



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Η ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΝΙΚΗ Ι. ΑΓΝΑΝΤΗ

**«Μοριακοί καρκινικοί δείκτες σε όγκους του παχέος εντέρου,
καρκίνο του μαστού και προστατικές νεοπλασίες: ανίχνευση
«γυμνού» DNA και RNA στο πλάσμα, μεθυλίωση και ο ρόλος των
πρωτεϊνών 14-3-3»**

Ειρήνη Παπαδοπούλου

Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2006



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



Ημερομηνία αίτησης: 8-10-2002

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 497^α/1-4-2003

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Αγνάντη Νίκη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Μέλη

Γεωργάτος Σπυρίδων Καθηγητής Βιολογίας

Νασιούλας Γεώργιος Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας (με το νόμο 407)

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 5-6-2003

Ημερομηνία κατάθεσης διατριβής: 6-9-2006

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αγνάντη Νίκη,	Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γεωργάτος Σπυρίδων,	Καθηγητής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σεφεριάδης Κωνσταντίνος,	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ευαγγέλου Άγγελος,	Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στεφάνου Δημήτριος ,	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπάη Μαρία,	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπατιστάτου Άννα,	Επίκουρος Καθηγήτριας Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Η Διδακτορική Διατριβή εγκρίθηκε με το βαθμό : « **ΛΟΙΠΟΝ** »

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας



Η Γραμματέας της Σχολής
Ευαγγελία Τσαγγαλά

Η διατριβή αυτή αφιερώνεται στον πατέρα μου.



1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στην εποχή μας ο ρυθμός ανάπτυξης και προόδου της Μοριακής Βιολογίας έχει φτάσει σε αξιοθαύμαστα επίπεδα. Η χρήση σύγχρονων τεχνικών Μοριακής Βιολογίας, οι οποίες χαρακτηρίζονται από εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα, αποτελεί στις μέρες μας απαραίτητο διαγνωστικό συμπλήρωμα των "κλασικών" διαγνωστικών μεθόδων. Σήμερα, με τα επιτεύγματα της Μοριακής Βιολογίας, τους συστηματικούς πληθυσμιακούς ελέγχους και την συνεχή και έγκυρη ενημέρωση, διεθνώς, ο καρκίνος μπορεί να προληφθεί, εάν διαγνωσθεί και αντιμετωπισθεί εγκαίρως.

Η διδακτορική διατριβή που ακολουθεί ασχολείται με τη μελέτη της χρησιμότητας των μοριακών δεικτών στην διάγνωση διαφόρων νεοπλασιών. Σκοπός ήταν να αποδειχθεί ότι η Μοριακή Βιολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη διάγνωση των σποραδικών καρκίνων.

Ευχαριστώ θερμά τη καθηγήτριά δρ. Νίκη Ι. Αγνάντη, το Δρ. Γεώργιο Νασιούλα και τον καθηγητή Σ. Γεωργάτο που ανέλαβαν την επίβλεψη της διδακτορικής μου διατριβής και για τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις τους. Επίσης ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής καθηγητές Κωνσταντίνο Σεφεριάδη, Άγγελο Ευαγγέλου, Δημήτριο Στεφάνου, Μαρία Μπαή και Άννα Μπατιστάνου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Γεώργιο Νασιούλα για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί του και γιατί με την εμπειρία και τις γνώσεις του συνέβαλε καθοριστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τους υπεύθυνους του ερευνητικού κέντρου Μοριακής Βιολογίας ΥΓΕΙΑ «Αντώνης Παπαγιάννης» και τη διοίκηση Δ.Θ.Κ.Α «ΥΓΕΙΑ» για την ηθική και υλική τους υποστήριξη με τα απαραίτητα αντιδραστήρια και τον προηγμένο εξοπλισμό του κέντρου, χωρίς τα οποία δεν θα ήταν δυνατόν η εκπόνηση αυτής της διατριβής.

Θα ήθελα τέλος να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους μου στο τμήμα Μοριακής Βιολογίας του Νοσοκομείου «ΥΓΕΙΑ» για την βοήθεια και τη συμπαράσταση που μου προσέφεραν.



ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

DNA: Δεσοξυριβοζονουκλεϊκό οξύ

RNA: Ριβοζονουκλεϊκό οξύ

RNase: Ριβονουκλεάση

DNase: Δεοξυριβονουκλεάση

mRNA: Μήνυμα (αγγελιοφόρο) RNA

PSMA: Prostate Specific Membrane Antigen

PSA: Prostate Specific Antigen

CEA: Καρκινοεμβρυικό αντιγόνο

MGMT: O⁶-μεθύλ-γουανινο-DNA μεθυλοτρανσφεράση (O6 methyl guanine methyl transferase)

GSTP1: Glutathione S transferase P1

RASSF1A: Ras Association Domain Family 1A

ATM: Ataxia-Telangiectasia Mutated

PCR: Polymerase Chain Reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

kDa: kilo Dalton, χιλιάδες Dalton

kb: kilobase, χιλιάδες βάσεων

CpG: κυτοσίνη φωσφορικό γουανίνη

DEPC: Diethyl Pyrocarbonate

PBS: Phosphate Buffered Saline

EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid Na₂-salt

dNTPs: δεοξυνουκλεοτίδια

bp: base pair, ζεύγος βάσεων

PTEN: Phosphatase and Tensin human homolog

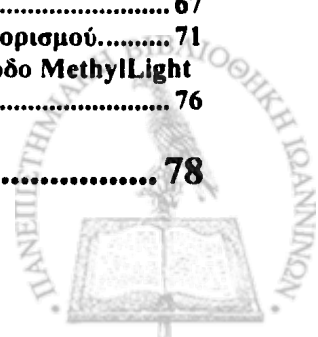
MSP: Methylation specific PCR

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells



2. ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	7
2. ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	9
3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
3.1 RNA δείκτες.....	13
3.1.1 PSMA mRNA στο πλάσμα και στα εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος ασθενών με καρκίνο του προστάτη.	16
3.1.2 Ανίχνευση CEA mRNA στο πλάσμα και στα εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος ασθενών με καρκίνο του γαστρεντερικού συστήματος, του μαστού και του προστάτη.....	18
3.1.3 14-3-3σ σε όγκους και φυσιολογικούς ιστούς ατόμων με καρκίνους του πνεύμονα, μαστού, προστάτη και σε λευχαιμίες.	19
3.2 DNA δείκτες	20
3.2.1 Ποσοτικοποίηση του φορτίου DNA στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του προστάτη, του μαστού και του γαστρεντερικού συστήματος.....	20
3.2.2 Μεθυλίωση του DNA	22
3.2.2.1 MGMT.....	29
3.2.2.2 14-3-3σ	32
3.2.2.3 GSTP1.....	32
3.2.2.4 RASSF1A.....	33
3.2.2.5 ATM.....	35
4. ΜΕΘΟΔΟΙ	36
4.1 Επιλογή των ασθενών	36
4.2 Απομόνωση με επιστοιβασία και φυγοκέντρηση σε φικόλη	36
4.3 Απομόνωση ολικού RNA	37
4.3.1 Απομόνωση RNA από εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος.....	38
4.3.2 Απομόνωση RNA από ιστό	38
4.4 Απομόνωση RNA από πλάσμα	39
4.5 DNase treatment.....	41
4.6 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription).....	42
4.7 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης "PCR"	43
4.8 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.....	49
4.9 Απομόνωση DNA.....	52
4.9.1 Απομόνωση DNA από πλάσμα	52
4.9.2 Απομόνωση DNA από εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος και ιστό	53
4.10 Ποσοτικοποίηση του DNA.....	55
4.10.1 DNA DipStick Kit.....	55
4.10.2. PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)	57
4.11 Στατιστική ανάλυση.....	61
4.12 Ανάλυση της μεθυλίωσης	61
4.12.1 Τροποποίηση του DNA από το διθειώδες νάτριο	62
4.12.1.1 Τροποποίηση του DNA όταν το δείγμα είναι αίμα ή ιστός:	62
4.12.1.2 Τροποποίηση του DNA όταν το δείγμα είναι πλάσμα:	64
4.12.2 Ειδική για τη μεθυλίωση PCR (Methylation Specific PCR ή MSP).....	67
4.12.2.1 Ανίχνευση μεθυλίωσης στα γονίδια MGMT και 14-3-3σ με την ειδική για τη μεθυλίωση PCR (Methylation Specific PCR ή MSP).....	67
4.12.2.2 Ανίχνευση μεθυλίωσης στο γονίδιο GSTP1 με τη μέθοδο MSP φθορισμού.....	71
4.12.2.3 Ανίχνευση μεθυλίωσης στα γονίδια RASSF1 και ATM με τη μέθοδο MethylLight	76
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	78



5.1 RNA δείκτες.....	78
5.1.1 PSMA mRNA στο πλάσμα και στα εμπύρηνια κύτταρα του αίματος.....	78
5.1.2 CEA mRNA στο πλάσμα και στα εμπύρηνια κύτταρα του αίματος	79
5.1.3 Ανίχνευση mRNA του γονιδίου 14-3-3σ	84
5.2 DNA δείκτες.....	87
5.2.1 Ποσοτικοποίηση του DNA στο πλάσμα.....	87
5.2.1.1 Προσδιορισμός της ποσότητας DNA στο πλάσμα των ασθενών με καρκίνο του προστάτη	87
5.2.1.2 Προσδιορισμός της ποσότητας DNA στο πλάσμα των ασθενών με γαστρεντερικό καρκίνο	91
5.2.1.3 Προσδιορισμός της ποσότητας DNA στο πλάσμα των ασθενών με καρκίνο του μαστού	93
5.2.2 Ανάλυση μεθυλίωσης.....	102
5.2.2.1 MGMT.....	102
5.2.2.2 14-3-3σ	104
5.2.2.3 GSTP1	106
5.2.2.4 RASSF1A και ATM στο πλάσμα.....	109
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	112
6.1 RNA δείκτες.....	112
6.1.1 PSMA και CEA mRNA.....	112
6.2 DNA δείκτες.....	114
6.2.1 Προσδιορισμός της ποσότητας DNA στο πλάσμα	114
6.2.2 Ανάλυση της μεθυλίωσης	119
6.2.2.1 Μεθυλίωση του γονιδίου GSTP1 στο πλάσμα	119
6.2.2.2 Μεθυλίωση των γονιδίων RASSF1A και ATM.....	119
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	121
8. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	124
9. ABSTRACT	126
10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	128



3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο μέσος όρος ηλικίας σε πολλές χώρες αυξάνεται σταθερά όπως επίσης και οι θάνατοι που οφείλονται στον καρκίνο. Σχεδόν οποιοδήποτε όργανο ή κυτταρικός τύπος μπορεί να υποστεί κακοήγη μετασχηματισμό προκαλώντας μια πολύπλοκη σειρά κλινικών συνεπειών.

Η ανάπτυξη των περισσότερων όγκων στον άνθρωπο, οφείλεται σε προοδευτική συσσώρευση πολλαπλών γενετικών μεταβολών. Αυτές οι μεταβολές συμπεριλαμβάνουν απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και επαγωγή των ογκογονιδίων που προσδίδουν στα κύτταρα νεοπλασματικά χαρακτηριστικά, όπως ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός, απώλεια απόπτωσης, νέο-αγγειογένεση, και εισβολή σε ιστούς.

Η εφαρμογή πιο εξελιγμένων και ευαίσθητων ανοσοιστοχημικών και μοριακών τεχνικών, οδήγησε στη ταυτοποίηση των γενετικών αλλαγών που συμβαίνουν κατά τον κακοήγη μετασχηματισμό (καρκινογένεση) και την ανάπτυξη του όγκου. Η μελέτη της Μοριακής Βιολογίας των όγκων ρίχνει φως σε γεγονότα που δεν είναι δυνατό να γίνουν ορατά μόνο με απεικονιστικές μεθόδους. Μη ανιχνεύσιμες μικρομεταστάσεις μπορούν να συμβάλουν στην αποτυχία της αρχικής θεραπείας. Για τον λόγο αυτό, η ταυτοποίηση μικρομεταστάσεων είναι ουσιαστικής κλινικής σημασίας για την πρόγνωση και θεραπεία των ασθενών με καρκίνο.

Η διαφυγή καρκινικών κυττάρων με στόχο άλλα όργανα του σώματος, επιτυγχάνεται κυρίως μέσω του αίματος. Η Μοριακή Βιολογία μπορεί να συμβάλλει στην ανίχνευση των μικρομεταστάσεων αντλώντας πληροφορίες άμεσα από το ίδιο το γενετικό υλικό (DNA/RNA)¹. Η προηγμένη τεχνολογία που χρησιμοποιεί επέτρεψε την ταυτοποίηση καρκινικών νουκλεϊκών οξέων (DNA/RNA) σε ένα εύκολο για τον κλινικό γιατρό υλικό, το αίμα. Επιπλέον, μοριακοί καρκινικοί δείκτες μπορούν να ανιχνευθούν τόσο στα εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος όσο και στο πλάσμα/ορό ασθενών με καρκίνο.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή επικεντρώθηκε στη μελέτη της χρησιμότητας των μοριακών δεικτών στην διάγνωση διαφόρων νεοπλασιών όπως οι καρκίνοι του προστάτη, του μαστού και του γαστρεντερικού συστήματος.



Μελετήθηκαν οι εξής καρκινικοί δείκτες:

1. RNA δείκτες:

- a. PSMA mRNA στο πλάσμα και στα εμπύρηνια κύτταρα του αίματος ασθενών με καρκίνο του προστάτη.
- b. CEA mRNA στο πλάσμα και στα εμπύρηνια κύτταρα του αίματος ασθενών με νεοπλασίες του γαστρεντερικού συστήματος και του προστάτη.
- c. Ανίχνευση mRNA του 14-3-3σ σε όγκους και φυσιολογικούς ιστούς ατόμων με καρκίνους του πνεύμονα, μαστού, προστάτη και σε λευχαιμίες.

2. DNA δείκτες:

- a. Ποσοτικοποίηση του φορτίου DNA στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του προστάτη, του μαστού και του γαστρεντερικού συστήματος.
- b. Ανίχνευση της μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων:

I. MGMT

II. 14-3-3σ

III. GSTP1

IV. RASSF1a

V. ATM

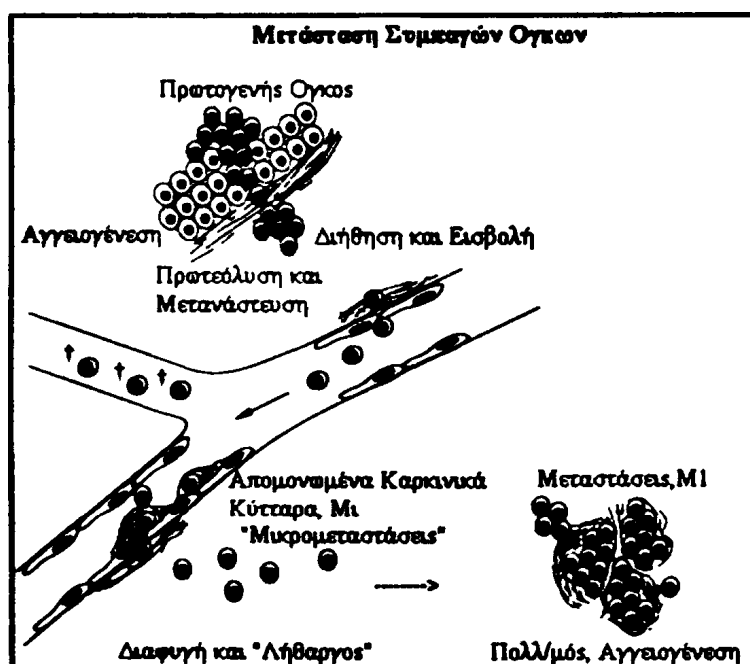
Η μεθυλίωση στα παραπάνω γονίδια μελετήθηκε σε περιφερικό αίμα ή/και ιστούς ασθενών με καρκίνο.



3.1 RNA δείκτες

Καρκινικά κύτταρα είναι δυνατόν να διαφύγουν από τη πρωτογενή εστία του όγκου διαμέσου της κυκλοφορίας του αίματος (εικόνα 1). Η ταυτοποίηση τέτοιων μικρομεταστάσεων μπορεί να επιτευχθεί μέσω της ανίχνευσης mRNA καρκινικής προέλευσης σε εμπύρηντα κύτταρα του περιφερικού αίματος. Με τη μέθοδο της RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) είναι δυνατή η ανίχνευση mRNA διαφόρων γονιδίων, τα οποία δεν ανιχνεύονται σε φυσιολογικά άτομα και η ανίχνευσή τους στο αίμα των ασθενών με καρκίνο υποδηλώνει την ύπαρξη κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων.

Η διαγνωστική σημασία της μεθόδου έχει μελετηθεί διεξοδικά και έχει αποδειχθεί σε διάφορες μορφές καρκίνου².



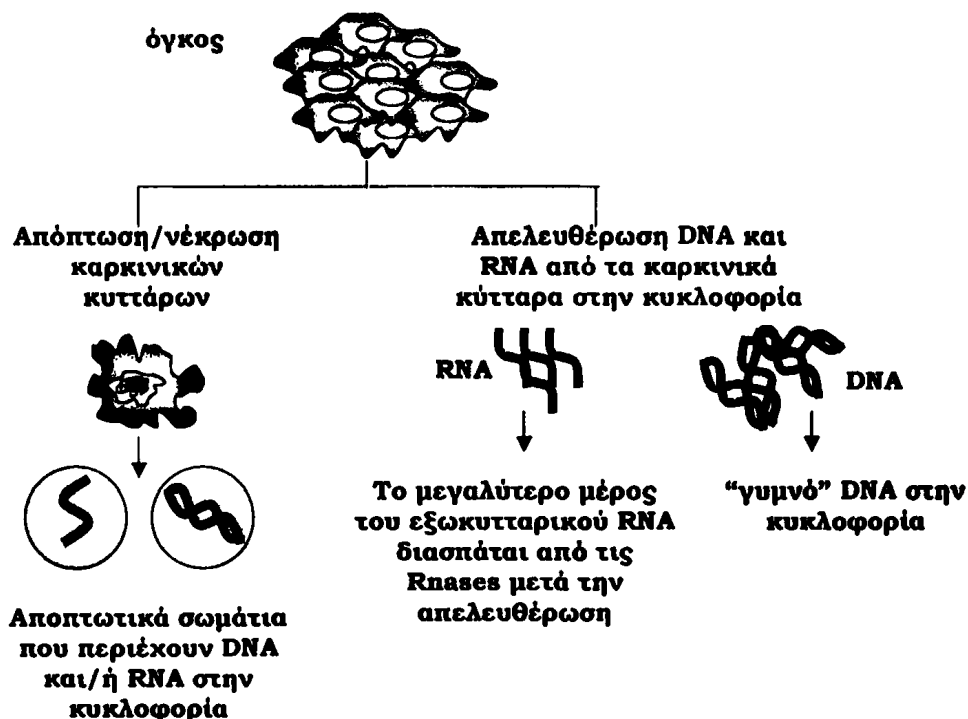
Εικόνα 1. Μετάσταση συμπαγών όγκων.

Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι είναι δυνατή η ανίχνευση «γυμνού» (δηλαδή εξωκυτταρικού) καρκινικού mRNA και DNA στο πλάσμα των καρκινοπαθών, αλλά η μέχρι τώρα γνώση σχετικά με το εξωκυτταρικό RNA είναι ελλιπής^{3,4,5,6,7}.

Έχουν γίνει διάφορες υποθέσεις σχετικά με το μηχανισμό απελευθέρωσης νουκλεϊκών οξέων στο πλάσμα⁸. Θεωρείται ότι προέρχονται από:



1. την απόπτωση καρκινικών κυττάρων και απελευθέρωση νουκλεϊκών οξέων από αυτά
2. τη λύση του όγκου
3. τη λύση των καρκινικών κυττάρων που κυκλοφορούν στο αίμα
4. τη μειωμένη ενεργότητα της δεοξυριβονουκλεάσης (DNase) και ριβονουκλεάσης (RNase) (ένζυμα που διασπούν το DNA και το RNA αντίστοιχα) στους ασθενείς με καρκίνο (εικόνα 2).



Εικόνα 2. Πιθανοί μηχανισμοί απελευθέρωσης νουκλεϊκών οξέων στο πλάσμα/ορό ασθενών με καρκίνο.

Το RNA που κυκλοφορεί στο πλάσμα και στον ορό είναι ένας ακόμα αναδυόμενος τομέας στις διαγνωστικές εφαρμογές. Η ανίχνευση καρκινικού RNA στο πλάσμα και στον ορό ασθενών με καρκίνο^{3, 4, 5, 6, 7} και παραγόμενου από το έμβρυο RNA στο πλάσμα εγκύων γυναικών⁹, έχουν ανοίξει έναν νέο ορίζοντα για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων χρησιμοποιώντας μη επεμβατικές μεθόδους. Η ύπαρξη «γυμνού» RNA στη κυκλοφορία του αίματος είναι μια αξιόλογη ανακάλυψη επειδή το RNA είναι ασταθέστερο από το DNA και επιπλέον είναι γνωστό ότι στο αίμα βρίσκονται ριβονουκλεάσες, οι οποίες θεωρητικά θα έπρεπε να το διασπούν¹⁰. Μέχρι σήμερα, οι ακριβείς μηχανισμοί που προστατεύουν το εξωκυτταρικό RNA από

τη διάσπαση, είναι ακόμα άγνωστοι. Το RNA ενδεχομένως δημιουργεί σύμπλοκα με λιπίδια, πρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες, ή φωσφολιπίδια, ή είναι συνδεδεμένο με το DNA στα νουκλεοσώματα ή βρίσκεται προστατευμένο μέσα σε αποπτωτικά σωματίδια ή άλλες κυστοειδείς δομές¹⁰. Μια εργασία που δημοσιεύτηκε από τους Hasselmann και συνεργάτες έδειξε ότι το RNA in vitro είναι ανθεκτικό στην αποικοδόμηση στον ορό¹¹. Μια άλλη ερευνητική ομάδα έδειξε ότι το μεγαλύτερο μέρος του εξωκυτταρικού RNA στο πλάσμα είναι συνδεδεμένο με σωματίδια¹². Επομένως, το RNA στην κυκλοφορία μπορεί να μην είναι τόσο εύθραυστο όσο είχε θεωρηθεί παλιότερα. Αν και το εξωκυτταρικό RNA είναι ανιχνεύσιμο στο πλάσμα και τον ορό, λίγα είναι γνωστά για τη σταθερότητά του.

Θεωρητικά, για να διατηρηθεί η ακεραιότητα του RNA, ο χρόνος και τα βήματα μεταξύ της λήψης του αίματος και της απομόνωσης RNA πρέπει να μειωθούν στο ελάχιστο. Διάφορες μέθοδοι, όπως το αιφνιδιαστικό πάγωμα του πλάσματος ή η προσθήκη ενός αντιδραστηρίου σταθεροποίησης, έχουν χρησιμοποιηθεί για να μειώσουν την πιθανότητα της αποικοδόμησης του RNA¹⁰. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι το RNA στο πλάσμα είναι σταθερό μέσα στο αντιπηκτικό EDTA όπου αποθηκεύεται το αίμα στους 4 °C, αλλά για να λάβουμε μια σταθερή συγκέντρωση του RNA από όρο, το πηγμένο αίμα πρέπει να αποθηκευτεί στους 4 °C και να υποβληθεί σε επεξεργασία μέσα σε 6 ώρες. Ένας κύκλος παγώματος/ξεπαγώματος δεν έχει καμία σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση RNA του πλάσματος ή του ορού¹⁰.



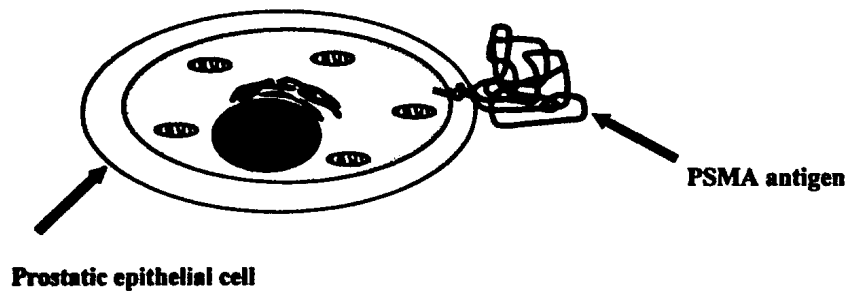
3.1.1 PSMA mRNA στο πλάσμα και στα εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος ασθενών με καρκίνο του προστάτη.

Ο καρκίνος του προστάτη είναι η δεύτερη αιτία θανάτου στους Καυκάσιους. Το ποσοστό καρκίνου του προστάτη, αυξάνεται με τη ηλικία πχ. 82 στους 100.000 άνδρες ηλικίας 50-54 εμφανίζουν καρκίνο του προστάτη σε σχέση με 1362 στους 100.000 άνδρες ηλικίας 70-74¹³. Η θνησιμότητα των ασθενών ποικίλει ανάλογα με την εθνικότητα, αλλά ακόμα και μέσα στο ίδιο πληθυσμό, ο καρκίνος του προστάτη δεν έχει προβλέψιμη πορεία. Αυτό αντικατοπτρίζει την ετερογένεια της νόσου τόσο σε κλινική συμπεριφορά όσο και σε μοριακό επίπεδο. Η διαφυγή καρκινικών κυττάρων με στόχο τα οστά αλλά και τους ιστούς του πνεύμονα και ήπατος, επιτυγχάνεται μέσω του αίματος καθώς και από τους λεμφαδένες.

Για τον έλεγχο πληθυσμών υψηλού κινδύνου, καθώς και για τον ακριβή προσδιορισμό του σταδίου του καρκίνου του προστάτη αλλά και για την παρακολούθηση των ασθενών, χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι όπως η DRE (digital rectal examination), βιοχημικές εξετάσεις (PSA), ιστολογικές αναλύσεις, CT scan, υπέρηχοι (TRUS) και πρόσφατα η ανάλυση μοριακών δεικτών (PSMA).

Το ειδικό μεμβρανικό προστατικό αντιγόνο (PSMA) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 100 kDa η οποία έχει κλωνοποιηθεί από την κυτταρική σειρά LNCaP, από προστατικό αδενοκαρκίνωμα ανθρώπου (Εικόνα 3). Εκφράζεται σε υγιή και καρκινικό προστατικό ιστό ενώ η έκφραση του είναι ετερογενής ή δεν εκφράζεται σε καλοήθεις προστατικές υπερπλασίες. Σε αντίθεση με το PSA, το PSMA είναι μια μη εκκρινόμενη πρωτεΐνη, της οποίας η ύπαρξη συσχετίζεται με την ύπαρξη προστατικών κυττάρων. Η ανίχνευση του PSMA στο αίμα πιστεύεται ότι αντικατοπτρίζει την ύπαρξη μικρομεταστάσεων. Τα τελευταία χρόνια, η αντίστροφη μεταγραφή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό καρκινικών κυττάρων σε μονοπύρνηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος αλλά και σε υπολειμματικά καρκινικά κύτταρα στους περιφερειακούς λεμφαδένες. Η ανίχνευση mRNA του PSMA και του PSA στο αίμα με τη μέθοδο της RT-PCR, μπορεί να συμβάλλει στην εκτίμηση της εξέλιξης της νόσου¹⁴.





Εικόνα 3. PSMA αντιγόνο σε προστατικό επιθηλιακό κύτταρο.

3.1.2 Ανίχνευση CEA mRNA στο πλάσμα και στα εμπύρηνια κύτταρα του αίματος ασθενών με καρκίνο του γαστρεντερικού συστήματος, του μαστού και του προστάτη.

Η οικογένεια CEA (καρκινοεμβρυικό αντιγόνο) περιλαμβάνει 29 γονίδια που βρίσκονται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 19 και από τα οποία 18 εκφράζονται: 7 ανήκουν στην υποομάδα CEA και 11 στην ειδική για την εγκυμοσύνη υποομάδα γλυκοπρωτεϊνών (pregnancy-specific glycoproteins PSG). Η υποομάδα γονιδίων CEA κωδικοποιεί για το CEA και τα αντιγόνα που αλληλεπιδρούν με αυτό και είναι κυρίως συνδεδεμένα στη μεμβράνη, ενώ η άλλη υποομάδα γονιδίων κωδικοποιεί για της γλυκοπρωτεΐνες PSG που εκκρίνονται. Διάφορα μέλη της υποομάδας CEA κατέχουν ιδιότητες κυτταρικής προσκόλλησης και το αρχέγονο μέλος, η χολική γλυκοπρωτεΐνη, φαίνεται ότι λειτουργεί στη μεταγωγή σημάτων ή στη ρύθμιση της μεταγωγής σημάτων ενδεχομένως σε συνδυασμό με άλλα μέλη της υποοικογένειας CEA¹⁵.

Το CEA εκφράζεται πολύ συχνά στα κύτταρα του καρκίνου και αποτελεί ένα σημαντικό καρκινικό δείκτη. Εκφράζεται στο 95% των καρκίνων του ορθού και του παχέος εντέρου, των γαστρεντερικών καρκίνων και του παγκρέατος. Επίσης εκφράζεται στην πλειοψηφία των μη-μικροκυτταρικών καρκίνων του πνεύμονα και σε άλλους τύπους καρκινωμάτων, όπως οι καρκίνοι κεφαλής τραχήλου και στο 50% των καρκίνων του μαστού¹⁵. Η πρωτεΐνη CEA στον ορό χρησιμοποιείται σήμερα για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της θεραπείας στους καρκίνους του ορθού και του παχέος εντέρου¹⁶.

Αν και η πρωτεΐνη CEA εκφράζεται σε πολλούς τύπους όγκων, σπάνια βρίσκεται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα στον ορό. Επιπλέον, ακόμη και στην περίπτωση του καρκίνου του ορθού και του παχέος εντέρου, έχει αποδειχθεί ότι μόνο περίπου οι μισοί από τους ασθενείς είχαν ανιχνεύσιμα επίπεδα CEA κατά τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της θεραπείας¹⁶. Επιπροσθέτως, έχει αποδειχθεί από τη στατιστική ανάλυση ότι, δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του CEA στις βιοψίες όγκων και της παρουσίας της πρωτεΐνης CEA στον ορό¹⁷. Κατά συνέπεια, η ανίχνευση στο αίμα των καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν mRNA του CEA θα μπορούσε πιθανόν να βοηθήσει περισσότερο (από ότι η ανίχνευση της πρωτεΐνης) στην πρόγνωση των ασθενών, στη μελέτη της κλινικής πορείας των ασθενών και την ανάλυση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας.



3.1.3 14-3-3σ σε όγκους και φυσιολογικούς ιστούς ατόμων με καρκίνους του πνεύμονα, μαστού, προστάτη και σε λευχαιμίες.

Το γονίδιο 14-3-3σ (ή stratifin) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1p34.11. Η πρωτεΐνη 14-3-3σ ανήκει σε μία οικογένεια ιδιαίτερα συντηρημένων όξινων πρωτεϊνών τις 14-3-3 πρωτεΐνες οι οποίες υπάρχουν σε τουλάχιστον επτά διαφορετικές ισομορφές στα θηλαστικά. Διάφορες δραστηριότητες έχουν αποδοθεί σε αυτές τις πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της μεταγωγής σημάτων Raf-1 και της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου¹⁸. Εντούτοις, ο μοριακός μηχανισμός πίσω από τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου έχει παραμείνει ασαφής. Η 14-3-3σ εκφράζεται μόνο στα επιθηλιακά κύτταρα, και η έκφρασή της είναι εντυπωσιακά χαμηλή κατά τον κακοήγη μετασχηματισμό. Εντούτοις, ο ρόλος της στην καρκινογένεση δεν είναι πλήρως κατανοητός. Επιπλέον, η πρωτεΐνη 14-3-3σ επάγεται από τη p53 ως απάντηση στην γ-ακτινοβολία και άλλους παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA και συμβάλει στη καταστολή του κυτταρικού κύκλου στη G2 φάση¹⁹.



3.2 DNA δείκτες

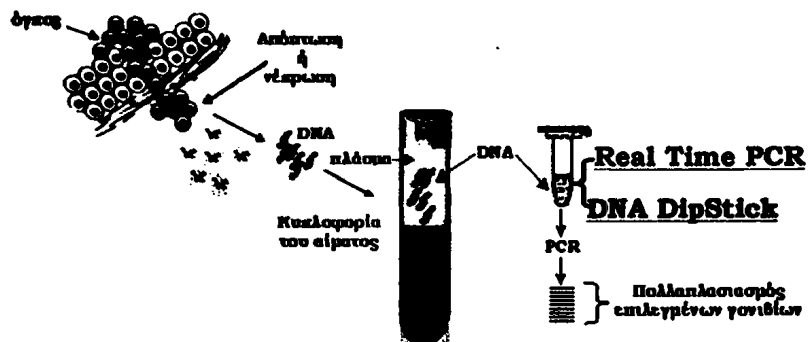
3.2.1 Ποσοτικοποίηση του φορτίου DNA στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του προστάτη, του μαστού και του γαστρεντερικού συστήματος.

Όπως είναι γνωστό το πλάσμα είναι το ρευστό τμήμα του αίματος από το οποίο έχουν διαχωριστεί τα αιμοσφαίρια και τα κύτταρα, ενώ ο ορός είναι το υγρό μέρος του αίματος αφότου αυτό έχει πήξει. Διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η ποσότητα DNA που μπορεί να ανιχνευθεί στα δύο αυτά υλικά είναι σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με καρκίνο²⁰. Καρκινικής προέλευσης εξωκυτταρικό DNA έχει μελετηθεί και ανιχνευτεί στη πλειονότητα των καρκίνων^{21, 22}.

Η προέλευση και οι μηχανισμοί απελευθέρωσης των ελεύθερων από κύτταρα («γυμνών») νουκλεϊκών οξέων στο πλάσμα, καθώς και οι μηχανισμοί προστασίας τους από τη δράση των δεοξυριβονουκλεασών (Dnase) και των ριβονουκλεασών (Rnase) είναι άγνωστοι. Η πιο κοινή υπόθεση είναι ότι προέρχονται από τη λύση των καρκινικών κυττάρων που κυκλοφορούν στο αίμα, καθώς επίσης ότι απελευθερώνονται μέσω της νέκρωσης όγκων, της απόπτωσης ή μέσω ενεργής απελευθέρωσης στην κυκλοφορία (εικόνες 2 και 4)⁸.

Η απελευθέρωση DNA στο αίμα των ασθενών με καρκίνο, διαμέσου των παραπάνω μηχανισμών, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ολικής ποσότητας DNA (φορτίο DNA) που ανιχνεύεται στο πλάσμα^{22, 23}. Η ποσοτικοποίηση του φορτίου DNA στο πλάσμα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως καρκινικός δείκτης. Επιπλέον, η παρακολούθηση της μεταβολής της συγκέντρωσης του DNA κατά την εξέλιξη της νόσου και στη διάρκεια της φαρμακευτικής αγωγής, μπορεί να φανεί χρήσιμη ως προγνωστικός δείκτης.



DNA quantitation : μέθοδος

Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση του βιολογικού μονοπατιού που οδηγεί στην απελευθέρωση του καρκινικού DNA και η εν συνεχεία ταυτοποίησή του με PCR.

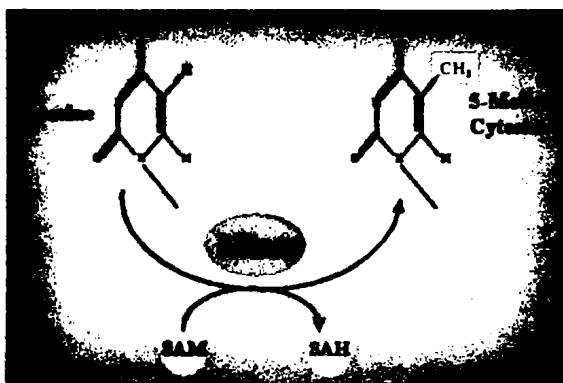
3.2.2 Μεθυλίωση του DNA

Το DNA, όπως είναι γνωστό, αποτελείται από τέσσερις βάσεις (αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη και κυτοσίνη) από τις οποίες μπορούν να σχηματιστούν 16 συνδυασμοί δινουκλεοτιδίων (AA, AT, AC, AG, TT, TA, TC, TG, CC, CA, CT, CG, GG, GA, GT και GC). Έτσι η πιθανότητα να βρεθεί ένα οποιοδήποτε δινουκλεοτίδιο σε μία δεδομένη ακολουθία DNA είναι $1/16$ ή (~6%). Στον άνθρωπο όμως η συχνότητα των δινουκλεοτιδίων CpG (κυτοσίνη-γουανίνη) είναι πολύ χαμηλή, ένα φαινόμενο που αναφέρεται ως καταστολή των CG. Η καταστολή των CG είναι χαρακτηριστική όλων των γονιδιωμάτων που χρησιμοποιούν τη μεθυλίωση της κυτοσίνης και μπορεί να σχετίζεται με την αυξημένη μεταλλαξιμότητα της μεθυλιωμένης κυτοσίνης. Το φαινόμενο της καταστολής των CG είναι εμφανές σε όλη την έκταση του ανθρώπινου γονιδιώματος εκτός από μικρές περιοχές οι οποίες έχουν μήκος 300-3000 ζεύγη βάσεων όπου η συχνότητα των CpGs είναι είτε η ίδια είτε πολύ μεγαλύτερη από την αναμενόμενη. Αυτές οι περιοχές ονομάζονται νησίδες CpG και πιστεύεται ότι αποτελούν το 1% του γονιδιώματος. Η αιτία για την οποία οι νησίδες CpG διέφυγαν από το φαινόμενο της CG καταστολής κατά την εξέλιξη, είναι ότι κανονικά είναι μη μεθυλιωμένες και έτσι διαφεύγουν από τη μεταλλαξογόνο πίεση που περιγράφηκε πιο πάνω. Οι νησίδες CpG παρατηρήθηκαν αρχικά στο 5' άκρο των γονιδίων που εκφράζονται. Πάνω από το 60% των υποκινητών των ανθρώπινων γονιδίων περιέχονται σε τέτοιες περιοχές. Πάντως, πολλές νησίδες CpG δεν βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων και η σημασία τους παραμένει αδιευκρίνιστη.

Το ενδιαφέρον μας εστιάζεται στις CpG νησίδες των υποκινητών, γιατί όταν αυτές μεθυλιώνονται το γονίδιο καταστέλλεται μόνιμα και αυτή η καταστολή μεταδίδεται κατά τη μίτωση. Η μεθυλίωση των νησίδων CpG πιστεύεται ότι *αντιπροσωπεύει ένα επιγενετικό τρόπο κληρονομικότητας*, είναι δηλαδή αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων που είναι κληρονομήσιμες κατά την κυτταρική διαίρεση χωρίς να συνδυάζονται με αλλαγές στην ακολουθία του DNA.

Η μεθυλίωση αποτελεί μια χημική τροποποίηση που επάγεται από ένζυμα και κατά την οποία προστίθενται ομάδες μεθυλίου σε συγκεκριμένες θέσεις σε πρωτεΐνες DNA και RNA²⁴. Στον άνθρωπο και τα περισσότερα θηλαστικά, η μεθυλίωση του DNA είναι η μόνη γνωστή φυσιολογική τροποποίηση του DNA και επιδρά στην κυτοσίνη που ακολουθείται από γουανίνη. Έτσι σε αυτούς τους οργανισμούς η μεθυλίωση του DNA συμβαίνει σε θέσεις CpG. 70-80% όλων των CpG θέσεων στο

ανθρώπινο DNA είναι μεθυλιωμένες. Πάντως, αυτή η μεθυλίωση συμβαίνει κυρίως σε περιοχές όπου η πυκνότητα των CpG είναι χαμηλή ή σε θέσεις επαναλαμβανόμενου DNA όπως τα στοιχεία Alu. Το μεγαλύτερο ποσοστό των νησίδων CpG (όπου η συχνότητα των CpG είναι υψηλή) είναι εντελώς αμεθυλίωτο, τουλάχιστον σε νεαρούς ανθρώπους. Ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA δεν έχει διευκρινιστεί εντελώς. Κατά τη διάρκεια των ετών προτάθηκαν διάφοροι ρόλοι για τη μεθυλίωση του DNA, όπως ρόλος στην έκφραση των γονιδίων, έλεγχος της χρωμοσωμικής ακεραιότητας και έλεγχος των γεγονότων ανασυνδυασμού. Πιο πρόσφατα προτάθηκε ότι η μεθυλίωση του DNA δημιουργήθηκε αρχικά κατά την εξέλιξη, ως ένας μηχανισμός ενάντια στις παρασιτικές ακολουθίες του DNA στο γονιδίωμα όπως τα ρετροϊκά στοιχεία, οι Alu κλπ.



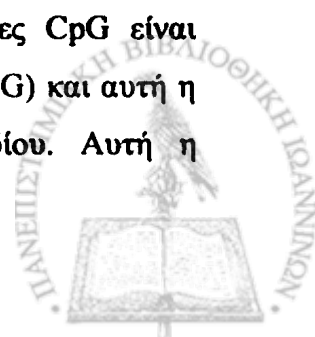
Εικόνα 5. Η μεθυλίωση του DNA αναφέρεται στη μεταφορά μιας ομάδας μεθυλίου σε μία από τις βάσεις που αποτελούν το DNA. Η αντίδραση καταλύεται από μία DNA μεθυλτρανσφεράση (Mtase) και

χρησιμοποιεί S αδενοσυλμεθειονίνη (SAM) ως δότη μεθυλίων. Στον άνθρωπο η φυσιολογική μεθυλίωση του DNA περιορίζεται στη βάση κυτοσίνη.

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, οι νησίδες CpG φυσιολογικά προστατεύονται από κάθε είδος μεθυλίωσης του DNA αν και αυτές οι περιοχές είναι πλούσιες σε CpG δινουκλεοτίδια. Αυτό είναι πολύ σημαντικό για τις νησίδες CpG που βρίσκονται στον υποκινητή, γιατί η μη μεθυλιωμένη κατάσταση είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή του αντίστοιχου γονιδίου. Υπάρχουν δύο εξαιρέσεις σε αυτό τον κανόνα²⁴:

1. τα γονίδια στο ανενεργό X χρωμόσωμα
2. τα εντυπωμένα (imprinted) γονίδια

και στις δύο περιπτώσεις οι υποκινητές που περιέχουν τις νησίδες CpG είναι μεθυλιωμένες σε πολλές (αλλά όχι αναγκαστικά σε όλες τις θέσεις CpG) και αυτή η μεθυλίωση σχετίζεται με τη μεταγραφική καταστολή του γονιδίου. Αυτή η

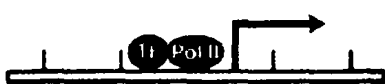


καταστολή είναι κληρονομήσιμη (δια μέσου της κυτταρικής διαίρεσης, μέσω της δράσης της μεθυλοτρανσφεράσης η οποία αναπαράγει το σχέδιο μεθυλίωσης του μητρικού κυττάρου) και πιστεύεται ότι είναι μη αναστρέψιμη, εκτός αν γίνει χρήση αναστολέων της μεθυλίωσης.

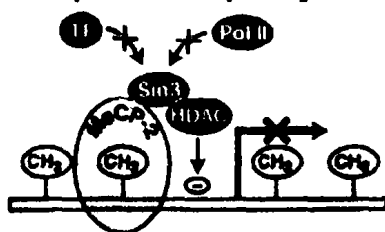
Το γεγονός ότι η μεθυλίωση είναι σημαντική για τη καταστολή των γονιδίων αποδεικνύεται από δύο πειράματα:

- Η απώλεια της μεθυλίωσης του DNA, η οποία επάγεται από ομόζυγη έλλειψη του γονιδίου της DNA μεθυλοτρανσφεράσης, έχει ως αποτέλεσμα την επανέκφραση των κατασταλμένων γονιδίων.
- Η καταστολή της DNA μεθυλοτρανσφεράσης (με χρήση φαρμάκων) έχει ως αποτέλεσμα την απομεθυλίωση και επανέκφραση των κατασταλμένων γονιδίων²⁴.

1. Ενεργή μεταγραφή



2. Καταστολή της μεταγραφής που επάγεται από τη MeCp-2



Μεθυλιωμένες
CpG
Αμεθυλιωτες
CpG

Εικόνα 6

Η επαγωγή της μεθυλίωσης των νησίδων CpG (στο X χρωμόσωμα και στα imprinted γονίδια) πιστεύεται ότι γίνεται από παράγοντες που δρουν in trans και οι οποίοι επάγουν τοπικά τη μεθυλίωση, ίσως επιτρέποντας την πρόσβαση της DNA μεθυλοτρανσφεράσης στις νησίδες.

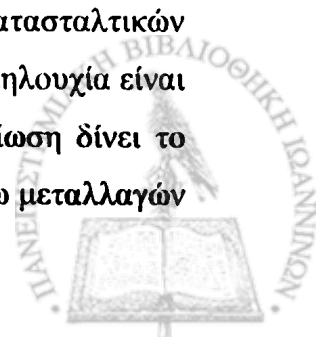
Ο μηχανισμός της καταστολής των γονιδίων μέσω μεθυλίωσης των νησίδων CpG μόλις αρχίζει να γίνεται γνωστός. Το μοντέλο που επικρατεί σήμερα (εικόνα 6) εμπεριέχει την αρχική σύνδεση πρωτεϊνών που συνδέονται με μεθυλιωμένο DNA (όπως η MeCp2) η οποία ακολουθείται από το σχηματισμό ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών που συμπεριλαμβάνει ιστόνες, αποακετυλάσες και άλλες πρωτεΐνες²⁴. Αυτό το

σύμπλοκο επάγει τον σχηματισμό ενός κλειστού χρωματινικού συμπλέγματος το οποίο αποκλείει τους μεταγραφικούς παράγοντες από την περιοχή του υποκινητή και έχει ως αποτέλεσμα τη (μη αναστρέψιμη) καταστολή του γονιδίου.



Στα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται μια γενική μείωση της μεθυλίωσης της κυτοσίνης. Κατά παράδοξο τρόπο το αντίθετο συμβαίνει στις φυσιολογικά μη μεθυλιωμένες νησίδες CpG (κυτοσίνη φωσφορικό γουανοσίνη), σε περιοχές υποκινητών διαφόρων γονιδίων. Η υπομεθυλίωση πιστεύεται ότι συμβάλλει στην χρωμοσωμική αστάθεια και πιθανόν αυξάνει την έκφραση ορισμένων πρωτοογκογονιδίων. Αντίθετα, η υπερμεθυλίωση προκαλεί καταστολή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και των επιδιορθωτικών γονιδίων και ίσως αυξάνει τη πιθανότητα μεταλλαγών σε αυτές τις περιοχές. Αυτό συμβαίνει γιατί η 5-μεθύλκυτοσίνη είναι περισσότερο ασταθής από τη μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη και μπορεί να υποστεί απαμίνωση σε θυμίνη. Αυτή η αλλαγή συχνά δεν γίνεται αντιληπτή από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Από την άλλη πλευρά η μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη μπορεί να υποστεί απαμίνωση σε ουρακίλη, η οποία δεν βρίσκεται κανονικά στο DNA με συνέπεια να αναγνωρίζεται και να επιδιορθώνεται. Τα πρώτα γονίδια που αποδείχτηκε ότι παρουσιάζουν ανώμαλη μεθυλίωση των νησίδων CpG τον υποκινητή κατά τον καρκίνο ήταν η καλσιτονίνη και το MyoD. Σύντομα διαπιστώθηκε ότι η μεθυλίωση του υποκινητή αποτελεί ένα από τους μηχανισμούς απενεργοποίησης πολλών ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως το Rb, VHL και P16, σε ένα μεγάλο αριθμό σποραδικών καρκίνων.

Μετά την ανακάλυψη της μεθυλίωσης των νησίδων CpG σε νεοπλασματικά κύτταρα, βρέθηκε ότι αυτή η επιγενετική τροποποίηση του DNA, ξεκινάει από τα φυσιολογικά κύτταρα του προσβληθέντος ιστού και μπορεί να αποτελεί το αρχικό βήμα για τον κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων. Στη πραγματικότητα βρέθηκε ότι η μεθυλίωση στον υποκινητή ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων αυξάνεται ως αποτέλεσμα της αύξησης της ηλικίας των κυττάρων, τα οποία εμφανίζονται ως φυσιολογικά. Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε ότι η υπερμεθυλίωση θα μπορούσε να αποτελεί το μοριακό σύνδεσμο μεταξύ της ηλικίας και της εμφάνισης του καρκίνου. Δεν παρουσιάζουν όμως όλα τα γονίδια, τα οποία υπόκεινται σε υπερμεθυλίωση κατά τον καρκίνο, αυτό το σύνδεσμο με την ηλικία. Γενικά, γονίδια των οποίων οι υποκινητές υπόκεινται σε μεθυλίωση νησίδων CpG δεν εκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα και αυτή η έκφραση μπορεί να αποκατασταθεί με χορήγηση του καταστολέα της μεθυλίωσης 5-deoxy-azacytidine. Στη περίπτωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων η μεθυλίωση του υποκινητή και οι μεταλλαγές στη κωδική αλληλουχία είναι γεγονότα τα οποία αλληλοαποκλείονται, υποδηλώνοντας ότι η μεθυλίωση δίνει το ίδιο επιλεκτικό πλεονέκτημα στα κύτταρα όπως η απενεργοποίηση μέσω μεταλλαγών



και αποτελεί εναλλακτικό μηχανισμό της απενεργοποίησης των γονιδίων στον καρκίνο.

Έχει διαπιστωθεί ότι η μεθυλίωση του υποκινητή αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς απενεργοποίησης πολλών ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως το Rb, VHL, p16 και p15 σε μεγάλο αριθμό σποραδικών καρκίνων²⁵ (πίνακας Α).

Πίνακας Α. Γονίδια που υπόκεινται σε μεθυλίωση του υποκινητή κατά την καρκινογένεση (<http://www.mdanderson.org/departments/methylation/>).

Γονίδιο	Γενετική θέση	Ποσοστό μεθυλίωσης
ABL1*	9q34.1	Αιματολογικές κακοήθειες
APC*	5q21	Καρκίνοι του παχέος εντέρου, του οισοφάγου και του γαστρεντερικού συστήματος
AR *	Xq11-12	Κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη
BRCA1*	17q21	10-20% στο καρκίνο του μαστού και σε καρκίνους των ωοθηκών
CALCA *	11p15	25-75% σε καρκίνους του παχέος εντέρου και του ορθού, σε καρκίνους του πνεύμονα και σε αιματολογικές κακοήθειες
CD44*	11pter-p13	Καρκίνος του προστάτη
GSTP1*	11q13	80-100% στον καρκίνο του προστάτη και του ήπατος. 30-60% σε καρκίνους του παχέος εντέρου, μαστού και νεφρών.
MGMT *	10q26	25-50% σε καρκίνους του εγκεφάλου, καρκίνους του πνεύμονα, μαστού και παχέος εντέρου
P15 (CDKN2B)*	9p21	80% σε λευχαιμίες, 2-20% σε καρκίνους του παχέος εντέρου, του πνεύμονα και του μαστού
P16 (CDKN2A)*	9p21	20-30% σε καρκίνους του πνεύμονα (NSCLC) 25-35% σε καρκίνους του παχέος εντέρου 5-25% σε λεμφώματα (ανάλογα με το στάδιο) και σε πολλούς άλλους
WT1*	11p13	90% σε καρκίνους του μαστού, 20-50% καρκίνους του παχέος εντέρου, 5-10% στο καρκίνο Wilm's
RASSF1A*	3p21.3	Καρκίνοι του πνεύμονα και του μαστού
14-3-3σ	1p	Καρκίνοι του μαστού και του γαστρεντερικού συστήματος

*Συντμήσεις:

ABL1: v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1

APC: adenomatosis polyposis coli



AR: Androgen Receptor

BRCA: Breast Cancer 1

CALCA: Calcitonin

CD44: CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)

GSTP1: Glutathione S transferase P1

MGMT: O⁶ methyl guanine methyl transferase

P15: cyclin-dependent kinase inhibitor 2B *p15^{INK4b}*

P16: D-type cyclin-dependent kinase inhibitor *p16^{INK4A}*

WT1: Wilms tumor 1

RASSF1A: Ras Association Domain Family 1A

Η κατανόηση της μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο έχει σημαντικές κλινικές εφαρμογές και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως καρκινικός δείκτης. Αυτό συμβαίνει γιατί η μεθυλίωση αρκετών γονιδίων αποτελεί πιθανότατα ένα εξειδικευμένο επιγενετικό γεγονός που συντελείται κατά τον κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων. Επιπλέον, καρκινικό DNA ανιχνεύεται επίσης και στο πλάσμα. Έτσι η υπερμεθυλίωση γονιδίων μπορεί να μελετηθεί και σε αυτό το δείγμα. Η ανίχνευση τέτοιων δεικτών στο DNA του πλάσματος μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη για την διάγνωση πολλών μορφών καρκίνου. Για παράδειγμα, απενεργοποίηση του *p16* μέσω μεθυλίωσης παρατηρείται συχνά στις ανθρώπινες νεοπλασίες^{25, 26}.

Υπάρχουν όμως και άλλα γονίδια δείκτες τα οποία είναι ανιχνεύσιμα σε μεγαλύτερο ποσοστό στο πλάσμα ασθενών με συγκεκριμένες μορφές καρκίνου. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η μεθυλίωση του επιδιορθωτικού γονιδίου του DNA, hMLH1 (mutL homolog 1), η οποία παρατηρείται στην πλειοψηφία των σποραδικών καρκινωμάτων του ενδομητρίου και του παχέος εντέρου με μικροδορυφορική αστάθεια²⁷. Η ανίχνευση της γονιδιακής μεθυλίωσης στο πλάσμα μπορεί να είναι ο ιδανικός δείκτης για ορισμένες μορφές καρκίνου. Επιπλέον, το σχέδιο μεθυλίωσης που ανιχνεύεται στον ορό μπορεί να μας παρέχει πληροφορίες για τη βιολογική συμπεριφορά του πρωταρχικού όγκου. Για παράδειγμα, η ανεύρεση απενεργοποίησης στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο DAP kinase θεωρείται ότι υποδεικνύει το μεταστατικό δυναμικό του όγκου²⁸. Επίσης, η ανίχνευση υπερμεθυλίωσης στο γονίδιο O⁶-μεθύλ-γουανινο-DNA μεθυλοτρανσφεράση (O⁶-methyl-guanine-methyltransferase ή MGMT) το οποίο στη μη μεθυλιωμένη του μορφή προκαλεί

ανθεκτικότητα στους αλκυλιωτικούς παράγοντες, μπορεί χρησιμοποιηθεί για να υποδείξει τη καταλληλότερη χημειοθεραπευτική αγωγή²⁹.

Μία από τις πιο ευαίσθητες μεθόδους για την ανάλυση της μεθυλίωσης είναι αυτή που χρησιμοποιεί διθειώδες νάτριο. Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τη χαρτογράφηση των 5-μεθυλκυτοσινών και εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι το διθειώδες νάτριο (NaHSO_3) αντιδρά γρήγορα με τον 5,6 διπλό δεσμό της κυτοσίνης, αλλά αντιδρά φτωχά με τις μεθυλιωμένες κυτοσίνες. Η κυτοσίνη αντιδρά με το διθειώδες ανιόν για να σχηματίσει μία ενδιάμεση θειική κυτοσίνη που είναι επιρρεπής στην απαμίνωση και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της θειικής ουρακίλης. Η θειική ομάδα μπορεί να απομακρυνθεί σε βασικές συνθήκες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ουρακίλης. Η ουρακίλη αναγνωρίζεται ως θυμίνη από τη Taq πολυμεράση και ενισχύεται στη PCR. Το προϊόν που παράγεται θα περιέχει κυτοσίνη μόνο στη θέση όπου υπήρχε 5-μεθύλκυτοσίνη στην αρχική οδηγό αλυσίδα του DNA. Ο βαθμός μεθυλίωσης των νησίδων CpC του υποκινητή του γονιδίου που εξετάζεται καθορίζεται από χημική τροποποίηση των μη μεθυλιωμένων, αλλά όχι των μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες. Η ειδική για την μεθυλίωση αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Methylation Specific PCR ή MSP) εκτελείται με εκκινητές ειδικούς τόσο για το μεθυλιωμένο όσο και για το τροποποιημένο, μη μεθυλιωμένο DNA.

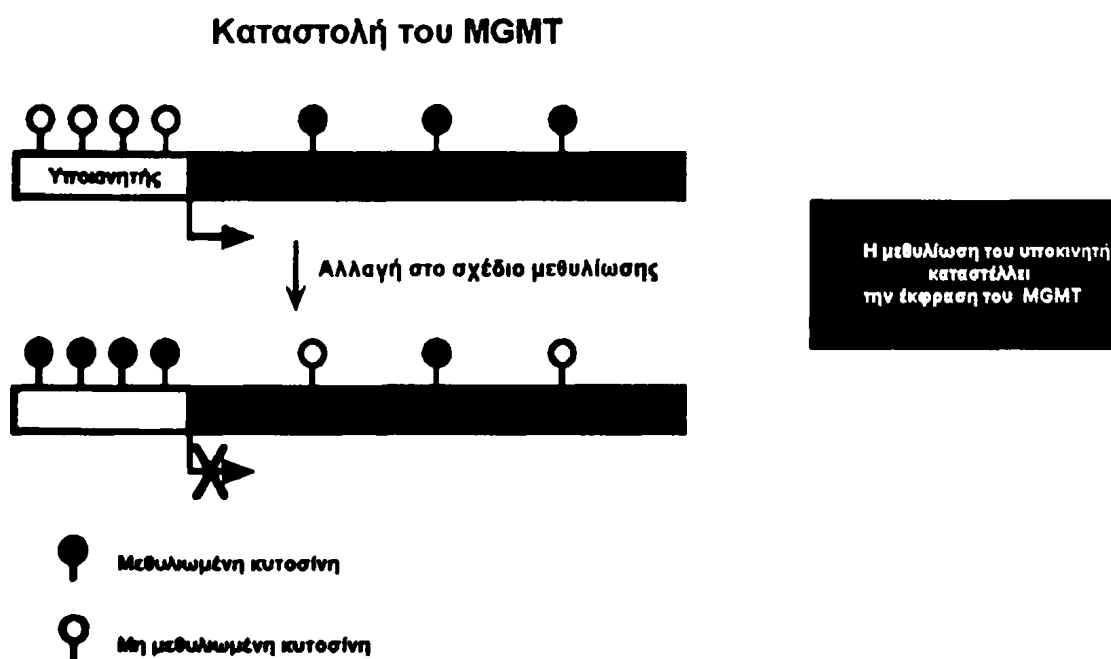
Στη συνέχεια θα μελετήσουμε τη μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων:

- MGMT (DNA O⁶-μεθύλ-γλουταμινο-DNA μεθυλοτρανσφεράση)
- 14-3-3σ
- GSTP1 (Glutathione S transferase P1)
- RASSF1A (Ras Association Domain Family 1A)
- ATM (Ataxia–Telangiectasia Mutated)



3.2.2.1 MGMT.

Το γονίδιο MGMT (O^6 -μεθύλ-γουανινο-DNA μεθυλοτρανσφεράση)) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10q26. Το προϊόν του είναι ένα ένζυμο επιδιόρθωσης του DNA που καταστέλλει το θάνατο των καρκινικών κυττάρων από αλκυλιωτικούς παράγοντες. Ψηλά επίπεδα αυτού του ενζύμου στους όγκους προκαλούν ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες. Η ενεργότητα του MGMT ελέγχεται από ένα υποκινητή. Η μεθυλίωση του υποκινητή καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου στον καρκίνο και τα κύτταρα δεν παράγουν πια MGMT (εικόνα 7).



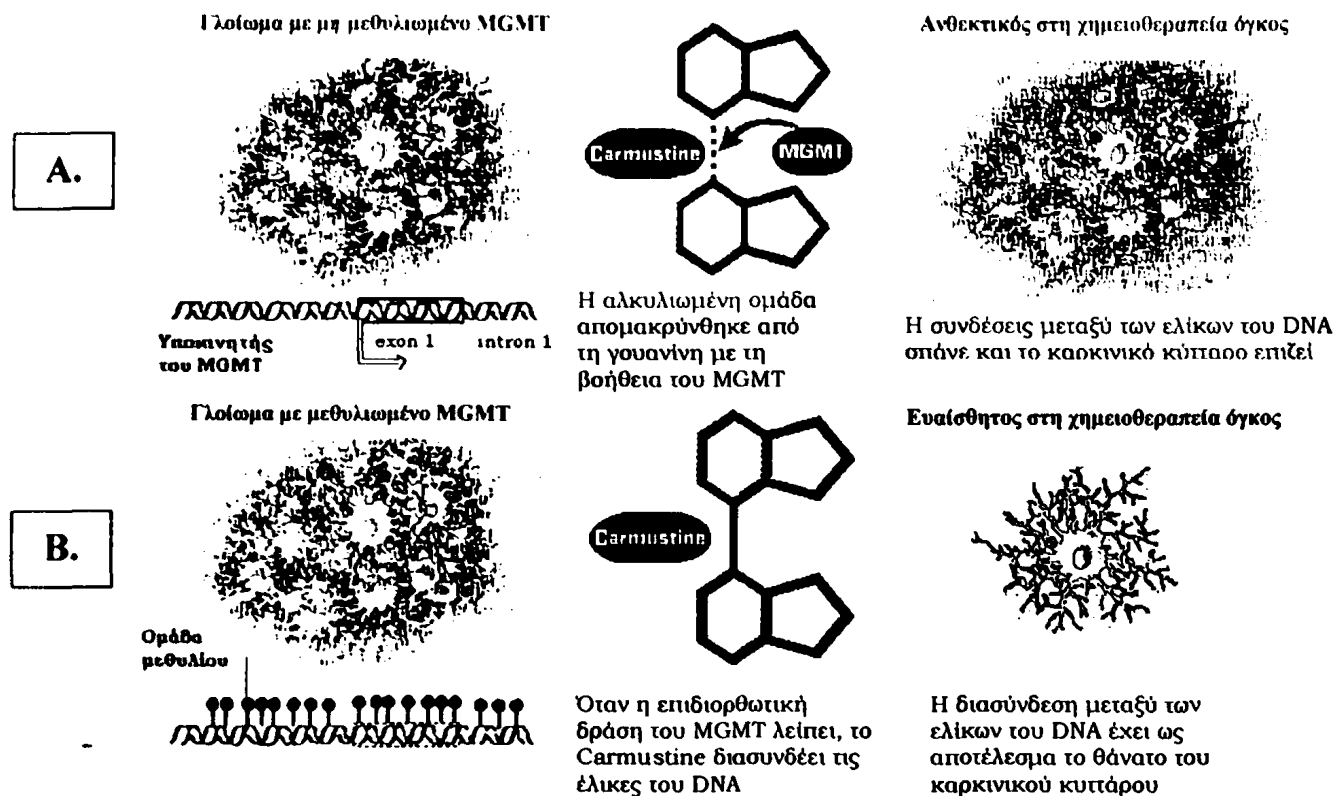
Εικόνα 7. Η καταστολή του επιδιορθωτικού ενζύμου MGMT μπορεί να συμβεί μέσω της επιγενετικής δράσης της μεθυλίωσης του DNA στις νησίδες CpG οι οποίες βρίσκονται στη περιοχή του υποκινητή.

Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες είναι πολύ δραστικά μόρια που προκαλούν κυτταρικό θάνατο μετά από σύνδεσή τους με το DNA. Η πιο συχνή θέση αλκυλίωσης του DNA είναι η O⁶ της γουανίνης. Η αλκυλίωση σε αυτή τη θέση προκαλεί το σχηματισμό διανηματικών συνδέσεων (cross links) μεταξύ των γειτονικών αλυσίδων του DNA και αυτό εξηγεί πως οι αλκυλιωτικοί παράγοντες, όπως οι νιτροζουρίες, οι τετραζίνες και οι προκαρβαζίνες, σκοτώνουν τα κύτταρα. Ο σχηματισμός διανηματικών συνδέσεων της διπλής έλικας του DNA από αλκυλιωτικούς παράγοντες, καταστέλλεται από το επιδιορθωτικό ένζυμο του DNA, O⁶-μεθυλ-γουανινο-DNA μεθυλοτρανσφεράση (MGMT), γνωστό επίσης και ως O⁶-αλκύλ-γουανινο-DNA αλκυλοτρανσφεράση (MGMT). Η πρωτεΐνη MGMT επιδιορθώνει την αλκυλίωση στη θέση O⁶ της γουανίνης, αποτρέποντας το σχηματισμό των θνησιγόνων διανηματικών συνδέσεων. Μέσω αυτού του μηχανισμού η MGMT προκαλεί ανθεκτικότητα στα αλκυλιωτικά φάρμακα²⁹.

Τα επίπεδα της MGMT διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου και μπορεί να διαφέρουν επίσης και μεταξύ όγκων του ίδιου τύπου. Για παράδειγμα, στο 30 % των γλοιωμάτων υπάρχει έλλειψη του MGMT. Αυτή η έλλειψη του ενζύμου μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία των καρκινικών όγκων στους αλκυλιωτικούς παράγοντες (όπως το Carmustine ή BCNU)³⁰. Το γονίδιο MGMT συνήθως δεν είναι μεταλλαγμένο και δεν χάνεται, η έλλειψη του MGMT μπορεί να προκαλείται από αλλαγές που δεν μεταβάλλουν τη γενετική πληροφορία του κυττάρου. Η μεθυλίωση του DNA είναι ο κύριος τύπος τέτοιων επιγενετικών τροποποιήσεων στους ανθρώπους και παίζει σημαντικό ρόλο στη καρκινογένεση. Η μεθυλίωση των νησίδων CpG στο γονίδιο MGMT, καταστέλλει τη μεταγραφή του ενζύμου και σε κυτταρικές σειρές όπου δεν μπορεί να γίνει επιδιόρθωση της αλκυλίωσης της O⁶ μεθυλογουανίνης, ο υποκινητής του MGMT είναι μεθυλιωμένος. Επιπλέον η χρήση in vitro απομεθυλωτικών φαρμάκων επαναφέρει την έκφραση του γονιδίου MGMT σε αυτά τα κύτταρα.

Υπερμεθυλίωση στο επιδιορθωτικό ένζυμο MGMT, έχει ανιχνευθεί σε πολλές μορφές καρκίνου. Μεθυλίωση στο γονίδιο αυτό ανιχνεύεται στο 40% των ασθενών με γλοίωμα και καρκίνο του παχέος εντέρου και στο 25% των ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και λέμφωμα^{29, 31}.





Εικόνα 8. Ο μηχανισμός της ενισχυμένης χημειοευαισθησίας, η οποία είναι αποτέλεσμα της επιγενετικής απενεργοποίησης του επιδιορθωτικού ενζύμου MGMT.

A. Όγκοι με μη μεθυλιωμένο υποκινητή του MGMT και εξόνιο 1 εκφράζουν τη πρωτεΐνη MGMT, η οποία απομακρύνει τις ομάδες μεθυλίου από την O⁶ θέση της γουανίνη στο DNA, που παράγονται από τη χορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (όπως το Carmustine ή BCNU) και αυτό προκαλεί ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων στη τοξική δράση του φαρμάκου²⁹.

B. Αντίθετα, όγκοι με μεθυλίωση στον υποκινητή του MGMT και στο εξόνιο 1, παρουσιάζουν μεταγραφική καταστολή του MGMT, η οποία οδηγεί σε έλλειψη της πρωτεΐνης MGMT. Οι διασυνδέσεις μεταξύ των ελίκων του DNA, που δημιουργούνται λόγω της δράσης του φαρμάκου σε αυτούς τους όγκους, δεν απομακρύνονται από το MGMT και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων λόγω της τοξικότητας του φαρμάκου.

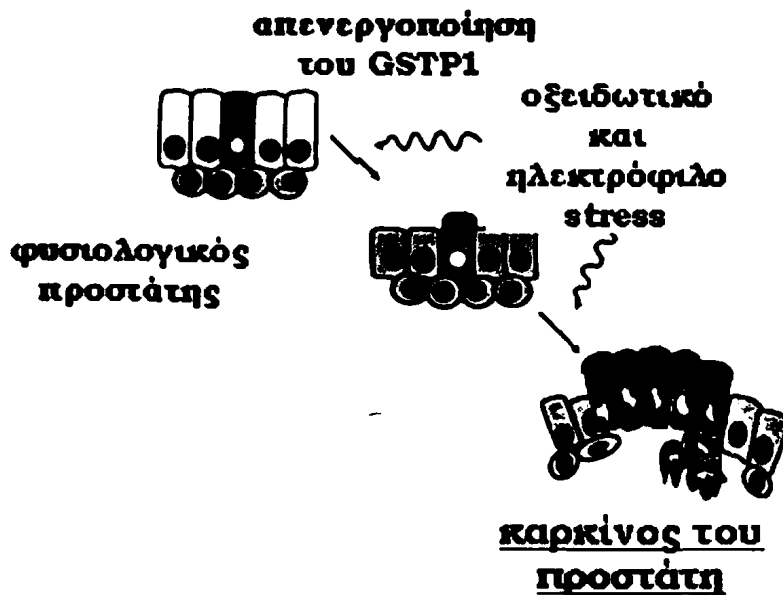
3.2.2.2 14-3-3σ

Η πρωτεΐνη 14-3-3σ εκφράζεται μόνο στα επιθηλιακά κύτταρα, και η έκφρασή της είναι εντυπωσιακά χαμηλή κατά τον κακοήγη μετασχηματισμό. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου καταστέλλεται μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή σε επιθηλιακούς καρκίνους^{32, 33, 34}. Μεθυλίωση στον υποκινητή του 14-3-3σ έχει βρεθεί σε καρκίνους του μαστού, του γαστρεντερικού συστήματος και των πνευμόνων.

3.2.2.3 GSTP1

Το γονίδιο GSTP1 (Glutathione S transferase P1), βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11q13. Το προϊόν του γονιδίου είναι ένα μεταβολικό ένζυμο το οποίο ανήκει σε μία οικογένεια ισοενζύμων, τις Glutathione S transferases που συμμετέχουν σε αντιδράσεις αποτοξίνωσης των κυττάρων και παρέχουν προστασία στα κύτταρα των θηλαστικών ενάντια στους ηλεκτρόφιλους μεταβολίτες των καρκινογόνων (εικόνα 9). Υπερμεθυλίωση στον υποκινητή του GSTP1 παρατηρείται στο 90% των καρκινικών ιστών του προστάτη. Η υπερμεθυλίωση του GSTP1, είναι η πιο συχνή μεταβολή του DNA σε προστατικό αδеноκαρκίνωμα και προκαλεί καταστολή της μεταγραφής του. Υπερμεθυλίωση του υποκινητή του GSTP1 δεν παρατηρείται σε φυσιολογικούς προστατικούς ιστούς καθώς και σε καλοήθεις προστατικές υπερπλασίες και είναι σπάνια σε μη προστατικές κακοήθειες. Έτσι, αυτή η επιγενετική μεταβολή του DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός δείκτης για τον καρκίνο του προστάτη³⁵.





Εικόνα 9. Μετασχηματισμός φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά μέσω της δράσης του GSTP1³⁵.

3.2.2.4 RASSF1A

Η υπεροικογένεια Ras (Ha-, Ki- και N-Ras) είναι μικρές συνδεδεμένες με GTP πρωτεΐνες που παίζουν κεντρικό ρόλο στα μονοπάτια ενδοκυτταρικής μεταγωγής σημάτων διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού. Οι Ras πρωτεΐνες έχει αποδειχθεί ότι μεταβιβάζουν πληροφορίες από υποδοχείς κινασών τυροσίνης (όπως ο υποδοχέας EGF), από υποδοχείς που δεν συνδέονται με κινάσες τυροσίνης (όπως ο υποδοχέας του κυτταρικού αντιγόνου T) και από ετεροτριμερικούς υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες. Στην ενεργή, συνδεδεμένη με GTP μορφή, οι Ras GTPases αλληλεπιδρούν με διάφορες πρωτεΐνες στόχους που ονομάζονται Ras-τελεστές (effectors) και προάγουν τα κυτταρικά γεγονότα. Οι Ras-τελεστές περιλαμβάνουν τη Rasf-1, τη φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη 3' κινάση, την Af-6, τη RalGDS και τη Norel³⁶. Οι Ras-τελεστές έχουν ομοιότητες που βασίζονται σε ομολογία στην αλληλουχία μέσα σε μία συγκεκριμένη περιοχή (domain) που ονομάζεται περιοχή συνδέσμου Ras (Ras Association Domain).



Ένα γονίδιο που ταυτοποιήθηκε και κλωνοποιήθηκε πρόσφατα είναι το ομόλογο των Ras-τελεστών RASSF1 (Ras Association Domain Family)³⁷. Το RASSF1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3p21.3, εντός μιας περιοχής 120kb που συχνά επιδεικνύει απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH), σε καρκίνους του πνεύμονα και του μαστού³⁷. Η απώλεια ετεροζυγωτίας της περιοχής 3p21.3 δεν περιορίζεται όμως μόνο σε αυτούς του τύπους καρκίνου, υποδεικνύοντας ότι αυτή η περιοχή πιθανότατα κατέχει ένα πιο οικουμενικό ρόλο ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Πράγματι, οι ιδιότητες του γονιδίου RASSF1 σε διάφορους όγκους υποδεικνύουν ότι πρόκειται για ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Το RASSF1 έχει τρία κύρια μετάγραφα (A, B και C) που προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα και χρήση διαφορετικών θέσεων εκκινήτων. Τα μετάγραφα A και C βρίσκονται σε πολλούς φυσιολογικούς ιστούς και περιέχουν πλούσιες σε CpG περιοχές εκκινήτων.

Η πρώτη παρατήρηση ότι η υπερμεθυλίωση στον υποκινητή του RASSF1A σχετίζεται με απώλεια έκφρασης του γονιδίου έγινε από τον Dammann R. και συνεργάτες σε καρκινικές κυτταρικές σειρές πνεύμονα³⁸. Από τότε η νησίδα CpG του υποκινητή του RASSF1A έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει ανώμαλη μεθυλίωση σε σημαντικό ποσοστό καρκινωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του μαστού, του προστάτη, των ωοθηκών, των νεφρών, της ουροδόχου κύστεως και του ρινοφάρυγγα. Επιπλέον, μεθυλίωση στο RASSF1A έχει αναφερθεί και σε καρκίνους του παχέος εντέρου και του ορθού αλλά όχι σε σημαντικά επίπεδα³⁹. Η κατανόηση του φυσιολογικού ρόλου του γονιδίου RASSF1A (Ras Association Domain Family 1A) δεν έχει επιτευχθεί πλήρως. Ο ρόλος της πρωτεΐνης RASSF1A ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο έχει υποδειχθεί μέσω διαφόρων μελετών της λειτουργίας του. Έχει αποδειχθεί ότι εισαγωγή του RASSF1A σε καρκινικές σειρές πνεύμονα που δεν εκφράζουν το RASSF1A, μπορεί να μειώσει το σχηματισμό αποικιών σε μαλακό άγαρ και τη καρκινογένεση σε ποντίκια⁴⁰. Η πρωτεΐνη RASSF1A έχει μια περιοχή συνδέσμου Ras στο καρβοξυτελικό της άκρο και 55% ομολογία στην πρωτεΐνη Norel 1 (Ras τελεστής) που συνδέεται με όμοιες με Ras GTPases. Η περιοχή σύνδεσης των Ras συνδέεται με τις Ras με εξαρτώμενο από το GTP τρόπο. Η περιοχή έχει αποδειχθεί ότι μεσολαβεί στη αποπτωτική απόκριση εντός του μονοπατιού μεταγωγής σήματος του Ras⁴⁰.



3.2.2.5 ATM

Η Αταξία-Τηλαγγειεκτασία είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια που χαρακτηρίζεται από εκφυλισμό του νευρικού συστήματος, ανοσοανεπάρκεια και σημαντική προδιάθεση για ανάπτυξη νεοπλασιών. Το γονίδιο ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) που σχετίζεται με αυτή την ασθένεια, χαρτογραφήθηκε στη περιοχή 11q22-23 και κλωνοποιήθηκε από τον Savinsky και συνεργάτες⁴¹. Σήμερα είναι γνωστό ότι το ATM είναι κινάση που λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο και πυροδοτεί την κυτταρική ανταπόκριση σε βλάβες του γονιδιώματος που προκαλούνται από ιονίζουσα ακτινοβολία ή έκθεση σε χημικά καρκινογόνα⁴². Παρά τον σημαντικό ρόλο του ATM στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος, σωματικές μεταλλαγές που το απενεργοποιούν έχουν βρεθεί κυρίως σε αιματολογικές κακοήθειες⁴³. Πρόσφατα, έχει αποδειχθεί ότι η ανώμαλη μεθυλίωση στον υποκινητή του ATM έχει ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της έκφρασης του γονιδίου, ενώ αναφέρθηκε ότι σημαντικό ποσοστό των χειρουργικά αφαιρούμενων όγκων μαστού (στάδιο II ή μεγαλύτερος) παρουσιάζουν μεθυλίωση στον υποκινητή του ATM⁴⁴. Επιπλέον, η ανάλυση της μεθυλίωσης στον υποκινητή του ATM βρέθηκε ότι έχει προγνωστική αξία σε μη μικροκυτταρικούς καρκίνους του πνεύμονα.



4. ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Επιλογή των ασθενών.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος και ιστοί από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη πριν την έναρξη της θεραπευτικής αγωγής καθώς και μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας.

Επιπλέον, επιλέχθηκαν ασθενείς με καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου, του στομάχου, του παγκρέατος και του πνεύμονα πριν την χειρουργική απομάκρυνση του όγκου ή την έναρξη οποιασδήποτε θεραπείας, καθώς και ασθενείς με λευχαιμία.

Για να διαπιστωθεί η αξιοπιστία και ευχρηστία της μεθόδου ανίχνευσης της μεθυλίωσης (Methylation Specific PCR), αρχικά χρησιμοποιήθηκαν αρχειακά δείγματα όγκων του εγκεφάλου, τα οποία είναι γνωστό ότι συχνά παρουσιάζουν μεθυλίωση στο γονίδιο MGMT.

4.2 Απομόνωση με επιστοίβαση και φυγοκέντρηση σε φικόλη

Γενικά

Το Ficoll ή Histopaque ή Biocoll ή Lymphoprep είναι ένα μείγμα Polysucrose 400 και Sodium Diatrizoate με πυκνότητα 1,077 gr/ml και ισότονο με τα έμμορφα συστατικά του αίματος και του μυελού (ερυθρά, λευκά αιμοσφαίρια). Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των εμπύρηνων κυττάρων από ολικό περιφερικό αίμα ή μυελό. Το αίμα ή ο μυελός επιστοιβάζονται με ficoll και ακολουθεί φυγοκέντρηση. Μετά τη φυγοκέντρηση προκύπτει η ακόλουθη κατανομή από κάτω προς τα πάνω:

α-έμμορφα στοιχεία του αίματος (π.χ ερυθρά αιμοσφαίρια., διαλυμένα ερυθρά, υπόλοιπα κύτταρα)

β-ficoll

γ-εμπύρηννα κύτταρα του αίματος

δ-πλάσμα

Η διαδικασία εφαρμόζεται σε φρέσκο υλικό γιατί τα παλαιά έχουν υποστεί αιμόλυση και η διάχυτη αιμοσφαιρίνη δεν επιτρέπει τον οπτικό διαχωρισμό των φάσεων μετά τη φυγοκέντρηση.



Αντιδραστήρια

Ficoll (Φικόλη)

DEPC (diethyl pyrocarbonate)

PBS (Phosphate Buffered Saline)

Trizol

Χλωροφόρμιο

Ισοπροπανόλη

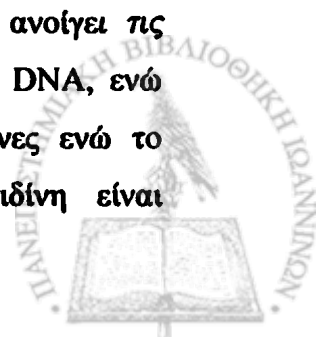
Αιθανόλη

Διαδικασία:

1. Επιστοιβάζουμε 5-7ml ολικού αίματος σε 4 ml φικόλη (μέσο διαχωρισμού των κυττάρων) με PASTEUR σε 15ml φιαλίδιο (επεξεργασμένο με DEPC).
- 2 Φυγοκεντρούμε στις 2000 rpm ,15 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C.
- 3 Μετά τη φυγοκέντρωση υπάρχουν από κάτω προς τα πάνω οι 4 στοιβάδες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Συλλέγουμε τη στιβάδα των μονοπύρηνων με PASTEUR πιπέττα και μεταφέρουμε σε νέο 15ml σωληνάριο (επεξεργασμένο με DEPC).
- 4 Προσθέτουμε 8-10ml PBS με πιπέττα των 10ml (ήπια ανακίνηση).
- 5 Φυγοκεντρούμε στις 2000 rpm, για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία 4° C.
- 6 Απορρίπτουμε το υπερκείμενο PBS, αφήνοντας 200 με 500 μl.
- 7 Αναδιαλύουμε το ίζημα με vortex.
- 8 Μεταφορά των κυττάρων σε σωληνάριο 1.5-2 ml με PASTEUR πιπέττα.

4.3 Απομόνωση ολικού RNA**ΔΕΙΓΜΑ : 1-AIMA****2-ΙΣΤΟΣ****Γενικά**

Χρησιμοποιούμε μείγμα όξινης φαινόλης και υδροχλωρικής γουανιδίνης για την απομόνωση RNA καθαρού από DNA, από ιστούς, κύτταρα ή άλλα υγρά. Το μείγμα χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το χλωροφόρμιο το οποίο ανοίγει τις μεμβράνες των κυττάρων. Η όξινη φαινόλη παίρνει στη φάση της το DNA, ενώ αφήνει στην υδατική το RNA. Ως φαινόλη παίρνει και τις πρωτεΐνες ενώ το χλωροφόρμιο απομακρύνει λιπίδια και ίχνη φαινόλης. Η γουανιδίνη είναι



ισχυρότατος αναστολέας των RNAσών η οποία περνά στην υδατική φάση και προστατεύει το RNA. Όλα τα σωληνάρια και οι πιπέττες πρέπει να έχουν υποστεί επεξεργασία με DEPC το οποίο καταστρέφει τις RNάσες.

4.3.1 Απομόνωση RNA από εμπύρηννα κύτταρα του αίματος

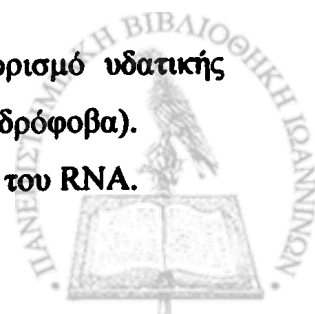
- 1 Σε DEPC σωληνάριο 1.5-2 ml προσθέτουμε 200 μ l Trizol για κάθε 10^6 κύτταρα.
- 2 Προσθέτουμε χλωροφόρμιο ίσο με το 1/5 του όγκου του RNAzol.
- 3 Γίνεται ισχυρή ανακίνηση στο vortex για 20 δευτερόλεπτα (για να λυθούν όλα τα κύτταρα και να μπορέσει η φαινόλη να απομακρύνει όλες τις πρωτεΐνες)
- 4 Τοποθετούμε το σωληνάριο στο πάγο και ακολουθεί επώαση στο πάγο 15-20 λεπτά.
- 5 Φυγοκεντρούμε στις 12000rpm, για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C
- 6 Μεταφέρουμε του υπερκείμενου σε άλλο σωληνάριο. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 1-6 αν η υπερκείμενη φάση που συλλέξαμε δεν είναι διαυγής.
- 7 Καταβυθίζουμε το RNA με ίσο όγκο ισοπροπανόλης.
- 8 Διατηρούμε σε -20 °C για 60 λεπτά
- 9 Φυγοκεντρούμε στις 12000rpm, για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία 4° C.
- 10 Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1ml αιθανόλης 75% (καθάρισμα του ιζήματος)
- 11 Φυγοκεντρούμε στις 12000rpm, 15 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C.
- 12 Στεγνώνουμε το ιζήμα (RNA)
- 13 Αναδιαλύουμε σε 50-100 λ ddH₂O (ανάλογα με τη ποσότητα του ιζήματος).
- 14 Φωτομετρούμε σε αραιώση 1:40 (10 λ RNA +390 λ ddH₂O).

4.3.2 Απομόνωση RNA από ιστό

Παίρνουμε τον ιστό και τον τεμαχίζουμε με αποστειρωμένο νηστεράκι. Τον τεμαχισμένο ιστό τον τοποθετούμε σε 1,5ml eppendorf DEPC με 300 μ l PBS .

Στη συνέχεια ακολουθούμε το κανονικό πρωτόκολλο από το βήμα 1.

- 1- Trizol: Καταστρέφει όλες τις πρωτεΐνες, προστατεύει το RNA από RNA-άσες (έχει μέσα φαινόλη).
- 2- Χλωροφόρμιο: Μετουσιώνει τις πρωτεΐνες, βοηθά στο διαχωρισμό υδατικής φάσης με την οργανική φάση (οργανική φάση: λιπίδια και άλλα υδρόφοβα).
- 3- Ισοπροπυλική αλκοόλη: Είναι για την διατήρηση και καταβύθιση του RNA.



- 4- Αιθυλική αλκοόλη: Βοηθάει στη καταβύθιση και τον καθαρισμό του RNA
- 5- DEPC (Diethyl Pyrocarbonate): Αναστέλλει τη λειτουργία των Ρνασών.

4.4 Απομόνωση RNA από πλάσμα

Το αίμα πρέπει να βρίσκεται σε **αντιπηκτικό** (EDTA). Η επεξεργασία πρέπει να γίνει την ημέρα της λήψης του δείγματος (κατά προτίμηση μέχρι 2 ώρες μετά τη λήψη).

1. Τοποθετούμε 2.5-5ml αίματος σε σωληνάριο των 15ml.
2. Φυγοκεντρούμε σε 2000 rpm για 10 λεπτά.
3. Μεταφέρουμε το πλάσμα σε νέο σωληνάριο των 15ml.
4. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 2.
5. Μεταφέρουμε το πλάσμα σε 1 ή 2 νέα φιαλίδια των 2ml.

Το RNA απομονώθηκε από 500μl πλάσματος χρησιμοποιώντας τη τυποποιημένη συσκευασία δοκιμασίας QIAamp RNA viral kit (Qiagen) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που υποδεικνύεται από τον προμηθευτή.

Αντιδραστήρια:

Διάλυμα AVL

Φορέας RNA (RNA carrier)

Αιθανόλη

Διάλυμα AW1

Διάλυμα AW2

Διάλυμα AE

Διαδικασία:

Βήμα 1 Προετοιμασία των αντιδραστηρίων

- Προσθέτουμε 310μl του ρυθμιστικού διαλύματος AVL στο σωλήνα που περιέχει 310μg φορέα RNA (που έχει υποστεί λυοφίληση) για να έχουμε ένα διάλυμα με συγκέντρωση 1μg/μl. Χωρίζουμε αυτό το διάλυμα σε σωληνάρια των 2ml και τα τοποθετούμε στους -20°C.
- Αναδιαλύουμε τα διαλύματα με την ένδειξη AW1 και AW2 σε αιθανόλη όπως αναγράφεται στη συσκευασία.



Βήμα 2 Διαδικασία

- Προσθέτουμε 2ml του διαλύματος AVL με το φορέα RNA σε ένα σωληνάριο των 15ml.
- Προσθέτουμε 500μl πλάσμα. Ανακατεύουμε για 15 δευτερόλεπτα (με vortex)
- Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Προσθέτουμε 2ml αιθανόλης. Ανακατεύουμε για 15 δευτερόλεπτα (με vortex).
- Τοποθετούμε 630μl από το παραπάνω διάλυμα στη κολώνα που μας δίνεται από τον κατασκευαστή μαζί με ένα σωληνάριο συλλογής. Φυγοκεντρούμε στις 8000gpm για 1 λεπτό. Απορρίπτουμε το περιεχόμενο του σωληναρίου συλλογής.
- Επαναλαμβάνουμε το παραπάνω βήμα 7 φορές.
- Προσθέτουμε 500μl του ρυθμιστικού διαλύματος AW1. Φυγοκεντρούμε στις 8000gpm για 1 λεπτό. Τοποθετούμε τη κολώνα QIAamp σε καθαρό σωληνάριο των 2ml και απορρίπτουμε το σωληνάριο συλλογής.
- Προσθέτουμε 500μl του ρυθμιστικού διαλύματος AW2. Φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 3 λεπτά. Τοποθετούμε τη κολώνα QIAamp σε καθαρό σωληνάριο των 2ml και απορρίπτουμε το σωληνάριο συλλογής.
- Φυγοκεντρούμε ξανά στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό. Τοποθετούμε τη κολώνα QIAamp σε καθαρό σωληνάριο των 1.5ml και απορρίπτουμε το σωληνάριο συλλογής.
- Προσθέτουμε 50μl του διαλύματος AVE. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Φυγοκεντρούμε στις 8000gpm για 1 λεπτό. Απορρίπτουμε τη κολώνα και κρατάμε το σωληνάριο των 1.5ml με το εκλούόμενο RNA. Τοποθετούμε το RNA στους -80°C.



4.5 DNase treatment

Έγινε επεξεργασία του RNA με δεοξυριβονουκλεάση (DNase), για την απομάκρυνση DNA που πιθανόν έχει επιμολύνει το RNA

Αντιδραστήρια:

Rnase-free Dnase

Rnase-out

PBS

Φαινόλη

Χλωροφόρμιο

DEPC (diethyl pyrocarbonate)

Ισοπροπανόλη

Αιθανόλη

Διαδικασία:

Σε κάθε δείγμα 10μg RNA προσθέτουμε :

- 2μl Rnase-free Dnase (3Kunitz units/μl) + 1μl Rnase-out (40u/μl)
- Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 25 λεπτά.
- Προσθέτουμε PBS έως τελικού όγκου 100μl.
- Ακολουθεί εκχύλιση με μίγμα φαινόλης / χλωροφορμίου (φαινόλη : χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη 25:24:1). Φυγοκεντρούμε σε 3500 rpm για 10 min.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε DEPC σωληνάριο των 1.5-2 ml.
- Καταβυθίζουμε το RNA με ίσο όγκο ισοπροπανόλης.
- Διατηρούμε σε -20 °C για 60 λεπτά
- Φυγοκεντρούμε στις 12000rpm, για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία 4° C.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1ml αιθανόλης 75% (καθάρισμα του ιζήματος)
- Φυγοκεντρούμε στις 12000rpm, 15 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C.
- Στεγνώνουμε το ίζημα (RNA)
- Αναδιαλύουμε σε 50-100λ ddH₂O (ανάλογα με τη ποσότητα του ιζήματος).
- Φωτομετρούμε σε αραιώση 1:40 (10λ RNA +390λ ddH₂O).



Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η τεχνική RT-PCR (Reverse Transcription PCR) για να μετατραπεί το RNA σε cDNA, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

4.6 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription)

Αρχή της μεθόδου

Είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για την μετατροπή του RNA σε cDNA. Βασίζεται στη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης η οποία μπορεί να συνθέτει DNA χρησιμοποιώντας ως μήτρα RNA.

Για την αντίστροφη μεταγραφή απαιτούνται:

1. Το RNA
2. Η αντίστροφη μεταγραφάση
3. Αναστολέας ριβονουκλεασών (RNasin)
4. Τυχαία εξαμερή νουκλεοτίδια, τα οποία αποτελούν τους εκκινητές για την έναρξη της αντιγραφής από την αντίστροφη μεταγραφάση
5. Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοσίδια
6. Ρυθμιστικό διάλυμα (5X RT-PCR buffer)

Διαδικασία:

1. Φτιάχνουμε το μείγμα (RT mix) χρησιμοποιώντας για κάθε δείγμα τη ποσότητα αντιδραστηρίων που αναγράφονται στον πίνακα:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
5X RT-PCR buffer (250mM Tris.Hcl pH 8,3/375mM Kcl/15mM Mgcl ₂)	4μl
dNTPs	1μl
RNasin* (40u/μl)	0,5μl
RT-MMLV (αντίστροφη μεταγραφάση) (200 units/μl)	1 μl

*Το RNasin είναι αναστολέας των ριβονουκλεασών

2. Μοιράζουμε τη ποσότητα του ddH₂O που απαιτείται για να έχουμε τελικό όγκο αντίδρασης 20μl.



3. Ετοιμάζουμε αραιώση 1:3 των τυχαίων εξαμερών (που χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικά τμήματα για παραγωγή cDNA) και τοποθετούμε 1μl σε κάθε σωληνάριο των 0.5ml.
4. Τα RNA είναι έτοιμα στον πάγο.
5. Τοποθετούμε 1-12μl RNA (1μg για RNA που απομονώνεται από κύτταρα, 12μl για RNA από πλάσμα) σε σωληνάριο των 0.5ml.
6. Τοποθετούμε τα δείγματα στο θερμικό κυκλοποιητή.
7. Πρόγραμμα: 70 °C - 4 λεπτά για αποδιάταξη του RNA.
8. Μεταφέρουμε τα δείγματα στον πάγο και βάζουμε 6,5μl του RT-mix.
9. Επώαση 37 °C για 1 ώρα.
10. 95 °C για 5 λεπτά για απενεργοποίηση του ενζύμου.

Το cDNA που παράγεται χρησιμεύει ως μήτρα για την PCR που θα ακολουθήσει.

4.7 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης "PCR"

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας δίκλωνου DNA με ταυτόχρονη επιμήκυνση πρωταρχικών τμημάτων (εκκινητών) και με μήτρα τις δύο συμπληρωματικές του αλυσίδες.

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σχεδιάστηκε και ονομάστηκε "PCR" από τον MULLIS και τους συνεργάτες του⁴⁵, παρ' όλο που η αρχή της μεθόδου είχε περιγραφεί με λεπτομέρειες από τον Khorana και τους συνεργάτες του⁴⁶, παραπάνω από μια δεκαετία πρωτότερα.

Η χρήση του PCR είχε περιοριστεί μέχρι να γίνει ευρέως διαθέσιμη, η θερμικά σταθερή DNA πολυμεράση.

Όπως είναι γνωστό, οι DNA πολυμεράσες πετυχαίνουν σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA στη γνωστή κατεύθυνση 5'-3' χρησιμοποιώντας μονόκλωνο υπόστρωμα αλλά ξεκινώντας από δίκλωνη περιοχή. Αυτή η αντίδραση γίνεται με επιμήκυνση πρωταρχικών τμημάτων (εκκινητών).

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης στηρίζεται στην ίδια αρχή, αλλά χρησιμοποιεί δύο εκκινητές (primers) που ο καθένας είναι συμπληρωματικός προς μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου μορίου του DNA. Οι εκκινητές είναι συμπληρωματικοί σε τέτοιες περιοχές του DNA, έτσι ώστε η επιμήκυνση που ξεκινά από τον ένα να κατευθύνεται προς τον άλλο. Δηλαδή ο εκκινητής Α κατευθύνει τη

σύνθεση μιας αλυσίδας DNA στην οποία μπορεί να συνδεθεί ο εκκινητής B γιατί αυτή περιέχει τη συμπληρωματική του αλληλουχία. Φυσικά, συμβαίνει και το αντίστροφο.

Το αποτέλεσμα είναι η *de novo* σύνθεση του τμήματος του δίκλωνου DNA που οριοθετείται από τους δύο εκκινητές.

Οι απαιτήσεις μιας τέτοιας αντίδρασης συνοψίζονται στα παρακάτω συστατικά:

1. Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοσίδια για προσφορά ενέργειας και νουκλεοσιδίων για τη σύνθεση του DNA.
2. DNA πολυμεράση, θερμικά σταθερή.
3. Εκκινητές με παρόμοιο ποσοστό G+C (γουανοσίνης και κυτοσίνης), μικρή δευτεροταγή δομή και χαμηλή μεταξύ τους συμπληρωματικότητα, ειδικά στο 3' άκρο.
4. Υπόστρωμα δηλαδή δίκλωνο DNA άθικτο και χωρίς αναστολείς (όπως απορρυπαντικά, EDTA, φαινόλη) ή cDNA που παράγεται κατά την αντίστροφη μεταγραφή.
5. Διάλυμα που να περιέχει Mg^{+2} , καθώς επίσης KCl, Tris και κάποιο από τα παρακάτω: Ζελατίνη ή Αλβουμίνη Ορού Βοδιού (BSA), NP-40, Tween 20, Triton-X 100.

Η αντίδραση εξελίσσεται σε τρία στάδια που περιγράφονται παρακάτω:

Πρώτο Στάδιο: αποδιάταξη

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης απαιτεί μονόκλωνο υπόστρωμα και για αυτό το λόγο στο πρώτο στάδιο γίνεται αποδιάταξη του δίκλωνου DNA έτσι ώστε όλο το DNA να είναι σε μονόκλωνη μορφή. Αυτό επιτρέπει στους εκκινητές να αναδιαταχθούν (επειδή προσθέτονται σε περίσσεια) στις συμπληρωματικές τους περιοχές πάνω σε κάθε αλυσίδα μονόκλωνου DNA.

Το στάδιο αυτό πρέπει να διαρκεί τουλάχιστον τριάντα δευτερόλεπτα της ώρας σε θερμοκρασία 94-95°C. Προαιρετικά, είναι δυνατό, πριν την εφαρμογή της αλληλουχίας των τριών σταδίων, να γίνει μια επώαση για μεγαλύτερο χρόνο (π.χ. 1 λεπτό) στους 95°C, έτσι ώστε να επέλθει πλήρης αποδιάταξη όλης της ποσότητας του αρχικού DNA.



Έτσι, όλη η ποσότητα του DNA θα αποδιαταχθεί και θα είναι σε μονόκλωνη μορφή, για να μπορούν να βρουν οι εκκινητές τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο δεύτερο στάδιο.

Δεύτερο Στάδιο: σύνδεση εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες

Στο δεύτερο στάδιο η θερμοκρασία χαμηλώνει, στους 45°C με 65°C, για να γίνει η αναδιάταξη των εκκινητών επάνω στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο, μονόκλωνο πια, υπόστρωμα. Η θερμοκρασία αυτού του σταδίου έχει πολύ μεγάλη σημασία γιατί αποτελεί κλειδί για την ειδικότητα της δέσμευσης των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες. Όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία τόσο πιο ειδική και με αυστηρά κριτήρια γίνεται η δέσμευση και το αντίστροφο.

Τρίτο Στάδιο: επιμήκυνση των εκκινητών

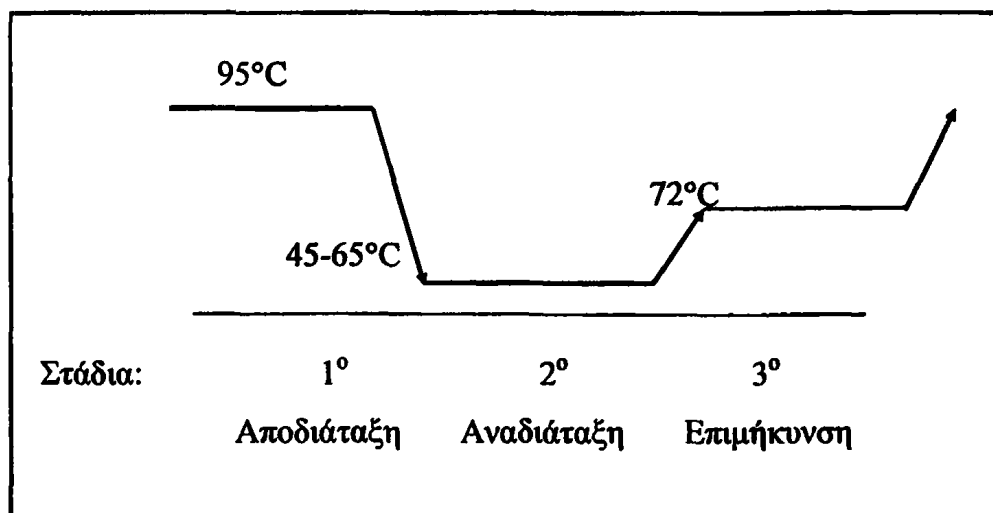
Είναι γνωστό ότι το πιο δημοφιλές, θερμοανθεκτικό, μόριο πολυμεράσης που χρησιμοποιείται - η Taq Πολυμεράση - αποδίδει τα μέγιστα σε θερμοκρασίες από 72°C μέχρι 75°C. Έτσι, το τρίτο στάδιο αποτελείται από μια επώαση περίπου μισού λεπτού της ώρας σε θερμοκρασία 72°C. Σε αυτή τη φάση γίνεται η σύνθεση καινούργιων αλυσίδων DNA με επιμήκυνση των εκκινητών και καλούπια τις αλυσίδες στις οποίες έχουν δεσμευθεί.

Τα προϊόντα της τρίτης φάσης είναι δίκλινα μόρια DNA τα οποία περιέχουν τις αλληλουχίες πρόσδεσης των εκκινητών. Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν υποστρώματα σε ένα νέο πρώτο στάδιο οπότε κλείνει ο πρώτος κύκλος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης. Είναι δυνατό με την επανάληψη πολλών κύκλων (30 - 40) να πολλαπλασιάσουμε το τμήμα του αρχικού DNA μεταξύ των συμπληρωματικών αλληλουχιών των δύο εκκινητών.

Αυθαίρετα, δίνουμε τα ονόματα FORWARD στον ένα και REVERSE στον άλλο εκκινητή.



Σχηματικά κάθε κύκλος της αντίδρασης μπορεί να παρουσιαστεί ως εξής:



Εικόνα 10. Ο κύκλος της PCR (The Simple Fool's Guide to PCR, ver.2, 1991).

Διαδικασία:

Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν οι παρακάτω συνθήκες για τους χρόνους και τις θερμοκρασίες του κάθε σταδίου καθώς και για τις συγκεντρώσεις των συστατικών και τον όγκο των αντιδράσεων:

PCR

cDNA*	5 μ l
10XPCR buffer	5 μ l
dNTPs (40mM total)	1 μ l
MgCl ₂ 50mM	1.5 μ l
Primer forward (10 pmols/ml)	2 μ l
Primer reverse (10 pmols/ml)	2 μ l
Taq polymerase	0,4 μ l
ddH ₂ O	33.1
Τελικός όγκος	έως 50 μ l

* Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται στην PCR είναι το cDNA που παρήχθη κατά την αντίστροφη μεταγραφή



Ο πολλαπλασιασμός του cDNA του γονιδίου PSMA έγινε με πρωτόκολλο διπλής αντίδρασης της πολυμεράσης (nested-PCR) χρησιμοποιώντας δύο ζεύγη εκκινητών. Το πρώτο ζεύγος εκκινητών ενισχύει ένα τμήμα μήκους 647bp και έχει αλληλουχία:

5'-CAGATATGTCATTCTGGGAGGTC-3' και

5'-AACACCATCCCTCCTCGAACC-3'.

5μl από τη πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν για ενίσχυση μικρότερου τμήματος (234bp) του γονιδίου, το οποίο βρίσκεται εσωτερικά του ενισχυμένου κατά τη πρώτη αντίδραση PCR τμήματος⁴⁷. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είχαν την εξής αλληλουχία:

5'-CCTAACAAAAGAGCTGAAAAGCCC-3' και

5'-ACTGTGATACAGTGGATAGCCGCT-3'.

Η nested PCR επιλέχθηκε γιατί παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία σε σχέση με την απλή PCR. Χρησιμοποιήθηκαν το εξής θερμικά πρωτόκολλα:

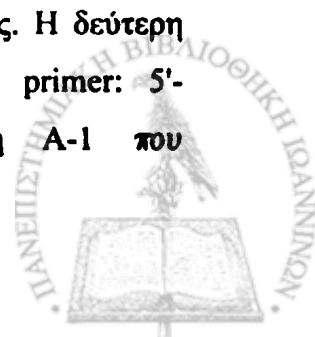
1^η PCR

1	95°C	5 λεπτά
2	95°C	1 λεπτό
3	52°C	1 λεπτό
4	72°C	1 λεπτό
5	Επανάληψη των βημάτων 2-4 35 φορές	
6	72°C	10 λεπτά

2^η PCR

1	95°C	5 λεπτά
2	95°C	1 λεπτό
3	56°C	1 λεπτό
4	72°C	1 λεπτό
5	Επανάληψη των βημάτων 2-4 30 φορές	
6	72°C	10 λεπτά

Ο πολλαπλασιασμός του γονιδίου CEA έγινε χρησιμοποιώντας πάλι δύο αντιδράσεις PCR, κατά τις οποίες όμως ο ένας εκκινητής ήταν κοινός (seminested PCR). Το πρώτο ζεύγος εκκινητών ήταν οι P-1 και A-1 (P-1 forward primer: 5'-GACGACCCACCATTTCCCC-3', A-1 reverse primer: 5'-AGGGCTTGGGCAGCTCCGCA-3') οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα του γονιδίου με μήκος 264bp. Στη συνέχεια, 2μl από τη πρώτη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση ενός μικρότερου τμήματος (190bp) του γονιδίου, το οποίο βρίσκεται εσωτερικά του ενισχυμένου κατά τη πρώτη αντίδραση PCR τμήματος. Η δεύτερη αυτή αντίδραση έγινε με τη χρήση ενός νέου εκκινητή (P-2 primer: 5'-TCTAACCCACCTGCACAGTA-3') καθώς και του εκκινητή A-1 που χρησιμοποιήθηκε στη πρώτη PCR⁴⁸.



Τα θερμικά πρωτόκολλα που επιλέχθηκαν ήταν:

1^η PCR

1	95°C	5 λεπτά
2	95°C	30 δευτερόλεπτα
3	62°C	30 δευτερόλεπτα
4	72°C	30 δευτερόλεπτα
5	Επανάληψη των βημάτων 2-4 30 φορές	
6	72°C	10 λεπτά

2^η PCR

1	95°C	5 λεπτά
2	95°C	30 δευτερόλεπτα
3	60°C	30 δευτερόλεπτα
4	72°C	30 δευτερόλεπτα
5	Επανάληψη των βημάτων 2-4 25 φορές	
6	72°C	10 λεπτά

Επιπλέον, η ανίχνευση mRNA του γονιδίου 14-3-3σ συντελέστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της RT-PCR και τους εξής εκκινητές:

14-3-3σ for1: 5'-GTGTGTCCCCAGAGCCATGG-3'

14-3-3σ rev1: 5'-TGTCGGCCGTCCACAGTGTC -3'

Το τμήμα του γονιδίου που ενισχύεται έχει μήκος 279bp

Το θερμικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι:

1	95°C	5 λεπτά
2	95°C	30 δευτερόλεπτα
3	60°C	30 δευτερόλεπτα
4	72°C	30 δευτερόλεπτα
5	Επανάληψη των βημάτων 2-4 35 φορές	
6	72°C	10 λεπτά

Επιπροσθέτως, η παρουσία άθικτου RNA αποδείχθηκε, μέσω ενίσχυσης με τη μέθοδο της RT-PCR του γονιδίου PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog ή Mutated in Multiple Advanced Cancers), το οποίο εκφράζεται σε όλα τα ανθρώπινα κύτταρα (εκκινητές: PTEN-F1 CCACCACAGCTAGAACTTATC και PTEN-R1 ATCTGCACGCTCTATACTGC). Το τμήμα του γονιδίου που ενισχύθηκε είχε μήκος 647bp

Το θερμικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι:



1	95°C	5 λεπτά
2	95°C	30 δευτερόλεπτα
3	59°C	30 δευτερόλεπτα
4	72°C	30 δευτερόλεπτα
5	Επανάληψη των βημάτων 2-4 35 φορές	
6	72°C	10 λεπτά

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης για να γίνει ορατή η ύπαρξη ή όχι του τμήματος του γονιδίου που ενισχύθηκε. Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σε διαφορετικά εξόνια για να αποφευχθεί η ενίσχυση DNA. Η μη ενίσχυση γενωμικού DNA αποδείχθηκε και από το γεγονός ότι το RNA που απομονώθηκε δεν έδωσε προϊόν ενίσχυσης κατά τη PCR, χωρίς προηγούμενη μετατροπή του σε cDNA με την αντίστροφη μεταγραφή.

4.8 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος 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 - όταν φωτισθεί με U.V. φως - χρωστική, που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA). Μπορούμε έτσι, να δούμε με υπεριώδες φως ακόμα και 1 ng DNA.

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται κύρια από τους παρακάτω παράγοντες :



- **Το μέγεθος του DNA.** Γραμμικά και δίκλωνα DNA κινούνται με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους.
- **Τη συγκέντρωση της αгарόζης.** Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίζουμε μεγάλο εύρος μεγεθών DNA.

<i>% Αγαρόζης στο πήκτωμα</i>	<i>Καλός διαχωρισμός γραμμικών DNA (Kb)</i>
0,3	60 - 5
0,6	20 - 1
0,7	10 - 0,9
0,8	7 - 0,5
0,9	6 - 0,4
1,2	4 - 0,2
2,0	3 - 0,1

- **Τη στερεοδιάταξη του DNA.** Η κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή (μορφή I), η ανοικτή κυκλική μορφή (μορφή II) και το γραμμικό DNA (μορφή III) του ίδιου μοριακού βάρους δεν έχουν την ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε πηκτώματα αγαρόζης. Οι σχετικές κινητικότητες των τριών μορφών εξαρτώνται κύρια από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα αλλά επίσης επηρεάζονται από την ένταση του ρεύματος, την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και από το βαθμό υπερελίκωσης της μορφής I
- **Την ένταση του ρεύματος.** Σε χαμηλή τάση (μικρή ένταση) η κινητικότητα των γραμμικών DNA είναι ανάλογη της εφαρμοζόμενης τάσης. Παραπέρα αύξηση της τάσης σηματοδοτεί αύξηση της κινητικότητας των μεγάλων κομματιών DNA με διαφορετικό συντελεστή για το καθένα. Γι' αυτό το λόγο μειώνονται η αξιοπιστία και η διαχωριστική ικανότητα των πηκτωμάτων αγαρόζης καθώς αυξάνεται η εφαρμοζόμενη τάση.

Τέλος, σε αντίθεση με αυτό που συμβαίνει στα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης, 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).



Ρυθμιστικά διαλύματα

Συνήθως τα φτιάχνουμε σε δεκαπλάσια συγκέντρωση και τα διατηρούμε σε θερμοκρασία δωματίου. 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 του ικανότητα έχουν αυτά με βορικό ή φωσφορικό οξύ.

Παρασκευή πηκτώματος.

Ζυγίζουμε την επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης ανάλογα με την επιθυμητή συγκέντρωση βάρος προς όγκο (π.χ. για 1% gel : 1gr αγαρόζη σε 100ml π.χ. 1X TBE). Προσθέτουμε το TBE και βράζουμε μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη. Στη συνέχεια προσθέτουμε την ανάλογη ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (ως τελική συγκέντρωση 50μg/ml). Αφήνουμε να κρυώσει (~50°C) και αδειάζουμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Κατά την ηλεκτροφόρηση τοποθετούμε στο πήκτωμα αγαρόζης τα εξής δείγματα:

- Ένα μάρτυρα μοριακών βαρών, που περιέχει ζώνες γνωστού μήκους βάσεων έτσι ώστε να προσδιορίσουμε το μήκος του προϊόντος που λήφθηκε κατά τη PCR.
- 15μl του προϊόντος της PCR από το άγνωστο(α) δείγμα(τα) που θέλουμε να μελετήσουμε.
- Ένα δείγμα που γνωρίζουμε ότι είναι αρνητικό για το γονίδιο που μελετάμε (αρνητικός έλεγχος).
- Και ένα που γνωρίζουμε ότι είναι θετικό (θετικό δείγμα ελέγχου).

Η εμφάνιση ζώνης στο πήκτωμα αγαρόζης στη σωστή θέση, υποδηλώνει την ύπαρξη προϊόντος της PCR και το δείγμα θεωρείται θετικό.



4.9 Απομόνωση DNA

4.9.1 Απομόνωση DNA από πλάσμα

Το αίμα βρίσκεται σε αντιπηκτικό (EDTA). Η επεξεργασία γίνεται την ημέρα της λήψης του δείγματος (κατά προτίμηση μέχρι 2 ώρες μετά τη λήψη).

Διαδικασία:

1. Τοποθέτηση 2.5-5ml αίματος σε σωληνάριο των 15ml.
2. Φυγοκέντρηση σε 1800 rpm για 10 λεπτά.
3. Μεταφορά του πλάσματος σε νέο σωληνάριο των 15ml.
4. Επανάληψη του βήματος 2.
5. Μεταφορά του πλάσματος σε 1 ή 2 νέα φιαλίδια των 2ml.

Το DNA απομονώνεται από 500μl πλάσματος χρησιμοποιώντας τη τυποποιημένη συσκευασία δοκιμασίας QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που υποδεικνύεται από τον προμηθευτή. Το DNA εκλύεται σε 50 μl στείρου διπλά απιονισμένου νερού και αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι τη χρήση.

Αντιδραστήρια:

Qiagen πρωτεάση

Διάλυμα AL

Αιθανόλη

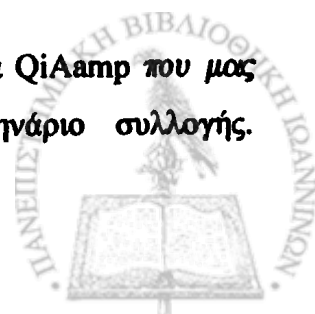
Διάλυμα AW1

Διάλυμα AW2

Διάλυμα AE

Διαδικασία:

1. Προσθέτουμε 50μl Qiagen πρωτεάση στον πυθμένα ενός σωληναρίου 2ml
2. Προσθέτουμε 500μl πλάσματος.
3. Προσθέτουμε 500μl του διαλύματος AL. Αναμιγνύουμε (vortex) για 15 δευτερόλεπτα.
4. Επωάζουμε στους 56°C για 10 λεπτά.
5. Προσθέτουμε 500μl αιθανόλη 100% και ανακατεύουμε.
6. Τοποθετούμε 500μl από το παραπάνω μείγμα στη κολώνα QiAamp που μας δίνεται από τον κατασκευαστή μαζί με ένα σωληνάριο συλλογής.



Φυγοκεντρούμε στις 8000rpm για 1 λεπτό. Απορρίπτουμε το περιεχόμενο του σωληναρίου συλλογής. Επαναλαμβάνουμε τη παραπάνω διαδικασία 4 φορές.

7. Προσθέτουμε 500μl του ρυθμιστικού διαλύματος AW1 Φυγοκεντρούμε στις 8000rpm για 1 λεπτό. Τοποθετούμε τη κολώνα QiAamp σε καθαρό σωληνάριο των 2ml και απορρίπτουμε το σωληνάριο συλλογής.
8. Προσθέτουμε 500μl του ρυθμιστικού διαλύματος AW2. Φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 3 λεπτά. Τοποθετούμε τη κολώνα QiAamp σε καθαρό σωληνάριο των 2ml και απορρίπτουμε το σωληνάριο συλλογής.
9. Φυγοκεντρούμε ξανά στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό Τοποθετούμε τη κολώνα QiAamp σε καθαρό σωληνάριο των 1.5ml και απορρίπτουμε το σωληνάριο συλλογής.
10. Προσθέτουμε 50μl του διαλύματος AE. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Φυγοκεντρούμε στις 8000rpm για 1 λεπτό. Απορρίπτουμε τη κολώνα και κρατάμε το σωληνάριο των 1.5ml με το εκλούόμενο DNA. Τοποθετούμε το DNA στους -20°C.

4.9.2 Απομόνωση DNA από εμπύρηννα κύτταρα του αίματος και ιστό

Αντιδραστήρια:

To Lysis II buffer (pH 8,2)

Φυκόλη

PBS (Phosphate Buffered Saline)

SDS (Sodium Dodecylsulphate)

Proteinase K

Φαινόλη

Χλωροφόρμιο

Ισοαμυλική αλκοόλη

Αιθανόλη

Διαδικασία:

1. Λήψη δείγματος ολικού αίματος σε αντιπηκτικό disodium EDTA.
2. Επιστοίβαση 5-7 ml ολικού αίματος 3 ml Ficoll (lymphocyte separation medium) σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου 15 ml.
3. Φυγοκέντρωση 2000rpm , 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου (15-25°C).
4. Συλλογή στιβάδας μονοκύρηνων και μεταφορά σε νέο σωληνάριο των 15ml.



5. Προσθήκη 8 ml διαλύματος PBS, ήπια ανακίνηση, φυγοκέντρωση 2000 rpm, για 5 λεπτά.
6. Απόρριψη υπερκειμένου, αφήνουμε 200-250μl PBS και επαναδιαλύουμε το ίζημα.
7. Στο ίζημα προστίθενται 1,5-3ml Lysis II buffer και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για >15 min.
8. Προστίθεται 275-550 μl SDS 10% και 85-200 μl Proteinase K από stock 10 mg/ml.
9. Επώαση σε 37°C overnight ή σε 55 °C για 2 h.
10. Προσθήκη με Pasteur πιπέττα, ίσου όγκου φαινόλης Φυγοκέντρωση σε 3500 rpm για 10 λεπτά.
11. Μετά τη φυγοκέντρωση δημιουργούνται 3 φάσεις από κάτω προς τα πάνω.
Μεταφορά υπερκείμενου με Pasteur πιπέττα, σε νέο σωληνάριο των 15ml (προσέχοντας να μην ληφθεί η μεσόφαση όπου βρίσκονται οι πρωτεΐνες).
12. Προσθήκη με Pasteur πιπέττα, ίσου όγκου του μίγματος φαινόλης / χλωροφορμίου / ισοαμυλικής αλκοόλης (φαινόλη: χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη 25:24:1). Φυγοκέντρωση σε 3500 rpm για 10 λεπτά.
13. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο των 15ml.
14. Καταβύθιση του DNA με προσθήκη 2-2,5 όγκων αιθανόλης 100%.
15. Λήψη DNA με Pasteur πιπέττα ή καταβύθιση με παραμονή για 20 min σε -20°C και φυγοκέντρωση.
16. Καθαρισμός με 75% αιθανόλη.
17. Ξήρανση και αναδιάλυση σε ddH₂O.
18. Φωτομέτρηση.

Όταν το δείγμα είναι ιστός:

Παίρνουμε τον ιστό και τον τεμαχίζουμε με αποστειρωμένο νηστεράκι. Τοποθετούμε τον τεμαχισμένο ιστό σε σωληνάριο των 15ml με 300μl PBS. Στη συνέχεια ακολουθούμε το κανονικό πρωτόκολλο από το βήμα 7.

- Το Lysis II buffer (pH 8,2) αποτελείται από τα εξής αντιδραστήρια:
Tris 10mM
NaCl 400mM
di-Na-EDTA 2mM
Ρύθμιση pH με HCl

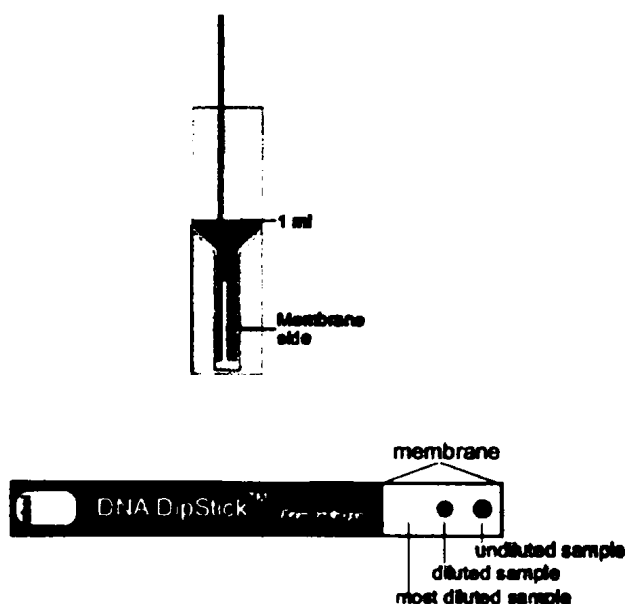


4.10 Ποσοτικοποίηση του DNA

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του DNA στο πλάσμα εκτελέστηκε με δύο μεθόδους: α. την τυποποιημένη συσκευασία DNA DipStick Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) και β. την PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR).

4.10.1 DNA DipStick Kit

Για την ποσοτικοποίηση του DNA με το DNA DipStick Kit χρησιμοποιείται μία μεμβράνη στην οποία τοποθετούμε διαφορετικές συγκεντρώσεις του δείγματος που θέλουμε να μελετήσουμε. Η μεμβράνη βυθίζεται σε διαλύματα. Από την ένταση των κηλίδων που παρατηρούμε στην μεμβράνη (και συγκρίνοντάς τη με αυτές δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης), μπορούμε να καταλήξουμε στην αρχική συγκέντρωση του DNA στο δείγμα μας (εικόνα 11).



Εικόνα 11. Ποσοτικοποίηση του DNA με DNA DipStick™

Η δοκιμή DNA DipStick παρέχει γραμμικά αποτελέσματα από 0,1 έως 10ng νουκλεϊκού οξέος.

Διαδικασία:

Έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις ενός πλασμιδιακού DNA ελέγχου γνωστής συγκέντρωσης (μη αραιωμένο, 1:10, και 1:100) και των δειγμάτων DNA που θέλουμε να εξετάσουμε.

1 μl κάθε του δείγματος, και οι αραιώσεις του τοποθετήθηκαν επάνω σε μεμβράνες και αφέθηκαν να ξηραθούν. Μετά έγινε τμηματική βύθιση των μεμβρανών σε 3 ενώσεις και οι εντάσεις χρώματος των κηλίδων των δειγμάτων που αναπτύχθηκαν στις μεμβράνες συγκρίθηκαν με το DNA ελέγχου. Όταν συγκρίθηκαν οι κηλίδες των δειγμάτων με το πρότυπο DNA, εάν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων δεν είχαν εμπίσει στη κλίμακα συγκεντρώσεων των DNA ελέγχου και ήταν ενδιάμεσης έντασης έναντι εκείνων, προετοιμάζονταν πρόσθετες διαλύσεις βασισμένες στο αρχικό αποτέλεσμα, και η δοκιμή επαναλαμβανόταν. Τουλάχιστον τρεις ανεξάρτητες δοκιμές προσδιορισμού της ποσότητας εκτελέστηκαν για κάθε δείγμα πλάσματος. Οι τιμές DNA που δόθηκαν στα δείγματα ήταν 10, 100, και 1000 ng/ml του πλάσματος και αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις 0,1, 1, και 10 ng/ml αντίστοιχα, υπολογίζοντας την ένταση χρώματος των κηλίδων, και λαμβάνοντας υπόψη ότι το DNA που λήφθηκε από 500μl πλάσματος διαχωρίστηκε με εκχύλιση σε 50μl. Ενδιάμεσες τιμές DNA λήφθηκαν μετά από αξιολόγηση των ενδιάμεσων διαλύσεων των δειγμάτων με σκοπό να πετύχουμε ακριβέστερη ανάγνωση της δοκιμής. Αυτό μας επέτρεψε να ταξινομήσουμε τις τιμές DNA στις ακόλουθες κατηγορίες: 0–10, 11–25, 26–50, 51–100, 101–250, 251–500, και 501–750, 751–1000, και > 1000 ng/ml πλάσματος²².



4.10.2. PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) ποσοτικοποιεί το αρχικό ποσό του DNA, πιο ειδικά, με περισσότερη ευαισθησία και επαναληψιμότητα. Ο φθορισμός που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης καταγράφεται και χρησιμοποιείται ως δείκτης της εκλεκτικής ενίσχυσης του γονιδίου σε κάθε κύκλο της PCR (δηλαδή σε πραγματικό χρόνο). Αντίθετα με τις συμβατικές μεθόδους PCR, μετρείται το τελικό σημείο ενίσχυσης του γονιδίου⁴⁹.

Το Real Time PCR σύστημα είναι βασισμένο στην ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του φθορισμού. Σε αυτή τη μέθοδο, το σήμα αυξάνεται ευθέως ανάλογα με το ποσό του προϊόντος της PCR σε μια αντίδραση. Με την καταγραφή του ποσού εκπομπής φθορισμού σε κάθε κύκλο, είναι δυνατό να ελεγχθεί η αντίδραση PCR κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης όπου η πρώτη σημαντική αύξηση στο ποσό του προϊόντος της PCR σχετίζεται με το αρχικό ποσό του γονιδίου στόχου. Υπάρχουν δύο γενικές μέθοδοι για την ποσοτική ανίχνευση του προϊόντος της PCR: (1) ποσοτικοποίηση με ανιχνευτές φθορισμού ή (2) ποσοτικοποίηση με παράγοντες δέσμησης του DNA⁵⁰.

Οι ανιχνευτές TaqMan, οι Molecular Beacons (και πιο πρόσφατα, οι Scorpions) χρησιμοποιούν την 5' εξωνουκλεοτιδική δράση της Taq πολυμεράσης για να μετρήσουν το ποσό της αλληλουχίας στόχου στα δείγματα DNA. Οι TaqMan ανιχνευτές είναι ολιγονουκλεοτίδια μακρύτερα από τους κοινούς εκκινητές (25-30 βάσεις με σημείο τήξεως 10°C υψηλότερο από τους εκκινητές). Αυτά τα μόρια περιέχουν μια φθορίζουσα χρωστική ουσία στα 5' άκρο που ονομάζεται REPORTER (για παράδειγμα FAM) και μια χρωστική ουσία που ονομάζεται QUENCHER (συνήθως TAMRA) στο 3' άκρο. Όταν ακτινοβολείται, η διεγερμένη φθορίζουσα χρωστική ουσία στο 5' άκρο μεταφέρει ενέργεια στη γειτονική χρωστική QUENCHER και δεν παράγει φθορισμό (αυτό το φαινόμενο ονομάζεται FRET = Förster ή Fluorescence Resonance Energy Transfer). Κατά συνέπεια, η στενή εγγύτητα του REPORTER και QUENCHER αποτρέπει την εκπομπή οποιουδήποτε φθορισμού όταν ο ανιχνευτής είναι άθικτος. Οι ανιχνευτές TaqMan σχεδιάζονται έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικοί και να συνδέονται με μια εσωτερική περιοχή του προϊόντος της PCR. Όταν η Taq πολυμεράση αντιγράφει ένα τμήμα στο οποίο ο



ανιχνευτής TaqMan είναι συνδεδεμένος, η 5' εξωνουκλεοτιδική δράση της διασπά τον ανιχνευτή. Αυτό σταματάει τη δράση του QUENCHER (δεν υπάρχει πια FRET) και η χρωστική REPORTER αρχίζει να εκπέμπει φθορισμό, ο οποίος αυξάνεται σε κάθε κύκλο ανάλογα με το ποσοστό διάσπασης των ανιχνευτών. Η συσσώρευση προϊόντων της PCR ανιχνεύεται με τον έλεγχο της αύξησης στο φθορισμό της χρωστικής ουσίας REPORTER (σημειώνεται ότι οι εκκινητές δεν είναι σημασμένοι).

Η αντίδραση με TaqMan ανιχνευτές χρησιμοποιεί τα θερμικά πρωτόκολλα και τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται συνήθως κατά τη PCR. Επειδή η διάσπαση του ανιχνευτή εμφανίζεται μόνο εάν ο ανιχνευτής υβριδίζεται στο στόχο, ο φθορισμός που ανιχνεύεται προέρχεται από ειδική ενίσχυση. Η διαδικασία της υβριδοποίησης και διάσπασης του ανιχνευτή δεν παρεμποδίζει την εκθετική συσσώρευση του προϊόντος. Μια σημαντική προϋπόθεση για τους φθορίζοντες ανιχνευτές είναι ότι δεν πρέπει να υπάρχει κανένα G (Γουανίνη) στο 5' άκρο τους. Ένα "G" δίπλα στη χρωστική REPORTER εμποδίζει το φθορισμό ακόμα και μετά τη διάσπασή του⁵¹.

Η φτηνότερη εναλλακτική λύση είναι η χρήση χρωστικών ουσιών που δένονται στη διπλή έλικα του DNA, η οποία ποσοτικοποιεί την παραγωγή προϊόντος PCR (συμπεριλαμβανομένων της μη ειδικής ενίσχυσης και των διμερών των εκκινητών) με την χρήση ενός μη ειδικού φθορίζοντα παράγοντα (SYBR green I ή βρωμιούχο αιθίδιο). Το SYBR green I είναι μια χρωστική ουσία που παρεμβάλλεται στη μικρή αύλακα του DNA, αλλά δεν δεσμεύεται σε μονόκλωνο DNA. Το σημαντικότερο πρόβλημα με τη βασιζόμενη στο SYBR green I ανίχνευση είναι ότι οι μη ειδικές ενισχύσεις δεν μπορούν να διακριθούν από τις ειδικές ενισχύσεις⁵⁰.

Μια σημαντική παράμετρος στη Real Time PCR είναι η τιμή Ct (threshold cycle), που αντιστοιχεί στον κύκλο στον οποίο για πρώτη φορά κατά την αντίδραση παρατηρείται μια σημαντική αύξηση στο φθορισμό. Ο κύκλος Ct σηματοδοτεί τότε το σύστημα αρχίζει να ανιχνεύει την αύξηση στο σήμα και σχετίζεται με μια εκθετική αύξηση του προϊόντος της PCR κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής-γραμμικής φάσης. Αυτή η φάση παρέχει τις πιο χρήσιμες πληροφορίες για την αντίδραση (βεβαίως σημαντικότερη από το τελικό σημείο). Όσο υψηλότερο το αρχικό ποσό του γονωμικού DNA, τόσο πιο σύντομα το συσσωρευμένο προϊόν ανιχνεύεται στη PCR διαδικασία, και τόσο χαμηλότερη η τιμή του Ct. Η επιλογή του κατώτατου ορίου, που θα καθορίσει την τιμή του Ct εξαρτάται από το χειριστή και είναι ένα από τα υποκειμενικά στοιχεία της Real Time PCR. Πρέπει να τοποθετηθεί επάνω από

οποιαδήποτε σήμα που προέρχεται από θόρυβο και μέσα στην εκθετική φάση αύξησης (που φαίνεται γραμμική στη μετατροπή σε λογαριθμική)⁵¹.

Διαδικασία:

Για το προσδιορισμό της ποσότητας του DNA στο πλάσμα, χρησιμοποιήθηκε ένα τμήμα 110bp του γονιδίου β-γλοβίνη το οποίο πολλαπλασιάστηκε με ειδικούς εκκινητές για ανθρώπινο γενωμικό DNA. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φθορισμό χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή TaqMan ο οποίος υβριδίζεται ειδικά με το πολλαπλασιασμένο προϊόν⁵². Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

β-globin-354 (forward), 5'-GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG A-3'

β-globin-455 (reverse), 5'-CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG-3'

Ο ανιχνευτής TaqMan ήταν:

5'(FAM) AAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GG (TAMRA)-3'

Το θερμικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι:

1	95°C	5 λεπτά
2	95°C	30 δευτερόλεπτα
3	60°C	1 λεπτό
5	Επανάληψη των βημάτων 2-3 40 φορές	

Η Real Time PCR εκτελέστηκε χρησιμοποιώντας τον θερμικό κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου Opticon 2 DNA σύστημα συνεχούς ανίχνευσης φθορισμού (MJ Research INC., MA). Χρησιμοποιήθηκε επίσης ο θερμικός κυκλοποιητής πραγματικού χρόνου Chromo4 (MJ Research INC., MA). Το DNA ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το γονίδιο της β-γλοβίνης όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες⁵². Για κάθε αντίδραση, 6 μl DNA που απομονώθηκαν από το πλάσμα αναλύθηκαν εις διπλούν. Για την κατασκευή μιας καμπύλης αναφοράς, χρησιμοποιήσαμε γενωμικό DNA σε συγκέντρωση 50 ng/μl DNA και έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις 5, 0.5 and 0.3 ng/μl. Οι συγκεντρώσεις DNA εκφράστηκαν σε ng DNA σε 1 ml πλάσματος.



Η συγκέντρωση DNA υπολογίστηκε σε ng/ml χρησιμοποιώντας τη παρακάτω εξίσωση:

$$C=Q*V_{DNA}/V_{PCR} * 1/V_{ext}$$

C = συγκέντρωση του DNA του δείγματος (ng/ml πλάσματος)

Q = ng DNA του δείγματος υπολογίζεται από τη Real Time PCR

V_{DNA} = όγκος που λήφθηκε κατά την απομόνωση DNA (συνήθως 50μl)

V_{PCR} = όγκος DNA που χρησιμοποιείται κατά PCR (συνήθως 6μl)

V_{ext} = όγκος πλάσματος από το οποίο απομονώθηκε το DNA



4.11 Στατιστική ανάλυση

Για να αξιολογήσουμε εάν το εξωκυτταρικό DNA που κυκλοφορεί στο πλάσμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διακρίνουμε μεταξύ ασθενών με καρκίνο και υγιών ατόμων, υπολογίσαμε την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου. Η ευαισθησία (sensitivity) της μεθόδου είναι το ποσοστό των ασθενών με καρκίνο οι οποίοι είναι θετικοί σε ένα συγκεκριμένο καρκινικό δείκτη. Επιπλέον, μετρήθηκε η ειδικότητα (specificity), η οποία αντιστοιχεί στο ποσοστό των υγιών ατόμων που είναι αρνητικοί για το συγκεκριμένο δείκτη. Επίσης, υπολογίστηκαν τα διαφορετικά κατώτατα όρια DNA, και οι auc-ROC σύμφωνα με τους Hanley και McNeil⁵³. Επιπλέον, υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις DNA και η σταθερή απόκλιση (standard deviation) της μέσης τιμής κάθε ομάδας. Η στατιστική ανάλυση εκτελέστηκε με το λογισμικό MedCalc 7.2.0.2 (MedCalc λογισμικό, Mariakerke, Βέλγιο). Χρησιμοποιήθηκε επίσης ο συντελεστής συσχέτισης Spearman (Spearman's rank correlation coefficient) (rs). Η $P < 0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

4.12 Ανάλυση της μεθυλίωσης

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τη χαρτογράφηση των 5-μεθυλκυτοσινών, εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι το διθειώδες νάτριο (NaHSO_3) αντιδρά γρήγορα με τον 5,6 διπλό δεσμό της κυτοσίνης, αλλά αντιδρά φτωχά με τις μεθυλιωμένες κυτοσίνες²⁵. Η κυτοσίνη αντιδρά με το διθειώδες ανιόν για να σχηματίσει μία ενδιάμεση θειική κυτοσίνη που είναι επιρρεπής στην απαμίνωση και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της θειικής ουρακίλης. Η θειική ομάδα μπορεί να απομακρυνθεί σε βασικές συνθήκες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ουρακίλης. Η ουρακίλη αναγνωρίζεται ως θυμίνη από τη Taq πολυμεράση και ενισχύεται στη PCR. Το προϊόν που παράγεται θα περιέχει κυτοσίνη μόνο στη θέση όπου υπήρχε 5-μεθύλκυτοσίνη στην αρχική οδηγό αλυσίδα του DNA. Ο βαθμός μεθυλίωσης των νησίδων GrC στον υποκινητή των γονιδίων, καθορίζεται από χημική τροποποίηση των μη μεθυλιωμένων, αλλά όχι των μεθυλιωμένων κυτοσινών, σε ουρακίλες. Στο μη μεθυλιωμένο DNA οι κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες οι οποίες αναγνωρίζονται από την Taq πολυμεράση ως θυμίνη. Αντίθετα, στο μεθυλιωμένο DNA η μετατροπή της κυτοσίνης σε ουρακίλη γίνεται με πολύ αργό ρυθμό με αποτέλεσμα να παρατηρείται μικρότερος βαθμός τροποποίησης μετά τη χρήση διθειώδους νατρίου. Η ειδική για την μεθυλίωση αλυσιδωτή αντίδραση της



πολυμεράσης (MSP) εκτελείται με εκκινητές ειδικούς τόσο για το μεθυλιωμένο όσο και για το τροποποιημένο, μη μεθυλιωμένο DNA.

Η διαδικασία ανάλυσης της μεθυλίωσης περιλαμβάνει:

- α. Τροποποίηση του DNA από το διθειώδες νάτριο
- β. Ειδική για τη μεθυλίωση PCR (Methylation Specific PCR ή MSP)

4.12.1 Τροποποίηση του DNA από το διθειώδες νάτριο

4.12.1.1 Τροποποίηση του DNA όταν το δείγμα είναι αίμα ή ιστός:

Διαδικασία:

1. Αποδιάταξη

DNA :	1-1,5μg
NaOH :	5 μL
dH ₂ O	x

Τελικός όγκος 50μl

Επωάζουμε στους 37 °C (heat block) για 30 min

2. Τροποποίηση

(I) Ετοιμάζουμε διαλύματα 3M διθειούχου νατρίου pH 5,0 και 10 mM υδροκινόνης (αποφεύγουμε την έκθεση στο φως καλύπτοντας τα δείγματα με αλουμινόχαρτο)

- διαλύουμε 2,5 g NaHSO₃ σε 8 ml απεσταγμένο H₂O.
- διαλύουμε 7,6 mg υδροκινόνης σε 6.9 ml dH₂O
- το pH του NaHSO₃ ρυθμίζεται στο 5,0 με 10M NaOH.

(II) Τροποποίηση με NaHSO₃:

- προσθέτουμε 520 μl NaHSO₃ και 30μl υδροκινόνης στα 50μl αποδιαταγμένου δείγματος DNA
- επωάζουμε στους 50 °C (heat block) για 16h



3. Καθαρισμός /απομάκρυνση αλάτων με Wizard DNA Clean up system (Promega)

Το Wizard DNA Clean-Up System είναι μια μέθοδος που παρέχει ένα απλό και αποτελεσματικό τρόπο για τον καθαρισμό γραμμικού ή κυκλικού DNA από τα εξής:

- Περιοριστικά ένζυμα
- Φωσφατάσες και κινάσες
- Εξωνουκλεάσες και ενδονουκλεάσες συμπεριλαμβανομένων των Dnaσών.
- Μονονουκλεοτίδια
- Άλατα

Ανακατεύουμε τη ρητίνη Wizard DNA Clean up πριν πάρουμε τη ποσότητα που χρειαζόμαστε από αυτή. Αν υπάρχουν κρύσταλλοι ή συσσωματώματα τα διαλύουμε, θερμαίνοντας τη ρητίνη στους 37° C για 10 λεπτά. Η ρητίνη είναι αδιάλυτη. Κρυώνουμε στους 25-30° C πριν τη χρήση. Ο όγκος του δείγματος πρέπει να είναι μεταξύ 50-500μl.

• Σύνδεση του DNA

- i) Χρησιμοποιούμε μία Wizard κολωνίτσα για κάθε δείγμα. Απομακρύνουμε το πώμα από μία σύριγγα των 2,5ml.

Τοποθετούμε στην άκρη της σύριγγας την προέκταση της κάθε κολώνας.

- ii) Προσθέτουμε 1ml ρητίνη (DNA Clean up Resin) σε ένα σωληνάριο των 1,5ml. Στη συνέχεια προσθέτουμε το δείγμα και ανακατεύουμε (αναποδογυρίζοντας το σωληνάριο)

- iii) Προσθέτουμε τη ρητίνη (που περιέχει το συνδεδεμένο DNA) στη σύριγγα. Εισάγουμε το πώμα της σύριγγας και σπρώχνουμε αργά με το έμβολο της σύριγγας το διάλυμα στη κολωνίτσα.

• Πλύσιμο

- iv) Απομακρύνουμε τη σύριγγα από τη κολωνίτσα και βγάζουμε το έμβολο από τη σύριγγα. Τοποθετούμε πάλι τη κολωνίτσα στην άκρη της σύριγγας. Προσθέτουμε 2ml ισοπροπανόλης 80% στη σύριγγα. Τοποθετούμε το έμβολο και σπρώχνουμε το διάλυμα στη κολωνίτσα.



v) Απομακρύνουμε τη σύριγγα και μεταφέρουμε τη κολωνίτσα σε ένα σωληνάριο των 1,5ml. Φυγοκεντρούμε τη κολωνίτσα με μέγιστη ταχύτητα σε μικροφυγόκεντρο για 2 λεπτά να στεγνώσει η ρητίνη.

- Διάλυση

vi) Μεταφέρουμε τη κολωνίτσα σε νέο σωληνάριο. Προσθέτουμε 50 μ l προθερμασμένο νερό (65-70°C) ή TE buffer στη κολωνίτσα και περιμένουμε 1 λεπτό. Φυγοκεντρούμε τη κολωνίτσα με μέγιστη ταχύτητα σε μικροφυγόκεντρο για 20 δευτερόλεπτα για να διαλυθεί το συνδεδεμένο DNA.

vii) Απομακρύνουμε και πετάμε τη κολωνίτσα. Το καθαρισμένο DNA μπορεί να διατηρηθεί σε σωληνάριο των 1.5ml στους 4 ° C ή στους 20 ° C.

4. Απομάκρυνση του θείου

- προσθέτουμε 3 μ l NaOH (3M) σε κάθε δείγμα
- επωάζουμε στους 37 °C για 20-30 min

5. Καταβύθιση με αιθανόλη

Στα δείγματα προσθέτουμε 150 μ l αιθανόλη 100%, 66 μ l οξικό αμμώνιο και γλυκογόνο, το οποίο βοηθάει στην καταβύθιση του DNA. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε (30 λεπτά, 12000rpm), πετάμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο ίζημα 1ml αιθανόλης 70%. Τέλος φυγοκεντρούμε, πετάμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 30 μ l ddH₂O.

4.12.1.2 Τροποποίηση του DNA όταν το δείγμα είναι πλάσμα:

Η τροποποίηση του DNA στο πλάσμα γίνεται με την τυποποιημένη συσκευασία CpGenomeTM DNA Modification kit (Chemicon) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Αντιδραστήρια

NaOH

Αιθανόλη

αντιδραστήριο I

αντιδραστήριο II

αντιδραστήριο III



αντιδραστήριο IV

β-μερκαπτοαιθανόλη

ρυθμιστικό διάλυμα TE

Βήμα 1 Προετοιμασία των αντιδραστηρίων

- Για την παραγωγή 3M NaOH, αναδιαλύουμε 1gr ξηρού NaOH σε 8.3ml νερό
- Για τη παρασκευή 20mM NaOH/90%EtOH, προσθέτουμε 900μl 100% αιθανόλη, 93.4μl H₂O και 6.6μl 3M NaOH
- Αναδιαλύουμε το αντιδραστήριο με την ένδειξη I. Θερμαίνουμε το μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου. Για κάθε δείγμα ζυγίζουμε 0.227g του αντιδραστηρίου I και προσθέτουμε 0.571ml νερό. Ανακατεύουμε καλά (vortex) και ρυθμίζουμε το pH στο 5, προσθέτοντας 20μl 3M NaOH. Ελέγχουμε το pH με πεχαμετρικό χαρτί. Προστατεύουμε το αντιδραστήριο I από το φως.
- Αναδιαλύουμε το αντιδραστήριο II. Θερμαίνουμε το μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1μl β-μερκαπτοαιθανόλη σε 20ml απεσταγμένου νερού. Για κάθε δείγμα που θα τροποποιήσουμε, προσθέτουμε 750μl από αυτό το διάλυμα σε 1.35g από το αντιδραστήριο II. Αναδεύουμε καλά. Το αναδιαλυμένο αντιδραστήριο μπορεί να διατηρηθεί στο σκοτάδι στους 2-8°C για 6 εβδομάδες.

Βήμα 2 Αποδιάταξη και τροποποίηση

- Σε σωληνάκι των 2ml, προσθέτουμε 2μl από το αντιδραστήριο IV σε 50μl DNA προσθέτουμε 48μl νερό. Στο παραπάνω διάλυμα βάζουμε 7μl 3M NaOH και ανακατεύουμε.
- Επωάζουμε το DNA 10 λεπτά στους 50°C.
- Προσθέτουμε 550μl του αντιδραστηρίου I και ανακατεύουμε καλά (vortex)
- Επωάζουμε στους 50°C για 4-16 ώρες, προστατεύοντας το σωληνάκι από το φως.

Βήμα 3 Αρχική αφαλάτωση

- Προσθέτουμε 5μl αντιδραστηρίου III
- Προσθέτουμε 750μl αντιδραστηρίου II και ανακατεύουμε



- Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου 5-10 λεπτά
- Φυγοκεντρούμε για 10 δευτερόλεπτα στις 5000g. Σχηματίζεται ένα μικρό άσπρο ίζημα. Πετάμε το υπερκείμενο
- Προσθέτουμε 1ml 70% αιθανόλη, φυγοκεντρούμε για 10 δευτερόλεπτα στις 5000g και πετάμε το υπερκείμενο Επαναλαμβάνουμε αυτή τη διαδικασία 3 φορές
- Όταν έχει πεταχτεί το υπερκείμενο μετά και από το τρίτο πλύσιμο, φυγοκεντρούμε το δείγμα στη μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά και απομακρύνουμε το υπερκείμενο με πιπέττα.

Βήμα 4 Ολοκλήρωση της τροποποίησης του DNA (απομάκρυνση Θείου), δεύτερη απομάκρυνση αλάτων και αναδιάλυση

- Προσθέτουμε 50μl από το 20mM NaOH/90%EtOH σε κάθε δείγμα
- Ανακατεύουμε (vortex) και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε για 10 δευτερόλεπτα στις 5000g (για απομάκρυνση σταγόνων από τα τοιχώματα του σωληναρίου) και προσθέτουμε 1ml αιθανόλη 90%. Φυγοκεντρούμε ξανά για 10 δευτερόλεπτα στις 5000g και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία ακόμα μία φορά.
- Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου από το δεύτερο πλύσιμο, φυγοκεντρούμε σε μέγιστη ταχύτητα για 3 λεπτά.
- Απομακρύνουμε όλο το υπερκείμενο με πιπέττα και αφήνουμε το σωληνάριο να στεγνώσει για 10-20 λεπτά.
- Προσθέτουμε 30μl από το ρυθμιστικό διάλυμα TE
- Επωάζουμε το δείγμα για 15 λεπτά στους 50-60°C για να διαλυθεί το DNA
- Φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 3 λεπτά και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωληνάριο.
- Τα δείγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν αμέσως για PCR ή να φυλαχτούν στους -20°C για 2 μήνες ή στους -80°C για 6 μήνες.



4.12.2 Ειδική για τη μεθυλίωση PCR (Methylation Specific PCR ή MSP)

Το DNA τροποποιείται με διθειώδες νάτριο και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αλλοιωμένων αλληλουχιών DNA των οποίων ο βαθμός τροποποίησης εξαρτάται από τη κατάσταση μεθυλίωσης του αρχικού (μη τροποποιημένου) DNA. Η MSP εκτελείται με 2 ζεύγη εκκινητών. Το ένα είναι ειδικό για το μεθυλιωμένο και το άλλο για το μη μεθυλιωμένο DNA. Όταν το γονίδιο που εξετάζεται είναι μη μεθυλιωμένο, κατά τη PCR ενισχύεται μόνο το δείγμα που πολλαπλασιάζεται με εκκινητές ειδικούς για μη μεθυλιωμένο DNA, ενώ δεν παρατηρείται σήμα ενίσχυσης όταν η αντίδραση εκτελείται με εκκινητές ειδικούς για το μεθυλιωμένο γονίδιο. Αντίθετα, όταν το γονίδιο που εξετάζεται παρουσιάζει κάποιο βαθμό μεθυλίωσης, κατά τη PCR παρατηρούμε σήμα ενίσχυσης στην αντίδραση που εκτελείται με εκκινητές ειδικούς για το μεθυλιωμένο DNA.

4.12.2.1 Ανίχνευση μεθυλίωσης στα γονίδια MGMT και 14-3-3σ με την ειδική για τη μεθυλίωση PCR (Methylation Specific PCR ή MSP).

Η μεθυλίωση στα γονίδια MGMT και 14-3-3σ ανιχνεύθηκε σε τροποποιημένα (με NaHSO₃) δείγματα DNA που απομονώθηκαν από ιστό και αίμα.

Διαδικασία:

Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

10x buffer	5μl
dNTP (40mM)	2μl
MgCl ₂ (50mM)	2μl
Forward primer (10pmols/μl)	2μl
Reverse primer (10pmols/μl)	2μl
DNA	9μl (0,5μg)
Taq	0,3μl
dd H ₂ O	X
Total volume	50μl



Το θερμικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

MGMT:

1	95°C	5 λεπτά
2	95°C	30 δευτερόλεπτα
3	59°C	1 λεπτό
4	72°C	30 δευτερόλεπτα
5	Επανάληψη των βημάτων 2-4 39 φορές	
6	72°C	10 λεπτά

14-3-3σ:

1	95°C	5 λεπτά
2	95°C	30 δευτερόλεπτα
3	56°C	1 λεπτό
4	72°C	30 δευτερόλεπτα
5	Επανάληψη των βημάτων 2-4 35 φορές	
6	72°C	10 λεπτά

Οι αλληλουχίες των πρωταρχικών τμημάτων που επιλέχθηκαν για τη μη μεθυλιωμένη αντίδραση του γονιδίου MGMT²⁹, ήταν:

5' TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT 3' (forward primer)

και 5' AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA 3' (reverse primer)

και για τη μεθυλιωμένη αντίδραση ήταν²⁹:

5' TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCG 3' (forward primer)

και 5' GCACTCTTCCGAAAACGAAACG 3' (reverse primer).

Το μήκος του μη μεθυλιωμένου προϊόντος της PCR για το γονίδιο MGMT ήταν 94bp και του μη μεθυλιωμένου προϊόντος 80bp.



Όσον αφορά το γονίδιο 14-3-3σ, επιλέχθηκαν οι εξής εκκινητές για το μεθυλιωμένο DNA ⁵⁴:

Forward primer: 5' TGGTAGTTTTTATGAAAGGCGTC 3'

Reverse primer: 5' CCTCTAACCGCCCACCACG 3'

Για το μη μεθυλιωμένο DNA, οι εκκινητές ⁵⁴ ήταν:

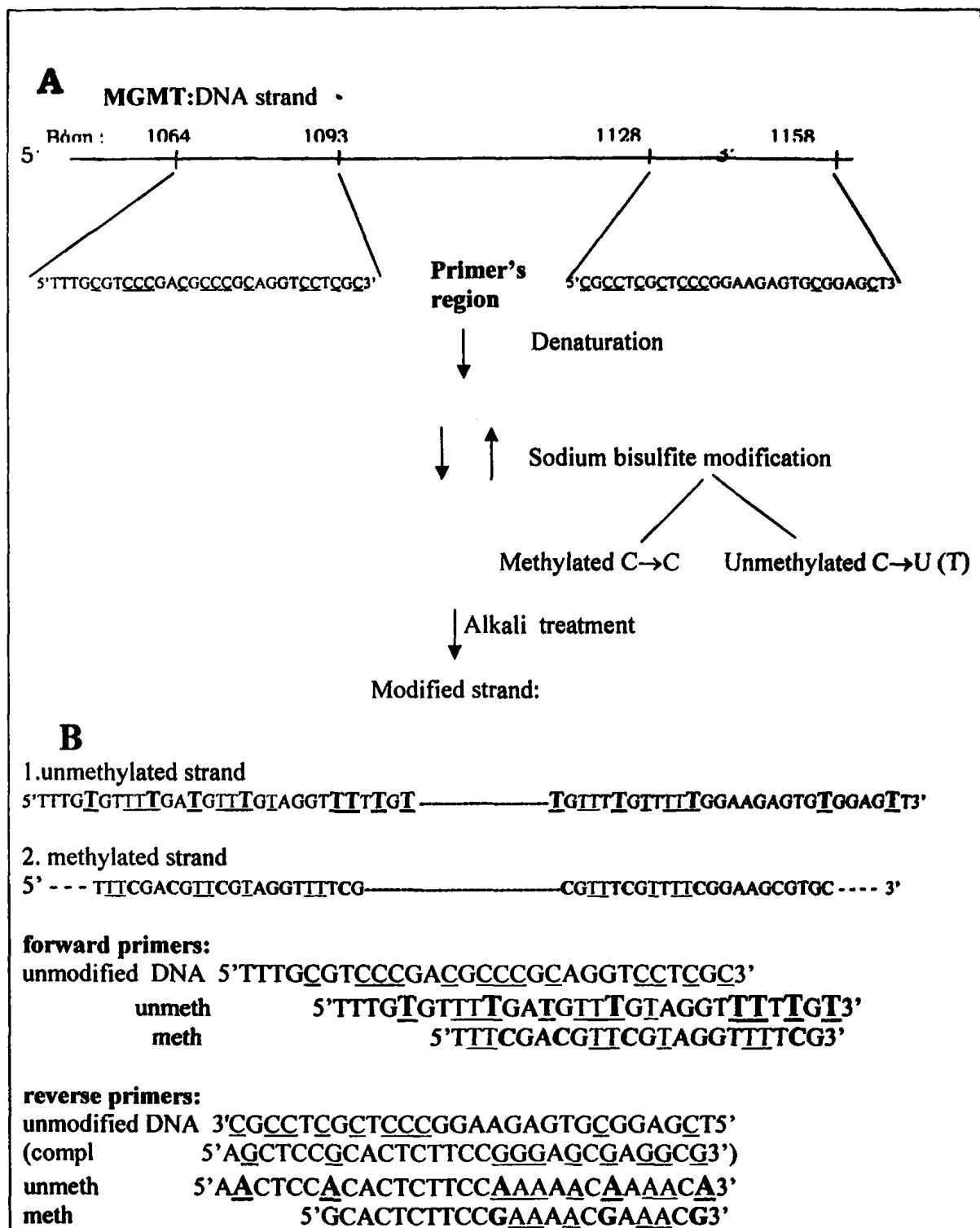
Forward primer: 5' ATGGTAGTTTTTATGAAAGGTGTT 3'

Reverse primer: 5' CCCTCTAACCACCCACCACA 3'

Το μήκος του προϊόντος της PCR ήταν 105 ζεύγη βάσεων (bp) για το μεθυλιωμένο 14-3-3σ και 107 bp για το μη μεθυλιωμένο DNA

Επιπλέον, εκτός από τα εξεταζόμενα δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ελέγχου χωρίς DNA, για κάθε σειρά ειδικών για τη μεθυλίωση PCR δοκιμών.



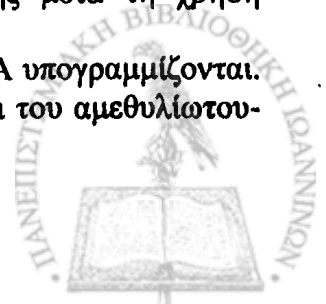


Εικόνα 12.

A. Τροποποίηση του DNA

B. Στο μη μεθυλιωμένο DNA οι κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες οι οποίες αναγνωρίζονται από την Taq πολυμεράση ως θυμίνη. Αντίθετα, στο μη μεθυλιωμένο DNA η μετατροπή της κυτοσίνης σε ουρακίλη γίνεται με πολύ αργό ρυθμό με αποτέλεσμα να παρατηρείται μικρότερος βαθμός τροποποίησης μετά τη χρήση NaHSO_3 .

Οι διαφορές μεταξύ τροποποιημένου και μη τροποποιημένου DNA υπογραμμίζονται. Οι διαφορές μεταξύ του μεθυλιωμένου-τροποποιημένου DNA και του αμεθυλιωμένου-τροποποιημένου DNA είναι με έντονα γράμματα.



4.12.2.2 Ανίχνευση μεθυλίωσης στο γονίδιο GSTP1 με τη μέθοδο MSP φθορισμού.

Η μέθοδος διαθέτει αυξημένη ευαισθησία και επιτρέπει την ανίχνευση καρκινικού DNA όχι μόνο σε καρκινικούς ιστούς, αλλά και σε δείγματα που περιέχουν μικροποσότητες DNA, όπως το πλάσμα. Έτσι η υπερμεθυλίωση του GSTP1 μπορεί να μελετηθεί και σε αυτά τα δείγματα. Η ανίχνευση μεθυλίωσης με αυτή τη μέθοδο περιλαμβάνει δύο βήματα:

- α. Ειδική για τη μεθυλίωση PCR με σημασμένους εκκινητές (methylation specific PCR ή MSP φθορισμού)
- β. Διαχωρισμός των σημασμένων δειγμάτων μέσω ηλεκτροφόρησης σε αυτόματη συσκευή προσδιορισμού αλληλουχίας του DNA (συσκευή ABI PRISM 310), χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ανάλυσης GeneScan

α. MSP

Η ειδική για τη μεθυλίωση PCR εκτελείται με 2 ζεύγη εκκινητών. Το ένα ζεύγος είναι ειδικό για το μεθυλιωμένο DNA, ενώ το άλλο για το μη μεθυλιωμένο DNA. Ο ένας από τους δύο εκκινητές του κάθε ζεύγους (ο forward) έχει σημειωθεί με φθορίζουσα χρωστική⁵⁵.

Οι ειδικοί για το μεθυλιωμένο DNA εκκινητές είχαν την εξής αλληλουχία⁵⁵:

Forward primer: 5'-6FAM-TTC GGG GTG TAG CGG TCG TC-3'

Reverse primer: 5'-GCC CCA ATA CTA AAT CAC GAC G-3'

Οι ειδικοί για το μη μεθυλιωμένο DNA εκκινητές είχαν την εξής αλληλουχία⁵⁵:

Forward primer: 5'-HEX-GAT GTT TGG GGT GTA GTG GTT GTT-3';

Reverse primer: 5'-CCA CCC CAA TAC TAA ATC ACA ACA-3')



Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για δείγματα DNA που απομονώθηκαν από πλάσμα και ιστό ήταν:

PCR mix

10x buffer	2.5μl
dNTP (40mM)	2μl
MgCl ₂ (50mM)	2μl
5' primer (10pmols/μl)	2μl
3' primer	2μl
DNA	9μl
Taq	0,3μl
dd H ₂ O	X
Total volume	25μl

Το θερμικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

GSTP1:

1	95°C	5 λεπτά
2	95°C	30 δευτερόλεπτα
3	58°C	1 λεπτό
4	72°C	30 δευτερόλεπτα
5	Επανάληψη των βημάτων 2-4 39 φορές	
6	72°C	10 λεπτά



β. GeneScan

Αρχή της μεθόδου

Το λογισμικό ανάλυσης GeneScan της συσκευής ABI PRISM 310, αναλύει τα ακατέργαστα στοιχεία για να ποσοτικοποιήσει τα τμήματα του DNA και να καθορίσει το μέγεθος τους, συγκρίνοντάς τα με τμήματα DNA που περιλαμβάνονται σε ένα πρότυπο μεγέθους (size standard).

Κάθε δείγμα σημαίνεται με φθορίζουσα χρωστική ουσία. Ένα σημασμένο εσωτερικό πρότυπο μεγέθους τοποθετείται επίσης στο ίδιο σωληνάριο με το δείγμα.. Τρία δείγματα και 1 πρότυπο μεγέθους μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα, καθώς οι χρωστικές ουσίες εμφανίζονται σε σύνολα τεσσάρων χρωμάτων.

Τα σωληνάρια με τα δείγματα τοποθετούνται σε έναν δίσκο (tray) του οργάνου, ο οποίος φέρνει διαδοχικά κάθε δείγμα σε επαφή με το ηλεκτρόδιο καθόδου και το ένα άκρο ενός γυάλινου τριχοειδούς αγγείου που γεμίζει με το πολυμερές (POP6). Ένα ηλεκτρόδιο ανόδου στο άλλο άκρο του τριχοειδούς αγγείου βυθίζεται στο ρυθμιστικό διάλυμα.

Ένα τμήμα του δείγματος εισέρχεται στο τριχοειδές αγγείο καθώς το ρεύμα ρέει από την κάθοδο στην άνοδο. Αυτό καλείται ηλεκτροκινητική έγχυση. Το άκρο του τριχοειδούς αγγείου κοντά στην κάθοδο τοποθετείται έπειτα στον ρυθμιστικό διάλυμα. Το ρεύμα εφαρμόζεται πάλι για να συνεχίσει την ηλεκτροφόρηση.

Καθώς τα τμήματα DNA περνούν μέσω του παραθύρου του τριχοειδούς αγγείου, ένα λέιζερ διεγείρει τις συνημμένες χρωστικές και φθορίζουν. Ο εκπνεύμενος φθορισμός (από τις χρωστικές ουσίες), συλλέγεται από μια CCD κάμερα. Το λογισμικό ερμηνεύει το αποτέλεσμα, υπολογίζοντας το μέγεθος ή την ποσότητα των κομματιών DNA από την ένταση φθορισμού σε κάθε σημείο.

Προετοιμασία του δείγματος

Για να διασφαλιστεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων για όλα τα δείγματα, ετοιμάζεται ένα μείγμα που περιέχει φορμαμίδιο, το πρότυπο μεγέθους και το δείγμα.

Για το σκοπό αυτό αναμιγνύουμε σε ένα φιαλίδιο δειγμάτων:

α. 0,5 μl GeneScan-350 [TAMRA] (πρότυπο μεγέθους)

β. 12 μl φορμαμίδιο

γ. 1-2 μl του προϊόντος της PCR με εκκινητές ειδικούς για μεθυλιωμένο DNA (σήμανση με 6-FAM)



δ. 1-2 μ l του προϊόντος της PCR με εκκινητές ειδικούς για μη μεθυλιωμένο DNA (σήμανση με 6-HEX) (εικόνα 13Α).

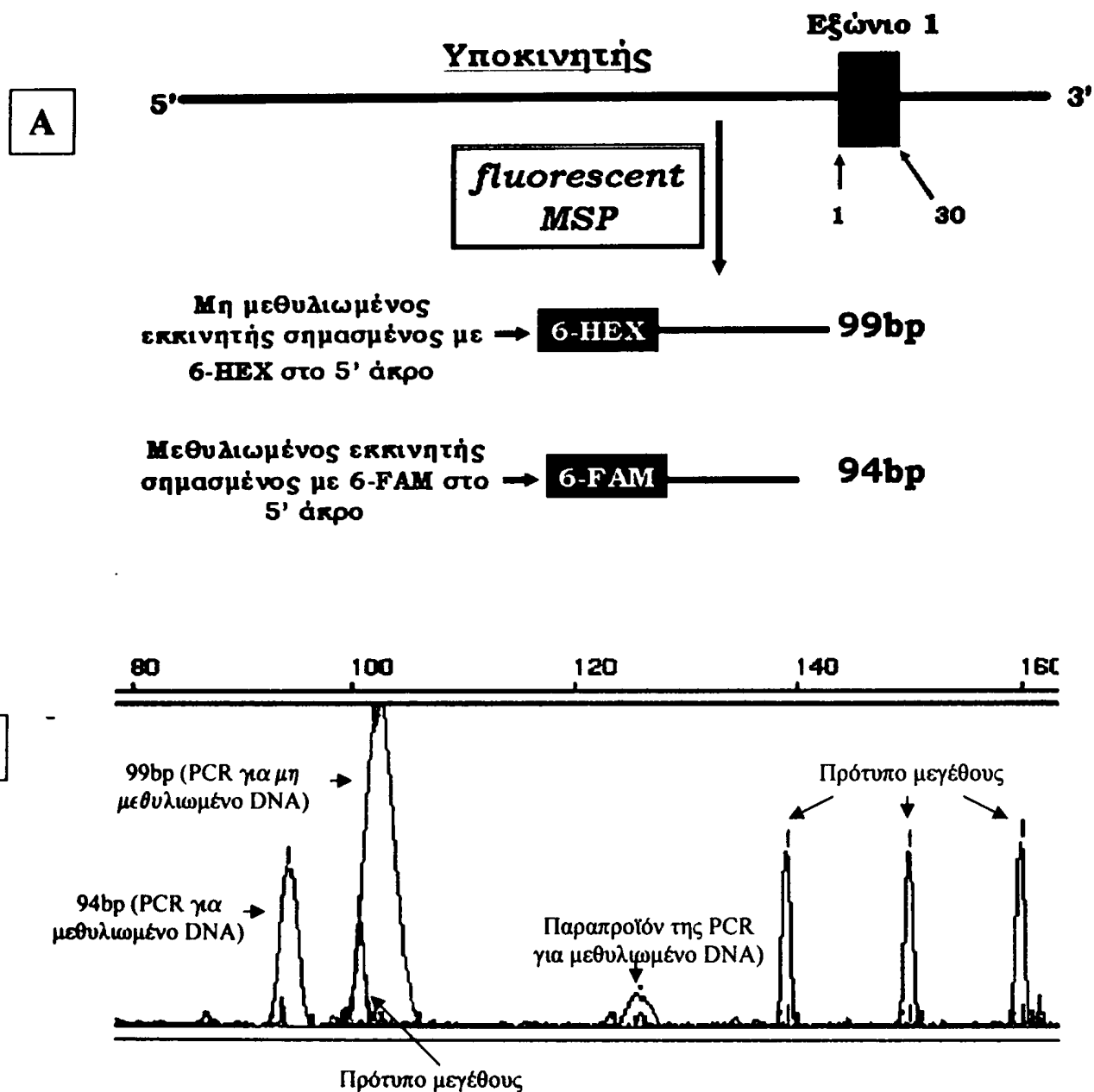
Ανάλυση αποτελεσμάτων:

Τα δείγματα, αφού ηλεκτροφορηθούν στη συσκευή ABI PRISM 310, αναλύονται αυτόματα από το λογισμικό ανάλυσης GeneScan. Στην οθόνη εμφανίζεται για το κάθε δείγμα:

- 1 κορυφή που αντιστοιχεί στο σημασμένο εκκινητή του προϊόντος PCR για μη μεθυλιωμένο DNA και εμφανίζεται σε συγκεκριμένο σημείο, ανάλογα με το μήκος του προϊόντος (στη περίπτωση μας το μήκος του προϊόντος είναι 99bp). Αυτή η κορυφή είναι πάντα παρούσα και ελέγχει την ύπαρξη DNA στο δείγμα
- 1 κορυφή που αντιστοιχεί στο σημασμένο εκκινητή του προϊόντος PCR για μεθυλιωμένο DNA και εμφανίζεται σε συγκεκριμένο σημείο, ανάλογα με το μήκος του προϊόντος (στη περίπτωση μας το μήκος του προϊόντος είναι 94bp). Αυτή η κορυφή εμφανίζεται μόνο όταν υπάρχει μεθυλίωση στο δείγμα που εξετάζουμε.
- κορυφές που προέρχονται από το σημασμένο πρότυπο μοριακού βάρους.

Η διαφορετική σήμανση απεικονίζεται στην οθόνη με διαφορετικό χρώμα στις κορυφές που εμφανίζονται. Στην εικόνα 13β, η σήμανση με HEX απεικονίζεται με μαύρο χρώμα, η σήμανση με FAM με μπλε και η σήμανση με TAMRA του προτύπου μεγέθους με κόκκινο. Η ύπαρξη κορυφών σε μη αναμενόμενα σημεία, υποδηλώνει την ύπαρξη παραπροϊόντων, τα οποία αν δεν γίνεται να εξαλειφθούν πρέπει να βρίσκονται μακριά από το αναμενόμενο προϊόν για να διευκολύνεται η ανάλυση των αποτελεσμάτων.





Εικόνα 13.

A. MSP φθορισμού για την ανίχνευση μεθυλίωσης στο γονίδιο GSTP1.

B. Ανάλυση των αποτελεσμάτων σε συσκευή προσδιορισμού αλληλουχίας ABI Prism 310, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GeneScan.

4.12.2.3 Ανίχνευση μεθυλίωσης στα γονίδια RASSF1 και ATM με τη μέθοδο MethylLight

Η μεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων RASSF1 και ATM ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας μια τεχνολογία βασισμένη στο φθορισμό με Real Time PCR, που ονομάζεται MethylLight⁵⁶

Χρησιμοποιήθηκαν 2 ζεύγη εκκινητών και ανιχνευτών για κάθε γονίδιο, που είναι σχεδιασμένα για το τροποποιημένο με διθειώδες νάτριο DNA. Αναλυτικά χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών ειδικό για μεθυλιωμένο DNA των γονιδίων RASSF1A και ATM, καθώς επίσης και ένα ζεύγος για το μη μεθυλιωμένο γονίδιο αναφοράς τη β-ακτίνη (ACTB), για την ομαλοποίηση με το DNA που εισήχθηκε. Η ειδικότητα των αντιδράσεων για το μεθυλιωμένο DNA επιβεβαιώθηκε χρησιμοποιώντας ανθρώπινο DNA που έχει υποστεί επεξεργασία με το ένζυμο SssI (New England Biolabs), το οποίο μεθυλιώνει βαριά το DNA. Το ποσοστό των πλήρως μεθυλιωμένων μορίων σε έναν γονιδιακό τόπο υπολογίστηκε διαιρώντας τη αναλογία GENE:ACTB του γονιδίου με τη αναλογία GENE:ACTB του επεξεργασμένου με ένζυμο SssI DNA και πολλαπλασιάζοντας το αποτέλεσμα με το 100. Για κάθε αντίδραση Methy-Light, χρησιμοποιήθηκαν 10 μl επεξεργασμένου με διθειώδες νάτριο DNA. Ένα γονίδιο θεωρείται μεθυλιωμένο αν το ποσοστό της μεθυλιωμένης τιμής αναφοράς είναι >0.

Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται για τη Real Time PCR ήταν οι εξής:

RASSF1A⁵⁷:

Forward primer: 5' GCGTTGAAGTCGGGGTTC 3'

Reverse primer: 5' CCCGTACTTCGCTAACTTTAAACG 3'

Probe: 5' FAM-ACAAACGCGAACCGAACGAAACCA-TAMRA 3'

β-ακτίνη (ACTB)⁵⁷:

Forward primer: 5' TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAG 3'

Reverse primer: 5' AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA 3'

Probe: 5' FAM-ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA-TAMRA 3'

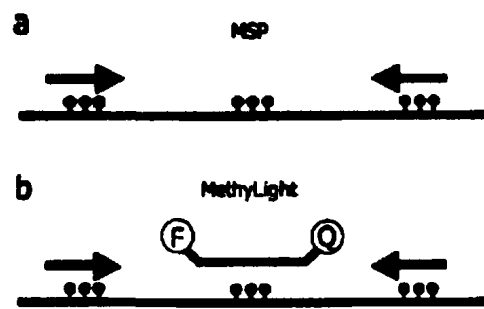
ATM:

Forward primer: 5' CGAAGGGCGAGTCGAAAAC 3'

Reverse primer: 5'CAAACACGATATACCCATACG 3'

Probe: 5' FAM CATCCAATATCACGCGATCTCCGC 3'





Εικόνα 14. Μέθοδοι ανίχνευσης της μεθυλίωσης⁵⁶

- a. Η MSP εκτελείται με 2 εκκινητές που συνδέονται με θέσεις στις οποίες υπάρχουν μία ή δύο νησίδες CpG. Όταν υπάρχει μεθυλίωση (πλήρης μεθυλίωση σε αυτή τη περίπτωση), παράγεται ένα ενισχυμένο μόριο DNA που μπορεί να αναλυθεί σε πήκτωμα αγαρόζης .
- b. Η τεχνολογία MethyLight είναι παρόμοια με τη κλασσική MSP, με τη προσθήκη ενός ανιχνευτή φθορισμού για ανίχνευση με Real Time PCR.

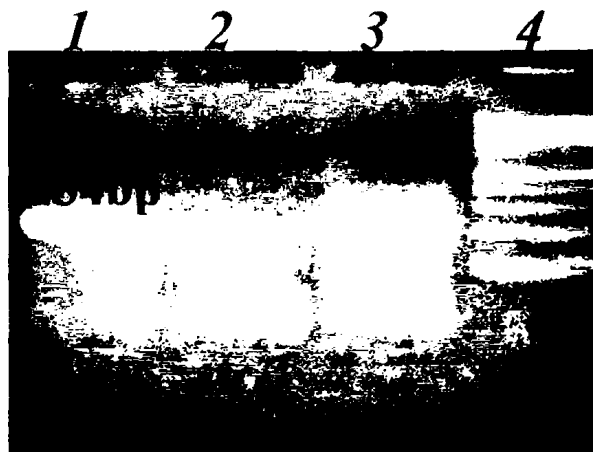
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 RNA δείκτες

5.1.1 PSMA mRNA στο πλάσμα και στα εμπύρηννα κύτταρα του αίματος

Ελέγχθηκε η παρουσία mRNA του PSMA στο πλάσμα και σε μονοπύρηννα κύτταρα του αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells- PBMC). Τέσσερις από τους δώδεκα ασθενείς (4/12, ποσοστό 33.3%) με πρόσφατα διαγνωσθείσα ασθένεια ήταν θετικοί για PSMA mRNA στο πλάσμα, ενώ μόνο δύο (2/12, ποσοστό 16.7%) ήταν θετικοί για PSMA mRNA σε PBMC (πίνακας 1)⁵⁸. Μεταξύ των δεκαεννιά ασθενών με καρκίνο του προστάτη υπό θεραπεία, τρεις (3/19, ποσοστό 15.8%) ήταν θετικοί για PSMA mRNA στο πλάσμα, ενώ μόνο το ένας (1/19, ποσοστό 5.3%) από αυτούς ήταν θετικός στα κύτταρα του αίματος (πίνακας 2)⁵⁸. Επιπλέον, κανένας από τους 9 φυσιολογικούς εθελοντές δεν παρουσίασε τα ανιχνεύσιμα ποσά mRNA του PSMA στα κύτταρα του αίματος ή στο πλάσμα.

Ανίχνευση PSMA mRNA



1. Θετικό δείγμα ελέγχου για PSMA
2. Αρνητικός έλεγχος
3. Θετικό δείγμα PSMA
4. Μάρτυρας μοριακού βάρους

Εικόνα 15. Ανάλυση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αгарόζης για το γονίδιο PSMA.



5.1.2 CEA mRNA στο πλάσμα και στα εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος

Καρκίνος του προστάτη:

Η ύπαρξη mRNA του γονιδίου CEA μελετήθηκε σε δείγματα πλάσματος και σε κύτταρα του αίματος στην ομάδα ασθενών με καρκίνο του προστάτη που δεν είχαν υποβληθεί σε θεραπεία. Βρέθηκε ότι ένας από τους δώδεκα ασθενείς ήταν θετικός για το mRNA του γονιδίου CEA στο πλάσμα (1/12, ποσοστό 8.33%) και πέντε (5/12, ποσοστό 41.67%) ασθενείς ήταν θετικοί για CEA στα κύτταρα του αίματος (πίνακας 1)⁵⁸.

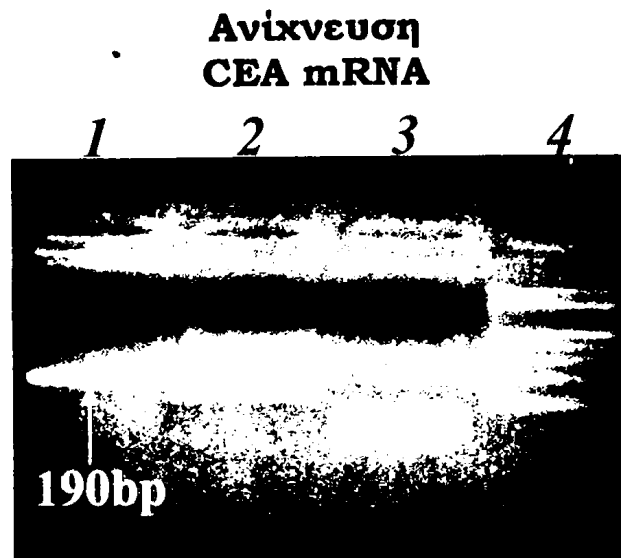
Μόνο τρεις (3/19, ποσοστό 15.8%) ασθενείς με προστατικό καρκίνο υπό θεραπεία ήταν θετικοί για mRNA του CEA σε PBMC, ενώ δεν ήταν δυνατό να ανιχνευθεί εξωκυτταρικό ελεύθερο CEA mRNA σε αυτήν την ομάδα ασθενών (πίνακας 2)⁵⁸.

Επιπλέον, κανένας από τους φυσιολογικούς εθελοντές δεν παρουσίασε ανιχνεύσιμα ποσά CEA mRNA στα κύτταρα του αίματος ή στο πλάσμα.

Καρκίνος του γαστρεντερικού συστήματος:

Ελέχθησαν ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου, του στομάχου και του παγκρέατος πριν τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου, για ύπαρξη ανιχνεύσιμων ποσοτήτων CEA στο αίμα. Από τους δεκαέξι ασθενείς που εξετάστηκαν, εννέα παρουσίασαν ανιχνεύσιμα ποσά CEA στα κύτταρα του αίματος (9/16, ποσοστό 56%), ενώ δεν βρέθηκε mRNA του γονιδίου στα αντίστοιχα δείγματα πλάσματος που εξετάστηκαν.





1. Θετικό δείγμα ελέγχου για CEA
2. Θετικό δείγμα CEA
3. Αρνητικός έλεγχος
4. Μάρτυρας μοριακού βάρους

Εικόνα 16. Ανάλυση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης για το γονίδιο CEA.

Πίνακας 1. Αποτελέσματα ανίχνευσης καρκινικού RNA στο πλάσμα και τα εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με καρκίνο του προστάτη πριν τη θεραπεία

Ασθενής	*PSMA		*CEA		Gleason score
	πλάσμα	Κύτταρα αίματος	πλάσμα	Κύτταρα αίματος	
1	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	θετικό	8
2	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	5
3	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	7
4	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	8
5	αρνητικό	αρνητικό	θετικό	θετικό	6
6	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	7
7	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	7
8	θετικό	θετικό	αρνητικό	θετικό	7
9	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	θετικό	7
10	θετικό	θετικό	αρνητικό	θετικό	8
11	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	7
12	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	7

* Η ανίχνευση mRNA των γονιδίων PSMA και CEA μελετήθηκε με τη μέθοδο της RT-PCR στο πλάσμα και τα εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος.



Πίνακας 2. Αποτελέσματα ανίχνευσης καρκινικού RNA στο πλάσμα και τα εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος ασθενών με καρκίνο του προστάτη υπό θεραπεία.

Ασθενής	*PSMA		*CEA		Θεραπεία	9 μήνες follow up	Gleason score
	πλάσμα	Κύτταρα αίματος	πλάσμα	Κύτταρα αίματος			
13	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	LHRH ^a	καμιά ένδειξη ασθένειας	7
14	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	6
15	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	7
16	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	8
17	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	RTH ^b & LHRH	ΔΕΝ ΥΠΑΡΧΟΥΝ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	7
18	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	θετικό	RTH & LHRH	υποτροπή της ασθένειας	7
19	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	θετικό	LHRH & CTH ^γ	υποτροπή της ασθένειας	8
20	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	LHRH & CTH	ΑΠΕΒΙΩΣΕ	8
21	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	ΟΡΧΕΚΤΟΜΗ & CTH	ΑΠΕΒΙΩΣΕ	7
22	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	RTH	ΔΕΝ ΥΠΑΡΧΟΥΝ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	8
23	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	7
24	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	7
25	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	LHRH	υποτροπή της ασθένειας	7
26	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	LHRH	υποτροπή της ασθένειας	6
27	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	RTH	υποτροπή της ασθένειας	8
28	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	θετικό	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	5
29	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	7
30	θετικό	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	LHRH	υποτροπή της ασθένειας	7
31	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	RPR ^δ & RTH	καμιά ένδειξη ασθένειας	7



* Η ανίχνευση mRNA των γονιδίων PSMA και CEA μελετήθηκε με τη μέθοδο της RT-PCR στο πλάσμα και τα εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος.

Συντμήσεις:

^aLHRH: Luteinising Hormone-Releasing Hormone

^bRTH: ακτινοθεραπεία

^γCTH: χημειοθεραπεία

^δRPR: ριζική προστατεκτομή

Πίνακας 3. Αποτελέσματα ανίχνευσης καρκινικού RNA στο πλάσμα και τα εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος ασθενών με καρκίνο του γαστρεντερικού συστήματος.

Ασθενής	CEA: στο πλάσμα	CEA: στα κύτταρα	Διάγνωση
8233	αρνητικό	αρνητικό	Καρκίνος παχέος εντέρου
7987	αρνητικό	θετικό	Καρκίνος παγκρέατος
7992	αρνητικό	αρνητικό	Καρκίνος παχέος εντέρου
7999	αρνητικό	θετικό	Καρκίνος στομάχου
7990	αρνητικό	αρνητικό	Καρκίνος παχέος εντέρου
8000	αρνητικό	θετικό	Καρκίνος παγκρέατος
8155	αρνητικό	αρνητικό	Καρκίνος παχέος εντέρου
8296	αρνητικό	θετικό	Καρκίνος παχέος εντέρου
7997	αρνητικό	αρνητικό	Καρκίνος στομάχου
7998	αρνητικό	θετικό	Καρκίνος παχέος εντέρου
8407	αρνητικό	αρνητικό	Καρκίνος παχέος εντέρου
8588	αρνητικό	αρνητικό	Καρκίνος παχέος εντέρου
8684	αρνητικό	θετικό	Καρκίνος παχέος εντέρου
8718	αρνητικό	θετικό	Καρκίνος παχέος εντέρου
8796	αρνητικό	θετικό	Καρκίνος παχέος εντέρου
8899	αρνητικό	θετικό	Καρκίνος παχέος εντέρου



5.1.3 Ανίχνευση mRNA του γονιδίου 14-3-3σ

Έκφραση του 14-3-3σ με τη μέθοδο της RT-PCR δεν ανιχνεύτηκε σε καρκίνο του πνεύμονα και του μαστού, ενώ ήταν δυνατή η ανίχνευσή του σε ένα ιστό από καρκίνο του εγκεφάλου που εξετάστηκε και σε ένα από τους τρεις φυσιολογικούς ιστούς από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα.

Πίνακας 4. Ανίχνευση του 14-3-3σ mRNA σε ασθενείς με καρκίνο.

ΑΑ	δείγμα	14-3-3 σ mRNA*
1	Φυσιολογικός πνεύμονας	αρνητικό
	Καρκίνος του πνεύμονα	αρνητικό
2	Καρκίνος του πνεύμονα	αρνητικό
3	Φυσιολογικός πνεύμονας	αρνητικό
4	Καρκίνος του πνεύμονα	αρνητικό
	Φυσιολογικός πνεύμονας	θετικό
5	Φυσιολογικός μαστός	αρνητικό
	Καρκίνος του μαστού	αρνητικό
6	Καρκίνος του εγκεφάλου	θετικό

*Το 14-3-3σ mRNA ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο RT-PCR (Reverse Transcription PCR)

Στο αίμα τέλος ανιχνεύθηκε mRNA του 14-3-3σ τόσο σε φυσιολογικά άτομα, όσο και σε ασθενείς με καρκίνους του πνεύμονα, μαστού, προστάτη και λευχαιμία



Πίνακας 5. Ανίχνευση του 14-3-3σ mRNA στα κύτταρα του αίματος.

ΑΑ	δείγμα	διάγνωση	14-3-3 σ mRNA
1	Αίμα	Φυσιολογικός	θετικό
2	Αίμα	Φυσιολογικός	θετικό
3	Αίμα	Φυσιολογικός	αρνητικό
4	Αίμα	Φυσιολογικός	αρνητικό
5	Αίμα	Καρκίνος του μαστού	αρνητικό
6	Αίμα	Λευχαιμία	αρνητικό
7	Αίμα	Λευχαιμία	αρνητικό
8	Αίμα	Λευχαιμία	αρνητικό
9	Αίμα	Λευχαιμία	αρνητικό
10	Αίμα	Λευχαιμία	αρνητικό
11	Αίμα	Λευχαιμία	αρνητικό
12	Αίμα	Λευχαιμία	αρνητικό
13	Αίμα	Λευχαιμία	αρνητικό
14	Αίμα	Λευχαιμία	θετικό
15	Αίμα	Λευχαιμία	θετικό
16	Αίμα	Λευχαιμία	θετικό
17	Αίμα	Λευχαιμία	θετικό
18	Αίμα	Λευχαιμία	θετικό
19	Αίμα	Καρκίνος του προστάτη	θετικό
20	Αίμα	Καρκίνος του προστάτη	θετικό
21	Αίμα	Καρκίνος του προστάτη	θετικό
22	Αίμα	Καρκίνος του προστάτη	αρνητικό
23	Αίμα	Καρκίνος του προστάτη	αρνητικό

*Το 14-3-3σ mRNA ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο RT-PCR



Παρατηρούμε ότι σε μεγάλο ποσοστό των δειγμάτων αίματος δεν ανιχνεύεται mRNA του γονιδίου 14-3-3σ και αυτό συμβαίνει τόσο σε υγιή άτομα όσο και σε ασθενείς με διάφορες μορφές νεοπλασιών (σε ποσοστό 50% και 58% αντίστοιχα). Η απουσία mRNA του γονιδίου 14-3-3σ σε μεγάλο ποσοστό δειγμάτων μπορεί να εξηγηθεί εξαιτίας της ύπαρξης μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου όπως θα δούμε παρακάτω.

Συμπεραίνουμε ότι η ανίχνευση mRNA του γονιδίου 14-3-3σ στα κύτταρα του αίματος δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καρκινικός δείκτης γιατί τα ποσοστά ανίχνευσης σε φυσιολογικά άτομα και σε ασθενείς με καρκίνο είναι παρόμοια.



5.2 DNA δείκτες

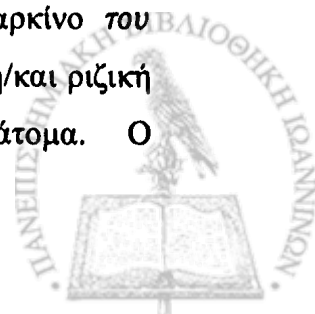
5.2.1 Ποσοτικοποίηση του DNA στο πλάσμα

5.2.1.1 Προσδιορισμός της ποσότητας DNA στο πλάσμα των ασθενών με καρκίνο του προστάτη

Τα επίπεδα DNA μετρήθηκαν με τη μέθοδο DNA DipStick σε 12 ασθενείς με πρόσφατα διαγνωσθέντα καρκίνο του προστάτη (πίνακας 6) και σε 19 ασθενείς με καρκίνο που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπείας ή/και χημειοθεραπεία ή/και ριζική προστατεκτομή (πίνακας 7)⁵⁸. Επιπλέον 18 υγιείς εθελοντές αίματος περιλήφθηκαν στη μελέτη. Χρησιμοποιώντας αυτήν την μέθοδο, η μέση τιμή της συγκέντρωσης DNA πλάσματος ήταν 236.58 ± 257.8 ng/μl στους ασθενείς με πρόσφατα διαγνωσθέντα καρκίνο του προστάτη και διέφερε σημαντικά από το μέσο ποσό του 13.1 ± 12.2 ng/μl. που παρατηρείται στους εθελοντές⁵⁸. Η διαφορά μεταξύ των ασθενών και των φυσιολογικών εθελοντών ήταν στατιστική σημαντική ($P=0.018$). Στους ασθενείς που υποβλήθηκαν στη θεραπεία, η μέση αξία της συγκέντρωσης DNA πλάσματος ήταν 56.9 ± 111.5 ng/μl, δηλαδή ελαφρώς αυξάνεται έναντι της ομάδας ελέγχου ($P = 0.095$)⁵⁸.

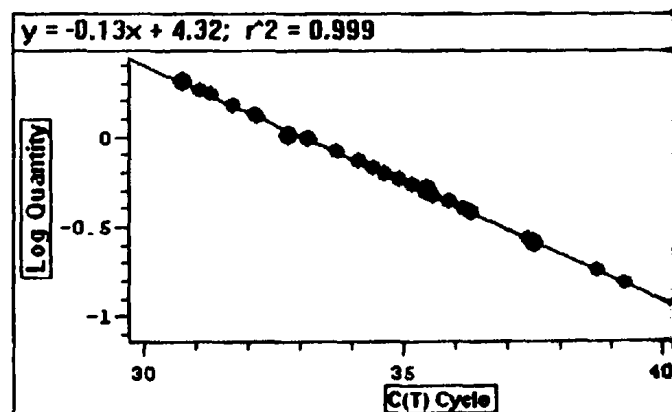
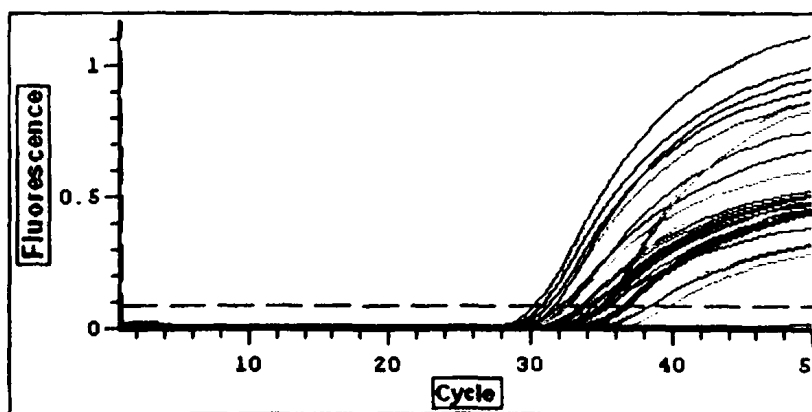
Η οριακή τιμή 37,5 ng/μl χρησιμοποιήθηκε για να διακρίνει μεταξύ των υγιών και των ασθενών. Χρησιμοποιώντας αυτή την οριακή τιμή, εφτά από τους δώδεκα (7/12) πρόσφατα διαγνωσθέντες ασθενείς με καρκίνο παρουσίασαν τιμές DNA στο πλάσμα μεγαλύτερες από την οριακή τιμή (ευαισθησία 58,33%), ενώ τέσσερις από τους δεκαεννιά (4/19) ασθενείς υπό θεραπεία είχαν συγκέντρωση DNA στο πλάσμα μεγαλύτερη από την οριακή τιμή (ευαισθησία 21,05%)⁵⁸. Επιπλέον, μόνο ένα από τα δεκαοχτώ υγιή άτομα (1/18) παρουσίασε συγκέντρωση DNA μεγαλύτερη από την οριακή (ειδικότητα 94,44%)⁵⁸. Στη συνέχεια έγινε ανάλυση της καμπύλης ROC (Receptor Operating Characteristics) Η περιοχή κάτω από τη καμπύλη ROC ήταν 0,840 (διάστημα εμπιστοσύνης 95%, 0,661 έως 0,947) για τους πρόσφατα διαγνωσθέντες ασθενείς με καρκίνο και 0,765 (διάστημα εμπιστοσύνης 95%, 0,597 έως 0.888) για εκείνους υπό θεραπεία.

Τα επίπεδα DNA μετρήθηκαν με τη μέθοδο της PCR σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR) σε δώδεκα ασθενείς με πρόσφατα διαγνωσθέντα προστατικό καρκίνο (πριν τη λήψη θεραπείας) και σε δεκαπέντε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη που υποβλήθηκαν στην ακτινοθεραπεία ή/και χημειοθεραπεία ή/και ριζική προστατεκτομή. Επιπλέον, ελέγχθηκαν δεκατρία φυσιολογικά άτομα. Ο



προσδιορισμός της ποσότητας του DNA πλάσματος με PCR σε πραγματικό χρόνο έδειξε ότι, η μέση συγκέντρωση του DNA στο πλάσμα είναι 20.2 ± 18.7 ng/ml για τους πρόσφατα διαγνωσθέντες ασθενείς με καρκίνο⁵⁸. Η διαφορά μεταξύ των ασθενών και των ελέγχων ήταν στατιστική σημαντική ($P=0.0097$). Στους ασθενείς που υποβλήθηκαν στη θεραπεία η μέση τιμή της συγκέντρωσης DNA στο πλάσμα ήταν 9.7 ± 14.4 ng/ml και ήταν ελαφρώς αυξημένη έναντι της ομάδας ελέγχου (4.7 ± 4 ng/ml). ($P=0.2494$)⁵⁸. Η οριακή τιμή 10 ng/ml χρησιμοποιήθηκε για να διακρίνει μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών. Εφτά από τους δώδεκα ασθενείς (7/12) με πρόσφατα διαγνωσθέντα καρκίνο του προστάτη παρουσίασαν τιμές DNA πλάσματος επάνω από την οριακή τιμή (ευαισθησία 58.3%), ενώ τέσσερις από τους δεκαπέντε (4/15) προστατικούς ασθενείς οι οποίοι ήταν υπό θεραπεία είχαν συγκέντρωση DNA στο πλάσμα επάνω από το όριο (ευαισθησία 26.7%) (πίνακες 6 και 7)⁵⁸. Επιπλέον μόνο ένα από τα δεκατρία (1/13) υγιή άτομα που ελέγχθηκαν παρουσίασε επίπεδα επάνω από το όριο (ειδικότητα 92.3%).

Η περιοχή κάτω από την καμπύλη ROC ήταν 0.708 (διάστημα εμπιστοσύνης 95%, 0.494 έως 0.871) για τους πρόσφατα διαγνωσθέντες ασθενείς με καρκίνο και 0.528 (διάστημα εμπιστοσύνης 95%, 0.332 έως 0.718) για εκείνους υπό θεραπεία. Στους ασθενείς με πρόσφατα διαγνωσμένο καρκίνο, η συγκέντρωση DNA στο πλάσμα δεν παρουσίασε οποιαδήποτε στατιστική συσχέτιση με το αποτέλεσμα Gleason (Gleason score $r_s = 0.283$ $P=0.3476$). Ομοίως, στους προστατικούς ασθενείς με καρκίνο υπό θεραπεία, το αποτέλεσμα Gleason δεν έδειξε συσχέτιση με το DNA πλάσμα ($r_s=0.141$, $P=0.5489$).



Εικόνα 17. Αποτελέσματα της Real time PCR για τη β-γλοβίνη.



Πίνακας 6. Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης του DNA στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του προστάτη πριν τη θεραπεία.

Ασθενής	¹ φορτίο DNA (ng/ml πλάσματος)		Gleason score
	DNA DipStick	Real-Time PCR	
1	625	43.5	8
2	75	21.6	5
3	18	3.6	7
4	75	12	8
5	18	5.6	6
6	375	21	7
7	18	0.2	7
8	375	35.7	7
9	625	52.8	7
10	625	45.3	8
11	5	0.6	7
12	5	0.9	7

¹ Η ποσοτικοποίηση του DNA στο πλάσμα έγινε χρησιμοποιώντας το DNA DipStick™ Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και με Real-Time PCR για το γονίδιο της β-γλοβίνης.



Πίνακας 7. Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης του DNA στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του προστάτη υπό θεραπεία.

Ασθενής	Φορτίο DNA (ng/ml πλάσματος)		Θεραπεία	9 μήνες follow up	Gleason score
	DNA DipStick	Real-Time PCR			
13	5	N.A ⁺	LHRH ^a	καμιά ένδειξη ασθένειας	7
14	18	N.A	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	6
15	5	N.A	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	7
16	18	N.A	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	8
17	18	6.8	RTH ^b & LHRH	ΔΕΝ ΥΠΑΡΧΟΥΝ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	7
18	75	17.2	RTH & LHRH	υποτροπή της ασθένειας	7
19	18	2.2	LHRH & CTH ^c	υποτροπή της ασθένειας	8
20	18	0.2	LHRH & CTH	Απεβίωσε	8
21	500	57.8	ΟΡΧΕΚΤΟΜΗ & CTH	Απεβίωσε	7
22	18	0.6	RTH	ΔΕΝ ΥΠΑΡΧΟΥΝ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	8
23	18	2.3	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	7
24	18	3.2	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	7
25	75	15.8	LHRH	υποτροπή της ασθένειας	7
26	5	0.4	LHRH	υποτροπή της ασθένειας	6
27	37.5	7	RTH	υποτροπή της ασθένειας	8
28	18	1.2	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	5
29	5	1.5	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	7
30	175	21.5	LHRH	υποτροπή της ασθένειας	7
31	37.5	7.6	RPR ^d & RTH	καμιά ένδειξη ασθένειας	7



¹ Η ποσοτικοποίηση του DNA στο πλάσμα έγινε χρησιμοποιώντας το DNA DipStick™ Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και με Real-Time PCR για το γονίδιο της β-γλοβίνης.

Συντμήσεις:

^aLHRH: Luteinising Hormone-Releasing Hormone

^bRTH: ακτινοθεραπεία

^γCTH: χημειοθεραπεία

^δRPR: ριζική προστατεκτομή

5.2.1.2 Προσδιορισμός της ποσότητας DNA στο πλάσμα των ασθενών με γαστρεντερικό καρκίνο

Τα επίπεδα DNA μετρήθηκαν με τη μέθοδο DNA DipStick σε 16 ασθενείς με πρόσφατα διαγνωσθέντα καρκίνο του γαστρεντερικού συστήματος πριν την χειρουργική αφαίρεση του όγκου ή οποιαδήποτε άλλη θεραπεία (πίνακας 8). Επιπλέον, 18 υγιείς εθελοντές αίματος περιελήφθησαν στη μελέτη. Χρησιμοποιώντας αυτή την μέθοδο, η μέση τιμή της συγκέντρωσης DNA πλάσματος ήταν 151.09 ± 184.22 ng/μl στους ασθενείς με πρόσφατα διαγνωσθέντα καρκίνο του γαστρεντερικού συστήματος και διέφερε σημαντικά από το μέσο ποσό του 13.1 ± 12.2 ng/μl. που παρατηρήθηκε στους εθελοντές. Η διαφορά μεταξύ των ασθενών και των φυσιολογικών εθελοντών ήταν στατιστική σημαντική.

Η οριακή τιμή 37,5 ng/μl χρησιμοποιήθηκε για να διακρίνει μεταξύ των υγιών χορηγών και των ασθενών. Χρησιμοποιώντας αυτή την οριακή τιμή, δέκα από τους δεκαέξι (10/16) ασθενείς με καρκίνο γαστρεντερικού συστήματος παρουσίασαν τιμές DNA στο πλάσμα μεγαλύτερες από την οριακή τιμή (ευαισθησία 62,5%). Επιπλέον, μόνο ένα από τα δεκαοχτώ (1/18) υγιή άτομα παρουσίασε συγκέντρωση DNA μεγαλύτερη από την οριακή (ειδικότητα 94,44%).



Πίνακας 8. Αποτελέσματα ανίχνευσης DNA στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του γαστρεντερικού συστήματος.

Ασθενής	φορτίο DNA (ng/ml πλάσματος)	Διάγνωση
8233	375	Καρκίνος παχέος εντέρου
7987	375	Καρκίνος παγκρέατος
7992	17,5	Καρκίνος παχέος εντέρου
7999	30	Καρκίνος στομάχου
7990	5	Καρκίνος παχέος εντέρου
8000	30	Καρκίνος παγκρέατος
8155	75	Καρκίνος παχέος εντέρου
8296	75	Καρκίνος παχέος εντέρου
7997	175	Καρκίνος στομάχου
7998	5	Καρκίνος παχέος εντέρου
8407	75	Καρκίνος παχέος εντέρου
8588	75	Καρκίνος παχέος εντέρου
8684	625	Καρκίνος παχέος εντέρου
8718	30	Καρκίνος παχέος εντέρου
8796	75	Καρκίνος παχέος εντέρου
8899	375	Καρκίνος παχέος εντέρου

[†] Η ποσοτικοποίηση του DNA στο πλάσμα έγινε χρησιμοποιώντας το DNA DipStick™ Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή



5.2.1.3 Προσδιορισμός της ποσότητας DNA στο πλάσμα των ασθενών με καρκίνο του μαστού

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του DNA πλάσματος με PCR σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR) στο πλάσμα 26 ασθενών με καρκίνο μαστού έγινε και με τις δύο μεθόδους (Real Time PCR και DNA DipStick). Οι ασθενείς με καρκίνο μαστού που περιελήφθησαν σε αυτή τη μελέτη δεν είχαν λάβει καμία θεραπευτική αγωγή. Χρησιμοποιώντας την μέθοδο Real Time PCR η μέση τιμή της συγκέντρωσης DNA πλάσματος ήταν 32.2 ± 104 ng/ml στους ασθενείς με καρκίνο και παρουσιάστηκε σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα (4.65 ± 3.96 ng/ml). Η οριακή τιμή 10.7 ng/ml χρησιμοποιήθηκε για να διακρίνει μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών Χρησιμοποιώντας αυτή τη τιμή δεκατέσσερα από τα είκοσι έξι (14/26) άτομα με καρκίνο μαστού παρουσίασαν συγκέντρωση DNA στο πλάσμα πάνω από το όριο (ευαισθησία 53.8%), ενώ ένα από τα δεκατρία (1/13) υγιή άτομα είχε επίπεδα DNA στο πλάσμα πάνω από το όριο (ειδικότητα 92.3%) Η τιμή της AUC-ROC καμπύλης ήταν 0.822, υποδεικνύοντας καλή διακριτική ικανότητα του τεστ.

Χρησιμοποιώντας την μέθοδο DNA DipStick η μέση τιμή της συγκέντρωσης DNA πλάσματος ήταν 100.88 ± 194.99 ng/ml στους ασθενείς με καρκίνο και παρουσιάστηκε σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα (8.33 ± 6.11 ng/ml). Η οριακή τιμή 37.5 ng/ml χρησιμοποιήθηκε για να διακρίνει μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών Χρησιμοποιώντας αυτή τη τιμή δεκατρία από τα είκοσι έξι (13/26) άτομα με καρκίνο μαστού παρουσίασαν συγκέντρωση DNA στο πλάσμα πάνω από το όριο (ευαισθησία 50%), ενώ ένα από τα δεκαοχτώ (1/18) υγιή άτομα είχε επίπεδα DNA στο πλάσμα πάνω από το όριο (ειδικότητα 94 %) Η τιμή της AUC-ROC καμπύλης ήταν 0.832, υποδεικνύοντας καλή διακριτική ικανότητα του τεστ.



Πίνακας 9. Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης του DNA στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του μαστού με τις μεθόδους Real-time PCR και DNA DipStick™.

Patient	DNA LOAD (ng/ml of plasma)	
	Real-time PCR	DNA DipStick™
1	19.3	75.0
2	8.2	37.5
3	4.3	5.0
4	27.6	250.0
5	5.3	5.0
6	28.0	75.0
7	5.0	18.0
8	14.7	75.0
9	12.5	75.0
10	12.7	75.0
11	540.9	1000.0
12	6.7	37.5
13	13.7	75.0
14	12.8	37.5
15	10.7	37.5
16	14.7	75.0
17	27.0	250.0
18	14	75.0
19	3.2	5.0
20	7.3	37.5
21	15.6	175.0
22	0.0	5.0
23	9.8	37.5
24	4.3	5.0
25	6.1	5.0
26	12.8	75.0



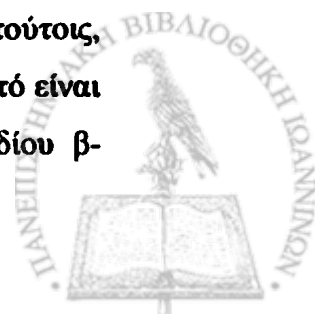
Πίνακας 10. Ευαισθησία και ειδικότητα της ποσοτικοποίησης του DNA, και η αντίστοιχη καμπύλη AUC-ROC (με 95% διάστημα εμπιστοσύνης) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Real-Time PCR σε 26 ασθενείς και 13 υγιή άτομα.

Οριακή τιμή συγκέντρωσης DNA (ng/ml)	Αριθμός ασθενών με θετικές τιμές DNA	Αριθμός υγιών ατόμων με θετικές τιμές DNA	Sensitivity %	Specificity %
4.3	22	4	84.6	69.2
6.5	19	3	73.1	76.9
10.8	14	1	53.8	92.3
19.3	4	0	15.4	100
28	1	0	3.8	100
>32.8	1	0	0	100
AUC ROC = 0.822 (0.667 - 0.926)				

Πίνακας 11. Ευαισθησία και ειδικότητα της ποσοτικοποίησης του DNA, και η αντίστοιχη καμπύλη AUC-ROC (με 95% διάστημα εμπιστοσύνης) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο DNA DipStick σε 26 ασθενείς και 18 υγιή άτομα.

Οριακή τιμή συγκέντρωσης DNA (ng/ml)	Αριθμός ασθενών με θετικές τιμές DNA	Αριθμός υγιών ατόμων με θετικές τιμές DNA	Sensitivity %	Specificity %
25	19	4	73	78
37.5	13	1	50	94
75	4	0	15	100
175	1	0	4	100
250	1	0	4	100
>1000	0	0	0	100
AUC ROC = 0.832 (0.689 - 0.927)				

Τα επίπεδα DNA που μετρήθηκαν στο πλάσμα για κάθε δείγμα ήταν συγκρίσιμα μεταξύ των μεθόδων (Real Time PCR και DipStick), εντούτοις, παρατηρήθηκε απόκλιση στην απόλυτη τιμή της συγκέντρωσης του DNA. Αυτό είναι αναμενόμενο δεδομένου ότι η Real Time PCR μετρά το ποσό του γονιδίου β-



γλοβίνης, ενώ η μέθοδος DNA DipStick μετρά το συνολικό ποσό του DNA που είναι παρόν στα δείγματα. Η Real Time PCR δοκιμή είναι βασισμένη στην ενίσχυση του DNA με PCR, η οποία θα μπορούσε να επηρεαστεί από το βαθμό τεμαχισμού του DNA. Επομένως, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε ότι μερικά από τα τεμάχια DNA στο πλάσμα δεν ενισχύθηκαν σε αυτήν την δοκιμή και το συνολικό ποσό DNA είναι υψηλότερο από αυτό που μετρήθηκε. Για το λόγο αυτό το μέγεθος του γονιδίου της β-γλοβίνης που ενισχύθηκε ήταν μικρό (μόλις 102bp), έτσι ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος μη ενίσχυσης λόγω τεμαχισμού του DNA. Η τεχνολογία Real Time PCR είναι πιο ευαίσθητη και τυποποιημένη μέθοδος και γι αυτό θεωρήθηκε καταλληλότερη για την μέτρηση της συγκέντρωσης DNA στο πλάσμα⁵².

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του DNA πλάσματος για τους υπόλοιπους ασθενείς και τα υγιή άτομα έγινε μόνο με PCR σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR). Η μέση συγκέντρωση DNA πλάσματος στους 68 συνολικά ασθενείς με καρκίνο μαστού είναι $45.8 \pm 18 \text{ ng/ml}$ και παρουσιάζεται αυξημένη σε σχέση με τη τιμή της ομάδας ελέγχου ($11.4 \pm 90.5 \text{ ng/ml}$)⁵⁹. Η οριακή τιμή 10.8 ng/ml χρησιμοποιήθηκε για να διακρίνει μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών. Τριάντα τρεις από τους εξήντα οχτώ (33/68) ασθενείς (πριν τη λήψη θεραπείας) παρουσίασαν τιμές DNA πλάσματος επάνω από την οριακή τιμή (ευαισθησία 48.5%), ενώ μόνο τρεις από τους πενήντα τέσσερις υγιείς ελέγχους παρουσίασαν συγκέντρωση DNA επάνω από το όριο των $10,8 \text{ ng/ml}$ (ειδικότητα 94.4%) (πίνακας 12)⁵⁹. Η τιμή του auc-ROC ήταν 0.827 (διάστημα εμπιστοσύνης 95% 0.748 έως 0.889), υποδεικνύοντας ότι η τεχνική έχει καλή διακριτική ικανότητα. Η μέση τιμή του DNA πλάσματος στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού με μετάσταση στους λεμφαδένες, ήταν αυξημένη ($69.9 \pm 285.8 \text{ ng/ml}$) έναντι των ασθενών χωρίς μετάσταση ($11.3 \pm 7 \text{ ng/ml}$).

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η ποσότητα του DNA στο πλάσμα συγκριτικά με άλλα κλινικά στοιχεία, όπως, η ύπαρξη μετάστασης σε λεμφαδένες, το μέγεθος του όγκου και οι καρκινικοί δείκτες που ανιχνεύονται με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η σχέση μεταξύ της ανίχνευσης αυξημένης ποσότητας DNA στο πλάσμα και της ανίχνευσης υποδοχέων οιστρογόνων (Estrogen Receptor, ER) και προγεστερόνης (Progesterone Receptor, PR), Her2/Neu, ki67 και p53. Παρατηρήθηκε αύξηση στην ποσότητα DNA πλάσματος στο 46% (13/28) των ασθενών με καρκίνο του μαστού και αρνητικούς λεμφαδένες (χωρίς μετάσταση), ενώ το ποσοστό των ασθενών με αυξημένο DNA στο πλάσμα και θετικούς λεμφαδένες

ήταν παρόμοιο (20/40, ποσοστό 50%). Δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση του DNA στο πλάσμα με το μέγεθος του όγκου, τη μετάσταση στους λεμφαδένες την έκφραση υποδοχέων προγεστερόνης και οιστρογόνων, αλλά ούτε και με το Her2/Neu και το p53. Πάντως, όπως φαίνεται και στο πίνακα 13, η μέση τιμή DNA στο πλάσμα είναι σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με μετάσταση στους λεμφαδένες (69.90 ± 285.80) σε σχέση με αυτούς που παρουσιάζουν αρνητικούς λεμφαδένες (11.35 ± 6.99).



Πίνακας 12. Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης του DNA στο πλάσμα και κλινικά στοιχεία ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Ασθενής	Στάδιο όγκου	μετάσταση	¹ DNA (ng/ml πλάσματος)	¹ ER	¹ PR	² KI67	³ P53	⁴ Her2/Neu	Μέγεθος όγκου
8382	II	θετικό	19,3	100	260	III	2	1+	2,2
8423	II	θετικό	8,2	200	200	I	1	3+	2,2
8550	II	θετικό	4,3	80	180	III	1	1+	N/A
8590	II	αρνητικό	27,6	100	190	III	3	2+	2,5
8812	II	θετικό	5,3	100	190	3	2	1+	3,8
8824	II	θετικό	28,0	0	0	III	3	3+	3,2
8924	II	αρνητικό	5,83	100	200	I	1	1+	2
8931	II	αρνητικό	14,7	100	45	I	1	1	1,7
8972	II	θετικό	12,5	100	100	III	2	2+	2
9043	II	θετικό	11,6	170	170	II	1	2+	2
9122	III	θετικό	15,0	170	180	II	1	1+	1,7
9128	II	θετικό	14,8	100	100	II	3	2+	1,5
9133	III	θετικό	12,7	100	0	III	1	3	2,5
9134	III	αρνητικό	27,0	0	0	III	4	3	2
9156	II	αρνητικό	6,7	80	140	I	1	1+	1
9176	II	αρνητικό	13,7	0	5	III	1	0	1,5
9252	II	αρνητικό	12,8	100	120	I	1	1+	1,3
9254	II	θετικό	10,7	0	0	III	2	3+	1.4+1
9270	II	θετικό	2,0	5	0	III	2	3+	1.4+1
9380	II	θετικό	32,8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1,7
9388	II	θετικό	14,0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	5,2
9397	II	αρνητικό	2,2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
9427	III	αρνητικό	7,3	100	0	III	1	2+	2
9477	III	θετικό	6,67	100	160	III	4	3+	1,5
9481	III	θετικό	9,8	80	0	III	3	3+	8
9527	II	αρνητικό	4,3	90	50	III	4	0	1,5
9532	II	αρνητικό	6,1	100	69	I	1	1+	2,4
9545	II	θετικό	15,6	5	60	N/A	N/A	0	N/A
9567	III	θετικό	12,8	90	0	III	3	3	4,5
9820	II	θετικό	8,3	90	0	II	1	2+	2,2
9890	II	θετικό	0,2	100	100	II	1	1+	1,5
9907	III	αρνητικό	9,1	100	100	II	1	1+	2,1
9969	II	αρνητικό	2,5	100	100	I	1	2+	2,2
10019	II	αρνητικό	6,9	90	90	I	1	0	1,8
10036	II	αρνητικό	11,4	70	70	I	1	1+	
10037	III	αρνητικό	1,4	0	0	III	4	2+	1,7
10061	I	αρνητικό	3,8	0	0	II	4	1	0,6
10139	II	αρνητικό	12,4	25	80	III	3	0	1,5
10157	II	θετικό	21,0	100	15	III	3	1+	2,5
10316	II	θετικό	14,1	100	100	III	2	2+	1,8

10325	II	θετικό	3	180	150	II	2	2+	N/A
10550	II	αρνητικό	20,0	100	100	I	1	1+	3,3
10551	II	αρνητικό	27,8	100	30	I	1	2+	3,5
10646	III	θετικό	540,9	15	0	III	4	2	3,2
10797	II	αρνητικό	10,58	200	260	II	1	1+	N/A
10816	II	αρνητικό	18,6	250	250	II	2	1+	2
10913	II	αρνητικό	16,7	230	30	I	1	1+	N/A
10917	II	θετικό	1,5	260	140	II	1	2	3,3
10933	II	θετικό	1,2	270	250	III	2	2	1
10948	II	αρνητικό	9,12	140	150	I	3	1+	N/A
10949	II	αρνητικό	5,88	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
10959	I	θετικό	325,42	15	75	I	0	0	1
10966	III	αρνητικό	12,82	0	0	II	1	0	N/A
11082	II	θετικό	1371,7	190	0	I	0	0	1,9
11142	II	θετικό	40,7	0	0	III	4	2	N/A
11213	III	θετικό	59,6	280	195	III	1	1	N/A
11260	II	αρνητικό	5,9	260	200	II	2	1+	1
11293	II	θετικό	7,8	260	50	III	1	1	N/A
11313	II	θετικό	3,2	260	260	III	1	2	N/A
11456	II	θετικό	1,4	230	140	I	1	1	N/A
11652	II	θετικό	19,3	260	45	II	1	1	N/A
11700	II	θετικό	126,2	240	150	III	1	1	N/A
11740	II	θετικό	0,8	0	0	III	4	0	4
11775	II	θετικό	1,0	170	16	II	4	0	1,1
11846	II	θετικό	3,2	210	210	I	1	1	3,9
11863	II	θετικό	0,8	240	200	II	2	1	N/A
11079	III	θετικό	8,6	150	0	III	1	3	4
11080	II	αρνητικό	14,7	0	0	III	1	1+	4

Επεξηγήσεις: ¹ER: Estrogen Receptor, PR: Progesterone Receptor

0-50: αρνητικό, 51-100: ασθενώς θετικό, 101-200: μετρίως θετικό, 201-300: εντόνως θετικό

²Ki67: I: χαμηλός δείκτης πολλαπλασιασμού, II: μέτριος δείκτης πολλαπλασιασμού, III: υψηλός δείκτης πολλαπλασιασμού

³p53 0: αρνητική χρώση, 1: ήπιας έντασης χρώση (1-25% θετικά κύτταρα)

2: μέτριας έντασης χρώση (25-50% θετικά κύτταρα), 3: έντονης έντασης χρώση (50-75% θετικά κύτταρα), 4:πολύ έντονης έντασης χρώση (75-100% θετικά)

⁴Her2/Neu: 0 και 1+: αρνητικό, 2+ και 3+: θετικό

N/A: μη διαθέσιμο

¹ Η ποσοτικοποίηση του DNA στο πλάσμα έγινε με Real-Time PCR για τη β-γλοβίνη.

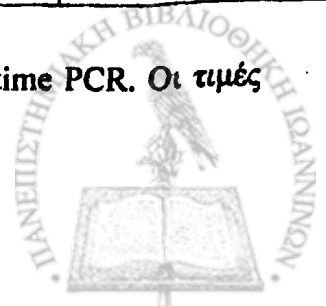


Ο παρακάτω πίνακας απαριθμεί τις τιμές του DNA πλάσματος στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού σύμφωνα με τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Πίνακας 13. Μέση τιμή της ποσότητας DNA στο πλάσμα σε σχέση με τα χαρακτηριστικά των ασθενών.

	Αριθμός ασθενών	Μέση τιμή ποσότητας DNA στο πλάσμα (ng/ml)*	Συντελεστής συσχέτισης Rank
Μετάσταση σε λεμφαδένες			
θετικό	40	69.9	$rs= 0.027$ $P=0.8274$
αρνητικό	28	11.35	
Size (cm)			
<2	20	93.27	$rs= 0.144$ $P=0.3134$
≥2	30	29.00	
Υποδοχέας οιστρογόνων			
0-50	15	69.99	$rs= -0.13$ $P=0.304$
51-100	27	11.29	
100-200	9	159.87	
201-300	13	20.41	
201-300	13	20.41	
Υποδοχέας προγεστερόνης			
0-50	26	85.42	$rs= -0.197$ $P=0.1179$
51-100	14	33.59	
100-200	18	17.31	
201-300	6	9.35	
Her2/Neu			
Negative (0-20% positive cells)	27	57.34	$rs= 0.01$ $P=0.9343$
Positive (20-100% positive cells)	38	31.79	
Stage			
I	2	164.61	$rs= 0.095$ $P=0.4356$
II	53	38.88	
III	13	55.67	

* Η ποσότητα DNA στο πλάσμα μετρήθηκε με τη μέθοδο Real time PCR. Οι τιμές αναφέρονται σε μg DNA ανά ml πλάσματος



Διαπιστώσαμε ότι περίπου 60% των ασθενών με καρκίνο του προστάτη, 48% των ασθενών με καρκίνο μαστού και 62.5% των ασθενών με καρκίνο του γαστρεντερικού συστήματος παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα εξωκυτταρικού DNA. Η μέτρηση του DNA στο πλάσμα μπορεί πιθανώς να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά μαζί με άλλους καρκινικούς δείκτες στη διάγνωση του καρκίνου. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι, η μέση συγκέντρωση του εξωκυτταρικού DNA που μετρήθηκε σε ασθενείς με καρκίνο μετά από την ολοκλήρωση της θεραπείας ήταν κοντά σε εκείνη που παρατηρήθηκε στην ομάδα ελέγχου. Αυτό είναι σε συμφωνία με προηγούμενες παρατηρήσεις που προτείνουν ότι το DNA πλάσματος μπορεί να υποβληθεί σε ποσοτικές αλλαγές στους ασθενείς με καρκίνο μετά από ακτινοθεραπεία⁶⁰. Εντούτοις, η χρησιμότητα της ποσοτικοποίησης του DNA του πλάσματος στον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της χημειοθεραπείας και της ακτινοθεραπείας δεν έχει καθοριστεί πλήρως ακόμα.



5.2.2 Ανάλυση μεθυλίωσης

5.2.2.1 MGMT

Για την ανάλυση της μεθυλίωσης χρησιμοποιήθηκε η ειδική για τη μεθυλίωση αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Methylation Specific PCR ή MSP). Αρχικά μελετήθηκε ένα γονίδιο το οποίο είναι γνωστό ότι παρουσιάζει υψηλά ποσοστά μεθυλίωσης σε καρκίνους του εγκεφάλου. Επιλέχθηκαν αρχειακά δείγματα όγκου, από τα οποία έγινε απομόνωση του DNA σύμφωνα με τα τυπικά πρωτόκολλα. Ο βαθμός μεθυλίωσης των νησίδων GrC του υποκινητή του MGMT καθορίστηκε από χημική τροποποίηση των μη μεθυλιωμένων, αλλά όχι των μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες

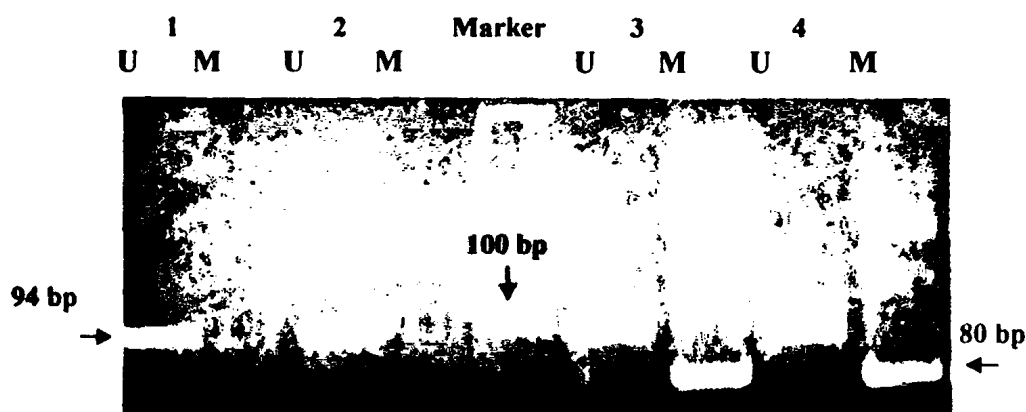
Εξετάστηκαν αρχειακά δείγματα όγκων από 24 ασθενείς. Σε όλους τους ασθενείς είχαν διαπιστωθεί ιστολογικά όγκοι (16 είχαν γλοίωμα και 8 μηνιγγίωμα). Οι ασθενείς ήταν μεταξύ 14 και 74 χρονών (μέση ηλικία κατά τη διάγνωση 55). Σε 7 από τους ασθενείς έγινε ανάλυση της μεθυλίωσης σε δείγματα αίματος. Υπερμεθυλίωση του υποκινητή MGMT βρέθηκε σε 5 από τα 16 γλοιώματα (45,5 %), συχνότητα παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε σε προηγούμενες μελέτες (πίνακας 14)²⁹. Η μεθυλίωση δεν σχετίστηκε με την ηλικία των ασθενών, ή το στάδιο του όγκου. Στα δείγματα αίματος δεν βρέθηκε μεθυλίωση του υποκινητή. Υπερμεθυλίωση στον υποκινητή του MGMT ανιχνεύτηκε επίσης σε 1 από τα 8 μηνιγγιώματα.

Πίνακας 14. Αποτελέσματα ανίχνευσης υπερμεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου MGMT.

	Γλοιώματα	Μηνιγγιώματα
Μεθυλίωση του MGMT	5	1
Απουσία μεθυλίωσης	11	7
Σύνολο	16	8
Συχνότητα μεθυλίωσης	45,5%	14%

Η μεθυλίωση δεν σχετίστηκε με την ηλικία των ασθενών, ή το στάδιο του όγκου. Στα δείγματα αίματος δεν βρέθηκε μεθυλίωση του υποκινητή. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η μεθυλίωση στον υποκινητή του MGMT προκαλεί καταστολή της επιδιορθωτικής λειτουργίας του ενζύμου. Για αυτό το λόγο αναμένεται ότι, ασθενείς οι οποίοι βρέθηκαν θετικοί για τη μεθυλίωση θα παρουσιάσουν αυξημένη ευαισθησία των καρκινικών ιστών στους αλκυλιωτικούς

παράγοντες (όπως το Carmustine ή BCNU), αφού δεν μπορεί να γίνει επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από αυτά τα φάρμακα, στο DNA των καρκινικών κυττάρων. Αντίθετα, σε ασθενείς με μη μεθυλιωμένο υποκινητή του MGMT αναμένεται μειωμένη αποτελεσματικότητα αυτών των φαρμάκων, λόγω της επιδιορθωτικής δράσης αυτού του ενζύμου. Είναι δυνατόν να μελετηθεί η ανταπόκριση των ασθενών στις αλκυλιωτικές ουσίες για να καθοριστεί αν η μεθυλίωση της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου MGMT μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση όγκων του εγκεφάλου που ανταποκρίνονται σε αλκυλιωτικές ουσίες. Αυτό θα ήταν πολύ σημαντικό για την αποφυγή άχρηστων θεραπευτικών μεθόδων και στον προσανατολισμό της θεραπευτικής αγωγής στην άμεση χρήση τέτοιων φαρμάκων (όπως το BCNU) σε ασθενείς θετικούς για τη μεθυλίωση στο MGMT. Η μελέτη της μεθυλίωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό του χρόνου επιβίωσης των ασθενών, αφού έχει βρεθεί ότι σε ασθενείς με γλοιώμα, ο μέσος χρόνος για την εξέλιξη της νόσου είναι μεγαλύτερος για τα μεθυλιωμένα γλοιώματα (21 μήνες) και μικρότερος για μη μεθυλιωμένα γλοιώματα (8μήνες)²⁹.



Εικόνα 18. Παραδείγματα MSP για το γονίδιο MGMT

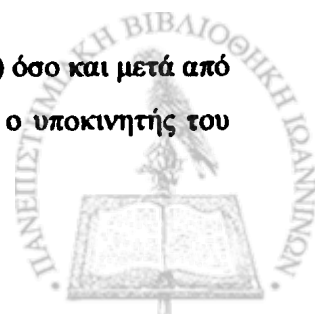
M: PCR για μεθυλιωμένο DNA. **U:** PCR για μη μεθυλιωμένο DNA

Marker: Δείκτης (ζώνες γνωστού μοριακού βάρους)

Οι γραμμές 1, 2, 3, 4 αντιστοιχούν στους ασθενείς 1, 2, 3, 4.

1, 2 : Η ανίχνευση ζώνης (μήκους 94bp) στο πήκτωμα ακρυλαμίδης μόνο μετά από PCR ειδική για το μη μεθυλιωμένο DNA, υποδεικνύει ότι σε αυτούς τους ασθενείς ο υποκινητής του γονιδίου δεν είναι μεθυλιωμένος.

2, 3 : Παρατηρούνται ζώνες τόσο μετά από PCR για μη μεθυλιωμένο DNA (94bp) όσο και μετά από PCR για μεθυλιωμένο DNA (80bp). Συμπεραίνουμε ότι σε αυτούς τους ασθενείς ο υποκινητής του MGMT είναι μεθυλιωμένος.



5.2.2.2 14-3-3σ

Ανιχνεύτηκε η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου 14-3-3σ σε ιστούς από ασθενείς με καρκίνο. Σε καρκινικούς ιστούς πνεύμονα και προστάτη ανιχνεύτηκε μεθυλίωση σε ποσοστό 100%, ενώ μόνο ένας παρακείμενος φυσιολογικός ιστός πνεύμονα ήταν μη μεθυλιωμένος (1/3).

Επίσης, εξετάστηκε η μεθυλίωση στο 14-3-3 σε δείγματα αίματος από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και σε φυσιολογικούς μάρτυρες. Σε όλες τις περιπτώσεις το 14-3-3 ήταν μεθυλιωμένο.

Πίνακας 15. Ανίχνευση μεθυλίωσης στον υποκινητή του 14-3-3σ σε ασθενείς με καρκίνο.

ασθενείς	Δείγμα	Μεθυλίωση στο 14-3-3σ*
1	Καρκίνος του πνεύμονα	+
	Φυσιολογικός πνεύμονας	+
2	Καρκίνος του πνεύμονα	+
	Φυσιολογικός πνεύμονας	+
3	Καρκίνος του προστάτη	+
	Φυσιολογικός προστάτης	+
4	Καρκίνος του προστάτη	+
	Φυσιολογικός προστάτη	+
5	καρκίνος του προστάτη	+
	Φυσιολογικός προστάτης	+
6	καρκίνος του προστάτη	+
7	καρκίνος του προστάτη	+
8	καρκίνος του προστάτη	+
9	Φυσιολογικός πνεύμονας	-

Συντμήσεις: +:θετικό, -:αρνητικό

* Η ανάλυση της μεθυλίωσης στον υποκινητή του 14-3-3σ έγινε με MSP (Methylation Specific PCR).



Πίνακας 16. Αποτελέσματα μεθυλίωσης στον υποκινητή του 14-3-3σ στο αίμα.

ασθενής	δείγμα	Μεθυλίωση στο 14-3-3σ*
1	Αίμα από ασθενή με καρκίνο του πνεύμονα	+
2	Αίμα από ασθενή με καρκίνο του πνεύμονα	+
3	Αίμα από φυσιολογικό μάρτυρα	+
4	Αίμα από φυσιολογικό μάρτυρα	+
5	Αίμα από φυσιολογικό μάρτυρα	+
6	Αίμα από φυσιολογικό μάρτυρα	+
7	Αίμα από φυσιολογικό μάρτυρα	+
8	Αίμα από φυσιολογικό μάρτυρα	+
9	Αίμα από φυσιολογικό μάρτυρα	+

Συντμήσεις: +:θετικό, -:αρνητικό

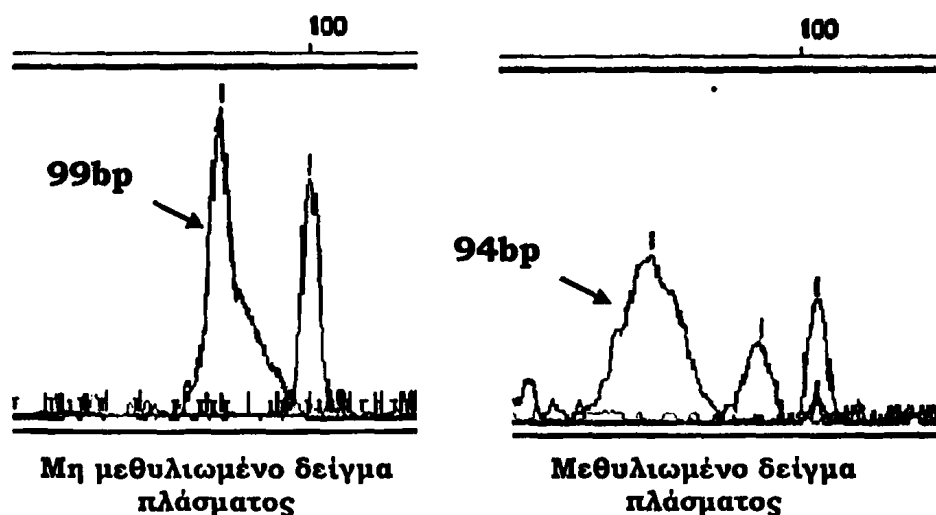
*Η ανάλυση της μεθυλίωσης στον υποκινητή του 14-3-3σ έγινε με MSP (Methylation Specific PCR).

Παρατηρούμε ότι μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου ανιχνεύεται στη πλειοψηφία των ιστών που απομονώνονται από ασθενείς με καρκίνο. Επιπλέον, μεθυλίωση παρατηρείται σε όλα τα δείγματα αίματος και αυτό έρχεται σε συμφωνία με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών⁵⁴. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι η μεθυλίωση στον υποκινητή του 14-3-3σ δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την ανίχνευση καρκίνου.



5.2.2.3 GSTP1

Η μεθυλίωση στον υποκινητή του GSTP1 εξετάστηκε σε καρκινικούς προστατικούς ιστούς και σε πλάσμα ασθενών με καρκίνο του προστάτη. Διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει το υψηλό ποσοστό μεθυλίωσης του νεοπλασματικού ιστού στον καρκίνο του προστάτη^{32,55}. Αυτά τα αποτελέσματα συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα που βρέθηκαν σε αυτή τη μελέτη κατά την οποία ανιχνεύθηκε μεθυλίωση στους 11 από τους 13 όγκους. Επιπλέον, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι υπερμεθυλίωση στο GSTP1 μπορεί να ανιχνευθεί στην πλειοψηφία των δειγμάτων πλάσματος από ασθενείς με καρκίνο του προστάτη πριν τη θεραπεία (7/12, ποσοστό 75%), αλλά το ποσοστό ανίχνευσης μειώνεται (7/19, ποσοστό 36.84%) στους ασθενείς υπό θεραπεία (πίνακες 17, 18)⁵⁸.



Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση σε αυτόματη συσκευή προσδιορισμού αλληλουχίας του DNA (ABI Prism 310), για την ανίχνευση του γονιδίου GSTP1.

Πίνακας 17. Αποτελέσματα ανάλυσης της μεθυλίωσης του GSTP1 στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του προστάτη πριν τη θεραπεία.

Ασθενής	[†] φορτίο DNA (ng/ml of plasma)		[‡] GSTP1	Gleason score
	DNA DipStick™	Real-time PCR		
1	625	43.5	θετικό	8
2	75	21.6	αρνητικό	5
3	18	3.6	θετικό	7
4	75	12	θετικό	8
5	18	5.6	θετικό	6
6	375	21	θετικό	7
7	18	0.2	θετικό	7
8	375	35.7	θετικό	7
9	625	52.8	θετικό	7
10	625	45.3	θετικό	8
11	5	0.6	αρνητικό	7
12	5	0.9	αρνητικό	7

[†] Η ανάλυση της μεθυλίωσης έγινε με την ειδική για τη μεθυλίωση αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με φθορισμό (fluorescent MSP).



Πίνακας 18. Αποτελέσματα ανάλυσης της μεθυλίωσης του GSTP1 στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του προστάτη υπό θεραπεία.

Ασθενής	¹ φορτίο DNA (ng/ml πλάσματος)		² GSTP1	Θεραπεία	9 μήνες follow up	Gleason score
	DNA DipStick	Real-Time PCR				
13	5	N.A ³	θετικό	LHRH ^a	καμιά ένδειξη ασθένειας	7
14	18	N.A	αρνητικό	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	6
15	5	N.A	αρνητικό	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	7
16	18	N.A	αρνητικό	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	8
17	18	6.8	αρνητικό	RTH ^b & LHRH	ΔΕΝ ΥΠΑΡΧΟΥΝ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	7
18	75	17.2	θετικό	RTH & LHRH	υποτροπή της ασθένειας	7
19	18	2.2	αρνητικό	LHRH & CTH ^γ	υποτροπή της ασθένειας	8
20	18	0.2	αρνητικό	LHRH & CTH	Απεβίωσε	8
21	500	57.8	θετικό	ΟΡΧΕΚΤΟΜΗ & CTH	Απεβίωσε	7
22	18	0.6	θετικό	RTH	ΔΕΝ ΥΠΑΡΧΟΥΝ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	8
23	18	2.3	αρνητικό	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	7
24	18	3.2	αρνητικό	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	7
25	75	15.8	θετικό	LHRH	υποτροπή της ασθένειας	7
26	5	0.4	αρνητικό	LHRH	υποτροπή της ασθένειας	6
27	37.5	7	αρνητικό	RTH	υποτροπή της ασθένειας	8
28	18	1.2	αρνητικό	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	5
29	5	1.5	αρνητικό	LHRH	καμιά ένδειξη ασθένειας	7
30	175	21.5	θετικό	LHRH	υποτροπή της ασθένειας	7
31	37.5	7.6	θετικό	RPR ^δ & RTH	καμιά ένδειξη ασθένειας	7

¹ Η ανάλυση της μεθυλίωσης έγινε με την ειδική για τη μεθυλίωση αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με φθορισμό (fluorescent MSP).

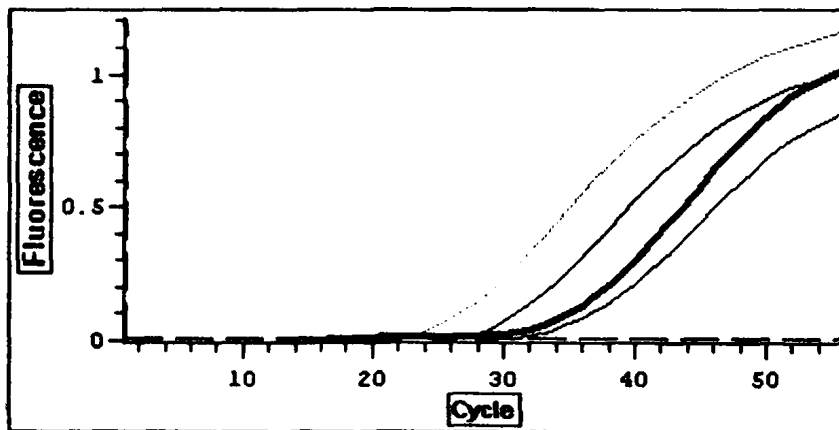
Συντμήσεις: ^aLHRH: Luteinising Hormone-Releasing Hormone, ^bRTH: ακτινοθεραπεία, ^γCTH: χημειοθεραπεία, ^δRPR: ριζική προστατεκτομή



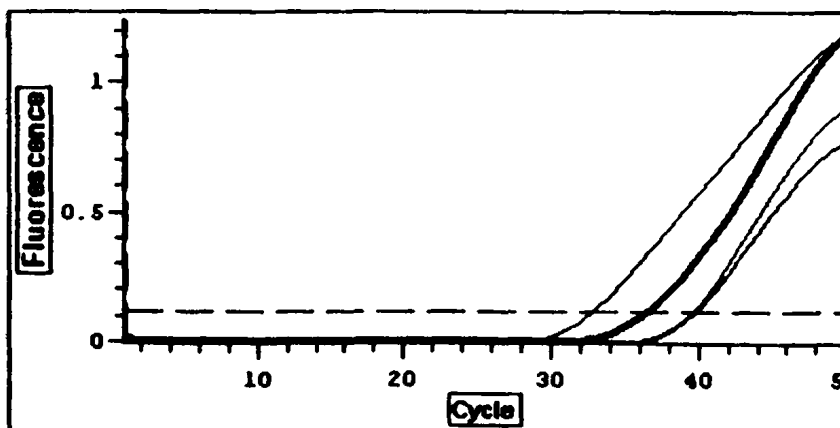
5.2.2.4 RASSF1A και ATM στο πλάσμα

Υπερμεθυλίωση του υποκινητή RASSF1A ήταν ανιχνεύσιμη σε δεκατρία από τα πενήντα (13/50, ποσοστό 26%) δείγματα DNA πλάσματος που λήφθηκαν από ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Επιπλέον, υπερμεθυλίωση του ATM ανιχνεύθηκε σε επτά από τους πενήντα (7/50, ποσοστό 14%) ασθενείς που εξετάστηκαν. Το 36% των ασθενών παρουσίασε μεθυλίωση σε τουλάχιστον ένα από τα δύο γονίδια που εξετάστηκαν (πίνακας 19)⁵⁹. Κανένας από τους δέκα φυσιολογικούς εθελοντές που ελέγχθηκαν δεν παρουσίασε υπερμεθυλίωση στα παραπάνω γονίδια στο πλάσμα.

Η ανάλυση της μεθυλίωσης στα δύο γονίδια (σε σχέση με άλλους προγνωστικούς δείκτες), δεν έδειξε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το μέγεθος του όγκου, τη μετάσταση στους λεμφαδένες την έκφραση υποδοχέων προγεστερόνης και οιστρογόνων, με το Her2/Neu και το p53.



Εικόνα 20. Αποτελέσματα ανάλυσης μεθυλίωσης για το γονίδιο RASSF1A με τη μέθοδο MethyLight (εικόνα από το Chromo4).



Εικόνα 21. Αποτελέσματα ανάλυσης μεθυλίωσης για το γονίδιο ATM με τη μέθοδο MethyLight (εικόνα από το Chromo4).



Πίνακας 19. Αποτελέσματα ανάλυσης της μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων RASSF1 και ATM στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του μαστού.

ασθενής	Στάδιο όγκου	μετάσταση	*Μεθυλίωση RASSF1A	*Μεθυλίωση ATM	¹ ER	¹ PR	² KI67	³ P53	⁴ Her2/Neu	Μέγεθος όγκου
8972	II	θετικό	θετικό	αρνητικό	100	100	III	2	2+	2
9134	III	αρνητικό	θετικό	θετικό	0	0	III	4	3	2
9380	II	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1,7
9388	II	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	5,2
9397	II	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
9427	III	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	100	0	III	1	2+	2
9477	III	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	100	160	III	4	3+	1,5
9481	III	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	80	0	III	3	3+	8
9527	II	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	90	50	III	4	0	1,5
9532	II	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	100	69	I	1	1+	2,4
9545	II	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	5	60	N/A	N/A	0	N/A
9567	III	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	90	0	III	3	3	4,5
9820	II	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	90	0	II	1	2+	2,2
9890	II	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	100	100	II	1	1+	1,5
9907	III	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	100	100	II	1	1+	2,1
9969	II	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	100	100	I	1	2+	2,2
10019	II	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	90	90	I	1	0	1,8
10036	II	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	70	70	I	1	1+	N/A
10037	III	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	0	0	III	4	2+	1,7
10061	I	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	0	0	II	4	1	0,6
10139	II	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	25	80	III	3	0	1,5
10157	II	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	100	15	III	3	1+	2,5
10316	II	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	100	100	III	2	2+	1,8
10325	II	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	180	150	II	2	2+	N/A
10550	II	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	100	100	I	1	1+	3,5
10551	II	αρνητικό	θετικό	θετικό	100	30	I	1	2+	3,5
10646	III	θετικό	θετικό	αρνητικό	15	0	III	4	2	3,2
10797	II	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	200	260	II	1	1+	N/A
10816	II	αρνητικό	θετικό	αρνητικό	250	250	II	2	1+	2
10913	II	αρνητικό	θετικό	αρνητικό	230	30	I	1	1+	N/A
10917	II	θετικό	αρνητικό	θετικό	260	140	II	1	2	3,5
10933	II	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	270	250	III	2	2	1
10948	II	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	140	150	I	3	1+	N/A
10949	II	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
10959	I	θετικό	θετικό	θετικό	15	75	I	0	0	1
10966	III	αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	0	0	II	1	0	N/A
11082	II	θετικό	θετικό	θετικό	190	0	I	0	0	1
11142	II	θετικό	θετικό	θετικό	0	0	III	4	2	N/A
11213	III	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	280	195	III	1	1	N/A

11260	II	αρνητικό	αρνητικό	θετικό	260	200	II	2	1+	I
11293	II	θετικό	θετικό	αρνητικό	260	50	III	1	1	N/A
11313	II	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	260	260	III	1	2	N/A
11456	II	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	230	140	I	1	1	N/A
11652	II	θετικό	θετικό	αρνητικό	260	45	II	1	1	N/A
11700	II	θετικό	θετικό	αρνητικό	240	150	III	1	1	N/A
11740	II	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	0	0	III	4	0	4
11775	II	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	170	16	II	4	0	1,1
1846	II	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	210	210	I	1	1	3,9
1863	II	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	240	200	II	2	1	N/A
1079	III	θετικό	αρνητικό	αρνητικό	150	0	III	1	3	4

Επεξηγήσεις: ¹ER: Estrogen Receptor, PR: Progesterone Receptor

0-50: αρνητικό, 51-100: ασθενώς θετικό, 101-200: μετρίως θετικό, 201-300: εντόνως θετικό

²Ki67: I: χαμηλός δείκτης πολλαπλασιασμού, II: μέτριος δείκτης πολλαπλασιασμού, III: υψηλός δείκτης πολλαπλασιασμού

³p53 0: αρνητική χρώση, 1: ήπιας έντασης χρώση (1-25% θετικά κύτταρα)

2: μέτριας έντασης χρώση (25-50% θετικά κύτταρα), 3: έντονης έντασης χρώση (50-75% θετικά κύτταρα), 4: πολύ έντονης έντασης χρώση (75-100% θετικά)

⁴Her2/Neu: 0 και 1+: αρνητικό, 2+ και 3+: θετικό

N/A: μη διαθέσιμο

¹ Η ανάλυση της μεθυλίωσης για τα γονίδια RASSF1A και ATM έγινε με τη μέθοδο MethyLight.



6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 RNA δείκτες

6.1.1 PSMA και CEA mRNA

Το 33.3% (4/12, ποσοστό 33.3%) των ασθενών με καρκίνο του προστάτη ήταν θετικοί για το γονίδιο PSMA στο πλάσμα, ενώ μόνο δύο (2/12, ποσοστό 16.7%) ήταν θετικοί στα κύτταρα του αίματος. Μεταξύ των ασθενών με καρκίνο του προστάτη υπό θεραπεία, τρεις (3/19, ποσοστό 15.8%) ήταν θετικοί για PSMA mRNA στο πλάσμα, ενώ μόνο ο ένας (1/19, ποσοστό 5.3%) από αυτούς ήταν θετικός στα κύτταρα του αίματος⁵⁸. Παρατηρούμε λοιπόν ότι τα ποσοστά ανίχνευσης PSMA στο πλάσμα είναι υψηλότερα σε σχέση με τα κύτταρα του αίματος. Αυτό σημαίνει ότι η ανίχνευση PSMA στο πλάσμα θα μπορούσε να αποδειχθεί χρησιμότερος δείκτης μεταστατικότητας για αυτούς τους ασθενείς. Μια επιπλέον παρατήρηση είναι ότι οι ασθενείς με PSMA mRNA στο πλάσμα παρουσίαζαν επίσης υψηλά επίπεδα εξωκυτταρικού DNA.

Θετική συσχέτιση με παθολογικές παραμέτρους συμβατές με επιθετικότερους όγκους και τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα παρατηρήθηκε σε ασθενείς με καρκινικό mRNA στο πλάσμα^{5,7}.

Πρέπει όμως να τονίσουμε ότι η ανίχνευση καρκινικού mRNA στο πλάσμα έχει και κάποια μειονεκτήματα. Αυτό συμβαίνει γιατί η ποσότητα RNA που απομονώνεται από το πλάσμα είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με τα κύτταρα του αίματος. Επιπροσθέτως, το RNA του πλάσματος είναι πιο εύθραυστο γιατί δεν προστατεύεται μέσα στα κύτταρα, με αποτέλεσμα να απαιτούνται πιο λεπτοί χειρισμοί στη επεξεργασία του υλικού αυτού. Οι χρόνος μεταξύ λήψης του αίματος και απομόνωσης RNA από το πλάσμα πρέπει να μειωθεί στο ελάχιστο (συνήθως μέχρι 2 ώρες).

Αντίθετα, το ποσοστό ανίχνευσης mRNA του CEA στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο είναι σημαντικά μειωμένο σε σχέση με το ποσοστό ανίχνευσης αυτού του γονιδίου στα κύτταρα του αίματος. Μόνο ένας από τους δώδεκα ασθενείς με προστάτη πριν τη θεραπεία ήταν θετικός για το συγκεκριμένο γονίδιο στο πλάσμα (ποσοστό 8.33%), ενώ κανένα από τα δείγματα πλάσματος ασθενών υπό θεραπεία δεν ήταν θετικό⁵⁸. Αντίθετα, τα ποσοστά ανίχνευσης CEA στα κύτταρα του αίματος ήταν αρκετά υψηλότερα (42.67% για ασθενείς πριν τη θεραπεία και 15.8% για ασθενείς υπό θεραπεία)⁵⁸.

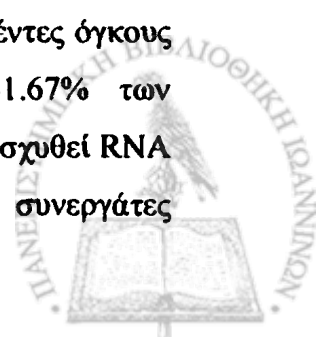


Η σχέση μεταξύ των καρκινικών κυττάρων στο αίμα και των καρκινικών νουκλεϊνικών οξέων στο πλάσμα παραμένει ασαφής. Η παρουσία εξωκυτταρικού mRNA του PSMA ελλείψει ανιχνεύσιμου ενδοκυτταρικού PSMA μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι το εξωκυτταρικά νουκλεϊκά οξέα (DNA/RNA) προερχόμενα από κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, μπορεί να έχουν ευκολότερη πρόσβαση στο αίμα σε σχέση με τα νουκλεϊκά οξέα που βρίσκονται στα κύτταρα της πρωταρχικής εστίας του όγκου. Εναλλακτικά, η αποπτωτική ικανότητα αυτών των ενδεχομένως μεταστατικών κυττάρων της κυκλοφορίας, μπορεί να είναι πολύ υψηλότερη, όπως προτείνεται από μελέτες που απέδειξαν την ύπαρξη διαφορών ρευστότητας της πλασματικής μεμβράνης μεταξύ των μεταστατικών και μη-μεταστατικών νεοπλασματικών κυττάρων⁷.

Αντίθετα, ο αριθμός των εξωκυτταρικών μορίων mRNA του CEA είναι πιθανώς πολύ μικρότερος συγκρινόμενος με τα μόρια mRNA του PSMA και αυτό εξηγεί το χαμηλό ποσοστό ανίχνευσης εξωκυτταρικού CEA. Εναλλακτικά, το mRNA του CEA, λόγω της διαφορετικής δομής του, μπορεί να είναι πιο ευαίσθητο στη δράση ριβονουκλεασών σε σχέση με το mRNA του PSMA. Με τον ίδιο τρόπο, οι Rappi και συνεργάτες ανίχνευσαν mRNA της τυροσινάσης στο 50% των δειγμάτων πλάσματος των ασθενών μελανώματος, ενώ κανένα δείγμα πλάσματος δεν ήταν θετικό για άλλα μόρια mRNA όπως το gp100 ή το MART-1⁶.

Προσδιορίσαμε ελεύθερο από κύτταρα mRNA του PSMA σε 3 ασθενείς με καρκίνο του προστάτη υπό θεραπεία. Επιπροσθέτως παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ ανίχνευσης καρκινικού mRNA στο πλάσμα και παθολογικές παραμέτρους συμβατές με επιθετικότερους όγκους και κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να κατανοηθεί πλήρως ο συσχετισμός αυτών των νέων μοριακών δεικτών με τη διάγνωση καρκίνου, την έκβαση της ασθένειας, και τελικά την ανταπόκριση στη θεραπεία.

Το εξωκυτταρικό mRNA του PSMA μπορεί να ανιχνευθεί ακόμη και ελλείψει ύπαρξης κυτταρικού mRNA. Όλοι οι ασθενείς που βρέθηκαν θετικοί για PSMA mRNA στα κύτταρα του αίματος ήταν θετικοί και στο πλάσμα. Αντίθετα, το mRNA του CEA ανιχνεύθηκε σε μόνο 1 από τους 12 ασθενείς με νεοδιαγνωσθέντες όγκους που εξετάστηκαν, ενώ ενδοκυτταρικό CEA ανιχνεύθηκε στο 41.67% των περιπτώσεων. Οι Chen και συνεργάτες απέδειξαν ότι ήταν δυνατό να ενισχυθεί RNA της τελομεράσης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού⁴. Οι Silva και συνεργάτες



ανίχνευσαν επίσης επιθηλιακό καρκινικό RNA στο πλάσμα από ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου⁵. Σε αυτή τη μελέτη το mRNA του CEA ανιχνεύθηκε στο 32% των δειγμάτων πλάσματος. Η ύπαρξη mRNA των CEA, CK19, ή και των δύο mRNAs στο πλάσμα, έδειξε συσχέτιση με την ύπαρξη διαλυτού CEA και με προχωρημένα στάδια του όγκου. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να κατανοηθεί πλήρως η συσχέτιση αυτών των νέων μοριακών δεικτών με τη διάγνωση καρκίνου, την έκβαση της ασθένειας, και τελικά την ανταπόκριση στη θεραπεία.

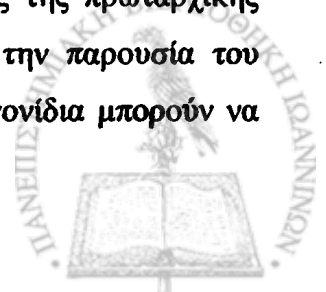
6.2 DNA δείκτες

6.2.1 Προσδιορισμός της ποσότητας DNA στο πλάσμα

Το αυξημένο εξωκυτταρικό DNA του πλάσματος που απομονώνεται από ασθενείς με καρκίνο έχει όλα τα χαρακτηριστικά του καρκινικού DNA όπως, η μειωμένη σταθερότητα των ελίκων, η παρουσία συγκεκριμένων ογκογονιδίων, ογκοκατασταλτικών γονιδίων και η μικροδορυφορική αστάθεια²³. Ο Anker και συνεργάτες⁶¹ ανίχνευσαν σημειακές μεταλλαγές των γονιδίων και μικροδορυφορική αστάθεια στο εξωκυτταρικό DNA που λήφθηκε από τους ασθενείς με διάφορους καρκίνους. Η παρατήρηση ότι το αυξημένο εξωκυτταρικό DNA προέρχεται από την εστία του όγκου στους ασθενείς με καρκίνο υποστηρίχθηκε περαιτέρω και από άλλους ερευνητές.

Στο πλάσμα και τον ορό ασθενών με καρκίνο ανιχνεύονται συχνά μεθυλιωμένα γονίδια, τα οποία όταν εκφράζονται (δηλαδή στη μη μεθυλιωμένη τους μορφή), προφυλάσσουν τα κύτταρα από μετάσταση και εμπλέκονται στη μεσοκυττάρια προσκόλληση, τη σταθεροποίηση του κυτταροσκελετού, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση⁶². Η ανίχνευση ειδικών για τον καρκίνο γενετικών αλλαγών στο πλάσμα μπορεί να χρησιμεύσει ως συμπληρωματικός δείκτης της κυκλοφορίας των καρκινικών κυττάρων που προκαλούν τελικά τις απόμακρες μεταστάσεις.

Μια εναλλακτική, αλλά εξίσου ελκυστική, υπόθεση είναι ότι το ίδιο το εξωκυτταρικό DNA της κυκλοφορίας μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη *de novo* όγκων σε όργανα που προσφέρονται για μακρινές μεταστάσεις της πρωταρχικής εστίας του όγκου. Οποιαδήποτε και αν είναι η εξήγηση για την παρουσία του «γυμνού» DNA στη κυκλοφορία, είναι τώρα σαφές ότι τα ογκογονίδια μπορούν να



κυκλοφορούν στο πλάσμα του αίματος. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στους ασθενείς με καρκίνο.

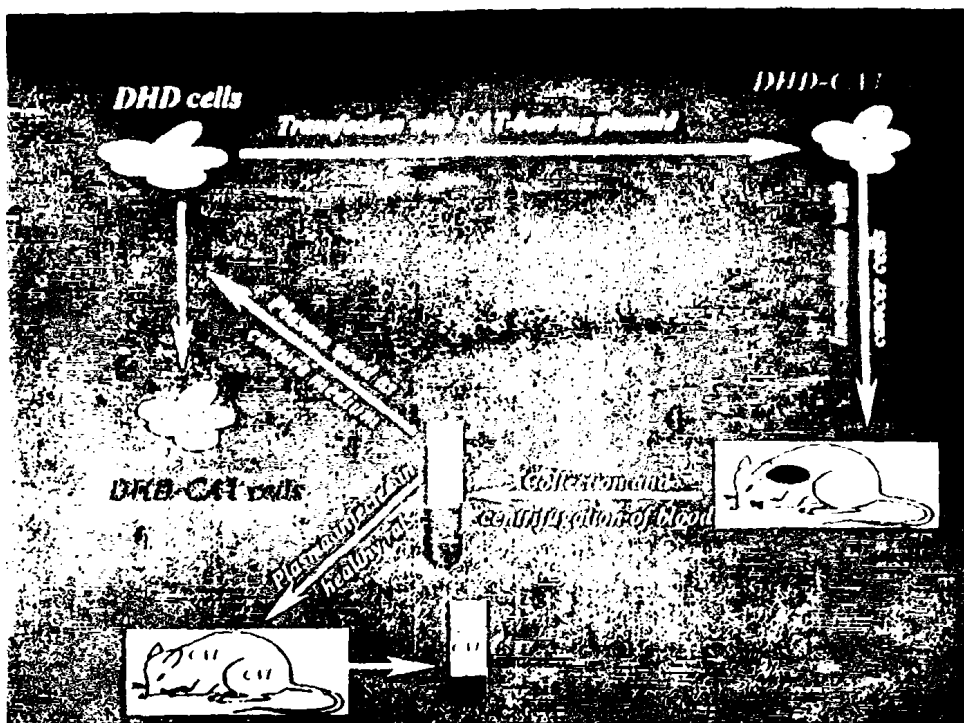
Χρησιμοποιώντας ένα πρότυπο αρουραίων, ο Garcia-Olmo και συνεργάτες κατέδειξαν τη παρουσία καρκινικού DNA στο πλάσμα, χρησιμοποιώντας καρκινικά κύτταρα (κύτταρα DHD/K12-PROb ή κύτταρα DHD) που ήταν μετασχηματισμένα με πλασμίδιο pCDNA3.1CAT (Invitrogen)^{63, 64, 65}. Αυτό το πλασμίδιο έκφρασης περιλαμβάνει ένα βακτηριακό γονίδιο (chloramphenicol acetyl transferase ή CAT), καθώς επίσης και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη.

Αποδείχθηκε ότι τα εγγενή κύτταρα DHD (που στερούνται τις ακολουθίες-δείκτη CAT) μπορούσαν να μετασχηματιστούν με DNA της κυκλοφορίας, απλά ως αποτέλεσμα επώασης με πλάσμα από αρουραίους που είχε μετατραπεί σε καρκινογόνο μέσω εγχύσεως με κύτταρα DHD-CAT αρκετές εβδομάδες προηγουμένως. Διαπιστώθηκε ότι τα καρκινικά κύτταρα DHD μετασχηματίζονται σε κύτταρα DHD-CAT όταν καλλιεργηθούν για μια εβδομάδα σε ένα μέσο που περιέχει 10% (v/v) πλάσμα από τους αρουραίους με καρκίνο (εικόνα 22)⁶⁵. Επίσης, όταν εμβολιάστηκαν υγιείς αρουραίοι ενδοπεριτοναϊκά με πλάσμα από αρουραίους με καρκίνο, το γονίδιο δείκτης CAT βρέθηκε στα εκχυλίσματα των πνευμόνων όλων των πειραματόζων μερικές εβδομάδες αργότερα (εικόνα 22)⁶⁴.

Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζονται εν μέρει και από εκείνα των Pulciani και συνεργατών, οι οποίοι κατέδειξαν τη παρουσία κυρίαρχων ογκογονιδίων στα καρκινικά κύτταρα ως αποτέλεσμα της μετάδοσης του κακοήθους φαινοτύπου από καρκινικά σε φυσιολογικά κύτταρα μέσω μετασχηματισμού με γενωμικό DNA⁶⁶.

Εξετάζοντας τα διαθέσιμα πειραματικά και κλινικά στοιχεία, προτάθηκε η ακόλουθη υπόθεση: η μετάσταση είναι πιθανόν να εμφανίζεται μέσω μετασχηματισμού των ευαίσθητων κυττάρων που βρίσκονται στα όργανα στόχους με τα κυρίαρχα ογκογονίδια που προέρχονται από τον αρχικό όγκο και κυκλοφορούν στο πλάσμα. Προτάθηκε δοκιμαστικά ο όρος γενωμετάσταση (genometastasis) για να περιγραφεί αυτό το υποθετικό φαινόμενο⁶⁵.





Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση των πειραμάτων μετασχηματισμού με το ονίδιο δείκτη CAT⁶⁴.

Είναι πιθανό, τα αποπτωτικά σωματίδια που προέρχονται από κύτταρα του όγκου και κυκλοφορούν στο πλάσμα, να λαμβάνονται από τα κύτταρα μέσω φαγοκυττώσης και αυτό το φαινόμενο να συνδέεται με τη διασπορά του καρκίνου. Η ικανότητα μεταφοράς του DNA μπορεί να εμφανίζεται μεταξύ καρκινικών κυττάρων και άλλων κυττάρων του σώματος και αυτή η μεταφορά να παρέχει ένα μηχανισμό για τη γενωμετάσταση. Τα στοιχεία υπέρ της υπόθεσης "genometastasis" είναι πολύ ελκυστικά και καθιστούν απαραίτητη τη διεξαγωγή περαιτέρω ερευνών..

Επιπλέον και άλλοι ερευνητές απέδειξαν την ύπαρξη εξωκυτταρικού DNA στο πλάσμα κυκλοφορία του αίματος. Ο de Kok και συνεργάτες⁶⁷, ανέφεραν ότι το DNA που προέρχεται από την εστία του όγκου θα μπορούσε να βρεθεί στον ορό ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου και του ορθού. Ανίχνευσαν επίσης τις ίδιες σημειακές μεταλλάξεις, που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις K-ras στο DNA του όγκου και στο DNA του ορού. Οι Kawamura και συνεργάτες⁶⁸, χρησιμοποιώντας την ανάλυση ανοσοφθορισμού, παρατήρησαν ότι το DNA που λήφθηκε από το πλάσμα ασθενών με καρκίνο των πνευμόνων σχηματίζει σύμπλοκα με την πρωτεΐνη p53. Πρότειναν ότι η ίδια αλληλεπίδραση που παρατηρείται μεταξύ p53 και του DNA στα φυσιολογικά κύτταρα, εμφανίζεται στον ορό πολλών ασθενών με καρκίνο. Οι Chen και

συνεργάτες⁶⁹ μελέτησαν την παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας και την απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) στο εξωκυτταρικό DNA από ασθενείς με καρκίνο του μαστού και βρήκαν τις ίδιες αλλαγές LOH στα δείγματα πλάσματος και στα αντίστοιχα δείγματα όγκων. Η ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας στο πλάσμα αναφέρθηκε επίσης σε καρκινώματα κεφαλής τραχήλου, καρκίνους του μαστού⁷⁰, των πνευμόνων⁷¹, και σε μελανώματα⁷². Όλες αυτές οι μελέτες προτείνουν ότι το DNA από τον όγκο απελευθερώνεται στην κυκλοφορία και είναι εμπλουτισμένο στο πλάσμα και τον ορό.

Πράγματι, και άλλες ανωμαλίες όπως η υπερμεθυλίωση γονιδίων^{55, 58, 73} και η μεταλλαγή K-ras⁷⁴ που ανιχνεύονται σε καρκινικό DNA, βρέθηκαν και στο εξωκυτταρικό DNA ασθενών με καρκίνο. Είναι εύλογο ότι στους ογκώδεις όγκους, η λύση κυττάρων από τη νέκρωση ή ακόμα και η απόπτωση οδηγεί στην απελευθέρωση του γυμνού DNA στην κυκλοφορία. Οι Jahr και συνεργάτες⁷⁵ θεώρησαν ότι τα αποπτωτικά και νεκρωτικά κύτταρα είναι η σημαντικότερη πηγή DNA στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο. Το DNA που κυκλοφορεί στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο μπορεί να περιέχει καρκινικό DNA όγκων σε διάφορα ποσοστά από 3% μέχρι 93%.

Αυτές και πολλές άλλες ακόμα μελέτες έχουν προτείνει ότι το εξωκυτταρικό DNA του πλάσματος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως καρκινικός δείκτης. Το DNA του πλάσματος θα μπορούσε να αντικαταστήσει το DNA που απομονώνεται μέσω επεμβατικών και επίπονων μεθόδων όπως οι βιοψίες ιστού. Η λήψη DNA του πλάσματος είναι όχι μόνο μια μη επεμβατική μέθοδος αλλά και μια διαδικασία που μπορεί να επαναλαμβάνεται συχνά.

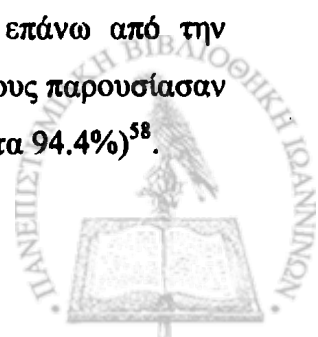
Δύο τύποι μετρήσεων του εξωκυτταρικού DNA θα μπορούσαν να είναι κλινικά χρήσιμοι. Η πρώτη είναι η μέτρηση της ποσότητας DNA του πλάσματος. Η μέτρηση αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά σε συνδυασμό με άλλους καρκινικούς δείκτες. Οι Shapiro και συνεργάτες⁷⁶, για παράδειγμα διαπίστωσαν ότι υπήρξε αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα όταν μετρήθηκε το εξωκυτταρικό DNA μαζί με το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA) στους γαστρεντερικούς όγκους. Σε μια άλλη μελέτη που έγινε από τον Sozzi και συνεργάτες διαπιστώθηκε αυξημένη ποσότητα DNA στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο των πνευμόνων, στο 78% των περιπτώσεων, ενώ κανένα από τα φυσιολογικά άτομα που εξετάστηκαν δεν παρουσίασε υψηλή ποσότητα DNA στο πλάσμα²².



Επιπλέον, το εξωκυτταρικό DNA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για μετρήσεις όπως η ανίχνευση γονιδιακών μεταλλαγών, η μικροδορυφορική αστάθεια και η ανάλυση της μεθυλίωσης. Προτάθηκε ότι, αυτές οι μετρήσεις έχουν προγνωστική και διαγνωστική αξία. Το γεγονός ότι οι μικροί όγκοι (T1) σταδίου 1 ή κανονικά καρκινώματα του μαστού παρουσιάζουν συχνά αλλαγές στο DNA του πλάσματος ή του ορού σε αρχικό στάδιο υποδεικνύει ότι, το DNA στο πλάσμα ή στον ορό μπορεί να γίνει ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο για τους πρώιμη διάγνωση ενδεχομένως ιάσιμων καρκίνων⁶⁹. Για παράδειγμα, η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου GSTP1 βρέθηκε ότι είναι ανιχνεύσιμη στο πλάσμα και στα ούρα ασθενών με προστάτη και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως καρκινικός δείκτης στη μοριακή σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη^{35,55}. Επιπλέον, ο Muller και συνεργάτες αναφέρουν ότι η μεθυλίωση στον ορό ασθενών με καρκίνο του μαστού (πριν την εγχείριση) ορισμένων γονιδίων και κυρίως του RASSF1A και του APC είναι πιο ισχυρός προγνωστικός δείκτης σε σχέση με τους συμβατικούς δείκτες⁷³. Το μεθυλιωμένο DNA για αυτά τα δύο γονίδια στον ορό των ασθενών αντανακλούν κακή πρόγνωση.

Η παρούσα μελέτη παρέχει στοιχεία ότι η ποσότητα DNA στο πλάσμα αυξάνεται σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη, του μαστού και του γαστρεντερικού συστήματος, σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα. Επιπροσθέτως, στο DNA του πλάσματος μπορεί να ανιχνευθεί υπερμεθυλίωση σε γονίδια τα οποία είναι μη μεθυλιωμένα στο αίμα υγιών ατόμων. Η ύπαρξη μεθυλίωσης (σε γονίδια όπως το GSTP1, το RASSF1A και το ATM) στο πλάσμα των ασθενών, όπως αναφέρθηκε, υποδηλώνει ύπαρξη DNA καρκινικής προέλευσης. Όπως είναι γνωστό το πλάσμα δεν περιέχει κύτταρα και τα νουκλεϊκά οξέα (DNA/RNA) βρίσκονται σε αυτό «γυμνά», χωρίς τη προστασία που τους παρέχουν τα κύτταρα.

Στη παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης DNA στο πλάσμα στο 58.33% (7/12) των ασθενών με καρκίνο του προστάτη πριν τη θεραπεία και σε 4 από τους 19 ασθενείς υπό θεραπεία (21.05%). Η αύξηση της συγκέντρωσης του DNA στο πλάσμα χρησιμοποιήθηκε για να διακρίνει μεταξύ των υγιών ατόμων και των ασθενών με καρκίνο του μαστού. Βρέθηκε ότι το 48.5% (33/68) των ασθενών (πριν τη λήψη θεραπείας) παρουσίασαν τιμές DNA πλάσματος επάνω από την ορισθείσα οριακή τιμή, ενώ μόνο 4 από τους 54 (5.6%) υγιείς ελέγχους παρουσίασαν συγκέντρωση DNA μεγαλύτερη από το όριο των 10,8ng/μl (ειδικότητα 94.4%)⁵⁸.



Με βάση τις προηγούμενες μελέτες αλλά και τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν από αυτή τη μελέτη μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το καρκινικής προέλευσης DNA του πλάσματος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως καρκινικός δείκτης.

6.2.2 Ανάλυση της μεθυλίωσης

6.2.2.1 Μεθυλίωση του γονιδίου GSTP1 στο πλάσμα

Η υπερμεθυλίωση στον υποκινητή του GSTP1 ήταν ανιχνεύσιμη σε 9 από τα 12 (75%) δείγματα πλάσματος που λήφθηκαν από τους ασθενείς με πρόσφατα διαγνωσθέντα προστατικό καρκίνο και σε 7 από τους 19 (36.8%) ασθενείς υπό θεραπεία, ενώ κανένας από τους 9 φυσιολογικούς εθελοντές που εξετάστηκαν δεν παρουσίασε υπερμεθυλίωση στο GSTP1 του πλάσματος. Η συσχέτιση της μεθυλίωσης του GSTP1 με την ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία και κατά συνέπεια με την χωρίς όγκο επιβίωση δεν έχει ακόμα καθοριστεί πλήρως. Από τη συνολική ανάλυση των μοριακών δεικτών στον καρκίνο του προστάτη προέκυψε ότι, όλοι οι ασθενείς με αυξημένα ποσά DNA στο πλάσμα παρουσίασαν επίσης την παρεκκλίνουσα μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου GSTP1 στο πλάσμα (πίνακες 18 και 19). Η συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης μεθυλίωσης στο GSTP1 και της ανταπόκρισης στη θεραπεία δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως ακόμα. Ένας από τους θετικούς ασθενείς για GSTP1 υπό θεραπεία παρουσίασε στη συνέχεια έναν όγκο νεφρών. Η πλειοψηφία των ασθενών με καρκίνο του προστάτη πριν τη θεραπεία παρουσίασε είτε υψηλά επίπεδα DNA είτε υπερμεθυλίωση στον υποκινητή του GSTP1 στο πλάσμα, ενώ το 88% αυτών παρουσίασε και τις δύο αυτές αλλαγές του DNA⁵⁸.

6.2.2.2 Μεθυλίωση των γονιδίων RASSF1A και ATM

Υπερμεθυλίωση είτε στο RASSF1A είτε στο ATM ήταν ανιχνεύσιμη στο 36% (18 από τους 50) των ασθενών με καρκίνο του μαστού που εξετάστηκαν. Επιπλέον, η πλειοψηφία των ασθενών με τον καρκίνο του μαστού παρουσίαζε είτε υψηλά επίπεδα DNA στο πλάσμα είτε έκτοπη μεθυλίωση στο πλάσμα, ενώ το 54% (27 από τους 50 ασθενείς) παρουσίαζε και τις δύο αλλαγές του DNA. Η παρούσα μελέτη περιγράφει για πρώτη φορά την ύπαρξη μεθυλίωσης στον υποκινητή του γονιδίου ATM στο DNA του πλάσματος.



Διάφορες μελέτες έχουν αναφέρει ότι η ύπαρξη μεθυλίωσης στις νησίδες CpG του υποκινητή του γονιδίου RASSF1A μπορεί να διαδραματίσει έναν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού. Επιπλέον, υπερμεθυλίωση στο γονίδιο αυτό έχει ανιχνευθεί σε δείγματα πλάσματος και ορών ασθενών με καρκίνο του μαστού^{59,73,77}. Οι Dulaimi και συνεργάτες ανίχνευσαν μεθυλίωση στο RASSF1A στο 65% του DNA από όγκους μαστού και στο 56% του DNA από ορό ασθενών⁷⁷, ενώ ο Muller ανίχνευσε υπερμεθυλίωση του RASSF1A στο 23% των δειγμάτων DNA από ορό ασθενών με πρωταρχικό καρκίνο του μαστού και στο 80% των ασθενών με συστηματικό καρκίνο του μαστού⁷³. Ο Vo και συνεργάτες ανέφεραν επιγενετική καταστολή της έκφρασης του ATM στο 78% των όγκων μαστού, όπως αποδείχθηκε με τη χρήση της ειδικής για τη μεθυλίωση PCR⁴⁴.

Η ανάλυση της μεθυλίωσης των γονιδίων φαίνεται ότι είναι ειδική, δεδομένου ότι έχει αναφερθεί πως όταν ένα γονίδιο είναι μη μεθυλιωμένο στο DNA που απομονώνεται από τον όγκο βρίσκεται πάντα μη μεθυλιωμένο στο αντίστοιχο DNA από ορό ή πλάσμα (ειδικότητα 100%). Αν και η μέθοδος είναι ειδική, η ευαισθησία της φαίνεται να μειώνεται στα υγρά του σώματος, δεδομένου ότι μόνο ένα ποσοστό των ασθενών με μεθυλιωμένα γονίδια στο DNA του όγκου έχει το ίδιο ανώμαλο σχέδιο μεθυλίωσης στον ορό. Επιπλέον, όλα τα γνωστά γονίδια παρουσιάζουν ανώμαλη μεθυλίωση μόνο σε ένα ποσοστό των ασθενών με καρκίνο μαστού. Για αυτούς τους λόγους, είναι απαραίτητο να αναλυθεί ένας μεγαλύτερος αριθμός γονιδίων στο πλάσμα ή τον ορό έτσι ώστε να λαμβάνονται αποτελέσματα για περισσότερες θέσεις μεθυλίωσης και να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου.

Για να είναι η ανάλυση της μεθυλίωσης χρήσιμη ως καρκινικός δείκτης, θα πρέπει το γονίδιο που εξετάζεται να είναι μεθυλιωμένο στην εστία του όγκου και μη μεθυλιωμένο στο περιφερικό αίμα. Για παράδειγμα η μεθυλίωση του γονιδίου 14-3-3σ που εξετάσαμε δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του καρκίνου, επειδή παρουσιάζει το ίδιο σχέδιο μεθυλίωσης τόσο στον όγκο όσο και στο περιφερικό αίμα φυσιολογικών ατόμων.



7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε αυτήν την μελέτη διάφοροι μοριακοί δείκτες εξετάστηκαν για τη χρησιμότητά τους στην ανίχνευση καρκίνου (πίνακες 20, 21). Οι διαγνωστικοί δείκτες που βασίζονται στην ανίχνευση DNA στο πλάσμα, όπως η ποσοτικοποίηση του DNA και η μεθυλίωση, φαίνεται ότι υπερτερούν σε σχέση με τους δείκτες που βασίζονται στην ανίχνευση RNA στο πλάσμα για τους εξής λόγους:

1. Το DNA μπορεί να απομονωθεί πιο εύκολα σε σχέση με το RNA από το πλάσμα ή τον ορό, είναι πολύ πιο σταθερό από αυτό και δεν απαιτεί τους λεπτούς χειρισμούς και τη ταχεία επεξεργασία του δείγματος, όπως γίνεται με το εξωκυτταρικό RNA.
2. Τα ποσοστά ανίχνευσης DNA δεικτών (και κυρίως μεθυλίωσης) στο πλάσμα είναι μεγαλύτερο από αυτό που έχει επιτευχθεί για τους γνωστούς μέχρι σήμερα RNA δείκτες. Αυτό είναι προφανές αν παρατηρήσουμε τους συγκεντρωτικούς πίνακες των DNA και RNA δεικτών για τον καρκίνο του προστάτη και του μαστού.
3. Επιπλέον η ανίχνευση DNA στο πλάσμα έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο δείκτη πρόγνωσης της εξέλιξης της νόσου.



Πίνακας 20. Σύγκριση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από DNA και RNA καρκινικούς δείκτες στον καρκίνο του προστάτη⁵⁸.

Ασθενείς	[†] Αυξημένη ποσότητα DNA στο πλάσμα	Μεθυλίωση στο [‡] GSTP1	*PSMA		*CEA	
			πλάσμα	κύτταρα	πλάσμα	κύτταρα
Ca προστάτη πριν τη θεραπεία	7/12	9/12	4/12	2/12	1/12	5/12
Ca προστάτη υπό θεραπεία	4/15	7/19	3/19	1/19	0/19	3/19
Φυσιολογικά άτομα	1/18	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9

Συντμήσεις

Ca: καρκίνος

[†]Ποσοτικοποίηση του DNA στο πλάσμα έγινε με Real-time PCR για το γονίδιο της β-γλοβίνης

[‡] Η μεθυλίωση στο GSTP1 ανιχνεύτηκε με MSP φθορισμού στο πλάσμα

*Η παρουσία mRNA των PSMA και CEA αναλύθηκε RT-PCR σε δείγματα πλάσματος και σε κύτταρα του αίματος



Πίνακας 21. Σύγκριση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν μετά από εξέταση του DNA στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του μαστού και φυσιολογικών ατόμων⁵⁹.

Patients	[†] Αυξημένη ποσότητα DNA στο πλάσμα	[‡] μεθυλίωση στο RASSF1A	[‡] μεθυλίωση στο ATM
Ca μαστού	33/68	13/50	7/50
Φυσιολογικά	51/54	0/14	0/9

Συντημήσεις:

Ca: καρκίνος

[†]Ποσοτικοποίηση του DNA στο πλάσμα έγινε με Real-time PCR για το γονίδιο της β-γλοβίνης

[‡] Η μεθυλίωση στα γονίδια RASSF1A and ATM ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο MethyLight σε δείγματα πλάσματος.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι, πιο υποσχόμενοι δείκτες είναι ο συνδυασμός φορτίου DNA και μεθυλίωσης των υποκινητών γονιδίων στο πλάσμα, που οδηγεί στην ανίχνευση των 88% των περιπτώσεων καρκίνου του προστάτη πριν τη θεραπεία και στο 54% των περιπτώσεων με μη επεξεργασμένο καρκίνο του μαστού.



8. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Τα εξωκυτταρικά νουκλεϊνικά οξέα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες στην έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου και στην πρόβλεψη της έκβασης της νόσου. Η παρούσα διδακτορική διατριβή επικεντρώθηκε στη μελέτη της χρησιμότητας των μοριακών δεικτών στην διάγνωση διαφόρων νεοπλασιών όπως οι καρκίνοι του προστάτη, του μαστού και του γαστρεντερικού συστήματος.

Μελετήθηκαν οι εξής καρκινικοί δείκτες:

1. RNA δείκτες:

- a. PSMA mRNA στο αίμα ασθενών με καρκίνο του προστάτη.
- b. CEA mRNA στο αίμα ασθενών με νεοπλασίες του γαστρεντερικού συστήματος και του προστάτη.
- c. Ανίχνευση mRNA του 14-3-3σ σε ασθενείς με καρκίνους του πνεύμονα, μαστού, προστάτη και σε λευχαιμίες.

2. DNA δείκτες:

- a. Ποσοτικοποίηση του φορτίου DNA στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του προστάτη, του μαστού και του γαστρεντερικού συστήματος.
- b. Ανίχνευση της μεθυλίωσης στους υποκινητές των γονιδίων:

I. MGMT

II. 14-3-3σ

III. GSTP1

IV. RASSF1a

V. ATM

Η μεθυλίωση στα παραπάνω γονίδια μελετήθηκε σε περιφερικό αίμα ή/και ιστούς ασθενών με καρκίνο.

Μέθοδοι: Το DNA πλάσματος ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) καθώς και τη τυποποιημένη συσκευή δοκιμασίας DNA DipStick™. Ελέγχθηκε επίσης η μεθυλίωση των γονιδίων MGMT, 14-3-3σ και GSTP1 χρησιμοποιώντας την ειδική για τη μεθυλίωση PCR (Methylation Specific PCR ή MSP), ενώ η μεθυλίωση στα γονίδια RASSF1A και του ATM στο πλάσμα ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τη τεχνολογία MethyLight. Η μέθοδος RT-PCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των PSMA και CEA mRNA.



Αποτελέσματα: Οι DNA μοριακοί δείκτες ανιχνεύθηκαν σε αυξημένα ποσοστά ασθενών με καρκίνο. Σημαντικά ποσοστά ανίχνευσης παρατηρήθηκαν για τη ποσοτικοποίηση του DNA στο πλάσμα και για την μεθυλίωση στα γονίδια GSTP1, RASSF1A και ATM. Πιο συγκεκριμένα, στο 58.3% των ασθενών με πρόσφατα διαγνωσθέντα καρκίνο του προστάτη και στο 21% των ασθενών υπό θεραπεία, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του DNA στο πλάσμα. Επιπλέον, το 48.5% των ασθενών με καρκίνο του μαστού και το 62.5% των ασθενών με καρκίνο γαστρεντερικού συστήματος παρουσίασαν αυξημένες τιμές στο εξωκυτταρικό DNA. Υπερμεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου GSTP1 ανιχνεύθηκε στο 75% των δειγμάτων πλάσματος που λήφθηκαν από ασθενείς με πρόσφατα διαγνωσθέντα καρκίνο του προστάτη και στο 37% των ασθενών υπό θεραπεία. Υπερμεθυλίωση στους υποκινητές των γονιδίων RASSF1A και ATM παρατηρήθηκε στο 26% και 14% αντίστοιχα των ασθενών με καρκίνο μαστού. Ανίχνευση RNA μοριακών δεικτών βρέθηκε σε μικρότερα ποσοστά στο αίμα ασθενών με καρκίνο.

Συμπέρασμα: Ο συνδυασμός της μέτρησης του φορτίου DNA και της ανάλυσης της μεθυλίωσης στους υποκινητές γονιδίων θα μπορούσε να είναι μία νέα μη επεμβατική προσέγγιση για την πρόωπη ανίχνευση του καρκίνου του προστάτη και του μαστού.



9. ABSTRACT

Scope: In this study we examined several molecular markers in cancer patients and in normal individuals. The present study was focused in the study of molecular markers in the diagnosis of various neoplasias such as brain tumors, prostate, breast and gastric cancers.

The markers tested were:

1. RNA markers:

- a. PSMA mRNA in blood samples of prostate cancer patients.
- b. CEA mRNA in blood samples of prostate and gastric cancer patients.
- c. 14-3-3 σ mRNA in patients with lung, breast and prostate cancer as well as in leukemias.

2. DNA markers:

- a. DNA quantification in plasma samples of patients with prostate, breast and gastric cancer.
- b. Methylation status in the promoter region of the following genes:
 - I. MGMT
 - II. 14-3-3 σ
 - III. GSTP1
 - IV. RASSF1a
 - V. ATM

The methylation pattern of these genes was tested in tissues and/or peripheral blood of cancer patients.

Methods: DNA quantification in plasma was performed using real-time PCR and the DNA DipStickTM Kit. We then assessed the methylation status of MGMT, 14-3-3 σ and GSTP1 in plasma DNA using MSP (Methylation-specific PCR) assay, while the methylation status of RASSF1A and ATM genes was examined by the MethyLight technology. RT-PCR analysis was used for the detection of PSMA and CEA RNA.

Results: DNA molecular markers were detected in increased percentages of cancer patients. Important rates of detection were observed for the quantification of DNA in plasma and for the methylation status of GSTP1, RASSF1A και ATM genes. 58.3% of newly diagnosed prostate cancer patients and 26.7% of prostate cancer patients under therapy had increased plasma DNA levels. Additionally, 48.5% of breast cancer

patients showed plasma DNA levels above the cut-off limit. GSTP1 promoter hypermethylation was detectable in 75% of plasma samples obtained from patients with newly diagnosed prostate cancer and in 36.8% of patients under therapy, whereas 26% and 14% of the breast cancer patients tested were positive for RASSF1A and ATM methylation respectively. Detection of RNA molecular markers was found in smaller percentages in the blood of cancer patients.

Conclusion: The combination of DNA load and genes promoter methylation status could be a new non invasive approach for early detection of both prostate and breast cancer.

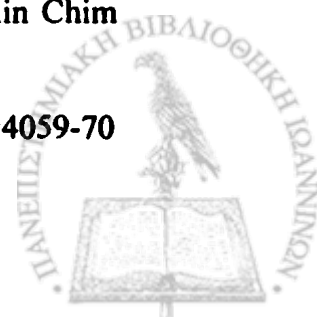


10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

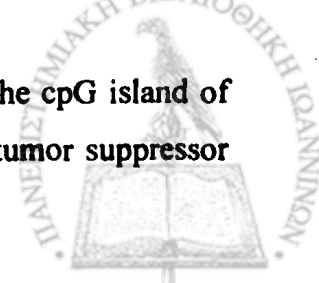
1. Timar J, Csuka O, Orosz Z, Jeney A, et al. Molecular pathology of tumor metastasis. II. Molecular staging and differential diagnosis. *Pathol Oncol Res.* 2002; 8(3):204-19.
2. Pantel K, Hosch SB. Molecular profiling of micrometastatic cancer cells. *Ann Surg Oncol.* 2001 Oct;8(9 Suppl):18S-21S.
3. M.S. Kopreski, F. A. Benko, L. W. Kwak, et al. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 1961-1965.
4. X. Chen, H. Bonnefoi, M. Pelte, et al. Telomerase RNA as a Detection Marker in the Serum of Breast Cancer Patients *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 3823-3826.
5. J M Silva, R Rodriguez, J M Garcia, et al. Detection of epithelial tumour RNA in the plasma of colon cancer patients is associated with advanced stages and circulating tumour cells. *Gut*, 2002; 50(4): 530-534.
6. G. Rappl, D.O. Hasselmann, M. Rossler, et al. Detection of tumor-associated circulating mRNA in patients with disseminated malignant melanoma. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 945:189-91.
7. J.M Silva, G. Dominguez, J. Silva, J et al. Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics. *Clin Cancer Res.* 2001 Sep 7; (9): 2821-5.
8. G. Y. M. Dennis Lo. Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum: An Overview *Ann NY Acad Sci* 2001; 945: 1-7
9. Poon LL, Leung TN, Lau TK, et al. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2000; 46:1832-4.
10. Ng EK, Tsui NB, Lam NY, et al. Stability of Endogenous and Added RNA in Blood Specimens, Serum, and Plasma. *Clin. Chem.*, 2002; 48(10): 1647-1653.
11. Hasselmann DO, Rappl G, Tilgen W, et al. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clin Chem* 2001; 47:1488-9.



12. Ng EK, Tsui NB, Lam NY, et al. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem* 2002; 48:1212-7.
13. Lara PN Jr, Kung HJ, Gumerlock PH, et al. Molecular biology of prostate carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1999 Dec; 32(3):197-208.
14. Bangma CH, Verhagen PC. Blood and serum substances for markers of prostate cancer. *Microsc Res Tech*. 2000 Dec 1; 51(5):430-5.
15. Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol*. 1999; (2):67-81.
16. Guadagni F., Roselli M., Cosimelli M., et al. Quantitative analysis of CEA expression in colorectal adenocarcinoma and serum: lack of correlation. *Int. J. Cancer* 1997; 72: 949-954.
17. Wanebo H. J., Rao B., Pinsky C. et al. Preoperative carcinoembryonic antigen levels as a prognostic indicator of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med*. 1978; 299: 448-451.
18. Christine Laronga, Heng-Yin Yang, Christopher Neal, et al. Association of the Cyclin-dependent Kinases and 14-3-3 Sigma Negatively Regulates Cell Cycle Progression *Biol. Chem.*, 2000 Vol. 275, Issue 30, 23106-23112.
19. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, et al. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell*. 1997 Dec;1(1):3-11.
20. S.A. Leon, B. Shapiro, D.M. Sklaroff, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect on therapy. *Cancer Res*. 1977 Mar;37(3):646-50.
21. J.M. Silva, G. Dominguez, J.M. Garcia, et al. Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations. *Cancer Res*. 1999 Jul 1; 59(13): 3251.
22. G. Sozzi, D. Conte, L. Mariani, S. et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res*. 2001 Jun 15; 61(12):4675-8.
23. T.L. Wu, D., Zhang, J.H., Chia, K.H., et al. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin Chim Acta*. 2002 Jul; 321(1-2):77-87.
24. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood*, 1999 Jun 15; 93(12):4059-70



25. Herman J. G., Graff J. R., Myohanen S., et al. Methylation-specific PCR. a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 9821-9826.
26. Baylin S. B., Herman J. G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 2000; 16: 168-174.
27. Herman JG, Umar A, Polyak K, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 Jun 15; 95(12):6870-5.
28. 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.
29. Esteller M., Garcia-Foncillas J., Andion E., et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 1350-1354.
30. Pegg AE. Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res.* 1990; 50: 6119-6129.
31. Yarosh D. B. The role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in cell survival, mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 1985; 145: 1-16.
32. Iwata N., Yamamoto H., Sasaki S., et al. Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 sigma gene in human hepatocellular carcinoma.. *Oncogene*, 2000; 19: 5298-5302.
33. Suzuki H., Itoh F., Toyota M., et al. Inactivation of the 14-3-3 sigma gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers. *Cancer Res.*, 2000; 60: 4353-4357.
34. Ferguson A. T., Evron E., Umbricht C. B., et al. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 6049-6054.
35. Goessl C., Müller M., Heicappell R., et al. DNA-Based Detection of Prostate Cancer in Blood; Urine; and Ejaculates. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2001, 945:51-8.
36. Vavvas D., Li X., Avruch J., Zhang X. F. Identification of Norel as a potential Ras effector. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 5439-5442.
37. Dammann R., Yang G., Pfeifer G. P. Hypermethylation of the cpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor



- gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Res.*, 2001; 61: 3105-3109.
38. Dammann R., Li C., Yoon J. H., Chin P. L., Bates S., Pfeifer G. P. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat. Genet.*, 2000; 25: 315-319.
 39. Burbee D. G., Forgacs E., Zochbauer-Muller S., et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)*, 2001; 93: 691-699.
 40. Vos M. D., Ellis C. A., Bell A., et al. Ras uses the novel tumor suppressor RASSF1 as an effector to mediate apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 35669-35672.
 41. Savitsky K., Bar-Shira A., Gilad S., et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, 1995; 268: 1749-1753.
 42. Shiloh Y., Kastan M. B. ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv. Cancer Res.*, 2001; 83: 209-254.
 43. Fang N. Y., Greiner T. C., Weisenburger D. et al. Oligonucleotide microarrays demonstrate the highest frequency of ATM mutations in the mantle cell subtype of lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, , 2003; 100: 5372-5377
 44. Vo QN, Kim WJ, Cvitanovic L, et al. The ATM gene is a target for epigenetic silencing in locally advanced breast cancer. *Oncogene*. 2004 Dec 16; 23(58):9432-7.
 45. Mullis MR, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
 46. Panet A, Khorana HG. Studies on polynucleotides. The linkage of deoxyribonucleotide templates to cellulose and its use in their replication. *J Biol Chem.* 1974 Aug25; 249(16):5213-21.
 47. Lintula S., Stenman U.H. The expression of prostate specific membrane antigen in peripheral blood leukocytes. *J. Urol.* 1997; 157:1969-1972.
 48. Funaki NO, Tanaka J, Kasamatsu T, et al. Identification of carcinoembryonic antigen mRNA in circulating peripheral blood of pancreatic carcinoma and gastric carcinoma patients. *Life Sci.* 1996; 59(25-26):2187-99.
 49. Freeman WM, WalkerSJ, Vrana KE Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential *Biotechniques*, 1999 Jan26 (1):112-22, 124-5.



50. Walker NJ. Tech Sight A technique whose time has come. *Science* 2002 Apr 19; 296(5567):557-9.
51. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 2000; 25, 169-193.
52. Lo Y.M.D, Tein M.S.C, Lau T.K., et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum. Implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.*,1998; 62:768-775.
53. Hanley J.A.; McNeil B.J. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 1982; 143: 29-36.
54. Bhatia K, Siraj A, Hussain A, et al. The tumor suppressor Gene 14-3-3 σ is commonly methylated in normal and malignant Lymphoid Cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Feb; 12(2):165-9.
55. Goessl C, Krause H, Muller M, et al. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res.* 2000 Nov 1; 60(21):5941-5.
56. Eads C.A, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 2000 April 15; 28(8): E32.
57. Cohen Y, Singer G, Lavie O, et al. The RASSF1A tumor suppressor gene is commonly inactivated in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res.* 2003 Aug 1; 9(8): 2981-4.
58. Eirini Papadopoulou, Elias Davilas, Vasilios. Sotiriou, et al. Cell-free DNA and RNA in plasma as a new molecular marker for prostate cancer *Oncol Res.* 2004; 14(9):439-45.
59. E. Papadopoulou, E. Davilas, V. Sotiriou, et al. Cell-free DNA in plasma of breast and prostate cancer patients *Ann NY Acad Sci.* (in press).
60. Stroun M., Maurice P, Vasioukhin V, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 906:161-8.
61. Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, et al. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18:65-73.



62. Dammann, R., Schagdarsurengin, U., Strunnikova, M., et al. Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene and its function in human carcinogenesis. *Histol. Histopathol.* 2003;18: 665–677.
63. Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC. Functionality of circulating DNA: the hypothesis of genomestasis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Sep; 945:265-75.
64. Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC, Ontanon J, et al. Horizontal transfer of DNA and the "genomestasis hypothesis". *Blood.* 2000 Jan 15; 95(2):724-5.
65. García-Olmo D, García-Olmo DC, Ontañón J, Martínez E, et al. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genomestasis. *Histol Histopathol.* 1999;14:1159-1164
66. Pulciani S, Santos E, Lauver AV, et al. Oncogenes in solid human tumours. *Nature.* 1982; 300:539-542
67. de Kok JB, van Solinge WW, Ruers TJ, et al. Detection of tumour DNA in serum of colorectal cancer patients. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57:601– 4.
68. Kawamura MT, Paschoal ME, da Costa Carvalho MD. In vitro interaction of serum protein with circulating DNA of lung cancer patient. *Int J Mol Med* 1999; 4:187– 90.
69. Chen X, Bonnefoi H, Diebold-Berger S, Lyautey J, Lederrey C, Faltin-Traub E, et al. Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5:2297– 303.
70. Mayall F, Fairweather S, Wilkins R, et al. Microsatellite abnormalities in plasma of patients with breast carcinoma: concordance with the primary tumour. *J Clin Pathol* 1999; 52:363– 6.
71. Bruhn N, Beinert T, Oehm C, et al. Detection of microsatellite alterations in the DNA isolated from tumor cells and from plasma DNA of patients with lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 906:72–82.
72. Nakayama T, Taback B, Nguyen DH, et al. Clinical significance of circulating DNA microsatellite markers in plasma of melanoma patients. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 906:87–98.
73. Muller HM, Widschwendter A, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res.* 2003 Nov 15; 63(22): 7641-5.



74. Castells A, Puig P, Mora J, et al. K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol* 1999;17:578– 84.
75. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61: 659– 65.
76. Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, et al. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 1983; 51:2116–20.
77. Dulaimi E, Hillinck J, Ibanez de Caceres I, et al. Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004 Sep 15; 10(18 Pt 1):6189-93.

