Εικόνα 3.13: Σημείο τήξης για την ισομορφή C έπειτα από χρήση DMSO.

3.5.5 Βελτιστοποίηση του αριθμού των κύκλων της αντίδρασης

Οι κύκλοι και για τις δύο αντιδράσεις Real-time qPCR καθορίστηκαν στους 45. Δοκιμάστηκαν κύκλοι αντίδρασης 35, 42 και 45. Στους κύκλους 35 και 42 η ένταση του φθορισμού δεν ήταν ιδιαίτερα υψηλή ενώ στους 45 κύκλους η αντίδραση άρχισε να εμφανίζει έντονη φάση κορεσμού.

3.6 Ποσοτικός προσδιορισμός του γενικού μετάγραφου του *COL11A1* στα δείγματα της ανιούσης αορτής

3.6.1 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού RNA και σύνθεση του cDNA

Στην παρούσα εργασία, απομονώθηκε ολικό RNA από 50 ιστούς από ανευρίσματα ανιούσης αορτής και πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός του ολικού RNA φθορισμομετρικά με το φθορισμόμετρο *Qubit*[®]. Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζονται η συγκέντρωση του ολικού RNA για κάθε δείγμα.

Πίνακας 3.1: Μέτρηση συγκέντρωσης RNA δειγμάτων.

ΔΕΙΓΜΑ	RNA ng/μL	ΔΕΙΓΜΑ	RNA ng/μL
1	42,2	26	20,8
2	53	27	19,1
3	119,6	28	10,8
4	85,1	29	35,7
5	5,1	30	49,4
6	4	31	27,9
7	105,6	32	17,3
8	17,4	33	51,7
9	14	34	15
10	40	35	19,3
11	1,1	36	39,1
12	85,3	37	33
13	5,8	38	88,7
14	47,8	39	41,1
15	16,4	40	7,2
16	3,7	41	77,6
17	58,8	42	30,9
18	23,7	43	30,3
19	9,7	44	72,9
20	41,2	45	59,3
21	33,3	46	65,6
22	51,2	47	140
23	23,6	48	69,3
24	73,6	49	5,44
25	84,1	50	36,7

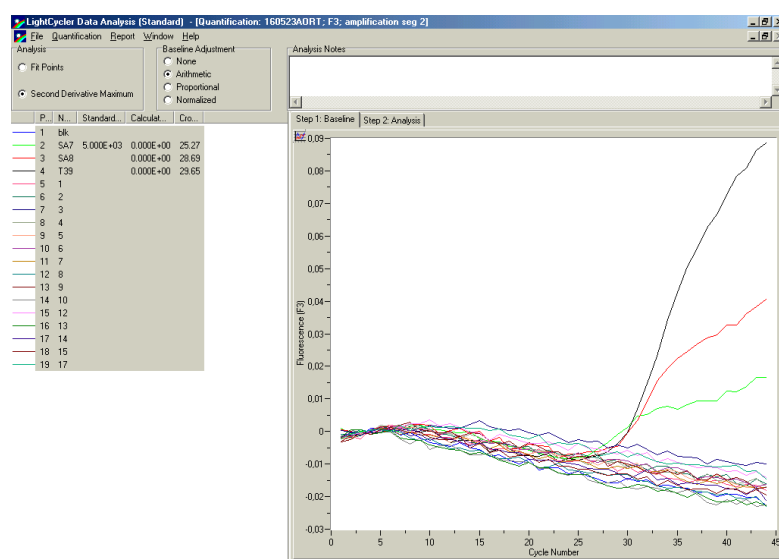
3.6.2 real-time qPCR αντιδράσεις για το γενικό μετάγραφο του γονιδίου *COL11A1* και των ισομορφών του στα δείγματα των ανευρισμάτων ανιούσης αορτής

3.6.2.1 PCR αντίδραση για γενική ανίχνευση του *COL11A1* mRNA

Πραγματοποιήθηκε real-time qPCR για την ποσοτική ανίχνευση του μεταγραφήματος του γονιδίου *COL11A1*, η οποία ωστόσο κατέστη ανεπιτυχής, αφού κανένα από τα δείγματα δεν έδωσε προϊόν. Η εικόνα αυτή επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πηκτή αγαρόζης 2 % w/v.

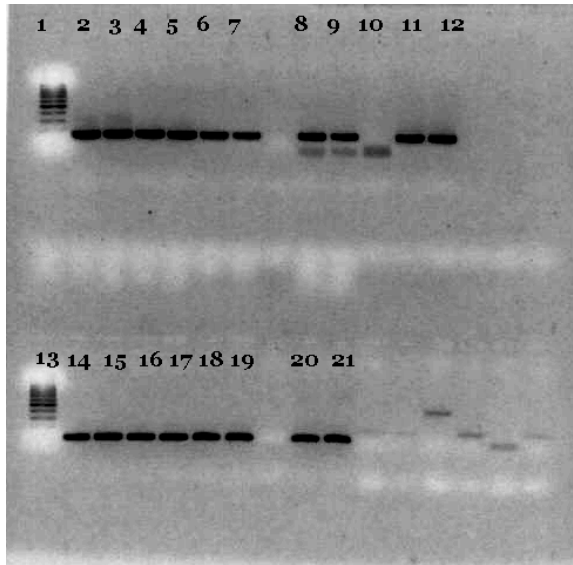
3.6.2.2 real-time qPCR αντίδραση για ανίχνευση των ισομορφών A και E του γονιδίου *COL11A1*

Πραγματοποιήθηκε real-time qPCR για τις δύο ισομορφές A και E, ωστόσο δεν βρέθηκε κανένα προϊόν. Τα παραπάνω αποτελέσματα κάθε δείγμα επιβεβαιώθηκαν και με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης 2 % w/v.



Εικόνα 3.14: Real-time qPCR ισομορφής A για τα δείγματα των ανευρισμάτων της αορτής.

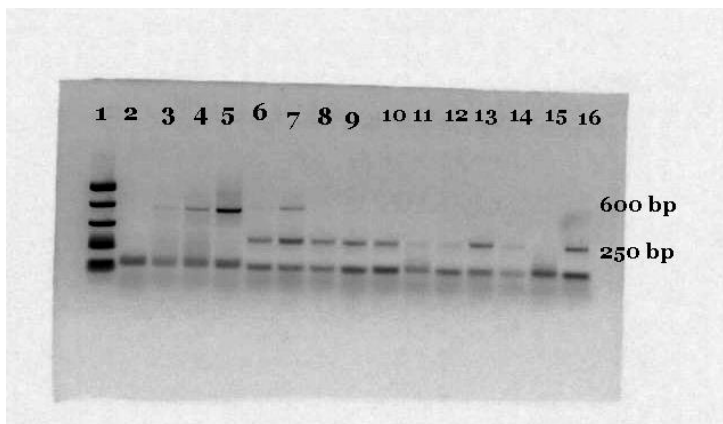
Όλα τα δείγματα είναι αρνητικά, εκτός από τα standards.



Εικόνα 3.15: Ηλεκτροφόρηση ανεπιτυχούς PCR σε πηκτή αγαρόζης 2% για την ισομορφή A.

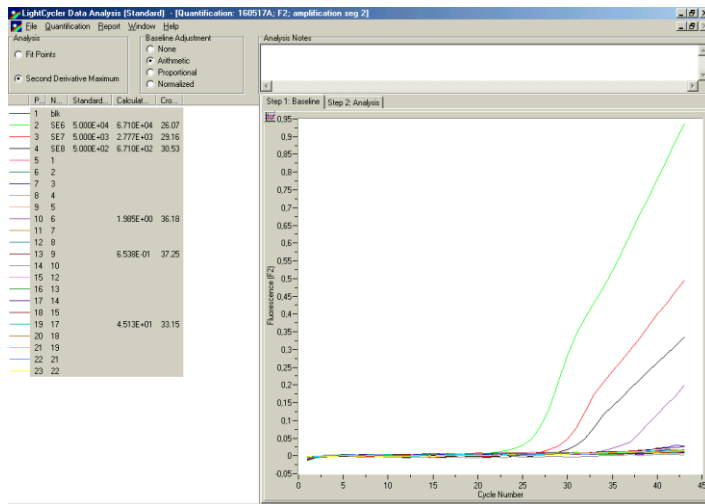
Θέσεις 1,13: 1 kb DNA Marker Ladder, Υπόλοιπες θέσεις: δείγματα ανευρισμάτων ανιούσης αορτής

Σε ορισμένα δείγματα αορτής, κατά την ηλεκτροφόρηση παραγόταν ένα διαφορετικό προϊόν από το αναμενόμενο, μεγέθους 250bp, το οποίο δεν ανιχνευόταν από την real-time PCR αντίδραση (Εικόνα 3.15A).



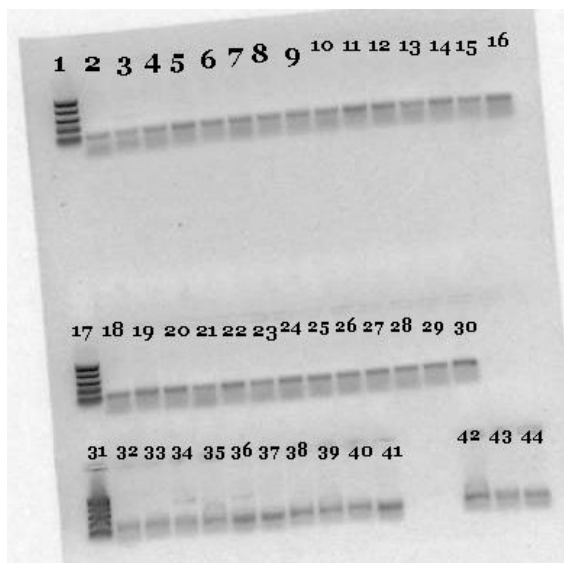
Εικόνα 3.15A: Ηλεκτροφόρηση ανεπιτυχούς PCR σε πηκτή αγαρόζης 2% για την ισομορφή A.

Ομοίως για την ισομορφή E τα αποτελέσματα ήταν παρεμφερή.



Εικόνα 3.16: Real-time qPCR για την ισομορφή E για τα δείγματα των ανευρισμάτων της αορτής.

Όλα τα δείγματα είναι αρνητικά, εκτός από τα standards.



Εικόνα 3.17: Ηλεκτροφόρηση ανεπιτυχούς PCR σε πηκτή αγαρόζης 2% για την ισομορφή E.

Θέσεις 1,13: 1 kb DNA Marker Ladder, Υπόλοιπες θέσεις: δείγματα ανευρισμάτων ανιούσης αορτής

Τα παραπάνω αποτελέσματα για τις δύο ισομορφές ήταν αναμενόμενα, καθώς ούτε στο γενικό μετάγραφο του *COL1A1* είχε βρεθεί προϊόν. Ωστόσο μια πιθανή αποτυχία της μεθόδου κατά το στάδιο της απομόνωσης του RNA αποκλείεται, καθώς μετά το πέρας της απομόνωσης αυτό μετρήθηκε και σε αρκετά δείγματα ήταν και αυξημένο. Επιπλέον, η μέθοδος της real-time qPCR δοκιμάστηκε και βελτιστοποιήθηκε και σε προηγούμενα δείγματα του καρκίνου του μαστού.

Επομένως, θεωρείται πιθανό στα ανευρίσματα της αορτής, το κολλαγόνο XI να βρίσκεται σε ελάχιστη ποσότητα ή απουσιάζει εντελώς.

3.7 Ποσοτικός προσδιορισμός του γενικού μετάγραφου του *COL11A1* στα του καρκίνου του πνεύμονα

3.7.1 Κλινικοπαθολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά δείγματος μελέτης

Διατέθηκαν 27 cDNA δείγματα από ιστούς πνεύμονα ασθενών με γνωστά ιστοπαθολογικά δεδομένα. Δόθηκαν στοιχεία που αφορούσαν τον ιστολογικό τύπο, δηλαδή εάν επρόκειτο για καρκινικό ιστό ή παρακείμενη του καρκίνου περιοχή, τον τύπο του καρκινώματος (αδενοκαρκίνωμα, πλακώδες, βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα, καρκίνωμα μεγάλου κυττάρου, καρκινοσάρκωμα), το στάδιο του καρκίνου (IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IV) τόσο πριν την χειρουργική αφαίρεση, όσο και μετά, τα στοιχεία του ασθενή (ημερομηνία και αιτία θανάτου), την ύπαρξη μετάστασης καθώς και την επανεμφάνισή του. Οκτώ από αυτά ήταν από παρακείμενες του καρκίνου περιοχές (control) και 19 από καρκίνο του πνεύμονα. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών.

ID	DATE OF OPERATION	SAMPLE TYPE1	HISTOLOGY1	NEW STAGE1	OLD STAGE	PATIENT DATA	RECURRENCE1	METASTASI
L53	12/16/2009	CONTROL	CONTROL	IB(T2aN0M0)	IB	ALIVE	NO	NO
L34	7/15/2009	CONTROL	CONTROL	IIIA(T2bN2M0)	IIIA	ALIVE	NO	NO
L37	10/14/2009	CONTROL	CONTROL			ALIVE		
L26	9/28/2009	CONTROL	CONTROL	IIA(T2aN1M0)	IIB	ALIVE	NO	NO
L48	9/21/2009	CONTROL	CONTROL			ALIVE		
L18	4/14/2008	CONTROL	CONTROL	IA(T1aN0M0)	IA	ALIVE	NO	NO
L7	9/22/2008	CONTROL	CONTROL	IIA(T2bN0M0)	IB	DEAD FROM DISEASE 4/09	YES	NO
L10	12/22/2008	CONTROL	CONTROL	IIB(T3N1M0)	IIB	ALIVE	NO	NO
L1	4/22/2009	TUMOR	SQUAMOUS	IIB(T3N1M0)	IIB	DEAD (DEATH CAUSE PULMON	NO	NO
L2	12/22/2008	TUMOR	CARCINOSARCOMA	IIB(T3N1M0)	IIB	ALIVE	NO	NO
L5	10/8/2008	TUMOR	ADENOCA	IV(T2NXM1)	IV	DEAD FROM DISEASE 12/9	YES	YES
L6	9/22/2008	TUMOR	SQUAMOUS	IIA(T2bN0M0)	IB	DEAD FROM DISEASE 4/09	YES	NO
L13	9/1/2008	TUMOR	ADENOCA	IIB(T2bN1M0)	IIB	ALIVE	NO	NO
L14	9/22/2008	TUMOR	ADENOCA	IIA(T1bN1M0)	IIA	DEAD WITH RECURRENCE 5/20	YES	NO
L16	11/19/2008	TUMOR	ADENOCA	IA(T1bN0M0)	IA	ALIVE	NO	NO
L25	9/28/2009	TUMOR	ADENOCA	IIA(T2aN1M0)	IIB	ALIVE	NO	NO
L27	7/15/2009	TUMOR	SQUAMOUS	IIIA(T2bN2M0)	IIIA	ALIVE	NO	NO
L28	7/15/2009	TUMOR	ADENOCA	IIA(T2bN1M0)	IIB	ALIVE	NO	NO
L30	9/16/2009	TUMOR	ADENOCA	IA(T1bN0M0)	IA			NO
L32	10/5/2009	TUMOR	LARGE CELL	IIA(T2aN1M0)	IIB	ALIVE	NO	NO
L35	8/5/2009	TUMOR	SQUAMOUS	IIA(T2BN0M0)	IB			NO
L36	7/15/2009	TUMOR	ADENOCA	IV(T3N0M1)	IV(T3N0M1)	ALIVE	YES	YES
L38	5/18/2009	TUMOR	SQUAMOUS	IIIA(T3N0M0)	IB			NO
L42	11/12/2009	TUMOR	SQUAMOUS	IIIA(T3N0M0)	IIIA	ALIVE	NO	NO
L45	6/22/2009	TUMOR	ADENOCA	IIB(T3N0M0)	IIB			NO
L52	1/9/2010	TUMOR	ENOCA	IIA(T2bN0M0)	IB	ALIVE	NO	NO
L54	12/16/2009	TUMOR	LARGE CELL	IB(T2aN0M0)	IB	ALIVE	NO	NO

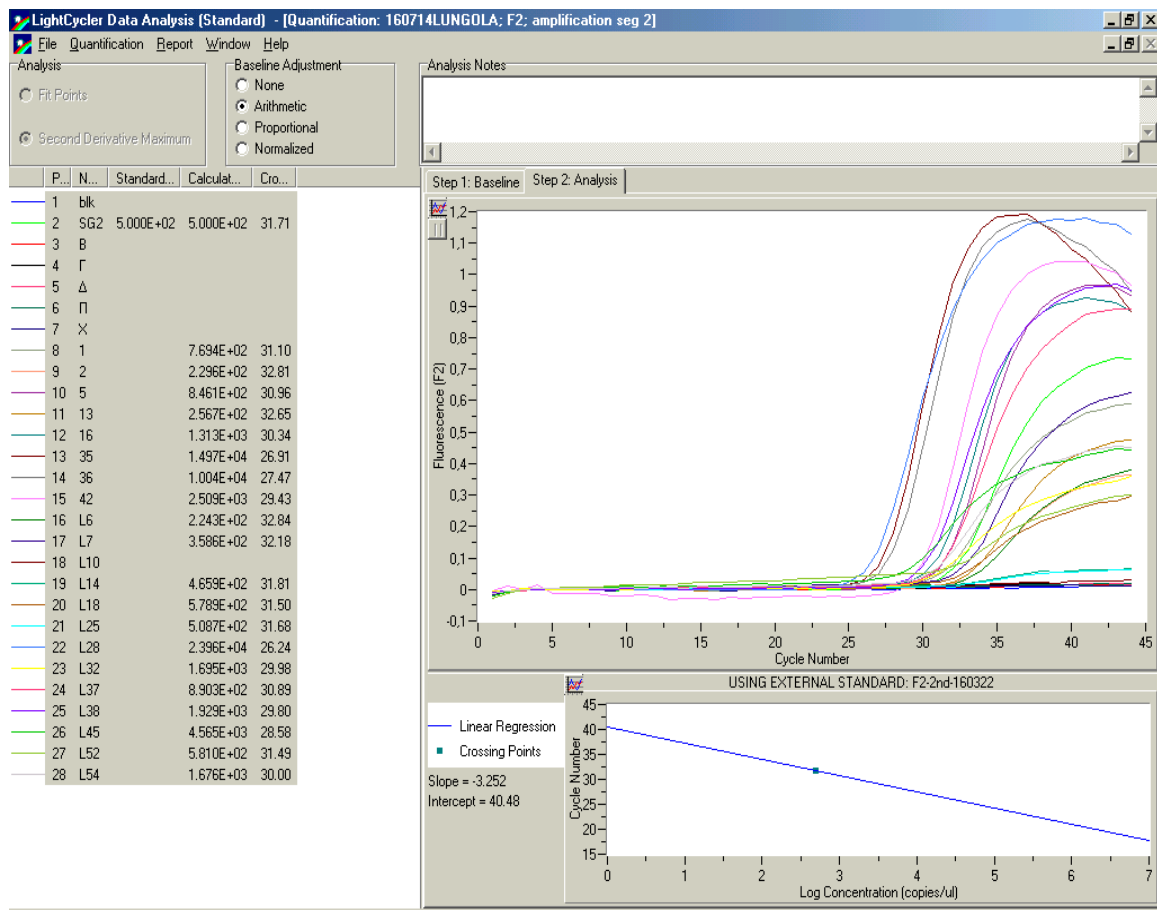
(Συντμήσεις: adenoca: αδενοκαρκίνωμα, squamous: πλακώδες, epoca: βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα (υπότυπος αδενοκαρκινώματος), large cell: μεγάλου κυττάρου, carcinosarcoma: καρκινοσάρκωμα)

3.7.2 real-time qPCR αντιδράσεις για το γονίδιο *COL11A1* στα δείγματα του καρκίνου του πνεύμονα

Διατέθηκαν 27 cDNA δείγματα από ιστούς πνεύμονα ασθενών με γνωστά ιστοπαθολογικά δεδομένα (τύπος, στάδια, κλπ). Οκτώ από αυτά ήταν από παρακείμενες του καρκίνου περιοχές (control) και 19 από καρκίνο του πνεύμονα. Για τα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε real-time qPCR αντιδράσεις τόσο για το γενικό μετάγραφο του *COL11A1* όσο και για τις ισομορφές του A, E και C.

3.7.2.1 PCR αντίδραση για γενική ανίχνευση του *COL11A1* mRNA

Αναπτύχθηκε real-time qPCR μέθοδος για τα δείγματα του καρκίνου του πνεύμονα, τόσο των καρκινικών δειγμάτων, όσο και των control. Παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα που αποτελούσαν control, απουσίαζε πλήρως το γενικό μετάγραφο του *COL11A1*.

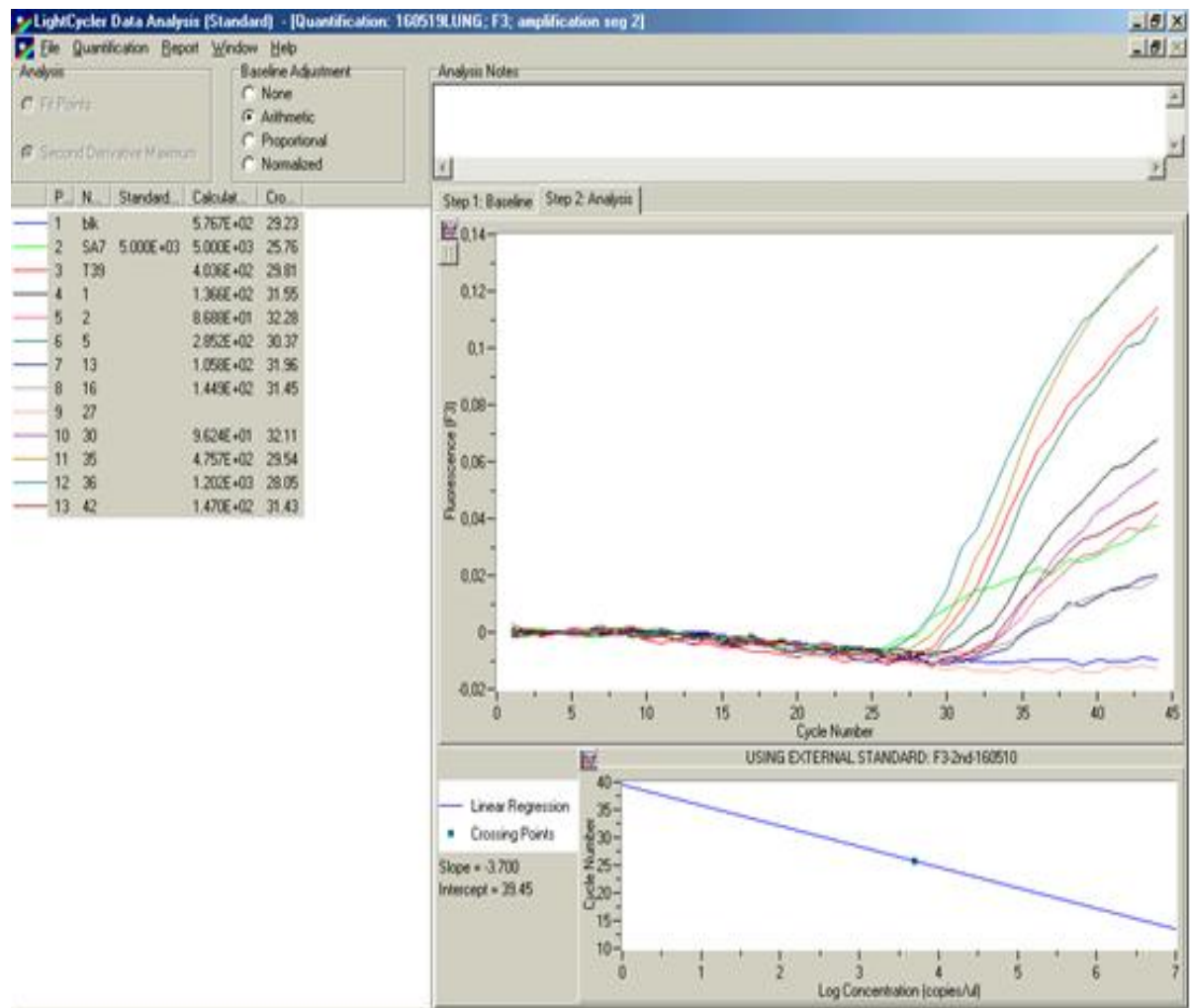


Εικόνα 3.18: real-time qPCR για το γενικό μετάγραφο του COL11A1.

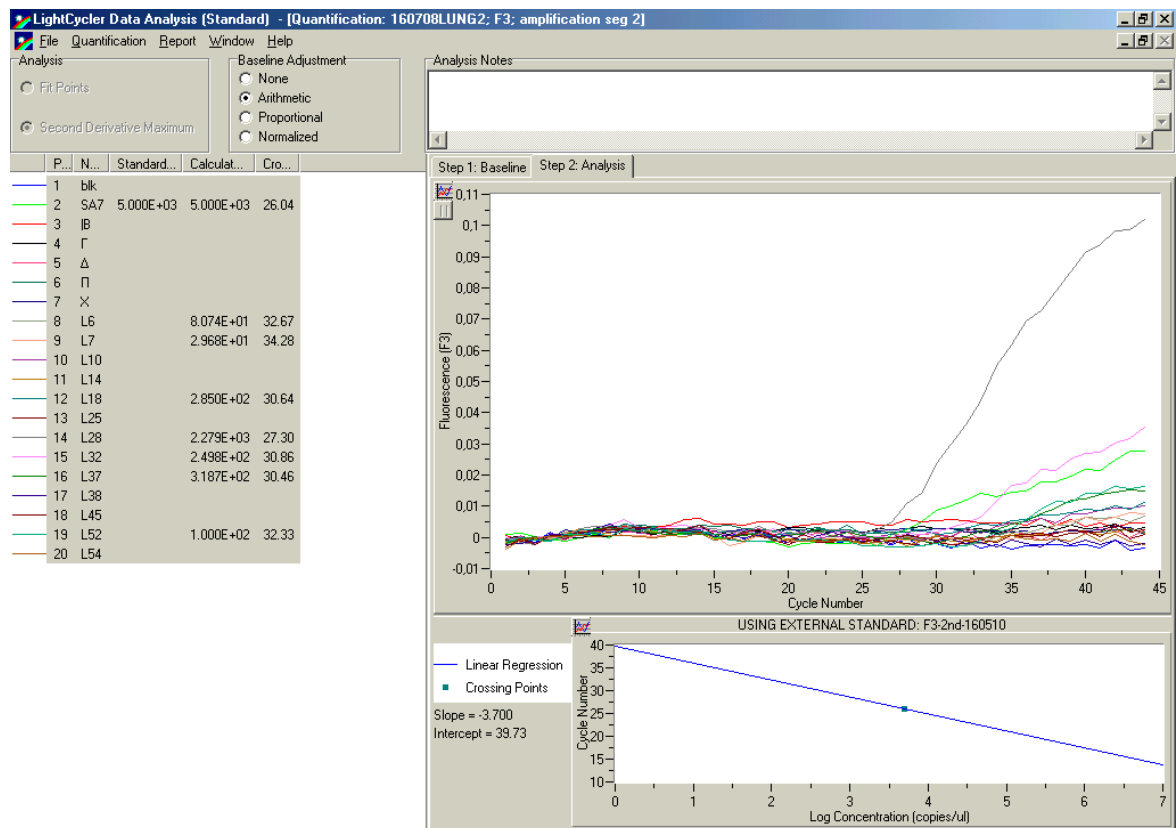
3.7.2.2 real-time qPCR αντίδραση για ανίχνευση των ισομορφών Α και Ε του γονιδίου COL11A1

Πραγματοποιήθηκε real-time qPCR μέθοδος για τα δείγματα που καρκίνου του πνεύμονα, control και καρκινικών ιστών, βάσει πρωτοκόλλου που έχει αναπτυχθεί από την ομάδα μας σε προηγούμενες μελέτες.

Πιο συγκεκριμένα, η ισομορφή Α ανιχνεύτηκε σε 16 από τα 25 δείγματα (εικόνες 3.19 και 3.20) και ποσοτικοποιήθηκε με εισαγωγή καμπύλης. Σε δύο από τα δείγματα control, ανιχνεύτηκε η παρουσία της ισομορφής Α, ωστόσο αυτή ήταν χαμηλή, επομένως εξηγείται γιατί το γενικό μετάγραφο ήταν μηδενικό.

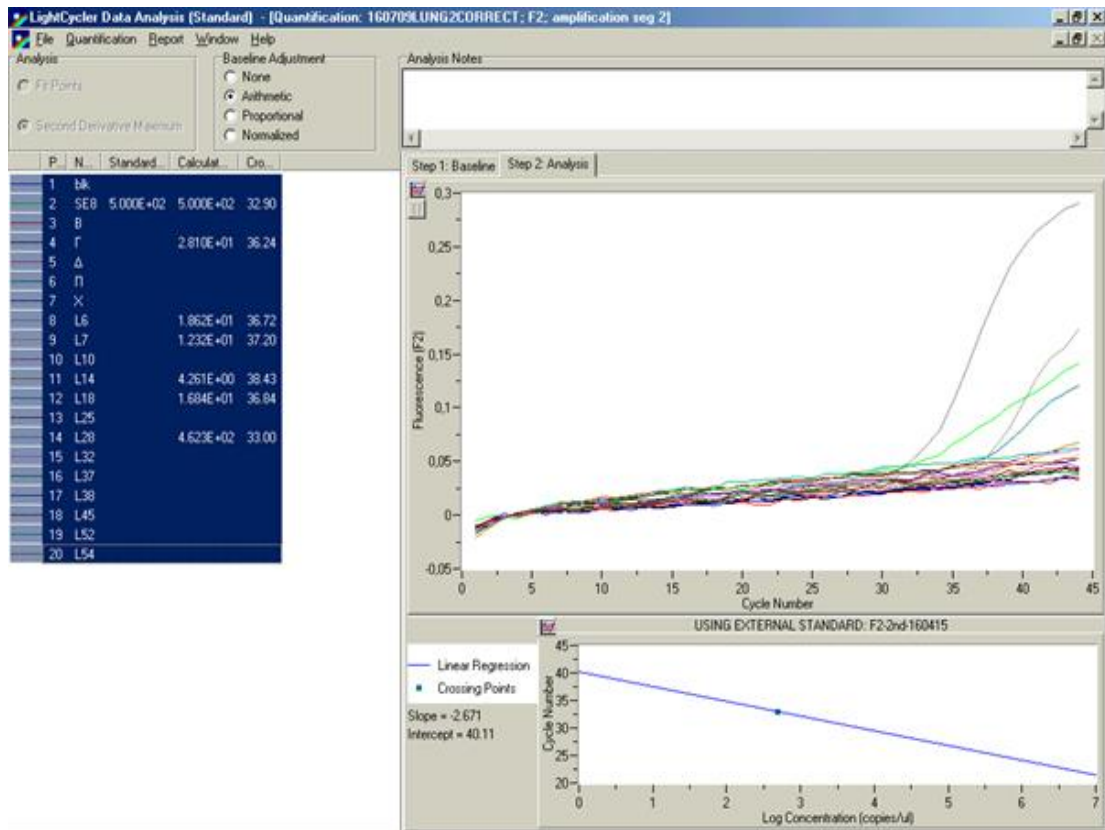


Εικόνα 3.19: real-time PCR για την ισομορφή A.

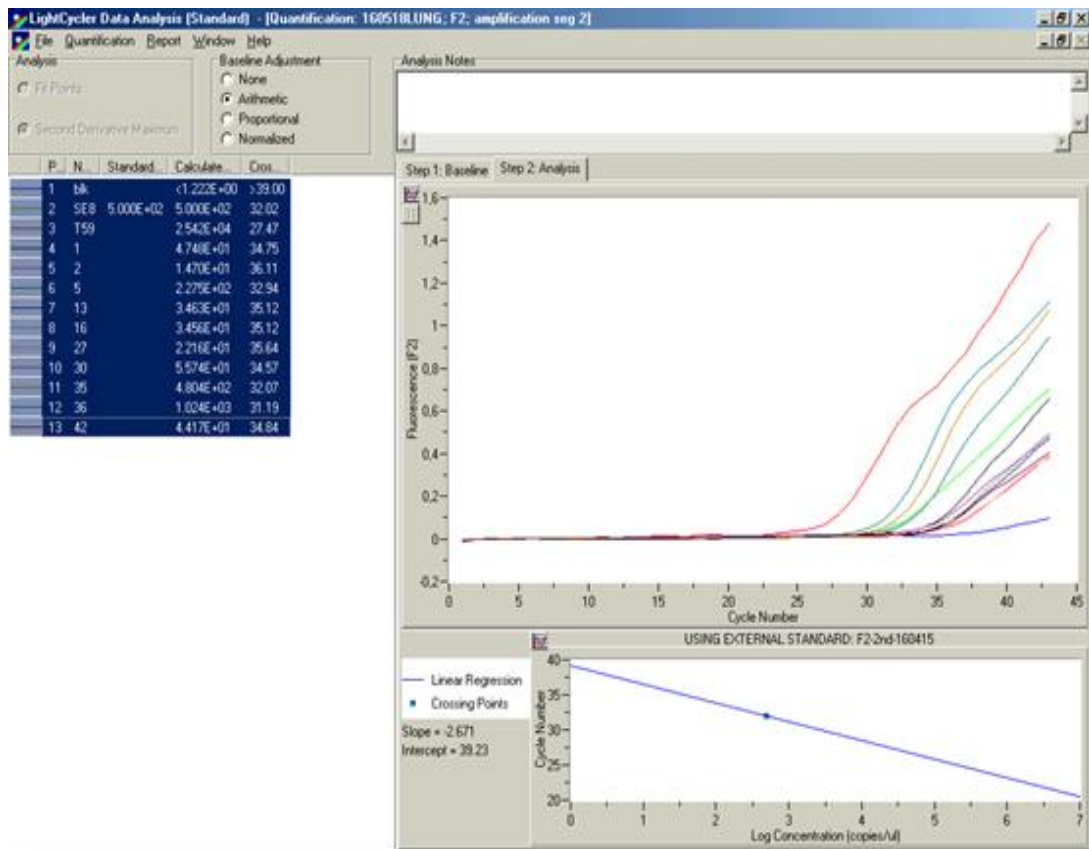


Εικόνα 3.20: real-time PCR για την ισομορφή A.

Αντίστοιχα για την ισομορφή E, πραγματοποιήθηκε real-time qPCR μέθοδος βάσει πρωτοκόλλου που έχει αναπτυχθεί από την ομάδα μας σε προηγούμενες μελέτες. Η ισομορφή E ανιχνεύτηκε σε 17 από τα 27 δείγματα. Σε 3 από τα 5 control ήταν έλαχιστα αυξημένα.

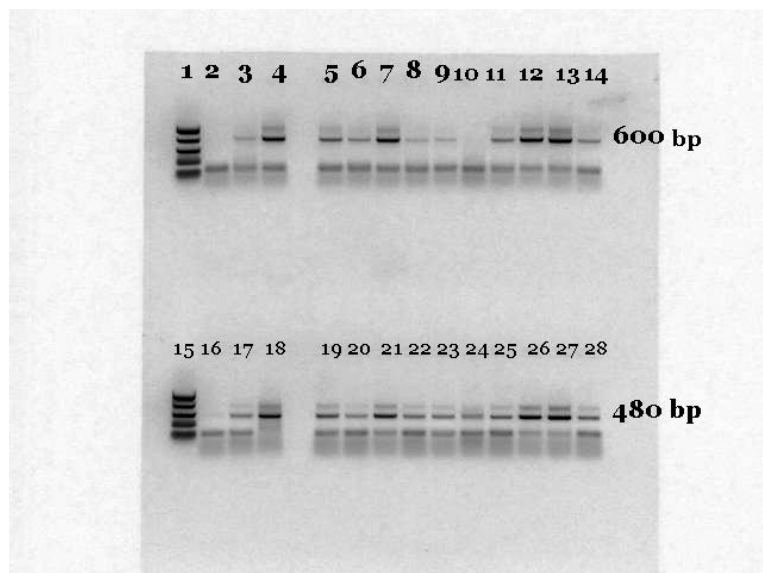


Εικόνα 3.21: real-time PCR για την ισομορφή E.



Εικόνα 3.22: real-time PCR για την ισομορφή E.

Τα προϊόντα των δειγμάτων συλλέχθηκαν μετά τον ποσοτικό προσδιορισμό και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2%. Η εικόνα που προκύπτει (Εικόνα 3.22Α) συμβαδίζει με τα προϊόντα που αναμένονται, αφού η ισομορφή Α παράγει προϊόν 596bp, ενώ η ισομορφή Ε, προϊόν 479bp.

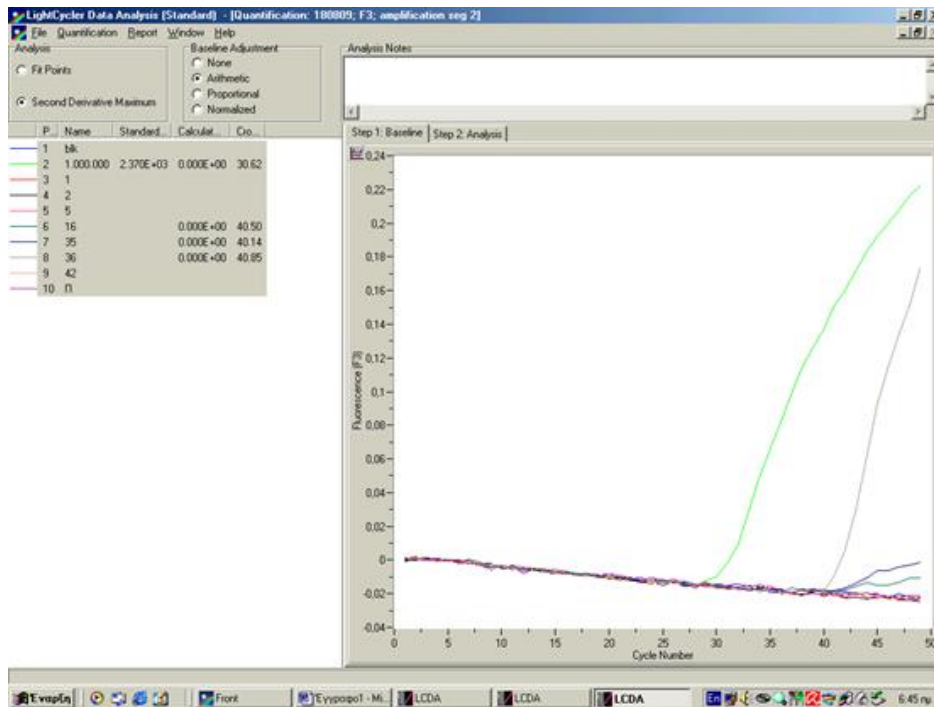


Εικόνα 3.22Α: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων για την ισομορφή Α (πάνω σειρά) και Ε (κάτω σειρά)

Θέσεις 1,15: PCR Marker, Θέσεις 2,16: blank, Θέσεις 5-14: δείγματα ισομορφής Α, Θέσεις 19-28: δείγματα ισομορφής Ε.

3.7.2.3 real- time PCR αντίδραση για ανίχνευση ισομορφής C του γονιδίου COL11A1

Έπειτα από τη βελτιστοποίηση της μεθόδου για την ανίχνευση της ισομορφής C, η μέθοδος δοκιμάστηκε και στο σύνολο των υπόλοιπων δειγμάτων. Ωστόσο, μόνο σε τρία από τα 27 δείγματα ήταν δυνατή η ανίχνευσή της ισομορφής C, συμπεριλαμβανομένου του δείγματος από το οποίο έγινε απομόνωση του προϊόντος και η παραγωγή των standards.



Εικόνα 3.23: Ποσοτικός προσδιορισμός ισομορφής C στα δείγματα καρκίνου του πνεύμονα.

3.8 Συνολικά αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού για τα δείγματα του καρκίνου του πνεύμονα και στατιστική ανάλυση μέσω του SPSS software

Πίνακας 3.3: Συνολικά αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού γενικού *COLL11A1* και των ισομορφών του A, E και C σε αντίγραφα ανά μL .

ID	SAMPLE TYPE	ISOFORM A	ISOFORM E	ISOFORM C	SUM ISOFORM	GENERAL
L53	CONTROL	0	28	0	28	0
L34	CONTROL	0	0	0	0	0
L37	CONTROL	319	0	0	319	890
L26	CONTROL	0	0	0	0	0
L48	CONTROL	0	0	0	0	0
L18	CONTROL	285	17	0	302	578
L7	CONTROL	30	12	0	42	359
L10	CONTROL	0	0	0	0	0
L1	TUMOR	136	47	0	183	769
L2	TUMOR	87	15	0	102	230
L5	TUMOR	285	228	939	1452	846
L6	TUMOR	81	19	0	100	224
L13	TUMOR	106	35	0	141	257
L14	TUMOR	0	4	0	4	466
L16	TUMOR	145	35	89	269	1313
L25	TUMOR	0	0	0	0	508
L27	TUMOR	0	22	0	22	4462
L28	TUMOR	2280	462	0	2742	23.960
L30	TUMOR	96	56	0	152	4077
L32	TUMOR	250	0	0	250	1695
L35	TUMOR	476	480	109	1065	14970
L36	TUMOR	1202	102	0	1304	10.000
L38	TUMOR	0	0	0	0	1929
L42	TUMOR	147	44	0	191	2509
L45	TUMOR	0	0	0	0	4565
L52	TUMOR	100	0	0	100	581
L54	TUMOR	0	0	0	0	1676

Τα παρακάτω δεδομένα εισήχθησαν στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SPSS, v.22 (IBM) μαζί με τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα, προκειμένου να πραγματοποιηθεί στατιστική ανάλυση και να βρεθεί πιθανή συσχέτιση μεταξύ δεδομένων και αποτελεσμάτων.

3.8.1 Περιγραφική στατιστική: Εύρεση μέσου, διάμεσου, μέγιστης και ελάχιστης τιμής για τις ισομορφές A και E

Αρχικά, μέσω εφαρμογής του προγράμματος SPSS αφαιρέθηκαν οι μηδενικές τιμές από τον πίνακα των τιμών για τις δύο ισομορφές A και E. Στη συνέχεια υπολογίστηκαν η μέση τιμή, η διάμεσος, η μέγιστη και ελάχιστη τιμή, καθώς και το εύρος των τιμών για τις δύο ισομορφές, όπως παρουσιάζονται παρακάτω.

Frequencies

Statistics

ISOFORMANOZEROS

N	Valid	16
	Missing	11
Mean		376,56
Median		146,00
Range		2250
Minimum		30
Maximum		2280

Statistics

ISOFORMENOZEROS

N	Valid	16
	Missing	11
Mean		100.38
Median		35.00
Range		476
Minimum		4
Maximum		480

Παρατηρείται μεγάλο εύρος μεταξύ των τιμών της μέγιστης και ελάχιστης τιμής. Επιπλέον, επειδή τα δείγματα ήταν πολύ λίγα, η κατανομή είναι μη κανονική, γι' αυτό υπολογίστηκαν και τα 25, 50 και 75 εκατοστημόρια για τις δύο ισομορφές.

Statistics

ISOFORMANOZEROS

N	Valid	16
	Missing	11
Percentiles	25	97,00
	75	310,50

ISOFORMENOZEROS

N	Valid	16
	Missing	11
Percentiles	25	17,50
	75	90,50

Statistics

		ISOFORMENO ZEROS	ISOFORMANO ZEROS
N	Valid	16	16
	Missing	11	11
Percentiles	25	17,50	97,00
	50	35,00	146,00
	75	90,50	310,50

3.8.2 Εφαρμογή τεστ χ^2 ως κριτήριο συσχέτισεως ποιοτικών χαρακτηριστικών

Στη συνέχεια, εφόσον ορίστηκε η διάμεσος και για τις δύο ισομορφές, υπολογίστηκαν οι τιμές των δειγμάτων, οι οποίες ήταν μεγαλύτερες και μικρότερες της εκάστοτε διαμέσου, και ορίστηκαν με τις ενδείξεις High και Low αντίστοιχα. Αυτές οι τιμές, (ISOFORM A CAT/ ISOFORM E CAT) χρησιμοποιήθηκαν, προκειμένου να εφαρμοστούν διάφορα ποιοτικά τεστ χ^2 , ώστε να βρεθεί κάποια πιθανή συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων που υπάρχουν. Ωστόσο λόγω μικρού αριθμού δειγμάτων δεν οδήγησαν σε κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Ελέγχθηκε και ο χωρισμός των δειγμάτων με βάση το 25^ο ή το 75^ο εκατοστημόριο χωρίς όμως και εδώ κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα.

Παρακάτω, παρουσιάζονται ενδεικτικά μερικά από τα τεστ αυτά.

1) HISTOLOGYGROUP * ISOFORMACAT

Crosstab

Count		ISOFORMACAT		Total
		NEG	POS	
HISTOLOGYGROUP	SQUAMOUS	2	4	6
	ADENOCA	3	6	9
Total		5	10	15

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.000 ^a	1	1.000	1.000	.713
Continuity Correction ^b	.000	1	1.000		
Likelihood Ratio	.000	1	1.000		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	.000	1	1.000		
N of Valid Cases	15				

a. 3 cells (75,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,00.

b. Computed only for a 2x2 table

2) LYMPHNODE * ISOFORMACAT

Crosstab

Count

		ISOFORMACAT		Total
		NEG	POS	
LYMPHNODE	NEG	3	7	10
	POS	3	6	9
Total		6	13	19

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.024 ^a	1	.876	1.000	.630
Continuity Correction ^b	.000	1	1.000		
Likelihood Ratio	.024	1	.876		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	.023	1	.879		
N of Valid Cases	19				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,84.

b. Computed only for a 2x2 table

3) HISTOLOGYGROUP * ISOFORMECAT

Crosstab

			ISOFORMECAT		Total
			NEG	POS	
HISTOLOGYGROUP	SQUAMOUS	Count	1	5	6
		% within HISTOLOGYGROUP	16.7%	83.3%	100.0%
	ADENOCA	Count	2	7	9
		% within HISTOLOGYGROUP	22.2%	77.8%	100.0%
	Total	Count	3	12	15
		% within HISTOLOGYGROUP	20.0%	80.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.069 ^a	1	.792		
Continuity Correction ^b	.000	1	1.000		
Likelihood Ratio	.071	1	.790		
Fisher's Exact Test				1.000	.659
Linear-by-Linear Association	.065	1	.799		
N of Valid Cases	15				

a. 3 cells (75,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,20.

b. Computed only for a 2x2 table

4) RECURRENCE * ISOFORMECAT

Crosstab

			ISOFORMECAT		Total
			NEG	POS	
RECURRENCE	NO	Count	4	7	11
		% within RECURRENCE	36.4%	63.6%	100.0%
	YES	Count	0	4	4

	% within RECURRENCE	0.0%	100.0%	100.0%
Total	Count	4	11	15
	% within RECURRENCE	26.7%	73.3%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1.983 ^a	1	.159		
Continuity Correction ^b	.560	1	.454		
Likelihood Ratio	2.977	1	.084		
Fisher's Exact Test				.516	.242
Linear-by-Linear Association	1.851	1	.174		
N of Valid Cases	15				

a. 3 cells (75,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,07.

b. Computed only for a 2x2 table

3.8.3 Εφαρμογή t-test μεταξύ ποσοτικών χαρακτηριστικών

Εφαρμόστηκαν t- test, προκειμένου να βρεθεί πιθανή συσχέτιση μεταξύ ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών, ωστόσο δεν βρέθηκε κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, λόγω μικρού αριθμού δειγμάτων. Παρακάτω, παρουσιάζεται ένα t-test με συσχέτιση του ιστολογικού τύπου (squamous, adenoca) και της ποσότητας των ισομορφών.

T-Test

5)

Group Statistics

	HISTOLOGYGROUP	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ISOFORMANOZEROS	SQUAMOUS	4	210.00	179.668	89.834
	ADENOCA	6	685.67	888.265	362.633
ISOFORM A	SQUAMOUS	6	140.00	176.432	72.028
	ADENOCA	9	457.11	781.453	260.484
ISOFORM E	SQUAMOUS	6	102.00	185.992	75.931
	ADENOCA	9	102.44	152.881	50.960
ISOFORMENOZEROS	SQUAMOUS	5	122.40	200.301	89.577
	ADENOCA	7	131.71	163.296	61.720
ISOFORMENOZEROS50	SQUAMOUS	5	.60	.548	.245
	ADENOCA	7	.86	.378	.143
ISOFORM C	SQUAMOUS	0 ^a	.	.	.
	ADENOCA	0 ^a	.	.	.

a. t cannot be computed because at least one of the groups is empty.

3.8.4 Έλεγχος κανονικότητας-συσχέτιση-γραμμική παλινδρόμηση

Επιπλέον, για να ελεγχθεί η συσχέτιση των ποσοτικών μεταβλητών ελέγχθηκε αρχικά η κανονικότητα με τεστ Kolmogorov- Smirnov για τις τιμές των ισομορφών Α και Ε, το άθροισμά τους, καθώς και για το γενικό *COL11A1*.

6) One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		ISOFORMANO ZEROS	ISOFORMENOZ EROS	SUM ISOFORM	GENERAL COL11A1
N		16	16	27	27
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	376,56	100,38	282,63	2846,81
	Std. Deviation	579,328	154,286	577,582	5398,368
	Absolute	,352	,363	,327	,308
Most Extreme Differences	Positive	,352	,363	,327	,308
	Negative	-,275	-,266	-,312	-,299
Kolmogorov-Smirnov Z		1,408	1,453	1,698	1,602
Asymp. Sig. (2-tailed)		,038	,029	,006	,012

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Εφόσον η κατανομή δεν είναι κανονική τόσο για τις δύο ισομορφές, όσο και για το γενικό *COL11A1*, οι τιμές αυτές λογαριθμίστηκαν και στη συνέχεια ελέγχθηκε εκ νέου η κανονικότητα.

7)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		logISOFORMA	logISOFORME
N		16	16
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2,2951	1,6263
	Std. Deviation	,46619	,56830
	Absolute	,171	,165
Most Extreme Differences	Positive	,171	,165
	Negative	-,141	-,105
Kolmogorov-Smirnov Z		,682	,660
Asymp. Sig. (2-tailed)		,741	,776

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

8)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		logGENERALC OL	LOGSUMISOF ORM
N		22	19
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	3,1396	2,1989
	Std. Deviation	,58342	,65706
	Absolute	,128	,171
Most Extreme Differences	Positive	,128	,111
	Negative	-,088	-,171
Kolmogorov-Smirnov Z		,599	,743
Asymp. Sig. (2-tailed)		,865	,638

a. Test distribution is Normal.

Ακόμα και με λογαριθμημένες τιμές μετά τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων, δεν βρέθηκε κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, λόγω μικρού αριθμού δειγμάτων. Η μόνη συσχέτιση που βρέθηκε, ήταν μεταξύ των δύο ισομορφών Α και Ε. Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι μεταξύ των ισομορφών Α και Ε υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p < 0,05$) που επιβεβαιώνεται μέσω της γραμμικής παλινδρόμησης $\log(\text{isoformA}) = 0,737\log(\text{isoformE}) + 1,010$, όπως παρουσιάζεται παρακάτω.

9)

Coefficients^a

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	
	B	Std. Error	Beta			
1	(Constant)	1,010	,321		3,144	,009
	logISOFORME	,737	,177	,783	4,168	,002

a. Dependent Variable: logISOFORMA

3.8.5 Λογαριθμιστική ανάλυση (Logistic regression)

Επιπλέον έγινε λογαριθμιστική ανάλυση για πρόβλεψη θετικού λεμφαδένα ή μετάστασης με βάση τον αριθμό ή τη θετικότητα στα μετάγραφα, καθώς και ανάλυση επιβίωσης (survival) χωρίς ωστόσο κάποιο εύρημα, λόγω μικρού αριθμού δειγμάτων.

Classification Table^{a,b}

		Observed	Predicted		
			LYMPHNODE		Percentage
			NEG	POS	Correct
Step 0	LYMPHNODE	NEG	8	0	100.0
		POS	7	0	.0
		Overall Percentage			53.3

a. Constant is included in the model.

b. The cut value is ,500

Variables not in the Equation

		Score	df	Sig.	
Step 0	Variables	HISTOLOGYGROUP	.714	1	.398
		ISOFORMECAT	.268	1	.605
		ISOFORMACAT	.536	1	.464
		Overall Statistics	3.660	3	.301

Classification Table^a

		Observed	Predicted		
			LYMPHNODE		Percentage
			NEG	POS	Correct
Step 1	LYMPHNODE	NEG	5	3	62.5
		POS	2	5	71.4
		Overall Percentage			66.7

a. The cut value is ,500

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1 ^a	HISTOLOGYGROUP	1.414	1.332	1.127	1	.288	4.112
	ISOFORMECAT	22.370	27333.842	.000	1	.999	5187546385.00
	ISOFORMACAT	-21.962	27333.842	.000	1	.999	.000
	Constant	-1.720	1.652	1.084	1	.298	.179

a. Variable(s) entered on step 1: HISTOLOGYGROUP, ISOFORMECAT, ISOFORMACAT.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Συμπεράσματα- συζήτηση

Ανεύρυσμα είναι μια ανώμαλη διόγκωση στο τοίχωμα μίας αρτηρίας. Πιο συγκεκριμένα αποτελεί μία μεγέθυνση (διαστολή) της αορτής σε μεγαλύτερο από 1,5 φορές το κανονικό μέγεθος. Κανονικά, τα τοιχώματα των αρτηριών είναι παχιά και μυώδη, επιτρέποντάς τους να αντέχουν ένα μεγάλο ποσό πίεσης. Περιστασιακά, εντούτοις, μια αδύναμη περιοχή αναπτύσσεται στο τοίχωμα μίας αρτηρίας. Αυτό επιτρέπει η πίεση εντός της αρτηρίας για να ωθήσει προς τα έξω, δημιουργώντας ένα εξόγκωμα. Ανευρύσματα αορτής μπορεί να συμβούν σε δύο κύρια μέρη, είτε κοιλιακά, είτε θωρακικά. Ανευρύσματα αορτής μπορεί να προκληθούν από διάφορους παράγοντες, όπως αθηροσκλήρωση, υπέρταση, γήρανση ή σύνδρομο Marfan.

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των κυττάρων στους ιστούς του πνεύμονα. Εάν δε θεραπευθεί, ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός μπορεί να εξαπλωθεί και πέραν του πνεύμονα με μια διαδικασία που ονομάζεται μετάσταση σε κοντινό ιστό και, τελικά, σε άλλα μέρη του σώματος. Οι κύριοι τύποι καρκίνου του πνεύμονα είναι το μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (SCLC) και το μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (NSCLC). Η πιο κοινή αιτία του καρκίνου του πνεύμονα είναι η μακροχρόνια έκθεση στον καπνό, η οποία προκαλεί το 80-90% των καρκίνων του πνεύμονα. Οι μη καπνιστές αντιστοιχούν στο 10-15% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα, που συχνά αποδίδεται σε ένα συνδυασμό γενετικών παραγόντων, την ατμοσφαιρική ρύπανση και το παθητικό κάπνισμα. Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την κύρια αιτία θανάτων από καρκίνο, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες; περίπου ένας στους τέσσερις θανάτους από καρκίνο προέρχονται από καρκίνο του πνεύμονα. Κάθε χρόνο, ο αριθμός των ανθρώπων που πεθαίνουν από καρκίνο του πνεύμονα είναι μεγαλύτερος από αυτών που πεθαίνουν από καρκίνου του παχέος εντέρου, μαστού και προστάτη μαζί ενώ, περίπου το 14% όλων των νέων καρκίνων είναι καρκίνοι του πνεύμονα.

Το κολλαγόνο XI είναι ένα ελάσσων ινώδες κολλαγόνο το οποίο είναι υπεύθυνο για την σωστή διαμόρφωση των ιών κολλαγόνου II. Εκφράζεται κυρίως στον αρθρικό χόνδρο και στο υαλώδες υγρό του οφθαλμού. Ωστόσο, η έκφραση του είναι ανιχνεύσιμη σε πολλούς άλλους ανθρώπινους εμβρυϊκούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των οστών. Είναι ετεροτριμερής πρωτεΐνη, που αποτελείται από τρεις άλφα αλυσίδες (α_1 , α_2 και α_3) οι οποίες οργανώνονται σε μια τριπλή έλικα. Αμφότερες οι α_1 (XI) και α_2 (XI) αλυσίδες είναι μοναδικά γονιδιακά προϊόντα, ενώ η α_3 (XI) αλυσίδα αποτελεί υπεργλυκοζυλιωμένη μορφή της α_1 αλυσίδας του κολλαγόνου τύπου II.

Η αλυσίδα α_1 (XI) που κωδικοποιείται από το γονίδιο *COL11A1*, είναι μία κρίσιμη ρυθμιστική πρωτεΐνη της οποίας η έκφραση αλλάζει στα νεοπλάσματα σε σχέση με

τον φυσιολογικό ιστό. Έχει δειχθεί, γενικά, ότι η έκφραση των κολλαγόνων αλλάζει στα νεοπλάσματα και ιδιαίτερα του κολλαγόνου XI, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να επηρεάζει την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να διαπερνούν το στρώμα και να δίνουν τοπικές ή απομακρυσμένες μεταστάσεις. Αν και η έκφραση του *COL11A1* έχει μελετηθεί διεξοδικά στις διάφορες μορφές καρκίνου αλλά και στον καρκίνο του μαστού με αμφιλεγόμενα αποτελέσματα, δεν υπάρχουν έως τώρα βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την έκφραση των εναλλακτικών μεταγράφων του. Το γονίδιο *COL11A1* αποτελείται από 67 εξόνια εκ των οποίων τα εξόνια 6 έως 9 υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα κατά την ωρίμανση του *COL11A1* mRNA και παράγουν τουλάχιστον 4 διαφορετικές ισομορφές A, B, C και E. Οι ισομορφές διαφέρουν ως προς την πρωτεόλυση του N-τελικού άκρου και δυνητικά, στον τρόπο που διευθετούν την εξωκυττάρια μήτρα.

Σε προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας, είχαν ανακαλυφθεί τα μετάγραφα A και E και είχαν επικυρωθεί με αξιόπιστες, real-time qPCR μεθοδολογίες. Επίσης μελετήθηκαν τα μετάγραφα αυτά σε δείγματα καρκίνου μαστού. Σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν η ανάπτυξη μιας νέας εύκολης μεθόδου για την γενική ανίχνευση του γονιδίου *COL11A1* με μεθοδολογία real-time qPCR, η ποσοτικοποίηση των A και E σύμφωνα με την ήδη αναπτυχθείσα μέθοδο καθώς και η προσπάθεια για εύρεση των άλλων δύο μεταγράφων B και C και η ανάπτυξη σχετικών μεθοδολογιών για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίησή τους. Επιπλέον, στόχο απετέλεσε και η εφαρμογή των παραπάνω μεθοδολογιών σε δύο είδη δειγμάτων: i) ανευρυσμάτων ανιούσης αορτής και ii) καρκίνου του πνεύμονα, για να προσδιοριστεί πιθανή συσχέτιση μεταξύ της διαφορικής έκφρασης όλων των ισομορφών του *COL11A1* και του γενικού μεταγράφου με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ιστών και των ασθενών.

Στο πρώτο μέρος της μελέτης, διατέθηκαν 50 ιστοί ανευρυσμάτων ανιούσης αορτής. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ολικού RNA των δειγμάτων με το *NucleoSpin[®] RNA/Protein Kit* και ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του με το φθορισμόμετρο *Qubit[®]*. Συντέθηκε το cDNA με το *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit*. Στο δεύτερο μέρος της μελέτης, διατέθηκαν 27 δείγματα έτοιμου cDNA, εκ των οποίων 19 ήταν καρκινικοί ιστοί και 8 από παρακείμενες του καρκίνου περιοχές (control). Στην συνέχεια, αναπτύχθηκε real-time qPCR μεθοδολογία για τη γενική ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου *COL11A1*. Καθώς βρέθηκε σε δείγματα η ισομορφή C αναπτύχθηκε περαιτέρω και η σχετική real-time qPCR μέθοδος. Ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός του γενικού μεταγράφου και της ισομορφής C στα δείγματα με τη μέθοδο της real-time qPCR στον θερμικό κυκλοποιητή *LightCycler 1.5* με χρήση ανιχνευτών υβριδισμού, οι οποίοι προσδίδουν μεγάλη ειδικότητα καθώς μετά τη λήξη της ανίχνευσης ακολουθεί melting curve analysis. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα βελτιστοποίησης με τη βοήθεια απομονωθέντων και ποσοτικοποιημένων *amplicons* ως βαθμονομητές των υπό ανάπτυξη real-time qPCR μεθόδων για το γενικό μετάγραφο και την ισομορφή C. Η βελτιστοποίηση των μεθόδων έγινε με ρύθμιση των βασικότερων παραμέτρων κάθε σταδίου. Επίσης,

εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν από τα πειράματα βελτιστοποίησης, έγινε έλεγχος των αναλυτικών παραμέτρων των μεθόδων real-time qPCR. Η T_m για το γενικό μετάγραφο ήταν $62,19^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1,03$), ενώ για την ισομορφή C ήταν $67,3^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,15$). Η ειδικότητα των μεθοδολογιών της Real-time qPCR ελέγχθηκε με *melting curve analysis* (αναμενόμενη T_m), με την παρουσία ειδικών ζωνών στο σωστό μέγεθος κατά την ηλεκτροφόρηση των qPCR προϊόντων, με περιοριστικές ενδονουκλεάσες για το γενικό μετάγραφο και με ανάλυση της αλληλουχίας του DNA των *amplicons* που προέκυψαν. Ο προσδιορισμός γίνεται εύκολα και ταχέως (εντός ~50 min) μετά την παραγωγή του cDNA με τη μέθοδο κλειστού σωληναρίου ώστε να μην τίθενται προβλήματα επιμολύνσεων και να είναι δυνατόν να αναλυθούν έως 32 δείγματα μαζί στον θερμικό κυκλοποιητή *LightCycler 1.5* (ωστόσο μπορεί να αναλυθούν ταυτόχρονα και 1536 δείγματα στη πιο εξελιγμένη πλατφόρμα LC1536).

Για τα δείγματα ανευρυσμάτων ανιούσης αορτής, η εφαρμογή της real-time qPCR, τόσο για το γενικό *COL1A1* όσο και για τις ισομορφές του, κατέστη ανεπιτυχής, αφού σε όλα τα δείγματα, η ανίχνευσή τους ήταν μηδενική.

Στα δείγματα του καρκίνου του πνεύμονα, το γενικό μετάγραφο ανιχνεύτηκε σε όλους τους καρκινικούς ιστούς (19 δείγματα), ενώ σε 5 από τα 8 control ήταν μηδενικό. Όσον αφορά τις ισομορφές A και E, 13 από τα 19 καρκινικά δείγματα ήταν θετικά για το καθένα (68%), και 11 και για τις δύο ισομορφές μαζί (58%). Ανιχνεύθηκε επίσης η ύπαρξη της ισομορφής C σε 3 δείγματα (11%) και επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση και DNA sequencing.

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων, με τη χρήση του προγράμματος SPSS, είτε με ποσοτικές μεταβλητές, είτε με ποιοτικές (πχ χωρισμός δειγμάτων σε θετικά/ αρνητικά ή high/low). Σε παλαιότερη μελέτη της ομάδας μας σε δείγματα καρκίνου του μαστού είτε αποκαλυφθεί συσχέτιση του μεταγράφου E με την παρουσία λεμφαδένων, την μετάσταση και την επιβίωση των ασθενών. Παρ' όλα αυτά, λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων, δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικά στοιχεία στα δείγματα καρκίνου του πνεύμονα. Μεταξύ των ισομορφών A και E υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p < 0,05$) που επιβεβαιώνεται μέσω της γραμμικής παλινδρόμησης $\log(\text{isoformA}) = 0,737 \log(\text{isoformE}) + 1,010$. Τέλος, καθώς ο αριθμός μεταγράφων/ μl στο *COL1A1* γονίδιο υπερβαίνει σε όλα τα δείγματα το σύνολο A+E, υπάρχει περιθώριο για ανακάλυψη και άλλων μεταγράφων (όπως για παράδειγμα του B, το οποίο δεν ελέγχθηκε στην μελέτη μας).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση των κολλαγόνων αλλάζει στις κακοήθειες, ιδίως εκείνη του κολλαγόνου XI. Αυτό θα μπορούσε να επηρεάσει την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να εισβάλλουν στο στρώμα και να δημιουργούν μεταστάσεις. Η α1 αλυσίδα του κολλαγόνου XI μεταγράφεται από το *COL11A1* γονίδιο, μέσω εναλλακτικού ματίσματος σε τουλάχιστον τέσσερα διαφορετικά μετάγραφα (A, B, C και E). Οι αντίστοιχες πρωτεϊνικές isoμορφές διαφέρουν ως προς την πρωτεόλυση του N-τελικού άκρου τους και δυνητικά, στον τρόπο που διευθετούν την εξωκυττάρια μήτρα. Οι isoμορφές δεν έχουν προηγουμένως μελετηθεί στον καρκίνο του πνεύμονα.

Σκοπός της μελέτης ήταν αφού αρχικά αναπτυχθούν νέες μεθοδολογίες για το γενικό (συνολικό) *COL11A1* μετάγραφο και την C isoμορφή (καθώς A και E είχαν αναπτυχθεί παλαιότερα από την ομάδα μας), στη συνέχεια να ποσοτικοποιηθούν όλα τα μετάγραφα και να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση τους με ιστοπαθολογικούς προγνωστικούς παράγοντες στον καρκίνο του πνεύμονα.

Ασθενείς και μέθοδοι: Σε 27 cDNA δείγματα από ιστούς πνεύμονα ασθενών με γνωστά ιστοπαθολογικά δεδομένα (8 control και 19 καρκινικοί ιστοί) αναπτύχθηκε real-time qPCR με ανιχνευτές υβριδισμού στον θερμοκυκλοποιητή LightCycler 1.5 (Roche) για τον ποσοτικό προσδιορισμό του γενικού *COL11A1* και του C μεταγράφου. Στη συνέχεια, αφού μετρήθηκαν και τα A/E μετάγραφα ακολούθησε στατιστική ανάλυση με το πρόγραμμα SPSS.

Αποτελέσματα και συμπεράσματα: Όλα τα δείγματα του καρκίνου του πνεύμονα ήταν θετικά ως προς το γενικό *COL11A1* μετάγραφο ενώ 5 από τα 8 control ήταν μηδενικά. Όσον αφορά τις isoμορφές A και E, 13 από τα 19 καρκινικά δείγματα ήταν θετικά για το καθένα (68%), και 11 και για τις δύο isoμορφές (58%). Ανιχνεύθηκε ποιοτικά η ύπαρξη της isoμορφής C σε 3 δείγματα (επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση αгарόζης και DNA sequencing). Μεταξύ των isoμορφών A και E υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p < 0,05$) που επιβεβαιώθηκε μέσω γραμμικής παλινδρόμησης $\log(\text{isoformA}) = 0,737\log(\text{isoformE}) + 1,010$. Καθώς ο αριθμός μεταγράφων/μl στο *COL11A1* γονίδιο υπερβαίνει σε όλα τα δείγματα το σύνολο A+E, υπάρχει περιθώριο για ανακάλυψη και άλλων μεταγράφων. Δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση στον μικρό αριθμό δειγμάτων μας με ιστοπαθολογικά δεδομένα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Βιβλιογραφία

- [1] Johnston KW, Rutherford RB, Tilson MD, et al. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery. *J Vasc Surg* 1991;13: 452-8.
- [2] Kent KC. Clinical practice. Abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med* 2014;371: 2101-8.
- [3] Upchurch GR, Jr., Schaub TA. Abdominal aortic aneurysm. *Am Fam Physician* 2006;73: 1198-204.
- [4] Groves EM, Khoshchehreh M, Le C, Malik S. Effects of weekend admission on the outcomes and management of ruptured aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2014;60: 318-24.
- [5] Saratzis A, Bown MJ. The genetic basis for aortic aneurysmal disease. *Heart* 2014;100: 916-22.
- [6] Aluffi A, Berti A, Buniva P, Rescigno G, Nazari S. Improved device for sutureless aortic anastomosis applied in a case of cancer. *Tex Heart Inst J* 2002;29: 56-9.
- [7] Nazari S, Salvi S, Visconti E, et al. Descending aorta substitution with expandable ends prosthesis. Case report. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1999;40: 417-20.
- [8] Cina CS, Abouzahr L, Arena GO, et al. Cerebrospinal fluid drainage to prevent paraplegia during thoracic and thoracoabdominal aortic aneurysm surgery: a systematic review and meta-analysis. *J Vasc Surg* 2004;40: 36-44.
- [9] Khan SN, Stansby G. Cerebrospinal fluid drainage for thoracic and thoracoabdominal aortic aneurysm surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; CD003635.
- [10] Thomas DM, Hulten EA, Ellis ST, et al. Open versus Endovascular Repair of Abdominal Aortic Aneurysm in the Elective and Emergent Setting in a Pooled Population of 37,781 Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *ISRN Cardiol* 2014;2014: 149243.
- [11] Biancari F, Catania A, D'Andrea V. Elective endovascular vs. open repair for abdominal aortic aneurysm in patients aged 80 years and older: systematic review and meta-analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2011;42: 571-6.
- [12] Paravastu SC, Jayarajasingam R, Cottam R, et al. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; CD004178.
- [13] Ilyas S, Shaida N, Thakor AS, Winterbottom A, Cousins C. Endovascular aneurysm repair (EVAR) follow-up imaging: the assessment and treatment of common postoperative complications. *Clin Radiol* 2015;70: 183-96.

- [14] Thun MJ, Hannan LM, Adams-Campbell LL, et al. Lung cancer occurrence in never-smokers: an analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies. *PLoS Med* 2008;5: e185.
- [15] Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132: 29S-55S.
- [16] O'Reilly KM, Mclaughlin AM, Beckett WS, Sime PJ. Asbestos-related lung disease. *Am Fam Physician* 2007;75: 683-8.
- [17] Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 2007;75: 56-63.
- [18] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127: 2893-917.
- [19] Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol* 2007;25: 561-70.
- [20] Rosti G, Bevilacqua G, Bidoli P, et al. Small cell lung cancer. *Ann Oncol* 2006;17 Suppl 2: ii5-10.
- [21] Seo JB, Im JG, Goo JM, Chung MJ, Kim MY. Atypical pulmonary metastases: spectrum of radiologic findings. *Radiographics* 2001;21: 403-17.
- [22] Tan D, Zander DS. Immunohistochemistry for assessment of pulmonary and pleural neoplasms: a review and update. *Int J Clin Exp Pathol* 2008;1: 19-31.
- [23] Honnorat J, Antoine JC. Paraneoplastic neurological syndromes. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2: 22.
- [24] Biesalski HK, Bueno de MB, Chesson A, et al. European Consensus Statement on Lung Cancer: risk factors and prevention. Lung Cancer Panel. *CA Cancer J Clin* 1998;48: 167-76.
- [25] Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3: 733-44.
- [26] Soperi M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002;2: 372-7.
- [27] Jaakkola MS, Jaakkola JJ. Impact of smoke-free workplace legislation on exposures and health: possibilities for prevention. *Eur Respir J* 2006;28: 397-408.
- [28] Parkin DM. 2. Tobacco-attributable cancer burden in the UK in 2010. *Br J Cancer* 2011;105 Suppl 2: S6-S13.
- [29] Taylor R, Najafi F, Dobson A. Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: effects of study type and continent. *Int J Epidemiol* 2007;36: 1048-59.
- [30] Schick S, Glantz S. Philip Morris toxicological experiments with fresh sidestream smoke: more toxic than mainstream smoke. *Tob Control* 2005;14: 396-404.
- [31] Chen H, Goldberg MS, Villeneuve PJ. A systematic review of the relation between long-term exposure to ambient air pollution and chronic diseases. *Rev Environ Health* 2008;23: 243-97.

- [32] Clapp RW, Jacobs MM, Loechler EL. Environmental and occupational causes of cancer: new evidence 2005-2007. *Rev Environ Health* 2008;23: 1-37.
- [33] Rami-Porta R, Crowley JJ, Goldstraw P. The revised TNM staging system for lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2009;15: 4-9.
- [34] Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004;54: 8-29.
- [35] Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 2003;200: 423-8.
- [36] Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 2010;123: 4195-200.
- [37] Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3.
- [38] Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55: 1531-46.
- [39] Mayne R, Brewton RG. New members of the collagen superfamily. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5: 883-90.
- [40] van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J* 1991;5: 2814-23.
- [41] Sato K, Yomogida K, Wada T, et al. Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. *J Biol Chem* 2002;277: 37678-84.
- [42] Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res* 2010;339: 247-57.
- [43] Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. Collagens at a glance. *J Cell Sci* 2007;120: 1955-8.
- [44] Hulmes DJ. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *J Struct Biol* 2002;137: 2-10.
- [45] Burgeson RE, Hollister DW. Collagen heterogeneity in human cartilage: identification of several new collagen chains. *Biochem Biophys Res Commun* 1979;87: 1124-31.
- [46] Blaschke UK, Eikenberry EF, Hulmes DJ, Galla HJ, Bruckner P. Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. *J Biol Chem* 2000;275: 10370-8.
- [47] Fichard A, Kleman JP, Ruggiero F. Another look at collagen V and XI molecules. *Matrix Biol* 1995;14: 515-31.
- [48] Bernard M, Yoshioka H, Rodriguez E, et al. Cloning and sequencing of pro-alpha 1 (XI) collagen cDNA demonstrates that type XI belongs to the fibrillar class of collagens and reveals that the expression of the gene is not restricted to cartilagenous tissue. *J Biol Chem* 1988;263: 17159-66.

- [49] Lui VC, Kong RY, Nicholls J, Cheung AN, Cheah KS. The mRNAs for the three chains of human collagen type XI are widely distributed but not necessarily co-expressed: implications for homotrimeric, heterotrimeric and heterotypic collagen molecules. *Biochem J* 1995;311 (Pt 2): 511-6.
- [50] Morris NP, Bachinger HP. Type XI collagen is a heterotrimer with the composition (1 alpha, 2 alpha, 3 alpha) retaining non-triple-helical domains. *J Biol Chem* 1987;262: 11345-50.
- [51] Thom JR, Morris NP. Biosynthesis and proteolytic processing of type XI collagen in embryonic chick sterna. *J Biol Chem* 1991;266: 7262-9.
- [52] Warner LR, Blasick CM, Brown RJ, Oxford JT. Expression, purification, and refolding of recombinant collagen alpha1(XI) amino terminal domain splice variants. *Protein Expr Purif* 2007;52: 403-9.
- [53] Fallahi A, Kroll B, Warner LR, et al. Structural model of the amino propeptide of collagen XI alpha1 chain with similarity to the LNS domains. *Protein Sci* 2005;14: 1526-37.
- [54] Warner LR, Brown RJ, Yingst SM, Oxford JT. Isoform-specific heparan sulfate binding within the amino-terminal noncollagenous domain of collagen alpha1(XI). *J Biol Chem* 2006;281: 39507-16.
- [55] Zhidkova NI, Justice SK, Mayne R. Alternative mRNA processing occurs in the variable region of the pro-alpha 1(XI) and pro-alpha 2(XI) collagen chains. *J Biol Chem* 1995;270: 9486-93.
- [56] Oxford JT, Doege KJ, Morris NP. Alternative exon splicing within the amino-terminal nontriple-helical domain of the rat pro-alpha 1(XI) collagen chain generates multiple forms of the mRNA transcript which exhibit tissue-dependent variation. *J Biol Chem* 1995;270: 9478-85.
- [57] Bowen KB, Reimers AP, Luman S, et al. Immunohistochemical localization of collagen type XI alpha1 and alpha2 chains in human colon tissue. *J Histochem Cytochem* 2008;56: 275-83.
- [58] Martin S, Richards AJ, Yates JR, et al. Stickler syndrome: further mutations in COL11A1 and evidence for additional locus heterogeneity. *Eur J Hum Genet* 1999;7: 807-14.
- [59] Griffith AJ, Sprunger LK, Sirko-Osadsa DA, et al. Marshall syndrome associated with a splicing defect at the COL11A1 locus. *Am J Hum Genet* 1998;62: 816-23.
- [60] Mio F, Chiba K, Hirose Y, et al. A functional polymorphism in COL11A1, which encodes the alpha 1 chain of type XI collagen, is associated with susceptibility to lumbar disc herniation. *Am J Hum Genet* 2007;81: 1271-7.
- [61] Henry I, Bernheim A, Bernard M, et al. Mapping of a human fibrillar collagen gene, pro alpha 1 (XI) (COL11A1), to the p21 region of chromosome 1. *Genomics* 1988;3: 87-90.
- [62] Annunen S, Korkko J, Czarny M, et al. Splicing mutations of 54-bp exons in the COL11A1 gene cause Marshall syndrome, but other mutations cause overlapping Marshall/Stickler phenotypes. *Am J Hum Genet* 1999;65: 974-83.

- [63] Karaglani M, Toumpoulis I, Goutas N, et al. Development of novel real-time PCR methodology for quantification of COL11A1 mRNA variants and evaluation in breast cancer tissue specimens. *BMC Cancer* 2015;15: 694.
- [64] Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005;39: 75-85.
- [65] Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27: 95-125.
- [66] Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006;1: 1559-82.
- [67] Lakhani SR, Ashworth A. Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past? *Nat Rev Cancer* 2001;1: 151-7.
- [68] Pavlidou A, Kroupis C, Goutas N, Dalamaga M, Dimas K. Validation of a Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Method for the Quantification of 3 Survivin Transcripts and Evaluation in Breast Cancer Tissues. *Clin Breast Cancer* 2014;14: 122-31.
- [69] Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55: 611-22.
- [70] Roberts RJ. Restriction endonucleases. *CRC Crit Rev Biochem* 1976;4.
- [71] Kessler C, Manta V. Specificity of restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases a review (Edition 3). *Gene* 1990;92.
- [72] Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74.
- [73] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74.

