



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΤΟΥ
ΔΟΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA, ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟΧΩΝ, ΩΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΝΕΟΠΛΑΣΙΩΝ ΣΤΟΝ
ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΨΩΦΑΚΗ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΤΟΥ
ΔΟΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA, ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟΧΩΝ, ΩΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΝΕΟΠΛΑΣΙΩΝ ΣΤΟΝ
ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ**

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΨΩΦΑΚΗ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης της κ. Ψωφάκη Βασιλικής: 31-7-2002

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 484^α/15-10-2002

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Σεφεριάδης Κωνσταντίνος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

Μέλη

Γεωργίου Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής – Γυναικολογίας με ειδικές γνώσεις Κλινικής Γενετικής

Μπαϊρακτάρη Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 8-3-2006

«Εργαστηριακή διερεύνηση της αστάθειας του δορυφορικού DNA, της μεθυλίωσης και των γονιδίων στόχων, ως δείκτες νεοπλασιών στον καρκίνο του παχέος εντέρου»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 662^α/26-5-2009

1. Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής – Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Σεφεριάδης Κωνσταντίνος, τ. Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Στεφάνου Δημήτριος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Τσιάνος Επαμεινώνδας Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Μπαϊρακτάρη Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Μπριασούλης Ευάγγελος Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Φράγκου -Λαζαρίδη Μαρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 11-12-2009

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ



**Στην οικογένεια μου
Με άπειρη αγάπη και ευγνωμοσύνη**

“Κάθε πείραμα αποτελεί ένα μέσο για να αναγκάσουμε τη φύση να μιλήσει. Αν αυτό σχεδιαστεί σωστά τότε το μόνο πράγμα που έχει να κάνει ο ερευνητής είναι να ακούσει.”

George Wald

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων, ενώ το πειραματικό μέρος εκτελέστηκε στο Βιοχημικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Π.Γ.Ν.Ι) υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Κωνσταντίνου Σεφεριάδη, Ομότιμο Καθηγητή Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων. Χρηματοδοτήθηκε για δύο χρόνια (2003-2005) από πρόγραμμα του ΚΕΣΥ στο πεδίο Ογκολογίας (Αρ. ΔΥ2β/οικ. 128320/30-11-20050 απόφαση του Υπουργείου Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης με κωδικό αριθμ. πρωτ. 111Κ/56).

Για την ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής συνέβαλαν σημαντικά τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, οι Καθηγητές Κ. Σεφεριάδης και Ι. Γεωργίου και η Αναπλ. Καθηγήτρια Ε. Μπαϊρακτάρη, που όλα αυτά τα χρόνια ήταν πρόθυμοι να ακούσουν τους προβληματισμούς μου γύρω από τα θεωρητικά και τεχνικά θέματα που προέκυπταν και με τις εύστοχες παρατηρήσεις τους καθόρισαν και την τελική δομή της παρούσας διατριβής, τους οποίους ευχαριστώ θερμά.

Ξεχωριστά ευχαριστώ τον καθηγητή Κ. Σεφεριάδη, Καθηγητή μου από το πρώτο έτος των σπουδών μου στο Πρόγραμμα Σπουδών Επιλογής Βιοχημεία του Παν/μίου Ιωαννίνων και επιβλέπων στη διδακτορική μου διατριβή, που μου μετέδωσε με τόση θέρμη τις γνώσεις του στον τομέα της Βιοχημείας και της Κλινικής Χημείας και με επέλεξε για την επίτευξη του στόχου του, να αναπτυχθεί στο Βιοχημικό Εργαστήριο του Π.Γ.Ν. Ιωαννίνων ένας νέος τομέας, αυτός της Μοριακής Διαγνωστικής, με απώτερο στόχο τον εκσυγχρονισμό, του μέχρι σήμερα τομέα της Κλινικής Χημείας με νέες τεχνικές που θα αντιμετωπίζουν τον κάθε ασθενή ξεχωριστά και με βάση το γενετικό του προφίλ.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Δρ. Βιοχημικό Γεώργιο Κολιό, που μου έδωσε την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί του από τα πρώτα δειλά βήματα της ερευνητικής μου πορείας μέχρι και σήμερα, ενώ οι ιδέες και οι παρατηρήσεις του ήταν καθοριστικής σημασίας τόσο από την έναρξη και τον ορισμό του θέματος της διδακτορικής μου διατριβής, όσο και κατά την πορεία των πειραμάτων αλλά και την τελική διαμόρφωση και συγγραφή της. Η ευρεία γνώση του στα θέματα και τις τεχνικές στον τομέα της Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας, αλλά και η αποφασιστικότητα, η επιμονή καθώς και το αστείρευτο μεράκι για την έρευνα που τον διακατέχουν, μου έδωσαν σε όλη την μέχρι σήμερα ερευνητική μου πορεία την

πίστη ότι τα πάντα είναι εφικτά να γίνουν αρκεί να βαδίζουμε με γνώμονα την υπομονή και επιμονή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στην Δρ. Βιοχημικό Χρυσούλα Καλογερά που ήταν η πρώτη που με μύησε στις τεχνικές της Μοριακής Διαγνωστικής και η οποία τόσο με τις γνώσεις της στον τομέα της Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας, όσο και με την συνεχή αγάπη της για την έρευνα αλλά και το μεράκι για οτιδήποτε αναλαμβάνει, επέδρασε καθοριστικά στη βελτίωση του χαρακτήρα μου και στην αγάπη μου για την έρευνα στον τομέα της Μοριακής Διαγνωστικής, αλλά και στον κανόνα ζωής: τα πάντα πρέπει να τα αντιμετωπίζουμε με χαμόγελο και καλή διάθεση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που δέχτηκαν να συμμετάσχουν ως κριτές της παρούσας διατριβής, οι καιρίες παρατηρήσεις των οποίων ήταν καθοριστικές για την τελική διαμόρφωσή της.

Για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα εργασίας που μου προσέφεραν, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου προς όλα τα μέλη του Βιοχημικού Εργαστηρίου του Π.Γ.Ν.Ι. καθώς και την Δρ. Χριστίνα Κωσταρά για την συνεργασία της στα πρώτα μας κοινά βήματα ως υποψήφιοι Διδάκτορες του Εργαστηρίου Κλινικής Χημείας.

Την απέραντη αγάπη και ευγνωμοσύνη μου θα ήθελα να εκφράσω στους γονείς μου, οι οποίοι με παρότρυναν πάντα στο δρόμο της γνώσης και συνέβαλλαν με την αγάπη και την κατανόηση τους καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής, καθώς και την αδερφή μου που με την αγάπη και τη φλόγα για ζωή που την διακατέχουν, με αφήνει να βλέπω τον κόσμο με διαφορετική ματιά.

Τέλος το μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω στο Γιώργο, τον καλύτερό μου φίλο, συμπαραστάτη και φύλακα-άγγελό μου όλα αυτά τα χρόνια, του οποίου η διαρκής παρουσία, οι πολύωρες συζητήσεις και η αμείωτη συμπαράσταση ελάφρυναν κατά πολύ το φορτίο της ολοκλήρωσης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
2. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	2
2.1. Συχνότητα και παράγοντες επικινδυνότητας.....	2
2.2. Το μονοπάτι εξέλιξης του καρκίνου του παχέος εντέρου.....	5
2.3. Μορφές του καρκίνου του παχέος εντέρου.....	7
2.3.1. Ο σποραδικός καρκίνος του παχέος εντέρου.....	7
2.3.2. Ο οικογενής καρκίνος του παχέος εντέρου.....	8
2.3.2.1. Η οικογενής αδενωματούδης πολυποδίαση (σύνδρομο FAP).....	9
2.3.2.2. Ο κληρονομικός μη-πολυποδιακός καρκίνος του παχέος εντέρου (σύνδρομο HNPCC).....	9
3. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	12
3.1. Μικροδορυφορική Αστάθεια.....	13
3.1.1. Μικροδορυφορική αστάθεια και καρκίνος του παχέος εντέρου.....	16
3.2. Το σύστημα επιδιόρθωσης λανθασμένων ζευγών του DNA (Mismatch Repair System, MMR).....	20
3.2.1. Γενετικές τροποποιήσεις του συστήματος MMR στον καρκίνο του παχέος εντέρου.....	22
3.2.2. Επιγενετικές τροποποιήσεις του συστήματος MMR στον καρκίνο του παχέος εντέρου.....	25
3.3. Συνέπεια του συστήματος MMR και της μικροδορυφορικής αστάθειας: η λειτουργική αδρανοποίηση των γονιδίων στόχων.....	33
4. ΣΚΟΠΟΣ.....	41

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
5.1. Δείγματα – Ασθενείς.....	43
5.2. Απομόνωση DNA.....	44
5.2.1. Απομόνωση DNA από ολικό αίμα.....	44
5.2.2. Απομόνωση DNA από ιστό.....	46
5.2.3. Απομόνωση DNA από δείγματα ιστού εμβαπτισμένα σε παραφίνη.....	47
5.2.4. Ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	49
5.3. Ανάλυση της μικροδορυφορικής αστάθειας.....	51
5.3.1. Εφαρμογή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) με τους 5 δείκτες Bethesda.....	52
5.3.2. Ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης PCR στη συσκευή LI-COR DNA sequencer 4200.....	56
5.4. Έλεγχος της μεθυλίωσης.....	59
5.4.1. Επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (NaHSO ₃).....	60
5.4.1.1. Α' Μέθοδος επεξεργασίας του DNA με όξινο θειώδες νάτριο.....	61
5.4.1.2. Β' Μέθοδος επεξεργασίας του DNA (EZ methylation-Gold kit).....	63
5.4.2. Ειδική PCR για μεθυλίωση.....	64
5.4.3. Αλληλούχιση των προϊόντων της ειδικής PCR για μεθυλίωση στη συσκευή LI-COR DNA Sequencer 4200.....	67
5.4.3.1. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR από πήκτωμα αγαρόζης.....	67
5.4.3.2. Αλληλούχιση του DNA και ανάλυση στον αναλυτή LI-COR.....	69
5.5. Έλεγχος της αστάθειας στα γονίδια στόχους: TGFβRII, BAX, IGF1R, hMSH3, hMSH6, EGFR και c-MYB.....	72
5.5.1. Καθαρισμός ιχνηθετημένων προϊόντων PCR αλληλούχισης με καταβύθιση με αιθανόλη.....	75
5.6. Έλεγχος γενετικών μεταλλάξεων στα γονίδια hMLH1 και hMSH2.....	75
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	77
6.1. Κατάταξη των ασθενών.....	77
6.2. Έλεγχος της μικροδορυφορικής αστάθειας.....	79
6.3. Έλεγχος της μεθυλίωσης.....	89

6.4. Έλεγχος της αστάθειας των γονιδίων στόχων: TGFβRII, BAX, IGF1R, hMSH3, hMSH6, EGFR και c-MYB.....	97
6.4.1. Έλεγχος των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στα γονίδια EGFR και c-MYB.....	101
6.5. Έλεγχος γενετικών μεταλλάξεων στα γονίδια hMLH1 και hMSH2.....	111
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	113
7.1. Γενικά.....	113
7.2. Μικροδορυφορική αστάθεια.....	113
7.3. Μεθυλίωση στον υποκινητή των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT.....	117
7.4. Μικροδορυφορική αστάθεια και μεθυλίωση.....	122
7.5. Γονίδια στόχοι.....	125
7.6. Γενετικός έλεγχος των γονιδίων hMLH1 και hMSH2.....	132
8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	135
9. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ.....	137
10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	141

ΕΙΚΟΝΕΣ

<u>Εικόνα 1.</u> Τα τμήματα του παχέος εντέρου.....	3
<u>Εικόνα 2.</u> Μοντέλο “Vogelgram”	6
<u>Εικόνα 3.</u> Αναπαράσταση της αντιγραφής του DNA και του τρόπου επιδιόρθωσής του.....	15
<u>Εικόνα 4.</u> Αναπαράσταση της λειτουργίας των πρωτεϊνών MutS, MutL και MutH του συστήματος MMR της E. Coli.....	21
<u>Εικόνα 5.</u> Ο τρόπος δράσης των γονιδίων του συστήματος MMR στον άνθρωπο.....	22
<u>Εικόνα 6.</u> Σχηματική αναπαράσταση των επιγενετικών τροποποιήσεων.....	26
<u>Εικόνα 7.</u> Μηχανισμός αποσιώπησης της έκφρασης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων μέσω μεθυλίωσης στον υποκινητή τους στα καρκινικά κύτταρα.....	27
<u>Εικόνα 8.</u> Η εξέλιξη της αστάθειας κατά την πρόοδο της MSI-H καρκινογένεσης.....	37
<u>Εικόνα 9.</u> Σχηματική απεικόνιση της μικροδορυφορικής αστάθειας, όπως φαίνεται μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα ουρίας -ακρυλαμίδιου.....	58
<u>Εικόνα 10.</u> Χημική μετατροπή της κυτοσίνης σε ουρακίλη με όξινο θειώδες νάτριο (NaHSO ₃).....	59
<u>Εικόνα 11.</u> Ενδοσκοπική εμφάνιση του παχέος εντέρου σε τρεις διαφορετικές περιπτώσεις.....	77
<u>Εικόνα 12.</u> Ανάλυση της μικροδορυφορικής αστάθειας με τους πέντε δείκτες Bethesda.....	80
<u>Εικόνα 13.</u> Ανάλυση της μικροδορυφορικής αστάθειας με τον δείκτη BAT26.....	81
<u>Εικόνα 14.</u> Η μικροδορυφορική αστάθεια στους πέντε δείκτες Bethesda.....	82
<u>Εικόνα 15.</u> Ανάλυση των προϊόντων της ειδικής για μεθυλίωση PCR στα γονίδια hMLH1, P16 και MGMT.....	90
<u>Εικόνα 16.</u> Η μεθυλίωση στους υποκινητές των 3 γονιδίων και ο φαινότυπος MSI για τις τέσσερις ομάδες ασθενών.....	94
<u>Εικόνα 17.</u> Αλληλούχιση των προϊόντων της ειδικής για μεθυλίωση PCR του υποκινητή του γονιδίου hMLH1.....	95
<u>Εικόνα 18.</u> Έλεγχος της αστάθειας στα γονίδια στόχους.....	97

<u>Εικόνα 19.</u> Επιβεβαίωση της αστάθειας στα γονίδια στόχους.....	98
<u>Εικόνα 20.</u> Ανάλυση της αστάθειας του γονιδίου EGFR.....	102
<u>Εικόνα 21.</u> Αλληλούχιση της περιοχής πολυ(CA) του γονιδίου EGFR.....	103
<u>Εικόνα 22.</u> Ανάλυση της αστάθειας και των επαναλήψεων του γονιδίου EGFR στον ασθενή P28.....	104
<u>Εικόνα 23.</u> Ανάλυση της αστάθειας του γονιδίου c-MYB.....	105
<u>Εικόνα 24.</u> Ανάλυση της αστάθειας και των επαναλήψεων του γονιδίου c-MYB στους ασθενείς P11 και P28.....	106
<u>Εικόνα 25.</u> Συχνότητα εμφάνισης των πολυ(CA) επαναλήψεων του γονιδίου EGFR στις 4 ομάδες ασθενών.....	107
<u>Εικόνα 26.</u> Συχνότητα εμφάνισης των πολυ(T) επαναλήψεων του γονιδίου c-MYB στις 4 ομάδες ασθενών.....	108
<u>Εικόνα 27.</u> Κατανομή των πολυ(CA) επαναλήψεων του γονιδίου EGFR σε σχέση με τη μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT.....	109
<u>Εικόνα 28.</u> Κατανομή των πολυ(T) επαναλήψεων του γονιδίου c-MYB σε σχέση με τη μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT.....	110

ΠΙΝΑΚΕΣ

<u>Πίνακας 1.</u> Κλινικά κριτήρια για τον καθορισμό των οικογενειών με το σύνδρομο HNPCC.....	11
<u>Πίνακας 2.</u> Επιλεγμένα γονίδια που επηρεάζονται από την μεθυλίωση στον υποκινητή τους.....	29
<u>Πίνακας 3.</u> Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων της PCR για κάθε δείκτη Bethesda.....	54
<u>Πίνακας 4.</u> Γενετικός τύπος, πριμοδοτικές αλληλουχίες, συνθήκες της PCR και μέγεθος του τελικού προϊόντος της PCR για τους 5 δείκτες Bethesda.....	55
<u>Πίνακας 5.</u> Ποσότητες των αντιδραστηρίων για τον έλεγχο των μεθυλιωμένων (M) και μη-μεθυλιωμένων (U) προϊόντων.....	65
<u>Πίνακας 6.</u> Πριμοδοτικές αλληλουχίες, θερμοκρασία υβριδοποίησης και μέγεθος του τελικού προϊόντος της PCR για τον έλεγχο της μεθυλίωσης.....	66
<u>Πίνακας 7.</u> Γονίδια στόχοι που μελετήθηκαν, πριμοδοτικές αλληλουχίες και συνθήκες για την PCR.....	73

<u>Πίνακας 8.</u> Δημογραφικά και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.....	78
<u>Πίνακας 9.</u> Κλινικο-εργαστηριακά χαρακτηριστικά ασθενών που εμφανίζουν τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας.....	85
<u>Πίνακας 10.</u> Αποτελέσματα ελέγχου της μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT για τις τέσσερις ομάδες ασθενών.....	92
<u>Πίνακας 11.</u> Έλεγχος αστάθειας και μεθυλίωσης των ασθενών με τον φαινότυπο MSI-H και MSI-L.....	100

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

A: Αδενίνη (Adenine)

ACF: αλλοιώσεις των εντερικών κρυπτών (**aberrant crypt foci**)

APC: γονίδιο του αδενωματώδους πολυποδάτου εντέρου (**adenomatous polyposis coli**)

APS: υπερθειϊκό αμμώνιο (**ammonium persulfate**)

ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη (**adenosine triphosphate**)

BAX: μέλος της οικογένειας των BCL2 πρωτεϊνών που συνδέεται με το X χρωμόσωμα (**BCL2-associated X protein**)

BCL2: οικογένεια πρωτεϊνών B-κυττάρων λευχαιμίας/λεμφώματος 2 (**B-cell CLL/Lymphoma 2**)

C: Κυτοσίνη (Cytosine)

CA-SSR I: απλές επαναλαμβανόμενες CA αλληλουχίες στο ιντρόνιο 1 (**CA-simple sequence repeats in intron 1**)

CIM: μεθυλίωση στις CpG νησίδες (**CpG islands methylation**)

CIMP: φαινότυπος που συνδέεται με τη μεθυλίωση στις CpG νησίδες (**CpG islands methylation phenotype**)

CIN: χρωμοσωμική αστάθεια (**chromosomal instability**)

c-MYB: ομόλογο ογκογονίδιο του ιογενούς μυελοβλαστώματος (**myeloblastosis viral oncogene homolog**)

CpA: κυτοσίνη με φωσφορική ομάδα δίπλα από αδενίνη (**-C-phosphate-A-**)

CpG islands: νησίδες με πλήθος CpG

CpG: κυτοσίνη με φωσφορική ομάδα δίπλα από γουανίνη (**-C-phosphate-G-**)

CpT: κυτοσίνη με φωσφορική ομάδα δίπλα από θυμίνη (**-C-phosphate-T-**)

dATP: τριφωσφορική δεοξυαδενίνη (**deoxyadenine triphosphate**)

dCTP: τριφωσφορική δεοξυκυτοσίνη (**deoxycytosine triphosphate**)

ddH₂O: δις-απεσταγμένο νερό (**dis distilled water**)

ddNTPs: τριφωσφορικά διδεόξυ νουκλεοτίδια (**dideoxy nucleotide triphosphates**)

dGTP: τριφωσφορική δεοξυγουανίνη (**deoxyguanine triphosphate**)

dH₂O: απεσταγμένο νερό (**distilled water**)

DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο (**dimethyl sulfoxide**)

DNA: δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (**deoxyribonucleic acid**)

DNMTs: DNA μεθυλοτρανφεράσες (**DNA methyltransferases**)

dTTP: τριφωσφορική δεοξυθυμίνη (**deoxythimine triphosphate**)

EDTA: ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$) αιθυλενοδινιτρολοτετροξικό οξύ (**ethylene dinitrilotetra-acetic acid**)

EGFR: υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (**epidermal growth factor receptor**)

erbB: ογκογονίδιο B της ερυθροβλάστωσης των πτηνών (**avian erythroblastosis oncogene B**)

FAP: οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (**familial adenomatous polyposis**)

G: Γουανίνη (**Guanine**)

hMLH1: ανθρώπινο ομόλογο 1 του βακτηριακού γονιδίου mutL (**human mutL homolog 1**)

hMSH2: ανθρώπινο ομόλογο 2 του βακτηριακού γονιδίου mutS (**human mutS homolog 2**)

hMSH3: ανθρώπινο ομόλογο 3 του βακτηριακού γονιδίου mutS (**human mutS homolog 3**)

hMSH6: ανθρώπινο ομόλογο 6 του βακτηριακού γονιδίου mutS (**human mutS homolog 6**)

HNPCC: κληρονομούμενος μη-πολυποδιακός καρκίνος του παχέος εντέρου (**hereditary non polyposis colorectal cancer**)

IGF1R: υποδοχέας του ινσουλινικού αυξητικού παράγοντα II (**insuline growth factor II receptor**)

LINEs: μακρά διάσπαρτα μεταθετά στοιχεία (**long interspersed nuclear elements**)

LOH: απώλεια ετεροζυγωτίας (**loss of heterozygosity**)

MAGE: αντιγόνο του μελανώματος (**melanoma antigen**)

MGMT: O⁶-μεθυλογουανίνη-DNA-μεθυλοτρανσφεράση (O⁶- **methylguanine-DNA-methyltransferase**)

MINT: περιοχές γνωστές ότι είναι μεθυλιωμένες σε όγκους (**methylated in tumors**)

MMR: σύστημα επιδιόρθωσης των λανθασμένων ζευγών του DNA (**mismatch repair**)

MSI: μικροδορυφορική αστάθεια (**microsatellite instability**)

MSI φαινότυπος: φαινότυπος με θετική μικροδορυφορική αστάθεια (υψηλή ή χαμηλή)

MSI-H: υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (**microsatellite instability high**)

MSI-L: χαμηλή μικροδορυφορική αστάθεια (**microsatellite instability low**)

MSS: σταθερό από μικροδορυφορική αστάθεια (**microsatellite instability stable**)

NaHSO₃: όξινο θειώδες νάτριο (**sodium bisulfite**)

P16 ή CDKN2A: 2A αναστολέας κυκλίνης εξαρτώμενος με κινάση (**Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A**)

PCNA: πολλαπλασιαστικό κυτταρικό πυρηνικό αντιγόνο (**proliferating cell nuclear antigen**)

PCR: αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (**polymerase chain reaction**)

Pol δ: DNA πολυμεράση δ (**polymerase δ**)

RNA: ριβονουκλεϊκό οξύ (**ribonucleic acid**)

RNase: ριβονουκλεάση (**ribonuclease**)

SAM: S-αδενοσυλομεθειονίνη (**S-adenosyl-L-methionine**)

SINES: κοντά διάσπαρτα μεταθετά στοιχεία (**short interspersed nuclear elements**)

T: Θυμίνη (**Thymine**)

TBE: ρυθμιστικό διάλυμα με Tris- Βορικό οξύ και EDTA (**Tris-Boric acid-EDTA**)

TEMED: τετραμεθυλένο διαμίνη (N, N, N, N-**tetramethylene diamine**)

TGCE: ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς με βαθμίδωση θερμοκρασίας (**temperature gradient capillary electrophoresis**)

TGFβRII: υποδοχέας τύπου II του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β (**transforming growth factor β receptor II**)

Tm: θερμοκρασία τήξης (**temperature melting**)

Tris: υδροξυ-μεθυλαμινομεθάνιο (**hydroxymethyl-aminomethan**)

U: Ουρακίλη (**Uracile**)

wt: άγριος τύπος (**wild type**)

Σημείωση: Η μετάφραση των αγγλικών όρων της παρούσας διατριβής έγινε με βάση το βιβλίο «Αγγλοελληνική Ορολογία Βιοχημείας, Μοριακής Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας» της Ελληνικής Βιοχημικής & Βιοφυσικής Εταιρείας και της Ελληνικής Εταιρείας Βιοτεχνολογίας.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε έναν πολυκύτταρο οργανισμό, η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων ελέγχονται αυστηρά, μέσω πολλαπλών μηχανισμών που στόχο έχουν την φυσιολογική του λειτουργία. Υπό φυσιολογικές καταστάσεις, μία βλάβη στο DNA θα οδηγήσει είτε σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου, ώστε να επιτραπεί η επιδιόρθωση της βλάβης αυτής, ή όπου αυτό δεν είναι εφικτό, σε μια προγραμματισμένη κυτταρική “αυτοκτονία”, την απόπτωση. Όταν αυτά τα μέτρα επιδιόρθωσης αποτυγχάνουν, προάγεται ένας ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των παρεκκλινόμενων κυττάρων, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία όγκων. Συνήθως μία τέτοια αποτυχία επιδιόρθωσης οφείλεται στην κακή λειτουργία αλλά και την απώλεια γονιδίων που ενεργοποιούνται στη διαδικασία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, τα ογκοκατασταλτικά και τα αποπτωτικά γονίδια. Κατά συνέπεια, τα γονίδια αυτά απενεργοποιούνται ενώ αντίθετα τα ογκογονίδια, που προορίζονται στο να προάγουν τον πολλαπλασιασμό, απορυθμίζονται και η ενεργότητά τους ενισχύεται.

Συνήθως, η ανάπτυξη ενός όγκου αρχίζει με ένα παρεκκλινόν κύτταρο που, μέσω μετάλλαξης, αποκτά πλεονέκτημα ανάπτυξης σε σχέση με τον φυσιολογικό κυτταρικό πληθυσμό στον οποίο ανήκει. Μέσω της κλωνικής επέκτασης, ένα πρόωρο αδένωμα διαμορφώνεται, όπου τα κύτταρα είναι διαφοροποιημένα και η κυτταρική αύξηση είναι εντοπισμένη. Στη συνέχεια, εξαιτίας επιπλέον γενετικών μεταλλάξεων και επιγενετικών αλλαγών, το πρόωρο αυτό αδένωμα θα μετασχηματιστεί σε όψιμο αδένωμα και θα εξελιχτεί σε καρκίνωμα, ικανό να βλάψει βασικές μεμβράνες, μέσω των μεταστατικών καρκινικών κυττάρων που έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τα ενδοθηλιακά τοιχώματα των αγγείων και, μέσω της ροής του αίματος, να εισβάλουν και στα πιο απομακρυσμένα όργανα.

Δεδομένων όλων αυτών, ο καρκίνος είναι ένα σπάνιο περιστατικό σε μεμονωμένη βάση και πιθανότερος μεταξύ των ηλικιωμένων ατόμων, λόγω της συσσώρευσης πολλαπλών γενετικών και επιγενετικών αλλαγών στα σωματικά τους κύτταρα κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Παρόλα αυτά, είναι απαισιόδοξα τα στατιστικά στοιχεία που αναφέρουν ότι σχεδόν 11 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο και πεθαίνουν πάνω από 6 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως [1].

2. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

2.1. Συχνότητα και παράγοντες επικινδυνότητας

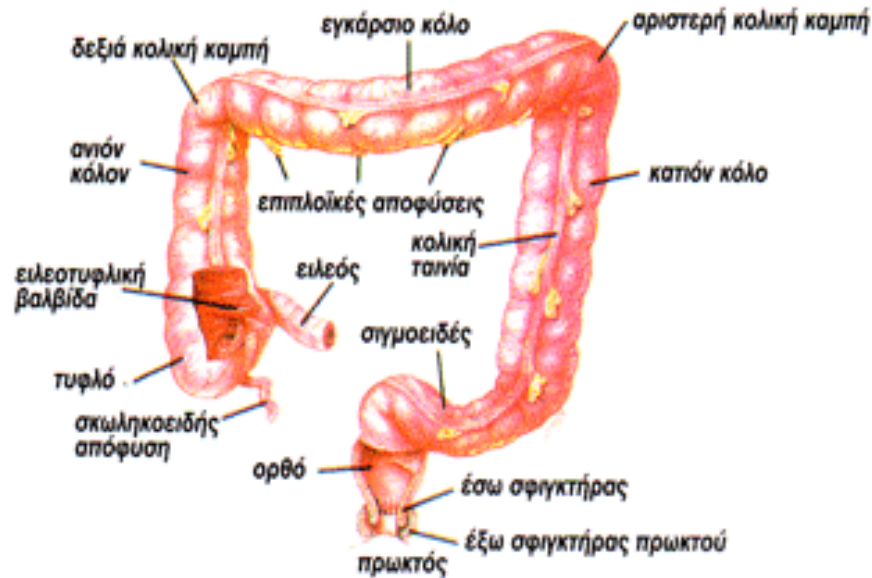
Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ο τρίτος σε συχνότητα εμφάνισης καρκίνος, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα και του μαστού. Παγκοσμίως, το 2002 είχε συχνότητα εμφάνισης της τάξης του ενός εκατομμυρίου και θνησιμότητας περίπου το μισό αυτού. Σε αντίθεση με τους περισσότερους άλλους καρκίνους, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, απαντάται με σχεδόν παρόμοια συχνότητα τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες με αναλογία 1.2:1 [2].

Μέχρι σήμερα έχουν παρατηρηθεί παγκοσμίως τουλάχιστον 25 παραλλαγές της νόσου. Τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης της νόσου καταγράφονται στη Βόρεια Αμερική, Αυστραλία/Νέα Ζηλανδία, Δυτική Ευρώπη και Ιαπωνία, ακολουθούν οι νότιες περιοχές της Νοτίου Αμερικής, ενώ τα χαμηλότερα ποσοστά των περιστατικών εντοπίζονται σε Αφρική και Ασία. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα ποσοστά εμφάνισης της νόσου μεταξύ των μεταναστών και των απογόνων τους, φθάνουν γρήγορα σε εκείνα της χώρας υποδοχής τους [3]. Αυτές οι διεθνείς διαφορές, μαζί με τα αποδημητικά στοιχεία και τις πρόσφατες μικρές αλλαγές στη συχνότητα εμφάνισης σε χώρες όπως η Ιαπωνία, δείχνουν ότι ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στις αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών και των διατροφικών συνηθειών.

Στην Ελλάδα, παρ' ότι η συχνότητα εμφάνισης της νόσου καταλαμβάνει τη χαμηλότερη θέση ανάμεσα στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, αποτελεί την τρίτη αιτία θανάτου από κακοήγη νεοπλασία (μετά τον καρκίνο του μαστού και του πνεύμονα) και ο ετήσιος επιπολασμός υπολογίζεται σε 7 με 9 άτομα ανά 100.000 πληθυσμού, με αυξητική τάση [1]. Η συχνότητα εμφάνισης στα δύο φύλα είναι παρόμοια, με τη διαφορά ότι στους άντρες είναι αυξημένη η συχνότητα του καρκίνου του ορθού. Η πιθανότητα ενός ατόμου, χωρίς συμπτώματα, να αναπτύξει στη διάρκεια της ζωής του τη νόσο πλησιάζει το 6% και για τα δύο φύλα, ενώ περίπου οι μισοί από αυτούς θα πεθάνουν από τη νόσο. Συνήθως το 80% των περιπτώσεων με καρκίνο του παχέος εντέρου αφορά άτομα ηλικίας μεταξύ 50-75 ετών, ενώ το 3-4% των περιπτώσεων αφορά άτομα ηλικίας κάτω των 35 ετών. Σπανιότερα και με

ποσοστό 0.5-1%, ο καρκίνος του παχέος εντέρου εντοπίζεται σε άτομα ηλικίας κάτω των 25 ετών.

Το παχύ έντερο (μήκους 1.5 έως 2 μέτρα) αποτελεί το τελευταίο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα και βρίσκεται στην κοιλιακή κοιλότητα (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Τα τμήματα του παχέος εντέρου.

Το παχύ έντερο αρχίζει από την ειλεοτυφλική βαλβίδα (η οποία λειτουργεί ως βαλβίδα μονής κατεύθυνσης και παρεμποδίζει την παλινδρόμηση περιεχομένου του τυφλού στον τελικό ειλέο) και τελειώνει στον πρωκτό. Αποτελείται από τρεις μικρότερες μοίρες που είναι: το τυφλό έντερο μαζί με τη σκωληκοειδή απόφυση, το κόλον (ανιόν, εγκάρσιο, κατιόν και σιγμοειδές) και τον ορθό.

Ο καρκίνος μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιοδήποτε από τα προαναφερθέντα τμήματα του παχέος εντέρου. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα 5 τύποι διαγνωστικών εξετάσεων για τον έλεγχο των ασθενών (έλεγχος κοπράνων για μικροσκοπική αιμορραγία, δακτυλική εξέταση του ορθού, σιγμοειδοσκόπηση, βαριούχος υποκλυσμός και κολονοσκόπηση) με πιο διαδεδομένη την ολική κολονοσκόπηση, εξέταση κατά την οποία ελέγχεται μέσω του κολονοσκοπίου, το εσωτερικό του παχέος εντέρου σε όλο το μήκος του, μέχρι και τον ειλέο και επιπλέον επιτρέπει την άμεση βιοψία ή ενδοεκτομή κάθε ύποπτου ευρήματος μέσα σε αυτό.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο καρκίνος του παχέος εντέρου μπορεί να έχει διαφορετικά συμπτώματα ανάλογα με τη θέση που εντοπίζεται. Συχνά ο

καρκίνος του δεξιού τμήματος του εντέρου (τυφλό, ανιόν) ή αλλιώς εγγύς τμήμα του παχέος εντέρου, συνοδεύεται από σιδηροπενική αναιμία. Αντίθετα ο καρκίνος στο αριστερό κόλον (κατιόν, σιγμοειδές) το οποίο έχει μικρή διάμετρο και φράζει εύκολα, εκδηλώνεται συχνότερα με συμπτώματα ειλεού χωρίς να λείπει και η αναιμία.

Ο δυτικός τρόπος ζωής αποτελεί έναν βασικό παράγοντα που συνδέεται με τον αυξανόμενο κίνδυνο για την εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου και υπολογίζεται ότι από μόνος του είναι υπεύθυνος για το περίπου 50% των σποραδικών περιπτώσεων [4]. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση λιπαρών ουσιών, κόκκινου κρέατος και αλκοόλ καθώς και το κάπνισμα συμβάλουν σημαντικά στην ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου ενώ αντίθετα η δίαιτα πλούσια σε φρούτα, λαχανικά και φυτικές ίνες, θεωρείται ότι μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Τέλος μελέτες έχουν δείξει ότι τα μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, οι ορμόνες για θεραπευτικούς λόγους καθώς και η φυσική δραστηριότητα έχουν προστατευτική δράση ενάντια στον καρκίνο του παχέος εντέρου [5]. Εν τούτοις, μερικές από αυτές τις ιδιότητες είναι αμφιλεγόμενες [6] και για κάποιους από αυτούς τους παράγοντες λίγα είναι γνωστά σχετικά με το πώς επιδρούν στον κίνδυνο για τον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Ωστόσο, ο πιο σημαντικός παράγοντας επικινδυνότητας για τον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι το θετικό οικογενειακό ιστορικό για τη νόσο αυτή. Η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου σε ένα άτομο με συγγενή πρώτου βαθμού με καρκίνο του παχέος εντέρου, είναι κατά δυο φορές μεγαλύτερη από ένα άτομο χωρίς οικογενειακό ιστορικό. Ενώ, η ύπαρξη πλέον του ενός συγγενή με καρκίνο του παχέος εντέρου, αυξάνει την πιθανότητα κατά τέσσερις φορές [7].

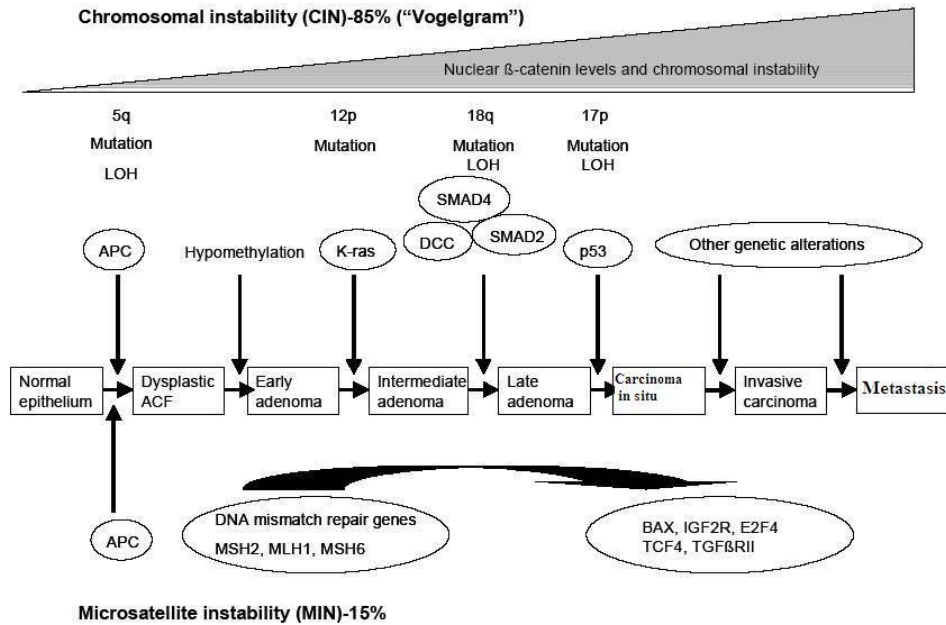
Λαμβάνοντας υπόψη λοιπόν τόσο το οικογενειακό ιστορικό του κάθε ατόμου, όσο και τον τρόπο ζωής και διατροφής του, είναι δυνατόν να κατηγοριοποιηθεί η κάθε περίπτωση ξεχωριστά και επιπλέον με τη βοήθεια πειραματικών μεθοδολογιών ανίχνευσης γενετικών και επιγενετικών παραγόντων, να προσδιοριστεί η αιτιολογική και παθογενετική πλευρά της νόσου. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι κάθε καρκίνος, αν ανιχνευθεί σε πρώιμο στάδιο και προσδιοριστεί η πιθανή του αιτία μπορεί να περιοριστεί ή και να εξαλειφτεί [8].

2.2. Το μονοπάτι εξέλιξης του καρκίνου του παχέος εντέρου

Οι όγκοι στο παχύ έντερο αναπτύσσονται σταδιακά, από τους πολύποδες στο αδενοκαρκίνωμα και είναι το αποτέλεσμα μεταλλάξεων στα φυσιολογικά κύτταρα του επιθηλίου που τα μετατρέπουν σε καρκινικά, μέσω μίας διαδικασίας που περιλαμβάνει εμφανείς ιστολογικές αλλαγές και συνοδεύεται από ταυτόχρονες μοριακές αλλαγές.

Η μέχρι σήμερα αναγνωρισμένη πορεία του αδενώματος προς το καρκίνωμα, χαρακτηρίζεται από αναγνωρίσιμες ιστολογικές αλλαγές οι οποίες αρχίζουν με την απορύθμιση των κυττάρων των εντερικών κρυπτών (ACF), που λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο APC επιτρέπεται ο σχηματισμός πρόωρων αδενωμάτων καθώς και άλλων μη νεοπλασματικών πολυπόδων όπως οι μεικτοί, οι υπερπλαστικοί, οι φλεγμονώδεις και οι νεανικοί πολύποδες. Στη συνέχεια αυτά τα πρόωρα αδενώματα μέσω γενετικών και επιγενετικών μηχανισμών όπως μεταλλάξεις στο γονίδιο K-ras καθώς και μίας γενικευμένης υπομεθυλίωσης του DNA, θα μετατραπούν αρχικά σε νεοπλασματικά καλοήγη αδενώματα (σωληνοειδή, σωληνολαχνωτά και λαχνωτά) τα οποία στη συνέχεια μέσω επιπρόσθετων γενετικών αλλαγών θα μετατραπούν και θα εξελιχθούν σε αδενοκαρκινώματα.

Το 1990, οι Fearon και Vogelstein πρότειναν ένα μοντέλο της σταδιακής καρκινογένεσης στο παχύ έντερο [9] (Εικόνα 2). Στο μοντέλο αυτό, το οποίο ονομάζεται και μοντέλο “Vogelgram”, ο καρκίνος του παχέος εντέρου προέρχεται από μία σειρά γενετικών αλλαγών με παράλληλη ιστολογική πρόοδο κατά την οποία το φυσιολογικό επιθήλιο μετατρέπεται σε δυσπλαστικά αδενώματα, μέσω συγκεκριμένων μηχανισμών και στη συνέχεια μέσω επιπρόσθετων γενετικών και επιγενετικών αλλαγών σε αδενοκαρκινώματα, με ικανότητα μετάστασης σε άλλους ιστούς. Το μοντέλο αυτό, το οποίο είναι ευρέως αποδεχτό, έχει τροποποιηθεί κατά καιρούς λόγω των νεότερων δεδομένων στην πορεία την καρκινογένεσης ενώ είναι εμφανή και έχουν βρεθεί τρία γονίδια κλειδιά στην ογκογένεση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Το γονίδιο APC, για την έναρξη των βλαβών στο φυσιολογικό επιθήλιο, το γονίδιο K-ras για την δυσπλαστική μετεξέλιξη των αδενωμάτων και το γονίδιο P53 για τον σχηματισμό του καρκινώματος.



Εικόνα 2. Μοντέλο “Vogelgram”.

Αλληλοδιαδοχή των γενετικών και επιγενετικών αλλαγών που οδηγούν στην εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. (Τροποποιημένο από τους [9-11].

Παράλληλα λοιπόν με το μετασχηματισμό του φυσιολογικού επιθηλίου του παχέος εντέρου σε πολύποδα, σε πολύποδα με αυξημένη δυσπλασία, σε αδενοκαρκίνωμα και τελικά σε μεταστατικό καρκίνο, παρατηρούνται τόσο γενετικές αλλαγές όπως χρωμοσωμική και μικροδορυφορική αστάθεια, μεταλλάξεις σε σημαντικά γονίδια, απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων αλλά και υπερέκφραση ογκογονιδίων όσο και επιγενετικές αλλαγές όπως η ολική υπομεθυλίωση του DNA και η στοχευμένη μεθυλίωση των νησίδων CpG σε υποκινητές σημαντικών γονιδίων (hMLH1, MGMT κ.ά.).

Για κάθε ασθενή, ο κίνδυνος να νοσήσει από καρκίνο του παχέος εντέρου θα μειωνόταν σημαντικά εάν όλες οι πρόδρομες βλάβες αφαιρούνταν με ενδοσκοπική πολύποδο-εκτομή. Αυτό έχει παρατηρηθεί σε πολλές μελέτες παρακολούθησης, σύμφωνα με τις οδηγίες για τους καρκίνους του παχέος εντέρου, με κολonosκοπική παρακολούθηση και θεραπεία των ασθενών που φέρουν πολύποδες [8]. Εντούτοις, αυτές οι μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι ένας σημαντικός αριθμός των καρκίνων του παχέος εντέρου αναπτύχθηκε παρά την στενή παρακολούθηση. Τέτοιοι καρκίνοι μπορεί να είχαν χαθεί σε μια προηγούμενη ενδοσκόπηση, είτε ως το αποτέλεσμα μίας

γρήγορης ανάπτυξης καρκίνου, ή λόγω λανθασμένης ερμηνείας των πρόδρομων βλαβών κατά την ενδοσκόπηση.

Σύμφωνα με μελέτες [12], ο διαχωρισμός των καρκίνων του παχέος εντέρου ανάλογα με την ανατομική περιοχή προέλευσής τους σε δύο ομάδες, είναι πολύ σημαντικός τόσο για τη διευκρίνιση των μοριακών μονοπατιών, τα οποία είναι υπεύθυνα για την εξέλιξη του καρκίνου, όσο και για τη μετέπειτα θεραπευτική αγωγή που θα πρέπει να ακολουθηθεί για το κάθε άτομο ξεχωριστά. Πράγματι, με βάση τη μελέτη του Elsaleh και της ομάδα του [13], οι ασθενείς με καρκίνο στο δεξί τμήμα του παχέος εντέρου που παίρνουν χημειοθεραπευτική αγωγή έχουν περισσότερες πιθανότητες επιβίωσης σε σχέση με τους ασθενείς με καρκίνο στο αριστερό τμήμα του παχέος εντέρου. Μάλιστα, η αποτελεσματικότητα της αγωγής ενισχύεται όταν οι ασθενείς αυτοί είναι θετικοί στην μικροδορυφορική αστάθεια, κάτι που θα αναλυθεί και στη συνέχεια.

2.3. Μορφές του καρκίνου του παχέος εντέρου

Σύμφωνα με τα ιστολογικά, φαινοτυπικά και γενοτυπικά χαρακτηριστικά, ο καρκίνος του παχέος εντέρου χωρίζεται αρχικά σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Τους σποραδικούς καρκίνους, η ανάπτυξη των οποίων οφείλεται είτε σε περιβαλλοντικούς και διατροφικούς παράγοντες, ή σε μεταλλάξεις στα ίδια τα σωματικά κύτταρα και τους οικογενείς καρκίνους, όπου η κύρια αιτία για την ανάπτυξή τους είναι το θετικό οικογενειακό ιστορικό για τη νόσο αυτή, καθώς και ετερόζυγες γενετικές και επιγενετικές αλλαγές στη γαμετική σειρά γνωστών ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

2.3.1. Ο σποραδικός καρκίνος του παχέος εντέρου

Ο σποραδικός καρκίνος του παχέος εντέρου αντιστοιχεί στο 70-80% όλων των περιπτώσεων καρκίνου στο παχύ έντερο. Εμφανίζεται συνήθως μετά την ηλικία των 60 ετών και δεν έχει εμφανή σημάδια μεταβίβασης μέσα στην οικογένεια του ασθενούς. Έχει παρατηρηθεί ότι σημαντικός παράγοντας στην έναρξη των σποραδικών καρκίνων είναι κατά 50% η διατροφή και ο τρόπος ζωής. Η πορεία εξέλιξης του σποραδικού καρκίνου του παχέος εντέρου, από τους πολύποδες στο αδενοκαρκίνωμα, ακολουθεί το μοντέλο “Vogelgram” που αναφέρθηκε παραπάνω, με σημαντικότερα την εμφάνιση σωματικών μεταλλάξεων στα ογκογονίδια K-ras

(50%), αλλά και σε μικρότερα ποσοστά στα c-Myc και c-erbB2, την απενεργοποίηση λόγω μεταλλάξεων των ογκοκατασταλτικών γονιδίων P53 (75%) και APC (60%), καθώς και την εμφάνιση μεταλλάξεων σε γονίδια του συστήματος επιδιόρθωσης λανθασμένων ζευγών του DNA (σύστημα MMR, Mismatch Repair) [14]. Λόγω μάλιστα μεταλλάξεων στα γονίδια του συστήματος MMR ή απενεργοποίησης αυτών λόγω μεθυλίωσης στον υποκινητή τους, ένα μεγάλο ποσοστό σποραδικών καρκίνων (10-15%) εμφανίζει διαφορές στον αριθμό κάποιων επαναλαμβανόμενων ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών του DNA, που είναι γνωστός ως φαινότυπος της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI, Microsatellite Instability).

2.3.2. Ο οικογενής καρκίνος του παχέος εντέρου

Ο οικογενής καρκίνος του παχέος εντέρου αντιπροσωπεύει το 20-30% του συνόλου των καρκίνων του εντέρου [15]. Στον οικογενή καρκίνο, υπάρχουν συνήθως περισσότερα από ένα περιστατικά με καρκίνο στο οικογενειακό περιβάλλον του ασθενούς και η ηλικία εμφάνισης είναι από 20 μέχρι 55 ετών. Δύο είναι τα πιο γνωστά σύνδρομα στους οικογενείς καρκίνους του παχέος εντέρου: η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (γνωστή και ως σύνδρομο FAP) που αντιστοιχεί στο 1-2% περίπου των καρκίνων του εντέρου και ο κληρονομικός μη-πολυποδιακός καρκίνος του παχέος εντέρου (γνωστός ως σύνδρομο HNPCC ή σύνδρομο Lynch) που είναι υπεύθυνος για το 1-3% περίπου των καρκίνων του εντέρου. Κάποια άλλα πιο σπάνια σύνδρομα, όπως το σύνδρομο Peutz Jeghers, το σύνδρομο Cowden, το σύνδρομο Turcot, το σύνδρομο της νεανικής πολυποδίασης και το σύνδρομο Muir Torre, ευθύνονται για λιγότερο από το 1% των περιστατικών του καρκίνου του παχέος εντέρου [15]. Για όλα τα παραπάνω σύνδρομα έχουν χαρακτηριστεί ήδη οι κύριες γενετικές και επιγενετικές αλλαγές που ευθύνονται για την εμφάνισή τους. Ένα κλινικό χαρακτηριστικό όλων των παραπάνω συνδρόμων, στο οποίο βασίζεται και η μεταξύ τους διάκριση, είναι η ύπαρξη πολυπόδων όπου ο αριθμός τους ποικίλει από ελάχιστους, στον κληρονομικό μη-πολυποδιακό καρκίνο του παχέος εντέρου, έως και χιλιάδες στην οικογενή αδενωματώδης πολυποδίαση [16].

2.3.2.1. Η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (σύνδρομο FAP)

Η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση, περιγράφηκε για πρώτη φορά πριν από 84 χρόνια [17] και είναι το πρώτο από τα σύνδρομα του παχέος εντέρου του οποίου διαλευκάνθηκε η γενετική βάση. Ο σημαντικότερος λόγος για αυτό ήταν ο επικρατής τρόπος κληρονομικότητας και ο χαρακτηριστικός φαινότυπος του συνδρόμου. Στην οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση, το έντερο γεμίζει με εκατοντάδες έως χιλιάδες πολύποδες μέχρι την ηλικία των 30 ετών. Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό, ότι το αργότερο 20 χρόνια μετά την εμφάνιση των πολυπόδων το άτομο θα εμφανίσει καρκίνο [18]. Γι' αυτό το λόγο η ολική κολεκτομή συνοδευόμενη από ειλεορθική αναστόμωση αποτελούν μονόδρομο για όσους υποφέρουν από αυτή την πάθηση. Ο καρκίνος εμφανίζεται συνήθως στο αριστερό κόλον και πολύ σπανιότερα στον ειλέο. Ακόμη όμως και μετά την κολεκτομή οι ασθενείς με οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση, έχουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου και σε άλλα σημεία. Το 1987 ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το κυρίως υπεύθυνο γονίδιο για την οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση, το γονίδιο APC στο χρωμόσωμα 5q21-q22 [19]. Πράγματι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο APC θεωρούνται ως ένα από τα πιο πρόωρα γεγονότα στην έναρξη και εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου, όπως φαίνεται και από το μοντέλο "Vogelgram". Στους ασθενείς με οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση, αλληλόμορφες μεταλλάξεις του γονιδίου APC ακολουθούμενες από απώλεια της ετεροζυγωτίας, είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα. Ειδικότερα, μεταλλάξεις στο γονίδιο APC παρατηρούνται σε ποσοστό 60 με 80% της συγκεκριμένης νόσου [20].

2.3.2.2. Ο κληρονομικός μη-πολυποδιακός καρκίνος του παχέος εντέρου (σύνδρομο HNPCC)

Ο Aldred Warthin για πρώτη φορά το 1913 περιέγραψε το σύνδρομο του κληρονομικού μη-πολυποδιακού καρκίνου του παχέος εντέρου, το οποίο είναι γνωστό και σαν σύνδρομο HNPCC ή Lynch [21]. Το σύνδρομο αυτό κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και υπολογίζεται ότι ευθύνεται για το 1 έως 3% όλων των περιπτώσεων καρκίνου στο παχύ έντερο. Η διάμεση ηλικία διάγνωσης είναι τα 44 χρόνια και συνήθως προσβάλλει το δεξί τμήμα του παχέος εντέρου (στο 70% περίπου των περιπτώσεων). Παράλληλα, ενώ στον σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου ο καρκίνος εμφανίζεται μετά από πέντε έως δέκα χρόνια από την εμφάνιση

των πολυπόδων έως το σχηματισμό του αδενοκαρκινώματος, στους ασθενείς με κληρονομικό μη-πολυποδιακό καρκίνο η διαδικασία αυτή κρατάει μόνο ένα με δύο χρόνια.

Αν και ο κληρονομικός μη-πολυποδιακός καρκίνος του παχέος εντέρου κατατάσσεται στα σύνδρομα με πολύποδες, οι ασθενείς εμφανίζουν μικρό αριθμό πολυπόδων, συνήθως δέκα, κατά μέσον όρο. Είναι σημαντικό επίσης ότι οι ασθενείς με το σύνδρομο αυτό, μπορεί να εμφανίσουν καρκίνο και σε άλλα όργανα εκτός του παχέος εντέρου, με ποιο χαρακτηριστικό το αδενοκαρκίνωμα του ενδομητρίου, ακολουθούμενο από το καρκίνωμα στο στομάχι, στο λεπτό έντερο, στο ήπαρ και στις ωοθήκες [22]. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα άτομα με προδιάθεση για το σύνδρομο HNPCC, έχουν πιθανότητα 50-80% να εμφανίσουν καρκίνο στο παχύ έντερο, 50-60% καρκίνο του ενδομητρίου (στις γυναίκες), αλλά και ποσοστό 15% για άλλους καρκίνους [23].

Από νωρίς έγινε κατανοητό ότι τα άτομα που φέρουν το σύνδρομο του κληρονομικού μη-πολυποδιακού καρκίνου του παχέος εντέρου, έχουν υψηλή πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο σε νεαρή ηλικία και χρήζουν ενδοσκοπικό έλεγχο σε τακτά χρονικά διαστήματα. Για το λόγο αυτό τέθηκαν το 1991 και στη συνέχεια το 1998, από την Διεθνή Ομάδα Συνεργασίας για τον κληρονομικό μη-πολυποδιακό καρκίνο του παχέος εντέρου, τα αναθεωρημένα κριτήρια Amsterdam (Πίνακας 1), ώστε να επιλέγονται οι ασθενείς που έχουν αυξημένη πιθανότητα να είναι φορείς του συνδρόμου αυτού [24, 25]. Στη συνέχεια και αφού έγινε κατανοητή η γενετική βάση του συνδρόμου, καθορίστηκαν το 2003 τα κριτήρια Bethesda (Πίνακας 1) [26]. Στόχος των κριτηρίων αυτών ήταν ο εντοπισμός των οικογενειών που χρήζουν γενετικό έλεγχο, αρχικά ως προς την εμφάνιση του φαινοτύπου της μικροδορυφορικής αστάθειας και στη συνέχεια για πιθανές μεταλλάξεις στη γαμετική σειρά των γονιδίων του συστήματος επιδιόρθωσης λανθασμένων νουκλεοτιδικών συνδέσεων του DNA (σύστημα MMR). Δύο σημαντικές γενετικές μεταβολές που σχετίζονται άμεσα με την εμφάνιση του συνδρόμου HNPCC.

Κριτήρια Amsterdam

Τουλάχιστον τρεις συγγενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και όλα τα ακόλουθα:

Ο ένας προσβαλλόμενος συγγενής να έχει πρώτου βαθμού συγγένεια με τους άλλους δύο συγγενείς.

Δύο διαδοχικές γενεές να έχουν προσβληθεί από καρκίνο.

Το λιγότερο μία περίπτωση να έχει διαγνωστεί με καρκίνο του παχέος εντέρου πριν την ηλικία των 50 ετών.

Όλες οι περιπτώσεις FAP εξαιρούνται.

Αναθεωρημένα κριτήρια Amsterdam

Ίδια με τα κριτήρια Amsterdam με την διαφορά ότι αντί μόνο για καρκίνο του παχέος εντέρου συμπεριλαμβάνονται και οι καρκίνοι που είναι σχετικοί με το σύνδρομο HNPCC (ενδομήτριο, λεπτό έντερο, ουρήθρα, νεφρική πύελο).

Κριτήρια Bethesda

Τα κριτήρια Amsterdam και ένα από τα παρακάτω:

Δύο περιπτώσεις με καρκίνο συσχετιζόμενο με το σύνδρομο σε έναν ασθενή συμπεριλαμβανομένων σύγχρονων ή μετάχρονων καρκίνων.

Καρκίνο του παχέος εντέρου και έναν συγγενή πρώτου βαθμού με HNPCC συσχετιζόμενο καρκίνο και/ή προχωρημένο πολύποδα στο παχύ έντερο (η μία περίπτωση με καρκίνο να έχει διαγνωστεί πριν την ηλικία των 45 ετών, ενώ ο πολύποδας να έχει διαγνωστεί πριν την ηλικία των 40 ετών).

Καρκίνος του παχέος εντέρου ή του ενδομητρίου διαγνωσμένος πριν την ηλικία των 45 ετών.

Καρκίνος του παχέος εντέρου εντοπισμένος στο δεξί τμήμα, με αδιαφοροποίητη εικόνα διαγνωσμένος πριν την ηλικία των 45 ετών.

Πίνακας 1. Κλινικά κριτήρια για τον καθορισμό των οικογενειών με το σύνδρομο HNPCC.

Η γενετική προσέγγιση του συνδρόμου HNPCC είναι πολύ πιο περίπλοκη από αυτή του συνδρόμου FAP, λόγω των πολυάριθμων μεταλλάξεων στα γονίδια του συστήματος MMR. Δύο από τα γονίδια του συστήματος αυτού, τα hMLH1 και hMSH2, ευθύνονται για το 85-90% των ασθενών με το συγκεκριμένο σύνδρομο [27], ενώ μεταλλάξεις στα γονίδια hMSH6, PMS2 και PMS1 παρατηρούνται στο 15% των περιπτώσεων [23]. Επίσης, εξαιτίας της ελαττωματικής λειτουργίας του συστήματος MMR, παρατηρείται αυξημένη αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA (μικροδορυφορική αστάθεια) σε ποσοστό που φτάνει το 90% των περιπτώσεων καθώς και αστάθεια σε νουκλεοτιδικές επαναλήψεις εντός λειτουργικών περιοχών γονιδίων (TGFβRII, IGFIIR, BAX, hMSH3 και hMSH6) με σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση [28]. Παράλληλα, επιγενετικές αλλαγές, όπως η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1, αποτελεί ένα επιπλέον συχνό φαινόμενο στους καρκίνους του συνδρόμου HNPCC [29] και παρουσιάζεται σε πρώιμο στάδιο κατά την εξέλιξη του καρκίνου [30].

3. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αναπτύσσεται μέσω διαδοχικών βημάτων στα οποία επιδρούν τόσο γενετικοί όσο και επιγενετικοί παράγοντες. Μέχρι σήμερα τα δύο πιο ευδιάκριτα μοριακά γενετικά μονοπάτια, στον καρκίνο του παχέος εντέρου, αποτελούν η χρωμοσωμική αστάθεια (CIN) και η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) [31]. Η απώλεια της γενομικής σταθερότητας, είτε λόγω χρωμοσωμικής αστάθειας είτε λόγω μικροδορυφορικής αστάθειας, εμφανίζεται μετά από το σχηματισμό των πολυπόδων αλλά πριν από την εξέλιξη της νόσου. Στην πραγματικότητα και τα δύο αυτά γενετικά γεγονότα φαίνεται να εμφανίζονται σχετικά νωρίς στην ανάπτυξη των όγκων, όπως φαίνεται και από το μοντέλο “Vogelgram” (Εικόνα 2) και επιδρούν σε όλα τα στάδιά του. Βέβαια, πρέπει να αναφερθεί ότι είναι δύο γεγονότα ανεξάρτητα μεταξύ τους αφού ακολουθούν ξεχωριστούς μοριακούς μηχανισμούς.

Στην περίπτωση της χρωμοσωμικής αστάθειας οι καρκίνοι χαρακτηρίζονται από μια υψηλή συχνότητα απώλειας ετεροζυγωτίας (LOH) (με συνηθέστερη αυτή στους χρωμοσωμικούς βραχίονες 5q, 8p, 17p και 18q), χρωμοσωμικών ενισχύσεων και μετατόπισης [32]. Αλλαγές που συνδέονται με το αποτέλεσμα της χρωμοσωμικής αστάθειας είναι η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων K-ras και c-myc, καθώς και η αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων APC, P53, DCC, SMAD2 και SMAD4 [33]. Η χρωμοσωμική αστάθεια είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται στο 85% των καρκίνων του παχέος εντέρου καθώς και στην πλειοψηφία των ασθενών με το σύνδρομο FAP εξαιτίας των μεταλλάξεων που παρατηρούνται στο γονίδιο APC.

Αντίθετα οι καρκίνοι με τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας χαρακτηρίζονται αφενός από αυξημένη αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA σε μη νοηματικές περιοχές του γονιδιώματος, οφειλόμενο στην κακή λειτουργία του συστήματος MMR, σε ποσοστό που φτάνει το 90% για το σύνδρομο HNPCC και το 15% για τους σποραδικούς καρκίνους του παχέος εντέρου και αφετέρου από αστάθεια σε επαναλαμβανόμενες μονονουκλεοτιδικές αλληλουχίες εντός των λειτουργικών περιοχών γονιδίων, με σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση. Επιπλέον οι όγκοι αυτοί χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό μεθυλίωσης στις νησίδες CpG των υποκινητών των γονιδίων του συστήματος MMR καθώς και από μία αδυναμία έκφρασης των γονιδίων αυτών.

Η παρούσα διατριβή ασχολείται με το δεύτερο γενετικό μονοπάτι, αυτό της μικροδορυφορικής αστάθειας καθώς και όλα τα στάδια, γενετικά και επιγενετικά που συμβάλλουν σε αυτό όπως το σύστημα MMR και η μεθυλίωση στους υποκινητές συγκεκριμένων γονιδίων.

3.1. Μικροδορυφορική Αστάθεια

Η μικροδορυφορική αστάθεια εμφανίζεται στο 10-15% του συνόλου των καρκίνων του παχέος εντέρου και προέρχεται από την ελαττωματική λειτουργία του συστήματος MMR, είτε ως αποτέλεσμα γενετικών μεταλλάξεων στα γονίδια του συστήματος MMR (όπως συμβαίνει στο σύνδρομο HNPCC) ή την αδυναμία έκφρασης των γονιδίων του συστήματος MMR λόγω μεθυλίωσης στους υποκινητές τους (όπως συμβαίνει στην περίπτωση των σποραδικών καρκίνων του παχέος εντέρου).

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της μικροδορυφορικής αστάθειας, είναι οι εκτεταμένες εισδοχές ή ελλείψεις νουκλεοτιδίων σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, γνωστές ως μικροδορυφόροι.

Από το σύνολο του γενετικού υλικού ενός οργανισμού, ένα πολύ μικρό ποσοστό (περίπου το 10-15%) αντιστοιχεί σε γονίδια και μεταφέρει γενετική πληροφορία. Το υπόλοιπο μέρος του DNA φαίνεται να μην έχει καμία λειτουργία και γι' αυτό πολλές φορές αναφέρεται ως "ρετάλι" (Junk DNA). Στο τμήμα αυτό του DNA υπάρχουν ορισμένες ασυνήθεις, εν σειρά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (tandemly repeated sequences) του DNA που είναι γνωστές ως:

- Δορυφόροι (satellites) με μέγεθος επαναλήψεων άνω των 100 ζευγών βάσεων.
- Μινιδορυφόροι (minisatellites) με μέγεθος επαναλήψεων 10-100 ζευγών βάσεων.
- Μικροδορυφόροι (microsatellites) με μέγεθος επαναλήψεων 1-6 ζεύγη βάσεων.

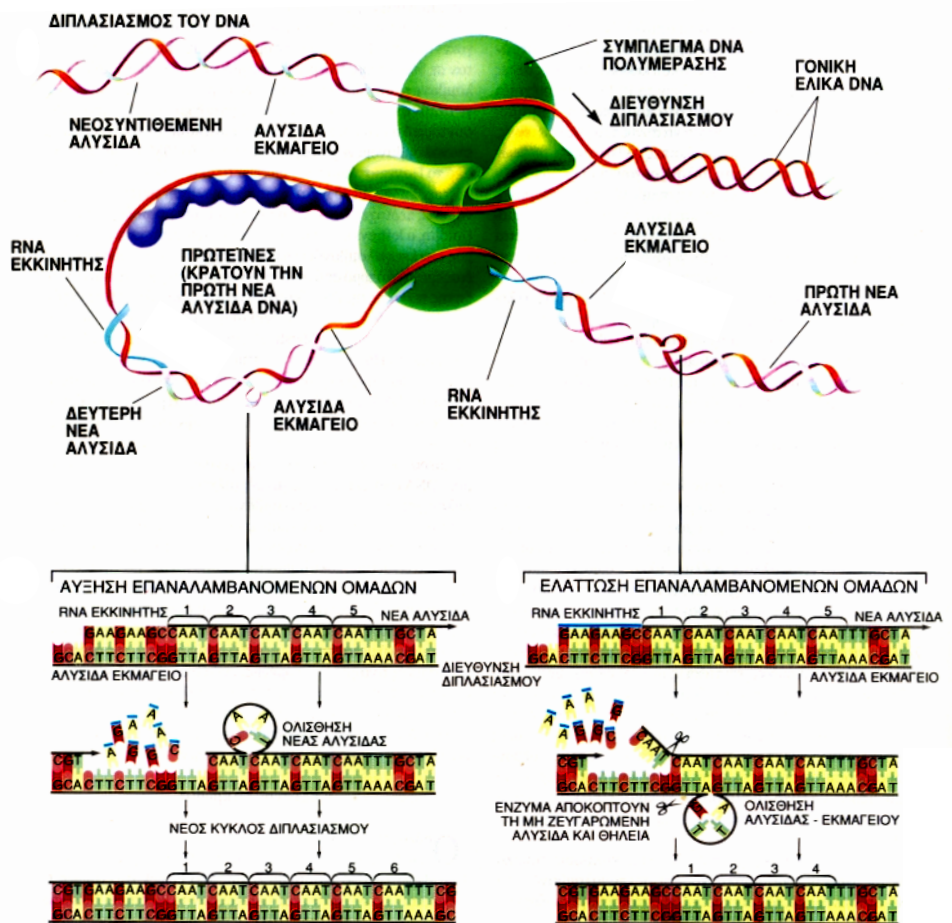
Το μικροδορυφορικό DNA (που αποτελεί το 30% του επαναλαμβανόμενου DNA) αποτελείται από μικρές όμοιες αλληλουχίες 1 έως 6 βάσεων, με συχνότερα

εμφανιζόμενες τις $(CA)_n$ βάσεις, οι οποίες επαναλαμβάνονται στη σειρά, η μία δίπλα στην άλλη όπως τα βαγόνια ενός τραίνου.

Η παρουσία του μικροδορυφορικού DNA ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1960. Διαπιστώθηκε τότε ότι κατά την φυγοκέντρωση του DNA σε βαθμίδωση συγκεντρώσεων, αυτό χωριζόταν σε δύο ή περισσότερες ζώνες: μία κύρια ζώνη που αποτελούνταν από το DNA των γονιδίων και κάποιες δευτερεύουσες ζώνες, που για το λόγο αυτό ονομάστηκαν δορυφορικές. Στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι οι δορυφορικές αυτές ζώνες αποτελούνταν από επιμήκεις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων.

Η ιδιότητα του μικροδορυφορικού DNA να μεταλλάσσεται πολύ γρήγορα είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την εξέλιξη. Έχει υπολογισθεί ότι η πιθανότητα να προστεθεί ή να χαθεί μία μονάδα επανάληψης σε μία μικροδορυφορική περιοχή σε μία γενεά είναι 10.000 φορές μεγαλύτερη από την πιθανότητα να γίνει μία σημειακή μετάλλαξη σε ένα άλλο γονίδιο. Επομένως, ενώ είναι εξαιρετικά σπάνιο το φαινόμενο να γίνει μία αντίστροφη μετάλλαξη η οποία θα επαναφέρει ένα μεταλλαγμένο γονίδιο στην προηγούμενη “φυσική” του κατάσταση, ένας μικροδορυφόρος μπορεί να αποκατασταθεί μέσα σε χρονικό διάστημα λίγων γενεών.

Η αλλαγή (αύξηση ή μείωση) στον αριθμό των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του μικροδορυφορικού DNA, καλείται μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) και θεωρείται ότι οφείλεται στο λανθασμένο “γλίστρημα” της DNA πολυμεράσης κατά τη αντιγραφή του DNA (Εικόνα 3) αλλά και στον άνισο διασκελισμό κατά την διάρκεια της μείωσης [34]. Αυτές οι αλλαγές των επαναλήψεων συνήθως διορθώνονται με τη βοήθεια των πρωτεϊνών του συστήματος MMR. Εντούτοις η επισκευή είναι αδύνατη όταν υπάρχει ανεπάρκεια μίας εκ των πρωτεϊνών αυτών. Έτσι η μικροδορυφορική αστάθεια αποτελεί και έναν δείκτη της καλής ή όχι λειτουργίας του συστήματος αυτού.



Εικόνα 3. Αναπαράσταση της αντιγραφής του DNA και του τρόπου επιδιόρθωσής του [34].

Πολύ νωρίς έγινε εμφανές στους ερευνητές ότι η μικροδορυφορική αστάθεια συνεπάγεται την εμφάνιση σημαντικών νευρολογικών ασθενειών όπως η νόσος του Huntington και οφείλονται σε επαναλαμβανόμενες τριάδες βάσεων [35].

Ακόμη έχει βρεθεί ότι το μέγεθος ορισμένων μικροδορυφών μεταβάλλεται κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης ορισμένων μορφών καρκίνου [36] γεγονός που τους καθιστά χρήσιμους δείκτες για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου. Επιπλέον, επειδή το μέγεθος των μικροδορυφών συνήθως διαφέρει από άτομο σε άτομο, χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση ατόμων (π.χ. για τον καθορισμό της πατρότητας, τον προσδιορισμό εγκληματιών κτλ) μία μέθοδος γνωστή ως “δακτυλοσκοπία” [37].

3.1.1. Μικροδορυφορική αστάθεια και καρκίνος του παχέος εντέρου

Το 1992, αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Peinado και την ομάδα του ότι κάποιοι καρκίνοι του παχέος εντέρου εμφανίζουν μεγάλο αριθμό εισδοχών ή ελλείψεων στις μικροδορυφορικές περιοχές [38]. Λίγο αργότερα, το 1993, βρέθηκε ότι το 12-15% όλων των καρκίνων του παχέος εντέρου εμφανίζουν έναν συγκεκριμένο φαινότυπο, αυτόν της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI phenotype) [39]. Την ίδια χρονολογία ο Aaltonen και η ομάδα του, συσχέτισε την μικροδορυφορική αστάθεια με τον κληρονομικό μη-πολυποδιακό καρκίνο του παχέος εντέρου [40] και μάλιστα σε ποσοστό που φτάνει το 90% .

Η μικροδορυφορική αστάθεια, ανιχνεύεται επίσης σε έξω-εντερικούς όγκους όπως οι όγκοι του γαστρικού, του μαστού, του ενδομητρίου καθώς και σε καρκινώματα του ανώτερου ουροποιητικού συστήματος [41] όμως δεν έχει αποδεχθεί ακόμα ότι αποτελεί μοριακό δείκτη σε αυτούς τους καρκίνους.

Υπολογίζεται ότι τα καρκινικά κύτταρα με τον φαινότυπο MSI έχουν πιθανότητα μετάλλαξης, σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, 100-1.000 φορές μεγαλύτερη από τα φυσιολογικά κύτταρα [42]. Αυτός ο μεταλλακτοφόρος φαινότυπος που χαρακτηρίζεται από μικροδορυφορική αστάθεια θεωρείται ότι συμβάλει στην έναρξη και την προώθηση της σταδιακής καρκινογένεσης [43], όμως πιστεύεται ότι η απλή αδρανοποίηση ενός μόνο γονιδίου του συστήματος MMR δεν αρκεί για την εκδήλωση του φαινοτύπου αυτού.

Εκτός όμως από τις μικροδορυφορικές περιοχές που βρίσκονται εκτός των γονιδίων ενός οργανισμού, υπάρχουν και περιοχές εντός των γονιδίων, ή σε λειτουργικές περιοχές αυτών, που εμφανίζουν έναν μικρό αριθμό νουκλεοτιδικών επαναλήψεων (8-10 επαναλήψεις) και αποτελούν ιδανικούς στόχους μεταλλάξεων σε κύτταρα που φέρουν το φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας, για το λόγο αυτό τέτοια γονίδια αναφέρονται και ως γονίδια στόχοι. Το 1995, το γονίδιο TGFβRII αναφέρθηκε ως το πρώτο γονίδιο στόχος στους όγκους με τον φαινότυπο MSI [44]. Μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, βρέθηκαν και πολλά άλλα σημαντικά γονίδια στόχοι, ανάμεσα στα οποία συμπεριλαμβάνονται γονίδια που συμβάλουν στην απόπτωση, όπως το BAX και η caspase-5 [45, 46], τα γονίδια ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου E2F4, TCF4 και PTEN ([47-49], τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, hMSH3 και hMSH6 [50] και ο αυξητικός παράγοντας IGFIIR [51]. Μέχρι σήμερα, τουλάχιστον 30 γονίδια έχουν θεωρηθεί γονίδια στόχοι της καρκινογένεσης

του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας και ο αριθμός αυτών αυξάνεται συνεχώς. Εντούτοις μόνο μερικά από αυτά έχουν αποδειχθεί ότι αποτελούν πραγματικά γονίδια στόχους [52].

Σήμερα, είναι ευρέως αποδεκτό το γεγονός ότι η μικροδορυφορική αστάθεια είναι ένα φαινόμενο που συσχετίζεται τόσο με τον κληρονομικό μη-πολυποδιακό καρκίνο (σε ποσοστό που αγγίζει το 90% των περιπτώσεων) όσο και με τους σποραδικούς καρκίνους του παχέος εντέρου (σε ποσοστό 10-15%) και μάλιστα σε πρώιμο στάδιο. Έτσι πολλοί επιστήμονες πλέον θεωρούν απαραίτητο τον έλεγχο του φαινοτύπου της αστάθειας των μικροδορυφορικών περιοχών μετά την διάγνωση ενός ασθενούς με καρκίνο του παχέος εντέρου ή όταν κάποιος πληροί ένα από τα κριτήρια Bethesda (Πίνακας 1).

Μέχρι σήμερα έχει ελεγχθεί μια ευρεία σειρά από μικροδορυφορικές περιοχές, με στόχο να προσδιοριστούν αυτές που επηρεάζονται συχνότερα τόσο στο σύνδρομο HNPCC όσο και στον σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου. Το 1997 σε μία επιστημονική ημερίδα του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου των Ηνωμένων Πολιτειών που έγινε στη Bethesda, προτάθηκαν εκτός από τα κλινικά κριτήρια που αναφέρθηκαν προηγουμένως για το σύνδρομο HNPCC (Πίνακας 1) και μια ομάδα 5 δεικτών (η οποία στη συνέχεια και καθιερώθηκε) για τον ομοιόμορφο χαρακτηρισμό των καρκίνων με το φαινότυπο MSI, γνωστοί και ως δείκτες Bethesda [53]. Οι πέντε αυτοί δείκτες περιέχουν είτε μονονουκλεοτιδικές επαναλήψεις (BAT25 και BAT26) ή δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις (D2S123, D5S346 και D17S250), εντοπίζονται σε διαφορετικές χρωμοσωμικές περιοχές του γονιδιώματος και ενδείκνυται να χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο του φαινοτύπου MSI.

Πιο συγκεκριμένα ο δείκτης BAT25 αντιστοιχεί σε μία περιοχή με 25 πολυ(T) επαναλήψεις και εντοπίζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 4q12 στο ιντρόνιο 16 του ογκογονιδίου C-kit. Ο δείκτης BAT26 αντιστοιχεί σε μία περιοχή 26 πολυ(A) επαναλήψεων και εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 2p16 στο ιντρόνιο 5 του γονιδίου hMSH2. Ο δείκτης D2S123, εντοπίζεται στην περιοχή 2p16-p21, περιοχή παρακείμενη του γονιδίου hMSH2 και φέρει δινουκλεοτιδικές (CA) επαναλήψεις με την μορφή (CA)₁₃TA(CA)₁₅. Ο δείκτης D5S346 εντοπίζεται στην περιοχή 5q21-q22 του γονιδίου APC και φέρει 26 πολυ(CA) επαναλήψεις. Τέλος ο δείκτης D17S250 εντοπίζεται στην περιοχή 17q11.2-q12, περιοχή παρακείμενη του γονιδίου P53 και φέρει 16 πολυ(CA) επαναλήψεις.

Η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA αποδεικνύεται με έλεγχο του μήκους των μικροδορυφορικών αλληλουχιών έπειτα από πολλαπλασιασμό των αντίστοιχων περιοχών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου, σε δείγματα DNA από τον καρκινικό ιστό (ο οποίος περιέχει >50% καρκινικά κύτταρα) συγκρινόμενα με τα δείγματα DNA του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού και το αίμα. Έτσι, οι όγκοι με αστάθεια σε δύο ή και περισσότερους από τους πέντε αυτούς δείκτες χαρακτηρίζονται ως MSI-υψηλής συχνότητας (MSI-H), ενώ αυτοί με αστάθεια σε έναν ή κανέναν από τους δείκτες αυτούς κατατάσσονται ως MSI-χαμηλής συχνότητας (MSI-L) και MSI-σταθεροί όγκοι (MSS) αντίστοιχα.

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι δινουκλεοτιδικοί δείκτες της μικροδορυφορικής αστάθειας (D2S123, D5S346 και D17S250) είναι περισσότερο ευαίσθητοι στους καρκίνους με τον φαινότυπο MSI-L, ενώ οι μονονουκλεοτιδικοί δείκτες (BAT25 και BAT26) έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα στους MSI-H καρκίνους [54]. Μάλιστα σε μία μελέτη [55] υποστηρίζεται ότι η χρήση και μόνο του δείκτη BAT26, αρκεί για τον προσδιορισμό των καρκίνων με τον φαινότυπο MSI-H, θεωρώντας ότι οι MSI-L όγκοι δεν διαφέρουν σε τίποτα από τους MSS όγκους και επιπλέον δεν έχουν διαγνωστική αξία. Η άποψη αυτή όμως δεν μπορεί να εδραιωθεί αφού πολλές μετέπειτα μελέτες βρίσκουν τόσο μορφολογικές διαφορές όσο και διαφορές στο μοριακό μονοπάτι που ακολουθούν οι όγκοι με τον φαινότυπο MSI-L σε σχέση με αυτούς με τον φαινότυπο MSS [56, 57]. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον Makinen [57], οι MSI-H και κάποιοι MSI-L καρκίνοι του παχέος εντέρου είναι πιο συχνοί στην δεξιά περιοχή του εντέρου (ανιόν, τυφλό) και φέρουν επιπλέον μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF καθώς και μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1 και MGMT, ενώ οι υπόλοιποι MSI-L και MSS καρκίνοι εντοπίζονται στο αριστερό τμήμα του εντέρου (κατιόν, σιγμοειδές) και φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο K-ras, ενώ μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου MGMT παρατηρείται κυρίως στους MSI-L καρκίνους.

Παρά το γεγονός ότι η μικροδορυφορική αστάθεια εντοπίζεται τόσο στους κληρονομικούς μη-πολυποδιακούς καρκίνους του παχέος εντέρου, όσο και στους σποραδικούς καρκίνους του παχέος εντέρου, η κάθε περίπτωση εμφανίζει διαφορετικά χαρακτηριστικά. Το πιο σημαντικό είναι ότι οι καρκίνοι με τον φαινότυπο MSI-H στο σύνδρομο HNPCC, προκαλούνται από μεταλλάξεις στην γαμετική σειρά των γονιδίων του συστήματος MMR [23], ενώ οι σποραδικοί

καρκίνοι του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI-H και MSI-L προκαλούνται λόγω μεθυλίωσης στον υποκινητή και αδρανοποίησης των γονιδίων hMLH1 και MGMT [58].

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι οι σποραδικοί καρκίνοι του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI-H είναι πιο συχνοί στις γυναίκες και μάλιστα σε ηλικία, κυρίως μετά την εμμηνόπαυση [59]. Μία πιθανή εξήγηση γι' αυτό μπορεί να είναι η πτώση των επιπέδων των οιστρογόνων και η εξάντληση των αποθεμάτων σε φυλικό οξύ, τα οποία προάγουν τη μικροδορυφορική αστάθεια αλλά και την μεθυλίωση των περιοχών με υψηλό ποσοστό CpG δινοκλεοτιδίων.

Πολλές μελέτες επισημαίνουν το γεγονός ότι ο φαινότυπος της μικροδορυφορικής αστάθειας στον καρκίνο του παχέος εντέρου, παρέχει χρήσιμες προγνωστικές πληροφορίες, αφού οι ασθενείς με μικροδορυφορικά ασταθή νεοπλασμάτα έχουν καλύτερο ρυθμό επιβίωσης, μειωμένο κίνδυνο μετάστασης στο ήπαρ, καθώς και διαφορετική ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία [60-62]. Ο φαινότυπος της μικροδορυφορικής αστάθειας βοηθάει επίσης στην επιλογή της θεραπευτικής αγωγής στον καρκίνο του παχέος εντέρου και στην εξατομίκευση της χημειοθεραπευτικής αγωγής για κάθε ασθενή [63].

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η χημειοθεραπευτική αγωγή βασισμένη στην 5'-φθοριουρακίλη (5-FU) (αντιμεταβολίτη των πυριμιδινών), είχε ωφέλιμα αποτελέσματα στους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και τον φαινότυπο MSI-L και MSS όχι όμως και σε αυτούς με τον φαινότυπο MSI-H [63, 64]. In vitro πειράματα υποστηρίζουν την άποψη αυτή, αφού κυτταρικές σειρές με τον φαινότυπο MSI έδειξαν μεγαλύτερη αντίσταση στην 5-FU σε σχέση με κυτταρικές σειρές με τον φαινότυπο MSS. Ειδικότερα τα συστατικά του συστήματος MMR αναγνωρίζουν και δεσμεύονται στην 5-FU που έχει δεσμευτεί στο DNA και επάγουν τον κυτταρικό θάνατο, ένα φαινόμενο που απουσιάζει από τους καρκίνους με τον φαινότυπο MSI αφού στην πλειονότητα τους έχουν ελαττωματικό το σύστημα MMR [64, 65]. Πιθανά μία διαφορετική χημειοθεραπευτική προσέγγιση μπορεί να έχει καλύτερα αποτελέσματα σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και τον φαινότυπο MSI-H, γεγονός που υποστηρίζεται και από δύο πρόσφατες μελέτες [60, 66], σύμφωνα με τις οποίες οι ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και τον φαινότυπο MSI-H, είχαν καλύτερη ανταπόκριση στην χημειοθεραπευτική αγωγή με Ιριντεκάνη (Irinotecan) σε σύγκριση με ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και τον φαινότυπο MSI-L και MSS αντίστοιχα, καθώς και πιο μεγάλο χρόνο επιβίωσης (15-17 μήνες).

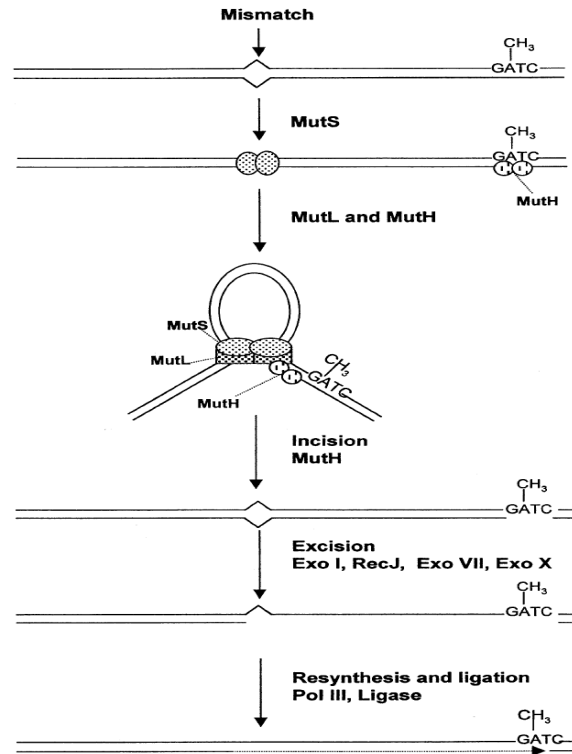
3.2. Το σύστημα επιδιόρθωσης λανθασμένων ζευγών του DNA (Mismatch Repair System, MMR)

Το σύστημα επιδιόρθωσης λανθασμένων ζευγών του DNA (σύστημα MMR) προσδιορίστηκε αρχικά στα βακτήρια. Αποτέλεσμα της αδρανοποίησής του ήταν η αύξηση του ποσοστού μεταλλάξεων εξαιτίας της ανικανότητας επιδιόρθωσης των λαθών κατά την αντιγραφή του DNA [67]. Η σημασία αυτού του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA έχει επιβεβαιωθεί στις αρχές της δεκαετίας του '90, όταν διαπιστώθηκε ότι η αδρανοποίησή του στα αντίστοιχα ανθρώπινα μονοπάτια ήταν η αρχική αιτία του κληρονομικού μη-πολυποδιακού καρκίνου του παχέος εντέρου (HNPCC) [68-71]. Το σύστημα MMR είναι καλύτερα γνωστό για τον ρόλο του στη μετά-αντιγραφική επιδιόρθωση των λαθών που γίνονται από τις DNA πολυμεράσες και έχουν ξεφύγει της επιδιόρθωσης κατά την διορθωτική ανάγνωση. Εκτός από την επιδιόρθωση των λαθών κατά την εισαγωγή των νουκλεοτιδίων, οι πρωτεΐνες του συστήματος MMR εμπλέκονται επίσης στην επισκευή σπασιμάτων στην διπλή έλικα του DNA και στον ανασυνδυασμό [72]. Ειδικότερα, το σύστημα MMR αναγνωρίζει τα λανθασμένα ταιριάσματα στην διπλή έλικα του DNA παρεμποδίζοντας έτσι την ολοκλήρωση του ανασυνδυασμού μεταξύ λαθεμένων αλληλουχιών, προωθώντας κατά συνέπεια τη γενετική σταθερότητα [73]. Το σύστημα MMR, συμμετέχει επίσης σε μια επιπλέον διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA, που σχετίζεται με το μονοπάτι επιδιόρθωσης που συνδέεται με την μεταγραφή [74]. Τέλος μερικά μόρια του συστήματος MMR εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την P53-εξαρτώμενη αποπτωτική απάντηση καθώς και σε μία ποικιλία βλαβών του DNA [75-77].

Το απλούστερο σύστημα MMR που έχει μελετηθεί και μας δίνει ουσιαστικές πληροφορίες για τον τρόπο λειτουργίας των συστημάτων αυτών, είναι της *E. coli*. Τρεις είναι οι ειδικές πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούν το σύστημα MMR της *E. coli*: η MutS, η MutL και η MutH. Ο ρόλος κάθε μιας είναι ο εξής :

Στο πρώτο βήμα αναγνωρίζεται η περιοχή λανθασμένων ζευγών από την MutS, μια ATP-άση που δρα ως ομοδιμερές και κινείται κατά μήκος του DNA αναγνωρίζοντας τις σχηματιζόμενες θηλιές. Μετά τη σύνδεσή της στη θηλιά του DNA, η MutS υφίσταται αλλαγές στη διαμόρφωσή της, οι οποίες της επιτρέπουν παρουσία ATP να αλληλεπιδρά με την MutL. Η MutL, η οποία είναι επίσης μια ATP-άση που δρα ως

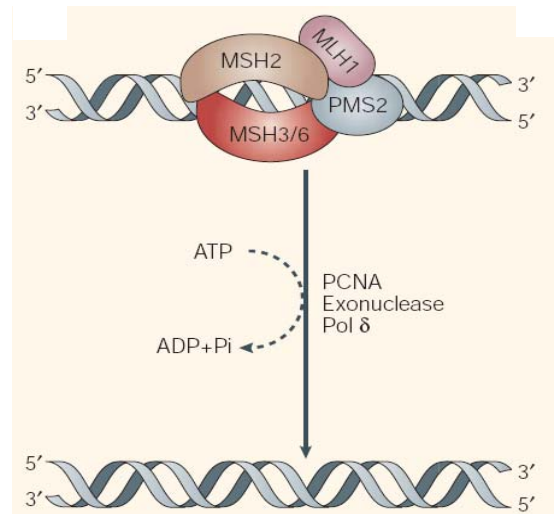
ομοδιμερές, σε συνεργασία με την MutS απομακρύνουν τη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα από το σημείο λανθασμένης σύζευξης. Η MutH είναι μια ενδονουκλεάση η οποία βοηθά στην αναγνώριση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας, μεταξύ των δύο αλυσίδων του DNA, την οποία και αποικοδομεί. Η δράση τους φαίνεται παραστατικά στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Αναπαράσταση της λειτουργίας των πρωτεϊνών MutS, MutL και MutH του συστήματος MMR της *E. Coli* [78].

Όσον αναφορά τον άνθρωπο, υπάρχουν πέντε ανάλογα της MutS (hMSH2 έως hMSH6), τέσσερα ανάλογα της MutL (hMLH1, hMLH3, hPMS1, hPMS2) ενώ δεν έχουν βρεθεί ανάλογα της MutH τόσο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς όσο και τον άνθρωπο. Το σύμπλοκο για την αναγνώριση των λαθών της αντιγραφής αποτελείται από δύο ετεροδιμερή της hMSH2 πρωτεΐνης με τις hMSH3 και hMSH6 πρωτεΐνες, που ονομάζονται hMutSa και hMutSβ και αφορούν αντίστοιχα τις κακοζεύξεις και τις θηλιές [79, 80]. Ένα άλλο ετεροδιμερές (hMutLa) των πρωτεϊνών hMLH1 και hPMS2 αναλαμβάνει τη διασύνδεση του συμπλόκου αναγνώρισης με άλλες πρωτεΐνες, απαραίτητες για την επιδιόρθωση. Αυτές είναι το πολλαπλασιαστικό κυτταρικό πυρηνικό αντιγόνο PCNA, οι DNA πολυμεράσες δ και ε, η DNA μονόκλωνο-προσδετική πρωτεΐνη SSB και πιθανόν κάποιες ελικάσες. Ο ρόλος άλλων πρωτεϊνών και των συμπλόκων τους είτε είναι γνωστός όπως για το ετεροδιμερές των

hMLH1-hMLH3 (επιδιόρθωση θηλιών) [81], είτε ακόμη ερευνάται όπως για το ετεροδιμερές hMutLβ των hMLH1- PMS1 [82, 83]. Το σύμπλεγμα αυτών των πρωτεϊνών και ο τρόπος δράσης τους παριστάνεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5. Ο τρόπος δράσης των γονιδίων του συστήματος MMR στον άνθρωπο [23].

Οι πρωτεΐνες MSH2, MSH3, MSH6, MLH1 και PMS2 αναγνωρίζουν τα λάθη στην αλυσίδα του DNA και τα επιδιορθώνουν με ATP-εξαρτώμενη δράση, η οποία επίσης απαιτεί αλληλεπιδράσεις μαζί με άλλες πρωτεΐνες, όπως είναι το πολλαπλασιαστικό κυτταρικό πυρηνικό αντιγόνο (PCNA), την εξονουκλεάση και την DNA πολυμεράση δ (Pol δ).

Όλα τα προϊόντα των γονιδίων του συστήματος MMR (hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH3 και hMSH6) συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA. Μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του ίδιου του συστήματος MMR καθώς και την εμφάνιση μη-φυσιολογικών αλληλοδιαδοχών σε τμήματα του DNA όπως οι μικροδορυφόροι.

3.2.1. Γενετικές τροποποιήσεις του συστήματος MMR στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Η ανακάλυψη ότι οι μεταλλάξεις στα γονίδια του συστήματος MMR (hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS1, hPMS2 και hMSH3) είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση του συνδρόμου HNPCC, ήταν μια σημαντική ανακάλυψη για τη σκιαγράφηση του συνδρόμου αυτού αλλά και για το σημαντικό ρόλο του συστήματος MMR στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Το 1966, ο Lynch μελέτησε δύο μεγάλες οικογένειες που εμφάνιζαν σειρά πρωτοπαθών καρκίνων στα μέλη τους, με πλειοψηφία το αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου, του ενδομητρίου και του στομάχου, και τα οποία κληρονομούνταν με επικρατή αυτοσωμικό χαρακτήρα [84]. Μερικά έτη αργότερα, η μελέτη σε μεγάλες οικογένειες, χρησιμοποιώντας συνδυαστικές αναλύσεις, έδωσαν μερικές ιδέες σχετικά με την αιτιολογία της κληρονομικότητας του καρκίνου του παχέος εντέρου. Έτσι, βρέθηκαν δύο χρωμοσωμικές περιοχές αυξημένης ευαισθησίας, στο χρωμόσωμα 2p16 και στο 3p21 [85, 86]. Προκειμένου να προσδιοριστούν οι περιοχές απώλειας ετεροζυγωτίας στους όγκους του παχέος εντέρου που εμφανίζουν κληρονομικότητα, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν έναν πίνακα μικροδορυφορικών περιοχών που φάνηκαν να είναι επιρρεπείς σε αστάθεια. Η μικροδορυφορική αστάθεια ήταν χαρακτηριστική των όγκων αυτών και ο μεταλλακτικός τους φαινότυπος προερχόταν από ανεπάρκεια του συστήματος MMR, ανάλογη αυτής των βακτηρίων και της ζύμης. Η παρατήρηση αυτή ενίσχυσε τον προσδιορισμό του hMSH2, το ανθρώπινο ομόλογο του γονιδίου *E. coli* MutS, στο χρωμόσωμα 2p [87, 88] και του hMLH1, το ανθρώπινο ομόλογο του *E. coli* MutL, στο χρωμόσωμα 3p [89] καθώς και την εμφάνιση μεταλλάξεων σε αυτά. Μεταλλάξεις σε ασθενείς με κληρονομικό μη-πολυποδιακό καρκίνο του παχέος εντέρου βρέθηκαν επίσης και στα γονίδια hPMS1 και hPMS2, ομόλογα της MutL [90].

Αναφέρθηκε και προηγουμένως ότι το σύνδρομο HNPCC, αποτελεί περίπου το 1-3% όλων των καρκίνων του παχέος εντέρου και συνδέεται άμεσα με μεταλλάξεις στην γαμετική σειρά σε ένα από τα γονίδια του συστήματος MMR. Οι πιο συχνά παρατηρούμενες μεταλλάξεις εντοπίζονται στα γονίδια hMSH2 και hMLH1 [87-90] όπου οι μεταλλάξεις στην γαμετική τους σειρά φτάνουν το ~90% (και για τα δύο γονίδια μαζί) του συνόλου των μεταλλάξεων που υπολογίζονται στο σύνδρομο HNPCC. Ακολουθεί το γονίδιο hMSH6 του οποίου οι μεταλλάξεις υπολογίζονται στο ~7% του συνόλου των μεταλλάξεων για το ίδιο σύνδρομο. Τέλος ένα πολύ μικρό ποσοστό μεταλλάξεων ανιχνεύθηκε στο γονίδια hPMS2 και σπανίως στο hPMS1 [23, 91].

Η διεισδυτικότητα των μεταλλαγμένων αυτών γονιδίων είναι πολύ υψηλή στο σύνδρομο HNPCC, με κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε ποσοστό πάνω από 80% και μεγαλύτερο για τους άντρες και για τους φορείς μεταλλάξεων στο γονίδιο hMSH2 [92]. Για το λόγο αυτό καθιερώθηκαν και τα κριτήρια Άμστερνταμ και Bethesda που αναφέρθηκαν παραπάνω (Πίνακας 1) ώστε να επιτραπεί ο έγκυρος έλεγχος των

ατόμων υψηλού κινδύνου για το σύνδρομο HNPCC για τυχόν μεταλλάξεις στα γονίδια του συστήματος MMR. Ο προσδιορισμός των μεταλλάξεων στην γαμετική σειρά των γονιδίων hMSH2 ή/και hMLH1 θα μπορούσε να εκτελεσθεί στο 50-70% των οικογενειών που ικανοποιούν τα κριτήρια του Άμστερνταμ για το σύνδρομο HNPCC, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι οικογένειες που δεν πληρούν αυτά τα κριτήρια παρουσιάζουν πολύ χαμηλότερη συχνότητα μεταλλάξεων στα γονίδια του συστήματος MMR [68, 70, 93, 94]. Μέχρι σήμερα, η ανίχνευση της μικροδορυφορικής αστάθειας υψηλής συχνότητας (MSI-H) ή η απώλεια έκφρασης είτε του hMSH2 ή/και του hMLH1 κατά την ανοσοϊστοχημική εξέταση των όγκων, είναι ο καλύτερος δείκτης ένδειξης για την παρουσία μεταλλάξεων στην γαμετική σειρά των γονιδίων του συστήματος MMR για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου με οικογενειακό ιστορικό [95, 96].

Όσον αφορά τον ελληνικό πληθυσμό και τις μεταλλάξεις των γονιδίων hMSH2 και hMLH1 στο σύνδρομο HNPCC, μόνο μία εμπεριστατωμένη μελέτη έχει γίνει στο ερευνητικό κέντρο ΥΓΕΙΑ [97]. Η μελέτη αυτή έγινε σε εννέα ελληνικές οικογένειες ασθενών με το σύνδρομο HNPCC και υψηλή πιθανότητα εμφάνισης μεταλλάξεων στα γονίδια του συστήματος MMR διότι πληρούσαν τα κριτήρια Amsterdam και Bethesda. Σύμφωνα με την μελέτη αυτή, το 77.7% των μεταλλάξεων που βρέθηκαν, οφείλονταν σε μεταλλάξεις στο γονίδιο hMSH2 σε αντίθεση με παρόμοιες μελέτες σε άλλες χώρες [98] όπου η πλειοψηφία των μεταλλάξεων προέρχεται από το γονίδιο hMLH1. Επίσης, ένα άλλο στοιχείο που προέκυψε από την μελέτη αυτή, είναι ότι σε κάθε περιστατικό παρατηρείται μόνο μία μετάλλαξη, σε αντίθεση με τον φιλανδικό πληθυσμό που συνήθως δύο μεταλλάξεις εμφανίζονται σε κάθε περίπτωση και μάλιστα σε ποσοστό $\geq 50\%$ [99].

Σε αντίθεση με τους καρκίνους του συνδρόμου HNPCC, στους σποραδικούς καρκίνους με τον φαινότυπο MSI, το 90% των περιπτώσεων οφείλεται κυρίως στην αδρανοποίηση του γονιδίου hMLH1 λόγω μεθυλίωσης στον υποκινητή του, ενώ ο υποκινητής του γονιδίου hMSH2 φαίνεται να μην είναι επιρρεπής σε μεθυλίωση [29, 100-102]. Επιπλέον στους σποραδικούς όγκους με τον φαινότυπο MSI, μεταλλάξεις στα γονίδια του συστήματος MMR ανιχνεύονται πιο συχνά στο γονίδιο hMLH1 απ' ότι στο hMSH2 [102, 103], ενώ απώλεια ετεροζυγωτίας εμφανίζεται και στα δύο γονίδια σε ποσοστό 20-40% του συνόλου των καρκίνων αυτών [104]. Τέλος, τόσο οι σωματικές μεταλλάξεις όσο και η έλλειψη ετεροζυγωτίας μπορούν να εμφανιστούν

στα γονίδια hMLH1 και hMSH2 ταυτόχρονα με τη μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1 ή και άλλων γονιδίων [102, 105].

3.2.2. Επιγενετικές τροποποιήσεις του συστήματος MMR στον καρκίνο του παχέος εντέρου

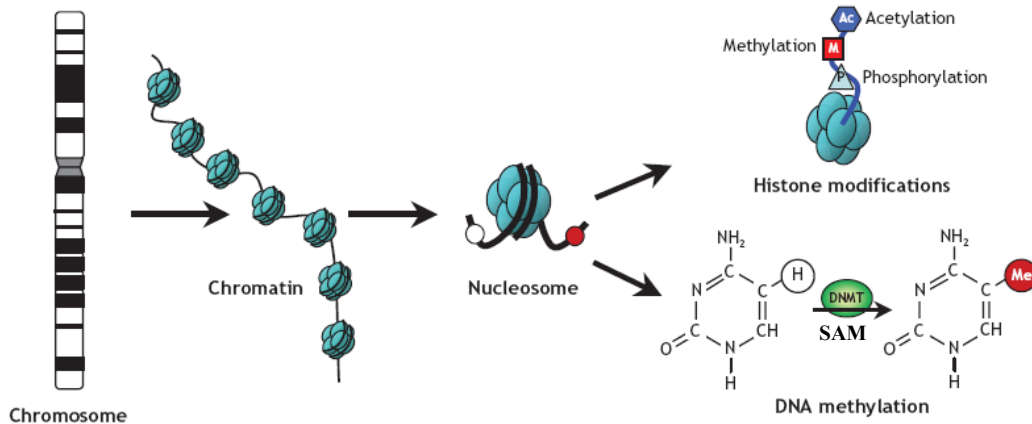
Με την ολοκλήρωση του προγράμματος της πλήρης αλληλούχισης του ανθρώπινου γονιδιώματος, έχουμε μία σχεδόν ολοκληρωμένη λίστα γονιδίων που υπάρχουν στον ανθρώπινο οργανισμό και είναι υπεύθυνα για τις λειτουργίες του. Παρόλα αυτά η πραγματικότητα είναι πολύ πιο πολύπλοκη από την αναφορά ενός απλού καταλόγου των γονιδίων αυτών.

Σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη του καρκίνου, έχει ένα δεύτερο σύστημα το οποίο χρησιμοποιούν τα κύτταρα για να προσδιορίσουν το πού και το πότε ένα συγκεκριμένο γονίδιο θα εκφραστεί κατά την εξέλιξη και την διαφοροποίησή του. Το σύστημα αυτό συμβάλει στο επίπεδο έκφρασης του DNA με την μορφή επιγενετικών μεταβολών και κληρονομείται κατά την κυτταροδιαίρεση χωρίς όμως να συνδυάζεται με αλλαγές στην αλληλουχία του DNA.

Οι πιο γνωστές και μελετημένες επιγενετικές μεταβολές στο DNA των θηλαστικών είναι μέχρι σήμερα η μετά-μεταφραστική τροποποίηση των ιστονών, μέσω ακετυλίωσης, μεθυλίωσης και φωσφορυλίωσης, γεγονός που συνδέεται με την λειτουργικότητα ή μη των γονιδίων [106] καθώς και η μεθυλίωση των κυτοσινών του DNA στο 5-καρβόξυ τελικό τους άκρο, όταν αυτές βρίσκονται σε δινουκλεοτίδια CpG και σε λίγες περιπτώσεις όταν βρίσκονται σε περιοχές CpA και CpT (Εικόνα 6) [107].

Οι επιγενετικές μετατροπές επιδρούν τόσο στο μονοπάτι της χρωμοσωμικής αστάθειας, μέσω της υπομεθυλίωσης και της ενεργοποίησης ογκογονιδίων όπως το c-myc, όσο και στο μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας, προκαλώντας λόγω της υπερμεθυλίωσης, πρόωρη απενεργοποίηση των γονιδίων του συστήματος MMR και επομένως συσσώρευση λαθών στην περιοχή των μικροδορυφόρων, αλλά και στις κωδικοποιούσες περιοχές των γονιδίων στόχων.

Η μεθυλίωση του DNA εμφανίζεται στην 5' θέση των ομάδων κυτοσίνης σε μια αντίδραση που καταλύεται από τις DNA μεθυλοτρανφεράσες (DNMTs) και χρησιμοποιεί τις S-αδενοσυλομεθειονίνες (SAM), ως δότες μεθυλομάδας (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση των επιγενετικών τροποποιήσεων.

Κόκκινοι κύκλοι: μεθυλιωμένες κυτοσίνες, άσπροι κύκλοι: μη-μεθυλιωμένες κυτοσίνες [108].

Στα φυσιολογικά κύτταρα, σχεδόν το 70% όλων των δινουκλεοτιδίων CpG του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι μεθυλιωμένα. Η φυσιολογική μεθυλίωση του DNA συμβαίνει τόσο σε επαναλαμβανόμενες περιοχές που περιέχουν δορυφορικό DNA όσο και σε παρασιτικά στοιχεία, όπως τα μακρά διάσπαρτα μεταθετά στοιχεία (LINEs), τα κοντά διάσπαρτα μεταθετά στοιχεία (SINEs) και τους ενδογενείς ρετροϊούς και λειτουργεί σαν μία φυσική μηχανή προστασίας του DNA από αυτά [109].

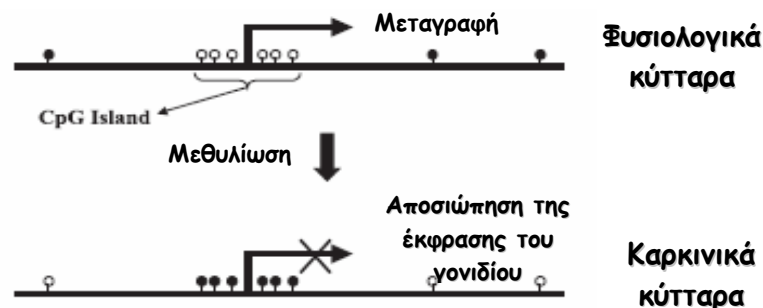
Στις περισσότερες περιπτώσεις οι νησίδες CpG, δηλαδή περιοχές 200bp έως και 1kb με υψηλό ποσοστό δινουκλεοτιδίων CpG, που εντοπίζονται κυρίως στον υποκινητή των γονιδίων, αλλά και σε μη μεταφραζόμενες περιοχές ή και στο εξόνιο 1 κάποιων γονιδίων, είναι επί το πλείστον μη μεθυλιωμένες, μία κατάσταση απαραίτητη για την λειτουργικότητα και τη μεταγραφή των γονιδίων αυτών.

Συσχέτιση μεταξύ μεθυλίωσης του DNA και εμφάνιση του καρκίνου, αποδείχτηκε για πρώτη φορά το 1983 από τους Feinberg και Vogelstein όταν παρατήρησαν σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα υπομεθυλίωση του γονιδίου H-gas [110]. Παράλληλα το 1989 παρατηρήθηκε σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα, υπερμεθυλίωση στις νησίδες CpG του υποκινητή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου Rb το οποίο είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη του Ρετινοβλαστώματος [111].

Επομένως, δύο είναι οι επιγενετικοί μηχανισμοί με τους οποίους τα φυσιολογικά κύτταρα θα μετατραπούν σε καρκινικά. Η μεταγραφική αποσιώπηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων λόγω μεθυλίωσης των νησίδων CpG στον υποκινητή τους και η γενωμική υπομεθυλίωση στο σύνολο του γονιδιώματος. Την

ίδια στιγμή λοιπόν που κάποιες νησίδες CpG υπόκεινται σε υπερμεθυλίωση, το γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων υπόκειται σε δραματική ολική υπομεθυλίωση.

Τα κακοήθη κύτταρα μπορούν να έχουν 20%-60% λιγότερες μέθυλοκυτοσίνες απ' ό τι τα ίδια φυσιολογικά κύτταρα στο σύνολο του DNA τους [112]. Η έλλειψη των μεθυλομάδων σχετίζεται κυρίως με υπομεθυλίωση στο «σώμα» (κωδικοποιούσες περιοχές και ιντρόνια) των γονιδίων, καθώς και με απομεθυλίωση των επαναλαμβανόμενων DNA αλληλουχιών οι οποίες υπολογίζονται στο 20%-30% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Ο βαθμός υπομεθυλίωσης του DNA αυξάνεται κατά την διάρκεια όλων των σταδίων της καρκινογένεσης, από την καλοήγη υπερπλασία ως τον επιθετικό καρκίνο [113]. Η υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, οδηγεί σε απενεργοποίηση της μεταγραφικής τους ικανότητας και σε αδυναμία εκτέλεσης των φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών που αυτά επιτελούν (Εικόνα 7). Με τον τρόπο αυτό, η υπερμεθυλίωση συμβάλλει στην εμφάνιση πολλών από τις χαρακτηριστικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων όπως η είσοδος στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, η αποφυγή της απόπτωσης, η επίδραση στην επιδιόρθωση του DNA, η αγγειογένεση και η έλλειψη της κυτταρικής αναστολής [114].



Εικόνα 7. Μηχανισμός αποσιώπησης της έκφρασης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων μέσω μεθυλίωσης στον υποκινητή τους στα καρκινικά κύτταρα.

Μαύροι κύκλοι: μεθυλιωμένες κυτοσίνες, άσπροι κύκλοι: μη-μεθυλιωμένες κυτοσίνες.

Οι νησίδες CpG, στην περιοχή του υποκινητή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, είναι φυσιολογικά μη-μεθυλιωμένες, όπως και σε όλα τα άλλα γονίδια. Η υπερμεθυλίωση που παρατηρείται στα καρκινικά κύτταρα, οδηγεί στην αποσιώπηση των γονιδίων αυτών καθώς και σε αλλαγές στην δομή της χρωματίνης (υποακετυλίωση των ιστονών). Είναι εντυπωσιακό το γεγονός ότι δεν μεθυλιώνονται όλα τα γονίδια σε οποιοδήποτε τύπο καρκίνου, αλλά υπάρχει επιλεκτική μεθυλίωση

αυτών ανάλογα με την περιοχή του ιστού που έχει προσβληθεί, καθώς και ότι ο αριθμός των υπερμεθυλιωμένων γονιδίων αυξάνεται ανάλογα με τη δυναμικότητα και την επιθετικότητα της κακοήθειας [113, 115]. Πάντως μέχρι σήμερα δεν είναι ξεκάθαρο γιατί κάποια γονίδια υπερμεθυλιώνονται σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, ενώ κάποια άλλα με τις ίδιες ιδιότητες (τυπική περιοχή με νησίδες CpG στον υποκινητή τους, έλλειψη έκφρασης σε καρκίνους και αδυναμία ανίχνευσης μεταλλάξεων) παραμένουν αμεθυλιώτα. Μόνο υποθέσεις μπορούν να γίνουν, του τύπου ότι πρόκειται για μία επιλεκτική και μία στοχευόμενη κατάσταση, που στην περίπτωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων γίνονται ταυτόχρονα.

Από την άλλη, μία σειρά γονιδίων που εμπλέκονται αντίστοιχα στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στην επιδιόρθωση του DNA, στην καρκινική διήθηση, στον ανασχηματισμό της χρωματίνης, στον μηχανισμό μεταβίβασης κυτταρικού σήματος, καθώς και στη μεταγραφή και την απόπτωση, είναι γνωστά ότι υπόκεινται σε μεθυλίωση και απενεργοποιούνται σε σχεδόν όλους τους τύπους καρκίνου. Αυτό, δίνει στα καρκινικά κύτταρα ένα μεγάλο πλεονέκτημα, αυξάνοντας την γενωμική τους αστάθεια (αφήνοντάς τους έτσι να αποκτήσουν επιπλέον γενετικές αλλαγές) και ταυτόχρονα τους επιτρέπει να οδηγήσουν στη μετάσταση. Στους καρκίνους με γνωστή πορεία εξέλιξης, όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου, η ασυνήθιστη υπερμεθυλίωση είναι εμφανής σε πρώιμα στάδια της πορείας καρκινογένεσης, δείχνοντας έτσι ότι θα οδηγήσει άμεσα σε μετασχηματισμό και ότι δεν είναι ένα όψιμο γεγονός που προκύπτει ως αποτέλεσμα γενετικών τροποποιήσεων [116]. Το γεγονός αυτό, καθιστά τον έλεγχο της μεθυλίωσης στις νησίδες CpG, ως έναν πρώιμο δείκτη της εμφάνισης και εξέλιξης των διαφόρων τύπων καρκίνων.

Πρόσφατα έχει συνδεθεί η μεθυλίωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων με δύο μετατροπές κλειδιά των ιστονών, την αποακετυλίωση και την μεθυλίωση της λυσίνης-9, κατάλοιπο της ιστόνης H3. Οι δύο αυτές διαδικασίες γίνονται ταυτόχρονα και αμοιβαία, καθώς επηρεάζουν το ίδιο σημείο. Η ακετυλίωση της λυσίνης-9 συσχετίζεται με την γονιδιακή έκφραση, ενώ η μεθυλίωσή της συσχετίζεται με τη γονιδιακή αποσιώπηση. Τέτοιες αλλαγές έχουν παρατηρηθεί και σε πολλούς καρκίνους του παχέος εντέρου [117]. Θεωρείται μάλιστα ότι η μεθυλίωση στους υποκινητές των ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως των P16 (CDKN2A), hMLH1 και MGMT, συνεπάγεται άμεσα αλλαγές στη δομή της χρωματίνης, όπως μείωση της ακετυλίωσης στη λυσίνη-9 και της μεθυλίωσης στη λυσίνη-4 και την παράλληλη αύξηση στη μεθυλίωση της λυσίνης-9 [118, 119], υποστηρίζοντας έτσι ότι η

μεθυλίωση του DNA και η μετατροπές των ιστονών είναι άμεσα συνυφασμένες στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Η μεθυλίωση στις νησίδες CpG, είναι ένα κοινό επιγενετικό φαινόμενο στις νεοπλασίες του παχέος εντέρου και ένας μηχανισμός αποσιώπησης πολλών γνωστών γονιδίων. Η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1 αποτελεί ένα κλασσικό παράδειγμα αυτού του φαινομένου. Ένα μεγάλο φάσμα γονιδίων έχουν βρεθεί ότι υφίστανται ασυνήθιστη υπερμεθυλίωση στον υποκινητή τους, στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Σε αυτά περιλαμβάνονται γνωστά ογκοκατασταλτικά γονίδια (π.χ. P16, P14), γονίδια που συνδέονται με τον αποπτωτικό θάνατο (π.χ. DAPK), γονίδια του συστήματος MMR (π.χ. hMLH1 και MGMT), γονίδια που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt (π.χ. SRFP), γονίδια που σχετίζονται με την επιθηλιακή διαφοροποίηση (π.χ. GATA4, 5), γονίδια συνδεδεμένα με p53 εξαρτώμενη απόκριση σε βλάβες (π.χ. HIC1), καθώς και γονίδια αποκρινόμενα σε εξωκυττάριες αντιδράσεις (cell-matrix interactions) (π.χ. TIMP3), με διαφορετικά ποσοστά εμφάνισης μεθυλίωσης για το κάθε ένα [118]. Μάλιστα, σε κάποια από αυτά τα γονίδια, η μεθυλίωση φαίνεται να είναι άμεσα συνυφασμένη με την ηλικία. Για παράδειγμα, η παρουσία μεθυλίωσης στον υποκινητή του hMLH1 και του P14, είναι στενά συνδεδεμένη με την ηλικία σε φυσιολογικά επιθήλια παχέος εντέρου και εντοπίζεται συνήθως σε ηλικιωμένα άτομα (Πίνακας 2).

Gene	Map	Expressed in colon?	Age-related methylation? (Quantitative)	Age-related methylation? (Sensitive)	Methylation in colon cancer (%)
COX2	1p25.2-3	Yes	Yes	—	10-20
CSPG2	5q12-14	Yes	Yes	—	70
EGFR	7p12	Yes	Yes	—	0
ER-alpha	6q25.1	Yes	Yes	—	> 90
HPP1/TPEF	2q33	Yes	Yes	—	60-80
IGF2 (P2-4)	11p15.5	Yes	Yes	—	70
MYOD1	11p15.4	No	Yes	—	> 90
N33	8p22	Yes	Yes	—	80
PAX6	11p13	Yes	Yes	—	70
RARB1	3p24	No	Yes	—	80
RARB2	3p24	Yes	Yes	—	10-30
RASSF1	3p21.3	Yes	Yes	—	50
THBS2	6q27	Yes	Yes	—	50
hMLH1	3p21.3	Yes	No	Yes	10-20
P14/ARF	9p21	Yes	No	Yes	10-20
APC	5q21	Yes	No	ND	10-20
CACNA1G	17q22	Yes	No	ND	10-20
CALCA	11p15	No	No	ND	50
HIC1	17p13.3	Yes	No	ND	50
HLTF	3q25-26	No	No	ND	50
LKB1/STK11	19p13.3	Yes	No	ND	5-10
MDR1	7q21.1	Yes	No	ND	20-30
⁶ O-MGMT	10q26	Yes	No	ND	30
P16 (CDKN2A)	9p21	Yes	No	ND	20-30
RIZ1	1p36	No	No	ND	10-20
THBS1	15q15	Yes	No	ND	10-20
TIMP3	22q12-13	Yes	No	ND	27
WT1	11p13	?	No	ND	50

ND, not done.

Πίνακας 2. Επιλεγμένα γονίδια που επηρεάζονται από την μεθυλίωση στον υποκινητή τους [118].

Η μεθυλίωση των νησίδων CpG, μπορεί να εντοπιστεί σε διάφορα στάδια της εξέλιξης του καρκίνου. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, έχουν εντοπιστεί δύο είδη μεθυλίωσης, ανάλογα και με τον ιστό που έχει προσβληθεί, ο τύπος A και ο τύπος C. Η μεθυλίωση των νησίδων CpG τύπου A (ηλικιακά εξαρτώμενη), εντοπίζεται τόσο στο φυσιολογικό επιθήλιο του εντέρου όσο και στα καρκινώματα του παχέος εντέρου και αυξάνεται με την ηλικία. Ο τύπος αυτός φαίνεται να μην σχετίζεται με την καρκινογένεση. Αντίθετα, η μεθυλίωση των νησίδων CpG τύπου C συμβαίνει αποκλειστικά στον καρκίνο του παχέος εντέρου και είναι προφανές ότι συμβάλει στην καρκινογένεση.

Το 1999 η ερευνητική ομάδα του Toyota [120] έλεγξε τους καρκίνους του παχέος εντέρου με βάση τον φαινότυπο της μεθυλίωσης των νησίδων CpG (CIMP), ελέγχοντας μία σειρά γνωστών γενετικών τόπων που είναι μεθυλιωμένες στον καρκίνο (γνωστές ως MINT) και φέρουν αλληλουχίες CpG, από καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου, καθώς και τη μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1 και P16. Έτσι κατατάσσει τον φαινότυπο μεθυλίωσης (CIMP) σε τύπου A όταν κάποιες από τις περιοχές (MINT 4, 6, 23, 32) είναι μεθυλιωμένες και εμφανίζονται τόσο σε φυσιολογικούς ιστούς όσο και σε άτομα μεγάλης ηλικίας και σε τύπου C όταν κάποιοι από τους γενετικούς τόπους (MINT 1, 2, 12, 25, 31) είναι μεθυλιωμένοι και εμφανίζονται αποκλειστικά σε καρκίνους και μη μεθυλιωμένοι στους περισσότερους φυσιολογικούς ιστούς. Επιπλέον, η ίδια ερευνητική ομάδα, διαχωρίζει τον φαινότυπο CIMP, σε CIMP+ όταν υπάρχουν ≥ 3 γενετικοί τόποι μεθυλιωμένοι και CIMP-I (ενδιάμεσοι) ή CIMP-L (χαμηλοί) όταν ≥ 2 γενετικοί τόποι είναι μεθυλιωμένοι και σε CIMP- όταν λιγότερο από 2 γενετικοί τόποι είναι μεθυλιωμένοι. Επιπλέον, για να εντοπίσουν πότε ο φαινότυπος CIMP επιδρά στη μεθυλίωση του υποκινητή των γονιδίων hMLH1 και P16, έλεγξαν την μεθυλίωσή τους στις διάφορες κατηγορίες CIMP. Όπως προέκυψε, όλοι οι καρκίνοι με μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1 έχουν τον φαινότυπο CIMP+ καθώς και τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας MSI-H, ενώ η εμφάνιση μεθυλίωσης στο γονίδιο P16 ακόμη και σε φυσιολογικά επιθήλια με τον φαινότυπο CIMP+ οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πολλοί CIMP+ καρκίνοι προέρχονται από CIMP+ πολύποδες. Φαίνεται λοιπόν ότι ο φαινότυπος CIMP+ συνδέεται με τη μεθυλίωση γνωστών γονιδίων και είναι ένα πρώιμο στάδιο στον καρκίνο του παχέος εντέρου που οδηγεί στην εμφάνιση και την εξέλιξη του καρκίνου μέσω αποσιώπησης των γονιδίων αυτών. Η σύνδεση του φαινοτύπου MSI με τον φαινότυπο CIMP

εξηγείται από τη μεθυλίωση του γονιδίου hMLH1 στον φαινότυπο CIMP+. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οι CIMP+ καρκίνοι εμφανίζονται σε πρώιμο στάδιο σε σχέση με τους CIMP- καρκίνους.

Το 1997 η ερευνητική ομάδα του Ahuja [121] βρήκε υψηλή συσχέτιση μεταξύ της μικροδορυφορικής αστάθειας και της μεθυλίωσης των νησίδων CpG, καθώς και ότι η μεθυλίωση αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα κυρίως των σποραδικών καρκίνων του παχέος εντέρου και όχι τόσο των καρκίνων του συνδρόμου HNPCC. Αργότερα αναγνωρίστηκε ότι η μεθυλίωση στις νησίδες CpG επιδρά στη εξέλιξη του 15% των σποραδικών καρκίνων, που επίσης ακολουθεί το μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας [122].

Από το 1999 και μετά οι περισσότερες αναφορές κατατάσσουν τους όγκους με τον φαινότυπο MSI και μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1 σε CIMP+. Παρόλα αυτά, κάποιοι τέτοιοι καρκίνοι δεν εμφανίζουν μεθυλίωση στο γονίδιο hMLH1 και κατατάσσονται ως CIMP-L ή CIMP-. Για το λόγο αυτό γίνεται έλεγχος της μεθυλίωσης στους υποκινητές και άλλων γνωστών γονιδίων που συμβάλουν στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Έτσι το 2004 η ερευνητική ομάδα του Wynter ανακάλυψε ότι η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου MGMT σε συνδυασμό με τον CIMP+ φαινότυπο και μερικές φορές σε συνδυασμό με μεταλλάξεις στο γονίδιο K-ras είναι προάγγελος καρκίνων με τον φαινότυπο MSI-L [123]. Μία πρόσφατη εργασία μάλιστα, που ασχολείται με τον φαινότυπο CIMP στον καρκίνο του παχέος εντέρου, αναφέρει ότι μία ομάδα τεσσάρων μόνο γονιδίων (RUNX3, CACNA1G, IGF2 και hMLH1) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ειδικοί και υψηλής ευαισθησίας δείκτες για τον προσδιορισμό του φαινοτύπου CIMP+ στον καρκίνο του παχέος εντέρου [124].

Είναι προφανής η στενή αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών μεταλλάξεων και επιγενετικών μετατροπών στο εσωτερικό των νεοπλαστικών κυττάρων. Για παράδειγμα η αποσιώπηση του ενός αλληλομόρφου, ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου λόγω μεθυλίωσης μπορεί να συμβάλλει στην εμφάνιση του δεύτερου απαιτούμενου “χτυπήματος” (“double hit”) στην περίπτωση ύπαρξης μετάλλαξης στην αλληλουχία του άλλου αλληλομόρφου.

Η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1, που ακολουθείται από μεταγραφική απενεργοποίηση του γονιδίου αυτού, εμφανίζεται σε ποσοστό περίπου 80% στους σποραδικούς καρκίνους με τον φαινότυπο MSI. Μάλιστα πολλές μελέτες αποδεικνύουν ότι ο η μεθυλίωση στον υποκινητή του hMLH1 είναι άμεσα

συνδεδεμένη με τον φαινότυπο της αστάθειας των μικροδορυφόρων. Σε μία μελέτη αποδείχθηκε ότι το 70% των καρκίνων του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI-H εμφάνισε μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1, ενώ στην περίπτωση των καρκίνων με τον φαινότυπο MSI-L και MSS, μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1 παρατηρήθηκε σε ποσοστό 19% και 18% αντίστοιχα [125]. Άλλες μελέτες ανέφεραν πρόωρη εμφάνιση μεθυλίωσης στον υποκινητή του hMLH1, ακολουθούμενη από αποσιώπηση του γονιδίου αυτού αλλά και μικροδορυφορική αστάθεια, σε πολύ αρχικά στάδια εξέλιξης του καρκίνου του παχέος εντέρου, όπως είναι οι υπερπλαστικοί πολύποδες, με τελικό στάδιο τις βαθμιαίες γενετικές και παθολογικές αλλαγές που θα καταλήξουν στην εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου [126].

Αν και η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1 είναι το χαρακτηριστικό γνώρισμα του μονοπατιού με τον φαινότυπο MSI, στον καρκίνο του παχέος εντέρου, επιγενετική αποσιώπηση και άλλων γονιδίων είναι επίσης εμφανής, όπως του γονιδίου BRAF σε σποραδικούς καρκίνους με τον φαινότυπο MSI και του γονιδίου K-ras στους MSI-L καρκίνους. Παρόλα αυτά μεταλλάξεις σε τέτοια γονίδια παρατηρούνται σπάνια, σε σύνδρομα όπως το HNPCC [127].

Πολλές πληθυσμιακές μελέτες σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, έδειξαν ότι οι καρκίνοι με μεθυλίωση στις νησίδες CpG είναι κλινικά, παθολογικά και γενετικά σαφώς προσδιορισμένοι. Έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τους καρκίνους που φέρουν τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας, όπως την κακή διαφοροποίηση, τις έσω- επιθηλιακές λεμφοκυτταρικές διεισδύσεις, τη συνήθη παρουσία στο δεξί τμήμα του παχέος έντερο, τις μεγάλες εστίες, την κολλώδη μορφή καθώς και μία υψηλή συχνότητα εμφάνισης σε ηλικιωμένα άτομα και γυναίκες [128].

Ωστόσο, σχεδόν το 50% των καρκίνων που παρουσιάζουν τον φαινότυπο της μεθυλίωσης (CIMP) χαρακτηρίζεται από μικροδορυφορική σταθερότητα (MSS), ένα γεγονός που δυσκολεύει την σωστή διάγνωση των ασθενών και καθιστά αναγκαία την περαιτέρω έρευνα.

Επιγενετικές και γενετικές αλλαγές, μόνες τους ή σε συνεργασία μεταξύ τους, συμμετέχουν στην έναρξη και εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Οι επιγενετικές αλλαγές και συγκεκριμένα η μεθυλίωση του DNA, γίνονται όλο και περισσότερο αναγνωρίσιμες ως ένας αιτιολογικός μηχανισμός στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου. Αν και ο μηχανισμός που προκαλεί την έναρξη των επιγενετικών αλλαγών χρήζει περαιτέρω διερεύνηση, ο χαρακτηρισμός των γονιδίων που

εμφανίζουν έκτροπη μεθυλίωση στους καρκίνους του παχέος εντέρου, με συνέπεια να επηρεάζεται η έκφρασή τους, προχωρά με γρήγορο ρυθμό. Η γνώση των γονιδίων που είναι επιρρεπή σε μεθυλίωση τόσο σε πρώιμα όσο και σε επόμενα στάδια της εξέλιξης του καρκίνου του παχέος εντέρου, με την βοήθεια των τεχνικών ελέγχου της μεθυλίωσης, που συνεχώς εξελίσσονται και απλοποιούνται κάνοντας την χρήση τους δυνατή σε κάθε εργαστήριο και νοσοκομείο, είναι ένα μεγάλο βήμα στην ανακάλυψη περισσότερων δεδομένων για τις αιτίες της καρκινογένεσης.

Επιπλέον, πρέπει να γίνει κατανοητό ότι η έρευνα δεν έχει μόνο ως στόχο της εύρεση της αιτιολογίας μία ασθένειας αλλά και την καταπολέμησή της. Για το λόγο αυτό, η ανακάλυψη των επιγενετικών αλλαγών έδωσε το έναυσμα στη φαρμακολογία για τη σχεδίαση κατάλληλων φαρμάκων τα οποία να επεμβαίνουν στο DNA και να αναστέλλουν είτε την υπερμεθυλίωση των γονιδίων, είτε την αλλαγή στη διαμόρφωση των ιστονών ανοίγοντας έτσι νέους ορίζοντες στη θεραπεία του καρκίνου.

3.3. Συνέπεια του συστήματος MMR και της μικροδορυφορικής αστάθειας: η λειτουργική αδρανοποίηση των γονιδίων στόχων

Υπάρχουν πολλά στοιχεία που αποδεικνύουν ότι οι επαναλαμβανόμενες ακολουθίες, όπως οι μικροδορυφόροι, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στις απαλείψεις ή προσθήκες νουκλεοτιδίων κατά τη διάρκεια της αντιγραφής. Πολυάριθμες μη-κωδικοποιούσες μονονουκλεοτιδικές και δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις είναι διάσπαρτες στο γονιδίωμα, συσσωρεύοντας αλλαγές κατά την εξέλιξη των όγκων λόγω κακής λειτουργίας του συστήματος MMR και είναι συνήθως χρήσιμες για την αξιολόγηση του φαινοτύπου της μικροδορυφορικής αστάθειας [53, 55]. Επαναλαμβανόμενες ακολουθίες, που είναι συνήθως μονονουκλεοτιδικά τμήματα, μέσα σε λειτουργικές περιοχές γονιδίων γίνονται πολύ συχνά στόχοι για μεταλλάξεις μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις ελαττωματικής λειτουργίας του συστήματος MMR, οδηγώντας έτσι σε κατακερματισμένες πρωτεΐνες [129, 130].

Πράγματι, μερικά από τα γονίδια που διαθέτουν τέτοιες αλληλουχίες βρέθηκαν μεταλλαγμένα στους όγκους του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI. Τα γονίδια αυτά έχουν καθοριστικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο. Κωδικοποιούν

πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος όπως οι TGFβRII, IGF1R και PTEN [44, 131, 132], στην απόπτωση και στη φλεγμονή όπως οι BAX και Κασπάση-5 [45, 46], στη ρύθμιση της μεταγραφής όπως οι E2F4 και TCF-4 [133, 134] και στην επιδιόρθωση του DNA όπως οι hMSH6, hMSH3, hMLH3, MED-1, RAD50, DNA- PKcs και BLM [55, 130, 135-138].

Η συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων ποικίλλει ανάλογα με το γονίδιο που ελέγχεται και τη φάση εξέλιξης των καρκίνων κατά την οποία μελετώνται οι αρχικοί όγκοι ή οι κυτταρικές σειρές [139, 140]. Για παράδειγμα, οι μεταλλάξεις μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης στην κωδικοποιούσα πολυA(10) περιοχή του TGFβRII εμφανίζονται σε εξαιρετικά υψηλή συχνότητα (75-90%) στους καρκίνους του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας τόσο στους ασθενείς με το σύνδρομο HNPCC όσο και σε ασθενείς με σποραδικό καρκίνο, καθώς επίσης και σε κυτταρικές σειρές καρκίνου παχέος εντέρου. Επιπλέον, μεταλλάξεις εισδοχών ή ελλείψεων στις μονονουκλεοτιδικές επαναλήψεις των κωδικοποιούντων περιοχών των γονιδίων BAX(G8), TCF-4(A9), IGF1R(G8) και hMSH6(C8) εμφανίζονται επίσης σε ένα σημαντικό ποσοστό στους όγκους του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI. Άλλα γονίδια, όπως τα hMSH3(A8), casp-5(A10) και RAD50(A9) βρέθηκαν λιγότερο συχνά αδρανοποιημένα σε πρωτογενείς όγκους, αλλά παρουσίασαν υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης σε κυτταρικές σειρές καρκίνου παχέος εντέρου [129, 130].

Για τον λόγο αυτό, γονίδια που φέρουν μονονουκλεοτιδικές επαναλήψεις σε κωδικοποιούσες περιοχές και τα οποία υφίστανται μεταλλάξεις σε καρκίνους με φαινότυπο MSI, ονομάζονται και γονίδια στόχοι της καρκινογένεσης που ακολουθεί το μονοπάτι της μικροδορυφορικής αστάθειας.

Οι περισσότερες μελέτες πάνω σε καρκίνους με τον φαινότυπο MSI αναφέρονται σε μία ομάδα πέντε γονιδίων στόχων που εμφανίζουν και την μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεων. Αυτά είναι τα γονίδια TGFβRII, IGF1R, BAX, hMSH3 και hMSH6, τα οποία φαίνεται να παρουσιάζουν την ίδια μορφή αλλαγών (εισδοχών ή ελλείψεων) στις κωδικοποιούσες επαναλαμβανόμενες περιοχές τους (A)10, (G)8, (G)8, (A)8 και (C)8 αντίστοιχα [52].

Το γονίδιο TGFβRII είναι κυρίως μεταλλαγμένο στις περισσότερες κυτταρικές σειρές και όγκους του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI-H και εμφανίζεται συνήθως ως έλλειψη 1 ή 2 ζευγών βάσεων στην κωδικοποιούσα πολυA(10) περιοχή του εξονίου 3 του γονιδίου, προκαλώντας μία μετάλλαξη

μετατόπισης πλαισίου. Εξαιτίας αυτού, η απενεργοποίηση του TGFβRII (σε ποσοστό που φτάνει το 90%) έχει προταθεί ως η πιο πρόιμη γονιδιακή αλλαγή στους καρκίνους του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI-H και συμβαίνει αμέσως μετά την έναρξη αδρανοποίησης του συστήματος MMR κατά την πορεία της καρκινογένεσης [46, 52, 141]. Ο TGFβRII, είναι ένας ισχυρός αρνητικός ρυθμιστής στην αύξηση των επιθηλιακών κυττάρων και σε κυτταροκαλλιέργειες μπορεί να προκαλέσει πλήρη αναστολή στην αύξηση των μη μετασχηματισμένων επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου, καθώς επίσης και να επάγει την απόπτωση των κυττάρων αυτών. Από την άλλη, ο πλήρης κακοήθης μετασχηματισμός των επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου συνδέεται στενά με την απόκτηση ανθεκτικότητας του γονιδίου TGFβRII [44].

Το γονίδιο IGF1R, είναι ένας υποδοχέας της κυτταρικής επιφάνειας, ο οποίος επιτρέπει σε μία πρωτεΐνη σερίνης B (granzyme B) να εισέλθει στα κύτταρα και να επάγει την απόπτωση των στοχευμένων κυττάρων. Μεταλλάξεις στην κωδικοποιούσα περιοχή των 8 επαναλαμβανόμενων γουανινών, πολυG(8), που εντοπίζεται στο εξόνιο 28 του γονιδίου, οδηγούν στο σχηματισμό ενός πρόωρου κωδικόνιου τερματισμού με αποτέλεσμα τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα, που επάγουν την απόπτωση των στοχευμένων κυττάρων, να αποτρέπονται [142]. Τελικό αποτέλεσμα αυτού είναι η επαγωγή της κυτταρικής αύξησης και κατ' επέκταση της καρκινογένεσης.

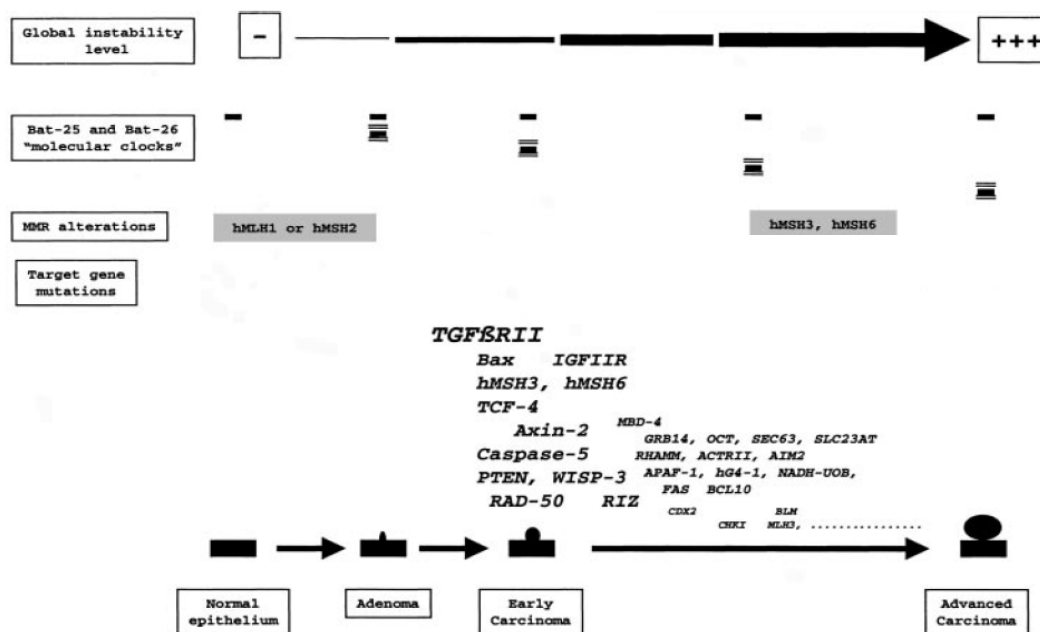
Το προ-αποπτωτικό γονίδιο BAX (μέλος της οικογένειας των BCL2 πρωτεϊνών που συνδέεται με το X χρωμόσωμα) είναι συχνά απενεργοποιημένο στους σποραδικούς καρκίνους του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI, λόγω μεταλλάξεων μετατόπισης πλαισίου στην κωδικοποιούσα περιοχή πολυG(8), που εντοπίζεται στο εξόνιο 3 του γονιδίου και οι οποίες οδηγούν στη δημιουργία κολοβής πρωτεΐνης και τη μείωση ή απενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου αυτού [45]. Επιπλέον η ανεπάρκεια του γονιδίου BAX σε μελέτες που έγιναν σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξε ότι επιταχύνει την ανάπτυξη των όγκων και μειώνει την απόπτωση [143].

Τα γονίδια hMSH3 και hMSH6, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, έχουν λειτουργικό ρόλο στο σύστημα MMR και η εμφάνιση μεταλλάξεων στα γονίδια αυτά ενδεχομένως να επιταχύνουν την καρκινογένεση λόγω αυξημένου ποσοστού μεταλλάξεων στο σύνολο του ανθρώπινου γονιδιώματος. Σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες [138, 144] οι πιο επιρρεπείς περιοχές για μεταλλάξεις στα γονίδια hMSH3 και hMSH6, στους καρκίνους του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI, είναι οι

πολυΑ(8) και πολυC(8) που εντοπίζονται στο εξόνιο 7 και εξόνιο 8 των γονιδίων αντίστοιχα. Μάλιστα κάποιες μελέτες πάνω στην αστάθεια των γονιδίων αυτών καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η απενεργοποίηση λόγω μεταλλάξεων στις κωδικοποιούσες αυτές περιοχές του hMSH3 ή/και στο hMSH6 οδηγούν σε επιπλέον αύξηση της αστάθειας που χαρακτηρίζει τους καρκίνους με τον φαινότυπο MSI παίζοντας έτσι έναν πολύ σημαντικό παράγοντα στην καρκινογένεση [52, 130, 138].

Βέβαια, για να χαρακτηρισθούν κάποια γονίδια ως γονίδια στόχοι της γενετικής αστάθειας στους ανθρώπινους καρκίνους που σχετίζονται με τον φαινότυπο MSI, έχουν προταθεί κάποια κριτήρια όσον αφορά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που θα πρέπει να διαθέτουν [53]. Έτσι τα γονίδια στόχοι θα πρέπει να εμφανίζουν: υψηλή συχνότητα απενεργοποίησης στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, απενεργοποίηση και στα δύο αλληλόμορφα με ταυτόχρονη μετάλλαξη του δεύτερου αλληλομόρφου (θεωρία διπλού χτυπήματος-double hit), συμμετοχή του υποψηφίου γονιδίου σε ένα μονοπάτι καταστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή της αύξησης, απενεργοποίηση του ίδιου μονοπατιού καταστολής της αύξησης σε καρκίνους που φέρουν τον φαινότυπο MSI μετά από μεταλλάξεις στο ίδιο γονίδιο ή σε άλλα γονίδια του ίδιου μονοπατιού και επιπλέον να συνοδεύονται από μελέτες που επιβεβαιώνουν καταστολή της αύξησης σε *in vitro* πειράματα ή ζωικά μοντέλα.

Μέχρι σήμερα, γίνεται μεγάλη ερευνητική προσπάθεια για τον εντοπισμό πιθανών γονιδίων στόχων της γενετικής αστάθειας σε μια προσπάθεια να διερευνηθούν τα αίτια και ο μοριακός μηχανισμός της καρκινογένεσης στον καρκίνο του παχέος εντέρου που συνδέεται με το φαινότυπο MSI. Η προσπάθεια αυτή οδήγησε στην πρόταση ενός μοντέλου όλων των γενετικών μεταβολών που συμβαίνουν κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης και συνδέεται με τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας [52] (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Η εξέλιξη της αστάθειας κατά την πρόοδο της MSI-H καρκινογένεσης [52].

Κάποιες άλλες μελέτες αναφέρουν ότι μικρές μονονουκλεοτιδικές μη κωδικοποιούσες επαναλήψεις που βρίσκονται σε μη λειτουργικές περιοχές κάποιων γονιδίων (π.χ. ιντρόνια), είναι επίσης μεταλλαγμένες και μάλιστα, σε μερικές περιπτώσεις, με υψηλή συχνότητα ($\geq 50\%$) [145, 146]. Με βάση τα στοιχεία αυτά πιστεύεται ότι οι μεταλλάξεις λόγω εισδοχών ή ελλείψεων σε μη κωδικοποιούσες περιοχές δεν συμβάλουν άμεσα στην εμφάνιση του καρκίνου αλλά μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο όταν επιδρούν σε λειτουργικές ρυθμιστικές περιοχές ή κοντά στον υποκινητή άλλων γονιδίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο MRE11 του οποίου η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία πολυT(11) που φέρει σε μη κωδικοποιούσα περιοχή οδηγεί σε μείωση της έκφρασης αλλά και λειτουργική βλάβη του συμπλόκου MRE11/ NBs1/RAD50 [145]. Είναι εμφανές ότι οι όγκοι με τον φαινότυπο MSI-H παρουσιάζουν έναν διαφορετικό τύπο καρκίνου σε σχέση με τους όγκους με μικροδορυφορικώς σταθερό φαινότυπο και χαρακτηρίζονται από ένα υψηλό υπόβαθρο αστάθειας τόσο στο μικροδορυφορικό DNA όσο και στα γονίδια στόχους. Σύμφωνα με κάποιες απόψεις ο βαθμός πολυμορφικότητας των μονονουκλεοτιδικών επαναλήψεων στους όγκους αυτούς, μπορεί να εξαρτάται όχι μόνο από λειτουργικούς αλλά και δομικούς καθώς και άλλους μέχρι σήμερα μη-διευκρινισμένους παράγοντες [52]. Βέβαια η άποψη αυτή απορρίπτεται από άλλες

ερευνητικές ομάδες, θεωρώντας ότι οι μεταλλάξεις αυτές, εξαιτίας του ότι βρίσκονται σε περιοχές των ιντρονίων, δεν μπορούν να έχουν καμία ογκογόνο δράση [147].

Στην παρούσα μελέτη έγινε μία προσπάθεια μελέτης δύο νέων πιθανών γονιδίων στόχων για την καρκινογένεση του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI. Το ομόλογο ογκογονίδιο του μυελοβλαστώματος c-MYB και το γονίδιο που εκφράζει τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR. Κοινό χαρακτηριστικό των δύο αυτών γονιδίων είναι οι μη κωδικοποιούσες επαναλήψεις στην περιοχή του πρώτου τους ιντρονίου (ιντρόνιο 1).

Το ογκογονίδιο c-MYB, όπως και πολλά άλλα γονίδια με κάποια ογκογόνα δράση (MYCN, MYCL, MYC, FOS), ρυθμίζεται με μηχανισμούς που επηρεάζουν τον ρυθμό της μεταγραφικής επιμήκυνσης [148] και οι αλληλουχίες που ελέγχουν αυτή τη διαδικασία εντοπίζονται σε μη κωδικοποιούσες περιοχές και κυρίως σε ιντρόνια [149]. Η υπερέκφραση του γονιδίου c-MYB είναι ένας προγνωστικός δείκτης για τον μικρό χρόνο επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου [150], ενώ η αιτία αυτής της υπερέκφρασης είναι ασαφής. Μεταξύ των πολλών επιπέδων ρύθμισης του γονιδίου c-MYB, η πιο σοβαρή είναι η ρύθμιση μέσω της μεταγραφικής επιμήκυνσης λόγω μιας αλληλουχίας με 19 επαναλαμβανόμενες θυμίνες (πολυT(19)) στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου. Μετά από ανάλυση της αλληλουχίας αυτής του γονιδίου c-MYB σε επτά καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου βρέθηκε ότι μία έλλειψη στην αγρίου τύπου περιοχή των πολυT(19), έχει ως συνέπεια την αύξηση της μεταγραφικής ικανότητας του γονιδίου, ενώ αντίθετα τυχόν αύξηση στον αριθμό των επαναλήψεων πολυT(19) φάνηκε να μην έχει κάποια λειτουργική σημασία [149]. Ομοίως μελέτες σε καρκίνους του παχέος εντέρου με επιπλέον τον φαινότυπο MSI-H έδειξαν ότι μεταλλάξεις στην περιοχή των πολυT(19) του γονιδίου c-MYB συνεισφέρουν στην υπερέκφραση του γονιδίου, επισημαίνοντας τη μεγάλη σημασία των μη-κωδικοποιουσών περιοχών στην ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων «κλειδιά» στον καρκίνο [151].

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, EGFR, είναι μέλος της οικογένειας erbB και εκφράζεται αμυδρά στα φυσιολογικά επιθήλια του παχέος εντέρου, αλλά φαίνεται να υπερεκφράζεται περίπου στο 25-77% των καρκίνων του παχέος εντέρου, ποσοστό εξαρτώμενο από την τεχνική που χρησιμοποιείται κάθε φορά [152]. Ο EGFR παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των διαδικασιών κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης και την εξέλιξη των όγκων, όπως στην κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση και την μετάσταση [153].

Υπερέκφραση του EGFR παρατηρείται επίσης σε ένα μεγάλο εύρος καρκίνων, που συνδυάζονται με φαινότυπο επιθετικού καρκίνου, κακή διάγνωση και μειωμένη επιβίωση [152, 154]. Παρόλα αυτά η υπερέκφραση του υποδοχέα EGFR δεν μπορεί να συνδυαστεί με την γονιδιακή ενίσχυση όπως έχει ήδη αποδειχθεί για το γλιοβλάστωμα [155] διότι η γονιδιακή ενίσχυση είναι ασυνήθης στους καρκίνους του παχέος εντέρου [156]. Επιπλέον, το γονίδιο EGFR περιέχει στο ιντρόνιο 1 μια πολυμορφική δινουκλεοτιδική περιοχή (CA-SSR I) με επαναλήψεις που κυμαίνονται από 14-21CA [157]. Η περιοχή αυτή έχει δειχθεί ότι ρυθμίζει άμεσα τη μεταγραφική ικανότητα του γονιδίου EGFR και την ενεργότητά του αφού η αύξηση των επαναλήψεων αυτών έχει ως συνέπεια τη μείωση τόσο της μεταγραφικής ικανότητας όσο και της ενεργότητάς του [158, 159]. Η άποψη αυτή έχει επιβεβαιωθεί στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού [160-163] του καρκίνου του πνεύμονα [164] καθώς και στο οστεοσάρκωμα [165]. Όσον αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου λίγα είναι γνωστά για την επίδραση της περιοχής (CA-SSR I) του EGFR στην πορεία της νόσου καθώς και την αστάθειά της. Σύμφωνα με τον Liu και την ομάδα του [157], οι πιο συχνές αλληλουχίες στις CA επαναλήψεις που έχουν προσδιοριστεί στους φυσιολογικούς ιστούς αποτελούνται από 16, 18 και 20 CA επαναλήψεις, ενώ ο πιο κοινός γενότυπος ήταν η ομοζυγωτία των 16 CA επαναλήψεων. Ο μηχανισμός δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, όμως πιστεύεται ότι η περιοχή CA-SSR I δρα ως ένας σύνδεσμος, που φέρει τον υποκινητή του γονιδίου κοντά σε μία πρωτεΐνη καταστολέα, συνδέοντάς τον καθοδικά της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας [158, 160, 163].

Εάν τα γονίδια αυτά αποτελούν αληθινούς στόχους αδρανοποίησης λόγω αλλαγής της διαμόρφωσής τους εξαιτίας μεταλλάξεων μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης, διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην έναρξη και την εξέλιξη των όγκων, ή απεικονίζουν απλώς ένα υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων που συνδέονται με ατέλειες του συστήματος MMR, είναι ένα σημαντικό ζήτημα στην κατανόηση της καρκινογένεσης που συνδέεται με τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας.

Πράγματι, ο προσδιορισμός των γονιδίων που διαδραματίζουν βασικό ρόλο σε πολλά βήματα κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο, είναι ιδιαίτερα σημαντικός όσον αφορά την κατανόηση του μηχανισμού αυτού στο σύνδρομο HNPCC, όπου αν και η συχνότητα εμφάνισης των πρόδρομων κρουσμάτων δεν είναι τόσο συχνή στον γενικό πληθυσμό, είναι ιδιαίτερα επιρρεπής σε κακοήθεις μετασχηματισμούς ως αποτέλεσμα της υψηλής συχνότητας μεταλλάξεων

μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης στα κύτταρα με ανεπάρκεια του συστήματος MMR [8].

Τελικά, η ελαττωματική λειτουργία του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA είτε ως αποτέλεσμα μιας μετάλλαξης στην γαμετική σειρά σε ένα από τα δύο σημαντικά γονίδια του συστήματος MMR, το hMSH2 και το hMLH1, ή λόγω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου hMLH1, συνδέεται άμεσα με την προδιάθεση για καρκίνο στο παχύ έντερο. Εντούτοις, το γενετικό υπόβαθρο ενός σημαντικού αριθμού ασθενών με το σύνδρομο HNPCC παραμένει αδιευκρίνιστο, υποδεικνύοντας ότι και άλλα γονίδια, που συμμετέχουν στο σύστημα MMR, διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη του καρκίνου.

Παρά την συνεχώς αυξανόμενη γνώση ως προς τη γενετική και τη βιοχημική λειτουργία του συστήματος MMR, λίγα είναι γνωστά όσον αφορά τους παράγοντες που συμβάλλουν στην αιτιολογία και την ιστική ιδιομορφία της καρκινογένεσης που συνδέεται με τον φαινότυπο MSI. Ο προσδιορισμός των ογκοκατασταλτικών γονιδίων που περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και τα καθιστούν πιθανούς στόχους μεταλλάξεων εξαιτίας της ελαττωματικής λειτουργίας του συστήματος MMR και επιπλέον φέρουν τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας, μπορούν να παρέχουν πολύτιμες ιδέες σε αυτό το ζήτημα.

4. ΣΚΟΠΟΣ

Η έκτροπη μεθυλίωση του DNA είναι η πιο συχνή μοριακή βλάβη των καρκινικών κυττάρων. Ούτε οι μεταλλάξεις των γονιδίων (αντικαταστάσεις βάσεων, απαλοιφές βάσεων, ανασυνδυασμοί γονιδίων), ούτε οι κυτταρολογικές ασυνήθειες αλλαγές είναι τόσο συχνές στον καρκίνο του ανθρώπου όσο οι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA. Η αποσιώπηση της έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων, μέσω της υπερμεθυλίωσης των νησίδων CpG, του υποκινητή τους στο 5' άκρο του γονιδίου, αποτελεί την καλύτερα μελετημένη αλλαγή στην μεθυλίωση του DNA.

Από την άλλη πλευρά ο φαινότυπος της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI phenotype) στον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι αποτέλεσμα της ελαττωματικής λειτουργίας του συστήματος επιδιόρθωσης λανθασμένων ζευγών στο DNA (σύστημα MMR) και προκαλείται από την συσσώρευση εισδοχών ή απαλοιφών κατά την διάρκεια της αντιγραφής μικρών περιοχών με επαναλαμβανόμενα νουκλεοτίδια (μικροδορυφόροι). Μεταλλάξεις των γονιδίων του συστήματος MMR στη γαμετική σειρά αποτελούν τη γενετική βάση της ελαττωματικής λειτουργίας του συστήματος στο σύνδρομο του κληρονομικού μη-πολυποδιακού καρκίνου του παχέος εντέρου (σύνδρομο HNPCC). Αντίθετα υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου hMLH1, στην περίπτωση του φαινοτύπου MSI-H, ή υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου MGMT στις περιπτώσεις του φαινοτύπου MSI-L ή MSS, αποτελούν συνήθως τα αίτια της παθογένεσης του σποραδικού καρκίνου του παχέος εντέρου. Τα υπερμεθυλιωμένα αυτά γονίδια δεν είναι μόνο πιθανά παθογενετικά συμβάντα στην πορεία εξέλιξης των πολυπόδων σε καρκίνο, αλλά αποτελούν και ειδικά μοριακά χαρακτηριστικά της νεοπλασίας που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες σε προκαρκινικά μορφώματα του παχέος εντέρου.

Επειδή όπως έχει αποδειχθεί η ελαττωματική λειτουργία του συστήματος MMR δεν είναι από μόνη της αρκετή για την έναρξη της καρκινογόνου εξαλλαγής αλλά απαιτούνται επιπλέον γενετικές αλλαγές για την δημιουργία πραγματικής κακοήθειας, θεωρείται ότι ο μηχανισμός που προκαλεί τη μικροδορυφορική αστάθεια προκαλεί επίσης μια γενικότερη αστάθεια, επηρεάζοντας επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες τόσο εντός (εξόνια) όσο και εκτός (ιντρόνια) των κωδικοποιουσών περιοχών γονιδίων με σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί, σε πολύ υψηλή συχνότητα σε ασθενείς με καρκίνο αλλά και πολύποδες του

παχέος εντέρου που φέρουν τον φαινότυπο MSI, μεταλλάξεις στα κύτταρα όγκων (συνήθως απαλοιφές) στις κωδικοποιούσες μονονουκλεοτιδικές επαναλήψεις γονιδίων όπως π.χ. τα TGFβRII και BAX που χαρακτηρίζονται ως γονίδια στόχοι της μικροδορυφορικής αστάθειας. Τα γονίδια στόχοι ανήκουν συνήθως στις κατηγορίες των γονιδίων που ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση ή τον κυτταρικό θάνατο. Τελευταία ως γονίδια στόχοι έχουν αναφερθεί και γονίδια που περιέχουν επαναλήψεις όχι στις περιοχές των εξονίων τους αλλά σε περιοχές ιντρονίων με λειτουργικά χαρακτηριστικά (π.χ. ρύθμιση της μεταγραφής).

Σκοπός της εργασίας μας ήταν η διερεύνηση της παρουσίας της «μοριακής υπογραφής» η οποία συνοδεύει την εξαλλαγή ενός φυσιολογικού ιστού αρχικά σε πολύποδα και αργότερα σε προχωρημένο πολύποδα και καρκίνωμα, χρησιμοποιώντας ως δείκτες την μικροδορυφορική αστάθεια, την υπερμεθυλίωση των υποκινητών και τις μεταλλάξεις γονιδίων στόχων. Η ανεύρεση της «μοριακής υπογραφής» που συνοδεύει κάθε στάδιο στην εξέλιξη της πορείας της καρκινογένεσης είναι ιδιαίτερα σημαντική, αφού αν ο καρκίνος διαγνωστεί έγκαιρα δίνεται η δυνατότητα με κατάλληλα μέσα να ιαθεί ή να περιοριστεί, αυξάνοντας έτσι το χρόνο επιβίωσης των ασθενών.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. Δείγματα – Ασθενείς

Τα δείγματα DNA που περιλαμβάνονται στην παρούσα μελέτη προέρχονται από 58 ασθενείς, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε κολonosκόπηση, είτε στα πλαίσια διερεύνησης συμπτωμάτων, ή για λόγους πρόληψης εξαιτίας οικογενειακού ιστορικού με καρκίνο του παχέος εντέρου, στην Ηπατογαστρεντερολογική Μονάδα της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Π.Γ.Ν.Ι). Τα κριτήρια που ελήφθησαν υπόψη για την επιλογή των συγκεκριμένων ασθενών ήταν η εμφάνιση 1-10 πολυπόδων στο παχύ έντερο σε διαφορετικά μορφολογικά στάδια (σωληνωτά, σωληνολαχνωτά και λαχνωτά αδενώματα), η εμφάνιση καρκίνου στο παχύ έντερο, καθώς και μία ομάδα υγιών ατόμων χωρίς οικογενειακό ιστορικό για καρκίνο. Αντίθετα, το θετικό ή αρνητικό οικογενειακό ιστορικό για καρκίνους, δεν αποτέλεσε βασικό κριτήριο επιλογής των ασθενών αφού η παρούσα μελέτη εκτείνεται τόσο στους σποραδικούς καρκίνους του παχέος εντέρου όσο και στους καρκίνους που προέρχονται από το σύνδρομο HNPCC. Πρέπει να σημειωθεί ότι, απορρίφθηκαν οι ασθενείς με περισσότερους από 100 σε αριθμό πολύποδες στο παχύ έντερο, μιας και πιθανώς να ανήκουν στο σύνδρομο της οικογενούς αδενωματώδης πολυποδίασης (FAP) που δεν θα ασχοληθούμε, καθώς και αυτοί με οικογενειακό ιστορικό για το σύνδρομο FAP.

Για να συμπληρωθεί ένας ικανοποιητικός αριθμός δειγμάτων από τις δύο κατηγορίες ασθενών με αδενώματα και καρκίνο στο παχύ έντερο, χρησιμοποιήθηκαν επίσης δείγματα DNA από παλαιότερους παραφινωποιημένους ιστούς από 20 επιπλέον ασθενείς, οι οποίοι εξετάστηκαν στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Π.Γ.Ν.Ι. και οι οποίοι πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια επιλογής των ασθενών της μελέτης μας.

Για κάθε ασθενή, ελήφθησαν 3 δείγματα: ολικό αίμα, παθολογικός ιστός (αδένωμα ή αδenoκαρκίνωμα) καθώς και παρακείμενος φυσιολογικός ιστός (στα δείγματα παραφίνης από το αρχείο δεν υπήρχε η δυνατότητα χρήσης ολικού αίματος). Τα δείγματα παραλαμβάνονταν αμέσως μετά την κολonosκόπηση και είτε επεξεργάζονταν αμέσως ή καταψύχονταν στους $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

5.2. Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA από τα δείγματα (αίμα και ιστοί) χρησιμοποιήθηκαν τυποποιημένα αντιδραστήρια και τα οποία βασίζονται στην απομόνωση του DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο [166] αλλά η διαδικασία που ακολουθείται είναι λιγότερο χρονοβόρα. Η απομόνωση του DNA περιλαμβάνει τα εξής στάδια: λύση των κυττάρων, πέψη πρωτεϊνών με πρωτεϊνάση K, εκχύλιση με φαινόλη για τον καθαρισμό του διαλύματος από πρωτεΐνες και πεπτίδια, εκχύλιση με χλωροφόρμιο για την απομάκρυνση λιπιδίων και ιχνών φαινόλης και κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη.

5.2.1. Απομόνωση DNA από ολικό αίμα

Αρχή της μεθόδου:

Για την απομόνωση του DNA στα δείγματα του ολικού αίματος χρησιμοποιήθηκαν τυποποιημένα αντιδραστήρια από την συσκευασία QIAamp Blood DNA Mini Kit της εταιρίας Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Γερμανία). Είναι μια απλοποιημένη, γρήγορη διαδικασία για την απομόνωση των νουκλεϊνικών οξέων από ευρεία ποικιλία κλινικών δειγμάτων, η οποία γίνεται με τη χρήση ειδικών στηλών ενώ τα απαιτούμενα βήματα εκλούσεων γίνονται με φυγοκέντρηση των στηλών αυτών. Τα νουκλεϊνικά οξέα δεσμεύονται εκλεκτικά στη QIAamp μεμβράνη πηκτώματος πυριτίου, ενώ οι υπόλοιποι κυτταρικοί παράγοντες περνούν στο διήθημα. Οι παράγοντες που αναστέλλουν την μεθοδολογία της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), όπως τα δισθενή κατιόντα και οι πρωτεΐνες, αφαιρούνται εντελώς σε δύο αποδοτικά βήματα πλυσίματος, αφήνοντας προσκολλημένο στη στήλη το καθαρό νουκλεϊνικό οξύ. Το DNA παραλαμβάνεται από τη στήλη με εκχύλιση είτε με αποσταγμένο νερό είτε με ένα ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχεται από την εταιρία.

Συσκευές:

Υδατόλουτρο: GFL (Γερμανία)

Αναδευτήρας (vortex): Heidolph DREHZAHl (Γερμανία)

Φυγόκεντρος: Heraeus CHRIST (Γερμανία)

Αντιδραστήρια:

1. Δείγμα ολικού αίματος 200 μl
2. Αιθανόλη (99.7-100%)

3. Τυποποιημένα αντιδραστήρια της συσκευασίας QIAamp Blood DNA Mini Kit της εταιρίας Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Γερμανία):

Qiagen πρωτεάση

Διάλυμα AL

Διάλυμα AW1

Διάλυμα AW2

Διάλυμα AE

Διαδικασία:

- i. Προστίθενται 20 µl Qiagen πρωτεάσης σε 200 µl δείγματος αίματος σε σωληνάριο Eppendorf 1.5 ml.
- ii. Προστίθενται 200 µl διαλύματος AL στο μίγμα και ακολουθεί ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα.
- iii. Το μείγμα επωάζεται στους 56°C για 10 λεπτά.
- iv. Προστίθενται 200 µl αιθανόλης (96-100%), ακολουθεί ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα και μία σύντομη φυγοκέντρηση.
- v. Το μείγμα μεταφέρεται σε σωληνάριο 2 ml (QIAamp Spin Column) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές για 1 λεπτό. Το σωληνάριο των 2 ml (QIAamp Spin Column) αποτελείται από δύο αποσπώμενα τμήματα: τη στήλη όπου εισάγεται το διάλυμα και η οποία περιέχει την μεμβράνη πηκτής πυριτίου όπου δεσμεύεται το DNA και το δοχείο συλλογής όπου οι υπόλοιποι κυτταρικοί παράγοντες και τα διαλυτικά συστήματα συλλέγονται σε αυτό μετά από φυγοκέντρηση του σωληναρίου.
- vi. Προστίθενται 500 µl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης AW1 και φυγοκεντρείται στις 8000 στροφές για 1 λεπτό. Το τμήμα του σωληναρίου QIAamp Spin Column που περιέχει τη στήλη αποσπάται και τοποθετείται σε καθαρό δοχείο συλλογής.
- vii. Προστίθενται 500 µl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης AW2 και φυγοκεντρείται στις 14000 στροφές για 3 λεπτά. Το τμήμα του σωληναρίου QIAamp Spin Column που περιέχει τη στήλη αποσπάται και τοποθετείται σε καθαρό δοχείο συλλογής και ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 1 λεπτό.
- viii. Τέλος, η στήλη μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωληνάριο Eppendorf 1.5 ml και προστίθενται 200 µl δις-αποσταγμένου νερού ή διαλύματος AE, αφήνεται

για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκεντρείται στις 8000 στροφές για 1 λεπτό, οπότε εκλύεται το DNA από τη στήλη.

- ix. Το τμήμα του σωληναρίου QIAamp Spin Column που περιέχει τη στήλη απορρίπτεται ενώ σωληνάριο Eppendorf που περιέχει το απομονωμένο DNA, από το δείγμα αίματος, τοποθετείται στους $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι την περαιτέρω χρήση του.

5.2.2. Απομόνωση DNA από ιστό

Αρχή της μεθόδου:

Για την απομόνωση του DNA από δείγματα ιστού (φυσιολογικού και παθολογικού) χρησιμοποιήθηκε η εμπορική συσκευασία QIAamp DNA Mini Kit της εταιρίας Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Γερμανία). Η αρχή της μεθόδου είναι ίδια με αυτή για την απομόνωση του DNA από ολικό αίμα με τη διαφορά ότι πριν την λύση των κυττάρων από τον ιστό, ο ιστός ομογενοποιείται.

Συσκευές:

Ομογενοποιητής: Fortuna[®] 2 ml (Γερμανία)

Υδατόλουτρο: GFL (Γερμανία)

Αναδευτήρας: Heidolph DREHZAHl (Γερμανία)

Φυγόκεντρος: Heraeus CHRIST (Γερμανία)

Αντιδραστήρια:

1. Δείγμα ιστού παχέος εντέρου
2. Αιθανόλη (99.7-100%)
3. Τυποποιημένα αντιδραστήρια της συσκευασίας QIAamp DNA Mini Kit της εταιρίας Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Γερμανία):

Διάλυμα ATL

πρωτεΐνάση K

Διάλυμα AL

Διάλυμα AW1

Διάλυμα AW2

Διάλυμα AE

4. RNase A (100 mg/ ml) (Qiagen GmbH, Hilden, Γερμανία)

Διαδικασία:

- i. Ένα τμήμα ιστού μάζας 50-100 mg ομογενοποιείται στον ομογενοποιητή Fortuna προσθέτοντας 45 μl διαλύματος ATL. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4 φορές και μέχρι τελικού όγκου 180 μl. Αν το τμήμα του ιστού είναι μεγαλύτερο των 100 mg προστίθεται επιπλέον ποσότητα διαλύματος ATL.
- ii. Το τελικό μείγμα μεταφέρεται σε σωληνάριο Eppendorf 1.5 ml.
- iii. Προστίθενται 20 μl πρωτεϊνάσης K και ακολουθεί ανάδευση σε vortex.
- iv. Το μείγμα επωάζεται στους 56 °C για μία ώρα, με σκοπό τη λύση των κυττάρων. Σε τακτά χρονικά διαστήματα γίνεται ανάδευση του δείγματος.
- v. Ύστερα από την πλήρη λύση των κυττάρων, το σωληνάριο φυγοκεντρείται για πολύ λίγο ώστε να γίνει η συγκέντρωση του περιεχομένου στον πυθμένα του σωληναρίου.
- vi. Προστίθενται 4 μl διαλύματος RNase A (100 mg/ ml) και ακολουθεί ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα. Το σωληνάριο Eppendorf φυγοκεντρείται για πολύ λίγο ώστε το μείγμα να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.
- vii. Προστίθενται 200 μl διαλύματος AL και ακολουθεί ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα.
- viii. Το τελικό μείγμα επωάζεται στους 70°C για 10 λεπτά.
- ix. Στη συνέχεια το σωληνάριο Eppendorf φυγοκεντρείται για πολύ λίγο ώστε το μείγμα να συγκεντρωθεί στον πυθμένα του σωληναρίου.
- x. Τέλος ακολουθεί η ίδια διαδικασία με την απομόνωση του DNA από αίμα (5.2.1.) από το στάδιο (iv) και μετά.

5.2.3. Απομόνωση DNA από δείγματα ιστού εμβαπτισμένα σε παραφίνη

Αρχή της μεθόδου:

Η βασική διαφορά της μεθόδου αυτής σε σχέση με την προηγούμενη (απομόνωση DNA από ιστό), είναι αρχικά η χρήση ξυλόλης, μίας ουσίας που διαλύει την παραφίνη με την οποία είναι σταθεροποιημένοι οι ιστοί και στη συνέχεια οι πλύσεις με αιθανόλη ώστε να διαλυθεί με την σειρά της η ξυλόλη και να απομακρυνθεί η παραφίνη με τις υπόλοιπες, άχρηστες ουσίες, από τον ιστό. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι να διαχωριστούν μικροσκοπικά οι ιστοί σε

φυσιολογικούς και παθολογικούς πριν απομακρυνθούν από το πλακάκι όπου είναι σταθεροποιημένοι με παραφίνη.

Συσκευές:

Υδατόλουτρο: GFL (Γερμανία)

Αναδευτήρας: Heidolph DREHZAHL (Γερμανία)

Φυγόκεντρος: Heraeus CHRIST (Γερμανία)

Αντιδραστήρια:

1. Δείγματα ιστών παχέος εντέρου εμβαπτισμένα σε παραφίνη
2. Ξυλόλη
3. Αιθανόλη (99.7-100%)
4. Τυποποιημένα αντιδραστήρια της συσκευασίας QIAamp DNA Mini Kit της εταιρίας Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Γερμανία):
 - Διάλυμα ATL
 - πρωτεΐνάση K
 - Διάλυμα AL
 - Διάλυμα AW1
 - Διάλυμα AW2
 - Διάλυμα AE
5. RNase A (100 mg/ ml) (Qiagen GmbH, Hilden, Γερμανία)

Διαδικασία:

- i. Απομονώνονται από το πλακάκι σταθεροποίησης των ιστών με παραφίνη περίπου 6 τομές πάχους 20 μm ώστε να χρησιμοποιηθούν το λιγότερο οι 3 από αυτές και τοποθετούνται σε σωληνάριο Eppendorf 1.5 ml.
- ii. Το σωληνάριο με τις τομές επωάζεται στους 65 °C για 10 λεπτά.
- iii. Προστίθεται αμέσως 1 ml ξυλόλης και γίνεται ισχυρή ανάδευση.
- iv. Το σωληνάριο με το μείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά κάνοντας περιοδικά ισχυρή ανάδευση.
- v. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- vi. Το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεχτικά.
- vii. Τα βήματα ii-vi επαναλαμβάνονται για ακόμη μία φορά.
- viii. Προστίθεται 1 ml αιθανόλης 100% και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση.
- ix. Στη συνέχεια το σωληνάριο φυγοκεντρείται στις 14000 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- x. Το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεκτικά και το ίζημα που περιέχει πλέον τον καθαρό ιστό αφήνεται να στεγνώσει.
- xi. Στη συνέχεια, προστίθεται 180 µl διαλύματος ATL από την εμπορική συσκευασία QIAamp DNA Mini Kit της εταιρίας Qiagen και ακολουθούνται όλα τα βήματα που περιγράφηκαν για την απομόνωση του DNA από ιστό.
- xii. Το τελικό σωληνάριο Eppendorf περιέχει το απομονωμένο DNA από τον ιστό και τοποθετείται στους -30 °C μέχρι την περαιτέρω χρήση του.

5.2.4. Ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Αρχή της μεθόδου:

Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο και επομένως κινείται μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο, ενώ το μέγεθός του, του επιτρέπει με δυσκολία ή ευκολία (αν είναι μεγάλο ή μικρό αντίστοιχα) να περνά μέσα από πορώδη πηκτώματα οργανικών πολυμερών όπως το πήκτωμα αγαρόζης.

Η θέση του DNA στο πήκτωμα μπορεί να προσδιοριστεί εύκολα και άμεσα με χρωματισμό των ζωνών με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr, φθορίζουσα χρωστική όταν φωτιστεί με υπεριώδη ακτινοβολία UV που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA). Έτσι γίνεται εφικτό σε πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίρεια υπεριώδους ακτινοβολίας να γίνεται ορατό ακόμα και 1ng DNA.

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται από τέσσερεις βασικούς παράγοντες: το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοδιάταξη του DNA και την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος που εφαρμόζεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Επιπλέον, σε αντίθεση με αυτό που συμβαίνει στα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου, η ηλεκτροφορητική συμπεριφορά του DNA δεν επηρεάζεται αισθητά ούτε από το ποσοστό των διαφορετικών βάσεων σε κάθε DNA ούτε από τη θερμοκρασία στην οποία γίνεται η ηλεκτροφόρηση (μεταξύ 4° και 30°C).

Τέλος, είναι απαραίτητη η χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση του DNA. Συνήθως χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν TRIS-οξικό, -βορικό ή -φωσφορικό, σε συγκέντρωση 50-100 mM και PH περίπου 8. Από αυτά την καλύτερη ρυθμιστική ικανότητα σε σχέση και με τη διαχωριστική τους ικανότητα έχουν αυτά με βορικό ή φωσφορικό οξύ.

Συσκευές:

Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης: Horizon 11-14 GIBCO BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus, της εταιρείας Life Technologies (Paisley, Σκωτία)

Τροφοδοτικό: GD 61D της εταιρείας Sebia (Γαλλία)

Συσκευή U.V.: UVT-20M της εταιρείας Herolab (Γερμανία)

Φωτογραφική μηχανή συσκευής UV: Kodak digital science DC40 Camera (Ιαπωνία)

Αντιδραστήρια:

1. 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE (Tris-Boric acid-EDTA) 10X
2. 900 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE (Tris-Boric acid-EDTA) 1X
3. 90 ml dH₂O
4. 1.7 g αγαρόζη, υψηλής διαλυτότητας, της εταιρείας Life technologies (Paisley, Σκωτία)
5. Βρωμιούχο αιθίδιο της εταιρείας Merck (Darmstadt, Γερμανία)
6. Μάρτυρας μοριακών βαρών XIV 100 bp (0.25 µg/µl) της εταιρείας Roche (Mannheim, Γερμανία)
7. Χρωστική Blue/Orange 6x Loading Dye της εταιρείας Promega (Madison, Αμερική)

Διαδικασία:

- i. Ζυγίζονται 1.7 g αγαρόζης, σε ζυγό ακριβείας, μέσα σε μια κωνική φιάλη.
- ii. Προστίθενται 10 ml TBE 10X και 90 ml dH₂O.
- iii. Ακολουθεί θέρμανση μέχρι βρασμού σε φούρνο μικροκυμάτων.
- iv. Προστίθενται 10 µl βρωμιούχο αιθίδιο.
- v. Ετοιμασία της συσκευής ηλεκτροφόρησης.
- vi. Όλο το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης χύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και με προσοχή απομακρύνονται οι φυσαλίδες που τυχόν δημιουργήθηκαν.
- vii. Αφήνεται το διάλυμα να πήξει (περίπου μισή ώρα) και προστίθενται στη συσκευή περίπου 900 ml TBE 1X.
- viii. Στο χρόνο της αναμονής για την πήξη του πηκτώματος προετοιμάζονται τα δείγματα προς εξέταση για την φόρτωση (σε 10 µl δείγματος προσθέτονται 2 µl χρωστικής).
- ix. Φορτώνονται 10 µl κάθε δείγματος και ο δείκτης μοριακών βαρών σε ξεχωριστά πηγαδάκια του πηκτώματος, γίνεται έλεγχος της συσκευής, τίθεται σε λειτουργία και ρυθμίζεται στα 80 Volts για μία ώρα.

- x. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η συσκευή τίθεται εκτός λειτουργίας και το πήκτωμα μεταφέρεται με προσοχή στη συσκευή UV, όπου τα τμήματα του DNA φθορίζουν λόγω του βρωμιούχου αιθιδίου και έτσι γίνονται ορατά.
- xi. Με τη φωτογραφική μηχανή της συσκευής UV λαμβάνεται η εικόνα του πηγματος και αποθηκεύεται σε αρχείο του υπολογιστή.

5.3. Ανάλυση της μικροδορυφορικής αστάθειας

Αρχή της μεθόδου:

Οι περιοχές επαναλαμβανόμενων αλληλοδιαδοχών του DNA, όπως οι περιοχές του μικροδορυφορικού DNA, κατά την αντιγραφή τους, μπορεί να “γλιστρήσουν” με αποτέλεσμα η νεοσυντιθέμενη θυγατρική αλυσίδα του DNA να είναι μικρότερη ή μεγαλύτερη κατά κάποιες επαναλήψεις. Τα σφάλματα αυτά μπορούν φυσιολογικά να αναγνωριστούν και να επισκευαστούν από το σύστημα MMR. Σε ένα ελαττωματικό σύστημα, οι προκαλούμενες εισδοχές ή οι απαλείψεις βάσεων που συμβαίνουν στις μικροδορυφορικές ακολουθίες, δεν επιδιορθώνονται με αποτέλεσμα την εμφάνιση του φαινοτύπου της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI).

Για τον έλεγχο της μικροδορυφορικής αστάθειας καθιερώθηκαν 5 δείκτες, γνωστοί και ως δείκτες Bethesda, που ενισχύουν μη λειτουργικές περιοχές, σε διαφορετικές χρωμοσωμικές περιοχές στο γονιδίωμα και οι οποίες φέρουν, είτε μονονουκλεοτιδικές επαναλήψεις όπως οι δείκτες BAT25 και BAT26, ή δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις, όπως οι δείκτες D2S123, D5S346 και D17S250 (Πίνακας 4). Οι 5 αυτοί δείκτες, με διαφορετικές πριμοδοτικές αλληλουχίες ο κάθε ένας, ενισχύονται με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Επειδή όμως η αύξηση ή η μείωση των επαναλαμβανόμενων αυτών περιοχών είναι μικρή, όσον αφορά το μέγεθος νουκλεοτιδίων, δεν είναι δυνατή η αποτίμησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης και εμφάνιση σε UV, αλλά σε αποδιατακτικό πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου που έχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα, αρκεί να είναι κατάλληλα ιχνηθετημένα τα προϊόντα PCR ώστε να είναι ορατά από τα λείζερ του αυτόματου αναλυτή προσδιορισμού αλληλουχίας LI-COR DNA Sequencer 4200, στον οποίο και επεξεργάζονται.

Συνολική Διαδικασία:

1. Απομόνωση του DNA από δείγματα ιστού (παθολογικού και παρακείμενου φυσιολογικού) και ολικού αίματος (παράγραφος 5.2).

2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για τον έλεγχο της ποιότητας και της ποσότητας του απομονωθέντος DNA (παράγραφος 5.2.4).
3. Εφαρμογή της αντίδρασης PCR χρησιμοποιώντας τις αντίστοιχες, για κάθε έναν από τους 5 δείκτες, πριμοδοτικές αλληλοδιαδοχές κατάλληλα ιχνηθετημένες με χρωστική IRD700 και IRD800 (της εταιρίας Invitrogen, Καλιφόρνια, Αμερική) που απορροφούν αντίστοιχα στα 700 και 800 nm και στα τρία είδη των δειγμάτων (αίμα, φυσιολογικός και παθολογικός ιστός) για κάθε ασθενή.
4. Ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης PCR με κατακόρυφη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμίδιου 6M στον αυτόματο αναλυτή προσδιορισμού αλληλουχίας LI-COR DNA sequencer 4200.
5. Και τέλος, επιλογή και καταγραφή των δειγμάτων που εμφανίζουν αστάθεια μικροδορυφόρων στα δείγματα του παθολογικού ιστού συγκρινόμενα με τα δείγματα του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού και αίματος του ίδιου ασθενούς.

Τα στάδια (1) και (2) γίνονται εξ' αρχής και αμέσως μετά την λήψη των δειγμάτων .

5.3.1. Εφαρμογή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) με τους 5 δείκτες Bethesda

Αρχή της μεθόδου:

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR), αποτελεί τεχνική *in vitro* ενζυμικής σύνθεσης του DNA με τη συμβολή του θερμοανθεκτικού ενζύμου DNA πολυμεράση. Με τη μέθοδο αυτή ενισχύονται συγκεκριμένα τμήματα γενετικού υλικού. Η PCR "αναπαράγει" με τεχνητό τρόπο τη διαδικασία αναδιπλασιασμού του DNA, χρησιμοποιώντας κάθε έλικά του ως μήτρα. Η ειδικότητα της μεθόδου προσδιορίζεται από τη συμμετοχή στην αντίδραση δύο συνθετικά κατασκευασμένων ολιγονουκλεοτιδίων που ονομάζονται "οδηγά ολιγονουκλεοτίδια" ή πριμοδοτικές αλληλουχίες (primers). Η σύνθεση των νέων αλυσίδων επιτυγχάνεται μέσω μιας σειράς κύκλων ενίσχυσης. Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR περιλαμβάνει 25-35 κύκλους ενίσχυσης, καθένας εκ των οποίων αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα :

- i. Αποδιάταξη του μορίου (denaturation). Θέρμανση του μείγματος για τη δημιουργία μονόκλωνων αλυσίδων DNA (μετατροπή διπλής έλικας σε απλή).

- ii. Υβριδοποίηση νουκλεϊκών οξέων (annealing). Σύνδεση των πριμοδοτικών αλληλουχιών στα μόρια του μονόκλωνου DNA, δηλαδή προσκόλληση των ολιγονουκλεοτιδίων στα σημεία έναρξης της αντιγραφής.
- iii. Προέκταση (extension). Αντιγραφή των αλυσίδων DNA με επιμήκυνση των πριμοδοτικών αλληλοδιαδοχών και επανάληψη της διαδικασίας.

Κάθε επανάληψη της σύνθεσης νέου κλώνου αποτελεί ένα κύκλο ενίσχυσης, ενώ κάθε νεοσυντιθέμενος κλώνος DNA αποτελεί το εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο ενίσχυσης. Το αποτέλεσμα είναι η ενίσχυση μιας αρχικής ποσότητας γενετικού υλικού σε δυνάμεις 2^n , όπου n ο αριθμός των κύκλων.

Στον έλεγχο της μικροδορυφορικής αστάθειας, η αρχή της μεθόδου PCR είναι η ίδια με αυτή που ήδη αναφέρθηκε, με την διαφορά ότι οι πριμοδοτικές αλληλουχίες των δεικτών Bethesda, τόσο η πρόσθια (forward) όσο και η αντίστροφη (reverse) είναι ιχνηθετημένες στο 5' άκρο τους με χρωστική (IRD700 και IRD800), ορατή στα 700 και 800 nm αντίστοιχα ώστε τα προϊόντα της PCR να είναι ορατά στον αυτόματο αναλυτή LI-COR DNA sequencer 4200 όπου ηλεκτροφορούνται.

Συσκευές:

Κυκλοποιητής: PTC-100TM, MJ Research Inc. (Αμερική)

Αντιδραστήρια:

1. 50-100 ng DNA
2. dH₂O
3. 10X PCR Buffer (Invitrogen, Καλιφόρνια, Αμερική)
4. 50 mM MgCl₂ (Invitrogen, Καλιφόρνια, Αμερική)
5. 10 mM από μείγμα νουκλεοτιδίων (NuclMix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen, Καλιφόρνια, Αμερική)
6. Πρόσθια πριμοδοτική αλληλουχία (primer 1) 1.5 pmol/ μl ιχνηθετημένη στο 5' άκρο με χρωστική IRD700 (Invitrogen, Καλιφόρνια, Αμερική)
7. Αντίστροφη πριμοδοτική αλληλουχία (primer 2) 1.5 pmol/ μl ιχνηθετημένη στο 5' άκρο με χρωστική IRD800 (Invitrogen, Καλιφόρνια, Αμερική)
8. Taq DNA Polymerase (5 U / μl) (Invitrogen, Καλιφόρνια, Αμερική)
9. Ειδικό ορυκτέλαιο για PCR αντιδράσεις - Mineral Oil (SIGMA, Steinheim, Γερμανία)

Διαδικασία:

Σε ειδικό σωληνάριο Eppendorf (200 µl) για PCR προστίθενται τα απαραίτητα αντιδραστήρια για κάθε δείκτη Bethesda (χωριστά για τον καθ' έναν) (Πίνακας 3) και για τα τρία, διαφορετικής προέλευσης DNA και τοποθετούνται στον κυκλοποιητή PTC-100TM στο αντίστοιχο για κάθε δείκτη πρόγραμμα (Πίνακας 4). Για να αποφευχθεί η εξάτμιση κατά τη διάρκεια της θέρμανσης στον κυκλοποιητή πρέπει, μετά την προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων, σε κάθε Eppendorf να προστεθεί μια σταγόνα ορυκτέλαιου ειδικού για PCR.

Συνολικά λοιπόν για κάθε ασθενή με τρία DNA διαφορετικού δείγματος (ολικό αίμα, φυσιολογικό και παθολογικό ιστό) θα πρέπει να γίνουν συνολικά 15 αντιδράσεις ώστε να γίνει ο έλεγχος της μικροδορυφορικής αστάθειας και στους 5 δείκτες Bethesda.

Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι η επιλογή των πριμοδοτικών αλληλουχιών για τους 5 δείκτες Bethesda (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 και D17S250), καθώς και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για την κάθε PCR και οι αντίστοιχες συνθήκες της PCR στον κυκλοποιητή (Πίνακας 3 και 4) έγινε με βάση τη μελέτη της Loukola [55].

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	BAT25 (A)	BAT26 (B) / D2S123 (C) / D5S346 (D) / D17S250 (E)
1X PCR Buffer	1 µl	1 µl
MgCl ₂ 50 mM	0.5 µl	0.55 µl
NuclMix 250 µM each	0.5 µl	0.5 µl
DNA (50-100 ng)	X	X
Primer 1* (1.5 pmol/µl)	0.5 µl	0.5 µl
Primer 2* (1.5 pmol/µl)	0.5 µl	0.5 µl
Taq Polymerase (1unit)	0.5 µl	0.5 µl
dH ₂ O	για συνολικό όγκο 10 µl	για συνολικό όγκο 10 µl

Πίνακας 3. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων της PCR για κάθε δείκτη Bethesda.

*Η αντίστοιχη πριμοδοτική αλληλουχία (Primer) (πρόσθια και αντίστροφη) για κάθε δείκτη.

ΔΕΙΚΤΗΣ	ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΤΟΠΟΣ	ΠΡΙΜΟΔΟΤΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR	ΠΡΟΙΟΝ PCR
BAT25	4q12	(1) 5'-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3' (2) 5'-TCTGGATTTTAACTATGGCTC-3'	75°C για 10', 28 κύκλοι (95°C για 1', 56°C για 45", 72°C για 45"), 72°C για 10'	120bp
BAT26	2p16	(1) 5'-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3' (2) 5'-AACCATTCAACATTTTAAACC-3'	75°C για 10', 32 κύκλοι (95°C για 45", 55°C για 1', 72°C για 30"), 72°C για 10'	116bp
D2S123	2p16-p21	(1) 5'-AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3' (2) 5'-GGACTTTCCACCTATGGGAC-3'	75°C για 10', 35 κύκλοι (95°C για 45", 55°C για 45", 72°C για 45"), 72°C για 10'	197-227bp
D5S346	5q21-q22	(1) 5'-ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG-3' (2) 5'-AGCAGATAAGACAAGTATTACTAG-3'	75°C για 10', 30 κύκλοι (95°C για 1', 57°C για 45", 72°C για 45"), 72°C για 10'	96-122bp
D17250	17q11.2-12	(1) 5'-GGAAGAATCAAATAGACAAT-3' (2) 5'-GCTGGCCATATATATATTTAAACC-3'	75°C για 10', 35 κύκλοι (95°C για 45", 55°C για 45", 72°C για 45"), 72°C για 10'	151-169bp

Πίνακας 4. Γενετικός τόπος, πριμοδοτικές αλληλουχίες, συνθήκες της PCR και μέγεθος του τελικού προϊόντος της PCR για τους 5 δείκτες Bethesda.

5.3.2. Ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης PCR στη συσκευή LI-COR DNA sequencer 4200

Αρχή της μεθόδου:

Ο αυτόματος αναλυτής LI-COR DNA sequencer 4200, επιτρέπει την κατακόρυφη ηλεκτροφόρηση ιχνηθετημένων προϊόντων, καθώς και την ηλεκτρονική συλλογή δεδομένων, από την αλληλούχιση του DNA. Το όργανο αυτό χρησιμοποιεί μονοφασματική ανίχνευση, όπου οι εκπεμπόμενες χρωστικές ουσίες διεγείρονται από ένα λέιζερ διόδων. Το όργανο διαθέτει δύο διαφορετικά λέιζερ που ανιχνεύουν φθορίζουσες ουσίες στα 700 και 800 nm. Οι φθορίζουσες αυτές ουσίες μπορεί να είναι είτε κατάλληλα ιχνηθετημένες πριμοδοτικές αλληλουχίες με χρωστική (IRD700 ή IRD800) ή ιχνηθετημένα διδεόξυ-νουκλεοτίδια στην περίπτωση αλληλούχισης του DNA.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμιδίου ή ουρίας-ακρυλαμιδίου ενώ οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης (τάση, ισχύς και θερμοκρασία) καθορίζονται από το μέγεθος του μορίου που εξετάζεται καθώς και το μήκος και πάχος του πηκτώματος στο οποίο εκτελείται η ηλεκτροφόρηση.

Συσκευές:

LI-COR DNA sequencer 4200 (LI-COR Inc., LONG READER 4200, Αμερική)

Φίλτρα καθαρισμού πρωτεϊνών (Corning Sterile Syringe Filter 0.45 µm, Γερμανία)

Αντιδραστήρια πηκτώματος ουρίας-ακρυλαμιδίου

1. Ουρία (Merck, Γερμανία)
2. Ακρυλαμίδιο: Rapid Gel -XL- 40% concentrate (USB, Αγγλία)
3. 10X TBE ή 5X TBE
4. dH₂O
5. DMSO (Merck, Darmstadt, Γερμανία)
6. TEMED (Sigma, Αμερική)
7. 10% φρέσκο APS (Ammonium persulfate) (Sigma, Αμερική)
8. Χρωστική φορμαμιδίου (formamide dye loading) της εταιρίας Amersham Biosciences (Freiburg, Γερμανία)

Διαδικασία:

- i. Καθαρίζονται σχολαστικά τα τζάμια πρώτα η εξωτερική πλευρά και μετά η εσωτερική. Αρχικά με αποσταγμένο νερό και μετά με αιθανόλη. Στη συνέχεια

συναρμολογούνται μεταξύ τους, τοποθετώντας 2 ειδικές ταινίες πάχους 2 mm στα άκρα, για τη ρύθμιση του πάχους του πηκτώματος.

- ii. Σε ένα ποτήρι ζέσεως παρασκευάζεται το μείγμα ουρίας – ακρυλαμιδίου 6M προσθέτοντας τα αντιδραστήρια (συστατικά A) στις ποσότητες που αναγράφονται παρακάτω.

Συστατικά A:

Ουρία 25 g

Rapid Gel 7 ml

10X TBE 5.5 ml (εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί 5X TBE 11 ml

dH₂O 28 ml και ο όγκος του dH₂O να είναι 22.5 ml)

DMSO 500 μl

- iii. Στη συνέχεια λαμβάνεται το μείγμα (των συστατικών A) με σύριγγα και ακολουθεί η διέλευσή του μέσα από το ειδικό φίλτρο καθαρισμού (Corning Sterile Syringe Filter 0.45 μm) για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων από τις παραπάνω ουσίες. Στο διαυγές πλέον διάλυμα προστίθενται 50 μl TEMED και 350 μl 10% APS υπό συνεχή ανάδευση.
- iv. Το τελικό διάλυμα τοποθετείται με σύριγγα στο κενό ανάμεσα στα τζάμια και όταν συμπληρωθεί ο απαραίτητος όγκος, τοποθετείται σε ειδική θέση ένα χτενάκι με σκοπό να δημιουργηθούν, μετά την πήξη του πηκτώματος, τα πηγαδάκια φόρτωσης των δειγμάτων.
- v. Μετά την πήξη του πηκτώματος (περίπου σε 1 ώρα), τα τζάμια τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και ακολουθεί καθαρισμός στα πηγαδάκια φόρτωσης του δείγματος με σύριγγα και ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X.
- vi. Γίνεται ένα αρχικό τρέξιμο του πηκτώματος στη συσκευή στα 3000 Volt, 30 mA και έως 75 W για 30 min.
- vii. Έπειτα ακολουθεί εστίαση των λείζερ στα 700 και 800 nm και η συσκευή ηλεκτροφόρησης είναι έτοιμη.
- viii. Τα δείγματα, πριν φορτωθούν στο πήκτωμα υπόκεινται σε αποδιάταξη, στους 95°C για 5 λεπτά αφού προηγουμένως έχει προστεθεί σε αυτά 5 μl χρωστικής φορμαμιδίου.
- ix. Καθαρίζονται ξανά τα πηγαδάκια του πηκτώματος και φορτώνονται τα δείγματα. Η ποσότητα του δείγματος που φορτώνεται στο πήκτωμα ποικίλει ανάλογα με το είδος του δείγματος και κυμαίνεται από 0.7–1 μl ενώ η σειρά

φόρτωσης των δειγμάτων στο πήκτωμα είναι: ολικό αίμα – φυσιολογικός ιστός – παθολογικός ιστός.

- χ. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης τίθεται σε λειτουργία αφού προηγουμένως καθοριστούν οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης: 3000 Volt, 30 mA, 75 W, 45 °C, Scan speed 3 και Signal filter 3.

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR των 5 δεικτών Bethesda διαρκεί περίπου 6 ώρες και τα αποτελέσματα συλλέγονται σε ειδικό φάκελο στο αρχείο της συσκευής LI-COR DNA Sequencer 4200.

Τα αποτελέσματα που αναμένονται μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης είναι παρόμοια με την Εικόνα 9, όπου οι επιπλέον ζώνες που εμφανίζονται στον καρκινικό ιστό σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό αποτελούν την λεγόμενη μικροδορυφορική αστάθεια.



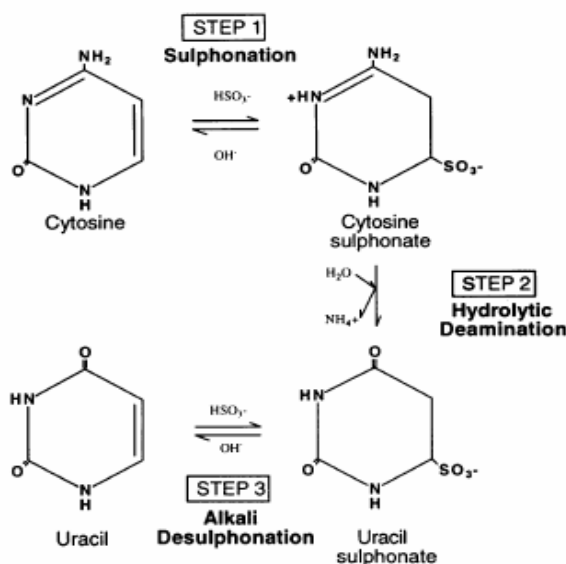
Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση της μικροδορυφορικής αστάθειας, όπως φαίνεται μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου.

Στο πήκτωμα το δείγμα DNA του καρκινικού ιστού εμφανίζει επιπλέον ζώνες εξαιτίας της μικροδορυφορικής αστάθειας.

Με τον τρόπο αυτό, ελέγχθηκαν όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, ως προς την ύπαρξη ή μή μικροδορυφορικής αστάθειας. Οι ασθενείς που εμφάνισαν αστάθεια σε δύο ή και περισσότερους από τους πέντε δείκτες χαρακτηρίστηκαν ως MSI-H ενώ αυτοί με αστάθεια σε έναν δείκτη ή κανέναν χαρακτηρίστηκαν ως MSI-L και MSS αντίστοιχα.

5.4. Έλεγχος της μεθυλίωσης

Την τελευταία δεκαετία, οι μεθοδολογίες για τον έλεγχο της μεθυλίωσης συνεχώς εξελίσσονται. Μέχρι πρότινος, ο έλεγχος της μεθυλίωσης στηριζόταν στην χρήση ενζύμων τα οποία αναγνωρίζουν μεθυλιωμένες και μη-μεθυλιωμένες ομόλογες περιοχές. Αυτή η προσέγγιση είχε πολλά μειονεκτήματα. Από ατελές περιοριστικό κόστιμο, μέχρι την τελική απομόνωση της περιοχής που μελετάται. Επιπλέον, προσδιορίζονταν με την βοήθεια τεχνολογιών, όπως το αποτύπωμα κατά Southern (Southern blot), οι οποίες όμως χρειάζονται υψηλές ποσότητες υποστρώματος και DNA μεγάλου μοριακού βάρους. Η ανακάλυψη της επεξεργασίας του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (NaHSO_3) (Εικόνα 10) το οποίο αλλάζει τις μη-μεθυλιωμένες κυτοσίνες, σε ουρακίλες (U) (σε επίπεδο RNA) ή θυμίνες (T) (σε επίπεδο DNA) αλλά αφήνει ανέπαφες τις μεθυλιωμένες κυτοσίνες [167], σε συνδυασμό με ενίσχυση με ειδικές για PCR πριμοδοτικές αλληλουχίες, καθώς και την χρήση μεθοδολογιών όπως της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR, Taqman) και τη γενωμική αλληλούχιση (sequencing), έχει κάνει δυνατή και εύκολη τη μελέτη της μεθυλίωσης του DNA σε κάθε παθολογικό υλικό, από ορό, αίμα, ιστό, μέχρι και παλαιότερους παραφρινοποιημένους ιστούς.



Εικόνα 10. Χημική μετατροπή της κυτοσίνης σε ουρακίλη με όξινο θειώδες νάτριο (NaHSO_3) [167].

Η βασική πειραματική διαδικασία ελέγχου της μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT περιλαμβάνει τα εξής στάδια :

1. Επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (NaHSO_3).
2. Εφαρμογή της αντίδρασης PCR με τη χρήση κατάλληλων πριμοδοτικών αλληλουχιών ειδικών για τα μεθυλιωμένα και τα μη μεθυλιωμένα προϊόντα. Ειδικότερα, οι πριμοδοτικές αλληλουχίες ειδικές για τις μη-μεθυλιωμένες περιοχές οι οποίες μετά την επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο έχουν όλες τις κυτοσίνες στις νησίδες CpG αλλαγμένες σε θυμίνη (T), περιέχουν βάσεις αδενίνης συμπληρωματικές των θυμιδινών, ενώ οι ειδικές για τις μεθυλιωμένες περιοχές πριμοδοτικές αλληλουχίες περιέχουν αντί για θυμίνες, γουανίνες συμπληρωματικές βάσεις των κυτοσινών.
3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, έλεγχος του αποτελέσματος κάτω από ακτινοβολία UV και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Παράλληλα για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την παραπάνω διαδικασία γίνεται αλληλούχιση των προϊόντων της PCR και ανάλυση σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου σύμφωνα με τα επιπλέον στάδια:

4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, έλεγχος και κόψιμο των ζωνών της PCR που προκύπτουν από το πήκτωμα.
5. Καθαρισμός του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης με τη χρήση της εμπορικής συσκευασίας QIAquick Gel Extraction Kit της Qiagen.
6. Αλληλούχιση του DNA με τη μέθοδο των ιχνηθετημένων διεδόξυ-νουκλεοτιδίων (ddNTPs) και τη χρήση της αντίστοιχης πριμοδοτικής αλληλουχίας (ειδικής για μεθυλιωμένη ή μη-μεθυλιωμένη περιοχή).
7. Ανάλυση και επεξεργασία των προϊόντων σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου 6M στον αυτόματο αναλυτή DNA LI-COR 4200.

5.4.1. Επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (NaHSO_3)

Για την επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (NaHSO_3) χρησιμοποιήθηκαν δύο μεθοδολογίες. Η κλασική μέθοδος όπως περιγράφηκε αρχικά από τον Clark και την ομάδα του το 1994 [167] και μια δεύτερη, πιο απλοποιημένη, αλλά εξίσου αξιόπιστη μέθοδος, που στηρίζεται και αυτή στην επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο, αλλά γίνεται με τη χρήση της εμπορικής συσκευασίας EZ methylation-Gold kit της εταιρίας ZYMO RESEARCH.

5.4.1.1. Α' Μέθοδος επεξεργασίας του DNA με όξινο θειώδες νάτριο

Συσκευές:

Κυκλοποιητής: PTC-100TM, MJ Research Inc. (Αμερική)

Υδατόλουτρο: GFL (Γερμανία)

Αναδευτήρας: Heidolph DREHZAHL (Γερμανία)

Φυγόκεντρος: Heraeus CHRIST (Γερμανία)

Αντιδραστήρια:

1. 1-1.5 µg/ml DNA από τα δείγματα ιστών και αίμα
2. NaOH 1 M (Sigma-Aldrich, Inc., USA)
3. 10 mg/ml DNA από σπέρμα σολομού
4. Υδροκινόνη 10 mM (Hydroquinone minimum 99%) (Sigma-Aldrich, Inc., USA)
5. Όξινο θειώδες νάτριο 3 M (Sodium bisulfite, NaHSO₃, minimum 99%) (Sigma-Aldrich, Inc., USA)
6. Εμπορική συσκευασία καθαρισμού με στήλες Wizard DNA Clean up system (Promega, Madison, Αμερική)
7. Ρητίνη (DNA Clean up Resin, Promega, Madison, Αμερική)
8. Ισοπροπανόλη 80% (Merck, Darmstadt, Γερμανία)
9. Αιθανόλη 100%
10. Ειδικό ορυκτέλαιο για PCR αντιδράσεις - Mineral Oil (SIGMA, Steinheim, Γερμανία)
11. Οξικό αμμώνιο (Merck, Darmstadt, Γερμανία)
12. Γλυκογόνο (Merck, Darmstadt, Γερμανία)

Διαδικασία:

- i. Σε ένα σωληνάριο Eppendorf των 1.5 ml, τοποθετούνται 10 µl DNA από το προς εξέταση δείγμα, 10 µl NaOH 1 M, 0,33 µl DNA από σπέρμα σολομού και συμπληρώνονται με νερό μέχρι τελικού όγκου 50µl. Η διαδικασία αυτή γίνεται για κάθε δείγμα. Ακολούθως τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά στους 37 °C.
- ii. Στη συνέχεια παρασκευάζεται διάλυμα υδροκινόνης 10 mM και διάλυμα όξινου θειώδες νατρίου 3 M (την ίδια ημέρα ώστε τα διαλύματα να είναι φρέσκα).

- iii. Μετά το πέρας της επώασης στους 37°C, τα δείγματα τοποθετούνται σε νέα σωληνάρια Eppendorf και προστίθενται 30 µl υδροκινόνη 10 mM, 520 µl όξινου θειώδες νατρίου 3 M και μια σταγόνα ειδικού ορυκτέλαιου στο κάθε ένα. Τα δείγματα επωάζονται στον κυκλοποιητή στους 50°C για 16 ώρες.
- iv. Στη συνέχεια ακολουθούν τα στάδια καθαρισμού σύμφωνα με πρωτόκολλο της συσκευασίας Wizard DNA Clean up system.
- v. Σε ένα σωληνάριο Eppendorf 1.5 ml, προστίθεται 1 ml ρητίνης και το μείγμα του DNA μετά την επώαση και ανακατεύονται ήπια.
- vi. Το παραπάνω μείγμα, μεταφέρεται στη στήλη που παρέχεται από την εμπορική συσκευασία καθαρισμού, με σύριγγα των 2.5 ml.
- vii. Στη συνέχεια προστίθεται στη στήλη με το μείγμα, 2 ml διαλύματος ισοπροπανόλης 80%.
- viii. Η στήλη μεταφέρεται σε ένα σωληνάριο των 1.5 ml και ακολουθεί φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα (14000 στροφές) για 2 λεπτά.
- ix. Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο και προστίθενται 50 µl προθερμασμένο νερό (60-70°C) και αφήνεται για 1 λεπτό. Η στήλη φυγοκεντρείται στη μέγιστη ταχύτητα για 20 δευτερόλεπτα και το καθαρό DNA εκλούεται από τη στήλη.
- x. Για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων θείου από το DNA, το διάλυμα του DNA επωάζεται με 3 µl NaOH 3 M στους 37°C για 20-30 λεπτά.
- xi. Τέλος στα δείγματα προστίθεται 150 µl αιθανόλη 100%, 66 µl οξικό αμμώνιο και γλυκογόνο, το οποίο βοηθάει στην καταβύθιση του DNA και το μείγμα φυγοκεντρείται για 30 λεπτά.
- xii. Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και στο ίζημα προστίθεται 1 ml αιθανόλης 70%. Φυγοκεντρείται για ένα λεπτό και το υπερκείμενο πετιέται.
- xiii. Το ίζημα, αφήνεται να στεγνώσει και επαναιωρείται σε 30 µl ddH₂O. Το καθαρό τροποποιημένο πλέον DNA διατηρείται στους 4°C για να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια ή φυλάσσεται στους -30°C για περίπου 1 χρόνο.

Η όλη διαδικασία επεξεργασίας του DNA με όξινο θειώδες νάτριο με τον παραπάνω τρόπο, φαίνεται ότι είναι αρκετά χρονοβόρα και πολύπλοκη, με αποτέλεσμα να αυξάνονται οι πιθανότητες πειραματικών λαθών κατά την πορεία εκτέλεσής της. Για το λόγο αυτό κατέσθει αναγκαίο να εφαρμοστεί, η εμπορική συσκευασία ελέγχου μεθυλίωσης του DNA, EZ methylation-Gold kit της εταιρίας ZYMO RESEARCH.

5.4.1.2. Β' Μέθοδος επεξεργασίας του DNA (EZ methylation-Gold kit)

Συσκευές:

Κυκλοποιητής: PTC-100TM, MJ Research Inc.(Αμερική)

Υδατόλουτρο: GFL (Γερμανία)

Αναδευτήρας: Heidolph DREHZAHL (Γερμανία)

Φυγόκεντρος: Heraeus CHRIST (Γερμανία)

Στήλες Zymo-Spin IC Collumns που παρέχονται από την εμπορική συσκευασία EZ methylation-Gold kit της εταιρίας ZYMO RESEARCH CORPORATION (Αμερική)

Αντιδραστήρια:

1. 500 pg- 2 μg DNA από δείγματα ιστών και αίμα
2. Τυποποιημένα αντιδραστήρια της εμπορικής συσκευασίας ελέγχου μεθυλίωσης του DNA, EZ methylation-Gold kit της εταιρίας ZYMO RESEARCH CORPORATION (Αμερική):

CT Conversion Reagent

M-Dilution Buffer

M-Dissolving Buffer

M-Binding Buffer

M-Desulphonation Buffer

M-Wash Buffer

M-Elution Buffer

Διαδικασία:

- i. Σε ειδικά σωληνάρια Eppendorf των 200 μl, τοποθετούνται 20 μl DNA και 130 μl διαλύματος CT Conversion Reagent.
- ii. Τα δείγματα τοποθετούνται στον κυκλοποιητή για 6 ώρες εκτελώντας το εξής πρόγραμμα: 98°C για 10 λεπτά, 53°C για 30 λεπτά, 8 κύκλοι που περιλαμβάνουν τα στάδια 53°C για 6 λεπτά και 37°C για 30 λεπτά και τέλος 4°C για συντήρηση των δειγμάτων στον κυκλοποιητή μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.
- iii. Το κάθε δείγμα (ποσότητας 150 μl) τοποθετείται σε στήλες (Zymo-Spin columns) και προστίθενται 600 μl διαλύματος M-Binding Buffer.
- iv. Μετά από καλή ανάδευση, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό και απομάκρυνση του διαλύματος έκλυσης από το δοχείο συλλογής των στηλών.

- v. Στη συνέχεια προστίθενται 200 µl διαλύματος M-Desulphonation Buffer. Τα δείγματα αφήνονται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό και απομάκρυνση του διαλύματος έκλουσης από το δοχείο συλλογής των στηλών.
- vi. Προστίθενται 200 µl διαλύματος M-Wash Buffer και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό και απομάκρυνση του διαλύματος έκλουσης από το δοχείο συλλογής των στηλών. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται για ακόμα μία φορά.
- vii. Οι στήλες που περιέχουν το πλέον καθαρό επεξεργασμένο DNA, τοποθετούνται σε σωληνάρια Eppendorf των 1,5 ml και προστίθενται 10 διαλύματος M-Elution Buffer ή dH₂O. Ακολουθεί γρήγορη φυγοκέντρηση και έκλυση του καθαρού επεξεργασμένου DNA.

Το επεξεργασμένο, με όξινο θειώδες νάτριο, DNA είναι έτοιμο για περαιτέρω χρήση ή μπορεί να διατηρηθεί στους -20°C για διάστημα ενός έτους.

5.4.2. Ειδική PCR για μεθυλίωση

Αρχή της μεθόδου:

Η μεθοδολογία της ειδικής PCR για μεθυλίωση, στηρίζεται στη χρήση δύο ζευγών ειδικά σχεδιασμένων πριμοδοτικών αλληλουχιών ώστε να αναγνωρίζουν το χημικώς τροποποιημένο με όξινο θειώδες νάτριο DNA, όπου όλες οι μη-μεθυλιωμένες κυτοσίνες έχουν μετατραπεί σε ουρακίλες, οι οποίες με τη σειρά τους αναγνωρίζονται από την πολυμεράση ως θυμίνες. Ειδικότερα το ένα ζεύγος πριμοδοτικών αλληλουχιών (που είναι ειδικό για τη μη-μεθυλίωση) περιέχει στην αλληλουχία του αδενίνη (A) ή θυμίνη (T) αντί για γουανίνη (G) ή κυτοσίνη (C) οι οποίες έχουν μετασχηματιστεί κατάλληλα από την επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο. Αντίθετα το άλλο ζεύγος πριμοδοτικών αλληλουχιών (που είναι ειδικό για τη μεθυλίωση) περιέχει στην αλληλουχία του αδενίνη (A) ή θυμίνη (T) αντί για γουανίνη (G) ή κυτοσίνη (C) στις περιοχές έξω από τις νησίδες CpG οι οποίες έχουν μετασχηματιστεί κατάλληλα από την επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο, ενώ αντίθετα στις περιοχές με CpG η γουανίνη (G) ή κυτοσίνη (C) παραμένει αφού εξ' αιτίας της μεθυλίωσης τους δεν έχουν επηρεαστεί από την επεξεργασία με όξινο θειώδες νάτριο. Έτσι όταν μόνο το πρώτο ζεύγος πριμοδοτικών αλληλουχιών δώσει προϊόν PCR στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, τότε το δείγμα θεωρείται

μη-μεθυλιωμένο (U). Και αντίστοιχα αν μόνο το δεύτερο ζεύγος πριμοδοτικών αλληλουχιών δώσει προϊόν PCR τότε το δείγμα θεωρείται μεθυλιωμένο (M). Ενώ στην περίπτωση που προκύψει προϊόν PCR και με τα δύο ζεύγη πριμοδοτικών αλληλουχιών σημαίνει ότι υπάρχουν τόσο μεθυλιωμένα όσο και μη μεθυλιωμένα μόρια στη συγκεκριμένη περιοχή.

Συσκευές:

Κυκλοποιητής: PTC-100TM, MJ Research Inc. (Αμερική)

Αντιδραστήρια:

1. 50-100 ng τροποποιημένο με όξινο θειώδες νάτριο DNA
2. 10X PCR Gold Buffer (Applied Biosystem, Γερμανία)
3. 25 mM MgCl₂ (Applied Biosystem, Γερμανία)
4. 10 mM NuclMIX each (Promega, Αμερική)
5. Primer M1, UM1 0.5 μM (10 pmol/μl)
6. Primer M2, UM2 0.5 μM (10 pmol/μl)
7. Ampli Taq Gold DNA polymerase (5U / μl) (Applied Biosystem, Γερμανία)

Σε ειδικό σωληνάριο Eppendorf (200 μl) για PCR προσθέτουμε τα απαραίτητα, για κάθε αντίδραση αντιδραστήρια (Πίνακας 5) και σε ξεχωριστά σωληνάκια το κάθε ένα από τα δύο διαφορετικά ζεύγη των ειδικά σχεδιασμένων πριμοδοτικών αλληλουχιών (Πίνακας 6), ώστε να προκύψει το μείγμα αντίδρασης του Πίνακα 5. Έτσι για κάθε δείγμα προκύπτουν δύο διαφορετικές αντιδράσεις εξαρτώμενες από το ζεύγος των πριμοδοτικών αλληλουχιών που χρησιμοποιείται.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	M	U
dH ₂ O	36,75 μl	35,25 μl
1X PCR Buffer	5,00 μl	5,00 μl
MgCl ₂ 2.5mM	2,00 μl	3,50 μl
NuclMIX 250 μM each	1,00 μl	1,00 μl
DNA (50-100 ng)	4,00 μl	4,00 μl
Primer 1 (10 pmol/μl)	0,50 μl	0,50 μl
Primer 2 (10 pmol/μl)	0,50 μl	0,50 μl
Taq Gold Polymerase	0,25 μl	0,25 μl
Σύνολο	50,00 μl	50,00 μl

Πίνακας 5. Ποσότητες των αντιδραστηρίων για τον έλεγχο των μεθυλιωμένων (M) και μη-μεθυλιωμένων (U) προϊόντων.

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ CpG	ΠΡΙΜΟΔΟΤΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ	ΠΡΟΪΟΝ PCR
hMLH1	M	(1) 5'-ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCGC-3' (2) 5'-CCTCATCGTAACTACCCGCG-3'	55°C	115bp
	U	(1) 5'-TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT-3' (2) 5'-ACCACCTCATCATAACTACCCACA-3'	55°C	124bp
MGMT*	M	(1) 5'-TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC-3' (2) 5'-GCACTCTCCGAAAACGAAACG-3'	62°C	121bp
	U	(1) 5'-TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT-3' (2) 5'-AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA-3'	62°C	133bp
P16	M	(1) 5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3' (2) 5'-CCACCTAAATCGACCTCCGACCG-3'	65°C	234bp
	U	(1) 5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3' (2) 5'-CCACCTAAATCAACCTCCAACCA-3'	55°C	234bp

M= πριμοδοτική αλληλουχία ειδική για μεθυλιωμένες CpG περιοχές, U= πριμοδοτική αλληλουχία ειδική για μη-μεθυλιωμένες CpG περιοχές.
* Και στις τέσσερις πριμοδοτικές αλληλουχίες του γονιδίου MGMT προστέθηκε μία ουρά 20bp (5'-GCGGTCCCAAAAGGGTCAGT-3') στο 5' άκρο τους.

Πίνακας 6. Πριμοδοτικές αλληλουχίες, θερμοκρασία υβριδοποίησης και μέγεθος του τελικού προϊόντος της PCR για τον έλεγχο της μεθυλίωσης.

Ένα τυπικό πρόγραμμα που χρησιμοποιείται στον κυκλοποιητή για την ενίσχυση με PCR των αντίστοιχων αντιδράσεων (Πίνακας 5) είναι το εξής: 95°C για 10 λεπτά, 55 κύκλοι με τα στάδια: 95°C για 30 δεύτερα, 30 δεύτερα στην αντίστοιχη θερμοκρασία υβριδοποίησης της κάθε πριμοδοτικής αλληλουχίας (Πίνακας 6) και 72°C για 1 λεπτό και τέλος 72°C για 10 λεπτά και 4°C για τη συντήρηση των δειγμάτων μέσα στον κυκλοποιητή μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

Στη συνέχεια τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης σύμφωνα με όσα περιγράφονται στην παράγραφο 5.2.4. Επειδή τα μοριακά βάρη των μεθυλιωμένων και μη-μεθυλιωμένων προϊόντων της PCR εμφανίζουν πολύ μικρές διαφορές μεταξύ τους, ο διαχωρισμός τους γίνεται σε πήκτωμα αγαρόζης υψηλής συγκέντρωσης 2.5% και τα αποτελέσματα ελέγχονται με τη χρήση ακτινοβολίας UV.

Η παραπάνω διαδικασία ακολουθείται σε όλα τα δείγματα (ιστό, παθολογικό και φυσιολογικό και αίμα) για κάθε ασθενή και για μεγαλύτερη αξιοπιστία επαναλαμβάνεται από το στάδιο της PCR για ακόμα δύο φορές.

5.4.3. Αλληλούχιση των προϊόντων της ειδικής PCR για μεθυλίωση στη συσκευή LI-COR DNA Sequencer 4200

Για να ελεγχθεί η πιθανότητα μετατροπής των μη-μεθυλιωμένων βάσεων κυτοσίνης σε ουρακίλη και ταυτόχρονα η διατήρηση των μέθυλο-κυτοσινών μετά από επεξεργασία των δειγμάτων με όξινο θειώδες νάτριο, καθώς και να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα των αντίστοιχων για κάθε περίπτωση προϊόντων PCR ακολουθεί αλληλούχιση των προϊόντων της PCR μετά από την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης 2.5%. Βασική προϋπόθεση πριν από την αλληλούχιση της υπό εξέταση περιοχής είναι ο πλήρης καθαρισμός του προϊόντος PCR από πήγμα αγαρόζης μικρής συγκέντρωσης (1%) και στη συνέχεια η εφαρμογή της αντίδρασης αλληλούχισης του DNA σύμφωνα με την μέθοδο που ανέπτυξε ο Frederick Sanger και οι συνεργάτες [168].

5.4.3.1. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR από πήκτωμα αγαρόζης

Τα δείγματα φορτώνονται σε πήκτωμα 1% αγαρόζης, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (παράγραφος 5.2.4.) και μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, με την βοήθεια της λυχνίας UV, κόβονται οι αντίστοιχες ζώνες από το πήκτωμα. Στη συνέχεια ακολουθεί καθαρισμός και απομόνωση του DNA από τα δείγματα με τη

χρήση της εμπορικής συσκευασίας QIAquick GelExtraction Kit της εταιρίας Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Γερμανία).

Συσκευές:

Υδατόλουτρο: GFL (Γερμανία)

Αναδευτήρας: Heidolph DREHZAHL (Γερμανία)

Φυγόκεντρος: Heraeus CHRIST (Γερμανία)

Στήλες QIAquick column της εταιρίας Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Γερμανία)

Αντιδραστήρια:

1. Τυποποιημένα αντιδραστήρια της συσκευασίας QIAquick GelExtraction Kit της εταιρίας Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Γερμανία):

Διάλυμα QG

Διάλυμα PE

2. Ισοπροπανόλη 100% (Merck, Darmstadt, Γερμανία)

Διαδικασία:

- i. Αφού κοπούν από το πήκτωμα αγαρόζης οι ζώνες που περιέχουν το DNA, τοποθετούνται σε προζυγισμένα ειδικά σωληνάρια Eppendorf (1.5 ml) και υπολογίζεται το καθαρό βάρος τους.
- ii. Σε κάθε ένα σωληνάριο προστίθεται, η τριπλάσια ποσότητα του βάρους του τεμαχίου του πηκτώματος, διάλυμα QG.
- iii. Τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά στους 50°C μέχρι να διαλυθεί το πήκτωμα αγαρόζης, κάνοντας ενδιάμεσα ισχυρή ανάδευση κάθε 2-3 λεπτά.
- iv. Αφού διαλυθεί το πήκτωμα, προστίθεται στο κάθε μείγμα ισοπροπανόλη σε ποσότητα ίση με το βάρος του κάθε τεμαχίου πηκτώματος αγαρόζης και αναμιγνύονται.
- v. Το κάθε δείγμα τοποθετείται στις ειδικές στήλες (QIAquick column) και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11.000 στροφές.
- vi. Απομακρύνεται το εκχύλισμα από το σωληνάριο συλλογής, προστίθενται 500 µl από το διάλυμα QG και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11.000 στροφές.
- vii. Απομακρύνεται το εκχύλισμα από το σωληνάριο συλλογής και προστίθενται 750 µl από το διάλυμα PE. Το μείγμα αφήνεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στις 11.000 στροφές.
- viii. Απομακρύνεται το εκχύλισμα από το σωληνάριο συλλογής και τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 2 λεπτά στις 14.000 στροφές.

- ix. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωληνάριο Eppendorf των 1.5 ml και προστίθεται 30 µl απεσταγμένο νερό. Τα δείγματα αφήνονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 2 λεπτά στις 14.000 στροφές ώστε να εκλουστεί το καθαρό DNA το οποίο και συλλέγεται και αποθηκεύεται στους -30°C μέχρι την περαιτέρω χρήση του.

5.4.3.2. Αλληλούχιση του DNA και ανάλυση στον αναλυτή LI-COR

Αρχή της μεθόδου:

Η αλληλουχία των βάσεων του DNA (sequencing) προσδιορίζεται με τη δημιουργία τμημάτων που προκύπτουν από τη ρυθμιζόμενη διακοπή της ενζυμικής αντιγραφής των αντιδράσεων PCR, λόγω προσθήκης διδεόξυ-νουκλεοτιδίων (ddNTPs), μια μέθοδο που αρχικά ανέπτυξε ο Frederick Sanger και οι συνεργάτες του [168]. Η σύνθεση απαιτεί την ύπαρξη μίας πριμοδοτικής αλληλουχίας για την έναρξη της αντιγραφής και φυσικά το υπόστρωμα DNA. Το μείγμα της κάθε αντίδρασης, εκτός από τα τέσσερα τριφωσφορικά δεόξυ-ριβονουκλεοτίδια (A, T, G, C), περιλαμβάνει και ένα 2',3'-διδεόξυ-ανάλογο του ενός από αυτά. Η ενσωμάτωση αυτού του αναλόγου παρεμποδίζει τη συνέχιση της νεοσχηματιζόμενης αλυσίδας γιατί δεν υπάρχει το 3'-υδροξυλικό άκρο που χρειάζεται για να σχηματισθεί ο επόμενος φωσφοδιεστερικός δεσμός. Αυτό έχει ως συνέπεια να παραχθούν τμήματα με διαφορετικά μήκη, στο 3' άκρο των οποίων θα βρίσκεται το διδεόξυ-ανάλογο (A, T, G ή C κάθε φορά). Οι τέσσερις τύποι αλυσίδων (μία για κάθε ένα από τα διδεόξυ-ανάλογα), διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου ή ουρίας-ακρυλαμιδίου όπου και διαβάζεται είτε με χρώση του πηκτώματος (αυτοραδιογράφημα) είτε με τους αυτόματους αναλυτές αλληλούχισης στους οποίους βέβαια απαιτείται η σήμανση (φθορισμός) του DNA.

Η σήμανση του DNA στις αυτόματες μεθοδολογίες αλληλούχισης είναι δυνατόν να προέρχεται είτε από τη χρήση φθορίζοντων ddNTPs (dye-terminator method), είτε από τη χρήση φθορίζοντων πριμοδοτικών αλληλουχιών (dye-primer), ή και φθορίζοντος dNTP (dye-elongation).

Για την επιβεβαίωση με αλληλούχιση των μεθυλιωμένων και μη-μεθυλιωμένων τμημάτων των υποκινητών των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT στον αυτόματο αναλυτή αλληλούχισης LI-COR ακολουθήθηκε η σήμανση του DNA με τη χρήση φθορίζοντων ddNTPs (dye-terminator method) με χρωστική που

ανιχνεύεται στα 700 nm και τα οποία παρέχονται από την εμπορική συσκευασία αλληλούχισης του DNA, Thermo Sequenase Cyp5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, της εταιρίας GE Healthcare (GE Healthcare Life Sciences, Λονδίνο, UK).

Για κάθε αντίδραση αλληλούχισης των μεθυλιωμένων ή μη-μεθυλιωμένων τμημάτων χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το αντίστοιχο καθαρισμένο DNA από τα προϊόντα PCR, η μία (πρόσθια ή αντίστροφη) κατάλληλα τροποποιημένη πριμοδοτική αλληλουχία του Πίνακα 6 για κάθε γονίδιο, το ένα από τέσσερα φθορίζοντα διδεόξυ-ριβονουκλεοτίδια (ddNTPs) που περιλαμβάνουν μίγμα και των τεσσάρων δεόξυ-ριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και μία θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (sequenase) που παρέχονται από την εμπορική συσκευασία αλληλούχισης του DNA (Thermo Sequenase Cyp5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit).

Συσκευές:

Κυκλοποιητής: PTC-100TM, MJ Research Inc., Αμερική.

Αυτόματος αναλυτής LI-COR DNA sequencer 4200 (LI-COR Inc., LONG READER 4200, Αμερική)

Αντιδραστήρια:

1. Καθαρισμένο DNA (50-250 fmol) από το προϊόν της ειδικής για μεθυλίωση PCR
2. Πρόσθια ή αντίστροφη πριμοδοτική αλληλουχία (Πίνακας 6) του κάθε γονιδίου για κάθε προϊόν PCR αντίστοιχα (10 pmol/μl)
3. Τυποποιημένα αντιδραστήρια της συσκευασίας αλληλούχισης του DNA Thermo Sequenase Cyp5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit της εταιρίας GE Healthcare (GE Healthcare Life Sciences, Λονδίνο, UK):

ddGTP Mix

ddATP Mix

ddTTP Mix

ddCTP Mix

Reaction Buffer

Thermo Sequenase DNA polymerase (10U/μl)

Χρωστική: Formamide Loading Dye

Διαδικασία:

- i. 4 ειδικά σωληνάρια Eppendorf (των 200μl) για PCR σημαίνονται ως “A”, “C”, “G” και “T” για τις αντίστοιχες αντιδράσεις τερματισμού και προστίθεται 1 μl από το αντίστοιχο ιχνηθετημένο διδεόξυ-ριβονουκλεοτίδιο (πχ. “A” για το ddATP Mix).
- ii. Για κάθε DNA που θα αλληλουχιθεί ετοιμάζεται το ακόλουθο μείγμα με τα αντιδραστήρια σε ειδικό σωληνάριο Eppendorf (των 200μl) για PCR τα οποία τοποθετούνται σε πάγο εξαιτίας της προσθήκης της πολυμεράσης:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	Μ ή U
DNA (50-250 fmol)	έως 24,0 μl
Buffer αντίδρασης	3,5 μl
Πριμοδοτική αλληλουχία 1 ή 2 (10 pmol/μl)	0,5 μl
Thermo sequenase DNA polymerase (10U/μl)	2,0 μl
dH ₂ O (για τελικό όγκο 31.5 μl)	x μl
Συνολικός όγκος	31,5 μl

- iii. Από το παραπάνω μείγμα, 7 μl μείγματος μεταφέρονται σε κάθε σεσημασμένο σωληνάριο με τα ιχνηθετημένα διδεόξυ-ριβονουκλεοτίδια (βήματος i).
- iv. Όλα τα σωληνάρια, τέσσερα για κάθε δείγμα, μεταφέρονται στον κυκλοποιητή και αρχίζει η διαδικασία πολυμερισμού για αλληλούχιση.
- v. Ένα τυπικό πρόγραμμα πολυμερισμού για αλληλούχιση είναι το ακόλουθο: 95°C για 5 λεπτά, 30 κύκλοι των: 95°C για 30 δεύτερα και 60°C για 30 δεύτερα, 72°C για 1 λεπτό και τέλος συντήρηση στους 4°C.
- vi. Μετά το τέλος του πολυμερισμού τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο.
- vii. Σε κάθε δείγμα προστίθεται 4 μl χρωστικής Formamide Loading Dye απαραίτητη για τη φόρτωσή τους στο πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου αλλά και για τον τερματισμό της αντίδρασης πολυμερισμού.

Πριν τη φόρτωση 1 μl από το κάθε δείγμα, σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου 6 M και την ανάλυσή τους στον αυτόματο αναλυτή LI-COR DNA sequencer 4200, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (παράγραφος 5.3.2.), τα δείγματα αποδιατάσσονται στους 95°C για 5 λεπτά και τοποθετούνται στον πάγο. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 6 ώρες και τα αποτελέσματα συλλέγονται και αποθηκεύονται σε φάκελο του αναλυτή.

5.5. Έλεγχος της αστάθειας στα γονίδια στόχους: TGFβRII, BAX, IGF1R, hMSH3, hMSH6, EGFR και c-MYB

Αρχή της μεθόδου:

Η μεθοδολογία αυτή έχει ως στόχο την ανάλυση της αστάθειας στα γονίδια στόχους TGFβRII, BAX, IGF1R, hMSH3, hMSH6, EGFR και c-MYB που φέρουν μονονουκλεοτιδικές ή δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις τόσο σε κωδικοποιούσες περιοχές (εξόνια) όσο και σε μη κωδικοποιούσες περιοχές (ιντρόνια). Η αστάθεια αυτή, οφείλεται στην ελαττωματική λειτουργία του συστήματος MMR και συνοδεύεται από τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας. Η μεθοδολογία ελέγχου περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Ενίσχυση των γονιδίων στόχων στην περιοχή των εξονίων ή ιντρονίων τους που φέρουν τις αντίστοιχες μονονουκλεοτιδικές ή δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις με PCR και στα τρία είδη δειγμάτων DNA (ολικό αίμα, φυσιολογικό και παθολογικό ιστό) για κάθε ασθενή.
2. Καθαρισμός των προϊόντων της πρώτης PCR και επιπλέον ενίσχυση με κατάλληλες, ιχνηθετημένους με φθορίζουσα χρωστική (IRD700 και IRD800), πριμοδοτικές αλληλουχίες.
3. Επεξεργασία και ανάλυση των ιχνηθετημένων προϊόντων PCR σε αποδιατακτικό πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου στον αναλυτή LI-COR DNA sequencer 4200.
4. Επιβεβαίωση της εμφανιζόμενης αστάθειας με αλληλούχιση των γονιδίων.

Η αρχική ενίσχυση των μονονουκλεοτιδικών ή δινουκλεοτιδικών περιοχών που φέρουν τα γονίδια στόχοι γίνεται με τις αντίστοιχες για κάθε περιοχή πριμοδοτικές αλληλουχίες (Πίνακας 7) με μία απλή αντίδραση PCR, τα αντιδραστήρια της οποίας και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις είναι σύμφωνα με τα αναφερόμενα στην παράγραφο 5.4.2.

Στον Πίνακα 7 που ακολουθεί αναγράφονται οι περιοχές των γονιδίων στόχων που μελετήθηκαν, οι αντίστοιχες πριμοδοτικές αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες της PCR και το τελικό μοριακό βάρος των περιοχών που ενισχύθηκαν.

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ	ΤΥΠΟΣ ΕΠΑΝΑΛΗΨΗΣ	ΠΡΙΜΟΔΟΤΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR	ΠΡΟΙΟΝ PCR
TGFβRII	Εξόνιο 3	πολυ A (10)	(1) 5'- AGTTTGCCATGACCCCAAGCT -3' (2) 5'- CTCATCAGAGCTACAGGAACA -3'	95°C για 5', 30 κύκλοι (94°C για 45", 61°C για 45", 72°C για 45"), 72°C για 10'	130bp
BAX	Εξόνιο 3	πολυ G (8)	(1) 5'- CCAGCTCTGAGCAGATCATG -3' (2) 5'- GCTCAGCTTCTTGGTGGACG -3'	95°C για 5', 30 κύκλοι (94°C για 45", 61°C για 45", 72°C για 45"), 72°C για 10'	140bp
IGFIIR	Εξόνιο 28	πολυ G (8)	(1) 5'- GTCTCCTGACTCAGAAGCTAAC -3' (2) 5'- CCGCTGGGTGCCGCGGTCACAG -3'	95°C για 5', 30 κύκλοι (94°C για 45", 61°C για 45", 72°C για 45"), 72°C για 10'	131bp
hMSH3	Εξόνιο 7	πολυ A (8)	(1) 5'- GTGAATCCCCTAATCAAGCTGG -3' (2) 5'- CACCTGCAAAGTACTTACCAC -3'	95°C για 5', 30 κύκλοι (94°C για 45", 61°C για 45", 72°C για 45"), 72°C για 10'	162bp
hMSH6	Εξόνιο 5	πολυ C (8)	(1) 5'- GAAGCCTCACTTTTACCCTCT -3' (2) 5'- ATGCAAGGATGGCGTGATCC -3'	95°C για 5', 30 κύκλοι (94°C για 45", 61°C για 45", 72°C για 45"), 72°C για 10'	155bp
EGFR	Ιντρόνιο 1	πολυ CA (16)	(1) 5'- GTTTGAAGAATTTGAGCCAACC -3' (2) 5'- TTCTTCTGCACACTTGGCAC -3'	95°C για 10', 30 κύκλοι (95°C για 30", 58°C για 30", 72°C για 30"), 72°C για 7'	121bp
c-MYB	Ιντρόνιο 1	πολυ T (19)	(1) 5'- CTGGGGACGAGAGGGCGACT -3' (2) 5'- CTACCTGGAGCCTCAGGGAAC -3'	95°C για 10', 30 κύκλοι (95°C για 45", 66°C για 1', 72°C για 1'), 72°C για 10'	290bp

Πίνακας 7. Γονίδια στόχοι που μελετήθηκαν, πριμοδοτικές αλληλουχίες και συνθήκες για την PCR

Όλα τα δείγματα DNA, τρία για κάθε ασθενή (αίμα, φυσιολογικός και παθολογικός ιστός) υποβάλλονται σε PCR με τα αντιδραστήρια και στις συνθήκες που αναγράφονται στον Πίνακα 7, για κάθε γονίδιο. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και καθαρίζονται με την εμπορική συσκευασία καθαρισμού των προϊόντων PCR, QIAquick Gel Extraction Kit της εταιρίας Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Γερμανία) όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.4.3.1. Στη συνέχεια τα καθαρά DNA των δειγμάτων, υποβάλλονται σε μία δεύτερη PCR ιχνηθέτισης με τις πριμοδοτικές αλληλουχίες κατάλληλα ιχνηθετημένες με χρωστική (IRD700 και IRD800) και ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου 6M σύμφωνα με τα αναφερόμενα στις παραγράφους 5.3.1. και 5.3.2. Με τον τρόπο αυτό γίνεται ένας πρώτος έλεγχος της αστάθειας των γονιδίων στόχων.

Για την επιβεβαίωση της ύπαρξης αστάθειας στα γονίδια στόχους και παράλληλα τον υπολογισμό του αριθμού των εισδοχών ή ελλείψεων στις αντίστοιχες πολυνουκλεοτιδικές περιοχές τους, τα δείγματα υποβάλλονται σε αλληλούχιση, χρησιμοποιώντας ως DNA υπόστρωμα τα προϊόντα της PCR μετά τον καθαρισμό τους από το πήκτωμα αγαρόζης και πριν την ιχνηθέτισή τους, σύμφωνα με τα περιγραφόμενα στην παράγραφο 5.4.3.2.

Ως προαιρετικό στάδιο, πριν την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πολυμερισμού στο πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου της συσκευής LI-COR, αλλά απαραίτητο σε περιπτώσεις που το τελικό προϊόν της PCR είναι μικρό σε μέγεθος νουκλεοτιδίων (<150 bp), όπως για παράδειγμα το γονίδιο EGFR, είναι η καταβύθισή τους με αιθανόλη. Στόχος του σταδίου αυτού είναι η απομάκρυνση των ιχνηθετημένων διδεόξυ-ριβονουκλεοτιδίων από το μίγμα της αντίδρασης, που εμφανίζονται στην αρχή της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου, ώστε η τελική εικόνα του προϊόντος αλληλούχισης μετά την ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα να είναι ευανάγνωστη.

5.5.1. Καθαρισμός ιχνηθετημένων προϊόντων PCR αλληλούχισης με καταβύθιση με αιθανόλη

Διαδικασία:

- i. Σε σωληνάριο Eppendorf (1.5 ml), τοποθετούνται 8 μl προϊόντος αλληλούχισης και προστίθενται 2 μl οξικού αμμωνίου 7.5 M και 30 μl παγωμένης αιθανόλης 100%. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και παραμονή για 20 λεπτά στον πάγο.
- ii. Τα σωληνάκια φυγοκεντρώνονται στις 12000 στροφές για 20-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- iii. Ακολουθεί προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου και πλύσιμο του ίζηματος με 200 μl παγωμένη αιθανόλη 70%.
- iv. Το μείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 12000 στροφές, το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά ενώ το ίζημα ξηραίνεται για 2-3 λεπτά σε φυγόκεντρο κενού.
- v. Το τελικό δείγμα επαναιωρείται σε 6 μl χρωστική φορμαμιδίου (formamide loading dye) και αναδεύεται για 15 δευτερόλεπτα ώστε να ολοκληρωθεί η επαναιώρησή του με την χρωστική. Τέλος φυγοκεντρείται στις 12000 στροφές για 5 δευτερόλεπτα ώστε να συλλεχτεί όλο το δείγμα στον πυθμένα του σωληναρίου και το δείγμα είναι έτοιμο να φορτωθεί στο πήγμα ουρίας ακρυλαμιδίου της συσκευής LI-COR όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.3.2.

5.6. Έλεγχος γενετικών μεταλλάξεων στα γονίδια hMLH1 και hMSH2

Η επιλογή των δειγμάτων για τον έλεγχο γενετικών μεταλλάξεων στα γονίδια hMLH1 και hMSH2 έγινε με βάση τα αποτελέσματα της μικροδορυφορικής αστάθειας και πραγματοποιήθηκε σε τρία δείγματα DNA ολικού αίματος ασθενών με τον φαινότυπο MSI-H.

Ο έλεγχος γενετικών μεταλλάξεων στα γονίδια hMLH1 και hMSH2, έγινε με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης τριχοειδούς με βαθμίδωση θερμοκρασίας (TGCE, Temperature gradient capillary electrophoresis) στο διαγνωστικό κέντρο “Βιοαναλυτική Γενότυπος” σε συνεργασία με διαπιστευμένο Ευρωπαϊκό εργαστήριο, μέλος του δικτύου αναφοράς Diageno.

Αρχή της μεθόδου:

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης τριχοειδούς με βαθμίδωση θερμοκρασίας ανιχνεύει αλλαγή(-ές) στην αλληλουχία των υπό εξέταση γονιδίων βασιζόμενη στη διαφορετική κινητικότητα που εμφανίζουν τα ετερόδιπλα μόρια του DNA κατά την κίνησή τους μέσω ενός ειδικά σχεδιασμένου πολυμερούς συμπλόκου. Θεωρητικά, τα ετερόδιπλα μόρια μετακινούνται με αργότερο ρυθμό, σε ένα πήκτωμα, απ' ότι τα ομόδιπλα μόρια εξαιτίας του σχηματισμού μίας διαφορετικής δομής, σαν θηλιά, στις δύο αλυσίδες λόγω μίας (ή και παραπάνω) κακοσύνδεσης όταν υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση με συγκεκριμένη θερμοκρασία (T_m). Πέραν του σχηματισμού ετερόδιπλων μορίων, το μήκος των προϊόντων της PCR, η περιεκτικότητα σε νουκλεοτίδια GC, η θέση αλλά και ο τύπος του πολυμορφισμού (A/T, A/C, A/G, C/T, C/G, ή G/T) επιδρούν επίσης στην κινητικότητα του συγκεκριμένου ετερόδιπλου μορίου κάτω από συγκεκριμένες αποδιατακτικές συνθήκες. Έτσι, όλοι οι παράγοντες που επηρεάζουν την κινητικότητα των ετερόδιπλων μορίων σε μία μεθοδολογία τριχοειδούς, θα επηρεάσουν και την τεχνική της ηλεκτροφόρησης τριχοειδούς με βαθμίδωση θερμοκρασίας. Η διαδικασία της τεχνικής αυτής πραγματοποιήθηκε σε εξωτερικό εργαστήριο και επομένως δεν θα περιγραφεί περαιτέρω.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1. Κατάταξη των ασθενών

Τα δείγματα από τους 78 ασθενείς της παρούσας μελέτης (58 φρέσκα δείγματα κολονοσκοπήσεων και 20 δείγματα αρχείου) χωρίστηκαν ανάλογα με το αποτέλεσμα της ιστοπαθολογικής ανάλυσης σε 4 ομάδες:

- Την ομάδα GI, η οποία αποτελείται από 13 υγιή άτομα και χωρίς οικογενειακό ιστορικό για κάποια μορφή νεοπλασίας.
- Την ομάδα GII, η οποία περιλαμβάνει 24 ασθενείς με πολύποδες χαμηλού ογκογενετικού δυναμικού, στους οποίους εντάσσονται οι δυσπλαστικές αλλοιώσεις των εντερικών κρυπτών (ACF), οι υπερπλαστικοί, οι μικτοί, οι φλεγμονώδεις και οι σωληνωτοί πολύποδες.
- την ομάδα GIII, η οποία περιλαμβάνει 21 ασθενείς με πολύποδες υψηλού ογκογενετικού δυναμικού, στους οποίους εντάσσονται οι σωληνολαχνωτοί και λαχνωτοί πολύποδες.
- Την ομάδα GIV, η οποία περιλαμβάνει 20 ασθενείς με κάποιας μορφής καρκίνου του παχέος εντέρου.

Τα δημογραφικά και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά όλων των ασθενών της μελέτης παρουσιάζονται λεπτομερώς στον Πίνακα 8.

Επιπλέον στην Εικόνα 11 παρουσιάζονται χαρακτηριστικές μορφές φυσιολογικού επιθηλίου, πολύποδα και αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου, που πάθησαν κατά τη διάρκεια κολονοσκόπησης.



A. Φυσιολογικό επιθήλιο



B. Πολύποδας



C. Αδενοκαρκίνωμα

Εικόνα 11. Ενδοσκοπική εμφάνιση του παχέος εντέρου σε τρεις διαφορετικές περιπτώσεις.

		GI	GII	GIII	GIV
ΠΛΗΘΟΣ		13	24	21	20
(N)					
ΗΛΙΚΙΑ		58 ± 18	59 ± 11	63 ± 13	69 ± 13
ΦΥΛΟ	Άντρες	4	15	12	11
	Γυναίκες	9	9	9	9
ΙΣΤΟΡΙΚΟ		0	1	3	2
ΘΕΣΗ					
Αριστερά			20/24	19/21	17/20
	Ορθό		4	7	10
	Σιγμοειδές		12	10	5
	Κατιών		2	2	1
	Κατιών+Σιγμοειδές		2	0	0
	Ορθό+Σιγμοειδές		0	0	1
Δεξιά			2/24	2/21	1/20
	Εγκάρσιο		1	1	0
	Ανιών		0	1	1
	Τυφλό		1	0	0
Καμία πληροφορία			2		2
ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ					
Φυσιολογικοί		13			
Πολύποδες	Αλλοιωμένες κρύπτες		1		
	Υπερπλαστικοί		4		
	Φλεγμονώδεις		1		
	Μικτοί		2		
	Σωληνωτοί		16		4
	Σωληνολαχνωτοί			19	
	Λαχνωτοί			2	1
Καρκίνος					20

Πίνακας 8. Δημογραφικά και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

6.2. Έλεγχος της μικροδορυφορικής αστάθειας

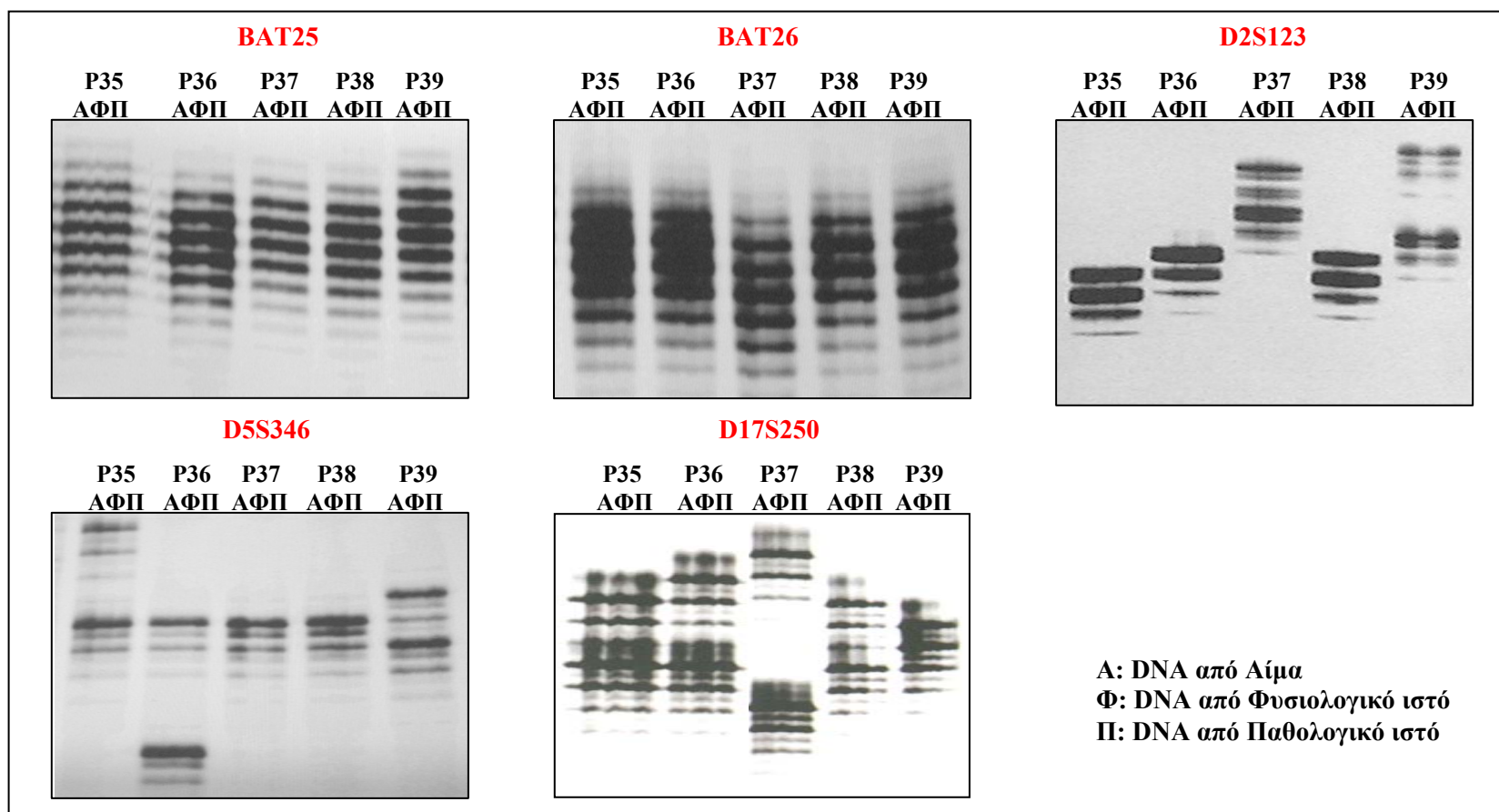
Ο έλεγχος της μικροδορυφορικής αστάθειας με τους 5 δείκτες Bethesda (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 και D17S250), πραγματοποιήθηκε και στους 78 ασθενείς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, με χρήση DNA από τα τρία βιολογικά υλικά (αίμα, παθολογικό ιστό και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό) για κάθε ασθενή (εξάιρεση αποτελούν τα δείγματα από τις παραφίνες όπου δεν υπήρχε η δυνατότητα χρήσης αίματος).

Κάθε δείκτης Bethesda αντιστοιχεί σε διαφορετικές περιοχές στο γονιδίωμα και το τελικό προϊόν ενίσχυσης έχει χαρακτηριστικό μοριακό βάρος, αλλά και τρόπο εμφάνισης στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης ουρίας-ακρυλαμιδίου. Συνήθως οι μονονουκλεοτιδικοί δείκτες BAT25 και BAT26 είναι αρκετά σταθεροί ως προς την εικόνα που εμφανίζουν στο πήκτωμα, ενώ αντίθετα οι δινουκλεοτιδικοί δείκτες D2S123, D5S346 και D17S250 δεν είναι τόσο σταθεροί γεγονός που πιθανώς να οφείλεται στο μεγάλο αριθμό δινουκλεοτιδικών (CA)_n επαναλήψεων που αντιστοιχούν. Παράλληλα όμως και κάθε ασθενής εμφανίζει χαρακτηριστική εικόνα των επαναλήψεων για κάθε δείκτη στο πήκτωμα, η οποία αποτελεί μία φυσιολογική κατάσταση (όταν εμφανίζεται και στα τρία είδη δείγματος) και θεωρείται ως το προσωπικό του αποτύπωμα.

Σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου, για κάθε ασθενή φορτώνονται στη σειρά τα ιχνηθετημένα προϊόντα της PCR με τον αντίστοιχο δείκτη Bethesda, από DNA αίματος (Α), φυσιολογικού ιστού (Φ) και παθολογικού ιστού (Π), όπως περιγράφηκε στις παραγράφους 5.3.1 και 5.3.2.

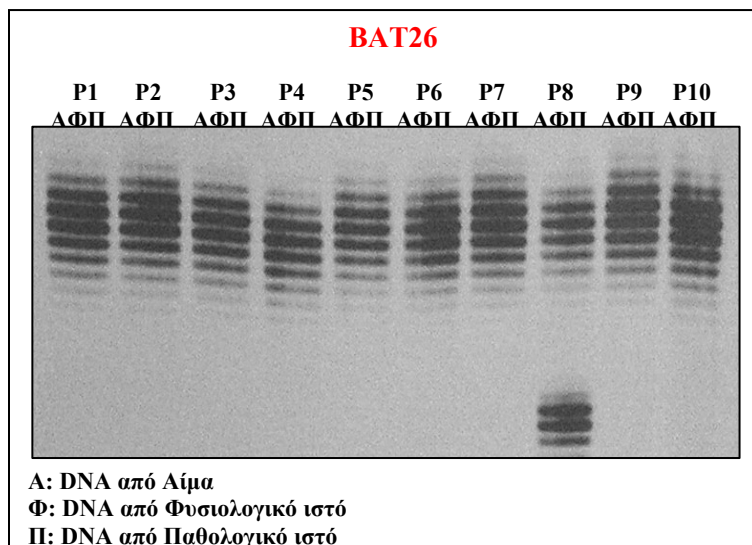
Στη συνέχεια παρουσιάζονται μερικές ενδεικτικές εικόνες του αναλυτή LICOR DNA sequencer 4200 μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, πέντε ασθενών (P35-P39), με τους πέντε δείκτες Bethesda κατάλληλα ιχνηθετημένους με χρωστική που φθορίζει στα 700 και 800 nm, σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου 6 M (Εικόνα 12).

Οι δείκτες BAT25 και BAT26 είναι αρκετά σταθεροί ως προς την κινητικότητα που εμφανίζουν στο πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου και ειδικό στην αστάθεια με τον φαινότυπο MSI-H, με αποτέλεσμα πολύ σπάνια να παρατηρούνται πολυμορφισμοί, δηλαδή αλλαγή στον αριθμό των νουκλεοτιδίων και στα τρία είδη δείγματος DNA. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα πολυμορφισμού φαίνεται στην Εικόνα 13 που ακολουθεί.



Εικόνα 12. Ανάλυση της μικροδορυφορικής αστάθειας με τους πέντε δείκτες Bethesda.

Τα τρία είδη DNA (από αίμα, φυσιολογικό και παθολογικό ιστό) των ασθενών P35-P39, ενισχύονται ξεχωριστά με PCR με τα πέντε ζεύγη ιχνηθετημένων πριμοδοτικών αλληλουχιών, αντίστοιχες για τους 5 δείκτες Bethesda και τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορούνται στη σειρά (αρχίζοντας με το δείγμα από DNA αίματος) σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμίδιου στον αυτόματο αναλυτή LI-COR DNA Sequencer 4200 όπου και συλλέγονται τα αποτελέσματα.

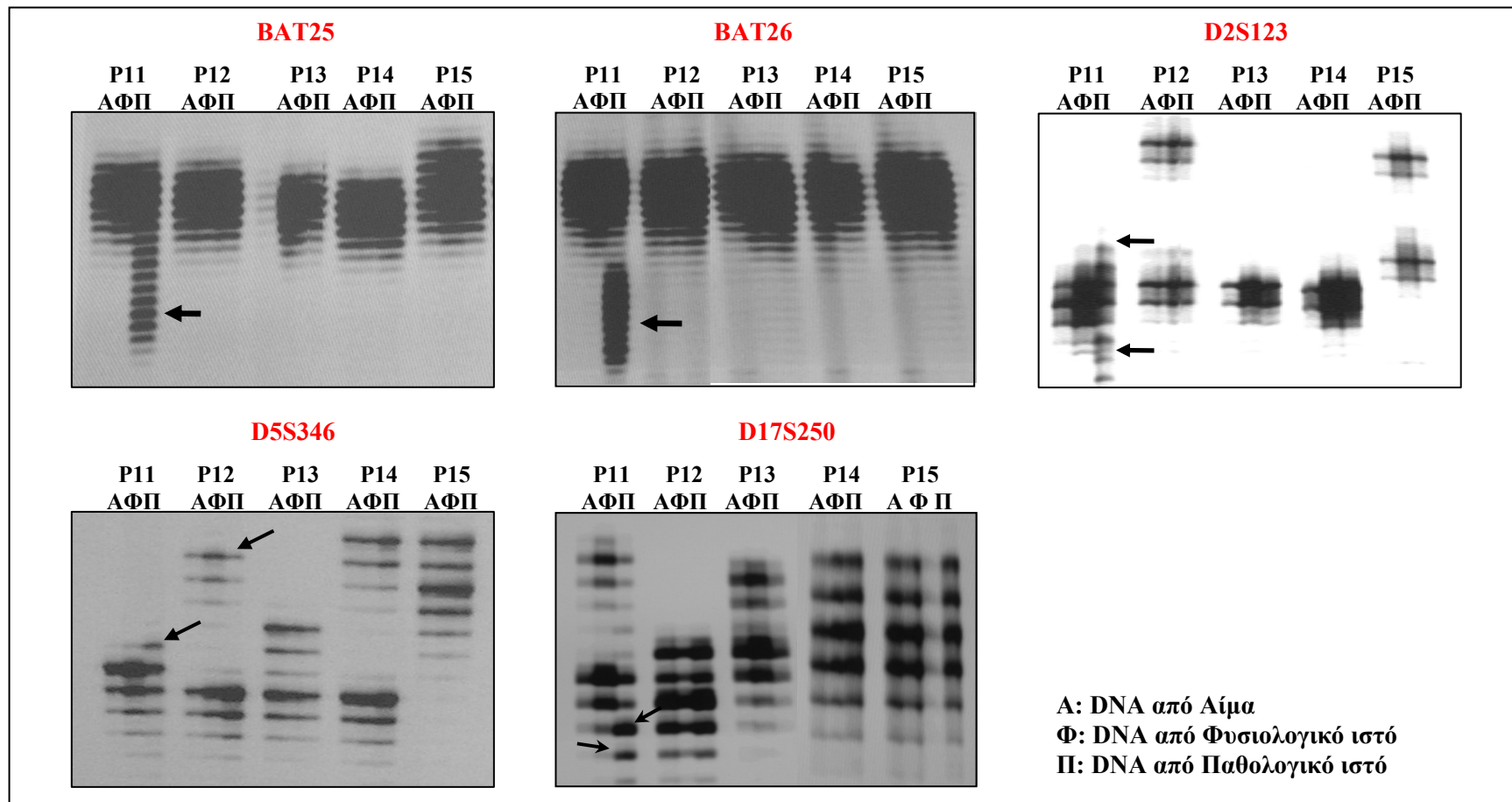


Εικόνα 13. Ανάλυση της μικροδορυφορικής αστάθειας με τον δείκτη BAT26.

Τα τρία είδη DNA (από αίμα, φυσιολογικό και παθολογικό ιστό) των ασθενών P1-P10, ενισχύθηκαν με τις ιχνηθετημένες πριμοδοτικές αλληλουχίες του δείκτη BAT26 και τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου στον αναλυτή LI-COR DNA Sequencer 4200.

Στην Εικόνα 13 ο ασθενής P8 εμφάνισε στο πήκτωμα επιπλέον ζώνες, μικρότερου μοριακού βάρους και στα τρία είδη DNA. Το γεγονός αυτό θεωρείται πολυμορφισμός και φαίνεται να συμβαίνει μόνο στο ένα από τα δύο αλληλόμορφα του DNA αφού εμφανίζονται και οι ζώνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Κανένα από τα δείγματα που παρουσιάστηκαν στις εικόνες 12 και 13 δεν φέρουν τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας και για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως MSS (σταθεροί στη μικροδορυφορική αστάθεια).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η μικροδορυφορική αστάθεια χαρακτηρίζεται από εισδοχές ή απαλείψεις νουκλεοτιδίων στις μικροδορυφορικές περιοχές και εμφανίζεται ως αλλαγή της μορφής του DNA στο πήκτωμα μόνο στο DNA του παθολογικού ιστού και θεωρείται ως ένα πρόδρομο στάδιο της καρκινογένεσης. Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 14) εμφανίζονται χαρακτηριστικές περιπτώσεις μικροδορυφορικής αστάθειας.



Εικόνα 14. Η μικροδορυφορική αστάθεια στους πέντε δείκτες Bethesda.

Τα τρία είδη DNA των ασθενών P11-P15, ενισχύονται ξεχωριστά με τις ιχνηθετημένες πριμοδοτικές αλληλουχίες, ειδικές για τους 5 δείκτες Bethesda. Αρχίζοντας με το δείγμα DNA αίματος, τα προϊόντα PCR φορτώνονται σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμίδιου και αναλύονται στον αναλυτή LI-COR. Τα βέλη δείχνουν τις επιπλέον ζώνες που εμφανίζονται στην εικόνα του DNA του παθολογικού ιστού, στο πήκτωμα, δηλαδή την ένδειξη της μικροδορυφορικής αστάθειας.

Όπως παρατηρούμε από την Εικόνα 14, στο δείγμα DNA του παθολογικού ιστού του ασθενούς P11 εμφανίζονται επιπλέον ζώνες (όπως δείχνουν και τα βέλη) μικρότερου μοριακού βάρους για τους δείκτες BAT25, BAT26, D2S123 και D17S250 αλλά και μεγαλύτερου μοριακού βάρους στον δείκτη D5S346. Το γεγονός αυτό είναι ένδειξη μικροδορυφορικής αστάθειας και πιο συγκεκριμένα μείωση ή αύξηση αντίστοιχα, στο ένα αλληλόμορφο του DNA, του αριθμού των νουκλεοτιδικών επαναλήψεων, με αποτέλεσμα όταν το τελικό προϊόν είναι μικρότερου μοριακού βάρους σε σχέση με το φυσιολογικό να εμφανίζεται πιο χαμηλά στο πήκτωμα ή μεγαλύτερου μοριακού βάρους και να εμφανίζεται πιο ψηλά στο πήκτωμα.

Επιπλέον το δείγμα DNA του παθολογικού ιστού του ασθενούς P12, στον δείκτη D5S346 εμφανίζει διαφορετική κατανομή στην πυκνότητα των ζωνών μεγαλύτερου μοριακού βάρους, γεγονός που υποδηλώνει επίσης την ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας.

Προκύπτει λοιπόν ότι ο ασθενής P11 εμφανίζει αστάθεια στο δείγμα DNA του παθολογικού ιστού, σε όλους τους δείκτες και για τον λόγο αυτό χαρακτηρίζεται ως MSI-H (υψηλής μικροδορυφορικής αστάθειας). Ο ασθενής P12 εμφανίζει αστάθεια στο DNA του παθολογικού ιστού μόνο στον δείκτη D5S346 και για το λόγο αυτό κατατάσσεται ως MSI-L (χαμηλής μικροδορυφορικής αστάθειας) ενώ οι υπόλοιποι 3 ασθενείς (P13, P14 και P15) της ίδιας εικόνας (Εικόνα 14) δεν εμφανίζουν αστάθεια, σε κανέναν από τους πέντε δείκτες Bethesda και επομένως χαρακτηρίζονται ως MSS (σταθεροί στη μικροδορυφορική αστάθεια). Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν εκτελώντας επιπλέον δύο φορές την ανάλυση της μικροδορυφορικής αστάθειας αρχίζοντας από το στάδιο της ενίσχυσης τις αντίστοιχης περιοχής με τους δείκτες Bethesda.

Τα αποτελέσματα που τελικά προέκυψαν από την ανάλυση της μικροδορυφορικής αστάθειας με τους πέντε δείκτες Bethesda στο σύνολο των 78 ασθενών καταγράφονται στον Πίνακα 9 και έχουν ως εξής:

Τρεις (3) ασθενείς (ένας της ομάδας GIII και δύο της ομάδας GIV) κατατάχθηκαν ως MSI-H διότι έφεραν αστάθεια σε όλους τους δείκτες Bethesda.

Δέκα (10) ασθενείς (τρεις της ομάδας GIII και 7 της ομάδας GIV) κατατάχθηκαν ως MSI-L διότι έφεραν αστάθεια σε έναν από τους πέντε δείκτες Bethesda.

Εξήντα πέντε (65) ασθενείς (83%) κατατάχθηκαν ως MSS διότι δεν έδειξαν αστάθεια σε κανέναν από τους πέντε δείκτες Bethesda.

Ειδικότερα, το ποσοστό εμφάνισης του φαινοτύπου της μικροδορυφορικής αστάθειας για την ομάδα GI (υγιή άτομα) είναι: 100% (13/13) MSS, 0% (0/13) MSI-L και 0% (0/13) MSI-H. Για την ομάδα GII (άτομα με πολύποδες χαμηλού ογκογενετικού δυναμικού) το αντίστοιχο ποσοστό είναι: 100% (24/24) MSS, 0% (0/24) MSI-L και 0% (0/24) MSI-H. Για την ομάδα GIII (άτομα με πολύποδες υψηλού ογκογενετικού δυναμικού) το αντίστοιχο ποσοστό είναι: 81% (17/21) MSS, 14% (3/21) MSI-L, 5% (1/21) MSI-H. Τέλος για την ομάδα GIV (άτομα με καρκίνο) τα αντίστοιχα ποσοστά είναι: 55% (11/20) MSS, 35% (7/20) MSI-L και 10% (2/20) MSI-H.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-H ή MSI-L), παρουσιάζουν μόνο οι ασθενείς με καρκίνο (ομάδα GIV) ή πολύποδες με υψηλό ογκογενετικό δυναμικό (ομάδα GIII). Είναι προφανές λοιπόν, ότι ο φαινότυπος της μικροδορυφορικής αστάθειας δεν εμφανίζεται σε φυσιολογικούς ιστούς αλλά ούτε και στα πρόδρομα στάδια μετασχηματισμού του φυσιολογικού επιθηλίου του παχέος εντέρου, όπως οι μεικτοί, οι φλεγμονώδεις και οι σωληνωτοί πολύποδες (ομάδα GII). Η μικροδορυφορική αστάθεια φαίνεται να αρχίζει από τους σωληνολαχνωτούς και λαχνωτούς πολύποδες (ομάδα GIII) και να γίνεται πιο έντονη στα αδενοκαρκινώματα (ομάδα GIV).

Μια λεπτομερής περιγραφή με βάση το ιστορικό, την ηλικία, το φύλο, την ιστοπαθολογική διάγνωση και την ομάδα κατάταξης των ασθενών με τον φαινότυπο MSI-H και MSI-L, παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9).

ΑΣΘΕΝΗΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΔΙΑΓΝΩΣΗ	ΟΜΑΔΑ	ΙΣΤΟΡΙΚΟ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	ΔΕΙΚΤΕΣ ΜΕ ΑΣΤΑΘΕΙΑ
P28	Γ	66	ΣΛ. Πολύποδας Ορθού	GIII	-	MSI-H	ΟΛΟΙ
P11	Γ	39	Μάζα Ορθού	GIV	πατέρας & θείος	MSI-H	ΟΛΟΙ
P74	A	75	Αδενοκαρκίνωμα	GIV	-	MSI-H	ΟΛΟΙ
P12	Γ	67	ΣΛ. Πολύποδας Ορθού	GIII	-	MSI-L	D5S346
P23	A	60	ΣΛ. Πολύποδας Ανιόντος	GIII	-	MSI-L	D17S250
P44	A	62	Λ. Πολύποδας Ορθού	GIII	-	MSI-L	D5S346
P15	A	58	Καρκίνος Σιγμοειδούς	GIV	-	MSI-L	D2S123
P17	A	72	Σ. Πολύποδας & Καρκίνος	GIV	-	MSI-L	D17S250
P18	A	78	Σ. Πολύποδας & Καρκίνος	GIV	-	MSI-L	D5S346
P24	Γ	70	Καρκίνος Ορθού & Μαστού	GIV	-	MSI-L	D17S250
P33	A	62	Λ. Πολύποδας & Καρκίνος	GIV	-	MSI-L	D2S123
P67	A	82	Αδενοκαρκίνωμα	GIV	-	MSI-L	D2S123
P69	Γ	76	Αδενοκαρκίνωμα	GIV	-	MSI-L	D5S346

Πίνακας 9. Κλινικο-εργαστηριακά χαρακτηριστικά ασθενών που εμφανίζουν τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας.

Γ: Γυναίκα, A: Άντρας, Σ.: Σωληνοειδής, Λ.: Λαχνωτός, ΣΛ.: Σωληνολαχνωτός Πολύποδας

Με βάση τα στοιχεία του Πίνακα 9 μπορούν να εξαχθούν τα παρακάτω συμπεράσματα όσον αφορά τους 13 ασθενείς με τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας MSI-H και MSI-L:

1. Ο ασθενής P11 πληρεί τόσο τα κριτήρια Amsterdam, όσο και τα κριτήρια Bethesda (Πίνακας 1, εισαγωγικό μέρος) και επομένως θεωρείται υποψήφιος για το σύνδρομο του Κληρονομικού μη-πολυποδιακού καρκίνου του παχέος εντέρου (HNPCC). Οι υπόλοιποι ασθενείς, λόγω αρνητικού ιστορικού, κατατάσσονται στο μονοπάτι των σποραδικών καρκίνων του παχέος εντέρου.
2. Ο φαινότυπος της μικροδορυφορικής αστάθειας εμφανίζεται αρχικά στα όψιμα στάδια των πολυπόδων στο παχύ έντερο (σωληνολαχνωτούς και λαχνωτούς) (ομάδα GIII) και η συχνότητά τους αυξάνεται κατά την μετέπειτα εξέλιξή τους, σε αδενοκαρκινώματα και καρκίνους του παχέος εντέρου (ομάδα GIV).
3. Από τους πέντε δείκτες Bethesda, οι δείκτες BAT25 και BAT26 εμφανίζουν αστάθεια μόνο στους ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-H με ποσοστό εμφάνισης 23% (ή 3/13 ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-H ή MSI-L) ενώ οι υπόλοιποι δείκτες εμφανίζουν αστάθεια και στους ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-L (πιο συχνά ο D5S346 με ποσοστό 54% (7/13 ασθενείς) και λιγότερο οι δείκτες D2S123 και D17S250, με παρόμοιο ποσοστό εμφάνισης 46% (ή 6/13 ασθενείς με τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας), κάνοντας έτσι σημαντική τη χρήση τους.
4. Όλοι οι ασθενείς που εμφάνισαν τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας είναι ηλικίας άνω των 60 ετών. Εξαίρεση αποτελεί ο ασθενής P11, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι πρόκειται για ασθενή με το σύνδρομο HNPCC

Επιπλέον από το σύνολο των 78 ασθενών που μελετήθηκαν ως προς τον έλεγχο της μικροδορυφορικής αστάθειας, εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

1. Η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-H και MSI-L) εμφανίζεται σε ποσοστό 15.6% στο σύνολο των σποραδικών καρκίνων, αριθμός που συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.
2. Στους σποραδικούς καρκίνους της παρούσας μελέτης, η εμφάνιση της μικροδορυφορικής αστάθειας φαίνεται να είναι άμεσα συνυφασμένη με την

ηλικία, γεγονός όμως που δυσχεραίνει την προεπιλογή των ασθενών για τον συγκεκριμένο έλεγχο.

3. Εκτός από τον ασθενή P11 που ανήκει στο σύνδρομο HNPCC, κανένας άλλος με οικογενειακό ιστορικό θετικό σε καρκίνο και με διαγνωσμένο καρκίνο δεν εμφάνισε μικροδορυφορική αστάθεια. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι καρκίνοι αυτοί προήλθαν από ένα άλλο μονοπάτι καρκινογένεσης, πιθανώς οφειλόμενο σε γενετικές μεταλλάξεις σημαντικών γονιδίων που εμπλέκονται στον καρκίνο του παχέος εντέρου.
4. Κανένα από τα υγιή άτομα της μελέτης μας δεν έδειξε αστάθεια σε κάποιον από τους πέντε δείκτες Bethesda, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μικροδορυφορική αστάθεια δεν είναι ένα τυχαίο γεγονός.
5. Η εμφάνιση πολυμορφισμού στον ασθενή P8 (Εικόνα 13) με τον δείκτη BAT26 μπορεί να θεωρήθηκε μία φυσιολογική κατάσταση όμως είναι μία σπάνια περίπτωση για τον συγκεκριμένο δείκτη και χρήζει επιπλέον μελέτη.
6. Τέλος η μικροδορυφορική αστάθεια είναι ένα φαινοτυπικό χαρακτηριστικό που δεν εμφανίζεται στα πρώιμα στάδια εξέλιξης του καρκίνου του παχέος εντέρου, αλλά στον μετέπειτα σχηματισμό σωληνολαχνωτών και λαχνωτών πολυπόδων, ικανός να αποτελέσει έναν σημαντικό διαγνωστικό δείκτη εξέλιξης της νόσου.

6.3. Έλεγχος της μεθυλίωσης

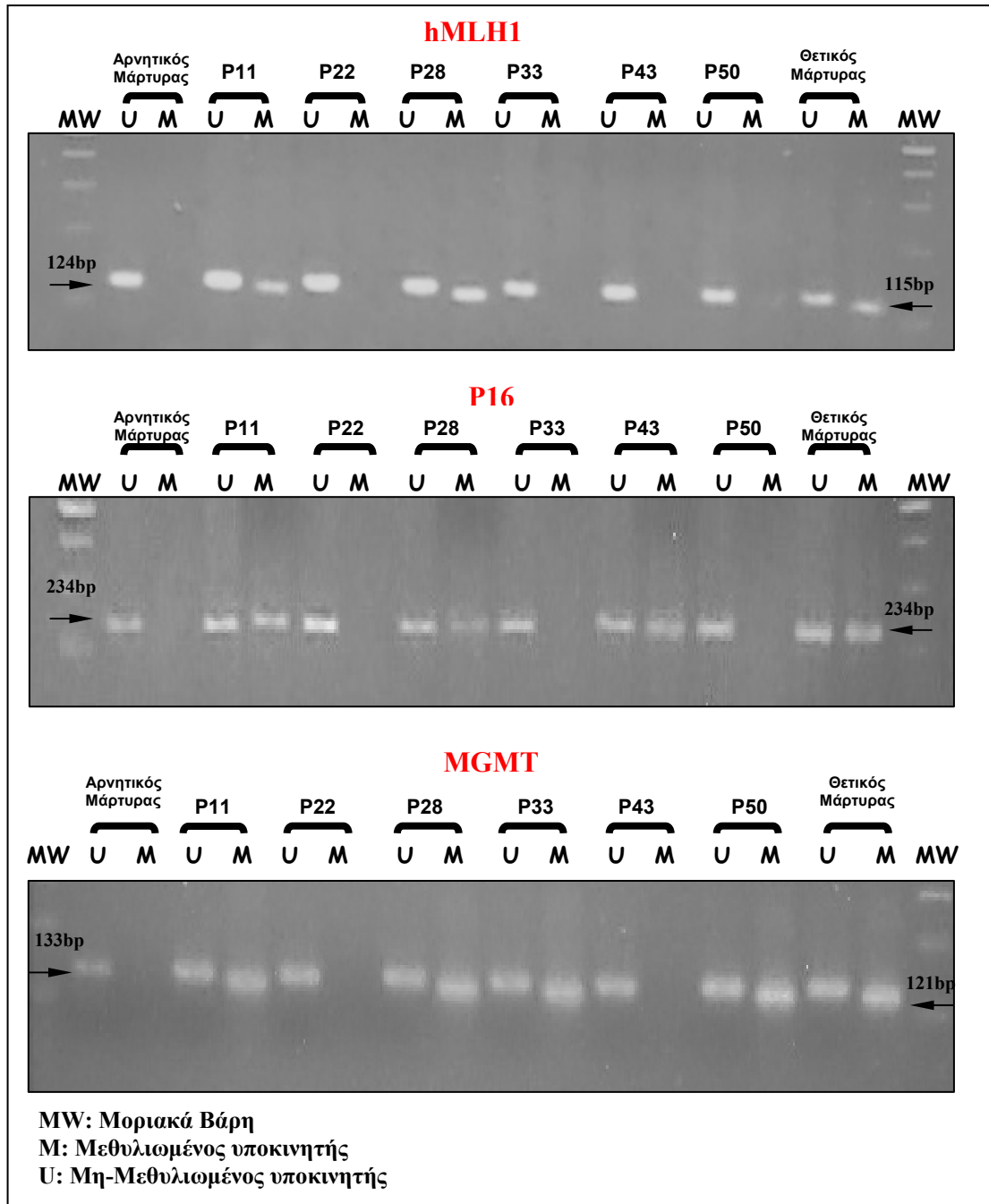
Ο έλεγχος της μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT βασίζεται στην χημική μετατροπή των μη-μεθυλιωμένων βάσεων κυτοσίνης του DNA με όξινο θειώδες νάτριο και την μετέπειτα ενίσχυση της περιοχής των υποκινητών των γονιδίων αυτών με PCR, με δύο ζεύγη κατάλληλα τροποποιημένων πριμοδοτικών αλληλουχιών για το κάθε γονίδιο (ένα ζεύγος για την περίπτωση ύπαρξης μεθυλίωσης και ένα ζεύγος για την ύπαρξη μη-μεθυλιωμένης περιοχής).

Με τον τρόπο αυτό, όλα τα δείγματα DNA από τα τρία είδη (αίμα, φυσιολογικό και παθολογικό ιστό) των 78 ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, ελέγχθηκαν ως προς την εμφάνιση μεθυλίωσης σε συγκεκριμένες περιοχές των υποκινητών των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT.

Έτσι αφού το DNA των δειγμάτων επεξεργάστηκε αρχικά με όξινο θειώδες νάτριο (παράγραφος 5.4.1.), υποβλήθηκε στη συνέχεια σε ειδική για μεθυλίωση PCR με τις αντίστοιχες για κάθε γονίδιο πριμοδοτικές αλληλουχίες (Πίνακας 6). Τέλος, τα προϊόντα της κάθε PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2.5% όπου ελέγχθηκαν και αξιολογήθηκαν κάτω από ακτινοβολία UV.

Πρέπει να σημειωθεί ότι σε κάθε ειδική για μεθυλίωση PCR ενισχύονται και δύο δείγματα γνωστά για την ύπαρξη μεθυλίωσης ή μη στον αντίστοιχο υποκινητή των γονιδίων και αποτελούν το θετικό και αρνητικό μάρτυρα της αντίδρασης PCR. Με τον τρόπο αυτό ελέγχεται κάθε φορά και η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων του ελέγχου για μεθυλίωση.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται χαρακτηριστικές εικόνες (Εικόνα 15) από το αποτέλεσμα ελέγχου της μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT, από δείγματα που ενισχύθηκαν με PCR με τις ειδικά τροποποιημένες για κάθε γονίδιο πριμοδοτικές αλληλουχίες, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2.5% και έγιναν ορατά με την χρήση λυχνίας UV.



Εικόνα 15. Ανάλυση των προϊόντων της ειδικής για μεθυλίωση PCR στα γονίδια hMLH1, P16 και MGMT.

Σε πήκτωμα αγαρόζης 2.5% φορτώνονται τα προϊόντα της PCR (δύο για κάθε ασθενή) ενισχυμένα με τις κατάλληλες πριμοδοτικές αλληλουχίες για κάθε γονίδιο (hMLH1, P16 και MGMT) και για την αντίστοιχη περιοχή του υποκινητή (μεθυλιωμένης ή μη-μεθυλιωμένης). Η εμφάνιση ζώνης στο πήκτωμα από το προϊόν PCR ειδικό για μεθυλίωση, συνεπάγεται την ένδειξη ότι ο αντίστοιχος υποκινητής είναι μεθυλιωμένος και αντίστοιχα για τα προϊόντα μη-μεθυλίωσης. Το DNA που ενισχύθηκε προέρχεται από τον παθολογικό ιστό των ασθενών P11, P22, P28, P33, P43 και P50.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 15, ο υποκινητής του γονιδίου hMLH1 είναι μεθυλιωμένος (στο ένα αλληλόμορφο του DNA) στα δείγματα DNA παθολογικού ιστού των ασθενών P11 και P28. Ο υποκινητής του γονιδίου P16 είναι μεθυλιωμένος στα δείγματα παθολογικού ιστού των ασθενών P11, P28 και P43. Ενώ αντίστοιχα ο υποκινητής του γονιδίου MGMT, είναι μεθυλιωμένος στα δείγματα του παθολογικού ιστού των ασθενών P11, P28, P33 και P50. Και στις τρεις περιπτώσεις των γονιδίων, η μεθυλίωση στα δείγματα παρατηρείται πάντα σε συνδυασμό και με το μη-μεθυλιωμένο προϊόν PCR (ζώνη μη-μεθυλίωσης), γεγονός που υποδηλώνει ότι η μεθυλίωση στον υποκινητή των γονιδίων αυτών συμβαίνει είτε στο ένα αλληλόμορφο του DNA τους, ή σε μερικά μόνο κύτταρα του ιστού που ελέγχεται.

Από τον έλεγχο της μεθυλίωσης στους φυσιολογικούς ιστούς και το αίμα των ίδιων ασθενών της παραπάνω εικόνας, τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν αρνητικά για τους υποκινητές των γονιδίων hMLH1 και P16 ενώ αντίθετα στον υποκινητή του γονιδίου MGMT τα δείγματα DNA αίματος και φυσιολογικού ιστού των ασθενών P28 και P33 εμφανίζουν μεθυλίωση. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε 19 από τα υπόλοιπα εξεταζόμενα δείγματα της παρούσας εργασίας, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου MGMT, σε αντίθεση με τους υποκινητές των άλλων δύο γονιδίων hMLH1 και P16, είναι ένα γεγονός που μπορεί να παρατηρηθεί στο DNA των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών και του αίματος. Μάλιστα για τα δύο αυτά είδη δείγματος DNA (φυσιολογικού ιστού και αίμα) η εμφάνιση ή μη της μεθυλίωσης εμφανίστηκε σε παρόμοια ποσοστά σε όλα τα 21 συνολικά δείγματα.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για όλα τα δείγματα DNA παθολογικού ιστού καθώς και για το DNA από αίμα (μόνο για τον υποκινητή του γονιδίου MGMT) σε σχέση με την εμφάνιση μεθυλίωσης ή μη στον υποκινητή των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως μεθυλίωση στο DNA από αίμα και φυσιολογικό ιστό δεν ανιχνεύθηκε στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1 και P16 και για τον λόγο αυτό δεν συμπεριλαμβάνονται στον Πίνακα 10. Επιπλέον στον ίδιο πίνακα δεν καταγράφονται τα δείγματα DNA φυσιολογικού ιστού που εμφάνισαν μεθυλίωση στο υποκινητή του γονιδίου MGMT, διότι είναι παρόμοια με αυτά στο αντίστοιχο DNA από αίμα.

Ομάδα	hMLH1		P16		MGMT		MGMT	
	(Ιστός)		(Ιστός)		(Ιστός)		(Αίμα)*	
Ασθενών	M	U	M	U	M	U	M	U
G1 (N = 13)	4/13 (31%)	9/13 (69%)	2/13 (15%)	11/13 (85%)	6/13 (46%)	7/13 (54%)	5/13 (39%)	8/13 (61%)
GII (N = 24)	10/24 (42%)	14/24 (58%)	8/24 (33%)	16/24 (67%)	9/24 (38%)	15/24 (62%)	2/18 (11%)	16/18 (89%)
	$p = 0.515$		$p = 0.245$		$p = 0.639$		$p = 0.077$	
GIII (N = 21)	10/21 (48%)	11/21 (52%)	14/21 (67%)	7/21 (33%)	16/21 (76%)	5/21 (24%)	7/17 (41%)	10/17 (59%)
	$p = 0.668$		$p = 0.028^{**}$		$p = 0.014^{**}$		$p = 0.050^{**}$	
GIV (N = 20)	13/20 (65%)	7/20 (35%)	14/20 (70%)	6/20 (30%)	18/20 (90%)	2/20 (10%)	7/11 (64%)	4/11 (36%)
	$p = 0.279$		$p = 0.837$		$p = 0.242$		$p = 0.245$	

Πίνακας 10. Αποτελέσματα ελέγχου της μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT για τις τέσσερις ομάδες ασθενών.

M: μεθυλίωση στον υποκινητή, U: μη-μεθυλίωση στον υποκινητή

* Για τα παλαιότερα δείγματα βιοψιών σε παραφίνη δεν υπήρχε η δυνατότητα ελέγχου στο αντίστοιχο αίμα.

** Στατιστικά σημαντικό ως προς την προηγούμενη ομάδα.

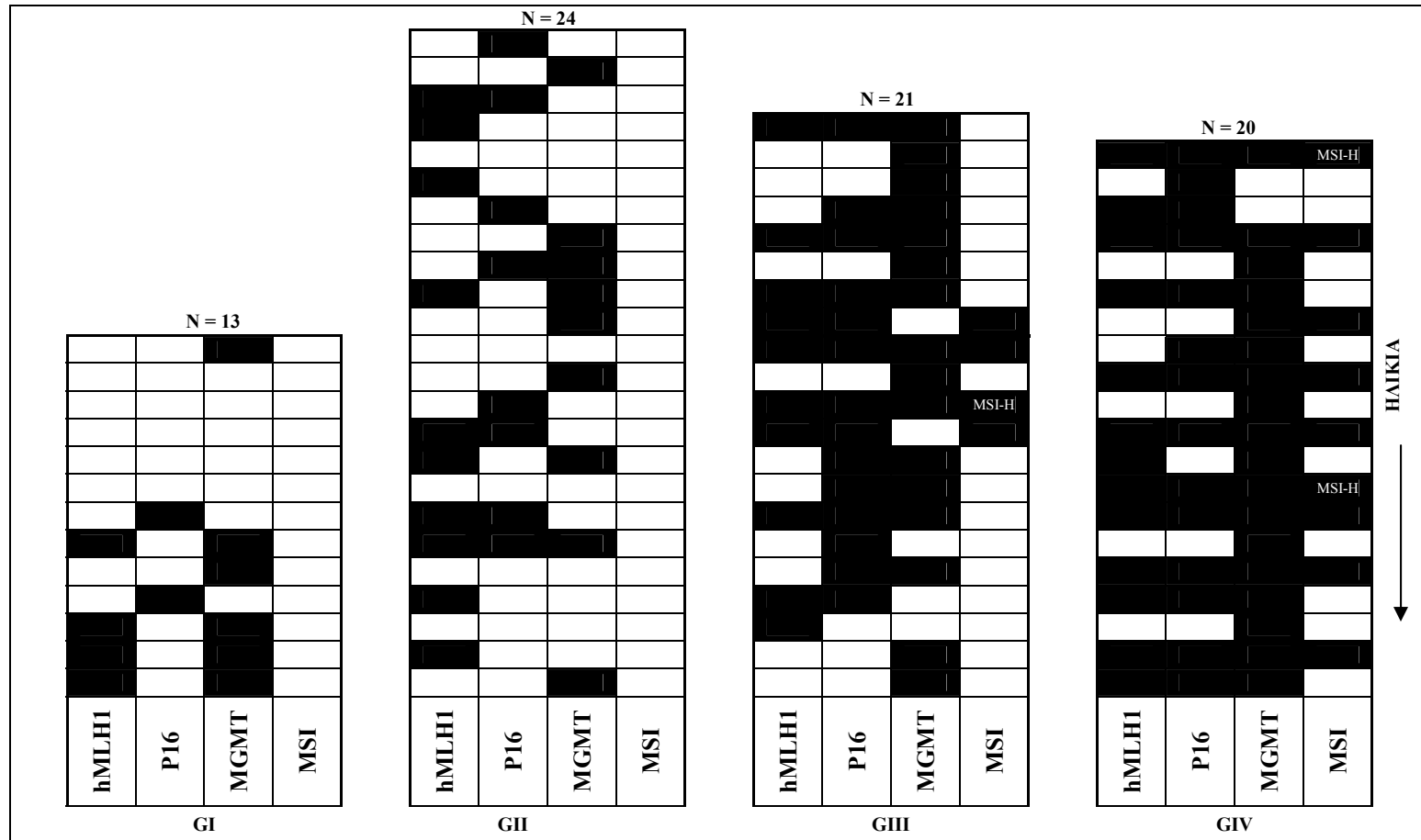
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν, οι υποκινητές των γονιδίων hMLH1 και P16 εμφάνισαν μεθυλίωση μόνο στο DNA του παθολογικού ιστού σε αντίθεση με τον υποκινητή του γονιδίου MGMT που εμφανίζει μεθυλίωση τόσο στο DNA του παθολογικού ιστού, όσο και στο DNA από το αίμα. Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 10, τα ποσοστά μεθυλίωσης για την ομάδα G1 στον υποκινητή του γονιδίου MGMT είναι περίπου ίδια (39% στο αίμα έναντι 46% στον ιστό), ενώ αυτά διαφοροποιούνται στους ασθενείς των ομάδων GII, GIII και GIV, όπου εμφανίζονται υψηλότερα τα ποσοστά στον ιστό από το αντίστοιχο δείγμα αίματος (38% στο ιστό έναντι 11% στο αίμα για την ομάδα GII, 76% στο ιστό έναντι 41% στο αίμα για την ομάδα GIII και αντίστοιχα 90% έναντι 64% για την ομάδα GIV). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου MGMT στις ομάδες αυτές είναι ειδική και ιστολογικά εξαρτώμενη.

Παράλληλα, η συχνότητα μεθυλίωσης για κάθε υποκινητή γονιδίου, στον παθολογικό ιστό, παρουσιάζει αύξηση από την ομάδα GI (31, 15 και 46% για τα γονίδια hMLH1, P16 και MGMT αντίστοιχα) στην ομάδα GII (42, 33 και 38%), στην ομάδα GIII (48, 67 και 76%) και επιπλέον στην ομάδα GIV (65, 70 και 90%). Σε μερικές μάλιστα περιπτώσεις η μεταβολή του ποσοστού μεθυλίωσης μεταξύ των ομάδων είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.028$ και $p=0.014$ μεταξύ των ομάδων GII και GIII στους υποκινητές των γονιδίων P16 και MGMT). Είναι σημαντικό επίσης να τονιστεί ότι αντίστοιχα αυξάνεται και η συχνότητα εμφάνισης της μεθυλίωσης στους δύο ή τρεις υποκινητές ταυτόχρονα στον ίδιο ασθενή (4/13 ή 31% για την ομάδα GI, 7/24 ή 29% για την ομάδα GII, 13/21 ή 62% για την ομάδα GIII και 14/20 ή 70% για την ομάδα GIV αντίστοιχα). Σε κάθε ομάδα, ο υποκινητής του γονιδίου MGMT εμφανίζει τα υψηλότερα ποσοστά μεθυλίωσης, ακολουθούμενος είτε από τον υποκινητή του γονιδίου P16 στις ομάδες GIII και GIV ή από τον υποκινητή του γονιδίου hMLH1 στις ομάδες GI και GII.

Η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου P16, συνήθως συνοδεύεται από ταυτόχρονη μεθυλίωση στους υποκινητές του ενός ή και των δύο άλλων γονιδίων (5/8 ή 62% για την ομάδα GII και 13/14 ή 93% για τις ομάδες GIII και GIV αντίστοιχα), με εξαίρεση στην ομάδα GI. Αντίθετα, η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου MGMT παρουσιάζει διαφορετική εικόνα και συνήθως δεν συνοδεύεται από μεθυλίωση στους υποκινητές των άλλων δύο γονιδίων (5/9 ή 56%, 6/16 ή 38% και 5/18 ή 28% για τις ομάδες GII, GIII και GIV αντίστοιχα).

Επιπλέον, η μεθυλίωση συνδέεται με την ηλικία μόνο στην ομάδα GI αφού μόνο οι ασθενείς άνω των εξήντα ετών εμφανίζουν μεθυλίωση σε κάποιον από τους υποκινητές των γονιδίων που μελετώνται, με εξαίρεση στον υποκινητή του γονιδίου MGMT που αφορά μία γυναίκα 28 ετών (Εικόνα 16).

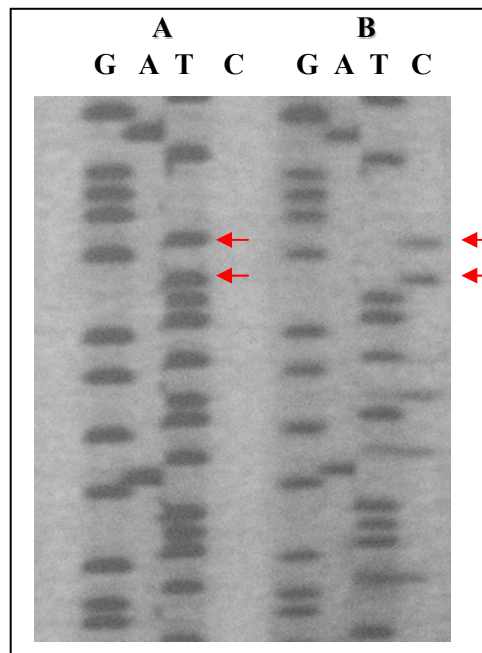
Από τους 24 ασθενείς της ομάδας GII οι 19 (79%) έδειξαν μεθυλίωση σε έναν τουλάχιστον υποκινητή από τα τρία γονίδια που εξετάζονται, ενώ 5 ασθενείς (21%) δεν εμφανίζουν μεθυλίωση σε κάποιον υποκινητή. Οι ασθενείς αυτοί φέρουν υπερπλαστικούς ή μεικτούς πολύποδες, μία κατηγορία πολυπόδων χαμηλής ογκογενετικής δυναμικότητας. Αντίθετα όλοι οι ασθενείς της κατηγορίας GIII με λαχνωτούς και σωληνολαχνωτούς πολύποδες καθώς και όλοι οι ασθενείς της κατηγορίας GIV, με κάποια μορφή καρκίνου, εμφανίζουν μεθυλίωση σε έναν τουλάχιστον από τους τρεις υποκινητές, γεγονός που υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο της μεθυλίωσης στην εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου.



Εικόνα 16. Η μεθυλίωση στους υποκινητές των 3 γονιδίων και ο φαινότυπος MSI για τις τέσσερις ομάδες ασθενών.

Κάθε σειρά αντιστοιχεί σε ένα άτομο ενώ τα μαυρισμένα κουτάκια δείχνουν την ύπαρξη μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT ή αντίστοιχα τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI). Αναγράφονται επίσης οι τρεις περιπτώσεις ασθενών με τον φαινότυπο MSI-H.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου της μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT επιβεβαιώθηκαν στα θετικά δείγματα για μεθυλίωση, με αλληλούχιση των αντίστοιχων μεθυλιωμένων και μη μεθυλιωμένων προϊόντων PCR, για κάθε δείγμα, μετά τη επεξεργασία τους με όξινο θειώδες νάτριο. Τα προϊόντα αλληλούχισης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου και αναλύθηκαν στον αυτόματο αναλυτή LI-COR DNA Sequencer 4200. Η παρακάτω εικόνα (Εικόνα 17) είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της περίπτωσης.



Εικόνα 17. Αλληλούχιση των προϊόντων της ειδικής για μεθυλίωση PCR του υποκινητή του γονιδίου hMLH1.

Στην εικόνα παρουσιάζεται το αποτέλεσμα αλληλούχισης δύο προϊόντων PCR, ενός μη μεθυλιωμένου (A) και ενός μεθυλιωμένου (B) προϊόντος, από τον έλεγχο μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1, μετά την επεξεργασία τους με όξινο θειώδες νάτριο και την ενίσχυσή τους με κατάλληλες πριμοδοτικές αλληλουχίες (ειδικές για μεθυλιωμένο και μη μεθυλιωμένο προϊόν). Τα προϊόντα αλληλούχισης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου στον αναλυτή LI-COR DNA Sequencer 4200. Τα βέλη δείχνουν την αντικατάσταση της κυτοσίνης (C) από θυμίνη (T) στο μη-μεθυλιωμένο DNA λόγω της επεξεργασίας τους με όξινο θειώδες νάτριο.

Όπως φαίνεται από την Εικόνα 17 στο προϊόν αλληλούχισης (B), που αντιστοιχεί στο προϊόν PCR με τις ειδικές για μεθυλίωση πριμοδοτικές αλληλουχίες, του υποκινητή του γονιδίου hMLH1, η αλληλουχία CGC (όπως δείχνουν και τα βέλη), παραμένει ως έχει μετά την επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες νάτριο,

ενώ αντίθετα στο προϊόν αλληλούχισης (A), που αντιστοιχεί στο προϊόν PCR με τις ειδικές για μη-μεθυλίωση πριμοδοτικές αλληλουχίες του υποκινητή του γονιδίου hMLH1, η αλληλουχία αυτή (CGC) μετατρέπεται σε (TGT), γεγονός που οφείλεται για την πρώτη περίπτωση στην ύπαρξη μεθυλιωμένων κυτοσινών στο DNA. Αντίθετα κάποιες άλλες κυτοσίνες (C) όπως εμφανίζονται στο πήκτωμα του προϊόντος (B), φαίνεται να υπάρχουν τόσο με την μορφή θυμίνης (T) όσο και με την μορφή κυτοσίνης (C) γεγονός που υποδηλώνει είτε ότι στο ένα αλληλόμορφο του DNA έχει υποστεί μεθυλίωση η κυτοσίνη, ή ότι στο παρόν δείγμα περιέχεται DNA διαφορετικών κυττάρων κάποια από τα οποία έχουν υποστεί μεθυλίωση και άλλα όχι. Αν ένα δείγμα και στα δύο αλληλόμορφα ή στο σύνολο του DNA του έχει μεθυλιωμένες κυτοσίνες, τότε θα δεν υπήρχε καθόλου το προϊόν μη μεθυλίωσης (U) στην αντίδραση PCR με τις ειδικές πριμοδοτικές αλληλουχίες μη-μεθυλίωσης, γεγονός που δεν προέκυψε για κανένα από τα δείγματα της μελέτης μας.

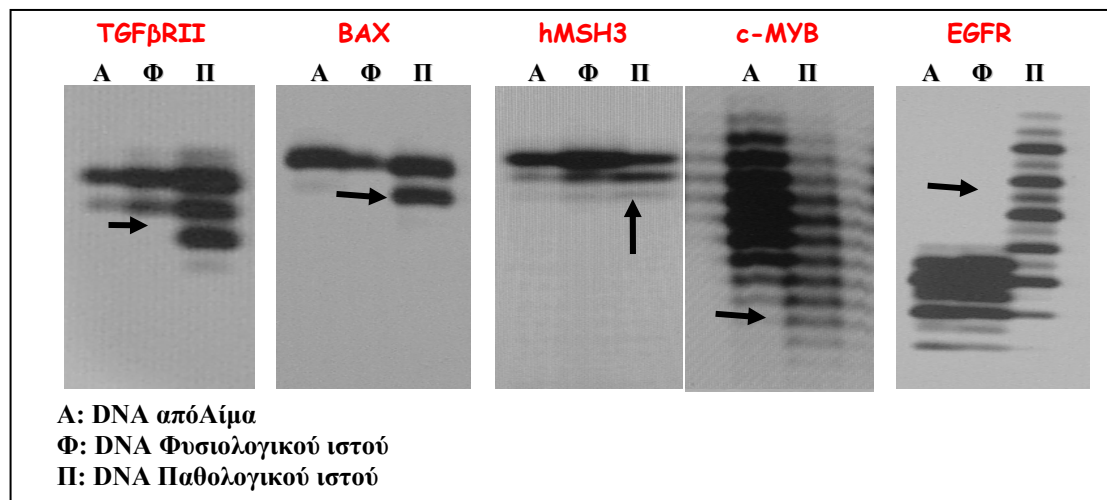
Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της μεθυλίωσης στον υποκινητή των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT με τα αποτελέσματα της μικροδορυφορικής αστάθειας προκύπτει ότι:

1. Και οι τρεις ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-H εμφάνισαν μεθυλίωση στους υποκινητές και των τριών γονιδίων.
2. Από τους δέκα ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-L μόνο ένας (ο ασθενής P33) δεν εμφάνισε μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1 και P16, καθώς και δύο ασθενείς (P23 και P12) που δεν εμφάνισαν μεθυλίωση στον υποκινητή του MGMT.
3. Ο ασθενής P8 που εμφάνισε πολυμορφισμό στον δείκτη BAT 26 αλλά όχι μικροδορυφορική αστάθεια, είναι θετικός στην μεθυλίωση και στους τρεις υποκινητές των γονιδίων ταυτόχρονα.

6.4. Έλεγχος της αστάθειας των γονιδίων στόχων: TGFβRII, BAX, IGFIIR, hMSH3, hMSH6, EGFR και c-MYB

Πρωταρχικό βήμα για τον έλεγχο της αστάθειας σε γονίδια στόχους με επαναλήψεις στις κωδικοποιούσες περιοχές τους, όπως τα TGFβRII, BAX, IGFIIR, hMSH3 και hMSH6, ή σε περιοχές των ιντρονίων τους όπως στα γονίδια EGFR και c-MYB, είναι η ενίσχυση με PCR των αντίστοιχων περιοχών για κάθε γονίδιο και στα τρία δείγματα DNA (αίμα, φυσιολογικός και παθολογικός ιστός) όλων των ασθενών. Στη συνέχεια ακολουθεί μία δεύτερη PCR με σκοπό την ιχνηθέτιση των προϊόντων της με κατάλληλα ιχνηθετημένες πριμοδοτικές αλληλουχίες και τέλος η ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμίδιου και η ανάλυσή τους στον αυτόματο αναλυτή LI-COR DNA Sequencer 4200.

Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ελέγχου της αστάθειας στο DNA του παθολογικού ιστού του ασθενή P11 και P28 (για το γονίδιο EGFR) σε πέντε από τα γονίδια στόχους.

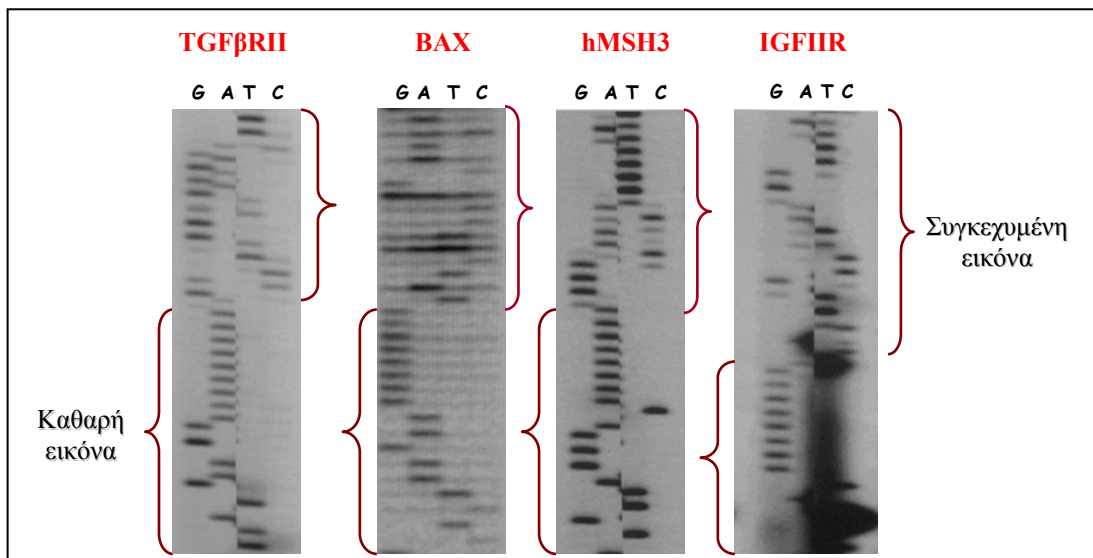


Εικόνα 18. Έλεγχος της αστάθειας στα γονίδια στόχους.

Τα προϊόντα PCR των γονιδίων TGFβRII, BAX, hMSH3, c-MYB και EGFR (τρία για κάθε ασθενή για το αντίστοιχο DNA τους) αφού ενισχύθηκαν με τις αντίστοιχες ιχνηθετημένες πριμοδοτικές αλληλουχίες για το αντίστοιχο γονίδιο, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμίδιου στον αυτόματο αναλυτή LI-COR DNA Sequencer 4200. Οι επιπλέον ζώνες που εμφανίζονται στην εικόνα του πηκτώματος ή η αλλαγή στη συγκέντρωση των ζωνών, στο DNA του παθολογικού ιστού, συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα DNA από το αίμα και τον φυσιολογικό ιστό, όπως δείχνουν και τα βέλη, αποτελεί ένδειξη αστάθειας.

Όπως βλέπουμε και από την Εικόνα 18 τα δείγματα DNA του παθολογικού ιστού του ασθενή P11 ή P28 (για την περίπτωση του EGFR) μετά την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου, εμφανίζουν αστάθεια στα γονίδια TGFβRII, BAX, hMSH3, c-MYB και EGFR, γεγονός που υποδηλώνει αλλαγή στον φυσιολογικό αριθμό των μονονουκλεοτιδικών ή δινουκλεοτιδικών επαναλήψεων που φέρουν στις αντίστοιχες περιοχές τους.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον έλεγχο της αστάθειας στα γονίδια στόχους σε όλους τους ασθενείς της παρούσας μελέτης επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια με αλληλούχιση των αντίστοιχων δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ουρίας ακρυλαμιδίου 6M στον αναλυτή LI-COR. Η αλληλούχιση περιοχών με μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων είναι αρκετά δύσκολη, ειδικότερα στην μετέπειτα ανάγνωση της αλληλουχίας και κυρίως όταν οι αλλαγές γίνονται μόνο στο ένα αλληλόμορφο του DNA ή σε μερικά μόνο από τα κύτταρα του παθολογικού ιστού. Ο λόγος είναι ότι μετά την αύξηση ή μείωση του κανονικού αριθμού των επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων, η εικόνα εμφανίζεται συγκεχυμένη διότι κάθε αλληλόμορφο είναι διαφορετικό και ακολουθεί την δική του αλληλουχία.



Εικόνα 19. Επιβεβαίωση της αστάθειας στα γονίδια στόχους.

Τα προϊόντα αλληλούχισης σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου των γονιδίων TGFβRII, BAX, hMSH3 και IGFIIR, από δείγματα με αστάθεια. Με την αλληλούχιση των γονιδίων γίνεται εφικτή η επιβεβαίωση της αστάθειας λόγω της δυνατότητας ανάγνωσης της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας. Βέβαια, η εισδοχή ή απαλοιφή ενός και μόνο νουκλεοτιδίου στην φυσιολογική αλληλουχία του DNA προκαλεί τη δημιουργία μίας συγκεχυμένης εικόνας στο πήκτωμα αφού πραγματοποιείται μόνο στο ένα αλληλόμορφο του DNA.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 19, τα γονίδια TGFβRII, BAX, hMSH3 και IGF1R που εμφάνισαν αστάθεια στα δείγματα του παθολογικού ιστού τους, μετά την ηλεκτροφόρηση των ιχνηθετημένων προϊόντων τους σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου, επιβεβαιώθηκαν με αλληλούχιση των προϊόντων PCR στο DNA του παθολογικού ιστού. Από την αλληλούχιση φαίνεται η μεταβολή του αριθμού των επαναλήψεων στις πολυ(A) και πολυ(G) περιοχές που μελετώνται, καθώς και η συγκεχυμένη εικόνα που δημιουργείται μετά την προσθήκη ή απαλοιφή ενός και μόνο νουκλεοτιδίου στην περιοχή μελέτης, αφού πραγματοποιείται (στη συγκεκριμένη περίπτωση) μόνο στο ένα αλληλόμορφο του DNA.

Τελικά, από το σύνολο των 78 ατόμων που ελέγχθηκαν στην παρούσα εργασία, ως προς την εμφάνιση αστάθειας στα γονίδια στόχους TGFβRII, BAX, IGF1R, hMSH3, hMSH6, EGFR και c-MYB, προέκυψαν τα εξής:

1. Κανένα από τα 13 υγιή άτομα της ομάδας GI δεν εμφάνισαν αστάθεια στα γονίδια στόχους
2. Από τα 24 άτομα της ομάδας GII, κανένα δεν εμφάνισε αστάθεια στα γονίδια στόχους.
3. Από τα 21 άτομα της ομάδας GIII δύο μόνο εμφάνισαν αστάθεια σε τρία από τα γονίδια στόχους.
4. Από τα 20 άτομα της ομάδας GIV, με καρκίνο, τα τρία είναι θετικά σε αστάθεια των γονιδίων στόχων.

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 11) καταγράφεται η παρατηρούμενη αστάθεια στα γονίδια στόχους TGFβRII, BAX, IGF1R, hMSH3, hMSH6, EGFR και c-MYB στους ασθενείς με τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας MSI-H και MSI-L, καθώς και τα αποτελέσματα της μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT για τους ίδιους ασθενείς.

Πρέπει να σημειωθεί ότι κανένα από τα άτομα με τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής σταθερότητας (MSS) δεν εμφάνισαν αστάθεια σε κάποια από τα γονίδια στόχους.

ΑΣΘΕΝΗΣ	ΟΜΑΔΑ	MSI	TGFβRII	BAX	IGFIIR	hMSH3	hMSH6	EGFR	c-MYB	hMLH1	P16	MGMT
P28	GIII		9A/10A*	wt	wt	wt	wt	18CA/19CA	16T/21T	+	+	+
P11	GIV	MSI-H	9A/10A	7G/8G	wt	7A/8A	wt	wt	14T/19T	+	+	+
P74	GIV		9A/10A	wt	7G/8G	7A/8A	wt	19CA/21CA	15T/19T	+	+	+
P12	GIII		wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	+	+	-
P23	GIII		wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	+	+	-
P44	GIII		9A/10A	wt	wt	wt	wt	wt	wt	+	+	+
P15	GIV		wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	+	+	+
P17	GIV	MSI-L	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	+	+	+
P18	GIV		wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	+	+	+
P24	GIV		wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	+	+	+
P33	GIV		9A/10A	wt	wt	wt	wt	wt	wt	-	-	+
P67	GIV		wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	+	+	+
P69	GIV		wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	+	+	+

Πίνακας 11. Έλεγχος αστάθειας και μεθυλίωσης των ασθενών με τον φαινότυπο MSI-H και MSI-L.

wt: άγριος τύπος - φυσιολογικός αριθμός στον αριθμό των νουκλεοτιδικών επαναλήψεων, +: θετικό σε μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου

* Οι αριθμοί δηλώνουν τον αριθμό των επαναλήψεων στις μελετώμενες περιοχές που εμφάνισαν αστάθεια.

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 11, από τους τρεις ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-H όλοι εμφάνισαν αστάθεια στα γονίδια TGFβRII και c-MYB και ταυτόχρονα μεθυλίωση στους υποκινητές και των τριών γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT. Επιπλέον, ο ασθενής P28 της ομάδας GIII (με σωληνολαχνωτούς πολύποδες) εμφάνισε αστάθεια και στο γονίδιο EGFR. Ο ασθενής P11 της ομάδας GIV (με μάζα ορθού) με θετικό οικογενειακό ιστορικό για καρκίνο και που πιθανώς ανήκει στο σύνδρομο HNPCC, εμφάνισε επιπλέον αστάθεια στα γονίδια BAX και hMSH3. Ενώ, ο ασθενής P74 της ομάδας GIV (με αδenoκαρκίνωμα ανιόντος) εμφάνισε επιπλέον αστάθεια στα γονίδια IGFIIR, hMSH3 και EGFR. Κανένας από τους ασθενείς δεν εμφάνισε αστάθεια στο γονίδιο hMSH6.

Από τους 10 ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-L, μόνο δύο (ο P44 και ο P33) εμφάνισαν αστάθεια και μόνο στο γονίδιο TGFβRII. Επιπλέον, ο ασθενής P44 της ομάδας GIII (με λαχνωτούς πολύποδες ορθού) με αρνητικό οικογενειακό ιστορικό καρκίνου εμφάνισε ταυτόχρονη μεθυλίωση στους υποκινητές και των τριών γονιδίων. Ενώ αντίθετα, ο ασθενής P33 της ομάδας GIV (με καρκίνο και λαχνωτούς πολύποδες ορθού) επίσης με αρνητικό οικογενειακό ιστορικό καρκίνου, παρουσίασε μεθυλίωση μόνο στον υποκινητή του γονιδίου MGMT. Κανένας από τους υπόλοιπους ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-L ή MSS δεν εμφάνισαν αστάθεια σε κάποια από τα γονίδια στόχους.

6.4.1. Έλεγχος των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στα γονίδια EGFR και c-MYB

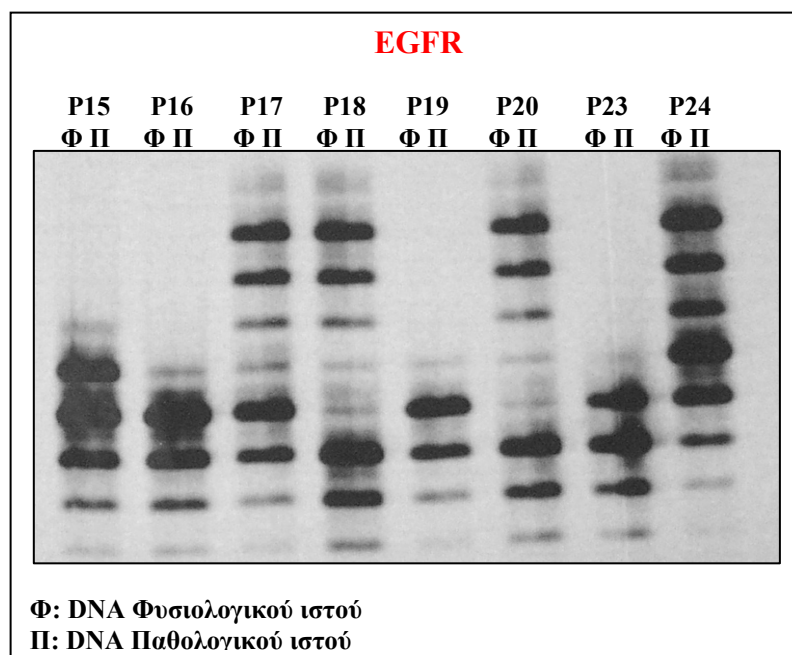
Η αστάθεια στα γονίδια TGFβRII, BAX, IGFIIR, hMSH3 και hMSH6 οφείλεται στην αύξηση ή τη μείωση κατά ένα ή δύο νουκλεοτίδια στις αντίστοιχες πολυνουκλεοτιδικές περιοχές τους. Βρίσκονται σε κωδικοποιούσες περιοχές των γονιδίων αυτών και έχουν άμεση επίδραση στο προϊόν του γονιδίου και τη λειτουργικότητά του. Ο αριθμός των επαναλήψεων στις περιοχές αυτές είναι πολύ σταθερός και συγκεκριμένος και δεν έχουν παρατηρηθεί αυξομειώσεις σε υγιή άτομα.

Αντίθετα στα γονίδια EGFR και c-MYB, οι περιοχές που μελετώνται βρίσκονται σε μή-κωδικοποιούσες περιοχές των γονιδίων (ιντρόνια) και έχουν παρατηρηθεί αυξομειώσεις στον αριθμό των επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων ακόμα και σε υγιή άτομα διαφορετικής εθνικότητας. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι

αύξηση στον αριθμό των 16 πολυ(CA) επαναλήψεων σε 17 έως 21 για το γονίδιο EGFR, καθώς και μείωση στον αριθμό των 19 πολυ(T) επαναλήψεων του γονιδίου c-MYB συμβάλουν στην μείωση της ενεργότητας και ταυτόχρονα της μεταγραφικής ικανότητας των γονιδίων αυτών.

Έτσι στην παρούσα εργασία θεωρήθηκε σημαντικό στα γονίδια EGFR και c-MYB να γίνει πέραν του ελέγχου της αστάθειάς τους, ως γονίδια στόχοι του ελαττωματικού συστήματος MMR και επιπλέον έλεγχος όσων αφορά τον αριθμό των πολυ(CA) και πολυ(T) επαναλήψεων για τα αντίστοιχα γονίδια, στους ασθενείς των διαφορετικών ομάδων της παρούσας μελέτης.

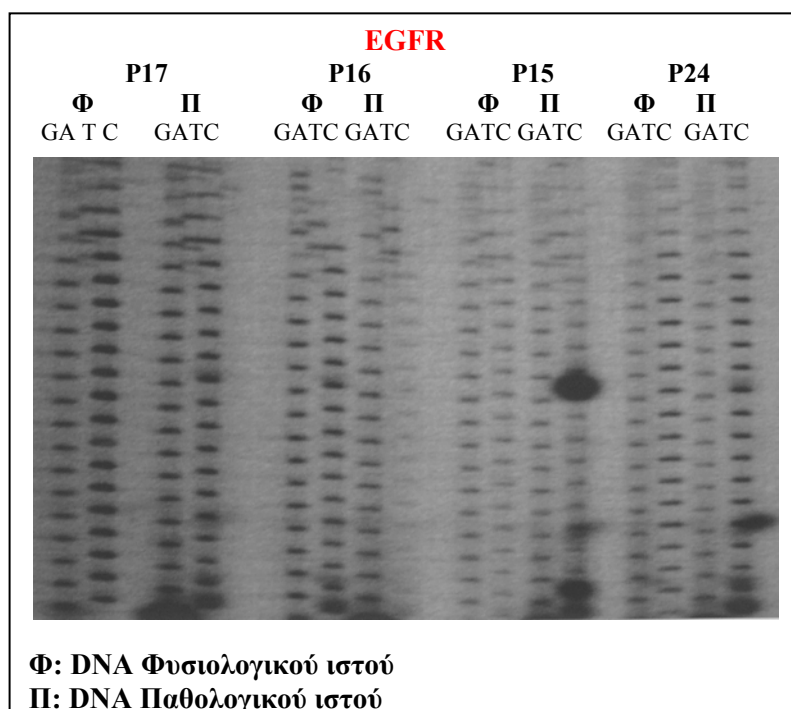
Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 20) παρουσιάζονται τα ιχνηθετημένα προϊόντα της PCR των επαναλήψεων του γονιδίου EGFR τυχαίων ασθενών σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου. Κάθε ασθενής παρουσιάζει διαφορετική κατανομή των ζωνών πάνω στο πήκτωμα, γεγονός που όπως αναφέρθηκε μπορεί να θεωρηθεί ως ένα φαινοτυπικό χαρακτηριστικό για τον κάθε ασθενή.



Εικόνα 20. Ανάλυση της αστάθειας του γονιδίου EGFR.

Για κάθε ασθενή ενισχύονται με PCR τα δείγματα DNA φυσιολογικού και παθολογικού ιστού, με κατάλληλα ιχνηθετημένες πριμοδοτικές αλληλουχίες, ειδικές για την περιοχή του πρώτου ιντρονίου, του γονιδίου EGFR. Τα ιχνηθετημένα προϊόντα PCR ηλεκτροφορούνται, στη σειρά για κάθε ασθενή, σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου και αναλύονται στον αναλυτή LI-COR DNA Sequencer 4200.

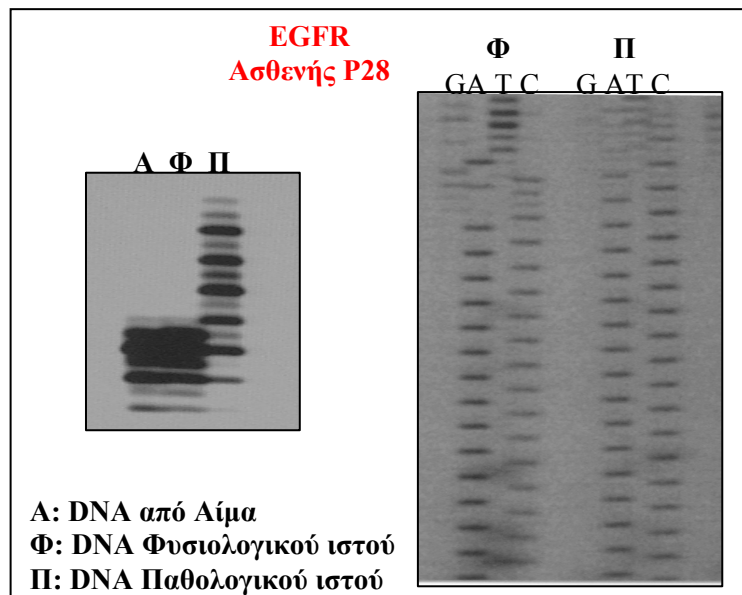
Κανένα από τα δείγματα της Εικόνας 20 δεν εμφανίζει αστάθεια. Παρόλα αυτά είναι εμφανής η διαφορετική κατανομή τους στο πήκτωμα. Από την αλληλούχιση των δειγμάτων DNA τόσο του παθολογικού όσο και του φυσιολογικού ιστού (ή του αντίστοιχου αίματος) για κάθε ασθενή ελέγχθηκε τόσο το γεγονός της ύπαρξης ή μη αστάθειας, όσο και ο ακριβής αριθμός των επαναλήψεων στη συγκεκριμένη περιοχή του γονιδίου EGFR. Συνήθως ο αριθμός των CA επαναλήψεων διαφέρει στα δύο αλληλόμορφα του DNA ή μεταξύ του συνόλου των κυττάρων για κάθε δείγμα και για το λόγο αυτό τα αποτελέσματα της αλληλούχισης καταγράφονται με τη μορφή κλάσματος για το πρώτο και για το δεύτερο αλληλόμορφο. Έτσι, από την αλληλούχιση και των δύο ειδών DNA του ασθενή P16 (Εικόνα 21) προκύπτει ότι στο ένα αλληλόμορφο περιέχει 16 CA επαναλήψεις και στο δεύτερο αλληλόμορφο έως 17 CA επαναλήψεις. Το ίδιο παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα που εμφανίζουν την ίδια εικόνα με αυτή του ασθενή P16 πάνω στο πήκτωμα (π.χ ο ασθενής P19). Ομοίως το δείγμα του P17 φέρει στο ένα αλληλόμορφο 16 CA επαναλήψεις και στο άλλο έως 18 CA επαναλήψεις, ενώ το δείγμα P24 φέρει από 16 έως 19 CA επαναλήψεις στα δύο αλληλόμορφα αντίστοιχα.



Εικόνα 21. Αλληλούχιση της περιοχής πολυ(CA) του γονιδίου EGFR.

Τα προϊόντα PCR του γονιδίου EGFR από το DNA φυσιολογικού και παθολογικού ιστού των ασθενών P17, P16, P15 και P24 υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση και ηλεκτροφορήθηκαν στη σειρά σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμίδιου στον αναλυτή LI-COR DNA Sequencer 4200.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, από το σύνολο των 78 ατόμων της παρούσας μελέτης, δύο ασθενείς (οι P28 και P74) έδωσαν αστάθεια στο DNA του παθολογικού ιστού σε σύγκριση με τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό, στο γονίδιο EGFR. Μία συνολική εικόνα τόσο της αστάθειας όσο και του αποτελέσματος της αλληλούχισης για την περιοχή του γονιδίου EGFR που μελετάται παρουσιάζεται στην Εικόνα 22 και αναφέρεται στον ασθενή P28.

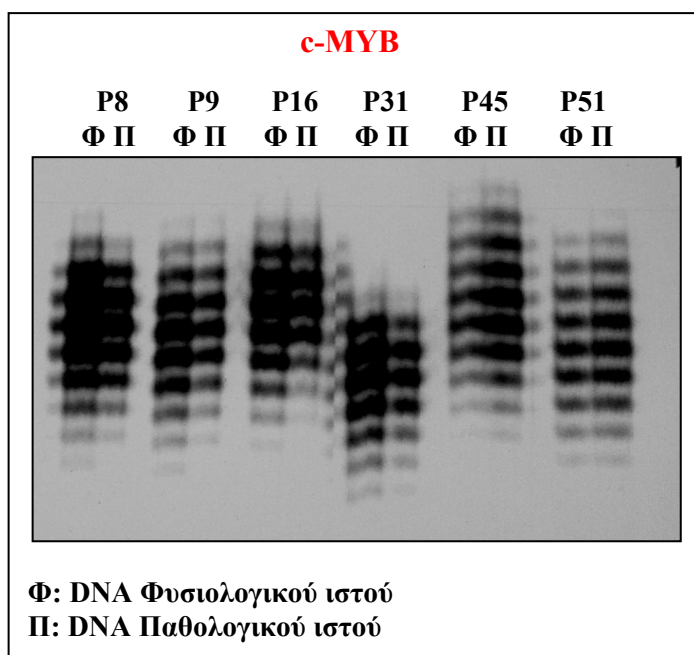


Εικόνα 22. Ανάλυση της αστάθειας και των επαναλήψεων του γονιδίου EGFR στον ασθενή P28.

Τα τρία είδη DNA (από αίμα, φυσιολογικό και παθολογικό ιστό) του ασθενή P28 ενισχύθηκαν ξεχωριστά με PCR με κατάλληλα ιχνηθετημένες πριμοδοτικές αλληλουχίες ειδικές για το ιντρόνιο 1 του γονιδίου EGFR και ηλεκτροφορήθηκαν στη σειρά σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμίδιου. Στη συνέχεια τα προϊόντα PCR από το DNA του φυσιολογικού και του παθολογικού ιστού υπόκεινται σε αλληλούχιση, ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμίδιου και αναλύονται στον αναλυτή LICOR DNA Sequencer 4200.

Όπως προκύπτει από την Εικόνα 22, το δείγμα DNA παθολογικού ιστού του ασθενή P28 φέρει 18 και 19 CA επαναλήψεις αντίστοιχα στα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου EGFR, ενώ το δείγμα DNA του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού του ίδιου ασθενή φέρει 16 και 17 CA επαναλήψεις αντίστοιχα.

Για το γονίδιο c-MYB και την περιοχή του ιντρονίου 1 που περιέχει μία αλληλουχία με 19πολυ(T) επαναλήψεις, είναι χαρακτηριστική η παρακάτω εικόνα (Εικόνα 23) των ιχνηθετημένων προϊόντων PCR σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου.



Εικόνα 23. Ανάλυση της αστάθειας του γονιδίου c-MYB.

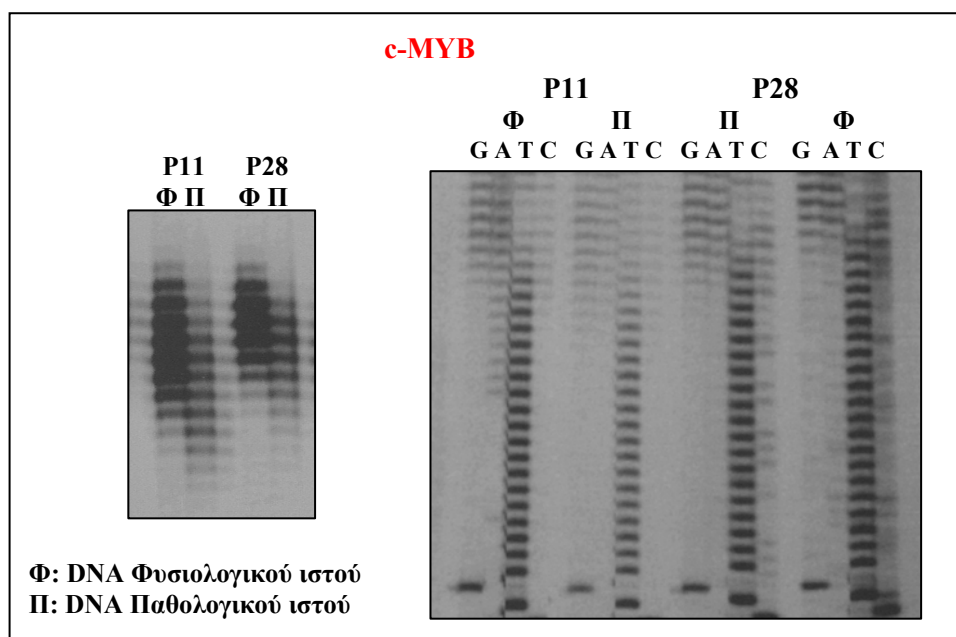
Το DNA από τον παθολογικό και τον φυσιολογικό ιστό των ασθενών P8, P9, P16, P31, P45 και P51, ενισχύθηκαν ξεχωριστά με PCR με κατάλληλες ιχνηθετημένες πριμοδοτικές αλληλουχίες, ειδικές για το ιντρόνο 1 του γονιδίου c-MYB και τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμιδίου στον αναλυτή LI-COR DNA Sequencer 4200.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 32, δεν παρατηρείται αστάθεια σε κανένα από τα DNA του παθολογικού ιστού των ασθενών P8, P9, P16, P31, P45 και P51, σε σύγκριση με τα δείγματα DNA του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού, αλλά μία διαφορετική τοποθέτηση της εικόνας του προϊόντος PCR στο πήκτωμα, κυρίως του ασθενή P31 γεγονός που σημαίνει διαφορετικό αριθμό επαναλήψεων στην περιοχή του γονιδίου c-MYB που μελετάται. Μετά από αλληλούχιση των δειγμάτων αυτών προκύπτει ότι ο ασθενής P31 φέρει από 16T επαναλήψεις στο ένα αλληλόμορφο έως και 19T επαναλήψεις στο άλλο αλληλόμορφο, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα της εικόνας κυμαίνονται μεταξύ 19 και 21 επαναλήψεις αντίστοιχα.

Βέβαια, λαμβάνοντας υπόψη ότι η μεταβολή των επαναλήψεων πολυ(T) παρατηρείται τόσο στα δείγματα του φυσιολογικού ιστού όσο και στα δείγματα του

παθολογικού ιστού, δεν θεωρείται ως μία παθολογική κατάσταση αλλά ως ένας πιθανός πολυμορφισμός.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, από το σύνολο των 78 ατόμων της παρούσας μελέτης, τρεις ασθενείς (P11, P28 και P74) εμφάνισαν αστάθεια, στο DNA του παθολογικού ιστού σε σύγκριση με το DNA του φυσιολογικού ιστού, στο γονίδιο c-MYB. Μία συνολική εικόνα τόσο της αστάθειας όσο και του αποτελέσματος της αλληλούχισης για την περιοχή του γονιδίου c-MYB που μελετάται παρουσιάζεται στην Εικόνα 24 και αναφέρεται στους ασθενείς P11 και P28.



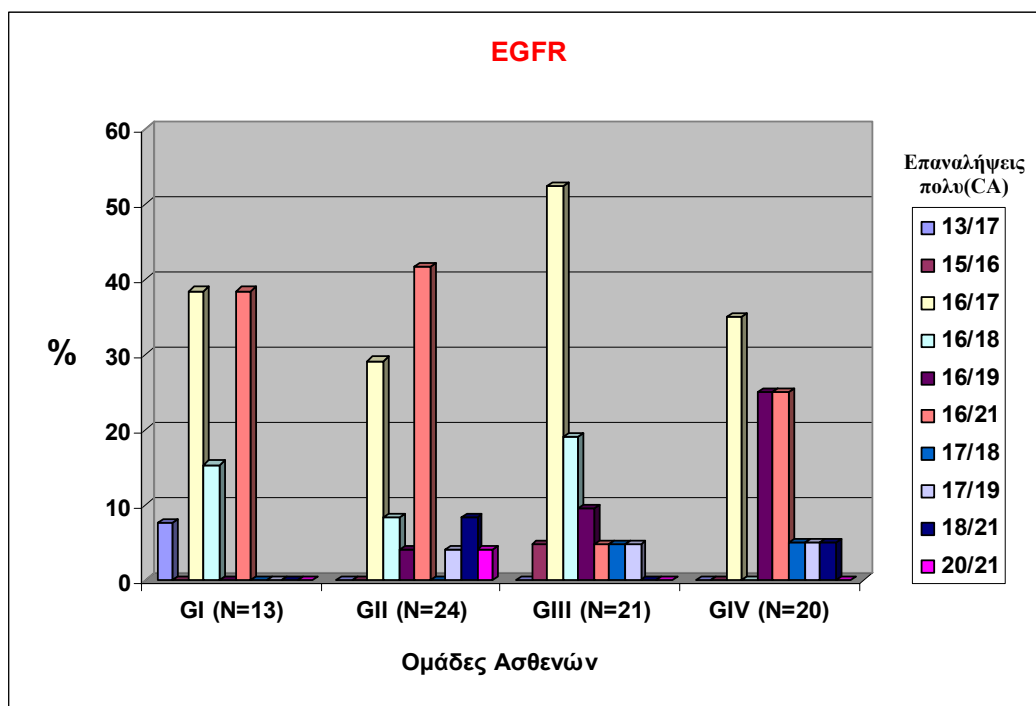
Εικόνα 24. Ανάλυση της αστάθειας και των επαναλήψεων του γονιδίου c-MYB στους ασθενείς P11 και P28.

Τα δύο είδη DNA (από φυσιολογικό και παθολογικό ιστό) των ασθενών P11 και P28 ενισχύονται με PCR με κατάλληλα ιχνηθετημένες πριμοδοτικές αλληλουχίες ειδικές για το ιντρόνιο 1 του γονιδίου c-MYB και ηλεκτροφορούνται στη σειρά σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμίδιου. Στη συνέχεια τα προϊόντα PCR από το DNA του φυσιολογικού και του παθολογικού ιστού υπόκεινται σε αλληλούχιση, ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ουρίας-ακρυλαμίδιου και αναλύονται στον αναλυτή LI-COR DNA Sequencer 4200.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 24 τα δείγματα των ασθενών P11 και P28 εμφανίζουν στο πήκτωμα μία μετατοπισμένη προς τα κάτω σειρά επαναλήψεων στο DNA του παθολογικού ιστού σε σύγκριση με το DNA του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού. Η αλληλούχιση των δειγμάτων έδειξε ότι το δείγμα DNA του ασθενή P11 στον παθολογικό ιστό έχει από 14 έως 19 πολυ(T) επαναλήψεις του

γονιδίου c-MYB, σε σύγκριση με τις 18 έως 21 πολυ(T) επαναλήψεις που φέρει στον φυσιολογικό ιστό. Αντίστοιχα το δείγμα DNA του ασθενή P28 φέρει από 16 έως 21 πολυ(T) επαναλήψεις στο γονίδιο c-MYB στον παθολογικό ιστό σε σύγκριση με τις 19 έως 21 πολυ(T) επαναλήψεις του παρακείμενου φυσιολογικού ιστού.

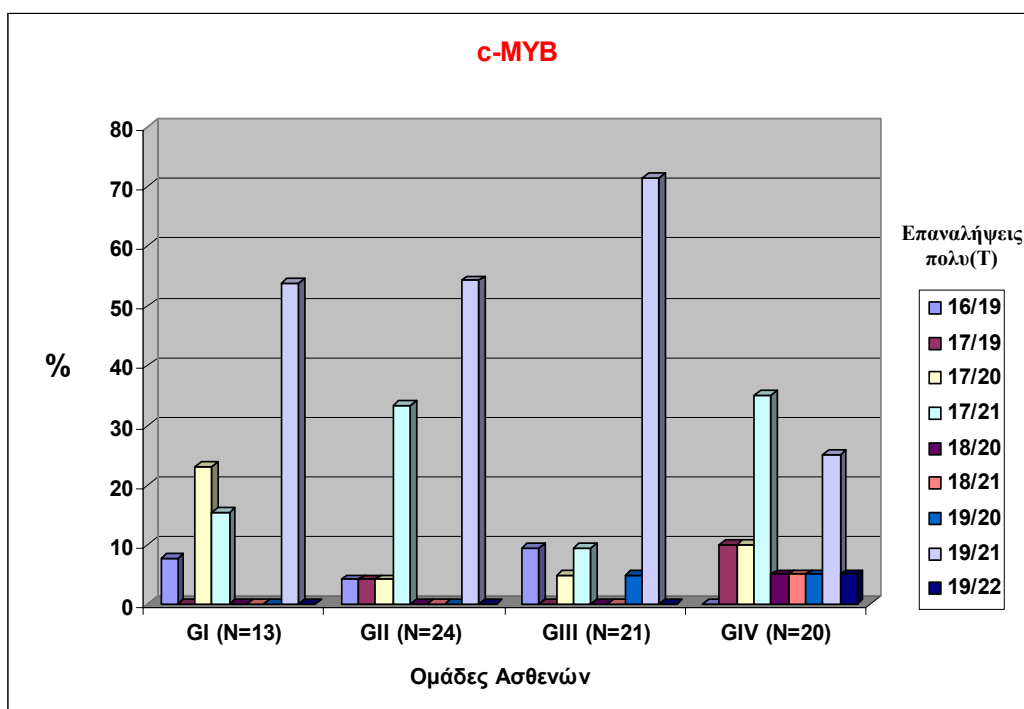
Τελικά από το σύνολο των 78 ατόμων που μελετήθηκαν, όλοι εμφάνισαν πολυμορφισμούς στις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες των γονιδίων EGFR και c-MYB, οι οποίες κατεγράφησαν και τα αποτελέσματα των οποίων φαίνονται στις εικόνες 25 και 26 που ακολουθούν.



Εικόνα 25. Συχνότητα εμφάνισης των πολυ(CA) επαναλήψεων του γονιδίου EGFR στις 4 ομάδες ασθενών.

Όπως παρατηρούμε από την Εικόνα 25 οι πιο κοινοί πολυμορφισμοί για το γονίδιο EGFR είναι οι 16, 17 και 21CA επαναλήψεις και στις τέσσερις ομάδες ασθενών που μελετώνται, με την πλειοψηφία να φέρει 16-17CA επαναλήψεις (30/78 ή 39%) και 16-21CA επαναλήψεις (21/78 ή 27%). Επιπλέον στην ομάδα GI (υγιή άτομα) η κατανομή των επαναλήψεων δεν εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες ενώ αξίζει να αναφερθεί ότι στην κατηγορία GIV (ασθενείς με καρκίνο) παρατηρείται μία πτώση στη συχνότητα εμφάνισης των κοινών πολυμορφισμών 16-17CA και 16-21CA επαναλήψεις και παράλληλα μία απότομη αύξηση (25%) στην συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού 16-19CA

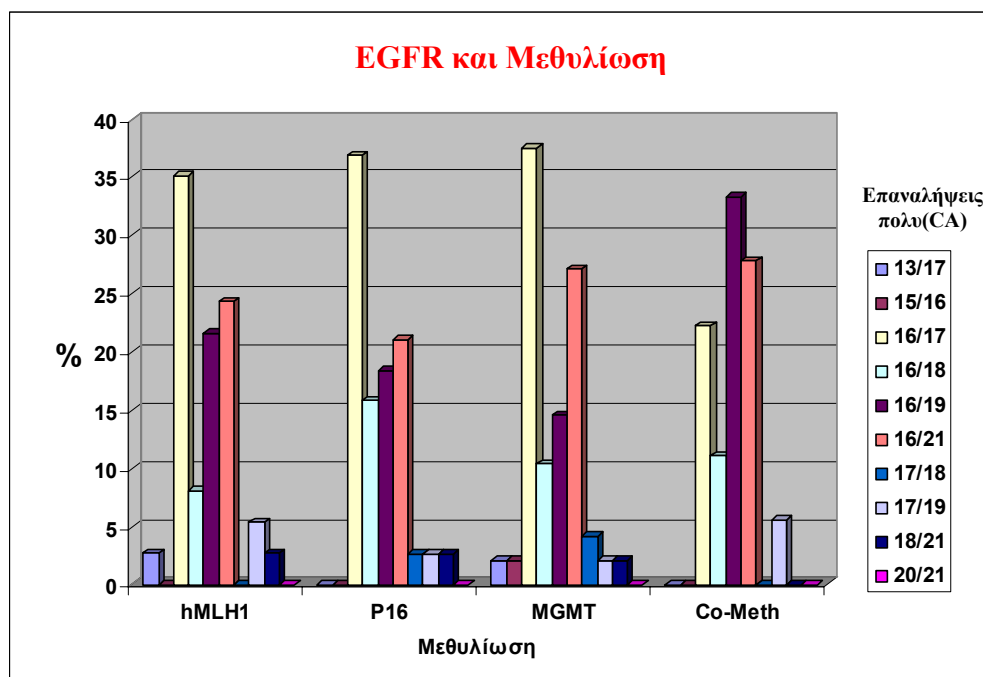
επαναλήψεις σε σχέση με τα αντίστοιχα ποσοστά εμφάνισης (4% και 9.5%) στις ομάδες GII και GIII.



Εικόνα 26. Συχνότητα εμφάνισης των πολυ(T) επαναλήψεων του γονιδίου c-MYB στις 4 ομάδες ασθενών.

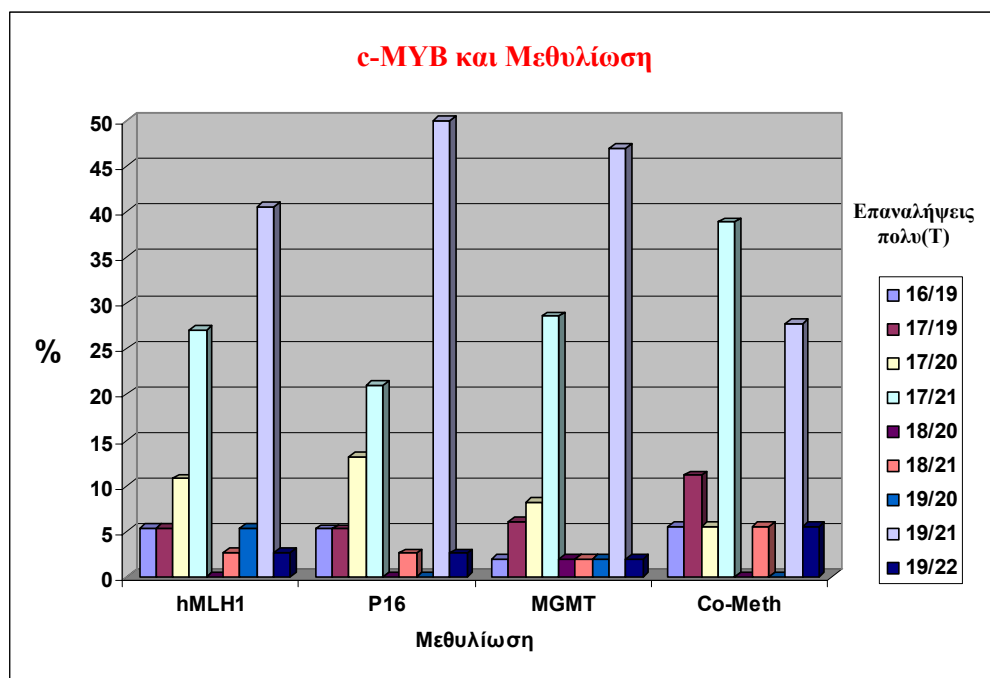
Από την Εικόνα 26 παρατηρούμε ότι για το γονίδιο c-MYB οι πιο κοινοί πολυμορφισμοί είναι οι 17, 19 και 21T επαναλήψεις, με την πλειοψηφία να φέρει 19-21πολυ(T) (40 από τους 78 ασθενείς, 51.3%) και 17-21πολυ(T) (19/78 ή 24.6%). Επιπλέον οι ασθενείς της ομάδας GIV (άτομα με καρκίνο) φαίνεται να παρουσιάζουν μία διαφορετική κατανομή και ποικιλία στους παρατηρούμενους πολυμορφισμούς στο γονίδιο c-MYB σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες ασθενών με μία αυξανόμενη τάση στους πολυμορφισμούς 17-21πολυ(T) και 17-19πολυ(T) επαναλήψεις και παράλληλα μείωση στα ποσοστά εμφάνισης του πολυμορφισμού 19-21πολυ(T) επαναλήψεις.

Μια διαφορετική προσέγγιση που περιλαμβάνει τη συσχέτιση των παρατηρούμενων επαναλήψεων των γονιδίων EGFR και c-MYB με την μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT έδωσε τις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 27 και Εικόνα 28).



Εικόνα 27. Κατανομή των πολυ(CA) επαναλήψεων του γονιδίου EGFR σε σχέση με τη μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT.

Όπως φαίνεται από την Εικόνα 27, η μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT σε συνδυασμό με τη συχνότητα κατανομής των πολυ(CA) επαναλήψεων στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου EGFR, είναι ανεξάρτητη και τα ποσοστά των πιο κοινών πολυμορφισμών (16-17πολυ(CA) και 16-21 πολυ(CA)) είναι στα ίδια επίπεδα στα θετικά δείγματα για μεθυλίωση στους υποκινητές των τριών γονιδίων (35%, 37% και 37,5% για τον πολυμορφισμό 16-17πολυ(CA) στα γονίδια hMLH1, P16 και MGMT αντίστοιχα και 24%, 21% και 27% για τον πολυμορφισμό 16-21πολυ(CA) στα αντίστοιχα γονίδια). Όμως όταν η μεθυλίωση στους υποκινητές των τριών γονιδίων εμφανίζεται ταυτόχρονα για κάθε ασθενή, τότε παρατηρείται μία αυξανόμενη τάση του πολυμορφισμού 16-19πολυ(CA) επαναλήψεις στο γονίδιο EGFR και παράλληλα μείωση του κυρίαρχου πολυμορφισμού 16-17πολυ(CA) επαναλήψεις, μια τάση που εμφανίζεται επίσης και στην Εικόνα 25, στην πορεία καρκινογένεσης από την ομάδα GI στην ομάδα GIV, χωρίς όμως να μπορεί να τεκμηριωθεί εάν αυτό είναι αποτέλεσμα της μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων ή ανεξάρτητο γενετικό συμβάν.



Εικόνα 28. Κατανομή των πολυ(T) επαναλήψεων του γονιδίου c-MYB σε σχέση με τη μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT.

Όπως φαίνεται από την Εικόνα 28, η μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT σε συνδυασμό με τη συχνότητα κατανομής των πολυ(T) επαναλήψεων στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου c-MYB, είναι ανεξάρτητη και τα ποσοστά των πιο κοινών πολυμορφισμών (19-21πολυ(T) και 17-21πολυ(T) επαναλήψεις) είναι στα ίδια επίπεδα στα θετικά δείγματα για μεθυλίωση στους υποκινητές των τριών γονιδίων (41%, 50% και 47% για τον πολυμορφισμό 19-21πολυ(T) στα γονίδια hMLH1, P16 και MGMT αντίστοιχα και 27%, 21% και 29% για τον πολυμορφισμό 17-21πολυ(T) στα αντίστοιχα γονίδια). Όμως όταν η μεθυλίωση στους υποκινητές των τριών γονιδίων εμφανίζεται ταυτόχρονα για κάθε ασθενή, τότε παρατηρείται μία αυξανόμενη τάση στους πολυμορφισμούς 17-19πολυ(T) και 17-21πολυ(T) και παράλληλα μία μείωση στα ποσοστά εμφάνισης του πολυμορφισμού 19-21πολυ(T). Μια τάση που εμφανίζεται επίσης και στην Εικόνα 26, στην πορεία καρκινογένεσης από την ομάδα GI στην ομάδα GIV, χωρίς όμως να μπορεί να τεκμηριωθεί εάν αυτό είναι αποτέλεσμα της μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων ή ανεξάρτητο γενετικό συμβάν.

6.5. Έλεγχος γενετικών μεταλλάξεων στα γονίδια hMLH1 και hMSH2

Ο γενετικός έλεγχος για πιθανές μεταλλάξεις στα γονίδια hMLH1 και hMSH2 εφαρμόστηκε στα δείγματα DNA από ολικό αίμα, των ασθενών P11, P28 και P74 (που φέρουν τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας MSI-H) με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης τριχοειδούς με διαβάθμιση θερμοκρασίας (TGCE).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για κάθε δείγμα έχουν ως εξής:

Ασθενής P11

Γονίδιο hMLH1: Το προς εξέταση δείγμα ήταν αρνητικό για γενετικές αλλοιώσεις που θεωρούνται παθογόνες.

Γονίδιο hMSH2: Ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη **472 C>T**, δηλαδή η αντικατάσταση μίας Κυτοσίνης (C) στο 472 νουκλεοτίδιο του γονιδίου hMSH2 σε Θυμίνη (T), που έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή του κωδικόνιου 158 της Γλουταμίνης (Q) σε κωδικόνιο τερματισμού (Q158X) οδηγώντας έτσι στην παραγωγή ημιτελούς πρωτεΐνης. Η μετάλλαξη αυτή εντοπίζεται στο εξόνιο 3 του γονιδίου hMSH2 και πρέπει να εκληφθεί ως παθογόνος. Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι έχει αναφερθεί ξανά τόσο στον ελληνικό πληθυσμό, σε μία οικογένεια με καρκίνο του παχέος εντέρου, από την ομάδα της Απέσσου στο ερευνητικό κέντρο “ΥΓΕΙΑ” [97] όσο και στη διεθνή βιβλιογραφία [169, 170]. Στον ίδιο ασθενή ανιχνεύθηκε επίσης η αντικατάσταση **1975-6 T>C**, δηλαδή η αντικατάσταση μιας θυμίνης (T) στο νουκλεοτίδιο 1975-1976 με κυτοσίνη (C) χωρίς να προκαλεί την αντικατάσταση κάποιου αμινοξέος. Η συγκεκριμένη αντικατάσταση εντοπίζεται στο ιντρόνιο 12 του γονιδίου hMSH2 και πιθανός να πρόκειται για πολυμορφισμό. Επιπλέον για την συγκεκριμένη αντικατάσταση δεν υπάρχουν αναφορές τόσο σε εθνικό όσο και διεθνή επίπεδο.

Συμπερασματικά, ο ασθενής P11 (γυναίκα 39 ετών με διαγνωσμένη μάζα ορθού και υποψήφια για το σύνδρομο HNPCC) βρέθηκε θετικός ως προς μια παθογόνα γενετική μετάλλαξη στο γονίδιο hMSH2, καθώς και έναν πολυμορφισμό. Επειδή πρόκειται για άτομο υποψήφιο για το σύνδρομο HNPCC που πληρεί τα κριτήρια Bethesda και έχει μετάλλαξη σε ένα από τα σημαντικά γονίδια του συστήματος MMR συνιστάται μετά και τη σύμφωνη γνώμη του ιδίου να ελεγχθούν και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας του.

Ασθενής P28

Γονίδιο hMLH1: Το προς εξέταση δείγμα ήταν αρνητικό για γενετικές αλλοιώσεις που θεωρούνται παθογόνες.

Γονίδιο hMSH2: Ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη **592 G>A**, δηλαδή η αντικατάσταση μίας Γουανίνης (G) στο 592 νουκλεοτίδιο του γονιδίου hMSH2 σε Αδενίνη (A), που έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος Γλουταμινικό οξύ (E) στο κωδικόνιο 198 σε Λυσίνη (K) (E198K). Αυτή η μετάλλαξη εντοπίζεται στο εξόνιο 3 του γονιδίου hMSH2 και είναι πιθανός παθογόνα. Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν έχει αναφερθεί ξανά τόσο στην ελληνική όσο και στην διεθνή βιβλιογραφία. Στο ίδιο δείγμα ανιχνεύθηκε επίσης η αντικατάσταση **1975-6 T>C**. Η συγκεκριμένη αντικατάσταση, η οποία βρέθηκε και στο δείγμα 11, μπορεί να θεωρηθεί ως πολυμορφισμός.

Συμπερασματικά, ο ασθενής P28 (γυναίκα 66 ετών με διαγνωσμένο σωληνολαχνωτό πολύποδα ορθού και αρνητικό ιστορικό σε καρκίνους) βρέθηκε θετικός ως προς μια γενετική μετάλλαξη στο γονίδιο hMSH2, που αν και δεν ανήκει στο σύνδρομο HNPCC λόγω του αρνητικού οικογενειακού ιστορικού με καρκίνο, συνιστάται να ελεγχθούν και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειάς του.

Ασθενής P74

Γονίδιο hMLH1: Ανιχνεύθηκαν δύο αντικαταστάσεις, η **307-29 C>A** και η **1668-19 A>G** στις περιοχές των ιντρονίων 3 και 14 αντίστοιχα του γονιδίου. Οι αντικαταστάσεις αυτές δεν προκαλούν την αντικατάσταση κάποιου αμινοξέος και επομένως χαρακτηρίζονται ως πολυμορφισμοί. Ο πρώτος πολυμορφισμός (307-29 C>A) δηλαδή η αντικατάσταση μίας Κυτοσίνης (C) από Αδενίνη (A) στο νουκλεοτίδιο 307-29 του γονιδίου hMLH1, έχει αναφερθεί στην διεθνή βιβλιογραφία σε τρεις χώρες, Γερμανία, Δανία και Σουηδία [171-173], αλλά αναφέρεται για πρώτη φορά στον ελληνικό πληθυσμό. Αντίθετα ο δεύτερος πολυμορφισμός (1668-19 A>G) πρόκειται για την αντικατάσταση μίας Αδενίνης (A) από Γουανίνη (G) και έχει αναφερθεί τόσο στον ελλαδικό χώρο [97] όσο και στη διεθνή βάση δεδομένων για το σύνδρομο HNPCC (<http://www.nfdht.nl> (ICG-HNPCC mutation database)).

Συμπερασματικά, ο ασθενής P74 (άντρας 75 ετών με αδenoκαρκίνωμα ανιόντος αλλά άγνωστο οικογενειακό ιστορικό) ήταν αρνητικός για γενετικές αλλοιώσεις που θεωρούνται παθογόνες στο γονίδιο hMLH1 όμως η εμφάνιση δύο πολυμορφισμών στο ίδιο γονίδιο χρήζει περαιτέρω εξέταση.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1. Γενικά

Η μετατροπή του φυσιολογικού επιθηλίου του παχέος εντέρου σε πολύποδα και στη συνέχεια σε καρκίνωμα κατά την διάρκεια της καρκινογένεσης, ακολουθεί μία καθορισμένη πορεία ιστολογικών και γενετικών αλλαγών που είναι γνωστή ως αλληλουχία εξέλιξης πολύποδα σε καρκίνο (polyp to cancer progression sequence). Η πορεία της καρκινογένεσης θεωρείται ότι είναι μία εξελικτική διαδικασία στην οποία τα νεοπλασματικά κύτταρα συσσωρεύουν επίκτητες γενετικές και επιγενετικές αλλαγές στο DNA τους που είναι υπεύθυνες για την έναρξη και την εξέλιξη της καρκινογένεσης [174]. Αυτές οι γενετικές και επιγενετικές αλλαγές μπορεί να είναι είτε κάποιες γονιδιακές μεταλλάξεις ή παρεκκλίνουσες μεθυλιώσεις στο DNA που προσδίδουν αναπτυξιακό πλεονέκτημα στους συγκεκριμένους κλώνους για όλη την μετέπειτα πορεία εξέλιξής τους. Κάθε κρίσιμο βήμα της εξελικτικής αυτής πορείας συνοδεύεται συνήθως από αναγνωρίσιμες ιστολογικές αλλαγές, αρχίζοντας από έναν υπερπλαστικό πολύποδα που εξελίσσεται σε καλοήγη σωληνοειδή πολύποδα και αργότερα σε ένα προχωρημένο πολύποδα (πχ σωληνολαχνωτό ή λαχνωτό) υψηλού ογκογενετικού δυναμικού και αργότερα καταλήγοντας σε ένα επιθετικό / μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα.

Είναι επίσης πιθανό οι γενετικές και επιγενετικές αλλαγές να εμφανίζουν συνεργιστική δράση στην πορεία σχηματισμού του όγκου και έτσι για παράδειγμα ο εντοπισμός ενός προχωρημένου πολύποδα στο παχύ έντερο με επιπλέον εντοπισμένη έκτροπη μεθυλίωση να προσδιορίζει και την ύπαρξη επιθηλίου “στόχου”, δηλαδή επιθήλιο του παχέος εντέρου με αυξημένο κίνδυνο απόκτησης γενετικών αλλαγών που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στο σχηματισμό όγκου στο παχύ έντερο [175].

7.2. Μικροδορυφορική αστάθεια

Η μικροδορυφορική αστάθεια, αποτελεί σήμερα την πλέον συχνή γενετική αλλαγή στον καρκίνο του παχέος εντέρου και το ποσοστό εμφάνισής της προσεγγίζει το 90% στις περιπτώσεις των ασθενών με το σύνδρομο HNPCC [40] αλλά και το 15% στους ασθενείς με σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου [39]. Οφείλεται στην ελαττωματική λειτουργία του συστήματος MMR και για το λόγο αυτό αποτελεί και σημαντικό δείκτη της λειτουργίας του. Επιπλέον αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη

εξέλιξης της νόσου αλλά και σημαντικό παράγοντα επιλογής της φαρμακευτικής αγωγής των ασθενών με τον φαινότυπο αυτό [59-61].

Στην παρούσα εργασία ο φαινότυπος της μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) ελέγχθηκε με τους πέντε δείκτες Bethesda [53]. Όλοι οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ικανοί να ανιχνεύσουν και τους 3 ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-H. Ωστόσο, στους ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-L, η αστάθεια ανιχνεύθηκε αποκλειστικά με τους δινουκλεοτιδικούς δείκτες (D2S123, D5S356 και D17S250) γεγονός που έρχεται σε πλήρη συμφωνία με παλαιότερες δημοσιεύσεις τόσο σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου [176], όσο και σε ασθενείς με αδενωματώδεις πολύποδες [177, 178]. Η ευαισθησία του κάθε δείκτη ξεχωριστά για την ανίχνευση του φαινοτύπου της μικροδορυφορικής αστάθειας ποικίλει, με υψηλότερη αυτή του δείκτη D2S123 με ποσοστό 54%, ακολουθούμενη από τους δείκτες D5S346 και D17S250 με ποσοστό 43%, ενώ οι BAT25 και BAT26 που ήταν θετικοί μόνο στους MSI-H ασθενείς δείχνουν μία συνολική ευαισθησία 23% για το σύνολο των ασθενών με τον φαινότυπο MSI, με ποσοστό εξειδίκευσης 100% για τους MSI-H ασθενείς. Τα αποτελέσματά μας, αν και αφορούν μικρό αριθμό ασθενών, συμφωνούν με τα αναφερόμενα στη βιβλιογραφία [28, 53, 121, 178].

Στην παρούσα εργασία ο φαινότυπος MSI εντοπίστηκε σε 13 περιπτώσεις από το σύνολο των 78 ασθενών της μελέτης και μάλιστα μόνο στις ομάδες GIII και GIV (με σωληνολαχνωτούς ή λαχνωτούς πολύποδες και καρκίνο). Η συχνότητα εμφάνισης του φαινοτύπου MSI-L ή MSI-H ανέρχεται σε ποσοστό 17% γεγονός που συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [34]. Πιο αναλυτικά τον φαινότυπο MSI-H φέρουν τρεις ασθενείς. Ο πρώτος ασθενής διαγνωσμένος με αδενοκαρκίνωμα ανιόντος (δεξί τμήμα του παχέος εντέρου), ο δεύτερος με μάζα ορθού (με ιστορικό καρκίνου σε συγγενείς πρώτου βαθμού και υποψήφιος για το σύνδρομο HNPCC) καθώς και ένας ασθενής με σωληνολαχνωτό αδένωμα ορθού χωρίς ιστορικό για καρκίνο. Τον MSI-L φαινότυπο φέρουν 10 ασθενείς, 7 με καρκίνο στο αριστερό τμήμα του παχέος εντέρου χωρίς οικογενειακό ιστορικό για καρκίνο και 3 ασθενείς με πολύποδες λαχνωτούς ή σωληνολαχνωτούς (1 μόνο στο δεξί τμήμα του παχέος εντέρου) επίσης χωρίς ιστορικό για καρκίνο. Σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες [40, 179] οι καρκίνοι με τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας εμφανίζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τους MSS καρκίνους, όπως εντοπισμός κυρίως στο δεξί τμήμα του παχέος εντέρου και υψηλή φλεγμονώδη κυτταρική διείδυση. Στη δική μας μελέτη από τους 20 ασθενείς με καρκίνο ο ένας μόνο εμφανίζει καρκίνο στο δεξί

τμήμα του παχέος εντέρου και ο οποίος φέρει τον φαινότυπο MSI-H. Στους υπόλοιπους ασθενείς ο καρκίνος εντοπίζεται στο αριστερό τμήμα και οι 7 από αυτούς φέρουν τον φαινότυπο MSI-L, ενώ μόνο ένας φέρει τον MSI-H φαινότυπο. Σύμφωνα με μία μελέτη [180], οι καρκίνοι με τον φαινότυπο MSI-H που εντοπίζονται στο αριστερό τμήμα του παχέος εντέρου παρουσιάζουν υψηλότερη γονιδιακή έκφραση σε γονίδια που είναι συνδεδεμένα με καρκίνο του μαστού, του στομάχου και του παχέος εντέρου (π.χ. τα EMI, PLAGL1, ABCB1, KIAA1776, FNBP1, SELE και PACAP γονίδια) σε σχέση με τους καρκίνους που εντοπίζονται στο δεξί τμήμα του παχέος εντέρου. Μάλιστα κάποια γονίδια που έδειξαν την μικρότερη έκφραση στους καρκίνους του δεξιού τμήματος του παχέος εντέρου (όπως τα ABCB1 και PLAGL1), συνήθως υπολειπονται σε ποικίλους καρκίνους εξαιτίας της μεθυλίωσης στον υποκινητή τους. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη, συγκρίνοντας όλους τους καρκίνους με τον φαινότυπο MSI σε σχέση με τους καρκίνους με τον φαινότυπο MSS, εντόπισαν υπερέκφραση σε γονίδια που εμπλέκονται με την απόπτωση (όπως το γονίδιο CASP2) ή με κάποια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των MSI καρκίνων, όπως η έντονη ανοσοαπόκριση (στα γονίδια MSTP9 και MST1) και η αυξημένη παραγωγή βλεννίνης (π.χ. στο γονίδιο MUC51C). Αντίθετα οι ίδιοι καρκίνοι εμφανίζουν απενεργοποίηση στο γονίδιο IGFIIR, που αποτελεί και ένα γονίδιο στόχο, στους καρκίνους με τον φαινότυπο MSI και συνδέεται με την κακή λειτουργία του συστήματος MMR.

Παρότι ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει επισημάνει τον σημαντικό ρόλο της μικροδορυφορικής αστάθειας στην διαδικασία της καρκινογένεσης στον καρκίνο του παχέος εντέρου, τα δεδομένα από τη ανάλυση του φαινοτύπου της μικροδορυφορικής αστάθειας στους πολύποδες του παχέος εντέρου είναι δύσκολο να συγκριθούν. Ο σπουδαιότερος παράγοντας που προκαλεί τις αντιφάσεις μεταξύ των μελετών είναι οι μικροδορυφορικοί δείκτες που επιλέγονται κάθε φορά, καθώς και τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για να καθοριστούν τα επίπεδα της μικροδορυφορικής αστάθειας. Για το λόγο αυτό υπάρχει μεγάλο εύρος στη συχνότητα εμφάνισης των πολυπόδων με τον φαινότυπο MSI. Τα ποσοστά στους σποραδικούς πολύποδες κυμαίνονται από 3 έως 32% για αυτούς με τον φαινότυπο MSI-L και 1-7% για αυτούς με τον φαινότυπο MSI-H, με την πλειοψηφία αυτών να είναι MSI-L [141, 178, 181-184]. Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκαν 45 πολύποδες με ποικίλες μορφολογικές διαμορφώσεις (Πίνακας 8). Οι πολύποδες αυτοί χωρίστηκαν σε δύο ομάδες την GII και GIII ανάλογα με το ογκογενετικό δυναμικό τους. Έτσι στην

ομάδα GII κατατάχθηκαν οι 24/45 ασθενείς με πολύποδες στο παχύ έντερο που η ιστολογική τους μορφή δεν θεωρείται επιθετική και επικίνδυνη για την περαιτέρω εξέλιξή τους σε καρκίνο όπως: δυσπλαστικές αλλοιώσεις των εντερικών κρυπτών, οι υπερπλαστικοί, οι μικτοί, οι φλεγμονώδεις καθώς και οι σωληνοειδείς πολύποδες. Αντίθετα οι υπόλοιποι 21 από τους 45 ασθενείς με πολύποδες στο παχύ έντερο αποτελούν την ομάδα GIII και φέρουν λαχνωτούς και σωληνολαχνωτούς πολύποδες, δύο τύποι πολυπόδων που αν και δεν θεωρούνται οι κυρίως υπεύθυνοι για την εξέλιξη τους σε καρκίνο, παρόλα αυτά πιστεύεται από πολλούς ότι είναι αρκετά επιθετικοί ως προς την εξέλιξή τους [181, 185-187]. Η ανάλυση του φαινότυπου της μικροδορυφορικής αστάθειας έδειξε ότι κανένας από τους πολύποδες της ομάδας GII δεν εμφανίζει τον φαινότυπο MSI, ενώ στην ομάδα GIII 1/21 ασθενείς (5%) φέρει τον φαινότυπο MSI-H και 3/21 (14%) τον φαινότυπο MSI-L. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν τις μελέτες που αναφέρουν την ύπαρξη της μικροδορυφορικής αστάθειας (με τη πλειοψηφία να είναι MSI-L) στους πολύποδες, καθώς και ότι ο φαινότυπος MSI εντοπίζεται κυρίως στους λαχνωτούς και σωληνολαχνωτούς πολύποδες. Σε μία μελέτη του Ricciardiello και της ομάδας του [177], για ένα σύνολο 70 ασθενών με πολύποδες (23 σωληνοειδείς και 47 λαχνωτοί) οι 12/70 (17%) παρουσίασαν τον φαινότυπο MSI-H ενώ οι 20/70 (29%) τον φαινότυπο MSI-L. Τα ποσοστά της μελέτης μας διαφέρουν από τα αναφερόμενα στην παραπάνω μελέτη τόσο εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των λαχνωτών πολυπόδων όσο και του γεγονότος ότι οι 22/70 πολύποδες της μελέτης εντοπίζονται στο δεξί τμήμα του παχέος εντέρου και μάλιστα οι 7 από αυτούς να ανήκουν σε ασθενείς με θετικό οικογενειακό ιστορικό για καρκίνους και φέρουν τον φαινότυπο MSI-H. Αντίθετα, στα δείγματα της μελέτης μας μόνο οι 4 από τους 45 πολύποδες βρίσκονται στο δεξί τμήμα του παχέος εντέρου, γεγονός που αιτιολογεί τα διαφορετικά αποτελέσματα αν λάβουμε υπ' όψιν μας τη μελέτη του Watanabe και της ομάδας του [180], που συσχετίζει την εμφάνιση της μικροδορυφορικής αστάθειας με την κατανομή των καρκίνων στο δεξί τμήμα του παχέος εντέρου.

7.3. Μεθυλίωση στον υποκινητή των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT

Η μεθυλίωση στον υποκινητή γονιδίων που συμμετέχουν στη ρύθμιση και τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου έχει αναγνωρισθεί ότι παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου μέσω αποσιώπησης της μεταγραφής τους. Η επιγενετική αποσιώπηση των γονιδίων που προκαλείται από τη μεθυλίωση στις νησίδες CpG του DNA του υποκινητή τους είναι ένας σημαντικός παράγοντας ρύθμισης της έκφρασης μέσω αποσιώπησης που όμως δεν έχει ακόμα κατανοηθεί πλήρως [188].

Στην περίπτωση του σποραδικού καρκίνου του παχέος εντέρου, μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερμεθυλίωση στο DNA δημιουργεί ένα “ελαττωματικό πεδίο” όπου μεγάλες περιοχές του εντερικού επιθηλίου είναι επιρρεπείς σε γενετικές αλλοιώσεις [189]. Στην περίπτωση που η υπερμεθυλίωση στις νησίδες CpG του DNA του υποκινητή ενός γονιδίου συντελεί στην εμφάνιση του καρκίνου του παχέος εντέρου, τότε η αλλαγή στη μεθυλίωση θα μπορεί να εντοπιστεί και στους πολύποδες του παχέος εντέρου.

Η μεθυλίωση στις νησίδες CpG έχει αποδειχθεί ότι αφορά έναν μεγάλο αριθμό γονιδίων στον καρκίνο του παχέος εντέρου, συμπεριλαμβανομένων των P16, MGMT, THBS-1, TIMP-3, P14ARF, hMLH1 και MINT 1, 2, 12 και 31 [120, 123, 190, 191]. Τα τελευταία χρόνια, μελέτες που αφορούν τη σχέση της μεθυλίωσης στις νησίδες CpG των υποκινητών διαφόρων γονιδίων τόσο στους καρκίνους του παχέος εντέρου [190, 192, 193], όσο και τη μεθυλίωση να εντοπίζεται και σε διαφορετικούς τύπους πολυπόδων [181, 194] βοήθησαν στην καλύτερη κατανόηση του ρόλου της μη-φυσιολογικής μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων στο μονοπάτι εξέλιξης πολύποδας σε καρκίνωμα, κατά την καρκινογένεση του παχέος εντέρου.

Ο φαινότυπος της μεθυλίωσης των νησίδων CpG (CIMP) έχει προσδιοριστεί κατά την διάρκεια διαφορετικών σταδίων στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου, όπως στις δυσπλαστικές αλλοιώσεις των εντερικών κρυπών (Aberrant Crypt Foci, ACF), την πιο πρώιμη νεοπλαστική βλάβη στο παχύ έντερο, στους υπερπλαστικούς πολύποδες, στους σωληνοειδείς, σωληνολαχνωτούς και λαχνωτούς πολύποδες καθώς και στα αδενοκαρκινώματα [116, 123, 190, 193, 195], υποδεικνύοντας ότι η μεθυλίωση του DNA μπορεί να είναι ένα καθοριστικό συμβάν στην εμφάνιση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Επιπλέον η έκτροπη μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων MGMT και hMLH1 έχει αποδειχθεί ότι συμβάλει στην αποσιώπηση της

έκφρασής τους έχοντας ως αποτέλεσμα την μετέπειτα εμφάνιση τόσο της μικροδορυφορικής αστάθειας, όσο και σημαντικών μεταλλάξεων στο γονίδιο K-ras [122, 175].

Παρόλα αυτά, μεθυλίωση στον υποκινητή κάποιων γονιδίων μπορεί να εντοπιστεί και στο φυσιολογικό βλενογόνο του παχέος εντέρου ο οποίος εντοπίζεται δίπλα από καρκινικό ιστό [189] καθώς και σε φυσιολογικά επιθήλια παχέος εντέρου ηλικιωμένων ατόμων [196, 197]. Για το λόγο αυτό, στον καρκίνο του παχέος εντέρου, δύο είδη μεθυλίωσης έχουν εντοπιστεί, ανάλογα και με τον ιστό που έχει προσβληθεί. Ο τύπος μεθυλίωσης των νησίδων CpG A και ο τύπος C. Ο τύπος μεθυλίωσης A (ηλικιακά εξαρτώμενος), εντοπίζεται στο φυσιολογικό επιθήλιο του παχέος εντέρου καθώς επίσης και στα καρκινώματα του παχέος εντέρου και η συχνότητα εμφάνισής του αυξάνεται με την ηλικία. Επιπλέον ο τύπος αυτός φαίνεται να μην σχετίζεται με την καρκινογένεση. Αντίθετα η μεθυλίωση τύπου C συμβαίνει αποκλειστικά στον καρκίνο του παχέος εντέρου και είναι προφανές ότι συμβάλει στην καρκινογένεση [120].

Η μοριακή γενετική των νεοπλασιών στο παχύ έντερο έχει μελετηθεί εκτεταμένα, όμως λίγες μόνο μελέτες αναφέρονται σε παθολογικές και κλινικές συσχετίσεις με ένα ευρύτερο πληθυσμό ασθενών. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τη μεθυλίωση στον υποκινητή των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT σε έναν πληθυσμό ατόμων που υποβλήθηκε σε κολονοσκόπηση και στους οποίους περιλαμβάνονταν υγιή άτομα, ασθενείς με πολύποδες χαμηλού και υψηλού ογκογενετικού δυναμικού, καθώς και ασθενείς με καρκίνο. Από τα αποτελέσματα ελέγχου της μεθυλίωσης προέκυψε ότι η ομάδα GI των υγιών ατόμων εμφανίζει και στα τρία γονίδια μια ηλικιακά εξαρτώμενη σχέση που πιθανώς να είναι και τύπου A μεθυλίωση, όμως είναι ηλικιακά ανεξάρτητη στους ασθενείς με πολύποδες (ομάδες GII και GIII) και στους ασθενείς με καρκίνο (ομάδα GIV). Το γεγονός αυτό συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες [197] που έδειξαν ότι η μεθυλίωση στις νησίδες CpG εμφανίζεται σε φυσιολογικούς ιστολογικά ιστούς του επιθήλιου του παχέος εντέρου με ηλικιακά-εξαρτώμενη συχνότητα καθώς και ότι τα μισά από τα γονίδια που εμφανίζουν μεθυλίωση εξαρτώμενη από την ηλικία είναι τα ίδια με αυτά που θεωρούνται υπεύθυνα στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Για το λόγο αυτό η παρουσία του φαινοτύπου της μεθυλίωσης CIMP θεωρείται ως ένας ικανός δείκτης χαρακτηρισμού ενός ελαττωματικού ή ογκογόνου πεδίου στο βλενογόνο του παχέος εντέρου [189]: δηλαδή μιας περιοχής φυσιολογικού ιστού που έχει την πιθανότητα να

μετατραπεί σε καρκινικό μέσω μεθυλίωσης στον υποκινητή των γονιδίων, ως επακόλουθο παραγόντων προδιάθεσης στο DNA, όπως οι περιβαλλοντικοί παράγοντες ή μίας γενετικής προδιάθεσης για μεθυλίωση [198].

Παρόλο που εφαρμόσαμε την ίδια τεχνική για τον έλεγχο της μεθυλίωσης και στους τρεις υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT, μεθυλίωση στο DNA του αίματος στο σύνολο των ασθενών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, βρέθηκε μόνο στην περίπτωση του γονιδίου MGMT και στις τέσσερις ομάδες των ασθενών. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο Grady και η ομάδα του [199] εφαρμόζοντας την ίδια τεχνική ελέγχου μεθυλίωσης για το γονίδιο hMLH1, αλλά σε διαφορετική περιοχή του υποκινητή του, ανίχνευσε μεθυλίωση και στον ορό των ασθενών με σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου και τον φαινότυπο MSI, σε ποσοστό 30% από μία μελέτη που περιλάμβανε συνολικά 20 ασθενείς. Το γεγονός αυτό επισημαίνει ότι η εμφάνιση της μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων είναι άμεσα εξαρτώμενη και από την περιοχή ελέγχου της μεθυλίωσης σε κάθε υποκινητή γονιδίου, με συνέπεια τα αποτελέσματα μεθυλίωσης μεταξύ των ερευνητικών ομάδων που ασχολούνται με τον τομέα της μεθυλίωσης στον υποκινητή κάποιων γονιδίων να μην είναι πάντα συγκρίσιμα. Για το λόγο αυτό στην παρούσα μελέτη η σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεθυλίωσης στον υποκινητή των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT έγινε μόνο με τις μελέτες που αναφέρονται στις ίδιες περιοχές των υποκινητών των αντίστοιχων γονιδίων.

Η υψηλότερη συχνότητα μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου MGMT στα δείγματα DNA των ιστών σε σχέση με τα αντίστοιχα DNA από αίμα, στις ομάδες GII, GIII και GIV των ασθενών, μπορεί να εξηγηθεί αν λάβουμε υπόψη την άποψη ότι η μεθυλίωση στις νησίδες CpG είναι το αποτέλεσμα γενετικής προδιάθεσης ή ενός ελαττωματικού πεδίου [189]. Αυτό μπορεί επίσης να εξηγήσει και το γεγονός ότι η μεθυλίωση και στους τρεις υποκινητές των γονιδίων που ελέγχθηκαν για τις ομάδες των ασθενών GII, GIII και GIV είναι ανεξάρτητη της ηλικίας.

Παρατηρήσαμε επίσης διαφορετική συχνότητα εμφάνισης της μεθυλίωσης στους τρεις υποκινητές που μελετήθηκαν μεταξύ των τεσσάρων ομάδων των ασθενών της μελέτης μας (Πίνακας 10). Ο υποκινητής του γονιδίου MGMT εμφάνισε τα μεγαλύτερα ποσοστά μεθυλίωσης σε όλες τις ομάδες (46%, 38%, 76% και 90% για το MGMT σε σύγκριση με 15%, 33%, 67% και 70% για το γονίδιο P16 και 31%, 42%, 48% και 65% για το γονίδιο hMLH1 στις ομάδες GI, GII, GIII και GIV αντίστοιχα), γεγονός που συμφωνεί και με άλλες μελέτες [181, 194, 200].

Παράλληλα, εντυπωσιακή είναι και η στατιστικά σημαντική αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης της μεθυλίωσης που παρατηρείται στην ομάδα GIII, δηλαδή των ασθενών που φέρουν σωληνολαχνωτούς και λαχνωτούς πολύποδες, σε σύγκριση με τους ασθενείς με μικτούς και σωληνοειδείς πολύποδες της ομάδας GII και στους τρεις υποκινητές των γονιδίων της μελέτης μας, με μεγαλύτερα τα ποσοστά εμφάνισης της μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου MGMT (76% έναντι 38%) και P16 (67% έναντι 33%) ενώ για το γονίδιο hMLH1 η διαφορά είναι πολύ μικρή (48% έναντι 42%). Το γεγονός αυτό συμφωνεί με παρόμοιες μελέτες [181, 190, 194, 200, 201] που υποστηρίζουν ότι η μεθυλίωση είναι πιο πιθανή σε μεγάλα αδενώματα ή πολύποδες με σωληνολαχνωτή ή λαχνωτή ιστολογική διαμόρφωση. Παρόμοια ποσοστά αύξησης στη μεθυλίωση του υποκινητή του MGMT έχουν βρεθεί και από τις μελέτες του Petko [194] με 61% έναντι 38%, του Kim [200] με 65% έναντι 30% και του Kakar [181] με 87% έναντι 37%. Σε αντίθεση όμως με την μελέτη του Kakar [181] βρήκαμε αύξηση και στη συχνότητα μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου P16 μεταξύ αυτών των δύο αυτών ομάδων (GII και GIII), γεγονός που συμφωνεί και με τη μελέτη του Petko και των συνεργατών του [194] οι οποίοι αναφέρουν συχνότητα μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου P16 από 10% για τους υπερπλαστικούς και μικτούς πολύποδες έως 30% για τους πολύποδες με υψηλό ογκογενετικό δυναμικό.

Ο Lee και οι συνεργάτες του [202] παρατήρησαν επίσης σταδιακή αύξηση στον αριθμό και τη συχνότητα εμφάνισης των μεθυλιωμένων υποκινητών των γονιδίων κατά την πρόοδο των μεταβολών σε όλα τα στάδια της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο. Παρόλα αυτά υπήρχαν κάποια γονίδια μεταξύ των δώδεκα που εξέτασαν (συμπεριλαμβανομένου και του MGMT) όπου η μεθυλίωση στον υποκινητή τους μεταξύ των ασθενών με πολύποδες υψηλού ογκογενετικού δυναμικού και των ασθενών με καρκίνο όπου δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Πιστεύεται ότι πολλά διαφορετικά μονοπάτια μεθυλίωσης λειτουργούν στην πορεία της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες [181, 194] η μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων MGMT και P16 συμβαίνει σχετικά νωρίτερα, αυξάνεται σημαντικά κατά την πορεία εξέλιξης του καρκίνου και φαίνεται να είναι χαρακτηριστική του μονοπατιού εξέλιξης αδένωμα προς καρκίνωμα, ενώ η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1 φαίνεται να είναι πιο στενά συνυφασμένη με την MSI-εξαρτώμενη καρκινογένεση. Στην παρούσα μελέτη η μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων MGMT και hMLH1 βρέθηκε να

συμβαίνει νωρίτερα στο μονοπάτι εξέλιξης φυσιολογικό επιθήλιο προς πολύποδας (ομάδες GI και GII) όμως κατά την πορεία εξέλιξης του καρκίνου (ομάδες GIII και GIV) αυξάνονται σημαντικά τα ποσοστά εμφάνισης της μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων MGMT και P16. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με την παραπάνω θεώρηση και μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων MGMT και P16 είναι χαρακτηριστική του μονοπατιού πολύποδας προς καρκίνωμα, ενώ η μεθυλίωση στο γονίδιο hMLH1 θα μπορούσε να είναι άμεσα συνυφασμένη με την έναρξη σχηματισμού των πολυπόδων όχι όμως και την πορεία εξέλιξης πολύποδας προς καρκίνωμα.

Πρέπει να σημειωθεί ότι μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί κάποιες μεταλλάξεις στο γονίδιο P16 υπεύθυνες για την εμφάνιση του καρκίνου του παχέος εντέρου, ενώ αντίθετα η μεθυλίωση στο υποκινητή του γονιδίου αυτού έχει ανιχνευθεί στο 40% των καρκίνων του παχέος εντέρου καθώς επίσης και σε πολύποδες [203] και συνήθως συνοδεύεται από μεθυλίωση και σε άλλα γονίδια [190, 194]. Στην παρούσα μελέτη, η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου P16 εμφανίστηκε στο 49% των πολυπόδων και συνήθως συνοδεύεται από μεθυλίωση και σε άλλα γονίδια (Εικόνα 16) γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με την μελέτη του Toyota και της ομάδας του [203], ενώ το ποσοστό φαίνεται να είναι μεγαλύτερο από το 27% που αναφέρει ο Rashid και η ομάδα του [190]. Η παρατήρηση αυτή αποδεικνύει ότι η μεθυλίωση στον υποκινητή των γονιδίων συμβαίνει σε αρχικό στάδιο κατά την πορεία πολύποδας προς καρκίνωμα, δεν επιβεβαιώνει όμως αν η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου P16 είναι ένα πρωταρχικό ή ένα δευτερεύον συμβάν σε σχέση με την γενετική προδιάθεση ή την ύπαρξη μιας περιοχής με καρκινικό δυναμικό [204]. Πράγματι, ο Bai και η ομάδα του [205] βρήκαν ότι η ασυνήθιστη μεθυλίωση στον υποκινητή των γονιδίων είναι εξακριβωμένη στην πορεία πολύποδα προς καρκίνωμα, υποστηρίζοντας ότι αυτά τα γεγονότα είναι επίκτητα κατά την έναρξη της νεοπλασίας στο παχύ έντερο, αλλά δεν έχουν κάποιον λειτουργικό ρόλο στην μετέπειτα εξέλιξή της σε καρκίνο. Αντίθετα, ο Lee και η ομάδα του [202] παρατήρησαν ότι μία ομάδα από γονίδια (συμπεριλαμβανομένου του hMLH1 και P16) ήταν συνήθως συχνότερα μεθυλιωμένα στον καρκίνο του παχέος εντέρου σε σύγκριση με τους πολύποδες, υποστηρίζοντας ότι τουλάχιστον κάποια γονίδια μπορούν να επηρεάσουν τα βήματα εξέλιξης κατά τον σχηματισμό του καρκίνου του παχέος εντέρου, μια άποψη που υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματά μας.

7.4. Μικροδορυφορική αστάθεια και μεθυλίωση.

Από το 1997, ο Ahuja και οι συνεργάτες του [121] έδειξαν μία άμεση συσχέτιση μεταξύ της μικροδορυφορικής αστάθειας και της μεθυλίωσης στις νησίδες CpG του DNA στους υποκινητές των γονιδίων, η οποία αργότερα φάνηκε ότι είναι χαρακτηριστικό των σποραδικών καρκίνων του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI-H αλλά όχι όμως και των καρκίνων που προέρχονται από το σύνδρομο HNPCC [206], αφού στους τελευταίους η πρόωρη εμφάνιση του φαινοτύπου MSI συσχετίζεται με σημειακές μεταλλάξεις στη γαμετική σειρά των γονιδίων του συστήματος MMR [55].

Σε όλους τους πολύποδες του παχέος εντέρου (καθώς επίσης και στους 8/9 καρκίνους) με τον φαινότυπο MSI (MSI-H ή MSI-L) που παρουσιάστηκαν στην παρούσα εργασία, ο φαινότυπος της μικροδορυφορικής αστάθειας συνοδεύεται από μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1 και σε παρόμοια ποσοστά στον υποκινητή του γονιδίου P16. Επιπλέον οι 2 από τους 4 πολύποδες καθώς επίσης και οι 8 από τους 9 καρκίνους με τον φαινότυπο MSI, παρουσιάζουν ταυτόχρονα και μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου MGMT, επισημαίνοντας έτσι το ρόλο της μεθυλίωσης στην έναρξη αλλά και την εξέλιξη αυτού του τύπου καρκίνου. Το γεγονός ότι η μικροδορυφορική αστάθεια ανιχνεύθηκε στους πολύποδες και συνοδεύεται ταυτόχρονα με μεθυλίωση στον υποκινητή κάποιου γονιδίου, υποδεικνύει ότι οι δύο πορείες, μικροδορυφορική αστάθεια και μεθυλίωση είναι αλληλοεξαρτώμενες. Όμως, η πραγματική αιτία που προκαλεί την εμφάνιση της μεθυλίωσης στον υποκινητή των γονιδίων δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Ο Sugimura και η ομάδα του [207] υπέθεσαν ότι η διαταραχή της μεθυλίωσης θα μπορούσε να προέλθει μέσω της διατροφής και του καπνίσματος, μία υπόθεση όμως που πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω.

Όπως έχει αναφερθεί σε κάποιες μελέτες, περίπου το 10 με 15% των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, φέρουν τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας και παράλληλα στο 70 με 80% εξ' αυτών εντοπίζεται επιγενετική αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου hMLH1 λόγω μεθυλίωσης στον υποκινητή του [29, 101, 122]. Ωστόσο, η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου hMLH1 και της μεθυλίωσης στον υποκινητή του δεν είναι απόλυτη, αφού σύμφωνα με τον Kane και τους συνεργάτες του [101] ένα 7% των MSI-H καρκίνων με ελλιπή έκφραση του γονιδίου hMLH1 φαίνεται να μην φέρουν μεθυλίωση στον υποκινητή

του ενώ παράλληλα ένα 42% των καρκίνων που παρουσίασαν έκφραση του γονιδίου hMLH1 εμφάνισαν μεθυλίωση στον υποκινητή του. Παράλληλα έχει αναφερθεί ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό από καρκίνους του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI-L και MSS συνοδεύονται από μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1 [208]. Αντίθετα στη μελέτη μας παρατηρήσαμε ότι εκτός από τους ασθενείς με καρκίνο και τον φαινότυπο MSI-H, επιπλέον 6 στους 7 ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-L έδειξαν ταυτόχρονη μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1. Βέβαια πρέπει να επισημάνουμε ότι ο αριθμός των καρκίνων της παρούσας μελέτης είναι μικρός και δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Σε αντίθεση με τους καρκίνους του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI-H, στους καρκίνους με τον φαινότυπο MSI-L και MSS μόνο το γονίδιο MGMT έχει συνδεθεί με αυτό τον τύπο καρκίνων, το οποίο λόγω μεθυλίωσης στον υποκινητή του υπόκειται σε μεταγραφική αποσιώπηση [58, 209]. Η αδρανοποίηση του γονιδίου MGMT μπορεί να συμβάλει στην υπέρ-ενεργοποίηση του συστήματος MMR εξαιτίας του αυξημένου αριθμού O⁶-μεθυλογουανινών που έχουν προστεθεί στο DNA και τα οποία πρέπει να επιδιορθωθούν στην περίπτωση αυτή από το σύστημα MMR (το ίδιο όμως δεν συμβαίνει και με την απενεργοποίηση του γονιδίου hMLH1 ή του hMSH2), συμβάλλοντας έτσι σε μία πιο ήπια μορφή μικροδορυφορικής αστάθειας όπως συμβαίνει στην περίπτωση του φαινότυπου MSI-L [210]. Ωστόσο απενεργοποίηση μέσω μεταγραφικής αποσιώπησης στο γονίδιο MGMT δεν εμφανίζουν όλοι οι καρκίνοι του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI-L, αφού και άλλα γονίδια που συμβάλουν στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA μπορεί να επηρεάζονται κατά τον ίδιο τρόπο.

Έχει αναφερθεί από τους Haydon και Jass [211] ότι περίπου το 45% των καρκίνων του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο μεθυλίωσης CIMP+, φέρουν τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας και επιπλέον το 100% των CIMP-θετικών καρκίνων του παχέος εντέρου με μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1 δείχνουν και μικροδορυφορική αστάθεια. Η παρούσα εργασία επιβεβαιώνει την πρώτη παραδοχή (από τους 14 καρκίνους του παχέος εντέρου, που εμφάνισαν μεθυλίωση σε δύο ή και παραπάνω γονίδια, οι 9 φέρουν επιπλέον τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας), δεν μπορεί όμως να συμφωνήσει με την δεύτερη παραδοχή αφού στη μελέτη μας έχουμε 3 ασθενείς της ομάδας GIV με μεθυλίωση σε όλα τα γονίδια που όμως δεν εμφανίζουν τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας. Η δεύτερη αυτή παρατήρηση της μελέτης μας σε αντίθεση με την μελέτη

των Haydon και Jass, συμφωνεί με την μελέτη του Arnold και της ομάδας του [125] που αναφέρουν ότι μόνο το 70% των καρκίνων με τον φαινότυπο MSI-H εμφανίζουν ταυτόχρονα τον φαινότυπο της μεθυλίωσης CIMP+.

Όπως αναφέρθηκε, όλοι οι δείκτες Bethesda που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για τον έλεγχο της μικροδορυφορικής αστάθειας έδειξαν αστάθεια σε κάποιους ασθενείς και επομένως ήταν ικανοί να ανιχνεύσουν τους 3 ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-H ενώ για τους ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-L, η αστάθεια ανιχνεύθηκε αποκλειστικά με τους δινουκλεοτιδικούς δείκτες (D2S123, D5S356 και D17S250). Σε μία μεγάλη ομάδα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, ο Arnold και οι συνεργάτες του [125] αναφέρουν ότι η εξειδίκευση για τον έλεγχο της μικροδορυφορικής αστάθειας είναι μεγαλύτερη στους δείκτες BAT26 με ποσοστό 99% και BAT25 με ποσοστό 95%. Ωστόσο όταν, κατά τον έλεγχο του φαινοτύπου της μικροδορυφορικής αστάθειας, σύγκριναν τον φαινότυπο MSI-H σε σχέση με την μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1 ή τον φαινότυπο MSI-H με τον μη-μεθυλιωμένο υποκινητή του γονιδίου hMLH1 στους καρκίνους, παρατήρησαν ότι όλοι οι δείκτες αλλά περισσότερο ο δινουκλεοτιδικός δείκτης D2S123 (με ποσοστό έως 90%) είχαν μεγάλο ποσοστό ανίχνευσης για αυτό το είδος καρκίνων. Υποστηρίζοντας έτσι ότι οι καρκίνοι με τον φαινότυπο MSI-H μπορεί να προέρχονται από διαφορετικά μονοπάτια, ένα από τα οποία μπορεί να οφείλεται στην αποσιώπηση του γονιδίου hMLH1 λόγω μεθυλίωσης στον υποκινητή του και τα υπόλοιπα σε αδιευκρίνιστες μέχρι σήμερα αιτίες. Στην παρούσα μελέτη, όλοι οι ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-H καθώς και 9 από τους 10 ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-L, εμφάνισαν επιπλέον μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1.

Θα πρέπει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες, στους σποραδικούς καρκίνους του παχέος εντέρου τουλάχιστον το 90% των περιπτώσεων με τον φαινότυπο MSI οφείλεται στη υπερμεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1 [59, 212, 213]. Αντίθετα στους ασθενείς με το σύνδρομο HNPCC όπως έχει προταθεί από τον Kaz και τους συνεργάτες του [214] η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1 δρα ως ένας μηχανισμός δεύτερου χτυπήματος “second hit” μετά την απενεργοποίηση του συστήματος MMR λόγω σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδιά του, με αποτέλεσμα ελαττωματικό προϊόν ή μειωμένη έκφραση και από τα δύο αλληλόμορφα του DNA τους.

Οι σποραδικοί καρκίνοι του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI, εμφανίζουν μία τάση εμφάνισης στο δεξί τμήμα του παχέος εντέρου ενώ αντίθετα οι σποραδικοί καρκίνοι με χρωμοσωμική αστάθεια δείχνουν μία προτίμηση προς το αριστερό τμήμα του παχέος εντέρου. Δεδομένου την άποψη του Toyota και της ομάδας του [120] ότι οι σποραδικοί καρκίνοι με τον φαινότυπο MSI είναι άμεσα συνυφασμένοι με την μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου hMLH1 και επιπλέον είναι επιρρεπείς στη μεθυλίωση των νησίδων CpG στο DNA των υποκινητών και άλλων γονιδίων, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η μεθυλίωση στις νησίδες CpG είναι πιο συχνή στους καρκίνους του δεξιού τμήματος του παχέος εντέρου παρά στο αριστερό τμήμα του. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες [215, 216] οι οποίες εντοπίζουν μία αυξημένη τάση υπερμεθυλίωσης των νησίδων CpG στο δεξί τμήμα του παχέος εντέρου. Παρόμοια μελέτη για πολύποδες δεν έχει αναφερθεί. Στην παρούσα εργασία έχουμε μόνο πέντε δείγματα (4 πολύποδες και 1 καρκίνο) που εντοπίζονται στο δεξί τμήμα του παχέος εντέρου. Παρά το μικρό αριθμό των δειγμάτων, τόσο το δείγμα με καρκίνο, όσο και ένας από τους τέσσερις πολύποδες, φέρουν τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας και εμφανίζουν ταυτόχρονα μεθυλίωση στον υποκινητή και των τριών γονιδίων που εξετάσαμε, συμφωνώντας έτσι απόλυτα με τις παραπάνω μελέτες. Αντίθετα οι υπόλοιπα τρεις πολύποδες δεν εμφανίζουν τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας και η μεθυλίωση εντοπίζεται στον υποκινητή ενός ή και κανενός γονιδίου.

7.5. Γονίδια στόχοι

Υποστηρίζεται στη βιβλιογραφία ότι οι καρκίνοι με θετικό φαινότυπο μεθυλίωσης (CIMP θετικό) χαρακτηρίζονται τόσο από υψηλό ποσοστό μεθυλίωσης στις νησίδες CpG, όσο και υψηλή συχνότητα εμφάνισης και άλλων φαινοτυπικών ή γενετικών αλλαγών όπως η μικροδορυφορική αστάθεια καθώς και μεταλλάξεις στο γονίδιο TGFβRII [195]. Είναι επίσης γνωστό ότι και άλλα γονίδια όπως ο IGFIIR, ο BAX καθώς και τα γονίδια του συστήματος MMR, hMSH3 και hMSH6, που περιέχουν μικροδορυφορικές αλληλουχίες σε κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδιώματός τους, υπόκεινται σε μεταλλάξεις τόσο σε σποραδικούς καρκίνους του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI-H, του ενδομητρίου και του στομάχου όσο και σε καρκίνους οφειλόμενους στο σύνδρομο HNPCC [44, 45, 47, 131, 138].

Σε αυτά περιλαμβάνονται και άλλα γονίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής, της πρωτεϊνικής σταθερότητας και στην ανοσο-επιτήρηση.

Ωστόσο, κάποιες μη-κωδικοποιούσες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που συμβάλλουν στην γονιδιακή έκφραση, όπως η περιοχή πολυT(11) του γονιδίου hMRE11, έχουν επίσης προταθεί ως γονίδια στόχοι του συστήματος MMR [145]. Για το λόγο αυτό στην παρούσα εργασία εκτός από τις αντίστοιχες κωδικοποιούσες μονονουκλεοτιδικές περιοχές των γονιδίων TGFβRII, IGF1R, BAX, hMSH3 και hMSH6 που μελετήθηκαν και από άλλους ερευνητές, ελέγχθηκαν και δύο μη-κωδικοποιούσες μονο- ή δι-νουκλεοτιδικές περιοχές που εντοπίζονται στο ιντρόνιο 1 των γονιδίων EGFR και c-MYB και οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση της μεταγραφής τους. Σύμφωνα με μία μελέτη, στους καρκίνους με τον φαινότυπο MSI-H, οι μικρές μη-κωδικοποιούσες μονονουκλεοτιδικές περιοχές εμφανίζουν σπάνια αλλαγές (σε ποσοστό που κυμαίνεται από 0 έως 44%) σε αντίθεση με τις μικρές κωδικοποιούσες μονονουκλεοτιδικές περιοχές που υπόκεινται σε αλλαγές με ασυνήθιστα ευμετάβλητες συχνότητες (0 έως 92%) [217].

Στην παρούσα εργασία και οι τρεις ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-H, έδειξαν επίσης αλλαγές τόσο στον αριθμό των κωδικοποιούντων μονονουκλεοτιδικών περιοχών στα γονίδια TGFβRII, IGF1R, BAX και hMSH3, όσο και των μη-κωδικοποιούντων μονο- ή πολυ-νουκλεοτιδικών περιοχών των γονιδίων EGFR και c-MYB. Μάλιστα τα ποσοστά εμφάνισης μεταλλάξεων στους ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-H στα παραπάνω γονίδια ανέρχονται για τα γονίδια TGFβRII και c-MYB στο 100% (3/3), για τα hMSH3 και EGFR στο 67% (2/3) και για τα BAX και IGF1R στο 33% (1/3), ενώ κανένα δείγμα δεν έδειξε αλλαγή στον αριθμό των μονονουκλεοτιδικών επαναλήψεων πολυC(8) για το γονίδιο hMSH6. Είναι επίσης σημαντικό ότι 2 από τους 10 ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-L (20%) εμφάνισαν αλλαγές στην περιοχή πολυA(10) του TGFβRII. Όλοι οι ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-H καθώς και ο ένας από τους δύο ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-L που εμφάνισαν αστάθεια στα γονίδια στόχους που μελετήθηκαν, παρουσίασαν επίσης μεθυλίωση στους υποκινητές όλων των γονιδίων που ελέγχθηκαν (φαινότυπος CIMP) ενώ ο δεύτερος από τους ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-L και αστάθεια στο γονίδιο TGFβRII εμφάνισε μεθυλίωση μόνο στον υποκινητή του γονιδίου MGMT. Τα ποσοστά εμφάνισης αστάθειας στα γονίδια στόχους ποικίλουν σε κάθε μελέτη και για το λόγο αυτό δεν είμαστε σε θέση να συγκρίνουμε τα δικά μας ποσοστά εμφάνισης της αστάθειας στα γονίδια στόχους με αυτά των άλλων εργασιών και επιπλέον ο

αριθμός των προς εξέταση υποψηφίων γονιδίων στόχων ποικίλει. Σε μία παλαιότερη μελέτη με 13 καρκίνους και τον φαινότυπο MSI-H [218] ο έλεγχος ως προς την αστάθεια των γονιδίων στόχων που μελετήθηκαν έδειξαν τα ακόλουθα ποσοστά εμφάνισης της αστάθειας: TGFβRII (12/13 ή 92%), BAX (5/13, 38%), IGF1R (2/12, 17%), hMSH3 (4/13, 31%), hMSH6 (3/13, 23%). Ενώ, σε μία άλλη μελέτη [177] όπου ο φαινότυπος MSI-H εντοπίστηκε σε δώδεκα περιπτώσεις πολύποδων του παχέος εντέρου, μεταλλάξεις εμφάνισαν οι 2/12 (17%) ασθενείς στο γονίδιο TGFβRII, ο 1/12 (8%) στο γονίδιο BAX, ο 1/12 (8%) στο γονίδιο hMSH6 και οι 2/12 (17%) στο γονίδιο MBD4. Κοινό πάντως συμπέρασμα τόσο της δική μας μελέτης όσο και των άλλων εργασιών είναι ότι τα ποσοστά εμφάνισης της αστάθειας στο γονίδιο TGFβRII στους καρκίνους αλλά και στους πολύποδες του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI-H είναι τα υψηλότερα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα γονίδια.

Όπως έχει αναφερθεί σε παλαιότερη μελέτη [141] καμία μετάλλαξη δεν έχει εμφανιστεί στο γονίδιο TGFβRII σε πρώιμους πολύποδες με τον φαινότυπο MSI, περιλαμβανομένων και των απλών σωληνοειδών και λαχνωτών πολύποδων, ενώ η εμφάνιση των μεταλλάξεων στο γονίδιο αυτό εντοπίζεται αρχικά σε περιοχές υψηλού βαθμού δυσπλασίας. Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύσαμε μετάλλαξη στο γονίδιο TGFβRII σε τρεις ασθενείς που έφεραν αδενοκαρκινώματα και τον φαινότυπο MSI (2 MSI-H και 1 MSI-L) καθώς και δύο ασθενείς με σωληνολαχνωτούς πολύποδες και τον φαινότυπο MSI (1 MSI-H και 1 MSI-L), χωρίς όμως ένδειξη καρκινώματος. Οι δύο τελευταίες περιπτώσεις αποδεικνύουν ότι η μετάλλαξη στο γονίδιο TGFβRII είναι ένα πρώιμο στάδιο στους πολύποδες με τον φαινότυπο MSI και πιθανώς να συνδέεται με την μετέπειτα εξέλιξή τους σε καρκίνο.

Όσον αφορά το γονίδιο IGF1R, η Souza και η ομάδα της [131] ανίχνευσαν σωματικές μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου στο γονίδιο IGF1R σε ποσοστό 9% των σποραδικών καρκίνων του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI, που συμφωνεί και με την ερευνητική ομάδα του Vilkkii [219] όπου τα ποσοστά εμφάνισης μεταλλάξεων στο ίδιο γονίδιο ανέρχονται στο 9.8% για τον ίδιο τύπο καρκίνου. Επιπλέον ο Ouyang και οι συνεργάτες του [220] δεν εντόπισαν καμία μετάλλαξη στο γονίδιο IGF1R σε σποραδικούς καρκίνους του παχέος εντέρου που δεν έφεραν τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας. Στην παρούσα εργασία μετάλλαξη στο γονίδιο IGF1R εντοπίσαμε μόνο σε μία περίπτωση καρκίνου με τον φαινότυπο MSI-H, στην οποία παρατηρείται ταυτόχρονα μετάλλαξη και στα γονίδια TGFβRII, hMSH3, EGFR και c-MYB, γεγονός που μας οδηγεί στην υπόθεση ότι αυτού του

είδους η μετάλλαξη είναι μάλλον ένα δευτερεύον βήμα στην εξέλιξη της καρκινογένεσης αυτού του τύπου.

Όσων αφορά το προαποπτωτικό γονίδιο BAX, η Miquel και οι συνεργάτες της [221] εντόπισαν μετάλλαξη έλλειψης ενός νουκλεοτιδίου στην περιοχή πολυG(8) του γονιδίου BAX στους 20 από τους 41 (49%) καρκίνους με τον φαινότυπο MSI και μάλιστα ήταν χαρακτηριστική στα εγγύς, μη-διαφοροποιημένα, ή βλεννώδη αδενοκαρκινώματα. Η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα υποστηρίζει επίσης ότι πιθανώς η διαφοροποιημένη πρωτεΐνη που προκύπτει λόγω μετάλλαξης, να οδηγεί σε υπολειτουργία της απόπτωσης παρέχοντας έτσι ένα σοβαρό πλεονέκτημα κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης, θεωρώντας το γονίδιο BAX ένα σημαντικό γονίδιο στόχο στην καρκινογένεση που συνδέεται με την ελαττωματική λειτουργία του συστήματος MMR. Βέβαια, ο Sakakibara και οι συνεργάτες του [222] ανέφεραν ότι μία μετάλλαξη στην κωδικοποιούσα περιοχή πολυG(8) του γονιδίου BAX δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην πορεία της καρκινογένεσης στους Ιάπωνες ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου λόγω του συνδρόμου HNPCC και επιπλέον τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας. Στην παρούσα εργασία μετάλλαξη στην περιοχή πολυG(8) του γονιδίου BAX εντοπίσαμε σε έναν μόνο ασθενή (1/3 ή 33%) με καρκίνο του παχέος εντέρου και τον φαινότυπο MSI-H, ο οποίος έφερε επιπλέον μεταλλάξεις και στα γονίδια TGFβRII, hMSH3 και c-MYB.

Τα γονίδια hMSH3 και hMSH6 ανήκουν στα γονίδια του συστήματος MMR και η εμφάνιση μεταλλάξεων στα γονίδια αυτά ενδεχομένως να επιταχύνει την καρκινογένεση λόγω αυξημένου ποσοστού μεταλλάξεων στο σύνολο του ανθρώπινου γονιδιώματος. Σε μία μελέτη της Planck και της ομάδας της [223] οι μεταλλάξεις στα γονίδια hMSH3 και hMSH6 εμφανίζονται στους καρκίνους του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI με ποσοστό 21% και 8% αντίστοιχα. Η ίδια ομάδα υποστηρίζει ότι όταν οι καρκίνοι προέρχονται από μία μετάλλαξη στη γαμετική σειρά ενός σημαντικού συστατικού του συστήματος MMR, όπως το γονίδιο hMLH1 ή hMSH2, τότε η εμφάνιση επιπλέον μεταλλάξεων στα γονίδια hMSH3 και hMSH6 θα παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου αυτού. Στην παρούσα εργασία μετάλλαξη στην κωδικοποιούσα περιοχή πολυA(8) του γονιδίου hMSH3 ανιχνεύτηκε στους 2 από τους 9 καρκίνους (22%) με τον φαινότυπο MSI (συμπεριλαμβανομένων και των καρκίνων με τον φαινότυπο MSI-L), ποσοστό που συμφωνεί με την παραπάνω μελέτη, ενώ στο γονίδιο hMSH6 δεν ανιχνεύτηκε μετάλλαξη σε κανένα δείγμα. Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι στο ένα από τα δύο δείγματα με μετάλλαξη στο γονίδιο

hMSH3 ανιχνεύθηκε επιπλέον και μία παθογόνα μετάλλαξη στη γαμετική σειρά του γονιδίου hMSH2 γεγονός που, σύμφωνα με τα υποστηριζόμενα του Planck και των συνεργατών του, μπορεί να αποτελέσει σημαντική ένδειξη για την μετέπειτα πορεία εξέλιξης του καρκίνου αυτού.

Ο Thompson και η ομάδα του [149], καταγράφουν αστάθεια στην πολυT(19) περιοχή του πρώτου ιντρονίου του γονιδίου c-MYB στο 60% των καρκίνων του παχέος εντέρου που φέρουν τον φαινότυπο MSI-H. Αντίθετα, η γενωμική αστάθεια στην γαμετική σειρά του DNA ήταν μη σημαντική, υποστηρίζοντας έτσι ότι η επίδραση του φαινοτύπου MSI-H περιορίζεται μόνο στους όγκους με καρκίνο του παχέος εντέρου. Επιπλέον παρατήρησαν ότι μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή του γονιδίου c-MYB εμφανίστηκαν και σε καρκίνους του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSS, ενισχύοντας την άποψη ότι υπάρχει πίεση επιλογής για την μετάλλαξη αυτή στους καρκίνους του παχέος εντέρου.

Στην παρούσα εργασία το γονίδιο c-MYB εμφανίζει τη δεύτερη μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεων, μετά το γονίδιο TGFβRII αφού εντοπίστηκε αστάθεια του γονιδίου αυτού και στους τρεις ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-H, ο ένας με σωληνολαχνωτό πολύποδα και οι άλλοι δύο με καρκίνο. Γίνεται λοιπόν εμφανές ότι το γονίδιο c-MYB μπορεί να αποτελέσει έναν καινούργιο γονίδιο στόχο για την καρκινογένεση λόγω κακής λειτουργίας του συστήματος MMR.

Είναι επίσης ενδιαφέρον οι πολυμορφισμοί που παρατηρήσαμε στον αριθμό των επαναλήψεων της πολυT περιοχής του γονιδίου c-MYB τόσο στους ασθενείς με πολύποδες και καρκίνο όσο και στην ομάδα των υγείων ατόμων. Η πλειοψηφία των ασθενών φέρει 19-21 πολυT (40 από τους 78 ασθενείς, 51.3%) και 17-21 πολυT (19/78 ή 24.6%) τόσο στον παθολογικό ιστό όσο και στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό ενώ σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών εντοπίζονται διαφορετικοί συνδυασμοί στον αριθμό των θυμιδινών και στα δύο αλληλόμορφα του DNA τους. Αν και το γεγονός αυτό θα μπορούσε να θεωρηθεί απλά ένα φαινοτυπικό χαρακτηριστικό των ατόμων, ο συνδυασμός του αριθμού των πολυT επαναλήψεων του γονιδίου c-MYB με την μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT (Εικόνα 28), φαίνεται να αλλάζει την άποψη αυτή. Ενώ η μεθυλίωση στον υποκινητή του κάθε γονιδίου ξεχωριστά εμφανίζεται στην πλειοψηφία των δειγμάτων με 19-21 πολυT στο γονίδιο c-MYB και με μικρότερα ποσοστά στην περίπτωση των δειγμάτων με 17-21 πολυT, το αυξημένο ποσοστό που παρατηρείται κατά την περίπτωση συν-μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT στα δείγματα

που φέρουν τον συνδυασμό 17-21πολυT (39%) σε σχέση με αυτό που προκύπτει στην περίπτωση των 19-21πολυT (28%) μας οδηγεί στην υπόθεση ότι η μείωση από 19 σε 17 θυμίνες ή και λιγότερες μπορεί είναι ένα πρώιμο στάδιο στην πορεία εξέλιξης ενός φυσιολογικού επιθηλίου σε πολύποδα και στη συνέχεια σε συνδυασμό και με άλλους παράγοντες σε καρκίνο. Μία άποψη που πρέπει να μελετηθεί εκτενέστερα.

Όσον αφορά το γονίδιο EGFR, αναφέρθηκε προηγουμένως ότι περιέχει στο ιντρόνιο 1 μια πολυμορφική δινουκλεοτιδική περιοχή (CA-SSR I) με επαναλήψεις που κυμαίνονται από 14-21 CA [157]. Η περιοχή αυτή έχει δειχθεί ότι ρυθμίζει άμεσα τη μεταγραφική ικανότητα και την ενεργότητα του γονιδίου αφού αύξηση στον αριθμό των επαναλήψεων CA έχει ως συνέπεια την μείωση τόσο της μεταγραφικής ικανότητας όσο και της ενεργότητάς του [158, 159]. Επιπλέον ο Liu και η ομάδα του [157] μελέτησαν τη συχνότητα των επαναλήψεων CA σε διαφορετικές φυλές, συμπεριλαμβάνοντας λευκούς, μαύρους και Ασιάτες (της ανατολής και της δύσης). Παρατήρησαν ότι οι επαναλήψεις των 20 CA στους λευκούς (21%) ήταν πιο συχνές απ' ότι στους μαύρους (14%), ενώ η συχνότητα των 16 CA επαναλήψεων στους λευκούς (43%) και στους μαύρους (42%) ήταν μεγαλύτερη από αυτή στους Ασιάτες (17%). Γίνεται λοιπόν εμφανές ότι ο αριθμός των επαναλήψεων CA του γονιδίου EGFR αποτελεί και ένα φαινοτυπικό χαρακτηριστικό των διαφορετικών εθνοτήτων με αποτέλεσμα το ίδιο πιθανώς να συμβαίνει και για την έκφραση του γονιδίου. Σύμφωνα με την ίδια έρευνα [157], οι πιο συχνές αλληλουχίες στις επαναλήψεις CA που έχουν προσδιοριστεί στους φυσιολογικούς ιστούς αποτελούνται από 16, 18 και 20 επαναλήψεις CA, ενώ ο πιο κοινός γενότυπος ήταν η ομοζυγωτία των 16 επαναλήψεων CA. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι ενώ διαφορές στο μήκος των αλληλουχιών παρατηρούνται και στους καρκίνους με μικροδορυφορική σταθερότητα, αστάθεια στην αλληλουχία της περιοχής CA-SSR I μεταξύ καρκινικού και φυσιολογικού ιστού έχει παρατηρηθεί μέχρι σήμερα μόνο στους καρκίνους με τον φαινότυπο MSI-H [224]. Σύμφωνα με την Buisine και τους συνεργάτες της, αστάθεια στην περιοχή CA-SSR I του EGFR, παρατηρήθηκε στους 36 από τους 42 (86%) καρκίνους του παχέος εντέρου με τον φαινότυπο MSI-H, ενώ κανένας από τους 44 καρκίνους με τον φαινότυπο MSS που ελέγχθηκαν δεν έδειξε αστάθεια. Επιπλέον παρατήρησαν ότι αστάθεια εμφάνισαν κυρίως τα δείγματα που στον φυσιολογικό ιστό ο αριθμός των CA επαναλήψεων ήταν μικρότερος από 20 επαναλήψεις CA (17/19, 89%), υποστηρίζοντας ότι οι ιστοί που φέρουν στην περιοχή CA-SSR I του EGFR μεγαλύτερες από 20 CA επαναλήψεις είναι λιγότερο επιρρεπείς στην αστάθεια

[224]. Επιπλέον η ίδια ερευνητική ομάδα κάνοντας ανοσοϊστοχημική ανάλυση με τη χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος αντι-EGFR, για να ελέγξουν την έκφραση του γονιδίου EGFR, δεν βρήκαν καμία συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου αυτού με το μήκος της CA-SSR I περιοχής, καθώς επίσης και με τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας. Συμπερασματικά αν και η έκφραση του EGFR δεν είναι άμεσα συνυφασμένη με την περιοχή CA-SSR I, το μήκος της αλληλουχίας αυτής συνδέεται άμεσα με την πιθανότητα εμφάνισης αλλά και της εξέλιξης της νόσου.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας, συμφωνούν με τη μελέτη της Buisine. Ο πιο συχνός αριθμός επαναλήψεων στην αλληλουχία των CA είναι οι 16 και 17 επαναλήψεις, ενώ σε υψηλή συχνότητα εμφανίζονται και οι αλληλουχίες των 18, 19 και 21 επαναλήψεων και στις τέσσερις ομάδες των ατόμων που ελέγχθηκαν. Αστάθεια του γονιδίου EGFR παρατηρήθηκε στα 2/3 (67%) των δειγμάτων μας με τον φαινότυπο MSI-H, με το ένα εκ των δύο να αποτελεί σωληνολαχνωτό αδένωμα και όχι καρκίνο, όπως αναφέρεται σε όλες τις μέχρι σήμερα μελέτες, ενώ αστάθεια δεν εντοπίστηκε σε κανέναν καρκίνο με τον φαινότυπο MSI-L ή MSS. Η αστάθεια εμφανίστηκε σε δύο δείγματα με τον φαινότυπο MSI-H που ο φυσιολογικός ιστός αποτελούνταν από 16-17 CA επαναλήψεις, ενώ το τρίτο δείγμα με τον ίδιο φαινότυπο που δεν παρουσίασε αστάθεια στο γονίδιο EGFR φέρει στο ένα αλληλόμορφο >20 CA επαναλήψεις, γεγονός που πιθανώς να έπαιξε προστατευτικό ρόλο έναντι της αστάθειας σύμφωνα και με τα αναφερόμενα της μελέτης της Buisine. Τέλος συγκρίνοντας τα αποτελέσματά μας με την μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT, παρατηρούμε ότι συν-μεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων αυτών έχουμε στις αλληλουχίες με 16-19 CA (33%), 16-21 CA (28%), 16-17 CA (22%), 16-18 CA (11%) και 17-19 CA (6%), γεγονός που αποδεικνύει ότι οι αλληλουχίες που έχουν το ένα ή και τα δύο αλληλόμορφα της περιοχής CA-SSR I με αριθμό επαναλήψεων μικρότερο των 20 CA γίνονται πιο επιρρεπείς σε κάθε είδους μεταβολή. Τα μέχρι σήμερα δεδομένα σε συνδυασμό και με τα δικά μας αποτελέσματα μας επιτρέπουν να θεωρήσουμε το γονίδιο EGFR ως ένα νέο “γονίδιο στόχο” της καρκινογένεσης οφειλόμενη στο ελαττωματικό σύστημα MMR.

7.6. Γενετικός έλεγχος των γονιδίων hMLH1 και hMSH2.

Το σύνδρομο του κληρονομικού μη-πολυποδιακού καρκίνου του παχέος εντέρου (HNPCC) έχει συνδεθεί άμεσα με την εμφάνιση μεταλλάξεων στη γαμετική σειρά των γονιδίων hMLH1 και hMSH2 και μάλιστα σε ποσοστό 85-90% [27]. Αντίθετα, στους σποραδικούς καρκίνους με μικροδορυφορική αστάθεια το 90% των περιπτώσεων οφείλεται κυρίως στην αδρανοποίηση του γονιδίου hMLH1 λόγω μεθυλίωσης στον υποκινητή του [101], ενώ η εμφάνιση μεταλλάξεων στα γονίδια hMLH1 και hMSH2, αν και σε πολύ μικρό ποσοστό σε σχέση με το σύνδρομο HNPCC, είναι πιο συχνή στο γονίδιο hMLH1 σε σχέση με το γονίδιο hMSH2 [102].

Σχεδόν 200 διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου hMLH1 έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με το σύνδρομο HNPCC και αντιπροσωπεύουν το 55% του συνόλου των μεταλλάξεων που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα. Όλες αυτές οι μεταλλάξεις καταγράφονται στη βάση δεδομένων (<http://www.nfdht.nl/database/mdbchoice.htm>) από την διεθνή ομάδα συνεργασίας για το σύνδρομο HNPCC. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα κατακερματισμένα γονιδιακά προϊόντα είτε λόγω μεταλλάξεων μετατόπισης πλαισίου ή μεταλλάξεων σε θέσεις ματίσματος του mRNA που οδηγούν στη διαγραφή εξονίων και τα οποία εμφανίζονται κατ' ασυνήθιστο τρόπο σε υψηλή συχνότητα.

Από την άλλη πλευρά, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο hMSH2 αντιπροσωπεύουν περίπου το 40% των μεταλλάξεων που έχουν ανιχνευθεί στο σύνδρομο HNPCC. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις είναι μοναδικές, ενώ λίγες έχουν αναφερθεί και σε ασθενείς διαφορετικών εθνικοτήτων. Μεταξύ των 154 διαφορετικών μεταλλάξεων του γονιδίου hMSH2 που έχουν αναφερθεί, περίπου το 80% οδηγούν στην πρόωρη λήξη του προϊόντος του γονιδίου hMSH2 και οι οποίες καταγράφονται επίσης στην βάση δεδομένων (<http://www.nfdht.nl/database/mdbchoice.htm>) της διεθνούς ομάδας συνεργασίας για το σύνδρομο HNPCC.

Στον Ελλαδικό χώρο η μελέτη της Απέσσου και των συνεργατών της [97] αναφέρει ότι στις οικογένειες με το σύνδρομο HNPCC, η εμφάνιση μεταλλάξεων στο γονίδιο hMSH2 είναι πιο συχνή (77,7%) σε σχέση με το γονίδιο hMLH1, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με παρόμοιες μελέτες άλλων ερευνητών [98]. Επιπλέον, σε κάθε περιστατικό παρατηρήθηκε μόνο μία μετάλλαξη σε γονίδιο του συστήματος MMR, σε αντίθεση με τον φιλανδικό πληθυσμό, όπου συνήθως εμφανίζονται δύο μεταλλάξεις σε κάθε ασθενή και μάλιστα σε ποσοστό $\geq 50\%$ [99].

Στην παρούσα εργασία έγινε γενετικός έλεγχος των γονιδίων hMLH1 και hMSH2 σε τρεις ασθενείς (P11, P28, P74) με τον φαινότυπο MSI-H. Πρέπει να τονιστεί ότι ο ασθενής P11, σύμφωνα και με το κλινικό του ιστορικό, ανήκει στο σύνδρομο HNPCC και έχει διαγνωστεί με μάζα ορθού, ενώ ο ασθενής P28 που φέρει σωληνολαχνωτούς πολύποδες καθώς και ο P74 με αδενοκαρκίνωμα ανιόντος δεν έχουν οικογενειακό ιστορικό για καρκίνο και δεν είμαστε σε θέση να τους κατατάξουμε στο σύνδρομο HNPCC. Επίσης πρέπει να επισημάνουμε ότι στον ασθενή P74 δεν υπήρχε η δυνατότητα ελέγχου του γονιδίου hMSH2.

Και οι τρεις ασθενείς, ήταν αρνητικοί στον έλεγχο για μεταλλάξεις στο γονίδιο hMLH1, ενώ μόνο ο ασθενής P74 εμφάνισε δύο γενετικούς πολυμορφισμούς 307-29C>A και 1668-19A>G στις περιοχές των ιντρονίων 3 και 14 αντίστοιχα του γονιδίου hMLH1. Ο πρώτος πολυμορφισμός (307-29C>A) αναφέρεται για πρώτη φορά στον ελληνικό πληθυσμό ενώ λίγες είναι και οι αναφορές σε διεθνές επίπεδο [171-173] ενώ για τον δεύτερο πολυμορφισμό (1668-19A>G) υπάρχουν τόσο μία ελληνική αναφορά [97] όσο και 145 διεθνείς αναφορές στην βάση δεδομένων (<http://www.nfdht.nl/database/mdbchoice.htm>) της διεθνούς ομάδας συνεργασίας για το σύνδρομο HNPCC, χωρίς όμως ενδείξεις για το αποτέλεσμα της παρουσίας τους. Επιπλέον η ύπαρξη δύο ταυτόχρονων πολυμορφισμών στο ίδιο άτομο χρήζει επιπλέον παρακολούθηση τόσο του ίδιου όσο και των υπολοίπων μελών της οικογένειάς του.

Αντίθετα, στο γονίδιο hMSH2 των ασθενών P11 και P28, εντοπίστηκαν δύο σημαντικές γενετικές μεταλλάξεις. Η παθογόνος μετάλλαξη 472C>T, που ανιχνεύθηκε στον ασθενή P11, έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος της Γλυκίνης (Q) στο κωδικόνιο 158 του γονιδίου με άλλο αμινοξύ, (Q158X), οδηγώντας σε κωδικόνιο τερματισμού, ενώ η μετάλλαξη που ανιχνεύθηκε στον ασθενή P28, 592G>A, έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση του αμινοξέος Γλουταμινικό οξύ (E) στο κωδικόνιο 198 σε Λυσίνη (K) (E198K). Επιπλέον και στους δύο αυτούς ασθενείς εντοπίστηκε μία κοινή αντικατάσταση η 1975-6T>C που θεωρείται πολυμορφισμός.

Η παθογόνος μετάλλαξη 472C>T στο γονίδιο hMSH2, έχει ήδη αναφερθεί στον ελληνικό πληθυσμό [97] και αφορούσε μία μεγάλη οικογένεια με πολλά κρούσματα καρκίνου του παχέος εντέρου. Αντίθετα η μετάλλαξη 592G>A στο γονίδιο hMSH2 που εντοπίστηκε από τον έναν εκ των δύο ασθενών, όπως επίσης και ο πολυμορφισμός 1975-6T>C που εμφανίστηκε και στους δύο ασθενείς με τις

αντίστοιχες μεταλλάξεις για το ίδιο γονίδιο, αναφέρονται για πρώτη φορά στη μελέτη μας, καθώς δεν έχουν αναφερθεί προηγουμένως τόσο στον ελληνικό πληθυσμό όσο και διεθνώς και χρήζουν περαιτέρω έλεγχο.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, επειδή η μετάλλαξη 592G>A στο γονίδιο hMSH2 εμφανίστηκε σε άτομο με σωληνολαχνωτούς πολύποδες, προερχόμενους από σωληνοειδείς πολύποδες, χωρίς μέχρι σήμερα ενδείξεις για καρκίνο και επιπλέον χωρίς οικογενειακό ιστορικό για τη νόσο αυτή, βοήθησε στη συγκεκριμένη περίπτωση του ασθενούς την έγκαιρη διάγνωση της νόσου χρήζοντας απαραίτητη την τακτική του παρακολούθησης. Παράλληλα η διερεύνηση των μελών της οικογένειας και των δύο ασθενών της μελέτης μας, για την ύπαρξη των συγκεκριμένων παθογόνων μεταλλάξεων στη γαμετική σειρά του γονιδίου hMSH2, θα επιτρέψει με την κατάλληλη κλινική και ενδοσκοπική παρακολούθηση την αποτροπή εμφάνισης και ανάπτυξης καρκίνων του παχέος εντέρου στα άτομα που πάσχουν του συνδρόμου HNPCC.

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήσαμε αντιδράσεις PCR υψηλής ευαισθησίας για το έλεγχο της μικροδορυφορικής αστάθειας με τη χρήση των 5 δεικτών Bethesda (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 και D17S250) καθώς και της μεθυλίωσης των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT, τριών γονιδίων των οποίων οι υποκινητές βρέθηκαν να είναι υπερμεθυλιωμένοι σε καρκινικά και προκαρκινικά μορφώματα του παχέος εντέρου και διερευνήσαμε τη συχνότητα εμφάνισής τους σε σχέση με την πορεία πολύποδας - πολύποδας υψηλής ογκογενετικής δράσης – καρκίνωμα, σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε κολονοσκόπηση. Διερευνήθηκε επίσης ο φαινότυπος της μικροδορυφορικής αστάθειας σε σχέση με την μεθυλίωση των υποκινητών των παραπάνω γονιδίων και περαιτέρω η συσχέτιση του φαινοτύπου MSI και του ελαττωματικού συστήματος MMR που αυτή υποκρύπτει, με μεταλλάξεις σε μονο-νουκλεοτιδικές επαναλήψεις κωδικοποιουσών περιοχών (MSH3, MSH6, BAX, IGF1R και TGFBR2) ή μονο- και δι- νουκλεοτιδικές επαναλήψεις ρυθμιστικών περιοχών γονιδίων στόχων (όπως τα γονίδια EGFR και c-MYC που αναφέρονται για πρώτη φορά) με σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση, σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί ο ρόλος τους στην εξέλιξη του πολύποδα σε καρκίνο.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δείχνουν ότι ο φαινότυπος της μικροδορυφορικής αστάθειας εμφανίζεται σε ποσοστό 17% του συνολικού αριθμού των ασθενών με πολύποδες και καρκίνο που μελετήθηκαν και μάλιστα μόνο στις ομάδες με σωληνολαχνωτούς ή λαχνωτούς πολύποδες και καρκίνο, ενώ κανένα υγιές άτομο της παρούσας μελέτης δεν εμφάνισε τον φαινότυπο αυτό, γεγονός που επισημαίνει την σημαντικότητά του ως δείκτη στην πορεία εξέλιξης πολύποδας προς καρκίνο του παχέος εντέρου.

Από την άλλη, η μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT εμφανίζει μία συνεχώς αυξανόμενη τάση ως προς την πορείας εξέλιξης του φυσιολογικού επιθηλίου του παχέος εντέρου σε πολύποδα και τέλος σε καρκίνο, καθώς επίσης και μία στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων P16 και MGMT στην ομάδα των ασθενών που φέρουν σωληνολαχνωτούς και λαχνωτούς πολύποδες σε σύγκριση με τους ασθενείς με πολύποδες χαμηλού ογκογενετικού δυναμικού. Τα όσα προαναφέρθηκαν καθώς και η εμφάνιση της μεθυλίωσης και σε υγιή άτομα κάνει

εμφανές το γεγονός ότι η μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων αποτελεί ένα από τα πρωταρχικά βήμα στην πορεία εξέλιξης του φυσιολογικού επιθηλίου του παχέος εντέρου σε πολύποδα, ενώ η επιπλέον αύξηση της μεθυλίωσης σε συγκεκριμένα γονίδια μπορούν να καθορίσουν και την μετέπειτα εξέλιξη ή μή του πολύποδα σε καρκίνο.

Συγκρίνοντας τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας με την μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT δείξαμε ότι τα δύο αυτά συμβάντα είναι άμεσα συνυφασμένα μεταξύ τους αφού το 100% των ασθενών με τον φαινότυπο MSI εμφανίζει μεθυλίωση σε ένα τουλάχιστον από τα τρία αυτά γονίδια και επιπλέον 9 από τους 10 καρκίνους και 2 από τους 4 πολύποδες με τον φαινότυπο αυτό εμφανίζουν μεθυλίωση στον υποκινητή και των τριών γονιδίων που μελετήθηκαν, επισημαίνοντας έτσι το ρόλο της μεθυλίωσης στην έναρξη αλλά και την εξέλιξη αυτού του τύπου καρκίνου.

Τέλος συγκρίνοντας τον φαινότυπο της μικροδορυφορικής αστάθειας με την ελαττωματική λειτουργία του συστήματος MMR που αυτή υποκρύπτει είτε μέσω αστάθειας στα γονίδια στόχους (TGFβRII, BAX, IGFIIR, MSH3, MSH6, EGFR και c-MYB) είτε μέσω μεταλλάξεων σε λειτουργικά γονίδια του συστήματος MMR (hMLH1 και hMSH2) είδαμε ότι όλα τα δείγματα (από πολύποδα ή καρκίνο) με τον φαινότυπο MSI-H καθώς και δύο δείγματα με τον φαινότυπο MSI-L έδειξαν επιπλέον αστάθεια σε ένα ή και παραπάνω γονίδια στόχους (με τα γονίδια TGFβRII και c-MYB να εμφανίζουν αστάθεια σε όλα τα δείγματα με τον φαινότυπο MSI-H), γεγονός που θα αποτελέσει σημαντικό δείκτη για την μετέπειτα πορεία εξέλιξης της νόσου ενώ παράλληλα μας επιτρέπει να θεωρήσουμε τα γονίδια c-MYB και EGFR ως δύο νέα γονίδια στόχους.

Επιπλέον ο έλεγχος μεταλλάξεων στα γονίδια του συστήματος MMR, τα hMLH1 και hMSH2, στα δείγματα με τον φαινότυπο MSI-H αποτέλεσε την αφορμή να εντοπίσουμε δύο πιθανός σημαντικές παθογόνες μεταλλάξεις στο γονίδιο hMSH2 (472C>T και 592G>A), τόσο σε έναν ασθενή με λαχνωτό πολύποδα χωρίς οικογενειακό ιστορικό όσο και σε έναν ασθενή με το σύνδρομο HNPCC, γεγονός που θα ωφελήσει τόσο στην μετέπειτα θεραπευτική προσέγγισή τους όσο και στην προληπτική παρακολούθηση των οικογενειών τους.

9. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΤΟΥ ΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA, ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟΧΩΝ, ΩΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΝΕΟΠΛΑΣΙΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΗΣ ΒΑΣΙΛΙΚΗΣ ΨΩΦΑΚΗ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου εξελίσσεται ως το αποτέλεσμα μίας πορείας βημάτων σημαντικών γενετικών και επιγενετικών αλλαγών. Η ασυνήθης μεθυλίωση στις νησίδες CpG ακολουθούμενη από χαμηλού ή υψηλού επιπέδου αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA, θα οδηγήσουν στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου μέσω μεταλλάξεων μετατόπισης πλαισίου σε γονίδια στόχους τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ή της κυτταρικής επιβίωσης.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η αναζήτηση της «μοριακής υπογραφής» που συνοδεύει την εξαλλαγή ενός φυσιολογικού ιστού αρχικά σε πολύποδα και αργότερα σε προχωρημένο πολύποδα και καρκίνωμα, χρησιμοποιώντας ως δείκτες την μικροδορυφορική αστάθεια, την μεθυλίωση των υποκινητών κάποιων γονιδίων και τις μεταλλάξεις των γονιδίων στόχων.

Το DNA που απομονώθηκε από αίμα, φυσιολογικό ιστό καθώς και ιστό από πολύποδες και καρκίνο, των ασθενών της μελέτης μας (υγιή άτομα, ασθενείς με πολύποδες και/ή καρκίνο), οι οποίοι υποβλήθηκαν σε κολονοσκόπηση, χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί η μικροδορυφορική αστάθεια (με την χρήση των 5 δεικτών Bethesda), η ασυνήθης μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT, καθώς και οι μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου σε γονίδια στόχους (TGFβRII, BAX, IGFIIR, hMSH3, hMSH6, EGFR και c-MYB). Τέλος με τη χρήση της πλήρους αλληλούχισης έγινε έλεγχος για μεταλλάξεις στα γονίδια του συστήματος MMR, τα hMLH1 και hMSH2, σε όλους τους ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-H.

Η μικροδορυφορική αστάθεια εμφανίστηκε σε ποσοστό 17% του συνολικού αριθμού των ασθενών που μελετήθηκαν και συγκεκριμένα μόνο στους ασθενείς με σωληνολαχνωτούς/λαχνωτούς πολύποδες και καρκίνο του παχέος εντέρου, ενώ η μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1 και P16 παρατηρήθηκε μόνο στο δείγμα του παθολογικού ιστού των ασθενών, σε αντίθεση με τον υποκινητή του γονιδίου MGMT, ο οποίος εμφάνισε μεθυλίωση και σε 21 δείγματα DNA από αίμα. Επιπλέον η συχνότητα εμφάνισης της μεθυλίωσης σε κάθε γονίδιο αυξάνεται καθ' όλη την πορεία πολύποδας/αδένωμα/καρκίνος, με το γονίδιο MGMT να εμφανίζει τα υψηλότερα ποσοστά μεθυλίωσης σε κάθε ομάδα ασθενών. Το γεγονός ότι όλοι οι ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου εμφάνισαν μεθυλίωση σε τουλάχιστον ένα από τα εξεταζόμενα γονίδια, υποδεικνύει τον σημαντικό ρόλο της μεθυλίωσης στην πορεία εξέλιξης του καρκίνου του παχέος εντέρου. Επίσης, τα γονίδια TGFβRII και c-MYB ήταν μεταλλαγμένα σε όλους τους ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-H και με επιπλέον μεθυλίωση στους υποκινητές και των τριών γονιδίων. Τέλος βρέθηκαν μία ήδη γνωστή και μία νέα μετάλλαξη στο γονίδιο hMSH2 σε 2 ασθενείς με τον φαινότυπο MSI-H (ο ένας ασθενής με το σύνδρομο HNPCC και ο άλλος με λαχνωτό πολύποδα).

Ο έλεγχος της μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων για τις τρεις διαφορετικές ομάδες ασθενών με αδενωματώδεις/σωληνοειδής πολύποδες, σωληνολαχνωτούς/λαχνωτούς πολύποδες και καρκίνο του παχέος εντέρου, παρείχε ειδικές πληροφορίες για το μεθυλιωμένο προφίλ της κάθε ομάδας, υποστηρίζοντας έτσι τη χρήση της ως ένας πρώιμος δείκτης ελέγχου. Επιπλέον ο φαινότυπος MSI, ως αποτέλεσμα μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων hMLH1, P16 και MGMT οδηγεί στην καρκινογένεση του παχέος εντέρου μέσω μεταλλάξεων όχι μόνο σε κωδικοποιούσες περιοχές αλλά πιθανόν και σε περιοχές ιντρονίων με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ρυθμιστικής αξίας για τα γονίδια, όπως στα γονίδια EGFR και c-MYB. Τέλος ο πλήρης έλεγχος του γενετικού και επιγενετικού υπόβαθρου και επιπλέον η ανακάλυψη των παθογόνων μεταλλάξεων στο γονίδιο hMSH2 θα ωφελήσει κάθε ασθενή ξεχωριστά για μία πιο στοχευμένη χημειοθεραπευτική προσέγγιση καθώς και τις οικογένειες τους ως ένας πιθανός προγνωστικός δείκτης.

9. SUMMARY

INVESTIGATION OF DNA MICROSATELLITE INSTABILITY, DNA METHYLATION AND TARGET GENE INACTIVATION AS MOLECULAR MARKERS IN COLORECTAL CANCER

DOCTORATE THESIS BY VASILIKI PSOFAKI

Colorectal cancer develops as the result of a stepwise progression through several genetic and epigenetic alterations. Aberrant DNA methylation of CpG islands and subsequent low- or high-level DNA microsatellite instability is assumed to drive colon carcinogenesis through frameshift mutations in target genes implicated in the regulation of cell growth or cell survival.

The aim of this study was the search of the “molecular signature” which accompanies the transformation of a normal tissue first to a polyp and then to an adenoma and cancer, using as molecular markers the microsatellite instability phenotype, promoter DNA methylation and the mutations of certain target genes.

DNA extracted from blood, normal tissue, and tissues from polyps, adenomas and colorectal cancer of patients undergoing colonoscopy (healthy individuals, polyp/adenoma patients and colorectal carcinoma patients) was used to assess the microsatellite instability (using the five Bethesda markers), the prevalence of aberrant DNA methylation of hMLH1, P16 and MGMT promoter, and the frameshift mutations of target genes (BAX, IGFIIR, hMSH3, hMSH6, TGFβRII, EGFR and c-MYB). Moreover a total genomic sequence analysis of the MMR genes hMLH1 and hMSH2 was performed in all MSI-H phenotype patients.

Microsatellite instability was found in 17% of all of our patients, and particularly in those with tubulovillous/villous polyps or cancer. hMLH1 or CDKN2A/p16 promoter methylation was present only in tissue samples in contrast to MGMT that was also found in the blood. The frequency of promoter methylation for each locus grows up in the polyp/adenoma/carcinoma sequence with MGMT showing

the higher frequency in each group. All colorectal cancer patients showed promoter DNA methylation in at least one locus, suggesting a potentially crucial role of DNA methylation in the progression of colorectal cancer. TGF β R2 and c-MYB genes were mutated in all patients showing the MSI-H phenotype together with simultaneous promoter DNA methylation of the three genes. One known mutation and one new mutation were found at the MSH2 gene in 2 of our MSI-H patients (1 patient with HNPCC syndrome and one other with villous adenoma).

DNA methylation analysis of a panel of genes provided specific methylation profiles for adenomatous/tubular polyps, tubulovillous/villous polyps and colorectal cancer, supporting the use of these alterations as a possible early detection marker. Moreover the MSI phenotype resulted in promoter DNA methylation of hMLH1 and MGMT driving colorectal carcinogenesis through frameshift mutations not only in coding but possibly also in intronic repetitive sequences showing regulatory function, as for example EGFR and c-MYB. Finally, the overall examination of the genetic and epigenetic background, together with the detection of the pathological mutation at hMSH2 gene, may give for our patients the possibility of a better chemotherapeutic prevention and possibly a useful prognostic marker.

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*. 2006 Mar-Apr;56(2):106-30.
- [2] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.
- [3] Stirbu I, Kunst AE, Vlems FA, Visser O, Bos V, Deville W, et al. Cancer mortality rates among first and second generation migrants in the Netherlands: Convergence toward the rates of the native Dutch population. *Int J Cancer*. 2006 Dec 1;119(11):2665-72.
- [4] Ahmed FE. Gene-gene, gene-environment & multiple interactions in colorectal cancer. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2006 Apr;24(1):1-101.
- [5] Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Jun 2;91(11):916-32.
- [6] Terry P, Giovannucci E, Michels KB, Bergkvist L, Hansen H, Holmberg L, et al. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Apr 4;93(7):525-33.
- [7] Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol*. 2001 Oct;96(10):2992-3003.
- [8] Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996 Oct 18;87(2):159-70.
- [9] Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67.
- [10] Chung DC. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology*. 2000 Sep;119(3):854-65.
- [11] Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2002 May;38(7):867-71.
- [12] Azzoni C, Bottarelli L, Campanini N, Di Cola G, Bader G, Mazzeo A, et al. Distinct molecular patterns based on proximal and distal sporadic colorectal cancer: arguments for different mechanisms in the tumorigenesis. *Int J Colorectal Dis*. 2007 Feb;22(2):115-26.
- [13] Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet*. 2000 May 20;355(9217):1745-50.
- [14] Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 2002 Oct 1;137(7):603-12.
- [15] de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;4(10):769-80.
- [16] Scott RJ. Familial adenomatous polyposis (FAP) and other polyposis syndromes. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*. 2003;1:19-30.
- [17] Lockhart-Mummery A. Cancer and heredity. *Lancet*. 1925;1:427-9.
- [18] Debinski HS, Love S, Spigelman AD, Phillips RK. Colorectal polyp counts and cancer risk in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*. 1996 Apr;110(4):1028-30.
- [19] Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, et al. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*. 1987 Aug 13-19;328(6131):614-6.
- [20] Narayan S, Roy D. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer*. 2003 Dec 12;2:41.

-
- [21] Warthin AS. Heredity with reference to carcinoma. *Arch Intern Med.* 1913;12:546-55.
- [22] Mecklin JP, Jarvinen HJ. Tumor spectrum in cancer family syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Cancer.* 1991 Sep 1;68(5):1109-12.
- [23] Umar A, Risinger JI, Hawk ET, Barrett JC. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004 Feb;4(2):153-8.
- [24] Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum.* 1991 May;34(5):424-5.
- [25] Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology.* 1999 Jun;116(6):1453-6.
- [26] Cai SJ, Xu Y, Cai GX, Lian P, Guan ZQ, Mo SJ, et al. Clinical characteristics and diagnosis of patients with hereditary non polyposis colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2003;9:284-7.
- [27] Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet.* 1999;36:801-18.
- [28] Chung DC, Rustgi AK. The Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: Genetics and Clinical Implications. *Ann Intern Med.* 2003;138:560-70.
- [29] Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 9;95(12):6870-5.
- [30] Ward R, Williams R, Law M, Hawkins N. The CpG island methylator phenotype is not associated with a personal or family history of cancer. *Cancer Res.* 2004;64:7618-21.
- [31] Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature.* 1997;386:623-7.
- [32] Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann NY Acad Sci.* 1995;768:101-10.
- [33] Raut CP, Pawlik TM, Rodriguez-Bigas MA. Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res.* 2004;568:275-82.
- [34] Moxon RE, Wills C. DNA Microsatellites: Agents of Evolution? *Scientific American.* 1999 January;280(1):94-9.
- [35] Mitas M. Trinucleotide repeats associated with human disease. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:2245-54.
- [36] Arzimanoglou I, Gilbert F, Barber H. Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer.* 1998;82(10):1808-20.
- [37] Jarne P, Lagoda P. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol.* 1996;11:424-9.
- [38] Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, Perucho M. Isolation and characterisation of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:10065-9.
- [39] Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature.* 1993 Jun 10;363(6429):558-61.

-
- [40] Aaltonen LA, Peltomaki P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Javinen H, Powell SM, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993;260(5109):812-6.
- [41] Risinger JI, Barrett JC, Watson P, Lynch HT, Boyd J. Molecular genetic evidence of the occurrence of breast cancer as an integral tumor in patients with the hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer*. 1996;77:1836-43.
- [42] Eshleman JR, Lang EZ, Bowerfind GK, Parsons R, Vogelstein B, Willson JK, et al. Increased mutation rate at the hprt locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene*. 1995 Jan 5;10(1):33-7.
- [43] Yamamoto H, Imai K, Perucho M. Gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype pathway. *Gastroenterology*. 2002;37:153-63.
- [44] Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*. 1995 Jun 2;268(5215):1336-8.
- [45] Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*. 1997 Feb 14;275(5302):967-9.
- [46] Schwartz S, Jr., Yamamoto H, Navarro M, Maestro M, Reventos J, Perucho M. Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res*. 1999 Jun 15;59(12):2995-3002.
- [47] Souza RF, Yin J, Smolinski KN, Zou TT, Wang S, Shi YQ, et al. Frequent mutation of the E2F-4 cell cycle gene in primary human gastrointestinal tumors. *Cancer Res*. 1997 Jun 15;57(12):2350-3.
- [48] Tashiro H, Blazes MS, Wu R, al. e. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res*. 1997;57:3935-40.
- [49] Duval A, Gayet J, Zhou XP, Iacopetta B, Thomas G, Hamelin R. Frequent frameshift mutations of the TCF-4 gene in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res*. 1999;59:4213-5.
- [50] Yamamoto H, Sawai H, Perucho M. Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res*. 1997;57:4420-6.
- [51] Thorstensen L, Diep CB, Meling GI, al. e. WNT1 inducible signaling pathway protein 3, WISP-3, a novel target gene in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Gastroenterology*. 2001;121:1275-80.
- [52] Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res*. 2002 May 1;62(9):2447-54.
- [53] Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998 Nov 15;58(22):5248-57.
- [54] Jass JR, Young J, Leggett BA. Hyperplastic polyps and DNA microsatellite unstable cancers of the colorectum. *Histopathology*. 2000;37: 295-301.
- [55] Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Jarvinen H, et al. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res*. 2001 Jun 1;61(11):4545-9.

- [56] Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007;50:113-30.
- [57] Makinen MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology*. 2007 Jan;50(1):131-50.
- [58] Whitehall VL, Walsh MD, Young J, Leggett BA, Jass JR. Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. *Cancer Res*. 2001 Feb 1;61(3):827-30.
- [59] Young J, Simms LA, Biden KG, Wynter CV, Whitehall VL, Karamatic R, et al. Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol*. 2001 Dec;159(6):2107-16.
- [60] Fallik D, Borrini F, Boige V, Viguier J, Jacob S, Miquel C, et al. Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res*. 2003;63:5738-44.
- [61] Barratt PL, Seymour MT, Stenning SP, Georgiades I, Walker C, Birbeck K, et al. DNA markers predicting benefit from adjuvant fluorouracil in patients with colon cancer: a molecular study. *Lancet*. 2002;360:1381-91.
- [62] Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2001;344:1196-206.
- [63] Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003;349:247-57.
- [64] Jo WS, Carethers JM. Chemotherapeutic implications in microsatellite unstable colorectal cancer. *Cancer Biomark*. 2006;2:51-60.
- [65] Blanes A, Jimenez-Martin JJ, Miranda MT, Diaz-Cano SJ. Absences of the physiologic cellular kinetic balance and down-regulation of mlh1/msh2 characterize deep topographic compartments of colorectal adenocarcinomas. *Lab Invest*. 2003;83:114-5.
- [66] del Rio M, Molina F, Bascoul-Mollevi C, Copois V, Bibeau F, Chalbos P, et al. Gene expression signature in advanced colorectal cancer patients select drugs and response for the use of Leucovorin, Fluorouracil, and Irinotecan. *J Clin Oncol*. 2007;25:773-80.
- [67] Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:101-33.
- [68] de la Chapelle A, Peltomaki P. The genetics of hereditary common cancers. *Curr Opin Genet Dev*. 1998;8:298-303.
- [69] Prolla TA. DNA mismatch repair and cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10:311-6.
- [70] Wheeler JM, Bodmer WF, Mortensen NJ. DNA mismatch repair genes and colorectal cancer. *Gut*. 2000;47:148-53.
- [71] Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet*. 2001;10:735-40.
- [72] Harfe BD, Jinks-Robertson S. DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet*. 2000;34:359-99.

- [73] Paques F, Haber JE. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63:349-404.
- [74] Mellon I, Rajpal DK, Koi M, Boland CR, Champe GN. Transcription-coupled repair deficiency and mutations in human mismatch repair genes. *Science.* 1996;272:557-60.
- [75] Duckett DR, Bronstein SM, Taya Y, Modrich P. hMutS alpha and hMutL alpha-dependent phosphorylation of p53 in response to DNA methylator damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:12384-8.
- [76] Wu J, Gu L, Wang H, Geacintov NE, Li GM. Mismatch repair processing of carcinogen-DNA adducts triggers apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1999;19:8292-301.
- [77] Li GM. The role of mismatch repair in DNA damage-induced apoptosis. *Oncol Res.* 1999;11:393-400.
- [78] Jacob S, Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie.* 2002; 84:27-47.
- [79] das Gupta R, Kolodner RD. Novel dominant mutations in *Saccharomyces cerevisiae* MSH6. *Nat Genet.* 2000;24:53-6.
- [80] Marsischky GT, Filosi N, Kane MF, Kolodner R. Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes Dev.* 1996;10:407-20.
- [81] Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Basu S, Baxevanis AD, Lynch HT, et al. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nat Genet.* 2000;24:27-35.
- [82] Raschle M, Marra G, Nystrom-Lahti M, Schar P, Jiricny JJBC, . Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. *J Biol Chem.* 1999;274:32368-75.
- [83] Leung WK, Kim JJ, Wu L, Sepulveda JL, Sepulveda AR. Identification of a second MutL DNA mismatch repair complex (hPMS1 and hMLH1) in human epithelial cells. *J Biol Chem.* 2000;275:15728-32.
- [84] Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, Larsen AL, Krush AJ. Hereditary factors in cancer. Study of two large Midwestern kindreds. *Arch Intern Med.* 1966;117:206-12.
- [85] Peltomaki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science.* 1993;260:810-2.
- [86] Nystrom-Lahti M, Parsons R, Sistonen P, Pylkkanen L, Aaltonen LA, Leach FS, et al. Mismatch repair genes on chromosomes 2p and 3p account for a major share of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families evaluable by linkage. *Am J Hum Genet.* 1994;55:659-65.
- [87] Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell.* 1993;75:1215-25.
- [88] Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell.* 1993;75:1027-38.
- [89] Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature.* 1994;368:258-61.

- [90] Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*. 1994;371:75-80.
- [91] Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003;348:919-32.
- [92] Vasen HF, Stormorken A, Menko FH, Nagengast FM, Kleibeuker JH, Griffioen G, et al. Msh2 mutation carriers are at higher risk of cancer than mlh1 mutation carriers: a study of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *J Clin Oncol*. 2001;19:4074-80.
- [93] Huang J, Kuismanen SA, Liu T, Chadwick RB, Johnson CK, Stevens MW, et al. MSH6 and MSH3 are rarely involved in genetic predisposition to nonpolyposis colon cancer. *Cancer Res*. 2001;61:1619-23.
- [94] Wijnen J, Khan PM, Vasen H, van der Klift H, Mulder A, van Leeuwen-Cornelisse I, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer families not complying with the Amsterdam criteria show extremely low frequency of mismatch-repair gene mutations. *Am J Hum Genet*. 1997;61:329-35.
- [95] Ward R, Meagher A, Tomlinson I, O'Connor T, Norrie M, Wu R, et al. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut*. 2001;48:821-9.
- [96] Terdiman JP, Gum JR, Conrad PG, Miller GA, Weinberg V, Crawley SC, et al. Efficient detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene carriers by screening for tumor microsatellite instability before germline genetic testing. *Gastroenterology*. 2001;120:21-30.
- [97] Apeless A, Mihalatos M, Danielidis I, Kallimanis G, Agnantis NJ, Triantafyllidis JK, et al. hMSH2 is the most commonly mutated MMR gene in a cohort of Greek HNPCC patients. *British Journal of Cancer*. 2005;92:396 - 404.
- [98] Wagner A, Barrows A, Wijnen JT, van der Klift H, Franken PF, Verkuijlen P, et al. Molecular analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States: high mutation detection rate among clinically selected families and characterization of an American founder genomic deletion of the MSH2 gene. *Am J Hum Genet*. 2003;72:1088-100.
- [99] Nystrom-Lahti M, Kristo P, Nicolaides NC, Chang SY, Aaltonen LA, Moisio AL, et al. Founding mutations and Alu-mediated recombination in hereditary colon cancer. *Nat Med*. 1995;1:1203-6.
- [100] Herfarth KK, Kodner IJ, Whelan AJ, Ivanovich JL, Bracamontes JR, Wells SA, et al. Mutations in MLH1 are more frequent than in MSH2 in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997;18:42-9.
- [101] Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*. 1997 Mar 1;57(5):808-11.
- [102] Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, de la Chapelle A, Peltomaki P. Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Am J Pathol*. 2000;156:1773-9.
- [103] Wu Y, Nystrom-Lahti M, Osinga J, Looman MW, Peltomaki P, Aaltonen LA, et al. MSH2 and MLH1 mutations in sporadic replication error-positive colorectal carcinoma as assessed by two-dimensional DNA electrophoresis. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997;18:269-78.

- [104] Benachenhou N, Guiral S, Gorska-Flipot I, Michalski R, Labuda D, Sinnett D. Allelic losses and DNA methylation at DNA mismatch repair loci in sporadic colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 1998;19:1925-9.
- [105] Jacob S, Aguado M, Fallik D, Praz F. The role of the DNA mismatch repair system in the cytotoxicity of the topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide to human colorectal cancer cells. *Cancer Res*. 2001;61:6555-62.
- [106] Fischle W, Wang Y, Allis CD. Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature*. 2003;425:475-9.
- [107] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16:6-21.
- [108] Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *Can Med Assoc J*. 2006;174:341-8.
- [109] Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosines methylation and the ecology of the intragenomic parasites. *Trend Genet*. 1997;13:335-40.
- [110] Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983;301:89-92.
- [111] Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet*. 1989;83:155-8.
- [112] Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*. 2001;61:3225-9.
- [113] Fraga MF, Herranz M, Espada J, Ballestar E, Paz MF, al. e. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res*. 2004;64:5527-34.
- [114] Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone- modification maps. *Nature Rev Genet*. 2007;8:286-98.
- [115] Esteller M, Fraga MF, Cuo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, al. e. Methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet*. 2001;10: 3001-7.
- [116] Chan AO, Broaddus RR, Houlihan PS, Issa JP, Hamilton SR, Rashid A. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol*. 2002 May;160(5):1823-30.
- [117] Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet*. 2005;37:391-400.
- [118] Kondo Y, Issa JP. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2004;23:29-39.
- [119] Kondo Y, Shen L, Issa JP. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol*. 2003;23:206-15.
- [120] Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 20;96(15):8681-6.
- [121] Ahuja N, Mohan AL, Li Q, Stolker JM, Herman JG, Hamilton SR, et al. Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1997;57(16):3370-4.
- [122] Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, et al. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 21;95(15):8698-702.

- [123] Wynter CV, Walsh MD, Higuchi T, Leggett BA, Young J, Jass JR. Methylation patterns define two types of hyperplastic polyp associated with colorectal cancer. *Gut*. 2004 Apr;53(4):573-80.
- [124] Ogino S, Kawasaki T, Kirkner J, Kraft P, Loda M, Fuchs C. Evaluation of Markers for CpG Island Methylation Phenotype (CIMP) in Colorectal cancer by a Large Population-Based Sample. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2007;9:305-14.
- [125] Arnold CN, Goel A, Compton C, Marcus V, Niedzwiecki D, Dowell JM, et al. Evaluation of microsatellite instability, hMLH1 expression and hMLH1 promoter hypermethylation in defining the MSI phenotype of colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*. 2004 Jan;3(1):73-8.
- [126] Hawkins N, Ward RL. Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:1307-13.
- [127] Deng G, Bell I, Crawley S, al. e. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10:191-5.
- [128] Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, al. e. Evaluation of a large, population based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology*. 2005;129:837-45.
- [129] Gayet J, Zhou XP, Duval A, Rolland S, Hoang JM, Cottu P, et al. Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene*. 2001;20:5025-32.
- [130] Duval A, Rolland S, Compoin A, Tubacher E, Iacopetta B, Thomas G, et al. Evolution of instability at coding and non-coding repeat sequences in human MSI-H colorectal cancers. *Human Molecular Genetics*. 2001;10(5):513-8.
- [131] Souza RF, Appel R, Yin J, Wang S, Smolinski KN, Abraham JM, et al. Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nat Genet*. 1996 Nov;14(3):255-7.
- [132] Shin KH, Park YJ, Park JG. PTEN gene mutations in colorectal cancers displaying microsatellite instability. *Cancer Lett*. 2001;174:189-94.
- [133] Ikeda M, Orimo H, Moriyama H, Nakajima E, Matsubara N, Mibu R, et al. Close correlation between mutations of E2F4 and hMSH3 genes in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res*. 1998;58:594-8.
- [134] Duval A, Rolland S, Tubacher E, Bui H, Thomas G, Hamelin R. The human T-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings, and mutational analysis in colorectal cancer cell lines. *Cancer Res*. 2000;60:3872-9.
- [135] Ohmiya N, Matsumoto S, Yamamoto H, Baranovskaya S, Malkhosyan SR, Perucho M. Germline and somatic mutations in hMSH6 and hMSH3 in gastrointestinal cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Gene*. 2001;272:301-13.
- [136] Loukola A, Vilkki S, Singh J, Launonen V, Aaltonen LA. Germline and somatic mutation analysis of MLH3 in MSI-positive colorectal cancer. *Am J Pathol*. 2000;157:347-52.
- [137] Riccio A, Aaltonen LA, Godwin AK, Loukola A, Percesepe A, Salovaara R, et al. The DNA repair gene MBD4 (MED1) is mutated in human carcinomas with microsatellite instability. *Nat Genet*. 1999;23:266-8.
- [138] Malkhosyan S, Rampino N, Yamamoto H, Perucho M. Frameshift mutator mutations. *Nature*. 1996 Aug 8;382(6591):499-500.

- [139] Woerner SM, Gebert J, Yuan YP, Sutter C, Ridder R, Bork P, et al. Systematic identification of genes with coding microsatellites mutated in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. *Int J Cancer*. 2001;93:12-9.
- [140] Calin GA, Gafa R, Tibiletti MG, Herlea V, Becheanu G, Cavazzini L, et al. Genetic progression in microsatellite instability high (MSI-H) colon cancers correlates with clinico-pathological parameters: A study of the TGRbetaRII, BAX, hMSH3, hMSH6, IGF1R and BLM genes. *Int J Cancer*. 2000;89:230-5.
- [141] Grady WM, Rajput A, Myeroff L, Liu DF, Kwon K, Willis J, et al. Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res*. 1998 Jul 15;58(14):3101-4.
- [142] Motyka B, Korbitt G, Pinkoski MJ, Heibein JA, Caputo A, Hobman M, et al. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T-cell-induced apoptosis. *Cell*. 2000;103:491-500.
- [143] Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, et al. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature*. 1997;385:637-40.
- [144] Yamamoto H, Sawai H, Weber TK, Rodriguez-Bigas MA, Perucho M. Somatic frameshift mutations in DNA mismatch repair and proapoptosis genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58:997-1003.
- [145] Giannini G, Rinaldi C, Ristori E, Ambrosini MI, Cerignoli F, Viel A, et al. Mutations of an intronic repeat induce impaired MRE11 expression in primary human cancer with microsatellite instability. *Oncogene*. 2004 Apr 8;23(15):2640-7.
- [146] Zhang L, Yu J, Willson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Short mononucleotide repeats sequence variability in mismatch repair-deficient cancers. *Cancer Res*. 2001;61:3801-5.
- [147] Woerner SM, Benner A, Sutter C, Schiller M, Yuan YP, Keller G, et al. Pathogenesis of DNA repair-deficient cancers: a statistical meta-analysis of putative Real Common Target Genes. *Oncogene*. 2003;22:2226-35.
- [148] Shilatifard A. Factors regulating the transcriptional elongation activity of RNA polymerase II. *FASEB J*. 1998;12(14):1437-46.
- [149] Thompson MA, Flegg R, Westin EH, Ramsay RG. Microsatellite deletions in the c-myc transcriptional attenuator region associated with over-expression in colon tumour cell lines. *Oncogene*. 1997 Apr 10;14(14):1715-23.
- [150] Birocio A, Benassi B, D'Agnano I, D'Angelo C, Buglioni S, Mottolese M, et al. c-Myb and Bcl-x overexpression predicts poor prognosis in colorectal cancer: clinical and experimental findings. *Am J Pathol*. 2001 Apr;158(4):1289-99.
- [151] Hugo H, Cures A, Suraweera N, Drabsch Y, Purcell D, Mantamadiotis T, et al. Mutations in the MYB intron 1 regulatory sequence increase transcription in colon cancers. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006;45:1143-54.
- [152] Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995;19:183-232.
- [153] Camp ER, Summy J, Bauer TW, Liu W, Gallick GE, Ellis LM. Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res*. 2005;11:397-405.
- [154] Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2001;37(4):9-15.

- [155] Romeike BF, Jung V, Feiden W, Moringlane JR, Zang KD, Urbschat SM. Distribution of epidermal growth factor receptor protein correlates with gain in chromosome 7 revealed by comparative genomic hybridization after microdissection in glioblastoma multiforme. *Pathol Res Pract*. 2001;197:427-31.
- [156] Shia J, Klimstra DSL, A. R. , Qin J, Saltz L, Teruya-Feldstein J, Akram M, et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Mod Pathol*. 2005;18:1350-6.
- [157] Liu W, Innocenti F, Chen P, Das S, Cook EH, Jr., Ratain MJ. Interethnic difference in the allelic distribution of human epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism. *Clin Cancer Res*. 2003 Mar;9(3):1009-12.
- [158] Gebhardt F, Burger H, Brandt B. Modulation of EGFR gene transcription by secondary structures, a polymorphic repetitive sequence and mutations--a link between genetics and epigenetics. *Histol Histopathol*. 2000 Jul;15(3):929-36.
- [159] Amador ML, Oppenheimer D, Perea S, Maitra A, Cusatis G, Iacobuzio-Donahue C, et al. An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res*. 2004 Dec 15;64(24):9139-43.
- [160] Buerger H, Gebhardt F, Schmidt H, Beckmann A, Hutmacher K, Simon R, et al. Length and loss of heterozygosity of an intron 1 polymorphic sequence of egfr is related to cytogenetic alterations and epithelial growth factor receptor expression. *Cancer Res*. 2000;60:854-7.
- [161] Jami MS, Hemati S, Salehi Z, Tavassoli M. Association between the length of a CA dinucleotide repeat in the EGFR and risk of breast cancer. *Cancer Investigation*. 2008;26:434-7.
- [162] Buerger H, Packeisen J, Boecker A, al. e. Allelic length of a CA dinucleotide repeat in the egfr gene correlates with the frequency of amplifications of this sequence--first results of an inter-ethnic breast cancer study. *J Pathol*. 2004;203:545-50.
- [163] Brandt B, Meyer-Staeckling S, Schmidt H, Agelopoulos K, Buerger H. Mechanisms of egfr gene transcription modulation: relationship to cancer risk and therapy response. *Clin Cancer Res*. 2006 December 15;12(24).
- [164] Zhang W, Weissfeld JL, Romkes M, Land SR, Grandis JR, Siegfried JM. Association of the EGFR intron 1 CA repeat length with lung cancer risk. *Molecular Carcinogenesis*. 2007;46:372-80.
- [165] Kersting C, Agelopoulos K, Schmidt H, Korsching E, August C, Gosheger G, et al. Biological importance of a polymorphic CA sequence within intron 1 of the epidermal growth factor receptor gene (EGFR) in high grade central osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47:657-64.
- [166] Mullenbach R, Lagoda PJJ, Welter C. An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. *Trend Genet*. 1989;5:391.
- [167] Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:2990-7.
- [168] Sanger F, Niklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74:5463-7.
- [169] Goldberg Y, Porat RM, Kedar I, Shochat C, Sagi M, Eilat A, et al. Mutation spectrum in HNPCC in the Israeli population. *Familial Cancer*. 2008;7:309-17.

- [170] Wijnen J, van der Klift H, Vasen H, Khan PM, Menko FH, Tops C, et al. MSH2 genomic deletions are a frequent cause of HNPCC. *Nat Genet.* 1998;20:326-8.
- [171] Christensen LL, Madsen BE, Wikman FP, Wiuf C, Koed K, Tjonneland A, et al. The association between genetic variants in hMLH1 and hMSH2 and the development of sporadic colorectal cancer in Danish population. *BMC Med Genet.* 2008;9:52.
- [172] Steinke V, Rahner N, Morak M, Keller G, Schackert HK, Gorgens H, et al. No association between MUTYH and MSH6 germline mutations in 64 HNPCC patients. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(5):531-2.
- [173] Liu T, Wahlberg S, Rubio CA, Holmberg E, Gronberg H, Lindblom A. DGGE screening of mutations in mismatch repair genes (hMSH2 and hMLH1) in 34 Swedish families with colorectal cancer. *Clin Genet.* 1998;53(2):131-5.
- [174] Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002;3:101-28.
- [175] Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer.* 2000 Dec;36(18):2294-300.
- [176] Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res.* 1997 Nov 1;57(21):4749-56.
- [177] Ricciardiello L, Goel A, Mantovani V, Fiorini T, Fossi S, Chang DK, et al. Frequent loss of hMLH1 by promoter hypermethylation leads to microsatellite instability in adenomatous polyps of patients with a single first-degree member affected by colon cancer. *Cancer Res.* 2003 Feb 15;63(4):787-92.
- [178] Iino H, Jass JR, Simms LA, Young J, Leggett B, Ajioka Y, et al. DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer? *J Clin Pathol.* 1999 Jan;52(1):5-9.
- [179] Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Pylkkanen L, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res.* 1993 Dec 15;53(24):5849-52.
- [180] Watanabe T, Kobunai T, Toda E, Yamamoto Y, Kanazawa T, Kazama Y, et al. Distal colorectal cancers with microsatellite instability (MSI) display distinct gene expression profiles that are different from proximal MSI cancers. *Cancer Res.* 2006 October 15;66(20):9804-8.
- [181] Kakar S, Deng G, Cun L, Sahai V, Kim YS. CpG island methylation is frequently present in tubulovillous and villous adenomas and correlates with size, site, and villous component. *Hum Pathol.* 2008 Jan;39(1):30-6.
- [182] Samowitz WS, Slattery ML. Transforming growth factor- β receptor type 2 mutations and microsatellite instability in sporadic colorectal adenomas and carcinomas. *Am J Pathol.* 1997;151:33-5.
- [183] Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen H, Jass JR, Green JS, et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 1994;54:1645-8.
- [184] Sasaki S, Masaki T, Umetani N, Shinozaki M, Yokoyama T, Ono M, et al. Microsatellite instability is associated with the macroscopic configuration of neoplasms in patients with multiple colorectal adenomas. *Jpn J Clin Oncol.* 1998;28(427-430).

- [185] Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med.* 1992 Mar 5;326(10):658-62.
- [186] Martinez ME, Sampliner R, Marshall JR, Bhattacharyya AK, Reid ME, Alberts DS. Adenoma characteristics as risk factors for recurrence of advanced adenomas. *Gastroenterology.* 2001 Apr;120(5):1077-83.
- [187] Loeve F, van Ballegooijen M, Snel P, Habbema JD. Colorectal cancer risk after colonoscopic polypectomy: a population-based study and literature search. *Eur J Cancer.* 2005 Feb;41(3):416-22.
- [188] Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* 1998;72:141-96.
- [189] Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Hernandez NS, Vilaythong J, et al. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Sep 21;97(18):1330-8.
- [190] Rashid A, Shen L, Morris JS, Issa JP, Hamilton SR. CpG island methylation in colorectal adenomas. *Am J Pathol.* 2001 Sep;159(3):1129-35.
- [191] Jubb AM, Bell SM, Quirke P. Methylation and colorectal cancer. *J Pathol.* 2001;195:111-34.
- [192] Bariol C, Suter C, Cheong K, Ku SL, Meagher A, Hawkins N, et al. The relationship between hypomethylation and CpG island methylation in colorectal neoplasia. *Am J Pathol.* 2003 Apr;162(4):1361-71.
- [193] Park SJ, Rashid A, Lee JH, Kim SG, Hamilton SR, Wu TT. Frequent CpG island methylation in serrated adenomas of the colorectum. *Am J Pathol.* 2003 Mar;162(3):815-22.
- [194] Petko Z, Ghiassi M, Shuber A, Gorham J, Smalley W, Washington MK, et al. Aberrantly methylated CDKN2A, MGMT, and MLH1 in colon polyps and in fecal DNA from patients with colorectal polyps. *Clin Cancer Res.* 2005 Feb 1;11(3):1203-9.
- [195] Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jan 18;97(2):710-5.
- [196] Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol.* 1999 Oct;9(5):349-57.
- [197] Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res.* 1998 Dec 1;58(23):5489-94.
- [198] Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003 Apr 15;63(8):1727-30.
- [199] Grady WM, Rajput A, Lutterbaugh JD, Markowitz SD. Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer. *Cancer Res.* 2001 Feb 1;61(3):900-2.
- [200] Kim YH, Petko Z, Dzieciatkowski S, Lin L, Ghiassi M, Stain S, et al. CpG island methylation of genes accumulates during the adenoma progression step of the multistep pathogenesis of colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006 Aug;45(8):781-9.
- [201] Kim HC, Roh SA, Ga IH, Kim JS, Yu CS, Kim JC. CpG island methylation as an early event during adenoma progression in carcinogenesis of sporadic colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005 Dec;20(12):1920-6.

- [202] Lee S, Hwang KS, Lee HJ, Kim JS, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia. *Lab Invest.* 2004 Jul;84(7):884-93.
- [203] Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res.* 1999 15 May;59(10):2307-12.
- [204] Grady WM. Epigenetic events in the colorectum and in colon cancer. *Biochem Soc Trans.* 2005 Aug;33(Pt 4):684-8.
- [205] Bai AHC, Tong JHM, To KF, Chan MW, Man EP, Lo KW, et al. Promoter hypermethylation of tumor-related genes in the progression of colorectal neoplasia. *Int J Cancer.* 2004;112:846-53.
- [206] Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, Schweizer P, Aaltonen LA, de la Chapelle A, et al. Epigenetic phenotypes distinguish microsatellite-stable and -unstable colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 October 26;96(22):12661-6.
- [207] Sugimura T, Ushijima T. Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis. *Mutat Res.* 2000;462:235-46.
- [208] Laiho P, Launonen V, Lahermo P, Esteller M, Guo M, Herman JG, et al. Low-level microsatellite instability in most colorectal carcinomas. *Cancer Res.* 2002 Feb 15;62(4):1166-70.
- [209] Jass JR, Biden KG, Cummings MC, Simms LA, Walsh M, Schoch E, et al. Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J Clin Pathol.* 1999 Jun;52(6):455-60.
- [210] Gerson SL. Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *J Clin Oncol.* 2002 May 1;20(9):2388-99.
- [211] Haydon AM, Jass JR. Emerging pathways in colorectal-cancer development. *Lancet Oncol.* 2002 Feb;3(2):83-8.
- [212] Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene.* 2002 Aug 12;21(35):5427-40.
- [213] Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Ichikawa A, Maekawa M, Shitoh K, et al. Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology.* 2001;121:1300-9.
- [214] Kaz A, Kim YH, Dzieciatkowski S, Lynch H, Watson P, Kay Washington M, et al. Evidence for the role of aberrant DNA methylation in the pathogenesis of Lynch syndrome adenomas. *Int J Cancer.* 2007 May 1;120(9):1922-9.
- [215] Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku SL, Meagher A, et al. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology.* 2002 May;122(5):1376-87.
- [216] Yamashita K, Dai T, Dai Y, Yamamoto F, Perucho M. Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype. *Cancer Cell.* 2003 Aug;4(2):121-31.
- [217] Duval A, Reperant M, Hamelin R. Comparative analysis of mutation frequency of coding and non coding short mononucleotide repeats in mismatch repair deficient colorectal cancers. *Oncogene.* 2002 Nov 14;21(52):8062-6.
- [218] Togo G, Shiratori Y, Okamoto M, Yamaji Y, Matsumura M, Sano T, et al. Relationship between grade of microsatellite instability and target genes of mismatch repair pathways in sporadic colorectal carcinoma. *Dig Dis Sci.* 2001 Aug;46(8):1615-22.

-
- [219] Vilkki S, Launonen V, Karhu A, Sistonen P, Vastrik I, Aaltonen LA. Screening for microsatellite instability target genes in colorectal cancers. *J Med Genet.* 2002;39:785-9.
- [220] Ouyang H, Shiwaku HO, Hagiwara H, Miura K, Abe T, Kato Y, et al. The insulin-like growth factor II receptor gene is mutated in genetically unstable cancers of the endometrium, stomach, and colorectum. *Cancer Res.* 1997 May 15;57(10):1851-4.
- [221] Miquel C, Borrini F, Grandjouan S, Aupurin A, Viguier J, Velasco V, et al. Role of bax mutations in apoptosis in colorectal cancers with microsatellite instability. *Am J Clin Pathol.* 2005;123:562-70.
- [222] Sakakibara T, Nakamura T, Yamamoto M, al. e. Microsatellite instability in Japanese hereditary non-polyposis colorectal cancer does not induce mutation of a simple repeat sequence of the bax gene. *Cancer Lett.* 1998;124:193-7.
- [223] Planck M, Wenngren E, Borg E, Olsson H, Nilber M. Somatic frameshift alterations in mononucleotide repeat-containing genes in different tumor types from an HNPCC family with germline MSH2 mutation. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;29:33-9.
- [224] Buisine MP, Wacrenier A, Mariette C, Leteurtre E, Escande F, Aissi S, et al. Frequent mutations of the CA simple sequence repeat in intron 1 of EGFR in mismatch repair-deficient colorectal cancers. *World J Gastroenterol.* 2008 Feb 21;14(7):1053-9.