

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2006

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ: ~ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΑΣ ΤΑΧΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΗΣ
ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ 5382insC
ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ BRCA1."

ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΓΙΑΝΝΟΥΚΑΚΟΣ ΔΡΑΚΟΥΛΗΣ

Ερευνητής Β΄,

Ινστιτούτο Ραδιοϊσοτόπων & Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων
Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών "ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ"

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: ΓΙΑΝΝΟΥΚΑΚΟΣ ΔΡΑΚΟΥΛΗΣ
ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ

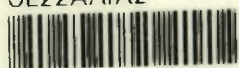
ΑΘΗΝΑ 2006



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4997/1
Ημερ. Εισ.: 13-11-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξινόμησης Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΑΘΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087756

Περιεχόμενα

Πρόλογος.	Σελ.
Περίληψη.	5
Εισαγωγή.	
1.1 Καρκίνος-Καρκίνος μαστού και ωοθηκών.	
1.1.1 Γενικά.	6
1.1.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια και ογκογονίδια.	7
1.1.3 Μοντέλα ογκογένεσης.	9
1.1.4 Καρκίνος μαστού- ωοθηκών.	10
1.1.5 Κληρονομικός καρκίνος.	12
1.2 Λειτουργία-ρόλος γονιδίου BRCA1 πρωτεΐνης BRCA1.	12
1.3 Μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA1.	13
1.3.1 Ιδρυτικές μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA1.	14
1.3.1.1 Περιγραφή ανά πληθυσμό.	14
1.3.1.2 Η Ιδρυτική Μετάλλαξη 5382insC.	15
1.4 Τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων.	
1.4.1 Τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων για μη γνωστές μεταλλάξεις.	17
1.4.2 Τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων για γνωστές μεταλλάξεις.	17
1.4.3 MS PCR.	17
2. Υλικά και Μέθοδοι	
2.1 Ασθενείς.	19
2.2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA.	19
2.3. Αλληλουχία εκκινητών για την Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).	21
2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).	22
2.5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης.	23
2.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου.	24
2.7. Καθαρισμός των προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.	24
2.7.1 Cycle Sequencing.	25
2.7.2. Καθαρισμός με στήλη σε G-50 και ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA.	27

3.	Αποτελέσματα.	
3.1	Προσδιορισμός των συνθηκών για την MS-PCR.	31
3.1.1	Θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες DNA.	31
3.1.2	Αριθμοί κύκλων - Συγκέντρωση Mg.	34
3.1.3	Συγκέντρωση εκκινητών (primers).	34
3.2	Αποτελέσματα και με τους 2 πρόσθιους εκκινητές (primers) μαζί.	34
3.3	Συγκέντρωση πηκτικής Ακρυλαμιδίου N Αγαρόζης.	36
3.4	Negative control.	38
3.5	Πιστοποίηση τεχνικής- reproducibility.	38
3.6	MS-PCR και στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων. Επιβεβαίωση με Sequencing.	39
4.	Συμπεράσματα.	
4.1	Γενικά.	42
4.2.	Αποτελέσματα ασθενών.	42
4.3.	Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα της MS-PCR- Προοπτική χρησιμοποίησής της ως τεχνική ρουτίνας.	43
5.	Βιβλιογραφία.	45

Πρόλογος.

Η παρακάτω διπλωματική εργασία έλαβε μέρος στο εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής, του Ινστιτούτου ΡΡΠ στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών "ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ".

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Γιαννουκάκο Δρακούλη, Ερευνητή Β' που με δέχθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής παρέχοντάς μου έτσι τη δυνατότητα να γνωρίσω τον εργαστηριακό χώρο, για τη συνεχή βοήθειά του σε εργασιακό αλλά και σε ψυχολογικό επίπεδο, αλλά και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αναγνωστόπουλο Θωδωρή, μεταδιδακτορικό ερευνητή, για τη σημαντική βοήθεια που μου παρείχε στο πειραματικό σκέλος της εργασίας όπως και για τις διορθώσεις στην τελική μορφή της εργασίας, όπως και τους Αρμάου Σοφία, Θώδη Γεωργία, Νικολόπουλο Γεώργιο, Παναγιωτακοπούλου Φαίη, Περτέση Μαρουλίτσα, για τη βοήθεια που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κ. Σταθόπουλο Κωνσταντίνο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και τον κ. Μαμούρη Ζήση, Αναπληρωτή Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Περίληψη.

Είναι γνωστό ότι γυναίκες ετεροζυγώτες για μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA1 έχουν αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών. Μια από τις πιο συχνές μεταλλάξεις στην Ευρώπη είναι η ιδρυτική μετάλλαξη 5382insC.

Η μετάλλαξη 5382insC έχει επαναλαμβανόμενα ανιχνευτεί σε οικογένειες με οικογενή καρκίνο του μαστού σε Εβραίους Ασκενάζυ είτε στο Ισραήλ είτε στις Η.Π.Α. όπως και σε μη εβραϊκές οικογένειες από χώρες όπως η Ρωσία η Πολωνία η Ελλάδα αλλά και σχεδόν στο σύνολο των ευρωπαϊκών χωρών. Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε σάρωση του γενετικού υλικού από 357 ασθενείς με σποραδικό καρκίνο του μαστού ή των ωοθηκών για να μελετηθεί η συχνότητα εμφάνισης της μετάλλαξης 5382insC. Η τεχνική η οποία χρησιμοποιήθηκε είναι η Mutagenically separated PCR (MS-PCR) η οποία και είναι μία εύχρηστη και ταχεία τεχνική ανίχνευσης σημειακών μεταλλάξεων.

Το ποσοστό της μετάλλαξης 5382insC στο σύνολο των ασθενών ήταν περίπου 3% (11/357) ενώ τα παραπάνω αποτελέσματα επαληθεύτηκαν με ανάγνωση της αλληλουχίας του γενετικού υλικού για έλεγχο της πιστότητας της τεχνικής.

Τα αποτελέσματα φανερώνουν μια σημαντική συνεισφορά της 5382insC σε σποραδικά περιστατικά καρκίνου μαστού και ωοθηκών στην Ελλάδα και αποδεικνύουν ότι η MS-PCR είναι μια αξιόπιστη διαγνωστική μέθοδος.

Abstract.

It is well known that female carriers for BRCA1 mutations have a high lifetime risk of developing Breast and Ovarian Cancer. One of the most common mutations in Europe is the founder mutation 5382insC.

Mutation 5382insC has been repeatedly detected in Ashkenazi Jewish Breast Cancer families living in USA and Israel as well as in non-Jewish families from Russia, Poland, Greece as well as in almost all European countries. In this study we have screened 357 patients with sporadic breast or ovarian cancer in order to evaluate the frequency of mutation 5382insC, with Mutagenically Separated PCR (MS-PCR) which is a simple and rapid detection method for point mutations.

The frequency of mutation 5382insC was approximately 3% (11/357) while the results were confirmed with Sequencing. The results show an important contribution of 5382insC in sporadic Breast and Ovarian cancer in Greece and MS-PCR proved to be a reliable diagnostic method.

1. Εισαγωγή.

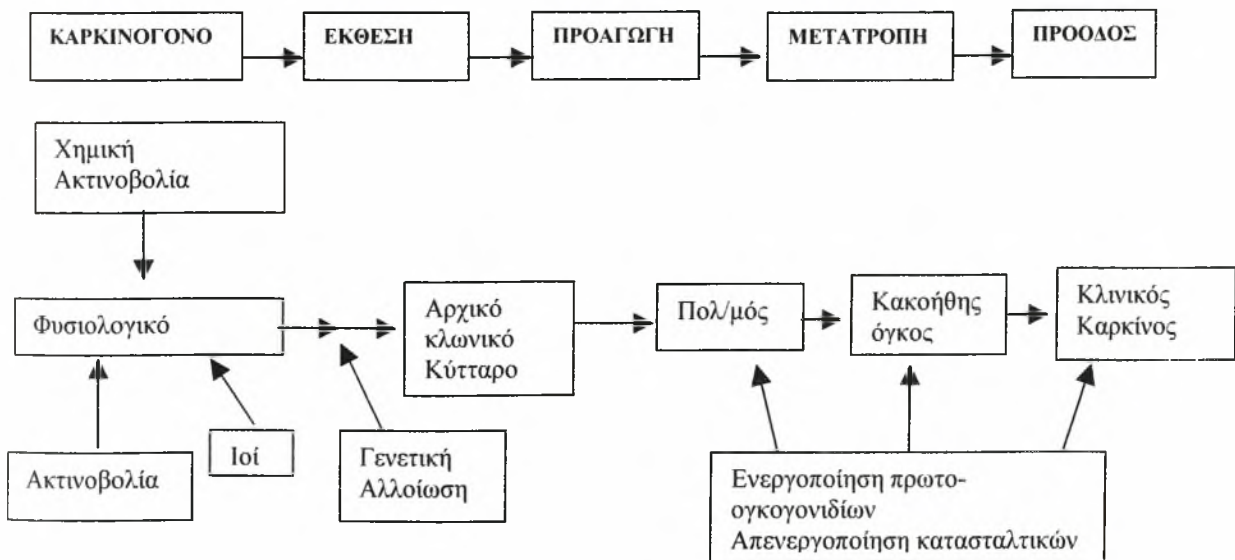
1.1 Καρκίνος-Καρκίνος μαστού και ωθηκών.

1.1.1 Γενικά.

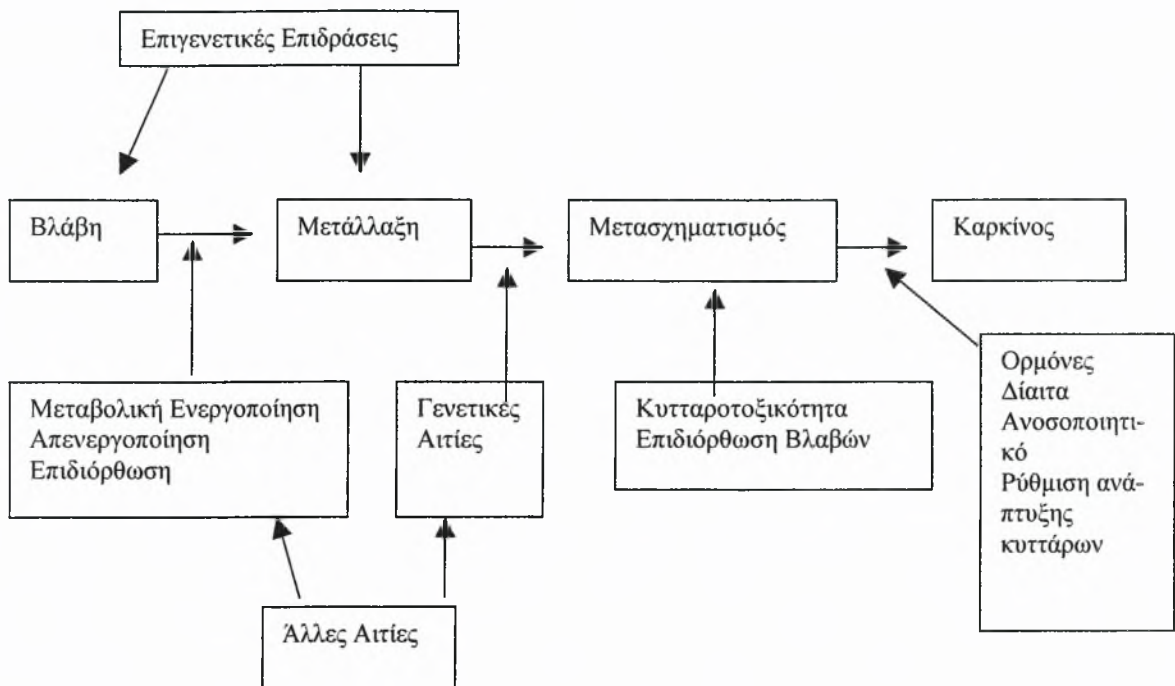
Καρκίνος είναι η πολυπαραγοντική ασθένεια που οφείλεται στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κάποιων κυττάρων -έπειτα από μεταβολή του γενετικού υλικού που οδηγεί σε διατάραξη του φυσιολογικού τους κύκλου- με αποτέλεσμα την καταστροφή των φυσιολογικών κυττάρων και στη συνέχεια του συγκεκριμένου ιστού[1].

Για τον φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων υπάρχει σύστημα ελέγχου στο κύτταρο (π.χ. κυτταρικός κύκλος). Πιθανή βλάβη στο σύστημα ελέγχου έχει επιπτώσεις και μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση καρκίνου [2]. Τα κύρια χαρακτηριστικά ενός καρκινικού κυττάρου είναι, i) η απώλεια φυσιολογικών μηχανισμών ρύθμισης της αύξησης, ii) ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός και iii) ο σχηματισμός στοιβάδων.

Τα πρώτα στάδια του μοντέλου της καρκινογένεσης αφορούν την αλλοίωση του γενετικού υλικού του κυττάρου (στάδια έκθεσης και έναρξης) για να φτάσουμε μέσω της επίδρασης γενετικών και επιγενετικών παραγόντων στο τελικό στάδιο (κλινικό) [2]. Στο στάδιο αυτό είναι πιθανό να υπάρχουν επιπρόσθετες βλάβες στο γενετικό υλικό, που συνήθως έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων ή/και την απώλεια λειτουργικότητας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1: Το μοντέλο καρκινογένεσης και τα στάδιά του[2]



Εικόνα 1.2 : Παράγοντες που επηρεάζουν την καρκινογένεση[2].

Η αρχική βλάβη στο κύτταρο μπορεί να προκαλείται από εξωτερικούς παράγοντες (ογκογόνοι ιοί, χημικά καρκινογόνα, ακτινοβολία) είτε από κληρονομούμενες μεταλλάξεις (εικόνα 1.2) .

1.1.2 Ογκοκατασταλτικά γονίδια και ογκογονίδια.

Ορισμένοι ρετροϊοί περιέχουν γονίδια που έχουν τη δυνατότητα να μετατρέψουν φυσιολογικά κύτταρα σε καρκινικά. Τα γονίδια των ιών αυτών προήλθαν από κύτταρα που προσέβαλαν οι ιοί και αποδείχθηκε ότι είναι αλλοιωμένα παράγωγα γονιδίων των κυττάρων που προσέβαλαν. Η αλλοίωση αυτή προσδίδει και τη ογκογόνο δράση τους [3].

Τα προϊόντα των ογκογονιδίων είναι τα εξής: α) αυξητικοί παράγοντες, β) υποδοχείς ορμονών και αυξητικών παραγόντων, γ) πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος, όπως πρωτεΐνες που συνδέονται με τη κυτταροπλασματική αλλά και την πυρηνική μεμβράνη, κυτταροπλασματικές τυροσινικές κινάσες ή κινάσες θρεονίνης/σερίνης, και δ) μεταγραφικοί παράγοντες. Παρακάτω παρατίθεται ενδεικτικά ένας πίνακας με κάποια ογκογονίδια και τα χαρακτηριστικά τους.

Ογκογονίδια / Χρωμόσωμα	Σχετιζόμενες ασθένειες	Μηχανισμός ενεργοποίησης
<i>EGFR / 7p1.1-1.3</i>	Καρκίνωμα του πλακώδους επιθηλίου	Γονιδιακή ενίσχυση- αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης
<i>RET / 10q11.2</i>	Καρκίνωμα του θυρεοειδούς	Ανασυνδυασμός του DNA /σημειακές μεταλλάξεις
<i>Src / 20p12-13</i>	Καρκίνος του παχέος εντέρου	Συνεχής ενεργότητα
<i>H-RAS / 11p15.5</i>	Καρκίνος του παχέος εντέρου, του πνεύμονα και του παγκρέατος	Σημειακή μετάλλαξη
<i>v/myc / 8q24.1</i>	Καρκίνωμα μυελοκυτομάτωσης	Μη ρυθμιζόμενη ενεργότητα

Πίνακας 1.3: Χαρακτηριστικά ογκογονίδια και οι μηχανισμοί ενεργοποίησής τους.(4.)

Η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων είναι δυνατή με τρεις τρόπους: i) μεταλλάξεις, ii)) με γονιδιακή ενίσχυση (gene amplification), ή (iii) με χρωμοσωμικές ανακατατάξεις.

Οι μεταλλάξεις στα πρωτογονίδια πρέπει να επιφέρουν αλλαγές στη δομή , άρα και λειτουργικότητα του πρωτεϊνικού προϊόντος του πρωτογονιδίου [2].

Οι αλλαγές συνήθως προκαλούνται από σημειακές μεταλλάξεις, όπου έχουμε ενθέσεις ή απαλοιφές βάσεων και παρανοηματικές μεταλλάξεις. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου το αποτέλεσμα μιας μετάλλαξης είναι αλλαγή σε ένα κρίσιμο αμινοξύ του πρωτεϊνικού προϊόντος, με αποτέλεσμα να προκύπτουν προϊόντα με διαφορετική δραστηριότητα [1].

Επίσης υπάρχουν περιπτώσεις όπου γονιδιακές ανακατατάξεις μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγή στη δομή άρα και στη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης του πρωτογονιδίου.

Κατά τη γονιδιακή ενίσχυση έχουμε πολλαπλά αντίγραφα του γονιδίου στο γονιδίωμα του οργανισμού μέσω αντιγραφής του γονιδιωμιακού DNA [1].

Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για την αλλαγή στην έκφραση των ογκογονιδίων είναι χρωμοσωμικές ανακατατάξεις όπως διπλασιασμοί, μετατοπίσεις ή ανασυνδυασμοί τμημάτων, η παρεμβολή τρανσποζονίων στο γονίδιο και η ενσωμάτωση ιών στη ρυθμιστική περιοχή των ογκογονιδίων [1,2].

Όσον αφορά τα ογκοκατασταλτικά γονίδια χωρίζονται σύμφωνα με το ρόλο τους σε δυο κατηγορίες: i) Στα γονίδια-φρουρούς (gatekeepers) που είναι οι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, διατηρούν δηλαδή τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε φυσιολογικά επίπεδα και, ii) στα γονίδια-φροντιστές (caretakers), που είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της ακεραιότητας του γενετικού υλικού [5,6]. Κάποια από τα ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως τα BRCA1 και BRCA2 έχουν και τις δυο παραπάνω ιδιότητες. Η απενεργοποίησή τους συνήθως οφείλεται σε μεταλλάξεις του ενός αλληλόμορφου που ακολουθείται από απώλεια του δεύτερου αλληλόμορφου που ονομάζεται απώλεια ετεροζυγωτίας (Loss of Heterozygosity, LOH)[7]. Απώλεια ετεροζυγωτίας παρατηρείται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις συμπαγών όγκων σε ανθρώπους και σε ορισμένους τύπους καρκίνου, όπως των ωοθηκών. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται κάποιες ασθένειες συσχετιζόμενες με ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Γονίδιο	Σχετιζόμενες ασθένειες
<i>TP53</i>	Σύνδρομο Li-Fraumeni
<i>RB</i>	Οικογενές ρετινοβλάστωμα, οστεοσάρκωμα, καρκίνος μαστού, προστάτη, παγκρέατος κ.α.
<i>APC</i>	Οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση, καρκίνος του παχέος εντέρου
<i>BRCA1</i>	Κληρονομικός καρκίνος του μαστού/ωοθηκών, προστάτη
<i>BRCA2</i>	Κληρονομικός καρκίνος του μαστού/ωοθηκών, παγκρέατος
<i>VHL</i>	Σύνδρομο von-Hippel Lindau
<i>MEN-1</i>	Πολλαπλή ενδοκρινής νεοπλασία τύπου 1
<i>LKB1/STK1</i>	Σύνδρομο Peutz-Jeghers

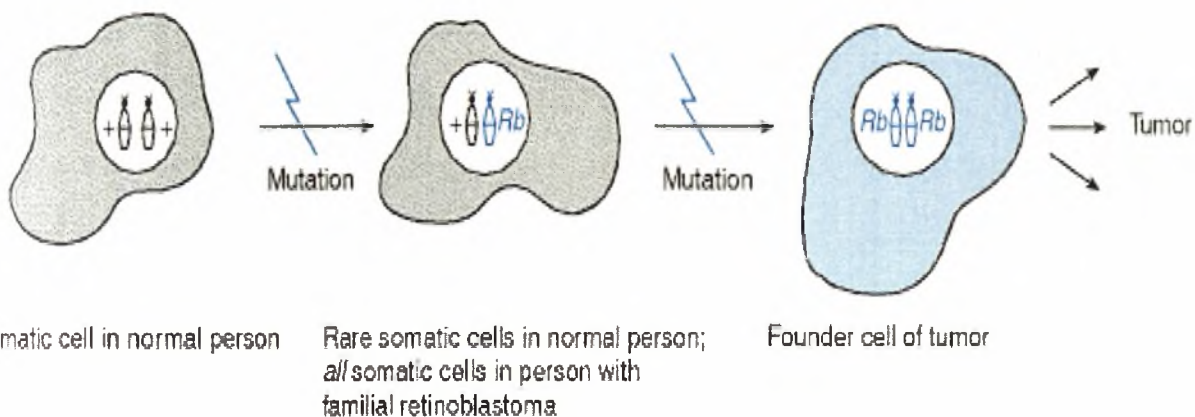
Πίνακας 1.4: Σημαντικά ογκογονίδια και οι ασθένειες με τις οποίες αυτά σχετίζονται.[4].

1.1.3 Μοντέλα ογκογένεσης.

Το μοντέλο Knudson (two-hit model)

Αποτελεί το σημαντικότερο μοντέλο ογκογένεσης. Στο μοντέλο αυτό απαιτείται η ύπαρξη τουλάχιστον δυο μεταλλάξεων οι οποίες οδηγούν σε απώλεια της ετεροζυγωτίας. Συνήθως το

πρώτο πλήγμα είναι μετάλλαξη του ενός αλληλόμορφου του γονιδίου, ενώ το δεύτερο είναι μετάλλαξη και στο δεύτερο αλληλόμορφο με συνέπεια την απώλεια της ετεροζυγωτίας (Loss of Heterozygosity) [7]. Επιπλέον απαιτείται το κύτταρο να επιβιώσει μετά την πρώτη μετάλλαξη, για να μπορέσει να συμβεί και δεύτερη μετάλλαξη στο ίδιο κύτταρο.[1]. Μια σχηματική απεικόνιση το μοντέλου, που είχε προταθεί με βάση το ρετινοβλάστωμα [8,9] παρουσιάζεται στο σχήμα.



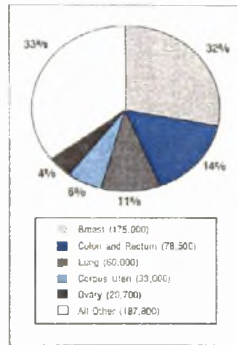
Εικόνα 1.5: Το πρώτο σχήμα δείχνει ένα σωματικό κύτταρο ενός υγιούς ανθρώπου. Και τα δυο αλληλόμορφα είναι λειτουργικά. Το δεύτερο σχήμα δείχνει την απενεργοποίηση ενός από τα δυο αλληλόμορφα μετά από μια μετάλλαξη σε λίγα σωματικά κύτταρα του ίδιου υγιούς ανθρώπου. Η ίδια εικόνα δείχνει όλα τα σωματικά κύτταρα ενός ατόμου με οικογενές ρετινοβλάστωμα. Εάν επιζήσει αυτό το κύτταρο και δεν οδηγηθεί στην απόπτωση και συμβεί μια δεύτερη μετάλλαξη τότε θα δημιουργηθεί όγκος. Είναι προφανές ότι για να υπάρξει απώλεια της ετεροζυγωτίας σε ένα υγιές άτομο θα πρέπει να γίνουν δυο μεταλλάξεις που θα οδηγήσουν σε απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου στο ίδιο κύτταρο ενώ σε κάποιον φορέα της μετάλλαξης θα είναι πολύ πιο εύκολο αφού από την αρχή της ζωής του όλα τα κύτταρά του έχουν τη μετάλλαξη στο ένα από τα δυο αλληλόμορφα [36].

1.1.4 Καρκίνος μαστού-ωοθηκών.

Για τη φυσιολογική ανάπτυξη του μαστού απαιτείται ένας σημαντικός αριθμός ορμονών (όπως προγεστερόνη, οιστρογόνα) και αναπτυξιακών παραγόντων (π.χ. EGF) [1].

Οι αλληλεπιδράσεις των παραπάνω συντελούν στην ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σημάτων τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν ή απενεργοποιούν κάποια γονίδια. Η διαταραχή της μεταβίβασης σήματος άρα και η μη φυσιολογική ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση γονιδίων μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και καρκινογένεση[1].

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συχνός καρκίνος ανάμεσα σε γυναίκες και ιδιαίτερα σε γυναίκες των Η.Π.Α. και των χωρών της Βόρειας Ευρώπης (εικόνα 1.6) [10].



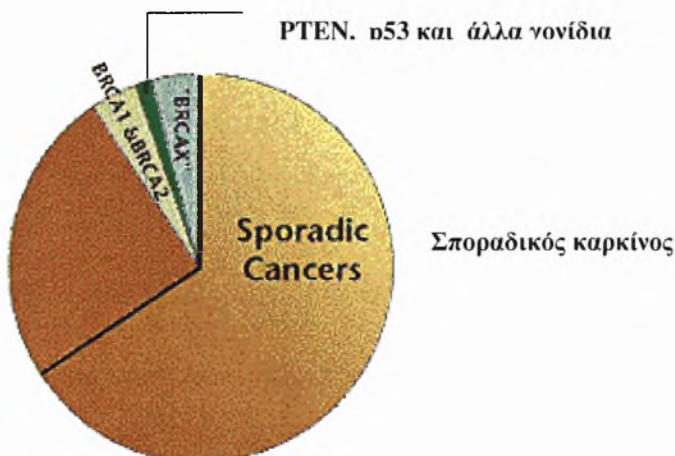
Εικόνα 1.6: Αριθμός περιστατικών διαφόρων τύπων καρκίνου σε γυναίκες ασθενείς και αντίστοιχο ποσοστό τους (1991).

Επιπλέον ρόλο στην εμφάνιση καρκίνου του μαστού στις γυναίκες παίζουν κάποιοι παράγοντες όπως η μεγάλη διάρκεια αναπαραγωγικής ηλικίας το αυξημένο βάρος, η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ και το κάπνισμα [1,10] .

Ο καρκίνος του μαστού παρατηρείται σε γυναίκες συνήθως κατά την περίοδο μετά την εμμηνόπαυση, ενώ η εμφάνιση του σε γυναίκες νέας ηλικίας οφείλεται κυρίως σε κληρονομικότητα [1]. Ο παράγοντας που έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζει περισσότερο την εμφάνιση καρκίνου των ωοθηκών είναι η μεγάλη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας της γυναίκας όπως και ο τρόπος διατροφής (διατροφή σε υψηλά λιπαρά και γαλακτόζη) [1].

Οι περιπτώσεις του καρκίνου του μαστού μπορούν να διακριθούν σε δυο κατηγορίες, ανάλογα με την παρουσία άλλων ασθενών με καρκίνο του μαστού στην οικογένεια του ασθενή (οικογενής καρκίνος μαστού), ή όχι (σποραδικός). Ο οικογενής αποτελεί το 30% των περιπτώσεων ενώ ο σποραδικός το 70% . Από τον οικογενή καρκίνο το 30% σχετίζεται με μεταλλάξεις σε γονίδια προδιάθεσης με υψηλή διεισδυτικότητα όπως PTEN, BRCA1, BRCA2, p53, STK11/LKB1. Αυτά τα περιστατικά (~10% των συνολικών περιπτώσεων) αποτελούν τον κληρονομικό καρκίνο.

Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζονται τα περιστατικά καρκίνου σύμφωνα με την αναλογία τους σε καρκινοπαθείς μαστού [11].



Σχήμα 1.7 : Κατανομή καρκίνου του μαστού ανάλογα με την παρουσία ή όχι οικογενειακού ιστορικού. Μέρος του οικογενούς καρκίνου αποτελεί ο κληρονομικός στον οποίο εμπλέκονται τα γονίδια PTEN, p53, BRCA1 και BRCA2 και άλλα. [11]

1.1.5 Κληρονομικός καρκίνος.

Όταν συμβεί μια μετάλλαξη σε ένα σωματικό κύτταρο τότε είναι πιθανό να συμβούν και άλλες τυχαίες μεταλλάξεις στο ίδιο κύτταρο και στο ίδιο γονίδιο. Εάν συμβεί αυτό, τότε ξεκινά ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση.

Αν η μετάλλαξη συμβεί σε γεννητικό κύτταρο, τότε μπορεί να υπάρξει πιθανή μεταφορά του γονιδίου με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη στους απογόνους καθώς κάθε γονέας συνεισφέρει ένα γαμέτη στο ζυγωτό. Ο απόγονος που έχει προκύψει από μεταλλαγμένο γαμετικό κύτταρο θα φέρει τη μετάλλαξη σε όλα του τα σωματικά και τα μισά γεννητικά κύτταρα που έχουν προκύψει από το ζυγωτό.

Επομένως, ο γονέας έχει 50% πιθανότητα να την κληρονομήσει στους δικούς του απογόνους, οπότε έχουμε την περίπτωση του κληρονομικού καρκίνου.

Από το 1960 υπάρχουν στατιστικές μελέτες σε οικογένειες, οι οποίες υποδηλώνουν τον αυτοσωμικό τρόπο μεταβίβασης για κάποια είδη καρκίνου., όπως καρκίνος μαστού, των ωοθηκών του παχέος εντέρου κ.α. Η πρόταση αυτή εδραιώθηκε το 1980 όταν κλωνοποιήθηκε το γονίδιο APC, και μεταλλάξεις σε αυτό συνδέθηκαν άμεσα με την εμφάνιση της οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης [12,13].

Γυναίκες οι οποίες είναι ετεροζυγώτες για γεννητικές μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 έχουν έως 80% πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού μέχρι την ηλικία των 75 χρόνων και 40-65% πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών. Τα παραπάνω ποσοστά αυξάνουν στο μέγιστό τους με την πάροδο του χρόνου γι αυτό ασθενείς με οικογενή καρκίνο συνήθως εμφανίζουν την ασθένεια σε μικρή ηλικία [14].

Επίσης σε περιπτώσεις κληρονομικής παθογόνων μεταλλάξεων και στα δυο αλληλόμορφα του BRCA1 (ομοζυγωτία ή σύνθετη ετεροζυγωτία) επέρχεται διακοπή της εμβρυογένεσης [15,16,17].

1.2 Λειτουργία-ρόλος γονιδίου BRCA1 - πρωτεΐνης BRCA1.

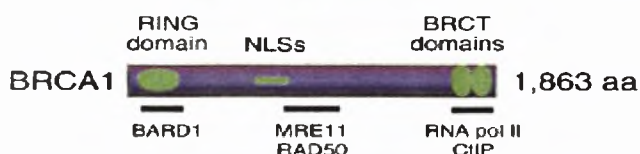
Το γονίδιο BRCA1 είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο, μεγάλο σε μέγεθος αποτελούμενο από 24 εξώνια [46]. Έχει ιδιότητες γονιδίου-φρουρού (gatekeeper) και γονιδίου Νφροντιστή (caretaker) [5]. Επομένως συμμετέχει σε διαδικασίες πολύ ζωτικές για το κύτταρο, όπως στην επιδιόρθωση του DNA, στον ανασυνδιασμό, στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, και τη μεταγραφή [5].

Συγκεκριμένα σε knockout κύτταρα ποντικών για το BRCA1 (Xu et al., 1999) παρατηρούνται δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες (ρόλος caretaker).

Επίσης σε knockout κύτταρα ποντικών για το BRCA1 εκτειθόμενα σε ιονίζουσα ακτινοβολία (Xu et al., 2001a), υπάρχει ανικανότητα αναβολής σύνθεσης DNA στη φάση S όπως και στη φάση G2 (gatekeeper) [5].

Η πρωτεΐνη BRCA1 αποτελείται από 1863 αμινοξέα και εκφράζεται ιδιαίτερα στις φάσεις S και G2 του κυτταρικού κύκλου ενώ εντοπίζεται στον πυρήνα [18,19,20]. Αποτελείται από 3 δομικές περιοχές (εικόνα 1.8) :

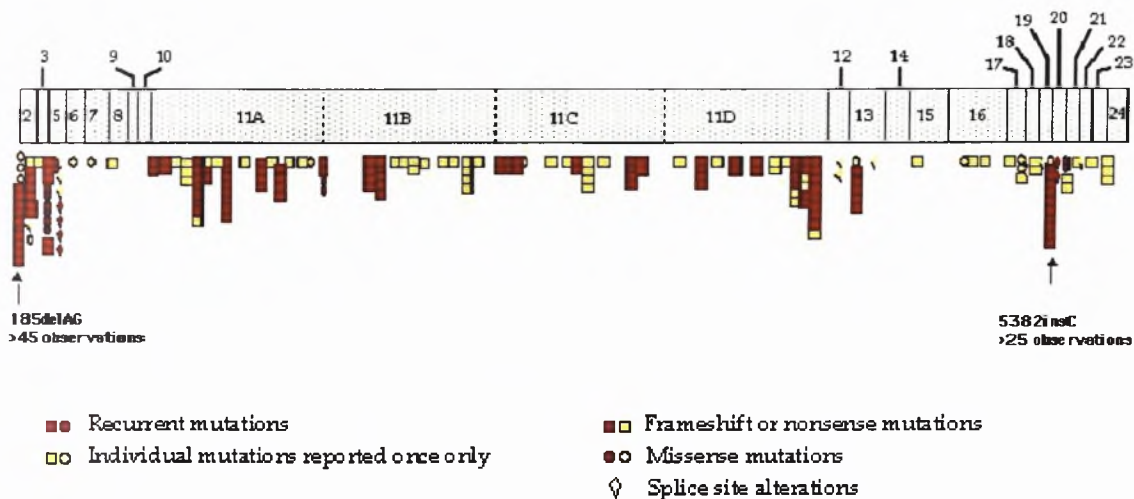
- 1) την περιοχή RING (Really Important New Gene) στο αμινοτελικό άκρο της
- 2) την περιοχή NLS (Nuclear Localization Signal) στο κεντρικό της τμήμα και
- 3) περιοχή BRCT (BRCA1 Carboxy Terminal) στο καρβοξυτελικό άκρο της



Εικόνα 1.8 : Παρατηρούνται στο σχήμα οι δομικές περιοχές της πρωτεΐνης BRCA1. Από κάτω αναφέρονται μόρια τα οποία αλληλεπιδρούν με κάθε μια από τις 3 δομικές περιοχές.

1.3 Μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA1.

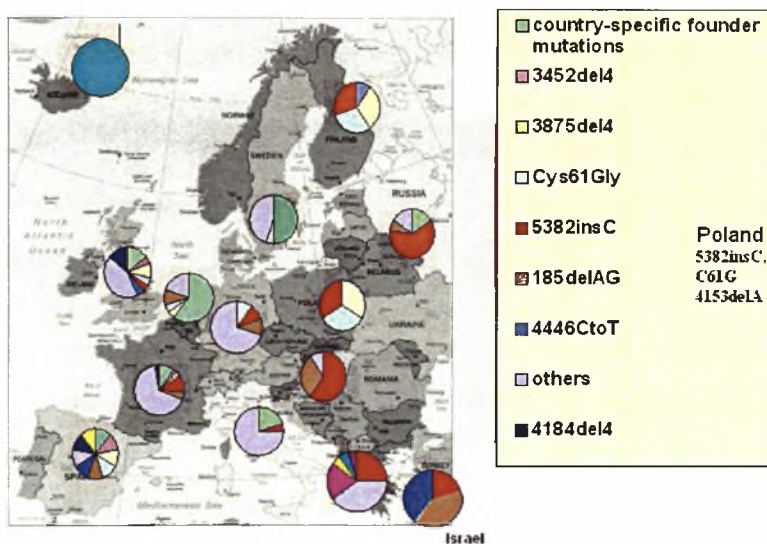
Οι μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί στο γονίδιο BRCA1 με βάση τη μονάδα του γενετικού υλικού που αλλάζει διακρίνονται σε σημειακές μεταλλάξεις (εικόνα 1.9) είτε γενωμικές αναδιατάξεις (εικόνα 1.10).



Εικόνα 1.9 : Σχηματική απεικόνιση των μεταλλάξεων στο γονίδιο BRCA1 κατά μήκος της αλληλουχίας του. Το γονίδιο είναι χωρισμένο σε εξώνια και η αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων σε κάποια περιοχή υποδεικνύεται με τα κουτάκια που αναγράφονται κάτω από κάθε εξώνιο. Στο γονίδιο BRCA1 τονίζεται η αυξημένη συχνότητα των μεταλλάξεων 185delAG και 5382insC στα εξώνια 2 και 20 αντίστοιχα.

Σε κάποιες χώρες όπως η Ιταλία εμφανίζονται μεταλλάξεις μοναδικές για τον ιταλικό καθώς και για το διεθνή χώρο, όπως η 1499insA στο BRCA1 το οποίο υποδηλώνει τη μεγάλη ετερογένεια μεταξύ πληθυσμών [29]. Στην Ελλάδα έχει χαρακτηριστεί ένας μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων υποδηλώνοντας μεγάλη γενετική ετερογένεια [31-38].

Εικόνα



1.11:

Κατανομή των μεταλλάξεων στο γονίδιο *BRCA1* στον ευρωπαϊκό χώρο. Χαρακτηριστικά φαίνεται να υπάρχει σε μεγάλο ποσοστό η 5382insC (κόκκινο). Δίπλα στο χάρτη παρατίθεται παράρτημα με τα χρώματα που χρησιμοποιούνται για συγκεκριμένες μεταλλάξεις [30].

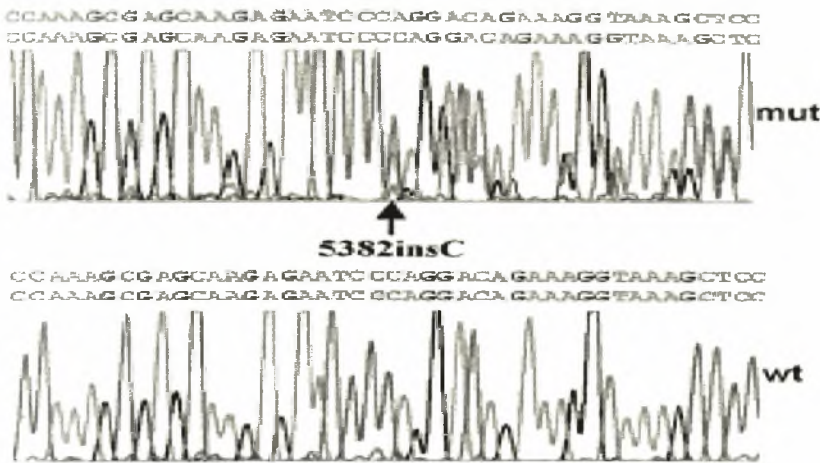
1.3.1.2 Η ΙΔΡΥΤΙΚΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ 5382insC.

Οι μεταλλάξεις 5382insC και 185delAG στο *BRCA1* έχουν επαναλαμβανόμενα παρατηρηθεί σε οικογένειες εβραίων με ιστορικό καρκίνου του μαστού στις Η.Π.Α. και το Ισραήλ οι οποίες μαζί με την επίσης ιδρυτική μετάλλαξη 6174 delT στο *BRCA2* συντελούν σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις οικογενούς καρκίνου του μαστού [23]. Η μετάλλαξη 5382insC είναι επίσης ιδρυτική και σε ασθενείς με ιστορικό καρκίνου του μαστού από την Πολωνία την Λετονία την Ουγγαρία τη Ρωσία και άλλες ευρωπαϊκές χώρες [23]. Όμως η διασπορά της παραπάνω μετάλλαξης φαίνεται να έχει μεγάλη έκταση. Συγκεκριμένα στη Ρωσία έχει βρεθεί σε ποσοστό 3,7% [23].

Η αρχική προέλευση της 5382insC είναι πιθανόν η περιοχή της Βαλτικής από όπου και εξαπλώθηκε αργότερα [30,31].

Η μετάλλαξη 5382insC είναι μια σημειακή μετάλλαξη κατά την οποία έχουμε εισαγωγή μιας βάσης (κυτοσίνης) στο πλαίσιο ανάγνωσης (εικόνα 14). Κάθε εισαγωγή ή απαλοιφή βάσεων μη πολλαπλάσιων του τρία έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της τριπλέτας νουκλεοτιδίων άρα και την διατάραξη του πλαισίου ανάγνωσης. Έτσι στη συγκεκριμένη μετάλλαξη με την εισαγωγή της κυτοσίνης έχουμε πρόωρο τερματισμό της πρωτεΐνης του *BRCA1* στο αμινοξύ

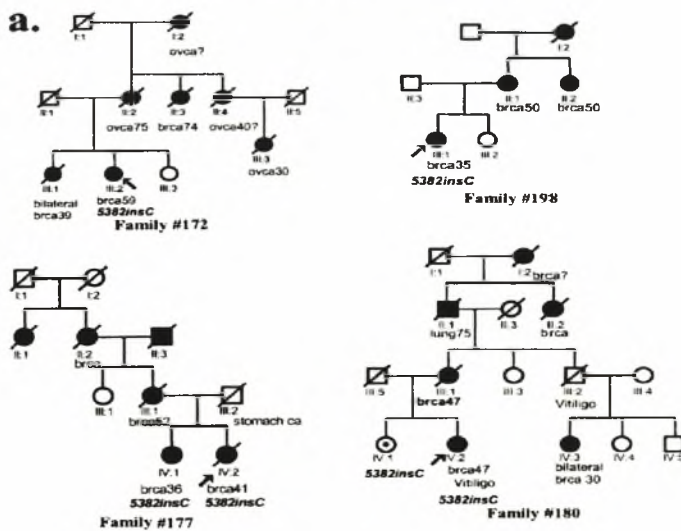
1829 αντί στο 1863 [31]. Ο πρόωρος αυτός τερματισμός έχει ως αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να μην είναι λειτουργική και επομένως για αυτό η μετάλλαξη 5382insC να θεωρείται παθογόνος.



Εικόνα 1.12 :Ανάλυση με αλληλούχηση DNA ασθενούς που φέρει την 5382insC. Κάτω παρατίθεται η ίδια εικόνα σε ασθενή που δε φέρει την 5382insC. Παρατηρείται στον ασθενή με την 5382insC η διπλή κορυφή και η μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης [31].

Στην Ελλάδα η 5382insC είναι η πιο συχνή μετάλλαξη που παρατηρείται σε ασθενείς με οικογενή καρκίνο μαστού και ωοθηκών με ποσοστό 45% (στο σύνολο των φορέων BRCA1) και εμφάνιση της ασθένειας σε μικρή ηλικία [31].

A. Laskopoulou et al. / Cancer Letters 185 (2002) 61-70



Εικόνα 1.13 : Δένδρο ελληνικών οικογενειών που φέρουν την μετάλλαξη 5382insC στο BRCA1 γονίδιο. Το BRCAxx δείχνει την ηλικία της διάγνωσης για τους καρκινοπαθείς ενώ το βέλος δείχνει τον ασθενή [31].

1.4 Τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων.

1.4.1 Τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων για μη γνωστές μεταλλάξεις.

Συνήθως οι μεταλλάξεις αυτές ανιχνεύονται με ενίσχυση (με χρήση PCR) του συνόλου της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του γονιδίου καθώς και των ορίων ιντρονίων εξωνίων. Στη συνέχεια τα διαφορετικά τμήματα αναλύονται με dHPLC ή ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA.

Άλλες μέθοδοι είναι:

A. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης μεγάλου μήκους (Long Range-PCR). Εξυπηρετούν για την ανίχνευση γενωμικών αναδιατάξεων οι οποίες μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμες με την Αλυσιδωτή Αντίδραση Μικρού μήκους (Short Range-PCR) [21].

B. Η παραγωγή cDNA και στη συνέχεια PCR. Με αυτό τον τρόπο ανιχνεύονται μεταλλάξεις που βρίσκονται σε ιντρόνια και έχουν σαν αποτέλεσμα το μη σωστό μάτισμα του mRNA του BRCA1.

Γ. Η MLPA, η οποία περιλαμβάνει φθορίζοντες ανιχνευτές για κάθε εξώνια ξεχωριστά για την ανίχνευση διπλασιασμών ή ελλείψεων [21]

Δ. Η τεχνική protein truncation test με την οποία εντοπίζονται μη λειτουργικές πρωτεΐνες οι οποίες έχουν υποστεί πρόωρο τερματισμό.

Όλα τα αποτελέσματα των παραπάνω τεχνικών επαληθεύονται με έλεγχο αλληλουχίας βάσεων (sequencing).

1.4.2 Τεχνικές ανίχνευσης μεταλλάξεων για γνωστές μεταλλάξεις.

Για μεταλλάξεις οι οποίες είναι γνωστές χρησιμοποιείται κυρίως Αλυσιδωτή Αντίδραση Μικρού μήκους (Short Range-PCR) και τα προϊόντα της παραπάνω αντίδρασης επαληθεύονται με έλεγχο αλληλουχίας βάσεων (sequencing) [21].

Έχουν όμως αναπτυχθεί και μία σειρά από άλλες τεχνικές χαμηλότερου κόστους και με μικρότερες απαιτήσεις εξειδικευμένου προσωπικού όπως η allele specific PCR, PCR-mediated site-directed mutagenesis, allele specific oligonucleotide hybridization οι οποίες είναι χρήσιμες για την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων [39].

1.4.3 MS-PCR (Mutagenically separated PCR).

Η MS-PCR είναι μια παραλλαγή της κλασσικής PCR. Οι διαφορές της έγκεινται στη χρησιμοποίηση τριών εκκινητών (primers). Υπάρχει ο κοινός αντίστροφος εκκινητής

(common reverse primer) και δυο πρόσθιοι, ένας συμπληρωματικός για το χωρίς μετάλλαξη αλληλόμορφο (wild-type primer) και ένας συμπληρωματικός για το με τη μετάλλαξη αλληλόμορφο (mutant-type primer). Οι δυο εκκινητές διαφέρουν ως προς το μήκος. Ο mutant-type primer έχει μήκος 44 νουκλεοτίδια ενώ ο wild-type primer έχει μήκος 21 νουκλεοτίδια. Έτσι ανάλογα με το αν υπάρχει μετάλλαξη ή όχι θα ποικίλλει και το μήκος του προϊόντος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) [39].

Έτσι με μια ηλεκτροφόρηση αγαρόζης του προϊόντος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) γίνεται εύκολη η διάγνωση φορέων για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη [39].

Η παραπάνω τεχνική είναι χρήσιμη για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων, από τις οποίες κάποιες είναι ιδρυτικές ώστε να γίνεται έγκαιρη διάγνωση σε ένα μεγάλο μέρος ατόμων με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού ή/ και ωοθηκών.

Επιπλέον με την παραπάνω τεχνική δεν είναι απαραίτητος ο έλεγχος αλληλουχίας βάσεων (sequencing) αφού η ύπαρξη της μετάλλαξης μπορεί να διαπιστωθεί με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης, γεγονός το οποίο είναι πολύ σημαντικό λόγω του μεγάλου κόστους του sequencing [23].

Έτσι σε πληθυσμούς με ιδρυτικές μεταλλάξεις η τεχνική αυτή μπορεί να είναι πολύ χρήσιμη λόγω της ανίχνευσης μεγάλου αριθμού ασθενών με την ίδια μετάλλαξη, της ευκολίας της και του χαμηλού της κόστους.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η ανίχνευση της μετάλλαξης 5382insC σε ασθενείς με βεβαρημένο καρκίνο μαστού ή ωοθηκών με την τεχνική MS-PCR. Συνοπτικά η διαδικασία αποτελείται από τα εξής στάδια:

- Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από το αίμα ασθενών.
- Ενίσχυση επιλεγμένων περιοχών με χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, έλεγχος και καθαρισμός του προϊόντος.
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την εύρεση αλληλουχίας του DNA καθαρισμός του προϊόντος και τοποθέτηση του δείγματος στον αυτόματο αναλυτή.
- Επεξεργασία των δεδομένων με υπολογιστικό πρόγραμμα και σύγκριση αλληλουχιών με διεθνείς βάσεις δεδομένων.

2.1 Ασθενείς.

Το γενετικό υλικό των ασθενών με σποραδικό καρκίνο του μαστού ή/και των ωοθηκών έχει απομονωθεί στο εργαστήριο Μοριακής Διαγνωστικής στα πλαίσια συνεργασίας με τον Καθηγητή Ογκολογίας του Αριστοτελείου Παν/μιου Θεσ/νίκης κο Γεώργιο Φούντζηλα και τα νοσοκομεία Παπαγεωργίου και ΑΧΕΠΑ.

Κάθε ασθενής που συμμετέχει στη μελέτη έχει υπογράψει έγγραφη συγκατάθεση για τη μελέτη αυτή.

2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA.

- Σουκρόζη, Fluka.
- MgCl₂, Fluka.
- Triton-X-100, Panreac.
- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), Riedel De Haen.

- Αιθανόλη, Riedel De Haen.
- Φυγόκεντρος, Universal 32R Hettich.
- Επωαστήρας, Biotline.
- Tris- HCl.
- SDS, Sigma.
- NaCl, Panreac.
- πρωτεΐνάση K.
- χλωροφόρμιο, Riedel De Haen
- ισοαμυλική αλκοόλη, Merck.

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης : 0.32M σουκρόζη, 10mM Tris-Hcl pH 7.5 , 5mM MgCl₂ , 1% Triton-X-100.

Διάλυμα SET : 10mM Tris-Hcl pH 7.5, 100mM NaCl, 1mM EDTA.

Τα λευκά αιμοσφαίρια απομονώθηκαν από το αίμα σύμφωνα με το Miller et al, (1988) [40].

1. Λαμβάνεται δείγμα ολικού αίματος 5-10 ml το οποίο είτε φυλάσσεται στους 4°C είτε χρησιμοποιείται απ'ευθείας .
2. Τα δείγματα αποψύχονται ή εάν κατεργασθούν αμέσως αφήνονται για μισή ώρα με το αντιπηκτικό σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα λύσης ώστε ο συνολικός όγκος να φτάσει τα 50 ml. Το δείγμα κατόπιν φυγοκεντρείται για 20 λεπτά σε 2500 στροφές ανά λεπτό (2500 rpm) σε θερμοκρασία 4 βαθμών κελσίου.
4. Το υπερκείμενο το οποίο περιλαμβάνει τα υπολείμματα των ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμοσφαιρίνη απορρίπτεται. Το ίζημα το οποίο περιέχει λευκά αιμοσφαίρια διαλύεται σε 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και το δείγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά σε 2500 στροφές ανά λεπτό (2500rpm).
5. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1ml SET, 50μl από 10% SDS και 100μl πρωτεΐνάσης K (10 mg/ml) και μετά επωάζεται στους 37 °C overnight. Απαιτείται σε κάποιες περιπτώσεις επιπλέον πρωτεΐνάση K για πλήρη αποικοδόμηση της πρωτεΐνης.
6. Το δείγμα ανακινείται σε θερμοκρασία δωματίου επαναδιαλυόμενο σε 300μl από 6M και 1,5ml δείγματος 24:1 χλωροφόρμιου/ισοαμυλικής αλκοόλης για 30 λεπτά, και φυγοκεντρείται για 30 λεπτά σε 3000 στροφές ανά λεπτό (3000rpm) , στους 4°C.
7. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε ένα νέο δοκιμαστικό σωλήνα Falcon. Το DNA καταβυθίζεται με προσθήκη αιθανόλης 100% (στους 3°C) και λαμβάνεται με πιπέτα

Pasteur, ενώ μεταφέρεται το DNA σε ένα eppendorf το οποίο περιέχει 200μl ρυθμιστικού διαλύματος TE.

8. Τελικά το DNA θερμαίνεται για 20 λεπτά στους 70°C και κατόπιν αποθηκεύεται στους 4°C.

2.3 Αλληλουχία εκκινητών για την Αλυσιδωτή Αντίδραση πολυμεράσης.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση μέρους του εξωνίου 20 του γονιδίου BRCA1 όπου βρίσκεται η 5382insC επιλέχθηκαν με βάση το άρθρο των Pak Cheung et al, 1999.

Η αλληλουχία των εκκινητών είναι η εξής:

Όνομασία: 5382insC common Reverse

Αλληλουχία: 5' -GAC GGG AAT CCA AAT TAC ACA G-3'

Μήκος : 22 νουκλεοτίδια.

Όνομασία: 5382insC w.t. Forward

Αλληλουχία: 5'-AAA GCG AGC AAG AGA ATC GCA-3'

Μήκος: 21 νουκλεοτίδια

Όνομασία: 5382insC mut Forward

Αλληλουχία: 5'-AAT CGA AGA AAC CAC CAA AGT CCT TAG CGA GCA AGA GAA TCA CC-3'

Μήκος: 44 νουκλεοτίδια.

Ο mutant primer είναι κατά 23 νουκλεοτίδια μεγαλύτερος και διαφέρει από τον wild-type primer στο 3' άκρο ως προς τη μετάλλαξη αλλά και σε άλλα επιπλέον σημεία. Οι διαφορές αυτές έχουν εισαχθεί για να ενισχύσουν ακόμα περισσότερο την εξειδίκευση των εκκινητών. Η διαφορά στο μήκος βοηθάει στην ταυτοποίηση της μετάλλαξης με ηλεκτροφόρηση.[39].

Table 1. Nucleotide sequences of the primer sets.

Primer	Primer sequence*	Size of amplicon
BRCA1 135delAG		
Common forward (P1)	5'- <u>ggttggcagcaat</u> atgtgaa	
Wild type reverse (P2)	5'-gttgacttaccagatggga <u>ctctc</u>	338 bp
Mutant reverse (P3)	5'- <u>cccaaat</u> taatacactctt <u>gttgg</u> gaacttaccagatggga <u>ctctc</u>	354 bp
BRCA1 5382insC		
Common reverse (P4)	5'-gacccggaatccaaattacacag	
Wild type forward (P5)	5'-aaagccgagcaagaagaatcgca	271 bp
Mutant forward (P6)	5'-aatcgagagaaccccaag <u>actctcttggc</u> gagcaagaatcagc	295 bp
BRCA2 6174delT		
Common reverse (P7)	5'-agctggctcgaalgttggtact	
Wild type forward (P8)	5'-gtgggatttttagcagcagctag	151 bp
Mutant forward (P9)	5'-cagctcactctgcaaatactcagggatttttagcagcagctag	171 bp

* Mismatched bases are underlined.

Εικόνα 2.1: Παραπάνω φαίνεται η αλληλουχία των εκκινητών για τη μετάλλαξη 5382insC για την MS-PCR. Φαίνεται η διαφορά του μήκους των δυο εκκινητών για των διαχωρισμό των παραγόμενων προϊόντων τους. Επίσης οι υπογραμμισμένες αλληλουχίες δείχνουν τις επιπλέον διαφορές των δυο εκκινητών οι οποίες προσδίδουν στους δυο εκκινητές μεγαλύτερη εξιδείκυση και ακρίβεια μετά τα πρώτα στάδια της αντίδρασης [39].

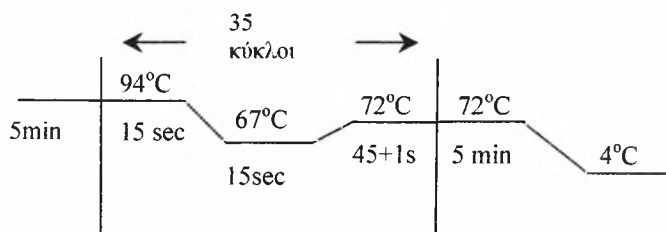
2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

- Ταq πολυμεράση, Hy Test, Lab Supplies.
- Δεοξυνουκλεοτίδια, Sigma.
- Χλωριούχο μαγνήσιο, Hy Test, Lab Supplies.
- 10X μίγμα αντίδρασης για PCR, Hy Test, Lab Supplies.
- Εκκινητές, Lab Supplies.
- Συσκευή για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, Gene Amp PCR system 2400, Applied Biosystems.

Ακολουθεί η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), η οποία περιλαμβάνει:

- ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA στους 94°C,
- αποδιάταξη στους 94°C
- υβριδισμό των εκκινητών με τις αποδιαταγμένες πλέον αλυσίδες του DNA στους 67°C.
- επιμήκυνση των εκκινητών με εκμαγείο το αρχικό DNA στους 72°C, και με τη χρονική διάρκεια του σταδίου να αυξάνει κατά 1 sec με την πάροδο κάθε κύκλου.
- ένα στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 5 λεπτά.
- ένα στάδιο ψύξης του δείγματος στους 4°C.

} 35 κύκλοι



Εικόνα 2.2 : Παρατίθενται σχηματικά τα στάδια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης σύμφωνα με το άρθρο [39] με μόνη διαφορά τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών με τις αποδιαταγμένες πλέον αλυσίδες του DNA.

Ποσοτικά το μείγμα της αντίδρασης περιέχει τα παρακάτω:

- 50 ng γονιδιωματικού DNA.
- 2,2 μl 10xPCR ρυθμιστικού διαλύματος.
- 1,43 μl MgCl₂ 50mM (τελική συγκέντρωση 3,25mM).
- 1,76 μl dNTPs 2,5 mM (τελική συγκέντρωση 0,2mM).
- 2,64 μl wild-type F εκκινητή 0,5pmol/μl (τελική συγκέντρωση 0,12μmol/L).
- 2,64 μl mutant F εκκινητή 0,5pmol/μl (τελική συγκέντρωση 0,12μmol/L).
- 2,64 μl common R εκκινητή 0,5pmol/μl (τελική συγκέντρωση 0,12μmol/L).
- 0.22 μl Taq πολυμεράσης 5U/μl (τελική συγκέντρωση 50 kU/L).
- 6,47 μl απεσταγμένο νερό έως τελικό όγκο 22 μl.

2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης.

- Trizma base, Sigma.
- Βορικό οξύ, Panreac.
- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), Riedel De Haen.
- 0.5xTBE: 0.045M Tris-borate, 0.001M EDTA.
- Loading buffer.
- Ζυγός, Denver Instrument Company.
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης, Biorad.
- Συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας, Biorad.
- Συσκευή για φωτογράφιση των πηκτών αгарόζης.
- Βρωμιούχο αιθίδιο, Sigma.

Η αρχή της ηλεκτροφόρησης στηρίζεται στη διαφορετική κινητικότητα μορίων DNA ανάλογα με το μέγεθός τους υπό την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος.

Χρησιμοποιείται 2,5% πηκτική αгарόζης , δηλαδή 1,75 gr αгарόζης σε 70 ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,5% TBE, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr).

5μl από το μείγμα της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης αναμιγνύονται με 1 μl loading buffer και τοποθετείται σε ειδικές θέσεις της πηκτής αгарόζης συγκέντρωσης 2,5%.

Έπειτα διαβιβάζεται στην πηκτή ρεύμα 100 Volt για 50 λεπτά με τον αρνητικό πόλο στην άνοδο και τον θετικό στην κάθοδο. Έτσι τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA κινούνται από την άνοδο προς την κάθοδο ανάλογα με το μέγεθός τους. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται ανάμεσα στη διπλή έλικα DNA και έτσι γίνονται διακριτά τα μόρια DNA λόγω της ικανότητας του βρωμιούχου αιθιδίου να φθορίζει κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία [41].

2.6 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου.

- Acrylamide 30% μείγματος ακρυλαμιδίου-μεθυλενοδιακρυλαμιδίου (29:1)
- Trizma base, Sigma.
- Βορικό οξύ, Panreac.
- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), Riedel De Haen.
- 5xTBE: 0.45M Tris-borate, 0.01M EDTA.
- 10% υπερθειικό αμμώνιο (APS).
- TEMED.
- Απεσταγμένο νερό.
- Loading buffer.
- Βρωμιούχο αιθίδιο, Sigma.

Η αρχή της ηλεκτροφόρησης της πηκτής ακρυλαμιδίου είναι η ίδια με αυτή της πηκτής αγαρόζης. Η διαφορά τους έγκειται στο ότι με την πηκτή ακρυλαμιδίου διαχωρίζονται μόρια DNA τα οποία διαφέρουν πάρα πολύ λίγο σε μέγεθος.

5μl από το μείγμα της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης αναμιγνύεται με 1 μl loading buffer και τοποθετείται στις θέσεις φόρτωσης της πηκτής ακρυλαμιδίου. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι όμοια με αυτή της πηκτής αγαρόζης με τη διαφορά ότι δεν προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο στο διάλυμα αλλά η πηκτή ακρυλαμιδίου μετά την ηλεκτροφόρησή της βυθίζεται σε ένα διάλυμα TBE 0,5x 100 ml-3μl EtBr.

2.7 Καθαρισμός των προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

- NucleoSpin Extract II Purification Kit.
- Φυγόκεντρος, Universal 32R Hettich

Ο καθαρισμός του προϊόντος γίνεται με το PCR Purification kit της εταιρείας Macherey-Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή [42].

2.7.1. Cycle Sequencing

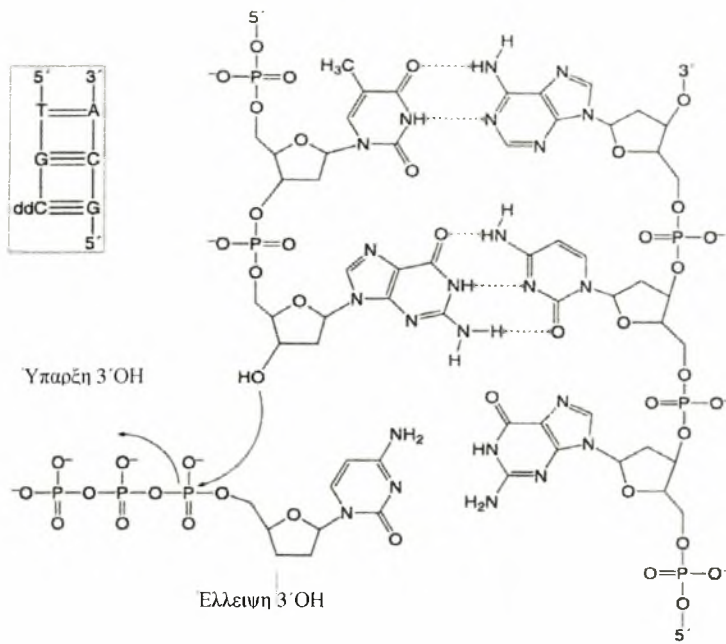
- Συσκευή για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, Takara PCR Thermal Cycler, Dice

Αφότου γίνει έλεγχος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης με πηκτική αгарόζης, ακολουθεί η αντίδραση Cycle Sequencing ώστε να γίνει ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στη μέθοδο Sanger [43,44], ενώ τα νουκλεοτίδια τα οποία χρησιμοποιούνται είναι φθορίζοντα αντί για ραδιενεργά που χρησιμοποιούνται στην κλασσική μέθοδο. Η αρχή της παραπάνω μεθόδου είναι παρόμοια με αυτή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Ο εκκινητής υβριδίζεται με τον ένα κλώνο του DNA χρησιμοποιώντας τον ως εκμαγείο με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης ενώ στον νεοσυντιθέμενο κλώνο δημιουργούνται μεταξύ των φθορίζόντων δεοξυριβονουκλεοτιδίων 3'-5' φωσφοδιεστερικοί δεσμοί με φορά κατεύθυνσης 5'-3'. Καθένα από τα τέσσερα διαφορετικά νουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται αποτελούνται από τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες (πίνακας).

<i>Νουκλεοτίδιο</i>	<i>Προσδεδεμένη Φθορίζουσα ουσία</i>
Αδενίνη	Διχλωρο[R6G]
Κυτοσίνη	Διχλωρο[ROX]
Γουανίνη	Διχλωρο[R110]
Θυμίνη	Διχλωρο[TAMRA]

Πίνακας 2.3 : Τα τέσσερα διαφορετικά νουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται και δίπλα η φθορίζουσα ουσία η οποία είναι προσδεδεμένη ξεχωριστά σε καθένα από αυτά.

Για τη δημιουργία ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού απαιτείται μια 5' φωσφοδιεστερική ομάδα και μια 3' υδροξυλομάδα. Με την εισαγωγή κάποιου διδεόξυνουκλεοτιδίου το οποίο στο 3' άκρο δεν έχει υδροξυλομάδα δεν είναι δυνατή η επιμήκυνση του νεοσυντιθέμενου κλώνου. Έτσι δημιουργούνται μόρια με διαφορά σε μήκος ακόμη και ενός νουκλεοτιδίου με το τελευταίο διδεόξυνουκλεοτίδιο να είναι φθορίζων άρα και δυνατό να αναγνωριστεί και με ίδιο 5' άκρο.



Εικόνα 2.4 : Αρχή της μεθόδου Sanger

Για την επαλήθευση αλληλουχίας DNA χρησιμοποιήθηκε προϊόν Αλυσιδωτής Αντιδρασης Πολυμεράσης του εξωνίου 20 στο οποίο βρίσκεται η μετάλλαξη 5382insC. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από τα εξής στάδια:

- ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA στους 94°C διάρκειας 5 λεπτών, 15 κύκλους που περιλαμβάνουν:
- αποδιάταξη στους 94°C για 30 sec,
- υβριδισμό των εκκινητών με τις αποδιαταγμένες πλέον αλυσίδες του DNA στους 66 °C για 45 sec με τη θερμοκρασία με την πάροδο του κάθε κύκλου να μειώνεται κατά 0,5 °C,
- επιμήκυνση των εκκινητών με εκμαγείο το αρχικό DNA στους 72 °C για ένα λεπτό.

Στη συνέχεια άλλους 20 κύκλους αντίδρασης με :

- αποδιάταξη στους 94°C για 30 sec,
- υβριδισμό των εκκινητών με τις αποδιαταγμένες πλέον αλυσίδες του DNA στους 59 °C για 30 sec,
- επιμήκυνση των εκκινητών με εκμαγείο το αρχικό DNA στους 72 °C για ένα λεπτό.
- ένα στάδιο επιμήκυνσης στους 72°C για 2 λεπτά
- ένα στάδιο ψύξης του δείγματος στους 4°C.

Από αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν :

- 200 ng του προϊόντος της PCR του εξωνίου 20,
- 1μl μείγματος αντίδρασης περιέχει dNTPs, ddNTPs, Taq πολυμεράση, Applied

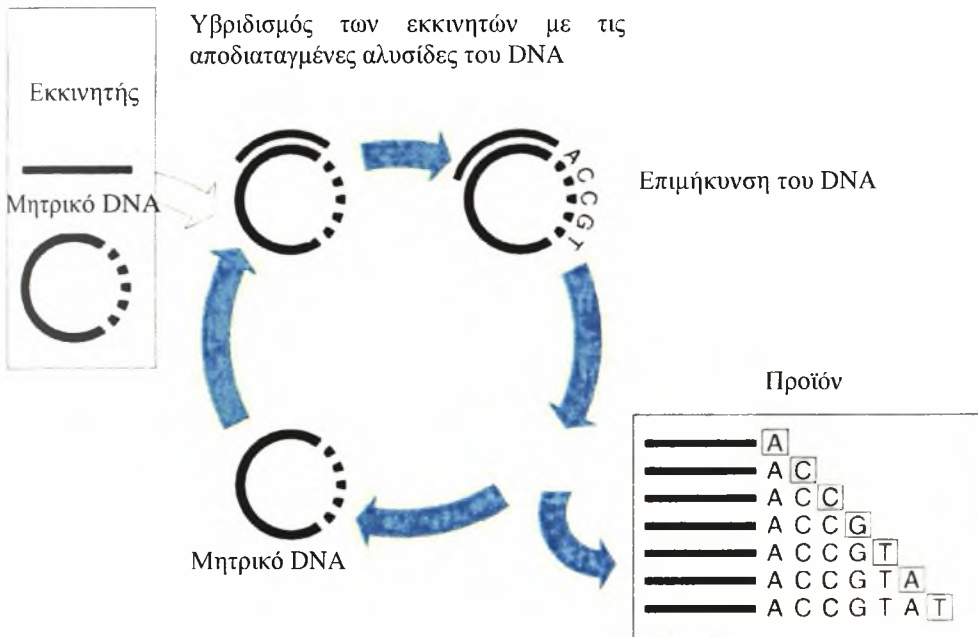
Biosystems

- 0,5 μl εκκινητή Forward του εξωνίου 20 συγκέντρωσης 0,1 mmol/L.
- 1,5 μl 5x ρυθμιστικού διαλύματος Sequencing, Applied Biosystems.
- νερό έως τα 10 μl.

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για το Cycle Sequencing είναι το εξής:

- ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA στους 96°C διάρκειας 2 λεπτών και 25 κύκλους αντίδρασης που περιλαμβάνουν:

- αποδιάταξη στους 96°C για 10 sec, υβριδισμό του πρόσθιου εκκινητή με τις αποδιαταγμένες πλέον αλυσίδες του DNA στους 50°C για 5 sec,
- επιμήκυνση του εκκινητή με εκμαγείο το αρχικό DNA στους 60°C για 4 λεπτά.



Εικόνα 2.5 : Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης cycle sequencing,

2.7.2 Καθαρισμός με στήλη σε G-50 και ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA .

Αντιδραστήρια:

- Αιθανόλη, Riedel de Haen.
- Sephadex G-50, Sigma.
- Trizma base, Sigma.
- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), Riedel de Haen.
- Φορμαμίδιο, Riedel de Haen.
- Συσκευή για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, Takara PCR Thermal Cycler,

Dice.

- Αυτόματος γενετικός αναλυτής, ABI PRISM 310 genetic analyzer, Applied Biosystems.

Πριν το δείγμα τοποθετηθεί στον αυτόματο αναλυτή για την ανάλυση της αλληλουχίας του DNA και μετά την αντίδραση Cycle Sequencing όπου έχει δημιουργηθεί μονόκλωνη αλυσίδα με φθορίζοντα νουκλεοτίδια πρέπει να γίνει καθαρισμός του προϊόντος από τα μη χρησιμοποιημένα συστατικά. Αυτό είναι εφικτό μέσω καθαρισμού με στήλη G σεφαρόζης.

Το πρωτόκολλο αυτό στηρίζεται στην τεχνική της μοριακής διήθησης, σύμφωνα με την οποία ο χρόνος έκλουσης ενός συστατικού που διαπερνά την στήλη εξαρτάται από το μέγεθός του.

Έτσι για παράδειγμα μη χρησιμοποιημένα διδεόξυνουκλεοτίδια έχουν μεγαλύτερο χρόνο έκλουσης από τα προϊόντα της αντίδρασης διότι επειδή είναι μικρά σε μέγεθος εγκλωβίζονται στις οπές του πορώδους υλικού που χρησιμοποιείται διανύοντας μεγαλύτερη απόσταση άρα και μεγαλύτερο χρόνο να εκλουστούν. Άρα πρώτα θα εκλουστούν τα προς αλληλούχιση προϊόντα.

Έτσι χρησιμοποιείται 1ml κορεσμένου διαλύματος Sephadex G-50 σε Tris-EDTA 10mM pH 8.0 το οποίο εισάγεται σε στήλη και κατόπιν φυγοκεντρείται στα 780 xg για 1 λεπτό. Στη στήλη σεφαρόζης που θα δημιουργηθεί επιβιβάζονται τα 10μl δείγματος από την αντίδραση του Cycle Sequencing. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 780xg για 2 λεπτά ώστε να εκλουστούν τα μόρια που είναι προς αλληλούχιση.

Κατόπιν τα μόρια που έχουν εκλουστεί συλλέγονται σε νέα σωληνάκια τύπου eppendorf και προστίθενται σε αυτά περίπου 2,5 όγκοι αιθανόλης, ενώ το δείγμα τοποθετείται στους -20 °C για μισή ώρα. Ύστερα ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12000xg για 15 λεπτά όπου και το DNA με τη βοήθεια της αιθανόλης κατακρημνίζεται σε ίζημα.

Έπειτα ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου ενώ το δείγμα ζεσταίνεται στους 96 °C στο μηχάνημα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για να στεγνώσει από πιθανά υπόλοιπα αιθανόλης.

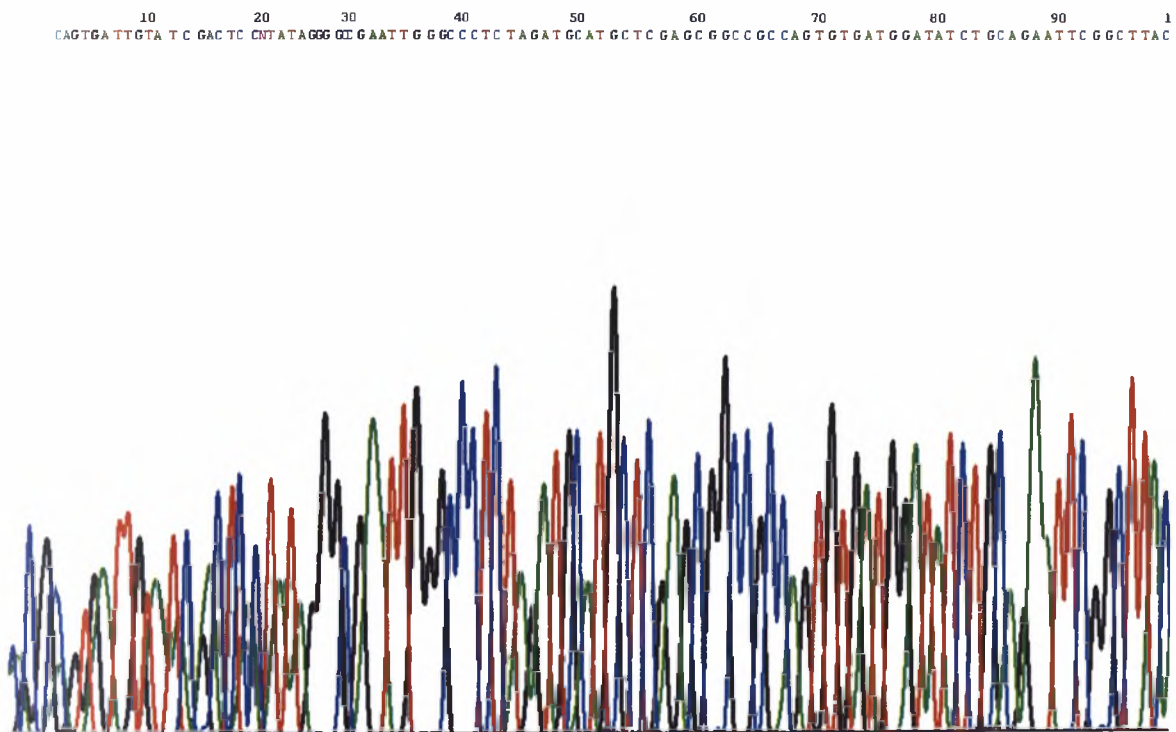
Ακολουθεί πρόσθεση στο δείγμα διαλύματος φορμαμίδιου 25μl, το οποίο βοηθά στην αποδιάταξη του DNA και κατόπιν επωάζεται στους 96 °C για 3 λεπτά. Αμέσως μετά τοποθετείται σε πάγο.

Κατόπιν το δείγμα τοποθετείται στην κατάλληλη υποδοχή του αυτόματου αναλυτή ανάγνωσης αλληλουχίας του DNA ABI Prism 310 της Applied Biosystems, ενώ η επεξεργασία του δείγματος γίνεται σύμφωνα με οδηγίες του κατασκευαστή [45].

Το δείγμα της αντίδρασης αφού τοποθετηθεί στον αυτόματο αναλυτή, ηλεκτροφορείται σε πηκτή ακρυλαμιδίου μέσα σε τριχοειδές. Έτσι είναι εφικτός ο διαχωρισμός μορίων με διαφορά ακόμα και ενός νουκλεοτιδίου

Τα μόρια κατά την έξοδο τους από το τριχοειδές διέρχονται από μια δέσμη λέιζερ , ώστε να διεγερθούν οι φθορίζουσες ουσίες, και το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού ανιχνεύεται από ειδική διάταξη (CCD camera). Παρακάτω παρατίθεται χαρακτηριστική εικόνα.

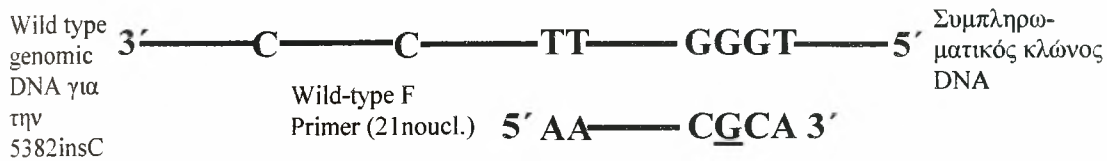
Εικόνα 2.6 : Σχήμα που προκύπτει μετά από ηλεκτροφόρηση του δείγματος στον αυτόματο αναλυτή ανάγνωσης της αλληλουχίας του DNA.



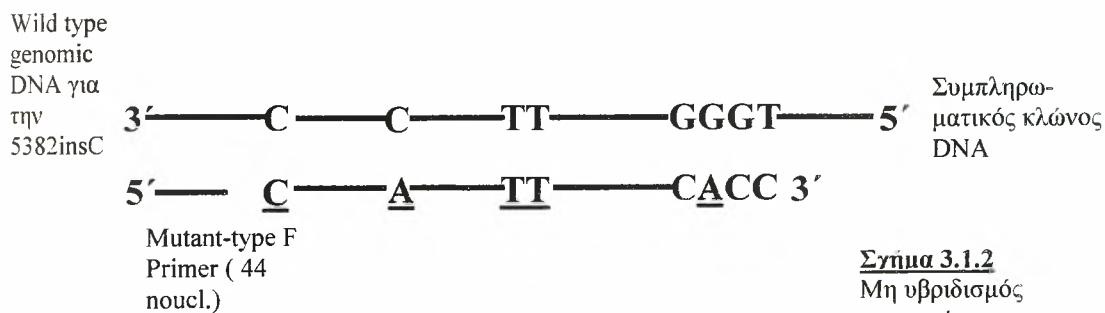
Κατόπιν συγκρίνονται τα αποτελέσματα αλληλούχισης με την αντίστοιχη της βάσης δεδομένων μέσω τοπικής ομοπαράθεσης , με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η σύγκριση των αποτελεσμάτων αλληλούχισης από τα προς εξέταση δείγματα συγκρίθηκαν με την αλληλουχία του cDNA του γονιδίου *BRCA1* που είναι καταχωρημένη με τον κωδικό U14680.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

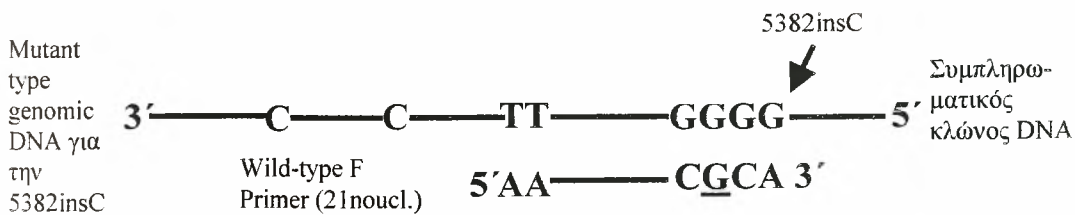
Η τεχνική της MS-PCR είναι μια παραλλαγή της κλασσικής PCR. Μια σημαντική διαφορά της είναι ότι οι συνολικοί εκκινητές που χρησιμοποιούνται σε αυτήν είναι τρεις αντί για δυο. Δηλαδή υπάρχουν δυο πρόσθιοι εκκινητές οι οποίοι διαφέρουν σε πέντε βάσεις όπως και σε μια βάση στο 3' τους άκρο ανάλογα με το αν θα υπάρχει η μετάλλαξη που είναι προς ανίχνευση ή όχι.



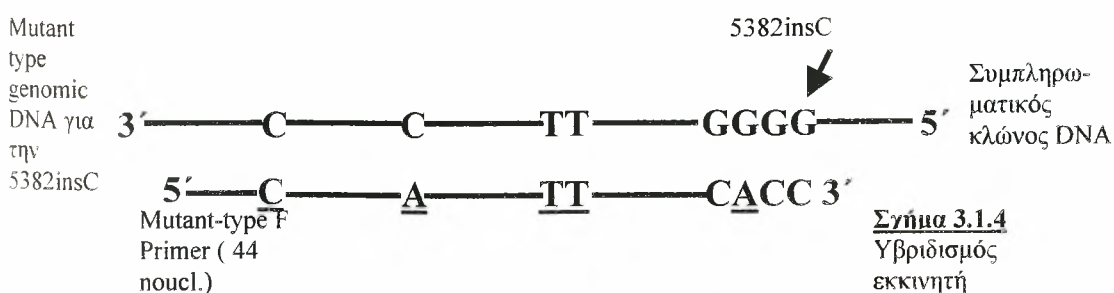
Σχήμα 3.1.1
Υβριδισμός
Εκκινητή



Σχήμα 3.1.2
Μη υβριδισμός
εκκινητή



Σχήμα 3.1.3
Μη Υβριδισμός
εκκινητή



Σχήμα 3.1.4
Υβριδισμός
εκκινητή

Εικόνα 3.1.1 : Ο wild- type primer προσδένεται στο γενωμικό DNA το οποίο δεν έχει τη μετάλλαξη 5382insC.

Εικόνα 3.1.2 : Ο mutant-type primer δεν μπορεί να προσδεθεί στο γενωμικό DNA το οποίο δεν έχει τη μετάλλαξη 5382insC, διότι το τελευταίο νουκλεοτίδιο στο 3' άκρο του primer είναι έτσι σχεδιασμένο ώστε να υβριδίζεται με το γενωμικό DNA το οποίο έχει τη μετάλλαξη (εισαγωγή μιας κυτοσίνης). Επιπλέον περιέχει άλλες τέσσερις διαφορές για να αυξηθεί η πιστότητα της συμπληρωματικότητας του mutant primer.

Εικόνα 3.1.3 : Ο wild-type primer δεν μπορεί να προσδεθεί στο γενωμικό DNA το οποίο έχει τη μετάλλαξη 5382insC, διότι το τελευταίο νουκλεοτίδιο στο 3' άκρο του primer είναι έτσι σχεδιασμένο ώστε να υβριδίζεται με το γενωμικό DNA το οποίο δεν περιέχει την 5382insC.

Εικόνα 3.1.4 : Ο mutant-type primer προσδένεται με το γενωμικό DNA το οποίο έχει τη μετάλλαξη 5382insC καθώς το 3' του mutant-type primer υβριδίζεται με το γενωμικό DNA. Οι άλλες διαφορές που υπάρχουν δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα τον υβριδισμό καθώς δεν είναι σχεδιασμένες να υπάρχουν στα άκρα του εκκινητή.

Από τη διαφορά του μεγέθους των δυο πρόσθιων εκκινητών γίνεται αντιληπτό ότι αν υπάρχει η προς ανίχνευση μετάλλαξη το προϊόν της αντίδρασης θα είναι κατά 20 νουκλεοτίδια μεγαλύτερο γιατί και ο συμπληρωματικός για τη μετάλλαξη εκκινητής (mutant F primer) είναι κατά 20 νουκλεοτίδια μεγαλύτερος. Έτσι αν κάποιος είναι ετεροζυγώτης για τη μετάλλαξη θα παράγονται δυο προϊόντα ένα (για τη μετάλλαξη) μεγέθους 295 βάσεων και ένα άλλο 271. Αντίθετα αν κάποιος δεν έχει τη μετάλλαξη θα παράγεται ένα προϊόν 271 βάσεων.

3.1 Προσδιορισμός συνθηκών για την MS-PCR.

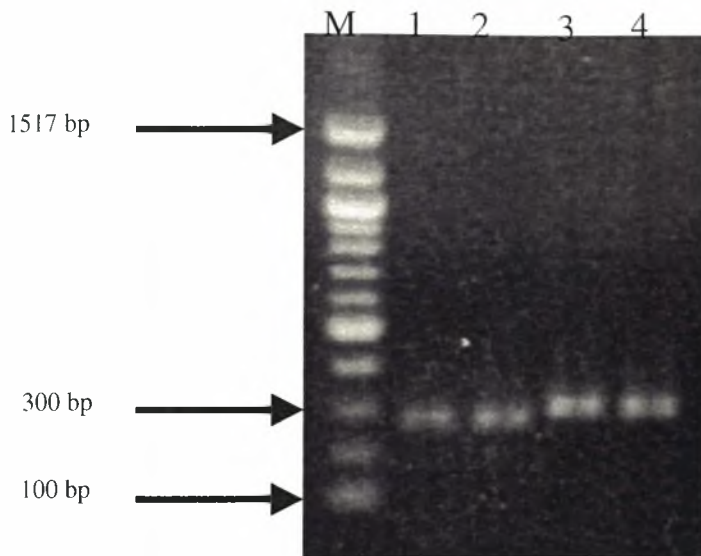
Λόγω των λεπτών διαφορών που υπάρχουν ανάμεσα στους δυο πρόσθιους primers για να γίνεται κάθε φορά υβριδισμός με τον σωστό primer θα έπρεπε να βρεθούν οι ακριβείς συνθήκες της αντίδρασης.

Με βάση το πρωτόκολλο από το άρθρο του Pak Cheung et al, 1999 [39] προσπάθησα να μεταβάλλω κάποιες παραμέτρους όπως τη θερμοκρασία υβριδισμού (annealing temperature), των αριθμό των κύκλων της αντίδρασης (x cycles) , τη συγκέντρωση μαγνησίου αλλά και τη συγκέντρωση των εκκινητών (primers). Για τον παραπάνω λόγο έγιναν αντιδράσεις στην αρχή με τους δυο forward primers ξεχωριστά, ενώ τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από πριν γνωστά για το αν είχαν τη μετάλλαξη 5382insC ή όχι (controls).

3.1.1 Θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες DNA.

Αρχικά έγινε αντίδραση με θερμοκρασία υβριδισμού 57 °C η οποία αναφέρεται στο άρθρο του Pak Cheung et al, 1999 [39].

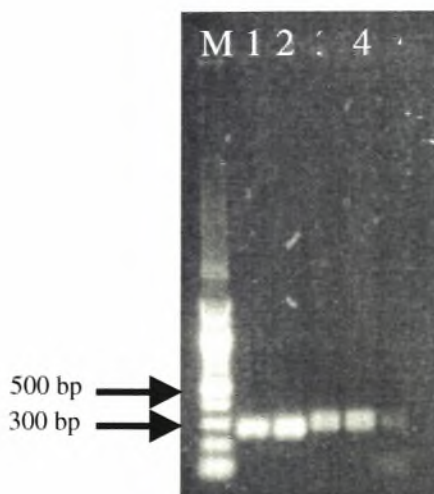
Στη συγκεκριμένη όμως θερμοκρασία δεν υπήρχε σωστός υβριδισμός των εκκινητών (εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2 : Τα δείγματα 1,2,3,4, έχουν παραχθεί κατόπιν αντίδρασης με θερμοκρασία υβριδισμού 57 °C.

Οι 1 και 2 είναι γνωστό ότι είναι ετεροζυγώτες για την 5382insC (positive control/ +ve control) ενώ οι 3 και 4 είναι γνωστό ότι δεν έχουν τη μετάλλαξη (negative control/ -ve control). Η αντίδραση για τους 1 και 2 γίνεται παρουσία wild type F primer και common Reverse primer και φυσιολογικά παράγεται προϊόν μεγέθους 271 βάσεων. Η αντίδραση για τους 3 και 4 γίνεται παρουσία mutant type F primer και common Reverse primer. Ενώ δε θα έπρεπε να είχαν παραχθεί προϊόντα λόγω του ότι και τα δυο αλληλόμορφα των 3 και 4 δεν έχουν μετάλλαξη 5382insC παράγονται προϊόντα με μέγεθος 295 βάσεων που σημαίνει ότι ο mutant F primer προσδένεται μη ειδικά. Επομένως η θερμοκρασία υβριδισμού δεν είναι η κατάλληλη διότι μπορεί να δώσει ψευδώς αρνητικούς ετεροζυγώτες. Πηκτή αгарόζης 1,5%. Με M συμβολίζεται ο Marker.

Κατόπιν έγινε αντίδραση με θερμοκρασία υβριδισμού 60 °C με τους primers να μην υβριδίζονται ειδικά (εικόνα 3.3).

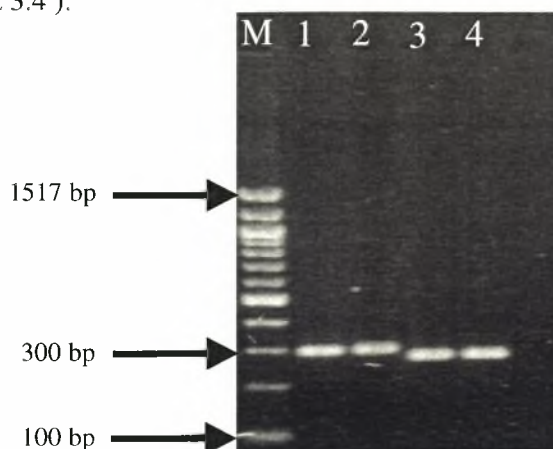


Εικόνα 3.3: Τα δείγματα 1,2,3,4, έχουν παραχθεί κατόπιν αντίδρασης με θερμοκρασία υβριδισμού 60 °C. Οι 1 και 2 είναι +ve control για την 5382insC ενώ οι 3 και 4 είναι -ve control. Η αντίδραση για

τους 1 και 2 γίνεται παρουσία wild type F primer και common Reverse primer και φυσιολογικά παράγεται προϊόν μεγέθους 271 βάσεων. Η αντίδραση για τους 3 και 4 γίνεται παρουσία mutant type F primer και common Reverse primer. Ενώ δε θα έπρεπε να είχαν παραχθεί προϊόντα λόγω του ότι και τα δυο αλληλόμορφα των 3 και 4 δεν έχουν μετάλλαξη 5382insC παράγονται προϊόντα με μέγεθος 295 βάσεων που σημαίνει ότι ο mutant type F primer προσδένεται μη ειδικά. Επομένως η θερμοκρασία υβριδισμού δεν είναι η κατάλληλη διότι μπορεί να δώσει ψευδώς αρνητικούς ετεροζυγώτες. Το 5 είναι negative control.

Πηκτή αгарόζης 1,5%. Με M συμβολίζεται ο Marker .

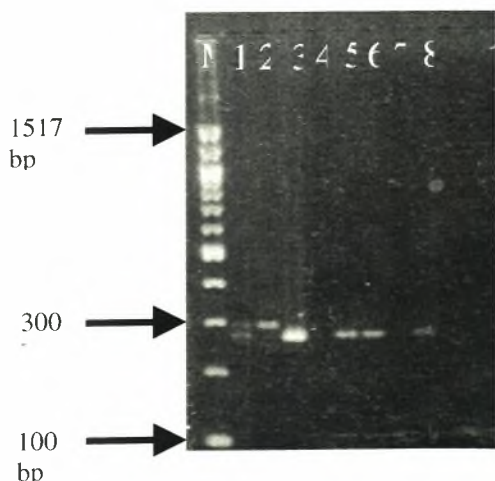
Στη συνέχεια έγινε αντίδραση με θερμοκρασία υβριδισμού 63 °C με τους primers να μην υβριδίζονται ειδικά (εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4: Τα δείγματα 1,2,3,4, έχουν παραχθεί κατόπιν αντίδρασης με θερμοκρασία υβριδισμού 63 °C. Οι 3 και 4 είναι γνωστό +ve control για την 5382insC ενώ οι 1 και 2 είναι -ve control . Η αντίδραση για τους 1 και 2 γίνεται παρουσία mutant type F primer και common Reverse primer. Ενώ δε θα έπρεπε να είχαν παραχθεί προϊόντα λόγω του ότι και τα δυο αλληλόμορφα των 1 και 2 δεν έχουν μετάλλαξη 5382insC παράγονται προϊόντα με μέγεθος 295 βάσεων που σημαίνει ότι ο mutant type F primer προσδένεται μη ειδικά. Επομένως η θερμοκρασία υβριδισμού δεν είναι η κατάλληλη διότι μπορεί να δώσει ψευδώς αρνητικούς ετεροζυγώτες . Η αντίδραση για τους 3 και 4 γίνεται παρουσία wild type F primer και common Reverse primer και φυσιολογικά παράγεται προϊόν μεγέθους 271 βάσεων. Πηκτή αгарόζης 1,5%. Με M συμβολίζεται ο Marker .

Επίσης έγιναν αντιδράσεις με θερμοκρασία υβριδισμού 65 °C και 66 °C με ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα με των παραπάνω θερμοκρασιών.

Τελικά έγινε αντίδραση με θερμοκρασία υβριδισμού 67 °C (εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5: Προϊόντα που έχουν παραχθεί ύστερα από αντίδραση με θερμοκρασία υβριδισμού 67 °C και διάφορους συνδυασμούς ασθενών και εκκινητών. Το δείγμα 1 είναι +ve control για τη μετάλλαξη 5382insC αντιδρώντας με wild-type Forward primer, mutant Forward primer και common Reverse primer. Ο ασθενής έχει ένα αλληλόμορφο φυσιολογικό στο οποίο θα υβριδιστεί ο wild-type Forward primer και ένα αλληλόμορφο με τη μετάλλαξη στο οποίο θα υβριδιστεί mutant Forward primer ο οποίος είναι κατά 20 νουκλεοτίδια μεγαλύτερος από τον wild-type Forward primer. Έτσι το αποτέλεσμα είναι δυο προϊόντα μήκους 271 και 295 βάσεων.

Το δείγμα δυο είναι +ve control για τη μετάλλαξη 5382insC αντιδρώντας με mutant Forward primer και common Reverse primer. Επομένως θα παραχθεί μόνο ένα προϊόν από το αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη μεγέθους 295 βάσεων.

Τα δείγματα 3,5,6,8, είναι Nve control για τη μετάλλαξη 5382insC αντιδρώντας με wild-type Forward primer και common Reverse primer. Επομένως θα παραχθεί προϊόν και από τα δυο αλληλόμορφα που δε φέρουν τη μετάλλαξη και τα δυο μεγέθους 271 βάσεων. Πηκτή αгарόζης 2,5% (η εύρεση της συγκέντρωσης της πηκτής αгарόζης για το διαχωρισμό των προϊόντων της αντίδρασης θα αναφερθεί σε επόμενη παράγραφο). Με M συμβολίζεται ο Marker.

Από την παραπάνω εικόνα γίνεται αντιληπτό ότι αντίδραση στη συγκεκριμένη θερμοκρασία υβριδισμού (67 °C) οι primers υβριδίζονται σωστά και τα αποτελέσματα της τεχνικής είναι τα αναμενόμενα.

Επομένως η κατάλληλη θερμοκρασία υβριδισμού είναι οι 67 °C.

3.1.2 Αριθμοί κύκλων - Συγκέντρωση Mg.

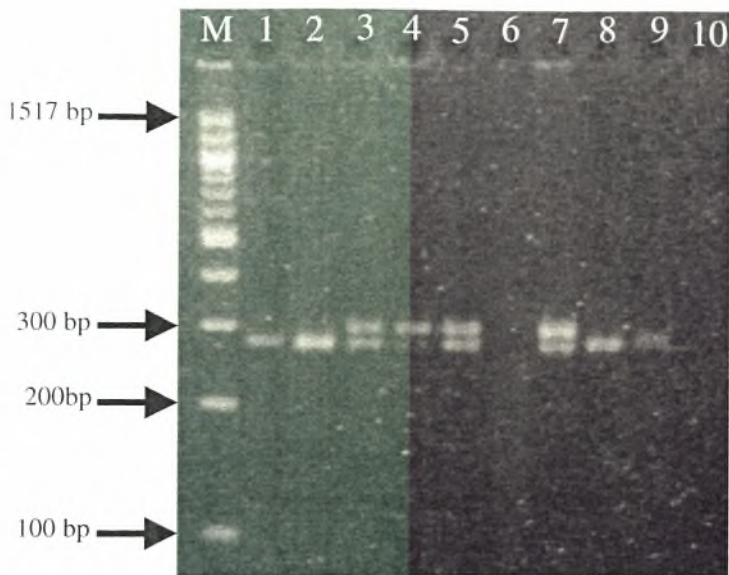
Οι αριθμοί κύκλων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 35, ίδιοι με αυτούς του άρθρου του Pak Cheung et al, 1999 [39]. Επίσης η συγκέντρωση του μαγνησίου ήταν 3,25 mmol/L ίδια με του παραπάνω άρθρου.

3.1.3 Συγκέντρωση εκκινητών (primers) .

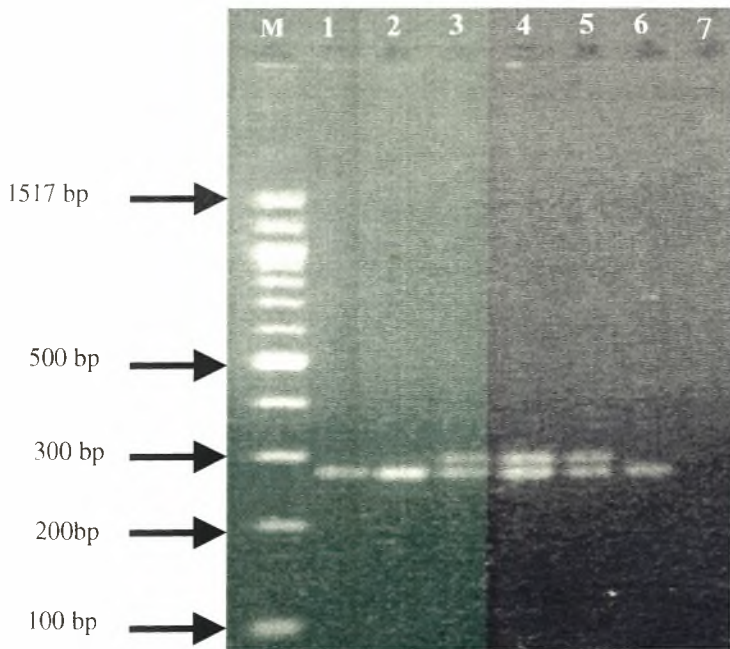
Σύμφωνα με το παραπάνω άρθρο η συγκέντρωση των primers που θα έπρεπε να χρησιμοποιηθεί είναι 0,12 mmol/L. Η συγκέντρωση αυτή χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση με θερμοκρασία υβριδισμού 63 °C, με τους primers να μην υβριδίζονται εξιδεικευμένα. Προκειμένου να είναι ακριβέστερος ο υβριδισμός των primers στα υπόλοιπα πειράματα η συγκέντρωση μειώθηκε σε 0,06 mmol/L.

3.2 Αποτελέσματα και με τους 2 πρόσθιους εκκινητές (primers) μαζί.

Αφού βελτιστοποιήσαμε τις συνθήκες της MS-PCR (T=67 °C, C_{primers}=0,06 mmol/L) με αντιδράσεις όπου οι δύο forward primers ήταν ξεχωριστά , βάλαμε τους δυο εκκινητές μαζί (εικόνα 3.5, 3.6).



Εικόνα 3.5 : Τα δείγματα 1,2,8,9 έχουν προκύψει από DNA ασθενών που είναι -ve control για την 5382insC, ενώ τα 3, 4 και 7 έχουν προκύψει από DNA ασθενών που +ve control για την 5382insC. Στην αντίδραση έχουν χρησιμοποιηθεί και οι δυο Forward primers. Πηκτή αγαρόζης 2,5%. Πολύ σημαντικές είναι οι διαφορές στην φωτεινότητα των προϊόντων των ετεροζυγωτών σε κάθε αντίδραση. Στο δείγμα 4 αλλά και 7 φαίνεται να παράγεται πολύ περισσότερο προϊόν για το με τη μετάλλαξη αλληλόμορφο ενώ λογικά θα αναμενόταν η ίδια παραγωγή άρα και φωτεινότητα των προϊόντων κάτι που δε συμβαίνει στην προκειμένη περίπτωση (preferential amplification). Το δείγμα 10 είναι negative control. Με M συμβολίζεται ο Marker.



Εικόνα 3.6 : . Οι 1,2,6, είναι -ve control για τη 5382insC ενώ οι 3,4,5 είναι +ve control. Έχουν χρησιμοποιηθεί μαζί και οι δυο Forward primers. Πηκτή αγαρόζης 2,5%. Στους ετεροζυγώτες παράγονται δυο προϊόντα 295 και 271 βάσεων αντίστοιχα τα οποία έχουν διαφορετικό μέγεθος λόγω του υβριδισμού του mutant primers (44 νουκλεοτίδια) στο αλληλόμορφο με τη μετάλλαξη 5382insC και του wild type primer (21 νουκλεοτίδια) άλλο αλληλόμορφο χωρίς τη μετάλλαξη. Στους χωρίς τη μετάλλαξη ασθενείς ο wild type primer (21 νουκλεοτίδια) έχει προσδεθεί και στα δυο αλληλόμορφα

αφού δεν υπάρχει η μετάλλαξη και παράγεται μόνο ένα προϊόν 271 βάσεων. Πηκτική αгарόζης 2,5%. Με M συμβολίζεται ο Marker.

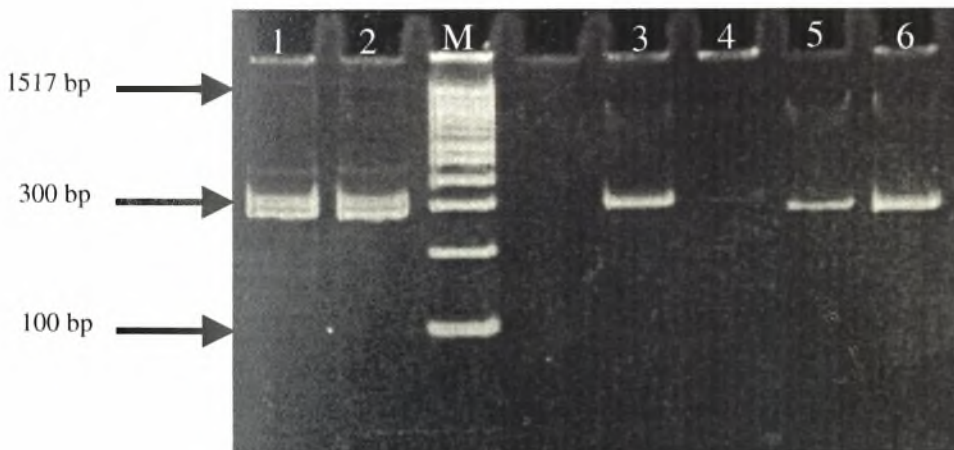
3.3 Συγκέντρωση πηκτικής Ακρυλαμιδίου – Αγαρόζης.

Όπως προαναφέρθηκε οι δυο Forward primers διαφέρουν σε μέγεθος μεταξύ τους ώστε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης να καθίσταται εμφανής η ύπαρξη της μετάλλαξης ή όχι. Επειδή ο mutant primer είναι 44 νουκλεοτίδια και ο wild type primer είναι 21, δηλαδή διαφορά 23 νουκλεοτιδίων είναι επόμενο ότι και τα προϊόντα τα οποία θα παραχθούν από τον κάθε primer θα διαφέρουν και αυτά 23 νουκλεοτίδια.

Επομένως για να διαχωριστούν πρέπει να βρεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση αгарόζης ή πολυακρυλαμιδίου.

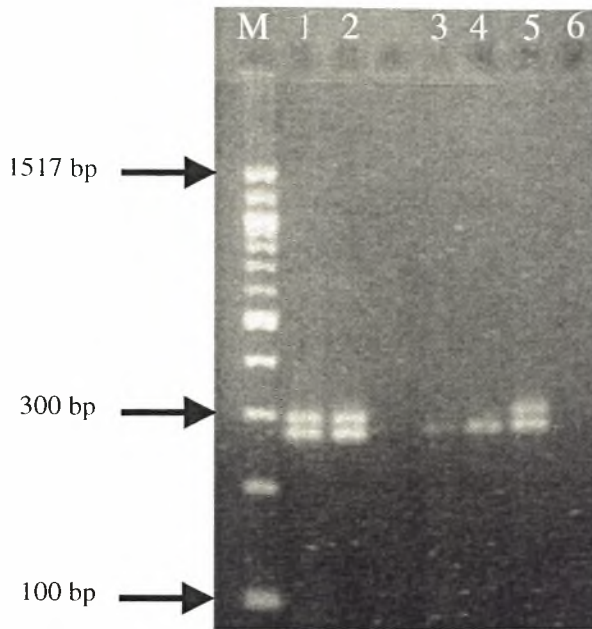
Όσον αφορά την πηκτική ακρυλαμιδίου δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις 7% (100 volt, 60 λεπτά), 17% (80volt, 180 λεπτά), 10% (300 volt, 45 λεπτά).

Τελικά σε συγκέντρωση 13,5% (50 volt, 270 λεπτά) ο διαχωρισμός των προϊόντων ήταν ξεκάθαρος όμως λόγω του ότι είναι αρκετά χρονοβόρο και έχει λίγες θέσεις για δείγματα δεν είναι κατάλληλο για μια τεχνική ρουτίνας όπως η MS-PCR.

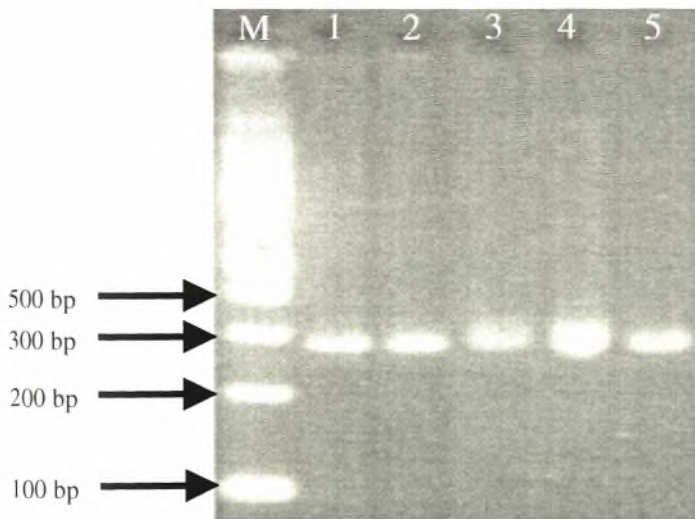


Εικόνα 3.7 : Πηκτική ακρυλαμιδίου όπου φαίνεται ο διαχωρισμός των προϊόντων της αντίδρασης MS-PCR τα οποία διαφέρουν σε μέγεθος 23 νουκλεοτίδια. Τα 1 και 2 δείγματα είναι +ve control για τη μετάλλαξη 5382insC ενώ χρησιμοποιούνται και οι δυο πρόσθιοι primers (mutant F και wild-type F). Τα 3 και 4 δείγματα είναι +ve control για τη μετάλλαξη 5382insC ενώ από τους πρόσθιους primers έχει χρησιμοποιηθεί μόνο ο mutant primer για αυτό και παράγεται ένα προϊόν 295 βάσεων. Τα δείγματα 5 και 6 είναι -ve control για τη μετάλλαξη 5382insC ενώ από τους πρόσθιους primers έχει χρησιμοποιηθεί μόνο ο wild-type primer για αυτό και παράγεται ένα προϊόν 271 βάσεων. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για τα παραπάνω δείγματα έχουν βρεθεί οι συνθήκες της MS-PCR και σκοπός του παραπάνω πειράματος είναι ο διαχωρισμός των δυο προϊόντων τα οποία διαφέρουν πολύ λίγο σε μέγεθος. Με M συμβολίζεται ο Marker.

Όσον αφορά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της MS-PCR σε πηκτική αгарόζης δοκιμάστηκαν πολλές συγκεντρώσεις αгарόζης όπως 0,6% (100 volt, 40 λεπτά), 1% (100 volt, 40 λεπτά), 1,5% (100 volt, 50 λεπτά, εικόνα 3.9), 2,5% (100 volt, 50 λεπτά, εικόνα 3.8) όπου και διαχωρίζονται τα προϊόντα.



Εικόνα 3.8 : Πηκτή συγκέντρωσης αγαρόζης 2,5 %. Τα δείγματα 1,2 και 5 είναι +ve control για τη μετάλλαξη 5382insC ενώ χρησιμοποιούνται και οι δυο forward primers (mutant F και wild-type F). Το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή δυο προϊόντων 295 και 271 βάσεων. Με την ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή αγαρόζης 2,5% γίνεται εμφανής ο διαχωρισμός των δυο παραπάνω προϊόντων. Τα δείγματα 3 και 4 είναι -ve control για τη μετάλλαξη 5382insC ενώ χρησιμοποιούνται και οι δυο forward primers (mutant F και wild-type F). Με M συμβολίζεται ο Marker.



Εικόνα 3.9 : Πηκτή συγκέντρωσης αγαρόζης 1,5%

Τα δείγματα 1,2 και 5 είναι -ve control για τη μετάλλαξη 5382insC ενώ χρησιμοποιούνται και οι δυο πρόσθιοι εκκινητές (mutant F και wild-type F). Το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή ενός προϊόντος 271 βάσεων. Τα δείγματα 3 και 4 5 είναι +ve control για τη μετάλλαξη 5382insC ενώ χρησιμοποιούνται και οι δυο πρόσθιοι εκκινητές (mutant F και wild-type F). Το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή δυο προϊόντων 295 και 271 βάσεων.

Στις θέσεις 3 και 4 τα προϊόντα θα πρέπει να είναι ξεκάθαρα διαχωρισμένα όπως στην παραπάνω εικόνα στις θέσεις 1,2 και 5. Με M συμβολίζεται ο Marker.

Επομένως για το διαχωρισμό των προϊόντων είναι καταλληλότερη η πηκτική αгарόζης 2,5% αφού η πηκτική ακρυλαμιδίου απαιτεί αρκετό χρόνο.

3.4 Negative control.

Στις αντιδράσεις της MS-PCR χρησιμοποιήθηκε negative control για την αξιοπιστία της αντίδρασης. Δηλαδή έγινε αντίδραση με όλα τα αντιδραστήρια εκτός από DNA. Έτσι κανονικά δεν θα πρέπει να παράγεται προϊόν αντίδρασης στο negative control. Εάν όμως κάποιο από τα αντιδραστήρια έχει επιμολυνθεί με DNA τότε θα υπάρχει προϊόν.

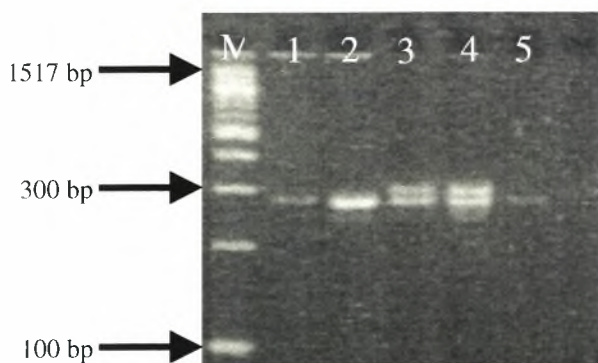
Στη συγκεκριμένη περίπτωση υπήρξε επιμόλυνση στα αντιδραστήρια με αποτέλεσμα να παράγεται ένα προϊόν μεγέθους 271 βάσεων. Το προϊόν αυτό παράγεται και σε δείγματα με γενετικό υλικό ασθενών που δε φέρουν την 5382insC και σε ετεροζυγώτες για την παραπάνω μετάλλαξη. Στους τελευταίους φυσιολογικά παράγονται δυο προϊόντα μεγέθους 271 και 295 βάσεων. Επομένως η επιμόλυνση αυτή δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα αφού το προϊόν των 295 βάσεων καθορίζει το αν υπάρχει η μετάλλαξη ή όχι και το προϊόν που έχει επιμολύνει τα αντιδραστήρια παράγεται σε οποιονδήποτε ασθενή ανεξαρτήτου μετάλλαξης.

Άλλωστε το προϊόν αυτό δεν εμφανίστηκε στο negative control σε όλες τις αντιδράσεις.

Η επιμόλυνση πιθανόν να δημιουργήθηκε λόγω της συνεχούς Αντίδρασης για το εξώνιο 20 στο εργαστήριο είτε από κάποιο λάθος χειρισμό.

3.5 Πιστοποίηση τεχνικής- reproducibility.

Αφότου διευκρινίστηκαν οι συνθήκες της MS-PCR με τους Forward εκκινητές αρχικά μαζί και στη συνέχεια ξεχωριστά, έγινε πιστοποίηση της τεχνικής. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν δυο ασθενείς που ήταν γνωστό ότι είχαν την 5382insC, και άλλοι δυο που ήταν πάλι γνωστό ότι δεν την είχαν. Χρησιμοποιήθηκαν και οι τρεις εκκινητές ταυτόχρονα.



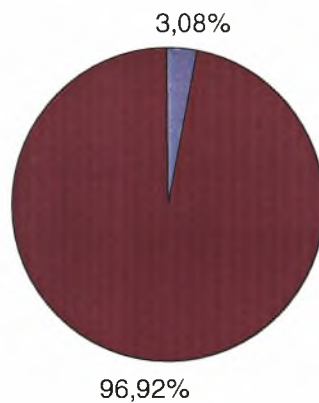
Εικόνα 3.10 : Τα δείγματα 1 και 2 είναι -ve control για την 5382insC ενώ τα 3 και 4 είναι +ve control για τη μετάλλαξη 5382insC. Χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα και οι δυο forward primers. Το 5 είναι negative control και παρατηρείται ένα αχνό προϊόν μεγέθους 271 βάσεων το οποίο όμως δεν επηρεάζει την αντίδραση αφού παράγεται ανεξάρτητα της μετάλλαξης σε όλα τα δείγματα.. Με M συμβολίζεται ο Marker.

Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε δέκα φορές. Τα αποτελέσματα και τις δέκα φορές ήταν τα αναμενόμενα. Η παραπάνω διαδικασία έγινε διότι θα έπρεπε να διασφαλιστεί όσο το δυνατόν περισσότερο η ακρίβεια και πιστότητα της τεχνικής ώστε να μπορεί να διευκρινιστεί αργότερα σε άγνωστα δείγματα το ποσοστό λάθους.

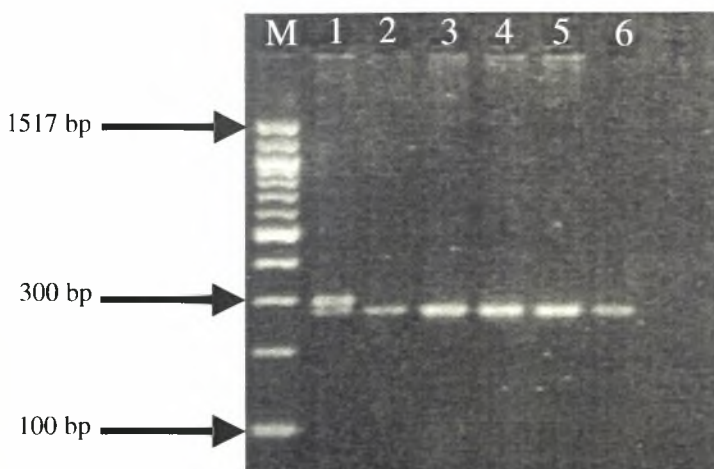
3.6 MS-PCR και στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων- επιβεβαίωση με Sequencing.

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η ανίχνευση ετεροζυγωτών για τη 5382insC σε ασθενείς με σποραδικό καρκίνο του μαστού ή/ και ωθηκών.

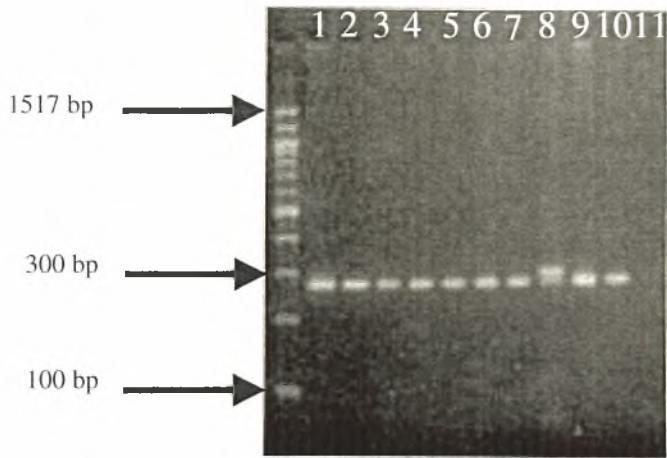
Σε 357 ασθενείς με σποραδικό καρκίνο μαστού και ωθηκών βρέθηκαν έντεκα ετεροζυγώτες για τη μετάλλαξη 5382insC στο γονίδιο BRCA1 χρησιμοποιώντας την MS-PCR.



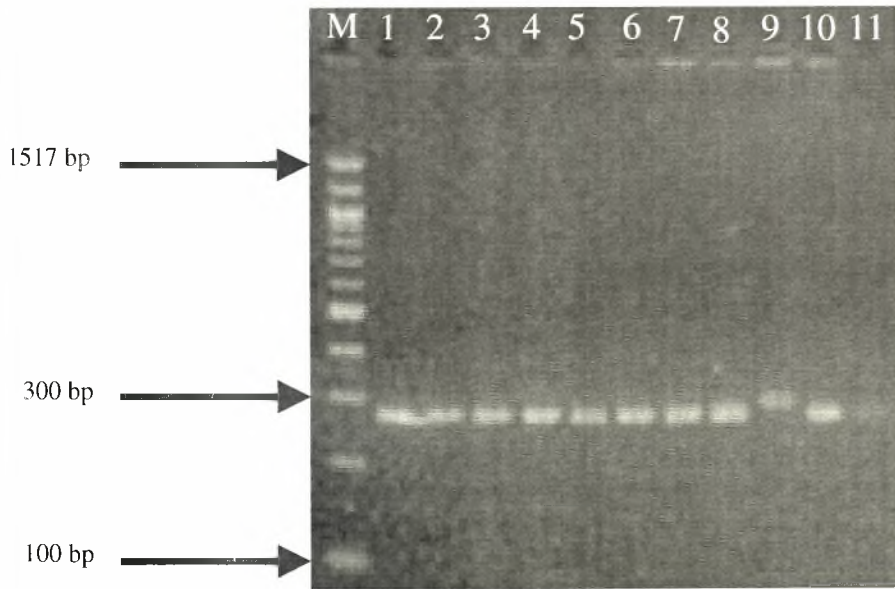
Εικόνα 3.11 : Στο παραπάνω σχήμα απεικονίζεται το ποσοστό των ετεροζυγωτών για τη μετάλλαξη 5382insC στο γονίδιο BRCA1 σε ασθενείς με σποραδικό καρκίνο μαστού και ωθηκών. Συγκεκριμένα το ποσοστό των ετεροζυγωτών ($11/357=3,08\%$) απεικονίζεται με γαλάζιο χρώμα ενώ το ποσοστό αυτών που δεν έχουν τη μετάλλαξη 5382insC στο γονίδιο BRCA1 ($346/357=96,92\%$) απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα.



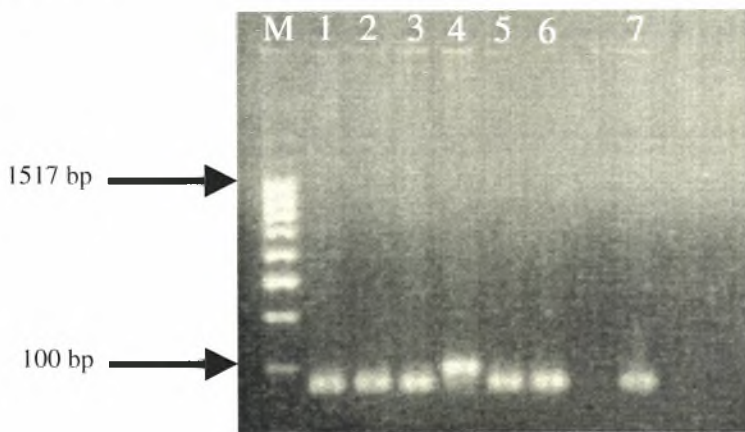
Εικόνα 3.12



Εικόνα 3.13



Εικόνα 3.14



Εικόνα 3.15

Εικόνες 3.12, 3.13, 3.14, 3.15 :

Οι παραπάνω εικόνες περιλαμβάνουν προϊόντα που έχουν παραχθεί με την τεχνική της MS-PCR σε δείγματα ασθενών με σποραδικό καρκίνο μαστού ή/και ωθηκών για την ανίχνευση της ιδρυτικής μετάλλαξης 5382insC. Παρόλο που οι ασθενείς έχουν σποραδικό καρκίνο μαστού και ωθηκών παρατηρείται ένα μεγάλο ποσοστό ετεροζυγτών για τη μετάλλαξη 5383insC.

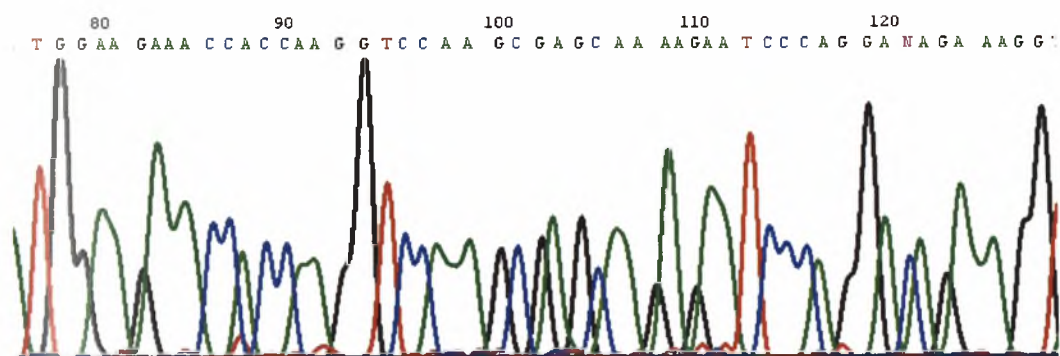
Αναλυτικότερα στην εικόνα 1 ο πρώτος ασθενής (1 θέση φόρτωσης) είναι ετεροζυγτής ενώ στην 6 θέση φόρτωσης όπου υπάρχει το negative control παρατηρείται ένα ασθενές προϊόν που πάντως δεν επηρεάζει τη διάγνωση αφού παράγεται σε ασθενείς που είτε έχουν ή όχι την μετάλλαξη.

Στην εικόνα 2 παρατηρείται ένας ετεροζυγτής (8 θέση φόρτωσης) ενώ φαίνεται να μην υπάρχει επιμόλυνση επειδή στο negative control δεν παρατηρείται κάποιο προϊόν.

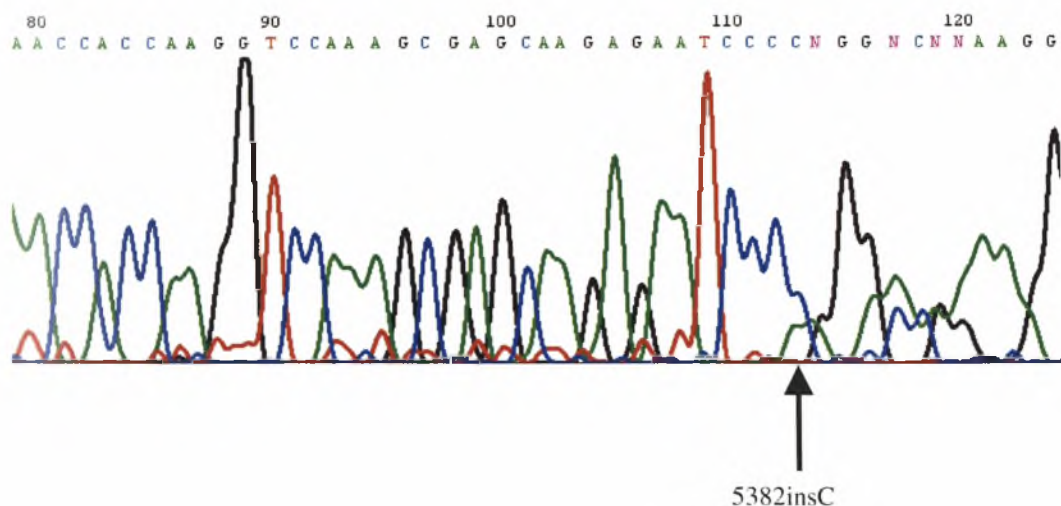
Στην εικόνα 3 παρατηρείται ένας ετεροζυγτής για τη μετάλλαξη 5382insC (9 θέση φόρτωσης). Στη 11 θέση φόρτωσης όπου υπάρχει το negative control παρατηρείται ένα ασθενές προϊόν.

Στην εικόνα 4 παρατηρείται ένας ετεροζυγτής για τη μετάλλαξη 5382insC (4 θέση φόρτωσης). Με M συμβολίζεται ο Marker.

Μετά την MS-PCR, τα έντεκα δείγματα με τα δυο προϊόντα και άλλα έντεκα τυχαία wild-type δείγματα ανιχνεύθηκαν με Sequencing. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα έντεκα πρώτα δείγματα ήταν όντως φορείς της μετάλλαξης ενώ τα υπόλοιπα έντεκα ήταν wild-type.



Εικόνα 3.16 : Επαλήθευση αποτελέσματος με ανάγνωση της αλληλουχίας DNA του σποραδικού δείγματος 83, το οποίο έχει βρεθεί wild-type για την 5382insC, με την MS-PCR.



Εικόνα 3.17 : Επαλήθευση αποτελέσματος με ανάγνωση της αλληλουχίας DNA του σποραδικού δείγματος 99, το οποίο έχει βρεθεί mutant-type για την 5382insC, με την MS-PCR.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Γενικά.

Όπως προαναφέρθηκε προηγουμένως άτομα με γεννητικές μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο BRCA1 έχουν σε όλη τους τη ζωή 80% πιθανότητες ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και 40-65% για καρκίνο των ωοθηκών. Τα παραπάνω άτομα έχουν συχνά ένα σημαντικό οικογενειακό ιστορικό με συγγενείς με καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών. Επομένως σύμφωνα με τα διεθνή δεδομένα η ανίχνευση τέτοιων μεταλλάξεων οδηγεί σε μία ολοκληρωμένη διαχείριση τόσο των ασθενών όσο και των συγγενών τους. Πιο συγκεκριμένα η θεραπευτική και η χειρουργική αγωγή των ασθενών εξαρτάται από το εάν είναι φορείς μεταλλάξεων ή όχι. Σχετικά με τους υγιείς συγγενείς τους η ανίχνευση των μεταλλάξεων αυτών συμβάλλει ουσιαστικά στην ανίχνευση του καρκίνου σε πρώιμα στάδια και κατά συνέπεια στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή του [21].

Για την ανίχνευση τέτοιων μεταλλάξεων σε κάθε άτομο ξεχωριστά απαιτείται πολύς χρόνος και μεγάλο κόστος καθώς λόγω του μεγάλου εύρους μεταλλάξεων στο BRCA1 συνήθως χρησιμοποιείται η μέθοδος ανάγνωσης αλληλουχίας DNA (Sequencing) η οποία όμως έχει υψηλό κόστος και δεν είναι προσιτή οικονομικά.

Σε ορισμένους πληθυσμούς ένας μικρός αριθμός μεταλλάξεων είναι υπεύθυνος για τη συντριπτική πλειοψηφία ασθενών με κληρονομικό καρκίνο, όπως στους εβραίους Ashkenazi (185delAG και 5382insC στο BRCA1 και 6174delT στο BRCA2) και στους Ρώσους για την 5382insC.

Στην Ελλάδα η 5382insC έχει βρεθεί σε ασθενείς με οικογενή καρκίνο μαστού και ωοθηκών σε ποσοστό 45% [31]. Εξαιτίας αυτού του μεγάλου ποσοστού έγινε προσπάθεια να βρεθεί η συχνότητα της 5382insC σε άτομα με σποραδικό καρκίνο μαστού ή/ και ωοθηκών.

4.2. Αποτελέσματα ασθενών.

Η MS-PCR χρησιμοποιήθηκε για να βρεθούν ετεροζυγώτες για την 5382insC , σε ασθενείς με σποραδικό καρκίνο μαστού και ωοθηκών δηλαδή άτομα που δεν είχαν οικογενειακό ιστορικό. Τελικά σε συνολικά 357 ασθενείς βρέθηκαν έντεκα ετεροζυγώτες οι οποίοι επιβεβαιώθηκαν με ανάγνωση αλληλουχίας DNA (Sequencing). Το ποσοστό της 5382insC το οποίο είναι περίπου 3% (11/357) είναι αρκετά υψηλό με δεδομένο ότι οι ασθενείς έχουν σποραδικό και όχι οικογενή καρκίνο μαστού των ωοθηκών. Το ποσοστό αυτό μπορεί να οφείλεται σε κάποιους από τους παρακάτω λόγους.

Σε ολιγομελείς οικογένειες είναι πιθανό λόγω πρόωρου θανάτου της φορέως από άλλο λόγο να μη γίνει αντιληπτή η ύπαρξη του ιστορικού τους. Ακόμα όταν η κληρονομηση των παθογόνων μεταλλάξεων γίνεται μέσω των ανδρών το ιστορικό συνήθως αποκρύβεται.

Επίσης στην Ελλάδα εδώ και λίγα χρόνια κρατείται ιατρικό ιστορικό για κάποια άτομα με καρκίνο μαστού ή/και ωοθηκών. Είναι λοιπόν πολύ πιθανό κάποια άτομα που είχαν αρκετούς συγγενείς με καρκίνο μαστού και ωοθηκών να θεωρούνται ως σποραδικοί επειδή δεν υπήρχε κάποιο αρχείο ασθενών στο παρελθόν.

Ακόμα η ασθενής η οποία θεωρείται ότι έχει σποραδικό καρκίνο μαστού ή ωοθηκών υπάρχει περίπτωση να είναι υιοθετημένη.

Όλοι οι παραπάνω λόγοι μπορεί να είναι υπεύθυνοι ξεχωριστά ή και να συνεπιδρούν ταυτόχρονα στο να θεωρούνται κάποιες οικογενείς περιπτώσεις καρκίνου μαστού ή ωοθηκών ως σποραδικές.

Η περίπτωση να έχει δημιουργηθεί η 5382insC de novo σε έντεκα διαφορετικά περιστατικά είναι κάτι εξαιρετικά σπάνιο έως αδύνατο.

Επίσης ένα παρόμοιο ποσοστό παρατηρείται σε έρευνα με σποραδικούς ασθενείς μαστού στη Ρωσία [23], γεγονός που δηλώνει την εκτεταμένη διασπορά της 5382insC και σε σποραδικούς ασθενείς.

4.3 Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα της MS-PCR- Προοπτική χρησιμοποίησής της ως τεχνική ρουτίνας.

Τα πλεονεκτήματα της MS-PCR είναι πολλά γι αυτό αποτελεί μια μελλοντικά υποσχόμενη μέθοδο. Το κυριότερο είναι οτι έχει χαμηλό κόστος, διότι για την διάγνωση ετεροζυγωτών για μεταλλάξεις στο BRCA1 δεν απαιτείται ανάγνωση της αλληλουχίας DNA (Sequencing). Η διάγνωση των ετεροζυγωτών είναι δυνατή μόνο με την MS-PCR. και μια ηλεκτροφόρηση αγαρόζης όπου οι ετεροζυγώτες παρουσιάζουν δυο προϊόντα ενώ αυτοί που δεν την έχουν ένα προϊόν αντίδρασης.

Επίσης η τεχνική αυτή είναι απλή και σύντομη.

Το κύριο μειονέκτημα της είναι οτι είναι πολύ ευαίσθητη και μπορεί να υπάρξει πολύ εύκολα επιμόλυνση, γι' αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιείται κάτω από πολύ αυστηρές και ελεγχόμενες συνθήκες .

Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά είναι απαραίτητα ώστε να αποτελέσει αυτή η τεχνική μια μέθοδο ρουτίνας για την ανίχνευση ιδρυτικών μεταλλάξεων, οι οποίες αφορούν ένα μεγάλο αριθμό ατόμων.

Η παρουσία της μετάλλαξης 5382insC σε ένα τόσο σημαντικό ποσοστό σε οικογενή αλλά και σε σποραδικά δείγματα καρκίνου του μαστού ή/και των ωοθηκών στοιχειοθετεί την αναγκαιότητα αυτή η εξέταση να γίνει σε όλα τα νέα περιστατικά καρκίνου του μαστού και

ιδιαίτερα σε εκείνα που υπάρχει εμφάνιση καρκίνου σε νέα ηλικία (κάτω των 50 ετών) ή εμφάνιση αμφοτερόπλευρου καρκίνου ή εμφάνιση καρκίνου μαστού και ωθηκών στην ίδια ασθενή.

5. Βιβλιογραφία.

- [1] Cancer Medicine, BC Decker Inc, 2000.
- [2] Βιολογία του Καρκίνου, Ε. Κιτράκη-Κ. Τρούγκος, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, 1999.
- [3] M.R. Alison The Cancer Handbook, Nature Publishing Group, 2002.
- [4] Άντζελα Λαδοπούλου, Διδακτορική Διατριβή : Ανάλυση των γονιδίων BRCA1 και BRCA2 σε ελληνικές οικογένειες με ιστορικό καρκίνου μαστού-ωοθηκών Συσχέτιση του ρόλου των μεταλλάξεων με τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης BRCA1, Αθήνα 2003.
- [5] Ashok R.Venkitaraman, Cancer Susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2, Cell (2002) Vol. 108:171-182.
- [6] K.W. Kinzler and B. Vogelstein Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers, Nature (1997) 386: 761,763.
- [7] E.R. Fearon Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer, Science (1997) 278: 1043-1050.
- [8] A.G. Knudson, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma, Proc Natl Acad Sci U S A (1971) 68: 820-823.
- [9] C.B. Knudson and B.P. Toole Changes in the pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm, Dev Biol (1985) 112: 308-318.
- [10] J.L. Kelsey and M.D. Gammon, The epidemiology of Breast Cancer, CA Cancer J Clin (1991) 41:146-165.
- [11] Katherine L. Nathanson, Richard Wooster and Barbara L. Weber, Breast Cancer Genetics; what we know and what we need, Nature (2001) Vol.7: 552-556.
- [12] M. Leppert, M. Dobbs, P. Scambler, P. O'Connell, Y. Nakamura, D. Stauffer, S. Woodward, R. Burt, J. Hughes, E. Gardner and et al. The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5, Science (1987) 238: 1411-1413.
- [13] K.W. Kinzler, M.C. Nilbert, L.K. Su, B. Vogelstein, T.M. Bryan, D.B. Levy, K.J. Smith, A.C. Preisinger, P. Hedge, D. McKechnie and et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21, Science (1991) 253: 661-665.

- [14] Mary-Claire King, Joan H. Marks, Jessica B. Mandell, Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2, *Science* (2003) Vol 302:643-646.
- [15] Razqallah Hakem, Jose Louis de la Pompa, Christian Sirard, Rong Mo, Minna Wo, Anne Hakem, Andrew Wakeham, Julia Potter, Armin Reitmair, Fillio Billia, Eduardo Firpo, Chi Chung Hui, Jim Roberts, Janet Rossant, Tak W. Mak The Tumor Suppressor Gene BRCA1 is Required for Embryonic Cellular Proliferation in the Mouse, *Cell*, (1996) Vol 85: 1009-1023.
- [16] Bettina Kuschel, Simon A. Gayther, Douglas F. Easton, Bruce A.G. Ponder, Paul D.P. Pharoah, Apparent Human BRCA1 Knockout Caused By Mispriming During Polymerase Chain Reaction: Implications For Genetic Testing, *GENES, CHROMOSOMES & CANCER* (2001) 31:96-98.
- [17] Thaddeus Judkins , Brant C. Hendrickson, Amie M. Deffenbaugh, Kristilyn Eliason, Benoit Leclair, Michael J. Norton, Brian E.Ward, Dmitri Pruss, Thomas Scholl, Application of Embryonic Lethal or Other Obvious Phenotypes to Characterize the Clinical Significance of Genetic Variants Found in Trans With Known Deleterious Mutations, *Cancer Res* (2005) 65:(21).
- [18] J.M. Gudas, T. Li, H. Nguyen, D. Jensen, F.J. Rauscher, 3rd and K.H. Cowan Cell cycle regulation of BRCA1 messenger RNA in human breast epithelial cells, *Cell Growth Differ* (1996) 7: 717-723.
- [19] S.C. Wang, S.H. Lin, L.K. Su and M.C. Hung Changes in BRCA2 expression during progression of the cell cycle, *Biochem Biophys Res Commun*(1997) 234 :247-251.
- [20] Ralph Scully & David M. Livingston, In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2, *Nature* (2000) 408: 429-432.
- [21] Tom Walsh, Silvia Casadei, Kathryn Hale Coats, Elizabeth Swisher, Sunday M. Stray, Jake Higgins, Kevin C. Roach, Jessica Mandell, Ming K. Lee, Sona Ciernikova, Lenka Foretova, Pavel Soucek, Mary-Claire King, Spectrum of Mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and p53 in Families at High Risk of Breast Cancer. *Jama* (2006) 295: 1379-1388.
- [22] Patricia De Los Rios, Elaine Jack, Graciela Kuperstein, Henry Lynch, Jan Lubinski, Steven A. Narod, Founder Mutations of BRCA1 and BRCA2 in North American Families of Polish Origin that Are Affected with Breast Cancer, *Am. J. Hum.Genet*, (2001) 68:546.

- [23] Anna P. Sokolenko, Natalia V. Mitiushkina, Konstantin G. Buslov, Elena M. Bit-Sava, Aglaya G. Iyeleva, Elena V. Chekmariova, Ekatherina Sh. Kyiligina, Yulia M. Ulibina, Maxim E. Rozanov, Evgeny N. Suspitsin, Dmitry E. Matshko, Oleg L. Chagunava, Dmitry Yu. Trofimov, Peter Devilee, Cees Cornelisse, Alexandr V. Togo, Vladimir F. Semiglazov, Eugeny N. Imyanitov. High Frequency of BRCA1 5382insC in Russian Breast Cancer patients. *Eur J Cancer*. (2006) Jul;42(10):1380-4
- [24] Steven A. Narod and William D. Foulkes, BRCA1 AND BRCA2: 1994 AND BEYOND, *Nature Reviews* (2004) Vol 4:665-676.
- [25] L.S. Friedman, C.I. Szabo, E.A. Ostermeyer, P. Dowd, L. Butler, T. Park, M.K. Lee, E.L. Goode, S.E. Rowell and M.C. King Novel inherited mutations and variable expressivity of BRCA1 alleles, including the founder mutation 185delAG in Ashkenazi Jewish families, *Am J Hum Genet*. (1995) 57: 1284-1297.
- [26] D.B. Berman, J. Costalas, D.C. Schultz, G. Grana, M. Daly and A.K. Godwin A common mutation in BRCA2 that predisposes to a variety of cancers is found in both Jewish Ashkenazi and non-Jewish individuals, *Cancer Res* (1996) 56: 3409-3414.
- [27] S. Thorlacius, S. Sigurdsson, H. Bjarnadottir, G. Olafsdottir, J.G. Jonasson, L. Tryggvadottir, H. Tulinius and J.E. Eyfjord Study of a single BRCA2 mutation with high carrier frequency in a small population, *Am J Hum Genet*. (1997) 60: 1079-1084.
- [28] B. Gorski, T. Byrski, T. Huzarski, A. Jakubowska, J. Menkiszak, J. Gronwald, A. Pluzanska, M. Bebenek, L. Fischer-Maliszewska, E. Grzybowska, S.A. Narod and J. Lubinski Founder mutations in the BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer, *Am J Hum Genet* (2000) 66: 1963-1968.
- [29] M.A. Caligo, C. Ghimenti, G. Cipollini, S. Ricci, I. Brunetti, V. Marchetti, R. Olsen, S. Neuhausen, D. Shattuck-Eidens, P.F. Conte, M.H. Skolnick and G. Bevilacqua BRCA1 germline mutational spectrum in Italian families from Tuscany: a high frequency of novel mutations, *Oncogene* (1996) 13: 1483-1488.
- [30] C.I. Szabo and M.C. King Population genetics of BRCA1 and BRCA2, *Am J Hum Genet*. (1997) 60: 1013-1020.
- [31] A. Ladopoulou, C. Kroupis, I. Konstantopoulou, L. Ioannidou-Mouzaka, A.C. Schofield, A. Pantazidis, S. Armaou, I. Tsiagas, E.Lianidou, E. Efstathiou, C. Tsionou, C. Panopoulos, M.Mihalatos, G. Nasioulas, D. Skarlos, N.E. Haites, G. Fountzilias, N. Pandis, D. Yannoukakos, Germline BRCA1 & BRCA2 mutations in

Greek breast/ovarian cancer families: 5382insC is the most frequent mutation observed. *Cancer Letters* (2002) 185 61-70.

- [32] Konstantopoulou I, Kroupis C, Ladopoulou A, Pantazidis A, Boumba D, Lianidou ES, Petersen MB, Florentin L, Chiotellis E, Nounesis G, Efstathiou E, Skarlos D, Tsiou C, Fountzilias G, Yannoukakos D. BRCA1 mutation analysis in breast/ovarian cancer families from Greece. *Human Mutation* (2000) 16(3): 272-273.
- [33] Armakolas A, Ladopoulou A, Konstantopoulou I, Gomatos IP, Kataki A, Konstadoulakis MM, Stathopoulos GP, Markopoulos C, Leandros E, Gogas I, Yannoukakos D, Androulakis G. The BRCA2 gene in Greek breast cancer patients. *Human Mutation* (2002) 19(1): 81-2.
- [34] Ladopoulou A, Konstantopoulou I, Armaou S, Efstathiou E, Mihalatos M, Nasioulas G, Bardi G, Pandis N, Yannoukakos D. A change in the last base of BRCA1 exon 23, 5586G>A, results in abnormal RNA splicing. *Cancer Genetics and Cytogenetics* (2002) 134: 175-177.
- [35] Kroupis C, Goutas N, Ladopoulou A, Konstantopoulou I, Pantazidis A, Efstathiou E, Vourlidis N, Yannoukakos D, Tsiou C, Lianidou E. Atypical Medullary Breast Carcinoma in a family carrying the 5382insC BRCA1 mutation. *The Breast Journal* (2003) 9(3):260-2.
- [36] Hughes DJ, Ginolhac SM, Coupier I, Corbex M, Bressac-de-Paillerets B, Chompret A, Bignon YJ, Uhrhammer N, Lasset C, Giraud S, Hardouin A, Berthet P, Peyrat JP, Fournier J, Nogues C, Lidereau R, Muller D, Fricker JP, Longy M, Toulas C, Guimbaud R, Maugard C, Olschwang S, Yannoukakos D, Durocher F, Moisan AM, Simard J, Mazoyer S, Lynch HT, Szabo C, Lenoir GM, Goldgar DE, Stoppa-Lyonnet D, Sinilnikova OM. Common BRCA2 variants and modification of breast and ovarian cancer risk in BRCA1 mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* (2005) Jan;14(1):265-7.
- [37] Chenevix-Trench G, Healey S, Lakhani S, Waring P, Cummings M, Brinkworth R, Deffenbaugh A.M, Burbidge L.A, Pruss5 D, Judkins T, Scholl T, Bekessy A, Marsh A, Lovelock P, Wong M, Tesoriero A, Southey M, Hopper J. L, Yannoukakos D, Brown M, kConFab Investigators, Easton D, Tavtigian S.V, Goldgar D, and Spurdle A.B. Genetic and histopathological evaluation of *BRCA1* and *BRCA2* DNA sequence variants of unknown clinical significance. *Cancer Res.* (2006) Feb 15;66(4):2019-27.

- [38] Armaou S, Konstantopoulou I, Anagnostopoulos T, Razi E, Boukovinas I, Xenidis N, Fountzilas G, King MC, Yannoukakos D. Novel Genomic Rearrangements in the BRCA1 Gene detected in Greek breast/ovarian cancer patients. *European J Cancer* (2006) in press.
- [39] Pak Cheung R. Chan, Betty Y.L. Wong, Hilmi Ozcelik, and David E.C. Cole, Simple and Rapid Detection of BRCA1 and BRCA2 Mutations by Multiplex Mutagenically Separated PCR., *Clin. Chem.* (1999) Vol. 45:1285-1287.
- [40] S.A. Miller, D.D. Dykes and H.F. Polesky. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* (1988) Vol. 16(3):1215.
- [41] F.E.F. Sambrook J., Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, New York, 1989.
- [42] Nucleospin Extract II, Macherey-Nagel-2004/Rev 01.
- [43] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=hmg.section.601> (Human Molecular Genetics 2 (2006)
- [44] F. Sanger, S. Nicklen and A.R. Coulson DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* (1977) 74: 5463-5467.
- [45] Automated DNA sequencing. Chemistry Guide, P.E. Applied Biosystems., USA.
- [46] Rohlf EM, Learning WG, Friedman KJ, Couch FJ, Weber BL, Silverman LM. Direct detection of mutations in the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 by PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Clin. Chem.* (1997) 43:24-9.