



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ  
ΝΕΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ  
ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

Πουμπουρίδου Νικολέτα

Χημικός

**ΑΘΗΝΑ**

**2015**



## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Μελέτη και κλινική αξιολόγηση νέων μοριακών δεικτών καρκίνου του μαστού**

**ΠΟΥΜΠΟΥΡΙΔΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΑ**

**ΑΜ: 72645**

### **Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:**

**Ευρύκλεια Λιανίδου**, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας - Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

### **Τριμελή συμβουλευτική επιτροπή:**

**Χρήστος Κρούπης**, Επίκουρος Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Διαγνωστικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

**Ευρύκλεια Λιανίδου**, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας - Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

**Μιχαήλ Κουμπάρης**, Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

### **Επταμελή συμβουλευτική επιτροπή:**

**Ευρύκλεια Λιανίδου**, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας - Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

**Μιχαήλ Κουμπάρης**, Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

**Χρήστος Κρούπης**, Επίκουρος Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Διαγνωστικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

**Παρασκευή Μουτσάτσου**, Καθηγήτρια Ιατρικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

**Νικόλαος Γούτας**, Επίκουρος Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

**Αμάντα Ψυρρή**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

**Τριαντάφυλλος Λιλόγλου**, Αναπληρωτής Καθηγητής, University of Liverpool, UK

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 27/10/2015



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πρόσφατες μελέτες συμπεριλαμβάνουν το γονίδιο *PALB2* (Partner and localizer of BRCA2) στην συνεχώς αυξανόμενη λίστα των γονιδίων κληρονομούμενου καρκίνου του μαστού. Εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 16p12.1 και αποτελείται από 13 εξόνια που μεταγράφουν mRNA περίπου 3,5 Kb που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 1186 αμινοξέων. Τα εξόνια 4 και 5 είναι αισθητά μεγαλύτερα από όλα τα άλλα (65 % του γονιδίου). Οι παθογενετικές μεταλλάξεις του προσδίδουν έναν σοβαρό κίνδυνο καρκίνου του μαστού στους ετεροζυγώτες και αναιμία Fanconi στους φορείς διαλληλικών μεταλλάξεων (γι' αυτό αλλιώς ονομάζεται και *FANCN*). Οι μεταλλάξεις του είναι σπάνιες και έχουν ανιχνευθεί στο 1-2 % των *BRCA* αρνητικών γυναικών με καρκίνο του μαστού. Η πρωτεΐνη *PALB2* αποτελεί τον συνδετικό κρίκο των *BRCA2* και *BRCA1* που εντοπίζονται στον πυρήνα και συμμετέχει στην επιδιόρθωση των σπασιμάτων της διπλής έλικας του DNA μέσω του αλάθητου ομόλογου ανασυνδυασμού. Η σημαντική του συνεισφορά θα μπορούσε να περιοριστεί αρκετά, εκτός από την ύπαρξη μεταλλάξεων, εάν επηρεαζόταν από επιγενετικούς μηχανισμούς όπως την μεθυλίωση των CpG νησίδων του υποκινητή. Σ' αυτή την περίπτωση, οι ασθενείς θα μπορούσαν να ωφεληθούν από θεραπευτική αγωγή με *PARP* αναστολείς.

Σκοπός της εργασίας ήταν: Α) η πλήρη γενετική μελέτη του γονιδίου *PALB2* για την εύρεση τυχόν μεταλλάξεων σε δείγματα DNA περιφερικού αίματος ασθενών με κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών Β) η ανάλυση έκφρασης του γονιδίου *PALB2* σε δείγματα ιστού ασθενών με σποραδικό καρκίνο του μαστού για τον εντοπισμό τυχόν επιγενετικών μηχανισμών που να εμποδίζουν την έκφρασή του.

### Μέθοδοι

Για τη γενετική ανάλυση των μεγάλων εξονίων του γονιδίου (εξόνιο 4 και 5) αναπτύχθηκε νέα μεθοδολογία PTT (Protein Truncation Test) ενώ για τα υπόλοιπα μικρά εξόνια του γονιδίου εφαρμόστηκε μεθοδολογία HRMA. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν σ' όλα τα δείγματα με την μεθοδολογία DNA Sequencing που είχε αναπτυχθεί από την ομάδα μας. Επιπλέον, το γονίδιο ελέγχθηκε και για μεγάλες γενετικές αναδιατάξεις με την μέθοδο MLPA.

Για την ανάλυση έκφρασης του γονιδίου *PALB2*, αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν μεθοδολογίες *ryosequencing* για την μελέτη μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου και RT-qPCR με ανιχνευτή TaqMan στο Light Cycler για την ποσοτικοποίηση των *PALB2* mRNA μεταγράφων. Απομονώθηκε RNA από 91 καρκινικά δείγματα (και 4 φυσιολογικά) και παράχθηκε cDNA. Στην συνέχεια έγινε προσπάθεια επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων έκφρασης με *PALB2* πολυκλωνικό αντίσωμα με την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας (IHC).

#### Αποτελέσματα – Συμπεράσματα γενετικής ανάλυσης *PALB2* γονιδίου

Κατά τη γενετική ανάλυση 57 δειγμάτων (ανάμεσά τους 15 με μυελοειδή καρκίνο του μαστού) βρέθηκε σε δύο δείγματα η παρανοηματική μετάλλαξη Q599R, σε πέντε η συνώνυμη μετάλλαξη T1100T και σε ένα μια νέα ιντρονική μετάλλαξη. Όλες θεωρούνται πολυμορφισμοί και δεν ανιχνεύθηκε παθογενωμική μετάλλαξη. Η MLPA ανάλυση απέβηκε αρνητική σ' όλα τα δείγματα. Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη καταγεγραμμένη *PALB2* γενετική ανάλυση στον σπάνιο υπότυπο των μυελοειδών καρκινωμάτων μαστού.

#### Αποτελέσματα – συμπεράσματα έκφρασης *PALB2* γονιδίου

Κατά τη μελέτη μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου δε βρέθηκε κανένα δείγμα που να είναι μεθυλιωμένο, συνεπώς η μεθυλίωση του DNA δεν φαίνεται να είναι ένας πιθανός μηχανισμός αποσιώπησης του γονιδίου. Κατά την ανάλυση έκφρασης με RT-qPCR, 4 δείγματα από τα 91 δεν εμφάνισαν έκφραση. Το γεγονός αυτό διερευνήθηκε περαιτέρω με πειράματα ανοσοϊστοχημείας. Κατέδειξαν μόνο κυτταροπλασματική χρώση της *PALB2* πρωτεΐνης και καθόλου πυρηνική όπως αναμενόταν γεγονός που πιθανόν οφείλεται σε ελαττωματικό αντίσωμα και συνεπώς δεν μπορούσε να εξαχθεί συμπέρασμα για τον λόγο μη έκφρασης του γονιδίου. Ο μέσος όρος των αντιγράφων ήταν  $7,23 \times 10^4$  copies/μg ολικού RNA, ενώ η μέση τιμή ήταν  $1,34 \times 10^4$  copies/μg (εύρος  $3,51 \times 10$  to  $1,23 \times 10^6$  copies/μg). Έγινε προσπάθεια συσχέτισης των επιπέδων *PALB2* mRNA με τα κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων που αναλύθηκαν (μέγεθος όγκου, βαθμός, λεμφαδένες, μετάσταση, ορμονικούς υποδοχείς, *C-ERBB2* έκφραση) ωστόσο δεν βρέθηκε κάποιος στατιστικά σημαντικός συσχετισμός. Δεν φαίνεται λοιπόν να αποτελεί η *PALB2* έκφραση καλό προγνωστικό και προβλεπτικό δείκτη.

## ABSTRACT

Recent reports have included *PALB2* (Partner and localizer of BRCA2) in the growing list of hereditary cancer genes. *PALB2* is located in the chromosome region 16p12.1 and consists of 13 exons transcribing approximately 3.5Kb mRNA, which encodes a protein of 1186 amino acids. Exons 4 and 5 are much larger than all the others (65% of the coding area). Its deleterious mutations confer a moderate breast cancer risk in heterozygotes and Fanconi anemia in biallelic mutation carriers (hence its other name: *FANCN*) and are rare: 1-2 % of *BRCA* negative breast cancer patients in most populations. *PALB2* protein co-localizes with BRCA2 and BRCA1 in nuclear structures and enables error-free homologous recombination DNA repair of double-stranded breaks. This important contribution could be severely diminished, not only by mutations, but also by epigenetic mechanisms such as promoter CpG island methylation. In such a case, patients could benefit from therapeutic treatment with PARP inhibitors.

The aim of the study was: A) The genetic analysis of the *PALB2* gene for identification of mutations in DNA from peripheral blood samples of patients with familiar breast and ovarian cancer B) the expression analysis of *PALB2* gene in tissue samples of patients with sporadic breast cancer for identification of epigenetics mechanisms that might silence gene's expression.

### Methods

For the genetic analysis of the two large exons of the gene (exon 4 and 5), a PTT novel methodology was developed (Protein Truncation Test) and for the rest small exons of the gene the HRMA methodology was applied. The results were confirmed with DNA Sequencing. In addition the gene was also tested for large rearrangements with MLPA analysis.

For the expression analysis of *PALB2* gene, pyrosequencing methodology for studying the DNA methylation of the gene's promoter and RT- qPCR with a TaqMan probe in the Light Cycler for the quantification of *PALB2* mRNA transcripts were developed and validated. Then, there was an effort to confirm the expression results with immunohistochemistry (IHC) with a polyclonal *PALB2* antibody.

### Results - Conclusions

During genetic analysis of 57 samples (among them 15 samples of medullary breast cancer) the missense mutations Q599R was found in two samples, the synonymous mutation T1100T was found in five samples and an intronic new polymorphism in one sample. The MLPA analysis was negative in all samples. No deleterious *PALB2* mutation was detected. This was the first study investigating *PALB2* mutations in the rare medullary breast cancer.

During the DNA methylation analysis of the *PALB2* promoter all specimens were found to be negative therefore, rendering DNA methylation as an unlikely mechanism for its expression silencing. In RT-qPCR four samples had no *PALB2* expression. The fact that *PALB2* gene was not expressed in four specimens was examined further with immunohistochemistry experiments. They have shown only cytoplasmic staining of the *PALB2* protein with no nuclear staining; probably due to defective antibody, thus it was not possible to draw any conclusion for *PALB2* protein expression profile of those four samples. The average value of the copies was  $7,23 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{g}$  of total RNA, while the median value was  $1,34 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{g}$  (range  $3,51 \times 10$  to  $1,23 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{g}$ ). The results were compared with clinical and histopathological data (tumor size, grade, lymph node involvement, hormone receptors, *C-ERBB2* overexpression) but no significant statistical correlation was found. So far, *PALB2* expression does not seem to be a promising prognostic and predictive biomarker for sporadic breast cancer.

**KEYWORDS:** *PALB2* (Partner and localizer of BRCA2), PTT (Protein Truncation Test), HRMA (High Resolution Melting curve Analysis), MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification), Pyrosequencing, DNA Methylation, RT- qPCR, reverse transcriptase- quantitative PCR.



## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του Αττικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Αθηνών, της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, στα πλαίσια του Διδακτορικού Προγράμματος υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Χρήστου Κρούπη και της Καθηγήτριας Αναλυτικής Χημείας- Κλινικής Χημείας του τμήματος Χημείας κα. Εύη Λιανίδου. Η εργασία ξεκίνησε τον Μάρτιο του 2009 και χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα Ηράκλειτος (70/3/10973) για 3 έτη.

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Ε. Λιανίδου, Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών για την παροχή του LightScanner 32 (Idaho) προκειμένου να κάνω HRMA και τις εύστοχες παρατηρήσεις της κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Χ. Κρούπη για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη την διάρκεια αυτής της εργασίας αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, παρέχοντάς μου την δυνατότητα να μάθω τόσο πολλές τεχνικές.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής – Τοξικολογίας Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών - Ε.Κ.Π.Α, τον κ. Νικόλαο Γούτα, Παθολογοανατόμο, στο Ευγενίδειο Θεραπευτήριο για την προσφορά των ιστών από ασθενείς με σποραδικό καρκίνο του μαστού και την προσφορά αντιδραστηρίων και εξοπλισμού προκειμένου να γίνουν τα πειράματα IHC.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Τριαντάφυλλο Λιλόγλου στο Πανεπιστήμιο του Liverpool (Dept. Of Molecular and Clinical Cancer Medicine) για την δυνατότητα που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριο του, στην εκμάθηση της τεχνικής του Pyrosequencing, την παροχή αντιδραστηρίων, την επίβλεψη και την καθοδήγηση του καθ' όλη την διάρκεια της παραμονής μου στο Liverpool και μέχρι την ολοκλήρωση της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κουμπάρη και όλα τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Επίσης, να ευχαριστήσω την Δρ. Χριστίνα Τσιώνου, Γυναικολόγο, στο Κέντρο Μαστού του Μαιευτηρίου Μητέρα για την προσφορά των δειγμάτων περιφερικού αίματος για την γενετική ανάλυση καθώς και τους ίδιους τους ασθενείς και τις οικογένειές τους για την συμμετοχή στην έρευνα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Άννα Παπαδοπούλου και τον Γιώργο Κουτσοδόνη για την βοήθεια και την άψογη συνεργασία και την παραχώρηση του Γενετικού Αναλυτή ABI-3500 κατά την εκτέλεση της MLPA ανάλυσης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, την Διδάκτορα Αθηνά Μάρκου του εργαστηρίου Κλινικής Χημείας του Τμήματος Χημείας καθώς και την διδάκτορα Amelia Acha Sagredo του εργαστηρίου του Liverpool για τη βοήθεια και συμπαράστασή τους. Επίσης την μεταδιδακτορική φοιτήτρια Samantha Oliveira καθώς και τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες του εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας του Νοσοκομείου ΑΤΤΙΚΟΝ, Αλίκη Βελισσάρη, Τζίκα Κωνσταντίνα και Καραγλάνη Μακρίνα για την βοήθεια, την συμπαράστασή τους και την ευχάριστη παρέα καθ' όλη την διάρκεια της παραμονής τους στο εργαστήριο, όπως και το υπόλοιπο προσωπικό του Βιοχημικού τμήματος του Αττικού Νοσοκομείου για το ευχάριστο κλίμα και την ηθική συμπαράστασή τους.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την ανοχή, την κατανόηση και την οικονομική υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς την υποστήριξή τους δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί αυτή η διατριβή.

## Περιεχόμενα

Θεωρητικό μέρος .....	1
Κεφάλαιο 1 <sup>ο</sup> Καρκίνος του μαστού .....	1
1.1 Ο καρκίνος και η θεραπεία του στην αρχαία Ελλάδα .....	1
1.2 Επιδημιολογικά Στοιχεία .....	2
1.3 Παθολογοανατομική Ταξινόμηση του Καρκίνου του Μαστού .....	6
1.4 Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού .....	11
1.5 Κλινικά σημεία και συμπτώματα .....	13
1.6 Διάγνωση καρκίνου του μαστού .....	13
1.7 Εξετάσεις για τον καρκίνο του μαστού .....	14
1.7.1 Εργαστηριακές εξετάσεις για τον καρκίνο του μαστού .....	16
1.7.2 Μη εργαστηριακές εξετάσεις.....	29
1.8 Πρόληψη καρκίνου του μαστού.....	30
1.9 Οδηγίες για πρώιμη ανίχνευση.....	30
1.10 Θεραπευτική Αντιμετώπιση του Καρκίνου του Μαστού .....	31
Κεφάλαιο 2 <sup>ο</sup> Κληρονομούμενος καρκίνος του μαστού και των ωθηκών- Γονίδιο <i>PALB2</i> 33	
Εισαγωγή .....	33
2.1 Κληρονομούμενος καρκίνος του μαστού και των ωθηκών .....	33
2.2 Το γονίδιο <i>PALB2</i> .....	41
2.2.1 Ρόλος του <i>PALB2</i> στον κυτταρικό κύκλο .....	41
2.2.2 Οι μεταλλάξεις που έχουν έως τώρα βρεθεί στο <i>PALB2</i> .....	47
2.2.3 Επιγενετικές τροποποιήσεις στο <i>PALB2</i> γονίδιο .....	52
2.2.4 Μελλοντικές κατευθύνσεις .....	53
Κεφάλαιο 3 <sup>ο</sup> - Αρχές μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν.....	55
3.1 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ <i>PALB2</i> ΓΟΝΙΔΙΟΥ.....	55
3.1.1 Δοκιμασία πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης (Protein .....	55
Truncation Test, PTT).....	55
3.1.1.1 Αρχή μεθόδου PTT .....	55
3.1.1.2 Εφαρμογές της μεθόδου PTT .....	60
3.1.1.3 Πλεονεκτήματα –Μειονεκτήματα της μεθόδου PTT .....	60
3.1.2 High Resolution Melting Analysis (HRM).....	61
3.1.2.1 Αρχή Μεθόδου .....	61
3.1.2.2 Πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα της μεθόδου.....	62

3.1.2.3 Εφαρμογές της HRMA τεχνικής .....	63
3.1.2.4 Αλληλούχιση DNA (DNA Sequencing)-Η ενζυμική μέθοδος κατά Sanger.....	63
3.1.3 Αυτοματοποίηση του DNA Sequencing.....	66
3.1.3.1 Αρχή Μεθόδου .....	66
3.1.4 MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) .....	68
3.1.4.1 Αρχή Μεθόδου .....	68
3.1.4.2 MLPA παραλλαγές.....	70
3.1.4.3 Πλεονεκτήματα της MLPA.....	70
3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ <i>PALB2</i> ΓΟΝΙΔΙΟΥ .....	71
3.2.1 Ανάλυση μεθυλίωσης με την μέθοδο Pyrosequencing. ....	71
3.2.2 Real-Time qPCR .....	74
3.2.2.1 Πλεονεκτήματα- Μειονεκτήματα .....	78
3.2.2.2 Σύστημα ανίχνευσης της PCR σε πραγματικό χρόνο με ανιχνευτές διπλής χρωστικής τύπου TaqMan.....	78
3.2.2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός με Real-time qPCR .....	80
3.2.3 Ανοσοϊστοχημεία (IHC).....	83
3.2.3.1 Πλεονεκτήματα- Μειονεκτήματα της IHC.....	85
Πειραματικό μέρος.....	87
Κεφάλαιο 4 - Υλικά και μέθοδοι .....	87
4.1 Γενετική Ανάλυση <i>PALB2</i> γονιδίου.....	87
4.1.1 Δοκιμασία πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης (Protein Truncation Test, PTT).....	92
4.1.2 High Resolution Melting Analysis .....	105
4.1.3 DNA Sequencing .....	108
4.1.4 MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) .....	121
4.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ <i>PALB2</i> ΓΟΝΙΔΙΟΥ .....	124
4.2.1 Έκφραση γονιδίου <i>PALB2</i> με Real-time qPCR .....	136
4.2.2 Ανίχνευση μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου <i>PALB2</i> .....	143
4.2.3 Ανοσοϊστοχημεία (IHC).....	154
4.2.4 Στατιστική Ανάλυση .....	157
Κεφάλαιο 5 – Αποτελέσματα .....	159
5.1- Αποτελέσματα Γενετικής Ανάλυσης του <i>PALB2</i> γονιδίου .....	159
Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών.....	159

5.1.1 Δοκιμασία πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης (PTT) για τα μεγάλα εξόνια του γονιδίου <i>PALB2</i> .....	164
5.1.2 High Resolution Melting Analysis μικρών εξονίων του γονιδίου <i>PALB2</i> .....	167
5.1.3 DNA Sequencing του γονιδίου <i>PALB2</i> .....	170
5.1.4 MLPA ανάλυση του <i>PALB2</i> γονιδίου .....	175
5.2- Ανάλυση Έκφρασης του <i>PALB2</i> γονιδίου.....	177
5.2.1 Ανίχνευση μεθυλίωσης του <i>PALB2</i> υποκινητή με Pyrosequencing .....	183
5.2.2 Έκφραση γονιδίου <i>PALB2</i> με RT- qPCR .....	185
5.2.3 Ανοσοϊστοχημεία (IHC).....	192
5.2.4 MLPA.....	194
Κεφάλαιο 6 – Συμπεράσματα –Συζήτηση .....	195
6.1 Γενετική Ανάλυση του <i>PALB2</i> γονιδίου .....	195
Νέος αλγόριθμος γενετικής ανάλυσης για κληρονομούμενο καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών .....	201
Μελλοντικές εξελίξεις στην γενετική/επιγενετική ανάλυση κληρονομούμενου καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών .....	202
6.2 Ανάλυση Έκφρασης του <i>PALB2</i> γονιδίου .....	203
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	207



## Κατάλογος σχημάτων

<b>Σχήμα 1.1:</b> α) Επίπτωση του καρκίνου του μαστού στο γυναικείο πληθυσμό β) Επίπτωση του καρκίνου του μαστού στο σύνολο του πληθυσμού (δεν απεικονίζεται ο καρκίνος του δέρματος).....	3
<b>Σχήμα 1.2:</b> Τα πιο συχνά νεοπλασμάτα στην Ελλάδα το διάστημα 2009-2011.....	4
<b>Σχήμα 1.3:</b> Ποσοστά καρκίνου μαστού από το 2009-2011. ....	4
<b>Σχήμα 1.4:</b> Είδη καρκίνου του μαστού στην Ελλάδα 2009-2011. ....	5
<b>Σχήμα 1.5:</b> Ηλικίες εμφάνισης γυναικείου καρκίνου του μαστού στην Ελλάδα 2009-2011. ..	5
<b>Σχήμα 1.6:</b> Εκτιμώμενη επίπτωση και θνησιμότητα για τον καρκίνο του μαστού στο γυναικείο πληθυσμό ανά 100.000 γυναίκες.....	6
<b>Σχήμα 1.7:</b> Η χρονική εξέλιξη του καρκίνου του μαστού παρουσιάζει ετερογένεια. ....	10
<b>Σχήμα 1.8:</b> Αλγόριθμος εξέτασης Oncotype DX για τη βαθμολόγηση επανεμφάνισης καρκίνου (RS, Recurrence Score) (25).....	22
<b>Σχήμα 1.9:</b> Στάδια εξέτασης της μικροσυστοιχίας MammaPrint (Agendia).....	23
<b>Σχήμα 1.10 :</b> Κυτταρικός κύκλος και σημεία ελέγχου. ( <a href="http://herb4cancer.files.wordpress.com">http://herb4cancer.files.wordpress.com</a> ).....	25
<b>Σχήμα 1.11:</b> Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού (1).....	27
<b>Σχήμα 2.1:</b> Διάγραμμα συσχέτισης κινδύνου μεταλλαγμένου αλληλίου σε σχέση με τη συχνότητά του (41). ....	35
<b>Σχήμα 2.2:</b> Βλάβες DNA και μηχανισμός επιδιόρθωσης.....	41
<b>Σχήμα 2.3:</b> Μηχανισμοί επιδιόρθωσης DNA βλαβών σε φυσιολογικά κύτταρα καθώς και σε κύτταρα με έλλειμα στον HR(74). ....	42
<b>Σχήμα 2.4:</b> Δίκτυο πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού (40).....	43
<b>Σχήμα 2.5:</b> Σχηματική αναπαράσταση της δράσης του PALB2 στο τελικό στάδιο του HR (78). .....	44
<b>Σχήμα 2.6:</b> Περιοχή του χρωμοσώματος 16 που εντοπίζεται το PALB2 ( <a href="http://genecards.cccb.re.kr/cards/pics/loc/GC16M023522.PALB2.png">http://genecards.cccb.re.kr/cards/pics/loc/GC16M023522.PALB2.png</a> ).....	45
<b>Σχήμα 2.7:</b> Δομή γονιδίου PALB2 και δομικές περιοχές της πρωτεΐνης PALB2 (40) .....	45
<b>Σχήμα 2.8:</b> PALB2 πρωτεΐνη συνδετικός κρίκος των BRCA1 και BRCA2 πρωτεϊνών κατά την επιδιόρθωση μέσω HR (82).....	46
<b>Σχήμα 2.9:</b> Περιοχές αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών BRCA1-BRCA2- PALB2 (86). ....	46
<b>Σχήμα 3.1:</b> Διαγραμματική αναπαράσταση των σταδίων της μεθόδου PTT .....	56
<b>Σχήμα 3.2:</b> Αλληλουχία 5'-εκκινητού ειδικού για PTT σε συνδυασμό με T7 πολυμεράση....	57
<b>Σχήμα 3.3:</b> Αλληλουχία 5'-εκκινητού ειδικού για PTT σε συνδυασμό με επίτοπο από την <i>mgc</i> πρωτεΐνη.....	57
<b>Σχήμα 3.4:</b> Παράδειγμα ανίχνευσης μεταλλάξεων με PTT (αυτοραδιογραφία) – θέσεις 1, 3-5 φυσιολογικά δείγματα, θέση 2, μεταλλαγμένο δείγμα.....	59
<b>Σχήμα 3.5:</b> Ενδεικτικό διάγραμμα καμπυλών τήξεως Ομοζυγώτης (A/A)- Ετεροζυγώτης (G/A)-Φυσιολογικός (G/G).....	62
<b>Σχήμα 3.6:</b> Δομή dNTP και ddNTP .....	64
<b>Σχήμα 3.7:</b> Προσθήκη ενός ddNTP σταματά την επιμήκυνση της αλυσίδας. ....	64
<b>Σχήμα 3.8:</b> Αρχή ενζυμικής μεθόδου DNA sequencing κατά Sanger.....	65

<b>Σχήμα 3.9:</b> α. Μέθοδος θερμικών κύκλων β. Μέθοδος DNA Sequencing με χρήση Dye Terminators ddNTPs.....	67
<b>Σχήμα 3.10:</b> Ηλεκτροφορογράφημα από DNA Sequencing. ....	68
<b>Σχήμα 3.11:</b> Βασικά στάδια MLPA αντίδρασης (www.mlpa.com). ....	69
<b>Σχήμα 3.12:</b> Στάδιο 2.....	71
<b>Σχήμα 3.13:</b> Στάδιο 3.....	72
<b>Σχήμα 3.14:</b> Στάδιο 4.....	73
<b>Σχήμα 3.15:</b> Στάδιο 5.....	73
<b>Σχήμα 3.16:</b> Σχηματική παράσταση της PCR. ....	75
<b>Σχήμα 3.17:</b> Οι φάσεις της real-time PCR. ....	77
<b>Σχήμα 3.18:</b> Καμπύλη βαθμονόμησης real-time PCR.....	77
<b>Σχήμα 3.19:</b> Φαινόμενο FRET. ....	79
<b>Σχήμα 3.20:</b> Αρχή μεθόδου συστήματος ανίχνευσης τύπου TaqMan. ....	80
<b>Σχήμα 3.21:</b> Σχηματική αναπαράσταση έμμεσης ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού (άμεσης ανοσοϊστοχημείας). ....	85
<b>Σχήμα 3.22:</b> Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας IHC που χρησιμοποιήθηκε με HRP πολυμερές. ....	85
<b>Σχήμα 4.1:</b> Φωτογραφία Qubit® φθορισμομέτρου. ....	91
<b>Σχήμα 4.2:</b> Σχηματική παράσταση του θερμικού κυκλοποιητή Primus 25 της MWG. ....	93
<b>Σχήμα 4.3:</b> TNT Quick Coupled Transcription/Translation System. ....	97
<b>Σχήμα 4.4:</b> «Sandwich» τεχνική. ....	104
<b>Σχήμα 4.5:</b> Σχέση πρόσδεσης του DNA στην μεμβράνη με το pH.....	112
<b>Σχήμα 4.6:</b> Επίδραση του όγκου του ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-Cl, pH 8,5 στην απόδοση απομόνωσης του DNA.....	113
<b>Σχήμα 4.7:</b> Γενετικός Αναλυτής ABI 310. ....	118
<b>Σχήμα 4.8:</b> Η RNA εκλεκτικότητα και ευαισθησία του Quant-iT™ RNA Assay Kit. ....	128
<b>Σχήμα 4.9:</b> Επισκόπηση των τριών διαφορετικών συστημάτων εκκινητών κατά τη σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA. ....	130
<b>Σχήμα 4.10:</b> Θέση εκκινητών και TaqMan ανιχνευτή πάνω στο cDNA. ....	137
<b>Σχήμα 4.11:</b> Σχηματική αναπαράσταση οργανολογίας LightCycler. ....	140
<b>Σχήμα 4.12:</b> Μετατροπή της μη μεθυλιωμένης και της μεθυλιωμένης κυτοσίνης με όξινο θειώδες νάτριο. ....	147
<b>Σχήμα 4.13:</b> CpG νησίδα του <i>PALB2</i> γονιδίου. ....	149
<b>Σχήμα 4.14:</b> Χαρακτηριστικά εκκινητών για την αντίδραση PCR του <i>PALB2</i> γονιδίου. ....	150
<b>Σχήμα 4.15:</b> Περιοχές του υποκινητή που εξετάστηκαν από τις 4 παραπάνω μελέτες.....	150
<b>Σχήμα 4.16:</b> Σύστημα προετοιμασίας δειγμάτων για Pyrosequencing. ....	152
<b>Σχήμα 5.1:</b> PCR προϊόντα των <i>PALB2</i> εξονίων 4 και 5 της μεθόδου PTT.....	165
<b>Σχήμα 5.2:</b> Western Blot σε μεμβράνη PVDF με μέθοδο PTT από το εξόνιο 4 του γονιδίου <i>PALB2</i> .....	166
<b>Σχήμα 5.3:</b> Western Blot σε μεμβράνη PVDF με μέθοδο PTT από το εξόνιο 5 του γονιδίου <i>PALB2</i> .....	167
<b>Σχήμα 5.4:</b> Καμπύλη τήξης για το εξόνιο 12 δειγμάτων και ανάμεσά τους δείγμα που φέρει τον πολυμορφισμό T1100T (μπλε χρώμα).....	168
<b>Σχήμα 5.5:</b> Ηλεκτροφορογράφημα μετάλλαξης στο εξόνιο 12 δείγματος που φέρει τον πολυμορφισμό T1100T. ....	169



<b>Σχήμα 5.6:</b> Καμπύλη τήξης για το εξόνιο 10 δειγμάτων και ανάμεσά τους και το δείγμα 43 που φέρει την αλλαγή στο ιντρόνιο πριν το εξόνιο 10.....	169
<b>Σχήμα 5.7:</b> Ηλεκτροφορογράφημα μετάλλαξης στο ιντρόνιο πριν το εξόνιο 10 του δείγματος 43 που φέρει τον πολυμορφισμό c.3197-46 G>C.....	170
<b>Σχήμα 5.8:</b> Αντιπροσωπευτική PCR για το εξόνιο 1 (1,5 %w/v, gel αγαρόζης). .....	170
<b>Σχήμα 5.9:</b> Αντιπροσωπευτική PCR για τα εξόνια 2,3 (1,5 %w/v, gel αγαρόζης).....	170
<b>Σχήμα 5.10:</b> Αντιπροσωπευτική PCR για το εξόνιο 4α (1,5 %w/v, gel αγαρόζης).....	171
<b>Σχήμα 5.11:</b> Αντιπροσωπευτική PCR για το εξόνιο 4b (1,5 %w/v, gel αγαρόζης).....	171
<b>Σχήμα 5.12:</b> Αντιπροσωπευτική PCR για το εξόνιο 4c (1,5 %w/v, gel αγαρόζης).....	171
<b>Σχήμα 5.13:</b> Αντιπροσωπευτική PCR για το εξόνιο 4d (1,5 %w/v, gel αγαρόζης). .....	171
<b>Σχήμα 5.14:</b> Αντιπροσωπευτική PCR για τα εξόνια 5b και 5a αντίστοιχα (1,5 %w/v, gel αγαρόζης). .....	172
<b>Σχήμα 5.15:</b> Αντιπροσωπευτική PCR για το εξόνιο 8 (1,5 %w/v, gel αγαρόζης). .....	172
<b>Σχήμα 5.16:</b> Αντιπροσωπευτική PCR για το εξόνιο 9 (1,5 %w/v, gel αγαρόζης). .....	172
<b>Σχήμα 5.17:</b> Αντιπροσωπευτική PCR για τα εξόνια 6, 7, 10 αντίστοιχα (1,5 %w/v, gel αγαρόζης). .....	173
<b>Σχήμα 5.18:</b> Αντιπροσωπευτική PCR για τα εξόνια 11, 12 αντίστοιχα (1,5 %w/v, gel αγαρόζης).....	173
<b>Σχήμα 5.19:</b> Αντιπροσωπευτική PCR για το εξόνιο 13 (1,5 %w/v, gel αγαρόζης). .....	173
<b>Σχήμα 5.20:</b> Ηλεκτροφορογράφημα μετάλλαξης στο <i>PALB2</i> εξόνιο 4d δείγματος που φέρει τον πολυμορφισμό Q559R. ....	174
<b>Σχήμα 5.21:</b> Ηλεκτροφορογράφημα μετάλλαξης στο <i>PALB2</i> εξόνιο 12 δείγματος που φέρει τον πολυμορφισμό T1100T. ....	174
<b>Σχήμα 5.22: A.</b> Raw Data κορυφές ανιχνευτών για κάθε εξόνιο των 3 γονιδίων που εξετάζει το kit, καθώς και ανιχνευτών ελέγχου που κρίνουν την ποιότητα της ανάλυσης. <b>B.</b> Οι μαύρες κουκκίδες είναι η τιμή του κάθε ανιχνευτή για το συγκεκριμένο δείγμα, η κόκκινη και η μπλε γραμμή (0,7-1,4) δημιουργούνται από την επεξεργασία των τιμών του συνόλου των φυσιολογικών δειγμάτων και αποτελούν τα όρια μέσα στα οποία θα πρέπει να βρίσκεται ένα φυσιολογικό δείγμα (95% όριο εμπιστοσύνης $\pm 2SD$ ). Πάνω από την μπλε γραμμή θεωρούμε ότι έχουν διπλασιασμό κάποιου εξονίου ενώ κάτω από την κόκκινη γραμμή έλλειψη.....	176
<b>Σχήμα 5.23:</b> PCR αντιδράσεις για την ανίχνευση επιγενετικών τροποποιήσεων στον υποκινητή του γονιδίου <i>PALB2</i> . .....	183
<b>Σχήμα 5.24:</b> Πυρογράφημα <i>PALB2</i> υποκινητή για το μη μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου τα ποσοστά Meth (%) είναι ο λόγος A/A+G για την reverse ακολουθία που ισχύει στην περίπτωση μας. Ο μέσος όρος είναι 0,92 % στα 12 εξεταζόμενα CpGs. Μιας και ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε υβριδίζεται στον ανάστροφο κλώνο, το ποσοστό της μεθυλίωσης προκύπτει από τον λόγο G/A+G καθώς μια μεθυλιωμένη κυτοσίνη παραμένει κυτοσίνη κατά την μετατροπή του DNA και είναι συμπληρωματική με την G. Τα 12 εξεταζόμενα CpGs παρουσιάζονται ως μπλε στήλες ενώ με τις κίτρινες στήλες παρουσιάζονται οι δυο κυτοσίνες εκτός CpGs περιοχών οι οποίες εξετάστηκαν προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της DNA μετατροπής με θειώδες νάτριο. ....	184
<b>Σχήμα 5.25:</b> Πυρογράφημα <i>PALB2</i> υποκινητή για το 80% μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου (τα ποσοστά Meth (%) είναι ο λόγος A/A+G για την reverse ακολουθία που ισχύει στην περίπτωση μας). Ο μέσος όρος είναι 76,23 % στα 12 εξεταζόμενα CpGs.....	185

<b>Σχήμα 5.26:</b> Ενίσχυση δειγμάτων κατά την RT - qPCR στο <i>PALB2</i> γονίδιο.....	186
<b>Σχήμα 5.27:</b> Ηλεκτροφόρηση προϊόντων RT-qPCR σε πηκτή αγαρόζης 2% σε cDNA από MCF-7 κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού και αραιώσεις του.....	186
<b>Σχήμα 5.28:</b> Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για τη μέθοδο RT - qPCR στο <i>PALB2</i> γονίδιο. .....	189
<b>Σχήμα 5.29:</b> Ενδεικτικά IHC αποτελέσματα: A. Χρώση DAB για το αντίσωμα έναντι της προγεστερόνης (θετικό control) B. Χρώση DAB για το αντίσωμα έναντι της <i>PALB2</i> πρωτεΐνης Γ. Αρνητικό δείγμα χωρίς την προσθήκη πρωτοταγούς αντισώματος. ....	193
<b>Σχήμα 5.30:</b> MLPA αντίδραση του DNA δείγματος του ιστού t16.....	194
<b>Σχήμα 6.1:</b> Αλγόριθμος γενετικής ανάλυσης για τον κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού για τις περισσότερες χώρες (εξωτερικός κύκλος). Τα προηγμένα συστήματα υγείας που μπορούν να καλύψουν το κόστος του Next Generation Sequencing θα μπορούσαν να ακολουθήσουν μόνο τον εσωτερικό κύκλο στο μέλλον (40).....	202

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1: Κυριότερες εξετάσεις καρκίνου του μαστού (www.labtestsonline.gr).....	14
Πίνακας 2.1 Μεταλλάξεις των εξονίων του γονιδίου PALB2(108).....	49
Πίνακας 2.2. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο PALB2.....	50
Πίνακας 4.1. Ακολουθίες εκκινητών, θέσεις εκκινητών και μέγεθος PCR προϊόντων της μεθόδου ΡΤΤ για το γονίδιο PALB2.....	94
Πίνακας 4.2.Συστατικά της αντίδρασης PCR για το γονίδιο PALB2.....	94
Πίνακας 4.3.Συνθήκες της αντίδρασης PCR του γονιδίου PALB2.....	95
Πίνακας 4.4. Συστατικά της αντίδρασης για την in vitro μεταγραφή/ μετάφραση του γονιδίου PALB2.....	98
Πίνακας 4.5. Αλληλουχία PALB2 εκκινητών για HRMA και θερμοκρασίες υβριδοποίησης για το κάθε σετ.....	105
Πίνακας 4.6. Συστατικά της real-time PCR αντίδρασης.....	106
Πίνακας 4.7.Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της real-time PCR στο Light Cycler.....	107
Πίνακας 4.8. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα καμπύλης τήξης.....	108
Πίνακας 4.9. Χαρακτηριστικά εκκινητών για τις αντιδράσεις PCR του γονιδίου PALB2(98).....	109
Πίνακας 4.10. Συστατικά της αντίδρασης PCR για το γονίδιο PALB2.....	110
Πίνακας 4.11: Συνθήκες της αντίδρασης PCR του γονιδίου PALB2.....	111
Πίνακας 4.12.Συστατικά της αντίδρασης cycle sequencing για το γονίδιο PALB2.....	115
Πίνακας 4.13. Συνθήκες της αντίδρασης cycle sequencing για τους εκκινητές του γονιδίου PALB2.....	115
Πίνακας 4.14 Εύρος περιοχών των μηκών κύματος των ομάδων των εικονικών φίλτρων..	119
Πίνακας 4.15 Μέγιστη απορρόφηση και εκπομπή των χρωστικών.....	120
Πίνακας 4.16. Θερμοκρασιακές συνθήκες PCR.....	123
Πίνακας 4.17. Συστατικά μίγματος εκμαγείου RNA-εκκινητή κατά τη σύνθεση του cDNA.....	131
Πίνακας 4.18. Συστατικά που περιέχονται στο δεύτερο μίγμα της σύνθεσης του cDNA.....	132
Πίνακας 4.19. Συστατικά της PCR αντίδρασης για το γονίδιο αναφοράς PBGD.....	134
Πίνακας 4.20. Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο αναφοράς PBGD.....	134
Πίνακας 4.21. Αλληλουχία εκκινητών για το γονίδιο αναφοράς της ακτίνης.....	135
Πίνακας 4.22. Αλληλουχία εκκινητών και ανιχνευτή TaqMan.....	137
Πίνακας 4.23. Συστατικά της real-time qPCR αντίδρασης.....	138
Πίνακας 4.24. Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της real-time qPCR.....	139
Πίνακας 4.25. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα καμπύλης τήξης.....	139
Πίνακας 4.26. Διαδοχικές αραιώσεις για την δημιουργία των δειγμάτων ελέγχου.....	146
Πίνακας 4.27.Συστατικά της αντίδρασης PCR για το γονίδιο PALB2.....	151
Πίνακας 4.28. Συνθήκες της αντίδρασης PCR για τον υποκινητή του γονιδίου PALB2.....	151
Πίνακας 5.1. Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών και αποτελέσματα γενετικής ανάλυσης.....	159
Πίνακας 5.2 . Συγκεντρωτικά αποτελέσματα PALB2 μεταλλάξεων και συγκέντρωση του DNA των δειγμάτων που αναλύθηκαν.....	163
Πίνακας 5.3. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο του μαστού.....	177
Πίνακας 5.4. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού RNA δειγμάτων.....	181
Πίνακας 5.5. Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού του PALB2 mRNA.....	187
Πίνακας 5.6. Κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών.....	190



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

<i>Συντομογραφία</i>	<i>Πλήρης Ονομασία</i>
ABC	Avidin-biotin complex
APS	Ammonium PerSulfate
BRCA1	BReast CAncer gene 1
BRCA2	BReast CAncer gene 2
BASC	BRCA1-associated genome surveillance complex
BER	Base excision repair
BrCa	Breast Cancer
BSA	Bovine serum albumin
CCD	Charge coupled device
cDNA	complementary DNA
Cq	Quantification cycle
Cp	Crossing point
CV	Coefficient of Variation
DCIS	Ductal Carcinoma <i>In Situ</i>
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid
ER	Estrogen Receptor
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
HER2/neu	Human Epidermal growth factor type 2 Receptor

HR	Homologous recombination
HRP	Horse radish peroxydase
IHC	Immunohistochemistry
ILC	Invasive Lobular Carcinoma
IDC	Invasive Ductal Carcinoma
IARC	International Agency for Research in Cancer
LCIS	Lobular Carcinoma <i>In Situ</i>
LOH	Loss of heterozygosity
MPNST	Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OvCa	Ovarian Cancer
PALB2	Partner And Localizer of BRCA2
PR	Progesterone Receptor
PTT	Protein Truncation Test
<i>PBGD</i>	PorphobilinoGen Deaminase
PCR	Polymerase Chain Reaction
RS	Recurrence Score
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
SD	Standard Deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TBE	Tris/Borate/EDTA
T <sub>m</sub>	melting Temperature

TNBC	Triple Negative Breast Cancer
TGF-a	Transforming Growth Factor – alpha
WHO	World Health Organization





## Θεωρητικό μέρος

### Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> Καρκίνος του μαστού

#### 1.1 Ο καρκίνος και η θεραπεία του στην αρχαία Ελλάδα

Αρχαίες πηγές παρέχουν αξιοσημείωτες πληροφορίες για την ύπαρξη πολλών κακοηθειών στην κλασική περίοδο. Ο Ιπποκράτης πιστεύεται ότι ήταν ο πρώτος θεραπευτής που έδωσε ιδιαίτερη προσοχή στην θεραπεία του καρκίνου. Σε αυτές του τις παρατηρήσεις οφείλουμε την σημερινή ορολογία για τα διάφορα είδη των μορφωμάτων συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου, των καρκινωμάτων, των ελκών, της σκλήρυνσης, του κρυφού ή του επιφανειακού καρκίνου και άλλων. Οι ισχυρισμοί του Ιπποκράτη σχετικά με τον καρκίνο βασίζονται μόνο στην κλινική παρατήρηση, τον θεμέλιο λίθο στην ιατρική του Ιπποκράτη. Υποστηρίζει ότι προκειμένου να θεραπευτούν αποτελεσματικά οι όγκοι, κάποιος πρέπει να εγκαθιδρύσει κάποια βασικά κριτήρια που σχετίζονται με την συνολική κατάσταση του ασθενή και την συγκεκριμένη δομή, λαμβάνοντας υπ' όψιν την ηλικία του, τον τύπο των όγκων καθώς και τα όργανα υπό θεραπεία. Πιστεύει ότι οι άντρες δεν διατρέχουν μεγάλο κίνδυνο, ειδικά μετά την ηλικία των 60, ωστόσο θα πρέπει να φοβούνται κρυμμένους καρκίνους. Επίσης, αναφέρει ότι ο μη κληρονομούμενος καρκίνος δεν αναπτύσσεται πριν την ενηλικίωση. Κατά την γνώμη του, οι πιο δύσκολες περιπτώσεις για θεραπεία είναι αυτές της μασχάλης, των λαγόνιων οστών του σώματος και του μηρού. Επιπλέον αξιοπρόσεκτη ήταν η παρατήρησή του ότι οι κρυμμένοι όγκοι δεν πρέπει να θεραπεύονται καθόλου γιατί είναι μη θεραπεύσιμοι και συνήθως ο ασθενής ζει περισσότερο χωρίς θεραπεία. Τέλος, πίστευε ότι η θεωρία των τεσσάρων υγρών του σώματος. Δεν συνδέεται άμεσα με την δημιουργία των όγκων ούτε θεωρούνται αυτοί φλεγμονώδους προέλευσης, όπως υποστήριζαν κάποιοι θεραπευτές. Ανάμεσα σε άλλα, αναφέρει και ένα περιστατικό μιας γυναίκας από τα Άβδηρα που είχε καρκίνο του μαστού με αιματηρά εκκρίματα από την θηλή τα οποία μόλις σταμάτησαν, αυτή πέθανε.

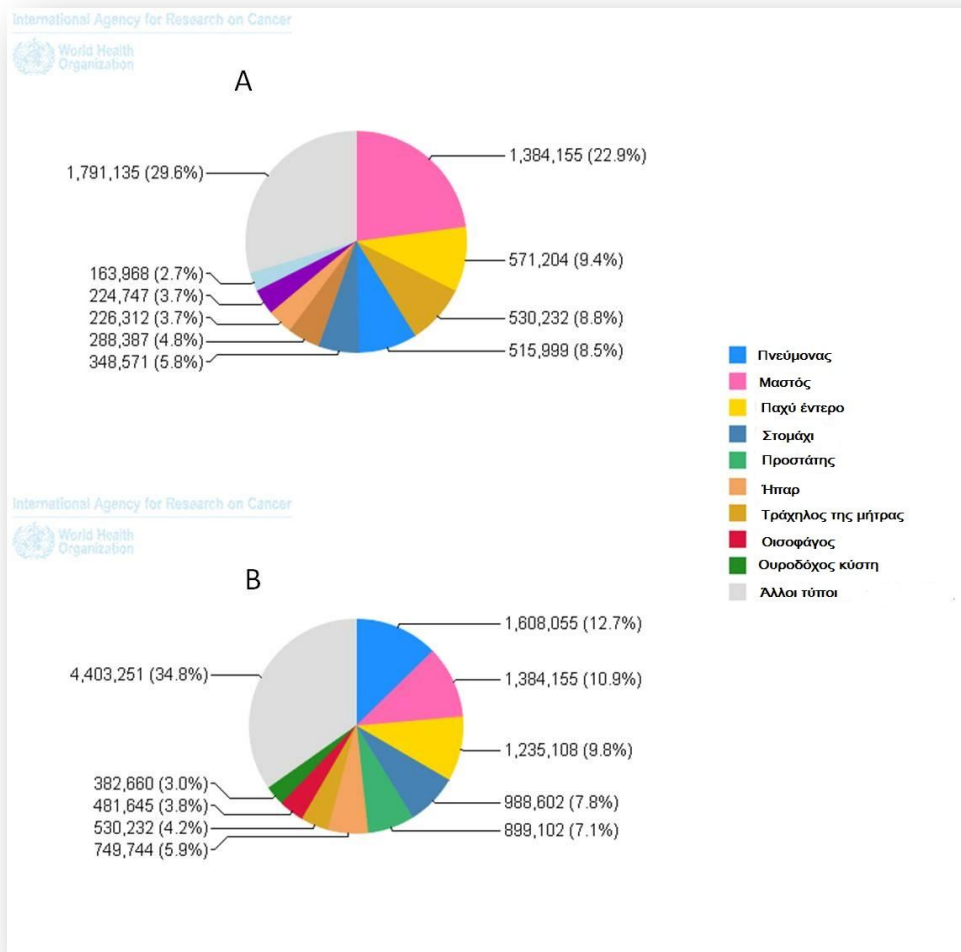
Εκτός από τον Ιπποκράτη, υπήρξαν και άλλοι πολλοί θεραπευτές οι οποίοι πίστευαν στην θεωρία των τεσσάρων υγρών του σώματος σύμφωνα με την οποία οποιαδήποτε διαταραχή στην σύστασή τους οδηγεί σε ασθένεια. Οι γυναίκες που βρίσκονταν στην

εμμηνόπαυση, για παράδειγμα, θεωρούνταν ότι ήταν δεκτικές σε καρκίνο του μαστού. Η ασθένεια επίσης συνδέθηκε και με το κακό κλίμα. Οι Βορειοευρωπαίοι που κατανάλωναν γάλα δεν επηρεάζονταν σε σχέση με τους Αιγυπτίους που τα βασικά στοιχεία της τροφής τους ήταν οι φακές, τα σαλιγκάρια, το αλατισμένο κρέας και άλλα παρόμοια. Μια υγιεινή διατροφή θα έπρεπε να περιλαμβάνει κριθαρένιο αλεύρι, γάλα, ψάρια, πουλερικά και λαχανικά. Ο καρκίνος θεωρείτο θεραπεύσιμος μόνο στα πρώιμα στάδια. Οι κρυμμένοι όγκοι δεν εγχειρίζονταν εύκολα. Οι χειρουργικές εγχειρήσεις δεν γίνονταν στο κεφάλι, στον λαιμό και στην πλάτη. Εν αντιθέσει με την θεραπεία του μαστού, της μήτρας και του φάρυγγα. Το επηρεαζόμενο τμήμα αφαιρείτο με εγχείρηση και ο υγιής ιστός καυτηριαζόταν μέχρι να σταματήσει τελείως η αιμορραγία.

Από την άλλη μεριά, βότανα, λάδι, ξύδι και ιατρικές ουσίες εμφανίζονταν συχνά στα φαρμακευτικά παρασκευάσματα. Έμπλαστρα και φαρμακευτικές ουσίες, για την θεραπεία του καρκίνου, συνδυάζονταν με εκχυλίσματα βοτάνων όπως όπιο από σπόρους παπαρούνας, φυτά αναμεμιγμένα με μία ποικιλία ουσιών όπως μέλι, κερήθρα, λάδια και λιπαρά, σε συνδυασμό με μόλυβδο, γύψο, χαλκό, ψευδάργυρο, κάδμιο και διοξείδιο του πυριτίου. Το ερώτημα είναι εάν αυτά είχαν αποτέλεσμα στην πράξη. Μερικές από αυτές τις φαρμακευτικές ουσίες είχαν χωρίς αμφιβολία αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και κάποιες άλλες ηρεμιστικές ή απλά αναλγητικές ιδιότητες. Δεν υπάρχουν, όμως, ξεκάθαρα στοιχεία για το αν είχαν αντικαρκινικά κυτταροστατικά χαρακτηριστικά (2).

## **1.2 Επιδημιολογικά Στοιχεία**

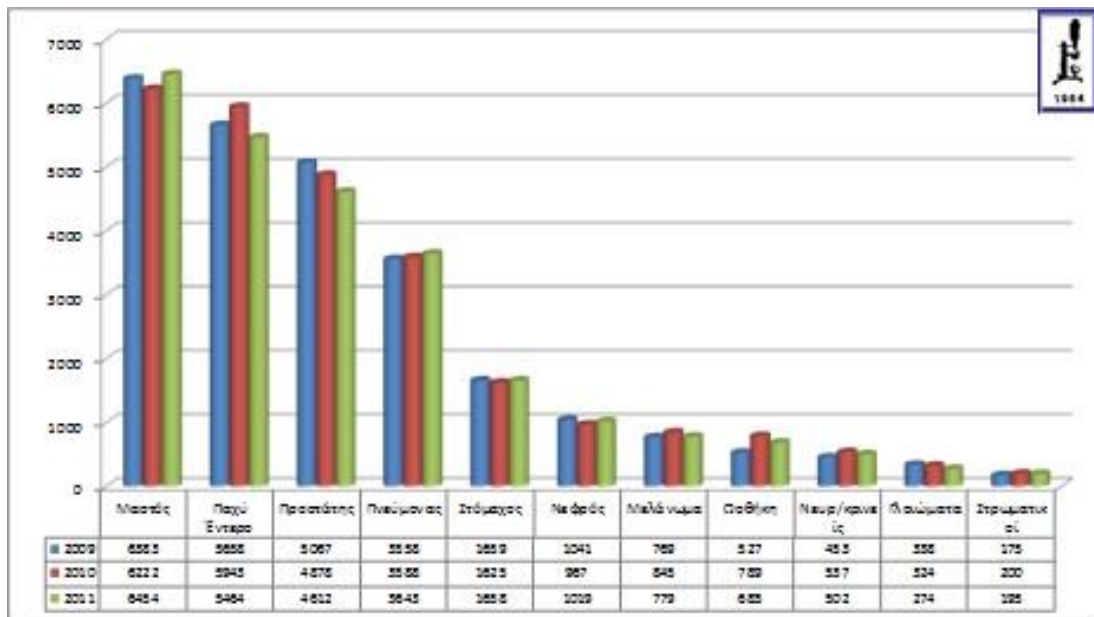
Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερος καρκίνος του γυναικείου πληθυσμού στις αναπτυγμένες χώρες του δυτικού κόσμου (3) (Σχήμα 1.1). Σύμφωνα, με τον *World Health Organization (WHO)*, ο καρκίνος του μαστού κατατάσσεται ως η πέμπτη αιτία θανάτου από καρκίνο συνολικά (458.000 θάνατοι), αλλά εξακολουθεί να είναι η πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο στον γυναικείο πληθυσμό, τόσο στις αναπτυσσόμενες (269.000 θάνατοι, 12,7 % του συνόλου) όσο και στις αναπτυγμένες χώρες, όπου οι εκτιμώμενοι 189.000 θάνατοι είναι σχεδόν ίσοι με τον εκτιμώμενο αριθμό των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα (188.000 θάνατοι).



**Σχήμα 1.1:** α) Επίπτωση του καρκίνου του μαστού στο γυναικείο πληθυσμό β) Επίπτωση του καρκίνου του μαστού στο σύνολο του πληθυσμού (δεν απεικονίζεται ο καρκίνος του δέρματος).

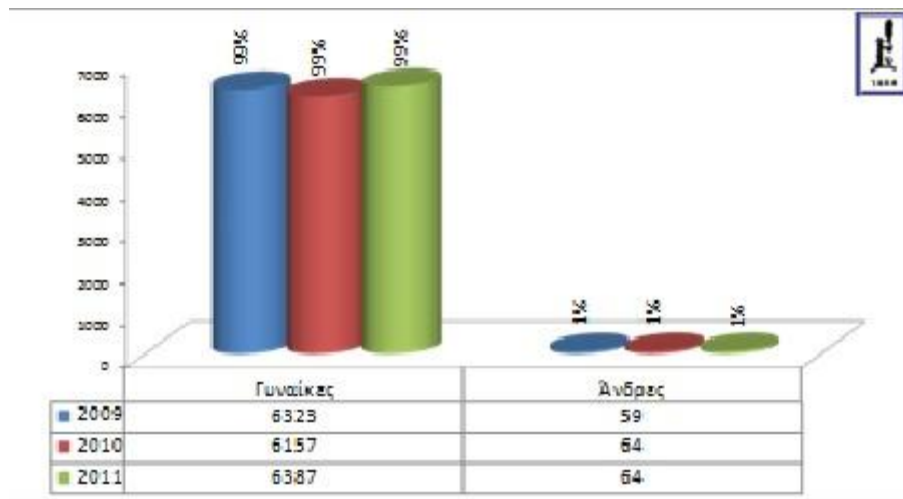
Πηγή: GLOBOCAN 2008 (International Agency for Research in Cancer - IARC)

Παγκοσμίως, το 2008 είχαμε 1,38 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου μαστού με 458.000 θανάτους. Παρατηρείται σπάνια στους άνδρες με περίπου 100 φορές μικρότερη συχνότητα σε σχέση με τις γυναίκες αλλά με ίδια ποσοστά επιβίωσης. Στην Ελλάδα έχουμε ακριβή στοιχεία, για τα περισσότερα είδη καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, από το 2009 έως και το 2011 καθώς αναπτύχθηκε το αρχείο νεοπλασιών της Ελληνικής Εταιρείας Παθολογικής Ανατομικής (Σχήμα 1.2).



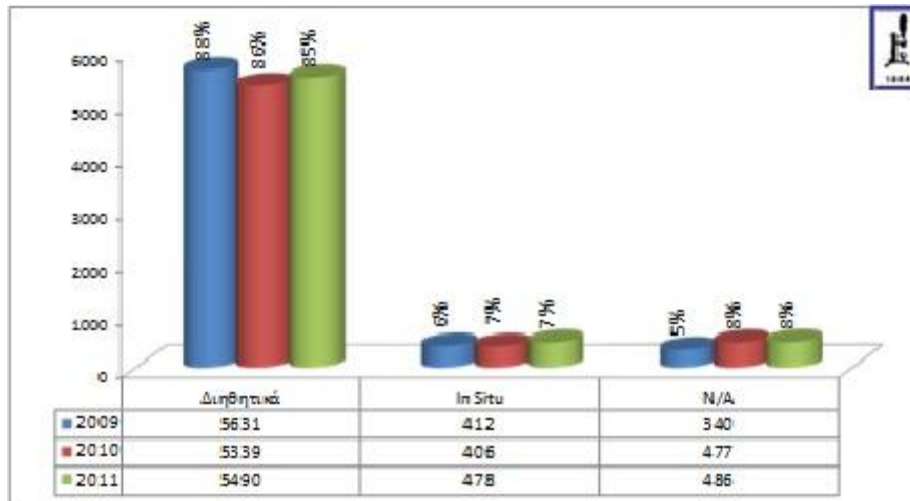
**Σχήμα 1.2:** Τα πιο συχνά νεοπλάσματα στην Ελλάδα το διάστημα 2009-2011.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 1.3, συνολικά το 2011 είχαμε 6451 περιστατικά καρκίνου με τον καρκίνο του μαστού να κυριαρχεί στις γυναίκες με 6387 περιστατικά (99% στις γυναίκες) και στους άνδρες 64 περιστατικά (1% συνολικά).

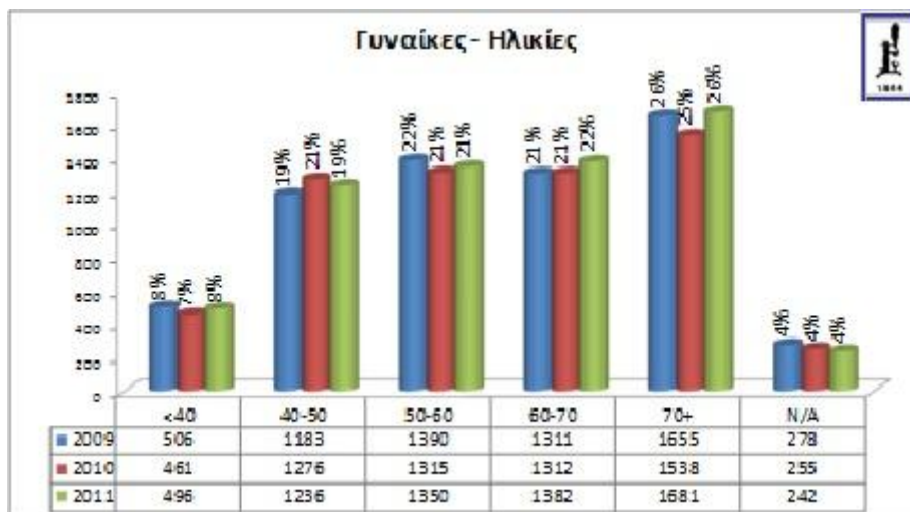


**Σχήμα 1.3:** Ποσοστά καρκίνου μαστού από το 2009-2011.

Το 2011 είχαμε 64 περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού σε σχέση με το 2009 που άρχισε η καταγραφή των νεοπλασιών από την εταιρεία. Στο σχήμα 1.4 φαίνονται τα είδη των καρκίνων μαστού που διαγνώστηκαν στην Ελλάδα το διάστημα 2009-2011 και στο σχήμα 1.5 οι ηλικίες εμφάνισης του το ίδιο διάστημα.

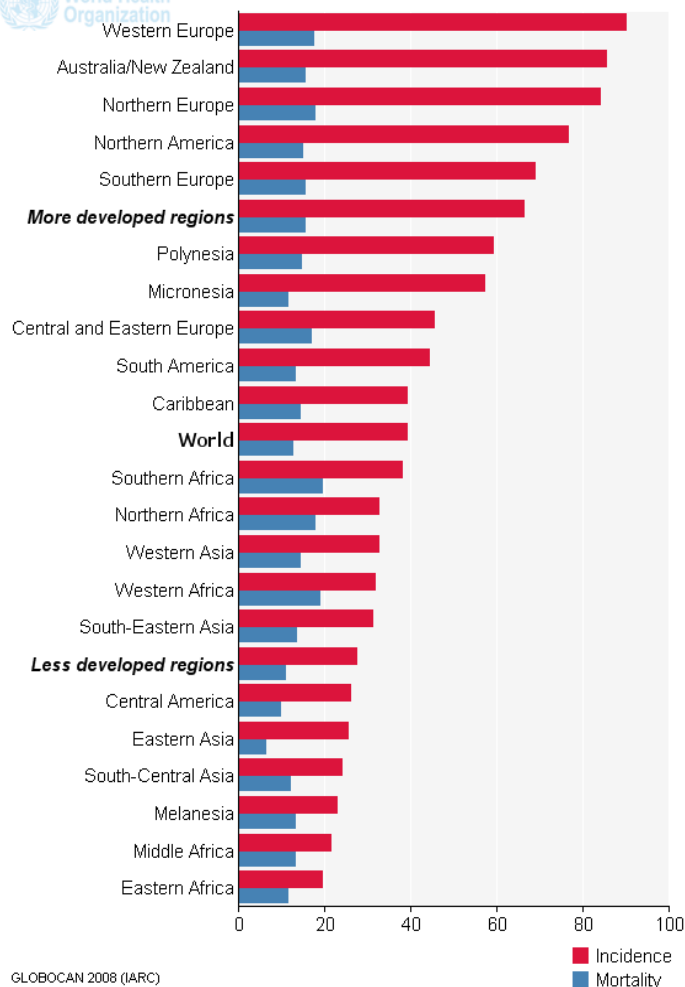


**Σχήμα 1.4:** Είδη καρκίνου του μαστού στην Ελλάδα 2009-2011.



**Σχήμα 1.5:** Ηλικίες εμφάνισης γυναικείου καρκίνου του μαστού στην Ελλάδα 2009-2011.

Κάθε χρόνο στην Ελλάδα, γίνεται διάγνωση καρκίνου του μαστού σε περισσότερες γυναίκες σε σχέση με οποιονδήποτε άλλο καρκίνο, με εξαίρεση τον καρκίνο του δέρματος. Τα ποσοστά επίπτωσης στον καρκίνο του μαστού ποικίλλουν ανά περιοχή, ωστόσο η συχνότητα εμφάνισής του όλο και αυξάνεται στον αναπτυσσόμενο κόσμο λόγω της αύξησης του προσδόκιμου ζωής, της αύξησης της αστικοποίησης και της υιοθέτησης του δυτικού τρόπου ζωής. Το εύρος θνησιμότητας από καρκίνο μαστού όπως φαίνεται στο σχήμα 1.6 είναι πολύ μικρότερο στις ανεπτυγμένες περιοχές, λόγω της καλύτερης επιβίωσης.



GLOBOCAN 2008 (IARC)

■ Incidence  
■ Mortality

**Σχήμα 1.6:** Εκτιμώμενη επίπτωση και θνησιμότητα για τον καρκίνο του μαστού στο γυναικείο πληθυσμό ανά 100.000 γυναίκες.

Πηγή: GLOBOCAN 2008 (IARC)

### 1.3 Παθολογοανατομική Ταξινόμηση του Καρκίνου του Μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι η κακοήθης εξαλλαγή που προκύπτει από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μαστού. Εμφανίζεται κυρίως στους πόρους, τα σωληνάκια που μεταφέρουν το γάλα στη θηλή κατά τη διάρκεια του θηλασμού αλλά και δευτερευόντως στους λοβούς, στους αδένες που παράγουν γάλα.

Ο καρκίνος του μαστού μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιαδήποτε ηλικία αλλά ο κίνδυνος ανάπτυξης του αυξάνεται με την ηλικία της γυναίκας. Ενώ ένα 5-10% των καρκίνων του μαστού σχετίζεται με κληρονομούμενο ελάττωμα στα γονίδια *BRCA-1* ή *BRCA-2* ή άλλα νεώτερα (πχ. *PALB2* κτλ) η πλειοψηφία των περιπτώσεων

αναπτύσσεται για λόγους που δεν είναι ακόμη κατανοητοί (4). Σαν γενικός κανόνας, σε αυτούς που έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού, συμπεριλαμβάνονται οι γυναίκες των οποίων στενοί συγγενείς έχουν νοσήσει, γυναίκες που είχαν προηγουμένως καρκίνο του μαστού στον άλλο μαστό, γυναίκες που δεν έχουν τεκνοποιήσει καθώς και γυναίκες που έκαναν το πρώτο τους παιδί μετά την ηλικία των 30. Κάθε καρκίνος του μαστού έχει τα δικά του χαρακτηριστικά. Κάποιοι αναπτύσσονται αργά ενώ άλλοι είναι επιθετικοί. Κάποιοι είναι ορμονοευαίσθητοι (σε οιστρογόνα και προγεστερόνη) ενώ άλλοι μπορεί να υπερεκφράζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Τα χαρακτηριστικά του καρκίνου μπορούν να επηρεάσουν τις θεραπευτικές επιλογές καθώς και την πιθανότητα επανεμφάνισής του.

Ο καρκίνος του μαστού μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια, τα οποία αντανακλούν το μέγεθος εξάπλωσής του στο σώμα.

1. **Πρώμο στάδιο** καρκίνου του μαστού, στο οποίο η καρκινική εξαλλαγή περιορίζεται στην αρχική θέση και είναι γνωστός ως μη μεταστατικός καρκίνος. Αν ο καρκίνος περιορίζεται στα γαλακτοφόρα σωληνάκια, ονομάζεται μη διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (DCIS-Ductal Carcinoma In Situ). Αποτελεί την πιο συχνή μορφή μη διηθητικού καρκινώματος του μαστού. Το DCIS διακρίνεται σε 5 μορφές (φαγεσωρικό, ηθμοειδές, θηλώδες, μικροθηλώδες, συμπαγές) με βάση ιδιαίτερα ιστολογικά χαρακτηριστικά και κυρίως τις αρχιτεκτονικές δομές που σχηματίζουν τα κακοήθη κύτταρα. Το DCIS χαρακτηρίζεται από σημαντική πιθανότητα (>20%) τοπικής υποτροπής, συνήθως ως διηθητικό καρκίνωμα (5) που οφείλεται κυρίως σε υπολειμματικές μικροσκοπικές εστίες της νόσου στο τμήμα του μαστού που παραμένει μετά από συντηρητική επέμβαση ευρείας εκτομής και διατήρησης του μαστού, χωρίς την προσθήκη ακτινοβολίας. Η χρήση μετεγχειρητικής ακτινοθεραπείας περιορίζει σημαντικά τον κίνδυνο της τοπικής υποτροπής. Το μέγεθος του κινδύνου ανάπτυξης τοπικής υποτροπής είναι δυνατό να εκτιμηθεί με τα συστήματα NSABP και Van Nuys Prognostic Index (VNPI) (6). Αν περιορίζεται στους λοβούς ονομάζεται *μη διηθητικό Λοβιακό Καρκίνωμα (LCIS-Lobular Carcinoma In Situ)*. Αποτελείται από ομοιόμορφα κακοήθη κύτταρα με βαθυχρωματικούς πυρήνες, χωρίς σημαντική ατυπία και μιτωτική δραστηριότητα, τα οποία πληρούν τον αυλό λοβιακών μονάδων και μικρών λοβιακών πόρων (7).

Πρόκειται για πολύ σημαντικό παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου λοβιακού ή πορογενούς (δεκαπλάσιος σχετικός κίνδυνος), που αφορά και τους δύο μαστούς. Η πρόγνωση του δεν εξαρτάται από το μέγεθός του ή τα μορφολογικά του χαρακτηριστικά. Σε πολλές περιπτώσεις είναι πολυεστιακό ή και αμφοτερόπλευρο νεόπλασμα (8).

2. **Διηθητικό** στάδιο καρκίνου του μαστού. Χαρακτηρίζεται από εξάπλωση του καρκίνου εκτός των γαλακτοφόρων σωληναρίων ή των λοβών μέσα στις περιβάλλουσες περιοχές των ιστών του μαστού. Σε αυτό το στάδιο, ο καρκίνος μπορεί να ανιχνευθεί είτε μέσω αυτοεξέτασης είτε από κλινική εξέταση του μαστού που γίνεται από εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό είτε με απεικονιστική μέθοδο (μαστογραφία, MRI κτλ.). Διαιρούνται ως εξής: (9).

α. Πορογενές Καρκίνωμα χωρίς ειδικούς χαρακτήρες (NST, non specific type):

Αποτελεί την πιο συνηθισμένη (70-80 % περίπου) ιστολογική μορφή διηθητικού καρκίνου μαστού. Μακροσκοπικά παρουσιάζει συνήθως ασαφή όρια, αστεροειδή παρυφή, γκριζωπή χροιά και σκληρή σύσταση. Μικροσκοπικά υπάρχει άφθονος συνδετικός ιστός εντός του οποίου περικλείονται πεπαχυμένοι και αποφραγμένοι πόροι.

β. Λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα (Lobular):

Αποτελεί το 10-15% περίπου των καρκινωμάτων του μαστού. Συχνά συνυπάρχει με πορογενές καρκίνωμα ως μικτό πορογενές/λοβιακό (Σχήμα 1.5). Μπορεί να είναι πολυεστιακό, ενώ πολύ συχνά παρουσιάζει σύγχρονη ή μετάχρονη αμφοτερόπλευρη εμφάνιση. Μαστογραφικά ευρήματα που σχετίζονται με το λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα θεωρούνται: διαταραχή αρχιτεκτονικής, σκίαση ασαφών ορίων, εντοπισμένη ασυμμετρία στην πυκνότητα του μαστού κ.α., ωστόσο συχνά δεν παρατηρούνται καθόλου μαστογραφικά ευρήματα (10).

γ. Μυελοειδές Καρκίνωμα (Medullary):

Εμφανίζεται συχνότερα σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και αποτελεί το 4% περίπου των καρκίνων του μαστού (9). Είναι γενικά μεγάλοι όγκοι, μαλακής σύστασης, καλώς περιγεγραμμένοι. Ιστολογικά η περιφέρειά τους είναι διηθητική, αλλά ομαλή με λίγες προεκβολές. Μικροσκοπικά τα κύτταρα είναι ευμεγέθη, με πυρηνική ατυπία και πολλές μιτώσεις



και σχηματίζουν αθροίσεις που διαχωρίζονται από τον συνδετικό ιστό. Η πρόγνωση του είναι καλή και οι λεμφαδενικές μεταστάσεις όχι ιδιαίτερα συχνές.

δ. Θηλώδες Καρκίνωμα (Papillary): Τα θηλώδη καρκινώματα σπάνια γίνονται διηθητικά. Εμφανίζονται σε ηλικιωμένες κυρίως γυναίκες, έχουν καλή πρόγνωση και σπάνια μεθίστανται στους επιχώριους λεμφαδένες (11).

ε. Σωληνώδες Καρκίνωμα (Tubular): Πρόκειται για σπάνιο νεόπλασμα που εμφανίζεται συνήθως σε γυναίκες μέσης ηλικίας, έχει πολύ καλή πρόγνωση και μικρή πιθανότητα λεμφαδενικών μεταστάσεων ενώ η παρουσία θετικού οικογενειακού ιστορικού είναι αρκετά συχνή (5). Μικροσκοπικά αποτελείται από μικρές σωληνώδεις αθροίσεις, στερούμενες βασικής μεμβράνης.

ζ. Βλεννώδες ή Κολλοειδές Καρκίνωμα (mucinous or colloid or gelatinous): Έχει καλή πρόγνωση και χαμηλή συχνότητα λεμφαδενικών μεταστάσεων ενώ το μέγεθός του ποικίλλει. Ιστολογικά αποτελείται από άφθονη εξωκυττάρια βλέννη, εντός της οποίας βρίσκονται μικρές αθροίσεις κακοήθων κυττάρων (12).

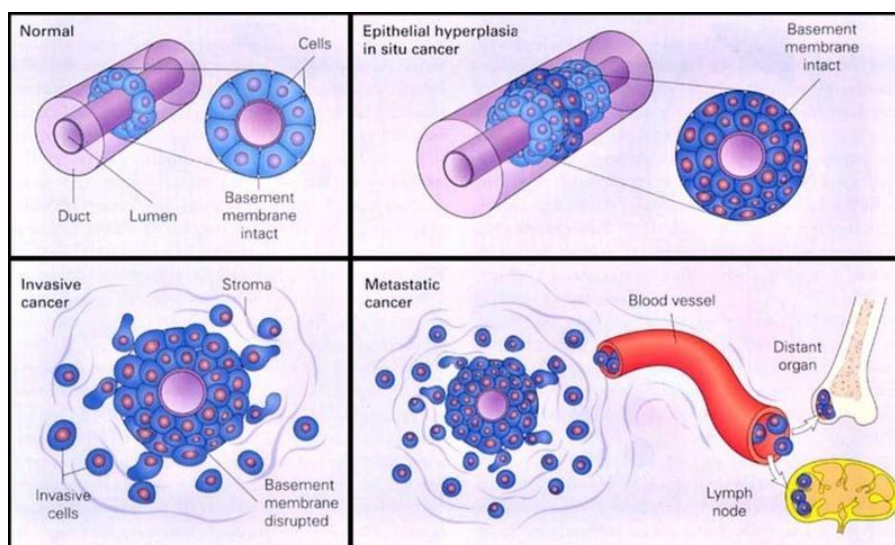
η. Πολύ σπάνιες μορφές καρκινωμάτων (13):

- Μεταπλαστικός
- Αδενοειδής κυστικός
- Μυοεπιθηλιακός
- Αποκρινής
- Λιποεκκριτικός
- Βλεννο-επιδερμοειδής

θ. Νόσος Paget: Η νόσος εκδηλώνεται ως εκζεματοειδής βλάβη, μετά συνοδού ορώδους εκκρίματος όπου μπορεί να συνυπάρχει υποκείμενο διηθητικό καρκίνωμα, αναγνωριζόμενο ως ψηλαφητή μάζα. Τα κύτταρα της νόσου Paget θεωρούνται, κατά την μεταναστευτική θεωρία, κύτταρα αδenoκαρκινώματος του μαστού, τα οποία μεταναστεύουν εντός της επιδερμίδας της θηλής και της θηλαίας άνω από καρκίνωμα που προσβάλλει τους πόρους στο υποκείμενο μαζικό παρέγχυμα (13). Σε άλλες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι σε μεγάλο ποσοστό μπορεί να μην συνυπάρχει άλλο καρκίνωμα σε κεντρική ή περιφερική θέση του μαστού και η νόσος Paget να εντοπίζεται μόνο στη θηλή του μαστού.

1. Φλεγμονώδες καρκίνωμα (Inflammatory Breast Ca): Παρουσιάζεται κλινικά με τη μορφή οξείας φλεγμονής του μαστού, ανάλογη της οξείας μαστίτιδας. Η εικόνα αυτή δεν αποδίδεται σε φλεγμονή, αλλά σε διήθηση των λεμφαγγείων του δέρματος από καρκινικά κύτταρα. Αποτελεί το 1-2% περίπου των καρκίνων μαστού. Ως αναγκαίο κριτήριο κλινικής διάγνωσης του θεωρείται η ερυθρότητα του δέρματος του μαστού τουλάχιστον στο ένα τρίτο αυτού. Πρόκειται για ιδιαίτερα κακοήθη κλινική μορφή, με κακή πρόγνωση, πολύ συχνή διήθηση επιχώριων λεμφαδένων κι εμφάνιση γενικευμένης μεταστατικής νόσου σε πολλές περιπτώσεις (14).

3. **Μεταστατικό** στάδιο καρκίνου του μαστού. Σε αυτό ο καρκίνος έχει κάνει μετάσταση και σε άλλες περιοχές του σώματος συμπεριλαμβανομένων και των λεμφαδένων. Σε αυτό το στάδιο η θεραπεία απαιτεί συνδυασμένη προσπάθεια ειδικών, συμπεριλαμβανομένων των χειρουργών, των ογκολόγων και των ακτινοθεραπευτών.



**Σχήμα 1.7:** Η χρονική εξέλιξη του καρκίνου του μαστού παρουσιάζει ετερογένεια. Οι πρωτοπαθείς καρκίνοι του μαστού ξεκινούν από ένα ή περισσότερα κύτταρα που έχουν χάσει την φυσιολογική ρύθμιση της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού αλλά παραμένουν μέσα στον αυλό. Καθώς αυτά τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται διασπών την βασική μεμβράνη και μεταναστεύουν σε απομακρυσμένα όργανα (15).

#### 1.4 Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού

Οι επιβαρυντικοί παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού είναι οι εξής :

1) *Φύλο*. Ο καρκίνος του μαστού μπορεί να εμφανιστεί και στους άνδρες, όμως συχνότερος είναι στις γυναίκες, όπου ο μαστός υφίσταται την επίδραση των ορμονών κατά την εφηβεία και κατά την διάρκεια των ετών της εμμηνου ρύσεως.

2) *Ηλικία*. Η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού αυξάνει αναλογικά όσο μεγαλώνει η γυναίκα. Εμφανίζεται κυρίως σε γυναίκες ηλικίας >50 ετών ενώ, είναι σπάνιος σε γυναίκες ηλικίας <35 ετών (<5% των περιπτώσεων), με εξαίρεση τις γυναίκες που έχουν κληρονομική προδιάθεση. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου μαστού είναι μικρός στις ηλικίες 20-30 (1:20.000), ανεβαίνει εκθετικά στα 2-3 περιστατικά ανά 1.000 σε γυναίκες ηλικίας 30-40 ετών, 1:50 στις γυναίκες ηλικίας 50 ετών ενώ ο αθροιστικός κίνδυνος ανάπτυξης της νόσου ξεπερνάει πλέον το 10% (1 στις 8 γυναίκες θα αναπτύξουν καρκίνο του μαστού μέχρι την ηλικία των 85 ετών).

3) *Θετικό οικογενειακό ιστορικό και κληρονομικός καρκίνος*. Όταν μία γυναίκα έχει συγγενή πρώτου βαθμού (μητέρα, αδερφή ή κόρη) με καρκίνο του μαστού, σχεδόν διπλασιάζεται ο σχετικός κίνδυνος να αναπτύξει καρκίνο του μαστού και η ίδια. Ο κίνδυνος σχεδόν πενταπλασιάζεται, όταν υπάρχουν δύο συγγενείς πρώτου βαθμού με καρκίνο του μαστού στο ιστορικό της.

4) *Εμμηνος ρύση*. Οτιδήποτε επηρεάζει την μακροχρόνια έκθεση στα οιστρογόνα, επηρεάζει και τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Για το λόγο αυτό, εάν η εμμηναρχή είναι πρόωμη (<12 ετών) και η εμμηνόπαυση καθυστερημένη (>50 ετών), εάν μια γυναίκα δεν έχει τεκνοποιήσει ή γέννησε το πρώτο παιδί της σε ηλικία μεγαλύτερη των 30 ετών, η γυναίκα αυτή εμφανίζει αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Κάτι ανάλογο συμβαίνει με την παρατεταμένη χρήση ορμονικής υποκατάστασης μετά την εμμηνόπαυση.

5) *Ιστορικό καρκίνου*. Γυναίκες που έχουν ήδη εμφανίσει καρκίνο στον έναν μαστό τους, έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν αμφοτερόπλευρο καρκίνο μαστού (μία, ανά 100 γυναίκες, ανά έτος)

6) *Προηγούμενη ακτινοθεραπεία*. Η ακτινοθεραπεία πριν από την ηλικία των 30 ετών (συνήθως για νόσο του Hodgkin) αυξάνει σημαντικά το κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου

του μαστού στη μετέπειτα ζωή τους (συνήθως 10-15 έτη μετά την ολοκλήρωση της ακτινοθεραπείας).

7) *Αλκοόλ*. Τα οινοπνευματώδη ποτά αυξάνουν την συγκέντρωση των οιστρογόνων στο αίμα (μέτρια συσχέτιση με το κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού).

8) *Το βάρος*. Η παχυσαρκία αυξάνει τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού μετά την εμμηνόπαυση, αυξάνοντας κυρίως τα επίπεδα των οιστρογόνων, διότι η μετατροπή των επινεφριδικών ανδρογόνων σε οιστρογόνα γίνεται κυρίως μέσα στο λιπώδη ιστό.

9) *Καθιστική ζωή*. Η τακτική έντονη άσκηση κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού μίας γυναίκας, κυρίως διότι μπορεί να καθυστερήσει την έναρξη της εμμηνου ρήσεως, να επιμηκύνει τον χρόνο μεταξύ των περιόδων και να ελαττώσει τον αριθμό των εμμηνοπαυσιακών κύκλων, μειώνοντας έτσι την έκθεση της γυναίκας στα οιστρογόνα.

10) *Έκθεση σε τοξικούς παράγοντες*. Πιθανή σχέση μεταξύ καρκίνου του μαστού και έκθεσης σε τοξικούς παράγοντες δεν έχει ακόμα τεκμηριωθεί. Μελέτες που αναφέρονται στην επίδραση χημικών ουσιών όπως τα οργανοχλωρίδια (D-DTPCB) και σε διάφορους παράγοντες (κάπνισμα, ηλεκτρομαγνητικά πεδία, προθέματα σιλκόνης στο μαστό) δεν έχουν καταλήξει σε κανένα σαφές συμπέρασμα ότι οι παράγοντες αυτοί σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού.

11) *Διατροφή και καρκίνος του μαστού*. Δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα και οδηγίες.

*Διατροφικό λίπος*: η πλούσια σε λίπος διατροφή φαίνεται να έχει μικρή ή και καθόλου επίδραση. Η αύξηση των ποσοστών καρκίνου του μαστού στις δυτικές χώρες μάλλον δεν οφείλεται στο αυξημένο λίπος στη διατροφή, αλλά σε άλλες παραμέτρους του τρόπου ζωής των γυναικών, όπως η παχυσαρκία και η καθιστική ζωή.

*Βιταμίνη Α*: ασκεί μέτρια προστατευτική δράση στον καρκίνο του μαστού, κυρίως στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Η βιταμίνη Α παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη και συμβάλλει στην προστασία των κυττάρων από τις επιβλαβείς δράσεις των ελευθέρων ριζών στο σώμα.

*Σόγια*: τα ισοφλαβινοειδή είναι ειδικοί τύποι οιστρογόνων που ανευρίσκονται άφθονα στα προϊόντα σόγιας. Σε εργαστηριακές μελέτες τα ισοφλαβινοειδή εμφανίζονται να

προστατεύουν τα κύτταρα του μαστού από εξαλλαγή ενώ σε μελέτες με γυναίκες στις οποίες χορηγήθηκαν συμπληρώματα σόγιας εμφάνισαν αυξημένη υπερπλασία των κυττάρων του μαζικού αδένου. Η σχέση ισοφλαβονοειδών, σόγιας και καρκίνου του μαστού σε ανθρώπους δεν έχει ακόμα διευκρινισθεί.

12) *Ορμονικά σκευάσματα. Αντισυλληπτικά:* η από του στόματος χρήση τους φαίνεται να αυξάνει ελαφρώς τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού στις γυναίκες κατά τον χρόνο της χρήσης τους ή λίγο μετά. *Θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης:* προσφέρει ανακούφιση από τα συμπτώματα της εμμηνόπαυσης, προστασία έναντι οστεοπόρωσης και αύξηση της προστατευτικής HDL χοληστερόλης έναντι της LDL (θετική επίδραση στο τοίχωμα των αρτηριών). Ωστόσο, η μακροχρόνια χρήση της μετά την εμμηνόπαυση (>5 ετών) φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Ο αυξημένος αυτός κίνδυνος, φαίνεται να εξαλείφεται δύο χρόνια μετά τη διακοπή της (8).

### 1.5 Κλινικά σημεία και συμπτώματα

Πρέπει να τονισθεί ότι οι περισσότεροι όζοι που ανευρίσκονται στο μαστό δεν είναι καρκίνοι αλλά καλοήθειες καταστάσεις καθώς και ότι τα συμπτώματα και τα κλινικά σημεία που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού μπορεί να οφείλονται και σε άλλες αιτίες. Κλινικά σημεία και συμπτώματα αποτελούν:

- όζος (ψηλαφητή μάζα) στο στήθος,
- αλλαγές στο δέρμα του στήθους (ρυτίδωση ή ερυθρότητα ή πάχυνση),
- εισολική της θηλής,
- πρήξιμο ή πόνος στο στήθος,
- πόνος στη θηλή και/ή έκκριμα,
- πρήξιμο ή μάζα στον κοντινό μασχαλιαίο λεμφαδένα

### 1.6 Διάγνωση καρκίνου του μαστού

Η σταδιοποίηση της νόσου της ασθενούς με καρκίνο του μαστού γίνεται σύμφωνα με το σύστημα *TNM* της Διεθνούς ένωσης κατά του καρκίνου (UICC-International Union Against Cancer) (*T=μέγεθος όγκου, N=Λεμφαδένες, M=Μετάσταση*) (16). Το *TNM* σύστημα αναπτύχθηκε από τον Pierre Denoix το 1942 σε μια προσπάθειά του να ταξινομήσει τις μεγάλες μορφολογικές ιδιότητες των κακοήθων όγκων. Το 1958 η

Διεθνής Ένωση κατά του καρκίνου υιοθέτησε μια κλινική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού βασισμένο σε αυτό το σύστημα, όπως και η Αμερικανική Επιτροπή Καρκίνου (AJCC) το 1977. Από το 1987 οι διαφορές μεταξύ των συστημάτων της AJCC και UICC έχουν ελαχιστοποιηθεί (16).

Ο βαθμός διαφοροποίησης (grade) προκύπτει σύμφωνα με το τροποποιημένο σύστημα του Nottingham. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται τρία μορφολογικά χαρακτηριστικά του ιστού: το ποσοστό των αδενικών μικροσωληνωδών σχηματισμών (tubules), ο βαθμός του πυρηνικού πλειομορφισμού και ατυπίας και ο αριθμός των μιτώσεων σε δέκα οπτικά πεδία, όλα βαθμολογούμενα από 1-3 και με άθροισμα 3-5 να χαρακτηρίζει τα καλά διαφοροποιημένα (grade I), το άθροισμα 6-7 τα ενδιάμεσης διαφοροποίησης (grade II) και τέλος το άθροισμα 8-9 τα αδιαφοροποίητα (grade III) καρκινώματα μαστού.

### 1.7 Εξετάσεις για τον καρκίνο του μαστού

Οι στόχοι των εξετάσεων του καρκίνου του μαστού είναι η ταυτοποίηση τυχόν γενετικής προδιάθεσης σε υψηλού κινδύνου ασθενείς, η ανίχνευση και διάγνωση του καρκίνου του μαστού σε πρώιμα στάδια, ο καθορισμός της έκτασης του, η αξιολόγηση των χαρακτηριστικών του καρκίνου με σκοπό την επιλογή θεραπείας, η παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και ο έλεγχος γυναικών για τυχόν υποτροπή. Στον παρακάτω πίνακα 1.1 φαίνονται περιληπτικά οι περισσότερο χρησιμοποιούμενες εξετάσεις καρκίνου του μαστού και επακολουθεί λεπτομερής ανάλυση αυτών αλλά και πολλών νεωτέρων.

*Πίνακας 1.1: Κυριότερες εξετάσεις καρκίνου του μαστού (www.labtestsonline.gr).*

<b>Εξέταση</b>	<b>Διάγνωση – Πρόγνωση - Θεραπεία</b>	<b>Δείγμα εξέτασης</b>
Her 2/neu	Ασθενείς με αυξημένη έκφραση του Her2/neu ανταποκρίνονται στο herceptin και έχουν καλή πρόγνωση.	Ιστός
Υποδοχείς Οιστρογόνων/ Προγεστερόνης	Αυξημένα επίπεδα υποδηλώνουν καλή πρόγνωση ως προς την ανταπόκριση στην	Ιστός

	αντι-ορμονική θεραπεία.	
CA15-3/ CA27.29	Ανεβασμένα επίπεδα καρκινικών αντιγόνων στο αίμα μπορεί να υποδηλώνουν επανεμφάνιση του καρκίνου.	Ορός - Πλάσμα
BRCA-1/BRCA-2	Γενετικοί δείκτες οι οποίοι αν υπάρχουν, υποδηλώνουν 80% πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού.	Ορός - Πλάσμα
Oncotype DX μελέτη έκφρασης 21 γονιδίων με real-time PCR	Μπορεί να βοηθήσει στον καθορισμό του κινδύνου επανεμφάνισης και στη πρόβλεψη ωφέλειας από χημειοθεραπεία ή ορμονοθεραπεία. (FDA approved)	Ιστός (παραφίνης)
MammaPrint (Agendia) μικροσυστοιχίες 70 γονιδίων	Μπορεί να βοηθήσει στον καθορισμό του κινδύνου πιθανής μετάστασης του καρκίνου. (FDA approved)	Ιστός (φρέσκος)
DNA Πλοειδισμός	Καθορίζει τον ρυθμό αύξησης του όγκου (S φάση). Αν είναι αυξημένη υποδηλώνει κακή πρόγνωση. Μπορεί να χρειαστεί χημειοθεραπεία.	Ιστός
Αντιγόνο Ki-67	Αυξημένα επίπεδα υποδηλώνουν γρήγορη ανάπτυξη των κυττάρων του όγκου και αυτό υποδηλώνει κακή πρόγνωση.	Ιστός
Έκπλυμα γαλακτοφόρων πόρων (ductal lavage)	Παρουσία μη φυσιολογικών κυττάρων στην κυτταρολογική εξέταση μπορεί να αποτελεί χρήσιμο εργαλείο ελέγχου για ανίχνευση καρκίνου.	N/A
Cell Search (Veridex) μικρομεταστατική νόσος	Προσδιορισμός αριθμού κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων CTCs σε μεταστατικό καρκίνο μαστού – προγνωστικός δείκτης. (FDA approved)	Ολικό αίμα
Μαστογραφία	Υψηλής ευαισθησίας ψηφιακή τεχνολογία ακτίνων X που μπορεί να ανιχνεύσει μικρά	N/A

	ογκίδια τα οποία δεν θα ανιχνεύονταν μέσω της αυτοεξέτασης.	
--	---	--

### 1.7.1 Εργαστηριακές εξετάσεις για τον καρκίνο του μαστού

Οι εργαστηριακές εξετάσεις για τον καρκίνο του μαστού χωρίζονται σε κατηγορίες ανάλογα με τον σκοπό της εξέτασης:

**Για μικροσκοπική διάγνωση:** στο μικροσκόπιο είτε κυτταρολογικές εξετάσεις καρκινικών κυττάρων που λαμβάνονται με αναρρόφιση μέσω σύριγγας (FNA, fine needle aspirate) είτε παθολογοανατομικές εξετάσεις σε χειρουργικά δείγματα ιστών μέσω βιοψίας.

**Για τον καθορισμό θεραπευτικών επιλογών:** στον ιστό εκτίμηση της ενίσχυσης (amplification) του γονιδίου *HER-2/neu* του όγκου καθώς και των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης.

**Για τον έλεγχο της θεραπείας και επανεμφάνισης του καρκίνου:** μέτρηση των επιπέδων CA 15-3 ή CA 27.29 στο αίμα καθώς και μέτρηση των CTCs.

**Για τον καθορισμό της γενετικής προδιάθεσης σε υψηλού κινδύνου ασθενείς:** εξετάσεις αίματος για μεταλλάξεις που μπορεί να είναι παρούσες στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* ή σε άλλα γονίδια.

Κάποιες εξετάσεις για τον καρκίνο του μαστού γίνονται σε δείγματα αίματος των ασθενών ενώ κάποιες άλλες γίνονται σε δείγμα κυττάρων του όγκου ή πάνω στον καρκινικό ιστό.

#### **Εξετάσεις κυτταρολογικές και παθολογοανατομικές**

Όταν ένας ακτινολόγος ανιχνεύσει μία ύποπτη περιοχή, με αποτιτανώσεις-ασβεστιώσεις ή μία μη-ψηλαφητή μάζα στην μαστογραφία ή αν βρεθεί ένας όζος κατά την κλινική εξέταση ή την αυτοεξέταση, ο γιατρός συχνά ζητάει παρακέντηση ή χειρουργική επέμβαση για τη λήψη βιοψίας είτε κυτταρολογική FNA. Σε κάθε περίπτωση, λαμβάνεται ένα μικρό δείγμα ιστού από την ύποπτη περιοχή του στήθους έτσι ώστε ο παθολογοανατόμος να εξετάσει τα κύτταρα μικροσκοπικά για τυχόν



σημάδια καρκίνου. Αυτή η παθολογοανατομική εξέταση γίνεται για να καθοριστεί εάν η υπό εξέταση περιοχή είναι καλοήθης ή κακοήθης.

Τα κακοήθη κύτταρα έχουν διαφορές από τα φυσιολογικά κύτταρα. Στα σημάδια συμπεριλαμβάνονται διαφορές στο μέγεθος του κυτταρικού πυρήνα και ενδείξεις αυξημένης κυτταρικής διαίρεσης. Οι παθολογοανατόμοι μπορούν να διαγνώσουν τον καρκίνο βασιζόμενοι στις παρατηρούμενες διαφορές, που καθορίζουν το μέγεθος της ανωμαλίας του κυττάρου και βλέπουν εάν υπάρχει ένας συγκεκριμένος τύπος αλλαγής ή πολλοί. Αυτά τα αποτελέσματα βοηθούν στην καθοδήγηση της θεραπείας για τον καρκίνο του μαστού.

Οι αναρροφήσεις με βελόνα είναι περιορισμένες λόγω του μικρού όγκου δείγματος που απαιτείται. Χρειάζεται βιοψία ιστού για να καθοριστεί αν ο καρκίνος είναι σε πρώιμο στάδιο ή είναι διηθητικός. Όταν ο καρκίνος του μαστού αφαιρεθεί χειρουργικά, κύτταρα του όγκου και κάποιες φορές και από τους περιβάλλοντες ιστούς και τους λεμφαδένες εξετάζονται από τον παθολογοανατόμο για να βοηθήσουν στον καθορισμό της εξάπλωσής του καρκίνου.

#### ***Εξετάσεις ρουτίνας που γίνονται στον καρκινικό ιστό***

Αν η διάγνωση του παθολογοανατόμου είναι καρκίνος του μαστού, υπάρχουν αρκετές εξετάσεις που μπορεί να γίνουν πάνω στα καρκινικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτών των εξετάσεων παρέχουν πρόγνωση και βοηθούν τους ογκολόγους να καθοδηγήσουν την θεραπεία του ασθενή. Οι πιο χρήσιμες από αυτές είναι οι εξετάσεις του HER-2/neu και των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης.

- ***HER-2/neu***: Είναι ένα ογκογονίδιο. Κωδικοποιεί έναν υποδοχέα για έναν συγκεκριμένο αυξητικό παράγοντα-προσδέτη που ωθεί την ανάπτυξη των κυττάρων αλλά ωστόσο δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί. Ο υποδοχέας αυτός ανήκει στην οικογένεια μεμβρανικών υποδοχέων τυροσινικής κινάσης EGFR με τέσσερα μέλη: EGFR (με προσδέτη το EGF), HER-2, HER-3 και HER-4 (τα δύο τελευταία έχουν προσδέτη το NRG). Τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα περιέχουν δύο αντίγραφα του γονιδίου HER-2/neu και παράγουν χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης HER-2 στην επιφάνειά τους. Περίπου στο 20-30% των διηθητικών καρκίνων, το γονίδιο αυτό έχει ενισχυθεί και η πρωτεΐνη του υπερεκφραστεί. Αυτό οδηγεί στην δημιουργία πολλών

ομο- και έτερο-διμερών με τα υπόλοιπα μέλη της και αύξηση της δραστηριότητας τυροσινικής κινάσης. Οι όγκοι αυτοί είναι κατάλληλοι για θεραπείες που δεσμεύουν ειδικά την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη. Η βιολογική θεραπεία με Herceptin (Trastuzumab, Roche), το οποίο είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, μπλοκάρει τους υποδοχείς αυτής της πρωτεΐνης, μειώνει την δραστηριότητα κινάσης αναστέλλοντας τον συνεχιζόμενο πολλαπλασιασμό και συνεπώς την ανάπτυξη του όγκου. Οι ασθενείς με ενισχυμένο το γονίδιο της HER-2/neu ανταποκρίνονται καλά στην θεραπεία με Herceptin και έχουν καλή πρόγνωση (17).

Το *pertuzumab*, το οποίο είναι ένα νεότερο μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει και δεσμεύει τον υποδοχέα HER2/neu εμποδίζοντας τον να διμεριστεί με τους υπόλοιπους υποδοχείς HER και να στείλει σήματα ανάπτυξης στα καρκινικά κύτταρα του μαστού που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα. Επειδή το *pertuzumab* προσδέεται σε διαφορετική περιοχή του υποδοχέα HER2/neu μπορεί να συνδυαστεί με το *trastuzumab* για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Ασθενείς που έλαβαν *pertuzumab*, *trastuzumab* και *docetaxel* είχαν σημαντικά βελτιωμένη ανταπόκριση σε σύγκριση με αυτούς που έλαβαν *trastuzumab* σε συνδυασμό με *docetaxel* (18).

Το *Ado-trastuzumab emtansine* αποτελείται από το *trastuzumab* και τον κυτταροτοξικό παράγοντα *mertansine* (DM1). Το *trastuzumab* σταματά την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων με την σύνδεσή του με τον υποδοχέα HER2/neu ενώ η *mertansine* εισέρχεται στα κύτταρα και τα καταστρέφει με σύνδεση του στην τουμπουλίνη. Το *Ado-trastuzumab emtansine* χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του HER2<sup>+</sup> μεταστατικού καρκίνου του μαστού σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί στο παρελθόν σε θεραπεία με *trastuzumab* και χημειοθεραπευτικά (19).

Οι αναστολείς κινάσης-τυροσίνης (*Tyrosine-Kinase Inhibitors – TKIs*) είναι στοχευμένα φάρμακα που εμποδίζουν τα σήματα που απαιτούνται για να αναπτυχθούν οι διάφοροι όγκοι. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν μαζί με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα ως επικουρική θεραπεία. Για παράδειγμα, το *lapatinib* είναι ένας αναστολέας κινάσης-τυροσίνης που μπλοκάρει τις επιδράσεις της πρωτεΐνης HER2/neu και άλλων πρωτεϊνών μέσα στα κύτταρα του όγκου. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μαζί με άλλα φάρμακα για τη θεραπεία ασθενών με HER2<sup>+</sup> καρκίνο του μαστού ο οποίος εξελίσσεται παρά την θεραπεία με *trastuzumab* ή ανάλογα του (20, 21).

- **Υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης:** οι υποδοχείς των οιστρογόνων και της προγεστερόνης είναι σημαντικοί προγνωστικοί δείκτες του καρκίνου του

μαστού. Όσο υψηλότερο είναι το ποσοστό των κυττάρων που είναι θετικά, καθώς και η ένταση της θετικότητας, τόσο καλύτερη είναι η πρόγνωση. Η θετικότητα στους υποδοχείς οιστρογόνων και/ή προγεστερόνης υποδηλώνει ευαισθησία στις ορμόνες. Οι ασθενείς μπορεί να ανταποκριθούν καλά στην ορμονοθεραπεία. Όγκοι που δεν εκφράζουν κανένα από αυτούς τους δύο υποδοχείς (όγκοι αρνητικοί για υποδοχείς) καθώς και για υπερέκφραση του HER2 ονομάζονται τριπλά αρνητικοί όγκοι (*Triple Negative Breast Cancers* - TNBC). Ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού έως τώρα στερείται στοχευμένης θεραπείας και επακόλουθα έχει συγκριτικά χειρότερη πρόγνωση (22-24). Οι παραπάνω εξετάσεις γίνονται συνήθως με ανοσοϊστοχημεία (Immunohistochemistry, IHC): Η πιο σύγχρονη μέθοδος για τον προσδιορισμό των ορμονικών υποδοχέων βασίζεται στην ανοσοϊστοχημεία σε τομές ιστού. Η IHC αποφεύγει όλα τα μειονεκτήματα των άλλων μεθόδων (π.χ. της παλιότερα χρησιμοποιούμενης Dextran-Coated Charcoal Assay, DCCA) ενώ παράλληλα μπορεί να συνδυάσει τη μέτρηση με μορφολογικά χαρακτηριστικά περιορίζοντας τη μέτρηση στα καρκινικά κύτταρα αλλά και να δώσει μια εικόνα της ετερογένειας στην έκφραση των υποδοχέων του όγκου. Η μέθοδος αξιολογείται ημιποσοτικά μετά από οπτική παρατήρηση στο μικροσκόπιο (με βαθμό 0-3) ή ακόμη καλύτερα ποσοτικά μετά από αντικειμενική μέτρηση με κυτταρομετρητή ανάλυσης εικόνας. Βασική προϋπόθεση για την επιτυχή εκτέλεση της IHC είναι η άμεση και σωστή αποθήκευση του δείγματος ώστε να μη χαθούν οι αντιγονικοί επίτοποι. Τελευταία, η μέθοδος έχει βελτιωθεί πολύ διότι λόγω της χρήσης των μονοκλωνικών αντισωμάτων περιορίζεται η μη ειδική πρόσδεση(4). Η εξέταση για HER-2/neu μπορεί να γίνει και με FISH (fluorescent in-situ hybridization) ή CISH (chromogenic in-situ hybridization) ειδικά για τους ιστούς με βαθμολογία 2 στην IHC καθώς διαχωρίζει ποιοι είναι θετικοί και ποιοι αρνητικοί για την HER2 υπερέκφραση.

#### ***Εξετάσεις αίματος***

Οι εξετάσεις αίματος μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να βοηθήσουν στον καθορισμό του αν ο όγκος ανταποκρίνεται στην θεραπεία ή αν έχει επανεμφανιστεί. Κάποιες μπορεί να ζητηθούν σε γυναίκες που ανήκουν στην κατηγορία υψηλού κινδύνου για να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού για να καθοριστεί εάν ο κίνδυνος αυτός έχει γενετικό υπόβαθρο.

- **CA 15-3 (ή CA 27.29) στον ορό του αίματος:** Είναι καρκινικοί δείκτες που μπορεί να ζητηθούν στα μεσοδιαστήματα μετά την θεραπεία για να βοηθήσουν στην παρακολούθηση του ασθενή για τυχόν επανεμφάνιση του όγκου. Δεν χρησιμοποιείται ως έλεγχος ανίχνευσης καρκίνου του μαστού αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παρακολούθηση ήδη διαγνωσμένων ασθενών.
- **Γενετική ανάλυση στα γονίδια *BRCA-1* ή *BRCA-2* (ή σε άλλα *PALB2* κτλ.):** Γυναίκες που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο λόγω ισχυρού οικογενειακού ιστορικού πρώιμης έναρξης του καρκίνου του μαστού ή καρκίνου των ωοθηκών μπορούν να ελεγχθούν για το εάν έχουν μετάλλαξη στα γονίδια *BRCA*. Μια μετάλλαξη σε οποιοδήποτε από τα γονίδια αυτά υποδηλώνει ότι ο ασθενής βρίσκεται σε σημαντικά υψηλό κίνδυνο (μέχρι 80%) για ανάπτυξη της νόσου. Είναι όμως σημαντικό να ληφθεί υπ' όψιν ότι μόνο το 5-10% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού εμφανίζονται σε γυναίκες με μετάλλαξη στα γονίδια *BRCA*. Η γενετική συμβουλευτική πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν και πριν γίνουν οι εξετάσεις και μετά από ένα θετικό αποτέλεσμα.

#### **Νεώτερες εξετάσεις**

Υπάρχουν αρκετές εξετάσεις διαθέσιμες, και πολλές άλλες σε ερευνητικό στάδιο, που αξιολογούν ένα πρότυπο έκφρασης μεγάλου αριθμού γονιδίων πάνω στους ιστούς με καρκίνο του μαστού. Αυτές οι εξετάσεις ερευνώνται ως προβλεπτικά τεστ για την επανεμφάνιση του καρκίνου του μαστού και το αποτέλεσμα της θεραπείας. Η American Society of Clinical Oncology (ASCO) αναφέρει αρκετές από αυτές στις πρόσφατες «αναθεωρημένες συστάσεις του 2007 για την χρήση των καρκινικών δεικτών στον καρκίνο του μαστού» και μερικές έχουν συμπεριληφθεί και στις Οδηγίες του 2008 του Εθνικού Δικτύου Καρκίνου των ΗΠΑ για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι εξετάσεις θεωρήθηκαν πολλά υποσχόμενες αλλά τα δεδομένα που υποστήριζαν την χρήση τους στην κλινική ρουτίνα, θεωρήθηκαν ακόμα ανεπαρκή. Παραδείγματα από αυτές τις εξετάσεις που ζητήθηκαν από κάποιους γιατρούς περιλαμβάνουν:

- **Oncotype DX:** Η ASCO υποδεικνύει ότι αυτή η εξέταση, η οποία μετράει την έκφραση 21 γονιδίων (εκ των οποίων 5 είναι γονίδια αναφοράς), μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη του κινδύνου επανεμφάνισης του καρκίνου σε

ασθενείς που έχουν πρόσφατως διαγνωστεί με πρώιμο καρκίνο του μαστού, είναι αρνητικοί στους λεμφαδένες, έχουν θετικούς όγκους ως προς τον υποδοχέα οιστρογόνων και λαμβάνουν το φάρμακο ταμοξιφαίνη.

Η εξέταση Oncotype DX είναι η πρώτη εξέταση που χρησιμοποιεί την μοναδική γονιδιακή έκφραση του όγκου κάθε ασθενή για να ποσοτικοποιήσει την πιθανότητα επανεμφάνισης του καρκίνου του. Η εξέταση αυτή μπορεί να βοηθήσει τον γιατρό να κατανοήσει την επιθετικότητα του όγκου του κάθε ασθενή και εκτιμήσει το κατά πόσο θα τον ωφελήσει η χημειοθεραπεία. Αυτή η πληροφορία μπορεί να παρέχει ένα πρόσθετο μέτρο βεβαιότητας ότι η θεραπεία είναι προσαρμοσμένη στις ανάγκες του ασθενή. Η εξέταση αυτή αναπτύχθηκε κυρίως για γυναίκες που έχουν πρόσφατα διαγνωσθεί με καρκίνο του μαστού σε στάδιο I ή II είναι αρνητικές στους λεμφαδένες και θετικές στους ορμονικούς υποδοχείς. Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η εξέταση Oncotype DX μπορεί να είναι πληροφοριακή και για πρόσφατα διαγνωσμένο καρκίνο του μαστού σε γυναίκες που βρίσκονται μετά την εμμηνόπαυση και είναι θετικές στους λεμφαδένες καθώς και στους ορμονικούς υποδοχείς.

Η εξέταση αυτή δεν είναι κατάλληλη για γυναίκες που βρίσκονται σε πολύ προχωρημένο στάδιο καρκίνου του μαστού.

Η εξέταση Oncotype DX (Genomic Health Redwood City, CA) γίνεται σε μικρή ποσότητα ιστού που αφαιρείται κατά την διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης και εγκλείεται σε κύβο παραφίνης. Απομονώνεται RNA και εξετάζεται η έκφραση γονιδίων με ποσοτική real-time RT-PCR. Η έκφραση κάθε γονιδίου αντιστοιχεί σε βαθμό ο οποίος πολλαπλασιάζεται με ειδικό συντελεστή βαρύτητας (θετικό ή αρνητικό) αναλόγως της κατηγορίας στην οποία ανήκει το γονίδιο π.χ. τα γονίδια πολλαπλασιασμού προσδίδουν την μεγαλύτερη βαρύτητα με συντελεστή +1.04 και ακολουθούν τα γονίδια της οικογένειας Her2 με +0.47. Υπάρχει επίσης σει πέντε γονιδίων αναφοράς (reference) με το οποίο αξιολογείται η επάρκεια και η ποιότητα του απομονωθέντος RNA.

Τα αποτελέσματα της εξέτασης αυτής παρέχουν ένα βαθμό επανεμφάνισης του όγκου. Ο βαθμός αυτός είναι μεταξύ 0 και 100 που αντιστοιχεί σε μία συγκεκριμένη πιθανότητα να επανεμφανιστεί ο καρκίνος του μαστού μέσα σε 10 χρόνια από την

στιγμή της αρχικής διάγνωσης. Ο βαθμός αυτός βγαίνει με έναν αλγόριθμο που φαίνεται στο σχήμα 1.8.

<b><u>Proliferation</u></b>	<b><u>Estrogen</u></b>	$RS = +0.47 \times \text{HER-2 group score}$ $- 0.34 \times \text{ER group score}$ $+ 1.04 \times \text{proliferation group score}$ $+ 0.10 \times \text{invasion group score}$ $+ 0.05 \times \text{CD68}$ $- 0.08 \times \text{GSTM1}$ $- 0.07 \times \text{BAG1}$								
Ki-67 STK15 Survivin Cyclin B1 MYBL2	ER PR Bcl2 SCUBE2 GSTM1    BAG1									
<b><u>Invasion</u></b>	<b><u>Reference</u></b>									
Stromelysin 3 Cathepsin L2 HER-2 GRB7 HER-2	CD68 Beta-actin GAPDH RPLPO GUS TFRC									
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Category</th> <th>RS (0 – 100)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Low risk</td> <td>RS &lt; 18</td> </tr> <tr> <td>Intermediate risk</td> <td>RS ≥ 18 and &lt; 31</td> </tr> <tr> <td>High risk</td> <td>RS ≥ 31</td> </tr> </tbody> </table>	Category	RS (0 – 100)	Low risk	RS < 18	Intermediate risk	RS ≥ 18 and < 31	High risk	RS ≥ 31
Category	RS (0 – 100)									
Low risk	RS < 18									
Intermediate risk	RS ≥ 18 and < 31									
High risk	RS ≥ 31									

**Σχήμα 1.8:** Αλγόριθμος εξέτασης Oncotype DX για τη βαθμολόγηση επανεμφάνισης καρκίνου (RS, Recurrence Score) (25).

Αν ο βαθμός αυτός είναι 17 και κάτω τότε ο ασθενής θεωρείται ότι έχει χαμηλό κίνδυνο επανεμφάνισης του καρκίνου και μπορεί να αρκестθεί σε ορμονοθεραπεία. Αυτό όμως δεν σημαίνει απαραίτητα ότι δεν θα ξαναεμφανιστεί ποτέ ο καρκίνος του μαστού.

Αν ο βαθμός είναι μεταξύ 18-30 τότε θεωρείται ότι ο ασθενής έχει ενδιάμεσο κίνδυνο να εμφανίσει ξανά καρκίνο του μαστού.

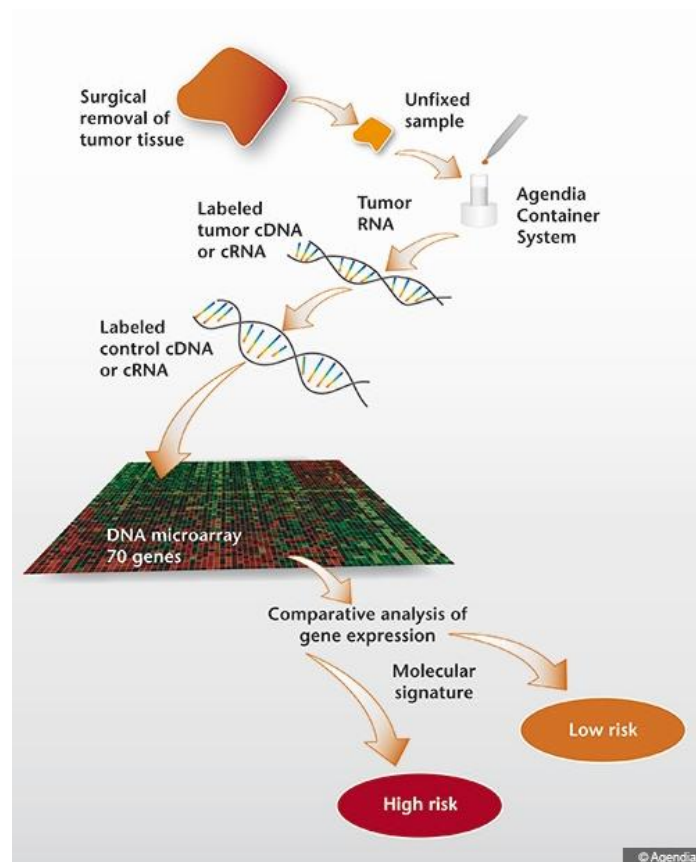
Αν ο βαθμός είναι 31 και πάνω τότε θεωρείται ότι ο ασθενής έχει υψηλό κίνδυνο επανεμφάνισης του καρκίνου και συνεπώς απαιτείται χημειοθεραπεία. Αυτό όμως δεν σημαίνει απαραίτητα ότι ο καρκίνος θα ξαναεμφανιστεί (25).

**II. MammaPrint:** Χρησιμοποιείται στην Ευρώπη και πρόσφατα εγκρίθηκε από το FDA για χρήση και στις ΗΠΑ. Αυτή η εξέταση αξιολογεί το πρότυπο έκφρασης 70 γονιδίων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να βοηθήσει στην πρόβλεψη για το εάν ένας καρκίνος του μαστού επανεμφανιστεί ή κάνει μετάσταση σε γυναίκες που έχουν πρώιμο καρκίνο, είναι κάτω από την ηλικία των 61 ετών και είναι αρνητικές στους λεμφαδένες. Για να χρησιμοποιηθεί η εξέταση αυτή, ο ασθενής πρέπει να έχει μέγεθος του όγκου μικρότερο των 5 cm, να είναι αρνητικός στους λεμφαδένες, το

στάδιο καρκίνου να είναι I ή II, να έχει ER+ ή ER-, και δεν εξαρτάται από την λήψης ταμοξιφαίνης.

Το MammaPrint είναι μια διαγνωστική εξέταση RNA που βασίζεται στη μέθοδο των μικροσυστοιχιών. Η εξέταση αυτή μετράει τα επίπεδα έκφρασης κάθε ενός από αυτά τα γονίδια σε φρέσκο ιστό που έχει αφαιρεθεί κατά την διάρκεια του χειρουργείου και έχει καταψυχθεί στους  $-70^{\circ}\text{C}$ . Στην συνέχεια χρησιμοποιεί έναν αλγόριθμο για να υπολογίσει τον βαθμό επανεμφάνισης του καρκίνου.

Για να υπολογιστεί η έκφραση των γονιδίων του δείγματος του όγκου απομονώνεται το mRNA από το δείγμα και μετατρέπεται σε cDNA ενώ παράλληλα επισημαίνεται με μία χρωστική. Το επισημασμένο mRNA του δείγματος μαζί με το επισημασμένο με άλλη χρωστική mRNA από ένα δείγμα αναφοράς υβριδίζονται σε μία επιφάνεια μικροσυστοιχιών DNA. Στο σχήμα 1.9 αναπαριστάται σχηματικά η διαδικασία της εξέτασης (26).



**Σχήμα 1.9:** Στάδια εξέτασης της μικροσυστοιχίας MammaPrint (Agendia).

III. **PAM 50:** Όπως θα αναφερθεί διεξοδικά στη συνέχεια, ο διηθητικός καρκίνος του μαστού μπορεί να ταξινομηθεί σε τουλάχιστον 4 κύριους βιολογικούς υποτύπους: *luminal A*, *luminal B*, *HER2-enriched* και *basal-like* και σε 3 υποτύπους που χρησιμοποιούνται λιγότερο στην κλινική πράξη: *luminal C*, *normal breast-like* και *claudin-low*. Το 2009, οι *Parker et al* πρότειναν ένα σέτ 50 γονιδίων (*Prediction Analysis of Microarrays - PAM50*) για την τυποποίηση των παραπάνω υποτύπων. Το PAM50 χρησιμοποιεί τη τεχνική της RT-qPCR σε μονιμοποιημένους σε FFPE ιστούς. Το τεστ μετρά την έκφραση 50 γονιδίων ταξινόμησης (*classifier genes*) και 5 γονιδίων ελέγχου για να προσδιορίσει τους 4 κύριους βιολογικούς υποτύπους. Πολυπαραγοντικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι το PAM50 αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα της επιβίωσης στον καρκίνο του μαστού, δηλαδή είναι ανεξάρτητο των κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών όπως ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου, κ.λπ. Το PAM50 παρέχει πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τη βιολογία του όγκου και ποσοτικά στοιχεία σχετικά με βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται ήδη στη επιλογή της θεραπείας. Μαζί με τον προσδιορισμό του υποτύπου του καρκίνου του μαστού, το PAM50 παρέχει ποσοτικές τιμές για τον πολλαπλασιασμό, για την έκφραση γονιδίων του αυλού, για τον ER, για τον PR, και τον HER2/neu (27).

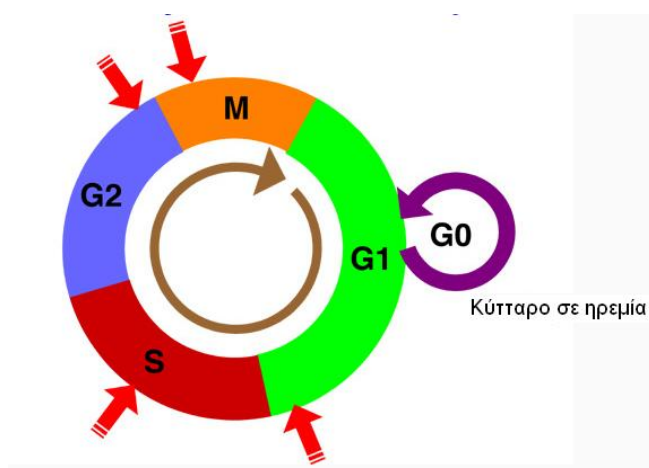
IV. **Mammostrat:** Σήμερα, πέρα από τις συνήθεις ανοσοϊστοχημικές μετρήσεις των ορμονικών υποδοχέων και του πρωτεϊνικού προϊόντος του ογκογονιδίου *HER2/neu* υπάρχει η τυποποιημένη δοκιμασία *Mammostrat* (GE Healthcare, ΗΠΑ), που αξιολογεί την πρωτεϊνική έκφραση των μορίων: SLC7A5, HTF9C, P53, NDRG1 και CEACAM5 με IHC (1).

V. **Aviara (τώρα bioTheranostics):** Είναι μια καινούρια μέθοδος που συνδυάζει τον λόγο Breast Cancer Index (*HOXB13:IL17BR*) με τον Molecular Grade Index (MGI) το οποίο αποτελείται από την έκφραση πέντε γονιδίων κυτταρικού κύκλου (*BUB1B*, *CENPA*, *NEK2*, *RACGAP1*, *RKM2*). Ο συνδυασμός των δύο μοριακών δεικτών βελτιώνει την πρόβλεψη της επανεμφάνισης της νόσου σε ασθενείς που βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο καρκίνου του μαστού (28). Προσφάτως κυκλοφόρησε και το Endopredict το οποίο βασίζεται στην ανάλυση 8 ογκογονιδίων (*BIRCS*, *UBE2C*, *DHCR7*, *RBBP8*, *IL6ST*, *AZ6P1*, *MGP*, *STC2*) συν 4 γονιδίων αναφοράς (*HBB*,



*CALM2, OAZ1, RPL37A*) σε συνδυασμό με κλασσικούς προγνωστικούς παράγοντες όπως η κατάσταση των λεμφαδένων και το μέγεθος του όγκου (29).

VI. **Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής ή εικόνας:** η μέτρηση του ποσού του DNA που περιέχουν τα κύτταρα του υπό εξέταση καρκινικού πληθυσμού και η τοποθέτησή τους σε φάσεις του κυτταρικού κύκλου ονομάζεται DNA πλοειδισμός (DNA ploidy). Σ' ένα φυσιολογικό πληθυσμό τα περισσότερα κύτταρα ανευρίσκονται ηρεμούντα εκτός του κύκλου στη φάση  $G_0$  (σχήμα 1.10). Εάν δοθεί σήμα να προχωρήσουν στον κύκλο ακολουθούν τις φάσεις  $G_1$ , S (συνθετική φάση) και  $G_2/M$  (μιτωτική φάση). Οι φάσεις G προκύπτουν από την λέξη gap καθώς αποτελούν «κενά» μεταξύ της συνθετικής και της μιτωτικής φάσης. Το περιεχόμενο ποσό DNA σε φυσιολογικά διπλοειδικά  $G_0$  ή  $G_1$  κύτταρα είναι σταθερό. Τα καρκινικά όμως κύτταρα έχουν χάσει ή κερδίσει χρωμοσώματα.



**Σχήμα 1.10 :** Κυτταρικός κύκλος και σημεία ελέγχου.

(<http://herb4cancer.files.wordpress.com>)

Ορίζεται λοιπόν ως βασική παράμετρος ο δείκτης DNA (DNA Index, D.I):

$$D.I = \frac{\text{ποσότητα DNA της } G_0 / G_1 \text{ φάσης των υπο εξέταση κυττάρων}}{\text{ποσότητα DNA της } G_0 / G_1 \text{ φάσης φυσιολογικών κυττάρων (αναφοράς)}}$$

Ως ευπλοειδικός ή διπλοειδικός ορίζεται ο κυτταρικός πληθυσμός που έχει D.I. κοντά στο 1 ενώ ως ανευπλοειδικός ο πληθυσμός που έχει διαφορετικό από 1 και συνήθως αρκετά μεγαλύτερο. Πιο ειδικά αν το D.I. είναι από 1,9 μέχρι 2,1 τότε ο κυτταρικός πληθυσμός χαρακτηρίζεται τετραπλοειδικός. Πιθανολογείται ότι τα ανευπλοειδικά με τιμές D.I. μεταξύ 1,2 – 1,4 προκύπτουν από τη προσθήκη χρωμοσωμάτων στα ευπλοειδικά κύτταρα ενώ τα ανευπλοειδικά με τιμές D.I. μεταξύ 1,5 – 1,8 από την απώλεια χρωμοσωμάτων στα τετραπλοειδικά ή από τα «ακίνητοποιημένα» στη G2/M φάση κύτταρα. Τα φυσιολογικά κύτταρα είναι ευπλοειδικά.

**VII. Ανοσοϊστοχημεία δεικτών πολλαπλασιασμού του DNA (Ki-67):** Το κυριότερο μόριο που χρησιμοποιείται ως δείκτης πολλαπλασιασμού του DNA είναι το Ki-67, μια πυρηνική πρωτεΐνη με δύο ισομορφές 345 και 395 KDa, η οποία εκφράζεται μόνο στα κύτταρα που έχουν ενταχθεί στον κυτταρικό κύκλο (φάσεις G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M) και όχι στα ηρεμούντα G<sub>0</sub> κύτταρα. Το μονόκλωνο αντίσωμα έναντι του Ki-67 που έχει επικρατήσει διεθνώς και χρησιμοποιείται στην ανοσοϊστοχημική μέθοδο είναι ο κλώνος MIB-1 γι' αυτό και η μέτρηση του ποσοστού των κυττάρων που το εκφράζουν αποκαλείται και MIB-1 count. Η μέτρηση καθίσταται ποσοτική και ιδιαίτερα ακριβής όταν γίνεται με σύστημα ανάλυσης εικόνας και όταν εστιάζεται μόνο στα καρκινικά κύτταρα.

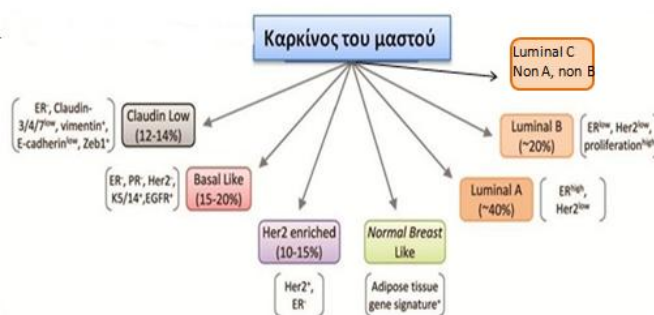
**VIII. CellSearch CTC (Immunicon, Veridex, Jonshon & Jonshon, USA):** Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), δεν ανευρίσκονται καθόλου σε άτομα χωρίς κακοήθεια αλλά βρίσκονται πολύ συχνά σε ασθενείς με μεταστατικά καρκινώματα. Η εκτίμηση της παρουσίας τους από τους ειδικούς μπορεί να βοηθήσει στην παρακολούθηση και την πρόβλεψη της προόδου του καρκίνου καθώς και στην αξιολόγηση της ανταπόκρισης στην θεραπεία του ασθενή. Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή τα κύτταρα επώάζονται με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι των επιθηλιακών κυττάρων (EpCAM). Τα επιθηλιακά κύτταρα διαχωρίζονται από τα λευκοκύτταρα με συσκευή ισχυρού μαγνητικού πεδίου το οποίο έλκει τα επισημασμένα επιθηλιακά κύτταρα. Μετά τον ανοσοεμπλουτισμό του δείγματος σε CTCs και τον αποχωρισμό από τα μαγνητικά σφαιρίδια, ακολουθεί νέα επώαση με άλλο αντίσωμα, επισημασμένο με φθορίζουσα χρωστική καθώς και

βαφή κάθε πυρήνα με ειδική χρωστική. Επακολουθεί μέτρηση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων με τον κυτταρομετρητή εικόνας CellSearch Τα αποτελέσματα αναφέρονται σαν CTCs ανά ορισμένο όγκο, ο οποίος συνήθως είναι 7.5ml ολικού αίματος (30). Η αξιολόγηση της ύπαρξης CTCs γίνεται πλέον και με άλλους τρόπους πχ. με μοριακή ανίχνευση (31).

Παρ' όλα αυτά, οι περισσότερες αρχές πιστεύουν πως το HER-2/neu και τα επίπεδα υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης είναι τα πιο σημαντικά για να αξιολογηθούν πρώτα. Οι άλλες εξετάσεις δεν έχουν θεραπευτική σημασία και, όταν συγκρίνονται με τον ιστολογικό βαθμό (grade) και το στάδιο της ασθένειας, δεν είναι από μόνες τους στατιστικά σημαντικές ως προς την πρόγνωση. Κάποια ιατρικά κέντρα χρησιμοποιούν αυτές τις εξετάσεις για επιπλέον πληροφορίες στην αξιολόγηση των ασθενών καθιστώντας σημαντική τη συζήτηση για την αξία των εξετάσεων αυτών με όλη την ιατρική ομάδα ([www.labtestsonline.gr](http://www.labtestsonline.gr)).

### Νέα ταξινόμηση με βάση το μοριακό προφίλ έκφρασης γονιδίων

Σήμερα, μέσω πολυγονιδιακών προφίλ έκφρασης (*genome-wide expression profiling*) και της ιεραρχικής ομαδοποίησης (*hierarchical clustering*), ο καρκίνος του μαστού έχει ταξινομηθεί σε επτά βιολογικούς υποτύπους. Οι υπότυποι αυτοί είναι: *luminal A*, *luminal B*, *luminal C*, *HER2-enriched*, *basal-like*, *claudin-low* και *normal breast-like* (σχήμα 1.11) (32).



Σχήμα 1.11: Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού (1).

Η ονομασία των *luminal-like* καρκίνων του μαστού προέρχεται από την ομοιότητα του προφίλ έκφρασής τους με αυτό του φυσιολογικού επιθηλίου του αυλού του μαστού. Οι όγκοι του μαστού που ταξινομούνται ως *luminal A* είναι γνωστό ότι εμφανίζουν υπερέκφραση των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον ER, υποέκφραση ενός συμπλέγματος γονιδίων (*cluster*) σχετικά με το ογκογονίδιο *HER2/neu* και υποέκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό. Περίπου το 40 % όλων των καρκίνων του μαστού έχουν ταξινομηθεί ως *luminal A* και φαίνεται να έχουν μια μάλλον ευνοϊκή πρόγνωση και ίσως δεν απαιτούν επιθετική θεραπεία. Οι *luminal B* όγκοι του μαστού εμφανίζουν πολύ χαμηλότερη έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τον ER, μεταβλητή έκφραση όσον αφορά το σύμπλεγμα γονιδίων του ογκογονιδίου *HER2/neu* και μία σχετικά υψηλότερη έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό. Αντιπροσωπεύουν περίπου το 20 % των καρκίνων του μαστού. Ο υπότυπος *luminal B*, λιγότερο συχνός από τον υπότυπο *luminal A* φαίνεται να έχει χειρότερη πρόγνωση (33).

Η υπότυπος *luminal C* διακρίνεται από τους A και τον B λόγω υψηλής έκφρασης ενός συνόλου διαφορετικών γονιδίων με άγνωστη λειτουργία προς το παρόν. Αυτό το σύμπλεγμα γονιδίων βρέθηκε επίσης να υπερεκφράζεται και στους *basal-like* και *HER2-enriched* υποτύπους (33).

Οι *HER2-enriched* καρκίνοι του μαστού αντιπροσωπεύουν το 20 % έως 30 % όλων των όγκων του μαστού. Χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση των γονιδίων πολλαπλασιασμού και *HER2/neu* και χαμηλή έκφραση του συμπλέγματος *luminal* γονιδίων. Το σύμπλεγμα *luminal* περιλαμβάνει τις κυτοκερατίνες (*CytoKeratins* - CKs) του αυλού CK7, CK8, CK18 και CK19 και άλλους δείκτες που σχετίζονται με τον αυλό. Οι *HER2-enriched* όγκοι είναι συνήθως, αλλά όχι πάντα, *HER2/neu*<sup>+</sup> και *ER/PR*<sup>-</sup>. Κλινικά σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση σε σύγκριση με *luminal A* όγκους (33).

Ο *basal-like* υπότυπος του καρκίνου του μαστού αντιπροσωπεύει περίπου το 15 % των διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων του μαστού. Το όνομα του προέρχεται από τα κοινά πρότυπα γονιδιακής έκφρασης που παρουσιάζει με τα φυσιολογικά βασικά επιθηλιακά κύτταρα. Οι *basal-like* όγκοι είναι συχνά *ER*<sup>-</sup>, *PR*<sup>-</sup>, *HER2*<sup>-</sup>, *CK5/6*<sup>+</sup> ή/και *EGFR*<sup>+</sup> με IHC. Θεωρούνται *ER/PR* και *HER2/neu* αρνητικοί («τριπλά αρνητικοί»), λόγω της χαμηλής έκφρασης του συμπλέγματος των γονιδίων του αυλού

και του ογκογονιδίου *HER2*. Ωστόσο, ο TNBC και ο *basal-like* καρκίνος του μαστού δεν είναι συνώνυμοι. Οι TNBC καρκίνοι του μαστού αποτελούν μια πιο ετερογενή ομάδα όγκων από τους *basal-like* καρκίνους. Περίπου το 30 % των TNBC δεν είναι *basal-like*. Αυτός ο υπότυπος χαρακτηρίζεται επίσης από σχετικά υψηλή συχνότητα *BRCA1* μεταλλάξεων, αυξημένη γενωμική αστάθεια, υψηλή έκφραση των γονιδίων του συμπλέγματος πολλαπλασιασμού και αποτελείται από όγκους υψηλού βαθμού διαφοροποίησης (*grade III*) (33).

Ο *normal breast-like* υπότυπος θυμίζει δείγματα φυσιολογικού ιστού του μαστού και χαρακτηρίζεται από σχετικά υψηλή έκφραση πολλών γονιδίων χαρακτηριστικών των λιπωδών κυττάρων και άλλων μη επιθηλιακών τύπων κυττάρων, και από χαμηλή έκφραση των γονιδίων των επιθηλιακών κυττάρων του αυλού (33).

Ο πρόσφατα αναγνωρισμένος *claudin-low* υπότυπος του καρκίνου του μαστού χαρακτηρίζεται από υπερέκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την επιθηλιακή-προς-μεσεγχυματική μετάβαση (*epithelial-to-mesenchymal transition* - EMT). Η πλειοψηφία των *claudin-low* καρκίνων του μαστού εμφανίζουν καθόλου έκφραση των δεικτών διαφοροποίησης του αυλού, είναι *HER2<sup>-</sup>* και αρνητικοί για ορμονικούς υποδοχείς από την IHC, παρουσιάζουν συχνά μεταπλαστική και μυελική διαφοροποίηση και συνήθως ανήκουν στον *basal-like* υπότυπο (33).

### 1.7.2 Μη εργαστηριακές εξετάσεις

Εκτός από τις εργαστηριακές εξετάσεις υπάρχουν και μη εργαστηριακές εξετάσεις που είναι εξίσου σημαντικές. Αυτές περιλαμβάνουν:

- **Μαστογραφία:** Η μαστογραφία συστήνεται ευρέως σαν εργαλείο ανίχνευσης. Χρησιμοποιεί την τεχνολογία ακτινών X για να δημιουργήσει μια εικόνα του στήθους και μπορεί να αποκαλύψει έναν καρκίνο του μαστού μέχρι και δύο χρόνια πριν ο όγκος γίνει τόσο μεγάλος ώστε να ψηλαφηθεί με την αυτοεξέταση.
- Νεώτερες τεχνολογίες όπως η ψηφιακή μαστογραφία και η ανίχνευση με την βοήθεια υπολογιστή σε κάποιες περιπτώσεις παρέχουν μια καθαρότερη εικόνα από αυτή της μαστογραφίας. Ιδιαίτερα σε νεώτερες γυναίκες όπου ο ιστός του μαστού είναι πολύ πυκνός για να δείξει καθαρά τους όγκους με τις ακτίνες X της κανονικής μαστογραφίας, μπορεί να συσταθεί υπέρηχος ή μαγνητική τομογραφία (MRI).
- **Έκπλυμα γαλακτοφόρων πόρων:** Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο ανίχνευσης, ειδικά σε γυναίκες υψηλού κινδύνου εμφάνισης της ασθένειας. Σε αυτή

την διαδικασία, ο ιατρός αποσπά κύτταρα μέσω ενός λεπτού σωλήνα που εισάγεται μέσω της θηλής του ασθενή. Αυτά τα κύτταρα μετά εξετάζονται ως προς την ύπαρξη κακοήθειας με μικροσκόπιο (ή πλέον και με μοριακές μεθόδους).

### **1.8 Πρόληψη καρκίνου του μαστού**

Για τις περισσότερες γυναίκες, ένας υγιεινός τρόπος ζωής που περιλαμβάνει συστηματική άσκηση, διατήρηση ενός υγιούς σωματικού βάρους και αποφυγή του αλκοόλ είναι ο καλύτερος τρόπος για να ελαχιστοποιήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Επιστημονικές μελέτες συνεχίζουν να εντοπίζουν παράγοντες που σχετίζονται με αύξηση ή μείωση του κινδύνου ανάπτυξης της ασθένειας αλλά δεν υπάρχει συγκεκριμένη ομάδα ενεργειών η οποία θα προκαλέσει ή θα εμποδίσει την εμφάνιση του καρκίνου του μαστού. Οι γυναίκες πρέπει να συνεργάζονται με τον ιατρό τους για να καθορίσουν τους ατομικούς τους παράγοντες κινδύνου και πως θα τους αντιμετωπίσουν καλύτερα.

Οι γυναίκες που βρίσκονται στην ομάδα υψηλού κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού, μπορούν να πάρουν το φάρμακο ταμοξιφαίνη για να μειώσουν αυτόν τον κίνδυνο. Παρ' όλα αυτά η ταμοξιφαίνη μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο ανάπτυξης θρόμβων, καρκίνου του ενδομητρίου και πιθανώς καρδιαγγειακού νοσήματος. Έτσι η απόφαση λήψης του φαρμάκου πρέπει να ληφθεί με μεγάλη προσοχή.

Για τις γυναίκες που φέρουν μετάλλαξη στα γονίδια *BRCA-1* και *BRCA-2* που συσχετίζονται ισχυρά με τον καρκίνο του μαστού, η προφυλακτική ωθηκεκτομή και μαστεκτομή είναι μια επιλογή. Ορισμένες γυναίκες επιλέγουν να αφαιρέσουν και τους δύο μαστούς προληπτικά παρά να διατρέξουν τον κίνδυνο ανάπτυξης της ασθένειας αργότερα στη ζωή τους. Μελέτες έχουν δείξει ότι τέτοια χειρουργεία μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού περίπου κατά 90%. Άλλες γυναίκες επιλέγουν να κάνουν προληπτική μαστεκτομή στον μαστό που δεν έχει καρκίνο όταν αναπτύξουν καρκίνο στον άλλον.

### **1.9 Οδηγίες για πρώιμη ανίχνευση**

Ο καρκίνος του μαστού που έχει ανιχνευτεί και αντιμετωπιστεί στα πρώιμα στάδια μπορεί να θεραπευτεί σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90%. Τα εργαλεία ανίχνευσης πρόωρου καρκίνου του μαστού είναι η αυτοεξέταση, ο κλινικός έλεγχος και οι μαστογραφίες. Η αμερικανική κοινότητα καρκίνου (ACS) προτείνει οι γυναίκες άνω

των 20 ετών να κάνουν αυτοεξέταση του στήθους κάθε μήνα. Επίσης προτείνει οι γυναίκες κάτω την 39 ετών να κάνουν κλινικό έλεγχο στήθους από έναν ειδικό τουλάχιστον κάθε 3 χρόνια. Γυναίκες από 40 ετών και πάνω πρέπει να κάνουν μαστογραφίες. Αυτές που ανήκουν στην κατηγορία υψηλού κινδύνου πρέπει να ξεκινήσουν τον έλεγχο νωρίτερα.

### **1.10 Θεραπευτική Αντιμετώπιση του Καρκίνου του Μαστού**

Οι περισσότεροι καρκίνοι του μαστού αφαιρούνται χειρουργικά, ή αφαιρείται όσο περισσότερος καρκίνος είναι δυνατόν και μετά χρησιμοποιούνται μια ή περισσότερες θεραπείες για να εξοντώσουν ή να ελέγξουν τα υπολειπόμενα καρκινικά κύτταρα. Η ογκεκτομή αφαιρεί μόνο τον καρκινικό ιστό ενώ αφήνει ανέπαφο τον υπόλοιπο ιστό του μαστού. Με την σαφέστατα πιο εκτεταμένη μαστεκτομή αφαιρείται χειρουργικά μεγάλο τμήμα του μαστού καθώς και περιβάλλοντος ιστού. Κάποτε η μαστεκτομή ήταν η προτιμώμενη θεραπεία ακόμα και στον πρώιμο καρκίνο του μαστού. Πλέον όμως υπάρχουν περισσότερες διαθέσιμες επιλογές. Η ογκεκτομή ακολουθούμενη από ακτινοθεραπεία έχει αποδειχτεί τόσο αποτελεσματική όσο και η μαστεκτομή στην θεραπεία πρώιμου καρκίνου του μαστού. Είτε στην μαστεκτομή, είτε στην ογκεκτομή ο ιατρός μπορεί να αφαιρέσει όλους ή τμηματικά τους λεμφαδένες κάτω από την μασχάλη και να παραπέμψει σε παθολογοανατομικές εξετάσεις για να ελεγχθεί αν έχει εξαπλωθεί ο καρκίνος εκεί. Η χρήση ακτινοθεραπείας, χημειοθεραπείας και άλλων φαρμακευτικών θεραπειών εξαρτάται από την γυναίκα, τα χαρακτηριστικά του όγκου και το κατά πόσο έχει εξαπλωθεί ο καρκίνος. Οι θεραπείες με φάρμακα μπορεί να περιλαμβάνουν: 1) την ταμοξιφαίνη, η οποία δρα ως ανταγωνιστής της οιστραδιόλης E2 ως προς τους υποδοχείς της (ER) αλλά ταυτόχρονα δρα και ως μερικός αγωνιστής σε άλλους ιστούς όπως τα οστά το ενδομήτριο κλπ, με αντίστοιχο φάσμα δραστηριότητας και ανεπιθύμητων ενεργειών 2) τους αναστολείς της αρωματάσης (π.χ. αναστροζόλη και λετροζόλη). Η αρωματάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει την μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα (ανδροντενδιόνη σε οιστρόνη και τεστοστερόνη σε οιστραδιόλη) στους περιφερικούς ιστούς, έτσι ο αναστολείς αυτού του ενζύμου μειώνουν την ύπαρξη διαθέσιμων οιστρογόνων με αποτέλεσμα να βοηθάει στην θεραπεία του ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου. Αυτοί που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη HER-2/neu μπορούν να ωφεληθούν από την θεραπεία με το φάρμακο Herceptin (Trastuzumab, Roche). Υπάρχουν πολλές νέες έρευνες που γίνονται στο πεδίο της θεραπείας του καρκίνου του μαστού. Καινούργια φάρμακα με

λιγότερες παρενέργειες κατασκευάζονται. Ένα καινούριο φάρμακο για τους ασθενείς που έχουν έλλειψη της έκφρασης των γονιδίων *BRCA1*, *BRCA2* και *PALB2* καθώς και στους τριπλά αρνητικούς ασθενείς οι οποίοι φαίνεται ότι μπορούν να ωφεληθούν από τα νέα φάρμακα Olaparib, Iniparib, Veliparib, Rucaparib τα οποία είναι αναστολείς της PARP πολυμεράσης. Τα φάρμακα αυτά στοχεύουν την πρωτεΐνη PARP η οποία είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη που παίζει βασικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA μέσω της εκτομής βάσης (BER, Base Excision Repair) (34). Υπάρχουν επίσης πολλά υποσχόμενα φάρμακα έναντι γονιδίων-στόχων και εμβόλια, κάποια από τα οποία ήδη χρησιμοποιούνται σε περιορισμένη κλίμακα ή σε δοκιμαστική βάση.



## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup> Κληρονομούμενος καρκίνος του μαστού και των ωοθηκών- Γονίδιο *PALB2*

### Εισαγωγή

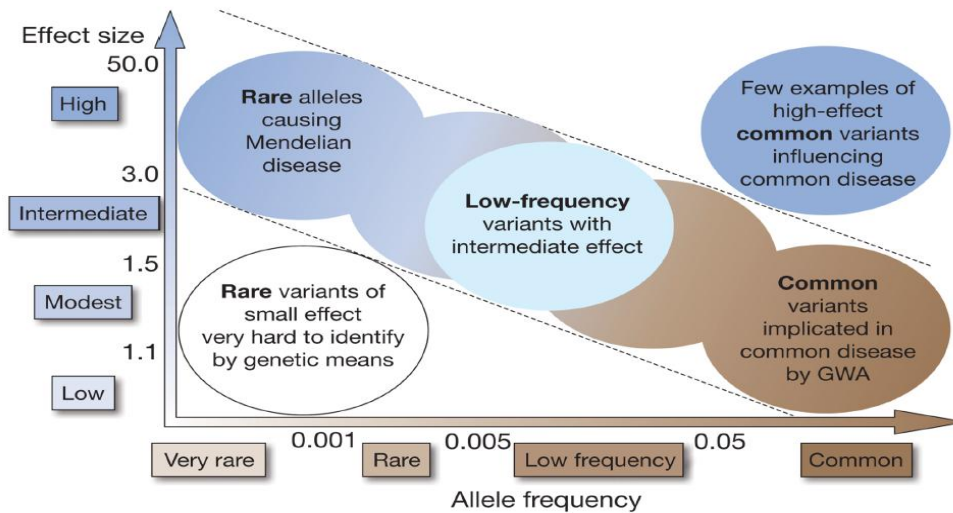
Κανονικά, η κυτταρική αύξηση και η διαφοροποίηση ακολουθούν τις ανάγκες του οργανισμού, και η κυτταρική διαίρεση γίνεται μόνον όταν είναι απαραίτητη. Υπάρχουν, λοιπόν, ρυθμιστικά μονοπάτια τα οποία ελέγχουν τις κυτταρικές διαιρέσεις. Σ' αυτά συμμετέχουν εξωκυτταρικοί αυξητικοί παράγοντες, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων στην πλασματική μεμβράνη, αρκετές πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος και αρκετά γονίδια. Όλα τα ανθρώπινα κύτταρα περιέχουν γονίδια, που καλούνται πρωτο-ογκογονίδια και εμπλέκονται στον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης. Αυτά τα γονίδια, αν μεταλλαχθούν μπορεί να μετατραπούν σε **ογκογονίδια**. Τα ογκογονίδια μπορεί να οδηγήσουν σε παραγωγή μιας μη φυσιολογικής πρωτεΐνης, ή ακόμα και σε αφύσικα υψηλά επίπεδα μιας φυσιολογικής πρωτεΐνης. Σε κάθε περίπτωση όμως υπάρχει κίνδυνος ανεξέλεγκτης κυτταρικής αύξησης και δημιουργίας ενός όγκου. Μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά μπορεί να οδηγήσουν σε καρκινογένεση.

Μια δεύτερη κατηγορία γονιδίων η οποία εμπλέκεται στη δημιουργία και εκδήλωση καρκίνου είναι τα **ογκοκατασταλτικά** γονίδια. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμποδίζουν την ανεξέλεγκτη κυτταρική αύξηση. Οποιαδήποτε μετάλλαξη παρεμβαίνει στην κανονική λειτουργία τους, αυξάνει τις πιθανότητες για ανάπτυξη καρκίνου.

### 2.1 Κληρονομούμενος καρκίνος του μαστού και των ωοθηκών

Ο Γάλλος ιατρός Paul Broca είναι ο πρώτος που κατέγραψε τον κληρονομούμενο καρκίνο μαστού και ωοθηκών: μέσα σε τέσσερις γενιές σε μία οικογένεια (πιθανόν της γυναίκας του) 10 από τις 24 γυναίκες είχαν πεθάνει από καρκίνο του μαστού, ενώ αρκετά ακόμα άτομα, και των δύο φύλων, εμφάνισαν άλλες κακοήθειες (35, 36). Περίπου 25% των ασθενών με καρκίνο μαστού έχουν κάποιο περιστατικό ανάλογο καρκίνου στην οικογένεια (familial cancer, οικογενής καρκίνος) ωστόσο μόνο στο 20-40% των περιπτώσεων αυτών ο καρκίνος μπορεί να αποδοθεί σε μεντελιανή κληρονόμηση ενός ισχυρά διεισδυτικού γονιδίου. Έχει υπολογισθεί ότι ένα ποσοστό

της τάξεως του 7% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού και ένα αντίστοιχο ποσοστό του 10% των περιπτώσεων του καρκίνου των ωοθηκών εντάσσονται σε αυτές τις περιπτώσεις του κληρονομούμενου (hereditary) καρκίνου (π.χ. τρεις γενεές με νόσο ή περισσότερα των δύο περιστατικών σε συγγενείς α βαθμού). Το 1994 και το 1995 ανακαλύφθηκαν δύο γονίδια με υψηλή διεισδυτικότητα (penetrance), τα οποία ευθύνονται για το 50% περίπου των περιπτώσεων αυτών: το γονίδιο *BRCA1* (Breast Cancer Susceptibility gene1) και το γονίδιο *BRCA2* (Breast Cancer Susceptibility gene2). Σε ένα μεγάλο ποσοστό οικογενειών με κληρονομούμενο καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών (~50% αναλόγως του πληθυσμού) δεν έχουν ανιχνευθεί έως τώρα παθογενωμικές μεταλλάξεις στο περιφερικό αίμα στα δύο σπάνια μεν αλλά υψηλής διεισδυτικότητας γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*, παρ' όλες τις τεχνολογικές βελτιώσεις και την εξονυχιστική πλέον γενετική ανάλυση που συμπεριλαμβάνει και τους μεγάλους γενωμικούς ανασυνδυασμούς και τις μη-εξονικές περιοχές. Ένα επιπλέον μικρό ποσοστό μεταλλάξεων επίσης ήταν γνωστό ότι υπήρχε σε γονίδια της ίδιας κατηγορίας υψηλής διεισδυτικότητας *p53*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1* τα οποία ωστόσο είναι ευκόλως αναγνωρίσιμα καθώς ο καρκίνος μαστού είναι μέρος ενός ευρύτερου συνδρόμου με πολλαπλούς καρκίνους. Το υπόλοιπο ποσοστό πιστεύεται ότι θα συμπληρωθεί είτε από συνδυασμό χαμηλής διεισδυτικότητας αλλά συχνών μεταλλαγμένων αλληλίων (μέσω genome-wide association studies) είτε από γονίδια μέτριας διεισδυτικότητας όπως τα *ATM*, *CHEK2*, *BRIP1*, *NBS1*, *RAD50* καθώς και το *PALB2* που πρωτοαναφέρθηκε το 2006 καθώς και το προσφάτως συσχετισθέν *RAD51C* (37-45). Στο σχήμα 2.1 φαίνεται ένα διάγραμμα η συχνότητα των μεταλλαγμένων αλληλίων σε σχέση με την ένταση της γενετικής τους επίδρασης (σχετικός κίνδυνος νόσου). Τα προαναφερθέντα ανήκουν στους τρεις κύκλους με διαφορετική συχνότητα αντιστρόφως ανάλογη του κινδύνου ενώ οι υπόλοιπες περιοχές αντιπροσωπεύουν την «χαμένη» κληρονομικότητα (missing heritability).



**Σχήμα 2.1:** Διάγραμμα συσχέτισης κινδύνου μεταλλαγμένου αλληλίου σε σχέση με τη συχνότητά του (41).

**BRCA1:** Το *BRCA1* χαρτογραφήθηκε το 1990 και κλωνοποιήθηκε το 1994. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό είναι υπεύθυνες για τον κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών (39, 42, 46-48). Δρα ως κομβική πρωτεΐνη με πολλαπλούς ρόλους που εμπλέκεται στην σταθερότητα του γονιδιώματος, την επιδιόρθωση του DNA, την ανταπόκριση σε βλάβες του DNA και στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, στην επαναδιάταξη της χρωματίνης και στην μεταγραφική ρύθμιση. Η πρωτεΐνη BRCA1 διευκολύνει την επιδιόρθωση του DNA με την συμμετοχή της στον ομόλογο ανασυνδυασμό και με την αποκοπή των νουκλεοτιδίων στην επιδιόρθωση. Οι ακριβείς λειτουργίες του *BRCA1* και η σχέση του με την παθολογία του καρκίνου συνεχίζουν να μελετούνται και πρόσφατα ευρήματα δείχνουν ότι μέσω του C τελικού άκρου του σχηματίζει τρία ευδιάκριτα ξεχωριστά σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες Abraxas, BACH1 (BTB and CNC Homology 1) ή CtIP (C-terminal binding protein Interacting Protein). Επίσης φαίνεται ότι η πρωτεΐνη RAP80 (Receptor-Associated Protein, 80KDa) επιστρατεύει τα σύμπλοκα BRCA1-Abraxas και BRCA1- CtIP για να διορθώσει το DNA. Επιπλέον φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο MRN (που αποτελείται από MRE11, RAD50 και NBS1) να διευκολύνει την αποκοπή της διπλής έλικας κατά τον ομόλογο ανασυνδυασμό.

Ο ρόλος του *BRCA1* για την ακεραιότητα των χρωμοσωμάτων έχει επισημανθεί καθώς έχει βρεθεί ότι το ετεροδιμερές του BRCA1 με το BARD1 είναι απαραίτητα για την συσσώρευση του TPX2, ενός κρίσιμου παράγοντα στην σταθεροποίηση των

μικροσωληνίσκων καθώς και της μιτωτικής ατράκτου. Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι ο παράγων sumo1 (small Ubiquitin-like Modifier 1) διαμεσολαβεί στην καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων που ρυθμίζονται από BRCA1 αναδιατάσσοντας την χρωματίνη. Η έκφραση του BRCA1 ρυθμίζεται από πολλαπλούς E2F μεταγραφικούς παράγοντες και πρωτεΐνες.

**BRCA2:** Το *BRCA2* κλωνοποιήθηκε το 1995 και έχει σημαντικό ρόλο στον ομόλογο ανασυνδυασμό και στην μείωση και στην επιδιόρθωση των τμημάτων της διπλής έλικας που έχουν σπάσει (39, 46-50). Φαίνεται ότι ρυθμίζει τις πρωτεΐνες RAD1 και DCM1 για να γίνουν αυτές οι λειτουργίες. Όπως θα συζητηθεί παρακάτω αλληλεπιδρά και με το DSS1 και PALB2. Όταν και τα δύο αλληλία του *BRCA2* είναι απενεργοποιημένα εμφανίζεται ο φαινότυπος της αναιμίας Fanconi (FA). Δύο καινούρια ευρήματα δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις στο *BRCA2* μπορεί να είναι η αιτία για το σύνδρομο Li-Fraumeni-like καθώς και για τους όγκους στην παιδική ηλικία (38).

Για τις ωοθήκες αντίστοιχα στα δύο γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* οφείλεται το 85-90% του κληρονομούμενου καρκίνου των ωοθηκών (στο *BRCA1* η μεγάλη πλειοψηφία 75-90% των περιπτώσεων). Το υπόλοιπο 10-15% ανήκει στο σύνδρομο HNPCC (Hereditary non-polyposis colorectal cancer) (παλαιότερα ονομαζόταν Lych) όπου κυριαρχεί ο μη πολυποδιασικός καρκίνος του παχέος εντέρου και συνδυάζεται με καρκίνο των ωοθηκών και ενδομητρίου στις γυναίκες (το 95% των περιπτώσεων αυτών μοιράζονται εξίσου τα γονίδια *MSH2* και *MLH1* ενώ το 5% το γονίδιο *PMS2*). Μετά από αυτά τα στοιχεία γίνεται αντιληπτό ότι η ονομασία των δύο γονιδίων δεν αποδίδει σωστά τον κίνδυνο για τον καρκίνο των ωοθηκών και ότι πιο ακριβής θα ήταν OVBRCAs. Μάλιστα τα δύο ανωτέρω γονίδια ενοχοποιούνται και για τον σχετικά σπάνιο κληρονομούμενο καρκίνο των σαλπίγγων (fallopian tube Ca) (4). Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε κάποια στιγμή της ζωής τους, στους *BRCA* φορείς μεταλλάξεων, ανέρχεται στο 82%. Ενώ μελέτες έδειξαν ότι το 67% θα έχει νοσήσει μέχρι την ηλικία των 50 ετών. Το 54% των φορέων μεταλλάξεων στο γονίδιο *BRCA1* και το 24% των φορέων μεταλλάξεων στο γονίδιο *BRCA2* θα εμφανίσει καρκίνο των ωοθηκών (46). Σε μελέτη που έγινε στον Ελληνικό πληθυσμό σε 760 οικογένειες με καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών το 28% βρέθηκε θετικό σε *BRCA* μεταλλάξεις (85% *BRCA1* και 15% στο *BRCA2*). Βρέθηκαν 6

επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA1* στο 58,5% των μεταλλάξεών του (το 24% ήταν μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις) (51).

**TP53:** Το γονίδιο TP53 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53, είναι συχνά μεταλλαγμένο στο σύνδρομο Li-Fraumeni, που κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα και προσδίδει προδιάθεση για καρκίνο του μαστού, σαρκώματα των μαλακών μορίων, οστεοσαρκώματα, όγκους στον εγκέφαλο, όγκους του Wilms και πολλούς άλλους σπάνιους όγκους. Η πρωτεΐνη p53 είναι ένας από τους πιο καλά μελετημένα ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, αφού η συσχέτιση της με την ογκογένεση περιγράφηκε από το 1979. Μπορεί να επιφέρει και θάνατο μέσω απόπτωσης και διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν τους μηχανισμούς δράσης p53. Φαίνεται πως η πρόσδεση με τη πρωτεΐνη Hzf πρωτεΐνη (zinc finger) προωθεί την ενεργοποίηση γονιδίων που είναι σημαντικά για την διακοπή του κυτταρικού κύκλου παρά για την απόπτωση. Αν η ζημιά στο DNA είναι πιο σημαντική, τότε η πρωτεΐνη που σχετίζεται με την χρωματίνη (CAS/CSE1L) συνδέεται με την p53 προωθώντας την μεταγραφή των προαπτωτικών γονιδίων. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53 είναι βασικός στόχος για την θεραπεία του καρκίνου και υπάρχει η ελπίδα πως κάποιες από αυτές τις θεραπείες μπορεί να εφαρμοστεί στην κλινική πράξη στο κοντινό μέλλον, όπως το αντιελονοσιακό φάρμακο κινακρίνη που ξαναενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου TP53 απενεργοποιώντας τον NFκB, έναν αναστολέα του TP53 (52).

**PTEN:** Το γονίδιο *PTEN* (phosphatase tensin homolog on chromosome ten) έχει ταυτοποιηθεί ως ογκοκατασταλτικό. Είναι συχνά μεταλλαγμένο με απαιοφία (deletion) στο σύνδρομο Cowden, ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από μακροκεφαλία και προδιάθεση στο δυσπλαστικό γαγγλιοκύτωμα της παρεγκεφαλίδας καθώς επίσης και καρκίνο του μαστού και του θυρεοειδή. Μεταλλάξεις στο *PTEN* μπορούνε επίσης να προκαλέσουν σύνδρομο όπως το σύνδρομο Bannayan – Riley – Ruvalcaba που χαρακτηρίζεται από μακροκεφαλία, πολλαπλά λιπώματα.

Το γονίδιο *PTEN* δρα ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο και ρυθμιστής της ανάπτυξης, ρυθμίζοντας την μεταγωγή του σήματος της PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase). Η μεταγωγή του σήματος της PI3K ρυθμίζει την επιβίωση του κυττάρου, την κινητικότητα, την αγγειογένεση, την αναπτυξιακή και μεταβολική ροή που είναι σημαντικοί παράγοντες της ογκογένεσης. Απώλεια της έκφρασης του PTEN,

δευτερευούσης της απώλειας του TP53, μπορεί να εμπλέκεται στην ογκογένεση που σχετίζεται με το BRCA1. Πρόσφατα περιγράφηκε μια ακόμα λειτουργία του PTEN που περιλαμβάνει την διατήρηση της χρωμοσωμικής ακεραιότητας και της ρύθμισης της φωσφολιπάσης C και D. Επιπλέον ανακαλύφθηκε ότι η ρύθμιση της ενεργότητας του PTEN είτε μέσω της αποδόμησης του είτε με τον πυρηνικό εντοπισμό του είναι στενά ρυθμισμένα με τα επίπεδα της ουβικιτιλίωσης (38).

**STK11:** Ένα άλλο γονίδιο που σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού είναι το *STK11* που κωδικοποιεί την κινάση σερίνης/ θρεονίνης. Μετάλλαξη στο *STK11* κληρονομούμενη σύμφωνα με τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα εμφανίζεται στο σύνδρομο Peutz-Jeghers, που χαρακτηρίζεται από περιστοματική μελάχρωση και πολύποδες. Οι ασθενείς με το σύνδρομο Peutz-Jeghers έχουν περίπου 30 -50% κίνδυνο να εμφανίσουν καρκίνο του μαστού έως την ηλικία των 70 χρόνων. Όπως και άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια, το *STK11* ασκεί την επίδρασή του μερικώς μέσω της διαδρομής του mTOR. Όπως και στην περίπτωση του PTEN, η ραπαμυκίνη (αναστολέας mTOR) θα μπορούσε να αποτελέσει φάρμακο θεραπείας για τους ασθενείς με το σύνδρομο Peutz-Jeghers (38).

**CDH1:** Ένα άλλο αυτοσωμικό επικρατές σύνδρομο καρκίνου, ο οικογενής γαστρικός καρκίνος, προδιαθέτει και για λοβιακό καρκίνο του μαστού. Προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο *CDH1* που κωδικοποιεί την E-cadherin, που είναι σημαντική ως μόριο προσκόλλησης μεταξύ κυττάρων. Παρόλα αυτά σε άτομα με λοβιακό καρκίνο του μαστού και ιστορικό καρκίνου του μαστού αλλά όχι γαστρικό καρκίνο, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *CDH1* δεν είναι συχτές (38).

**ATM:** Αταξία- τηλαγγειεκτασία είναι μία αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή που προκαλεί παρεγκεφαλιδική αταξία, προοδευτική νευρολογική επιδείνωση, ευαισθησία στην ακτινοβολία και αυξημένο κίνδυνο καρκίνου. Προκαλείται από μεταλλάξεις και των δύο αλληλίων του γονιδίου *ATM*, το οποίο κωδικοποιεί μία κινάση του κυτταρικού σημείου ελέγχου η οποία φωσφορυλιώνει την p53 και την BRCA1. Οι γυναίκες ετεροζυγώτες σε μετάλλαξη στο *ATM* δεν έχουν το φαινότυπο της αταξία τηλαγγειεκτασίας, αλλά έχουν αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου του μαστού. Η ενεργοποίηση του *ATM* προτείνεται σαν μία νέα θεραπευτική οδός στην ογκολογία (38).

**CHEK2:** Το γονίδιο CHEK2 κωδικοποιεί μια κινάση σερίνης θρεονίνης, που εμπλέκεται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και στην επιδιόρθωση του DNA, που ενεργοποιείται από την ATM ως απάντηση στα σπασίματα της διπλής έλικας του DNA. Το CHEK2 φωσφορυλιώνει το BRCA1 και πιθανόν επηρεάζει τον ρόλο του στην επιδιόρθωση του DNA. Η μετάλλαξη 1100delC στο γονίδιο CHEK2 έχει συσχετιστεί με αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού στους Βορειοευρωπαϊκούς πληθυσμούς. (38, 53).

**NBS1 και RAD50:** Δεδομένα δείχνουν ότι το γονίδιο NBS1 που ενέχεται στο σύνδρομο Nijmegen breakage (NBS1), όπου υπάρχει ελάττωμα στην επιδιόρθωση του DNA και το γονίδιο RAD50, και πιο ειδικά η μετάλλαξη RAD50 687delT η οποία υπάρχει μόνο στον φιλανδικό πληθυσμό, μπορεί να επιφέρουν αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού. Το σύμπλεγμα MRN (MRE11, RAD50, NBS1) πριν μεσολαβήσει το ATM, εμπλέκεται στην αναγνώριση και επιδιόρθωση της διπλής έλικας του DNA. Η μετάλλαξη 657del5 του γονιδίου NBS1 έχει μελετηθεί σε πολλούς πληθυσμούς αλλά φαίνεται μόνο να σχετίζεται με τον καρκίνο του μαστού στους Πολωνούς και τους Λευκορώσους (38).

**RAD51C:** Η πρωτεΐνη RAD51C μετέχει και αυτή στην DNA επιδιόρθωση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού και είναι προϊόν ενός εκ των πέντε παράλογων γονιδίων του RAD51 (τα άλλα είναι -B, -D, XRCC-2,-3). Το γονίδιο εντοπίζεται στη 17q23 θέση και διαθέτει 9 εξόνια. Παθογενετικές μεταλλάξεις του ανευρέθησαν σε ποσοστό 1,3% Γερμανίδων γυναικών με κληρονομούμενο καρκίνο μαστού και ωοθηκών που είχαν εξετασθεί με γενετική ανάλυση των γονιδίων BRCA1/2 και είχαν βρεθεί αρνητικές (54). Οι μεταλλάξεις ήταν όλων των ειδών (κωδικονίου τερματισμού, αλλαγής πλασίου ανάγνωσης, παρανοηματικές, ματίσματος). Επίσης υπομορφική παρανοηματική μετάλλαξη (R258H) σε ομοζυγωτία ανευρέθηκε και σε μία οικογένεια με αιμομιξία όπου υπήρχαν περιστατικά με Fanconi-like αναιμία με κυρίως αναπτυξιακές συγγενείς ανωμαλίες. Ωστόσο, η προαναφερθείσα συχνότητα αμφισβητήθηκε σε άλλους πληθυσμούς (55, 56).

**RAD51D:** Η πρωτεΐνη RAD51D μετέχει και αυτή στην DNA επιδιόρθωση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού και είναι προϊόν ενός εκ των πέντε παράλογων γονιδίων του RAD51 (τα άλλα είναι -B, -C, XRCC-2,-3). Δημιουργεί ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο με την RAD51B, την RAD51C και την XRCC2 που προσδένεται στο

μονόκλωνο DNA (συμπεριλαμβανομένου των ssDNA κενών που δημιουργούνται στο dsDNA) και είναι απαραίτητο για την συσσώρευση του RAD51 ως απάντηση στην βλάβη του DNA (57-59). Σε πρόσφατη μελέτη ταυτοποιήθηκαν οκτώ μεταλλάξεις που οδηγούσαν σε συντμημένη πρωτεΐνη στο RAD51D. Αυτές φαίνεται να οδηγούν σε σημαντικά αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο των ωοθηκών αλλά όχι τόσο για τον καρκίνο του μαστού (60). Σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε μετάλλαξη αλλαγής ματίσματος (c576+1G) σε 2 από τους 2.105 ασθενείς με κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού και σε 5 από τους 707 ασθενείς με κληρονομούμενο καρκίνο των ωοθηκών (61).

**SLX4:** Το *SLX4* είναι άλλο ένα γονίδιο που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα μεταλλάξεις του που να σχετίζονται με την αναιμία Fanconi (ονομάζεται και *FANCP*) (62, 63). Παρ' όλα αυτά όταν εξετάστηκε πληθυσμός Γερμανών και Λευκορώσων με κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού βρέθηκαν μόνο κάποιες παρανοηματικές μεταλλάξεις και ανάμεσά τους μία μόνο επιβλαβής μετάλλαξη (G700R) (64).

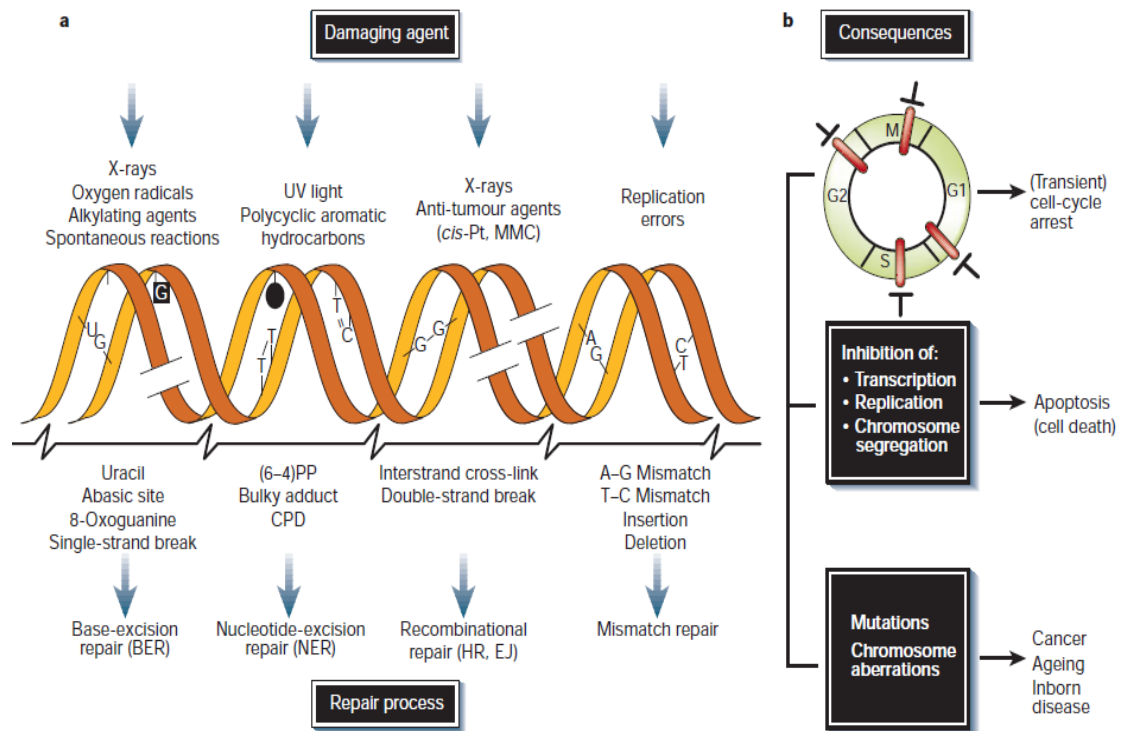
**BRIP1 ή BACH1:** Το γονίδιο αυτό εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 (17.22.2). Αποτελείται από 20 εξόνια και μεταγράφεται σε mRNA το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 130 KDa που περιέχει 1249 αμινοξέα. Το *BRIP1* κωδικοποιεί μία ελικάση που συμβάλει στην χρωμοσωμική σταθερότητα αλληλεπιδρώντας με το C-τελικό άκρο της BRCA1 (65). Μελέτες που έχουν γίνει μέχρι τώρα αναφέρουν ότι οι αλλαγές που επηρεάζουν την αλληλεπίδραση BRIP1-BRCA1 μπορεί να είναι υπεύθυνες για ένα πολύ μικρό ποσοστό του κληρονομούμενου καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών (66-70). Διαλληλικές μεταλλάξεις ταυτοποιήθηκαν σε οικογένειες με αναιμία Fanconi (αλλά όχι όγκων παιδικής ηλικίας) που κατηγοριοποιούνται στην ομάδα *FANCI* (71). Στον ανδρικό καρκίνο του μαστού δεν έχουν βρεθεί σημαντικά ευρήματα στο *BRIP1* γονίδιο (72). Παρ' όλα αυτά μία μετάλλαξη εισαγωγής κωδικονίου τερματισμού που ανιχνεύτηκε στο εξόνιο 17 (P798X) υπήρχε σε ποσοστό 0,3% του κληρονομούμενου καρκίνου του προστάτη (40, 73).



## 2.2 Το γονίδιο *PALB2*

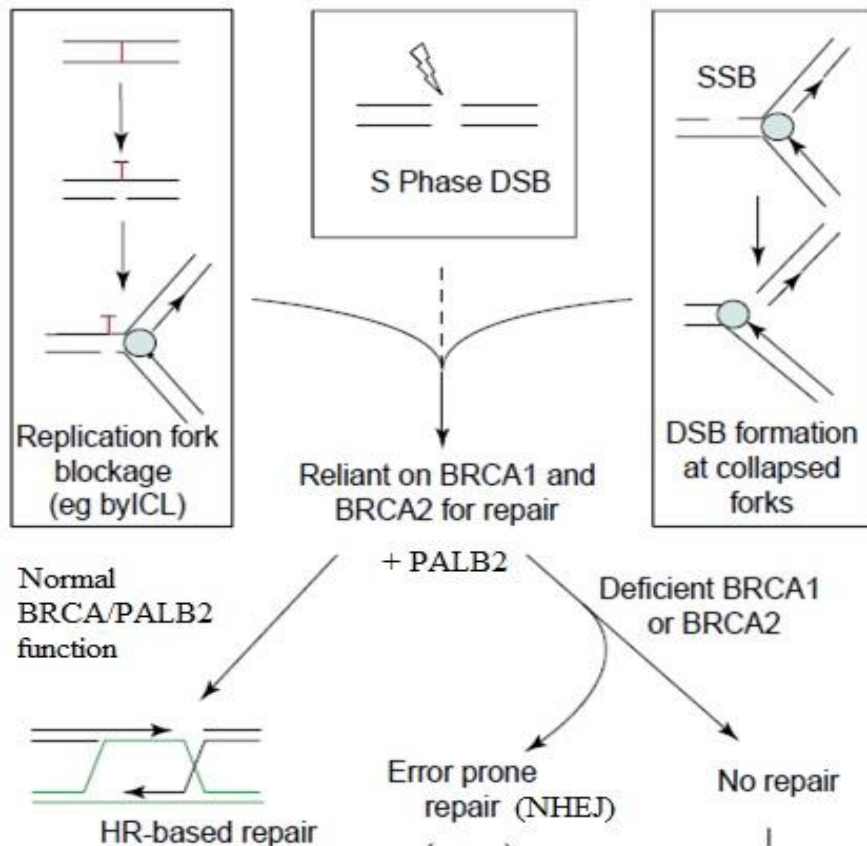
### 2.2.1 Ρόλος του *PALB2* στον κυτταρικό κύκλο

Καθημερινά συμβαίνουν δεκάδες βλάβες του DNA ανά κύτταρο. Τα σπασίματα διπλής έλικας (DSB, double stranded breaks) τα οποία προκύπτουν κάτω από την επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας είναι τα πιο τοξικά και πρέπει να διορθωθούν άμεσα και με αλάθητο τρόπο (Σχήμα 2.2).



Σχήμα 2.2: Βλάβες DNA και μηχανισμός επιδιόρθωσης

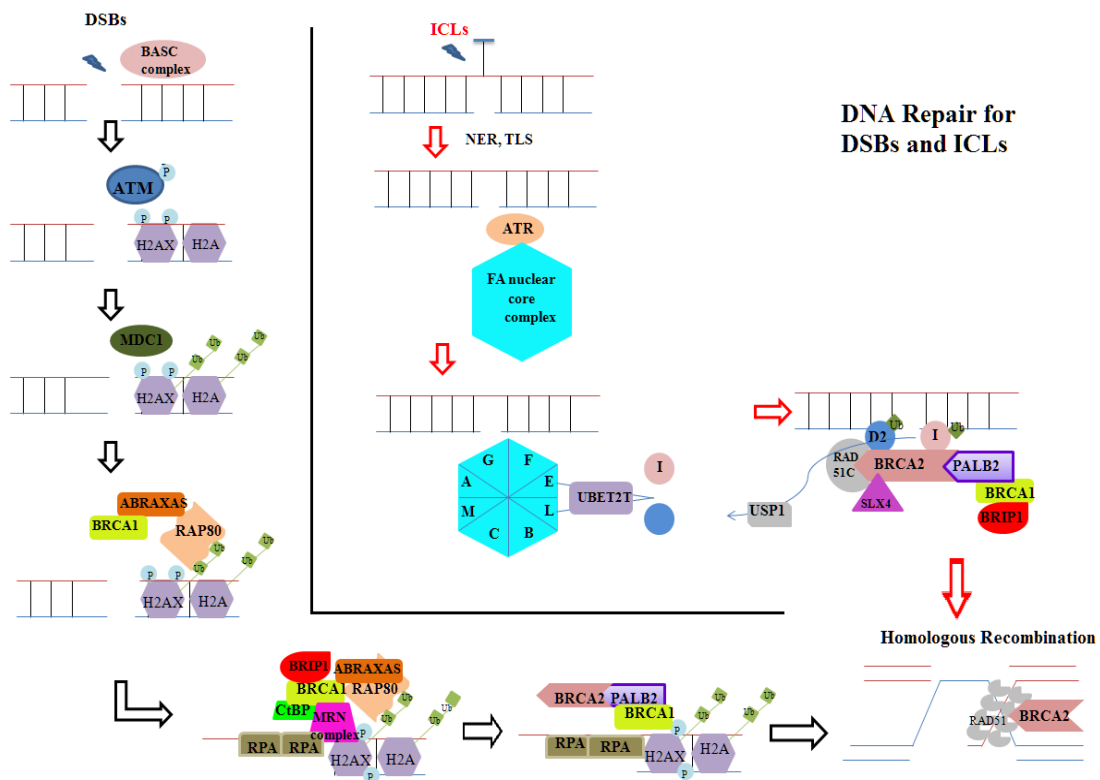
Σε σπάσιμο διπλής έλικας, οδηγεί, εκτός από την ακτινοβολία, και ο σχηματισμός διπλών δεσμών μεταξύ των δύο αλυσίδων (Interstrand cross Links) καθώς επίσης και το σπάσιμο μόνο της μίας αλυσίδας όταν αυτά συμβαίνουν κοντά σε δομές φουρκέτας κατά τον αναδιπλασιασμό. Η επιδιόρθωση αυτών των βλαβών στα φυσιολογικά κύτταρα γίνεται με τον ομόλογο ανασυνδυασμό (HR, Homologous Recombination) που είναι και ο ιδανικός για την σωστή επιδιόρθωση. Κύτταρα με έλλειμμα στον ομόλογο ανασυνδυασμό είτε οδηγούνται στην απόπτωση είτε σε καρκινογένεση λόγω της ένωσης σπασμένων χρωμοσωμάτων ή της συσσώρευσης μεταλλάξεων λόγω λαθών κατά την επιδιόρθωση με τον μη ομόλογο ανασυνδυασμό NHEJ (Non Homologous End Joining)(74) (Σχήμα 2.3).



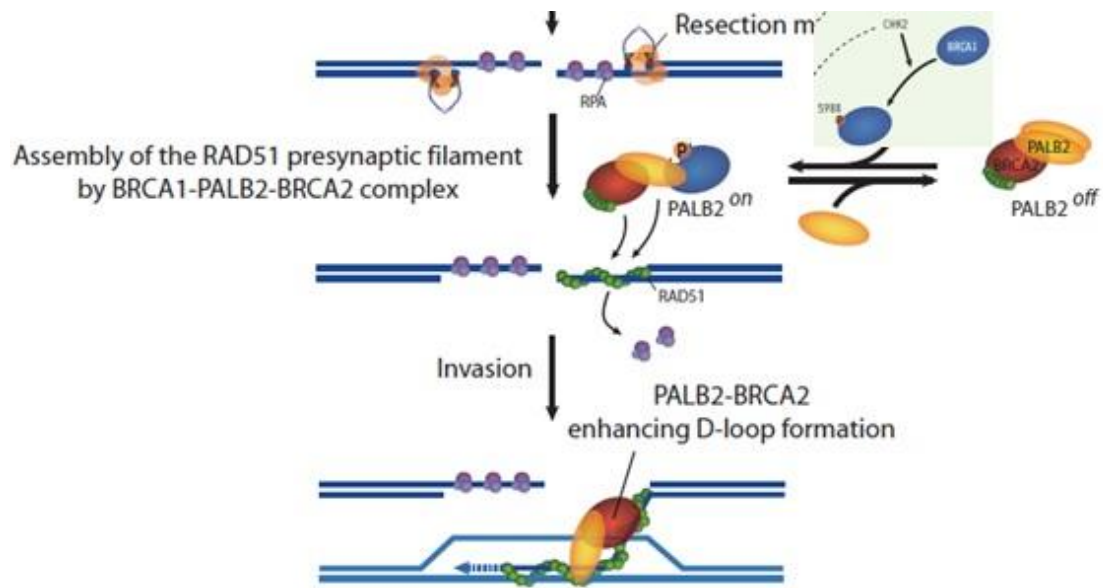
**Σχήμα 2.3:** Μηχανισμοί επιδιόρθωσης DNA βλαβών σε φυσιολογικά κύτταρα καθώς και σε κύτταρα με έλλειμα στον HR(74).

Τα σπασίματα της διπλής έλικας εντοπίζονται μέσω του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου BASC (BRCA1- associated surveillance complex) και η πληροφορία περνάει στην πρωτεΐνη – μετατροπέα ATM με φωσφορυλίωση. Στην συνέχεια η ATM πλησιάζει στην βλάβη και σηματοδοτεί την πρωτεΐνη H2AX φωσφορυλιώνοντάς τη σε δύο σημεία (Εικόνα 2.4, αριστερό μέρος). Αυτό αναγνωρίζεται από το MDC1 σύμπλοκο του οποίου και προσθέτει τα ανθεκτικότερα σημάδια της πολύ-ουβικιτυνιλίωσης στην Lys-63 της Ub (αυτά είναι σήματα εντοπισμού και όχι αποικοδόμησης όπως αυτά της Lys-48 όπου η πρωτεΐνη κατευθύνεται στο πρωτεάσωμα για πρωτεόλυση). Αυτά τα σημάδια προσελκύουν το σύμπλοκο RAP80-ABRAXAS-BRCA1 εξαιτίας των δύο περιοχών UIM (Ubiquitin interacting motif) που υπάρχουν στην RAP80 πρωτεΐνη. Ύστερα με την βοήθεια των δύο περιοχών BRCT της BRCA2 πρωτεΐνης, εμφανίζεται το σύμπλοκο MRN (MRE11-RAD50-NBS1), η πρωτεΐνη CtBP (C-terminal binding protein) και η BRIP1 που δρουν ως εξωνουκλεάσες και δημιουργούν μονόκλωνες προεκτάσεις οι οποίες αμέσως καλύπτονται και προστατεύονται από την RPA πρωτεΐνη (replication protein A). Εντωμεταξύ η BRCA1 ετεροδιμερίζεται μαζί με την

BARD1 (μέσω της περιοχής δακτυλίου) και ελέγχουν την G1/S φάση και άλλους ρυθμιστικούς παράγοντες. Τελικά, η πρόσδεση της φωσφολιωμένης BRCA1 (στη σερίνη 88 με την οποία ενεργοποιείται το PALB2 ως μονομερές, ενώ συνήθως βρίσκεται ως διμερές ανενεργό μόριο μαζί με την BRCA2 και την RAD51) με την PALB2 στρέφει την επιδιόρθωση οριστικά στον HR αλάθητο τρόπο (και όχι με NHEJ). Το σύμπλοκο αυτό τοποθετεί έτσι την BRCA2 στον πυρήνα και στον τόπο επιδιόρθωσης (repair foci). Στην συνέχεια οκτώ μόρια RAD51 προσδένονται στις οκτώ BRC επαναλαμβανόμενες περιοχές του BRCA2 και αντικαθιστούν την RPA από τις μονόκλωνες προεκτάσεις (74). Στη συνέχεια υποβοηθούμενα πιθανώς από την RAD51C επεκτείνουν την μονόκλωνη προέκταση διασταυρώνοντας τη (Holliday junction) με το ομόλογο χρωμόσωμα και λαμβάνει χώρα το τελικό στάδιο του ομόλογου ανασυνδυασμού (HR) μέσω D-loop (Σχήματα 2.4 και 2.5) (40, 75-77).



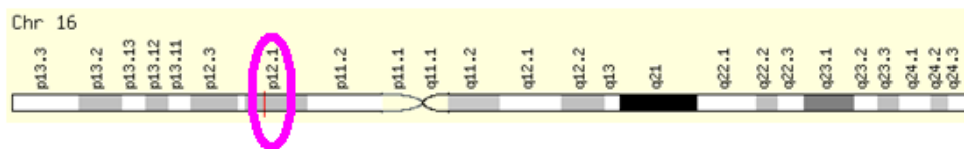
**Σχήμα 2.4:** Δίκτυο πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι του ομόλογου ανασυνδυασμού (40).



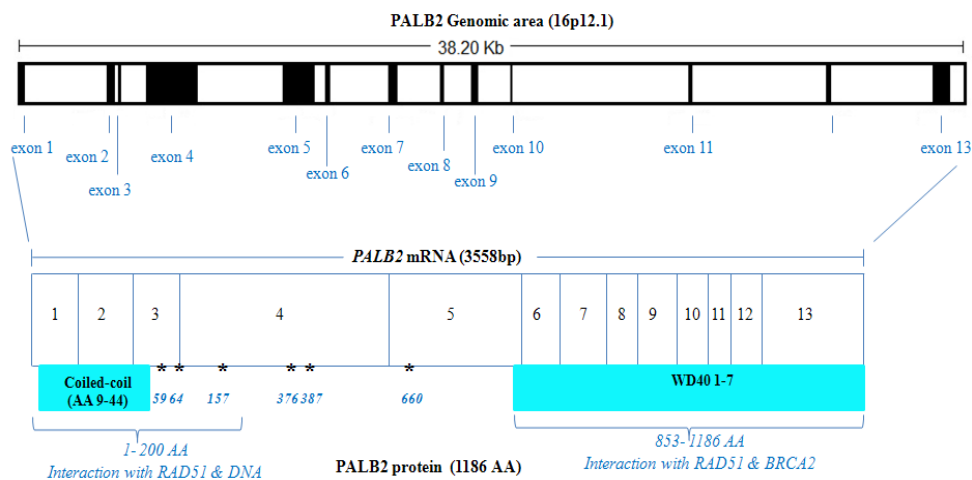
**Σχήμα 2.5:** Σχηματική αναπαράσταση της δράσης του PALB2 στο τελικό στάδιο του HR (78).

Το *PALB2* (Partner And Localizer of BRCA2) ή αλλιώς *FANCN* (Gene ID#79728, OMIM#610355) ταυτοποιήθηκε πρόσφατα ως γονίδιο που συσχετίζεται με την κακοήγη αναιμία Fanconi και τον καρκίνο του μαστού καθώς μεταλλάξεις του συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης των παραπάνω νοσημάτων. Το γονίδιο αυτό εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 16 (16p12.1) (Εικόνα 2.6) και απλώνεται σε περιοχή 38,20 Kb. Αποτελείται από 13 εξόνια που μεταγράφουν mRNA περίπου 3,5 Kb το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 1186 αμινοξέα (131 KDa) με pI 6,4 και φορτίο -2. Όπως φαίνεται στο σχήμα 2.7 τα εξόνια 4 και 5 είναι αισθητά μεγαλύτερα από τα υπόλοιπα (GenBank genomic sequence NG\_007406.1, mRNA sequence NM\_024675.3, χρωμόσωμα NC\_000016.8). Στο εξόνιο 4 μάλιστα έως τώρα έχουν βρεθεί οι περισσότερες μεταλλάξεις. Στο σχήμα 2.7 φαίνονται όλες οι λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης PALB2 (μια Coiled coil και τέσσερις WD40). Πλήρως ενημερωμένη βιβλιογραφικά για το PALB2 είναι και η τράπεζα πληροφοριών Protein DB με κωδικό Q86YC2 (NP\_078951.2). Το C τελικό άκρο της πρωτεΐνης PALB2 μέσω των WD40 (tryptophan-aspartic acid rich) περιοχών (AA 10-40) προσκολλάται στο N τελικό άκρο της πρωτεΐνης BRCA2 (όπου είναι και η περιοχή ενεργοποίησής του) συμβάλλοντας στον εντοπισμό του *BRCA2* σε πυρηνικές δομές χρωματίνης (εξ' ου και το όνομά του) και κατ' επέκταση στον ομόλογο ανασυνδυασμό (HR), και την επιδιόρθωση σπασίματος της διπλής αλυσίδας (DSBR) καθώς και στα σημεία ελέγχου της S φάσης του κυτταρικού κύκλου (79-81). Ο

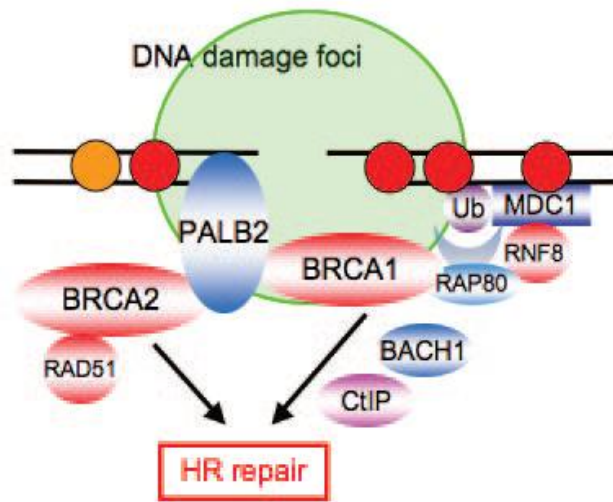
συνεντοπισμός των PALB2 και BRCA2 αποδείχθηκε με πειράματα ανοσοκαθίζησης και ανοσοφθορισμού μετά από πρόκληση DNA βλαβών με ιονίζουσα ακτινοβολία. Επίσης έλλειμμα στην DNA επιδιόρθωση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (HR) διαπιστώθηκε μετά από επιμόλυνση με siRNA έναντι του *PALB2*. Προσφάτως βρέθηκε επίσης ότι το N-τελικό άκρο του PALB2 αλληλεπιδρά και με τη πρωτεΐνη BRCA1 μέσω coiled coil περιοχών (PALB2 AA 9-44 με BRCA 1393-1424 λίγο πριν της δύο BRCT περιοχές) (82). Γίνεται πλέον φανερό ότι η DNA επιδιόρθωση με ομόλογο ανασυνδυασμό -στην οποία έχουν μεγάλο ρόλο και τα τρία προαναφερθέντα γονίδια- γίνεται μόνο μέσω υπερμεγεθών μοριακών συμπλεγμάτων (83). Έτσι η PALB2 αποτελεί τον συνδετικό κρίκο των πρωτεϊνών BRCA1 και BRCA2 όπως φαίνεται στα σχήματα 2.8 και 2.9. Το PALB2 αλληλεπιδρά επίσης και με το RAD51 (AA 1-200, 836-1186) και πιθανόν συνδέεται απευθείας με το DNA στην AA 1-200 (40, 67, 84, 85).



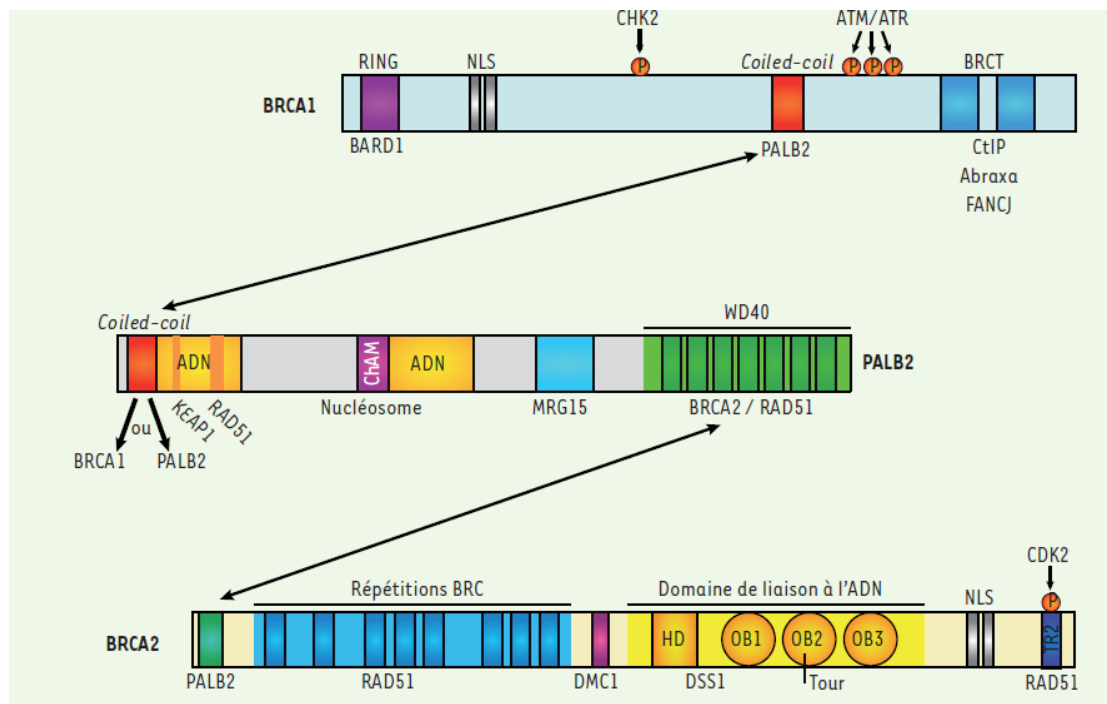
**Σχήμα 2.6:** Περιοχή του χρωμοσώματος 16 που εντοπίζεται το PALB2 (<http://genecards.ccbb.re.kr/cards/pics/loc/GC16M023522.PALB2.png>)



**Σχήμα 2.7:** Δομή γονιδίου PALB2 και δομικές περιοχές της πρωτεΐνης PALB2 (40) .



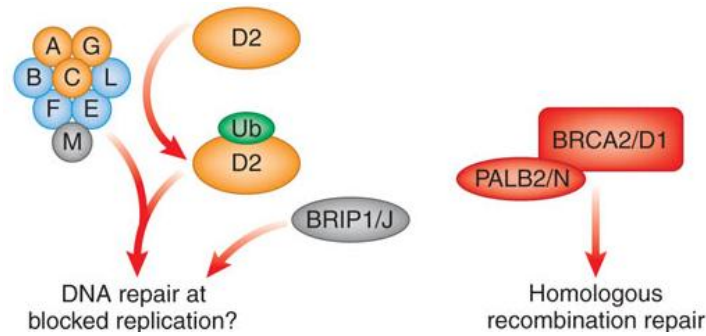
**Σχήμα 2.8:** PALB2 πρωτεΐνη συνδετικός κρίκος των BRCA1 και BRCA2 πρωτεϊνών κατά την επιδιόρθωση μέσω HR (82)



**Σχήμα 2.9:** Περιοχές αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών BRCA1-BRCA2- PALB2 (86).

### 2.2.2 Οι μεταλλάξεις που έχουν έως τώρα βρεθεί στο *PALB2*

Μεταλλάξεις στο DNA του γονιδίου *PALB2* σε ετεροζυγωτία ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά το 2007 σε οικογένειες με κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού αλλά και με παρουσία άλλων καρκινωμάτων (87). Έχουν ανευρεθεί επίσης σε καρκίνο μαστού στον άνδρα (88) και σε οικογενή καρκίνο παγκρέατος (89). Διαλληλικές μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν σε περιπτώσεις κακοήθους αναιμίας Fanconi της παιδικής ηλικίας καθώς και σε όγκους της παιδικής ηλικίας (90, 91). Η αναιμία Fanconi είναι μια σπάνια υπολειπόμενη διαταραχή που χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμική ευθραυστότητα, προοδευτική εξασθένιση του μυελού των οστών, συγγενείς ανωμαλίες και προδιάθεση στον καρκίνο συμπεριλαμβανομένων της λευχαιμίας και συμπαγών όγκων (μυελοβλάστωμα, όγκος Wilms). Έως τώρα έχει χωριστεί σε τουλάχιστον 13 κατηγορίες, τις επονομαζόμενες ομάδες συμπληρωματικότητας (FA complementation groups) οι οποίες έχουν αποδοθεί τελικά σε μεταλλάξεις σε 13 γονίδια: *FANCA-N* (το D έχει δύο: D1 και D2, παραλείφθηκαν H και K). Αντίστοιχα σε παλιότερες μελέτες, βρέθηκαν το γονίδιο *BRCA2* να αντιστοιχεί στο *FANCD1* και το γονίδιο *BRIP1* (παλαιότερα *BACH1*) στο *FANCI* (92). Σε προηγούμενες μελέτες παρατηρήθηκε ότι ένα μικρό ποσοστό των ατόμων που εμφάνιζαν τον φαινότυπο της αναιμίας Fanconi είχαν διαλληλικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA2* (93). Επόμενες μελέτες προσδιόρισαν ότι το *BRCA2* ήταν το γονίδιο κλειδί στην ρύθμιση του *RAD51*, ένα κομβικό ένζυμο που αρχίζει το στάδιο της επέκτασης της αλυσίδας στον ομόλογο ανασυνδυασμό (94). Το *PALB2*, το μέλος του συμπλόκου *BRCA2/RAD51* που ανακαλύφθηκε πρόσφατα, προσδέεται στα N τελικό άκρο της πρωτεΐνης *BRCA2* όπως έχει προαναφερθεί και διευκολύνει την συσσώρευσή του στην χρωματίνη. Η συμμετοχή του σε αυτό το σύμπλοκο, κατέστησε το γονίδιο *PALB2* υποψήφιο γονίδιο για την αναιμία Fanconi. Έτσι βρέθηκε ότι σε κύτταρα από ασθενείς που έπασχαν από αυτή την κακοήθη νόσο ήταν φορείς διαλληλικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *PALB2* και δεν ανιχνευόταν καθόλου η πρωτεΐνη *PALB2*. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι αποκατάσταση της έκφρασης του γονιδίου *PALB2* αποκαθιστούσε και το κυτταρικό ελάττωμα της αναιμίας Fanconi (90). Επίσης έχει βρεθεί ότι διαλληλικές μεταλλάξεις στο *PALB2* σχετίζονται με τον κληρονομούμενο καρκίνο της παιδικής ηλικίας (91). Στο σχήμα 2.10 παρουσιάζονται προϊόντα γονιδίων που σχετίζονται με την αναιμία Fanconi.



**Σχήμα 2.10:** Προϊόντα γονιδίων που σχετίζονται με την αναιμία Fanconi, οι αλληλεπιδράσεις τους και ο θεωρούμενος ρόλος τους στην επιδιόρθωση του DNA. Με κόκκινο χρώμα είναι οι πρωτεΐνες που είναι ο ρόλος τους είναι κρίσιμος για τον ομόλογο ανασυνδυασμό, με πορτοκαλί οι πρωτεΐνες που ο ρόλος τους ως ρυθμιστές του ομόλογου ανασυνδυασμού δεν είναι ξεκάθαρος, με γκρι είναι οι πρωτεΐνες που δεν επηρεάζουν τον ομόλογο ανασυνδυασμό και με μπλε οι πρωτεΐνες που ο ρόλος τους στον ομόλογο ανασυνδυασμό δεν έχει μελετηθεί ακόμα (92).

Σε ασθενείς φέροντες *PALB2* μεταλλάξεις, η ηλικία έναρξης του καρκίνου μαστού καθώς και τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά (ιστολογικός τύπος, ανοσοϊστοχημική IHC μελέτη ορμονικών υποδοχέων ER/PgR, p53, Ki-67 και ογκογονιδίου HER2) μοιάζουν με καρκίνους προερχόμενους από μεταλλάξεις είτε του *BRCA1* είτε του *BRCA2* (67, 95-99). Παρ όλα αυτά κάποιοι *PALB2* όγκοι είναι TNBC (triple negative breast cancer). Καθώς υπάρχει περιορισμένος αριθμός *PALB2* χαρακτηριστικών όγκων όπως ανευπλοειδία, παρουσία μυελοειδή τύπου, μεγάλων κυττάρων ένα μοντέλο έκφρασης του γονιδίου δεν είναι διαθέσιμο μέχρι τώρα. Έως τώρα δεν μπορούν να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με το αν η παθολογία επηρεάζεται από με τη θέση της μετάλλαξης του *PALB2* και/ή σε συνδυασμό με LOH και πολυμορφισμούς σ' άλλα γονίδια (40).

Οι παθογενετικές μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί μέχρι τώρα είναι είτε μη νοηματικές (non sense) είτε αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης frameshift (98) και απλώνονται σε όλη την έκταση του γονιδίου (ακόμη και στο τελευταίο 13<sup>ο</sup> εξόνιο, 3 αμινοξέα πριν το τέλος, Y1183X). Με μεθοδολογία MLPA, έχουν ανιχνευθεί και μεταλλάξεις με μεγάλους γενωμικούς ανασυνδυασμούς (90, 96, 100) όπως διαγραφές των εξονίων 1-10, 7-11, 7-8, 9-10 και διπλασιασμός 9-11 (90, 101, 102) ωστόσο εν γένει θεωρούνται σπανιότητες.



Επίσης έχουν βρεθεί και πολυμορφισμοί στα ιντρόνια του *PALB2* (95, 103). Θεωρείται ότι λίγες παρανοηματικές (missense) μεταλλάξεις είναι παθογνωμικές (98). Έως τώρα, παθογνωμικές *PALB2* μεταλλάξεις ανευρίσκονται σε διάφορους πληθυσμούς σε ποσοστό περίπου από 1-2% έως 3-4% των γυναικών με κληρονομούμενο καρκίνο μαστού και ωοθηκών που έχουν εξετασθεί με γενετική ανάλυση των γονιδίων *BRCAl/2* και έχουν βρεθεί αρνητικές (80, 87, 95, 98, 102-105), στο 1% του ανδρικού καρκίνου του μαστού και στο 3-4% του παγκρεατικού καρκίνου (89). Σε τέσσερις πληθυσμούς όπως σε αυτόν των Φιλανδών, των Γάλλων του Καναδά, των Πολωνών/Ρώσων και των Αυστραλών βρέθηκαν επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις ή ιδρυτικές μεταλλάξεις (95, 96, 106, 107). Στον πίνακα 2.1 φαίνονται οι πιο συχνές μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί μέχρι τώρα στο *PALB2* καθώς και η αλλαγή που επιφέρουν σε επίπεδο πρωτεϊνών. Οι μεταλλάξεις απλώνονται σε όλη την έκταση του γονιδίου. Στον πίνακα 2.2 φαίνονται ορισμένοι παρανοηματικοί πολυμορφισμοί που έχουν βρεθεί μέχρι τώρα στο γονίδιο *PALB2* και οι οποίοι ελέγχονται ως προς την παθογνωμικότητά τους.

Πίνακας 2.1 Μεταλλάξεις των εξονίων του γονιδίου *PALB2*(108).

<b>α/α</b>	<b>Εξόνιο</b>	<b>Αλλαγή νουκλεοτιδίου</b>	<b>Επίδραση στην πρωτεΐνη</b>	<b>Αναφορές</b>
1	4	229delT	C77fs	(98)
2	4	751 C→T	Q251X	(80)
3	4	1056_1057delGA	K353fsX7	(103)
4	4	1592 delT	L531→Fs→stop	(95)
5	4	c.2323C→T	Q775X	(96)
6	4	1050_1051delAAinsTCT	Q350fs	(80)
7	5	2521delA	T841fs	(98)
8	13	3433G→C	G1145R	(95)

9	13	3549 C→G	Y1183X	(87)
10	13	3549 C→A	Y1183X	(91)
11	4	c.509_510delGA	R170fs	(106)
12	10	c.3113G→A	W1038X	(107)

Πίνακας 2.2. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο PALB2

α/α	Εξόνιο	Αλλαγή νουκλεοτιδίου	Επίδραση στην πρωτεΐνη	Αναφορές
1	4	1010T→C	L337S	(95, 103)
2	4	1676A→G	Q559R	(80, 98, 103)
3	4	c.5038 ATA→GTA	I76V	(96)
4	4	c.5156 GGA→GTA	G115V	(96)
5	5	2014G→C	E672Q	(96, 103)
6	8	2794G→A	V932M	{Garcia, 2008; Erkko, 2008}
7	9	2993G→A	G998E	(80, 98, 103)
8	12	3300T→G	T1100T	(95, 98, 103)

Με DHPLC η μετάλλαξη 1056\_1057delGA (K353fsX7) βρέθηκε στον Ισπανικό πληθυσμό BRCA(-) με κληρονομούμενο καρκίνου του μαστού (1/95). Η μετάλλαξη αυτή προκαλεί διακοπή της μετάφρασης επτά κωδικόνια μετά το αμινοξύ που έχει

αλλάξει. Αυτή η μετάλλαξη εντοπίστηκε σε οικογένεια που εμφανίστηκε καρκίνος του μαστού και σε άντρα. Μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί σε άλλον πληθυσμό και στην Ισπανία βρέθηκε μόνο σε ένα δείγμα από τα 797 που αναλύθηκαν (103).

Η μετάλλαξη c.2323C→T (Q775X) είναι μια ιδρυτική μετάλλαξη που βρέθηκε στον πληθυσμό των Γάλλων του Καναδά και οι ασθενείς που έφεραν αυτή την μετάλλαξη είχαν διαγνωσθεί με διηθητικό πορογενές καρκίνο του μαστού σε ηλικία κάτω των 50 ετών. Αυτή η μετάλλαξη είναι καθαρά παθολογική αφού σταματάει την πρωτεϊνοσύνθεση και άλλες μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί και πριν και μετά από αυτό το αμινοξύ είναι γνωστό ότι είναι ικανές να προκαλέσουν καρκίνο του μαστού. Φαίνεται ότι υπάρχει στο 0.5% των ασθενών που διαγνώστηκαν με καρκίνο του μαστού κάτω από την ηλικία των 50 σε αυτόν τον πληθυσμό (96).

Η μετάλλαξη c.1592delT καταλήγει σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης της πρωτεΐνης στο αμινοξύ Leu531 με ένα νέο πλαίσιο ανάγνωσης. Ο Erkko και οι συνεργάτες του, εισήγαγαν την μετάλλαξη αυτή καθώς και την 3433G→C (G1145R) σε πειραματικά μοντέλα για να ελέγξουν την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι μειώνεται αισθητά η πρόσδεση της πρωτεΐνης με την *BRCA2*. Συνυπολογίζοντας σε αυτή την παρατήρηση την λειτουργική σημασία της δημιουργίας του συμπλόκου *BRCA2-PALB2* η πρωτεΐνη PALB2 αποτυγχάνει να υποστηρίξει τον ομόλογο ανασυνδυασμό στα κύτταρα με που περιείχαν την μετάλλαξη. Έτσι η μετάλλαξη αυτή έχει ως αποτέλεσμα απώλεια της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης σε αντίθεση με την μετάλλαξη 3433G→C που φαίνεται να μην έχει απώλεια της συνδετικής ικανότητας με την *BRCA2* και είναι λειτουργική. Η μετάλλαξη αυτή βρέθηκε και σε πληθυσμό καρκίνου του μαστού μη επιλεγμένο ως προς το οικογενειακό ιστορικό (95). Δεν βρέθηκε όμως στον συγγενή Ισλανδικό πληθυσμό (109).

Οι μεταλλάξεις 3549 C→G και 3549 C→A που καταλήγουν και οι δύο στην ίδια αλλαγή αμινοξέος (Y1183X) βρίσκονται στο τελευταίο εξόνιο (εξόνιο 13) του γονιδίου και απομένουν μόνο τρία αμινοξέα μέχρι το τέλος της πρωτεΐνης. Συνήθως οι μεταλλάξεις που βρίσκονται πολύ κοντά στο τέλος της πρωτεΐνης δεν δημιουργούν μεγάλο πρόβλημα στην λειτουργία της πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά η πρωτεΐνη PALB2 δεν ανιχνεύτηκε στα κύτταρα των ασθενών που έφεραν τη μετάλλαξη καταλήγοντας

στο συμπέρασμα ότι δημιουργείται ένα ανενεργό αλληλίο και επιβεβαιώνει την παθογνωμικότητα της μετάλλαξης (91).

Σύμφωνα με τα παραπάνω ευρήματα φαίνεται ότι ο μηχανισμός ογκογένεσης που προκαλείται από το γονίδιο *PALB2* δεν είναι ο ίδιος με αυτούς των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2*. Δεν γίνεται μέσω LOH (Loss Of Heterozygosity) καθώς έχει βρεθεί μόνο σε μια μελέτη στον Ισπανικό πληθυσμό (103) αλλά μέσω απλοανεπάρκειας (haploinsufficiency) (98) ή μέσω dominant negative effect, δηλαδή η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη που παράγεται από το ένα αλληλίο να επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την λειτουργία της φυσιολογικής που παράγεται από το άλλο με αποτέλεσμα ο φορέας της μονοαλληλικής μετάλλαξης να νοσεί.

### 2.2.3 Επιγενετικές τροποποιήσεις στο *PALB2* γονίδιο

Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *PALB2* θα μπορούσε να είναι ένας παράγοντας στον οποίο μπορεί να οφείλεται ο καρκίνος του μαστού. Έχει βρεθεί ότι η σίγαση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων που σχετίζεται με την υπερμεθυλίωση της CpG νησίδας του υποκινητή τους είναι κοινό χαρακτηριστικό του ανθρώπινου καρκίνου και αποτελεί εναλλακτικό μηχανισμό για την απώλεια της λειτουργικότητας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *PALB2* (περιοχή -180 έως -40 του γονιδίου) βρέθηκε με μεθοδολογίες real-time MSP και bisulfite Sequencing σε ποσοστό 25% των δειγμάτων κληρονομούμενου καρκίνου του μαστού (2/8), 66% σποραδικού καρκίνου του μαστού(4/6) και 7,5% σε σποραδικό καρκίνο των ωοθηκών (4/53), ποσοστά μεγαλύτερα αυτού των μεταλλάξεων που έχουν βρεθεί σε αυτό το γονίδιο. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ποσοστό αυτό είναι ίδιο με αυτό της εμφάνισης της υπερμεθυλίωσης του *BRCA1* στον κληρονομούμενο και στον σποραδικό καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών. Είναι επίσης πιθανό ότι η μεθυλίωση του *PALB2* είναι ένα γεγονός που εμφανίζεται αργά χρονικά στον σποραδικό καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών (110). Ωστόσο, σε νεότερη μελέτη που έγινε σε 92 δείγματα καρκίνου των ωοθηκών, με την μεθοδολογία MS HRM PCR στον υποκινητή του γονιδίου *PALB2* (περιοχή +51 έως -84) δεν ανιχνεύτηκε μεθυλίωση του υποκινητή (111).

#### 2.2.4 Μελλοντικές κατευθύνσεις

Με τις μεθόδους Next Generation Sequencing, που παρέχουν απλότητα και αυτοματοποίηση, είναι πιθανόν και στο 100% των οικογενειών με κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών να ταυτοποιηθούν μεταλλάξεις σε όλο το φάσμα των γονιδίων που εμπλέκονται στον ομόλογο ανασυνδυασμό, ακόμα και σ' εκείνες τις περιοχές που πολύ σπάνια ανιχνεύονται μεταλλάξεις μέχρι τώρα. Μια ομάδα στην Αμερική έχει επεκτείνει τις γενετικές αναλύσεις της πλέον σε 21 καρκινικά γονίδια στο Illumina GA IIx (112).

Το καινούριο panel 25 γονιδίων Myriad My Risk (Myriad, ΗΠΑ) είναι μια νέα μέθοδος σάρωσης πολλών γονιδίων ταυτόχρονα για ανίχνευση κλινικά σημαντικών μεταλλάξεων υπολογίζοντας έτσι τον κληρονομούμενο κίνδυνο για 8 είδη καρκίνου (μαστού, ωοθηκών, παχέος εντέρου, στομάχου, ενδομητρίου, παγκρέατος, προστάτη και μελάνωμα). Σε μελέτες που έγιναν βρέθηκε ότι το πάνελ γονιδίων της Myriad κατάφερε να ανιχνεύσει περίπου 48% περισσότερες μεταλλάξεις σε ασθενείς με κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών. Είναι πολύ σημαντικό ότι έχει πολύ υψηλή ευαισθησία (99,92%) και ακρίβεια (99%). Τα γονίδια που συμπεριλαμβάνονται στην ανάλυση για τον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών είναι: *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1*, *PALB2*, *CHEK2*, *ATM*, *NBN*, *BARD1*, *RAD51C*, *MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, *EPCAM*, *RAD51D*. Προβλήματα που μπορούν να προκύψουν από την σάρωση σε μεγάλο αριθμό καρκινικών γονιδίων είναι η εύρεση πολλών unclassified variants αλλά και unexpected findings σε γονίδια που δεν σχετίζονται με το οικογενειακό ιστορικό (πχ. στο *CDH1* που ενοχοποιείται για τον καρκίνο του στομάχου σε ασθενή με ιστορικό καρκίνου μαστού) και η κλινική τους αντιμετώπιση. Ασφαλώς μεγαλύτερα προβλήματα θα προκύψουν από ευρεία εφαρμογή whole genome (ή exome) sequencing.

Γενικά μ αυτές τις προσεγγίσεις οι περισσότεροι φορείς που φαινομενικά έχουν σποραδικό καρκίνο θα ανιχνευθούν και θα επωφεληθούν από τις νέες θεραπευτικές επιλογές κάνοντας έτσι την όλη διαγνωστική προσέγγιση πιο οικονομική για τα συστήματα υγείας. Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύονται μπορεί να είναι παθογνωμικές αλλά θα υπάρχουν και περιπτώσεις μεταλλάξεων που δεν είναι εμφανώς επιβλαβής

όπως και πολυμορφισμών σε πληθώρα γονιδίων, με το τελικό αποτέλεσμα να είναι πάντα το ίδιο: έλλειμμα στον ομόλογο ανασυνδυασμό (40).

## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup> - Αρχές μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν

### 3.1 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ *PALB2* ΓΟΝΙΔΙΟΥ

#### 3.1.1 Δοκιμασία πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνσύνθεσης (Protein

##### Truncation Test, PTT)

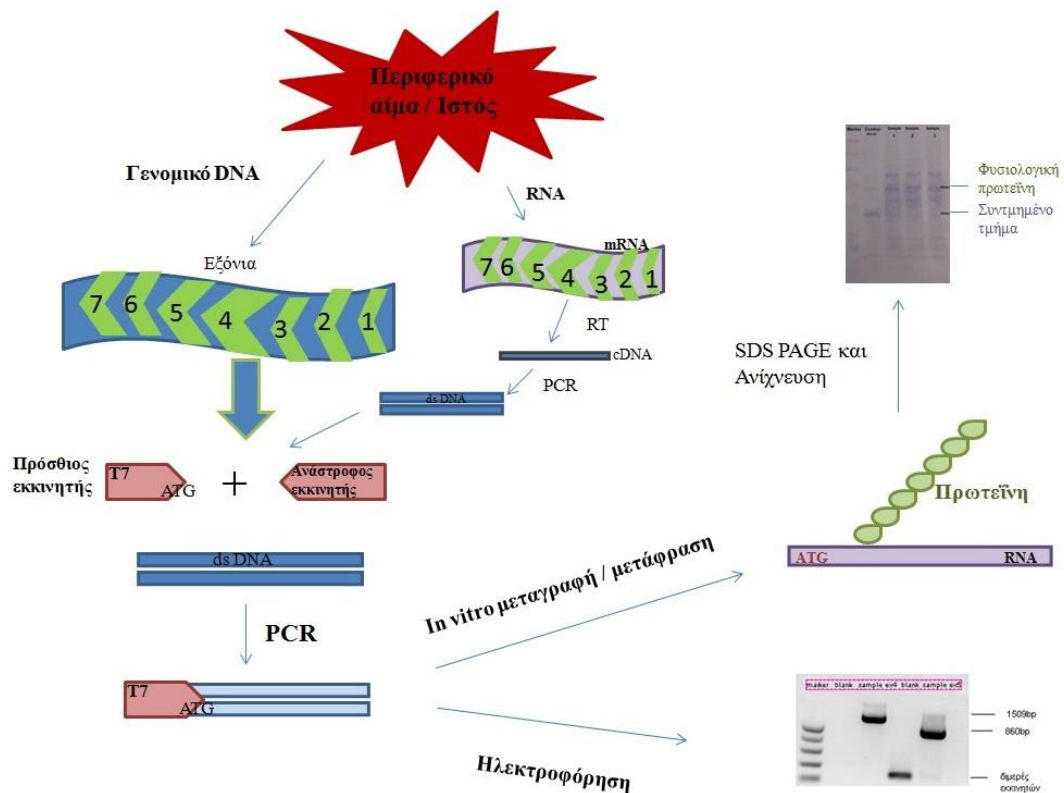
Η μεθοδολογία αυτή πρωτοεμφανίστηκε στη βιβλιογραφία το 1993 κυρίως για ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο της δυστροφίνης (113). Η μέθοδος PTT ανιχνεύει γρήγορα και με αξιοπιστία μη νοηματικές μεταλλάξεις καθώς και μεταλλάξεις που αλλάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης, διαταράσσουν την συνέχεια της μετάφρασης και κατά συνέπεια καταλήγουν σε κωδικόνιο τερματισμού με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή συντμημένης (truncated) πρωτεΐνης. Αυτές οι μεταλλάξεις είναι κλινικά σημαντικές καθώς παράγεται μη λειτουργική πρωτεΐνη.

##### 3.1.1.1 Αρχή μεθόδου PTT

Η μέθοδος PTT αποτελεί μια *in vitro, de novo* πρωτεϊνική σύνθεση από ένα ενισχυμένο τμήμα του υπό ανάλυση γονιδίου. Αποτελείται από τα κάτωθι τέσσερα κύρια στάδια: α) απομόνωση DNA ή RNA β) PCR ή RT-PCR και ηλεκτροφόρηση DNA σε αгарόζη γ) *in vitro* μεταγραφή και μετάφραση και δ) ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανίχνευση σήματος (Σχήμα 3.1).

##### α) Απομόνωση DNA ή RNA

Η μέθοδος PTT μπορεί να εφαρμοσθεί σε σχετικά μεγάλο τμήμα γενετικού υλικού (μέχρι 2kb) εν αντιθέσει με τις πιο κλασσικές μεθόδους που εφαρμόζονται σε μικρότερα τμήματα DNA όπως το SSCP που ιδανικά χρησιμοποιεί τμήματα 200-300 βάσεων και το DGGE που ιδανικά χρησιμοποιεί τμήματα 400-500 βάσεων. Εάν το προς εξέταση γονίδιο περιέχει μεγάλα εξόνια (π.χ. γονίδια *BRCA1/2*, *PALB2* κλπ) τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί γενωμικό DNA και η μέθοδος PTT εφαρμόζεται σε αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα αυτών των εξονίων διαφορετικά εάν το προς εξέταση γονίδιο έχει πολλά μικρά εξόνια (π.χ. γονίδια *DMD*, *ATM*, *hMSH2* κλπ) τότε απομονώνεται ολικό RNA ή mRNA και χρησιμοποιείται η αντίστροφη μεταγραφή (RT) για να παραχθεί cDNA αντίγραφο.



Σχήμα 3.1: Διαγραμματική αναπαράσταση των σταδίων της μεθόδου PTT

### β) PCR (ή RT-PCR) και ηλεκτροφόρηση DNA σε αгарόζη

Ανάλογα εάν απομονώθηκε DNA ή RNA, ακολουθεί PCR ή RT-PCR. Στη δεύτερη περίπτωση μπορεί να χρειασθεί διπλή (nested) PCR στο cDNA καθώς η έκφραση του προς εξέταση γονιδίου μπορεί να είναι χαμηλή στα λεμφοκύτταρα.

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στη σχεδίαση των εκκινητών του τελικού ενισχυμένου προϊόντος. Ειδικά ο 5'-εκκινητής οφείλει να περιέχει τις ακόλουθες πέντε ειδικές περιοχές:

- i) στο 5'-άκρο υποκινητή για T7 (ή SP6 ή T3) RNA πολυμεράση για το ξεκίνημα μεταγραφής (18 βάσεις),
- ii) 5-7 τυχαίες βάσεις (spacer),
- iii) αλληλουχία Kozak που διευκολύνει το ξεκίνημα της μετάφρασης σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς ,
- iv) κωδικόνιο έναρξης ATG
- v) και στο 3' άκρο-προσέχοντας να είναι ίδιο το πλαίσιο ανάγνωσης- ειδική ακολουθία 17-20 βάσεων για το γονίδιο προς εξέταση (Σχήμα 3.2).



**5'- tectaatacgaactactatagg acaga ccaccATG - (γονίδιο) - 3'**

T7 υποκινητής

τυχαίες Kozak  
βάσεις αλληλουχία  
(spacer)

**Σχήμα 3.2:** Αλληλουχία 5'-εκκινήτου ειδικού για PTT σε συνδυασμό με T7 πολυμεράση.

Προαιρετικά μπορεί να τοποθετηθεί και ακολουθία περιοριστικής ενδονουκλεάσης πριν τον υποκινητή του φάγου σε περίπτωση που το ενισχυμένο προϊόν χρειάζεται να κλωνοποιηθεί. Τελευταία επίσης χρησιμοποιείται μεταξύ των περιοχών iv) και v) του πρόσθιου εκκινήτου αλληλουχία που μεταφράζεται σε επίτοπο π.χ. του myc ή της αιμαγλουτινίνης (HA) διευκολύνοντας έτσι την μη ραδιενεργή ανίχνευση του τελικού προϊόντος με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι των πρωτεϊνών αυτών (Σχήμα 3.3) (114). Επίσης η ειδικότητα του προϊόντος αυξάνεται με την προσθήκη και στον 3' εκκινήτου αντίστοιχων επιτόπων όπως π.χ. του C5 ή του V5 (115) .



**Σχήμα 3.3:** Αλληλουχία 5'-εκκινήτου ειδικού για PTT σε συνδυασμό με επίτοπο από την myc πρωτεΐνη.

Εάν η περιοχή που εξετάζεται είναι πολύ μεγάλη για να επιτευχθούν καλύτερα αποτελέσματα, χωρίζεται σε τμήματα μεγέθους το πολύ μέχρι 2 kb με αλληλοεπικάλυση 200-300 βάσεων μεταξύ τους.

Μετά την ενίσχυση με PCR ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη και έλεγχος των προϊόντων ως προς την καθαρότητα και το σωστό μέγεθος. Ύπαρξη και άλλου κυρίου προϊόντος καταδεικνύει γενετικό ανασυνδυασμό (deletions, duplications) στο ένα από τα δύο αλλήλια και εάν το αρχικό υλικό ήταν το RNA τότε υπάρχει και η περίπτωση της παράλειψης ενός εξονίου λόγω προβλήματος στο μάτισμα του RNA (RNA

splicing). Γι' αυτό είναι προτιμότερο οι εκκινητές πέραν του να τοποθετούνται σε διαφορετικά εξόνια, να μην ευρίσκονται επίσης στο τέλος του ενός και την αρχή του επομένου εξονίου (exon junction).

### **γ) In vitro μεταγραφή και μετάφραση**

Για το επόμενο στάδιο της μεθόδου PTT απαιτούνται 50-500 ng προϊόντος PCR, για το οποίο συνήθως δεν απαιτείται καθαρισμός. Η μεταγραφή σε RNA πραγματοποιείται με τη χρήση της RNA πολυμεράσης -αντίστοιχης του υποκινητή που χρησιμοποιήθηκε στον 5' εκκινητή- (προαιρετικά σε αυτό το σημείο μπορεί να ελεγχθεί το παραγόμενο RNA σε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης). Στην συνέχεια ακολουθεί *in vitro* μετάφραση σε πρωτεΐνη με τη χρήση συστήματος δικτυοκυττάρου κονίκλου (rabbit reticulocyte) ή εκχυλίσματος φύτρου του σίτου (wheat germ lysate). Υπάρχουν πλέον εμπορικώς διαθέσιμα συστήματα που συνδυάζουν στο ίδιο σωληνάριο τις δύο αντιδράσεις και το μόνο που απαιτούν είναι την προσθήκη του προϊόντος PCR και ενός επισημασμένου αμινοξέος (ανάλογα με το είδος της ανίχνευσης που ακολουθεί). Η αντίδραση είναι πολύ σύντομη: 1-1,5 ώρα στους 30-37 °C. Τα συστήματα αυτά περιέχουν μίγματα με όλα τα απαραίτητα νουκλεοτίδια, αμινοξέα, ένζυμα, ριβοσώματα και ρυθμιστικά διαλύματα για τις αντιδράσεις της μεταγραφής και μετάφρασης και φυλάσσονται αυστηρά στους -70 °C.

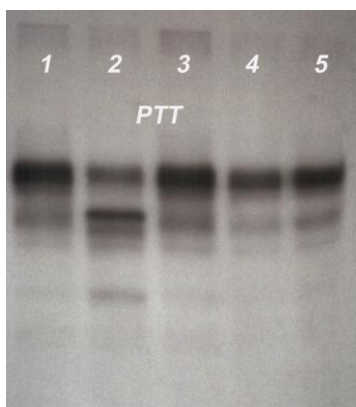
### **δ) Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανίχνευση πρωτεϊνών**

Για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνικών προϊόντων της μετάφρασης πρέπει να υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου ώστε να ανιχνεύονται ταυτόχρονα και το πλήρες μεγάλο μέγεθος του κανονικού αλληλίου αλλά και τα πιθανά μικρά συντημημένα προϊόντα που προκύπτουν από τις μεταλλάξεις που προκαλούν πρόωρο τερματισμό. Συνήθως σε πήκτωμα συγκέντρωσης 12-15% σε πολυακρυλαμίδιο μπορούν να διαχωριστούν εύκολα πρωτεϊνικά προϊόντα της μεθόδου PTT μεγέθους μέχρι 60-75 kDa σε περίπου 1-1,5 ώρα.

Η ανίχνευση των πρωτεϊνικών προϊόντων της PTT στο ηλεκτροφόρημα SDS-PAGE μπορεί να γίνει με δύο τρόπους:

**i) Ραδιοϊσοτοπικά.** Είναι η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος ιδιαίτερα όταν το εργαστήριο διαθέτει εμπειρία χρηστών και άδεια χρήσης ραδιοϊσοτοπών. Σ' αυτή την περίπτωση ενσωματώνεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης της

μετάφρασης ραδιενεργό αμινοξύ στην πρωτεΐνη που συντίθεται: είτε [<sup>35</sup>S]-μεθειονίνη είτε [<sup>35</sup>S]-κυστεΐνη είτε [<sup>3</sup>H]-13λευκίνη (οποιοδήποτε αρκεί να είναι συχνό στο τμήμα που συντίθεται). Μετά την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE ακολουθεί μονιμοποίηση των ζωνών στο πήκτωμα (fixation), ενίσχυση ~10 φορές του ραδιενεργού σήματος με φθορισμογραφία φθοριζουσών ουσιών που εκπέμπουν φωτόνια κατά την επαφή με ραδιενεργά ισότοπα (116) και τέλος ακολουθεί αυτοραδιογραφία. Έκθεση του φιλμ για 15-18 ώρες συνήθως δίνει ένα ικανοποιητικό σήμα κατά την εμφάνιση. Στο σχήμα 3.4 δίνεται ένα σχετικό παράδειγμα τελικού σταδίου ανίχνευσης με τη μέθοδο PTT. Τα μεταλλαγμένα δείγματα εντοπίζονται εύκολα καθώς σε αυτά υπάρχουν δύο κυρίως σήματα: αυτό του κανονικού αλληλόμορφου που εντοπίζεται στο πάνω μέρος του πηκτώματος και αυτό του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου που κινείται γρηγορότερα και εντοπίζεται σε χαμηλότερη θέση.



**Σχήμα 3.4:** Παράδειγμα ανίχνευσης μεταλλάξεων με PTT (αυτοραδιογραφία) – θέσεις 1, 3- 5 φυσιολογικά δείγματα, θέση 2, μεταλλαγμένο δείγμα.

ii) **Μη ραδιοϊσοτοπικά.** Σε αυτή τη περίπτωση χρησιμοποιείται βιοτινυλιωμένη λυσίνη στη θέση του επισημασμένου αμινοξέος. Μετά την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση ακολουθεί αποτύπωση σε μεμβράνη (Western blot) και ανίχνευση με σύμπλεγμα στρεπταβιδίνης με ένζυμο (π.χ. HRP, ALP κλπ) είτε με χρωματικό τρόπο (ενζυμικό υπόστρωμα: BCIP/NBT) είτε με χημειοφωταύγεια (ενζυμικό υπόστρωμα: λουμινόλη). Στη μέθοδο αυτή το στάδιο της έκθεσης και εμφάνισης είναι πιο σύντομο (μερικά λεπτά αντί για ώρες) αλλά και πιο ελεγχόμενο ως προς την ένταση του σήματος. Ο τρόπος αυτός πλεονεκτεί ως προς την αποφυγή χρήσης ισοτόπων ωστόσο απαιτεί περισσότερη εργασία συνολικά. Η χρήση αμινοξέων επισημασμένων με

φθορισμό ή χημειοφωταύγεια (κυρίως λυσίνη) δίνει τη δυνατότητα άμεσης ανίχνευσης των μεταλλάξεων με το πέρας της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης.

#### **3.1.1.2 Εφαρμογές της μεθόδου PTT**

Η μέθοδος PTT αυτή τη στιγμή εφαρμόζεται σε ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων των οποίων το κοινό χαρακτηριστικό είναι ότι η πλειοψηφία των μεταλλάξεων οδηγούν σε συντημημένη πρωτεΐνη. Η μέθοδος PTT είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στη μοριακή διαγνωστική του καρκίνου όπου είναι πολύ σύνηθες φαινόμενο η απώλεια της λειτουργικότητας (loss of function) των ογκοκατασταλτικών γονιδίων εξαιτίας αυτού του είδους των μεταλλάξεων όπως π.χ. στα γονίδια του καρκίνου μαστού/ωοθηκών και του παχέος εντέρου. Επίσης χρησιμοποιείται σε X-φυλοσύνδετα νοσήματα (DMD, Hunter κλπ) όπου και η ανάλυση των αποτελεσμάτων σε άρρενες ασθενείς είναι πιο εύκολη καθώς υπάρχει ένα μόνο αλληλόμορφο είτε φυσιολογικό (wild type) είτε μεταλλαγμένο.

#### **3.1.1.3 Πλεονεκτήματα -Μειονεκτήματα της μεθόδου PTT**

Πλεονεκτήματα της μεθόδου PTT:

- Άμεση ανίχνευση μεταλλάξεων με παθογνωμική αξία σε μεγάλο τμήμα DNA
- Σχετικά εύκολος εντοπισμός της θέσης της μετάλλαξη με βάση το πρωτεϊνικό μέγεθος του συντημημένου αλληλίου ώστε να ταυτοποιηθεί η μετάλλαξη με DNA sequencing.
- Η ευαισθησία είναι πολύ καλή 5-10% δηλαδή εάν αναμιχθούν 10 δείγματα (20 αλληλόμορφα) μπορεί να ανιχνευθεί το ένα μεταλλαγμένο (117)

Μειονεκτήματα της μεθόδου PTT:

- Αδυναμία ανίχνευσης σιωπηλών ή παρανοηματικών μεταλλάξεων ή μικρών προσθηκών ή απαλοιφών που δεν καταλήγουν σε κωδικόνιο τερματισμού μέσα στο πρωτεϊνικό τμήμα που εξετάζεται.
- Αδυναμία ανίχνευσης πολυμορφισμών σε ιντρόνια καθώς δεν υπάρχει τρόπος να σαρωθούν με τη συγκεκριμένη μέθοδο.
- Δυσκολία ανίχνευσης όταν η μετάλλαξη εμφανίζεται στην αρχή του τμήματος DNA με αποτέλεσμα το πρωτεϊνικό τμήμα να είναι τόσο μικρό που να εξέρχεται νωρίς από το πήκτωμα ή όταν η μετάλλαξη είναι στο τέλος με

αποτέλεσμα να μην διαχωρίζεται το συντημένο από το φυσιολογικό αλληλόμορφο.

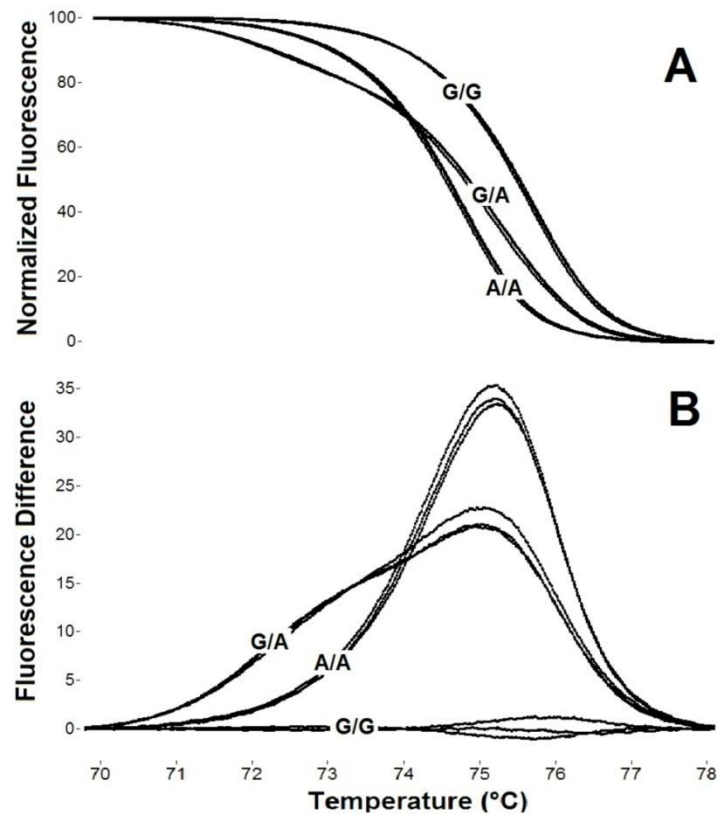
### **3.1.2 High Resolution Melting Analysis (HRM)**

#### **3.1.2.1 Αρχή Μεθόδου**

Η HRM είναι μια τεχνική ανίχνευσης μεταλλάξεων, πολυμορφισμών και επιγενετικών τροποποιήσεων στη διπλή αλυσίδα του DNA που ανακαλύφθηκε και αναπτύχθηκε από την Idaho Technology και το πανεπιστήμιο της Utah.

Αρχικά γίνεται Real-time PCR με κατάλληλους εκκινητές για την ενίσχυση της επιθυμητής περιοχής. Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται φθορίζουσα χρωστική προκειμένου να παρακολουθείται η διαδικασία ενίσχυσης σε πραγματικό χρόνο. Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται προσδένονται ειδικά στο διπλό μόριο του DNA και όταν προσδένονται φθορίζουν. Τέτοιες χρωστικές είναι οι SYBR Green I, LC Green, LC Green Plus, ResoLight, EvaGreen, Chromofy και SYTO 9. Απουσία διπλής αλυσίδας DNA δεν υπάρχει τίποτα να προσδεθεί η χρωστική οπότε δεν υπάρχει φθορισμός (118). Μετά το πέρας της PCR, καθώς αρχίζει η ανάλυση η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά συνήθως από τους 50 °C έως τους 95 °C. Στην αρχή της HRM ανάλυσης υπάρχει υψηλό επίπεδο φθορισμού καθώς υπάρχουν δισεκατομμύρια μόρια δίκλωνου DNA στο δείγμα. Καθώς ανεβαίνει η θερμοκρασία οι δυο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται έτσι καθώς μειώνονται τα δίκλινα μόρια DNA μειώνεται κι ο φθορισμός. Η κάμερα του μηχανήματος παρακολουθεί τη διαδικασία καταγράφοντας τον φθορισμό και στο τέλος το μηχάνημα δημιουργεί ένα διάγραμμα φθορισμού – θερμοκρασίας που ονομάζεται καμπύλη τήξης.

Η θερμοκρασία τήξης του προϊόντος στην οποία το δίκλινο μόριο του DNA γίνεται μονόκλινο μπορεί να προβλεφτεί και εξαρτάται από την αλληλουχία των βάσεων του DNA. Σε περίπτωση που υπάρχει αλλαγή έστω και μιας βάσης σε κάποιο από τα προϊόντα τότε η καμπύλη τήξης αλλάζει. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται ενδεικτικά οι διαφορές των καμπυλών τήξεως σε έναν δείγμα ομοζυγώτη, ετεροζυγώτη και φυσιολογικό για κάποια μετάλλαξη (Σχήμα 3.5).



**Σχήμα 3.5:** Ενδεικτικό διάγραμμα καμπυλών τήξεως Ομοζυγώτης (A/A)-Ετεροζυγώτης (G/A)-Φυσιολογικός (G/G)

### 3.1.2.2 Πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα της μεθόδου

Τα πλεονεκτήματα HRM ανάλυση σε σχέση με άλλες γενετικές τεχνικές είναι:

- Είναι πιο οικονομική σε σχέση με άλλες τεχνικές γονοτύπωσης όπως DNA Sequencing και real-time PCR με TaqMan ανιχνευτές.
- Μειωμένος κίνδυνος επιμόλυνσης καθώς όλα γίνονται σ' ένα σωληνάριο.
- Είναι γρήγορη και μπορεί να αναλύσει μεγάλο αριθμό δειγμάτων.
- Είναι απλή. Με ένα καλά σχεδιασμένο πρωτόκολλο HRM μπορεί να γίνει γενετική ανάλυση δειγμάτων σε οποιοδήποτε εργαστήριο διαθέτει HRM real-time PCR μηχανήματα.

Μειονεκτήματα:

- Η απόδοση της HRM ανάλυσης εξαρτάται από την ποιότητα της PCR, το μηχανήματα ανάλυσης και τις χρωστικές που χρησιμοποιούνται.

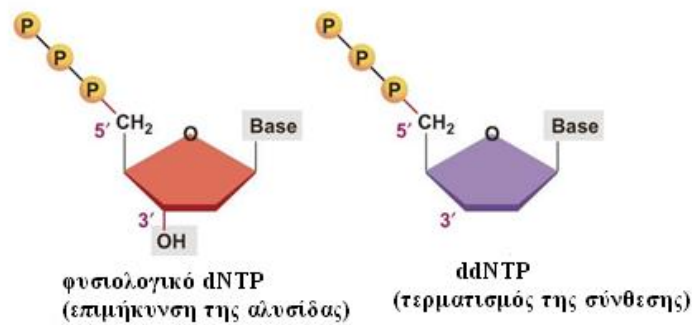
- Η ανίχνευση του ετεροζυγώτη δεν εξαρτάται από το είδος της μετάλλαξης ή την θέση του πολυμορφισμού.
- Μικρές προσθήκες ή διαγραφές βάσεων ίσως είναι πιο δύσκολο να ανιχνευτούν σε σχέση με τις αντικαταστάσεις βάσεων.
- Η ακρίβεια εξαρτάται άμεσα από την ικανότητα ανάλυσης του μηχανήματος.
- Ιδανική για ανάλυση μόνο μικρών PCR προϊόντων. Η ακρίβεια της ανάλυσης μειώνεται όσο μεγαλώνει το μήκος του προς ανάλυση PCR προϊόντος (119).

### 3.1.2.3 Εφαρμογές της HRMA τεχνικής

- Ανίχνευση άγνωστων σημειακών μεταλλάξεων.
- Επιγενετική. Ανάλυση μεθυλίωσης.
- Έλεγχος ζυγωτίας.

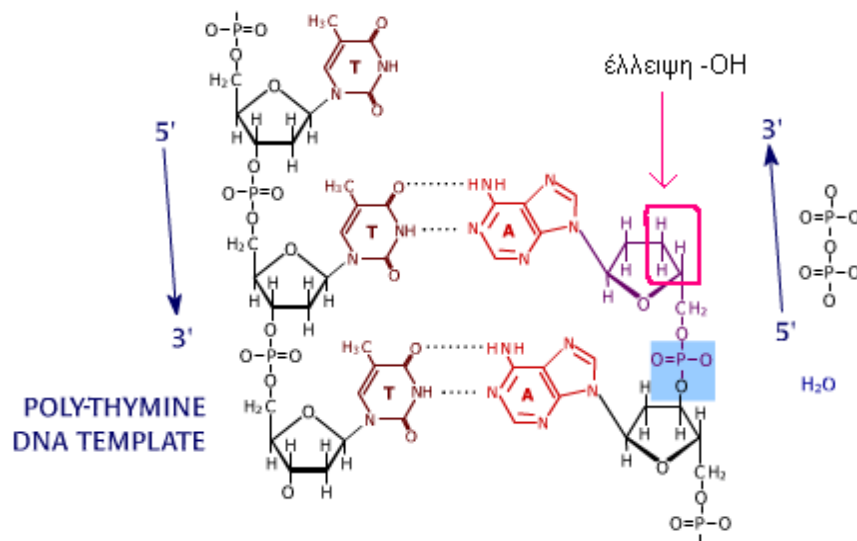
### 3.1.2.4 Αλληλούχιση DNA (DNA Sequencing)-Η ενζυμική μέθοδος κατά Sanger

Η ενζυμική μέθοδος κατά Sanger ή η μέθοδος των διδεοξυ αντιδράσεων βασίστηκε σε προηγούμενη εργασία του Arthur Kornberg (<http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/sangerseq.html>) στην αντιγραφή του DNA καθώς και στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να χρησιμοποιεί εκτός των τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) και τα 2',3'-τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) σαν υποστρώματα. Κατά την διαδικασία αντιγραφής του DNA το άτομο άνθρακα στο 5' άκρο του εισερχόμενου δεοξυνουκλεοτιδίου (dNTP) ενώνεται με το άτομο άνθρακα στο 3' άκρο στο τέλος της αλυσίδας ([www.dnalc.org/ddnalc/resources/sangerseq.html](http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/sangerseq.html)). Οι ομάδες υδροξυλίου σε κάθε θέση σχηματίζουν εστερικούς δεσμούς με ένα κεντρικό άτομο φωσφόρου και η αλυσίδα επιμηκύνεται. Το «κλειδί» στη μέθοδο του Sanger είναι η ιδιαίτερη χημεία των διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTP). Όπως γίνεται με ένα δεοξυνουκλεοτίδιο, έτσι και ένα ddNTP ενσωματώνεται στην αλυσίδα σχηματίζοντας έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό στο 5' άκρο. Ωστόσο το ddNTP δεν έχει ομάδα υδροξυλίου (OH) στη θέση 3' που είναι απαραίτητη για τη δημιουργία δεσμού με ένα εισερχόμενο νουκλεοτίδιο. Έτσι η προσθήκη ενός ddNTP σταματά την επιμήκυνση της αλυσίδας (120)



**Σχήμα 3.6:** Δομή dNTP και ddNTP

([http://campus.queens.edu/faculty/jannr/Genetics/images/dnatech/FG12\\_12aDideoxy.JPG](http://campus.queens.edu/faculty/jannr/Genetics/images/dnatech/FG12_12aDideoxy.JPG))

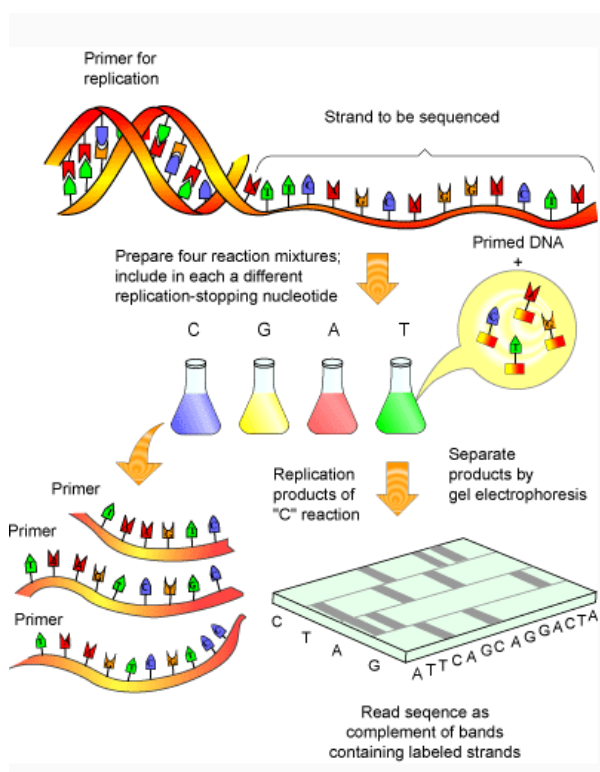


**Σχήμα 3.7:** Προσθήκη ενός ddNTP σταματά την επιμήκυνση της αλυσίδας.

Για την αντίδραση του προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA, ένας ολιγονουκλεοτιδικός φορέας- εκκινητής υβριδίζεται στον 3'- 5' κλάδο του προς προσδιορισμό DNA και με τη βοήθεια του ενζύμου DNA Πολυμεράση επεκτείνεται σε κατεύθυνση 5'- 3', συμπληρωματικά στον αντιγραφόμενο κλάδο με την ανάπτυξη φωσφοδιεστερικών δεσμών ανάμεσα στο 3' άκρο του εκκινητή και το 5' άκρο του προστιθέμενου νουκλεοτιδίου που δρα ως δομικός λίθος. Εκτελούνται ταυτόχρονα τέσσερις αντιδράσεις, στις οποίες το ένα είδος από τα τέσσερα χρησιμοποιούμενα



dNTPs είναι ραδιοεπισημασμένο (συνήθως με  $^{35}\text{S}$ ). Επίσης, κάθε μία από τις τέσσερις αντιδράσεις φέρει εκτός των τεσσάρων dNTPs και ένα από τα τέσσερα ddNTPs το οποίο εξ' αιτίας της έλλειψης 3' υδροξυλομάδας τερματίζει την αντίδραση νουκλεϊκής σύνθεσης όπως προαναφέρθηκε και χαρακτηρίζει την τελευταία βάση αυτού του κομματιού. Το συγκεκριμένο ddNTP είναι και αυτό που δίνει το όνομα της κάθε αντίδρασης. Τελικά, τα σχηματιζόμενα προϊόντα ηλεκτροφορούνται 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 νουκλεοτίδια της κάθε μίας αντίδρασης, δηλαδή, πρέπει να σχηματιστούν όλα τα δυνατά προϊόντα ανά αντίδραση για να είναι σωστός ο προσδιορισμός της ελεγχόμενης αλληλουχίας DNA (121).



**Σχήμα 3.8:** Αρχή ενζυμικής μεθόδου DNA sequencing κατά Sanger ([www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006](http://www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006)).

### 3.1.3 Αυτοματοποίηση του DNA Sequencing

#### 3.1.3.1 Αρχή Μεθόδου

Ένα άλλο σημαντικό σταθμό του DNA Sequencing απετέλεσε η ανάπτυξη και η χρήση αυτοματοποιημένων συσκευών (DNA sequencers) για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας νουκλεϊκών οξέων. Έτσι από τις αρχές της δεκαετίας του '90, η χρήση αυτής της τεχνολογίας αυτοματοποιεί:

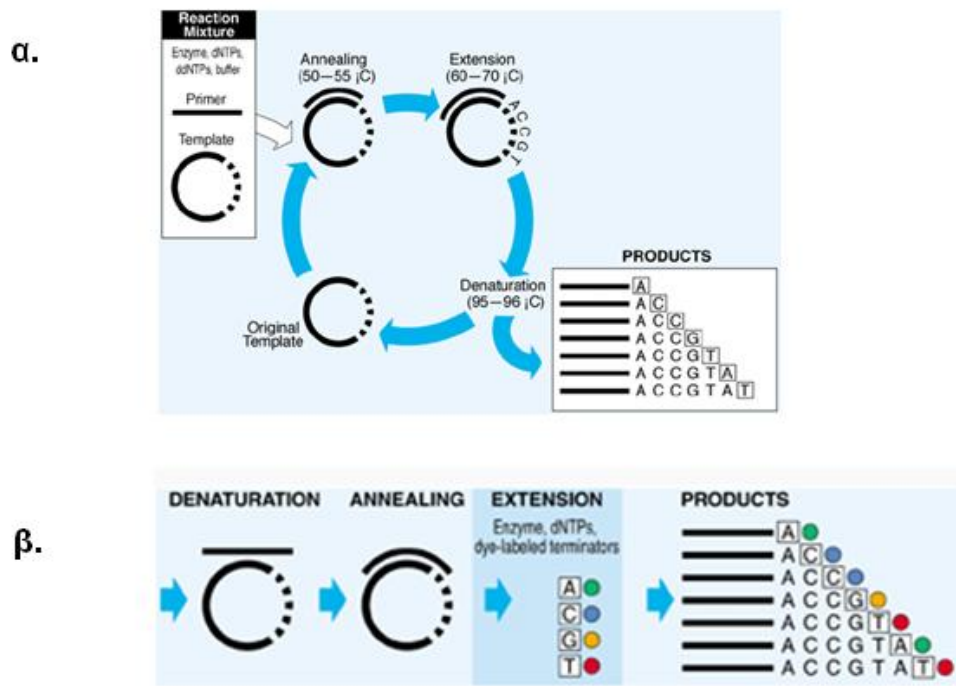
1. Την ηλεκτροφόρηση
2. Την ανίχνευση του σήματος
3. Την ανάγνωση της αλληλουχίας.

Η καινοτομία αυτή οφείλεται στην κατάργηση της ραδιενεργούς σήμανσης και στη χρήση φθορίζουσών ουσιών αντί αυτής. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται αποτελεί τροποποίηση την 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. Ο διαχωρισμός των πολυνουκλεοτιδικών μορίων που παράγονται κατά την ενζυμική σύνθεση, επιτυγχάνεται είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, είτε στους πλέον αυτοματοποιημένους sequencers, με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis). Τέλος η ανάγνωση της αλληλουχίας γίνεται μέσω μέτρησης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού, που εκπέμπουν τα επισημασμένα τμήματα DNA κατά την ηλεκτροφόρηση, όταν περνούν από ορισμένο σημείο έπειτα από την διέγερση με κατάλληλη πηγή laser. Το μόνο μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι το αυξημένο κόστος ανάλυσης το οποίο όμως αντισταθμίζεται από τον αυξημένο αριθμό αποτελεσμάτων στον ίδιο χρόνο.

Σε σχέση με την κλασική μέθοδο αναφοράς από το 1977 έχουν γίνει σημαντικές βελτιώσεις:

1. Έχει επικρατήσει η μέθοδος των θερμικών κύκλων (cycle sequencing). Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο χρησιμοποιείται
  - Taq πολυμεράση
  - Ένας μόνο εκκινητής

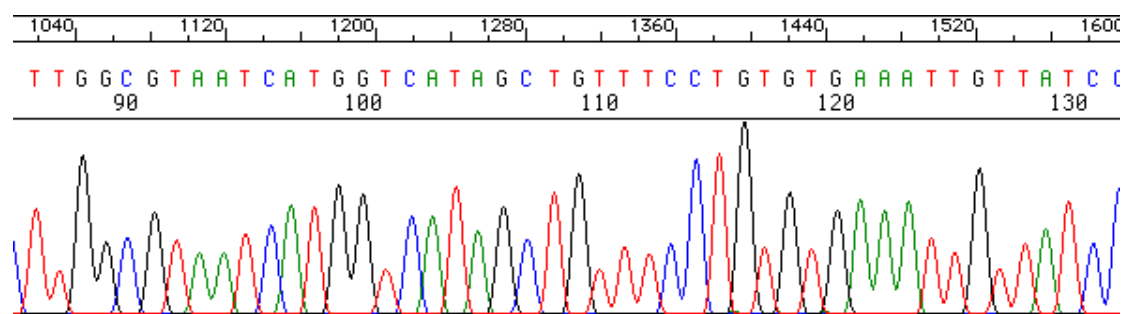
- Διδεόξυ νουκλεοτίδια
  - Και αντίδραση cycle sequencing για 20- 35 κύκλους (ανάλογα με το μέγεθος της αναλυόμενης περιοχής)
2. Υπάρχει πλέον η δυνατότητα είτε να επισημανθούν τα ddNTPs με τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές σε μία μόνο αντίδραση (dye terminators) είτε να επισημανθεί ο εκκινητής με τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες και να γίνουν τέσσερις αντιδράσεις (dye primers).



**Σχήμα 3.9:** α. Μέθοδος θερμικών κύκλων β. Μέθοδος DNA Sequencing με χρήση Dye Terminators ddNTPs (<http://www3.appliedbiosystems.com/cms>).

3. Αποφεύγεται η χρήση πολυακρυλαμιδίου καθώς πλέον η ηλεκτροφόρηση γίνεται εύκολα και πιο γρήγορα σε ειδικά τριχοειδή στα οποία διοχετεύεται ειδικό πολυμερές το οποίο αναγεννάται μετά το πέρας της ανάλυσης.
4. Εφ' όσον τα φάσματα εκπομπής των τεσσάρων χρωστικών δεν αλληλεπικαλύπτονται τότε μια διάφανη οπή στο τέλος του τριχοειδούς και με το κατάλληλο laser και

ανιχνευτή είναι δυνατόν να ανιχνεύονται τα σήματα που προκύπτουν και από τις τέσσερις χρωστικές μέσα σε ένα μόνο πέρασμα στο ίδιο τριχοειδές.



**Σχήμα 3.10:** Ηλεκτροφορογράφημα από DNA Sequencing.

### 3.1.4 MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification)

#### 3.1.4.1 Αρχή Μεθόδου

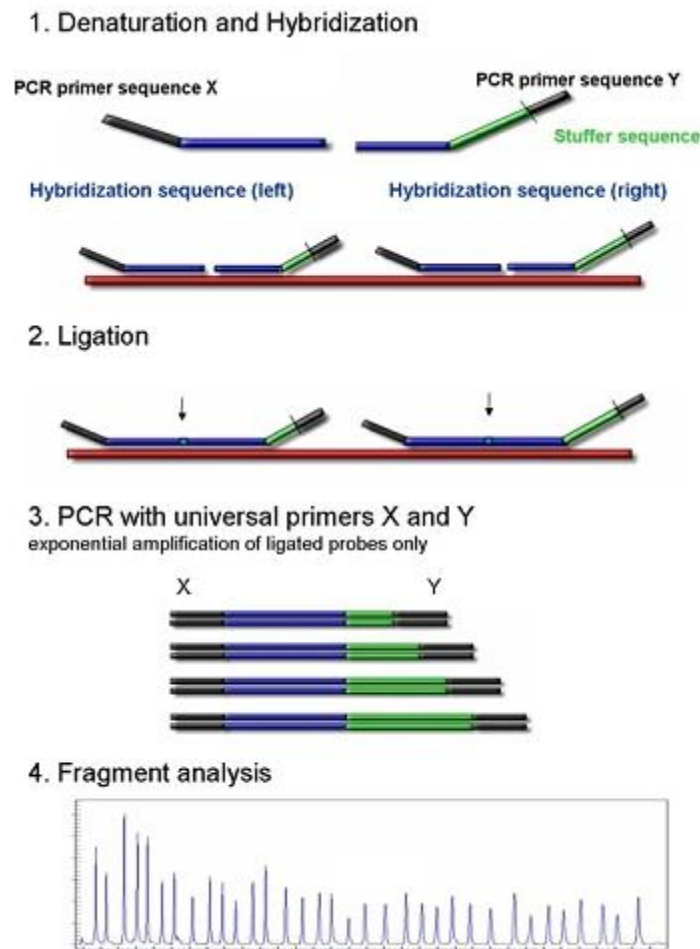
Η MLPA είναι μια μέθοδος πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (multiplex PCR), η οποία ανιχνεύει μη φυσιολογικούς αριθμούς αντιγράφων μέχρι και 50 διαφορετικών DNA ή RNA αλληλουχιών και είναι ικανή να ξεχωρίζει αλληλουχίες που διαφέρουν κατά μόνο ένα νουκλεοτίδιο (122). Η τεχνική αυτή είναι εύκολη στη χρήση και μπορεί να γίνει σε πολλά εργαστήρια καθώς απαιτεί έναν θερμικό κυκλοποιητή και εξοπλισμό για τριχοειδή ηλεκτροφόρηση. Μέχρι 96 δείγματα μπορούν να γίνουν ταυτόχρονα με αποτελέσματα διαθέσιμα σε 24 ώρες. Παρόλο που για τις περισσότερες κληρονομικές καταστάσεις οι διαγραφές γονιδίων ή ο διπλασιασμός γονιδίων είναι λιγότερο του 10% όλων των μεταλλάξεων, για άλλες ανωμαλίες το φαινόμενο αυτό μπορεί να είναι 10 μέχρι 30% (123-125) ή και ακόμα μεγαλύτερο (126, 127).

Η MLPA δεν βασίζεται στις αλληλουχίες που ενισχύονται, αλλά στους MPLA ανιχνευτές που υβριδίζονται στην αλληλουχία στόχο (δύο ανιχνευτές ανά περιοχή). Οι ανιχνευτές πέραν της ειδικής ακολουθίας με την οποία υβριδίζεται στο στόχο περιέχουν αλληλουχίες κοινών εκκινητών. Σε αντίθεση με μια τυπική πολλαπλή PCR χρησιμοποιείται μόνο ένα σετ κοινών εκκινητών. Το μέγεθος των προϊόντων που ενισχύονται είναι μεταξύ 130 και 480 νουκλεοτιδίων και πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους ώστε να αναλυθούν με ανάλυση θραυσμάτων με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση.

Έτσι συγκρίνοντας τις κορυφές που προκύπτουν με αυτές των δειγμάτων ελέγχου βρίσκουμε ποια δείγματα έχουν μη φυσιολογικό αριθμό αντιγράφων.

Η αντίδραση MLPA μπορεί να χωριστεί σε πέντε βασικά στάδια όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.11:

1. Αποδιάταξη DNA και υβριδισμός των MLPA ανιχνευτών
2. Αντίδραση ένωσης
3. Αντίδραση PCR
4. Διαχωρισμός των ενισχυμένων προϊόντων με ηλεκτροφόρηση
5. Ανάλυση δεδομένων



**Σχήμα 3.11:** Βασικά στάδια MLPA αντίδρασης ([www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)).

Κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου αναδιατάσσεται πλήρως το DNA και επωάζεται για 20 ώρες με το μίγμα των MLPA ανιχνευτών. Οι ανιχνευτές αποτελούνται από δύο διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια που το καθένα περιέχει την κοινή αλληλουχία ενός PCR εκκινητή. Οι δύο ανιχνευτές υβριδίζονται στην αλληλουχίες στόχους. Μόνο όταν οι εκκινητές υβριδιστούν στις αλληλουχίες στόχους μπορούν να ενωθούν κατά την διάρκεια του δεύτερου σταδίου λιγάσης και μόνο αυτοί οι ανιχνευτές που έχουν ενωθεί θα ενισχυθούν στη συνέχεια κατά την PCR. Ο αριθμός προϊόντων των ανιχνευτών που έχουν ενωθεί είναι το μέτρο του αριθμού των αλληλουχιών στόχων που υπάρχουν στο δείγμα. Τα ενισχυμένα προϊόντα διαχωρίζονται με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση. Οι ανιχνευτές που δεν έχουν ενωθεί περιέχουν μόνο τον ένα εκκινητή έτσι δεν ενώνονται και δεν παράγουν σήμα. Η αφαίρεση των ανιχνευτών που δεν έχουν ενωθεί από την αντίδραση και δεν είναι απαραίτητη έτσι η MLPA είναι εύκολο να διεξαχθεί.

#### **3.1.4.2 MLPA παραλλαγές**

Υπάρχουν μερικές παραλλαγές MLPA. Η RT-MLPA (Reverse Transcriptase MLPA) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το προφίλ του mRNA (128). Καθώς η λιγάση δεν μπορεί να ενώσει ανιχνευτές που είναι προσδεμένοι σε RNA, η RT-MLPA διαδικασία ξεκινάει με την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής του mRNA σε cDNA. Μετά από αυτό το στάδιο συνεχίζει κανονικά όπως η MLPA.

Μια άλλη παραλλαγή είναι η MS-MLPA (Methylation- Specific MLPA) που μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων και για το προφίλ μεθυλίωσης (129).

#### **3.1.4.3 Πλεονεκτήματα της MLPA**

- Οι μέθοδοι που αρχικά αναπτύχθηκαν για να ανιχνεύουν σημειακές μεταλλάξεις, όπως το Sequencing, δεν μπορούν να ανιχνεύσουν αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων.
- Η ανάλυση Southern blot θα ανιχνεύσει πολλές μεγάλες αναδιατάξεις αλλά δεν θα ανιχνεύσει μικρές απαλοιφές και δεν είναι ιδανική για τεχνική ρουτίνας.
- Συγκρίνοντας την MLPA με την FISH, η MLPA δεν είναι μόνο πολλαπλή τεχνική αλλά μπορεί να ανιχνεύσει αλλαγές στον αριθμό

μικρών αλληλουχιών στόχων (50-70 νουκλεοτίδια) τα οποία είναι πολύ μικρά για να ανιχνευτούν με τη FISH.

- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε απομονωμένο DNA.
- Έχει χαμηλό κόστος και δεν είναι πολύπλοκη.

### 3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ *PALB2* ΓΟΝΙΔΙΟΥ

#### 3.2.1 Ανάλυση μεθυλίωσης με την μέθοδο Pyrosequencing.

Η μέθοδος του Pyrosequencing είναι μια μέθοδος sequencing by synthesis (SBS) που επινόησε ο Ronaghi και οι συνεργάτες του στο πανεπιστήμιο του Stanford(130). Βασίζεται στην δράση της πυροφωσφατάσης όταν ανόργανο PPI απελευθερώνεται μετά την ενσωμάτωση του νουκλεοτιδίου από την DNA πολυμεράση και περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

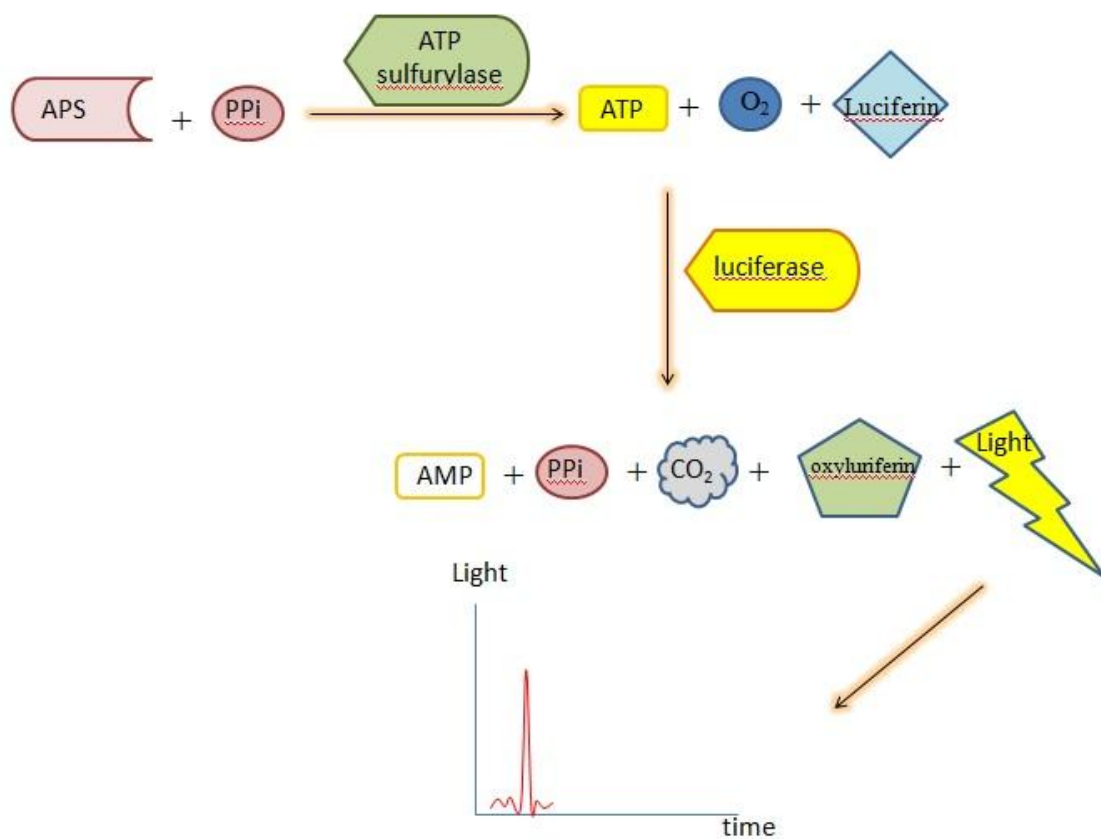
*Στάδιο 1:* Ένας συνήθως βιοτυνιλιωμένος εκκινήτης αλληλούχισης υβρίζεται σε μια μονή αλυσίδα DNA η οποία έχει ενισχυθεί προηγουμένως με αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινήτες. Επιάζεται με τα ένζυμα, DNA πολυμεράση, ATP σουλφορυλάση, λουσιφεράση και απυράση καθώς και τα υποστρώματα, adenosine 5' phosphosulfate (APS) και λουσιφερίνη.

*Στάδιο 2:* Η προσθήκη νουκλεοτιδίων dNTP γίνεται με προκαθορισμένη σειρά. Το πρώτο από τα τέσσερα dNTP προστίθεται στην αντίδραση. Η DNA πολυμεράση ενσωματώνει το dNTP στην αλυσίδα του DNA, αν είναι συμπληρωματικό με την βάση της αλυσίδας. Κάθε ενσωμάτωση νουκλεοτιδίου συνοδεύεται από απελευθέρωση πυροφωσφορικού (PPI) σε ποσότητα ισογραμμομοριακή με την ποσότητα του ενσωματωμένου νουκλεοτιδίου (Σχήμα 3.12).



Σχήμα 3.12: Στάδιο 2.

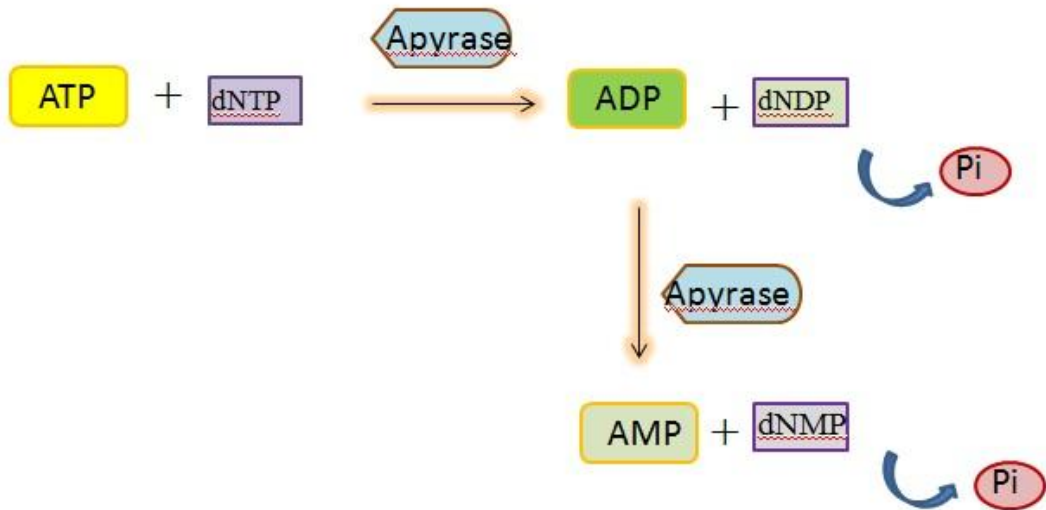
Στάδιο 3: Η ATP σουλφαρυλάση μετατρέπει ποσοτικά το PPI σε ATP παρουσία του APS. Αυτό το ATP οδηγεί στην μετατροπή της λουσιφερίνης σε οξυλουσιφερίνη απελευθερώνοντας ορατό φως σε ποσότητες ανάλογες με την ποσότητα του ATP. Το φως που παράγεται από την αντίδραση που καταλύει η λουσιφεράση ανιχνεύεται από μια κάμερα CCD (charge coupled device) και φαίνεται ως κορυφή στο πυρόγραμμα. Το ύψος της κάθε κορυφής είναι ανάλογο με τον αριθμό των νουκλεοτιδίων που ενσωματώθηκαν (Σχήμα 3.13).



Σχήμα 3.13: Στάδιο 3.

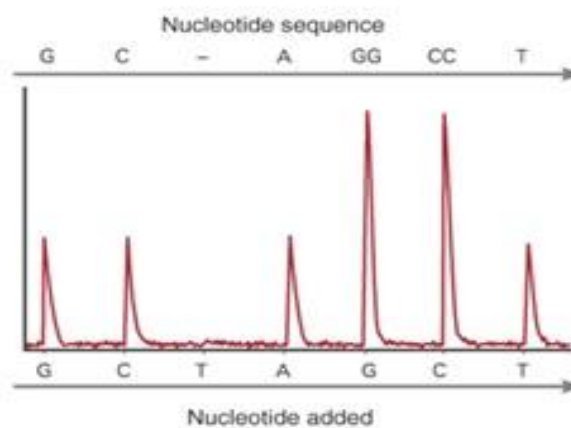
Στάδιο 4: Η απυράση είναι ένα ενζυμο αποδιάταξης, αποδιατάσσει το ATP και τα dNTPs που δεν ενσωματώθηκαν. Αυτό «σβήνει το φως» και ανανεώνει το διάλυμα της αντίδρασης. Στη συνέχεια προστίθεται το επόμενο dNTP (Σχήμα 3.14).





**Σχήμα 3.14:** Στάδιο 4.

*Στάδιο 5:* Κάθε φορά προστίθεται μόνο ένα dNTP. Πρέπει να σημειωθεί ότι το dATPaS χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο του φυσικού dATP μιας και χρησιμοποιείται αποτελεσματικά από την DNA πολυμεράση αλλά δεν αναγνωρίζεται από την λουσιφεράση. Καθώς η διαδικασία συνεχίζεται (130), η συμπληρωματική αλυσίδα του DNA δημιουργείται και η σειρά των νουκλεοτιδίων καθορίζεται από το σήμα των κορυφών στο πυρόγραμμα (131)( Σχήμα 3.15).



**Σχήμα 3.15:** Στάδιο 5.

### 3.2.2 Real-Time qPCR

#### *Συμβατική PCR*

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια μέθοδος αποτελεσματική για την *in vitro* παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων συγκεκριμένων περιοχών DNA. Τα απαραίτητα συστατικά για την διαδικασία αυτή είναι:

- Δυο συνθετικοί νουκλεοτιδικοί εκκινητές (~20 νουκλεοτίδια ο καθένας), συμπληρωματικοί περιοχών σε αντίθετες πλευρές των δύο αλυσίδων έτσι ώστε να περικλείεται ανάμεσα τους το DNA στόχος. Οι εκκινητές αυτοί μετά την υβριδίωση με το DNA στόχο έχουν τα 3' –OH άκρα αντικριστά μεταξύ τους.
- Μια αλληλουχία στόχος, δείγματος DNA, που βρίσκεται μεταξύ του ζεύγους των εκκινητών και μπορεί να έχουν μήκος 100-3500 bp.
- Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, ώστε να αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη του DNA.
- Τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs).

Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για την σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλιωνα μόρια μπορούν να παραχθούν με απλό τρόπο από δίκλιωνα μόρια του DNA, όταν θερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες, οπότε αποχωρίζονται. Η DNA πολυμεράση απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Επομένως το σημείο έναρξης της σύνθεσης του DNA μπορεί να καθοριστεί με την χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδίου εναρκτήριου μορίου (εκκινητή, primer), που συνδέεται με την μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο. Έτσι με την κατάλληλη επιλογή εκκινητών μπορούμε να κατευθύνουμε τη DNA πολυμεράση να συνθέσει συγκεκριμένη περιοχή του DNA.

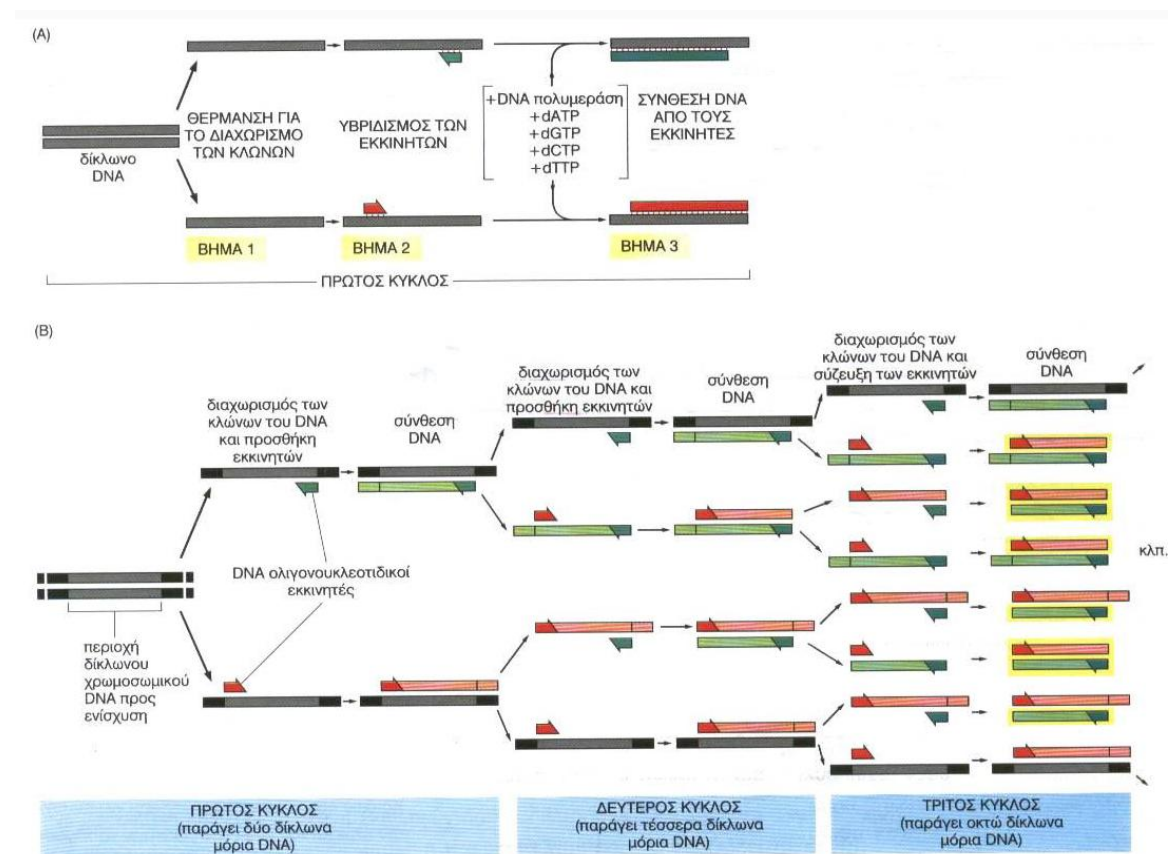
Μία τυπική διαδικασία PCR περιέχει έναν αριθμό επαναλαμβανόμενων κυκλικών διαδικασιών, για τον πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Κάθε κύκλος περιέχει τρία βήματα:

1<sup>ο</sup> βήμα: **Αποδιάταξη**. Το πρώτο στάδιο είναι η θερμική αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας στόχου, που επιτυγχάνεται αυξάνοντας τη θερμοκρασία στο δοχείο αντίδρασης στους 95 °C. Στο στάδιο αυτό στο δοχείο αντίδρασης περιέχονται: τα

dNTPs, η θερμοανθεκτική πολυμεράση και το ζεύγος εκκινητών σε περίσσεια. Η θερμοκρασία διατηρείται εκεί για ένα περίπου λεπτό.

2<sup>ο</sup> βήμα: **Υβριδοποίηση**. Στο δεύτερο στάδιο, της υβριδοποίησης, η θερμοκρασία του μίγματος σταδιακά κατεβαίνει περίπου στους 55 °C. Η θερμοκρασία αυτή ποικίλει ανάλογα με τις ακολουθίες. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου οι εκκινητές σχηματίζουν ζεύγη βάσεων με τις συμπληρωματικές περιοχές του DNA στόχου.

3<sup>ο</sup> βήμα: **Επέκταση**. Στο τρίτο στάδιο, η θερμοκρασία αυξάνεται περίπου στους 72 °C, όπου είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για την καταλυτική δράση της πολυμεράσης. Ο χρόνος επάσης ποικίλει ανάλογα με το μήκος του τμήματος στόχο. Η σύνθεση του DNA αρχίζει στο 3' -OH άκρο κάθε εκκινητή.



**Σχήμα 3.16.:** Σχηματική παράσταση της PCR.

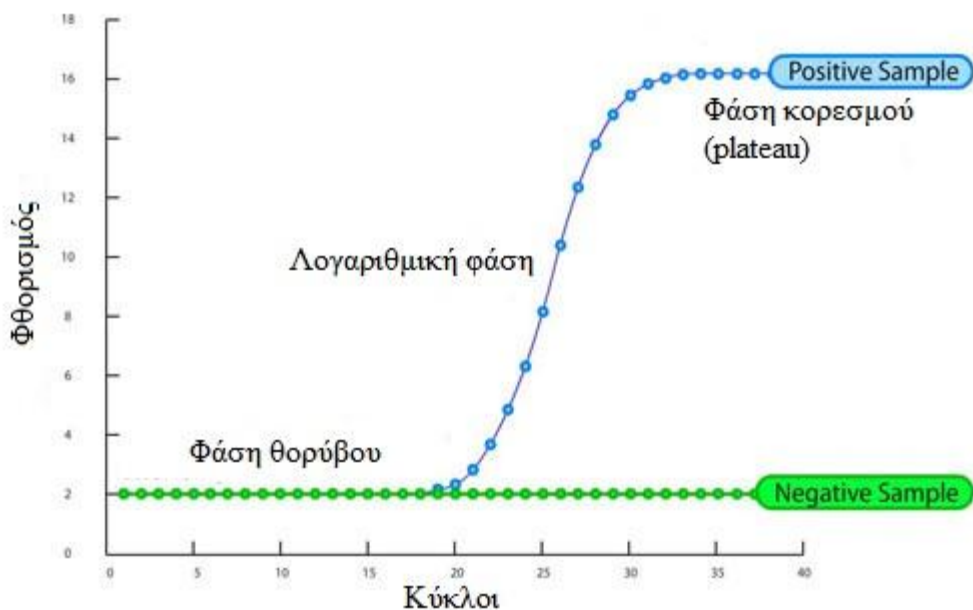
(<http://panacea.med.uoa.gr/extra/1575.jpg>)

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) ή αλλιώς αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR) είναι μια τεχνική που βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), η οποία χρησιμοποιείται για να ενισχύσει και ταυτόχρονα να ποσοτικοποιήσει το DNA στόχο.

Η διαδικασία ακολουθεί την αρχή της PCR, η διαφορά είναι ότι το πολλαπλασιαζόμενο DNA ανιχνεύεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σε «πραγματικό χρόνο» σ' αντίθεση με την συμβατική PCR που το προϊόν της αντίδρασης ανιχνεύεται στο τέλος. Βασίζεται στην ιχνηθέτηση των PCR προϊόντων με φθορίζοντα μόρια και στην μέτρηση της εκπομπής του παραγόμενου φθορισμού κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Οι δυο κοινές μέθοδοι ανίχνευσης των προϊόντων είναι:

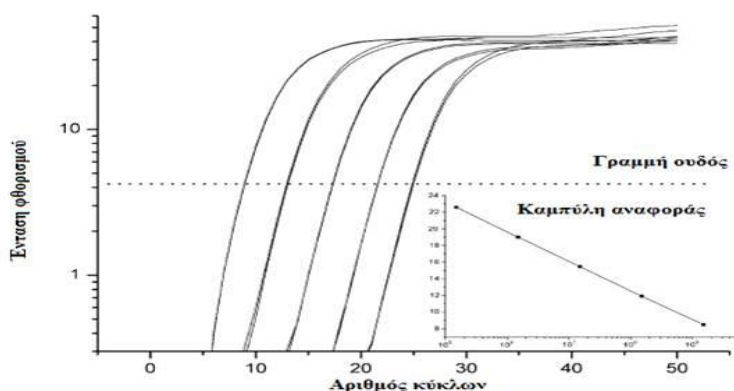
1. Μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται στην διπλή έλικα του DNA
2. Ειδικές αλληλουχίες DNA ανιχνευτών που αποτελούνται από ολιγονουκλεοτίδια που είναι επισημασμένα με φθορίζοντα ουσία η οποία επιτρέπει την ανίχνευση μόνο μετά την υβριδοποίηση του ανιχνευτή με την συμπληρωματική του αλληλουχία, για να ποσοτικοποιήσει το mRNA σε κύτταρα ή ιστούς.

Η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου (Real-time qPCR) αποτελείται όπως και η συμβατική PCR από τρεις φάσεις: την πρώιμη φάση υποβάθρου ή φάση θορύβου, την εκθετική φάση ή λογαριθμική φάση και την φάση κορεσμού (Σχήμα 3.16). Στην PCR σε πραγματικό χρόνο η ανίχνευση γίνεται στην λογαριθμική φάση και το λαμβανόμενο σήμα αυξάνει ευθέως ανάλογα με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος. Ο κύκλος στον οποίο αρχίζει η λογαριθμική φάση υπολογίζεται με κατάλληλο λογισμικό, ορίζεται από το σημείο τομής  $C_p$  (Crossing point) ή σύμφωνα με την νεώτερη ονοματολογία  $C_q$  (quantification cycle) σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες MIQE (119) και είναι αντιστρόφως ανάλογο της αρχικής ποσότητας DNA ή cDNA που υπήρχε στα δείγματα. Όσο μικρότερο είναι το  $C_q$  τόσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα του γενετικού υλικού.



**Σχήμα 3.17:** Οι φάσεις της real-time PCR.

Χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα με γνωστές συγκεντρώσεις κατασκευάζεται διάγραμμα βαθμονόμησης το οποίο εκφράζει την σχέση της συγκέντρωσης ( $\log C$ ) ως προς τα σημεία τομής  $C_q$ . Με βάση την κλίση της ευθείας (slope), την εξίσωση  $E = 10^{-1/\text{κλίση}}$  και το σημείο τομής με τον άξονα Y (intercept), μπορεί να γίνει ο υπολογισμός της απόδοσης της αντίδρασης (E) καθώς και η ποσοτικοποίηση αγνώστων δειγμάτων (Σχήμα 3.18).



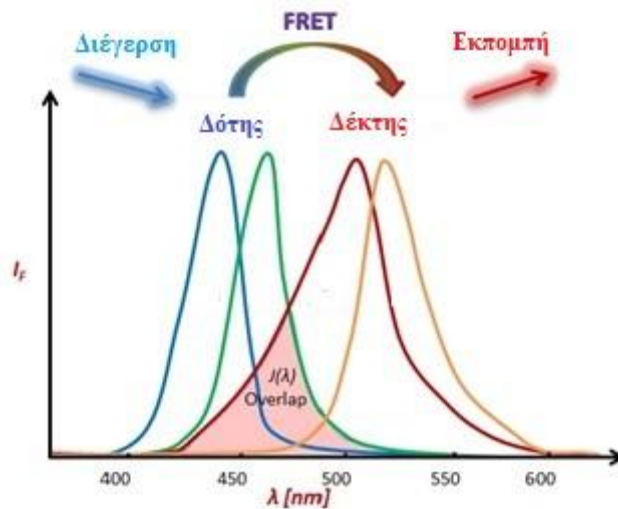
**Σχήμα 3.18:** Καμπύλη βαθμονόμησης real-time PCR.

### 3.2.2.1 Πλεονεκτήματα- Μειονεκτήματα

Υπάρχουν πολλά οφέλη από τη χρήση της Real-time PCR έναντι άλλων μεθόδων για την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Η Real-time PCR μπορεί να παράγει ποσοτικά δεδομένα με σύνηθες δυναμικό εύρος μεγέθους 7 έως 8 λογαριθμικών τάξεων και δεν απαιτεί κάποιο χειρισμό μετά την ενίσχυση. Οι δοκιμασίες της Real-time PCR 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 PCR 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 PCR 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 (132). Η επικύρωση μεθοδολογιών real-time qPCR γίνεται με βάση τα MIQE guidelines (119).

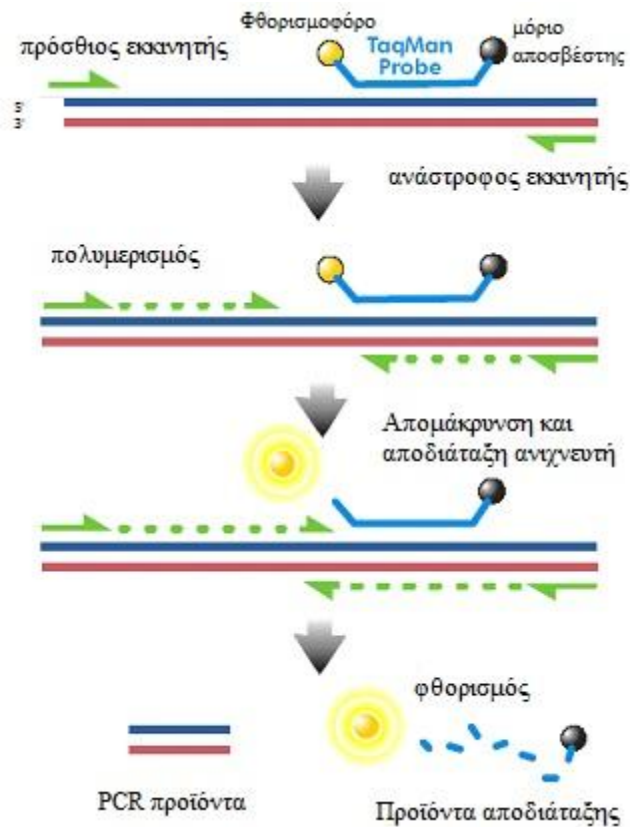
### 3.2.2.2 Σύστημα ανίχνευσης της PCR σε πραγματικό χρόνο με ανιχνευτές διπλής χρωστικής τύπου TaqMan.

Για την ανίχνευση των προϊόντων του *PALB2* γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν ανιχνευτές DNA διπλής χρωστικής τύπου TaqMan. Αυτοί είναι ανιχνευτές υδρόλυσης που σχεδιάζονται για να αυξήσουν την ειδικότητα της ποσοτικοποίησης της PCR. Η λειτουργία τους βασίζεται στο φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας με φθορισμό (Fluorescence Energy Transfer, FRET) ανάμεσα σε ένα φθορισμοφόρο και ένα μη-φθορίζοντα αποσβέστη ο οποίος διαχέει την ενέργεια με τη μορφή θερμότητας. Το φαινόμενο FRET είναι μια φασματοσκοπική διαδικασία μέσω της οποίας η ενέργεια μεταφέρεται ανάμεσα σε μόρια τα οποία απέχουν 10-100 Å και έχουν επικαλυπτόμενα φάσματα εκπομπής και απορρόφησης (Σχήμα 3.19). Η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς ενέργειας είναι ανάλογη του αντιστρόφου της απόστασης υψωμένη στην έκτη δύναμη ανάμεσα στο μόριο δότη και στο μόριο δέκτη (133).



**Σχήμα 3.19:** Φαινόμενο FRET.

Οι ανιχνευτές τύπου TaqMan είναι ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία φέρουν δύο χρωστικές στο ίδιο μόριο. Οι ανιχνευτές υβριδοποιούνται στην προσδιοριζόμενη αλληλουχία DNA μεταξύ το πρόσθιου και του ανάστροφου εκκινητή κατά την διάρκεια του σταδίου πρόσδεσης των εκκινητών. Η DNA πολυμεράση, δρώντας ως 5'-3' εξωνουκλεάση, υδρολύει τον ανιχνευτή που έχει ενσωματωθεί στην αλυσίδα του DNA. Ως αποτέλεσμα οι δύο χρωστικές αποχωρίζονται και εκπέμπεται φθορισμός από το φθοροφόρο μόριο καθώς το μόριο αποσβέστης δεν είναι σε ικανή απόσταση για να απορροφήσει την ενέργεια φθορισμού (Σχήμα 3.20).



**Σχήμα 3.20:** Αρχή μεθόδου συστήματος ανίχνευσης τύπου TaqMan.

### 3.2.2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός με Real-time qPCR

Υπάρχουν δύο μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού:

1. Απόλυτος ποσοτικός προσδιορισμός, όπου η συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου εκφράζεται ως απόλυτη τιμή η οποία καθορίζεται με την βοήθεια διαγράμματος βαθμονόμησης με πρότυπα διαλύματα κεκαθαρμένα και ποσοτικοποιημένα (PCR amplicons).
2. Σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός, όπου η συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου εκφράζεται σε σχέση με την συγκέντρωση ενός γονιδίου αναφοράς (reference gene). Στην περίπτωση αυτή η καμπύλη βαθμονόμησης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης γονιδίου-στόχου και του γονιδίου αναφοράς.

*Απόλυτη ποσοτικοποίηση με καμπύλη βαθμονόμησης*



Η απόλυτη ποσοτικοποίηση (*absolute quantification*) χρησιμοποιεί σειριακές αραιώσεις πρότυπων διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων (*standards*) για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης. Η πρότυπη καμπύλη παράγει μια γραμμική σχέση μεταξύ του Cq και των αρχικών ποσοτήτων του συνολικού RNA ή cDNA, επιτρέποντας τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των αγνώστων δειγμάτων με βάση τις τιμές του Cq τους. Η μέθοδος αυτή προϋποθέτει ότι όλα τα πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα έχουν περίπου ίσες αποδόσεις. Επιπλέον, η συγκέντρωση των σειριακών αραιώσεων πρέπει να περιλαμβάνει όλο το εύρος συγκεντρώσεων που ανιχνεύονται με ακρίβεια από την μέθοδο. Τα πρότυπα διαλύματα είναι τμήματα είτε δίκλωνου είτε μονόκλωνου DNA ή cDNA που φέρουν την αλληλουχία στόχο. Τα χρησιμοποιούμενα πρότυπα διαλύματα πρέπει να είναι καθαρά από προσμίξεις οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την αντίδραση και κατά συνέπεια την καμπύλη. Τα πρότυπα διαλύματα DNA έχειδειχθεί ότι παρουσιάζουν μεγαλύτερο εύρος ποσοτικοποίησης και μεγαλύτερη ευαισθησία, αναπαραγωγικότητα και σταθερότητα από ότι τα πρότυπα διαλύματα RNA. Ωστόσο, πρότυπα διαλύματα DNA δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μια ενός σταδίου RT-PCR, λόγω της απουσίας ενός στοιχείου ελέγχου για την απόδοση της αντίστροφης μεταγραφής.

Γενικά, η απόλυτη ποσοτικοποίηση με την χρήση καμπύλης βαθμονόμησης είναι ο πιο εύκολος τρόπος για τον προσδιορισμό της απόλυτης τιμής της συγκέντρωσης του γονιδίου-στόχου είτε εκτελείται ανίχνευση με SYBR *Green* I, είτε με έναν ανιχνευτή τύπου *TaqMan*, είτε με ζεύγος ανιχνευτών υβριδισμού.

Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν ανιχνεύει αλλά ούτε διορθώνει τα αποτελέσματα στην περίπτωση παρουσίας αναστολέων της PCR αντίδρασης στα δείγματα (134). Ωστόσο, η παρουσία αναστολέων μπορεί να ανιχνευθεί με τη δοκιμασία “SPUD” (135).

#### *Απόλυτη ποσοτικοποίηση με καμπύλη βαθμονόμησης και εσωτερικό πρότυπο*

Η απόλυτη ποσοτικοποίηση με την χρήση καμπύλης βαθμονόμησης και ενός εσωτερικού προτύπου πραγματοποιείται είτε με ανιχνευτές τύπου *TaqMan* επισημασμένους με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές είτε με δύο ζεύγη ανιχνευτών υβριδισμού όπου ο ένας ανιχνευτής είναι κοινός (τρεις διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές). Σε κάθε αντίδραση (σε υάλινο τριχοειδές) τοποθετείται ένα

εξωγενές DNA ελέγχου-εσωτερικό πρότυπο. Το γονίδιο-στόχος και το εσωτερικό πρότυπο έχουν ταυτόσημες θέσεις σύνδεσης των εκκινητών της αντίδρασης αλλά παρουσιάζουν μικρές διαφορές μεταξύ τους. Το εσωτερικό πρότυπο χρησιμεύει ως δείκτης για την απόδοση της αντίδρασης. Με αυτή τη μέθοδο είναι δυνατή η ανίχνευση της παρουσίας αναστολέων στην PCR αντίδραση (134).

#### *Σχετική ποσοτικοποίηση με καμπύλη βαθμονόμησης*

Κατά τη σχετική ποσοτικοποίηση (*relative quantification*), οι αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-στόχου προσδιορίζονται ως προς την ποσότητα ενός γονιδίου αναφοράς σταθερής έκφρασης μέσα στο ίδιο δείγμα. Τα εξωτερικά πρότυπα διαλύματα χρησιμοποιούνται και πάλι για την κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης. Η καμπύλη χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό τόσο του γονιδίου-στόχου όσο και του γονιδίου αναφοράς. Η παράλληλη εκτίμηση του γονιδίου αναφοράς και του γονιδίου-στόχου δίνει τη δυνατότητα έκφρασης της συγκέντρωσης του γονιδίου-στόχου σε σχέση με τη σταθερή ποσότητα αναφοράς. Μαθηματικά το αποτέλεσμα για κάθε δείγμα εκφράζεται ως λόγος του αποτελέσματος που αφορά το γονίδιο-στόχο ως προς το γονίδιο αναφοράς και προκύπτει από τη διαίρεση των αντίστοιχων συγκεντρώσεων, όπως αυτές προσδιορίζονται από την καμπύλη βαθμονόμησης. Έτσι, τα αποτελέσματα είναι κανονικοποιημένα, αφού διορθώνονται ως προς την ανομοιογένεια και τα σφάλματα που μπορεί να προκύψουν κατά τη πειραματική διαδικασία (134).

#### *Σχετική ποσοτικοποίηση με βαθμονομητή*

Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται ένας βαθμονομητής (*calibrator*). Για κάθε άγνωστο δείγμα και τον βαθμονομητή προσδιορίζεται η σχετική ποσότητα του γονιδίου-στόχου και ενός γονιδίου αναφοράς. Για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων χρησιμοποιούνται μόνο οι τιμές των Cq. Σε αντίθεση, με τη μέθοδο του σχετικού ποσοτικού προσδιορισμού με καμπύλη βαθμονόμησης δεν απαιτούνται πρότυπα διαλύματα για την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο λόγος (τιμή γονιδίου-στόχου/τιμή γονιδίου αναφοράς) στο άγνωστο δείγμα προς τον λόγο (τιμή γονιδίου-στόχου/τιμή γονιδίου αναφοράς) στο βαθμονομητή ή με τη  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  μέθοδο. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι διορθώνει πιθανή παρουσία αναστολέων και άλλων παραγόντων που επηρεάζουν την PCR αντίδραση (134).

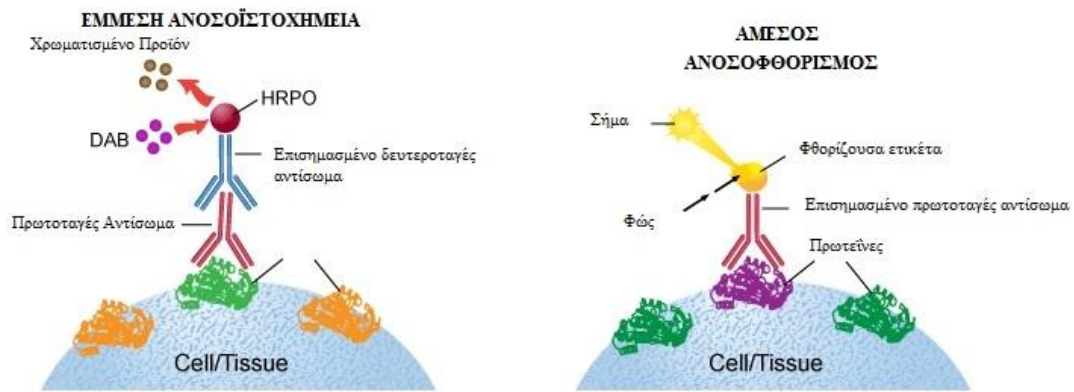
### 3.2.3 Ανοσοϊστοχημεία (IHC)

Ανοσοϊστοχημεία ονομάζουμε μια εργαστηριακή τεχνική που συνδυάζει την ιστοπαθολογία με την ανοσολογία και την χημεία. Ένα αντίσωμα κατευθύνεται προς ένα ειδικό αντιγόνο-στόχο και μια χημική αντίδραση λαμβάνει χώρα για να καταστήσει ορατό το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος, εφ' όσον είναι παρόν. Επομένως με τον όρο ανοσοϊστοχημεία εννοούμε μια ομάδα ανοσοεπισημασμένων τεχνικών, που επιτυγχάνουν να καταστήσουν ορατά διάφορα αντιγόνα σε ιστούς και κύτταρα. Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στην ικανότητα των ειδικών αντισωμάτων να εντοπίζουν και να συνδέονται με το αντίστοιχο αντιγόνο. Η σήμανση του αντισώματος με την κατάλληλη ουσία-ετικέτα καθιστά το σύμπλεγμα αντιγόνου αντισώματος ορατό. Ανάλογα με τη φύση της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής και το είδος της ουσίας-ετικέτας που χρησιμοποιούμε, η αντίδραση μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος ελέγχεται με κοινό ηλεκτρονικό ή φθορίζον μικροσκόπιο.

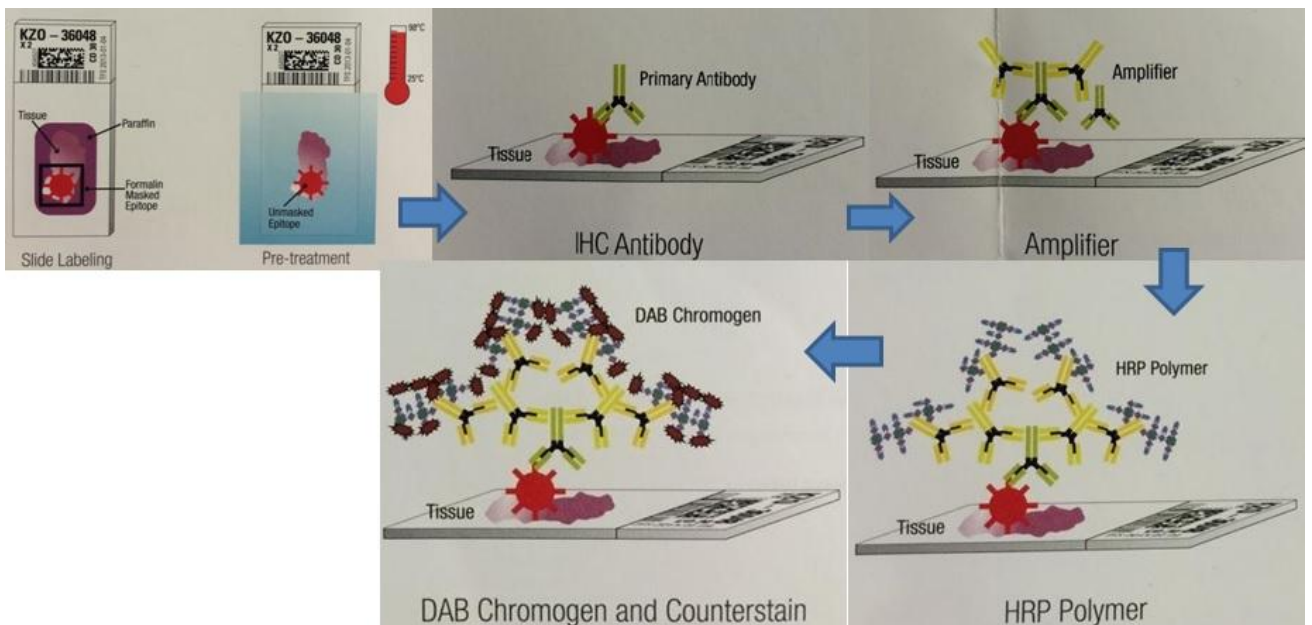
Η αρχική μέθοδος ξεκίνησε από τον Coons που πρώτος είχε την ιδέα να σημάνει με φθορίζοντα ιχνηθέτη ένα αντίσωμα που ανέπτυξε και κατόπιν να αναζητήσει σε ιστική τομή το αντιγόνο εναντίον του οποίου είχε αναπτυχθεί το αντίσωμα εξετάζοντας τον ιστό (μετά την επώαση) με φθορίζον μικροσκόπιο. Η ανοσοϊστοχημεία έγινε αποδεκτή σαν ένα απλό και πρακτικό εργαλείο στη διαγνωστική ιστοπαθολογία, μετά την εισαγωγή των σεσημασμένων με ένζυμα αντισωμάτων (136, 137). Το αμέσως επόμενο βήμα ήταν η εισαγωγή των μονοκλωνικών αντισωμάτων στην ανοσοϊστοχημεία και προσέφερε στο παθολογοανατομικό εργαστήριο μια ανεξάντλητη πηγή ειδικών αντιδραστηρίων μεγάλης εξειδίκευσης για την ανίχνευση διαφόρων αντιγόνων σε ιστούς και κύτταρα. Το σύμπλεγμα αντισώματος - ενζύμου διατηρεί τόσο τις ανοσολογικές όσο και τις ενζυμικές του ιδιότητες και έτσι είναι σε θέση να δεσμεύει τόσο το αντιγόνο που αναζητούμε στον ιστό όσο και να μεταβάλλει το χρώμα του κατάλληλου χρωμογόνου καθιστώντας το ορατό με το μικροσκόπιο.

Έχουν επινοηθεί διάφορες μέθοδοι ανοσοϊστοχημείας με σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας ή την αύξηση της ταχύτητας της μεθόδου. Οι δυο βασικές κατηγορίες είναι η άμεση και η έμμεση ανοσοϊστοχημεία και φαίνονται στο σχήμα 3.21. Στην άμεση το πρωτοταγές αντίσωμα είτε πολυκλωνικό είτε μονοκλωνικό συνδέεται χημικά με ένζυμο ή με φθορίζουσα ουσία και επακολουθεί προσθήκη υποστρώματος χρωμογόνου. Αν και είναι ιδιαίτερα γρήγορη υστερεί σε ευαισθησία ανίχνευσης

αντιγονικού επιτόπου. Στην έμμεση χρησιμοποιείται δευτεροταγές αντίσωμα είτε επισημασμένο με ένζυμο είτε με τη δεύτερη Fab περιοχή του να αντιδρά με διαλυτό σύμπλεγμα ενζύμου - αντισώματος ενός ενζύμου (πχ αλκαλικής φωσφατάσης- αντι-αλκαλικής φωσφατάσης στην APAAP μέθοδο). Ωστόσο η ισχυρή χημική συγγένεια του συστήματος βιοτίνης-στρεπταβιδίνης που χρησιμοποιείται σε πολλές ανοσοχημικές τεχνικές βρήκε την εφαρμογή του και στην ανοσοϊστοχημεία με τα συστήματα LSAB (Labeled StreptAvidin-Biotin) και ABC (Avidin-Biotin Complex) (138). Και στις δύο μεθόδους το δευτεροταγές αντίσωμα είναι βιοτινυλιωμένο και αντιδρά είτε με ένζυμο συζευγμένο με στρεπταβιδίνη στην πρώτη περίπτωση είτε με σύμπλεγμα στρεπταβιδίνης με βιοτινυλιωμένο ένζυμο στην δεύτερη. Τα συνηθέστερα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι η υπεροξειδάση του ρεπανιού HRP (Horse Radish Peroxidase) και η αλκαλική φωσφατάση (ALP). Στην περίπτωση που το ένζυμο είναι η υπεροξειδάση τότε υπάρχει και η μέθοδος ενίσχυσης του σήματος στην ABC μέθοδο μέσω κατάλυσης προστιθέμενου βιοτινυλιωμένου τυραμιδίου και εναπόθεσης του ιζήματος που σχηματίζεται. Πρόσφατα βελτίωση της μεθόδου τόσο στην ταχύτητα όσο και στην ευαίσθησία επιφέρει η χρήση αδρανούς πολυμερούς δεξτράνης επισημασμένου με 70 μόρια ενζύμου και 10 δευτεροταγή αντισώματα (σχήμα 3.22) (139). Τα συνηθέστερα υποστρώματα είναι το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μαζί με είτε διαμινοβεζιδίνη (DAB) είτε αμινο-αιθυλο καρβαζόλη (AEC) είτε χλωρο-ναφθόλη (CN). Ενώ για την αλκαλική φωσφατάση συνηθέστερα υποστρώματα η ναφθολη-φωσφορικό MX-Fast Red, NBT-BCIP και η φουξίνη. Παράγεται αδιάλυτο ίζημα το οποίο καθιζάνει στις θέσεις αντιγόνου/αντισώματος ενώ τα υπόλοιπα κυτταρικά στοιχεία διαφοροποιούνται με κατάλληλη βαφή υποβάθρου (counterstain) πχ. αιματοξυλίνη, methyl green. Οι πλέον χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανοσοϊστοχημείας είναι αυτές του ανοσο-σμπλέγματος υπεροξειδάσης- αντιυπεροξειδάσης της ανοσοενζυμικής τεχνικής βιοτίνης-αβιδίνης και του HRP πολυμερούς στο οποίο χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία.



**Σχήμα 3.21:** Σχηματική αναπαράσταση έμμεσης ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού (άμεσης ανοσοϊστοχημείας).



**Σχήμα 3.22:** Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας IHC που χρησιμοποιήθηκε με HRP πολυμερές.

### 3.2.3.1 Πλεονεκτήματα- Μειονεκτήματα της IHC

Πλεονεκτήματα:

- Ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα.
- Δυνατότητα εφαρμογής σε αρχεϊακό υλικό ρουτίνας ακόμα και μετά την παρέλευση μεγάλου χρονικού διαστήματος (ιστοί έγκλειστοι σε παραφίνη).
- Επαναληψιμότητα και δυνατότητα συσχέτισης με μορφολογικές παραμέτρους.
- Μπορεί να συνδυαστεί με άλλες ιστοχημικές χρώσεις στην ίδια τομή.

### Μειονεκτήματα:

- Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε περίπτωση π.χ. ακατάλληλου ή εξασθενημένου αντισώματος. Έτσι το ανοσοϊστοχημικό αποτέλεσμα από μόνο του δεν είναι ικανό να αποκλείσει μια διάγνωση.
- Ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε περίπτωση π.χ. μη ειδικής πρόσδεσης του αντισώματος ή παρουσία ενδογενούς υπεροξειδάσης ή έλξη για το σύμπλεγμα αβιδίνης- βιοτίνης από κάποια στοιχεία του ιστού π.χ. βιοτίνη (140).

## Πειραματικό μέρος

### Κεφάλαιο 4 - Υλικά και μέθοδοι

#### 4.1 Γενετική Ανάλυση *PALB2* γονιδίου

##### *Απομόνωση DNA*

Συλλέχθηκε περιφερικό αίμα από κατάλληλα επιλεγμένους ασθενείς από οικογένειες με κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού (ή των ωοθηκών) (n=57). Επιλέχθηκαν ασθενείς με ισχυρό οικογενειακό ιστορικό (>2 περιστατικά) ή μικρή ηλικία εμφάνισης της νόσου ή οικογένεια με καρκίνο μαστού στον άνδρα καθώς και μια ομάδα ασθενών με τον σπάνιο υπότυπο μυελοειδές καρκίνος του μαστού (n=15). Τα δείγματα προέρχονταν κυρίως από το Μαιευτήριο Μητέρα (Δρ. Χριστίνα Τσιώνου, Υπεύθυνη Κέντρου Μαστού) και τα μυελοειδή από το Ευγενίδειο θεραπευτήριο (κ. Βασίλαρος, κ. Γούτας). Για όλα τα δείγματα υπήρχε έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών. Ιδανικά η αιμοληψία γίνεται σε δύο EDTA σωληνάρια των 3 ml για κάθε ασθενή έτσι ώστε εάν βρεθεί μετάλλαξη να επιβεβαιωθεί και στο δεύτερο σωληνάριο. Εάν δεν υπάρχουν σωληνάρια EDTA χρησιμοποιούνται και σωληνάρια με κιτρικό νάτριο με ή χωρίς δεξτρόζη χωρίς διαφορά στην ποιότητα του απομονωθέντος DNA, ενώ καλύτερα να αποφεύγονται τα σωληνάρια με ηπαρίνη. Από το αίμα απομονώνεται γενωμικό DNA, το οποίο φυλάσσεται στους -20 °C. Αν δεν είναι δυνατή η άμεση απομόνωση του DNA, τότε είτε απομονώνεται τουλάχιστον η στιβάδα των μονοπύρηνων λευκοκυττάρων (buffy coat) και φυλάσσεται στους -20 °C, είτε το ίδιο το αίμα φυλάσσεται στους -20 °C και όταν αποψυχθεί φυγοκεντρείται δύο φορές για 10 min στα 4.100 rpm με 6 ml φυσιολογικού ορού ή PBS και γίνεται η απομόνωση γενωμικού DNA στο κυτταρικό ίζημα. Για την απομόνωση γενωμικού DNA έγινε χρήση ειδικών στηλών με ρητίνη.

Συγκεκριμένα στην εργασία η απομόνωση και ο καθαρισμός του γενωμικού DNA έγινε με τις στήλες QIAamp των προπαρασκευασμένων αντιδραστηρίων (kit) QIAamp DNA Blood Mini Kits (QIAGEN, Hilden, Germany). Με τις στήλες αυτές το ολικό DNA (γενωμικό, μιτοχονδριακό, ιϊκό) μπορεί να απομονωθεί και να καθαριστεί

από το ολικό αίμα, πλάσμα, ορό, buffy coat, μυελό των οστών, λεμφοκύτταρα, καλλιεργημένα κύτταρα και άλλα βιολογικά υγρά και δείγματα. Μπορεί να γίνει ταυτόχρονη επεξεργασία πολλών δειγμάτων και να απομονωθεί καθαρό και με μεγάλη απόδοση DNA (έτοιμο για αντιδράσεις PCR) εντός 20 min. Η αρχή μεθόδου απομόνωσης στηρίζεται στην ειδική σύσταση των μεμβρανών της στήλης QIAamp από οξειδίο του πυριτίου (silica gel). Οι στήλες αυτές με την χρήση ειδικών ρυθμιστικών διαλυμάτων για έκπλυση και ρύθμιση του pH, κατάλληλων συγκεντρώσεων αλάτων και διαδοχικών φυγοκεντρήσεων, κατακρατούν από το κυτταρικό εκχύλισμα μόνο το DNA, το οποίο προσροφάται μέσω ενός έντονου σταδίου φυγοκέντρωσης πάνω στην πυριτική μεμβράνη, ενώ οι πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις διαπερνούν τη στήλη. Το DNA που απομονώνεται με αυτόν τον τρόπο εκλύεται σε απεσταγμένο νερό και είναι έτοιμο για αξιόπιστες αντιδράσεις PCR ή άλλες ενζυματικές διαδικασίες ή αποτύπωση κατά Southern καθώς είναι καθαρό και ελεύθερο πρωτεϊνών, νουκλεασών, παρεμποδιστών της PCR καθώς και καταλοίπων φαινόλης ή αλκοόλης που αφήνουν οι πιο καθιερωμένες μέθοδοι παρασκευής DNA. Το μήκος του DNA που απομονώνεται με τα QIAamp Kits κυμαίνεται έως 50kb με τα τμήματα των 20 – 30 kb να πλειοψηφούν. Είναι σημαντικό ότι το DNA αυτού του μήκους αναδιατάσσεται πλήρως στην αντίδραση PCR. Μακροπρόθεσμα το DNA φυλάσσεται καλύτερα στους -20 °C.

#### **Αντιδραστήρια / Υλικά / Εξοπλισμός**

- Ένζυμο πρωτεάση (QIAGEN, Γερμανία)
- Λυτικό διάλυμα ATL (QIAGEN, Γερμανία)
- Λυτικό διάλυμα AL με χαοτροπικό άλας (QIAGEN, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα AW1 (QIAGEN, Γερμανία, προστίθεται EtOH)
- Ρυθμιστικό διάλυμα AW2 (QIAGEN, Γερμανία, προστίθεται EtOH)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Φικόλη (Seromed, d = 1,077g/L)
- Φυσιολογικός ορός (0,9 % NaCl)
- Απόλυτος αιθανόλη EtOH ( Merck, Γερμανία)
- Απεσταγμένο και αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O, ελεύθερο νουκλεασών και πυρετογόνων
- Φυγόκεντρος (Labofuge 400, Heraeus, Thermo Fisher, ΗΠΑ)
- Επωαστήρας σωληναρίων (Grant, Αγγλία)



- Συσκευή Vortex (Fisher, ΗΠΑ)
- Πιπέτες ακριβείας 0,1 – 20  $\mu\text{L}$  και 50 -1000  $\mu\text{L}$  (Gilson, ΗΠΑ)
- Μικροφυγόκεντρος (Minispin plus, Eppendorf, Γερμανία)

### ***Πειραματική πορεία***

1. Αν η πειραματική διαδικασία αφορά κυτταρικό ίζημα από αποψυχθέν αίμα τότε επωάζεται με 180  $\mu\text{l}$  λυτικού διαλύματος ATL και 20  $\mu\text{L}$  πρωτεΐνάσης K ολονύκτια στους 56° C στον κλίβανο.
2. Η πειραματική διαδικασία μπορεί να ξεκινήσει από 200  $\mu\text{l}$  ολικού αίματος ωστόσο καλύτερα για μεγαλύτερες αποδόσεις απομονώνεται η στιβάδα των μονοπύρηνων λευκοκυττάρων μετά από φυγοκέντρηση του σωληναρίου για 10 min στα 3500 rpm και ακολουθεί συλλογή της λευκής στιβάδας των λευκοκυττάρων μαζί με ερυθροκύτταρα σε πλαστικό σωληνάριο Eppendorf του 1,5 ml. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν απομονωθέντα λεμφοκύτταρα ( $5 \times 10^6$ ) μετά από επιστίβαση ολικού αίματος (αραιωμένου 1:1 με PBS) σε φικόλη και ήπια φυγοκέντρηση στα 1.000 rpm για 20 min. Αποχύνεται το πλάσμα και προσέχεται να μην συλλεχτούν ερυθροκύτταρα και στη συνέχεια επακολουθεί έκπλυση δύο φορές με PBS. Χρησιμοποιούνται 200  $\mu\text{l}$  από το buffy coat ή τα απομονωθέντα λεμφοκύτταρα ενώ όταν τα δείγματα είναι μικρότερου όγκου, προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα PBS έως τα 200  $\mu\text{l}$ .
3. Προσθήκη 20  $\mu\text{l}$  πρωτεάσης ( εάν ξεκινάμε από το στάδιο 2).
4. Προσθήκη 200  $\mu\text{l}$  λυτικού διαλύματος AL στο δείγμα. Άμεση ανάδευση σε vortex για 15 sec (να μην προπαρασκευάζεται διάλυμα ενζύμου / AL καθώς αυτοαποικοδομείται το ένζυμο εάν παραμείνει για μεγάλο διάστημα χωρίς προσθήκη δείγματος).
5. Επώαση στους 70°C για 10 min στον επωαστήρα σωληναρίων.
6. Προσθήκη 210  $\mu\text{l}$  απόλυτης αιθανόλης στο δείγμα και ανάμιξη πάλι με vortex.
7. Τοποθέτηση μιας QIAamp spin στήλης σε ένα σωληνάριο συλλογής. Προσεκτική ένεση του μίγματος του σταδίου 4 στην QIAamp spin στήλη χωρίς να υγρανθεί το χείλος της, κλείσιμο του πώματος και φυγοκέντρηση στα 6.000 x g (8.000 x rpm) για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τοποθέτηση της QIAamp spin στήλης σε ένα καθαρό πλαστικό σωληνάριο συλλογής των 2 ml και απόρριψη του σωληναρίου που περιέχει το διήθημα.

8. Προσεκτικό άνοιγμα της QIAamp spin στήλης και προσθήκη 500  $\mu$ l του ρυθμιστικού διαλύματος AW1. Φυγοκέντρωση στα 6.000 x g (8.000 x rpm) για 1 min. Τοποθέτηση της QIAamp spin στήλης σε ένα καθαρό πλαστικό σωληνάριο συλλογής των 2 ml και απόρριψη του σωληναρίου που περιέχει το διήθημα.
9. Προσεκτικό άνοιγμα της QIAamp spin στήλης και προσθήκη 500  $\mu$ l του ρυθμιστικού διαλύματος AW2. Φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα 20.000 x g (14.000 rpm) για 3 min ώστε να μην μείνουν υπολείμματα αιθανόλης στη στήλη.
10. Τοποθέτηση της QIAamp spin στήλης σε ένα καθαρό πλαστικό σωληνάριο συλλογής των 1,5 ml και απόρριψη του σωληναρίου που περιέχει το διήθημα.
11. Προσεκτικό άνοιγμα της QIAamp spin στήλης. Έκλυση του DNA με 200  $\mu$ l απεσταγμένου ύδατος προθερμασμένο στους 70 °C. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και κατόπιν φυγοκέντρωση στα 6.000 x g (8.000 x rpm) για 1 min.
12. Επαναφορά του εκχυλίσματος στη στήλη και επώαση της στήλης για 5 min στους 70 °C σε επωαστήρα σωληναρίων (ή σε κλίβανο) και κατόπιν φυγοκέντρωση στα 6.000 x g (8.000 x rpm) για 1 min.
13. Το DNA που απομονώνεται με αυτόν τον τρόπο περιέχει και RNA το οποίο εάν δεν είναι επιθυμητό μπορούμε να το κατεργαστούμε με RNase A στο στάδιο 3.

#### ***Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA***

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA έγινε φθορισμομετρικά από τον αναλυτή Qubit Fluorimeter της εταιρείας Invitrogen (HΠΑ), χρησιμοποιώντας το Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit (Σχήμα 4.1). Το Kit αυτό μπορεί να μετρήσει ποσοτικά γενωμικό DNA, ιικό dsDNA καθώς και PCR προϊόντα. Η ποσότητα του δείγματος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι από 1 έως 20 $\mu$ l, ενώ τα όρια ανίχνευσης είναι 10 pg/ $\mu$ l. Η πειραματική διαδικασία μπορεί να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου (22-28° C) ενώ η φωτοσταθερότητα των αντιδραστηρίων είναι υψηλή. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 1 $\mu$ l δείγματος σε σωληνάρια PCR των 0.5 ml, με καινούρια βαθμονόμηση για κάθε χρήση του.



**Σχήμα 4.1:** Φωτογραφία Qubit® φθορισμομέτρου.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA γίνεται με βάση την καμπύλη αλγορίθμου χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 0ng/ml και 100ng/ml.

Τέλος το Qubit® fluorometer δίνει τις τιμές των συγκεντρώσεων είτε σε µg/ml είτε σε ng/ml. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης χρησιμοποιείται η σχέση :

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

Όπου QF value= η τιμή που δίνεται στον αναλυτή

n = ο αριθμός των µl του δείγματος που χρησιμοποιήθηκαν.

#### **Αντιδραστήρια / Υλικά/Εξοπλισμός**

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

### ***Πειραματική πορεία***

Αρχικά αφήνουμε όλα τα διαλύματα να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου.

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

#### **4.1.1 Δοκιμασία πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης (Protein**

##### **Truncation Test, PTT)**

#### ***Συμβατική PCR-Οργανολογία***

Για την εκτέλεση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε θερμικός κυκλοποιητής: Primus 25 της MWG Biotech, Γερμανίας. Το όργανο αυτό διαθέτει υποδοχείς για σωληνάρια PCR των  $0,2\text{ml}$  και μπορεί χάρη στα θερμικά Peltier στοιχεία που διαθέτει να υποβάλλει τα δείγματα σε κύκλους αλλαγής θερμοκρασίας μεταξύ  $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{sec}$  και  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ , με ακρίβεια  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ , χωρίς την χρήση εξωτερικών παροχών εκτός του βασικού ενισχυτή ηλεκτρονικού ρεύματος. Επίσης προγραμματίζει μέσω ψηφιακού πληκτρολογίου και έκθεσης εικόνας σε LCD οθόνη και έχει την δυνατότητα αποθήκευσης 90 προγραμμάτων. Επιπρόσθετα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως επωαστήρας με εύρος θερμοκρασιών από  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Σχήμα 5.2). Το όργανο διαθέτει θερμαινόμενο καπάκι (lid) και η ταχύτητα ανόδου θερμοκρασίας (ramp time) είναι  $4^{\circ}\text{C}/\text{sec}$  ενώ ψύξης  $2^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ .



**Σχήμα 4.2:** Σχηματική παράσταση του θερμικού κυκλοποιητή Primus 25 της MWG.

***Συνθήκες PCR για τους υποκινητές του γονιδίου PALB2***

Έγινε σχεδιασμός των εκκινητών για την *in vitro* μεταγραφή και μετάφραση των μεγάλων εξονίων (εξόνια 4 και 5) του *PALB2* γονιδίου που αποτελούν το 65% του γονιδίου και πραγματοποιήθηκε PCR με τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν (Invitrogen, ΗΠΑ) για την μεθοδολογία PTT. Οι ακολουθίες τόσο του πρόσθιου όσο και του ανάστροφου εκκινητή που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση PCR στα παραπάνω τμήματα παρατίθενται στη συνέχεια στους πίνακες 4.1, 4.2 και 4.3 μαζί με την ακριβή τοποθεσία τους στις ακολουθίες του cDNA GenBank, το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε καθώς τις θερμοκρασιακές συνθήκες. Στον πρόσθιο εκκινητή έχει προστεθεί αρχική ακολουθία 36 ή 39 βάσεων που εμπεριέχει υποκινητή για T7 πολυμεράση, ακολουθία Kozak και κωδικόνιο έναρξης όπως προαναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος.

Πίνακας 4.1. Ακολουθίες εκκινητών, θέσεις εκκινητών και μέγεθος PCR προϊόντων της μεθόδου PTT για το γονίδιο PALB2

Εξόνιο	Εκκινητής	Μέγεθος	Αλληλουχία	Θέση στο γενομικό DNA (NG_007406.1)	Μέγεθος PCR προϊόντος
4	PTT-P4F	59	5'-GCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AAC AGA CCA CCA TGG AAC CTA AAA ATA AAA TAT GTG TT-3'	5024- 5047	1473 + 36 = 1509 bp
4	PTT-P4R	22	5'-CTT TCA CTT GAA TAA ATA ATT T-3'	6447-6496	
5	PTT-P5F	56	5'-GCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AAC AGA CCA CCA TGG GGA AGA AAA GTC GTC ATC AA-3'	10889-10909	834 + 36 = 870 bp
5	PTT-P5R	21	5'-CTG TTC GAC GGA ATG TTT ATG-3'	11697-11718	

Πίνακας 4.2.Συστατικά της αντίδρασης PCR για το γονίδιο PALB2.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	12,3	
10X ρυθμιστικό διάλυμα (Promega)	5	1X
dNTPs (2mM)	2,5	200 μM
MgCl <sub>2</sub> (25mM, Promega)	1,5	1,5 mM
Πρόσθιος εκκινητής (20 pmol/μl)	1	0,8 pmol/μl
Ανάστροφος εκκινητής (20 pmol/μl)	1	0,8 pmol/μl
GoTaq πολυμεράση (Promega)	0,2	0,04 U/μl
DNA	1,5	
Συνολικός όγκος	25	

Πίνακας 4.3. Συνθήκες της αντίδρασης PCR του γονιδίου PALB2.

Στάδιο PCR	Συνθήκες	
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων	95 °C / 10 min	
Διαχωρισμός των κλώνων	95 °C / 1 min	40 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	55 °C / 1 min	
Επέκταση των εκκινητών	72 °C / 2 min	
Τελικό στάδιο επέκτασης εκκινητών	72 °C / 7 min	
Ψύξη	4 °C	

#### *Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης - Αρχή της μεθόδου*

Η κυριότερη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την απομόνωση τμημάτων DNA, που συντίθεται κατά την μέθοδο PCR, είναι η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (agarose gel electrophoresis). Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA σε ουδέτερο pH είναι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων του. Έτσι τα διάφορα μόρια DNA μετακινούνται, κατά την ηλεκτροφόρηση προς το θετικό ηλεκτρόδιο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου ( $\log_{10}$ ) του αριθμού των βάσεων τους. Κατ' αυτόν τον τρόπο, τα μικρότερα μόρια DNA μετακινούνται μέσα στην πηκτή πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα, κι έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μορίων διαφορετικού μεγέθους. Επειδή η πηκτή εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μεγέθους διαχωρίζονται σε ζώνες. Οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές κατόπιν σχηματισμού συμπλόκων παρεμβολής του DNA με μόρια, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται στην διπλή έλικα και να σχηματίζει φθορίζον σύμπλοκο με το DNA.

### ***Αντιδραστήρια / Υλικά***

- Ρυθμιστικό διάλυμα 5XTBE (τρις-βορικό-EDTA) [54 g Trizma Base (Applichem, Γερμανία), 27,5 g βορικό οξύ (Sigma, ΗΠΑ ) και 20 ml EDTA 0,5 M pH 8,0 σε 1 L].
- Βρωμιούχο αιθίδιο (0,5 mg/ml) (Invitrogen, ΗΠΑ)
- Αγαρόζη (Applichem, Γερμανία)
- Δείκτης μοριακών βαρών 50-766 bp, (New England Biolabs, ΗΠΑ)
- Χρωστική 6X (loading dye) με κυανό της βρωμοφαινόλης [0,1 g κυανό της βρωμοφαινόλης (Sigma, USA), 5 g φικόλης (Amersham Biosciences, Σουηδία), 20ml H<sub>2</sub>O]
- Πιπέτες (Thermo, Γερμανία) των 20 μl και των 100 μl.
- Ρύγχη των 20 μl χωρίς φίλτρο
- Ηλεκτροφορητική συσκευή (μικρή) (Peqlab Technology, Γερμανία) και μεσαίου μεγέθους HU13 (Scie-Plas, Αγγλία)
- Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης EPS5301 (Amersham Biosciences, Σουηδία)
- Τράπεζα ακτινοβολίας UV (Vilbert Loumart, Γαλλία)
  
- Φωτογραφική μηχανή Photo DOC-it Imaging System (UPV, ΗΠΑ)

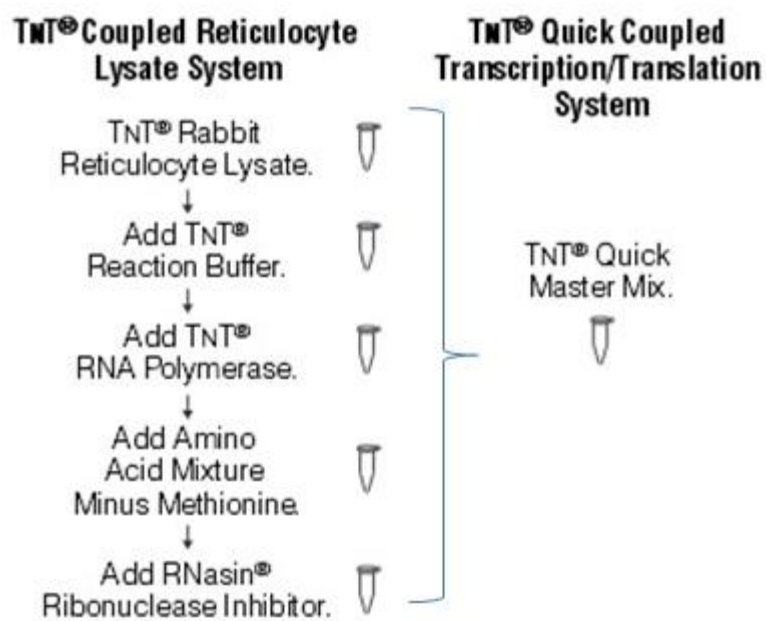
### ***Πειραματική πορεία***

Παρασκευάστηκε πηκτή αγαρόζης 1,5% (w/v) προσθέτοντας 0,6 g αγαρόζης σε 40 ml αραιωμένου διαλύματος 0,5X TBE και 40μl βρωμιούχο αιθίδιο. Στην συνέχεια 10 μl προϊόντος PCR αναμιγνύεται με 2μl διαλύματος χρωστικής και τοποθετούνται στα πηγαδάκια του πηκτώματος αγαρόζης. Η ηλεκτροφορητική συσκευή ρυθμίζεται στα 120V για 20 min, οπότε το αρνητικά φορτισμένο DNA κινείται προς την άνοδο. Παράλληλα με τα δείγματα γίνεται ηλεκτροφόρηση δείγματος δείκτη μοριακών βαρών DNA για τον υπολογισμό του μεγέθους των προϊόντων PCR. Οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές λόγω της εκπομπής ακτινοβολίας φθορισμού από το βρωμιούχο αιθίδιο ύστερα από επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας UV στα 312 nm. Η φωτογράφιση των προϊόντων γίνεται με ψηφιακή κάμερα και τα αποτελέσματα αποθηκεύονται σε δισκέτα. Η επεξεργασία της εικόνας γίνεται με την χρήση του ειδικού λογισμικού προγράμματος Photocapture (Vilbert Lourmat, Γαλλία).



### *In vitro* μεταγραφή και μετάφραση - Αρχή μεθόδου

Χρησιμοποιήθηκε το Kit TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation Systems το οποίο συνδυάζει την RNA πολυμεράση, τα νουκλεοτίδια, άλατα και τον ανασυνδυασμένο αναστολέα RNasin ριβονουκλεάσης με διάλυμα κυτταρολύματος δικτυοκυττάρου κονίκλου σε ένα Master Mix (Σχήμα 5.3). Τα συστατικά του master mix έχουν προσαρμοστεί για την μέγιστη έκφραση και πιστότητα μεταγράφων των γονιδίων. Η προσθήκη του RNasin αναστολέα προστατεύει από την πιθανή καταστροφή του RNA από προσθήκη φορέων RNAσης μέσα στα διαλύματα DNA.



**Σχήμα 4.3:** TNT Quick Coupled Transcription/Translation System.

#### *Αντιδραστήρια / Υλικά/Εξοπλισμός*

- Heat Block (Grant Instruments, Αγγλία)
- Πιπέτες (Thermo, Γερμανία) των 10 μl και των 200 μl.
- Ρύγχη των 10 μl και 200 μl με φίλτρο (Axygen Scientific, ΗΠΑ)
- Σωληνάρια των 500 μl
- TNT T7 Quick coupled Transcription/Translation System (Promega, ΗΠΑ)
- Μεθειονίνη (Promega, ΗΠΑ)

- Enhancer (Promega, ΗΠΑ)
- Transcend tRNA (Promega, ΗΠΑ)

#### **Πειραματική πορεία**

Το αντιδραστήριο της μεταγραφής-μετάφρασης είναι ιδιαίτερα ευπαθές στις μεταβολές θερμοκρασίας (αποθήκευση στους  $-80^{\circ}\text{C}$ ). Για την μεταγραφή / μετάφραση των PCR προϊόντων των εξονίων 4 και 5 του γονιδίου *PALB2* χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο και ακολούθησε επώαση στους  $30^{\circ}\text{C}$  για 60 min. Σε περίπτωση που στην συνέχεια δεν επακολουθεί ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE τα προϊόντα της αντίδρασης φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Πίνακας 4.4. Συστατικά της αντίδρασης για την in vitro μεταγραφή/ μετάφραση του γονιδίου PALB2.*

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Ποσότητα</b>
TNT Master Mix	20 $\mu\text{l}$
Μεθειονίνη (1 mM)	0,5 $\mu\text{l}$
Enhancer	0,5 $\mu\text{l}$
Transcend biotin-Lysyl-tRNA	0,58 $\mu\text{l}$
PCR προϊόν	3 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	0,42 $\mu\text{l}$
Σύνολο	25 $\mu\text{l}$

#### **Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανίχνευση πρωτεϊνών**

Για την κάθετη (slab) ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των πρωτεϊνικών δειγμάτων της μετάφρασης ακολουθήθηκε η μεθοδολογία κατά Laemmli για την κίνηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων μέσω της χρήσης δύο διαφορετικών ζωνών πολυακρυλαμιδίου διαφορετικής συγκέντρωσης και διαφορετικού pH (141). Δύο πηκτές πολυακρυλαμιδίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα από την

συσκευή ηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιώντας τα γυάλινα πλακίδια, που παρέχονται με τις συσκευές. Καθώς χρησιμοποιήθηκαν χτένια των 10 θέσεων (πάχους 0,75 mm) κατέστη δυνατό να πραγματοποιείται η ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση 20 δειγμάτων από την αντίδραση μεταγραφής και μετάφρασης.

#### **Αντιδραστήρια/ Υλικά**

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad, ΗΠΑ)
- Τροφοδοτικό Zoom Dual Power (Invitrogen, ΗΠΑ)
- Πλατφόρμα ανάδευσης (GFL 3005, Γερμανία)
- Ρύγχι των 10 µl χωρίς φίλτρο
- Πιπέτες των 10 µl (Thermo, Γερμανία)
- Ακρυλαμίδιο 30% (Applichem, Γερμανία)
- APS, υπερθειικό αμμώνιο (Applichem, Γερμανία)
- TEMED (Applichem, Γερμανία)
- SDS Sodium Dodecyl sulfate (Applichem, Γερμανία)
- Κυανούν βρωμαφαινόλης
- Trizma Base (Applichem, Γερμανία)
- Tween 20 (Applichem, Γερμανία)
- Γλυκίνη (Sigma, ΗΠΑ)
- 2-Μερκαπτοαιθανόλη (Applichem, Γερμανία)
- Μεθανόλη (Scharlab, Ισπανία)
- Spectra Multicolor Broad Range, Protein Ladder Rainbow (Thermo Scientific, ΗΠΑ)
- PVDF μεμβράνη (Thermo Scientific, ΗΠΑ)

- Χαρτί Extra Thick Western Blotting 8,5x 9 cm (Thermo Scientific, ΗΠΑ)
- Streptavidin-AP (Promega, ΗΠΑ)
- Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (Promega, ΗΠΑ)

#### *Διαλύματα*

1. Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 1M pH = 6,8 (12,11 gr Trisma Base, 80 ml H<sub>2</sub>O ρύθμιση pH με πυκνό HCl 37% και προσθήκη H<sub>2</sub>O έως τα 100 ml) και διατηρείται στους 4 °C.
  2. Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 1,5 M pH = 8,8 (18,16 gr Trisma Base, 80 ml H<sub>2</sub>O και ρύθμιση pH με πυκνό HCl 37% και προσθήκη H<sub>2</sub>O έως τα 100 ml) και διατηρείται στους 4 °C.
  3. Διάλυμα TBST (8,77 gr NaCl, 2,42 gr Tris base και 5 ml Tween 20) και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
  4. Διάλυμα stock 5X ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης SDS PAGE (σε 800 ml H<sub>2</sub>O προσθέτουμε 15,1 gr Trisma Base, 72 gr γλυκίνη, 50 ml SDS 10% και προσθέτουμε H<sub>2</sub>O μέχρι τα 1000 ml) και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
  5. Ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας 1X παρασκευάζεται με αραίωση 1:5 (200ml stock σε 800 ml H<sub>2</sub>O) και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
  6. Διάλυμα κυανού της βρωμοφαινόλης 0,05% (50 mg σε 1ml H<sub>2</sub>O).
  7. Έγχρωμο διάλυμα προετοιμασίας δείγματος 2X όγκου 9,2 ml (1ml Tris-HCl 1M pH = 6,8, 4 ml SDS 10% (Applichem, Germany), 2 ml γλυκερόλης, 200 μl H<sub>2</sub>O, 2 ml διάλυμα κυανού της βρωμοφαινόλης 0,05%). Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου ωστόσο πριν χρησιμοποιηθεί προστίθεται 8% β-μερκαπτοαιθανόλη (460 μl έγχρωμο διάλυμα 2X και 40 μl β-μερκαπτοαιθανόλη) σε απαγωγό λόγω της δυσάρεστης οσμής της.
- Διάλυμα APS 10% (Applichem, Germany) (0,1gr σε 1ml H<sub>2</sub>O). Μπορεί να διατηρηθεί για μια βδομάδα στους 4 °C.

**8.** Διάλυμα διαχωρισμού (running) πηκτώματος 10% σε πολυακρυλαμίδιο (2 gel) με τη σειρά προσθήκης:

- ✓ 4,1 ml H<sub>2</sub>O
- ✓ 3, 3ml ακρυλαμίδιο 30% (Applichem, Germany)
- ✓ 2,5 ml ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 1,5 M pH = 8,8
- ✓ 100 μl SDS 10% w/v (Applichem, Germany)
- ✓ 50 μl APS (Applichem, Germany)
- ✓ 5 μl TEMED (Applichem, Germany)

**9.** Διάλυμα επιστίβασης (stacking) πηκτώματος 10% σε πολυακρυλαμίδιο (2 gel) με τη σειρά προσθήκης:

- ✓ 4,1 ml H<sub>2</sub>O
- ✓ 3,3 ml ακρυλαμίδιο 30% (Applichem, Germany)
- ✓ 2,5 ml ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 1,5 M pH = 6,8
- ✓ 100 μl SDS 10% w/v (Applichem, Germany)
- ✓ 50μl APS (Applichem, Germany)
- ✓ 10 μl TEMED (Applichem, Germany)

**10.** Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (3,03 gr Trisma Base, 4 gr γλυκίνη και 1000 ml H<sub>2</sub>O). Δοκιμάστηκε και ρυθμιστικό διάλυμα που να περιέχει μεθανόλη από 100ml έως 200ml ωστόσο δεν στέφθηκε με επιτυχία στην δική μας πειραματική διαδικασία. Η μεθανόλη στο ρυθμιστικό διάλυμα αφαιρεί το SDS από το σύμπλοκο απορρυπαντικού- πρωτεΐνης και αυξάνει την συγγένεια μεταξύ της νιτροκυτταρίνης και των πρωτεϊνών χωρίς SDS. Προκαλεί όμως και γενική μείωση των πόρων της πηκτής περιορίζοντας την μεταφορά κάποιων πρωτεϊνών. Η PVDF μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε ενισχύει την σύνδεση των πρωτεϊνών

παρουσία SDS. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C και χρησιμοποιείται κρύο για να βοηθήσει στην αποφυγή της υπερθέρμανσης του συστήματος.

#### ***Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου***

1. Καθαρίζονται τα ειδικά υάλινα πλακίδια της συσκευής με μεθανόλη και στη συνέχεια συναρμολογούνται σύμφωνα με το εγχειρίδιο της συσκευής.
2. Παρασκευάζεται το διάλυμα για την πηκτή πολυακρυλαμιδίου (διαχωρισμού) 10% όπως αναφέρεται παραπάνω και προστίθενται στο τέλος APS το οποίο δημιουργεί ελεύθερες ρίζες για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου και TEMED το οποίο δρα ως ο καταλύτης στη διάδοση των ελεύθερων ριζών στο διάλυμα. Το όλο μίγμα αναδεύεται και αμέσως μετά με τη χρήση ενός πουάρ εγχύεται σιγά και προσεκτικά στη ειδική θέση της συσκευής ηλεκτροφόρησης όπου και παραμένει για 60 min μέχρι πλήρους πολυμερισμού. Για να μην δημιουργηθούν ανωμαλίες στο πάνω μέρος του πηκτώματος επιστιβάζεται ισοπροπανόλη.
3. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το δεύτερο διάλυμα πολυμερισμού (επιστίβασης) και με αντίστοιχο τρόπο προστίθεται πάνω από το προηγούμενο (διαχωρισμού) και στη συνέχεια τοποθετούνται οι χτένες των 10 θέσεων. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε περίπου 60 min. Αν δεν επακολουθήσει άμεσα η ηλεκτροφόρηση τότε μπορεί τα πηκτώματα να διατηρηθούν μέσα στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης για 3-4 ημέρες στους 4 °C.

#### ***Προετοιμασία δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση SDS PAGE***

1. Σε συγκεκριμένη ποσότητα προϊόντος μεταγραφής και μετάφρασης ανά δείγμα, η οποία εξαρτάται άμεσα από την ένταση του σήματος του προϊόντος PCR (συνήθως από 5 έως 7 μl) προστίθεται ίση ποσότητα διαλύματος προετοιμασίας δείγματος 2X στο οποίο έχει προστεθεί β-μερκαπτοαιθανόλη ώστε να ανηχθούν οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Ακολούθως, κάθε ένα από τα παραπάνω δείγματα επωάζονται για 5 min στους 95°C για να αποδιαταχθούν τα πρωτεϊνικά τμήμα.
2. Πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων στις ειδικά φρεάτια (wells) στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου που έχει παρασκευασθεί, γεμίζουμε το εσωτερικό διαμέρισμα της συσκευής με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Κατόπιν, τοποθετούνται προσεκτικά τα δείγματα στις ειδικές θέσεις της πηκτής με τη χρήση πιπετών και

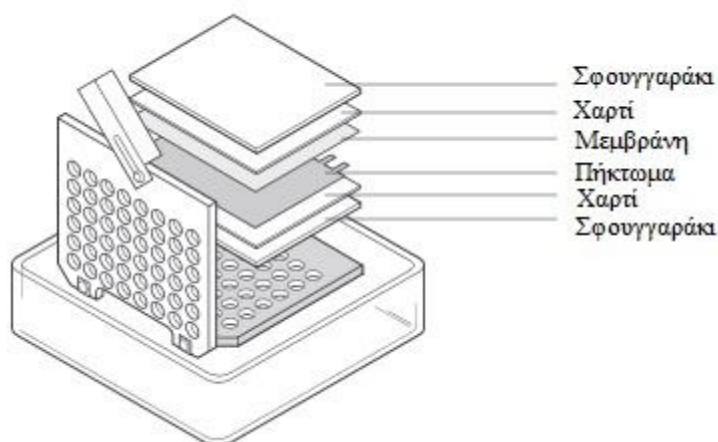
ρυγχών μιας χρήσης, ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε πιθανότητα επιμόλυνσης. Επίσης τοποθετείται σε μια θέση και ο Rainbow δείκτης μοριακών βαρών πρωτεϊνών.

3. Τα εξωτερικά διαμερίσματα της συσκευής γεμίζονται με το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται το καπάκι στην συσκευή. Η ένταση του ρεύματος στο τροφοδοτικό ρυθμίζεται στα 100 V στην αρχή όταν ακόμη τα δείγματα βρίσκονται στο πήκτωμα επιστίβασης και στη συνέχεια στα 150V, συνολικά για περίπου 60 min. Έτσι αποφεύγονται τάσεις ρεύματος μεγαλύτερες των 200 V στην συσκευή ώστε να μην δημιουργηθούν υψηλές θερμοκρασίες εντός του πηκτώματος και κατά συνέπεια «χαμόγελα» στο μέτωπο της ηλεκτροφόρησης με συνέπεια την μείωση της διακριτικότητας και άρα και της ευαισθησίας της μεθόδου.

#### ***Μεταφορά σε μεμβράνη PVDF***

1. Ανοίγονται προσεκτικά τα υάλινα πλακίδια με τη βοήθεια μιας ειδικής σπάτουλας και τοποθετείται η πηκτή μέσα στο διάλυμα μεταφοράς μέχρι να ετοιμαστεί η συσκευή για την μεταφορά προκειμένου να διευκολυνθεί η αφαίρεση των αλάτων από το διάλυμα ηλεκτροφόρησης και την εξουδετέρωση των αλάτων που προκύπτουν από την αναδιάταξη των νουκλεϊκών οξέων πριν την μεταφορά. Αν τα άλατα δεν αφαιρεθούν θα αυξηθεί η αγωγιμότητα του διαλύματος μεταφοράς και θα αυξηθεί η θερμοκρασία κατά την μεταφορά. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει στην πηκτή να προσαρμοστεί στο τελικό της μέγεθος πριν την μεταφορά.
2. Η PVDF μεμβράνη εμβαπτίζεται μέσα σε καθαρή μεθανόλη. Τα χαρτιά και τα σφουγγαράκια που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία του «sandwich» εμβαπτίζονται στο διάλυμα μεταφοράς.
3. Συναρμολογείται το «sandwich» όπως φαίνεται στην εικόνα 5.4 ως εξής: Πρώτα τοποθετείται το ένα σφουγγαράκι, από πάνω του ένα χαρτί, μετά την πηκτή, στην συνέχεια εφαρμόζεται η μεμβράνη προσεκτικά και καλά ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες, μετά τοποθετείται το δεύτερο χαρτί και από πάνω του το δεύτερο σφουγγαράκι, κλείνεται το «sandwich» και τοποθετείται στην συσκευή προσέχοντας να είναι η μεμβράνη προς τον σωστό πόλο ώστε οι πρωτεΐνες να οδεύσουν προς αυτή. Τοποθετείται μέσα στην συσκευή μια ειδική παγωμένη

παγοκύστη, ένας μαγνητικός αναδευτήρας και το κρύο διάλυμα μεταφοράς ώστε να είναι η θερμοκρασία του συστήματος ομοιόμορφη και σχετικά χαμηλή.



**Σχήμα 4.4:** «Sandwich» τεχνική.

4. Ρυθμίζεται η συσκευή στα 100V για 60 min. Μετά το πέρας της μεταφοράς απορρίπτεται το ρυθμιστικό διάλυμα, τα χαρτιά και η πηκτή και πλένονται καλά τα σφουγγαράκια και όλα τα υπόλοιπα μέρη της συσκευής.

#### **Χρωματομετρική ανίχνευση**

1. Τοποθετείται η μεμβράνη σε 15 ml διαλύματος TBST και 3% άπαχο γάλα σε σκόνη και ανακινείται για 60 min έτσι ώστε να μπλοκαριστούν όλες οι μη ειδικές περιοχές των πρωτεϊνών.
2. Στην συνέχεια απορρίπτεται το TBST και ακολουθεί πλύση με H<sub>2</sub>O.
3. Φτιάχνεται ένα διάλυμα στρεπταβιδίνης προσθέτοντας σε 15 ml TBST 6 μl Streptavidin –AP (Promega, ΗΠΑ). Σ αυτό το διάλυμα εμβαπτίζεται η μεμβράνη και ανακινείται για 60 min.
4. Ακολουθεί έκπλυση 2 φορές από ένα λεπτό με TBST και 2 φορές από ένα λεπτό με H<sub>2</sub>O.
5. Τέλος εμβαπτίζεται η μεμβράνη σε 5 ml υποστρώματος Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (Promega, ΗΠΑ), ανακινείται για 15 min και τερματίζεται η αντίδραση προσθέτοντας H<sub>2</sub>O.



#### 4.1.2 High Resolution Melting Analysis

Η HRMA έγινε στα μικρά εξόνια του γονιδίου *PALB2* (όλα τα εξόνια εκτός από το 4 και 5). Οι αντιδράσεις για την ανάλυση HRMA πραγματοποιήθηκαν στο *LightCycler*<sup>®</sup> (Roche, Γερμανία), όπου έγινε η αρχική PCR και στη συνέχεια τα υάλινα τριχοειδή με τα PCR προϊόντα μεταφέρονταν στο LightScanner 32 (Idaho Technology, ΗΠΑ) προκειμένου να γίνει η ανάλυση καμπύλης τήξεως με υψηλή διαχωριστικότητα. Όλοι οι εκκινητές είχαν ήδη χρησιμοποιηθεί στην μελέτη των Bogdanova et al. (99) εκτός από τους εκκινητές του εξονίου 1 που είχαν σχεδιαστεί από την ομάδα μας και ήταν οι ίδιοι που χρησιμοποιήθηκαν για το DNA Sequencing. Το εξόνιο 13 χωρίστηκε σε δύο τμήματα. Όλοι οι εκκινητές και ο ανιχνευτής παρασκευάστηκαν από την Invitrogen (ΗΠΑ). Παρασκευάστηκαν για τον κάθε εκκινητή διαλύματα παρακαταθήκης 100 pmol/μL και εν συνεχεία παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας 20 pmol/μL. Η αλληλουχία των εκκινητών φαίνονται στον Πίνακα 4.5.

*Πίνακας 4.5. Αλληλουχία PALB2 εκκινητών για HRMA και θερμοκρασίες υβριδοποίησης για το κάθε σετ.*

Εκκινητής	Sequence 5'→3'	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Θερμοκρασία υβριδοποίησης
PALB2-ex1-F	GTGCGCAGGCCGAATGGT	286	63°C
PALB2-ex1-R	AGTCCTGCGTCCGCCCTTC		
PALB2-ex2-F	ATTGTTGGTGTTTTCTTCTTC	108	58°C
PALB2-ex2-R	AATTTGAGAATACGATTCACTTA		
PALB2-ex3-F	CTGGGGCTGTTTTTGTCTCC	139	58°C
PALB2-ex3-R	GTCTAGATTTACCTGAGTGTTT		
PALB2-ex6-F	AGACTAATGATGTGACTTTTGT	131	58°C
PALB2-ex6-R	CGAGACACTGGAAGAGAATA		
PALB2-ex7-F	GCCATTGTGTCAGAATCCTT	186	58°C
PALB2-ex7-R	ATTCCCCTTACCTCTGCGA		
PALB2-ex8-F	GCTGCTTTGTTTTATTAGGTT	116	58°C
PALB2-ex8-R	GGAATTACATACCTGATCTC		
PALB2-ex9-F	TATTTGGCTTAGGGCATTGTT	180	58°C

PALB2-ex9-R	TTCTTACCCTCCATCTTCTG		
PALB2-ex10-F	ATTACAGAGGCAAAGAAAACC	131	58 °C
PALB2-ex10-R	AGCTTACCAAATAACAATGTTGT		
PALB2-ex11-F	GTGATCAGCTTATTTATTTTTG	141	58 °C
PALB2-ex11-R	GGTCCCAGCCAGTCATTA		
PALB2-ex12-F	GACAGTCTATTTGGGATATTTA	196	58 °C
PALB2-ex12-R	CACACTTGCCTGCCAGCC		
PALB2-ex13_1-F	TCTTTGTATGCTATCAGGTTC	131	60 °C
PALB2-ex13_1-R	AGAGACAGGTGGGAGGAG		
PALB2-ex13_2-F	ACTTCTCGGTCACTGTACTG	180	60 °C
PALB2-ex13_2-R	GAGGCCCAATATATCCAGAAA		

Για την PCR αντίδραση χρησιμοποιήθηκε η GoTaq πολυμεράση (Promega, ΗΠΑ). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η χρωστική LCGreen Plus (Biofire, ΗΠΑ) η οποία έχει υψηλότερο σήμα φθορισμού σε σχέση με τις άλλες φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση καμπυλών τήξεως. Η χρωστική LCGreen παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 440-470 nm και μέγιστη εκπομπή στα 480-510 nm. Έχει την ικανότητα να προσδέεται στην διπλή έλικα του DNA. Θεωρείται ότι εισέρχεται στην μικρή αύλακα του δίκλωνου μορίου και με τη σύνδεσή του σε αυτό ο φθορισμός του αυξάνει μέχρι και 100 φορές. Η ποσότητα χρωστικής που προσδέεται στο νεοσυντιθέμενο δίκλωνο dsDNA είναι ανάλογη του σήματος του φθορισμού, παρέχοντας έτσι την δυνατότητα τόσο για ποσοτική όσο και για ποιοτική ανάλυση. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση, οι προστιθέμενοι όγκοι καθώς και οι τελικές συγκεντρώσεις τους που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα 4.6. Η χρήση του BSA ήταν σημαντική ώστε να μην είναι κολλώδη τα υάλινα τριχοειδή.

Πίνακας 4.6. Συστατικά της real-time PCR αντίδρασης

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος	Τελική συγκέντρωση
ddH <sub>2</sub> O	2,5 µL	
5X Buffer (Promega)	2 µL	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM, Promega)	1 µL	2,5 mM

Πρόσθιος εκκινητής (20 pmol/μL)	0,2 μL	0,4 pmol/μL
Ανάστροφος εκκινητής (20 pmol/μL)	0,2 μL	0,4 pmol/μL
dNTPs 2mM (Promega)	1 μL	0,2 mM
LCGreen Plus (Biofire, ΗΠΑ)	0,5 μL	0,5X
BSA (10 μg/μL) (NEB)	0,5 μL	0,5 μg/μL
GoTaq πολυμεράση (Promega)	0,1 μL	1U/ μL
DNA δείγματος	1-2μL	25ng
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>10 μL</b>	

Το θερμοκρασιακό κυκλικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε αναφέρεται στον πίνακα 4.7.

Πίνακας 4.7.Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της real-time PCR στο Light Cycler.

Στάδιο PCR	Συνθήκες	
Αρχική Αποδιάταξη	95°C / 10 min	
Αποδιάταξη	95°C / 10 sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση	Θερμοκρασίες που φαίνονται στον πίνακα 4.5 για κάθε σετ εκκινητών / 28 sec	
Επέκταση	72 °C / 28 sec	
Ψύξη	40°C/ 30sec	

Στις αντιδράσεις της real-time PCR, μετά την ενίσχυση πραγματοποιήθηκε πρόγραμμα τήξης στο LightScanner κατά το οποίο η θερμοκρασία μετά από αρχική αποδιάταξη στους 95 °C, μειώνεται σταδιακά στους 40 °C καταγράφοντας τον φθορισμό κάθε 0,1 sec μέχρι του 60 °C. Η καμπύλη τήξης, η οποία και σχεδιάζεται αυτόματα από το όργανο, προκύπτει όταν το PCR προϊόν αποδιατάσσεται και η

χρωστική η οποία είναι δεσμευμένη στο DNA παράγει υψηλή ένταση φθορισμού. Έτσι τα προϊόντα μπορούν να διαφοροποιηθούν ανάλογα με το  $T_m$  τους καθώς διαφορετικό  $T_m$  δίνει διαφορετική καμπύλη τήξεως. Το  $T_m$  επηρεάζεται από την αλληλουχία του προϊόντος και κατ' επέκταση από την ύπαρξη μεταλλάξεως. Ο πίνακας 4.8 συνοψίζει το θερμοκρασιακό πρόγραμμα τήξης που χρησιμοποιήθηκε. Τα δείγματα τοποθετούνταν ανά οκτάδες για ανάλυση καθώς σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων παρατηρήθηκε αλλοίωση των καμπύλων τήξης προς το χειρότερο.

Πίνακας 4.8. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα καμπύλης τήξης.

Στάδιο ανάλυσης τήξης	Θερμοκρασία	Ρυθμός τήξης
Θερμοκρασία έναρξης	60 °C	0,01 °C/sec
Θερμοκρασία λήξης	95 °C	
Θερμοκρασία ψύξης	40 °C	

#### 4.1.3 DNA Sequencing

##### Συνθήκες PCR για τους εκκινητές του γονιδίου *PALB2*

Για το γονίδιο *PALB2* οι εκκινητές για τη PCR ελήφθησαν από το άρθρο του Marc Tischkowitz (98) και επιβεβαιώθηκαν στο διαδικτυακό τόπο του Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Το πρόγραμμα αυτό βρίσκει τις περιοχές του γονιδιώματος που είναι συμπληρωματικές μεταξύ βιολογικών αλληλουχιών (BLAST). Λόγω του μεγάλου μεγέθους των εξονίων 4 και 5 αυτά χωρίστηκαν σε 4 και 2 κομμάτια αντίστοιχα. Οι εκκινητές παρασκευάστηκαν από την IDT (Integrated DNA Technology, ΗΠΑ). Παρασκευάστηκαν για τον κάθε εκκινητή διαλύματα παρακαταθήκης 100 pmole/μL (stock) εν συνεχεία παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας 20 pmole/μl (work). Στους παρακάτω πίνακες 4.5 – 4.7 καταγράφονται οι ακολουθίες των εκκινητών για τις αντιδράσεις PCR καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης PCR για το γονίδιο *PALB2*.

Πίνακας 4.9. Χαρακτηριστικά εκκινητών για τις αντιδράσεις PCR του γονιδίου PALB2(98).

Εξόνιο	Εκκινητής	Αλληλουχία 5' - 3'	bp	Tm (°C)	Προϊόν (bp)
1	Πρόσθιος	gtg cgc agg ccg aat ggt	18	61	286
	Ανάστροφος	agt cct gcg tcc gcc ctt c	19		
2,3	Πρόσθιος	gtg cta ctc cct gcc tct tg	20	61	471
	Ανάστροφος	cac act gtg gga aaa aga aca a	22		
4a	Πρόσθιος	tgt cac tga ttc ttt ctt aaa taa atg tt	29	61	594
	Ανάστροφος	tgg gca gtt ggt gga att a	19		
4b	Πρόσθιος	gca aaa atc ctg cta gat cac c	22	60	556
	Ανάστροφος	aga ttt tca ttc ctg cca tca	21		
4c	Πρόσθιος	cca gca aat gaa aac caa aa	20	54	396
	Ανάστροφος	gca tgt gcc aga cat cct aa	20		
4d	Πρόσθιος	gag tca ttt gga tgt caa gaa aaa	24	60	470
	Ανάστροφος	aag gaa gtg cca ggc aaa ta	20		
5a	Πρόσθιος	ttg tct gtt ttg ttg ggt ttt g	22	60	507
	Ανάστροφος	gcg caa ccg tat tta aag ga	20		
5b	Πρόσθιος	aca tcc caa aag gcc aaa ct	20	60	569
	Ανάστροφος	taa acg tgg aag gcc caa t	19		
6	Πρόσθιος	att tgg agc ttt gct gct gt	20	58	275
	Ανάστροφος	tga ctg aat tct ttt cag ttc att	24		
7	Πρόσθιος	tgc ttt gca taa aac agc act	21	58	315
	Ανάστροφος	gca tgg tca tag ctc cca at	20		
8	Πρόσθιος	caa aaa tga aac aac caa gca	21	55	203
	Ανάστροφος	tgc act taa aac cag ctg aca	21		

9	Πρόσθιος	cct agg cga cag agc aag ac	20	60	392
	Ανάστροφος	att aca ccc cca gca cag aa	20		
10	Πρόσθιος	cag ttc aac aat gcg gag aa	20	58	278
	Ανάστροφος	tct tca caa caa ccc tgt aaa a	22		
11	Πρόσθιος	ttt ccc tgg tca cct cct aa	20	58	290
	Ανάστροφος	cgg gga agg ttt gtt cat ta	20		
12	Πρόσθιος	ttg ttt ggt ttt tgt ctc tgc	21	58	259
	Ανάστροφος	tgt gtt tgc aca gtg cct tt	20		
13	Πρόσθιος	tgg gaa cat ggt ttt gac ct	20	56	643
	Ανάστροφος	tgc ttc tgc aaa tga tct tga	21		

Πίνακας 4.10. Συστατικά της αντίδρασης PCR για το γονίδιο PALB2.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
Πρόσθιος εκκινητής (20 pmol/μl)	0,5	0,4 pmol/μl
Ανάστροφος εκκινητής (20 pmol/μl)	0,5	0,4 pmol/μl
dNTP's (2 mM), (NEB), (10X)	2,5	200 μM
MgCl <sub>2</sub> (25 mM), Promega	1,5	1,5 mM
10X PCR buffer, Promega	2,5	1X
GoTaq πολυμεράση (5 U/μl), Promega	0,2	0,04 U/μl
H <sub>2</sub> O	15,8	
DNA	1,5	
Συνολικός όγκος	25	

Πίνακας 4.11: Συνθήκες της αντίδρασης PCR του γονιδίου PALB2.

Στάδιο PCR	Συνθήκες	
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων	94°C / 4 min	
Διαχωρισμός των κλώνων	94°C / 1 min	
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	T °C του πίνακα 4.1 ανάλογα με τον Tm του εκκινητή / 1 min	40 κύκλοι
Επέκταση των εκκινητών	72 °C / 1 min	
Τελικό στάδιο επέκτασης εκκινητών	72°C / 5 min	
Ψύξη	8°C	

#### **Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης**

Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% όπως έχει προαναφερθεί.

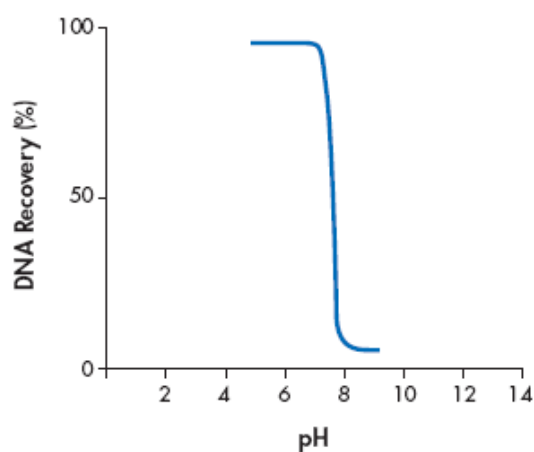
#### **Καθαρισμός PCR προϊόντων**

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων έγινε με το πρωτυποποιημένο σετ αντιδραστηρίων QIAquick της Qiagen (Γερμανία). Το σύστημα της QIAquick συνδυάζει την εύκολη χρήση των στηλών με τις ιδιότητες επιλεκτικής πρόσδεσης της μεμβράνης από πυρίτιο. Παρέχονται ειδικά διαλύματα με το kit που μεγιστοποιούν την ικανότητα ανάκτησης του DNA και το ποσοστό αφαίρεσης των επιμολύνσεων. Το DNA απορροφάται στην μεμβράνη με την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων άλατος ενώ οι προσμίξεις διαπερνούν την στήλη. Οι προσμίξεις απομακρύνονται με πλύσεις και το καθαρό DNA εκλύεται με το ρυθμιστικό διάλυμα (EB διάλυμα 10 mM Tris – Cl, pH 8,5).

Σε κάθε QIAquick στήλη μπορούν να προσδεθούν μέχρι 10 µg DNA. Το διάλυμα πρόσδεσης, παρέχει την κατάλληλη συγκέντρωση άλατος και το κατάλληλο pH για την απορρόφηση του DNA στην μεμβράνη. Η απορρόφηση των νουκλεϊκών οξέων

στη σίλικα γίνεται μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις χαοτροπικών αλάτων που αλλάζουν την δομή του νερού.

Η κατακράτηση του DNA εξαρτάται επίσης και από το pH. Η απορρόφηση είναι τυπικά 95%, αν το pH είναι  $\leq 7.5$ , και μειώνεται δραστικά σε υψηλότερο pH (εικόνα 4.5). Αν το μίγμα που φορτώνεται έχει  $\text{pH} > 7.5$  το ιδανικό pH για την πρόσδεση του DNA μπορεί να επιτευχθεί προσθέτοντας ένα μικρή ποσότητα οξικού νατρίου, (pH 5.0). Όταν το pH του διαλύματος μετά την προσθήκη του PB είναι καλό, το χρώμα του διαλύματος είναι κίτρινο. Όταν το pH του διαλύματος είναι πολύ υψηλό, τότε το χρώμα του διαλύματος γίνεται μωβ.



**Σχήμα 4.5:** Σχέση πρόσδεσης του DNA στην μεμβράνη με το pH.

Το διάλυμα PB παρέχει αποτελεσματική πρόσδεση μονόκλωνων και δίκλωνων PCR προϊόντων μεγέθους μέχρι 100 bp και ποσοτική (99.5%) αφαίρεση εκκινητών μέχρι και 40 νουκλεοτίδια.

Κατά το στάδιο της πρόσδεσης του DNA η περίσσεια των εκκινητών και οι προσμίξεις όπως άλατα, ένζυμα, μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια, αγαρόζη, χρωστικές, βρωμιούχο αιθίδιο, δεν συνδέονται στην μεμβράνη και την διαπερνούν. Τα άλατα εκλύονται από το διάλυμα αιθανόλης PE. Όποια υπολείμματα ενζυματικών αντιδράσεων απομακρύνονται με μια επιπλέον φυγοκέντρωση.

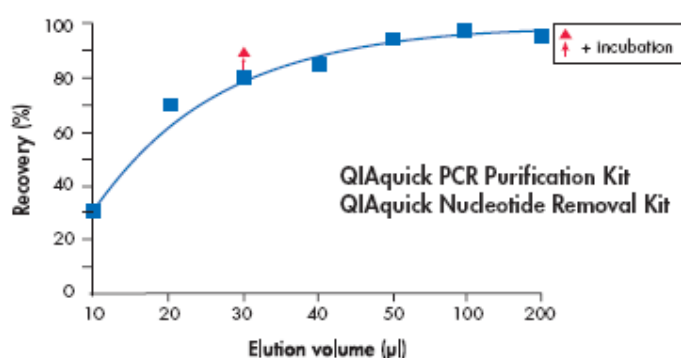
Η αποτελεσματικότητα της έκλυσης του DNA εξαρτάται από την συγκέντρωση του αλάτος και από το pH του διαλύματος έκλυσης. Αντίθετα με την πρόσδεση, η έκλυση του DNA από την μεμβράνη είναι πιο αποτελεσματική σε βασικές συνθήκες



και χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος. Το DNA εκλύεται με 50 ή 30 μl από το EB ή με νερό. Η μέγιστη ικανότητα έκλουσης επιτυγχάνεται μεταξύ pH 7.0 και 8.5.

Η απόδοση του DNA εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες:

- Όγκος του διαλύματος έκλουσης (Σχήμα 4.6)
- Πως εφαρμόζεται το διάλυμα στη στήλη
- Τον χρόνο επώασης του διαλύματος την στήλη



**Σχήμα 4.6:** Επίδραση του όγκου του ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM Tris-Cl, pH 8,5 στην απόδοση απομόνωσης του DNA.

#### **Αντιδραστήρια / Υλικά/Εξοπλισμός**

- Πιπέτες (Thermo, Fisher ΗΠΑ) των 10 μl, 100 μl , 200 μl και 1000 μl
- Ρύγχη των 10 μl, 200 μl και 1000 μl
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus,Thermo Fisher, ΗΠΑ)
- Συσκευή Vortex (Fisher, ΗΠΑ)
- Σωληνάρια τύπου eppendorfs των 1,5 ml
- Στήλες QIAquick
- Αιθανόλη 96-100%
- 3M οξικό άλας του νατρίου, pH 5,0

### ***Πειραματική πορεία***

1. Προστίθεται όγκος PB 5 φορές μεγαλύτερου από τον όγκο του μίγματος του δείγματος.
2. Αν ο δείκτης pH έχει προστεθεί στο διάλυμα PB, ελέγχουμε το χρώμα του διαλύματος να είναι κίτρινο. Αν το χρώμα του δείγματος είναι μωβ, τότε προστίθενται 10 μl οξικού άλατος νατρίου 3M.
3. Τοποθετείται η QIAquick στήλη στο σωληνάριο 2 ml που παρέχεται από το kit.
4. Τοποθετείται το δείγμα την στήλη και φυγοκεντρείται για 30- 60 sec στα 17900 x g.
5. Το διήθημα απορρίπτεται και τοποθετείται η στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο.
6. Προστίθενται 750 μl διάλυμα PE στη στήλη και φυγοκεντρούμε για 30- 60 sec στα 17900 x g.
7. Το διήθημα απορρίπτεται και τοποθετείται η στήλη μέσα στο ίδιο σωληνάριο και φυγοκεντρείται στα 17900 x g για ένα επιπλέον λεπτό.
8. Τοποθετείται η στήλη σε ένα καθαρό eppendorf των 1,5 ml.
9. Για την έκλουση του DNA, προστίθενται 30 μl EB. Ακολουθεί επώαση 1 min και μετά φυγοκέντρηση στα 17900 x g για 1 min.

### ***Αντίδραση θερμικών κύκλων (cycle sequencing)***

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 διαφορά είναι ότι μόνο ένας εκκινητής χρησιμοποιείται σε κάθε αντίδραση cycle sequencing (είτε ο πρόσθιος είτε ο ανάστροφος), ώστε η ενίσχυση του προϊόντος να είναι γραμμική και όχι εκθετική. Μια άλλη διαφορά είναι ότι τα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) που χρησιμοποιούνται διακόπτουν την επέκταση του DNA όταν ενσωματωθούν. Τα διδεοξυνουκλεοτίδια είναι νουκλεοτίδια που τους λείπει η 3'-υδροξυλομάδα στο σάκχαρο της δεοξυριβόζης τους. Αφού η δεοξυριβόζη έχει ήδη έλλειψη της 2'-OH, η διδεοξυριβόζη έχει έλλειψη των υδροξυλομάδων και στον 2' και στον 3' άνθρακα. Λόγο της έλλειψης αυτής αφού η DNA πολυμεράση προσθέσει ένα διδεοξυνουκλεοτιδιο στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, δεν μπορούν να προσδεθούν από εκεί και πέρα άλλα νουκλεοτίδια, αφού δεν μπορεί να δημιουργηθεί φωσφοδιεστερικός δεσμός ο οποίος είναι απαραίτητος για την

ένωση των δύο δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Έτσι τερματίζεται η επέκταση της αλυσίδας. Επειδή η αντίδραση του cycle sequencing είναι μια διαδικασία γραμμικής ενίσχυσης είναι λιγότερο επιρρεπής στις επιμολύνσεις, αλλά παρόλα αυτά δεν παύει να χρειάζεται στείρες συνθήκες (120). Στους πίνακες 4.12 και 4.13 καταγράφονται τα συστατικά και οι θερμοκρασιακές συνθήκες της αντίδρασης cycle sequencing.

Πίνακας 4.12. Συστατικά της αντίδρασης cycle sequencing για το γονίδιο PALB2.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
RRmix (Applied Biosystems, Life Technologies, ΗΠΑ)	1	
5X sequencing buffer, ABI	7	1,75X
Εκκινητής (5 pmol/μl)	1	0,25 pmol/μl
H <sub>2</sub> O	9	
Κεκαθαρμένο PCR προϊόν	2	
Σύνολο	20	

Πίνακας 4.13. Συνθήκες της αντίδρασης cycle sequencing για τους εκκινητές του γονιδίου PALB2.

Στάδιο cycle sequencing	Συνθήκες	
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων	96°C / 1min	
Διαχωρισμός των κλώνων	96°C / 10 sec	25 κύκλοι
Υβριδισμός του εκκινητή	50°C / 10 sec	
Επέκταση του εκκινητή	60°C / 4 min	
Ψύξη	8°C	

### ***Καθαρισμός cycle sequencing προϊόντων***

Για τον καθαρισμό των cycle sequencing προϊόντων δοκιμάστηκαν τρεις μέθοδοι. Το προτυποποιημένο σετ αντιδραστηρίων Nucleoseq της Machete – Nagel (Γερμανία), το προτυποποιημένο σετ αντιδραστηρίων Big Dye Exterminator (Applied Biosystems, ΗΠΑ) και καθαρισμός με καθίζηση μέσω αιθανόλης και EDTA. Και οι τρεις μέθοδοι είχαν περίπου τα ίδια αποτελέσματα με καλύτερη τη μέθοδο καθαρισμού με αιθανόλη αλλά επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε το kit της Machete – Nagel (Γερμανία) γιατί η διαδικασία ήταν πολύ πιο γρήγορη.

### ***Μέθοδος με στήλες***

Το kit αυτό αποτελείται από στήλες Nucleoseq. Οι στήλες αυτές είναι σχεδιασμένες για τον γρήγορο και αποτελεσματικό καθαρισμό νουκλεϊκών οξέων. Περιέχουν gel το οποίο παρέχει αξιόπιστη αφαίρεση των μικρότερων μορίων από τα νουκλεϊκής οξέα. Ακαθαρσίες όπως άλατα, περίσσεια επισημάτων, νουκλεοτίδια, ίχνη οργανικών διαλυτών και εκκινητών συγκρατούνται από τη στήλη ενώ τα νουκλεϊκής οξέα που μας ενδιαφέρουν ανακτούνται με υψηλή απόδοση.

### ***Αντιδραστήρια / Υλικά/Εξοπλισμός***

- Πιπέτες (Thermo, Fisher ΗΠΑ) των 100μl και 1000μl
- Ρύγχη των 200μl και 1000μl
- Φυγόκεντρος (Biofuge, Heraeus, Thermo Fisher, ΗΠΑ)
- Στείρο νερό (BIOSEP A.E, Ελλάδα)
- Συσκευή Vortex (Fisher, ΗΠΑ)
- Σωληνάκια τύπου eppendorfs των 1,5 ml
- Στήλες NucleoSEQ ( Macherey – Nagel, Γερμανία).

### ***Πειραματική πορεία***

- Φυγοκέντρωση των στηλών NucleoSEQ για 30 sec στα 750 x g για να συλλεχθεί στον πυθμένα, η πηκτή που βρίσκεται σε σκόνη μέσα στις στήλες.
- Προσθήκη 600μl στείρου νερού και έντονη ανακίνηση ώστε να ενυδατωθεί το gel. Αφαιρούνται οι φυσαλίδες κάνοντας vortex.

- Επώαση τουλάχιστον 30 min ή όλη τη νύχτα. Η επώαση μπορεί να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C. Οι ενυδατωμένες στήλες μπορούν να φυλαχθούν στους 4°C για τον πολύ 14 μέρες. Γίνεται ανασύσταση του gel που έχει συγκεντρωθεί στον πάτο της στήλης κάνοντας έντονη ανάδευση. Δεν πρέπει να δημιουργηθούν φυσαλίδες. Αφαιρείται το πώμα που βρίσκεται στον πυθμένα της στήλης και τοποθετείται η στήλη μέσα στο δοχείο συλλογής.
- Φυγοκέντρωση για 2 min στα 750 x g για να αφαιρεθεί το διάλυμα αποθήκευσης που περισσεύει. Απορρίπτεται το δοχείο συλλογής με το διάλυμα και τοποθετείται η στήλη στο κατάλληλο δοχείο συλλογής .
- Ανοίγεται το καπάκι της στήλης. Προσεκτικά φορτώνεται το δείγμα στο κέντρο του gel χωρίς να διαταραχτεί η επιφάνειά του. Η τοποθέτηση του δείγματος στα πλάγια της στήλης μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της αποτελεσματικότητας της στήλης. Ο όγκος του δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 20 μl.
- Φυγοκέντρωση της στήλης για 4 – 6 min στα 750 x g. Απορρίπτουμε τη στήλη ξηραίνουμε το δείγμα ή το χρησιμοποιούμε απευθείας.

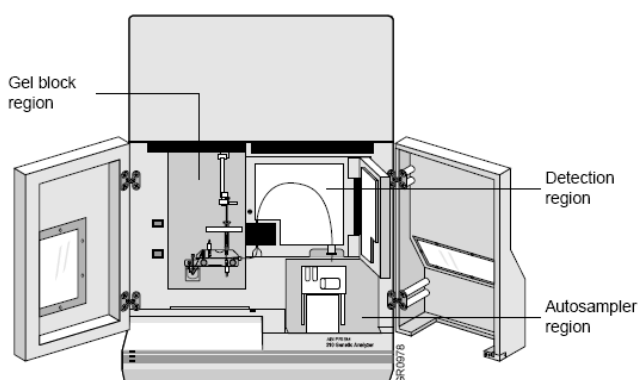
#### ***Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση αλληλουχίας του DNA***

Η ανάλυση της αλληλουχίας των δειγμάτων έγινε στον γενετικό αναλυτή ABI 310 (Applied Biosystems, ΗΠΑ). Ο γενετικός αναλυτής ABI 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 γεμίζει με πολυμερές. Το ηλεκτρόδιο της ανόδου από το άλλο άκρο του τριχοειδούς είναι βυθισμένα στο ρυθμιστικό διάλυμα. Το δείγμα εισέρχεται στο τριχοειδές καθώς το 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 CCD κάμερα. Κάθε περιοχή αντιστοιχεί σε ένα φάσμα μηκών κύματος που περιέχει ή είναι κοντά στο μέγιστο της εκπομπής της χρωστικής του ABI prism. 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. Οι ακριβείς θέσεις των CCD περιοχών και οι κατάλληλοι συνδυασμοί των χρωστικών για αυτές τις θέσεις εξαρτώνται από τις ομάδες των εικονικών φίλτρων που χρησιμοποιούνται. 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.



**Σχήμα 4.7:** Γενετικός Αναλυτής ABI 310.

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 Α με πράσινο, το C με μπλε, το G με μαύρο και το T με κόκκινο στο ηλεκτροφορογράφημα. Το αρχείο λαμβάνεται σε FASTA μορφή και μπορεί να το συγκριθεί με τη φυσιολογική αλληλουχία του *PALB2* μέσω BLAST του Pubmed ή όταν υπάρχουν πολλές συγκρίσεις ταυτόχρονα με το Cluster W2 ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) ή με το πρόγραμμα CLC (Qiagen Bioinformatics, Aarhus Δανία). Στον πίνακα 4.15 φαίνονται οι χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και τα μήκη κύματος στα οποία έχουν μέγιστη εκπομπή και απορρόφηση. Για την χρωστική PET δεν είναι διαθέσιμα τα δεδομένα.

*Πίνακας 4.14 Εύρος περιοχών των μηκών κύματος των ομάδων των εικονικών φίλτρων.*

<b>Ομάδα εικονικού φίλτρου</b>	<b>Χρώμα</b>	<b>Εύρος μήκους κύματος του εικονικού φίλτρου</b>
A	Μπλε	530-541
	Πράσινο	554-564
	Μαύρο	581-591
	κόκκινο	610-620
E	Μπλε	535-545
	Πράσινο	565-575
	Μαύρο	590-600
	κόκκινο	620-630

Πίνακας 4.15 Μέγιστη απορρόφηση και εκπομπή των χρωστικών.

Χρωστική	Μέγιστη απορρόφηση (nm)	Μέγιστη εκπομπή (nm)
NED	546	575
6FAM	494	518
VIC	538	552
PET	-	-

#### **Αντιδραστήρια / Υλικά/ Εξοπλισμός**

- Επωαστήρας σωληναρίων (Grant, Αγγλία)
- Πιπέτες (Thermo, Fisher, ΗΠΑ) των 100 µl
- Στείρο νερό (BIOΣΕΡ Α.Ε, Ελλάδα)
- Συσκευή Vortex (Fisher, ΗΠΑ)
- Σωληνάρια τύπου erpedorfs των 1,5 ml
- Πολυμερές POP4 (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10X (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- Φορμαμίδιο (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- Σωληνάρια αντίδρασης 0,5 ml (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- Τριχοειδές 47 mm (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- Γενετικός Αναλυτής ABI 310 (Applied Biosystems, ΗΠΑ)

#### **Πειραματική πορεία**

- Τοποθετείται σε ένα σωληνάριο τύπου Eppendorf των 1,5 ml, 10 µl από το καθαρό cycle sequencing προϊόν και 10 µl φορμαμίδιο.
- Επιάζεται τους 95°C για 2 min και στην συνέχεια στους 4 °C για άλλα 2 min.
- Τα μεταφέρονται τα σωληνάρια αντίδρασης των 0,5 ml και τα φορτώνονται στον γενετικό αναλυτή ABI310.

#### **Έλεγχος ποιότητας των αποτελεσμάτων**

Ο έλεγχος ποιότητας του μηχανήματος στην ικανότητά του να διαβάζει τις βάσεις έγινε με το πλασμίδιο pGEM (Applied Biosystems, ΗΠΑ). Αφού ακολουθήθηκαν



όλες οι παραπάνω διαδικασίες ελέγχθηκε ο αριθμός και το ποσοστό των βάσεων που διαβάζει σωστά ο γενετικός αναλυτής.

Για τον έλεγχο ικανότητας του αναλυτή να εντοπίζει και να παρουσιάζει τις παθολογικές μεταλλάξεις αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης χρησιμοποιήθηκε η μετάλλαξη *BRCA1* 5382insC που έχει ελεγχθεί με τρεις διαφορετικές μεθοδολογίες σε προηγούμενη μελέτη (142).

#### **4.1.4 MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)**

Για την ανάλυση MLPA χρησιμοποιήθηκε το Salsa MLPA probemix P260-A1 PALB2-RAD50-RAD51C kit (MRC-Holland, Ολλανδία). Το kit αυτό περιέχει ανιχνευτές για τα 13 εξόνια του γονιδίου *PALB2*, τα εξόνια 1, 4, 9, 15, 21, 25 του γονιδίου *RAD50* και τα 9 εξόνια του γονιδίου *RAD51C* και έτσι έχει την δυνατότητα να ανιχνεύει απαλοιφές/διπλασιασμούς μιας ή περισσότερων μεγάλων αναδιατάξεων από τα παραπάνω γονίδια μέσα στο δείγμα DNA.

#### **Αντιδραστήρια/Υλικά/Εξοπλισμός**

- Πιπέτες (Thermo, Fisher, ΗΠΑ) των 10 μl και 200 μl
- Ρύγχι των 10 μl και 200 μl
- Σωληνάρια των 200 μl
- SALSA MLPA probemix P260-A1 kit(MRC-Holland, Ολλανδία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα TE (AmpliChem, Γερμανία)
- *LIZ-500 size standard* (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- *Φορμαμίδιο* (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- *Πολυμερές POP7* (Applied Biosystems, ΗΠΑ)
- Θερμικός κυκλοποιητής Primus25 (MWG, Γερμανία)
- Γενετικός Αναλυτικής ABI 3500 ( Applied Biosystems, ΗΠΑ)

#### **Πειραματική πορεία**

##### *Επεξεργασία δείγματος*

- Σε σωληνάρια των 200 μl προστέθηκε δείγμα DNA και ποσότητα TE ρυθμιστικού διαλύματος ώστε η συγκέντρωση του DNA να είναι περίπου 100 ng σε τελικό όγκο 5 μl. Το βήμα αυτό αποσκοπεί στην ρύθμιση του pH του DNA που πρέπει να είναι μεταξύ 8.0-8.5 ώστε να αποφευχθεί αποπουρίνωση κατά την διάρκεια της αρχικής επώασης στους 98 °C.

### Αποδιάταξη DNA

- Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 5min στους 98 °C και στη συνέχεια ψύξη στους 25 °C στον θερμικό κυκλοποιητή.

### Αντίδραση υβριδισμού (Hybridization Reaction)

- Ανακινήθηκαν καλά το ρυθμιστικό διάλυμα *MLPA buffer* και το διάλυμα *MLPA probemix* και δημιουργήθηκε master mix το οποίο να περιλαμβάνει 1,5 μl *MLPA buffer* +1.5 μl *MLPA probemix* για κάθε αντίδραση.
- Προστέθηκαν 3 μl από το master mix υβριδισμού σε κάθε δείγμα και αναδεύτηκαν καλά.
- Επώαστηκαν για 1min στους 95 °C και στη συνέχεια για 20 ώρες στους 60 °C.

### Αντίδραση ένωσης (Ligation Reaction)

- Αναδεύονται τα ρυθμιστικά διαλύματα *Ligase buffer A* και *Ligase buffer B* και δημιουργείται το Ligase-65 master mix το οποίο περιλαμβάνει 25 μl dH<sub>2</sub>O, 3 μl *Ligase buffer A*, 3 μl *Ligase buffer B* και 1 μl *Ligase-65 ένζυμο* για κάθε αντίδραση.
- Τα δείγματα επωάζονται στους 54 °C και μόλις φτάσουν αυτή την θερμοκρασία προστίθενται 32 μl από το Ligase-65 master mix που μόλις παρασκευάστηκε.
- Ακολουθεί επώαση για 15 min στους 54 °C (για την ένωση) και στη συνέχεια επώαση για 5 min στους 98 °C για θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου *Ligase-65*. Ψύχονται οι αντιδράσεις στους 20 °C. Σ αυτό το σημείο τα σωληνάρια μπορούν να φυλλαχθούν στους 4 °C για αρκετές ώρες μέχρι και μία βδομάδα.

### Αντίδραση PCR

- Αναδεύεται το *SALSA PCR primer mix* και δημιουργείται το master mix της πολυμεράσης το οποίο περιλαμβάνει για κάθε αντίδραση 7,5 μl dH<sub>2</sub>O, 2 μl *SALSA PCR primer mix* και 0,5 μl *SALSA polymerase*.
- Ενώ τα δείγματα που έχουν προετοιμαστεί βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου προστίθενται 10 μl από το master mix της πολυμεράσης και ακολουθεί το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που φαίνεται στον πίνακα 5.16.

- Μετά την αντίδραση PCR τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν σε σκουρόχρωμο κουτί, διότι οι φθορίζουσες χρωστικές είναι φωτοευαίσθητες, και δύνανται να αντέξουν στους 4 °C για μια βδομάδα και στους -20 °C για μεγαλύτερα διαστήματα.

Πίνακας 4.16. Θερμοκρασιακές συνθήκες PCR.

Στάδιο PCR	Συνθήκες	
Διαχωρισμός των κλώνων	95°C / 30 sec	35 κύκλοι
Υβριδισμός του εκκινητή	60°C / 30 sec	
Επέκταση του εκκινητή	72°C / 30sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης εκκινητών	72°C/ 20min	

#### Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση PCR αντίδρασης-Ανάλυση

- Το κάθε σωληνάριο που εισήχθηκε στον αναλυτή προς ανάλυση περιείχε 0,75 μl από την PCR αντίδραση, 0,75 μl dH<sub>2</sub>O, 0,5 μl *LIZ size standard* και 13,5 μl φορμαμίδιο.
- Τα σωληνάρια επωάστηκαν για 2 min στους 80 °C και ακολούθησε ψύξη σε πάγο για άλλα 2 min.
- Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων έγινε στον αναλυτή ABI-3500 με την χρήση τριχοειδούς 50 cm, πολυμερές *POP7* και τις ρυθμίσεις εξής ρυθμίσεις: injection voltage 1,6 kV, injection time 10sec, run voltage 15 kV, run time 3600 sec.
- Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Coffalyzer.Net Version 2014 (MRC-Holland, Ολλανδία)

## 4.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ *PALB2* ΓΟΝΙΔΙΟΥ

### *Δείγματα ασθενών*

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

Ο ιστολογικός τύπος και η διαβάθμιση διαγνώστηκε σύμφωνα με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Εξετάστηκαν με ανοσοϊστοχημεία (IHC) οι υποδοχείς οιστρογόνων (ER), προγεστερόνης (PgR) και το ογκογονίδιο HER2. Στην περίπτωση που η τιμή για το *HER2* ήταν 2 εξεταζόταν και με τη μέθοδο CISH.

### *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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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.τ.λ.. Το κλασικό πρωτόκολλο επιτρέπει τον καθαρισμό έως 70 µg ολικού RNA (>200 nt) ανά *NucleoSpin<sup>®</sup> RNA/Protein* στήλη από 30 mg ιστού.

#### **Αντιδραστήρια/ Υλικά/ Εξοπλισμός**

- Υγρό άζωτο
- Ρυθμιστικό διάλυμα RP1 (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (AppliChem, Γερμανία)
- *NucleoSpin<sup>®</sup>* φίλτρα (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- *NucleoSpin<sup>®</sup> RNA* στήλες (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα MDB (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Λυοφιλιωμένη rDNάση (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης για rDNάση (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα RA2 (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα RA3 (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- *RNase-free* H<sub>2</sub>O (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Διάλυμα αιθανόλης 70 % από αιθανόλη 100 % (Scharlab, Ισπανία)
- Επωαστήρας σωληναρίων (Grant, Ηνωμένο Βασίλειο)
- Συσκευή *Vortex* (Fisher, ΗΠΑ)
- Μικροφυγόκεντρος *Minispin plus* (Eppendorf, Γερμανία)
- Σωληνάρια τύπου *Eppendorf* 1,5 mL

#### **Πειραματική πορεία**

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

##### *Προετοιμασία δείγματος*

- Αρχικά, απομακρύνεται το διάλυμα *RNAlater<sup>®</sup>* και ~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  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος λύσης RP1 και 3,5  $\mu\text{L}$   $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη στον κονιορτοποιημένο ιστό και ακολουθεί έντονη ανάδευση.

#### *Διήθηση του διαλύματος*

- Το διάλυμα μεταφέρεται στο *NucleoSpin*<sup>®</sup> φίλτρο και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 $\times$  g.

#### *Ρύθμιση συνθηκών πρόσδεσης του RNA*

- Έπειτα, το *NucleoSpin*<sup>®</sup> φίλτρο απορρίπτεται και προστίθενται 350  $\mu\text{L}$  διαλύματος αιθανόλης 70 % στο διήθημα με επακόλουθη έντονη ανάδευση.

#### *Πρόσδεση του RNA*

- Το διήθημα φορτώνεται στην *NucleoSpin*<sup>®</sup> RNA στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 sec στα 11.000 $\times$  g (Το DNA και το RNA είναι προσδεδεμένα στην μεμβράνη πυριτίου, ενώ οι πρωτεΐνες βρίσκονται στο διήθημα, επομένως σε κάποια δείγματα που θέλουμε να απομονώσουμε και τις πρωτεΐνες τους, το διήθημα φυλάσσεται για περαιτέρω επεξεργασία).

#### *Αφαλάτωση της μεμβράνης πυριτίου*

- Στη συνέχεια, προστίθενται 350  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  ανασυσταθέν rDNάση με 90  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης για την rDNάση και αναδεύονται καλά. Έπειτα, προστίθενται 95  $\mu\text{L}$  μείγματος αντίδρασης rDNάσης απευθείας πάνω στο κέντρο της μεμβράνης πυριτίου της *NucleoSpin*<sup>®</sup> RNA/Protein στήλης. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.

#### *Έκπλυση και στέγνωμα της μεμβράνης πυριτίου*

- 1<sup>η</sup> έκπλυση: Προστίθενται 200  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης RA2 στην *NucleoSpin*<sup>®</sup> RNA/Protein στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 sec στα 11.000 $\times$  g. Το διήθημα απορρίπτεται.

- 2<sup>η</sup> έκπλυση: Προστίθενται 600  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης RA3 στην *NucleoSpin<sup>®</sup> RNA/Protein* στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 sec στα 11.000 $\times$  g. Το διήθημα απορρίπτεται.
- 3<sup>η</sup> έκπλυση: Προστίθενται 250  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης RA3 στην *NucleoSpin<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> RNA/Protein* στήλη τοποθετείται σε νέο *RNase-free* σωληνάριο τύπου *Eppendorf* 1,5 mL.

#### *Έκλυση υψηλής καθαρότητας RNA*

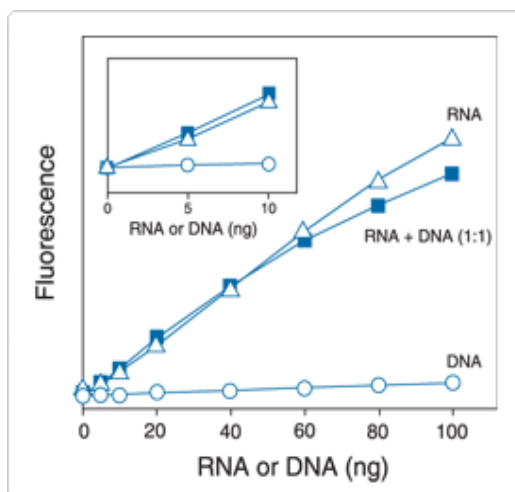
- Προστίθενται 60  $\mu\text{L}$  *RNase-free* H<sub>2</sub>O στην *NucleoSpin<sup>®</sup> RNA/Protein* στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 $\times$  g. Το RNA εκλύεται με το υδάτινο διάλυμα μέσα στο νέο σωληνάριο. Το διήθημα επανατοποθετείται στην *NucleoSpin<sup>®</sup> RNA/Protein* 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 °C για σύντομο χρονικό διάστημα είτε στους -80 °C για μακρύ χρονικό διάστημα. Από το τελικό υδάτινο διάλυμα του RNA χρησιμοποιείται 1  $\mu\text{L}$  για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του.

#### **Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού RNA**

Η συγκέντρωση του RNA υπολογίζεται με μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στο φθορισμόμετρο *Qubit<sup>®</sup>* (Invitrogen, ΗΠΑ).

Η ποσοτικοποίηση του RNA επιτυγχάνεται με την χρήση ουσίας που φθορίζει κατά την εκλεκτική πρόσδεση σε RNA και η οποία παρέχεται με το *Quant-iT<sup>™</sup> 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 προσδεμένη σε μόρια RNA. Η μέτρηση πρότυπων διαλυμάτων – βαθμονομητών τα οποία παρέχονται με το *kit*, επιτρέπει τον αυτοματοποιημένο σχεδιασμό καμπύλης βαθμονόμησης με βάση την οποία γίνεται η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης. Η δοκιμασία είναι ιδιαίτερα εκλεκτική για το RNA έναντι του δίκλωνου DNA και στην περιοχή από 5 έως 100 ng, το σήμα φθορισμού είναι γραμμικά ανάλογο της συγκέντρωσης του RNA (Σχήμα 4.8). Η πειραματική

διαδικασία μπορεί να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου (22 με 28 °C) ενώ η φωτοσταθερότητα των αντιδραστηρίων είναι ιδιαίτερα υψηλή.



**Σχήμα 4.8:** Η RNA εκλεκτικότητα και ευαισθησία του Quant-iT™ RNA Assay Kit.

(<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.

#### **Αντιδραστήρια/Υλικά/Εξοπλισμός**

- Ρυθμιστικό διάλυμα για RNA *Quant-iT™* (Invitrogen, ΗΠΑ)
- Φθορίζον αντιδραστήριο για RNA *Quant-iT™* (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



### Πειραματική πορεία

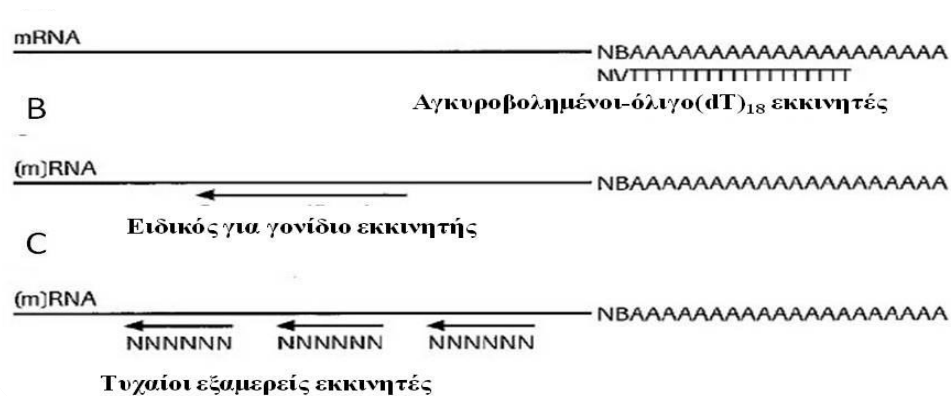
Η πειραματική πορεία μέτρησης της συγκέντρωσης του RNA των δειγμάτων με το φθορισμόμετρο *Qubit*<sup>®</sup> είναι η εξής:

- Αρχικά, εξασφαλίζεται ότι όλα τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στη συνέχεια, αναμειγνύονται (199 × n) μL ρυθμιστικού διαλύματος *Quant-iT*<sup>™</sup> με (1 × n) μL φθορίζοντος αντιδραστηρίου *Quant-iT*<sup>™</sup> (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*<sup>®</sup> 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*<sup>®</sup> η αραίωση των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, η τελική τιμή της συγκέντρωσης του RNA δίνεται από τον τύπο:  $C_{\text{δείγματος}} \text{ (ng/}\mu\text{L)} = \text{QF τιμή} \times (200/x)$   
όπου QF είναι η τιμή της συγκέντρωσης που μετρά το φθορισμόμετρο *Qubit*<sup>®</sup> 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*<sup>®</sup> πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή αραίωσης = 200.

### 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 4.9). Στο *kit* περιλαμβάνονται οι τυχαίοι εξαμερείς εκκινητές (*random hexamer primers*) και οι αγκυροβολημένοι-όλιγο(dT)<sub>18</sub> εκκινητές (*anchored-oligo(dT)<sub>18</sub> 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.



**Σχήμα 4.9:** Επισκόπηση των τριών διαφορετικών συστημάτων εκκινητών κατά τη σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA.

([www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com))

#### **Αντιδραστήρια/Υλικά/Εξοπλισμός**

- *Nuclease-free* PCR σωληνάρια τύπου *Eppendorf* 0,2 mL
- Τυχαίοι εξαμερείς εκκινητές (Roche Applied Science, Γερμανία)
- H<sub>2</sub>O (*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)

#### **Πειραματική πορεία**

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

#### *1<sup>ο</sup> βήμα / αντίδραση*

- Σε ένα *nuclease-free* PCR σωληνάριο τύπου *Eppendorf* 0,2 mL προετοιμάζεται το μείγμα εκμαγείου RNA-εκκινητή για κάθε αντίδραση (αντίδραση = δείγμα) τελικού όγκου 20 μL, προσθέτοντας τα αντιδραστήρια που αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 4.17).

Πίνακας 4.17. Συστατικά μίγματος εκμαγείου RNA-εκκινητή κατά τη σύνθεση του cDNA.

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Όγκος αντιδραστηρίου</b>	<b>Τελική συγκέντρωση αντιδραστηρίου</b>
<i>RNA δείγματος (ή 2 μL RNA αναφοράς - 50 μg/μL)</i>	Μεταβλητός έως 11μL	3 μg (100 ng)
<i>Τυχαίοι εξαμερείς εκκινητές (600 pmol/μL)</i>	2 μL	60 μM
<i>H<sub>2</sub>O (PCR-grade)</i>	Μεταβλητός μέχρι τελικού όγκου 13 μL	
<i>Συνολικός όγκος</i>	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 (143).

### 2<sup>ο</sup> βήμα / αντίδραση

- Στην συνέχεια προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα της αντίδρασης σε τελικό όγκο 7  $\mu\text{L}$ , το οποίο περιλαμβάνει τα αντιδραστήρια που αναφέρονται στον πίνακα 4.18 και προστίθεται στο αρχικό μείγμα.

Πίνακας 4.18. 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 5<math>\times</math></i>	4 $\mu\text{L}$	1 $\times$ (8 mM MgCl <sub>2</sub> )
Αναστολέας RNασών (40 U/ $\mu\text{L}$ )	0,5 $\mu\text{L}$	20 U
Μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (10 mM το καθένα)	2 $\mu\text{L}$	1 mM το καθένα
Αντίστροφη μεταγραφάση <i>Transcriptor</i> (20 U/ $\mu\text{L}$ )	0,5 $\mu\text{L}$	10 U
<i>Συνολικός όγκος</i>	7 $\mu\text{L}$	

- 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 H<sub>2</sub>O στην κάθε αντίδραση.

Στη μελέτη δεν πραγματοποιήθηκε έλεγχος της παρουσίας αναστολέων στα δείγματα με χρήση της δοκιμασίας SPUD (135) ούτε δοκιμασία λόγου 3'/5' (135).

#### **PCR ελέγχου παραχθέντος cDNA**

Προκειμένου να ελεγχθεί η ποιότητα του παραχθέν cDNA, πραγματοποιήθηκε PCR ελέγχου για το γονίδιο αναφοράς *PBGD* (*PorphoBilinoGen Deaminase* – Απαμινάση του πορφυροχολινογόνου) με μείγμα εκκινητών που παρέχονται από το *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit* το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του cDNA. Το συγκεκριμένο γονίδιο ανήκει στην ομάδα των γονιδίων αναφοράς σταθερής έκφρασης (*reference genes*), τα οποία δεν παρουσιάζουν σημαντική διακύμανση στην έκφραση. Οι εκκινητές για το γονίδιο *PBGD* οριοθετούν μια περιοχή 151 bp εντός του γονιδίου. Στην αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκε η *GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA Πολυμεράση* (Promega, ΗΠΑ). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση, οι προστιθέμενοι όγκοι καθώς και οι τελικές συγκεντρώσεις τους φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 4.19).

Πίνακας 4.19. Συστατικά της PCR αντίδρασης για το γονίδιο αναφοράς PBGD.

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα 5× Green GoTaq® Flexi	5 μL	1X
Διάλυμα MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 μL	3 mM
Μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (10 mM το καθένα dNTP)	2,5 μL	0,2 mM το καθένα dNTP
Μείγμα εκκινητών (5 μM)	1 μL	0,2 μM
GoTaq® DNA Πολυμεράση (5 U/μL)	0,2 μL	0,04 U/μL
cDNA δείγματος / αναφοράς	1,5 μL	
ddH <sub>2</sub> O	11,8 μL	
Συνολικός όγκος	25 μL	

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή *Primus* 25 με το θερμοκρασιακό κυκλικό πρωτόκολλο που προτείνεται από το *kit* και περιλαμβάνει αρχική αποδιάταξη των κλώνων του DNA στους 95 °C για 5 min, 35 κύκλους με αποδιάταξη των κλώνων στους 95 °C για 10 sec, υβριδισμό των εκκινητών στους 50 °C για 20 sec και επιμήκυνση της αλυσίδας στους 72 °C για 30 sec. Τέλος, τελική επιμήκυνση της αλυσίδας στους 72 °C για 7 min και ψύξη στους 4 °C (πίνακας 4.20).

Πίνακας 4.20. Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο αναφοράς PBGD.

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

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

Προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα των RNA δειγμάτων κατά την σύνθεση του cDNA, στα μισά δείγματα πραγματοποιήθηκε συμβατική PCR αντίδραση για το

γονίδιο αναφοράς της ακτίνης με εκκινητές που παρουσιάζονται στον πίνακα 4.21. Τα cDNA που είναι ελεύθερα από προσμίξεις γενωμικού DNA παράγουν PCR προϊόν 587 bp (και όχι ένα επιπλέον προϊόν 1122 bp που είναι ενδεικτικό της παρουσίας γενωμικού DNA).

Πίνακας 4.21. Αλληλουχία εκκινητών για το γονίδιο αναφοράς της ακτίνης.

	<i>Αλληλουχία εκκινητή</i>
<b>Πρόσθιος εκκινητής Actin F</b>	5' CCAAGGCCAACC GCGAGAAGATGAC
<b>Ανάστροφος εκκινητής Actin R</b>	5' AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC

Όλα τα cDNA δείγματα φυλάσσονται στους -20 °C.

#### **Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντος για το γονίδιο αναφοράς PBGD**

##### **Αντιδραστήρια/Υλικά/ Εξοπλισμός**

- Tris (AppliChem, Γερμανία)
- Βορικό οξύ (SIGMA, ΗΠΑ)
- EDTA (AppliChem, Γερμανία)
- Αγαρόζη *low* EEO (AppliChem, Γερμανία)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) (10 mg/mL - Invitrogen, ΗΠΑ)
- Κυανούν της βρωμοφαινόλης (SIGMA, ΗΠΑ)
- Φικόλλη (Amersham Biosciences, Ηνωμένο Βασίλειο)
- Δείκτης μοριακών βαρών DNA PCR *Marker* (300 ng/μL) (New England BioLabs, ΗΠΑ)
- DNA *Molecular Weight Marker VIII* (Roche Applied Science, Γερμανία)
- 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)

### ***Πειραματική Πορεία***

Το προϊόν της PCR για το γονίδιο *PBGD* 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).

#### **4.2.1 Έκφραση γονιδίου *PALB2* με Real-time qPCR**

##### ***Πειραματική πορεία***

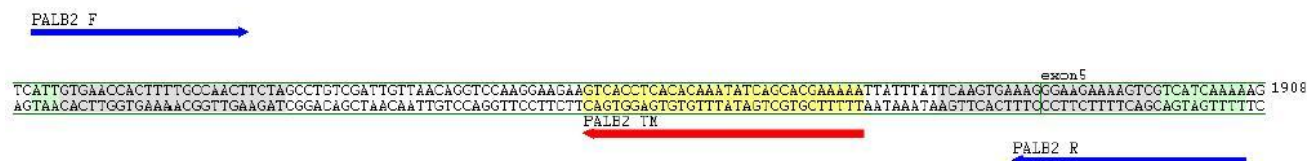
Στην παρούσα εργασία, ο ποσοτικός προσδιορισμός του *PALB2* μεταγράφου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της real-time qPCR με ανιχνευτή TaqMan. Η ποσοτικοποίηση των μεταγράφων βασίστηκε στη μέθοδο του απόλυτου ποσοτικού προσδιορισμού με κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης με σειριακές αραιώσεις πρότυπων διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων του amplicon που προέκυψε από την PCR της καρκινικής κυτταρικής σειράς MCF-7.



Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του μεταγράφου του γονιδίου *PALB2* σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές (Πίνακας 4.22, Σχήμα 4.10) και ανιχνευτής TaqMan. Ο πρόσθιος εκκινητής και ο ανιχνευτής υβριδίζονται στο εξόνιο 4 του *PALB2* γονιδίου ενώ ο ανάστροφος στη σύνδεση των εξονίων 4 και 5 ώστε να εξασφαλίζεται η ειδικότητα του προϊόντος.

Πίνακας 4.22. Αλληλουχία εκκινητών και ανιχνευτή TaqMan.

Εκκινητές/ Ανιχνευτής	Αλληλουχία	cDNA (NM_024675)	Tm
PALB2 πρόσθιος	5'- ATTGTGAACCACTTTTGCCAACT-3'	1777-1799	59,1 °C
PALB2 ανάστροφος	5'- TTTTGATGACGACTTTTCTTCCCTT-3'	1906-1882	59,5 °C
PALB2 TM ανιχνευτής	FAM-TTTTTCGTGCTGATATTTGTGTGAGGTGAC-BBQ	1865-1836	65,0 °C



Σχήμα 4.10: Θέση εκκινητών και TaqMan ανιχνευτή πάνω στο cDNA.

Όλοι οι εκκινητές και ο TaqMan ανιχνευτής παρασκευάστηκαν από την TIB (MolBiol, Γερμανία). Παρασκευάστηκαν για τον κάθε εκκινητή διαλύματα παρακαταθήκης 100 pmol/μL και εν συνεχεία παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας 20 pmol/μL. Ο ανιχνευτής αραιώθηκε σε τελική συγκέντρωση 3 μM.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του *PALB2* μεταγράφου, οι εκκινητές ενισχύουν περιοχή 129 bp (GC % = 38,0) του mRNA.

Οι αντιδράσεις της 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 PCR. Χρησιμοποιεί 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 φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα 4.23.

Πίνακας 4.23. Συστατικά της *real-time qPCR* αντίδρασης.

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Προστιθέμενος όγκος</b>	<b>Τελική συγκέντρωση</b>
ddH <sub>2</sub> O	5,7 μL	
Διάλυμα MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,8 μL	2 mM
Πρόσθιος εκκινητής (20 pmol/μL)	0,25 μL	0,5 pmol/μL
Ανάστροφος εκκινητής (20 pmol/μL)	0,25 μL	0,5 pmol/μL
Ανιχνευτής PALB2TM (3μM)	1 μL	2,4 μM
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe 10×	1 μL	1×
cDNA δείγματος / αναφοράς	1 μL	
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>10 μL</b>	

Το βελτιστοποιημένο θερμοκρασιακό κυκλικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε αναφέρεται στον πίνακα 4.24.

Πίνακας 4.24. Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της real-time qPCR.

Στάδιο PCR	Συνθήκες	
Αρχική Αποδιάταξη	95 °C / 20 min	
Αποδιάταξη	95 °C / 10 sec	45 κύκλοι
Υβριδοποίηση	58 °C / 20 sec	
Επέκταση	72 °C / 20 sec	
Ψύξη	40 °C / 30 sec	

Στις 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 4.25 συνοψίζει το θερμοκρασιακό πρόγραμμα τήξης που χρησιμοποιήθηκε.

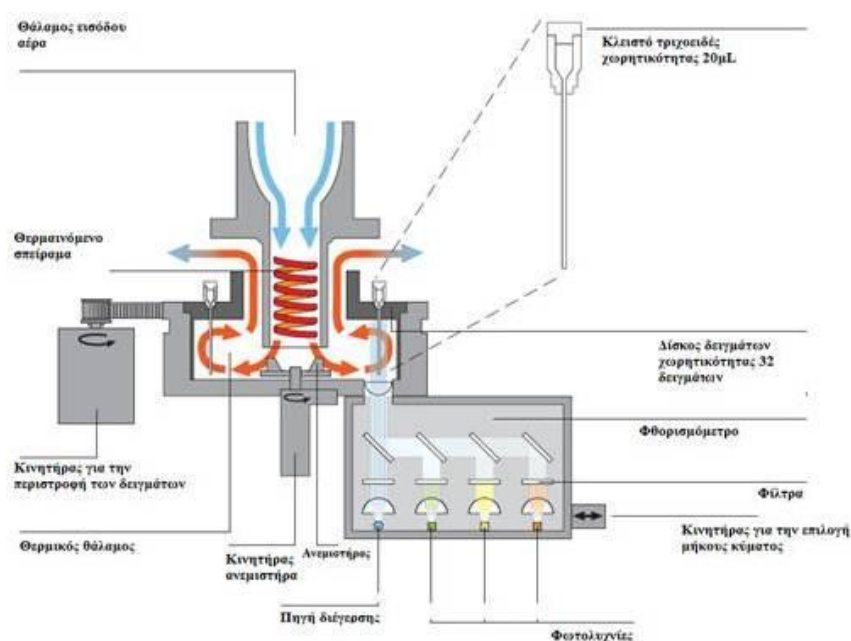
Πίνακας 4.25. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα καμπύλης τήξης.

Στάδιο ανάλυσης τήξης	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

#### Οργανολογία

Όλες οι αντιδράσεις real-time qPCR και οι 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

επιτυγχάνομενη 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 (Σχήμα 4.11). Τα τριχοειδή, με χωρητικότητα 20  $\mu\text{L}$ , 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  $^{\circ}\text{C}$  ανά δευτερόλεπτο και επιτρέπουν την τέλεση μιας PCR αντίδρασης 30 έως 40 κύκλων σε χρονικό διάστημα 20 με 30 λεπτών.



**Σχήμα 4.11:** Σχηματική αναπαράσταση οργάνωσης LightCycler.

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).

Κατά τη μέτρηση του σήματος φθορισμού, ιώδες φως μήκους κύματος 470 nm εκπέμπεται από την πηγή διέγερσης και εστιάζεται στην άκρη του τριχοειδούς, διεγείροντας τα φθορισμοφόρα της αντίδρασης. Κατόπιν, ο παραγόμενος φθορισμός κατευθύνεται εκ νέου προς την οπτική μονάδα, όπου μια σειρά φίλτρων και κατόπτρων διαχωρίζει τη φωτεινή ακτινοβολία σε διαφορετικά μήκη κύματος που μετρώνται από τα τρία κανάλια. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, ένας κατάλληλος κινητήρας περιστρέφει κυκλικά το δίσκο με τα δείγματα, έτσι ώστε το άκρο κάθε τριχοειδούς να τοποθετείται ακριβώς στο εστιακό σημείο της φθορισμομετρικής οπτικής. Η βέλτιστη θέση για τη μέτρηση καθορίζεται για κάθε τριχοειδές σε μια “διαδικασία αναζήτησης” που προηγείται κάθε αντίδρασης PCR.

Για την παρακολούθηση της αντίδρασης ενώ αυτή εξελίσσεται, οι διάφορες πληροφορίες μεταφέρονται από και προς έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή, μέσω κατάλληλης σύνδεσης. Ο χρήστης εισάγει τα δεδομένα μέσω πληκτρολογίου στο κατάλληλο πειραματικό πρωτόκολλο μέσα στον υπολογιστή και στη συνέχεια ο υπολογιστής μεταφέρει τις πληροφορίες στο όργανο. Επίσης, ο υπολογιστής καταγράφει τις θερμοκρασίες και τα σήματα φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και επεξεργάζεται τέλος τα αποτελέσματα μέσω κατάλληλου αναλυτικού λογισμικού.

#### **Καμπύλη βαθμονόμησης**

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των μεταγράφων *PALB2*, προετοιμάστηκαν κατάλληλα πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης αντιγράφων (copies). Η καμπύλη βαθμονόμησης 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 ανάλογες με αυτές της real-time qPCR. Τα PCR προϊόντα ελέγχθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 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<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up Kit*

(MACHEREY-NAGEL, Γερμανία) με διαδικασία όμοια με αυτή που περιγράφηκε 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) όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως και έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις.
- D. Η κλίση της καμπύλης, η τομή επί του άξονα και η απόδοση (E) από κάθε καμπύλη βαθμονόμηση με βάση τη χρήση της εξίσωσης:  $E = 10^{-1/\text{κλίση}}$  καταγράφηκαν και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους και η μεταβλητότητα τους (CV). Το όριο ανίχνευσης (LOD) της μεθόδου υπολογίστηκε με την εξίσωση ( $n = 3$ ):  $\text{LOD} = -3.3 \times \text{SD}_0/\text{κλίση}$  ( $\text{SD}_0$ : η τυπική απόκλιση της τομής της καμπύλης βαθμονόμησης). Επίσης διαλέχθηκε ένα καρκινικό δείγμα ως εσωτερικό δείγμα ελέγχου για να χρησιμοποιηθεί στον υπολογισμό της ακρίβειας (επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα). Η επικύρωση έγινε με βάση τις διεθνείς οδηγίες MIQE και πρότερη εμπειρία (135, 144, 145).

#### **Βελτιστοποιήσεις μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού**

Στην παρούσα εργασία έγιναν πειράματα βελτιστοποίησης των αναλυτικών παραμέτρων της real-time qPCR για το *PALB2*, 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 των εκκινητών,
- ✓ 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.

#### 4.2.2 Ανίχνευση μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου PALB2

##### *Απομόνωση ολικού DNA*

Για την απομόνωση του ολικού DNA χρησιμοποιήθηκε το *NucleoSpin® Genomic DNA from Tissue kit* (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία) το οποίο βασίζεται στην ειδική σύνθεση της μεμβράνης της στήλης που περιέχει οξείδιο του πυριτίου (*silica membrane*).

Το *NucleoSpin® Genomic DNA from Tissue kit* επιτρέπει την απομόνωση καθαρού DNA με αναλογία  $A_{260}/A_{280}$  1,7 έως 1,9. Το απομονωμένο DNA είναι έτοιμο προς χρήση για εφαρμογές PCR, κ.τ.λ.. Το κλασικό πρωτόκολλο επιτρέπει τον καθαρισμό έως 35  $\mu g$  ολικού DNA ανά *NucleoSpin®* στήλη από 25 mg ιστού.

##### *Αντιδραστήρια/Υλικά/Εξοπλισμός*

- Υγρό άζωτο
- Ρυθμιστικό διάλυμα T1 (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- *NucleoSpin®* στήλες (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα B3 (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνάση K (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης για την πρωτεΐνάση K (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα B3 (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Αιθανόλη 100 % (Scharlab, Ισπανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα BW (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Ρυθμιστικό διάλυμα B5 (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)

- Ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης BE (MACHEREY-NAGEL, Γερμανία)
- Επωαστήρας σωληναρίων (Grant, Ηνωμένο Βασίλειο)
- Συσκευή *Vortex* (Fisher, ΗΠΑ)
- Μικροφυγόκεντρος *Minispin plus* (Eppendorf, Γερμανία)
- Σωληνάρια τύπου *Eppendorf* 1,5 mL

### **Πειραματική πορεία**

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

#### *Προετοιμασία δείγματος*

- Αρχικά, απομακρύνεται το διάλυμα *RNAlater*<sup>®</sup> και ~25 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 180  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος λύσης T1 και 25  $\mu$ L πρωτεΐνωση K (που έχει ήδη διαλυθεί στο ρυθμιστικό της διάλυμα) στον κονιορτοποιημένο ιστό, ακολουθεί έντονη ανάδευση και επωάζεται στους 56°C για 1-3 ώρες μέχρι να γίνει διάφανο.

#### *Ρύθμιση συνθηκών πρόσδεσης του DNA*

- Έπειτα, προστίθενται 210  $\mu$ L αιθανόλης 100 % στο μίγμα με επακόλουθη έντονη ανάδευση.

#### *Πρόσδεση του DNA*

- Το μίγμα φορτώνεται στην *NucleoSpin*<sup>®</sup> στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στα 11.000 $\times$  g

#### *Έκπλυση και στέγνωμα της μεμβράνης πυριτίου*

- 1<sup>η</sup> έκπλυση: Προστίθενται 500  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης BW στην *NucleoSpin*<sup>®</sup> στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1min στα 11.000 $\times$  g. Το διήθημα απορρίπτεται.
- 2<sup>η</sup> έκπλυση: Προστίθενται 600  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης B5 στην *NucleoSpin*<sup>®</sup> στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1min στα 11.000 $\times$  g. Το διήθημα απορρίπτεται.



- Η *NucleoSpin*<sup>®</sup> στήλη φυγοκεντρείται για 1min χωρίς την προσθήκη κανενός διαλύματος προκειμένου να μην μείνουν υπολείμματα αιθανόλης.

#### *Έκλουση υψηλής καθαρότητας DNA*

- Προστίθενται 100 μL διαλύματος έκλουσης BE στην *NucleoSpin*<sup>®</sup> στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 min στα 11.000× g. Το DNA εκλύεται με το διάλυμα μέσα στο νέο σωληνάριο και φυλάσσεται είτε στους -20 °C για μακρύ χρονικό διάστημα. Από το τελικό διάλυμα του DNA χρησιμοποιείται 1 μL για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του.

#### **Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού DNA**

Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται με μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στο φθορισμόμετρο *Qubit*<sup>®</sup> (Invitrogen, ΗΠΑ) με την διαδικασία που έχει προαναφερθεί.

#### **Δημιουργία πλήρως μεθυλιωμένου και αμεθυλιώτου δείγματος ελέγχου- Αντίδραση μεθυλοτρανσφεράσης (*MSssI*)**

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

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

#### **Αντιδραστήρια/ Υλικά/Εξοπλισμός**

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

#### **Πειραματική πορεία**

- Σε 25 μl αμεθυλιώτου DNA (5μg) προστέθηκαν 1 μl SAM, 5 μl, NEB2 (10X), 1 μl *M.SssI* (20U/μl) και 18μl ddH<sub>2</sub>O.
- Επώαση για 1 h στους 37 °C.
- Προσθήκη 1 μl SAM

- Επώαση overnight στους 37 °C για πλήρη μεθυλίωση
- Επώαση για 15 min στους 65 °C για θερμική αδρανοποίηση του ενζύμου.
- Αποθήκευση στους -20 °C.

#### **Καμπύλη των δειγμάτων ελέγχου**

Δημιουργήσαμε καμπύλη μεθυλίωσης των δειγμάτων ελέγχου με διαδοχικές αραιώσεις όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

*Πίνακας 4.26. Διαδοχικές αραιώσεις για την δημιουργία των δειγμάτων ελέγχου.*

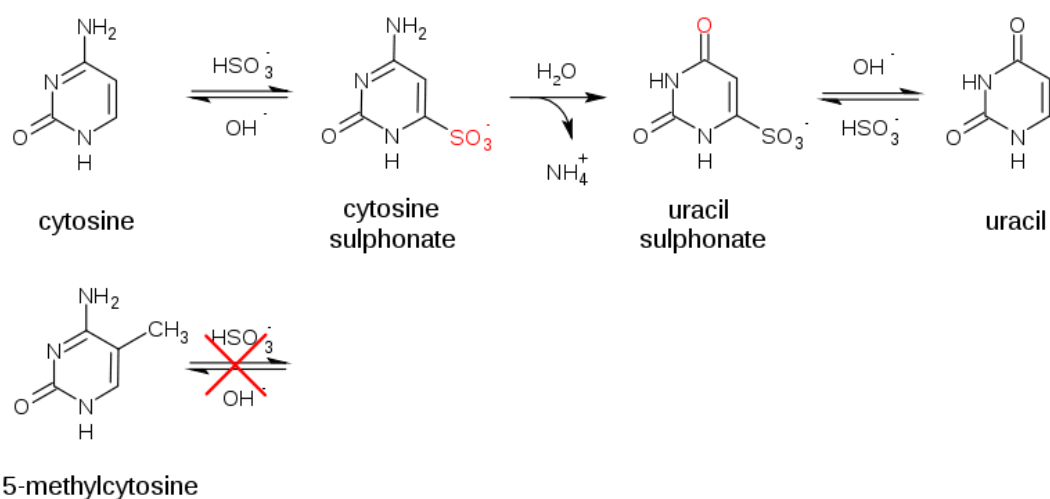
<b>Ποσοστό μεθυλίωσης</b>	<b>Διαδοχικές αραιώσεις</b>	<b>Μη μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου σε μl</b>
80%	62,5 μl πλήρως μεθυλιωμένου δείγματος	12,5
40%	30 μl 80% μεθυλιωμένου δείγματος	30
20%	30 μl 40% μεθυλιωμένου δείγματος	30
10%	30 μl 20% μεθυλιωμένου δείγματος	30
5%	30 μl 10% μεθυλιωμένου δείγματος	30
2,5%	30 μl 5% μεθυλιωμένου δείγματος	30
Unmethylated	30 μl 2.5% μεθυλιωμένου δείγματος	30

#### **Αντίδραση μετατροπής του μεθυλιωμένου DNA με όξινο θειώδες νάτριο (*Sodium Bisulfate Conversion*)**

Η μεθυλίωση του DNA είναι μια φυσιολογική διαδικασία που συμβαίνει στους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς η μεθυλίωση του DNA παρέχει ένα τρόπο για να προστατεύει το DNA του ξενιστή από την πέψη των περιοριστικών ενδονουκλεασών που είναι σχεδιασμένες να εξουδετερώνουν το ξένο DNA ενώ στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η μεθυλίωση του DNA φαίνεται να ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων (146). Έχει αποδειχθεί ότι η μη φυσιολογική μεθυλίωση του DNA είναι ένα διαδεδομένο φαινόμενο στον καρκίνο και μπορεί να είναι από τις πρώτες αλλαγές που συμβαίνουν κατά την ογκογένεση (147). Η πλειοψηφία της μεθυλίωσης του DNA στα θηλαστικά συμβαίνει στα 5'-CpG-3' δινουκλεοτίδια, αλλά υπάρχουν κι άλλα μοντέλα

μεθυλίωσης. Για την ακρίβεια περίπου το 80% των 5'-CpG-3' δινουκλεοτιδίων στο γονιδίωμα των θηλαστικών έχει βρεθεί μεθυλιωμένο ενώ η μειοψηφία του 20% που παραμένει αμεθυλιωτο είναι μέσα στους υποκινητές ή στα πρώτα εξόνια των γονιδίων.

Η δυνατότητα να ανιχνεύουμε και να ποσοτικοποιούμε αποτελεσματικά και με ακρίβεια την μεθυλίωση του DNA έχει γίνει απαραίτητη για την μελέτη του καρκίνου, την έκφραση των γονιδίων, τις γενετικές ασθένειες όπως και για πολλά άλλα θέματα της βιολογίας. Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι για την ανίχνευση/ ποσοτικοποίηση της μεθυλίωσης του DNA. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική είναι αυτή της μετατροπής με όξινο θειώδες νάτριο (148). Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει επεξεργασία του μεθυλιωμένου DNA με όξινο θειώδες νάτριο όπου οδηγεί στην μετατροπή των βάσεων της μη μεθυλιωμένης κυτοσίνης σε ουρακίλη (Σχήμα 4.12) ενώ οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες παραμένουν ανεπηρέαστες.



**Σχήμα 4.12:** Μετατροπή της μη μεθυλιωμένης και της μεθυλιωμένης κυτοσίνης με όξινο θειώδες νάτριο.

([http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/archive/b/bc/20110216020547!Bisulfite\\_conversion.svg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/archive/b/bc/20110216020547!Bisulfite_conversion.svg))

Με την ενίσχυση μέσω PCR, οι ουρακίλες εκλαμβάνονται ως θυμίνη ενώ οι μεθυλοκυτοσίνες εκλαμβάνονται κανονικά ως κυτοσίνη. Το αποτέλεσμα είναι ότι μετά την επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο οι δύο αλυσίδες του DNA δεν είναι πλέον συμπληρωματικές. Η προκύπτουσα ακολουθία του DNA μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της μεθυλίωσης στο αρχικό, μη επεξεργασμένο με όξινο θειώδες νάτριο, DNA. Στην παρούσα εργασία η μετατροπή του DNA έγινε με το EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo, ΗΠΑ).

#### **Αντιδραστήρια/ Υλικά**

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

#### **Πειραματική πορεία**

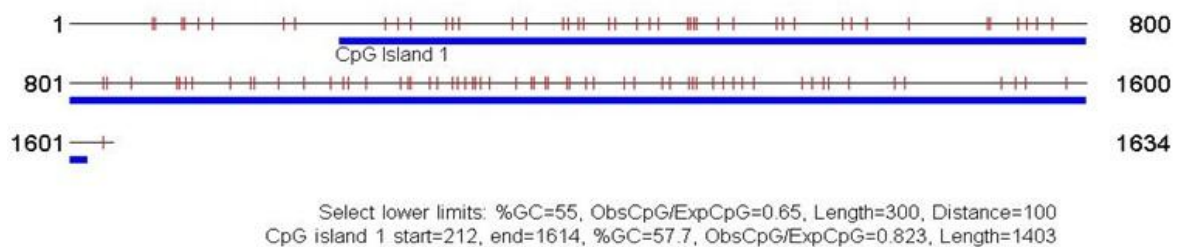
Πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου απαιτείται η παρασκευή του αντιδραστηρίου μετατροπής CT. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit για κάθε φιαλίδιο με αντιδραστήριο CT χρειάζονται 900 μl H<sub>2</sub>O, 300 μl M-Dilution buffer (Zymo, ΗΠΑ) και 50μl M-Dissolving buffer (Zymo, ΗΠΑ) τα οποία ανακινούνται για 10 min. Είναι σημαντικό για την μέγιστη απόδοση του αντιδραστηρίου το νερό να είναι προθερμασμένο και τα διαλύματα να προστεθούν ακριβώς με την σειρά που αναγράφονται στο EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo, USA).

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

- Προστίθενται 200 µl M-Desulphonation Buffer (Zymo, ΗΠΑ) στην στήλη και επωάζεται για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση φυγοκεντρείται στα 14.000 x g για 1 min και απορρίπτεται το διήθημα.
- Προστίθενται 400 µl M-Wash buffer (Zymo, ΗΠΑ) στην στήλη, φυγοκεντρείται στα 14.000 x g για 1 min και απορρίπτεται το διήθημα.
- Προστίθενται 400 µl M-Wash buffer (Zymo, ΗΠΑ) στην στήλη, φυγοκεντρείται στα 14.000 x g για 4 min και απορρίπτεται το διήθημα.
- Τοποθετείται η στήλη σ' ένα σωληνάριο των 1,5 ml, προστίθενται 50 µl TE Buffer (Zymo, ΗΠΑ) απευθείας στο φίλτρο της στήλης και φυγοκεντρείται στα 14.000 x g για 1 min.
- Αποθηκεύεται το διήθημα, το οποίο είναι το δείγμα μας, στους -80 °C και απορρίπτεται η στήλη.

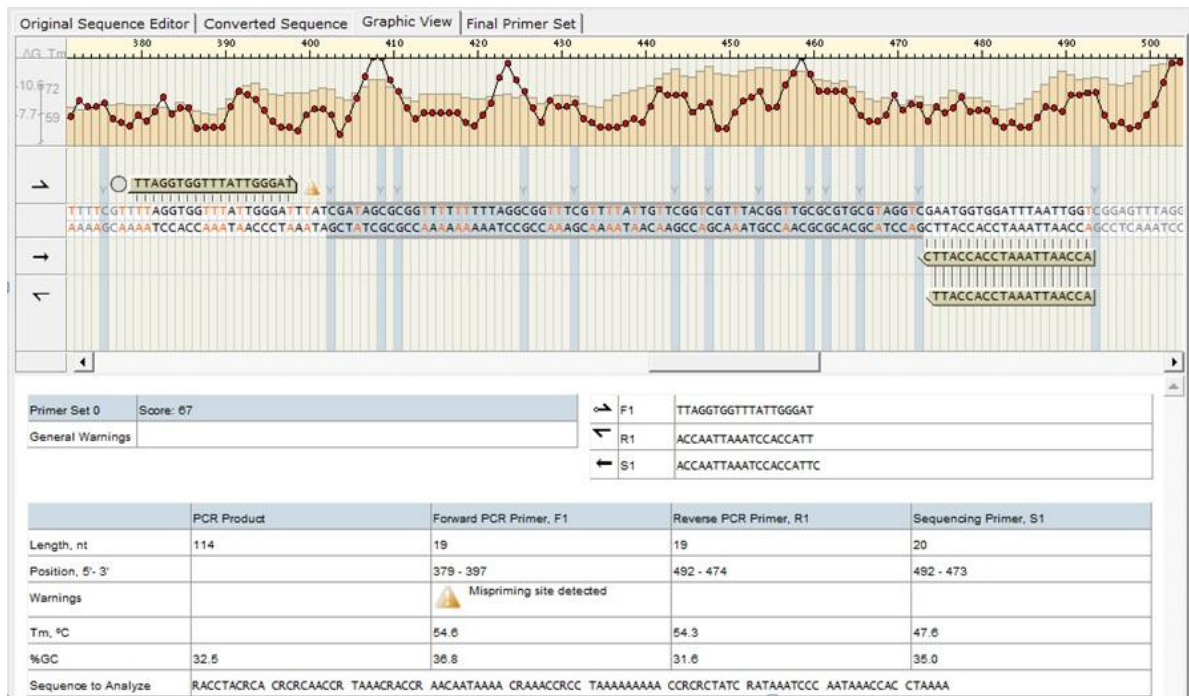
#### **Βιοπληροφορική μελέτη PCR για τον υποκινητή του γονιδίου *PALB2***

Ελέγχθηκε η περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *PALB2* για CpG νησίδες με το πρόγραμμα CpG Island Searcher (<http://www.cpgislands.com>) και επιλέχθηκε η περιοχή στην πρώτη CpG νησίδα (1402bp) για ανάλυση μεθυλίωσης (Σχήμα 4.13)

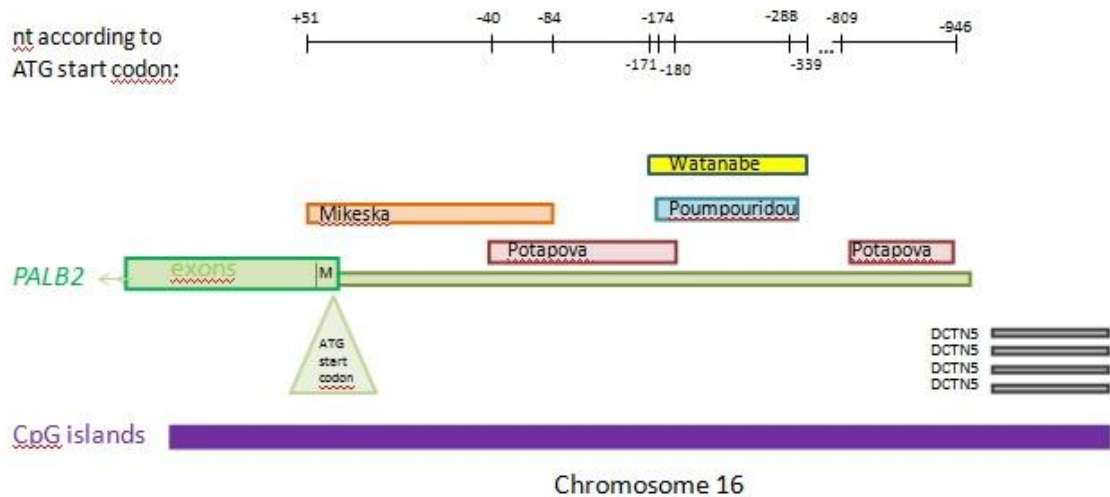


**Σχήμα 4.13:** CpG νησίδα του *PALB2* γονιδίου.

Σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές για την αντίδραση PCR με το πρόγραμμα PyroMark (Qiagen, Γερμανία) οι οποίοι κάλυπταν την περιοχή μεταξύ του νουκλεοτιδίου -174 και -288 (σε σχέση με το ATG κωδικόνιο έναρξης). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να ενισχύουν το bisulfite-converted DNA ανεξάρτητα από το επίπεδο μεθυλίωσής του. Οι εκκινητές δεν υβριδίζονταν σε CpG δινουκλεοτίδια (Σχήμα 4.14). Επίσης σχεδιάστηκαν σε διαφορετική περιοχή του υποκινητή του *PALB2* γονιδίου σε σχέση με τις δύο προηγούμενες μελέτες που προαναφέρθηκαν (Σχήμα 4.15). Μετέπειτα δημοσιεύτηκε και μια τρίτη μελέτη η οποία εξέτασε την μεθυλίωση του υποκινητή του *PALB2* στην ίδια περιοχή με την δική μας (149).



Σχήμα 4.14: Χαρακτηριστικά εκκινήτων για την αντίδραση PCR του *PALB2* γονιδίου.



Σχήμα 4.15: Περιοχές του υποκινητή που εξετάστηκαν από τις 4 παραπάνω μελέτες.

Πίνακας 4.27. Συστατικά της αντίδρασης PCR για το γονίδιο PALB2

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος σε $\mu\text{l}$	Τελική συγκέντρωση
ddH <sub>2</sub> O	20,65	
CoralLoad 10X buffer (Qiagen)	3	1X, 1.5 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTPs (5 $\mu\text{M}$ )	1,2	200 $\mu\text{M}$
*Μίγμα εκκινητών (6 $\mu\text{M}$ )	1	0,2 $\mu\text{M}$
HotStar Πολυμεράση (Qiagen)	0,15	0,01X
Converted DNA	4	1 $\mu\text{g}$
Σύνολο	30	

\*το μίγμα εκκινητών περιελάμβανε 6  $\mu\text{l}$  από τον πρόσθιο βιοτυνλιωμένο εκκινητή (100  $\mu\text{M}$ ), 6  $\mu\text{l}$  από τον ανάστροφο εκκινητή (100  $\mu\text{M}$ ) και 88 $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O.

Πίνακας 4.28. Συνθήκες της αντίδρασης PCR για τον υποκινητή του γονιδίου PALB2

Στάδιο PCR	Συνθήκες	
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων	95 °C / 5 min	
Διαχωρισμός των κλώνων	95 °C / 30sec	} 40 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών	53 °C / 30sec	
Επέκταση των εκκινητών	72 °C / 30sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης εκκινητών	72 °C / 10 min	
Ψύξη	6 °C	

Στην συνέχεια τα PCR προϊόντα ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης 2% με τη διαδικασία που περιγράφηκε πιο πάνω.

### *Ανάλυση μεθυλίωσης με την μέθοδο Pyrosequencing.*

#### *Αντιδραστήρια/ Υλικά/Εξοπλισμός*

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

#### *Πειραματική πορεία*

### **Προετοιμασία δειγμάτων για Pyrosequencing**

#### **Ακινητοποίηση των PCR προϊόντων**

Στην αντίδραση PCR του κάθε δείγματος προστίθενται 50 μl PyroMark Binding Buffer (Qiagen, Γερμανία), 2 μl Streptavidin Sepharose High Performance Beads (Qiagen, Γερμανία) και 18 μl ddH<sub>2</sub>O. Αναδεύονται καλά και αφήνονται στην ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ολοκληρωθεί η προετοιμασία του μηχανήματος (περίπου 10min).

Ακολουθούν στάδια καθαρισμού των δειγμάτων με την ειδική αντλία καθαρισμού που φαίνεται στο Σχήμα 4.16.



**Σχήμα 4.16:** Σύστημα προετοιμασίας δειγμάτων για Pyrosequencing.



## **Διαχωρισμός των αλυσίδων DNA και απελευθέρωση των δειγμάτων στο PyroMark πιάτο**

*Στάδιο 1:* Διαλύονται 1,5 μl από τον εκκινητή αλληλούχισης (100μM) σε 43,5 PyroMark Annealing Buffer (Qiagen, Γερμανία) για κάθε αντίδραση PCR και τοποθετούνται στο Pyrosequencing πιάτο.

*Στάδιο 2:* Πληρώνεται το σύστημα έκπλυσης με τα αντίστοιχα διαλύματα που φαίνονται στο παραπάνω σχήμα προσέχοντας ώστε η στάθμη του NaOH να είναι λίγο πιο χαμηλά από την στάθμη του tris-Acetate ώστε να μην μείνουν σταγονίδια NaOH πάνω στα ρύγχη και χαλάσουν το pH της αντίδρασης.

*Στάδιο 3:* Ανοίγεται ο διακόπτης της αντλίας και ξεπλένονται τα ρύγχη με τα φίλτρα στο ddH<sub>2</sub>O.

*Στάδιο 4:* Έχοντας το κενό ανοιχτό τοποθετούνται τα ρύγχη μέσα στο διάλυμα των PCR αντιδράσεων με τα σφαιρίδια και για περίπου 15 sec προσέχοντας να μην ακουμπήσουν στο πυθμένα του πιάτου. Έτσι προσροφούνται τα σφαιρίδια και συγκρατούνται από την μεμβράνη των ρυγχών από την οποία δεν μπορούν να περάσουν καθώς το μέγεθός τους είναι μεγαλύτερο από τους πόρους της.

*Στάδιο 5:* Έχοντας ακόμα το κενό ανοιχτό τοποθετούνται τα ρύγχη στο διάλυμα 70% EtOH μέχρι να περάσει όλο μέσα από τα ρύγχη.

*Στάδιο 6:* Συνεχίζουμε με το κενό ανοιχτό και τοποθετούνται τα ρύγχη στο διάλυμα αποδιάταξης NaOH στο οποίο απομακρύνονται οι αλυσίδες DNA οι οποίες δεν έχουν προσδεθεί στα σφαιρίδια, και αφήνονται για 5 sec.

*Στάδιο 7:* Συνεχίζουμε με το κενό ανοιχτό και τοποθετούνται τα ρύγχη στο διάλυμα Tris-Acetate για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα NaOH, έτσι ώστε να μην επηρεαστεί το pH της αντίδρασής μας, και τα αφήνονται για 5 sec.

*Στάδιο 8:* Ευθυγραμμίζονται τα ρύγχη με τις θέσεις του πιάτου όπου έχει επικαλυφθεί το διάλυμα με τον εκκινητή αλληλούχισης και απενεργοποιείται το κενό τοποθετώντας αμέσως μέσα στα πηγαδάκια τα ρύγχη και ανακατεύοντας καλά ώστε να ελευθερωθούν τα σφαιρίδια με τα προϊόντα μας.

*Στάδιο 9:* Απομακρύνονται τα ρύγχη από το πιάτο αντίδρασης και τοποθετούνται στο ddH<sub>2</sub>O ανοίγοντας πάλι την αντλία κενού προκειμένου να εκπλυθούν.

*Στάδιο 10:* Τοποθετείται το πιάτο με τα σφαιρίδια στο οποία είναι προσκολλημένα τα προϊόντα της αντίδρασης σε μια προθερμασμένη πλάκα στους 80 °C για 2 min και μετά αφήνονται να κρυσώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min.

*Στάδιο 11:* Τα δείγματα είναι έτοιμα. Τοποθετούνται στον PyroMark Q96 αναλυτή (Qiagen, Γερμανία) προς ανάλυση.

#### **4.2.3 Ανοσοϊστοχημεία (IHC)**

Η μελέτη IHC έγινε σε τομές παραφίνης 3 μm ιστών σποραδικού καρκίνου του μαστού, οι οποίες είχαν στρωθεί σε θετικά πλακάκια Super Frost Plus από το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Ευγενιδείου Νοσοκομείου.

#### ***Αντιδραστήρια/ Υλικά/Εξοπλισμός***

- Dewax and HIER Buffer L (citrate, pH=6) (Thermo Scientific, ΗΠΑ)
- Dewax and HIER Buffer M (EDTA, pH=8) (Thermo Scientific, ΗΠΑ)
- Triton 0,1% in PBS (AmpriChem, Γερμανία)
- TBS που παρασκευάστηκε όπως αναφέρθηκε
- Peroxide blocking (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution)
- Πρωτογενές αντίσωμα πολυκλωνικό κονίκλου έναντι του επιτόπου AA 200-250 του PALB2 για IHC σε παραφίνες (Abcam 84533-Lot number: GR58163-3, Αγγλία)
- DAB Quanto (Thermo Scientific, ΗΠΑ)
- Mayer's Αιματοξυλίνη, Aqueous (Thermo Scientific, ΗΠΑ)
- Autostainer 360 (Thermo scientific, ΗΠΑ)
- PT Module (Thermo scientific, ΗΠΑ)
- ZytoChem Plus HRP Polymer Kit (Zytomed, Γερμανία)
- UltraVision Quanto Detection System (Thermo Scientific, ΗΠΑ)

### **Πειραματική πορεία**

#### *Αποπαραφίνωση και αποκάλυψη των επιτόπων*

- Τοποθετήθηκαν τα πλακάκια με τις τομές παραφίνης στο αυτόματο μηχάνημα επώασης PT Module και επώαστηκαν για 20 min στους 98°C με *Dewax and HIER Buffer M*. Δοκιμάστηκε και το *Dewax and HIER Buffer L*.

Εναλλακτικά έγινε αποπαραφίνωση και αποκάλυψη επιτόπων σε φούρνο μικροκυμάτων ως εξής:

- Ενώ καλύπτονταν τα πλακάκια με το *Dewax and HIER Buffer M* τοποθετήθηκαν στο φούρνο μικροκυμάτων για 7 min στο low power στη συνέχεια 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και συμπληρωνόταν Buffer μέχρι να καλυφθούν οι τομές και στη συνέχεια άλλα 7 min στο low power. Δοκιμάστηκε και το *Dewax and HIER Buffer L*.

#### *Διάσπαση πυρηνικών μεμβρανών*

- Μετά την επώαση προστέθηκε Triton 0,1% για 10min προκειμένου να γίνει επιπλέον διάσπαση των πυρηνικών μεμβρανών.

#### *Χρώση του ιστού*

- Τα πλακάκια τοποθετήθηκαν στο αυτόματο μηχάνημα Autostainer 360 και χρησιμοποιήθηκε το kit UltraVision Quanto Detection System.

Εναλλακτικά η χρώση του ιστού έγινε χειροκίνητα με το ZytoChem Plus HRP Polymer kit.

#### *Στάδια χρώσης*

- Με το kit UltraVision Quanto Detection System.
  - Πλύση με TBS
  - Προσθήκη 200 μl UltraVision Protein Block (μέρος του kit) και επώαση για 5 min
  - Πλύση με TBS

- Προσθήκη 200 μl UltraVision Hydrogen Peroxide Block (μέρος του kit) και επώαση για 10 min
- Πλύση με TBS
- Προσθήκη 200 μl πρωτοταγούς αντισώματος PALB2 αραιωμένο 1:50 και επώαση για 1 ώρα
- Πλύση με TBS
- Προσθήκη 200 μl UltraVision Quanto HRP Amplifier (μέρος του kit) και επώαση για 10 min
- Πλύση με TBS
- Προσθήκη 200 μl UltraVision Quanto HRP Polymer (μέρος του kit) και επώαση για 10 min
- Προσθήκη 200 μl DAB Quanto (μέρος του Kit) επώαση 5 min
- Προσθήκη 200 μl dH<sub>2</sub>O για τερματισμό της αντίδρασης
- Προσθήκη 200 μl αιματοξυλίνης για 5min
- Προσθήκη 200 μl dH<sub>2</sub>O

➤ Με το ZytoChem Plus HRP Polymer kit

- Πλύση με TBST για 2 min
- Προσθήκη 200 μl Peroxide blocking (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution) και επώαση για 10 min σε RT.
- Πλύση με TBST για 2 min
- Προσθήκη 200 μl Blocking Solution protein block Reagent 1 και επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύση με TBST για 2 min
- Προσθήκη 200 μl πρωτοταγούς αντισώματος PALB2 αραιωμένο 1:50 και επώαση για 1 ώρα (δοκιμάστηκε και overnight επώαση στους 4°C).
- Πλύση με TBST για 5 min
- Προσθήκη 200 μl PostBlock Reagent 2 και επώαση για 20 min σε RT
- Πλύση με TBST για 5 min
- Προσθήκη 200 μl HRP-polymer Reagent 3 και επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Πλύση με TBST για 5 min

- Προσθήκη 200 μl DAB Quanto (μέρος του UltraVision Quanto Detection System) και επώαση για 10 min σε RT
- Προσθήκη 200 μl dH<sub>2</sub>O για τερματισμό της αντίδρασης
- Προσθήκη 200 μl αιματοξυλίνης και επώαση για 5 min σε RT
- Προσθήκη 200 μl dH<sub>2</sub>O

#### *Αφυδάτωση πλακιδίων*

- Εμβαπτίζονται τα πλακίδια σε διαλύματα αιθανόλης 80%, 95%, 100% για περίπου 1 min στο καθένα και τέλος εμβάπτιση για 3 min σε δύο διαφορετικά διαλύματα ξυλόλης.

#### *Μονιμοποίηση χρώσης ιστού*

- Προστίθεται μια σταγόνα ειδικής κόλλας (Entellan) και τοποθετούνται οι καλυπτρίδες και εξετάζονται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο συνδεδεμένο με σύστημα ψηφιακής φωτογραφίας.

#### **4.2.4 Στατιστική Ανάλυση**

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε περιγραφική στατιστική ανάλυση των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ιστών και των ασθενών και ακολούθησε ο έλεγχος της κανονικότητας των ποσοτικών μεταβλητών (ηλικία, μέγεθος του όγκου, αντίγραφα και  $\log_{\text{αντίγραφα}}$ ) με τις δοκιμασίες *Kolmogorov-Smirnov*.

Έπειτα, η ποσοτική μεταβλητή αντίγραφα μετατράπηκε σε κατηγορική μεταβλητή δύο ομάδων με τη χρήση της διαμέσου των τιμών των εκατοστημορίων 50 και 75, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τα δεδομένα αξιολογήθηκαν μέσω διδιάστατων πινάκων συνάφειας (*cross-tabulation or contingency table*). Ο έλεγχος της ύπαρξης ή όχι ανεξαρτησίας μεταξύ των κατηγορικών μεταβλητών ελέγχθηκε με τη δοκιμασία *Pearson  $X^2$*  ή την δοκιμασία *Fisher's exact*. Για τις συνεχείς μεταβλητές που ακολουθούν την κανονική κατανομή εφαρμόστηκαν οι παραμετρικές δοκιμασίες *t-test* και *One-Way Anova* ενώ για εκείνες που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή εφαρμόστηκαν οι μη-παραμετρικές δοκιμασίες *Mann-Whitney* και *Kruskal-Wallis*. Ακόμη, οι συντελεστές συσχέτισης *Pearson* και *Spearman* χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθεί η ισχύς της συσχέτισης μεταξύ των συνεχών μεταβλητών.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν η Γραμμική Παλινδρόμηση (*Linear Regression*) με σκοπό την εύρεση ενός μοντέλου που θα προβλέπει τον αριθμό των αντιγράφων με βάση τις τιμές των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών, καθώς και η Διωνυμική Λογιστική Παλινδρόμηση (*Binary Logistic Regression*) με σκοπό την εύρεση μοντέλου που να συσχετίζει τη μετάσταση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά.

Όλα τα παρατηρηθέν επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας (p-value) ήταν *two-sided* και η στάθμη εμπιστοσύνης ( $\alpha$ ) ορίστηκε στο 0,05.

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> *Statistics version 21* (IBM, ΗΠΑ).

## Κεφάλαιο 5 – Αποτελέσματα

### 5.1- Αποτελέσματα Γενετικής Ανάλυσης του *PALB2* γονιδίου

#### Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών

Στον πίνακα 5.1 δίνονται τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών (n=57), η ηλικία και το οικογενειακό ιστορικό. Όλοι οι ασθενείς που επιλέχθηκαν ήταν *BRCA* αρνητικοί σε προηγούμενη μελέτη ενώ ανάμεσά τους ήταν 4 ασθενείς που είχαν αμφοτερόπλευρο καρκίνο του μαστού, 2 είχαν καρκίνο του παγκρέατος στο οικογενειακό ιστορικό, 24 ασθενείς είχαν μόνο καρκίνο του μαστού στο οικογενειακό ιστορικό, 7 είχαν και καρκίνο του μαστού και καρκίνο των ωοθηκών στο οικογενειακό ιστορικό, μία ασθενής είχε η ίδια καρκίνο των ωοθηκών σε πολύ μικρή ηλικία χωρίς οικογενειακό ιστορικό, σε άλλες δύο περιπτώσεις συνυπήρχε καρκίνος του μαστού και των ωοθηκών στην ίδια γυναίκα, 15 ασθενείς είχαν μυελοειδές καρκίνο του μαστού και 2 ασθενείς ήταν άντρες ενώ μια ασθενής είχε στην οικογένεια ανδρικό καρκίνο του μαστού. Στον πίνακα 5.2 δίνονται τα αποτελέσματα της μέτρησης της συγκέντρωσης του DNA καθώς και συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών που βρέθηκαν κατά την γενετική ανάλυση στο *PALB2* γονίδιο.

Πίνακας 5.1. Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών και αποτελέσματα γενετικής ανάλυσης.

#	ID	Αρχικά ασθενών	Ηλικία	Είδος καρκίνου	Ιστορικό	Αριθμός/Είδος περιστατικών στην οικογένεια
1	62/1	Σ.Σ	32	BrCa	οι δύο αδελφές της μητέρας	3 BrCa
2	74/3	B.M	31	BrCa	Αδελφή με bilateral BrCa	2 BrCa
3	90/7	M.B		BrCa	Αδελφή BrCa Μητέρα OvCa	1 BrCa 1OvCa
4	105/12	Σ.Ε	30	BrCa	Μητέρα BrCa	2 BrCa
5	118/17	Ξ-Γ.Α	39	BrCa	Αδελφή BrCa	2 BrCa
6	122/18	Σ.Ε	62	BrCa	Γιαγιά BrCa	2 BrCa

7	115/19	Κ.Μ	71	BrCa	Αδελφή OvCa, Αδελφή Πάγκρεας Ca, Αδελφή Thyroid Ca, Αδελφός Colon Ca	2 Ov/Br
8	116/20	Σ.Κ	46	BrCa	Αδελφή BrCa	2 BrCa
9	121/21	Ξ.	40	BrCa	Μητέρα BrCa, Γιαγιά Colon Ca	2BrCa
10	9/23	Α.Ε	45	BrCa	Μητέρα BrCa, Αδελφή BrCa	3 BrCa
11	133/28	Σ.Σ	17	OvCa	-	1 OvCa
12	136/29	Τ.Α	46	BrCa	Αδελφή BrCa	2 BrCa
13	142/32	Ο.Ν	42	BrCa	Δίδυμη αδελφή BrCa	2 BrCa
14	190/37	Μ.Π		BrCa	Κόρη, Μητέρα, Θεία BrCa	3 BrCa
15	191/38	Π.Ε	36	BrCa	Αδελφή BrCa, Γιαγιά πάγκρεας Ca	2 BrCa
16	192/39	Ξ.Α	35	BrCa	Μητέρα BrCa, Αδελφή OvCa	3 Ov/Br
17	170/46	Π.Α	38	BrCa	-	1 BrCa
18	160/50	Μ.Α	29	BrCa	Μητέρα BrCa	2 BrCa
19	162/11	Χ.Μ	69	BrCa	Μητέρα, αδελφή, γιαγιά BrCa	4 BrCa
20	35/82	Π.Π		BrCa	-	1 Male BrCa
21	36/91	Ρ.Δ	49	BrCa	-	1 Male BrCa
22	47/173	Β.Σ	57	BrCa	Αδελφή BrCa, Μητέρα Colon Ca, παππούς BrCa	3BrCa 1 Male BrCa
23	48/194	Β.Α	42	OvCa	Μητέρα BrCa	2 Ov/Br
24	49/195	Ξ.Χ		BrCa	Μητέρα, θεία, ξαδέλφη BrCa	3 BrCa
25	59/225	Λ.Ε	41	Bilateral BrCa	Πατέρας liver Ca,Εξαδέλφη πατέρα BrCa,	2BrCa



					Αδελφός μητέρας Lung Ca, Ανιμιός μητέρας head Ca 7y	
26	60/226	N-Z.X	39	BrCa	Αδελφή, θεία BrCa	3 BrCa
27	70/268	B.M	59/69	Bilateral BrCa	Αδελφή, 2 εξαδέλφους BrCa	4 BrCa
28	81/265	I.A	45	Ov/Br	Πατέρας Lung Ca, αδελφός Lung Ca	1 Ov/ Br
29	83	X-Θ.Π	50	BrCa	Μητέρα BrCa	2 BrCa
30	58/196	I.		BrCa		2 BrCa
31	53/179	B.	44/46	Bilateral BrCa	2 αδελφές BrCa, πατέρας prostate ca, γιαγιά BrCa?	4 BrCa
32	84/R746	Φ.Ε	27	BrCa	-	1 BrCa
33	82/208	Z.M	32/34	Bilateral BrCa	Γιαγιά, αδελφή γιαγιάς BrCa	3 BrCa
34	43/165	Σ.Θ	63/69	Ov/Br	-	1 Ov/Br
35	88/10	K.A	57	BrCa	2 αδελφές BrCa	3 BrCa
36	55/183	A.E	36	BrCa	Κόρη, μητέρα, θεία BrCa	4 BrCa
37	56/184	A.M	35	BrCa	Αδελφή, μητέρα, θεία BrCa	4 BrCa
38	77/4	T.Π.		OvCa	Αδελφή, μητέρα BrCa	3 Ov/Br
39	30/78	K.Δ	39	BrCa	Θεία BrCa, Μητέρα άλλο ca	2 BrCa
40	31/134	Λ.Ξ	39	BrCa	Μητέρα BrCa	2 BrCa
41	61/227	M-M.A	44	Medullary BrCa		1 BrCa
42	62/228	Σ.Α	46	Medullary BrCa		1 BrCa
43	63/229	Υ.Δ	38	Medullary BrCa	Μητέρα, θεία BrCa	3 BrCa

44	65/231	M.E	46	Medullary BrCa		1 BrCa
45	66/232	Γ.Γ	62	Medullary BrCa		1 BrCa
46	67/233	Γ.Χ	60	Medullary BrCa	Θείες και από τις δύο μεριές BrCa	3 BrCa
47	68/234	Χ.Α	48	Medullary BrCa	Μητέρα renal Ca	1 BrCa
48	69/235	Δ.Ε	45	Medullary BrCa		1 BrCa
49	72/251	Τ.Μ	29	Medullary BrCa		1 BrCa
50	73/269	Σ.Α	65	Medullary BrCa		1 BrCa
51	75/266	Π.Α	48	Medullary BrCa	Πατέρας stomach ca, θείος Liver ca	1 BrCa
52	76/263	Σ-Ψ.Χ	43	Medullary BrCa	Μητέρα BrCa, πατέρας Lung ca	2 BrCa
53	77/264	M.E	43	Medullary BrCa	2 αδελφές πατέρα και πατέρας stomach ca	1 BrCa
54	78/267	Κ.Ο	65	Medullary BrCa		1 BrCa
55	79/240	A.A	31	Medullary BrCa	Αδελφή BrCa, αδελφός γιαγιάς ca προστάτη	2 BrCa
56	85/R718	M-Π.Μ	49/50	OvCa/BrCa	Πατέρας prostate+colon Ca	1 BrCa
57	80/259	P.Φ	57	BrCa	Αδελφή και αδελφός μητέρας BrCa, μητέρα OvCa	4 BrCa

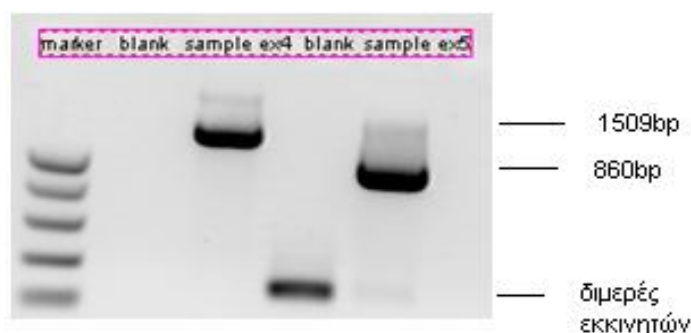
Πίνακας 5.2 . Συγκεντρωτικά αποτελέσματα PALB2 μεταλλάξεων και συγκέντρωση του DNA των δειγμάτων που αναλύθηκαν.

ID	C DNA ng/μl	PTT εξόνιο 4	PTT εξόνιο 5	DNA Sequencing	HRMA	MLPA
62/1	15,18	normal	normal	normal	normal	normal
74/3	164,20	normal	normal	normal	normal	normal
90/7	144,20	normal	normal	normal	normal	normal
105/12	13,06	normal	normal	normal	normal	normal
118/17	2,48	normal	normal	normal	normal	normal
122/18	111,8	normal	normal	normal	normal	normal
115/19	2,02	normal	normal	normal	normal	normal
116/20	113,2	normal	normal	normal	normal	normal
121/21	26,8	normal	normal	normal	normal	normal
*9/23	8,70	normal	normal	normal	normal	normal
133/28	74,6	normal	normal	normal	normal	normal
136/29	27,80	normal	normal	normal	normal	normal
142/32	161	normal	normal	normal	normal	normal
190/37	29	normal	normal	normal	normal	normal
191/38	8,64	normal	normal	Q559R	normal	normal
192/39	2,36	normal	normal	Q559R +T1100T	T1100T	normal
170/46	55,2	normal	normal	normal	normal	normal
160/50	298	normal	normal	normal	normal	normal
162/11	102,2	normal	normal	normal	normal	normal
35/82	67,2	normal	normal	normal	normal	normal
36/91	25,6	normal	normal	normal	normal	normal
47/173	3,38	normal	normal	normal	normal	normal
48/194	5,9	normal	normal	normal	normal	normal
49/195	11,7	normal	normal	normal	normal	normal
59/225	24,6	normal	normal	normal	normal	normal
60/226	77,6	normal	normal	normal	normal	normal
70/268	69,8	normal	normal	T1100T	T1100T	normal
81/265	4,2	normal	normal	normal	normal	normal
83	21,7	normal	normal	normal	normal	normal
58/196	232	normal	normal	normal	normal	normal
53/179	16,16	normal	normal	normal	normal	normal
84/R746	1,8	normal	normal	normal	normal	normal

82/208	177,8	normal	normal	normal	normal	normal
43/165	224	normal	normal	c.3197-46 G>C	c.3197-46 G>C	normal
88/10	17,94	normal	normal	normal	normal	normal
55/183	2,1	normal	normal	normal	normal	normal
56/184	23,2	normal	normal	normal	normal	normal
77/4	126	normal	normal	normal	normal	normal
30/78	2,6	normal	normal	normal	normal	normal
31/134	154,6	normal	normal	normal	normal	normal
61/227	72,2	normal	normal	normal	normal	normal
62/228	71,6	normal	normal	normal	normal	normal
63/229	49,4	normal	normal	normal	normal	normal
65/231	82,2	normal	normal	normal	normal	normal
66/232	27	normal	normal	normal	normal	normal
67/233	66	normal	normal	normal	normal	normal
68/234	105	normal	normal	normal	normal	normal
69/235	67,8	normal	normal	normal	normal	normal
72/251	47	normal	normal	normal	normal	normal
73/269	4,62	normal	normal	normal	normal	normal
75/266	45,6	normal	normal	normal	normal	normal
76/263	148,8	normal	normal	normal	normal	normal
77/264	181	normal	normal	T1100T	T1100T	normal
79/240	334	normal	normal	T1100T	T1100T	normal
85/R718	21,4	normal	normal	normal	normal	normal
80/259	92,8	normal	normal	T1100T	T1100T	normal

### 5.1.1 Δοκιμασία πρόωρου τερματισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης (PTT) για τα μεγάλα εξόνια του γονιδίου *PALB2*

Αρχικά έγινε *in silico* ο σχεδιασμός των εκκινητών για την *in vitro* μεταγραφή/μετάφραση των μεγάλων εξονίων (εξόνια 4, 5) του *PALB2* γονιδίου. Ακολούθησε PCR με τους κατάλληλους εκκινητές για την μεθοδολογία PTT. Στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% για τον έλεγχο της καθαρότητας της αντίδρασης καθώς και του σωστού μεγέθους των προϊόντων της (Σχήμα 5.1).



**Σχήμα 5.1:** PCR προϊόντα των *PALB2* εξονίων 4 και 5 της μεθόδου PTT.

Έγινε μετάφραση των παραπάνω προϊόντων με ιχνηθέτη βιοτινυλιωμένη λυσίνη και ακολούθησε SDS PAGE ηλεκτροφόρηση σε 10% πολυακρυλαμίδιο, μεταφορά των πρωτεϊνών σε PVDF μεμβράνη και τέλος ανίχνευση των προϊόντων με τη μέθοδο της Στρεπταβιδίνης- Αλκαλικής Φωσφατάσης και με υπόστρωμα WesternBlue. Η μεθοδολογία είναι καινοτόμος και απαιτήθηκε βελτιστοποίηση της και για τα δύο εξόνια.

Στα πλαίσια της βελτιστοποίησης της μεθόδου, δοκιμάστηκε η χρήση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης -αντί για PVDF- καθώς και η ανίχνευση με HRP (horseradish peroxidase) αντί της Στρεπταβιδίνης-Αλκαλικής Φωσφατάσης. Τέλος, πειραματιστήκαμε με τις συνθήκες ηλεκτροφόρησης (πυκνότητα της πηκτής πολυακρυλαμιδίου, τάση ρεύματος και χρόνο ηλεκτροφόρησης) καθώς και με την περιεκτικότητα μεθανόλης στο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη. Ιδιαίτερη σημασία φάνηκε να έχει η φόρτωση σημαντικής ποσότητας του δείγματος με τη κατάλληλη χρωστική (στην δική μας περίπτωση δούλεψε η homemade χρωστική και όχι η 3X NEB) ώστε να καθιζάνει το δείγμα στο σημείο φόρτωσης και να εισέρχεται στη πηκτή.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε 57 DNA δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών με κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού και σε δύο DNA δείγματα ελέγχου (ένα για το κάθε εξόνιο) με γνωστές μεταλλάξεις που οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης, άρα και σε μικρότερη πρωτεΐνη. Το δείγμα ελέγχου του εξονίου 4 έφερε την μετάλλαξη R414X (ευγενική χορηγία Prof. E. Imiyatov, St. Petersburg, Russia) και το δείγμα ελέγχου του εξονίου 5 έφερε την μετάλλαξη Q775X (ευγενική χορηγία Prof. W. Foulkes, Montreal, Canada). Στα δείγματα που αναλύθηκαν δεν

βρέθηκε κάποιο που να περιέχει μεταλλάξη η οποία να οδηγεί σε μικρότερη πρωτεΐνη. Στα σχήματα 5.2 και 5.3 φαίνονται ενδεικτικά κάποια δείγματα για τη σάρωση παθογνωμικών μεταλλάξεων με τη PTT μεθοδολογία για τα εξόνια 4 και 5 αντίστοιχα και υποδεικνύονται τα αναμενόμενα μοριακά βάρη (με βάση τον αριθμό αμινοξέων που μεταφράζονται και τον αριθμό μορίων βιοτίνης που προστίθενται στις υπό μετάφραση λυσίνες). Έτσι στην περίπτωση του εξονίου 4 αναμένεται πρωτεϊνικό μέγεθος 50 KDa για το φυσιολογικό αλληλόμορφο. Το μεταλλαγμένο δείγμα ελέγχου έφερε διακριτή μπάντα στα 30 KDa (όπως αναμενόταν για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο). Στην περίπτωση του εξονίου 5 το δείγμα ελέγχου είχε μειωμένο κατά το ήμισυ σήμα στο αναμενόμενο για το φυσιολογικό αλληλόμορφο 30 KDa ωστόσο είχε και μία έντονη μπάντα στα 22 KDa για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (στην ίδια θέση στα φυσιολογικά δείγματα υπάρχει παραπροϊόν μετάφρασης).



**Σχήμα 5.2:** Western Blot σε μεμβράνη PVDF με μέθοδο PTT από το εξόνιο 4 του γονιδίου *PALB2*.



**Σχήμα 5.3:** Western Blot σε μεμβράνη PVDF με μέθοδο PTT από το εξόνιο 5 του γονιδίου *PALB2*.

Συνοπώς η PTT μεθοδολογία αναπτύχθηκε με επιτυχία καθώς ανιχνεύθηκαν τα μεταλλαγμένα δείγματα ελέγχου ενώ και τα αποτελέσματα της PTT ανάλυσης για τα δείγματα της μελέτης που βγήκαν όλα αρνητικά επιβεβαιώθηκαν καθώς με τη μεθοδολογία ανάγνωσης DNA (DNA sequencing) που έγινε σ' όλα τα δείγματα, δεν ανιχνεύθηκαν δείγματα με μεταλλάξεις που οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό της πρωτεΐνης.

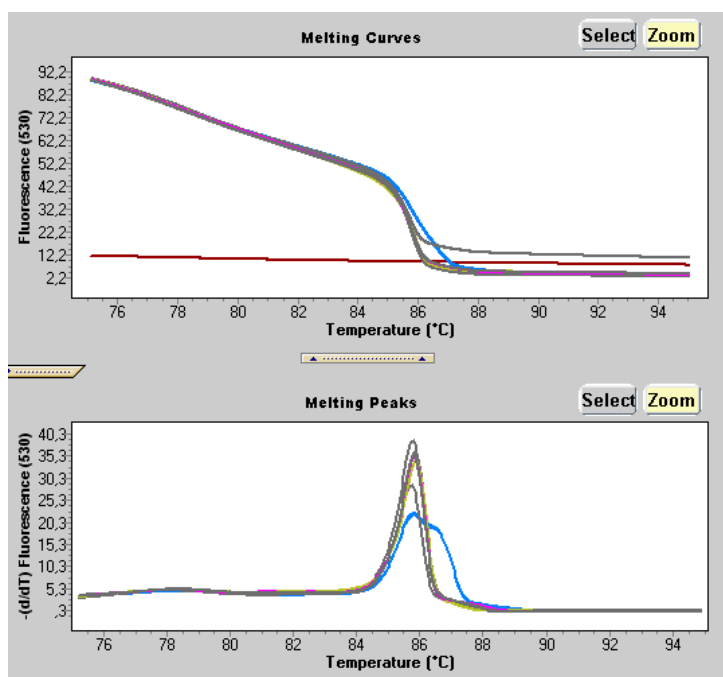
#### **5.1.2 High Resolution Melting Analysis μικρών εξονίων του γονιδίου *PALB2***

Τα μικρά εξόνια του γονιδίου *PALB2* (εξόνια 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) ελέγχθηκαν για μεταλλάξεις με την μέθοδο HRMA (high resolution melting curve analysis) στο όργανο Light Scanner 32 της Idaho Technology (USA) όπου μπορεί να γίνει μαζί PCR και HRMA παρουσία LCGreen plus χρωστικής με σκοπό την εξοικονόμηση χρόνου και τη μαζική ανάλυση δειγμάτων. Παρ' όλα αυτά στην δική μας περίπτωση προτιμήθηκε η PCR των δειγμάτων να γίνει στο LightCycler 1.5 του Αττικού Νοσοκομείου και στη συνέχεια τα υάλινα τριχοειδή να αναλυθούν με HRMA Light Scanner 32 στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας. Θετικοί μάρτυρες υπήρχαν για τα εξόνια 8 και 12. Για το εξόνιο 8 ο θετικός μάρτυρας ο οποίος προήλθε από την ευγενική χορηγία Prof. E. Imiyatov, St. Petersburg, Russia έφερε την

μετάλλαξη V932M ενώ για το εξόνιο 12 χρησιμοποιήθηκε δείγμα που είχε αναλυθεί στα πλαίσια της μεταπτυχιακής εργασίας μου με DNA Sequencing και έφερε τον πολυμορφισμό T1100T.

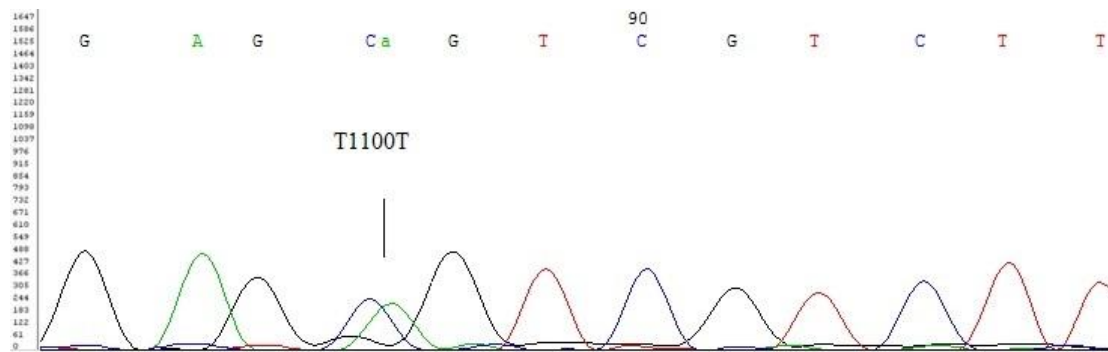
Η PCR αντίδραση για HRMA στο εξόνιο 1 όπου χρησιμοποιήθηκαν δικοί μας εκκινητές αναπτύχθηκε χωρίς προβλήματα. Κατά την διενέργεια της HRMA ανάλυσης στα εξόνια 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11 και 13 δεν βρέθηκε καμία μετάλλαξη. Στο εξόνιο 12 βρέθηκαν πέντε δείγματα που έφεραν τον πολυμορφισμό T1100T rs45516100 (δείγματα 192/39, 70/268, 77/264, 79/240, 80/259) ενώ κατά την ανάλυση του εξονίου 10 βρέθηκε ένας πολυμορφισμός κοντά στον πρόσθιο εκκινητή ο οποίος όμως ευρισκόταν στην περιοχή του ιντρονίου c.3197-46 G>C όπως φάνηκε με το DNA sequencing που πραγματοποιήθηκε στην συνέχεια (δείγμα 43/165 εικόνα 5.7) ο οποίος δεν έχει αναφερθεί σε άλλες εργασίες και δεν προβλέπεται να επηρεάζει το μάτισμα σύμφωνα με το λογισμικό splice site predictor software: [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)).

Όλα τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με DNA Sequencing που έγινε στον γενετικό αναλυτή ABI 310. Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται η καμπύλη τήξης και το ηλεκτροφορογράφημα του εξονίου 12 ενδεικτικά ένα δείγμα.

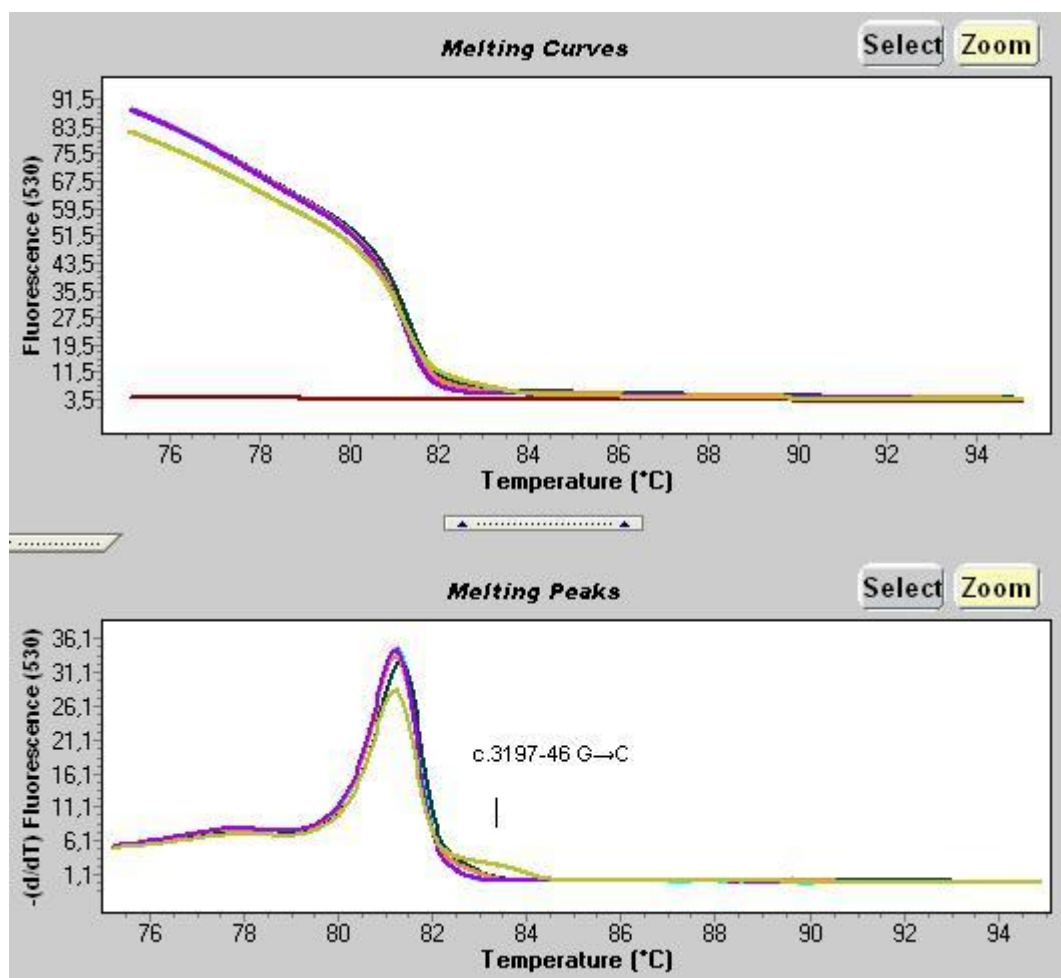


**Σχήμα 5.4:** Καμπύλη τήξης για το εξόνιο 12 δειγμάτων και ανάμεσά τους δείγμα που φέρει τον πολυμορφισμό T1100T (μπλε χρώμα).

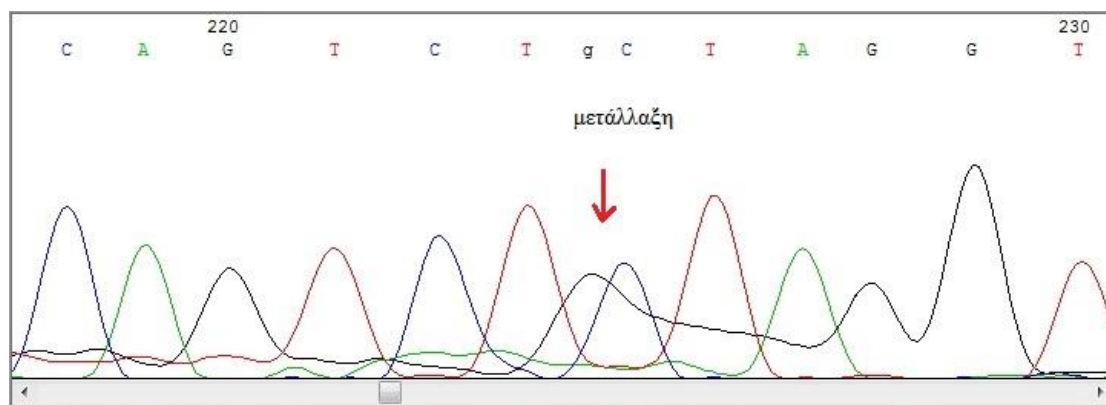




**Σχήμα 5.5:** Ηλεκτροφορογράφημα μετάλλαξης στο εξόνιο 12 δείγματος που φέρει τον πολυμορφισμό T1100T.



**Σχήμα 5.6:** Καμπύλη τήξης για το εξόνιο 10 δειγμάτων και ανάμεσά τους και το δείγμα 43 που φέρει την αλλαγή στο ιντρόνιο πριν το εξόνιο 10.

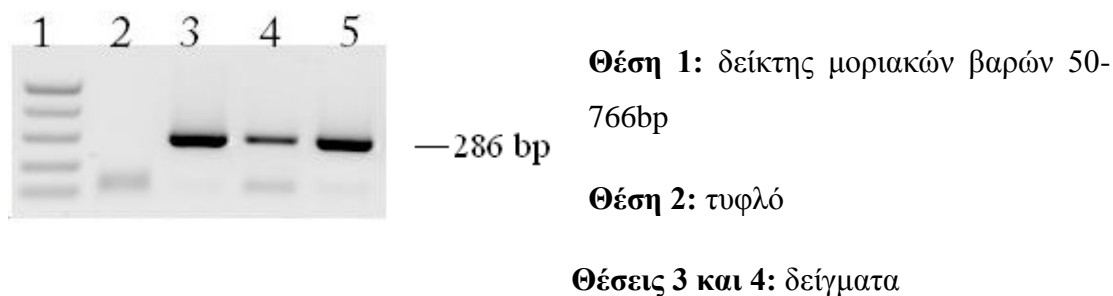


**Σχήμα 5.7:** Ηλεκτροφορογράφημα μετάλλαξης στο ιντρόνιο πριν το εξόνιο 10 του δείγματος 43 που φέρει τον πολυμορφισμό c.3197-46 G>C.

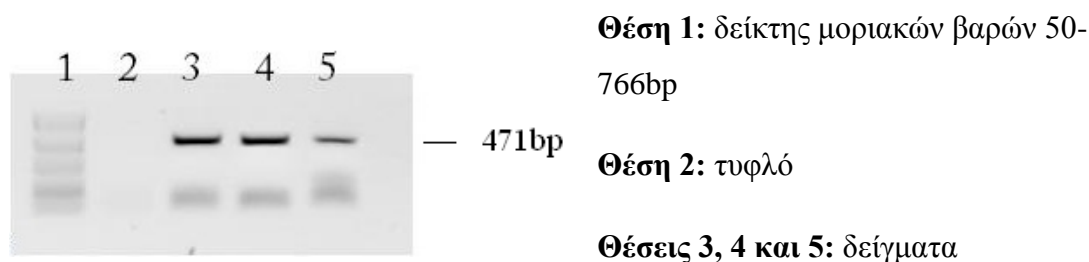
Και η HRMA μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία καθώς τα αποτελέσματα της ήταν ίδια και στην μέθοδο αναφοράς, DNA Sequencing.

### 5.1.3 DNA Sequencing του γονιδίου *PALB2*

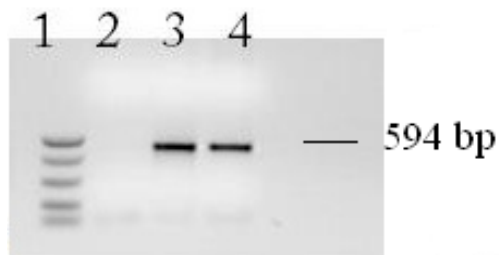
Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην γενετική ανάλυση αναλύθηκαν με την μέθοδο DNA Sequencing και για τα 13 εξόνια του γονιδίου *PALB2*. Στα σχήματα 5.8-5.19 φαίνονται οι ηλεκτροφορήσεις PCR προϊόντων για κάθε εκκινητή.



**Σχήμα 5.8:** Αντιπροσωπευτική PCR για το εξόνιο 1 (1,5 %w/v, gel αγαρόζης).



**Σχήμα 5.9:** Αντιπροσωπευτική PCR για τα εξόνια 2,3 (1,5 %w/v, gel αγαρόζης).

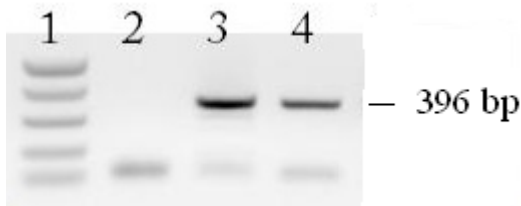


**Θέση 1:** δείκτης μοριακών βαρών 50-766bp

**Θέση 2:** τυφλό

**Θέσεις 3 και 4:** δείγματα

**Σχήμα 5.10:** Αντιπροσωπευτική PCR για το εξόνιο 4a (1,5 %w/v, gel αγαρόζης).



**Θέση 1:** δείκτης μοριακών βαρών 50-766bp

**Θέση 2:** τυφλό

**Θέσεις 3 και 4:** δείγματα

**Σχήμα 5.11:** Αντιπροσωπευτική PCR για το εξόνιο 4b (1,5 %w/v, gel αγαρόζης).

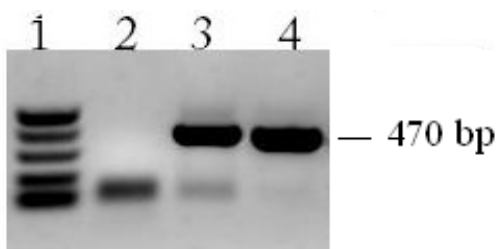


**Θέση 1:** δείκτης μοριακών βαρών 50-766bp

**Θέση 2:** τυφλό

**Θέσεις 3 και 4:** δείγματα

**Σχήμα 5.12:** Αντιπροσωπευτική PCR για το εξόνιο 4c (1,5 %w/v, gel αγαρόζης).

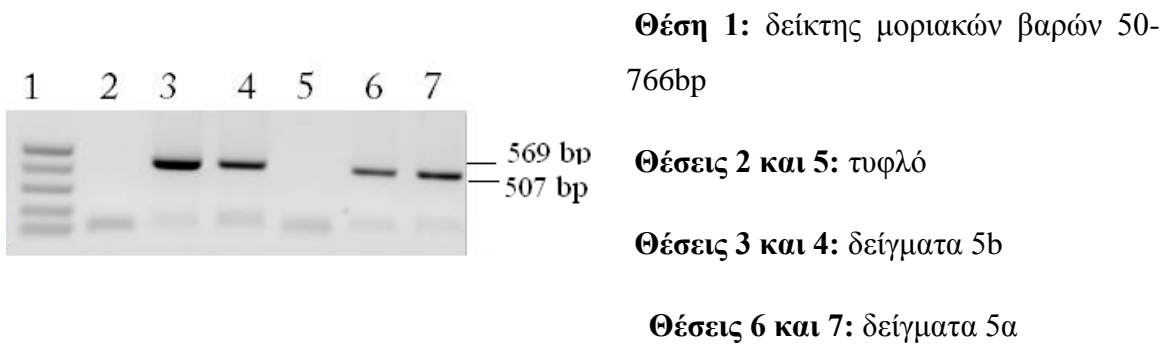


**Θέση 1:** δείκτης μοριακών βαρών 50-766bp

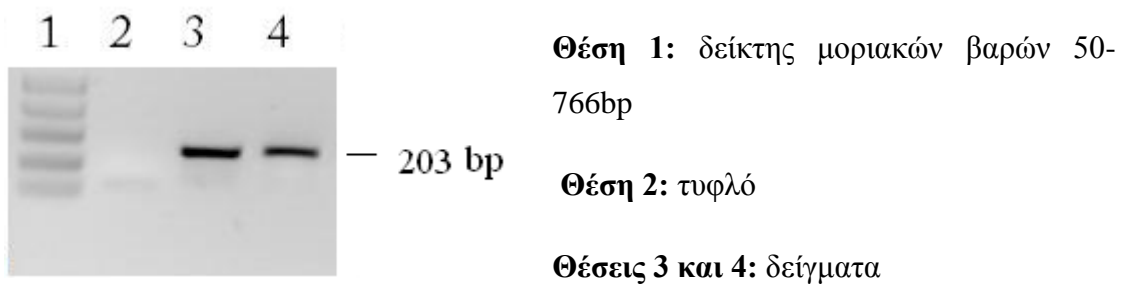
**Θέση 2:** τυφλό

**Θέσεις 3 και 4:** δείγματα

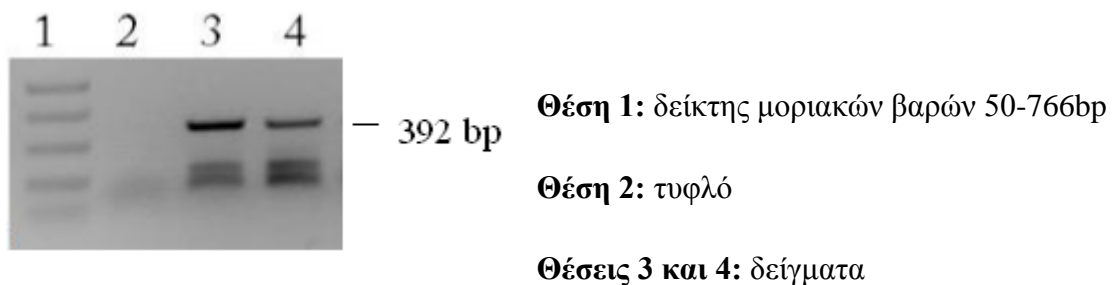
**Σχήμα 5.13:** Αντιπροσωπευτική PCR για το εξόνιο 4d (1,5 %w/v, gel αγαρόζης).



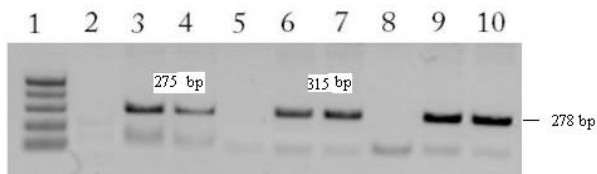
**Σχήμα 5.14:** Αντιπροσωπευτική PCR για τα εξόνια 5b και 5a αντίστοιχα (1,5 %w/v, gel αγαρόζης).



**Σχήμα 5.15:** Αντιπροσωπευτική PCR για το εξόνιο 8 (1,5 %w/v, gel αγαρόζης).



**Σχήμα 5.16:** Αντιπροσωπευτική PCR για το εξόνιο 9 (1,5 %w/v, gel αγαρόζης).



**Θέση 1:** δείκτης μοριακών βαρών 50-766bp

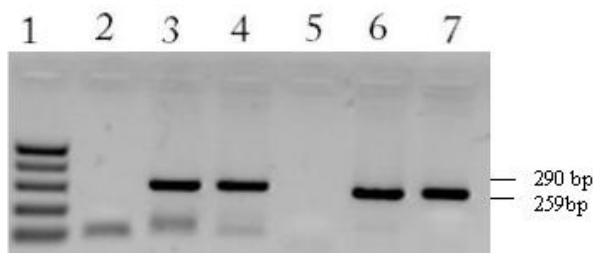
**Θέσεις 2,5 και 8:** τυφλό

**Θέσεις 3 και 4:** δείγματα εξονίου 6

**Θέσεις 6 και 7:** δείγματα εξονίου 7

**Θέσεις 9 και 10:** δείγματα εξονίου 10

**Σχήμα 5.17:** Αντιπροσωπευτική PCR για τα εξόνια 6, 7, 10 αντίστοιχα (1,5 %w/v, gel αγαρόζης).



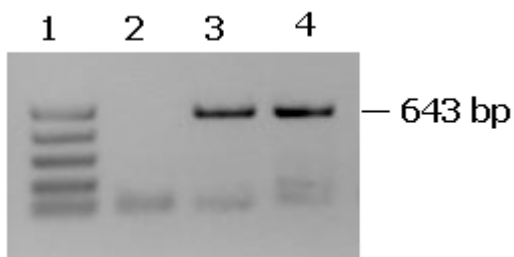
**Θέση 1:** δείκτης μοριακών βαρών 50-766bp

**Θέσεις 2 και 5:** τυφλό

**Θέσεις 3 και 4:** δείγματα εξονίου 11

**Θέσεις 6 και 7:** δείγματα εξονίου 12

**Σχήμα 5.18:** Αντιπροσωπευτική PCR για τα εξόνια 11, 12 αντίστοιχα (1,5 %w/v, gel αγαρόζης)



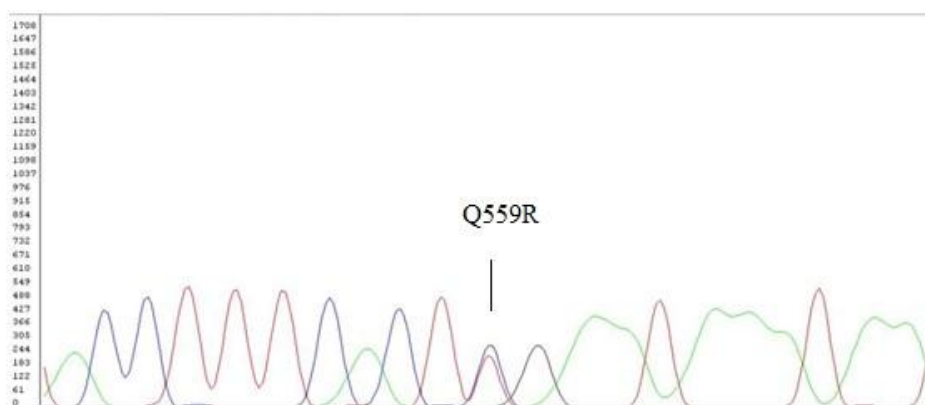
**Θέση 1:** δείκτης μοριακών βαρών 50-766bp

**Θέση 2:** τυφλό

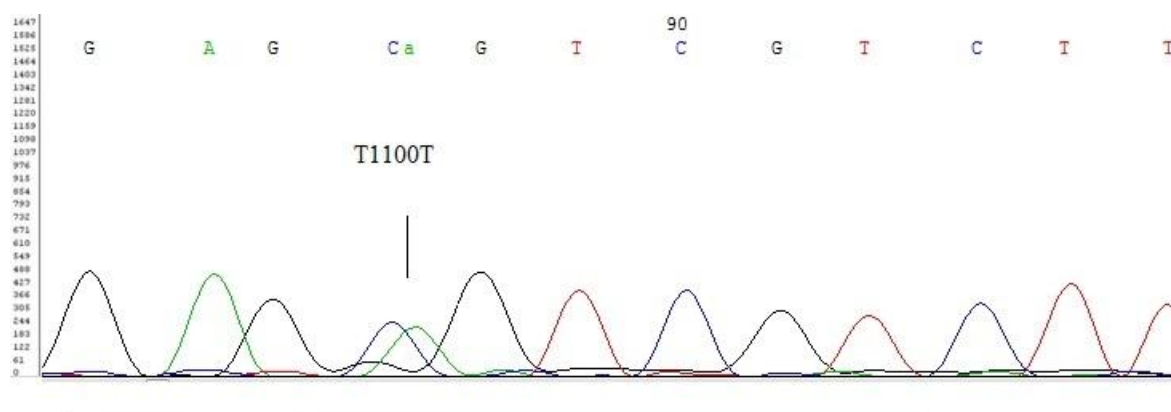
**Θέσεις 3 και 4:** δείγματα

**Σχήμα 5.19:** Αντιπροσωπευτική PCR για το εξόνιο 13 (1,5 %w/v, gel αγαρόζης).

Στα δείγματα 38 και 39 βρέθηκε η παρανοηματική μετάλλαξη c.1876 A→G του εξονίου 4 (rs152451) στην οποία έχουμε αλλαγή του αμινοξέος Q559R. Η μετάλλαξη αναλύθηκε με το πρόγραμμα Polyphen ([www.genetics.bwh.harvard.edu/pph](http://www.genetics.bwh.harvard.edu/pph)) και βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Η ονοματολογία είναι σύμφωνα με τις τελευταίες διεθνείς οδηγίες του HUGO (108). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες η μετάλλαξη αυτή μπορεί να χαρακτηριστεί πολυμορφισμός λόγω της ανίχνευσης της και σε ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό (περίπου 17 %) των φυσιολογικών δειγμάτων (80, 98, 103). Στα σχήματα 5.20 και 5.21 φαίνονται ενδεικτικά τα γραφήματα που εντοπίζονται οι μεταλλάξεις που βρέθηκαν.



**Σχήμα 5.20:** Ηλεκτροφορογράφημα μετάλλαξης στο *PALB2* εξόνιο 4d δείγματος που φέρει τον πολυμορφισμό Q559R.

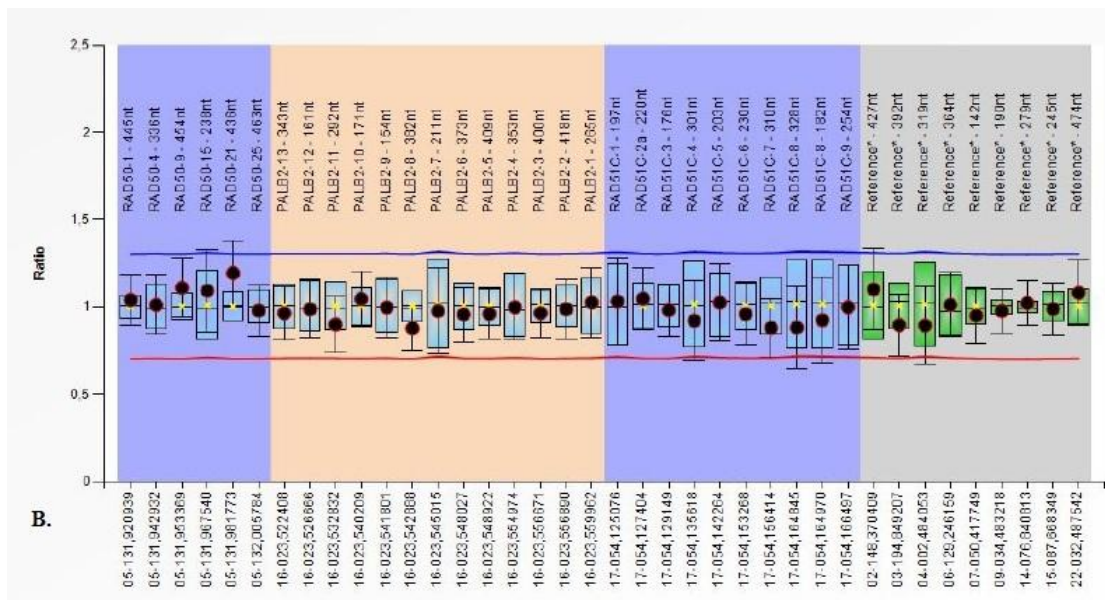
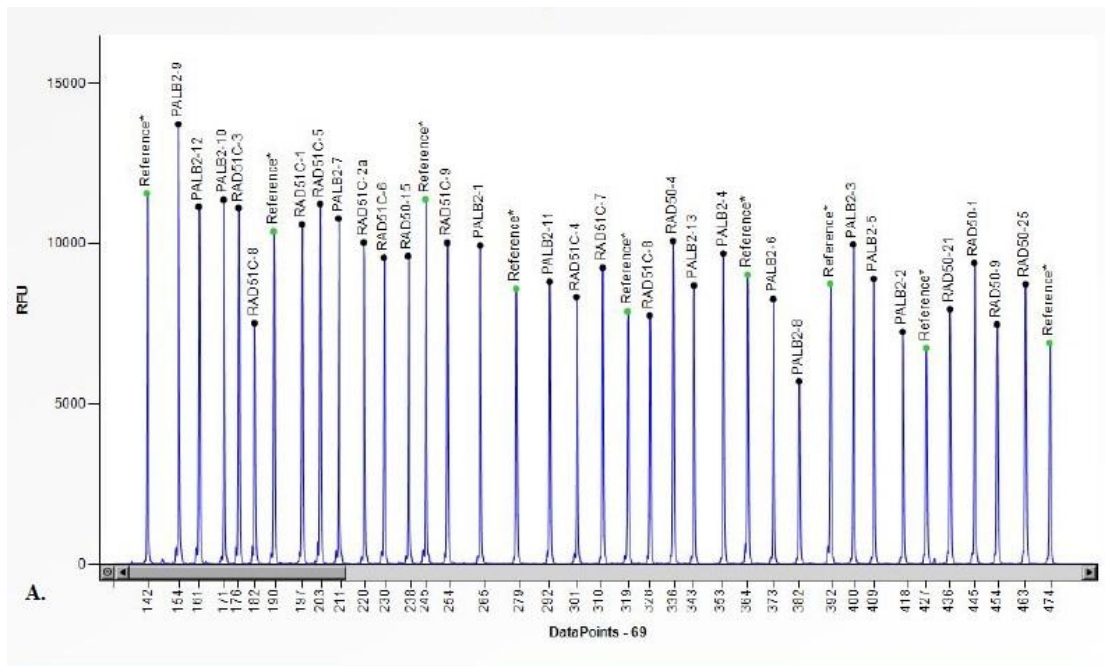


**Σχήμα 5.21:** Ηλεκτροφορογράφημα μετάλλαξης στο *PALB2* εξόνιο 12 δείγματος που φέρει τον πολυμορφισμό T1100T.

Ο ποιοτικός έλεγχος του μηχανήματος έγινε τρεις φορές με το πλασμίδιο PGEM (Applied Biosystems, ΗΠΑ) και αναγνώστηκαν 543, 547 και 546 βάσεις με ακρίβεια 100% αντίστοιχα.

#### 5.1.4 MLPA ανάλυση του *PALB2* γονιδίου

Προκειμένου να ελεγχθούν τα ίδια δείγματα που σαρώθηκαν με την μέθοδο PTT και HRMA για μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις έγινε MLPA ανάλυση. Χρησιμοποιήθηκε το Kit Salsa MLPA probemix P260-A1 το οποίο ανιχνεύει μεγάλες αναδιατάξεις και στα 13 εξόνια του γονιδίου *PALB2*. Η ηλεκτροφόρηση των θραυσμάτων έγινε στον γενετικό αναλυτή ABI 3500 (Applied Biosystems, USA) και η ανάλυση με το ειδικό λογισμικό Coffalyzer.Net (MRC Holland). Ως αρνητικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν DNA από περιφερικό αίμα 8 υγιών ανθρώπων καθώς και τα control fragments που εμπεριέχονται στο αντιδραστήριο του Kit (92 nt fragment για έλεγχο της απόδοσης της αντίδρασης λιγάσης, Q-fragments για χαμηλές ποσότητες DNA, D-fragments για προβλήματα αποδιάταξης και X&Y fragments για έλεγχο σωστής σειράς των δειγμάτων). Κανένα δείγμα δεν βρέθηκε να έχει διπλασιασμό ή έλλειψη κάποιου εξονίου του *PALB2* αλλά ούτε και των *RAD50* και *RAD51C* που συναναλύονταν. Στο σχήμα 5.22 φαίνεται ενδεικτικά η λήψη RawData από τον γενετικό αναλυτή και η ανάλυση από το πρόγραμμα Coffalyzer.Net για το δείγμα 69.



**Σχήμα 5.22:** **A.** Raw Data κορυφές ανιχνευτών για κάθε εξόνιο των 3 γονιδίων που εξετάζει το kit, καθώς και ανιχνευτών ελέγχου που κρίνουν την ποιότητα της ανάλυσης. **B.** Οι μαύρες κουκκίδες είναι η τιμή του κάθε ανιχνευτή για το συγκεκριμένο δείγμα, η κόκκινη και η μπλε γραμμή (0,7-1,4) δημιουργούνται από την επεξεργασία των τιμών του συνόλου των φυσιολογικών δειγμάτων και αποτελούν τα όρια μέσα στα οποία θα πρέπει να βρίσκεται ένα φυσιολογικό δείγμα (95% όριο εμπιστοσύνης  $\pm 2SD$ ). Πάνω από την μπλε γραμμή θεωρούμε ότι έχουν διπλασιασμό κάποιου εξονίου ενώ κάτω από την κόκκινη γραμμή έλλειψη.



## 5.2- Ανάλυση Έκφρασης του *PALB2* γονιδίου

Στην παρούσα εργασία, απομονώθηκε DNA και ολικό RNA από 91 ιστούς καρκίνου του μαστού και 4 φυσιολογικούς ιστούς (χωρίς κακοήθεια) από το Ευγενίδειο Θεραπευτήριο και πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός του ολικού RNA φθορισμομετρικά με το φθορισμόμετρο *Qubit*<sup>®</sup>. Στον πίνακα 5.3 φαίνονται τα κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Η μεταβλητή ιστοπαθολογικός τύπος ομαδοποιήθηκε σε τρεις ομάδες: φυσιολογικοί ιστοί (NORMAL), καρκινώματα καλής πρόγνωσης και καρκινώματα κακής πρόγνωσης προς διευκόλυνση των μετέπειτα αναλύσεων. Στα καρκινώματα κακής πρόγνωσης, που αποτελούσαν το 80% των δειγμάτων, συμπεριλήφθηκαν το πορογενές (IDC) και το Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors (MPNST) ενώ στα καρκινώματα καλής πρόγνωσης, το λοβιακό καρκίνωμα (ILC), το μικτό καρκίνωμα (IDC & ILC) (MIX), το βλεννώδες καρκίνωμα (MUC), το θηλώδες καρκίνωμα (PAP), το λοβιακό καρκίνωμα σπάνιου τύπου (LOBRARE), το ενδοπορικό καρκίνωμα (DCIS) και το μεταπλαστικό καρκίνωμα (MET). Ακόμη, η έκφραση των ορμονικών υποδοχέων κατηγοριοποιήθηκε σε θετική (2 έως 3) και αρνητική (0 έως 1). Η ενίσχυση του ογκογονιδίου *HER2/neu* ομαδοποιήθηκε είτε σε θετική (3 ή 2 με FISH<sup>+</sup>) είτε σε αρνητική (0 έως 2 ή 2 με FISH<sup>-</sup>). Στον πίνακα 5.4 παρουσιάζεται η συγκέντρωση του DNA και του ολικού RNA για κάθε δείγμα. Στα περισσότερα των δειγμάτων έγινε προσπάθεια να παραχθεί cDNA από 3 μg RNA (ειδιάλλως από 0,5μg RNA). Στην πρώτη στήλη του πίνακα 5.6 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα ποσοστά των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών.

Πίνακας 5.3. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο του μαστού.

<i>ID</i>	<i>Age</i>	<i>Size</i>	<i>Ιστοπαθολογικός τύπος</i>	<i>Node</i>	<i>Grade</i>	<i>ER</i>	<i>PgR</i>	<i>HER2/neu ενίσχυση</i>	<i>Μετάσταση</i>
<b>T2</b>	56	1,5	NORMAL						
<b>T3</b>	70	3,0	ILC	Θετικό	II	3	1	1	ΟΧΙ
<b>T4</b>	58	1,5	IDC	Θετικό	II	2	1	0	ΟΧΙ
<b>T5</b>	76	3,5	IDC	Αρνητικό	II	3	2	0	-

<b>T9</b>		1,3	IDC	Θετικό	II	3	2	0	OXI
<b>T10</b>	58	1,8	IDC	Θετικό	I	3	2	0	OXI
<b>T11</b>	47	1,5	IDC	Θετικό	II	3	3	3	OXI
<b>T12</b>		3,0	IDC	Αρνητικό	III	0	0	2	OXI
<b>T13</b>		2,2	MUC	Θετικό		2	2	0	OXI
<b>T14</b>		2,0	IDC	Θετικό	III	3	1	1	-
<b>T15</b>	63	2,0	IDC	Θετικό	II	3	2	2	-
<b>T16</b>		1,5	IDC	Θετικό	II	1	1	0	OXI
<b>T17</b>			IDC		III	1	2	0	NAI
<b>T18</b>		2,2	IDC	Αρνητικό	III	0	0	2	OXI
<b>T19</b>			MIX						-
<b>T20</b>		1,0	IDC	Θετικό	II	2	2	0	-
<b>T28</b>		1,5	IDC	Αρνητικό	II	3	1	1	OXI
<b>T31</b>		2,0	IDC	Αρνητικό	II	3	2	1	OXI
<b>T32</b>	38	1,5	NORMAL						
<b>T33</b>		1,6	IDC	Θετικό	II	3	2	1	-
<b>T34</b>			NORMAL						
<b>T35</b>		3,0	IDC	Αρνητικό	III	1	0	1	OXI
<b>T36</b>	72	4,0	LOBRARE	Θετικό	III	3	3	1	OXI
<b>T37</b>	57	2,0	IDC	Αρνητικό	II	0	0	2	OXI
<b>T38</b>	49	4,0	IDC	Αρνητικό	III	3	1	3	-
<b>T39</b>	65	5,5	ILC	Θετικό	II	2	2	2	OXI
<b>T40</b>	45	1,8	MIX	Αρνητικό	III	2	2	2	OXI
<b>T42</b>	69	1,3	IDC	Θετικό	II	3	3	2	OXI
<b>T43</b>	62	3,0	IDC	Θετικό	II	2	0	1	OXI

<b>T44</b>	76	2,3	IDC	Θετικό	II	2	2	2	OXI
<b>T46</b>	72	1,8	IDC	Θετικό	II	3	1	2	OXI
<b>T48</b>	60	1,6	IDC	Αρνητικό	III	1	0	2	NAI
<b>T49</b>	65	2,2	IDC	Αρνητικό	II	3	2	3	NAI
<b>T50</b>	40	1,0	IDC	Θετικό	II	3	2	2	-
<b>T51</b>	64	2,0	IDC	Θετικό	II	3	1	2	OXI
<b>T52</b>	50	2,5	IDC	Αρνητικό	III	2	1	2	OXI
<b>T53</b>	80	3,0	IDC	Αρνητικό	II	3	2	2	-
<b>T54</b>	45	5,0	DCIS	Αρνητικό		1	0	1	OXI
<b>T55</b>	50	2,0	IDC	Θετικό	II	3	2	2	-
<b>T56</b>	66	2,0	PAP	Θετικό		3	2	2	-
<b>T57</b>	42	1,8	IDC	Θετικό	III	0	0	2	OXI
<b>T58</b>	71	3,0	IDC	Αρνητικό	II	1	0	2	OXI
<b>T59</b>	56	1,6	IDC	Θετικό	II	3	0	2	OXI
<b>T61</b>	65	3,0	IDC	Θετικό	III	3	1	2	OXI
<b>T63</b>	69	1,0	PAP	Θετικό		3	2	2	OXI
<b>T64</b>	40	2,5	PAP	Θετικό	II	0	0	0	-
<b>T65</b>	59	1,5	IDC	Θετικό	II	3	3	2	-
<b>T66</b>	64	1,5	PAP	Θετικό		3	0	1	NAI
<b>T68</b>	54	2,0	IDC	Θετικό	III	3	3	2	OXI
<b>T69</b>		3,5	IDC	Θετικό	III	2	1	2	-
<b>T70</b>	47	1,5	IDC		II	3	1	2	NAI
<b>T71</b>	83	1,8	IDC	Αρνητικό	II	1	1	2	OXI
<b>T72</b>	49	1,8	IDC	Αρνητικό	II	3	1	2	OXI
<b>T73</b>	72	1,0	PAP	Θετικό		3	1	1	OXI

<b>T74</b>	68	2,5	IDC	Θετικό	II	3	1	2	-
<b>T75</b>	56	1,3	IDC	Θετικό	II	3	2	2	OXI
<b>T76</b>	39	1,0	IDC	Θετικό	II	3	2	2	-
<b>T77</b>	50	1,3	IDC	Θετικό	I	2	2	0	OXI
<b>T78</b>	42	1,6	IDC	Θετικό	II	2	2	2	-
<b>T79</b>		1,3	IDC	Θετικό	II	3	1	2	OXI
<b>T80</b>	51	1,3	MIX	Θετικό	II	3	1	1	OXI
<b>T81</b>	59	2,5	MUC	Θετικό	II	3	0	1	ΝΑΙ
<b>T82</b>	29	2,2	IDC	Θετικό	II	2	1	2	-
<b>T87</b>	48	1,2	IDC	Θετικό	II	0	0	1	-
<b>T88</b>	45	1,5	MET			0	0	1	-
<b>T89</b>	45	3,5	ILC	Αρνητικό	II	3	3	1	OXI
<b>T91</b>	74	1,5	IDC	Θετικό	III	3	1	2	-
<b>T92</b>	62	1,3	IDC	Αρνητικό	II	0	0	0	OXI
<b>T93</b>	52	1,0	IDC		III	3	2	2	ΝΑΙ
<b>T94</b>	67	1,0	IDC	Θετικό	II	3	2	1	OXI
<b>T95</b>	47	2,5	IDC	Θετικό	III	1	0	1	OXI
<b>T98</b>	64	2,0	IDC	Αρνητικό	II	0	0	1	-
<b>T100</b>	60	3,0	MPNST		II				ΝΑΙ
<b>T101</b>	75	1,5	IDC	Θετικό	II	0	0	1	OXI
<b>T102</b>	45	2,0	IDC	Θετικό	II	3	2	1	ΝΑΙ
<b>T103</b>	68	2,0	IDC		I	3	3	0	-
<b>T104</b>	55	1,4	IDC	Θετικό	II	3	3	1	-
<b>T105</b>	48	1,6	IDC	Θετικό	II	2	2	3	-
<b>T106</b>	36	2,2	IDC	Αρνητικό	III	3	0	2	-

<b>T108</b>	63	1,6	IDC	Αρνητικό	II	0	0	2	-
<b>T109</b>		1,0	IDC	Θετικό	II	3	3	0	-
<b>T110</b>		1,5	IDC	Θετικό	II	3	2	2	OXI
<b>T111</b>	62	1,7	IDC	Θετικό	II	3	2	2	-
<b>T112</b>	62	3,5	IDC	Αρνητικό	II	3	2	1	-
<b>T114</b>	78	2,0	IDC	Θετικό	II	3	3	2	-
<b>T116</b>	81	2,8	IDC	Θετικό	II	3	3	2	-
<b>T121</b>	35		NORMAL						
<b>T126</b>	76	2,0	IDC	Θετικό	II	0	0	0	-
<b>T127</b>	48	1,0	IDC		III	3	1	3	-
<b>T128</b>	51	1,8	ILC	Αρνητικό	III	3	3	2	OXI
<b>T129</b>	53	2,0	IDC	Αρνητικό	III	0	0	3	-
<b>T130</b>	45	3,0	IDC	Θετικό	II	3	2	0	NAI
<b>T131</b>	43	1,8	IDC	Θετικό	II	3	0	0	OXI
<b>T132</b>	47	3,5	ILC	Αρνητικό	II	2	2	1	OXI
<b>T134</b>	45		NORMAL						OXI
<b>T142</b>	39	1,5	IDC	Θετικό	II	3	3	3	OXI

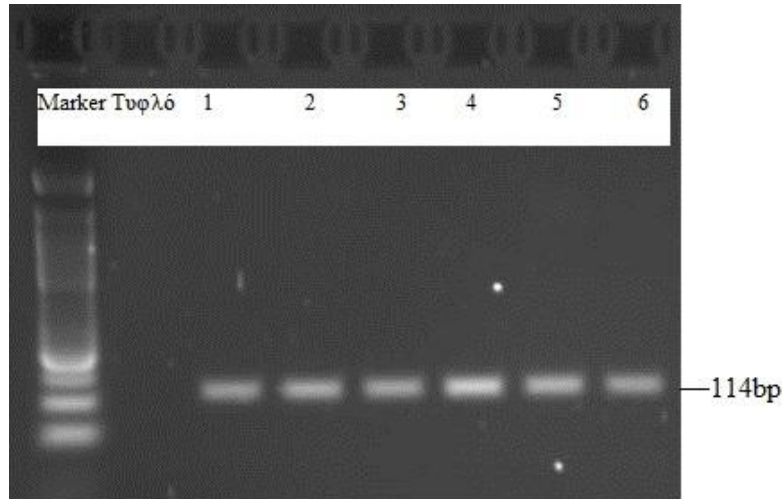
Πίνακας 5.4. Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού RNA δειγμάτων.

<b>ID</b>	<b>DNA (ng/μL)</b>	<b>RNA (ng/μL)</b>	<b>ID</b>	<b>DNA (ng/μL)</b>	<b>RNA (ng/μL)</b>	<b>ID</b>	<b>DNA (ng/μL)</b>	<b>RNA (ng/μL)</b>	<b>ID</b>	<b>DNA (ng/μL)</b>	<b>RNA (ng/μL)</b>
<b>T2</b>	98,4	1200	<b>T38</b>	231,5	579,1	<b>T68</b>	86,4	27,6	<b>T100</b>	74,2	154,8
<b>T3</b>	174	20	<b>T39</b>	78,4	9	<b>T69</b>	36,6	36,8	<b>T101</b>	57	2,8
<b>T4</b>	300	800	<b>T40</b>	199,9	74,3	<b>T70</b>	47,2	102	<b>T102</b>	128,4	114,8

<b>T5</b>	2,57	1100	<b>T42</b>	46,2	8,54	<b>T71</b>	15,58	78,6	<b>T103</b>	75	107,5
<b>T9</b>	94,5	100	<b>T43</b>	118,5	5,36	<b>T72</b>	92,2	492	<b>T104</b>	196,3	1,7
<b>T10</b>	172	60	<b>T44</b>	431,4	65	<b>T73</b>	236	66,6	<b>T105</b>	365,5	191,2
<b>T11</b>	227	50	<b>T46</b>	267,4	17,34	<b>T74</b>	55,4	38,4	<b>T106</b>	296,6	408,2
<b>T12</b>	271	2400	<b>T48</b>	564,1	39,6	<b>T75</b>	70	10,72	<b>T108</b>	225,2	107,8
<b>T13</b>	10,7	40	<b>T49</b>	325,4	64	<b>T76</b>	31,8	120	<b>T109</b>	200,1	24,2
<b>T14</b>	1,82	300	<b>T50</b>	123,6	51,8	<b>T77</b>	130,8	106	<b>T110</b>	190	11,5
<b>T15</b>	no DNA	4000	<b>T51</b>	135,6	95,6	<b>T78</b>	80,4	42	<b>T111</b>	79,5	131,7
<b>T16</b>	600	5	<b>T52</b>	84,2	108	<b>T79</b>	99,8	62,6	<b>T112</b>	295,11	123
<b>T17</b>	73,5	120	<b>T53</b>	143,6	174	<b>T80</b>	98,4	41,4	<b>T114</b>	no DNA	20,9
<b>T18</b>	396	300	<b>T54</b>	128,2	35,2	<b>T81</b>	78,8	71,2	<b>T116</b>	102,2	116,9
<b>T19</b>	121	150	<b>T55</b>	183,6	39,2	<b>T82</b>	169,00	56,8	<b>T121</b>	134,7	108,8
<b>T20</b>	2,34	800	<b>T56</b>	67,8	16,58	<b>T87</b>	75,6	138	<b>T126</b>	194,2	no RNA
<b>T28</b>	6,67	98	<b>T57</b>	51	110	<b>T88</b>	102,6	102	<b>T127</b>	73,6	141,2
<b>T31</b>	126	200	<b>T58</b>	21,2	102	<b>T89</b>	240	174	<b>T128</b>	282,3	81,4
<b>T32</b>	7,37	87	<b>T59</b>	194,4	60,8	<b>T91</b>	68,6	57,2	<b>T129</b>	302,8	159,5
<b>T33</b>	1,93	63,4	<b>T61</b>	120,6	128	<b>T92</b>	27,4	74,8	<b>T130</b>	80,4	5,2
<b>T34</b>	54,3	62	<b>T63</b>	19,34	88	<b>T93</b>	38,2	116	<b>T131</b>	183,5	36,6
<b>T35</b>	89,1	51	<b>T64</b>	130,2	64,4	<b>T94</b>	32	25,2	<b>T132</b>	159,2	14,8
<b>T36</b>	396,1	191,9	<b>T65</b>	29,4	80,6	<b>T95</b>	50,8	14,66	<b>T142</b>	193,2	75,7
<b>T37</b>	348,9	21,3	<b>T66</b>	64	1	<b>T98</b>	46,2	197,6			

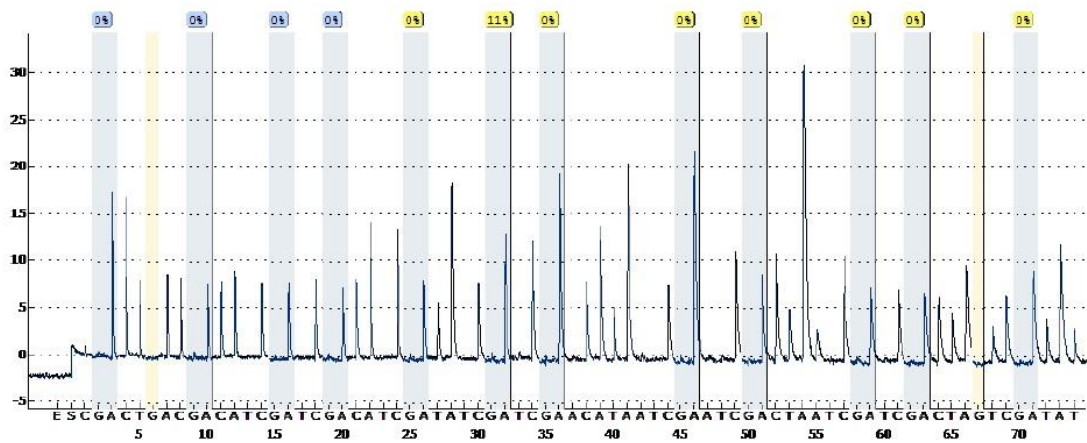
### 5.2.1 Ανίχνευση μεθυλίωσης του *PALB2* υποκινητή με Pyrosequencing

Για την ανίχνευση μεθυλίωσης της CpG νησίδας του *PALB2* υποκινητή έγινε αρχικά PCR και ελέγχθησαν τα προϊόντα για το σωστό μέγεθος και την καθαρότητα της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης 2%. Στο σχήμα 5.23 φαίνονται ενδεικτικά οι αντιδράσεις μερικών δειγμάτων.



**Σχήμα 5.23:** PCR αντιδράσεις για την ανίχνευση επιγενετικών τροποποιήσεων στον υποκινητή του γονιδίου *PALB2*.

Στην συνέχεια τα δείγματα έπειτα από την κατάλληλη προεργασία εισήχθησαν στον αναλυτή PyroMark Q96 προς ανάλυση. Κατά την ανάλυση υπήρχε εσωτερικός έλεγχος για την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης μετατροπής των δειγμάτων με όξινο θειώδες νάτριο. Σε δύο δείγματα η μετατροπή τους δεν ήταν ικανοποιητική σύμφωνα με το εσωτερικό έλεγχο της μεθόδου (κατά τον οποίο μετριέται η ενσωμάτωση για παράδειγμα, σε ανάστροφη ακολουθία, dATP σε μια C βάση πριν την μετατροπή εκτός CG περιοχής, και αναμένεται το ratio να είναι 100% για να θεωρήσουμε ότι έχει γίνει πλήρης μετατροπή C σε T) οπότε αφαιρέθηκαν από την μελέτη. Αναλύθηκαν 12 CpG *PALB2* δινουκλεοτίδια. Σε κανένα από τα 91 δείγματα που αναλύθηκαν δεν βρέθηκε μεθυλίωση του υποκινητή του *PALB2* γονιδίου. Στα σχήματα 5.24 και 5.25 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα πυρογραφήματα για τα δείγματα ελέγχου 0% και 80% *PALB2* μεθυλιωμένο. Η μέθοδος ανίχνευσε μεθυλίωση έως και το 5% δείγμα ελέγχου.



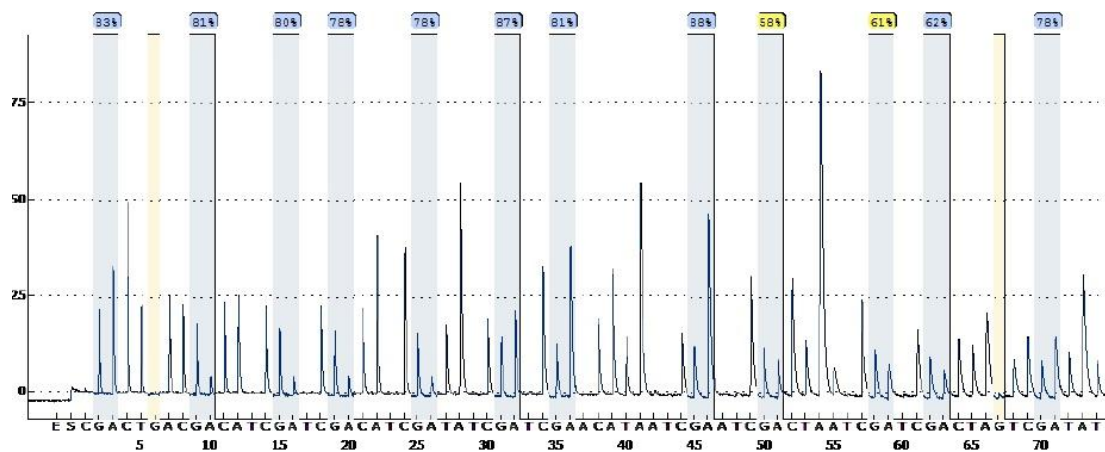
Sequence to analyze:

RACCTACRCACRCRCAACCR TAAACRACCR AAACAATAAAAACRAAACCR CCTAAAAAAAACCCRCRCTATCR  
ATAAATCCCAATAAACCACTAAAA

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed	Check	Check	Check	Check	Check	Check	Check	Check
Meth (%)	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0

**Σχήμα 5.24:** Πυρογράφημα *PALB2* υποκινητή για το μη μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου τα ποσοστά Meth (%) είναι ο λόγος A/A+G για την reverse ακολουθία που ισχύει στην περίπτωση μας. Ο μέσος όρος είναι 0,92 % στα 12 εξεταζόμενα CpGs. Μιας και ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε υβριδίζεται στον ανάστροφο κλώνο, το ποσοστό της μεθυλίωσης προκύπτει από τον λόγο G/A+G καθώς μια μεθυλιωμένη κυτοσίνη παραμένει κυτοσίνη κατά την μετατροπή του DNA και είναι συμπληρωματική με την G. Τα 12 εξεταζόμενα CpGs παρουσιάζονται ως μπλε στήλες ενώ με τις κίτρινες στήλες παρουσιάζονται οι δυο κυτοσίνες εκτός CpGs περιοχών οι οποίες εξετάστηκαν προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της DNA μετατροπής με θειώδες νάτριο.





Sequence to analyze:

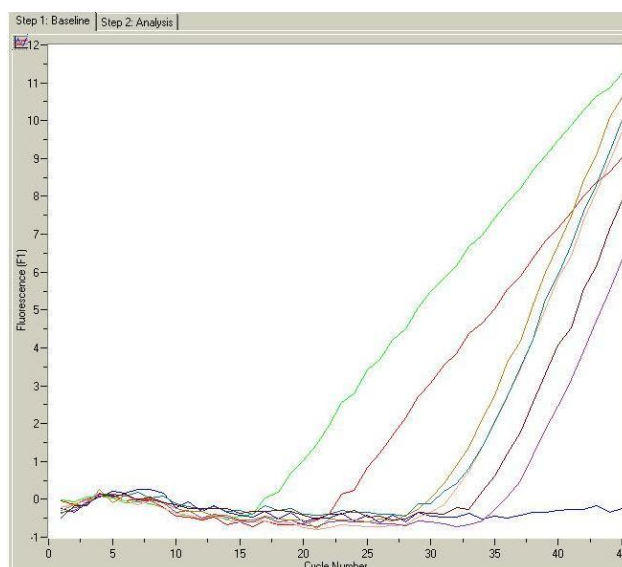
RACCTACRCACRCRCAACCR<sup>83%</sup>TAAACR<sup>81%</sup>ACCR<sup>80%</sup>AAACAATAAAACR<sup>78%</sup>AAAACCR<sup>78%</sup>CCTAAAAAAAACCR<sup>87%</sup>CRCTATCR  
ATAAATCCCAATAAACCACTAAAA

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Quality	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Passed	Check	Check	Passed	Passed
Meth (%)	83	81	80	78	78	87	81	88	58	61	62	78

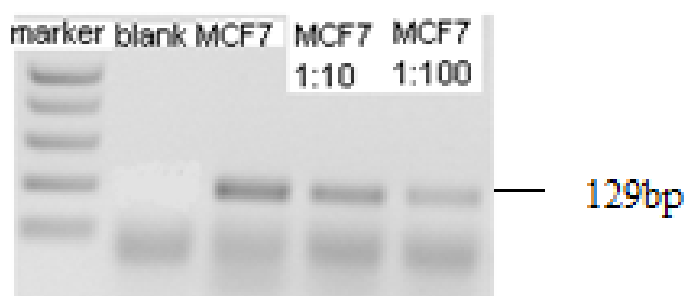
**Σχήμα 5.25:** Πυρογράφημα *PALB2* υποκινητή για το 80% μεθυλιωμένο δείγμα ελέγχου (τα ποσοστά Meth (%) είναι ο λόγος A/A+G για την reverse ακολουθία που ισχύει στην περίπτωση μας). Ο μέσος όρος είναι 76,23 % στα 12 εξεταζόμενα CpGs.

### 5.2.2 Έκφραση γονιδίου *PALB2* με RT- qPCR

Ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός των αντιγράφων *PALB2* σε κάθε δείγμα. Στο σχήμα 5.26 παρουσιάζεται η ενίσχυση δειγμάτων κατά την RT- qPCR. Η εξειδίκευση των προϊόντων ενίσχυσης που λαμβάνονται με την RT-qPCR στο Light Cycler επιβεβαιώθηκε από φυγοκέντρηση των ανεστραμμένων υάλινων τριχοειδών σε σωληνάρια τύπου *Eppendorf*. Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτής αгарόζης 2 % κατέδειξε το σωστό μέγεθος (129 bp) και την καθαρότητα των PCR προϊόντων (Σχήμα 5.27). Όταν αναλύθηκε γενωμικό DNA, δεν ανιχνεύτηκε αντίστοιχη ζώνη. Οι αλληλουχίες των RT-qPCR προϊόντων ελέγχθηκαν με DNA Sequencing και το αντιδραστήριο Big Dye 1.1 (Life Technologies Applied Biosystems, USA) στον γενετικό αναλυτή ABI Prism 310. Με το πρόγραμμα BLAST του Pub Med επιβεβαιώθηκε ότι αφορά αλληλουχία του *PALB2* γονιδίου.



**Σχήμα 5.26:** Ενίσχυση δειγμάτων κατά την RT - qPCR στο *PALB2* γονίδιο.



**Σχήμα 5.27:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων RT-qPCR σε πηκτή αγαρόζης 2% σε cDNA από MCF-7 κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού και αραιώσεις του.

Μεταξύ των 95 δειγμάτων (91 ιστοί καρκίνου του μαστού και 4 φυσιολογικοί ιστοί μαστού) που μελετήθηκαν, το *PALB2* εμφάνισε έκφραση σε 87 από τα 91 καρκινικά δείγματα (95,6 %). Η μέση τιμή των αντιγράφων ήταν  $7,23 \times 10^4$  copies/μg ολικού RNA ενώ η διάμεση τιμή ήταν  $1,34 \times 10^4$  copies/μg αντίγραφα/μg ολικού RNA. Το εύρος των αντιγράφων κυμάνθηκε από  $3,51 \times 10$  έως  $1,23 \times 10^6$  copies/μg αντίγραφα/μg ολικού RNA. Στον πίνακα 5.5 τα αντίγραφα του *PALB2* που ανιχνεύτηκαν και υπολογίστηκαν για κάθε δείγμα (συμπεριλαμβανομένων των αραιώσεων που έγιναν) ανά μg ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκε στη παρασκευή του cDNA.

Πίνακας 5.5. Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού του PALB2 mRNA.

<i>ID</i>	<i>Μετάγραφα PALB2 /<math>\mu</math>g ολικού RNA</i>	<i>ID</i>	<i>Μετάγραφα PALB2 /<math>\mu</math>g ολικού RNA</i>	<i>ID</i>	<i>Μετάγραφα PALB2 /<math>\mu</math>g ολικού RNA</i>	<i>ID</i>	<i>Μετάγραφα PALB2 /<math>\mu</math>g ολικού RNA</i>
<i>T2</i>	7.060	<i>T38</i>	587	<i>T68</i>	13.075	<i>T100</i>	4.348
<i>T3</i>	7.637	<i>T39</i>	23.419	<i>T69</i>	8.308	<i>T101</i>	361.264
<i>T4</i>	8.918	<i>T40</i>	1.227.456	<i>T70</i>	2.284	<i>T102</i>	8.015
<i>T5</i>	2.927	<i>T42</i>	6.663	<i>T71</i>	21.139	<i>T103</i>	30.955
<i>T9</i>	3.373	<i>T43</i>	26.765	<i>T72</i>	33.740	<i>T104</i>	26.416
<i>T10</i>	6.853	<i>T44</i>	1.330	<i>T73</i>	4.770	<i>T105</i>	129.546
<i>T11</i>	8.900	<i>T46</i>	1.675	<i>T74</i>	55.729	<i>T106</i>	3.825
<i>T12</i>	2.408	<i>T48</i>	9.250	<i>T75</i>	101.052	<i>T108</i>	63.522
<i>T13</i>	3.435	<i>T49</i>	24.219	<i>T76</i>	83.000	<i>T109</i>	769
<i>T14</i>	105.200	<i>T50</i>	6.597	<i>T77</i>	16.311	<i>T110</i>	58.033
<i>T15</i>	157	<i>T51</i>	10.523	<i>T78</i>	519.780	<i>T111</i>	7.913
<i>T16</i>	0	<i>T52</i>	103.704	<i>T79</i>	43.653	<i>T112</i>	12.221
<i>T17</i>	96.667	<i>T53</i>	59.050	<i>T80</i>	20.126	<i>T114</i>	19.728
<i>T18</i>	57.053	<i>T54</i>	1.468	<i>T81</i>	48.193	<i>T116</i>	32.533
<i>T19</i>	16.589	<i>T55</i>	116.366	<i>T82</i>	304.683	<i>T121</i>	1.225
<i>T20</i>	1.250	<i>T56</i>	6.764	<i>T87</i>	73.372	<i>T126</i>	0
<i>T28</i>	88.010	<i>T57</i>	1.264	<i>T88</i>	145.882	<i>T127</i>	141

<b>T31</b>	75.550	<b>T58</b>	13.775	<b>T89</b>	122.605	<b>T128</b>	81
<b>T32</b>	2.707	<b>T59</b>	5.086	<b>T91</b>	8.238	<b>T129</b>	160
<b>T33</b>	7.836	<b>T61</b>	168.984	<b>T92</b>	93.871	<b>T130</b>	5
<b>T34</b>	-	<b>T63</b>	35	<b>T93</b>	22.719	<b>T131</b>	0
<b>T35</b>	518.552	<b>T64</b>	52.878	<b>T94</b>	535.043	<b>T132</b>	15
<b>T36</b>	1.222	<b>T65</b>	68.404	<b>T95</b>	56.218	<b>T142</b>	76
<b>T37</b>	3.034	<b>T66</b>	545.231	<b>T98</b>	25.958		

#### **Καμπύλη βαθμονόμησης**

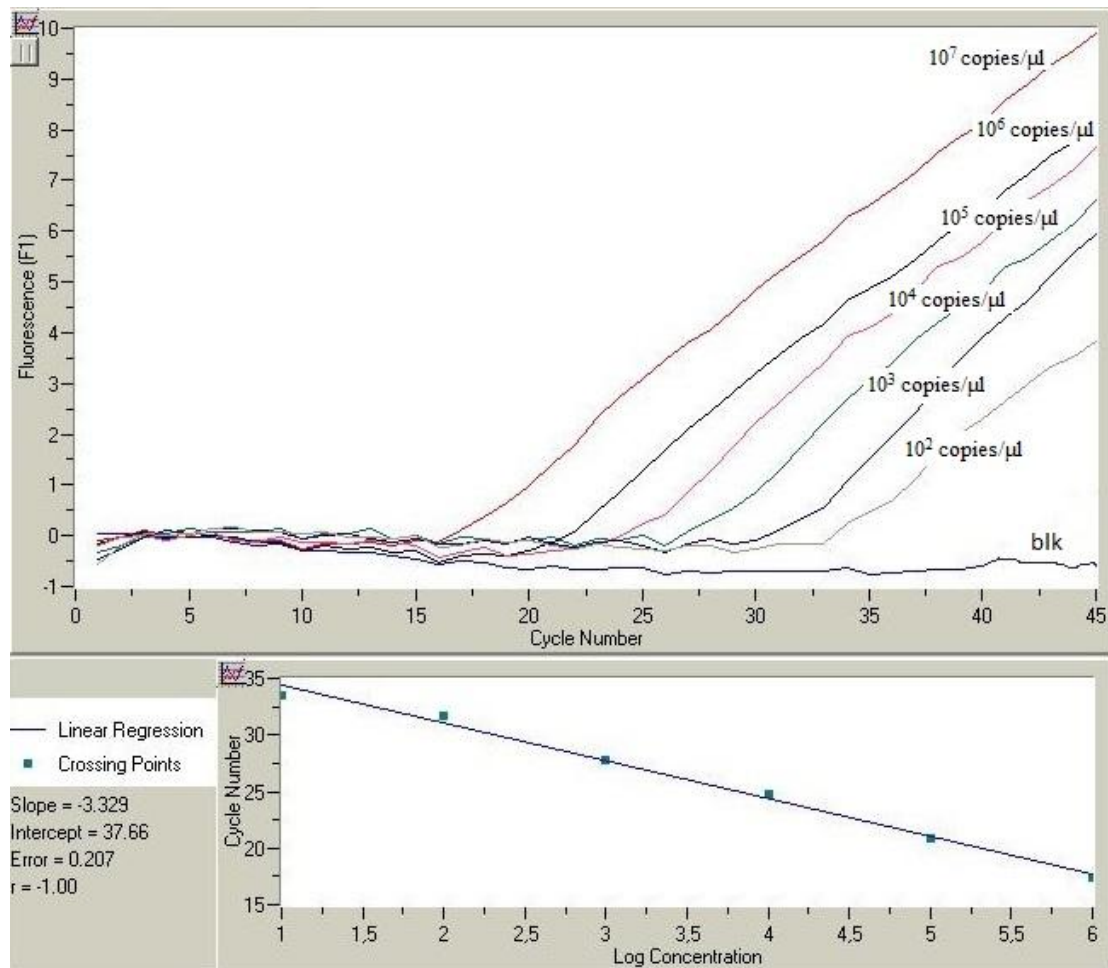
Το πυκνό διάλυμα του *PALB2* περιέχει τμήμα DNA με γνωστό αριθμό βάσεων καθώς έχει ενισχυθεί περιοχή 129 bp του mRNA του *PALB2*. Το μοριακό βάρος των 129 bp μπορεί να υπολογιστεί από το γινόμενο:

$$MB_A = 129 \times 660 \Rightarrow MB_A = 85.140$$

Γνωρίζουμε όμως ότι 1 *mole* μιας ουσίας περιέχει  $6,023 \times 10^{23}$  μόρια. Η συγκέντρωση του πυκνού διαλύματος που μετρήθηκε με το φθορισμόμετρο *Qubit*<sup>®</sup> είναι ίση με 14 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 85.140 g ( $85 \times 10^9$  ng).

Άρα, αναλογικά προκύπτει ότι το πυκνό διάλυμα περιέχει  $1 \times 10^{11}$  αντίγραφα/μL.

Ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις 1:10 των πυκνών διαλυμάτων και κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης με εύρος προτύπων διαλυμάτων  $10^7 - 10^2$  (Σχήμα 5.28).



**Σχήμα 5.28:** Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για τη μέθοδο RT - qPCR στο *PALB2* γονίδιο.

Το εύρος των συγκεντρώσεων που συμμετείχαν στην δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης ήταν από  $1 \times 10^7$  αντίγραφα/μL έως  $1 \times 10^2$  αντίγραφα/μL. Ο μέσος όρος της κλίσης και της τομής των καμπυλών βαθμονόμησης του *PALB2* ήταν  $3,23 \pm 0,21$  και  $36,50 \pm 1,93$  αντίστοιχα ( $n = 3$ ) καθώς η απόδοση της αντίδρασης PCR ήταν  $2,04 \pm 0,10$  ( $CV \% = 4,83$ ), πολύ κοντά στην ιδανική τιμή που είναι 2,00. Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης (LOD) υπολογίστηκε 2 copies/μL: εμείς καταφέραμε να ανιχνεύσουμε πραγματικό όριο ανίχνευσης 10 copies/μL. Το CV % των C<sub>q</sub> του εσωτερικού δείγματος ελέγχου του εργαστηρίου, μέσα στο ίδιο πείραμα ήταν  $0,16\%$  ( $28,66 \pm 0,05$ ,  $n=3$ ) και μεταξύ διαφορετικών πειραμάτων ήταν  $1,8\%$  ( $n=5$ ). Το CV% των C<sub>q</sub> όλων των πρότυπων δειγμάτων της καμπύλης ήταν μικρότερο από 3 % ( $n=3$ ).

### Στατιστική Ανάλυση

Η μέση τιμή των *PALB2* μεταγράφων στα 4 φυσιολογικά δείγματα ήταν  $3,36 \times 10^3$  στατιστικά μικρότερη από αυτή των καρκινικών δειγμάτων ( $p=0,014$ ). Στην πρώτη στήλη του πίνακα 5.6 καταγράφεται η περιγραφική στατιστική ανάλυση για τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνου του μαστού ( $n=91$ ). Η πλειοψηφία ήταν πάνω από 50 ετών (64,4%) και το μέγεθος των όγκων σχετικά μικρό. Τα περισσότερα ήταν πυρογενή διηθητικά καρκινώματα (περίπου 81%), grade 1-2 (περίπου 74%), με αρνητική την διήθηση των λεμφαδένων (περίπου 66%). Η βιολογική μελέτη έδειξε ότι τα περισσότερα ήταν θετικά στους υποδοχείς οιστρογόνων (78%), σ' αντίθεση με τους υποδοχείς προγεστερόνης που ήταν περίπου στο ίδιο ποσοστό τα αρνητικά και τα θετικά δείγματα. Επίσης ένα σχετικά μικρότερο ποσοστό από το αναμενόμενο, περίπου 16%, ήταν θετικό στην υπερέκφραση του ογκογονιδίου *HER2*. Τέλος ένα ποσοστό περίπου 17% εμφάνισε μετάσταση της νόσου σε άλλα όργανα.

Πίνακας 5.6. Κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών.

Κλινικά χαρακτηριστικά	N(%)	PALB2 έκφραση (50 <sup>th</sup> percentile διχοτόμηση)			PALB2 αντίγραφα	
		Low n (%)	High n (%)	Pearson $\chi^2$ or Fisher's exact p-value	Median	Mann-Whitney p-value
Ηλικιακή ομάδα, n (%)				0.688		0.690
≤50 έτη	26 (35.6)	12 (33.3)	14 (37.8)		116,755	
>50 έτη	47 (64.4)	24 (66.7)	23 (62.2)		53,587	
Μέγεθος όγκου, n (%)				0.768		0.770
≤2,0 cm	56 (65.1)	28 (66.7)	28 (63.6)		85,634	
>2,0 cm	30 (34.9)	14 (33.3)	16 (36.4)		57,858	
Ιστοπαθολογικός				0.632		0.634

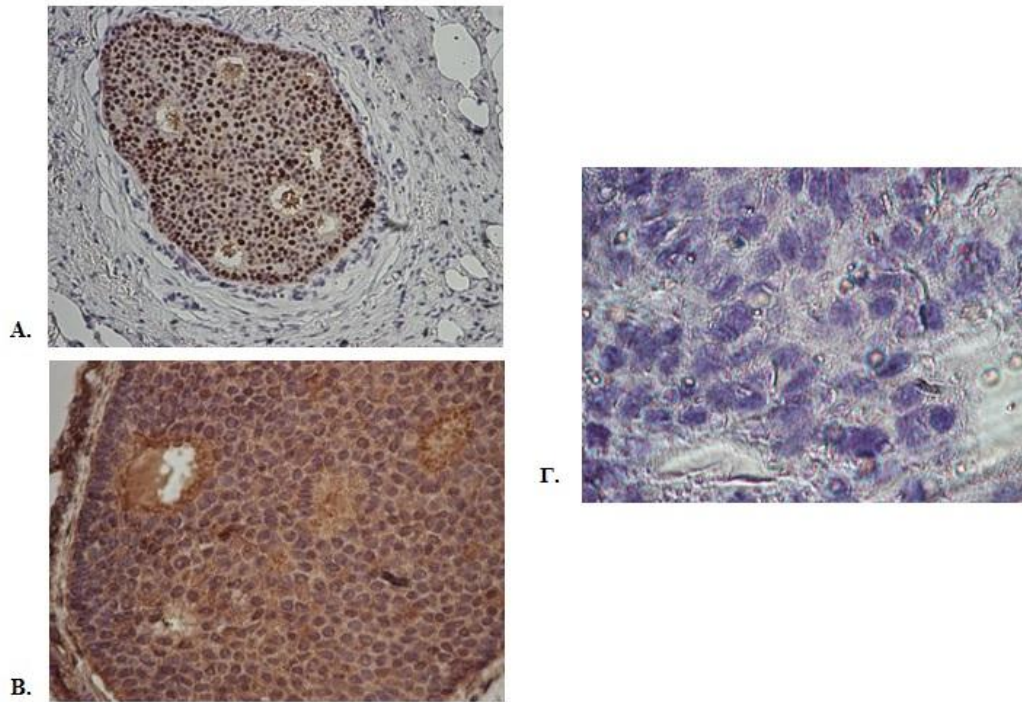
<b>τύπος, n (%)</b>						
Πορογενές διηθητικό	17 (19.3)	9 (21.4)	8 (17.4)		123,131	
Λοβιακό διηθητικό και υπόλοιπα	71 (80.7)	33 (78.6)	38 (82.6)		64,018	
<b>Λεμφαδένες, n (%)</b>				0.683		0.442
Αρνητικοί (N <sub>0</sub> )	52 (65.0)	27 (69.2)	25 (61.0)		71,328	
Θετικοί (N <sub>+</sub> )	28 (35.0)	12 (30.8)	16 (39.0)		93,124	
<b>Μετάσταση, n (%)</b>				1.000		1.000
Αρνητικοί (M0)	44 (81.5)	22 (81.5)	5 (81.5)		88,007	
Θετικοί (M1)	10 (18.5)	22 (18.5)	5 (18.5)		76,553	
<b>Grade, n (%)</b>				0.244		0.247
1-2	59 (73.8)	25 (67.6)	34 (79.1)		59,349	
3	21 (26.3)	12 (32.4)	9 (20.9)		114,891	
<b>Estrogen-receptor Status, n (%)</b>				0.112		0.114
Αρνητικό	19 (22.1)	6 (14.6)	13 (28.9)		84,142	
Θετικό	67 (77.9)	35 (85.4)	32 (71.1)		74,908	
<b>Progesterone-receptor Status, n (%)</b>				0.382		0.385
Αρνητικό	42 (48.8)	18 (43.9)	24 (53.3)		74,058	
Θετικό	44 (51.2)	23 (56.1)	21 (46.7)		79,707	
<b>HER2 υπερέκφραση, n (%)</b>				0.931		0.932
Αρνητικό	71 (82.6)	34(82.9)	37 (82.2)		80,316	
Θετικό	15 (17.4)	7 (17.1)	8 (17.8)		61,289	

Οι τιμές των *PALB2* μεταγράφων δεν ακολουθούν κανονική κατανομή συνεπώς επιλέχθηκε η δοκιμασία Mann-Whitney για τη σύγκριση των διαμέσων στις διάφορες κατηγορίες. Επίσης χωρίστηκαν ποιοτικά σε δείγματα υψηλής ή χαμηλής έκφρασης με βάση τη διάμεσο τιμή και ακολούθησαν δοκιμασίες  $\chi^2$ . Τα ποσοτικά αποτελέσματα των *PALB2* μεταγράφων συγκρίθηκαν με τα ιστοπαθολογικά δεδομένα (τύπος και grade μέσω ιστολογικής έκθεσης, παρουσία λεμφαδένων ή μετάστασης, ορμονικοί υποδοχείς με IHC, HER2 ογκογονίδιο με IHC/CISH) αλλά δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση (Πίνακας 5.6). Με Kaplan-Meier Survival ανάλυση δεν βρέθηκε συσχέτιση των *PALB2* μεταγράφων με τη μετάσταση.

### 5.2.3 Ανοσοϊστοχημεία (IHC)

Σε 4 ασθενείς οι οποίοι δεν εμφάνισαν έκφραση του γονιδίου *PALB2* αλλά και σε άλλους 20 αντιπροσωπευτικούς ασθενείς με πολύ χαμηλή ή πολύ υψηλή έκφραση έγινε ανοσοϊστοχημική χρώση για την πρωτεΐνη *PALB2* καθώς υπήρχε διαθέσιμος ιστός έγκλειστος σε παραφίνη. Χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα *PALB2* της Abcam όπως προαναφέρθηκε το οποίο αναμένεται να χρώσει τους πυρήνες των φυσιολογικών κυττάρων καθώς η πρωτεΐνη *PALB2* εντοπίζεται επί το πλείστον στον πυρήνα των κυττάρων. Παρότι πειραματιστήκαμε με διαφορετικό pH στο διάλυμα αποκάλυψης αντιγόνου (κιτρικά pH=6,0 ή EDTA pH=8,0) κατά την αποκάλυψη των επιτόπων, με διαφορετικά kit ανοσοϊστοχημείας, με διαφορετικές αραιώσεις του αντισώματος και με διαφορετικούς χρόνους επώασης (από 30min έως ολονύχτια) το συγκεκριμένο αντίσωμα δεν έβαψε σε κανένα από τα πειράματά μας τον πυρήνα των κυττάρων παρά μόνο το κυτταρόπλασμα σε όλα τα δείγματα. Για να βεβαιωθούμε ότι η μέθοδός μας δούλευε, παράλληλα με το *PALB2*, ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα για την προγεστερόνη το οποίο ήταν γνωστό ότι έβαφε πυρηνικά. Το αντίσωμα της προγεστερόνης έβαψε πυρηνικά και με τα τρία kit ανοσοϊστοχημείας που χρησιμοποιήσαμε σε αντίθεση με *PALB2* που έβαφε πάντα μόνο κυτταροπλασματικά. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε ελαττωματικό αντίσωμα ή σε καταστροφή του αντισώματος κατά την διάρκεια αποθήκευσης του στο εργαστήριο. Στο σχήμα 5.28 φαίνονται ενδεικτικά η χρώση με το αντίσωμα προγεστερόνης, ως θετικό control, αρνητικό control (χρώση χωρίς κανένα αντίσωμα) και η χρώση με το αντίσωμα *PALB2*. Συνεπώς δεν μπορέσαμε να βγάλουμε συμπέρασμα για την αιτία για την οποία τα 4 δείγματα ήταν αρνητικά ως προς την έκφραση του *PALB2*.

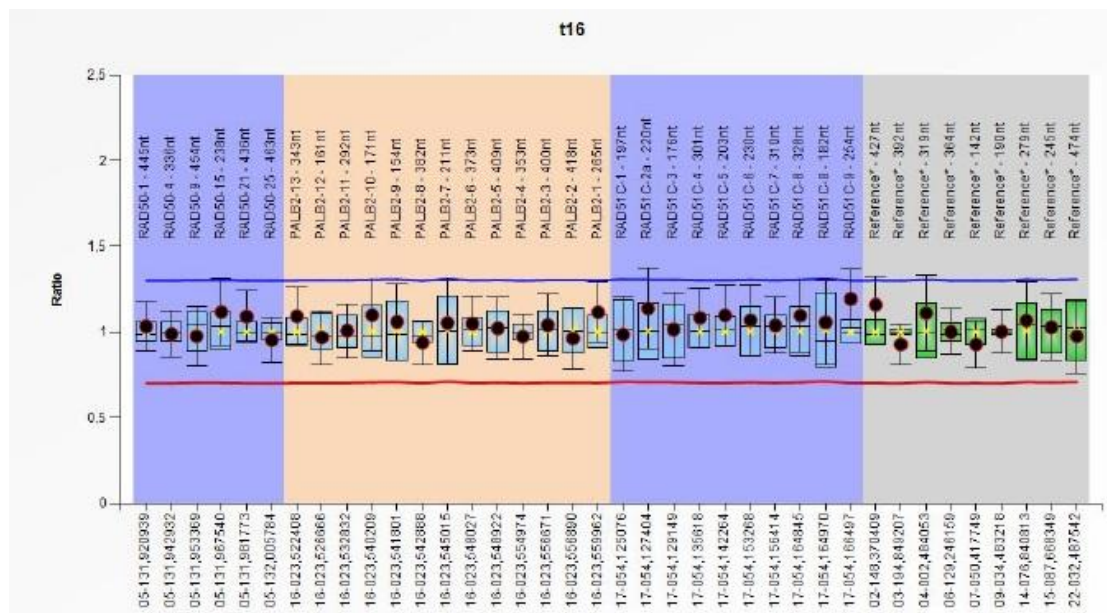




**Σχήμα 5.29:** Ενδεικτικά IHC αποτελέσματα: Α. Χρώση DAB για το αντίσωμα έναντι της προγεστερόνης (θετικό control) Β. Χρώση DAB για το αντίσωμα έναντι της PALB2 πρωτεΐνης Γ. Αρνητικό δείγμα χωρίς την προσθήκη πρωτοταγούς αντισώματος.

### 5.2.4 MLPA

Στα DNA των όγκων των τεσσάρων δείγματα που δεν εμφάνισαν έκφραση εφαρμόσαμε την μέθοδο MLPA (όπως αναφέρθηκε στην γενετική ανάλυση) προκειμένου να ελέγξουμε αν υπάρχουν μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις καθώς δεν μπόρεσαν να εξαχθούν συμπεράσματα σε πρωτεϊνικό επίπεδο με την μέθοδο της IHC. Κανένα από τα τέσσερα δείγματα δεν βρέθηκε να φέρει τέτοιου είδους μετάλλαξη. Στο σχήμα 5.30 φαίνεται ενδεικτικά η ανάλυση με το πρόγραμμα Coffalyzer.Net για το δείγμα t16.



Σχήμα 5.30: MLPA αντίδραση του DNA δείγματος του ιστού t16.

## Κεφάλαιο 6 – Συμπεράσματα –Συζήτηση

### 6.1 Γενετική Ανάλυση του *PALB2* γονιδίου

Εκτός από τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*, πολλά άλλα γονίδια εμπλέκονται στον κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού, εξαιτίας του ρόλου τους στο κοινό μονοπάτι της αλάθητης επιδιόρθωσης του DNA, με ομόλογο ανασυνδυασμό. Το *PALB2* φαίνεται να είναι το τρίτο γονίδιο καρκίνου του μαστού, παρόλα αυτά το ποσοστό μεταλλάξεων του είναι χαμηλό: 1-2% των *BRCA* αρνητικών ασθενών στους περισσότερους πληθυσμούς (87, 105, 107, 150) και μόνο σε λίγους πληθυσμούς είναι ελαφρώς αυξημένο 3-4% (102, 104). Η ανίχνευση μεταλλάξεων είναι περίπλοκη εξαιτίας του γεγονότος ότι οι μεταλλάξεις του *PALB2* που έχουν ανιχνευθεί έως τώρα είναι μοναδικές, διάσπαρτες σ' όλο το γονίδιο και μόνο μερικοί πληθυσμοί έχουν ιδρυτικές μεταλλάξεις (95, 96, 106, 107, 151, 152), στους οποίους αξίζει να αναπτυχθούν τεχνικές απλής PCR προκειμένου να ανιχνευτούν αυτές οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις πριν από κάθε άλλη προσέγγιση. Παρόλα αυτά, χρειάζονται αποτελεσματικές στρατηγικές για να ξεπεραστούν αυτές οι δυσκολίες στην αναζήτηση των *PALB2* μεταλλάξεων.

Αφού η πλειοψηφία των επιβλαβών μεταλλάξεων του *PALB2* προκαλούν πρόωρο τερματισμό της πρωτεΐνης (και υπάρχουν μόνο λίγες παρανοηματικές μεταλλάξεις και λίγες μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις), αποφασίσαμε να αναπτύξουμε μια μέθοδο PTT που μέχρι στιγμής δεν έχει αναπτυχθεί από άλλη ομάδα. Το διαθέσιμο υλικό ήταν DNA από ασθενείς με καρκίνο του μαστού από προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας (153, 154). Σκοπός ήταν η ανάπτυξη και η εφαρμογή αξιόπιστης και γρήγορης τεχνικής σάρωσης στα δυο μεγάλα εξόνια 4 και 5 του *PALB2* γονιδίου που αποτελούν και το μεγαλύτερο μέρος της περιοχής κωδικοποίησης (65%). Στο μέλλον θα μπορούσε να αναπτυχθεί μια PTT μέθοδος και για τα υπόλοιπα μικρά εξόνια με τη χρήση απομονωμένου RNA από περιφερικό αίμα ως αρχικό υλικό. Οι περισσότερες ερευνητικές ομάδες μέχρι στιγμής χρησιμοποιούν το DNA Sequencing για την ανίχνευση *PALB2* μεταλλάξεων (67, 96, 98, 105, 150, 155). Η PTT μέθοδος που αναπτύχθηκε είναι γρήγορη, καθώς σκανάρει μια μεγάλη περιοχή που αλλιώς θα χρειαζόνταν 6 αντιδράσεις sequencing (4 για το εξόνιο 4 και 2 για το εξόνιο 5), και οικονομική καθώς οι ποσότητες των αντιδραστηρίων PTT μπορούν να μειωθούν

χωρίς πρόβλημα. Είναι επίσης ακριβής καθώς ανιχνεύει τα δύο θετικά δείγματα ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν (R414X για το εξόνιο 4 και Q775X για το εξόνιο 5). Τα δείγματα που βρέθηκαν αρνητικά για μεταλλάξεις που οδηγούν σε πρόωρο τερματισμό επιβεβαιώθηκαν και με την μέθοδο DNA sequencing.

Κάποιες άλλες ομάδες χρησιμοποιούν τη μέθοδο HRMA για την ανίχνευση μεταλλάξεων ολόκληρου του *PALB2* γονιδίου (99, 102, 156). Χρησιμοποιήσαμε αυτή την τεχνική για την υπόλοιπη περιοχή κωδικοποίησης του *PALB2* γονιδίου η οποία αποτελείται από μικρά εξόνια που μεταφράζουν μικρά πεπτίδια τα οποία δεν έχουν ικανό μοριακό βάρος ώστε να αναλυθούν με την μέθοδο PTT, ενώ χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο MLPA για την ανίχνευση μεγάλων γενωμικών αναδιατάξεων του DNA του *PALB2* γονιδίου. Παρόλα αυτά δεν μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε παθογενετικές μεταλλάξεις, κι αν λάβουμε υπ' όψιν μας το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις στο *PALB2* γονίδιο είναι σπάνιες, θα έπρεπε να εξεταζόντουσαν τουλάχιστον 200 *BRCA* αρνητικά δείγματα προκειμένου να διασφαλίζαμε ένα θετικό εύρημα. Πρέπει να σημειωθεί ότι αν και ήταν ενδεδειγμένη η *BRCA* ανάλυση στα δείγματα αυτά σε προηγούμενη μελέτη με PTT και DNA Sequencing, δεν μπορεί να αποκλεισθεί η παρουσία μετάλλαξης σε κάποιο από τα *BRCA* γονίδια λόγω ιδιαίτερης τεχνικής δυσκολίας (157) και ιδιαίτερα λόγω των γενωμικών ανασυνδυασμών. Με βάση αρχική μελέτη στον Ελληνικό πληθυσμό, δεν αναμενόταν ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό σε μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις στο *BRCA1* γονίδιο (158). Ωστόσο η πιο πρόσφατη μελέτη έχει αναθεωρήσει την πρόβλεψη σε υψηλότερο ποσοστό (24% *BRCA1* μεγάλες αναδιατάξεις) (51). Οι ασθενείς επιλέχθηκαν είτε γιατί είχαν έντονο οικογενειακό ιστορικό είτε γιατί νόσησαν σε πολύ μικρή ηλικία είτε γιατί έχουν ιστολογική διάγνωση με μυελοειδή καρκινώματα είτε γιατί υπήρχε και ανδρικός καρκίνος του μαστού με ή χωρίς οικογενειακό ιστορικό. Οι τρεις τελευταίες περιπτώσεις αγγίζουν ένα θέμα που δυσκολεύει την διερεύνηση της κληρονομικότητας καθώς παρατηρείται το λεγόμενο κρυφό ιστορικό. Οι λόγοι για τους οποίους μπορεί ένα ιστορικό να είναι κρυμμένο είναι οι παρακάτω: 1) Φορείς της μετάλλαξης να είναι άνδρες και να μην έχουν νοσήσει καθώς ο καρκίνος του μαστού είναι πολύ πιο σπάνιος στους άντρες απ' ό,τι στις γυναίκες, 2) λόγω υιοθεσίας καθώς σε αυτή την περίπτωση δεν ξέρουμε απολύτως τίποτα για το ιστορικό του ατόμου, 3) λόγω μικρής διεισδυτικότητας του γονιδίου (παρουσία modifier γονιδίου), 4) λόγω θανάτου του ατόμου που φέρει την μετάλλαξη από άλλο αίτιο, πριν προλάβει να εκδηλωθεί η νόσος και 5) λόγω του

μικρού αριθμού των μελών των σημερινών οικογενειών, με αποτέλεσμα να μειώνεται το ποσοστό κληρονομής του μεταλλαγμένου γονιδίου.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η επιλογή με βάση το οικογενειακό ιστορικό ίσως να ήταν διαφορετική από την περίπτωση του κληρονομούμενου καρκίνου που οφείλεται σε μετάλλαξη στα γονίδια *BRCA1* ή *BRCA2*. Ο κληρονομούμενος καρκίνος λόγω *BRCA1* έχει περισσότερες ενδείξεις όταν στο ιστορικό της γυναίκας υπάρχουν συγγενείς που εκδήλωσαν καρκίνο μαστού ή ωοθηκών σε μικρή ηλικία, αμφοτερόπλευρα ή όταν συνυπάρχει και ιστορικό καρκίνου των ωοθηκών. Ίσως το ιστορικό στο *PALB2* να ελέγχεται μόνο για την παρουσία του καρκίνου του μαστού (είτε στον άνδρα είτε στην γυναίκα) ανεξαρτήτου ηλικίας (στις έως τώρα μελέτες έχει βρεθεί MO ηλικίας των νοσούντων με καρκίνο του μαστού και μετάλλαξη στο *PALB2* γονίδιο ελαφρώς μικρότερο του αντίστοιχου σποραδικού).

Η έλευση των μεθόδων Next Generation Sequencing (NGS) με την ευκολία που παρέχουν, στο μέλλον θα αντικαταστήσουν τις παραδοσιακές μεθόδους ανίχνευσης (συμπεριλαμβανομένης της PTT) εάν υποθέσουμε ότι θα γίνουν πιο οικονομικές. Μέχρι στιγμής έχουν αναπτυχθεί τέτοιες προσπάθειες είτε ως ανίχνευση μεταλλάξεων μόνο του *PALB2* γονιδίου (159) ή ίσως πιο υποσχόμενες, ως μέρος ενός πάνελ γονιδίων για NGS (160). Ειδικά αυτή η τελευταία προσέγγιση θα είναι πολύ πιο αποτελεσματική για την ανίχνευση όλων των HR μεταλλάξεων και ανάμεσα τους και αυτών του *PALB2*. Παρόλα αυτά για τα περισσότερα γονίδια που συμπεριλαμβάνονται σ' αυτά τα πάνελ δεν υπάρχουν κατευθυντήριες γραμμές για την κλινική διαχείριση των ασθενών και των φορέων με θετικά ευρήματα σ' αυτά τα γονίδια κι έτσι η ευρεία χρήση τους εμποδίζεται προς το παρόν. Μια πλήρης ανάλυση των κινδύνων των φορέων μεταλλάξεων του *PALB2* γονιδίου ωστόσο δημοσιεύτηκε πρόσφατα (161). Θα ήταν επίσης σημαντικό να ανιχνευτούν όσο το δυνατόν περισσότεροι ασθενείς καρκίνου του μαστού με μεταλλάξεις στο *PALB2* καθώς οι αναστολείς PARP και η μιτομυκίνη C φαίνεται να είναι αποτελεσματικά μέσα στη θεραπεία των όγκων με έλλειψη HR (78, 105, 162, 163).

Ο χαμηλός αριθμός εύρεσης μεταλλάξεων του *PALB2* γονιδίου ίσως θα μπορούσε να αυξηθεί αν τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων μπορούσαν να φανούν χρήσιμα για την επιλογή των ασθενών που ελέγχονται. Μια τέτοια προσέγγιση ήταν πολύ επιτυχής στην ανίχνευση μεταλλάξεων του *BRCA1* ειδικά στους ασθενείς με

τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (TNBC). Από τη στιγμή που οι *PALB2* όγκοι είναι σπάνιοι, τέτοια χαρακτηριστικά έχουν μόλις αρχίσει να μαζεύονται: η ελάχιστη σκλήρυνση ήταν ικανή να προβλέψει τη φορεία *PALB2* μεταλλάξεων σε 28 περιπτώσεις ανάμεσα σε 856 όγκους καρκίνου του μαστού (164). Επίσης το 30% των *PALB2* καρκίνων είναι TNBC (161) (αρκετά αυξημένο σχετικά με τον σποραδικό), ένα χαρακτηριστικό που υποδεικνύει ομοιότητα με τους *BRCA1* όγκους (165), παρόλο που οι *PALB2* όγκοι φαίνεται να έχουν ιδιαίτερα ποικίλο φαινότυπο και περισσότερο τα χαρακτηριστικά τους κλίνουν προς αυτά των *BRCA2* όγκων.

Έτσι, στρέψαμε την προσοχή μας στον μυελοειδή καρκίνο με σκοπό να εντοπίσουμε κάποια συσχέτιση του *PALB2* γονιδίου μ' αυτό το είδος καρκίνου. Ο μυελοειδής καρκίνος του μαστού είναι ένας σπάνιος ιστοπαθολογικός υπότυπος (1-2% όλων των περιπτώσεων) ο οποίος είναι αξιοσημείωτα αυξημένος στους *BRCA1* όγκους σε σχέση με τους *BRCA2* όγκους και τους σποραδικούς (13%, 3%, 2% αντίστοιχα) (166-170) και θα ήταν ενδιαφέρον να ελεγχθεί για *PALB2* μεταλλάξεις. Ο ιδιαίτερος αυτός ιστολογικός τύπος καρκίνου μαστού με κριτήρια που έχουν καταγραφεί (171) έχει σαφώς περιγραμμένα όρια και ιδιαίτερα κυτταρικά στοιχεία ανοσολογικής απάντησης, είναι συνήθως triple negative (TNBC) και εμφανίζει υπερέκφραση του p53. Παρότι χαρακτηρίζεται από κακή πρόγνωση (π.χ. οι μυελοειδείς όγκοι είναι συνήθως TNBC [στο δικό μας σετ δειγμάτων, 9 από τις 17 περιπτώσεις]) οι ασθενείς αυτοί έχουν γενικά καλή επιβίωση.

Σ' αυτή την μελέτη ανάμεσα στα 59 δείγματα που μελετήθηκαν (ανάμεσά τους 3 ανδρικού καρκίνου του μαστού και 4 ηλικίας <30 ετών), τα 17 ήταν ασθενείς με μυελοειδή καρκίνο του μαστού και αυτή είναι η πρώτη συστηματική προσπάθεια να μελετηθούν μεταλλάξεις του *PALB2* γονιδίου σ' αυτή τη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών. Μέχρι τώρα, *PALB2* μεταλλάξεις έχουν βρεθεί μόνο σε δύο περιπτώσεις μυελοειδή καρκίνου του μαστού (και οι δύο με c.1592delT, pLeu531Cysfs\*30) (97, 156) και σ' ένα πορογενές καρκίνωμα με μυελοειδή χαρακτηριστικά (Q775X) (96). Δύο από τα δείγματα μυελοειδή καρκίνου που μελετήσαμε ήταν *BRCA1* θετικά: ένα με τη συχνή μετάλλαξη 5382insC σε μεγάλη οικογένεια (154) και ένα με τη R1203X μετάλλαξη σε υιοθετημένη γυναίκα 41 ετών (167). Παρόλα αυτά ελέχθησαν και για *PALB2* μεταλλάξεις καθώς διπλή ετεροζυγωτία *PALB2/BRCA1* δεν μπορεί να αποκλεισθεί και έχει ήδη ανιχνευθεί σε μια οικογένεια (172).

Με βάση τα πειραματικά μας αποτελέσματα, σε δύο δείγματα βρέθηκε η παρανοηματική μετάλλαξη c.1876 A→G (και με τους δύο εκκινητές) που προκαλεί αλλαγή του αμινοξέος γλουταμίνη σε αργινίνη (Q559R) ενώ σε 5 δείγματα βρέθηκε η συνώνυμη μετάλλαξη c. T3300G (T1100T) που εξ' ορισμού θεωρείται μη παθογόνος.

Η μετάλλαξη Q559R είναι η **πρώτη μετάλλαξη** του γονιδίου *PALB2* που εντοπίστηκε στον ελληνικό πληθυσμό. Πολλές παρανοηματικές μεταλλάξεις σε γονίδια προδιάθεσης είναι αμφίβολης κλινικής σημασίας και ο χαρακτηρισμός αυτών σε υψηλού ή χαμηλού κινδύνου κατηγορίας αλλήλια ή σε unclassified variant είναι ένα σημαντικό πρόβλημα στην κλινική γενετική. Η κατηγοριοποίηση αυτών μπορεί να γίνει άμεσα από επιδημιολογικές παρατηρήσεις, παρατηρώντας εάν το μεταλλαγμένο αλλήλιο είναι σε θέση να διαχωρίσει φυσιολογικούς ή νοσούντες μέσα στις οικογένειες (segregation), ή με έμμεσους τρόπους, που περιλαμβάνουν τον έλεγχο της διατήρησης των νουκλεϊκών οξέων και του αμινοξέος σε άλλα είδη πέραν του ανθρώπου, το πόσο συντηρητική ή μη είναι η αλλαγή του αμινοξέος και εάν εντοπίζεται σε σημαντική για την λειτουργία της πρωτεΐνης περιοχή (173). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των εργασιών των Erkko et al για τις Φιλανδικές οικογένειες (95), των Garcia et al για τις ισπανικές οικογένειες (103) αυτή η μετάλλαξη που βρήκαμε υπάρχει σε ποσοστό 15,0 % και 22,1% των φυσιολογικών δειγμάτων αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας το 3,5% των δειγμάτων φαίνεται να φέρει αυτήν την μετάλλαξη. Επίσης αναλύθηκε με το πρόγραμμα Polyphen και βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Στην παρούσα μελέτη δεν έγινε ανάλυση φυσιολογικών δειγμάτων για έλεγχο αυτής της μετάλλαξης στις Ελληνικές οικογένειες αλλά σύμφωνα με τα λεχθέντα, αυτή η μετάλλαξη θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως **πολυμορφισμός**.

Επίσης ανιχνεύτηκε η ιντρονική αλλαγή c.3197-46 G>C η οποία δεν έχει αναφερθεί σε άλλες εργασίες και δεν προβλέπεται να επηρεάζει το μάτισμα σύμφωνα με το λογισμικό splice site predictor.

Η μελέτη αυτή θα μπορούσε να επεκταθεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ασθενών με κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών έτσι ώστε να είναι πιο αντιπροσωπευτική για τον ελληνικό πληθυσμό και πιο αποδοτική σε ανίχνευση παθογνωμικών μεταλλάξεων καθώς στους περισσότερους πληθυσμούς έχουν

ανιχνευτεί μεταλλάξεις στο περίπου 1% των *BRCA* αρνητικών ασθενών συνεπώς είναι αναμενόμενο το αποτέλεσμα.

Θα αξίζει επέκταση της μελέτης σε περισσότερους ασθενείς με μυελοειδή καρκίνο του μαστού καθώς το *PALB2* σχετίζεται άμεσα με το *BRCA1* κατά τον ομόλογο ανασυνδυασμό. Έτσι μια μετάλλαξη στο *PALB2* θα μπορούσε να οδηγήσει επίσης σ' αυτό το είδος του καρκίνου.

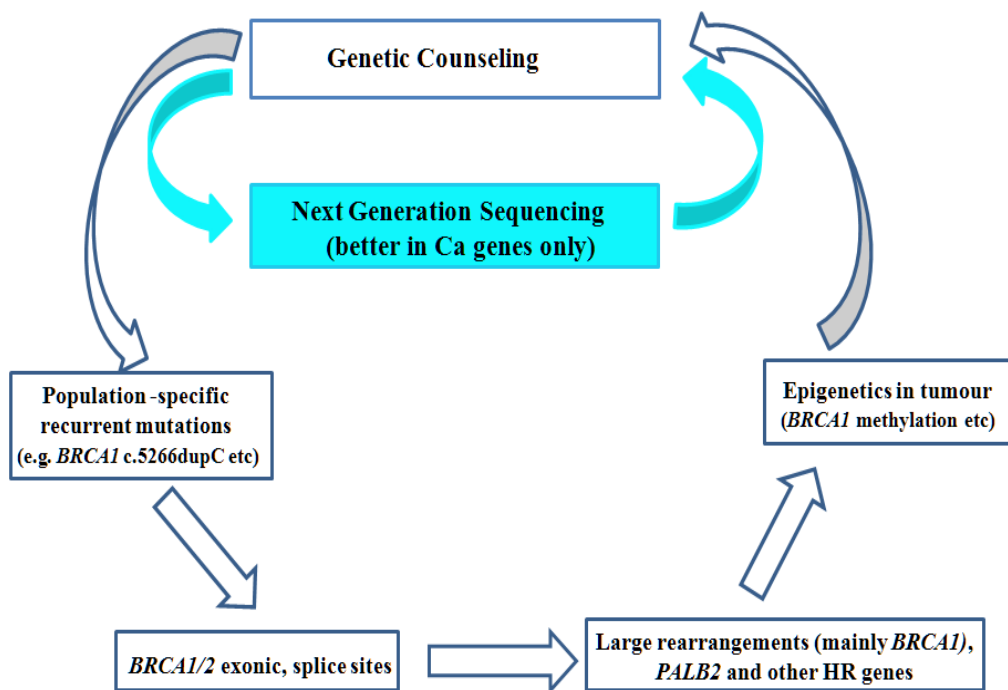
Η μελέτη θα μπορούσε να επεκταθεί στα: Α) υπόλοιπα *BRCA* αρνητικά δείγματα από την προηγούμενη μελέτη στον Ελληνικό χώρο της He.C.O.G (4, 157, 167, 174) και θα μπορούσε να δοθεί μία ιδιαίτερη προσοχή σε δείγματα με πολυμορφισμούς στο N-τελικό άκρο του *BRCA2* (10-41αα) και στο C-τελικό άκρο του *BRCA1* καθώς είναι οι περιοχές με τις οποίες αλληλεπιδρά η πρωτεΐνη *PALB2* και θα μπορούσε ένας απλός πολυμορφισμός στο *BRCA2* που από μόνος του δεν έχει καμία επίπτωση στο κύτταρο εάν συνδυαστεί με μία μετάλλαξη ή με έναν πολυμορφισμό στο *PALB2* να προκαλεί σημαντικά προβλήματα που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στον καρκίνο.

Β) Δείγματα με σποραδικό καρκίνο όπως αυτά που είναι καλά χαρακτηρισμένα από προηγούμενη μελέτη (4). Έχουν ήδη καταγραφεί σχετικοί πολυμορφισμοί (175) και ας μην ξεχασθεί ότι στην Φιλανδική μελέτη η συχνή μετάλλαξη εντοπίστηκε και σε μη επιλεγμένο πληθυσμό καρκίνου μαστού. Ένας ακόμη λόγος για την ανάλυση σε τέτοιο πληθυσμό είναι η διαπίστωση ότι ο τρόπος καρκινογένεσης του *PALB2* δεν είναι μέσω LOH (έχει βρεθεί μόνο σε μια μελέτη στον μεταλλαγμένο ιστό (103)) αλλά μέσω απλοανεπάρκειας (haploinsufficiency) (98) ή μέσω dominant negative effect. Η ανάλυση του γονιδίου σε ένα μεγάλο αριθμό από αυτά τα δείγματα θα μπορούσε να γίνει πιο γρήγορα και αποτελεσματικά με τις μέθοδο σάρωσης PTT που αναπτύξαμε στα μεγάλα εξόνια (4 και 5) και με την HRM (High Resolution Melting curve analysis) στα μικρά εξόνια τα οποία αξίζει να αναλυθούν και αυτά περαιτέρω καθώς σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες έχουν βρεθεί παθογνωμικές μεταλλάξεις ακόμη και στο τελευταίο εξόνιο 13 (π.χ. Y1183X), οι οποίες, παρόλο που βρίσκονται πολύ κοντά στο τέλος της πρωτεΐνης έχουν υψηλό σχετικό κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (87, 176).



## Νέος αλγόριθμος γενετικής ανάλυσης για κληρονομούμενο καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών

Υπάρχει πληθώρα υπολογιστικών προγραμμάτων για την υποβοήθηση της γενετικής συμβουλευτικής σε ασθενείς με κληρονομούμενο καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών ή σε άτομα με υποψία για προδιάθεση για το σύνδρομο αυτό λόγω οικογενειακού ιστορικού ή σε φορείς μεταλλάξεων όπως τα BRCA Risk calculator, BOADICEA (177, 178), BRCAPRO, IBIS, FHAT, Penn, Manchester score κλπ καθώς και βιβλιογραφία για τη συγκριτική τους αξιολόγηση (179). Είναι φανερό ότι μελλοντικές εκδόσεις των ανωτέρω προγραμμάτων πρέπει να περιλαμβάνουν επιπλέον στοιχεία πέραν της ηλικίας και του οικογενειακού ιστορικού όπως ο ιστολογικός τύπος και η IHC μελέτη (όταν υπάρχουν τα δεδομένα σε ER, PR, HER2 αλλά και σε άλλους νεώτερους δείκτες όπως το CK14 και CK5/6) αλλά και να συνυπολογίζουν την πιθανότητα ύπαρξης μετάλλαξης και στα υπόλοιπα γονίδια που προδιαθέτουν για καρκίνο μαστού (όπως π.χ. στα γονίδια *PALB2*, *BRIP1*, *RAD51C* κλπ). Στην Ελλάδα μετά την έγγραφη συγκατάθεση του ασθενούς κατά την γενετική συμβουλευτική, καλό είναι να προηγείται η ανάλυση του εξόνιου 20 στο γονίδιο *BRCA1* καθώς και η πλειονότητα των μεταλλάξεων αφορά τις μεταλλάξεις 5382insC και G5331A (G1738R) στο εξόνιο αυτό και έχουν αναπτυχθεί γρήγορες μέθοδοι για την αξιόπιστη ανίχνευσή τους (Σχήμα 6.1) (24, 40, 142). Στη συνέχεια να αναλύεται το υπόλοιπο του *BRCA1* γονιδίου και κατόπιν το γονίδιο *BRCA2* (καθώς υπολείπεται σε μεταλλάξεις σε σχέση με το *BRCA1*). Στην συνέχεια να αναλύονται οι μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις του *BRCA1* και άλλα γονίδια που θα βρεθούν οι μεταλλάξεις τους σε υψηλό ποσοστό στον Ελληνικό χώρο (πχ. *PALB2*, *CHECK2* κτλ.)



**Σχήμα 6.1:** Αλγόριθμος γενετικής ανάλυσης για τον κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού για τις περισσότερες χώρες (εξωτερικός κύκλος). Τα προηγμένα συστήματα υγείας που μπορούν να καλύψουν το κόστος του Next Generation Sequencing θα μπορούσαν να ακολουθήσουν μόνο τον εσωτερικό κύκλο στο μέλλον (40).

#### **Μελλοντικές εξελίξεις στην γενετική/επιγενετική ανάλυση κληρονομούμενου καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών**

Με την έλευση των μεθόδων Next Generation Sequencing και με την ευκολία που παρέχουν, είναι πολύ πιθανό να συμπληρωθεί το ποσοστό οικογενειών με κληρονομούμενο καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών με ανιχνεύσιμη μετάλλαξη έως και το 100%: θα εντοπίζονται σε άλλα γονίδια της DNA επιδιόρθωσης που ενέχονται στον ομόλογο ανασυνδυασμό (εκτός αυτών που προαναφέρθηκαν εκτενώς). Οι μεταλλάξεις τους μπορεί να είναι παθογνομικές αλλά μπορεί και να ανευρεθούν περιπτώσεις με συνδυασμό υπομορφικών μεταλλάξεων σε πολλά από τα γονίδια με τελικό αποτέλεσμα πάντα έλλειμμα στον ομόλογο ανασυνδυασμό. Ίσως και η επιγενετική μελέτη στον ιστό να μπορεί να βοηθήσει σημαντικά καθώς υποκινητές σε ορισμένα από τα γονίδια πιθανότατα θα ανευρεθούν μεθυλιωμένοι και αυτό θα είχε συνέπειες στην επιλογή κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής (πχ. με PARP αναστολείς) (40).

## 6.2 Ανάλυση Έκφρασης του *PALB2* γονιδίου

Για την ανάλυση έκφρασης του γονιδίου *PALB2* απομονώθηκε RNA από ιστούς σποραδικού καρκίνου του μαστού (n=91) που προέρχονταν από το Ευγενίδειο Θεραπευτήριο. Σκοπός της μελέτης ήταν: Α) η ανάλυση μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *PALB2*, καθώς η μεθυλίωση του DNA είναι μια επιγενετική διαδικασία που παρουσιάζεται στα καρκινικά κύτταρα (αναφέρθηκε 8% σποραδικού καρκίνου για το γονίδιο *PALB2*) (110) και ο συνδυασμός των παραπάνω αποτελεσμάτων με τη μελέτη έκφρασης του RNA με RT-PCR σε δείγματα σποραδικού καρκίνου του μαστού με γνωστά βιολογικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των όγκων. Β) ο συσχετισμός των βιολογικών και παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των όγκων με τη μεθυλίωση ή το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου, έλεγχος της παρουσίας της πρωτεΐνης *PALB2* με IHC καθώς και συσχετισμός γονότυπου με φαινότυπο έτσι ώστε να έχουμε μια ολοκληρωμένη εικόνα για αυτό το γονίδιο και να μπορούμε να εκτιμήσουμε την σοβαρότητα του κινδύνου απώλειας της έκφρασής του (μέσω μεταλλάξεων, επιγενετικών τροποποιήσεων ή άλλου μηχανισμού).

Μέχρι την πραγματοποίηση της μελέτης είχαν δημοσιευτεί δύο μελέτες που αφορούσαν την μεθυλίωση του *PALB2* υποκινητή. Η μία έγινε σε 92 δείγματα καρκίνου των ωοθηκών με την μέθοδο MS-HRMA PCR (111) και έρχονταν σ' αντίθεση με την άλλη μελέτη της Rotarova στην οποία εξετάστηκαν δείγματα καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών με την μέθοδο real-time qMSP και 6/68 δείγματα με καρκίνο του μαστού και 4/53 δείγματα με καρκίνο των ωοθηκών βρέθηκαν να έχουν μεθυλιωμένο τον *PALB2* υποκινητή, ένα ποσοστό 8% σχεδόν όσο ανευρίσκεται και για το *BRCA1* (13%) (22, 110). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές περιοχές του υποκινητή που εξετάστηκαν στην κάθε μελέτη καθώς και σε διαφορές στην ευαισθησία της κάθε μεθόδου ανάλυσης. Έτσι επιλέξαμε να μελετήσουμε μια διαφορετική περιοχή του υποκινητή του γονιδίου. Επιλέξαμε την μέθοδο pyrosequencing επειδή είναι μια τεχνική εξετάζει πλήρως μια σχετικά μεγάλη περιοχή με ποσοτικό τρόπο: στην δική μας μέθοδο αναλύθηκαν 12 CpGs στην περιοχή του υποκινητή. Όλα τα θετικά και τα αρνητικά δείγματα ελέγχου είχαν τα αναμενόμενα ποσοστά μεθυλίωσης και η μέθοδος ήταν αρκετά ευαίσθητη ώστε να ανιχνεύει *PALB2* DNA μεθυλίωση σε επίπεδο ευαισθησίας 5%. Στη δική μας μελέτη δεν βρέθηκε μεθυλίωση του υποκινητή του *PALB2* γονιδίου αποτέλεσμα το

οποίο συμφωνούσε με την μελέτη του Mikeska (111). Πρόσφατα δημοσιεύτηκε μια νέα εργασία η οποία μελέτησε ακριβώς την ίδια περιοχή του υποκινητή με τη δική μας μελέτη και η οποία έρχεται σ' αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα βρίσκοντας ότι το 16,7% των δειγμάτων είχαν υπερμεθυλιωμένο τον υποκινητή του *PALB2* γονιδίου (149)! Ωστόσο η προσπάθεια της σάρωσης της περιοχής του υποκινητή και της διαλεύκανσης του ρόλου της *PALB2* μεθυλίωσης στην καρκινογένεση έχει μεγάλη σημασία καθώς εάν αποδειχθεί, τότε έχουν νόημα οι μέθοδοι ανάλυσης *PALB2* μεθυλίωσης στον ιστό και η θεραπευτική εφαρμογή των PARP αναστολέων σ' αυτούς τους ασθενείς κατ' αναλογία με το *BRCA* (1, 23).

Η αναλυτική ευαισθησία και γραμμικότητα της μεθόδου RT - qPCR για την ανάλυση της έκφρασης του *PALB2* γονιδίου καθορίστηκε με την χρήση προτύπων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης που παρασκευάστηκαν όπως έχει προαναφερθεί. Η καμπύλη βαθμονόμησης έδειξε γραμμικότητα σ' όλο το εύρος των μετρήσεων  $10^7$ - $10^2$ . Η μέθοδος ήταν γρήγορη, ειδική, αναπαραγώγιμη και ευαίσθητη σύμφωνα με τα αρχεία επικύρωσης. Κατά την ανάλυση έκφρασης με RT-qPCR 4 δείγματα δεν εμφάνισαν έκφραση. Ο μέσος όρος των αντιγράφων ήταν  $7,23 \times 10^4$  copies/μg ολικού RNA, ενώ η μέση τιμή ήταν  $1,34 \times 10^4$  copies/μg (εύρος  $3,51 \times 10$  to  $1,23 \times 10^6$  copies/μg). Έγινε προσπάθεια συσχέτισης των επιπέδων *PALB2* mRNA με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων (μέγεθος όγκου, βαθμός διαφοροποίησης, λεμφαδένες, μετάσταση, ορμονικούς υποδοχείς, *C-ERBB2* έκφραση) που αναλύθηκαν ωστόσο δεν βρέθηκε κάποιος στατιστικά σημαντικός συσχετισμός. Αυτό έρχεται σ' αντίθεση με άλλα HR γονίδια που δείχνουν να έχουν συσχέτιση με αυτά τα χαρακτηριστικά των όγκων (π.χ. το mRNA του *BRCA* και η πρωτεϊνική έκφραση με τους υποδοχείς οιστρογόνων και το βαθμό διαφοροποίησης (180, 181). Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που επιχειρεί να συσχετίσει τα χαρακτηριστικά των όγκων με την έκφραση του *PALB2* γονιδίου. Η σύγκριση των μη καρκινικών δειγμάτων σε σχέση με τα καρκινικά εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά όμως ο μικρός αριθμός των δειγμάτων που αναλύθηκαν αποτελεί σοβαρό περιορισμό για να διεξαχθούν στέρεα συμπεράσματα αύξησης της *PALB2* μεταγραφικής ενεργότητας στον καρκίνο του μαστού.

Το γεγονός ότι τέσσερα δείγματα ήταν αρνητικά στην έκφραση του *PALB2* mRNA άξιζε περαιτέρω διερεύνηση και αποφασίσαμε να τα μελετήσουμε σε πρωτεϊνικό

επίπεδο με IHC. Δυστυχώς το αντίσωμα που επιλέξαμε δεν λειτούργησε όπως αναμενόταν καθώς έδειξε μόνο κυτταροπλασματική χρώση της πρωτεΐνης αντί για πυρηνική (όπως θα έπρεπε καθώς η PALB2 πρωτεΐνη εντοπίζεται στον πυρήνα) και κατά συνέπεια δεν μπορούν να βγουν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με την παρουσία ή μη της PALB2 πρωτεΐνης. Αυτή η διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση είναι σύνηθες πρόβλημα στην εφαρμογή πολλών πολυκλωνικών αντισωμάτων. Δυστυχώς δεν υπάρχουν μονοκλωνικά PALB2 αντισώματα μέχρι στιγμής και για τα υπόλοιπα εμπορικά διαθέσιμα πολυκλωνικά αντισώματα δεν υπάρχει κάποια δημοσίευση που να δείχνει ότι λειτουργούν με IHC σε ιστούς παραφίνης, έτσι αποφασίσαμε να μην το επιδιώξουμε άλλο σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

Επιπλέον ψάξαμε το DNA των όγκων αυτών των τεσσάρων δειγμάτων για μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις και μεταλλάξεις που να επηρεάζουν το μάτισμα τα οποία θα μπορούσαν να δικαιολογούν απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) και πλήρη αναστολή της παραγωγής *PALB2* mRNA. Αυτές οι αλλαγές γενικά θεωρούνται πολύ σπάνιες για το *PALB2* γονίδιο (40, 104). Καμία τέτοια μετάλλαξη δεν ανιχνεύτηκε στα τέσσερα αυτά δείγματα με των συνδυασμών μεθόδων που ελέγχθηκε το γονίδιο (MLPA/PTT/HRMA (176)).

Η αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας συγκεκριμένων miRNAs θα μπορούσε να ήταν ένας άλλος μηχανισμός για την μείωση της έκφρασης σ' αυτά τα 4 δείγματα π.χ. τα has-mir-299-3p, has-mir-137 και has-mir-340 φαίνονται πολύ ικανά να μειώσουν την έκφραση του *PALB2* in silico όταν υπερεκφράζονται στις ανθρώπινες κακοήθειες σύμφωνα με τη βάση δεδομένων MiRanda (<http://www.microrna.org>).

Συμπερασματικά, αναπτύξαμε δύο καινούρια ερευνητικά εργαλεία χρήσιμα για το *PALB2* γονίδιο και τις μελέτες HR: μια μέθοδο Pyrosequencing για DNA μεθυλίωση και μια RT-qPCR mRNA. Με τη χρήση αυτών των δύο ερευνητικών εργαλείων μελετήσαμε την έκφραση του *PALB2* στον σποραδικό καρκίνο. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι τα επίπεδα έκφρασης του *PALB2* mRNA και τα επίπεδα μεθυλίωσης του *PALB2* υποκινητή στον ιστό του όγκου δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αξιόπιστοι και ευαίσθητοι προγνωστικοί βιοδείκτες στον σποραδικό καρκίνο του μαστού(182). Παρόλα αυτά η μέθοδος που αναπτύχθηκε για την έκφραση του γονιδίου θα μπορούσε σε μελλοντικές μελέτες να βοηθήσει στην μέτρηση του απόλυτου αριθμού *PALB2* αντιγράφων ανά κύτταρο και να ανιχνεύσει αύξηση ή

μείωση της *PALB2* μεταγραφικής ενεργότητας ως απάντηση σε διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις και κατ' επέκταση να μελετήσει τα επίπεδα *PALB2* mRNA ως προβλεπτικό βιοδείκτη.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bartlett JM, Thomas J, Ross DT, Seitz RS, Ring BZ, Beck RA, et al. Mammostrat as a tool to stratify breast cancer patients at risk of recurrence during endocrine therapy. *Breast Cancer Res* 2010;12:R47.
2. Karpozilos A, Pavlidis N. The treatment of cancer in greek antiquity. *Eur J Cancer* 2004;40:2033-40.
3. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA: a cancer journal for clinicians* 1999;49:8-31, 1.
4. Kroupis C. Μοριακή μελέτη των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2* σε Έλληνες ασθενείς με κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών, 2003.
5. Lagios MD, Westdahl PR, Margolin FR, Rose MR. Duct carcinoma in situ. Relationship of extent of noninvasive disease to the frequency of occult invasion, multicentricity, lymph node metastases, and short-term treatment failures. *Cancer* 1982;50:1309-14.
6. Silverstein MJ, Lagios MD. Use of predictors of recurrence to plan therapy for dcis of the breast. *Oncology (Williston Park, NY)* 1997;11:393-406, 9-10; discussion 13-5.
7. Patchefsky AS, Schwartz GF, Finkelstein SD, Prestipino A, Sohn SE, Singer JS, Feig SA. Heterogeneity of intraductal carcinoma of the breast. *Cancer* 1989;63:731-41.
8. Apostolidis S. PG. Ο καρκίνος του μαστού. Σύγχρονες απόψεις, Vol., 1998.
9. Powell DE SC. The diagnosis and detection of breast disease St Louis: Mosby - Year Book, Inc, 1994.
10. Sickles EA. The subtle and atypical mammographic features of invasive lobular carcinoma. *Radiology* 1991;178:25-6.
11. Page DL, Dixon JM, Anderson TJ, Lee D, Stewart HJ. Invasive cribriform carcinoma of the breast. *Histopathology* 1983;7:525-36.
12. Rasmussen BB, Rose C, Christensen IB. Prognostic factors in primary mucinous breast carcinoma. *American journal of clinical pathology* 1987;87:155-60.
13. Markopoulos C, Gogas H, Livaditou A, Floros D. Mucoepidermoid carcinoma of the breast. *European journal of gynaecological oncology* 1998;19:291-3.
14. Lucas FV, Perez-Mesa C. Inflammatory carcinoma of the breast. *Cancer* 1978;41:1595-605.
15. Bowcock A. Molecular genetics, pathogenesis and therapeutics, 1999.
16. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, et al. Revision of the american joint committee on cancer staging system for breast cancer. *JClinOncol* 2002;20:3628-36.
17. Hortobagyi GN. Trastuzumab in the treatment of breast cancer. *New England Journal of Medicine* 2005;353:1734-6.
18. Gianni L, Pienkowski T, Im Y-H, Roman L, Tseng L-M, Liu M-C, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early *HER2*-positive breast cancer (neosphere): A randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 2012;13:25-32.

19. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, et al. Trastuzumab emtansine for *HER2*-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012;367:1783-91.
20. Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, Rugo H, Sledge G, Koehler M, et al. Randomized study of lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with *ERBB2*-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2010;28:1124-30.
21. Bilancia D, Rosati G, Dinota A, Germano D, Romano R, Manzione L. Lapatinib in breast cancer. *Annals of Oncology* 2007;18:vi26-vi30.
22. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007;13:4429-34.
23. Irvin WJ, Jr., Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer* 2008;44:2799-805.
24. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation* 2011;121:2750-67.
25. Sparano JA, Paik S. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 2008;26:721-8.
26. Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-6.
27. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009;27:1160-7.
28. Ma XJ, Salunga R, Dahiya S, Wang W, Carney E, Durbecq V, et al. A five-gene molecular grade index and *hoxb13:Il17br* are complementary prognostic factors in early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:2601-8.
29. Dubsy P, Filipits M, Jakesz R, Rudas M, Singer CF, Greil R, et al. Endopredict improves the prognostic classification derived from common clinical guidelines in er-positive, *HER2*-negative early breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2013;24:640-7.
30. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *NEnglJMed* 2004;351:781-91.
31. Lianidou ES, Markou A. Circulating tumor cells as emerging tumor biomarkers in breast cancer. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2011;49:1579-90.
32. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10869-74.
33. Kittaneh M, Montero AJ, Gluck S. Molecular profiling for breast cancer: A comprehensive review. *Biomarkers in cancer* 2013;5:61-70.
34. Lord CJ, Tutt AN, Ashworth A. Synthetic lethality and cancer therapy: Lessons learned from the development of *parp* inhibitors. *Annual review of medicine* 2014.



35. Plu-Bureau G, Thalabard JC. Hereditary risks of breast cancer. Interaction of genetic factors and hormonal factors. *Annales d'endocrinologie* 1998;59:465-9.
36. Steel M, Thompson A, Clayton J. Genetic aspects of breast cancer. *British medical bulletin* 1991;47:504-18.
37. Hirshfield KM, Rebbeck TR, Levine AJ. Germline mutations and polymorphisms in the origins of cancers in women. *J Oncol* 2010;2010:297671.
38. Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: New genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet* 2008;124:31-42.
39. Walsh T, King M-C. Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer cell* 2007;11:103-5.
40. Poupouridou N, Kroupis C. Hereditary breast cancer: Beyond *BRCA* genetic analysis; *PALB2* emerges. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2012;50:423-34.
41. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 2009;461:747-53.
42. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science* 1994;266:66-71.
43. Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348:2339-47.
44. Nathanson KN, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: What we know and what we need. *NatMed* 2001;7:552-6.
45. Weitzel JN, Blazer KR, MacDonald DJ, Culver JO, Offit K. Genetics, genomics, and cancer risk assessment: State of the art and future directions in the era of personalized medicine. *CA Cancer J Clin* 2011.
46. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *Science* 2003;302:643-6.
47. Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, et al. Spectrum of mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, and *TP53* in families at high risk of breast cancer. *JAMA* 2006;295:1379-88.
48. Welch PL, Owens KN, King MC. Insights into the functions of *BRCA1* and *BRCA2*. *Trends Genet* 2000;16:69-74.
49. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature* 1995;378:789-92.
50. Shamoo Y. Structural insights into *BRCA2* function. *Curr Opin Struct Biol* 2003;13:206-11.
51. Konstantopoulou I, Tsitlaidou M, Fostira F, Pertesi M, Stavropoulou AV, Triantafyllidou O, et al. High prevalence of *brca1* founder mutations in greek breast/ovarian families. *Clin Genet* 2014;85:36-42.
52. Byrnes GB, Southey MC, Hopper JL. Are the so-called low penetrance breast cancer genes, *ATM*, *BRIP1*, *PALB2* and *CHEK2*, high risk for women with strong family histories? *Breast Cancer Res* 2008;10:208.
53. Meijers-Heijboer H, van den OA, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R, et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to *CHEK2*(\*)1100delc in noncarriers of *BRCA1* or *BRCA2* mutations. *Nat Genet* 2002;31:55-9.

54. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish *RAD51C* as a human cancer susceptibility gene. *NatGenet* 2010;42:410-4.
55. Akbari MR, Tonin P, Foulkes WD, Ghadirian P, Tischkowitz M, Narod SA. *RAD51C* germline mutations in breast and ovarian cancer patients. *Breast Cancer Res* 2010;12:404.
56. Zheng Y, Zhang J, Hope K, Niu Q, Huo D, Olopade OI. Screening *RAD51C* nucleotide alterations in patients with a family history of breast and ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;124:857-61.
57. Masson JY, Tarsounas MC, Stasiak AZ, Stasiak A, Shah R, McIlwraith MJ, et al. Identification and purification of two distinct complexes containing the five *RAD51* paralogs. *Genes & development* 2001;15:3296-307.
58. Smiraldo PG, Gruver AM, Osborn JC, Pittman DL. Extensive chromosomal instability in *RAD51D*-deficient mouse cells. *Cancer Res* 2005;65:2089-96.
59. Thompson ER, Rowley SM, Sawyer S, kConfab, Eccles DM, Trainer AH, et al. Analysis of *RAD51D* in ovarian cancer patients and families with a history of ovarian or breast cancer. *PloS one* 2013;8:e54772.
60. Loveday C, Turnbull C, Ramsay E, Hughes D, Ruark E, Frankum JR, et al. Germline mutations in *RAD51D* confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet* 2011;43:879-82.
61. Pelttari LM, Kiiski J, Nurminen R, Kallioniemi A, Schleutker J, Gylfe A, et al. A finnish founder mutation in *RAD51D*: Analysis in breast, ovarian, prostate, and colorectal cancer. *J Med Genet* 2012;49:429-32.
62. Kim Y, Lach FP, Desetty R, Hanenberg H, Auerbach AD, Smogorzewska A. Mutations of the *SLX4* gene in fanconi anemia. *NatGenet* 2011;43:142-6.
63. Stoepker C, Hain K, Schuster B, Hilhorst-Hofstee Y, Rooimans MA, Steltenpool J, et al. *SLX4*, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new fanconi anemia subtype. *NatGenet* 2011;43:138-41.
64. Landwehr R, Bogdanova NV, Antonenkova N, Meyer A, Bremer M, Park-Simon TW, et al. Mutation analysis of the *slx4/fancc* gene in hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011.
65. Cantor SB, Guillemette S. Hereditary breast cancer and the *BRCA1*-associated *FANCF/BACH1/BRIP1*. *FutureOncol* 2011;7:253-61.
66. Hollestelle A, Wasielewski M, Martens JW, Schutte M. Discovering moderate-risk breast cancer susceptibility genes. *CurrOpinGenetDev* 2010;20:268-76.
67. Wong MW, Nordfors C, Mossman D, Pecunpetelovska G, Avery-Kiejda KA, Talseth-Palmer B, et al. *BRIP1*, *PALB2*, and *RAD51C* mutation analysis reveals their relative importance as genetic susceptibility factors for breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2011;127:853-9.
68. Seal S, Thompson D, Renwick A, Elliott A, Kelly P, Barfoot R, et al. Truncating mutations in the fanconi anemia j gene *BRIP1* are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *NatGenet* 2006;38:1239-41.
69. De Nicolo A, Tancredi M, Lombardi G, Flemma CC, Barbuti S, Di CC, et al. A novel breast cancer-associated *BRIP1* (*FANCF/BACH1*) germ-line mutation impairs protein stability and function. *ClinCancer Res* 2008;14:4672-80.
70. Rafnar T, Gudbjartsson DF, Sulem P, Jonasdottir A, Sigurdsson A, Besenbacher S, et al. Mutations in *BRIP1* confer high risk of ovarian cancer. *NatGenet* 2011;43:1104-7.

71. Levrán O, Attwooll C, Henry RT, Milton KL, Neveling K, Rio P, et al. The *BRCA1*-interacting helicase *brip1* is deficient in fanconi anemia. *NatGenet* 2005;37:931-3.
72. Silvestri V, Rizzolo P, Falchetti M, Zanna I, Masala G, Bianchi S, et al. Mutation analysis of *BRIP1* in male breast cancer cases: A population-based study in central Italy. *Breast Cancer Res Treat* 2011;126:539-43.
73. Kote-Jarai Z, Jugurnauth S, Mulholland S, Leongamornlert DA, Guy M, Edwards S, et al. A recurrent truncating germline mutation in the *BRIP1/FANCD1* gene and susceptibility to prostate cancer. *BrJCancer* 2009;100:426-30.
74. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect of *BRCA* tumours. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5:388-93.
75. Hoeller D, Dikic I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature* 2009;458:438-44.
76. Bergink S, Jentsch S. Principles of ubiquitin and sumo modifications in DNA repair. *Nature* 2009;458:461-7.
77. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009;461:1071-8.
78. Buisson R, Masson JY. *PALB2* self-interaction controls homologous recombination. *Nucleic Acids Res* 2012;40:10312-23.
79. Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, et al. Control of *BRCA2* cellular and clinical functions by a nuclear partner, *PALB2*. *Molecular cell* 2006;22:719-29.
80. Cao AY, Huang J, Hu Z, Li WF, Ma ZL, Tang LL, et al. The prevalence of *PALB2* germline mutations in *brca1/brca2* negative Chinese women with early onset breast cancer or affected relatives. *Breast Cancer Res Treat* 2009;114:457-62.
81. Hamel N, Tischkowitz M, Foulkes WD. A role for *PALB2/FANCD1* in breast cancer predisposition. *Med Sci (Paris)* 2008;24:120-1.
82. Sy SM, Huen MS, Chen J. *PALB2* is an integral component of the *brca* complex required for homologous recombination repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:7155-60.
83. Livingston DM. Cancer. Complicated supercomplexes. *Science (New York, NY)* 2009;324:602-3.
84. Buisson R, Dion-Cote AM, Coulombe Y, Launay H, Cai H, Stasiak AZ, et al. Cooperation of breast cancer proteins *PALB2* and piccolo *BRCA2* in stimulating homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:1247-54.
85. Dray E, Etchin J, Wiese C, Saro D, Williams GJ, Hammel M, et al. Enhancement of *RAD51* recombinase activity by the tumor suppressor *PALB2*. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:1255-9.
86. Buisson R, Masson JY. Functions of *PALB2* and *BRCA2* tumor suppressors in DNA double-strand break repair. *Med Sci (Paris)* 2013;29:301-7.
87. Rahman N, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, Elliott A, et al. *PALB2*, which encodes a *brca2*-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nature genetics* 2007;39:165-7.
88. Silvestri V, Rizzolo P, Zanna I, Falchetti M, Masala G, Bianchi S, et al. *PALB2* mutations in male breast cancer: A population-based study in central Italy. *Breast cancer research and treatment* 2010;122:299-301.

89. Jones S, Hruban RH, Kamiyama M, Borges M, Zhang X, Parsons DW, et al. Exomic sequencing identifies *PALB2* as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science* 2009;324:217.
90. Xia B, Dorsman JC, Ameziane N, de Vries Y, Rooimans MA, Sheng Q, et al. Fanconi anemia is associated with a defect in the *BRCA2* partner *PALB2*. *Nature genetics* 2007;39:159-61.
91. Reid S, Schindler D, Hanenberg H, Barker K, Hanks S, Kalb R, et al. Biallelic mutations in *PALB2* cause fanconi anemia subtype fa-n and predispose to childhood cancer. *Nature genetics* 2007;39:162-4.
92. Patel KJ. Fanconi anemia and breast cancer susceptibility. *Nature genetics* 2007;39:142-3.
93. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, Die-Smulders C, et al. Biallelic inactivation of *BRCA2* in fanconi anemia. *Science* 2002;297:606-9.
94. Pellegrini L, Venkitaraman A. Emerging functions of *BRCA2* in DNA recombination. *Trends Biochem Sci* 2004;29:310-6.
95. Erkkö H, Xia B, Nikkilä J, Schleutker J, Syrjäkoski K, Mannermaa A, et al. A recurrent mutation in *PALB2* in finnish cancer families. *Nature* 2007;446:316-9.
96. Foulkes WD, Ghadirian P, Akbari MR, Hamel N, Giroux S, Sabbaghian N, et al. Identification of a novel truncating *PALB2* mutation and analysis of its contribution to early-onset breast cancer in french-canadian women. *Breast cancer research : BCR* 2007;9:R83-R.
97. García MJ, Fernández V, Osorio A, Barroso A, Llorca G, Lázaro C, et al. Analysis of *FANCB* and *FANCN/PALB2* fanconi anemia genes in *BRCA1/2*-negative spanish breast cancer families. *Breast cancer research and treatment* 2009;113:545-51.
98. Tischkowitz M, Xia B, Sabbaghian N, Reis-Filho JS, Hamel N, Li G, et al. Analysis of *PALB2/FANCN*-associated breast cancer families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:6788-93.
99. Bogdanova N, Sokolenko AP, Iyevleva AG, Abysheva SN, Blaut M, Bremer M, et al. *PALB2* mutations in german and russian patients with bilateral breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011;126:545-50.
100. Pylkäs K, Erkkö H, Nikkilä J, Sölyöm S, Winqvist R. Analysis of large deletions in *BRCA1*, *BRCA2* and *PALB2* genes in finnish breast and ovarian cancer families. *BMC cancer* 2008;8:146.
101. Blanco A, de la Hoya M, Balmaña J, Ramón y Cajal T, Teulé A, Miramar M-D, et al. Detection of a large rearrangement in *PALB2* in spanish breast cancer families with male breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2012;132:307-15.
102. Janatova M, Kleibl Z, Stribrna J, Panczak A, Vesela K, Zimovjanova M, et al. The *PALB2* gene is a strong candidate for clinical testing in *BRCA1* and *BRCA2* negative hereditary breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013.
103. García MJ, Benítez J. The fanconi anaemia/brca pathway and cancer susceptibility. Searching for new therapeutic targets. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 2008;10:78-84.

104. Casadei S, Norquist BM, Walsh T, Stray S, Mandell JB, Lee MK, et al. Contribution of inherited mutations in the *brca2*-interacting protein *palb2* to familial breast cancer. *Cancer Res* 2011;71:2222-9.
105. Hellebrand H, Sutter C, Honisch E, Gross E, Wappenschmidt B, Schem C, et al. Germline mutations in the *PALB2* gene are population specific and occur with low frequencies in familial breast cancer. *Human mutation* 2011;32:E2176-88.
106. Noskowicz M, Bogdanova N, Bermisheva M, Takhirova Z, Antonenkova N, Khusnutdinova E, et al. Prevalence of *PALB2* mutation c.509\_510delga in unselected breast cancer patients from central and eastern europe. *Familial cancer* 2014;13:137-42.
107. Southey MC, Teo ZL, Dowty JG, Odefrey FA, Park DJ, Tischkowitz M, et al. A *PALB2* mutation associated with high risk of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12:R109.
108. Den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: A discussion. *HumMutat* 2000;15:7-12.
109. Gunnarsson H, Arason A, Gillanders EM, Agnarsson BA, Johannesdottir G, Johannsson OT, Barkardottir RB. Evidence against *PALB2* involvement in icelandic breast cancer susceptibility. *J NegatResults Biomed* 2008;7:5.
110. Potapova A, Hoffman AM, Godwin AK, Al-Saleem T, Cairns P. Promoter hypermethylation of the *PALB2* susceptibility gene in inherited and sporadic breast and ovarian cancer. *Cancer research* 2008;68:998-1002.
111. Mikeska T, Alsop K, Mitchell G, Bowtell DD, Dobrovic A. No evidence for *PALB2* methylation in high-grade serous ovarian cancer. *Journal of ovarian research* 2013;6:26.
112. Walsh T, Lee MK, Casadei S, Thornton AM, Stray SM, Pennil C, et al. Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:12629-33.
113. Roest PA, Roberts RG, Sugino S, van Ommen GJ, Den Dunnen JT. Protein truncation test (ptt) for rapid detection of translation- terminating mutations. *Hum Mol Genet* 1993;2:1719-21.
114. Rowan AJ, Bodmer WF. Introduction of a myc reporter tag to improve the quality of mutation detection using the protein truncation test. *Hum Mutat* 1997:172-6.
115. Kahmann S, Herter P, Kuhnen C, Muller KM, Muhr G, Martin D, et al. A non-radioactive protein truncation test for the sensitive detection of all stop and frameshift mutations. *Hum Mutat* 2002;19:165-72.
116. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
117. Den Dunnen JT, van Ommen GJ. The protein truncation test: A review. *Hum Mutat* 1999;14:95-102.
118. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using *lqgreen*. *Clin Chem* 2003;49:853-60.
119. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The miqe guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611-22.

120. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-7.
121. Πουμπουρίδου Νικολέτα, Ανίχνευση πολυμορφισμών και μεταλλάξεων στο γονίδιο *PALB2* σε *BRCA* αρνητικούς Έλληνες ασθενείς με κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών, 2008.
122. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e57.
123. Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S, Stolte M, Entius MM, Loff S, et al. High proportion of large genomic deletions and a genotype phenotype update in 80 unrelated families with juvenile polyposis syndrome. *J Med Genet* 2007;44:702-9.
124. Redeker EJ, de Visser AS, Bergen AA, Mannens MM. Multiplex ligation-dependent probe amplification (mlpa) enhances the molecular diagnosis of aniridia and related disorders. *Molecular vision* 2008;14:836-40.
125. Kanno J, Hutchin T, Kamada F, Narisawa A, Aoki Y, Matsubara Y, Kure S. Genomic deletion within *gldc* is a major cause of non-ketotic hyperglycinaemia. *J Med Genet* 2007;44:e69.
126. Depienne C, Fedirko E, Forlani S, Cazeneuve C, Ribai P, Feki I, et al. Exon deletions of *spg4* are a frequent cause of hereditary spastic paraplegia. *J Med Genet* 2007;44:281-4.
127. Beetz C, Nygren AO, Schickel J, Auer-Grumbach M, Burk K, Heide G, et al. High frequency of partial spast deletions in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neurology* 2006;67:1926-30.
128. Eldering E, Spek CA, Aberson HL, Grummels A, Derks IA, de Vos AF, et al. Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e153.
129. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, et al. Methylation-specific mlpa (ms-mlpa): Simultaneous detection of cpg methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res* 2005;33:e128.
130. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome research* 2001;11:3-11.
131. Nyren P, Karamohamed S, Ronaghi M. Detection of single-base changes using a bioluminometric primer extension assay. *Anal Biochem* 1997;244:367-73.
132. Wong ML, Medrano JF. Real-time pcr for mrna quantitation. *Biotechniques* 2005;39:75-85.
133. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time pcr in virology. *Nucleic Acids Res* 2002;30:1292-305.
134. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 2001;25:402-8.
135. Nolan T, Hands RE, Ogunkolade W, Bustin SA. Spud: A quantitative pcr assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Analytical biochemistry* 2006;351:308-10.
136. Avrameas S, Uriel J. Method of antigen and antibody labelling with enzymes and its immunodiffusion application. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences Serie D: Sciences naturelles* 1966;262:2543-5.

137. Nakane PK, Pierce GB, Jr. Enzyme-labeled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 1966;14:929-31.
138. Diamandis EP, Christopoulos TK. The biotin-(strept)avidin system: Principles and applications in biotechnology. *Clin Chem* 1991;37:625-36.
139. Chan JK. Advances in immunohistochemistry: Impact on surgical pathology practice. *Seminars in diagnostic pathology* 2000;17:170-7.
140. Buffa R, Crivelli O, Fiocca R, Fontana P, Solcia E. Complement-mediated unspecific binding of immunoglobulins to some endocrine cells. *Histochemistry* 1979;63:15-21.
141. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 1970;227:680-5.
142. Kroupis C, Christopoulos K, Devetzoglou M, Tsiagas I, Lianidou ES. Asymmetric real-time pcr detection of *BRCA1* 5382insc mutation by melting curve analysis in the lightcycler. *Clin Chim Acta* 2008;390:141-4.
143. Karaglani M, Toumpoulis I, Goutas N, Poupouridou N, Vlachodimitropoulos D, Vasilaros S, 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.
144. Kroupis C, Stathopoulou A, Zygalaki E, Ferekidou L, Talieri M, Lianidou ES. Development and applications of a real-time quantitative RT-PCR method (qRT-PCR) for *BRCA1* mRNA. *Clin Biochem* 2005;38:50-7.
145. Pavlidou A, Kroupis C, Dimas K. Association of survivin splice variants with prognosis and treatment of breast cancer. *World journal of clinical oncology* 2014;5:883-94.
146. Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001;38:285-303.
147. Stirzaker C, Millar DS, Paul CL, Warnecke PM, Harrison J, Vincent PC, et al. Extensive DNA methylation spanning the *RB* promoter in retinoblastoma tumors. *Cancer Res* 1997;57:2229-37.
148. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:1827-31.
149. Watanabe Y, Maeda I, Oikawa R, Wu W, Tsuchiya K, Miyoshi Y, et al. Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 2013;18:1120-30.
150. Fernandes PH, Saam J, Peterson J, Hughes E, Kaldate R, Cummings S, et al. Comprehensive sequencing of *PALB2* in patients with breast cancer suggests *PALB2* mutations explain a subset of hereditary breast cancer. *Cancer* 2014;120:963-7.
151. Tischkowitz M, Sabbaghian N, Hamel N, Pouchet C, Foulkes WD, Mes-Masson AM, et al. Contribution of the *PALB2* c.2323c>t [p.Q775x] founder mutation in well-defined breast and/or ovarian cancer families and unselected ovarian cancer cases of french canadian descent. *BMC medical genetics* 2013;14:5.
152. Dansonka-Mieszkowska A, Kluska A, Moes J, Dabrowska M, Nowakowska D, Niwinska A, et al. A novel germline *PALB2* deletion in polish breast and ovarian cancer patients. *BMC medical genetics* 2010;11:20.

153. Ladopoulou A, Kroupis C, Konstantopoulou I, Ioannidou-Mouzaka L, Schofield AC, Pantazidis A, et al. Germ line *BRCA1* & *BRCA2* mutations in greek breast/ovarian cancer families: 5382insc is the most frequent mutation observed. *Cancer Lett* 2002;185:61-70.
154. Kroupis C, Lianidou E, Goutas N, Ladopoulou A, Konstantopoulou I, Pantazidis A, et al. Atypical medullary breast carcinoma in a family carrying the 5382insc *BRCA-1* mutation. *Breast J* 2003;9:260-2.
155. Zheng Y, Zhang J, Niu Q, Huo D, Olopade OI. Novel germline *PALB2* truncating mutations in african american breast cancer patients. *Cancer* 2012;118:1362-70.
156. Tischkowitz M, Capanu M, Sabbaghian N, Li L, Liang X, Vallee MP, et al. Rare germline mutations in *PALB2* and breast cancer risk: A population-based study. *Hum Mutat* 2012;33:674-80.
157. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA: a cancer journal for clinicians* 2008;58:71-96.
158. Belogianni I, Apeossos A, Mihalatos M, Razi E, Labropoulos S, Petounis A, et al. Characterization of a novel large deletion and single point mutations in the *BRCA1* gene in a greek cohort of families with suspected hereditary breast cancer. *BMCCancer* 2004;4:61-.
159. Nguyen-Dumont T, Teo ZL, Pope BJ, Hammet F, Mahmoodi M, Tsimiklis H, et al. Hi-plex for high-throughput mutation screening: Application to the breast cancer susceptibility gene *PALB2*. *BMC medical genomics* 2013;6:48.
160. Couch FJ, Hart SN, Sharma P, Toland AE, Wang X, Miron P, et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol* 2015;33:304-11.
161. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, Barrowdale D, Pylkas K, Roberts J, et al. Breast-cancer risk in families with mutations in *PALB2*. *N Engl J Med* 2014;371:497-506.
162. Villarroel MC, Rajeshkumar NV, Garrido-Laguna I, De Jesus-Acosta A, Jones S, Maitra A, et al. Personalizing cancer treatment in the age of global genomic analyses: *PALB2* gene mutations and the response to DNA damaging agents in pancreatic cancer. *Molecular cancer therapeutics* 2011;10:3-8.
163. Smith MA, Reynolds CP, Kang MH, Kolb EA, Gorlick R, Carol H, et al. Synergistic activity of parp inhibition by talazoparib (bmn 673) with temozolomide in pediatric cancer models in the pediatric preclinical testing program. *Clin Cancer Res* 2015;21:819-32.
164. Teo ZL, Provenzano E, Dite GS, Park DJ, Apicella C, Sawyer SD, et al. Tumour morphology predicts *PALB2* germline mutation status. *Br J Cancer* 2013;109:154-63.
165. Southey MC, Teo ZL, Winship I. *PALB2* and breast cancer: Ready for clinical translation! *The application of clinical genetics* 2013;6:43-52.
166. van der Groep P, van der Wall E, van Diest PJ. Pathology of hereditary breast cancer. *Cellular oncology (Dordrecht)* 2011;34:71-88.
167. Kroupis C, Lianidou E, Goutas N, Vasilaros S, Yannoukakos D, Petersen MB. Genetic counseling of medullary breast cancer patients. *Clin Genet* 2004;65:343-4.
168. Breast Cancer Linkage C, Lakhani SR, Easton D, Stratton MR. Pathology of familial breast cancer: Differences between breast cancers in carriers of *BRCA1* or *BRCA2* mutations and sporadic cases. *Lancet* 1997;349:1505-10.



169. Shousha S. Medullary carcinoma of the breast and *BRCA1* mutation. *Histopathology* 2000;37:182-5.
170. Eisinger F, Noguez C, Birnbaum D, Jacquemier J, Sobol H. *BRCA1* and medullary breast cancer. *JAMA* 1998;280:1227-8.
171. Ridolfi RL, Rosen PP, Port A, Kinne D, Mike V. Medullary carcinoma of the breast: A clinicopathologic study with 10 year follow-up. *Cancer* 1977;40:1365-85.
172. Pern F, Bogdanova N, Schurmann P, Lin M, Ay A, Langer F, et al. Mutation analysis of *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* and *BRD7* in a hospital-based series of german patients with triple-negative breast cancer. *PloS one* 2012;7:e47993.
173. Goldgar DE, Easton DF, Deffenbaugh AM, Monteiro AN, Tavtigian SV, Couch FJ. Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: Application to *BRCA1* and *BRCA2*. *AmJHumGenet* 2004;75:535-44.
174. Konstantopoulou I, Kroupis C, Ladopoulou A, Pantazidis A, Boumba D, Lianidou ES, et al. *BRCA1* mutation analysis in breast/ovarian cancer families from greece. *Hum Mutat* 2000;16:272-3.
175. Chen P, Liang J, Wang Z, Zhou X, Chen L, Li M, et al. Association of common *PALB2* polymorphisms with breast cancer risk: A case-control study. *Clin Cancer Res* 2008;14:5931-7.
176. Poumpouridou N GN, Tsionou C, Dimas K, Lianidou E, Kroupis C. Development of a novel ptt assay for mutation screening in *PALB2* gene mutations with medullary breast cancer, 2015, *Familial Cancer* (submitted).
177. Antoniou AC, Cunningham AP, Peto J, Evans DG, Lalloo F, Narod SA, et al. The boadicea model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancers: Updates and extensions. *Br J Cancer* 2008;98:1457-66.
178. Lee AJ, Cunningham AP, Kuchenbaecker KB, Mavaddat N, Easton DF, Antoniou AC. Boadicea breast cancer risk prediction model: Updates to cancer incidences, tumour pathology and web interface. *Br J Cancer* 2014;110:535-45.
179. Panchal SM, Ennis M, Canon S, Bordeleau LJ. Selecting a brca risk assessment model for use in a familial cancer clinic. *BMC medical genetics* 2008;9:116.
180. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, Penault-Llorca F, van der Vijver M, Parry S, et al. Prediction of brca1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res* 2005;11:5175-80.
181. Abbott DW, Thompson ME, Robinson-Benion C, Tomlinson G, Jensen RA, Holt JT. *BRCA1* expression restores radiation resistance in *BRCA1*-defective cancer cells through enhancement of transcription-coupled DNA repair. *The Journal of biological chemistry* 1999;274:18808-12.
182. Poumpouridou N, Acha-Sagredo A, Goutas N, Vlachodimitropoulos D, Chatziioannidou I, Lianidou E, Liloglou T, Kroupis C. Development and validation of molecular methodologies to assess *PALB2* expression in sporadic breast cancer, 2015, *CLinical Biochemistry* (in press).