

THE UNIVERSITY OF TORONTO
LIBRARY
130 St. George Street
Toronto, Ontario
M5S 1A5

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200251







272

A

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Η ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΝΙΚΗ Ι. ΑΓΝΑΝΤΗ

«Μοριακή μελέτη του γονιδίου APC σε οικογένειες με το φαινότυπο της οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης, από την Ελλάδα»

Μάρκος Μιχαλάτος

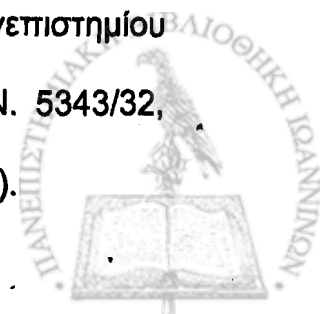
Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2005



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



Ημερομηνία αίτησης υποψηφίου: 10-05-2001

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 467α/02-04-2002

Μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Νίκη Ι. Αγκάντη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Επιβλέπουσα

Μαρίκα Σύρρου Επίκουρη Καθηγήτρια Γεν. Βιολογίας – Ιατρικής Γενετικής, Μέλος

Γεώργιος Νασιούλας Επιστήμων Μοριακής Βιολογίας Πανεπιστημίου Θράκης,

Μέλος

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 15-04-2002

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 29-06-2005

Όνομα προέδρου Ιατρικής Σχολής:

Επαμεινώνδας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας

Ονόματα μελών επταμελούς επιτροπής:

Νίκη Ι. Αγκάντη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Επιβλέπουσα

Κωνσταντίνος Σεφεριάδης Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Μέλος

Άγγελος Ευαγγέλου Καθηγητής Φυσιολογίας, Μέλος

Δημήτριος Στεφάνου Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας, Μέλος

Μπάη Μαρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Μέλος

Μαρίκα Σύρρου Επίκουρη Καθηγήτρια Γεν. Βιολογίας – Ιατρικής Γενετικής, Μέλος

Άννα Μπατιστάτου Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Μέλος

Βαθμός με τον οποίο έγινε δεκτή η διατριβή: Άριστα

Η Γραμματέας της Ιατρικής Σχολής

Ευαγγελία Τσαγγαλά



Η διατριβή αυτή αφιερώνεται στη σύζυγό μου Άντζελα και στο γιο μας που κυοφορεί, στους γονείς μου Κοσμά και Ευανθία, στον αδερφό μου Σωτήρη, στο Θείο μου Δημήτρη και σε όσους πιστεύουν στην αμφισβήτηση, στην επανάσταση, στην ελπίδα, στη δημιουργικότητα, στην κατανόηση, στη φαντασία, στη ζωή, στη μνήμη, στη δημοκρατία, στην ελευθερία και στη δικαιοσύνη.



ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

- ΚΜΠΚΠΕ:** Κληρονομούμενος μη πολυποδιακός καρκίνος παχέος εντέρου
- ΚΝΣ:** Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
- ΚΠΕ:** Καρκίνος του παχέος εντέρου
- ΟΑΠ:** Οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση
- ΑΤΡ, dΑΤΡ:** τριφωσφορική αδενοσίνη, τριφωσφορική δεοξυαδενοσίνη
- ΑΡC:** Adenomatous Polyposis Coli
- bp:** base pair, ζεύγος βάσεων
- BRCA:** γονίδιο breast cancer
- CHRPE:** congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium
- c-myc:** ανθρώπινο ομόλογο του ογκογονιδίου του ιού avian myelocytomatosis
- DCC:** deleted in colorectal carcinoma
- DEPC:** diethyl pyrocarbonate
- DNA:** Δεσοξυριβοζονουκλεϊκό οξύ
- dNTPs, ddNTPs:** δεοξυνουκλεοτίδια, διδεοξυνουκλεοτίδια
- dHPLC:** denaturing High Performance Liquid Chromatography
- DPC4:** deleted in pancreatic carcinoma 4
- EB1:** πρωτεΐνη σχετιζόμενη με μικροσωληνίσκους
- EDTA:** Ethylene diamine tetraacetic acid Na₂-salt
- FAP:** Familial Adenomatous Polyposis
- FISH:** Fluorescence In Situ Hybridization
- hMLH1:** ανθρώπινο ομόλογο του γονιδίου mutL της *E. coli*
- hMSH2:** ανθρώπινο ομόλογο του γονιδίου mutS της *E. coli*
- HNPCC:** Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer
- kb:** kilobase, χιλιάδα βάσεων
- kDa:** kilo Dalton, χιλιάδες dalton
- k-RAS:** ανθρώπινο ομόλογο του ογκογονιδίου του ιού Kirsten rat sarcoma
- MEFV:** Mediterranean Fever
- mRNA:** μήνυμα (αγγελιαφόρο) RNA
- ΜΥΗ:** ανθρώπινο ομόλογο του γονιδίου mutY της *E. coli*
- p53:** transformation related protein 53
- PBS:** Phosphate Buffered Saline
- PCR:** Polymerase Chain Reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
- PTEN:** Phosphatase and Tensin human homolog
- Rb:** retinoblastoma



RNA: ριβοζονουκλεϊκό οξύ

RNase A: ριβονουκλεάση A

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SMAD4: ανθρώπινο ομόλογο του γονιδίου mothers against decapentaplegic της δροσόφιλας

STK11: κινάση σερίνης/θρεονίνης 11

Tris, Trizma base: Tris(hydroxymethyl)-aminomethane

UV: Ultra-violet, υπεριώδες

Wnt: wingless type

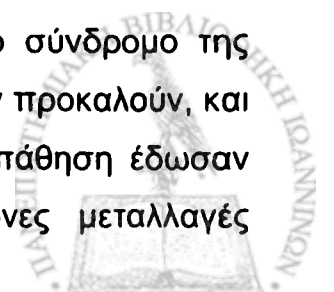


1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Όταν εκπονούσα τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο των καθηγητών Γιώργη Ροδάκη και Ρένας Λεκανίδου το διάστημα 1994-1995, είχα αποφασίσει να μην εκπονήσω διατριβή. Η απόφασή μου αυτή δεν είχε να κάνει με αυτούς τους φωτισμένους δασκάλους ούτε με το εξαιρετικό σχολείο που ήταν και είναι το εργαστήριό τους. Η απόφαση είχε να κάνει με τις οικονομικές δυσκολίες που αντιμετώπιζαν εκείνη την εποχή οι διδακτορικοί φοιτητές στην Ελλάδα. Χωρίς χρηματοδότηση, χωρίς προγράμματα της Γεν. Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας, της ευρωπαϊκής ένωσης ή άλλο πόρο αυτοί οι φοιτητές έπρεπε να είναι ή οικονομικά εύποροι ή να αναγκάζονται να επιδιώκουν υποτροφίες ή να ασχολούνται με την παραπαιδεία των «ιδιαιτέρων» και των φροντιστηρίων. Και σαν να μην έφτανε αυτό η απόσβεση του διδακτορικού διπλώματος στην αγορά εργασίας ήταν – όπως και ακόμη είναι, βέβαια – αμφίβολη και πενιχρή στην Ελλάδα. Έτσι, στράφηκα απ'ευθείας στην αγορά εργασίας.

Στο διάστημα 1995 έως 2000 δούλεψα σε δύο εργασίες, τελείωσα τις στρατιωτικές μου υποχρεώσεις και πήρα το πτυχίο της Βιολογίας. Η πρώτη από τις δυο εργασίες ήταν εταιρεία εμπορίας αντιδραστηρίων ανοσολογίας, ανοσοϊστοχημείας και μοριακής βιολογίας. Η δεύτερη ήταν το διαγνωστικό κέντρο του καθηγητή Κων. Μοίρα, ενός φωτισμένου δασκάλου στον οποίο οφείλω τουλάχιστον τη μεταστροφή όσον αφορά την υπόθεση του διδακτορικού. Το 2000 ήταν πολύ σημαντική χρονιά αφού γνώρισα τον Δρ. Γιώργο Νασιούλα τον άνθρωπο κλειδί στην υπόθεση του διδακτορικού μου. Έκανε την υπόσχεσή του για εκπόνηση διατριβής πραγματικότητα. Χάρη στις ικανότητες και τις προσπάθειές του το πειραματικό μέρος είχε πάντα τα αναγκαία αντιδραστήρια και εξοπλισμό της τελευταίας λέξης της τεχνολογίας, αλλά φυσικά και τα απαραίτητα δείγματα προς εξέταση. Προσπάθησα λοιπόν να αξιοποιήσω το δρόμο που μου άνοιξε όσο το δυνατόν καλύτερα. Απέκτησα γνώσεις θεωρητικές, τεχνικές, εργαστηριακή εμπειρία, ηθική ικανοποίηση και αναγνώριση μέσα από συνέδρια και δημοσιεύσεις της ημεδαπής και της αλλοδαπής. Είναι στην ευχέρεια του αναγνώστη να χαρακτηρίσει αμερόληπτα και αντικειμενικά το εκπόνημα που ακολουθεί.

Η διδακτορική διατριβή, που ακολουθεί, ασχολείται με το σύνδρομο της οικογενούς αδενωματώδους πολυποδίασης, με τα γονίδια που την προκαλούν, και με τις σχέσεις γονοτύπου και φαινοτύπου. Οικογένειες με την πάθηση έδωσαν οικιοθελώς δείγματα για εξέταση και οι υπεύθυνες παθολόγες μεταλλάξεις



εντοπίστηκαν στην πλειονότητά τους. Εντοπίστηκαν γνωστές και νέες μεταλλαγές με τη χρήση μοριακών τεχνικών όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, η αλληλούχηση και η αποδιατακτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

Ελπίζω η δουλειά που έγινε να συντελέσει θετικά προς την κατεύθυνση της αντιμετώπισης της συγκεκριμένης πάθησης και του καρκίνου γενικότερα. Τα δεδομένα θα μπορούσαν να φανούν χρήσιμα μέσω πρόληψης, έγκαιρης διάγνωσης και οικογενειακού προγραμματισμού (προγεννητικός, προεμφυτευτικός έλεγχος) στην άνοδο του βιοτικού επιπέδου των πασχόντων και των συγγενών τους και στον περιορισμό της εξάπλωσης των παθογόνων μεταλλαγών.

Ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου και τη σύζυγό μου. Ευχαριστώ τους προϊστάμενους μου στην τωρινή εργασία μου και ειδικά την Αντιγόνη Κοϊτσάνου και τον Παντελή Μήτση για την κατανόησή τους κατά τη διάρκεια της συγγραφής της διατριβής. Ευχαριστώ τους καθηγητές μου Κωνσταντίνο Μοίρα, Γιώργη Ροδάκη και Ρένα Λεκανίδου, για τις γνώσεις και την εμπειρία που μου μετέδωσαν.

Ευχαριστώ τον Δρ. Hans Dauwerse και την καθηγήτρια Nadia Ranzani για την πολύτιμη βοήθειά τους στα πειράματα FISH και στην ανίχνευση μεταλλαγών στο γονίδιο *MYH*, αντίστοιχα.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Νίκη Ι. Αγνάντη, τον Δρ. Γιώργο Νασιούλα και την αναπληρώτρια καθηγήτρια Μαρίκα Σύρρου για την επιστημονική και ηθική τους υποστήριξη. Ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής καθηγητές Κωνσταντίνο Σεφεριάδη, Άγγελο Ευαγγέλου, Δημήτριο Στεφάνου, Μαρία Μπάη και Άννα Μπατιστάτου για τις εύστοχες παρατηρήσεις, τις συμβουλές τους και την εποικοδομητική κριτική τους.



2. ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	9
2. ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	11
3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
3.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	13
3.1.1 Γενικά για τον καρκίνο.....	13
3.1.2 Καρκίνος του παχέος εντέρου.....	15
3.1.3 Οικογενής Αδενωματώδης Πολυποδίαση.....	19
3.1.3.1 Φαινότυπος	19
3.1.3.2 Γονότυπος	21
3.1.3.3 Κληρονομούμενες μεταλλάξεις του APC και φαινότυπος	24
3.1.4 Γενετικός έλεγχος στην Οικογενή Αδενωματώδη Πολυποδίαση	26
3.2 Σκοπός της ερευνητικής εργασίας.....	29
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
4.1 Επιλογή των ασθενών	30
4.2 Υλικό εξέτασης.....	31
4.3 Απομόνωση λεμφοκυττάρων	32
4.3.1 Απομόνωση με επιστοίβαση και φυγοκέντρηση σε «φικόλη»	32
4.3.2 Απομόνωση με αιμόλυση	33
4.4 Απομόνωση DNA.....	34
4.4.1 Λύση κυττάρων – πέψη πρωτεϊνών με πρωτεϊνάση K.....	34
4.4.2 Εκχύλιση με φαινόλη – φαινόλη/χλωροφόρμιο	35
4.4.3 Κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη	36
4.5 Απομόνωση ολικού RNA	37
4.6 Φωτομέτρηση νουκλεϊκών οξέων.....	38
4.7 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription – RT).....	39
4.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	40
4.9 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	46
4.10 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης	48
4.11 Αποδιατακτική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης – dHPLC	50
4.12 Καθαρισμός προϊόντων PCR.....	53
4.13 Αντιδράσεις προσδιορισμού πρωτοδιάταξης – αλληλούχιση.....	55
4.14 Ταυτοποίηση μεταλλαγών με τη βοήθεια λογισμικού H/Y	59
4.15 Ανίχνευση μεγάλων αναδιατάξεων με MLPA	59
4.16 Ταξινόμηση και αποθήκευση δεδομένων και αποτελεσμάτων	62
4.17 Αλγόριθμος εξέτασης ασθενών	63
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	66
5.1 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα.....	66
5.2 Αναλυτικά αποτελέσματα	70
5.2.1 Οικογένειες με καινούργιες (NOVEL) μεταλλάξεις.....	70
5.2.1.1 Οικογένεια 2963.....	70
5.2.1.2 Οικογένεια 3441.....	71
5.2.1.3 Οικογένεια 7552.....	73
5.2.1.4 Οικογένεια 7400.....	74
5.2.1.5 Οικογένεια 8919.....	76
5.2.2 Οικογένειες με εξωεντερικές αλλοιώσεις.....	78
5.2.2.1 Οικογένεια 3843.....	78

5.2.2.2	Οικογένεια 7416	80
5.2.2.3	Οικογένεια 4218	83
5.2.3	Οικογένεια με μικρή ηλικία έναρξης ΟΑΠ	84
5.2.4	Οικογένειες χωρίς παθογόνο μεταλλαγή στο APC	85
5.2.4.1	Οικογένεια 7782	85
5.2.4.2	Οικογένεια 10177	87
5.2.5	Οικογένεια με μεταλλαγές στο ΜΥΗ	87
6.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	90
6.1	Γενετικός έλεγχος στην ΟΑΠ	90
6.2	Γονότυπος και μεταλλαγές γονιδίων στην ΟΑΠ.....	92
6.2.1	De-νovo και κανούργιες (novel) μεταλλαγές.....	92
6.2.2	Τύποι και ποσοστά μεταλλαγών.....	93
6.2.3	Η παρανοηματική D1822V	94
6.2.4	Μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις.....	95
6.2.5	Μεταλλαγές ματίσματος.....	96
6.2.6	Μεταλλαγές στο ΜΥΗ και ΟΑΠ.....	97
6.3	Γονότυπος και φαινότυπος στην ΟΑΠ.....	98
6.3.1	Εξω-εντερικές αλλοιώσεις – συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου	98
7.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	100
8.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	102
9.	ABSTRACT	104
10.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	106



3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

3.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

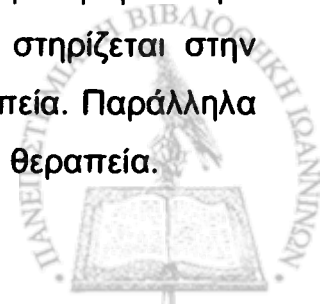
3.1.1 Γενικά για τον καρκίνο

Ο καρκίνος είναι μια πάθηση που προκαλείται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αυτός έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία του όγκου, ο οποίος ανάλογα με το μέγεθος και τη θέση του επηρεάζει τα γειτονικά όργανα του οργανισμού και παρεμποδίζει τη σωστή λειτουργία τους. Στους καλοήθεις όγκους τα καρκινικά κύτταρα περιβάλλονται από συνδετικό ιστό ο οποίος τα περιορίζει τοπικά. Αντίθετα, στους κακοήθεις όγκους τα καρκινικά κύτταρα εισβάλλουν στους γειτονικούς ιστούς ενώ μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και της λέμφου μπορούν να διασπαρθούν και να δημιουργήσουν δευτερογενείς όγκους σε άλλα σημεία του σώματος και η πορεία αυτή ονομάζεται μετάσταση.

Ο καρκίνος είναι γνωστός εδώ και χιλιάδες χρόνια, σχεδόν από τότε που ξεκινά η ιστορία του ανθρώπου. Ιατρικοί πάπυροι ηλικίας 3000-4000 χρόνων περιέχουν περιγραφές όγκων και κακοηθειών. Στους τοίχους των πυραμίδων της Αιγύπτου υπάρχουν εικόνες ανθρώπων που υποφέρουν από καρκίνο. Στην αρχαία Ελλάδα, ο Ιπποκράτης και ο Γαληνός καθιέρωσαν την ονομασία καρκίνωμα και καρκίνος λόγω της ομοιότητας των όγκων – με την κεντρική μάζα και τις αποφύσεις – με τα καρκινοειδή και συγκεκριμένα με τον κάβουρα.

Για αιώνες, μέχρι και σήμερα, η μοναδική θεραπεία του καρκίνου ήταν η χειρουργική αφαίρεση του όγκου. Η αποτελεσματικότητα των πρώτων χειρουργικών επεμβάσεων ήταν μικρή, αφού τα καρκινικά κύτταρα που παρέμεναν στον ασθενή, συνέχιζαν την ανεξέλεγκτη πορεία τους μέχρι τον θάνατο του ασθενούς από νέους όγκους.

Στα μέσα του 19^{ου} αιώνα έγιναν οι πρώτες προσπάθειες θεραπείας με φάρμακα. Αυτά ήταν δηλητήρια, όπως το αρσενικό με θανάσιμες όμως παρενέργειες. Η εξέλιξη της αναισθησιολογίας επέτρεψε αργότερα την πραγματοποίηση ακριβέστερων χειρουργικών επεμβάσεων με μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας. Στις μέρες μας η θεραπεία του καρκίνου στηρίζεται στην ακτινοθεραπεία, στη χημειοθεραπεία καθώς και στην ανοσοθεραπεία. Παράλληλα η έρευνα κατευθύνεται στην ανάπτυξη εμβολίων και στη γονιδιακή θεραπεία.



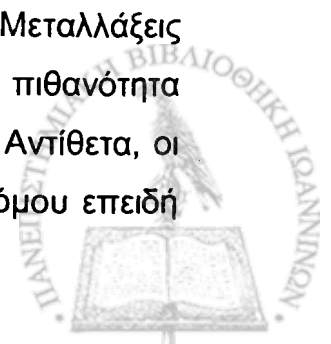
Τον περασμένο αιώνα παρά την άνοδο του βιοτικού επιπέδου ο καρκίνος εξελίχθηκε στη δεύτερη αιτία θανάτου για τους ανθρώπους μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Έτσι, στις σημαντικότερες αιτίες εμφάνισης της νόσου ανήκει ο τρόπος ζωής (καπνός, αλκοόλ, φαγητό, άγχος) και το περιβάλλον (ρύπανση, ακτινοβολίες, χημικές ενώσεις). Ο καρκίνος όμως προκαλείται και από μολυσματικούς παράγοντες (ιούς) και φυσικά από μεταλλάξεις σε μια σειρά γονιδίων.

Μέσα από την πρόοδο της Μοριακής Βιολογίας, τα τελευταία είκοσι χρόνια ανακαλύφθηκαν τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τα ογκογονίδια ανακαλύφθηκαν αρχικά σε ιούς οι οποίοι μπορούσαν να μετατρέπουν στο εργαστήριο τα φυσιολογικά κύτταρα σε καρκινικά. Στη συνέχεια βέβαια επιβεβαιώθηκε η παρουσία τους και στο γονιδίωμα των κυττάρων και αυτά ονομάστηκαν πρωτοογκογονίδια. Όταν τα πρωτοογκογονίδια όπως το *c-myc*, ή το *k-ras* μεταλλάσσονται τότε τροποποιείται η σωστή λειτουργία τους ή η έκφρασή τους και μετατρέπονται σε ογκογονίδια.

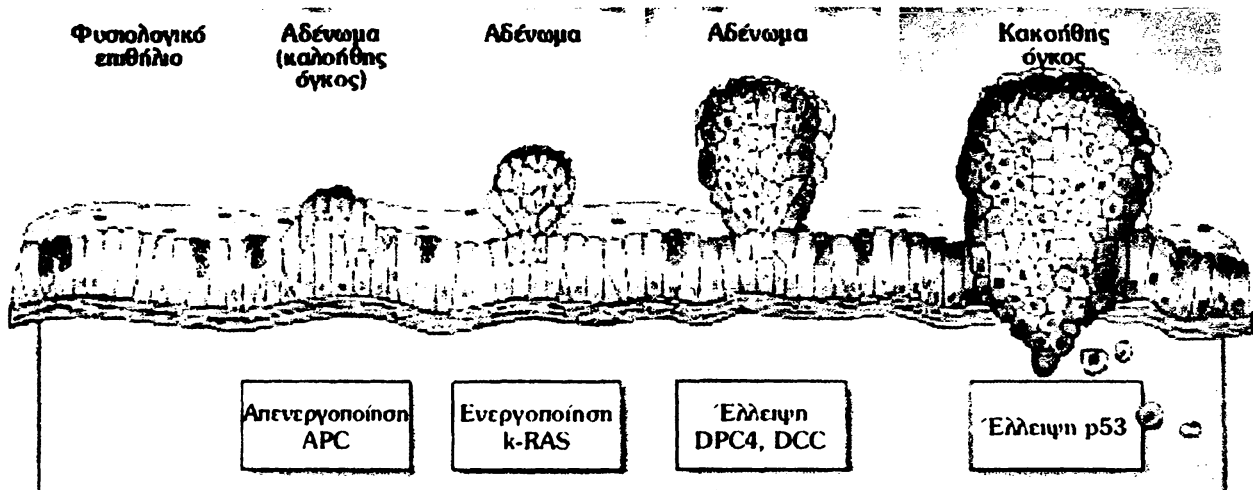
Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως το *APC* ή το *Rb* ρυθμίζουν την έκφραση και τη δράση των πρωτοογκογονιδίων. Και οι δυο ομάδες συνεργάζονται για την ομαλή ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Επομένως όταν μεταλλάσσονται, είτε τα πρωτοογκογονίδια είτε τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τότε απορυθμίζεται ο κυτταρικός κύκλος και τα κύτταρα μπαίνουν σε φάση ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού.

Τέλος, πολύ σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση μέσω γονιδιακών μεταλλάξεων παίζει μια τρίτη ομάδα γονιδίων, των οποίων τα προϊόντα ασχολούνται με την διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος. Όταν αυτά τα γονίδια δυσλειτουργούν (π.χ. λόγω μεταλλαγών), τότε δυσλειτουργεί η επιδιόρθωση των μεταλλαγών, που φυσιολογικά συμβαίνουν στο γονιδίωμα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεταλλαγών, οι οποίες απενεργοποιούν πρωτοογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τέτοια επιδιορθωτικά γονίδια είναι τα γονίδια επιδιόρθωσης κακού ζεύγους βάσεων του DNA (Mismatch repair genes) και το *MYH* του συστήματος επιδιόρθωσης από οξειδωτικές βλάβες, μέσω εκτομής βάσεων.

Γίνεται λοιπόν φανερό ότι αρκετοί καρκίνοι έχουν γενετική βάση. Μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε σωματικά κύτταρα έχουν μικρότερη πιθανότητα σταθεροποίησης στον κυτταρικό πληθυσμό και ανάπτυξης καρκίνου. Αντίθετα, οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις ευρίσκονται σε όλα τα κύτταρα του ατόμου επειδή προϋπήρχαν ή εμφανίστηκαν στη γενετική σειρά των γονίων του.



Έτσι, ένα άτομο που φέρει κληρονομούμενη μετάλλαξη σε πρωτοογκογονίδιο ή ογκοκατασταλτικό γονίδιο εμφανίζει καρκίνο πολύ νωρίτερα. Όσο νωρίτερα εμφανίζεται η πάθηση τόσο πιθανότερο είναι να έχει ξεκάθαρη γενετική βάση, δηλαδή να προκαλείται από συγκεκριμένη κληρονομούμενη μετάλλαξη σε συγκεκριμένο γονίδιο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι για την έναρξη και την πρόοδο της νεοπλασίας απαιτούνται παραπάνω από ένα μεταλλαγμένα γονίδια (Εικ. 1).



Εικόνα 1. Γονιδιακές μεταλλάξεις στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Ογκογονίδια: *k-ras* και Ογκοκατασταλτικά γονίδια: *APC*, *p53*, *DPC4*, *DCC*.

Έτσι όσοι φέρουν ήδη ένα μεταλλαγμένο γονίδιο, σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού τους, έχουν πολύ περισσότερες πιθανότητες για ανάπτυξη καρκίνου.

Η έρευνα έχει φωτίσει αρκετές καρκινικές παθήσεις και έχει αποδείξει ως αιτιολογία τους γονιδιακές μεταλλάξεις. Λογικά λοιπόν αναμένουμε τη διαλεύκανση και άλλων καρκίνων στο μέλλον. Αυτή τη στιγμή το μεγαλύτερο ποσοστό του καρκίνου θεωρείται σποραδικό ενώ μικρό ποσοστό έχει αποδεδειγμένη γενετική βάση. Οι ερευνητές ευελπιστούν ότι τα ποσοστά θα αντιστραφούν και αυτό θα βοηθήσει στην αντιμετώπιση της μάστιγας.

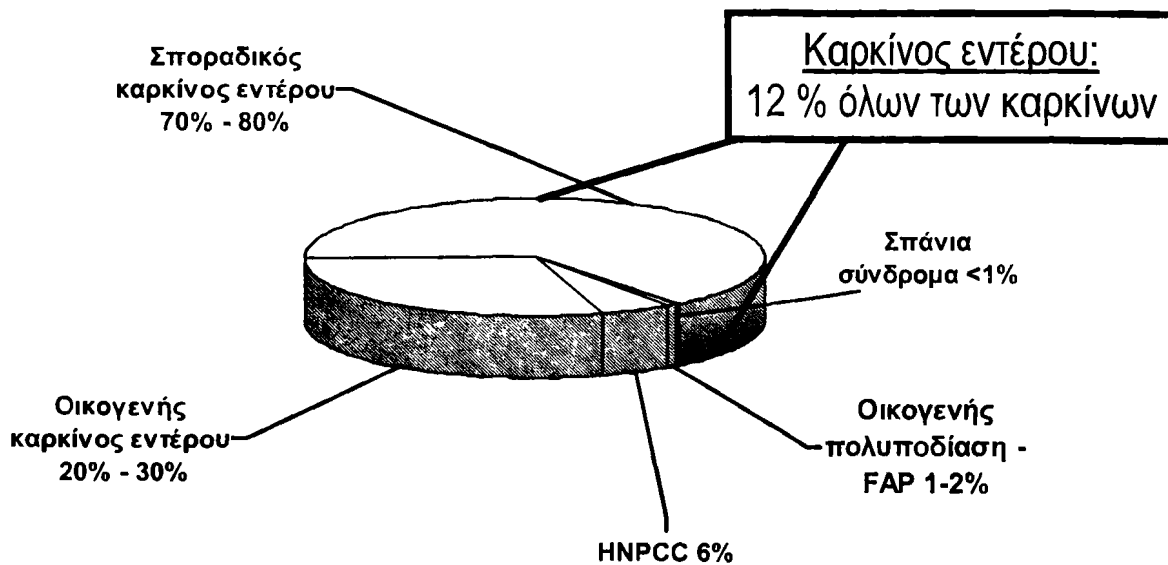
3.1.2 Καρκίνος του παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου την τελευταία δεκαετία έχει ανέβει από την τέταρτη στην τρίτη θέση εμφάνισης μετά τον καρκίνο προστάτη, μαστού και πνεύμονα. Σήμερα συνεισφέρει περίπου στο 12% του συνόλου των καρκίνων τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες. Σε αυτό σίγουρα μεγάλο ρόλο έχει παίξει η αλλαγή των διατροφικών συνηθειών του αστικού πληθυσμού στις δυτικές κοινωνίες (Ευρώπη και Β. Αμερική)^{1,2}.

Το ζωικό λίπος, το κόκκινο κρέας, το αλκοόλ, ο καπνός και η παχυσαρκία αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου για καρκίνο του παχέος εντέρου (ΚΠΕ). Αντίθετα, προφυλακτικοί παράγοντες είναι η πρόσληψη φυτικών ινών, φρούτων, λαχανικών, ασβεστίου και η σωματική άσκηση^{1,3}. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μετανάστες μέσα σε 2 με 3 δεκαετίες αποκτούν τον ίδιο κίνδυνο για ΚΠΕ σε σχέση με τον τοπικό πληθυσμό, ως αποτέλεσμα της προσαρμογής τους στις τοπικές διατροφικές συνήθειες⁴.

Σήμερα πιστεύεται ότι όλοι σχεδόν οι καρκίνοι του παχέος εντέρου εκκινούν από αδενώματα που μεταπίπτουν σε καρκίνο. Ακόμη είναι γνωστό ότι τέτοια αδενώματα θα εμφανίσει ο ένας στους δυο κατοίκους – γυναίκα ή άνδρας – στις δυτικές κοινωνίες μέχρι τα 70 του χρόνια⁵. Στην καρκινογένεση στο έντερο, τη διαδικασία με την οποία το φυσιολογικό εντερικό επιθήλιο μεταπίπτει σε καρκινικό επιθήλιο, εμπλέκονται και ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% των αδενωμάτων το γονίδιο *APC* ευρίσκεται μεταλλαγμένο ή με απώλεια ετεροζυγωτίας, έτσι ώστε η απενεργοποίησή του να θεωρείται ίσως το πρώτο γεγονός στην εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου (Εικ. 1)^{6,7,8}.

Περίπου το 70% - 80% του ΚΠΕ θεωρείται στις μέρες μας σποραδικός (Εικ. 2). Εμφανίζεται δηλαδή κατά μέσο όρο μετά τα 60 έτη και δεν έχει εμφανή σημάδια μεταβίβασης μέσα στην οικογένεια του ασθενούς.



Εικόνα 2. Ποσοστά επιμέρους παθήσεων στον καρκίνο του εντέρου.



Ο λεγόμενος οικογενής καρκίνος του εντέρου αντιπροσωπεύει το 20-30% του συνόλου των καρκίνων του εντέρου⁹ (Εικ. 2). Στον οικογενή καρκίνο υπάρχουν περισσότερα από ένα περιστατικά στο οικογενειακό περιβάλλον του ασθενούς και η ηλικία εμφάνισης είναι από 20 μέχρι και 55 ετών. Στον οικογενή καρκίνο του εντέρου για το ένα τρίτο περίπου των περιπτώσεων έχει τεκμηριωθεί η γενετική τους βάση. Δυο σπάνια σύνδρομα ευθύνονται για την πλειονότητα των κληρονομούμενων καρκίνων του εντέρου: η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (ΟΑΠ) για περίπου 1-2% των καρκίνων του εντέρου και ο κληρονομούμενος μη πολυποδιακός καρκίνος του παχέος εντέρου (ΚΜΠΚΠΕ) για περίπου 6% των καρκίνων του εντέρου. Κάποια άλλα πιο σπάνια σύνδρομα ευθύνονται για λιγότερο από 1% των περιστατικών στο έντερο⁹. Τέτοια είναι το σύνδρομο reutz jehgers, το σύνδρομο cowden, το σύνδρομο turcot το σύνδρομο της νεανικής πολυποδίασης ή το σύνδρομο muir torre.

Για όλα τα παραπάνω σύνδρομα έχουν χαρακτηριστεί τα γονίδια τα οποία, όταν δυσλειτουργούν εξαιτίας κληρονομούμενων μεταλλαγών ή άλλων επιγενετικών επιδράσεων, προκαλούν την εμφάνιση των αντιστοίχων παθήσεων¹⁰⁻¹⁵ (Πίνακας 1).

Ένα σημαντικό κοινό χαρακτηριστικό όλων των παραπάνω συνδρόμων, στο οποίο βασίζεται και η μεταξύ τους διάκριση, είναι η οντότητα του πολύποδα¹⁶. Οι πολύποδες – προεκβολές του βλεννογόνου μέσα στον αυλό του εντέρου – μπορεί να είναι αδενωματώδεις ή αμαρτωματώδεις. Μπορεί να είναι έμμισχοι ή άμισχοι, σωληνώδεις ή λαχνωτοί, ελαφριάς έως βαριάς δυσπλασίας, με μυικές ίνες ή χωρίς, με μέγεθος από μερικά χιλιοστά έως και τρία εκατοστά του μέτρου. Τέλος είναι δυνατόν να βρίσκονται σε όλο τον γαστρεντερικό σωλήνα. Όμως αυτοί που τελικά εξελίσσονται σε νεοπλασία είναι οι αδενωματώδεις.

Κάθε σύνδρομο έχει χαρακτηριστική κλινική εικόνα και φαινότυπο στο γαστρεντερικό σωλήνα (Εικ. 3). Σε ορισμένα από αυτά ο φαινότυπος συνοδεύεται από χαρακτηριστικές εξωεντερικές αλλοιώσεις (Πίνακας 1).

Τέλος, ο αριθμός των πολυπόδων ποικίλει από ελάχιστους στο σύνδρομο του μη πολυποδιακού καρκίνου του παχέος εντέρου έως και χιλιάδες στην οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση (ΟΑΠ)¹⁶ (Πίνακας 1).



ΣΥΝΔΡΟΜΟ / ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	ΕΝΤΕΡΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ						ΕΞΩΕΝΤΕΡΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ			ΥΠΕΥΘΥΝΟ ΓΟΝΙΔΙΟ
	ΠΟΛΥΠΩΔΕΣ - ΑΔΕΝΩΜΑΤΑ						ΚΑΡΚΙΝΟΣ	ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ	ΜΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ	
	ΑΡΙΘΜΟΣ	ΜΕΓΕΘΟΣ	ΗΛΙΚΙΑ	ΕΙΔΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΗΛΙΚΙΑ				
FAP και GARDNER / 1:8000	>100	2 - 35 mm	5 - 30	Αδενωματώδεις, έμμοχοι ή άμμοχοι, σωληνωδείς ή και λαχνωτοί, ελαφρώς ή μέτριας δυσπλασίας, μικροσκοπικά αδενώματα ακόμη και μιας κρυπτής	Καλύπτουν όλο το παχύ. Μικροί πολλαπλοί υπερπλαστικοί στο στομάχι και στο ανώτερο πεπτικό (φύμα του νεφρού, δωδεκαδάκτυλο, νηστίδα ή τελικός ειλεός)	30 - 40	Συνήθως στο ανώτερο έντερο, ή απομακρυσμένος σπινάλιος σε νηστίδα, ειλεό, ενώ στο φύμα του νεφρού είναι συχνή αιτία θανάτου	Ενδο- και έξω-κολοκικοί δεσμοειδείς όγκοι, ηπατοβλαστώματα, μυελοβλάστια, όγκοι του θυρεοειδούς, του εγκέφαλου, των ηπατικών χοληφόρων, του φρυμάτος του νεφρού (σημαντική αιτία θανάτου), των επινεφριδίων	Κύστες της επιδερμίδας, των σηληματογόνων αδένων, οστεώματα του κρανίου, της γνάθου και των μακρίων οστών, οδοντικές ανωμαλίες, συγγενής υπερπλασία του επιθήλιου του αμφιβλητρωειδούς (CHORPE)	APC, MYH
AFAP	<100	Ως FAP	20 - 40	Ως FAP, αλλά και οδοντωτά (ή επιπέδα) αδενώματα	Ως FAP, αλλά κυρίως στο δεξί κόλον	50 - 70	Κυρίως στο δεξί κόλον	Ως FAP	Ως FAP	APC, MYH
TURCOT / αρκετά σπάνιο	Ως FAP	Ως FAP	Ως FAP	Ως FAP	Ως FAP	5 - 20	Ως FAP	Ως FAP	Ως FAP	APC, hMLH1, hMSH2
MUIR-TORRE / πολύ σπάνιο	<100	Ως FAP	20 - 40	Αδενωματώδεις	Κυρίως στο εγγύς κόλον	40 - 50	Κυρίως στο εγγύς κόλον	Πολλαπλές αλλά μάλλον ανώδυνες, καρκίνοι βασικών ή πλακωδών κυττάρων, ή σηληματογόνων αδένων, κερατοακανθώματα, καρκίνος του ενδομητρίου, σπλαχνικές κακοήθειες	Επιδερμικές αλλοιώσεις	hMSH2, hMLH1
JUVENILE POLYPOSIS / σπάνιο	Λίγοι < 100	Έως μερικά εκατοστά	1 - 10	Αμαρτωματώδεις με αδενικό επιθήλιο χωρίς όμως proliferative αλλαγές όπως στους αδενωματώδεις, έχουν λεπτό μίσχο, είναι σφαιρικοί με ομαλή επιφάνεια, σε τομή παρουσιάζουν πολλα κυστίδια με φαιοκίτρινη βλέννα και κοκκινωπό στρώμα που όμως δεν έχει μυϊκές ίνες όπως στο σύνδρομο peutz-jeghers	Μόνο στο κόλον, μόνο στο στομάχι, ή παντού, αρχικά εμφανίζονται στο ορθό από πολύ νεαρή ηλικία	30 - 60	Κυρίως στο κόλον, σπινάλιος στο στομάχι	Χαμηλό ύψος, πλατιά μύτη, «δίδυμο» του δέρματος, του λαιμού, των χεριών, υποπλαστικά αυτιά, μικρο κεφαλή, μικρή σφραγματική κνήμη, υποπλαστικοί λοξοί μύες, αμφοτερόπλευρη κοιλιακή διάγκωση, προεξέχουσες φλέβες στο θώρακα και στην κοιλιά, ακούρες άνω επιφανείες χεριών και ποδιών, κοντά και φαρδιά χέρια και πόδια, καθυστερημένη έναρξη ομιλίας και βδισματός	SMAD4, BMPR1A	
PEUTZ-JEGHERS / 1:60000-300000	Λίγοι < 100	μικροί	1 - 20	Αμαρτωματώδεις, περιέχουν μικρές ίνες και καλύπτονται από αδενικό επιθήλιο	Σε όλο το έντερο, αλλά κυρίως στη νηστίδα	30 - 60	Σε όλο το έντερο, ξεκινούν από αδενωματώδεις περιοχές των πολύποδων ή από σύγχρονους αδενωματώδεις πολύποδες	Καρκίνοι στους πνευμόνες, στο μαστό, στις ουθήκες, στα κύτταρα του στομάχου (όρχες), στο θυρεοειδή, νιαδενώματα, πολλαπλά μυελώματα, καρκίνοι χολής, χοληδόχου κύστης, ουρητήρα και ουροδόχου κύστης	Φακίδες, κηλίδες μελανίνης (χρυσάτος πρσσανού, καφέ ή μαυρού) στα χείλη, στο στοματικό βλεννογόνο και στα δάκτυλα, ακόμα και στην περιγεννητική περίοδη, γυνακομαστία. Οι κηλίδες μπορεί να «κρίνονται» στην εφηβεία εκτός από αυτές στο στομάχι. Πολύποδες στη μύτη στους βρόγχους, στη χολή, στην ουροδόχο κύστη.	STK11
COWDEN / έχουν περιγραφεί περίπου 200 περιστατικά παγκοσμίως	<100	μικροί	10 - 30	Αμαρτωματώδεις, φλεγμονώδεις, λιπωματώδεις, ή τύπου juvenile	Πολλαπλοί αμαρτωματώδεις πολύποδες σε όλο το έντερο, πολλαπλές αμαρτωματώδεις αλλοιώσεις στο δέρμα, κονδυλώματα στις αμυγδαλές, στη σταφυλή.	20 - 70	Οι πολύποδες του εντέρου δεν δίνουν καρκίνο	Καρκίνος και νιώματα μαστού, θυρεοειδούς, κύστες ουθήκων, λιπώματα μήτρας, μηνιγγίωμα, υποδόρια λιπώματα και δερματικά σηλητωματώματα, οξεία υπερκερατινοποίησης κακοήβει, αλλοιώσεις των ούλων και της στις παλάμες και τα πέλματα	Προσοδευτική μακροκεφαλία, τοξοειδής σφραγισμός, σχετική γλώσσα και ελαφρά ως μέτρια διανοητική καθυστέρηση στα παιδιά, προεξέχουσες ώμοσκαλας, σκολίωση, κονδυλώματα και λεχίνες δέρματος και ακρών, αλλοιώσεις των ούλων και της στοματικής κοιλότητας	P TEN

3.1.3 Οικογενής Αδενωματώδης Πολυποδίαση

3.1.3.1 Φαινότυπος

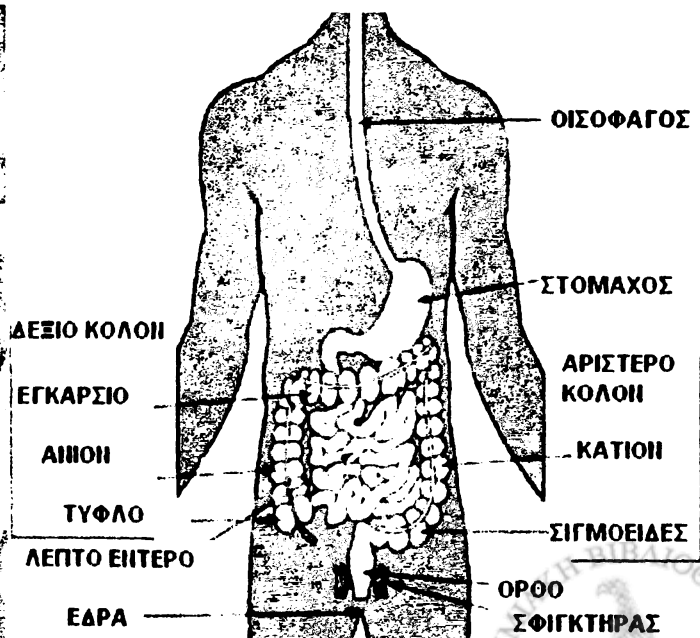
Το πρώτο από τα σύνδρομα ΚΠΕ του οποίου διαλευκάνθηκε η γενετική βάση ήταν η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση^{10,11}. Ο σημαντικότερος λόγος για αυτό είναι ο επικρατούσας τρόπος κληρονομικότητας και ο πολύ χαρακτηριστικός φαινότυπος του συνδρόμου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ΟΑΠ περιγράφηκε πρώτη φορά πριν από 80 χρόνια¹⁷.

Στην ΟΑΠ το έντερο του ασθενούς γεμίζει με εκατοντάδες έως και χιλιάδες πολύποδες μέχρι την ηλικία των 30 ετών. Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου είναι μεταξύ 1:8000 με 1:10000¹⁸. Η εικόνα της κολonosκόπησης είναι χαρακτηριστική με τον αυλό του εντέρου να έχει τη μορφή τάπητα από τους πολυάριθμους πολύποδες (Εικ. 3).

Αυτοί είναι αδενωματώδεις προκαρκινωματώδεις βλάβες. Μπορεί να είναι έμμισχοι ή άμισχοι, σωληνώδεις ή και λαχνωτοί, ελαφριάς ή μέτριας δυσπλασίας, μικροσκοπικά αδενώματα ακόμη και μιας κρύπτης. Οι πολύποδες καλύπτουν όλο το παχύ έντερο (Εικ. 4). Μικροί πολλαπλοί υπερπλαστικοί εμφανίζονται συχνά στο στομάχι και στο ανώτερο πεπτικό (φύμα του vater, δωδεκαδάκτυλο, νήστιδα ή τελικό ειλεό). Το μέγεθός τους ποικίλει από 2 έως και 35 χιλιοστά.



Εικόνα 3. Εικόνα κολonosκόπησης - ΟΑΠ



Εικόνα 4. Ο γαστρεντερικός σωλήνας.

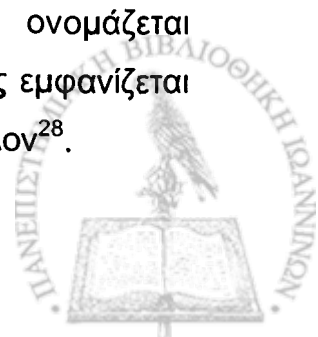
Εκτός των πολυπόδων στην ΟΑΠ ο ασθενής εμφανίζει και μια σειρά εξωεντερικών αλλοιώσεων που επίσης χαρακτηρίζουν το σύνδρομο ή ομαδοποιούνται δημιουργώντας συγκεκριμένες υπομορφές της πάθησης όπως το σύνδρομο Gardner²⁰ και το σύνδρομο Turcot²¹. Περίπου το 60% των ασθενών με ΟΑΠ εμφανίζουν συγγενή υπερτροφία του μελανινοφόρου επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς γνωστή ως CHRPE (Congenital Hypertrophy of the Retinal Pigment Epithelium)²¹. Αυτή η υπερτροφία, που δεν επηρεάζει την όραση ούτε αποτελεί κακοήθεια, ελέγχεται με βυθοσκόπηση και παλαιότερα αποτελούσε ένα από τα διαγνωστικά κριτήρια για την ΟΑΠ.

Στο σύνδρομο Gardner της ΟΑΠ, εμφανίζονται κύστεις της επιδερμίδας και των σμηγματογόνων αδένων, οστεώματα του κρανίου, της γνάθου και των μακριών οστών και οδοντικές ανωμαλίες²⁰. Στο σύνδρομο Turcot της ΟΑΠ εκτός από τους πολύποδες εμφανίζεται και μυελοβλάστωμα²¹.

Η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου στους ασθενείς της ΟΑΠ, το αργότερο 20 χρόνια μετά την εμφάνιση των πολυπόδων έχει μετατραπεί σε βεβαιότητα¹⁹. Για αυτό το λόγο η ολική κολεκτομή συνοδευμένη από ειλεορθική αναστόμωση αποτελούν μονόδρομο για όσους ανθρώπους υποφέρουν από αυτήν την πάθηση.

Ο καρκίνος εμφανίζεται συνήθως στο αριστερό κόλον και πολύ σπανιότερα στη νήστιδα ή στον ειλεό. Ακόμη όμως και μετά την κολεκτομή οι ασθενείς με ΟΑΠ έχουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου και σε άλλα σημεία. Έτσι, αναπτύσσονται ενδο- και έξω- κοιλιακοί δεσμοειδείς όγκοι²³, ηπατοβλάστωμα²⁴, όγκοι του θυρεοειδούς²⁵, του εγκεφάλου, των ηπατικών χοληφόρων, και των επινεφριδίων²⁶. Ειδικά, ο καρκίνος στο φύμα του vater²⁷ αποτελεί την πιο συχνή αιτία θανάτου των ασθενών με ΟΑΠ, ενώ δεύτεροι σε συχνότητα ακολουθούν οι δεσμοειδείς όγκοι.

Τα παραπάνω αφορούν την κλασσική πολυποδίαση. Υπάρχει όμως και μια δεύτερη έκφραση της πάθησης που χαρακτηρίζεται από την παρουσία λιγότερων από 100 πολυπόδων οι οποίοι εμφανίζονται σε μεγαλύτερη ηλικία από την κλασσική πολυποδίαση. Οι πολύποδες εδώ είναι όπως και στην ΟΑΠ αλλά μπορεί να είναι και οδοντωτά (ή επίπεδα) αδενώματα. Συνήθως οι πολύποδες εμφανίζονται στο δεξιό κόλον. Αυτή η μορφή της πάθησης ονομάζεται εξασθενημένη ΟΑΠ (ΕΟΑΠ), και σε αυτούς τους ασθενείς ο καρκίνος εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία από την κλασσική ΟΑΠ και κυρίως στο δεξιό κόλον²⁸.



3.1.3.2 Γονότυπος

Εξήντα περίπου χρόνια μετά την πρώτη περιγραφή της νόσου και περίπου 30 χρόνια μετά την ανακάλυψη της δομής του DNA, το υπεύθυνο γονίδιο για την ΟΑΠ χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 5q21 μετά από αναλύσεις σύνδεσης σε πάσχουσες οικογένειες²⁹.

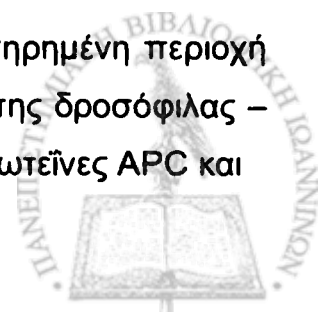
Το 1991 το γονίδιο *Adenomatous Polyposis Coli (APC)* κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε από δυο ομάδες ερευνητών¹⁰⁻¹¹. Αυτοί παρουσίασαν την κωδική αλληλουχία του γονιδίου καθώς και μια σειρά από παθογόνες μεταλλάξεις του σε ασθενείς της ΟΑΠ.

Το *APC* καλύπτει μια περιοχή περίπου 100 χιλιάδων ζευγών βάσεων (Kbp) σε επίπεδο χρωμοσώματος και έχει μια κωδική αλληλουχία 8535 βάσεων. Αυτή μοιράζεται σε 15 εξόνια. Το 15^ο εξόνιο απολαμβάνει τη μερίδα του λέοντος καλύπτοντας περισσότερο από το 75% της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου και συγκεντρώνοντας την πλειονότητα των κληρονομούμενων και σωματικών μεταλλαγών. Υπάρχουν επίσης, και άλλα εξόνια που είτε εκφράζονται σε πολύ μικρότερο ποσοστό όπως το 9A ή δεν εκφράζονται σε όλους τους ιστούς όπως το 10A^{10,30}.

Το *APC* εκφράζεται εξίσου σε όλους του ιστούς του ανθρωπίνου οργανισμού¹⁰. Έχει δυο υποκινητές – 1A και 1B – από τους οποίους αυτός που είναι συνήθως ενεργός είναι ο 1A³¹. Η πρωτεΐνη *APC*, που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο, αποτελείται από 2843 αμινοξικά κατάλοιπα και έχει μοριακό βάρος 312 kDa. Έχει δε πολλές διαφορετικές περιοχές με διακριτές και σημαντικές λειτουργίες³² (Εικόνα 5).

Ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο διακρίνουμε αρχικά την περιοχή ολιγομερισμού η οποία με συντηρημένες επαναλήψεις μήκους 7 αμινοξικών καταλοίπων επιτρέπει τον διμερισμό των *APC* πρωτεϊνών³³. Η παρουσία αυτής της περιοχής προς το αμινοτελικό άκρο επιτρέπει τον διμερισμό ακόμη και μεταλλαγμένων ημιτελών πρωτεϊνικών προϊόντων με φυσιολογικές πρωτεΐνες αχρηστεύοντας και αυτές και επιτείνοντας έτσι τις εκδηλώσεις του παθολογικού φαινοτύπου³⁴. Αυτό το φαινόμενο λέγεται αρνητική επικράτηση.

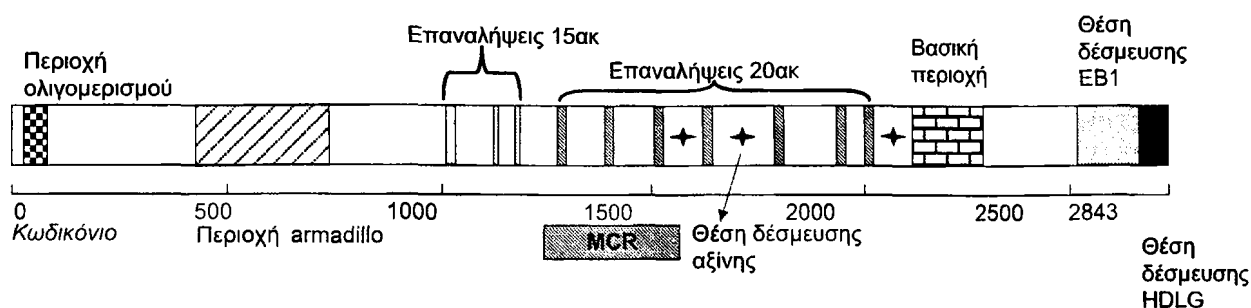
Επόμενη περιοχή είναι η περιοχή *armadillo* μια πολύ συντηρημένη περιοχή που συναντάται και στη β-κατενίνη και στην ομόλογη πρωτεΐνη της δροσόφιλας – *armadillo*³⁵. Συνήθως διατηρείται ακόμη και σε μεταλλαγμένες πρωτεΐνες *APC* και



πιστεύεται ότι επιτρέπει στην APC πρωτεΐνη να ρυθμίζει την σταθερότητα και την κίνηση του δικτύου των μικρο-ινιδίων της ακτίνης³⁵.

Ακολουθεί μια σειρά τριών επαναλήψεων των 15 αμινοξικών καταλοίπων, οι οποίες δεσμεύουν την β-κατενίνη και συνήθως και αυτές διατηρούνται στις περισσότερες μεταλλαγμένες πρωτεΐνες APC.

Μετά από αυτές τις επαναλήψεις ακολουθεί ίσως η πιο σημαντική περιοχή της πρωτεΐνης: μια σειρά επτά επαναλήψεων μήκους 20 αμινοξικών καταλοίπων η κάθε μια. Αυτές οι επαναλήψεις φέρουν την «υπογραφή» TPXXFSXXXSL και ξεκινούν από τα κωδικόνια 1267, 1380, 1496, 1647, 1852, 1959 και 2017³⁵.



Εικόνα 5. Περιοχές της πρωτεΐνης APC.

Σε αυτές δεσμεύεται β-κατενίνη η οποία σηματοδοτείται για περαιτέρω πρωτεόλυση³⁶. Αρχικά οι επαναλήψεις της APC φωσφορυλιώνονται από την 3β κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου (GSK3b). Στη συνέχεια η β-κατενίνη δεσμεύεται σε αυτές τις επαναλήψεις. Παράλληλα – μια τρίτη πρωτεΐνη – η αξίνη δεσμεύεται σε συγκεκριμένες περιοχές της APC που βρίσκονται μετά την 3^η, την 4^η και την 7^η επανάληψη των 20 αμινοξικών καταλοίπων (α.κ.). Η αξίνη στηρίζει δομικά το παραπάνω σύμπλοκο το οποίο υποκινεί την φωσφορυλίωση των καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης της β-κατενίνης. Με αυτόν τον τρόπο η β-κατενίνη σηματοδοτείται για πρωτεολυτική αποικοδόμηση μέσω του συστήματος της ουβικιτίνης³⁶.

Ακολουθούν προς το καρβοξυτελικό άκρο η βασική περιοχή και οι θέσεις δέσμευσης των πρωτεϊνών EB1 και HDLG (Human discs large tumour suppressor protein). Σημαντικότερες είναι η βασική περιοχή και η θέση για την EB1, οι οποίες συνδέουν την πρωτεΐνη APC με το δίκτυο των μικροσωληνίσκων και τα κεντρομερίδια των χρωμοσωμάτων³⁵. Με αυτόν τον τρόπο το APC εμπλέκεται και στον κυτταροσκελετό και τη διαίρεση του κυττάρου.

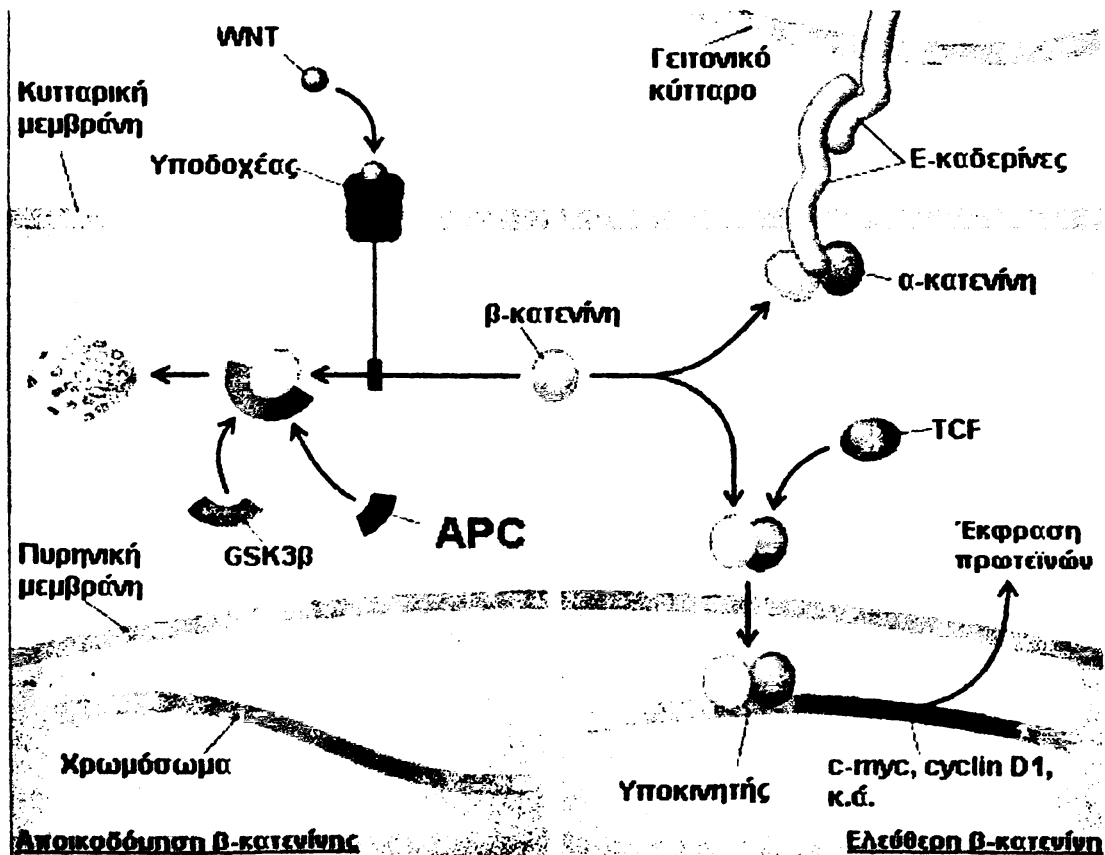


Η σημαντικότερη όμως λειτουργία της πρωτεΐνης APC στο κύτταρο είναι η ρύθμιση των ενδοκυττάρων επιπέδων της β-κατενίνης μέσω των επαναλήψεων των 20 α.κ. και αποτελεί την ουσία της ογκοκατασταλτικής δράσης του APC.

Η β-κατενίνη αποτελεί τον τελικό ενδοκυτταρικό μηνύτορα του πολύ συντηρημένου μονοπατιού μετάδοσης σημάτων, wnt (Εικόνα 6). Το μονοπάτι αυτό λειτουργεί για επιλογή κυτταρικής σειράς στον *C. elegans*, για σχηματισμό νωτιαίου άξονα στον *X. laevis*, για την ανάπτυξη του ΚΝΣ στα θηλαστικά και για τη δημιουργία προτύπων στη δροσόφιλα³⁷.

Έτσι, αύξηση των επιπέδων της β-κατενίνης μπορεί να συμβαίνει είτε φυσιολογικά λόγω μετάδοσης αναπτυξιακών σημάτων μέσω του wnt είτε παθολογικά εξαιτίας μεταλλαγών στο APC ή στην β-κατενίνη.

Στην αντίθετη περίπτωση, όπου η β-κατενίνη συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα, περνά στον πυρήνα όπου σε συνεργασία με τους μεταγραφικούς παράγοντες T cell Factor (TCF) και Lymphoid Enhancer Factor (LEF) επάγει την μεταγραφή μιας σειράς πρωτο-ογκογονιδίων όπως του *c-myc* και της *cyclin D1* τα οποία ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο³⁸.



Εικόνα 6. Μονοπάτι μετάδοσης ενδοκυτταρικών σημάτων - wnt.



Ακόμη, η β-κατενίνη (Εικόνα 6) συμμετέχει μέσω του συστήματος των Ε-καδερινών στη σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους, εμπλέκοντας έτσι και το APC σε αυτή τη διαδικασία³⁹.

Είναι λοιπόν φανερό γιατί περίπου το 50% των μεταλλαγών του APC εντοπίζονται στην περιοχή των επαναλήψεων των 20 αμινοξικών καταλοίπων. Η πλειονότητα των ημιτελών μεταλλαγμένων πρωτεϊνών APC έχουν απωλέσει όλες ή τις περισσότερες επαναλήψεις των 20 αμινοξικών καταλοίπων, που χρειάζονται για τον έλεγχο των ενδοκυττάρων επιπέδων της β-κατενίνης.

Όταν στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα αυξάνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση β-κατενίνης λόγω μεταλλαγής στο APC τότε συμβαίνουν τα εξής:

A. Απορυθμίζεται ο κυτταρικός κύκλος λόγω μεταγραφικής ενεργοποίησης ογκογονιδίων³⁸.

B. Αναστέλλεται η φυσιολογική μετανάστευση των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων προς την κορυφή των εντερικών λαχνών και η απόπτωσή τους³⁹.

Τα παραπάνω γεγονότα προκαλούν την εμφάνιση των αδενωμάτων στον εντερικό σωλήνα⁴⁰. Η ογκογένεση στους ασθενείς της ΟΑΠ ξεκινά από τους πολύποδες στους οποίους απενεργοποιείται και το δεύτερο αλληλόμορφο του APC είτε από σωματικές μεταλλαγές είτε από απώλεια ετεροζυγωτίας, σύμφωνα με την υπόθεση των δυο χτυπημάτων του Knudson⁴¹.

3.1.3.3 Κληρονομούμενες μεταλλαγές του APC και φαινότυπος

Η πλειονότητα των κληρονομούμενων μεταλλαγών του APC σε ποσοστό που υπερβαίνει το 94% προκαλούν πρόωρο τερματισμό στην πρωτεϊνοσύνθεση και παραγωγή ατελούς μη λειτουργικού πρωτεϊνικού προϊόντος. Αυτό συμβαίνει είτε με μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης είτε με τερματισμό λόγω μη νοηματικής μεταλλαγής.

Περίπου το 33% των μεταλλαγών είναι μη νοηματικές, ένα 6% μικρές προσθήκες και 55% μικρές απαλοιφές νουκλεοτιδικών βάσεων⁴². Πιο σπάνιες είναι οι μεταλλαγές που επηρεάζουν το φυσιολογικό μάτισμα του ωρίμου μεταγράφου mRNA του APC.

Τα ποσοστά αυτά στηρίζονται σε μελέτες ανίχνευσης σημειακών μεταλλαγών. Τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί και χρησιμοποιούνται εύχρηστες μέθοδοι που επιτρέπουν την ανίχνευση μεγάλων γενωμικών αναδιατάξεων. Με αυτές έχει ανατραπεί η αντίληψη περί σπανιότητας τέτοιων



γεγονότων στο γονίδιο APC. Σύγχρονες μελέτες αναπροσαρμόζουν το ποσοστό αυτών των μεταλλαγών περίπου στο 10-15% των ασθενών ΟΑΠ στους οποίους δεν έχει εντοπιστεί σημειακή μεταλλαγή στο APC⁴³⁻⁴⁵.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι περίπου το 20-30% των κληρονομούμενων μεταλλαγών στο APC είναι *de-novo* δηλαδή εμφανίζονται χωρίς προηγούμενο οικογενειακό ιστορικό¹⁸, πιθανότατα στο ζυγωτό ή κατά τη δημιουργία των γαμετών. Έτσι παρά το εξελικτικό μειονέκτημα του μεταλλαγμένου APC η συχνότητα της νόσου διατηρείται υψηλή λόγω των *de-novo* μεταλλαγών του.

Η κατανομή των μεταλλαγών είναι ιδιαίτερη στο APC με περισσότερο από το 50% αυτών να συσσωρεύεται σε μια περιοχή περίπου 2000 ζευγών βάσεων στην αρχή του εξωνίου 15, τη λεγόμενη περιοχή συσσώρευσης μεταλλαγών (MCR – mutation cluster region)⁴².

Επιπλέον η θέση της μεταλλαγής επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό το φαινότυπο. Έτσι, έχουμε⁴⁶:

- μεταξύ κωδικονίων 1249 και 1330 πολύ επιθετικό φαινότυπο
- μεταξύ κωδικονίων 1-163 και 1860-1897 εξασθενημένη ΟΑΠ
- μεταξύ κωδικονίων 457 και 1387 CHRPE
- μεταξύ κωδικονίων 1310 και 2011 δεσμοειδείς όγκους
- μεταξύ κωδικονίων 457 και 1309 ηπατοβλάστωμα
- μεταξύ κωδικονίων 976 και 1067 πολύποδες δωδεκαδακτύλου
- μεταξύ κωδικονίων 1256 και 1303 οδοντικές αλλοιώσεις και οστεώματα
- μεταξύ κωδικονίων 1250 και 1464 ΚΠΕ σε πολύ μικρή ηλικία
- πολύ μικρή ηλικία έναρξης για το κωδικόνιο 1309
- κλασσικό φαινότυπο ΟΑΠ για μεγάλες ελλείψεις του γονιδίου

Πέρα όμως από τις μεταλλαγές που προκαλούν διακοπή της πρωτεϊνοσύνθεσης και είναι ξεκάθαρα παθογόνες, στο APC εντοπίζονται και μια σειρά παρανοηματικών μεταλλαγών οι οποίες αλλάζουν απλώς ένα μόνο αμινοξικό κατάλοιπο. Τέτοιες μεταλλαγές όπως η D1822V, η I1307K και η E1317Q δεν είναι ακόμη ξεκάθαρα κατά πόσο προκαλούν φαινότυπο ΟΑΠ ή τον ενισχύουν.

Υπάρχουν μελέτες όπου αυτές οι μεταλλαγές είτε συνδέονται με τις διατροφικές συνήθειες είτε έχουν υψηλότερες συχνότητες σε εθνικές ομάδες όπως οι εβραίοι Εσκενάζυ⁴⁷⁻⁴⁹. Ο φαινότυπος σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να είναι φυσιολογικός, ελαφριάς μορφής με απλά μεγαλύτερες πιθανότητες για ΚΠΕ, ή ακόμη και σοβαρός. Η επικρατούσα άποψη για την παθογένεια αυτών των μεταλλαγών είναι ότι η θέση τους και η αμινοξική αλλαγή που προκαλούν,

επηρεάζουν από λίγο ως πολύ τη σωστή λειτουργία της πρωτεΐνης, οπωσδήποτε όμως σε πολύ μικρότερο βαθμό από τις μεταλλαγές τερματισμού πρωτεϊνοσύνθεσης και συχνά σε συνδυασμό με το συνολικό γενετικό υπόβαθρο του ασθενούς.

Τέλος αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι σε ασθενείς με ΟΑΠ στους οποίους δεν ανευρίσκεται κληρονομούμενη μεταλλαγή στο *APC*, ανευρίσκονται πολλές σωματικές μεταλλαγές του ίδιου γονιδίου στο έντερο. Αυτές είναι κυρίως μεταστροφές του τύπου G:C σε T:A. Προκαλούνται από εσφαλμένη λειτουργία του συστήματος επιδιόρθωσης οξειδωτικών βλαβών στο DNA, μέσω εκτομής βάσεων (Base Excision Repair system – BER). Δείχθηκε από σειρά μελετών ότι αυτοί οι ασθενείς φέρουν κληρονομούμενες μεταλλαγές στο γονίδιο *MYH* το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο επιδιόρθωσης κακού ζεύγους βάσεων αδενίνης με 8-όξογουανίνη, του συστήματος BER¹⁵.

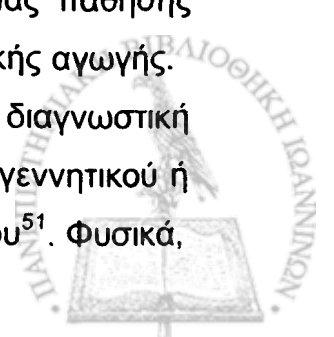
Η λεγόμενη *MYH*-ΟΑΠ φαίνεται να κληρονομείται με υπολειπόμενο τρόπο. Χρειάζονται δηλαδή δυο μεταλλαγές για να απενεργοποιηθούν και τα δυο αλληλόμορφα του *MYH*. Τελευταία όμως υπάρχουν μελέτες όπου παρουσιάζονται περιπτώσεις *MYH*-ΟΑΠ με μια μόνο μεταλλαγή στο *MYH*⁵⁰.

3.1.4 Γενετικός έλεγχος στην Οικογενή Αδενωματώδη Πολυποδίαση

Καθημερινά όλο και περισσότερη πληροφορία σχετικά με την αλληλουχία γονιδίων συσσωρεύεται. Αυτή η πληροφορία αξιοποιείται για τον έλεγχο αυτών των γονιδίων και την διάγνωση της προδιάθεσης σε κληρονομικά νοσήματα. Ήδη ένα πλήθος μονογονιδιακών παθήσεων ελέγχεται σε εξειδικευμένα κέντρα και νοσοκομεία.

Ο γενετικός έλεγχος στις γενετικές ασθένειες αφορά στην εξακρίβωση της γονιδιακής βλάβης – μεταλλαγής που είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση της πάθησης στον ασθενή. Τα οφέλη του γενετικού ελέγχου πέρα από την αξία αυτής καθ'αυτής της πληροφορίας είναι πολλά. Η γνώση της γενετικής μιας πάθησης επιτρέπει τον καθορισμό της κατάλληλης θεραπευτικής ή υποστηρικτικής αγωγής.

Ακόμη διευκολύνει και κατευθύνει την περαιτέρω διαγνωστική παρακολούθηση του ασθενούς. Επίσης, επιτρέπει, με μεθόδους προγεννητικού ή προεμφυτευτικού ελέγχου, τη γέννηση απογόνων ελεύθερων της νόσου⁵¹. Φυσικά,



στις πάσχουσες οικογένειες αφαιρεί το άγχος από όσους δεν φέρουν τη γενετική βλάβη, μαζί βέβαια με το σωματικό, οικονομικό, και ψυχολογικό βάρος των διαρκών απεικονιστικών εξετάσεων.

Είναι φανερό ότι ο γενετικός έλεγχος διευκολύνει τη ζωή των ασθενών και των συγγενών τους και μπορεί να αυξήσει και το προσδόκιμο αλλά και την ποιότητα της ζωής τους.

Μεταξύ των πιο γνωστών εξετάσεων που γίνονται είναι η ανίχνευση μεταλλαγών στα γονίδια *hMLH1*, *hMSH2* για το σύνδρομο του μη πολυποδιακού καρκίνου του παχέος εντέρου⁵², η ανίχνευση μεταλλαγών στα γονίδια *BRCA1,2* για τον καρκίνο μαστού – ωθηκών⁵³, στο γονίδιο *MEFV* για τον μεσογειακό πυρετό, στο γονίδιο *ret* για το σύνδρομο της πολλαπλής ενδοκρινής νεοπλασίας, και άλλα.

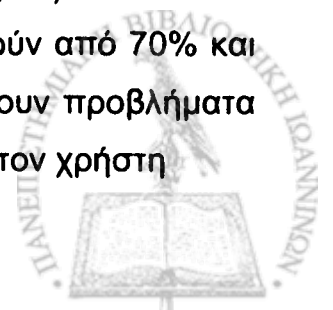
Στο γονίδιο *APC* ο γενετικός έλεγχος εφαρμόζεται ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του 1990.

Τα πιο σημαντικά θέματα στον γενετικό έλεγχο είναι η σωστή επιλογή των υποψηφίων, η επιλογή των μεθόδων, το κόστος, η ψυχολογική υποστήριξη των εξεταζομένων και η αξιολόγηση του αρνητικού αποτελέσματος⁵⁴.

Η λεπτομερής καταγραφή και αξιολόγηση των συμπτωμάτων και του οικογενειακού ιστορικού αποτελούν το πρώτο και σημαντικότερο βήμα για την κατάταξη του ασθενούς στη σωστή κατηγορία. Για παράδειγμα, τα κριτήρια για να θεωρηθεί κάποιος ότι πιθανότατα φέρει κληρονομούμενη μεταλλαγή στο *APC* είναι καρκίνος του εντέρου ή/και περισσότεροι από 100 πολύποδες του παχέος εντέρου σε ηλικία μικρότερη των 40 ετών ή / και ένας πρώτου βαθμού συγγενής με *APC* δοκιμασία θετική. Φυσικά στην ΟΑΠ η απουσία οικογενειακού ιστορικού συμβαίνει αρκετά συχνά εξαιτίας των *de-novo* μεταλλαγών του *APC*.

Το δεύτερο βήμα στη συνέχεια αφορά την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου για την ανίχνευση των μεταλλαγών. Το μεγάλο μέγεθος του *APC* καθιστά την όλη διαδικασία ακριβή και χρονοβόρα. Έτσι, αρχικά καθιερώθηκαν μέθοδοι γρήγορης σάρωσης του γονιδίου για σημειακές μεταλλαγές. Τέτοιες είναι η δοκιμασία «κολοβής» πρωτεΐνης (Protein Truncation Test – PTT), η SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism), η DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) και η ανάλυση ετεροδιμερών (Heteroduplex Analysis).

Οι παραπάνω μέθοδοι έχουν ποσοστά επιτυχίας που ξεκινούν από 70% και φθάνουν στην καλύτερη περίπτωση το 90%, ενώ γενικά εμφανίζουν προβλήματα ευαισθησίας^{55,56}. Η απόδοσή τους ποικίλει σημαντικά ανάλογα με τον χρήστη



και το κάθε εργαστήριο που της εφαρμόζει. Παρ'όλα αυτά όμως σε αυτές τις μεθόδους στηρίχθηκε η ανίχνευση μεταλλαγών σε όλη τη δεκαετία του 1990.

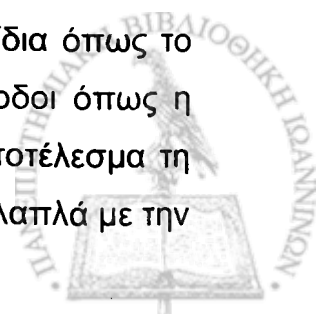
Η ταυτοποίηση πάντα γινόταν με αλληλούχιση της περιοχής του γονιδίου στην οποία είχε ανιχνευθεί η μεταλλαγή και ακόμη και σήμερα η αλληλούχιση (sequencing) αποτελεί την πιο αξιόπιστη λύση για ταυτοποίηση μεταλλαγών.

Τα τελευταία χρόνια όμως, μια καινούργια μέθοδος ανίχνευσης μεταλλαγών συνεχώς κερδίζει έδαφος λόγω της πολύ υψηλής ευαισθησίας της, που ξεκινά από 95% και πάνω, της σταθερότητάς της και της ικανότητας ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε πολύ μικρό χρόνο, γεγονός που μειώνει το κόστος⁵⁷. Αυτή η μέθοδος είναι απλή στη σύλληψη και στηρίζεται στην ιδέα του διαχωρισμού ετερογενών πληθυσμών νουκλεϊκών οξέων με βάση το μήκος τους ή/και την αλληλουχία τους⁵⁷. Ονομάζεται αποδιατακτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης - dHPLC (denaturing High Performance Liquid Chromatography) και αποτελεί την αιχμή του δόρατος στην ανίχνευση μεταλλαγών σε μια σειρά γονιδίων που ελέγχονται στις μέρες μας⁵⁸⁻⁶⁰.

Πέρα όμως από τις μεθόδους και τα ποσοστά της επιτυχίας τους υπάρχει και η σχέση και η επικοινωνία με τον ασθενή. Η διαδικασία πρέπει να περιλαμβάνει επαρκή ενημέρωση για τα οφέλη και τα προβλήματα που μπορεί να προκύψουν από τον γενετικό έλεγχο. Προβλήματα μπορεί να προκύψουν από την αποδοχή και την αφομοίωση ενός θετικού αποτελέσματος από τον ασθενή, την εμφάνιση κατάθλιψης ή ακόμη και τάσεων αυτοκτονίας, την δημιουργία ενοχών σε όσους συγγενείς δε φέρουν τη μεταλλαγή και πολλά άλλα. Για αυτούς τους λόγους η παρουσία ψυχολογικής υποστήριξης κατά τη γνωστοποίηση του αποτελέσματος κρίνεται απαραίτητη και σημαντική όσο και ο ίδιος ο γενετικός έλεγχος.

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα του γενετικού ελέγχου είναι η αξιολόγηση του αρνητικού αποτελέσματος. Παράμετροι όπως η ευαισθησία των μεθόδων ανίχνευσης, η καταλληλότητά τους για την ανίχνευση των πιθανών βλαβών (σημειακές μεταλλαγές ή μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις), το ανθρώπινο λάθος, η επίδραση άλλων άγνωστων μέχρι τώρα γονιδίων, τείνουν να υποβαθμίσουν την αξία του αρνητικού αποτελέσματος.

Αυτό, σε συνδυασμό με το υψηλό κόστος του γενετικού ελέγχου αποτελούν τα δυο μεγάλα προβλήματα της διαδικασίας. Ειδικά για μεγάλα γονίδια όπως το *APC*, τα *BRCA1,2*, το κόστος μπορεί να είναι αρκετά υψηλό. Μέθοδοι όπως η dHPLC επιτρέπουν την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων με αποτέλεσμα τη μείωση του κόστους. Μακροπρόθεσμα το κόστος αντισταθμίζεται πολλαπλά με την



ορθή θεραπευτική, φαρμακευτική και διαγνωστική αντιμετώπιση του ασθενούς αλλά και την ανακούφιση των «αρνητικών» από το οικονομικό βάρος των τακτικών ελέγχων.

Όταν ο γενετικός έλεγχος γίνεται με συνεργασία μοριακών βιολόγων, γεγετιστών, ιατρών, ψυχολόγων τότε μπορεί να λειτουργήσει ευεργετικά για τον ασθενή. Το κλειδί για τη σωστή αξιοποίηση των αποτελεσμάτων του είναι η καλή συνεργασία των επιστημών.

3.2 Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η καθιέρωση και στην Ελλάδα μιας σύγχρονης, οικονομικής, αξιόπιστης και σύντομης μεθόδου για την ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταλλαγών απενεργοποίησης του γονιδίου *APC* σε ασθενείς με Οικογενή Αδενωματώδη Πολυποδίαση. Η πληροφορία από την εξέταση μπορεί να βοηθήσει τους ασθενείς ώστε να ακολουθήσουν την κατάλληλη προληπτική αγωγή με κολεκτομή και χορήγηση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων⁶¹. Η γνώση της υπεύθυνης παθογόνου μεταλλαγής δίνει τη δυνατότητα παραγωγής υγιών απογόνων έπειτα από εξωσωματική γονιμοποίηση και προεμφυτευτικό έλεγχο⁵¹.

Τέλος όσοι δε φέρουν μεταλλαγή απαλλάσσονται από το άγχος, το οικονομικό, σωματικό και ψυχολογικό βάρος των τακτικών κολονοσκοπήσεων.

Ακόμη, μέσα στους στόχους της μελέτης είναι και η συλλογή και καταγραφή πληροφοριών για τις μεταλλαγές του *APC* που εμφανίζονται στον Ελληνικό πληθυσμό.



4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Επιλογή των ασθενών

Τα κριτήρια επιλογής των ασθενών για γενετικό έλεγχο του γονιδίου *APC* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν:

1. Περισσότεροι από 100 πολύποδες πριν την ηλικία των 40 ετών σε συνδυασμό ή όχι με καρκίνο του παχέος εντέρου ή/και εξωεντερικές αλλοιώσεις (Πίνακας 1).

2. Συγγενής πρώτου βαθμού με διαγνωσμένη ΟΑΠ.

Σε αυτήν την κατηγορία εξετάσαμε ασθενείς από 18 οικογένειες.

Επιπρόσθετα για την κάλυψη και των περιπτώσεων της εξασθενημένης ΟΑΠ και της ΜΥΗ-ΟΑΠ, συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη και ασθενείς που είτε είχαν λιγότερους από 100 πολύποδες είτε η ηλικία τους ήταν μεγαλύτερη των 50 ετών.

Σε αυτή την κατηγορία εξετάσαμε ασθενείς από 7 οικογένειες.

Συνολικά λοιπόν γενετικός έλεγχος για *APC* εφαρμόστηκε σε 25 πάσχουσες οικογένειες.

Η διαδικασία περιλάμβανε μια αρχική συζήτηση με τον ασθενή στην οποία γινόταν συλλογή πληροφοριών σχετικά με τα εξής:

1. Τον φαινότυπο, τα συμπτώματα, την ηλικία έναρξης, το οικογενειακό ιστορικό σε βάθος τουλάχιστον μιας γενιάς και προς τη μητέρα και προς τον πατέρα.

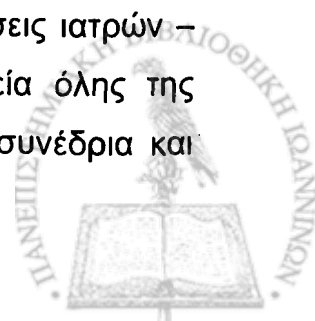
2. Τις ιατρικές απεικονιστικές εξετάσεις, όπως κολονοσκοπήσεις και ιστολογικές – ιστοχημικές εξετάσεις πολυπόδων.

3. Στοιχεία επικοινωνίας με τον ασθενή και τον ιατρό του.

Στη συνέχεια γινόταν μια αδρή εκτίμηση της πιθανότητας να ανήκει ο ασθενής στην ομάδα αυτών που χρήζουν γενετικό έλεγχο για *APC*. Στη συζήτηση αυτή γίνονταν γνωστά στον ασθενή τα θετικά και αρνητικά του γενετικού ελέγχου.

Σε δεύτερο χρόνο επικοινωνούσαμε με τον ιατρό του ασθενούς και συλλέγαμε επιπλέον πληροφορίες για τον φαινότυπο.

Για την συλλογή των ασθενών χρειάστηκε να γίνουν ενημερώσεις ιατρών – κυρίως γαστρεντερολόγων – από δημόσια και ιδιωτικά νοσοκομεία όλης της χώρας. Αυτές είτε γίνονταν απ'ευθείας είτε μέσω συμμετοχών σε συνέδρια και ερευνητικές ομάδες και πρωτόκολλα.



Έτσι, ασθενείς προσήλθαν καθοδηγούμενοι από ιατρούς, από τα νοσοκομεία ΑΧΕΠΑ και Ιπποκράτειο της Θεσσαλονίκης, Ευαγγελισμό, Γεν. Κρατικό Νίκαιας, Παίδων Αγία Σοφία, θεραπευτήρια ΙΚΑ, 251 Γ.Ν.Α., ΔΘΚΑ Υγεία, Ερ.Ντυνάν και Euromedica από την Αθήνα και από το πανεπιστημιακό νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης. Αρκετοί ασθενείς επίσης προσήλθαν από την Ελληνική συνεργαζόμενη ογκολογική ομάδα (HeCoG), και την Ομάδα μελέτης του κληρονομούμενου καρκίνου του παχέος εντέρου της Ελληνικής Εταιρείας Όγκων του Πεπτικού Συστήματος. Στο πέρασμα του χρόνου ασθενείς άρχισαν να προσέρχονται και από μόνοι τους λόγω της δημοσιότητας που έλαβε ο γενετικός έλεγχος του *APC*, δεδομένου ότι έγινε για πρώτη φορά στην Ελλάδα.

4.2 Υλικό εξέτασης

Το αίμα είναι κοινά αποδεκτό για χρήση στην ανίχνευση μεταλλαγών σε επίπεδο DNA. Δεδομένου ότι το γονίδιο *APC* εκφράζεται σε ικανά επίπεδα και στα λεμφοκύτταρα, επιλέχθηκε το αίμα ως υλικό εξέτασης για την παρούσα μελέτη εφόσον από αυτό το υλικό θα μπορούσαμε να απομονώσουμε και DNA και RNA.

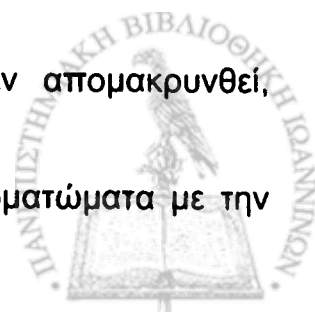
Περίπου 5 ml ολικού αίματος ανά άτομο ελήφθησαν από τα μέλη κάθε οικογένειας που προσήλθε για εξέταση. Η λήψη έγινε από εξειδικευμένο προσωπικό. Για συμβατότητα με τις μεθόδους εξέτασης χρησιμοποιήθηκε αντιπηκτικό Na_2EDTA , έτσι ώστε να είναι εφικτή η απομόνωση των λεμφοκυττάρων από κάθε δείγμα, εφόσον τα ανθρώπινα ερυθρά είναι απύρρηνα.

Όπου ήταν δυνατό η απομόνωση των λεμφοκυττάρων έγινε την ίδια ημέρα για την αποφυγή της αιμόλυσης των ερυθρών με την πάροδο του χρόνου. Όταν κάτι τέτοιο ήταν αδύνατο το αίμα φυλασσόταν στους -80°C μέχρι τη στιγμή της επεξεργασίας.

Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος γινόταν αιμοληψία εκ νέου και επιβεβαίωση του αποτελέσματος και στο δεύτερο δείγμα προτού δοθεί η απάντηση.

Σε κάθε περίπτωση το αίμα ως υλικό εξέτασης έχει τις ακόλουθες ιδιότητες:

1. Είναι εύκολο στη λήψη.
2. Μπορεί κάποιος να πάρει αρκετή ποσότητα.
3. Περιέχει την ομάδα της αίμης η οποία αν δεν απομακρυνθεί, αναστέλλει μια σειρά παρακάτω αντιδράσεων.
4. Τα λεμφοκύτταρα τείνουν να δημιουργούν συσσωματώματα με την ακινησία.



5. Τα ερυθρά αρχίζουν να αιμολύονται όταν παραμείνει για περισσότερες από 2 με 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή όταν υφίστανται διαδοχικούς κύκλους παγώματος – ξεπαγώματος.

4.1

4.3 Απομόνωση λεμφοκυττάρων

πρ

4.3.1 Απομόνωση με επιστοιβάση και φυγοκέντρηση σε «φικόλη»

συ

Γενικά

(Π

Το Ficoll ή Biocoll ή Histopaque 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).

κσ

λη

Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των εμπύρηνων κυττάρων από ολικό περιφερικό αίμα ή μυελό. Το αίμα ή ο μυελός επιστοιβάζονται σε ficoll και ακολουθεί φυγοκέντρηση. Μετά τη φυγοκέντρηση προκύπτει η ακόλουθη κατανομή από πάνω προς τα κάτω:

οι

γι'

1. Πλάσμα
2. Στοιβάδα λευκών
3. Ficoll
4. Ερυθρά

ισ

π.

ισ

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. Εάν παρόλα αυτά πρέπει να χρησιμοποιήσουμε παλαιό υλικό τότε φυγοκεντρούμε, απομακρύνουμε το πλάσμα και αντικαθιστούμε με ίσο όγκο PBS. Ανακινούμε και επιστοιβάζουμε σε ficoll.

αι

α

σ

κ

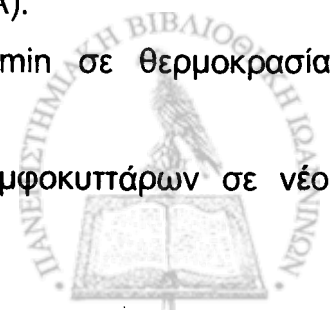
χ

ει

Το ficoll είναι ευαίσθητο στο φως και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) ή στους 4°C.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Ανακινούμε ελαφρά το αίμα (ή μυελό). Επιστοιβάζουμε περίπου 5 ml αίματος (μυελού) σε 4 – 6 ml Ficoll με πολύ προσοχή (το σωληνάριο σε κλίση και αφήνουμε το αίμα στο τοίχωμα λίγο πιο ψηλά από την επιφάνεια του ficoll), σε 15 ml σωληνάριο (DEPC επεξεργασμένο εάν πρόκειται για RNA).
2. Φυγοκεντρούμε στις 2000-2500 rpm για 10-13 min σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Μεταφέρουμε προσεκτικά τη λευκή φάση των λεμφοκυττάρων σε νέο σωληνάριο 15 ml.



4. Προσθέτουμε 8-10 ml PBS και ανακινούμε καλά.
5. Φυγοκεντρούμε στις 2000-2500 rpm για 6-8' στους 4°C.
6. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο PBS, αφήνοντας περίπου 200 με 500 μl.
7. Κάνουμε vortex για να αναδιαλυθεί το ίζημα των κυττάρων στην ποσότητα του PBS που έχει απομείνει.
8. Συνεχίζουμε για απομόνωση DNA ή RNA ή φυλάσσουμε στους -80°C.

4.3.2 Απομόνωση με αιμόλυση

Γενικά

Η διαδικασία της αιμόλυσης χρησιμοποιείται όταν δεν είναι δυνατόν να διαχωρίσουμε τα λεμφοκύτταρα του αίματος με Ficoll λόγω παλαιότητας του δείγματος. Με την αιμόλυση δημιουργούμε συνθήκες πλασμόλυσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων οι οποίες όμως δεν είναι αρκετές για την πλασμόλυση και των λευκών. Η αιμοσφαιρίνη περνά στο υπερκείμενο και στο ίζημα παίρνουμε τα λεμφοκύτταρα. Πλένουμε με Διάλυμα I για απομάκρυνση της αιμοσφαιρίνης (η αίμη μπορεί να δράσει χηλικά και να δεσμεύσει ιόντα Mg^{+2} τα οποία χρειάζεται η Taq πολυμεράση για να δράσει). Όλα τα διαλύματά μας περιέχουν EDTA που δεσμεύει χηλικά τα Mg^{+2} ώστε να παρεμποδίζονται οι νουκλεάσες.

Δείγματα: αίμα και μυελός

Αντιδραστήρια

Διάλυμα I pH 7,4

NH_4Cl 155mM

$KHCO_3$ 10mM

Na_2EDTA 1mM

Ρύθμιση pH με NaOH

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Ετοιμάζουμε τα δείγματα, τα απαραίτητα αντιδραστήρια και υλικά.
2. Τα δείγματα ξεπαγώνονται ή εάν κατεργαστούν αμέσως μένουν 1 ώρα με το αντιπηκτικό σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Μεταφορά του δείγματος (αίμα) σε σωληνάριο 15ml.
4. Αιμόλυση με προσθήκη ddH₂O μεταξύ ίσου και διπλάσιου όγκου. Ξεπλένουμε τα αρχικά φιαλίδια όπου βρισκόταν το αίμα.



5. Φυγοκέντρηση στις 3500 rpm, 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Απόρριψη υπερκείμενου.
6. Πλύσιμο ιζήματος (αποκόλληση και διάλυση) με 10-15ml Διαλύματος I.
7. Φυγοκέντρηση στις 3500 rpm, 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Απόρριψη υπερκείμενου.
8. Επανάληψη των βημάτων (8-9) μέχρι να λευκανθεί το ίζημα (1-3 φορές).
9. Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση, απορρίπτουμε το υπερκείμενο αφήνοντας λίγο μέσα στο σωληνάριο. Κάνουμε ισχυρή ανακίνηση για να διαλυθεί το ίζημα και αφήνουμε 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Συνεχίζουμε για απομόνωση DNA ή RNA ή φυλάσσουμε στους -80°C .

4.4 Απομόνωση DNA

4.4.1 Λύση κυτάρων – πέψη πρωτεϊνών με πρωτεϊνάση K

Γενικά

Η κατεργασία με πρωτεϊνάση K γίνεται για την καταστροφή των πρωτεϊνών του δείγματός μας⁶². Στο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιούμε (Διάλυμα II) περιέχεται TrisHCl για τη ρύθμιση του pH στο 8,2 που είναι ιδανικό για την πρωτεϊνάση, NaCl για την κατακρήμνιση του DNA στην επόμενη φάση, και EDTA για τη χηλική δέσμευση του Mg^{+2} που χρειάζονται οι νουκλεάσες για να δράσουν. Επίσης, συγκέντρωση SDS (Sodium Dodecyl Sulfate - απορρυπαντικό) μεταξύ 0,5 και 1%, ανοίγει τα κύτταρα, αποδιατάσσει πρωτεΐνες και βοηθά την πρωτεϊνάση που δεν επηρεάζεται, να δράσει καλύτερα. Η πρωτεϊνάση λειτουργεί από τους 37 μέχρι και τους 60°C και σε συγκέντρωση έως 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Όσο μεγαλύτερη είναι χρονικά η επώαση τόσο καλύτερη και η απο-πρωτεϊνοποίηση. Η μικρότερη επώαση που θεωρείται ικανοποιητική είναι 2 ώρες στους 55°C .

Αντιδραστήρια

Διάλυμα II pH 8,2	SDS 10%	Πρωτεϊνάση K 10 mg/ml
Tris	10mM	
NaCl	400mM	
Na ₂ EDTA	2mM	
Ρύθμιση pH με HCl		

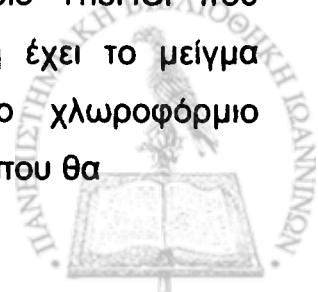


ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. - Στο εναιώρημα των κυττάρων προσθέτουμε ίσο όγκο Διαλύματος II και ανακινούμε καλά με vortex.
2. Προσθέτουμε SDS σε τελική συγκέντρωση 0,5 – 1% από αρχική συγκέντρωση 10% (1/10 του τελικού όγκου).
3. Προσθέτουμε πρωτεΐνάση K (από αρχική συγκέντρωση 10 mg/ml) σε τελική συγκέντρωση 300μg/ml (1/30 του τελικού όγκου).
4. Ανακινούμε με vortex. Επωάζουμε τουλάχιστον 2 ώρες στους 55°C. Επωάζουμε όλη νύκτα στους 37°C για καλύτερα αποτελέσματα.
5. Περιοδικά ανακινούμε με vortex.

4.4.2 Εκχύλιση με φαινόλη – φαινόλη/χλωροφόρμιο**Γενικά**

Η εκχύλιση με φαινόλη χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό διαλυμάτων από πρωτεΐνες και πεπτιδία⁶². Η φαινόλη αποδιατάσσει πρωτεΐνες και πολυπεπτιδία και τα παίρνει στη φάση της. Προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης ώστε να έχουμε επαρκή καθαρισμό του δείγματος χωρίς τον κίνδυνο αφυδάτωσής του. Το μείγμα ανακινείται π.χ. με vortex (έχοντας πάντα υπόψη ότι το DNA σπάει και μηχανικά) ώστε να αναμειχθούν καλά η οργανική (φαινόλη) με την υδατική (δείγμα) φάση και να σχηματισθεί γαλάκτωμα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για τον διαχωρισμό των φάσεων. Η φάση της φαινόλης είναι συνήθως η κάτω φάση. Μεταξύ των δύο φάσεων υπάρχει η μεσόφαση η οποία περιέχει πρωτεΐνες που δεν πέρασαν επιτυχώς στη φάση της φαινόλης. Η απουσία μεσόφασης δηλώνει την επιτυχία του καθαρισμού. Προσοχή απαιτείται στη ρύθμιση του pH της φαινόλης στο 8 (βασικό) περίπου γιατί όταν αυτό είναι όξινο τότε το DNA περνάει και αυτό στη φάση της φαινόλης. Η φαινόλη οξειδώνεται με την πάροδο του χρόνου (αλλάζει χρώμα και γίνεται ροζ προς κόκκινη) και όταν είναι οξειδωμένη κατακερματίζει το DNA. Για αυτό το λόγο, κατά την παρασκευή της προσθέτουμε υδροξυκινολίνη η οποία εμποδίζει την οξείδωσή της. Επιπλέον φροντίζουμε πάντα το μπουκάλι που φυλάσσεται η φαινόλη να είναι σκοτεινό, στο ψυγείο και πάντα η φάση της φαινόλης να καλύπτεται από υδατική φάση (συνήθως το ίδιο TrisHCl που χρησιμοποιήθηκε για τη ρύθμιση του pH της. Ευρεία χρήση έχει το μείγμα φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1). Το χλωροφόρμιο βοηθάει στην πλήρη απομάκρυνση λιπιδίων και ιχνών φαινόλης (που θα



μπορούσαν να αναστείλουν ένζυμα όπως την Taq πολυμεράση) από την υδατική φάση ενώ η ισοαμλική αλκοόλη στον σαφή διαχωρισμό των φάσεων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης και ανακινούμε (ελαφρό vortex) για σχηματισμό γαλακτώματος.
2. Φυγοκεντρούμε για 12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στις 12000 rpm για σωληνάρια μέχρι 2 ml ή στις 3500 rpm για σωληνάρια των 15 ml.
3. Μεταφέρουμε προσεκτικά την υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο σωληνάριο. (όταν η μεσόφαση μας δυσκολεύει μπορούμε να την απορρίψουμε πριν τη συλλογή της υδατικής φάσης).
4. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 2 και 3, χρησιμοποιώντας μείγμα φαινόλης/χλωροφ./ισοαμυλ. μέχρι να μην υπάρχει ορατή μεσόφαση.

4.4.3 Κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη

Γενικά

Η κατακρήμνιση με αιθανόλη είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος συγκέντρωσης του DNA σε ίζημα. Το DNA είναι αδιάλυτο στην αιθανόλη και δημιουργεί ιζήματα σχετικά μεγάλης καθαρότητας (μπορεί επίσης να περιέχουν RNA ή αλάτι) σ' αυτή, αντίθετα με τις πρωτεΐνες⁶². Στην υπάρχουσα υδατική φάση (πρέπει να έχει κατιόντα) προσθέτουμε 2 ως 2.5 όγκους παγωμένη απόλυτη αιθανόλη. Επωάζουμε για ορισμένο χρόνο σε χαμηλή θερμοκρασία (πάγο, -20°C ή -80°C) ανάλογα με την ποσότητα του DNA και την καθαρότητά του. Εάν έχουμε μικρή ποσότητα και καθαρό DNA τότε σίγουρα χρειάζεται να προσθέσουμε κατιόντα για να αυξήσουμε την ιονική ισχύ του διαλύματος, ειδικά αν η υδατική φάση δεν έχει κατιόντα από προηγούμενες κατεργασίες. Τα μονοσθενή κατιόντα χρησιμοποιούνται ευρέως, ειδικά αυτά του Νατρίου. Συνήθως προσθέτουμε 1/10 του όγκου της υδατικής φάσης από :

ή 3M CH₃COONa pH 5.2

ή 5M NaCl

ή LiCl₂

ή 1/2 του όγκου 7.5M CH₃COONH₄ (Τα οξικά εξατμίζονται εύκολα).



ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Όταν έχουμε λίγο και καθαρό DNA, προσθέτουμε 1/10 του όγκου της υδατικής φάσης 3M CH₃COONa pH 5,2.
2. Προσθέτουμε 2 έως 2,5 όγκους απόλυτης παγωμένης αιθανόλης και ανακινούμε με vortex.
3. Εάν κατακρημνιστεί DNA (ίζημα ή «συννεφάκι») τότε μπορούμε να προχωρήσουμε αμέσως. Επωάζουμε για τουλάχιστον μισή με μία ώρα στους -20 ή στους -80°C.
4. Φυγοκεντρούμε στους 4°C, για 15' στη μέγιστη ταχύτητα (14000 rpm, για 1,5-2 ml σωληνάρια ή 7000 rpm για σωληνάρια 15 ml). Τοποθετούμε τα σωληνάρια έτσι ώστε να είναι εμφανής η θέση που θα σχηματιστεί το ίζημα ακόμα και αν αυτό είναι αόρατο.
5. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε 500 μl (ή 5 ml για 15 ml σωληνάρια) 75-80% EtOH και κάνουμε ισχυρό vortex.
6. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 4.
7. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε το ίζημα.
8. Αναδιαλύουμε το ίζημα στην κατάλληλη, ανάλογα με τον όγκο του, ποσότητα (προθερμασμένου) ddH₂O ή T.E. (10 mM TrisHCl pH 8, 1mM EDTA).
9. Επωάζουμε για λίγη ώρα στους 55°C μέχρι την πλήρη αναδιάλυση.
10. Προσθέτουμε 2 μl RNAase A (10mg/ml). Επωάζουμε στους 37°C για 30 – 60 min.
11. Εκχυλίζουμε με φαινόλη αφού αυξήσουμε τον όγκο με T.E. προσθέτοντας και 1/10 του τελικού όγκου NaCl 4M.
12. Κατακρημνίζουμε με Αιθανόλη. Φυλάσσουμε στους -20°C.

4.5 Απομόνωση ολικού RNA**Γενικά**

Χρησιμοποιούμε μείγμα όξινης φαινόλης και (υδροχλωρικής) γουανιδίνης για την απομόνωση ολικού RNA καθαρού από DNA από ιστούς, κύτταρα ή άλλα υγρά⁶³. Το μείγμα χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με 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 πιππέτες μας πρέπει να έχουν υποστεί κατεργασία με DEPC το οποίο καταστρέφει τις RNAσες.

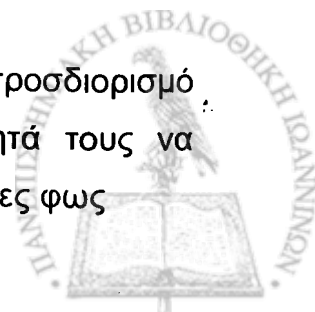
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Σε DEPC σωληνάριο 1,5 – 2 ml για κάθε 10^6 περίπου κύτταρα προσθέτουμε 200 μl μείγματος. Στη συνέχεια προσθέτουμε το 1 / 5 του όγκου του μείγματος, χλωροφόρμιο.
2. Κάνουμε ισχυρό vortex για περίπου μισό λεπτό για να λυθούν όλα τα κύτταρα και να μπορέσει η φαινόλη να απομακρύνει όλες τις πρωτεΐνες του δείγματος. Αφήνουμε 15' στον πάγο για να ολοκληρωθεί η παραπάνω διαδικασία. (Σε αυτό το σημείο είναι δυνατό να κρατήσουμε το δείγμα στους -20°C ή -80°C για αρκετούς μήνες).
3. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στους 4°C στις 13000 rpm.
4. Μεταφέρουμε προσεκτικά την υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο σωληνάριο. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 1 – 3 εάν το η υπερκείμενη φάση που συλλέξαμε δεν είναι διαυγής.
5. Προσθέτουμε ίσο όγκο παγωμένης ισοπροπανόλης (κατακρημνίζει εκλεκτικά το RNA) και ανακινούμε. Αφήνουμε τουλάχιστον μια ώρα στους -20°C .
6. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στους 4°C στις 13000 rpm.
7. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1 ml παγωμένης EtOH 75-80%. Κάνουμε ισχυρό vortex. (Σε αυτό το σημείο είναι δυνατό να κρατήσουμε το δείγμα στους -20°C ή -80°C για αρκετούς μήνες).
8. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στους 4°C στις 13000 rpm. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε το ίζημα.
9. Αναδιαλύουμε το ίζημα στην κατάλληλη, ανάλογα με τον όγκο του, ποσότητα ddH₂O (DEPC), συνήθως 60-120 μl.
10. Φυλάσσουμε σε πάγο αν πρόκειται να συνεχίσουμε αμέσως ή στους -80°C .

4.6 Φωτομέτρηση νουκλεϊκών οξέων

Γενικά

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό νουκλεϊκών οξέων σε υδατικό διάλυμα⁶². Στηρίζεται στην ιδιότητά τους να παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση στα 260nm δηλαδή στο υπεριώδες φως



εξαιτίας των αλληλοεπικαλυπτόμενων ηλεκτρονικών νεφών των αζωτούχων βάσεων τους.

Η σχέση Οπτικής Πυκνότητας και συγκέντρωσης είναι περίπου γραμμική με ένα συντελεστή αναλογίας 40 $\mu\text{g/ml}$ για κάθε μονάδα Οπτικής Πυκνότητας (Optical Density – O.D.). για μονόκλωνο RNA (ή DNA) και 50 $\mu\text{g/ml}$ για δίκλωνο DNA.

Για την εκίμηση της καθαρότητας του δείγματος από προσμίξεις, χρησιμοποιείται άλλη μια μέτρηση στα 280nm και υπολογίζεται ο λόγος των δυο απορροφήσεων (A), δηλαδή A_{260}/A_{280} . Το DNA θεωρείται καθαρό όταν δίνει λόγους μεταξύ 1,7 και 1,9 ενώ το RNA μεταξύ 1,8 και 2,1.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Αραιώνουμε το δείγμα με T.E. σε ορισμένη αναλογία. Π.χ. 1 προς 40.
2. Μετράμε την O.D. στα 260nm και στα 280nm.
3. Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση ανάγοντας στο αρχικό υλικό, πριν την αραιώση και χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο συντελεστή, για παράδειγμα: $A_{260} * \text{αραιώση} * 40\mu\text{g/ml}$.

4.7 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription – RT)

Γενικά

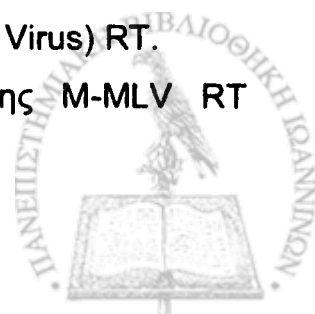
Η αντίστροφη μεταγραφή είναι ένας από τους τρόπους μελέτης που χρησιμοποιείται για να μελετηθεί η έκφραση γονιδίων στο επίπεδο του RNA⁶².

Ειδικά ένζυμα – οι αντίστροφες μεταγραφάσες (Reverse Transcriptases – RT) – χρησιμοποιούνται για τη μεταγραφή του RNA σε DNA (cDNA) ώστε να είναι ευκολότερη η περαιτέρω ανάλυσή του. Τέτοια ένζυμα, που πρώτα ανακαλύφθηκαν σε ρετροϊούς, είναι RNA εξαρτώμενες DNA πολυμεράσες.

Είναι δηλαδή πολυμεράσες που συνθέτουν DNA με μήτρα RNA ξεκινώντας από μικρά τμήματα μονόκλωνου RNA ή DNA, τους λεγόμενους εκκινητές. Αυτοί μπορεί να είναι ειδικοί για τη μήτρα RNA ή μίγμα τυχαίων ολιγονουκλεοτιδίων – συνήθως εξαμερών (random hexamers).

Δυο είναι τα πιο δημοφιλή ένζυμα που χρησιμοποιούνται: η AMV (Avian Myeloblastosis Virus) RT και η M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) RT.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το σύστημα της M-MLV RT (Invitrogen, The Netherlands).



ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Σε τελικό όγκο μέχρι 13,5 μl αναμιγνύονται 500-1000 ng ολικού RNA, με 100 pmoles Random Hexamers (συμπληρώνουμε με H₂O μέχρι τα 13,5 μl).
2. Αποδιατάσσουμε για 4 min στους 70°C και στη συνέχεια τοποθετούμε αμέσως σε πάγο.
3. Προσθέτουμε 4 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα 5X First Strand Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂).
4. Προσθέτουμε 0,5 μl RNaseOUT (ένζυμο, αναστολέας RNA νουκλεασών – αρχική συγκέντρωση 40 U/μl).
5. Προσθέτουμε 1 μl dNTPs (αρχική συγκέντρωση 10 mM έκαστο).
6. Προσθέτουμε 1 μl M-MLV RT (αρχική συγκέντρωση 200 U/μl).
7. Έχοντας φθάσει σε τελικό όγκο 20 μl, επωάζουμε για μια ώρα στους 37°C, ώστε να γίνει η αντίστροφη μεταγραφή και στη συνέχεια 5 min στους 95°C για αποδιάταξη του ενζύμου και υδρόλυση της μήτρας RNA.
8. Φυλάσσουμε το cDNA στους -20°C.

4.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Γενικά

Η μέθοδος PCR (Polymerase Chain Reaction) χρησιμοποιείται για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας δίκλωνου DNA με ταυτόχρονη επιμήκυνση πρωταρχικών τμημάτων (εκκινήτων) και με καλούπια τις δύο συμπληρωματικές του αλυσίδες.

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σχεδιάστηκε και ονομάστηκε "PCR" από τον Mullis και τους συνεργάτες του⁶⁴, παρ'όλο που η αρχή της μεθόδου είχε περιγραφεί με λεπτομέρειες από τον Khorana και τους συνεργάτες του^{65,66} παραπάνω από μια δεκαετία πρωύτερα.

Η χρήση της PCR είχε περιοριστεί μέχρι να γίνει ευρέως διαθέσιμη, θερμικά σταθερή, DNA πολυμεράση⁶⁷.

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 είναι η επιμήκυνση πρωταρχικών τμημάτων (εκκινήτων), βασική για πολλές διαδικασίες όπως η σήμανση και ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης.



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 σε τέτοιες περιοχές συμπληρωματικοί έτσι ώστε η επιμήκυνση που ξεκινά από τον ένα να κατευθύνεται προς τον άλλο. Δηλαδή ο εκκινητής A 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 είναι λογικές και συνοψίζονται στα παρακάτω συστατικά:

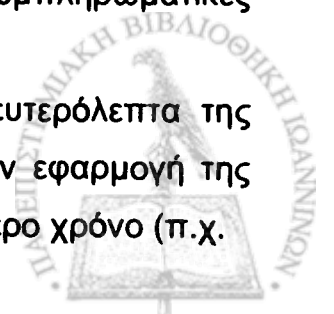
1. Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοσίδια (dNTPs) για προσφορά ενέργειας και νουκλεοσιδίων για τη σύνθεση του DNA.
2. DNA πολυμεράση, θερμικά σταθερή.
3. Εκκινητές με παρόμοιο ποσοστό G+C (γουανοσίνης και κυτοσίνης), μικρή δευτεροταγή δομή και χαμηλή μεταξύ τους συμπληρωματικότητα, ειδικά στο 3' άκρο.
4. Υπόστρωμα δηλαδή δίκλωνο DNA άθικτο και χωρίς παρεμποδιστές όπως απορρυπαντικά, EDTA, φαινόλη.
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 αποτελείται από τρία στάδια που περιγράφονται παρακάτω:

Πρώτο Στάδιο

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 τουλάχιστο τριάντα δευτερόλεπτα της ώρας σε θερμοκρασία 94°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

Στο δεύτερο στάδιο η θερμοκρασία χαμηλώνει, στους 45°C με 60°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

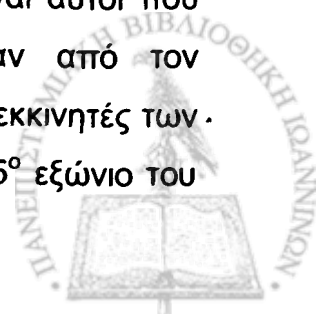
Είναι γνωστό ότι το πιο δημοφιλές, θερμοανθεκτικό, μόριο πολυμεράσης που χρησιμοποιείται - η Taq Πολυμεράση - αποδίδει τα μέγιστα σε θερμοκρασίες από 72°C μέχρι 75°C. Έτσι, το τρίτο στάδιο αποτελείται από μια επώαση περίπου μισού λεπτού της ώρας σε θερμοκρασία 72°C.

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.

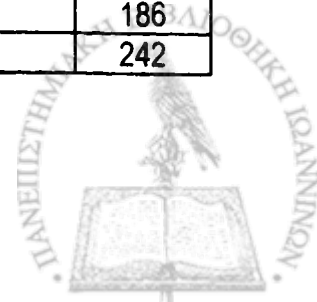
Αυθαίρετα, δίνουμε τα ονόματα FORWARD (πρόσθιος) στον ένα και REVERSE (ανάστροφος) στον άλλο εκκινητή.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι αυτοί που προτείνονται από προηγούμενες μελέτες^{10,59,68}, ή σχεδιάστηκαν από τον συγγραφέα όσον αφορά το γονίδιο *APC*, ενώ για το γονίδιο *MYH* οι εκκινητές των *Al Tassan et al (2002)*¹⁵ (Πίνακας 2). Λόγω μεγάλου μεγέθους το 15^ο εξώνιο του *APC* έχει κατανεμηθεί σε περισσότερες από μια αντιδράσεις PCR.



Πίνακας 2. Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και μήκος προϊόντος PCR (bp).

Εξώνιο	Πρόσθιος (5' - 3')	Ανάστροφος (5' - 3')	Μήκος
Γονίδιο APC			
1	GCATATTAACACAATTCTTCTTAAACGTC	TAAAAATGGATAAACTACAATTAAAAG	317
2	AAATACAGAATCATGTCTTGAAGT	ACACCTAAAGATGACAATTTGAG	212
3	GACCCAAGTGGACTTTTCAGG	ACAATAAACTGGAGTACACAAGG	423
4	TGCTCTTCTGCAGTCTTTATTAGCA	TGAATTTTAATGGATTACCTAGGT	253
5	CTTTTTTTGCTTTTACTGATTAACG	TGTAATTCATTTTATTCCCTAATAGCTC	244
6	GGTAGCCATAGTATGATTATTTCT	CTACCTATTTTTATACCCACAAAC	204
7	AAGAAAGCCTACACCATTTTTGC	GATCATTCTTAGAACCATCTTGC	238
8	ACCTATAGTCTAAATTATACCATC	GTCATGGCATTAGTGACCAG	184
9	AGTCGTAATTTTGTCTTCTAAACTC	GCTTTGAAACATGCACTACGAT	458
10	AAACATCATTGCTCTTCAAATAAC	TACCATGATTTAAAAATCCACCAG	216
10A	GGATTTCAAATAAAACCTAGAC	AAGAAGGTAATCCCCTGTG	173
11	GATGATTGTCTTTTTCCCTTGC	CTGAGCTATCTTAAGAAATACATG	215
12	TTTTTAATGATCCTCTATTCTGTAT	ACCCTGCCTCAAAGAAAAAG	170
13	TTTCTATTCTTACTGCTAGCATT	ATACACAGGTAAGAAATTAGGA	306
14	TAGATGACCCATATTCTGTTTC	CAATTAGGTCTTTTTGAGAGTA	308
15a	GTTACTGCATACACATTGTGAC	GCTTTTTGTCTTCTAACATGAAG	372
15b	AGTACAAGGATGCCAATATTATG	ACTTCTATCTTTTTTCAGAACGAG	347
15c	ATTTGAATACTACAGTGTACCC	CTTGTATTCTAATTTGGCATAAGG	398
15d	CTGCCCATACACATTCAAACAC	TGTTTGGGTCTTGCCCATCTT	382
15e	AGTCTTAAATATTCAGATGAGCAG	GTTTCTCTTCATTATATTTTATGCTA	430
15f	AAGCCTACCAATTATAGTGAACG	AGCTGATGACAAAGATGATAATG	435
15g	CAGACTTATTGTGTAGAAGATACTCC	GCTAAACATGAGTGGGGTCTCC	378
15h	ATCTCCCTCCAAAAGTGGTGC	TCCATCTGGAGTACTTTCCGTG	421
15i	TGGACCTAAGCAAGCTGCAGT	ATCATCCCCCGGTGTA AAC	517
15j	CCCAGACTGCTTCAA AATTACC	GAGCCTCATCTGTACTTCTGC	318
15k	CCCTCCAAATGAGTTAGCTGC	TTGTGGTATAGGTTTTACTGGTG	352
15l	ACCCAACAAAAATCAGTTAGATG	GTGGCTGGTAACTTTAGCCTC	415
15m	ATGATGTTGACCTTTCCAGGG	ATTCTGTAACTTTTTCATCAGTTGC	251
15n	AAAGACATACCAGACAGAGGG	CTTTTTTGGCATTGCGGAGCT	339
15o	AAGATGACCTGTTGCAGGAATG	GAATCAGACGAAGCTTGTCTAGAT	292
15p	CCATAGTAAGTAGTTTACATCAAG	AAACAGGACTTGTACTTGAGGA	411
15q	CAGCCCTTCAAGCAAACATG	GAGGACTTATTCCATTTCTACC	373
15r	CAGTCTCCTGGCCGAAACTC	GTTGACTGGCGTACTAATACAG	362
15s	TGGTAATGGAGCCAA TAAAAAGG	TGGGAGTTTTCGCCATCCAC	302
15t	TGTCTCTATCCACACATTTCGTC	ATGTTTTTCATCCTCACTTTTTGC	307
15u	GGAGAAGAACTGGAAGTTCATC	TTGAATCTTTAATGTTTGGATTTCG	402
15v	TCTCCACAGGTAATACTCCC	GCTAGA AACTGAATGGGGTACG	276
15w	CAGGACAAAAATAATCCTGTCCC	ATTTTCTTAGTTTCATTCTTCCTC	342
Εκκινητές για RT-PCR			
IVS9+5	ATGAAACAGCCAGTGTTTTGAG	CCTTTCATAGAGCATAGCGTAG	715
Γονίδιο MYH			
7	GGGACTGACGGGTGATCTCT	TTGGAGTGCAAGACTCAAGATT	186
13	AGGGCAGTGGCATGAGTAAC	GGCTATTCCGCTGCTCACTT	242



Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή ώστε οι εκκινητές να υβριδίζονται σε ικανή απόσταση από τα εξώνια και τις περιοχές σύνδεσης με εσώνια για να είναι δυνατός ο έλεγχος αυτών των περιοχών για μεταλλάξεις.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για την προετοιμασία των αντιδράσεων PCR χρησιμοποιήθηκαν δυο ξεχωριστά ενζυμικά συστήματα με γνώμονα τη μέγιστη απόδοση σε κάθε περίπτωση. Αυτά ήταν το σύστημα Taq polymerase της Invitrogen (The Netherlands) και το σύστημα Optimase Polymerase της Transgenomic Inc. (USA).

Για τον υπολογισμό της θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές προσεγγίσεις για κάθε σύστημα, ανάλογα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (μ =μήκος εκκινητή σε νουκλεοτίδια):

$$T_m = 69,30 + (0,41 \times GC\%) - (650/\mu) \quad \text{Invitrogen}$$

$$T_m = 63,72 + (0,41 \times GC\%) - (600/\mu) \quad \text{Transgenomic}$$

Για τις αντιδράσεις με Invitrogen χρησιμοποιήθηκε θερμοκρασία αναδιάταξης το πολύ 4°C χαμηλότερη από την χαμηλότερη T_m μεταξύ των δυο εκκινητών. Για τις αντιδράσεις με Transgenomic χρησιμοποιήθηκε θερμοκρασία αναδιάταξης 2-3°C υψηλότερη από το μέσο όρο των T_m του εκάστοτε ζεύγους εκκινητών.

Στις περιπτώσεις εκείνες που η διαφορά των T_m μεταξύ των εκκινητών ήταν μεγαλύτερη από 3°C χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο κυκλοποίησης "touchdown". Σε αυτό το πρωτόκολλο η θερμοκρασία αναδιάταξης στους αρχικούς κύκλους (10-15) είτε παραμένει υψηλή περίπου στα επίπεδα του υψηλότερου T_m είτε ξεκινώντας από εκεί φθίνει σε κάθε κύκλο μέχρι να πέσει στα επίπεδα του χαμηλότερου T_m . Έτσι, στους πρώτους κύκλους έχουμε μόνο αριθμητική αύξηση μονόκλωνου προϊόντος που συντίθεται από τον εκκινητή με το υψηλότερο T_m .

Όταν η θερμοκρασία αναδιάταξης έρθει στα επίπεδα του χαμηλότερου T_m τότε αρχίζει η σύνθεση προϊόντος και από τον αντίστοιχο εκκινητή και η αύξηση είναι γεωμετρική. Ήδη όμως τα ειδικά προϊόντα από την αριθμητική αύξηση των αρχικών κύκλων έχουν πλεονέκτημα με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται υψηλή ειδικότητα στο τελικό προϊόν, παρόλο που οι εκκινητές διαφέρουν σημαντικά στα T_m τους. Τα πρωτόκολλα κυκλοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:



Απλή PCR

95°C	5 min	} 35 κύκλοι
95°C	30 sec	
T _m	30 sec	
72°C	30-60 sec	
72°C	5 min	

Touchdown (TD) PCR

95°C	5 min	} 15 κύκλοι
95°C	30 sec	
(Μέση T _m)+7°C	30 sec	
μείωση 0,5°C ανά κύκλο	30-60 sec	
72°C	30-60 sec	
95°C	30 sec	} 20 κύκλοι
T _m	30 sec	
72°C	30-60 sec	
72°C	30-60 sec	
72°C	5 min	

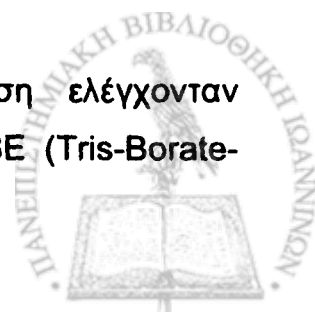
Για κάθε ενζυμικό σύστημα ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά οι αντιδράσεις προετοιμάστηκαν ως εξής:

	<u>Invitrogen</u>	<u>Transgenomic</u>
10X PCR buffer	5,0 μl	5,0 μl
dNTPs (10 mM έκαστο)	1,0 μl	1,0 μl
MgCl ₂	1,5 μl (50mM)	3,0 μl (25mM)
Πρόσθιος εκκινητής (10 μM)	1,5 μl	2,0 μl
Ανάστροφος εκκινητής (10 μM)	1,5 μl	2,0 μl
Πολυμεράση	0,3 μl (5Uμl ⁻¹)	0,8 μl (2,5Uμl ⁻¹)
DNA	50 – 100 ng	
Όγκος αντίδρασης	50 μl	

Σε κάθε αντίδραση εκτός των δειγμάτων υπό εξέταση συμπεριλαμβανόταν αρνητικός μάρτυρας (νερό – όχι DNA) και θετικός μάρτυρας (DNA με γνωστή μεταλλαγή).

Η προετοιμασία των αντιδράσεων έγινε κάθε φορά σε πάγο ώστε να αποφευχθούν παράπλευρες μη ειδικές αντιδράσεις της πολυμεράσης από κακό υβριδισμό των εκκινητών στη θερμοκρασία δωματίου. Οι αντιδράσεις παρέμειναν στον πάγο μέχρι η πλάκα του θερμικού κυκλοποιητή να φθάσει τη θερμοκρασία της αρχικής αποδιάταξης και στη συνέχεια τοποθετούνταν στο μηχάνημα για την έναρξη της κυκλοποίησης («θερμή έναρξη»). Σε κάθε περίπτωση δεν χρησιμοποιήθηκε παραφινέλαιο για την κάλυψη των αντιδράσεων γιατί κάτι τέτοιο είναι ασύμβατο με τη στήλη ανάλυσης της dHPLC. Για αυτό το λόγο οι κυκλοποιητές που χρησιμοποιήθηκαν είχαν θερμαινόμενο καπάκι.

Μετά το τέλος της PCR, 4 μl από κάθε αντίδραση ελέγχονταν ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα αγαρόζης 2% σε διάλυμα 1X TBE (Tris-Borate-EDTA).



4.9 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Γενικά

Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο και επομένως θα 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 αγαρόζης⁶².

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 :

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

% Αγαρόζης στο πήκτωμα	Καλός διαχωρισμός γραμμικών DNA (Kb)
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

3. **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, από το βαθμό υπερελικώσεως της μορφής I και από τη συγκέντρωση του EtBr. Για τα περισσότερα δείγματα της μορφής I, η κρίσιμη συγκέντρωση EtBr κυμαίνεται από 0,1 ως 0,5 μg/ml.



4. **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 αгарόζης 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 πενταπλάσια ή 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.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Παρασκευή πηκτώματος

Για πήκτωμα X % ζυγίζουμε:

$(X/100) \cdot V$ gr αгарόζης.

V ml (το πολύ 1X) TBE (διάλυμα ηλεκτροφόρησης).

Βράσιμο. Αφήνουμε να κρυώσει γύρω στους 55°C.

Προσθέτουμε EtBr από αρχική συγκέντρωση 10 mg/ml σε τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml.

Τοποθετούμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης

Παρασκευή 5X TBE

Για 1 lt: 121,14 gr Tris

51.35 gr Boric Acid

3.72 gr EDTA

Βάζουμε νερό μέχρι το 1t (800ml, διαλύουμε με μαγνήτη και ογκομετρούμε μέχρι τα 1000ml).

Φιλτράρουμε με φίλτρο Whatman.



4.10 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Γενικά

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό DNA μορίων με βάση το μέγεθός τους. Στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο και επομένως θα 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 πήκτωμα οργανικών πολυμερών όπως το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αποτελείται από μακριές αλειφατικές αλυσίδες (πολυμερή) ακρυλαμίδης που συνδέονται εγκάρσια μεταξύ τους με παρεμβαλλόμενα μόρια N-N μεθυλενο Bis - ακρυλαμίδης (MBA)⁶².

Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, γίνεται με υπερθειικό αμμώνιο (APS) και TEMED. Ο πολυμερισμός γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και ξεκινάει με άτομα οξυγόνου που παράγονται από το APS.

Η δομή που προκύπτει μετά τον πολυμερισμό είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα του οποίου η διάμετρος και η ελαστικότητα των πόρων είναι αντίστροφα ανάλογη της συγκέντρωσης ακρυλαμίδης και Bis-ακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του καθώς και του λόγου των συγκεντρώσεων αυτών. Πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση είναι μαλακά και επειδή έχουν μεγάλους πόρους χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μορίων DNA μεγάλου μοριακού βάρους. Πηκτώματα με συγκέντρωση ακρυλαμίδης μεγαλύτερη από 10% είναι σκληρότερα και περισσότερα εύθραυστα, έχουν μικρούς πόρους και χρησιμοποιούνται για διαχωρισμό μορίων DNA μικρού μοριακού βάρους.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο στις περισσότερες περιπτώσεις είναι TBE.

Η θέση του DNA στο πήκτωμα μπορεί να προσδιοριστεί με διάφορους τρόπους όπως χρώση EtBr, σήμανση των μορίων με κάποιο ραδιενεργό (π.χ. ³⁵S ή ³²P) και αυτοραδιογραφία του πηκτώματος μετά την ηλεκτροφόρηση.

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

1. **Το μέγεθος του DNA.** Γραμμικά DNA κινούνται με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους.
2. **Το ποσοστό των διαφορετικών βάσεων σε κάθε DNA.**



3. Τη θερμοκρασία στην οποία γίνεται η ηλεκτροφόρηση.
4. Τη συγκέντρωση της ακρυλαμίδης. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίζουμε μεγάλο εύρος μεγεθών DNA.
5. Την ένταση του ρεύματος. Σε χαμηλή τάση (μικρή ένταση) η κινητικότητα των διαφόρων 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 πολυακρυλαμίδης καθώς αυξάνεται η εφαρμοζόμενη τάση.
6. Το ποσοστό του DNA που είναι σε δίκλινη μορφή. Σε γενικές γραμμές τα δίκλινα τμήματα εφόσον έχουν μεγαλύτερο αρνητικό φορτίο κινούνται ταχύτερα από τα μονόκλινα. Επιπλέον το παραπάνω ποσοστό έχει να κάνει και με τη στερεοδιάταξη του μορίου η οποία επίσης επηρεάζει την κινητικότητα. Σε περιπτώσεις που όλα τα μόρια πρέπει να είναι μονόκλινα όπως για παράδειγμα στην αλληλούχιση, τότε χρησιμοποιείται στο πήκτωμα αποδιατακτικός παράγοντας που συνήθως είναι ουρία.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Όλα τα πηκτώματα που παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος αυτής της εργασίας, ήταν μη αποδιατακτικά και είχαν τα εξής χαρακτηριστικά :

Μήκος:	10 cm	Acryl.:	6% (τελική)
Πλάτος:	10 cm	Acr. / MBA:	30% (29 / 1) (αρχική)
Πάχος:	0,4 mm	APS:	78 μl (από 10%)
Όγκος:	80 ml	TEMED:	20 μl
Μέγιστη Τάση:	190 V		
TBE:	1 X (από 5 X)	Μέγιστη Ένταση:	15 mA
Μέγιστη ισχύς:	25 Watt		

Το πήκτωμα τοποθετείται μεταξύ δύο τζαμιών που απέχουν μεταξύ τους μόλις 0,4 mm με τη βοήθεια ειδικών αποστατών. Οι θέσεις εφαρμογής των δειγμάτων δημιουργούνται χρησιμοποιώντας ειδικά «χτενάκια». Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί χρώση σε διάλυμα EtBr (0,5μg/ml) για 10 λεπτά.

4.11 Αποδιατακτική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης – dHPLC

Γενικά

Η dHPLC (denaturing High Performance Liquid Chromatography) αποτελεί μια επαναστατικά απλή στη σύλληψη εφαρμογή για τον διαχωρισμό και την κλασμάτωση ετερογενών πληθυσμών νουκλεϊκών οξέων με βάση το μήκος, τη σύσταση των βάσεων ή και τα δύο⁵⁷.

Για το λόγο αυτό χρησιμοποιεί χρωματογραφία ανάστροφης φάσης με τη μεσολάβηση ιόντων (ion paired reverse phase chromatography). Αρχικά το DNA αναμιγνύεται με οξεικό τριαιθυλαμμώνιο (TEAA – triethylammonium acetate) και ο αρνητικός σκελετός του συνδέεται με τη θετική κεφαλή (αμώνιο) αυτού του μορίου. Τόσο πιο πολλά μόρια οξεικού τριαιθυλαμμωνίου δεσμεύονται όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος του DNA και όσο περισσότερο δίκλωνο είναι. Στη συνέχεια το σύμπλοκο δεσμεύεται σε υδρόφοβη οργανική στήλη αλκυλιωμένου πολυστυρενίου-διβυνιλβενζενίου μέσω των αλειφατικών αλυσίδων του οξεικού τριαιθυλαμμωνίου. Επομένως, μεγαλύτερη συγγένεια προς τη στήλη έχουν μακριά και δίκλινα μόρια DNA και αυτά δεσμεύονται ισχυρότερα.

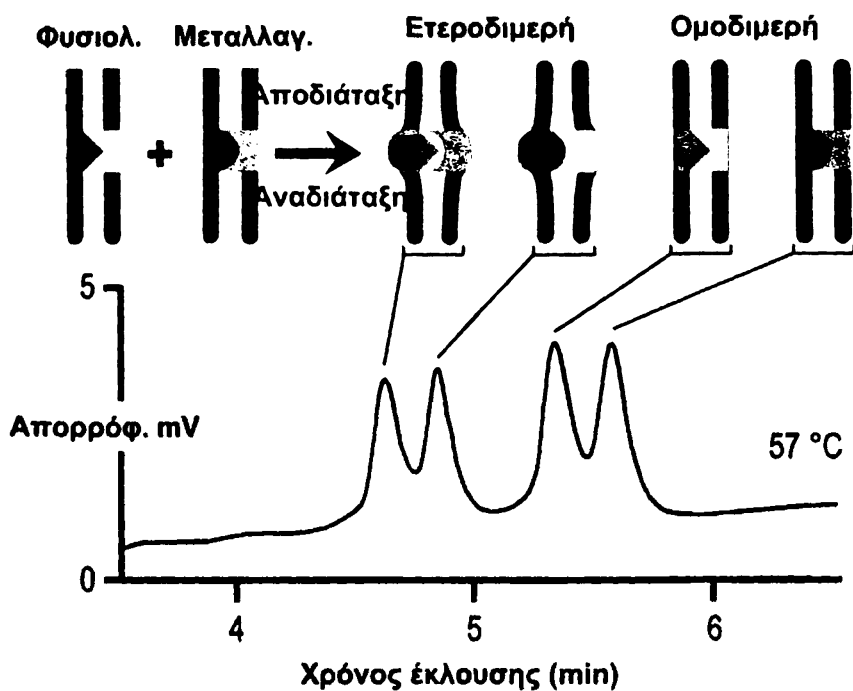
Για τον διαχωρισμό και την κλασμάτωση των δεσμευμένων μορίων, διοχετεύεται στη στήλη αποδεσμευτικός παράγοντας με αυξανόμενη συγκέντρωση. Ο παράγοντας αυτός είναι το ακετονιτρίλιο. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωσή του, πρώτα χρονικά αποδεσμεύονται τα μικρότερα και λιγότερο δίκλινα μόρια DNA. Η ανίχνευση των μορίων που εκλύονται γίνεται από ανιχνευτή υπεριώδους (260nm).

Όταν ο πληθυσμός των μορίων είναι ομοιογενής τότε αυτά εκλύονται όλα στον ίδιο χρόνο και σε διάγραμμα απορρόφησης ως προς το χρόνο έκλουσης εμφανίζεται μια μοναδική κορυφή που αντιστοιχεί σε αυτόν τον πληθυσμό. Όταν ο πληθυσμός είναι ετερογενής, εμφανίζονται παραπάνω από μια κορυφές ανάλογα με τους υποπληθυσμούς των μορίων.

Για την ανίχνευση μεταλλαγών στο προϊόν μιας PCR ακολουθείται η εξής διαδικασία. Το δείγμα αποδιατάσσεται και αφήνεται να επανέλθει αργά σε θερμοκρασία δωματίου έτσι ώστε στη θέση της μεταλλαγής να σχηματιστούν ετεροδιμερή και ομοδιμερή (Εικ. 7). Χρησιμοποιώντας τη θερμοκρασία οι θηλιές που δημιουργούνται στα ετεροδιμερή στη θέση της μεταλλαγής μπορούν να μεγαλώνουν ή να μικραίνουν αναλόγως. Έτσι, τα ετεροδιμερή είναι λιγότερο



δίκλινα από τα αντίστοιχα ομοδιμερή και για αυτό εκλούνται νωρίτερα από τη στήλη⁵⁷. (Εικ. 7).



Εικόνα 7. Αρχή της μεθόδου dHPLC.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για την εφαρμογή της μεθόδου dHPLC χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Wave DNA Fragment Analysis της Transgenomic Inc. (USA) σε συνδυασμό με το λογισμικό WAVE-MakerTM.

Τα προϊόντα της PCR αποδιάταχθηκαν για 10 λεπτά στους 96°C και στη συνέχεια με ρυθμό 1,5°Cmin⁻¹ επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια θερμικού κυκλοποιητή. Περίπου 4-8 μl δείγματος αναλύθηκε σε τουλάχιστον 2 διαφορετικές θερμοκρασίες για μεγιστοποίηση της ευαισθησίας (Πίνακας 3). Οι θερμοκρασίες επιλέχθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού WAVE-MakerTM, του λογισμικού διαδικτύου <http://insertion.stanford.edu/melt.html> ή εμπειρικά. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν διάλυμα A (0,1M TEAA) και διάλυμα B (0,1M TEAA – 25% ACN). Τα δείγματα εκλούστηκαν με μια γραμμική βαθμίδωση διαλύματος B σε χρονικό διάστημα 4,5 λεπτών με σταθερή ροή 0,9 ml/min. Η αρχική συγκέντρωση B επιλέγεται αυτόματα από το λογισμικό WAVE-MakerTM και εξαρτάται από την αλληλουχία και το μήκος του προϊόντος PCR που αναλύεται.

Τα χρωματογραφήματα κάθε δείγματος συγκρίνονται με τα αντίστοιχα από φυσιολογικό δείγμα. Κάθε δείγμα που δεν εμφανίζει μια μοναδική κορυφή θεωρείται πιθανό μεταλλαγμένο και είναι υποψήφιο για απ'ευθείας αλληλούχιση.

Εξώνιο	PCR Tm °C	Ένζυμο	dHPLC Tm °C
1	TD 58-51	Transgenomic	51, 55, 56, 58
2	54	Transgenomic	52, 54
3	TD 62-55	Transgenomic	53, 56, 58
4	TD 59-52	Transgenomic	52, 54, 56
5	54	Transgenomic	51, 53, 57, 58
6	54	Invitrogen	51, 56, 58
7	54	Transgenomic	53, 58
8	54	Transgenomic	54, 59
9	54	Transgenomic	55, 58, 59, 60
10	54	Transgenomic	55, 57, 59
10a	52	Transgenomic	52, 56, 61
11	54	Transgenomic	52, 57, 58
12	53	Transgenomic	51, 56, 57
13	52	Transgenomic	50, 55, 56, 57
14	54	Invitrogen	52, 55, 57
15a	54	Transgenomic	55, 58, 59
15b	54	Transgenomic	55, 57
15c	54	Transgenomic	55, 57, 59
15d	54	Transgenomic	54, 55
15e	52	Transgenomic	52, 55, 57
15f	54	Transgenomic	55, 58
15g	59	Transgenomic	50, 54, 57, 59
15h	59	Transgenomic	58, 59, 60
15i	57	Transgenomic	56, 59
15j	54	Invitrogen	58, 59
15k	57	Transgenomic	54, 59
15l	56	Invitrogen	54, 55, 56
15m	56	Transgenomic	56, 58, 59
15n	57	Transgenomic	56, 57, 58
15o	58	Transgenomic	57, 58
15p	56	Transgenomic	56, 57
15q	56	Transgenomic	58, 59, 60
15r	58	Transgenomic	56, 57, 58
15s	57	Transgenomic	56, 58, 59
15t	TD 59-52	Transgenomic	54, 58, 59
15u	TD 59-52	Transgenomic	52, 56, 57
15v	58	Transgenomic	57, 58, 60
15w	53	Transgenomic	54, 59, 60

Πίνακας 3. Συνθήκες ανάλυσης γονιδίου APC. TD=touchdown PCR.



4.12. Καθαρισμός προϊόντων PCR

Γενικά

Για την αλληλούχιση PCR προϊόντων απαιτείται η απαλλαγή τους από εναπομείναντα αντιδραστήρια και παραπροϊόντα της αντίδρασης ώστε να μην παρεμποδίσουν την αλληλούχιση. Τέτοια είναι οι εκκινητές, τα διμερή ή πολυμερή τους, η πολυμεράση, τα dNTPs. Το υπόστρωμα της αντίδρασης της αλληλούχισης πρέπει να περιέχει μόνο το προϊόν της PCR και τίποτε άλλο.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη στηρίζεται στην εκλεκτική δέσμευση του DNA σε ειδική στήλη υλικού, που έχει βάση το πυρίτιο, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες υψηλής ιονικής ισχύος που δημιουργούνται από χαστροπικά άλατα. Διατηρώντας τις συνθήκες αυτές η κολώνα με το δεσμευμένο DNA (προϊόν PCR) πλένεται με διαλύματα με βάση την αιθανόλη και όλα τα ανεπιθύμητα αντιδραστήρια απομακρύνονται. Τμήματα DNA μικρότερα από 100 bp δε διαθέτουν αρκετή συγγένεια με το υλικό της στήλης και απομακρύνονται και αυτά. Το καθαρό πλέον προϊόν PCR αποδεσμεύεται με την αλλαγή της ιονικής ισχύος (χαμηλή ιονική ισχύς) του διαλύματος έκλουσης (H₂O ή T.E.).

Σε περίπτωση που το επιθυμητό προϊόν βρίσκεται σε τμήμα αγαρόζης (έχει απομονωθεί από πήκτωμα) τότε προηγείται στάδιο διαλυτοποίησης της αγαρόζης σε θερμοκρασία 50°C.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα συστήματα καθαρισμού Concert Rapid PCR Purification και Concert Gel Extraction PCR Purification της Gibco BRL (USA).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή με χρήση μικροφυγοκέντρου.

Concert Rapid PCR Purification

1. Αναμιγνύουμε το προϊόν της PCR με τετραπλάσιο όγκο διαλύματος σύνδεσης H1.
2. Τοποθετούμε στη στήλη και φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό στις 12600 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.



3. Απορρίπτουμε το έκλουσμα. Προσθέτουμε 700 μl διαλύματος πλύσης (Wash Solution). Φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό στις 12600 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Απορρίπτουμε το έκλουσμα. Επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρηση του βήματος 3 για να μη μείνει αιθανόλη από το διάλυμα πλύσης στη στήλη.
5. Προσθέτουμε τουλάχιστον 30 μl H₂O ή T.E. στη στήλη, επωάζουμε για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στις 12600 rpm.
6. Ελέγχουμε ηλεκτροφορητικά το καθαρισμένο προϊόν.

Concert Gel Extraction PCR Purification

1. Ζυγίζουμε τη ζώνη της αγαρόζης.
2. Για πηκτώματα μέχρι 2% συγκέντρωση προσθέτουμε 30 μl διαλύματος διαλυτοποίησης L1 για κάθε 10 mg ζώνης. Για πυκνότερα από 2% χρησιμοποιούμε 30 μl διαλύματος διαλυτοποίησης L1 για κάθε 10 mg ζώνης.
3. Επωάζουμε στους 50°C υπό τακτική ανακίνηση με vortex για τουλάχιστον 15 λεπτά.
4. Τοποθετούμε στη στήλη και φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό στις 12600 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Απορρίπτουμε το έκλουσμα και προσθέτουμε 400 μl διαλύματος L1 στη στήλη. Επωάζουμε για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό στις 12600 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Απορρίπτουμε το έκλουσμα και προσθέτουμε 700 μl διαλύματος πλύσης (Wash solution). Επωάζουμε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό στις 12600 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Απορρίπτουμε το έκλουσμα. Επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρηση του βήματος 3 για να μη μείνει αιθανόλη από το διάλυμα πλύσης στη στήλη.
8. Προσθέτουμε τουλάχιστον 30 μl H₂O ή T.E. στη στήλη, επωάζουμε για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στις 12600 rpm.
9. Ελέγχουμε ηλεκτροφορητικά το καθαρισμένο προϊόν.



4.13 - Αντιδράσεις προσδιορισμού πρωτοδιάταξης – αλληλούχιση

Γενικά

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται η μία αλυσίδα του DNA ως καλούπι για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας, όχι όμως με προδρόμους μόνο τα συνηθισμένα νουκλεοτίδια (τριφωσφορικά δεοξυ- νουκλεοσίδια) αλλά και με καθορισμένη ποσότητα από τα διδεόξυ ανάλογά τους (τριφωσφορικά 2', 3' - διδεοξυνουκλεοσίδια)⁶⁹.

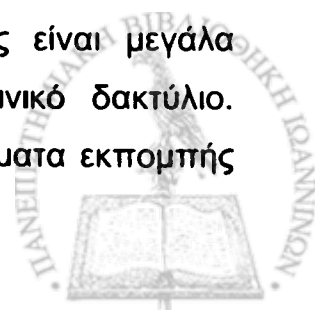
Αυτά διαφέρουν από τα φυσιολογικά νουκλεοτίδια στο ότι δεν έχουν 3' -OH. Έτσι, όταν ενσωματώνονται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA, λειτουργούν σα σημεία λήξης, γιατί το άκρο της αλυσίδας δεν έχει πλέον ελεύθερο 3' -OH και έτσι δε μπορεί να προστεθεί εκεί άλλο νουκλεοτίδιο.

Για την όλη διαδικασία απαιτείται ένα πρωταρχικό τμήμα εκκινητής (Primer) που να είναι συμπληρωματικό με ένα τμήμα του καλουπιού. Αυτό είτε συντίθεται χημικά, είτε παράγεται με δράση κάποιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης.

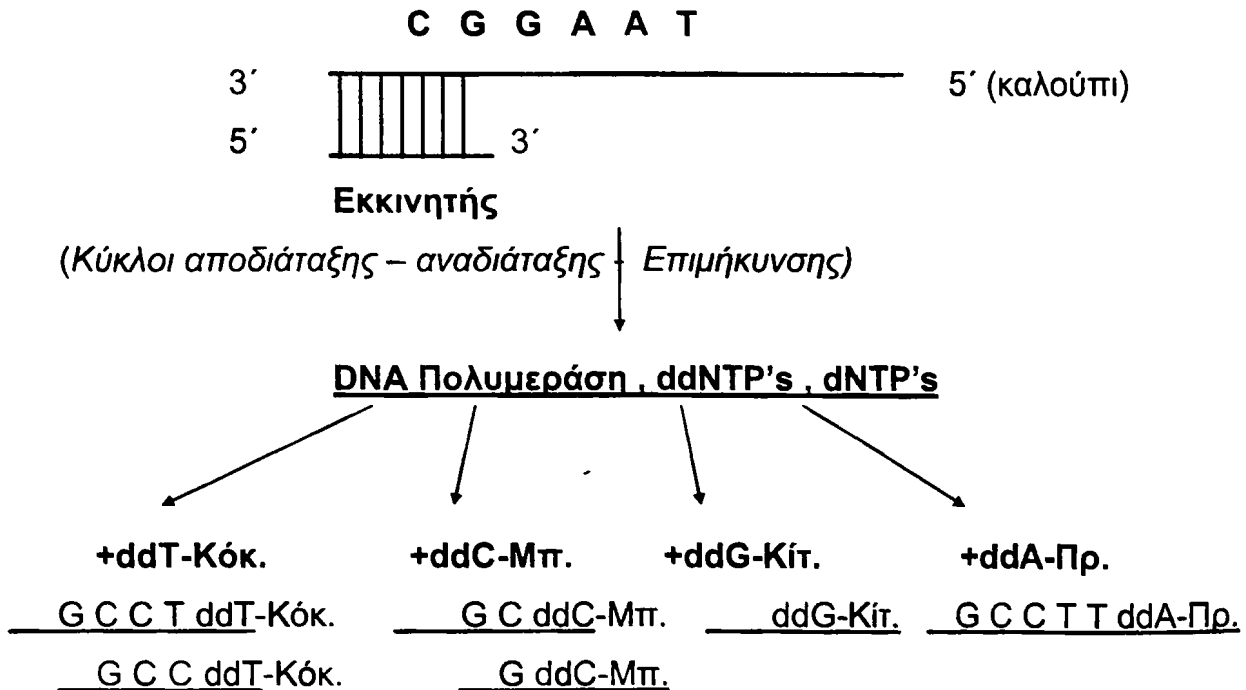
Στο σύμπλεγμα καλουπιού - πρωταρχικού τμήματος προστίθεται DNA πολυμεράση I, μίγμα δεοξυ- και διδεόξυ- νουκλεοτιδίων, ρυθμιστικό διάλυμα με βάση το Tris και ιόντα Mg^{+2} . Ακολουθεί αποδιάταξη και αναδιάταξη του πρωταρχικού τμήματος (εκκινητή) στο καλούπι (PCR προϊόν) και στη συνέχεια πολυμερισμός.

Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού η ενσωμάτωση διδεόξυ- νουκλεοτιδίου οδηγεί στον τερματισμό της σύνθεσης. Τα τέσσερα διδεόξυ- νουκλεοτίδια είναι σήμασμένα με διαφορετική χρωστική το κάθε ένα. Με την επανάληψη του κύκλου αποδιάταξης – αναδιάταξης – επιμήκυνσης αρκετές φορές (20-30 κύκλοι) παράγεται μια σειρά προϊόντων τερματισμού του πολυμερισμού. Αυτά στο 3' άκρο τους είναι σήμασμένα από το διδεόξυ- νουκλεοτίδιο που έχει ενσωματωθεί εκεί.

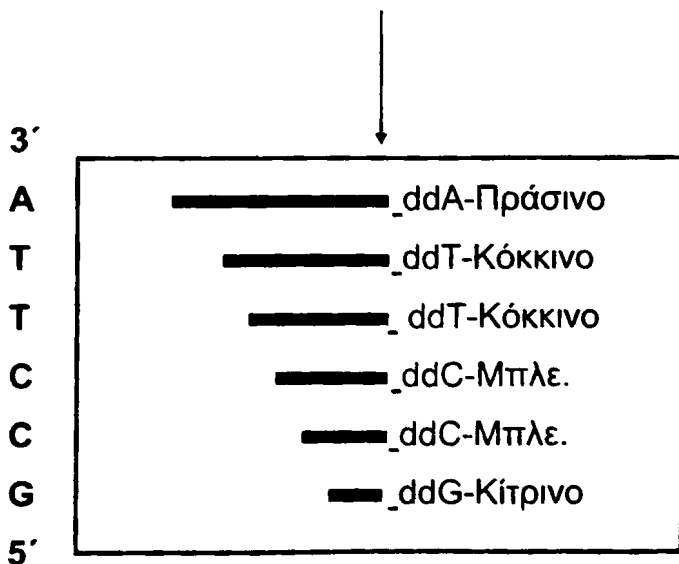
Αυτό φυσικά εξαρτάται από τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων του DNA, που βρίσκονται στο καλούπι στο αντίστοιχο σημείο. Τα προϊόντα τερματισμού διαφέρουν κατά ένα νουκλεοτίδιο το ένα από το άλλο. Στη συνέχεια ηλεκτροφορούμε τα προϊόντα τερματισμού σε αποδιατακτικές συνθήκες (ώστε να διαχωρίζονται μόνο με βάση το μήκος τους) διεγείροντας και ανιχνεύοντας τις χρωστικές τους (Εικ. 8). Οι χρωστικές αυτές είναι μεγάλα οργανικά φθορίζοντα μόρια τα οποία βασίζονται σε πορφυρινικό δακτύλιο. Συνήθως διεγείρονται από πηγή laser και έχουν διαφορετικά φάσματα εκπομπής (π.χ. μπλε, πράσινο, κίτρινο, κόκκινο).



Κατά την ηλεκτροφόρηση λοιπόν τα προϊόντα τερματισμού διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους (αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση) και η ταυτότητά τους καθορίζεται από τη χρωστική τους. Αυτή εξαρτάται από το διδεόξυ- νουκλεοτίδιο στο άκρο τους, το οποίο εξαρτάται με τη σειρά του από το νουκλεοτίδιο που υπήρχε αντικριστά στο καλούπι σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας. Έτσι, διαβάζοντας τη σειρά των χρωμάτων, ουσιαστικά βλέπουμε τη σειρά των βάσεων στο καλούπι, δηλαδή κάνουμε αλληλούχιση (Εικ. 8).



ΗΛΕΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ



Εικόνα 8. Η διαδικασία της αλληλούχισης του DNA κατά Sanger.



ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η αλληλούχιση σε αυτή τη μελέτη έγινε με το σύστημα ABI Prism[®] 310 Genetic Analyzer της Applied Biosystems Inc (USA) σε συνδυασμό με αντιδραστήρια της ίδιας εταιρείας (Big Dye Terminator Reaction Ready mix έκδοση 1.1).

Χρησιμοποιήθηκαν 10 ng καθαρισμένου PCR προϊόντος για προϊόντα μέχρι 250 bp και 20-30 ng για μήκη από 250 – 1000 bp. Για την ευκολότερη ποσοτικοποίηση των PCR προϊόντων φωτογραφήθηκε πήκτωμα αγαρόζης (2%) με γνωστές ποσότητες (10-20-50-80-100-150-200 ng) PCR προϊόντος, που είχε ποσοτικοποιηθεί με φωτομέτρηση. Η φωτογραφία αυτή χρησιμοποιήθηκε ως οδηγός για την εμπειρική εκτίμηση της ποσότητας όλων των προϊόντων που αλληλουχήθηκαν. Έτσι, κάθε προϊόν πριν την αλληλούχιση αναλυόταν σε πήκτωμα αγαρόζης και φωτογραφιζόταν υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες με τη φωτογραφία «οδηγό».

Για την αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά εκείνος ο εκκινητής του προϊόντος, που είχε ποσοστό GC μεταξύ 30-50%, μήκος μεταξύ 19-24 νουκλεοτιδίων, κατά προτίμηση τελευταίο νουκλεοτίδιο στο 3' άκρο G ή C και όχι επαναλήψεις γουανίνης ή κυτοσίνης.

Προετοιμασία αντιδράσεων

1. Η προετοιμασία των αντιδράσεων γίνεται σε πάγο και εφαρμόζεται το πρωτόκολλο «θερμής έναρξης».

2. Προσθέτουμε:

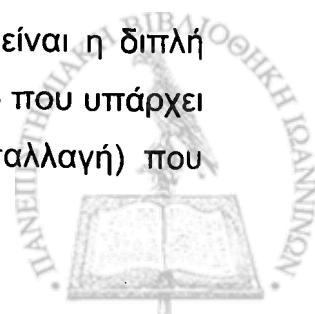
PCR προϊόν καθαρισμένο	x μl	(10-30 ng)
H ₂ O	14,5-x μl	
Εκκινητή (10μM)	0,5 μl	(5 pmoles)
Διάλυμα (5X Sequencing Buffer)	3,0 μl	
Reaction Ready mix έκδοση 1.1	2,0 μl	
<hr/>		
Τελικός όγκος	20,0 μl	

3. Σε θερμικό κυκλοποιητή με θερμαινόμενο καπάκι εφαρμόζεται το ακόλουθο πρωτόκολλο κυκλοποίησης:

96°C 10''	} 25 κύκλοι
50°C 5''	
60°C 4'	



4. Μετά το τέλος των αντιδράσεων ακολουθεί καθαρισμός των προϊόντων τερματισμού από τα διδεόξυ- νουκλεοτίδια που δεν έχουν ενσωματωθεί και μπορεί να λειτουργήσουν ως θόρυβος στην ανάλυση.
5. Επιστοιβάζουμε στήλες Sephadex G50 (αναδιαλυμένου σε T.E.)⁶² σε φυγοκεντρικά σωληνάρια των 2 ml.
6. Φυγοκεντρούμε στα 1800 g για ένα λεπτό. Απορρίπτουμε το έκλουσμα και βάζουμε καθαρό υποδοχέα για τη συλλογή του δείγματος.
7. Αποθέτουμε την αντίδραση στο κέντρο της στήλης G50 και φυγοκεντρούμε στα 1400 g για 2 λεπτά.
8. Λόγω μοριακής διήθησης, στο έκλουσμα παίρνουμε καθαρισμένα μόνο τα προϊόντα τερματισμού.
9. Ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη.
10. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 25 μl απιονισμένο φορμαμίδιο ή TSR (Template Suppressor Reagent) που παρέχεται από την Applied Biosystems (USA).
11. Ακολουθεί αποδιάταξη 2 λεπτών στους 95°C και άμεση τοποθέτηση στον πάγο.
12. Τα δείγματα είναι έτοιμα για αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση στον αναλυτή ABI Prism[®] 310 σε τριχοειδές (capillary) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η διέγερση των χρωστικών γίνεται με laser και η ανίχνευση με καταγραφική μηχανή CCD (Charged Coupled Device).
13. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε πολυμερές POP-6 (Performance Optimized Polymer – 6) με τριχοειδές μήκους 47 cm και διαμέτρου 50 μm. Χρησιμοποιούνται οι συνθήκες “Seq POP6 Rapid 1 ml filter E” που αντιστοιχούν σε σύριγγα πολυμερούς 1 ml, αναρρόφηση 30’’ στα 2 KV και ηλεκτροφόρηση στα 15 KV στους 50°C για 20 με 45 λεπτά ανάλογα με το μήκος του PCR προϊόντος. Για την ονομασία των βάσεων στο λογισμικό Sequencing Analysis (ABI) χρησιμοποιούνται οι αλγόριθμοι (basecaller και mobility file, αντίστοιχα) ABI-CE1 και DT POP6 (BD set-Any Primer). Το αποτέλεσμα είναι ένα χρωματογράφημα με τις διαδοχικές κορυφές των τεσσάρων χρωμάτων που αντιστοιχούν μια σε κάθε βάση. Συνήθως μπορούμε να «διαβάσουμε» ακόμη και την πρώτη βάση μετά τον εκκινήτη, που έκανε την αλληλούχιση.
14. Η κλασική εικόνα της μεταλλαγής (από δείγματα αίματος) είναι η διπλή κορυφή (δύο χρώματα). Αυτή σχηματίζεται από το ένα χρώμα (βάση) που υπάρχει στο ένα χρωμόσωμα και από το άλλο χρώμα (άλλη βάση = μεταλλαγή) που υπάρχει στο άλλο χρωμόσωμα.



4.14. Ταυτοποίηση μεταλλαγών με τη βοήθεια λογισμικού H/Y

Για την ταυτοποίηση μεταλλαγών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Sequencher™ της εταιρείας GeneCodes Inc (USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πρόκειται για λογισμικό στοίχισης αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων.

Κάθε αλληλουχία, που προέκυψε από την αλληλούχιση, στοιχίστηκε με τις φυσιολογικές αλληλουχίες των γονιδίων που αντλήθηκαν από την GenBank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (κωδικοί για APC: DNA-15296801, cDNA-NM_000038, κωδικοί για MYH: DNA- AF527839, cDNA-NM_012222).

Η στοίχιση περιελάμβανε έλεγχο των κορυφών κάθε χρωματογραφήματος μία προς μία τουλάχιστον 2 φορές. Ελέχθηκαν για μεταλλαγές τόσο οι αλληλουχίες των εξωνίων όσο και οι αλληλουχίες των περιοχών σύνδεσης εσωνίων – εξωνίων σε βάθος τουλάχιστον 40 βάσεων μέσα στο εσώνιο.

Για κάθε μεταλλαγή, έγινε αναγωγή σε επίπεδο αμινοξικών καταλοίπων πρωτεΐνης ώστε να αξιολογηθεί η αλλαγή (π.χ βασικό σε αρωματικό) ή ο τερματισμός στην πρωτεϊνοσύνθεση. Στη συνέχεια ονομαζόταν η μεταλλαγή σύμφωνα με τη διεθνή ονοματολογία (den Dunnen JT, Antonarakis SE. Hum Genet. 2001 Jul;109(1):121-4.). Τέλος, γινόταν αναζήτηση στη βιβλιογραφία⁴² αλλά και σε ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων (<http://p53.free.fr/Database/APC.html>) και ώστε να δειχθεί η μοναδικότητα ή όχι της μεταλλαγής.

4.15 Ανίχνευση μεγάλων αναδιατάξεων με MLPA

Γενικά

Η τεχνική MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) επιτυγχάνει ημιποσοτικό προσδιορισμό του αριθμού συγκεκριμένων αλληλουχιών σε ένα δοσμένο ευρύτερο πληθυσμό αλληλουχιών⁷⁰. Έτσι λοιπόν χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του αριθμού των αντιγράφων διαφόρων γονιδίων (π.χ. στο ανθρώπινο DNA για τον προσδιορισμό μεγάλων γενωμικών αναδιατάξεων, μεγαλύτερων από τα συνήθη PCR των 500 bp).

Για ένα δοθέν γονίδιο η μέθοδος χρησιμοποιεί έτοιμους ιχνηθέτες που μπορούν να υβριδιστούν ο καθένας ανά εξώνιο. Όλοι οι ιχνηθέτες έχουν μια κεντρική αλληλουχία περίπου 60 νουκλεοτιδίων απολύτως συμπληρωματικών σε συγκεκριμένη περιοχή του αντιστοίχου εξωνίου αποφεύγοντας περιοχές με γνωστούς πολυμορφισμούς. Στα άκρα τους οι ιχνηθέτες έχουν πανομοιότυπες αλληλουχίες, ενώ περιέχουν και άσχετη με το υπό εξέταση γονίδιο αλληλουχία

μεταβλητού μήκους, έτσι ώστε να διαφέρουν τουλάχιστον κατά 10 νουκλεοτίδια σε μέγεθος όλοι μεταξύ τους.

Έτσι έχουμε έναν πληθυσμό ιχνηθετών διαφορετικού μήκους που «καλύπτουν» νοητά (δεν υβριδίζονται σε όλο το μήκος της) όλη τη γενωμική περιοχή του δοθέντος γονιδίου. Επίσης, χρησιμοποιούνται και ιχνηθέτες που με τον ίδιο τρόπο μπορούν να υβριδίζονται σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος, λειτουργώντας ως μάρτυρες. Οι ιχνηθέτες αυτοί, αφού υβριδιστούν στο υπό εξέταση DNA σε διάλυμα, στη συνέχεια λειτουργούν ως μήτρες για τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό τους από ένα και μοναδικό ζευγάρι εκκινητών που αναδιατάσσονται στα πανομοιότυπα άκρα τους.

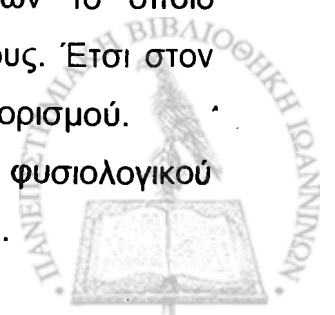
Για την αποφυγή πολλαπλασιασμού και ιχνηθετών που δεν έχουν υβριδιστεί, προηγείται το εξής βήμα: οι ιχνηθέτες είναι «σπασμένοι» σε δύο τμήματα DNA σε σημείο που βρίσκεται μέσα στην περιοχή τους που υβριδίζεται. Έτσι, αφού γίνει ο υβριδισμός, ακολουθεί σύνδεση (ligation) με λιγάση, η οποία συνδέει τα δύο ελεύθερα τμήματα κάθε ιχνηθέτη χρησιμοποιώντας ως μηχανικό υπόβαθρο τη γενωμική αλληλουχία στην οποία έχουν αυτά υβριδιστεί διαδοχικά.

Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται ιχνηθέτες ικανοί να πολλαπλασιαστούν, σε ποσότητες ευθέως ανάλογες με τον αριθμό των αντιγράφων των εξετασθέντων γενωμικών περιοχών, ενώ όσοι δεν υβριδίζονται δεν πολλαπλασιάζονται και δε χρειάζεται να απομακρυνθούν. Τα προϊόντα της multiplex PCR που ακολουθεί διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση ακόμα και σε αгарόζη υψηλής διακριτικότητας, ή αναλυτή φθορίζοντων τμημάτων DNA (όταν έχουν χρησιμοποιηθεί φθορίζοντες εκκινητές) ή γενικά όπου μπορεί να γίνει ημιποσοτική εκτίμηση των προϊόντων της αντίδρασης.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το σύστημα P043 APC MLPA kit της MRC-Holland (The Netherlands) με φθορίζοντες εκκινητές και ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές στον αυτόματο αναλυτή ABI Prism[®] 310 της Applied Biosystems (USA).

Τα δείγματα συνηλεκτροφορούνται με μάρτυρα μεγέθους TAMRA-500 (ABI) που φθορίζει σε άλλο μήκος κύματος. Τα αποτελέσματα φαίνονται σε διάγραμμα της έντασης φθορισμού των προϊόντων ως προς τον χρόνο της ηλεκτροφόρησης, ως κορυφές απορρόφησης σε σχέση το μήκος των προϊόντων το οποίο υπολογίζεται από το λογισμικό με τη βοήθεια του μάρτυρα μεγέθους. Έτσι στον οριζόντιο άξονα έχουμε μήκος σε nt και στον κατακόρυφο ένταση φθορισμού.

Διαφορές στις εντάσεις που ξεπερνούν το 40 με 50% του φυσιολογικού μάρτυρα θεωρούνται αρκετές για να δηλώσουν γενωμική αναδιάταξη.



Τα αποτελέσματα τοποθετούνται σε ειδική εφαρμογή (λογιστικό φύλλο του Microsoft Excel), που παρέχεται από την MRC-Holland. Ο υπολογισμός γίνεται αυτόματα και τα αποτελέσματα προβάλλονται σε διάγραμμα με τον αριθμό των αντιγράφων (2n ο φυσιολογικός) στον κατακόρυφο άξονα και το μήκος των προϊόντων στον οριζόντιο άξονα.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αποδιάταξη DNA και υβριδισμός των ιχνηθετών (SALSA-probes)

1. Σε όγκο 5 μl αποδιατάσσουμε 20-500 ng DNA, επωάζοντας 5 λεπτά στους 98°C (σε θερμικό κυκλοποιητή με θερμαινόμενο καπάκι). Επαναφέρουμε σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Προσθέτουμε 1,5 μl SALSA Probe και 1,5 μl MLPA buffer (διάλυμα υβριδισμού).
3. Αποδιατάσσουμε για ένα λεπτό στους 95°C. Επωάζουμε για 16 περίπου ώρες στους 60°C.

Αντίδραση σύνδεσης (Ligation)

4. Θέτουμε τη θερμοκρασία στους 54°C. Προετοιμάζουμε το μίγμα της σύνδεσης (στον πάγο) ως εξής: 3 μl Ligase-65 buffer A + 3 μl Ligase-65 buffer B + 25 μl H₂O + 1 μl Ligase-65.
5. Προσθέτουμε 32 μl διαλύματος σύνδεσης σε κάθε δείγμα και επωάζουμε για 15 λεπτά στους 54°C, ώστε να γίνει η σύνδεση (ligation)
6. Απενεργοποιούμε τη λιγάση θερμαίνοντας για 5 λεπτά στους 98°C.

Αντίδραση PCR

7. Προετοιμάζουμε το μίγμα της PCR (στον πάγο) ως εξής:

10 X SALSA PCR buffer	4,0 μl
SALSA PCR-primers	2,0 μl
SALSA Enzyme Dilution buffer	2,0 μl
SALSA Polymerase	0,5 μl
H ₂ O	31,5 μl
8. Προσθέτουμε 10 μl από την αντίδραση της σύνδεσης.
9. Σε θερμικό κυκλοποιητή εφαρμόζουμε το παρακάτω πρωτόκολλο κυκλοποίησης με «θερμή έναρξη»: 95°C-3' - (95°C-30'', 60°C-30'', 72°C-60'')x35 - 72°C-20'.



10. Μετά το τέλος της αντίδρασης ηλεκτροφορούμε 10 μl σε πήκτωμα αγαρόζης για ένα γρήγορο έλεγχο, πριν προχωρήσουμε στο επόμενο βήμα.

11. Για την ανάλυση στον ABI Prism[®] 310 προετοιμάζουμε τα δείγματα ως εξής:

PCR προϊόν	0,75 μl
H ₂ O	0,75 μl
TAMRA 500	0,50 μl
Απιονισμένο φορμαμίδιο	12,00 μl

12. Αποδιατάσσουμε για 2 λεπτά στους 95°C και αμέσως τοποθετούμε σε πάγο.

13. Ηλεκτροφορούμε σε αποδιατακτικές συνθήκες στον αναλυτή ABI Prism[®] 310 σύμφωνα με τις οδηγίες της MRC-Holland. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε πολυμερές POP-6 με τριχοειδές μήκους 47 cm και διαμέτρου 50 μm. Χρησιμοποιούνται τροποποιημένες συνθήκες (module) "GS STR POP4 1 ml filter C", που αντιστοιχούν σε σύριγγα πολυμερούς 1 ml, αναρρόφηση 50'' στα 2 KV και ηλεκτροφόρηση στα 15 KV στους 50°C για 55 λεπτά. Φυσιολογικά βλέπουμε 31 κορυφές από 130-400 bp.

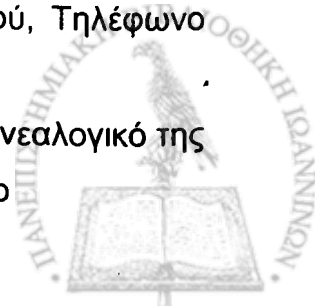
14. Σε κάθε ανάλυση MLPA συμπεριλαμβάνουμε τουλάχιστον 5 φυσιολογικούς μάρτυρες.

15. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης εξάγουμε τα αποτελέσματα από το λογισμικό GeneScan Analysis (Applied Biosystems) και στη συνέχεια τα εισάγουμε στο λογισμικό φύλλο που παρέχεται από την MRC Holland για την αυτόματη ανάλυσή τους.

4.16 Ταξινόμηση και αποθήκευση δεδομένων και αποτελεσμάτων

Όλες οι πληροφορίες που συλλέγονται από τους ασθενείς ταξινομούνται σε πίνακες (Microsoft Excel) για εύκολη πρόσβαση όταν χρειάζεται. Οι πληροφορίες που αποθηκεύονται είναι: Κωδικός, Οικογένεια, Επώνυμο, Όνομα, Έτος γέννησης, Φαινότυπος, CHRPE, Ηλικία διάγνωσης, Υλικό εξέτασης, Ημ/νία Παραλαβής, γενετικό υλικό που απομονώθηκε, Εξώνια που έχουν ελεγχθεί, Εξώνια για έλεγχο, Αποτελέσματα MLPA, Πολυμορφισμοί, Παθογόνες Μεταλλαγές, Απάντηση, Τηλέφωνο επικοινωνίας, Αντίγραφο Κολονοσκόπησης Όνομα ιατρού, Τηλέφωνο ιατρού.

Για κάθε οικογένεια κατασκευάζεται σε ηλεκτρονική μορφή το γενεαλογικό της δέντρο με βάση τις υπάρχουσες πληροφορίες. Αυτό έγινε εφικτό με το



λογισμικό Cyrillic έκδοσης 2.1.3 της Cherwell Scientific Publishing Ltd (UK), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για κάθε ασθενή δημιουργείται ξεχωριστός φάκελος αποθήκευσης στον Η/Υ και εκεί αποθηκεύονται όλα τα αποτελέσματά του. Σε διαφορετικό φάκελο αποθηκεύονται όλες οι φυσιολογικές αλληλουχίες των γονιδίων που εξετάζονται. Για την ονομασία των ηλεκτρονικών αρχείων τηρείται κοινός κώδικας (π.χ. κωδικός ασθενούς – γονίδιο – εξώνιο – εκκινητής αλληλούχισης) έτσι ώστε να είναι εύκολη η ταξινόμηση και η αναζήτησή τους μέσα από το λειτουργικό πρόγραμμα του υπολογιστή.

4.17 Αλγόριθμος εξέτασης ασθενών

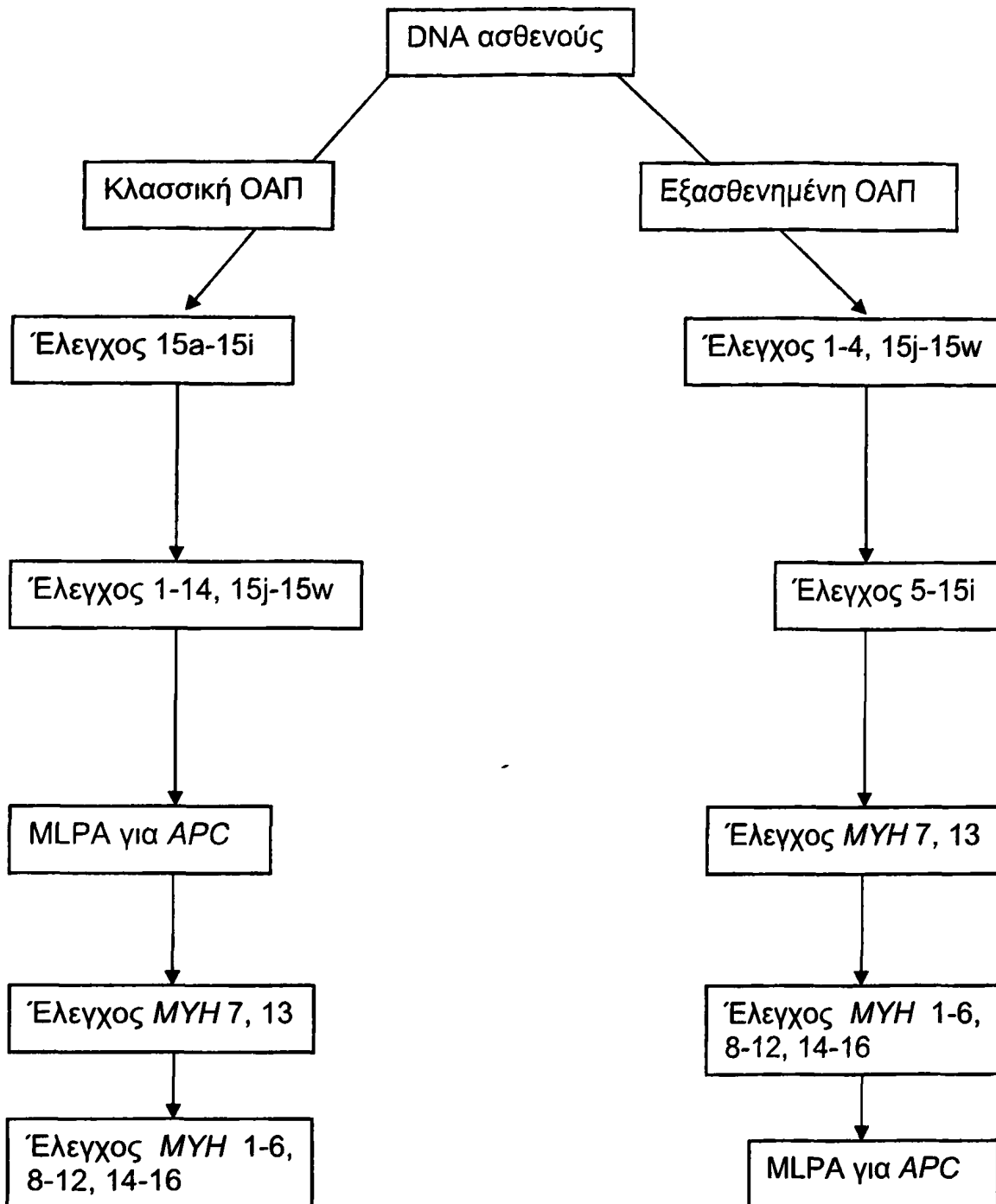
Για την καλύτερη οικονομία χρόνου και αντιδραστηρίων αξιοποιήθηκε η γνώση της σχέσης του φαινότυπου της ΟΑΠ με τη θέση της μεταλλαγής στο APC. Επιπλέον, η εξέταση άρχιζε πάντα από το ασθενές μέλος κάθε οικογένειας.

Αρχικά υπήρξε μια περίοδος στην οποία δεν υπήρχε η δυνατότητα χρήσης της τεχνικής dHPLC και τότε η μόνη μέθοδος ανίχνευσης και ταυτοποίησης μεταλλαγών ήταν η αλληλούχιση. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα σε αρκετούς ασθενείς και ειδικά σε αυτούς που τελικά δεν βρέθηκε παθογόνος μεταλλαγή στο APC να αλληλουχιθεί ολόκληρο το γονίδιο. Αυτό σημαίνει ότι το μήκος αλληλουχίας που αναγνώσθηκε σε αυτούς τους ασθενείς έφθασε τις 12500 βάσεις (περίπου 8500 βάσεις κωδική αλληλουχία και 4000 βάσεις «σύνορα» εξωνίων – εσωνίων).

Όταν στη συνέχεια άρχισε να χρησιμοποιείται το dHPLC ο όγκος της αλληλούχισης μειώθηκε δραστικά με ανάλογη μείωση στο χρόνο της εξέτασης και στην κατανάλωση αντιδραστηρίων.

Σε κάθε περίπτωση όταν είχαμε κλασσικό φαινότυπο ΟΑΠ η εξέταση του γονιδίου ξεκίνησε από την περιοχή συσσώρευσης μεταλλαγών (MCR) δηλαδή από τα PCR προϊόντα 15a έως και 15i. Όταν ο φαινότυπος ήταν εξασθενημένος η εξέταση άρχισε από τα 5' και 3' άκρα του γονιδίου, δηλαδή από τα PCR προϊόντα 1 – 4 και 15j – 15w (Εικ. 9).





Εικόνα 9. Αλγόριθμος μοριακής εξέτασης ασθενών με φαινότυπο Οικογενούς Αδενωματώδους Πολυποδίασης.

Σε περίπτωση που δεν εντοπιζόταν παθογόνος σημειακή μεταλλαγή στο *APC* τότε ανάλογα με τον φαινότυπο ακολουθήσαμε διαφορετική στρατηγική. Δείγματα «*APC* – αρνητικά» με φαινότυπο κλασσικής πολυποδίασης ελέγχονταν με MLPA για μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις. Είναι γνωστό ότι οι μεγάλες αναδιατάξεις στο *APC* προκαλούν κλασσική ΟΑΠ.



Σε περίπτωση δείγματος «APC – αρνητικού» με εξασθενημένο φαινότυπο ΟΑΠ τότε γινόταν έλεγχος του *MYH*. Αυτό θεωρήθηκε σωστό υπό την έννοια της άμεσης σχέσης (σχέση αιτίας και αποτελέσματος) αυτών των μεταλλαγών με τη συσσώρευση σωματικών μεταλλαγών στο *APC* και την εμφάνιση φαινοτύπου ΟΑΠ.

Από την πλευρά μας ελέγχαμε τις δυο πιο κοινές (για καυκάσιους πληθυσμούς) μεταλλαγές αυτού του γονιδίου: Y165C και G382D που αντιστοιχούν σε έλεγχο των εξωνίων 7 και 13 του *MYH* με απ'ευθείας αλληλούχιση. Τα υπόλοιπα εξώνια του *MYH* (1-6, 8-12, 14-16) ελέγχθηκαν σε συνεργασία με την Καθηγήτρια Γενετικής του ανθρώπου από το τμήμα Γενετικής και Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου της Παβίας της Ιταλίας. Ο έλεγχος έγινε έπειτα από αποστολή δειγμάτων DNA στο δικό της εργαστήριο.

Για την επιβεβαίωση της ταυτοποίησης παθογόνου μεταλλαγής ακολουθούσε αλληλούχιση και με τους δυο εκκινητές του αντίστοιχου PCR προϊόντος και επανάληψη της διαδικασίας με νέα αιμοληψία από τον ασθενή. Τότε, ο έλεγχος των συγγενών ήταν πιο εύκολος. Η εξέταση των συγγενών γινόταν απ'ευθείας στη θέση της μεταλλαγής, που είχε εντοπιστεί στο ασθενές μέλος της οικογένειας.

Αρχικά γινόταν κοινοποίηση του αποτελέσματος, θετικού ή αρνητικού, στον ιατρό του ασθενούς. Έπειτα, γινόταν η ανακοίνωση του αποτελέσματος στον ασθενή και όπου κρίθηκε απαραίτητο αυτό έγινε παρουσία ψυχολόγου.



5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα

Σε 25 οικογένειες (σύνολο 105 ατόμων) με φαινότυπο ΟΑΠ εξετάσθηκαν 40 ασθενείς με ΟΑΠ και 53 συγγενείς τους⁷¹⁻⁷⁴. Οι υπόλοιποι 12 συγγενείς δεν εξετάσθηκαν γιατί είτε ανήκαν στις οικογένειες εκείνες που δεν εντοπίστηκε παθογόνος μεταλλαγή στο *APC*, είτε ήταν εξ'αγχιστείας συγγενείς των ασθενών.

Σε 32 από τους 40 ασθενείς – ποσοστό 80% - εντοπίστηκε η υπεύθυνη μεταλλαγή για το φαινότυπο της ΟΑΠ (Πίνακας 4). Στους υπόλοιπους 8 ασθενείς δεν βρέθηκε μεταλλαγή στο *APC*. Τρεις από αυτούς που ανήκαν στην ίδια οικογένεια (αδέρφια) βρέθηκαν να έχουν απενεργοποιημένα και τα δυο αλληλόμορφα του *MYH* από τις μεταλλάξεις Q324X και G382D (Πίνακας 5).

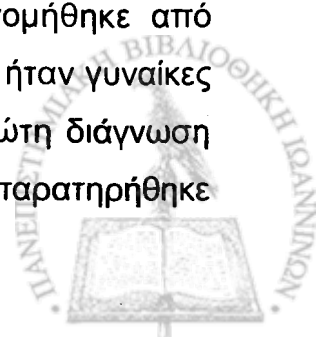
Επιπλέον, μια σειρά πολυμορφισμών του *APC* – μη παθογόνων μεταλλαγών – εντοπίστηκαν σχεδόν σε όλους τους ασθενείς.

Σε επίπεδο οικογένειας η υπεύθυνη παθογόνος μεταλλαγή εντοπίστηκε σε 18 από τις 25 οικογένειες, που εξετάσθηκαν, ποσοστό 72%. Στις 17 από αυτές η μεταλλαγή ήταν στο *APC* ενώ σε μια οικογένεια υπεύθυνες ήταν δυο μεταλλάξεις στο *MYH*.

Ορισμένες από τις παθογόνες μεταλλάξεις εμφανίζονταν σε περισσότερες από μια ασύνδετες μεταξύ τους οικογένειες. Η R564X εντοπίστηκε σε τρεις διαφορετικές οικογένειες, η 1309del5 σε δύο και η Q1045X σε άλλες δυο. Ανάλογα πολλοί από τους πολυμορφισμούς ανιχνεύτηκαν σε περισσότερους του ενός ασθενούς.

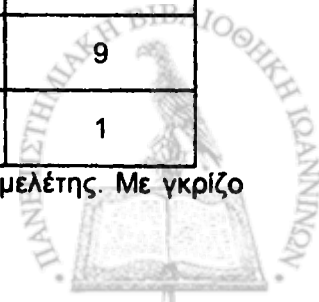
Εντοπίστηκαν αρκετά είδη μεταλλαγών όπως μεταλλάξεις μη νοηματικές (1, 8, 11, 13, 14), παρανοηματικές (19, 22), σιωπηλές (5, 7, 18, 20, 21, 23, 24), πλαισιοτροποποιητικές (6, 10, 12, 15, 16, 17), κακού ματίσματος του mRNA (4) και μια μεγάλη γενωμική έλλειψη (3). Πέντε από τις παθογόνες μεταλλάξεις που ταυτοποιήθηκαν δεν είχαν αναφερθεί ξανά στη διεθνή βιβλιογραφία (Πίνακας 4).

Σε έξι από τις 17 οικογένειες - ποσοστό περίπου 35% - με μεταλλαγή στο *APC*, η μεταλλαγή είχε *de-novo* εμφάνιση. Δηλαδή δεν κληρονομήθηκε από κανέναν από τους γονείς του ασθενούς. Από τους 40 ασθενείς οι 21 ήταν γυναίκες και οι 19 άντρες. Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών κατά την πρώτη διάγνωση της πάθησης ήταν τα 26 έτη. Η μικρότερη ηλικία εμφάνισης που παρατηρήθηκε ήταν σε ένα αγόρι 7 ετών και η μεγαλύτερη σε έναν άντρα 66 ετών.



A/A	Εξώνιο	Παθολόγος	Κωδικόνιο	Νουκλεοτίδιο	Συχνότητα
1.	5	+	R213X	C637T	4
2.		-	intron	IVS5+32C>T	2
3.	6	+		del exon 6-15	1
4.	9	+	intron	IVS9+5G>A	1
5.	11	-	Y486Y	C1458T	8
6.	12	+	STOP @ 535	1577insT	1
7.	13	-	A545A	A1635G	10
8.		+	R564X	C1690T	7
9.		-	intron	IVS13+78A>G	1
10.	15 A	+	H672X	1973delAG	1
11.	15 C	+	R876X	C2626T	2
12.		+	T910X	2601delGA	2
13.		+	R923X	A2767T	5
14.	15 D	+	Q1045X	C3133T	4
15.	15 E	+	V1125X	3180delAAAA	1
16.		+	V1125X	3212delA	2
17.	15 G	+	codon1309del5	3927-3931del5	2
18.	15 I	-	T1493T	G4479A	15
19.		-	E1576D	A4728T	1
20.	15 J	-	G1678G	A5034G	7
21.	15 K	-	S1756S	G5268T	10
22.	15 L	+/-	D1822V	A5465T	19
23.	15 N	-	P1960P	A5880G	9
24.	15 R	-	L2401L	C7201T	1

Πίνακας 4. Μεταλλαγές που εντοπίστηκαν στο APC κατά τη διάρκεια της μελέτης. Με γκρίζο σκιαζονται οι καινούργιες μεταλλαγές.



Εξώνιο	Παθογόνος	Κωδικόνιο	Νουκλεοτίδιο	Συχνότητα
12	+	Q324X	C970T	10
13	+	G382D	G1145A	8

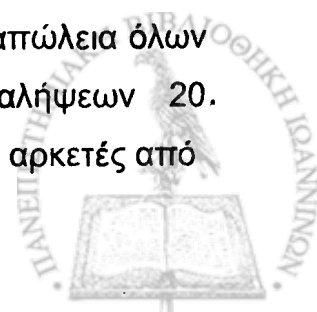
Πίνακας 5. Μεταλλαγές που εντοπίστηκαν στο *MYH* κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Για όσες οικογένειες εντοπίστηκε παθογόνος μεταλλαγή μελετήθηκαν τα ποσοστά της μεταβίβασης στους απογόνους της. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Οικογένεια	Μεταλλαγή	Μεταβίβαση από μητέρα (M) ή από πατέρα (Π)	Σε πόσα παιδιά μεταβιβάστηκε
1.	R923X	M	4 / 4 (100%)
2.	2601delGA	M *	2 / 2 (100%)
3.	R213X	M	2 / 2 (100%)
4.	R564X	Π	2 / 2 (100%)
5.	R564X	Π	2 / 2 (100%)
6.	R213X	M	0 / 2 (0%)
7.	R876X	M	1 / 3 (33%)
8.	Q1045X	M	0 / 2 (0%)
9.	3180del4A	M	0 / 3 (0%)
10.	1973delAG	Π	1 / 2 (50%)
11.	3212delA	M	1 / 2 (50%)
12.	R564X	Π	0 / 2 (0%)
13.	R564X	M	2 / 2 (100%)

Πίνακας 6. Μεταβίβαση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου. Αποτελέσματα από οικογένειες που έχουμε στοιχεία για όλους τους απογόνους. Στη γραμμή 2 δεν υπήρχε δείγμα από τη μητέρα που απεβίωσε όμως λόγω ΟΑΠ και ΚΠΕ.

Τέλος, οι περισσότερες παθογόνες μεταλλαγές οδηγούν στην απώλεια όλων ή των περισσότερων θέσεων δέσμησης β-κατενίνης (επαναλήψεων 20. αμινοξικών καταλοίπων) και αξίνης (Πίνακας 7) του *APC*. Παράλληλα αρκετές από



αυτές αναμένεται να δίνουν αρκετά μεγάλου μοριακού βάρους ατελή πρωτεϊνικά προϊόντα (Πίνακας 7).

Έξωνιο	Κωδικόνιο	Νουκλεοτίδιο	Θέσεις β-κατενίνης	Θέσεις αξίνης	Μοριακό βάρος (kDa)
5	R213X	C637T	-	-	23
6	-	del exon 6-15	-	-	24 ;
9	intron	IVS9+5G>A	-	-	36
12	STOP @ 535	1577insT	-	-	59
13	R564X	C1690T	-	-	62
15 A	H672X	1973delAG	-	-	74
15 C	R876X	C2626T	-	-	96
15 C	T910X	2601delGA	-	-	100
15 C	R923X	A2767T	-	-	102
15 D	Q1045X	C3133T	-	-	115
15 E	V1125X	3180delAAAA	-	-	124
15 E	V1125X	3212delA	-	-	124
15 G	1309del5	3927-3931del5	1	-	312

Πίνακας 7. Μοριακό βάρος των ατελών πρωτεϊνικών προϊόντων που αναμένεται να παράγονται από τις παθογόνες μεταλλαγές του APC και αριθμός θέσεων δέσμευσης β-κατενίνης (για καταστροφή της) και αξίνης. Πεπτίδια με μοριακό βάρος μικρότερο από 60 kDa δεν είναι σταθερά και έχουν πολύ μικρό χρόνο ζωής στο κύτταρο.

Ακολουθεί αναλυτική περιγραφή για τα πιο ενδιαφέροντα αποτελέσματα της μελέτης.

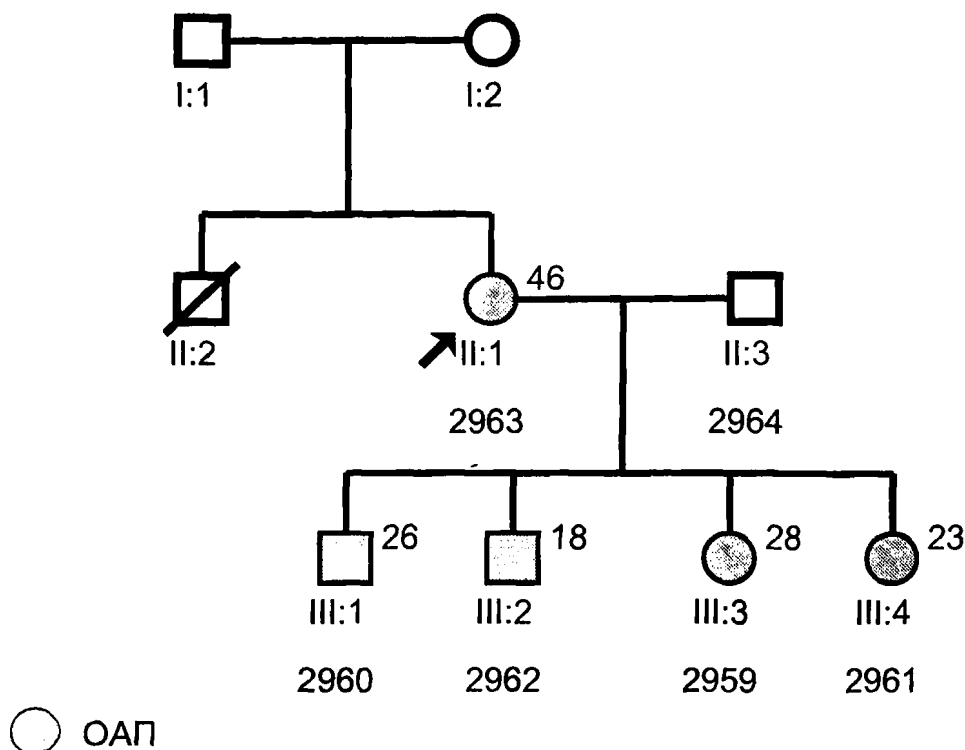


5.2 Αναλυτικά αποτελέσματα

5.2.1 Οικογένειες με καινούργιες (NOVEL) μεταλλαγές

5.2.1.1 Οικογένεια 2963

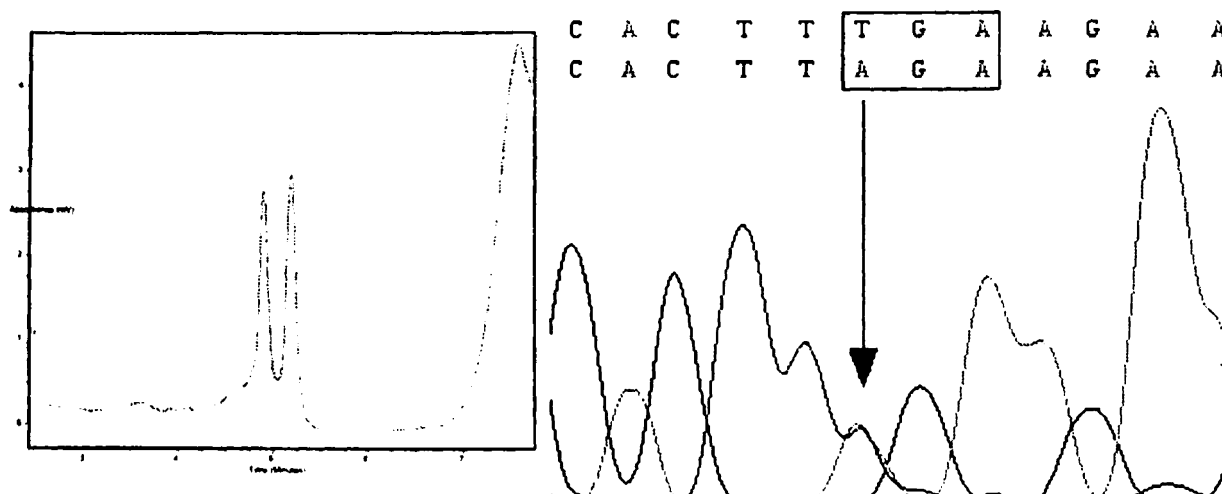
Στην οικογένεια αυτή (Εικ. 10) η μητέρα και τρία από τα τέσσερα παιδιά της (δύο αγόρια και δύο κορίτσια) είχαν το φαινότυπο της ΟΑΠ.



Εικόνα 10. Οικογένεια με την καινούργια R923X APC μεταλλαγή σε *de-novo* εμφάνιση. Το βέλος δείχνει το άτομο από το οποίο άρχισε η εξέταση.

Η διάγνωση στη μητέρα (II:1) έγινε σε ηλικία 31 ετών οπότε και ακολούθησε κολεκτομή με ειλεορθική αναστόμωση. Οι πολύποδες είχαν μέγεθος περίπου 5 χιλιοστών. Αυτό οδήγησε στο έλεγχο και των παιδιών της. Στο III:1 διαγνώσθηκε ΟΑΠ στα 19 οπότε και έγινε κολεκτομή. Στο III:3 η διάγνωση έγινε στα 18, ακολούθησε κολεκτομή ενώ στη συνέχεια εμφανίσθηκε και λίπωμα στο στομάχι. Στο III:4 η διάγνωση έγινε επίσης στα 18 οπότε έγινε κολεκτομή. Οι πολύποδες είχαν μέγεθος περίπου 10 χιλιοστών. Οι γονείς της II:1 είναι φυσιολογικοί σε μεγάλη ηλικία. Ο αδερφός της II:2 πέθανε από άγνωστο καρκίνο. Όταν η οικογένεια προσήλθε για εξέταση το III:2 δεν είχε υποβληθεί ακόμη σε κολονοσκόπηση. Στη μητέρα και στα τέσσερα παιδιά της ταυτοποιήθηκε σε ετεροζυγωτία η καινούργια APC μεταλλαγή A2767T (Εικ. 11) η οποία μετατρέπει

το κωδικόνιο 923 της αργινίνης σε κωδικόνιο τερματισμού (R923X) και αναμένεται να προκαλεί την παραγωγή ημιτελούς πρωτεΐνης. Σύντομα η κολονοσκόπηση στον III:2, επιβεβαίωσε την παρουσία της μεταλλαγής και σε αυτόν. Η μεταλλαγή είναι *de-novo* εφόσον οι γονείς της II:1 είναι φυσιολογικοί σε μεγάλη ηλικία. Επιπλέον, στα πέντε αυτά άτομα ταυτοποιήθηκε επίσης η παρανοηματική μεταλλαγή D1822V, σε ομοζυγωτία στους III:2 και III:3 και σε ετεροζυγωτία στους II:1, III:1 και III:4 αλλά και στον II:3.

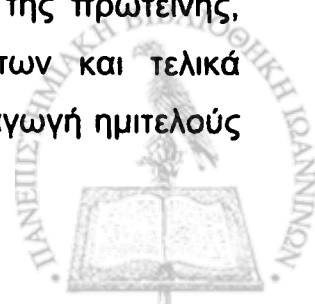


Εικόνα 11. Χρωματογραφήματα dHPLC και αλληλούχησης της μεταλλαγής A2767T (R923X). Επάνω φαίνεται η μεταλλαγμένη αλληλουχία (τερματισμός) του κωδικονίου 923 (σε κουτί) και κάτω η φυσιολογική (αργινίνη).

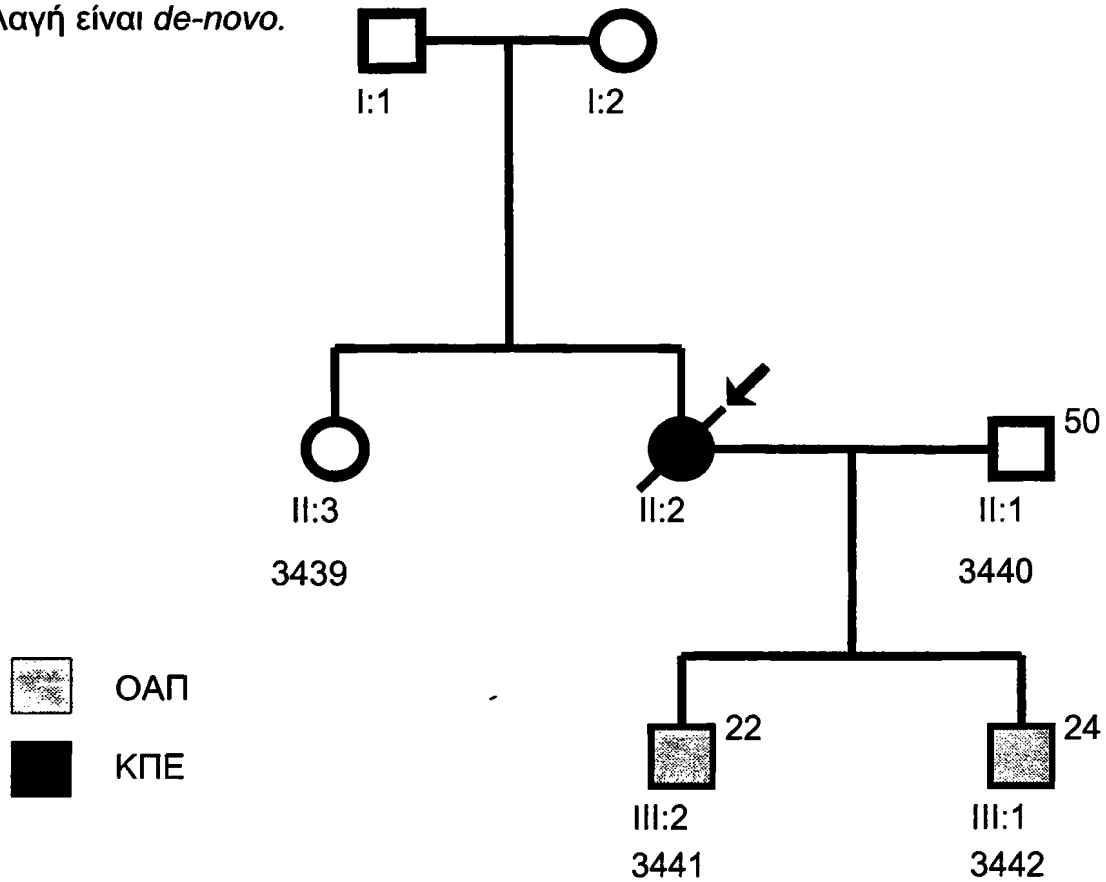
5.2.1.2 Οικογένεια 3441

Στην οικογένεια αυτή (Εικ. 12) η μητέρα και τα δυο παιδιά της είχαν το φαινότυπο της ΟΑΠ. Η μητέρα II:2, διαγνώσθηκε με ΟΑΠ σε ηλικία 35 ετών με πολλαπλούς πολύποδες σε όλο το παχύ έντερο διαμέτρου 4-25 χιλιοστών με μορφή σωληνοειδών αδενωμάτων μέτριας ως βαριάς δυπλασίας. Ακολούθησε σπληνεκτομή και κολεκτομή η οποία αποκάλυψε την παρουσία και αδενοκαρκινώματος. Τελικά η ασθενής απεβίωσε σε ηλικία 36 ετών. Ο III:1 διαγνώσθηκε με ΟΑΠ στα 21 του έτη ενώ ο III:2 στα 19 του και έχει πολύποδες και στο στομάχι.

Και στα δυο παιδιά ταυτοποιήθηκε η πλαισιοτροποποιητική μεταλλαγή 2601delGA (Εικόνα 13) σε ετεροζυγωτία. Πρόκειται για απαλοιφή δυο βάσεων (Γουανίνη, Αδενίνη) η οποία μετατοπίζει το πλαίσιο ανάγνωσης της πρωτεΐνης, δημιουργεί μη αναγνωρίσιμη αλληλουχία αμινοξικών καταλοίπων και τελικά δημιουργία κωδικονίου λήξης στη θέση 910 με συνέπεια την παραγωγή ημιτελούς πρωτεΐνης.

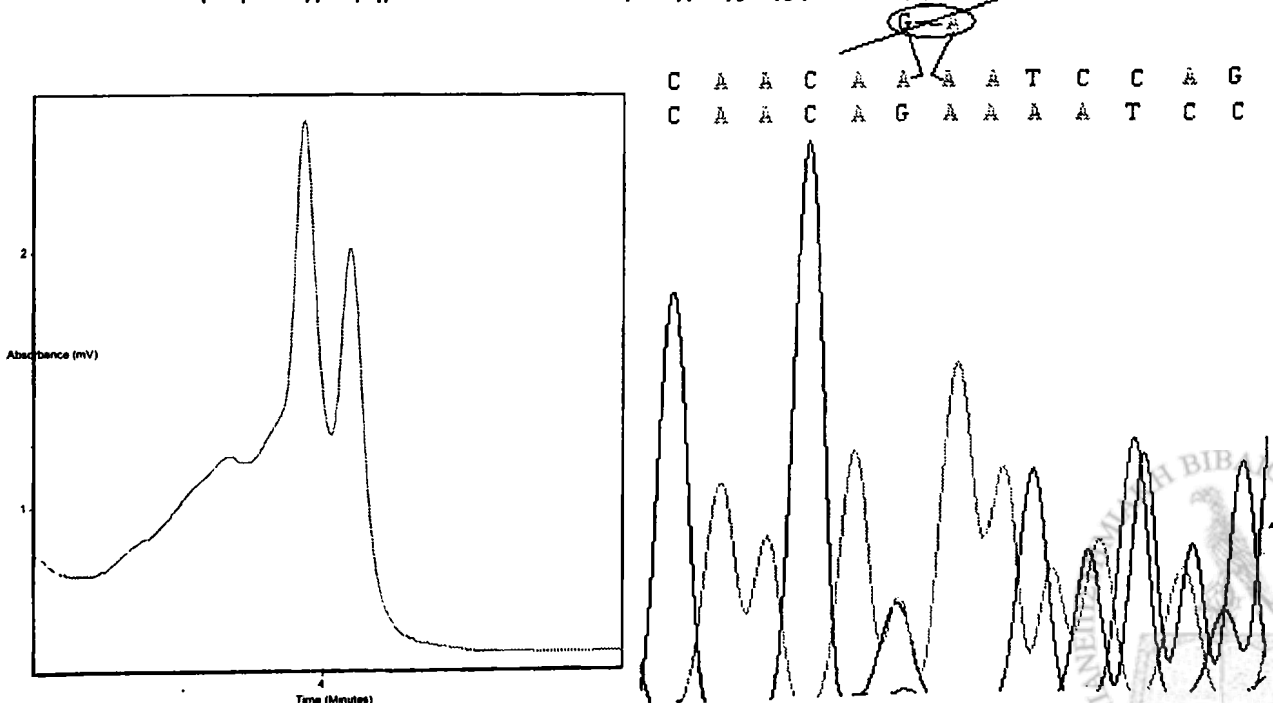


Δείγμα εξέτασης δεν υπήρχε για την II:2. Όμως από τον χαρακτηριστικό φαινότυπό της είναι φανερό ότι θα πρέπει να ήταν φορέας της 2601delGA και να την μεταβίβασε στα παιδιά της. Οι γονείς της II:2 ήταν φυσιολογικοί σε μεγάλη ηλικία, ενώ η αδερφή της (II:3) δεν είχε τη μεταλλαγή. Επομένως και αυτή η μεταλλαγή είναι *de-novo*.



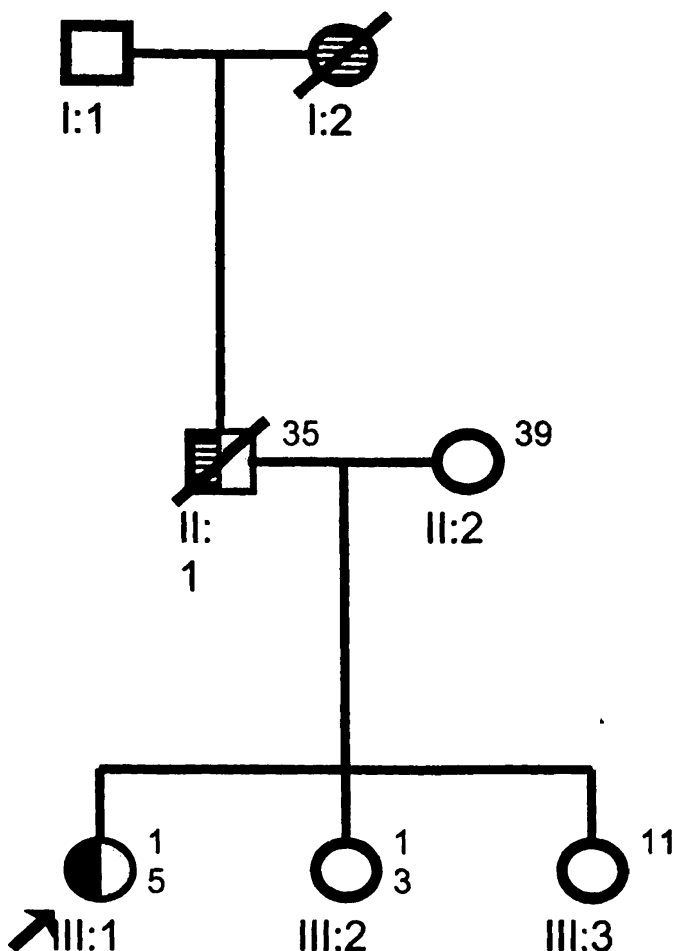
Εικόνα 12. Οικογένεια με την καινούργια APC μεταλλαγή 2601delGA σε *de-novo* εμφάνιση. Το βέλος δείχνει το άτομο από το οποίο ξεκίνησε η εξέταση.

Εικόνα 13. Χρωματογράφημα dHPLC και αλληλούχησης της μεταλλαγής 2601delGA.






5.2.1.3 Οικογένεια 7552

Στην οικογένεια αυτή έχουμε μεταβίβαση ΟΑΠ σε τρεις συνεχόμενες γενιές, και ΚΠΕ σε δύο (Εικ. 14)



7552

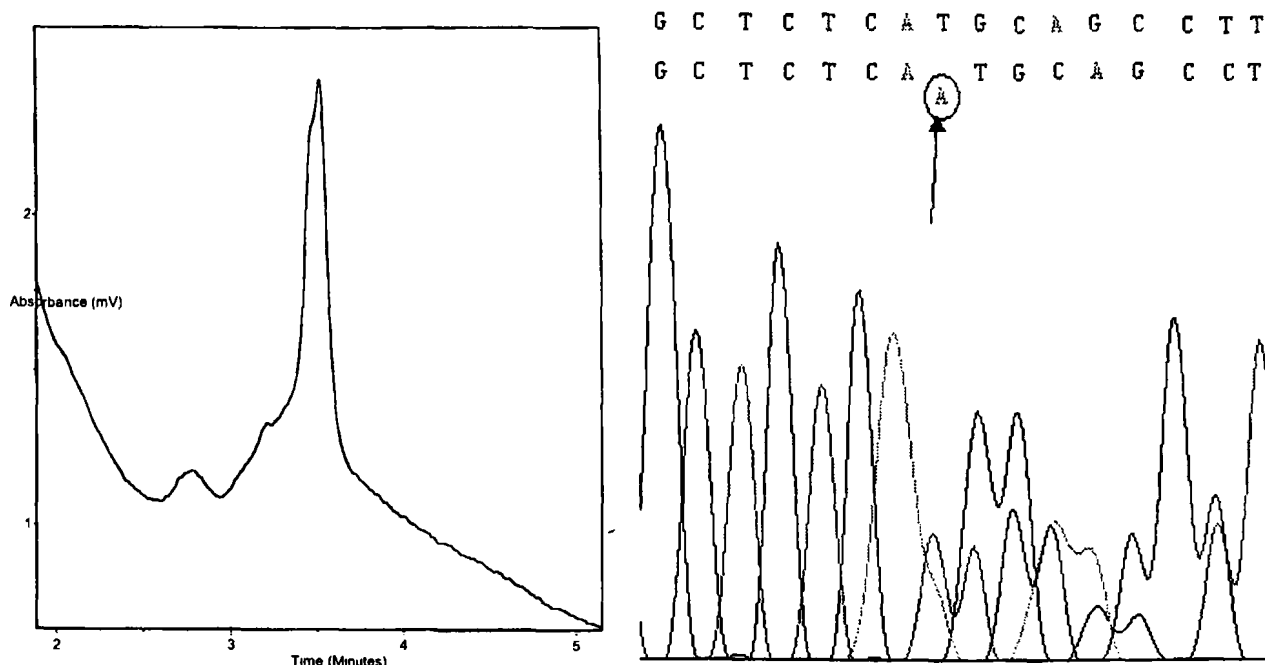
-  ΚΠΕ
-  ΟΑΠ
-  Ηπατοβλάστωμα σε ηλικία 1 έτους

Εικόνα 14. Οικογένεια με την καινούργια *APC* μεταλλαγή 1577insT. Το βέλος δείχνει το άτομο το οποίο εξετάστηκε. Για τις III:2 και III:3 δεν είχαμε δείγμα ούτε ιστορικό.

Η III:1 σε ηλικία 1 έτους εμφάνισε ηπατοβλάστωμα. Σε ηλικία 9 ετών παρουσίασε πολύποδα στο ορθό και περίπου 21 αδενωματώδεις πολύποδες μεγέθους περίπου 3 χιλιοστών (μικρά σωληνώδη αδενώματα και μεγαλύτεροι μισχωτοί) κυρίως στο αριστερό κόλον μαζί με αδenoκαρκίνωμα. Ακολούθησε ολική κολεκτομή. Ο πατέρας της (II:1) πέθανε σε ηλικία 35 ετών από ΟΑΠ και ΚΠΕ. Η πατρική γιαγιά πέθανε από ΚΠΕ και αναφέρεται πως είχε πολύποδες και στο ανώτερο πεπτικό.

Υλικό για εξέταση είχαμε μόνο από την III:1. Σε αυτήν εντοπίστηκε η πλαισιοτροποποιητική μεταλλαγή 1577insT (Εικ. 15) του APC σε ετεροζυγωτία.

Η συγκεκριμένη μεταλλαγή που προσθέτει μια θυμίνη στο κωδικόνιο 526 προκαλεί μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης της πρωτεΐνης, δημιουργία μη αναγνωρίσιμης αλληλουχίας αμινοξικών καταλοίπων και τελικά κωδικόνιο τερματισμού στη θέση 535. Αναμένεται λοιπόν να προκαλεί την παραγωγή ημιτελούς πρωτεΐνης.

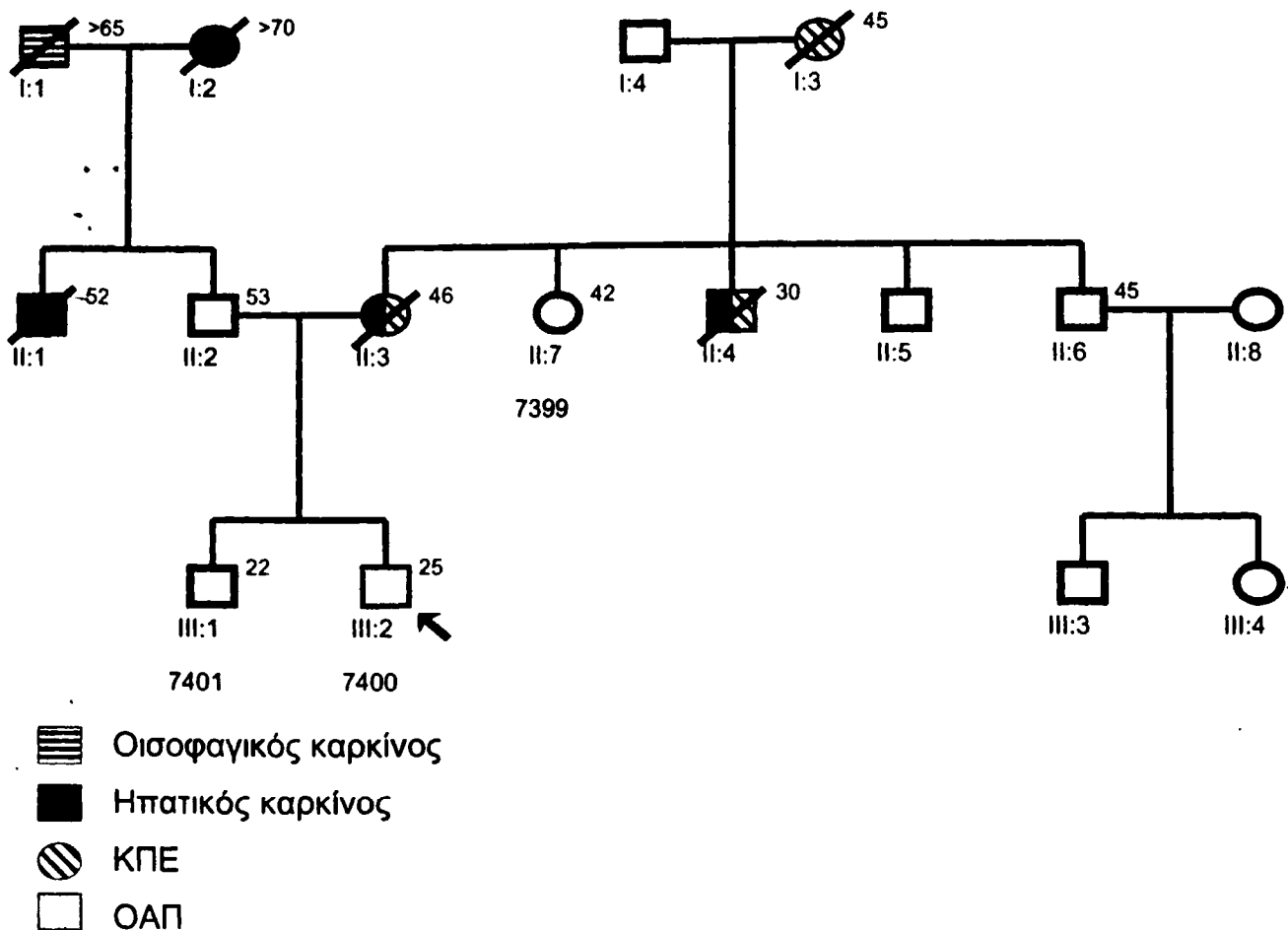


Εικόνα 15. Χρωματογράφημα dHPLC και αλληλούχισης της μεταλλαγής 1577insT. Η αλληλούχιση φαίνεται με τον ανάστροφο εκκινητή για αυτό φαίνεται να προστίθεται αδενίνη (ανάστροφη συμπληρωματική αλληλουχία) αντί θυμίνης.

5.2.1.4 Οικογένεια 7400

Στην οικογένεια αυτή ο ασθενής III:2 (Εικόνα 16) προσήλθε σε ηλικία 25 ετών με ΟΑΠ και περισσότερους από 100 πολύποδες σε όλο το παχύ του έντερο. Η μητέρα του (II:3) και η αδερφή (II:4) της απεβίωσαν από ΚΠΕ και ηπατικό καρκίνο (πιθανότατα μεταστατικό) σε ηλικίες 46 και 30 αντιστοίχως. Η μητρική γιαγιά του ασθενούς είχε πεθάνει από ΚΠΕ σε ηλικία 45 ετών.

Ο ασθενής είχε επίσης πολύποδες στο στομάχι, στο δωδεκαδάκτυλο και στον ειλεό. Οι πολύποδες ήταν σωληνώδη αδενώματα μεγέθους 5-15 χιλιοστών ενώ υπήρχαν και μερικοί μισχωτοί των 10 χιλιοστών. Όλες οι αλλοιώσεις ήταν αδενώματα ελαφριάς ως μέτριας δυσπλασίας. Επιπλέον, βυθοσκόπηση αποκάλυψε την ύπαρξη υπερτροφίας του μελανινοφόρου επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς του ασθενούς (CHRPE).



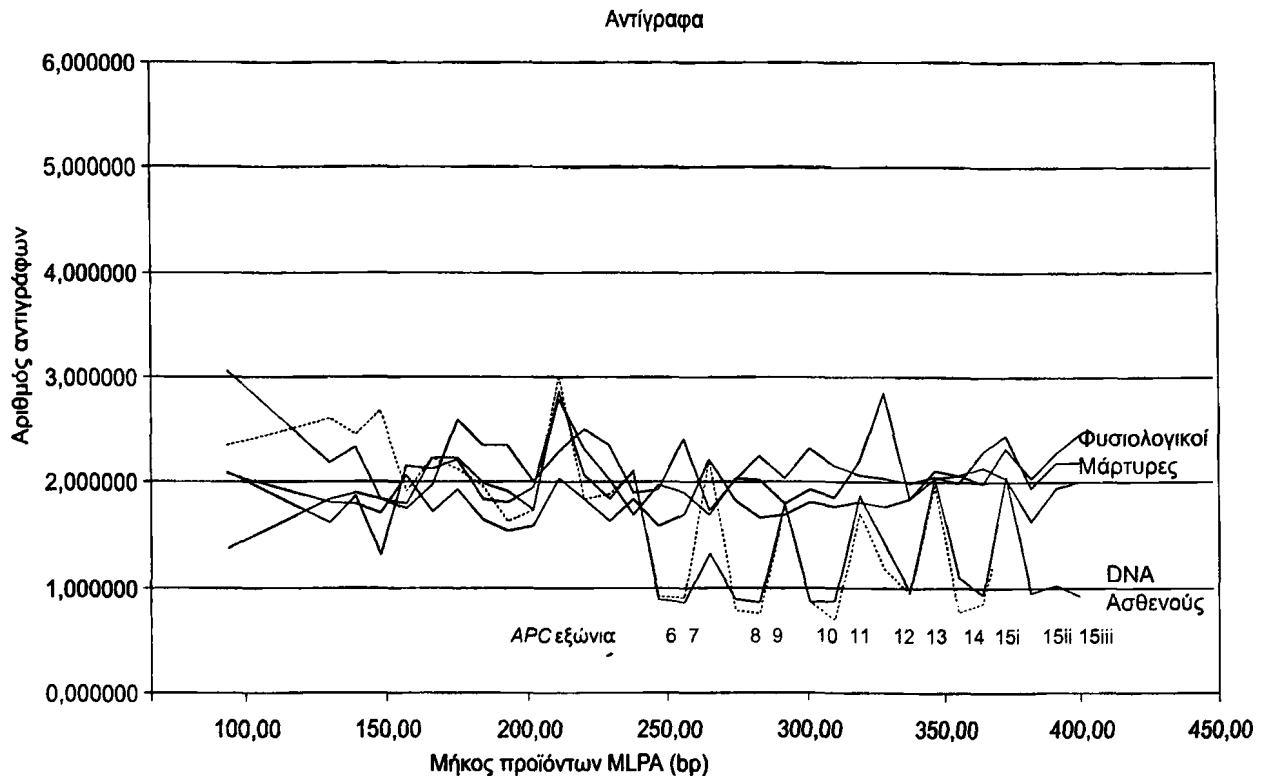
Εικόνα 16. Οικογένεια με την καινούργια μεγάλη έλλειψη 250 kb που περιλαμβάνει τα εξώνια 6 έως και 15 του γονιδίου *APC*. Με βέλος δείχνεται ο ασθενής που εξετάστηκε.

dHPLC και αλληλούχιση ολόκληρης της κωδικής περιοχής και των περιοχών σύνδεσης με τα εσώνια έδειξε την παρουσία μόνο μιας μεταλλαγής (G4479A) στον ασθενή III:2. Ο πολυμορφισμός G4479A βρέθηκε σε ομοζυγωτία και είναι σιωπηλή μεταλλαγή αφού δεν αλλάζει το κωδικόνιο της θρεονίνης στη θέση 1493. Εξαιτίας του κλασσικού φαινοτύπου ακολούθησε έλεγχος με MLPA.

Η MLPA έδειξε παρουσία ενός μόνο αντιγράφου για τα εξώνια από 6 έως 15 του *APC* (Εικ. 17), γεγονός που υποδήλωνε μεγάλη γενωμική έλλειψη από το ένα χρωμόσωμα στην περιοχή 5q21 η οποία κάλυπτε τα εξώνια 6-15 του *APC*. Στη συνέχεια λεμφοκύτταρα του ασθενούς στάλθηκαν στον Δρ. Hans Dauwerse στο κέντρο ανθρωπίνης και κλινικής γενετικής του ιατρικού κέντρου του πανεπιστημίου του Leiden της Ολλανδίας για έλεγχο FISH.

Ο έλεγχος FISH επιβεβαίωσε την έλλειψη και καθόρισε το μέγεθος της στα 250 kb. Η έλλειψη αυτή, που δεν εντοπίστηκε στον υγιή αδερφό του ασθενούς, εκτείνεται από το εσώνιο 5 του *APC* μέχρι το 3' άκρο του γονιδίου *MCC* που βρίσκεται περίπου 200 kb μακριά από το *APC* προς το τελομερίδιο του

χρωμοσώματος 5, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του FISH (προσωπική επικοινωνία με Hans Dauwerse). Η συγκεκριμένη έλλειψη απενεργοποιεί το ένα από τα δυο αλληλόμορφα του *APC* και προκαλεί το φαινότυπο της ΟΑΠ. Επίσης, εμφανίζεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, άρα είναι καινούργια μεταλλαγή (novel).

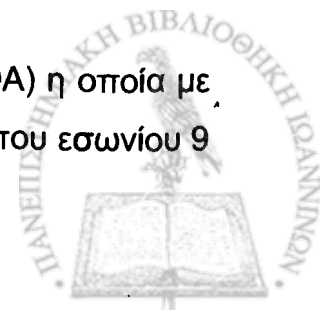


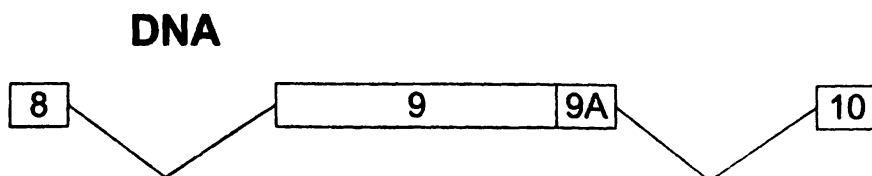
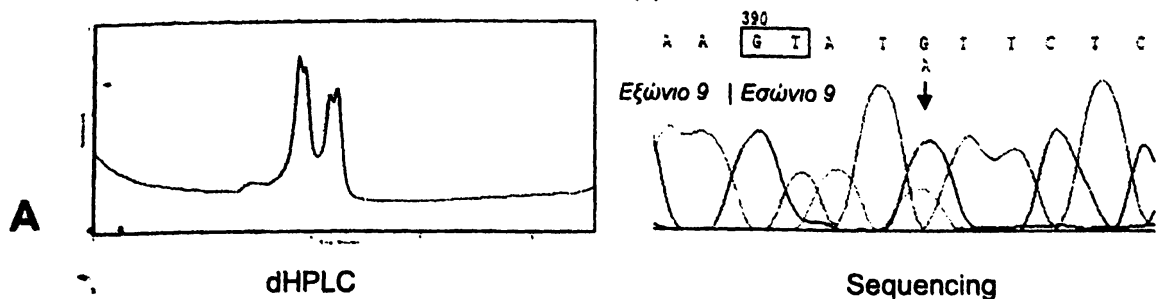
Εικόνα 17. Αποτελέσματα ελέγχου MLPA. Τα εξώνια 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 (τμήματα i, ii, iii) εκπροσωπούνται από ένα αντί για δύο αντίγραφα όπως στους φυσιολογικούς ασθενείς.

5.2.1.5 Οικογένεια 8919

Σε αυτή την οικογένεια ο μοναδικός ασθενής ήταν ένας νέος 29 ετών (II:3) με περισσότερους από 100 αδενωματώδεις πολύποδες στο παχύ έντερο – κυρίως στο κατιόν, στο σιγμοειδές και στο ορθό. Ο οισοφάγος, το δωδεκαδάκτυλο και ο ειλεός ήταν ελεύθερα πολυπόδων. Οι πολύποδες είχαν μέγεθος περίπου 5 χιλιοστά και περιλάμβαναν και σωληνώδη και λαχνωτά αδενώματα. Όλα τα αδενώματα είχαν χαμηλή έως μέτρια δυσπλασία ενώ μερικά λαχνωτά ήταν ελαφρώς υπερπλαστικά. Η βυθοσκόπηση απέκλεισε την παρουσία CHRPE. Οι γονείς του ασθενούς ήταν φυσιολογικοί σε μεγάλη ηλικία (Εικ. 18) ενώ τα αδέρφια του φυσιολογικά χωρίς να έχουν εξεταστεί με κολonosκόπηση.

Ο έλεγχος με dHPLC έδειξε την παρουσία μεταλλαγής (Εικ. 20A) η οποία με αλληλούχιση δείχθηκε ότι είναι η αντικατάσταση της πέμπτης βάσης του εσωνίου 9 (γουανίνη) από αδενίνη – IVS9+5G>A (Εικ. 20A) σε ετεροζυγωτία.

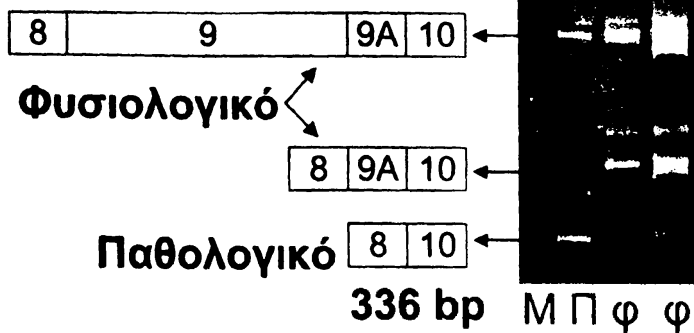




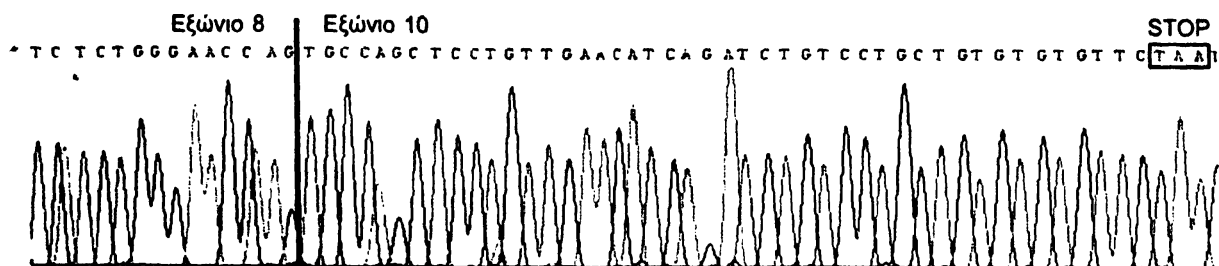
RNA



B



Γ



Εικόνα 20. Α. dHPLC και αλληλούχηση της νέας APC μεταλλαγής IVS9+5G>A. Σε κουτί το διινουκλεοτίδιο GT που είναι η συντηρημένη αλληλουχία δότης του εσωνίου κατά το μάτισμα του mRNA. Το βέλος δείχνει τη θέση της μεταλλαγής. Το σχέδιο δείχνει τη γενωμική οργάνωση της περιοχής - εξώνια 8, 9, 9A (φυσιολογικό εναλλακτικό μάτισμα) και 10 σε κουτιά, τα εσώνια αντιπροσωπεύουν οι τεθλασμένες γραμμές που συνδέουν τα κουτιά. **Β.** Φαίνεται η οργάνωση των φυσιολογικών μεταγράφων (κανονικό και εναλλακτικό μάτισμα) και του παθολογικού, και η αντιστοιχία τους με τα προϊόντα της RT-PCR, που έχουν ηλεκτροφορηθεί σε μη αποδιατακτική πολυακρυλαμίδη 6% με μάρτυρα «Μ» μοριακού βάρους της New England Biolabs (USA) των 100 bp. «Π» = παθολογικό δείγμα και «φ» = φυσιολογικό. **Γ.** Η αλληλούχηση της ζώνης των 336 bp, που υπάρχει μόνο στο παθολογικό δείγμα, έδειξε ότι αντιστοιχεί σε παθολογικό μάτισμα που εξαλείφει τα εξώνια 9 και 9A από το ώριμο μετάγραφο προκαλώντας μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης και δημιουργία κωδικονίου τερματισμού (STOP).

Για να διερευνήσουμε τις επιπτώσεις αυτής της αλλαγής, κάναμε αντίστροφη μεταγραφή από ολικό RNA του ασθενούς και πολλαπλασιάσαμε με PCR την περιοχή μεταξύ των εξωνίων 8 και 12 του APC με εκκινήτες από τους Varesco *et al* (1994)⁶⁸. Ως φυσιολογικούς μάρτυρες χρησιμοποιήσαμε RNA από φυσιολογικά άτομα και άτομα με μεταλλαγή στο APC αλλά σε άλλο σημείο. Τα προϊόντα αυτής της RT-PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα μη αποδιατακτικής πολυακρυλαμίδης 6% (Εικ. 20B). Στην ηλεκτροφόρηση πήραμε σε όλα τα δείγματα τη ζώνη των 715 bp που αντιστοιχεί στο κανονικό φυσιολογικό μάτισμα του mRNA (8-9-9A-10) και τη ζώνη των 413 bp που αντιστοιχεί στο εναλλακτικό φυσιολογικό μάτισμα του mRNA (8-9A-10).

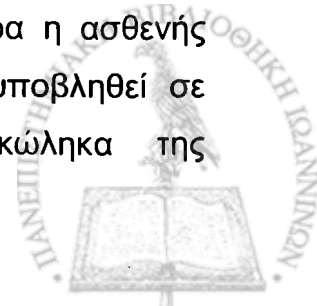
Μόνο στο παθολογικό δείγμα εμφανίστηκε μια επιπλέον ζώνη στα 336 bp. Η ζώνη αυτή στη συνέχεια απομονώθηκε από πήκτωμα αγαρόζης και αλληλουχήθηκε. Η αλληλουχία έδειξε ότι η ζώνη αυτή αντιστοιχεί σε παθολογικό μετάγραφο που παράγεται από την απ'ευθείας σύνδεση του εξωνίου 8 με το εξώνιο 10. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης της πρωτεΐνης και τη δημιουργία κωδικονίου λήξης 16 κωδικόνια μέσα στο εξώνιο 10 (Εικ. 20Γ). Έτσι, αναμένεται να δημιουργεί ατελές πρωτεϊνικό προϊόν. Οι Varesco *et al* (1994)⁶⁸ έχουν περιγράψει μεταλλαγή στην ίδια θέση IVS9+5G, με διαφορετική αντικατάσταση (γουανίνη από θυμίνη) αλλά ίδια αποτελέσματα όσον αφορά το μάτισμα. Η αντικατάσταση της γουανίνης από αδενίνη σε αυτή τη θέση περιγράφεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία.

Ακολούθησε έλεγχος των συγγενών του ασθενούς για πιθανή παρουσία της μεταλλαγής IVS9+5G>A, οι οποίοι βρέθηκαν φυσιολογικοί. Επομένως, η μεταλλαγή είχε de-novo εμφάνιση.

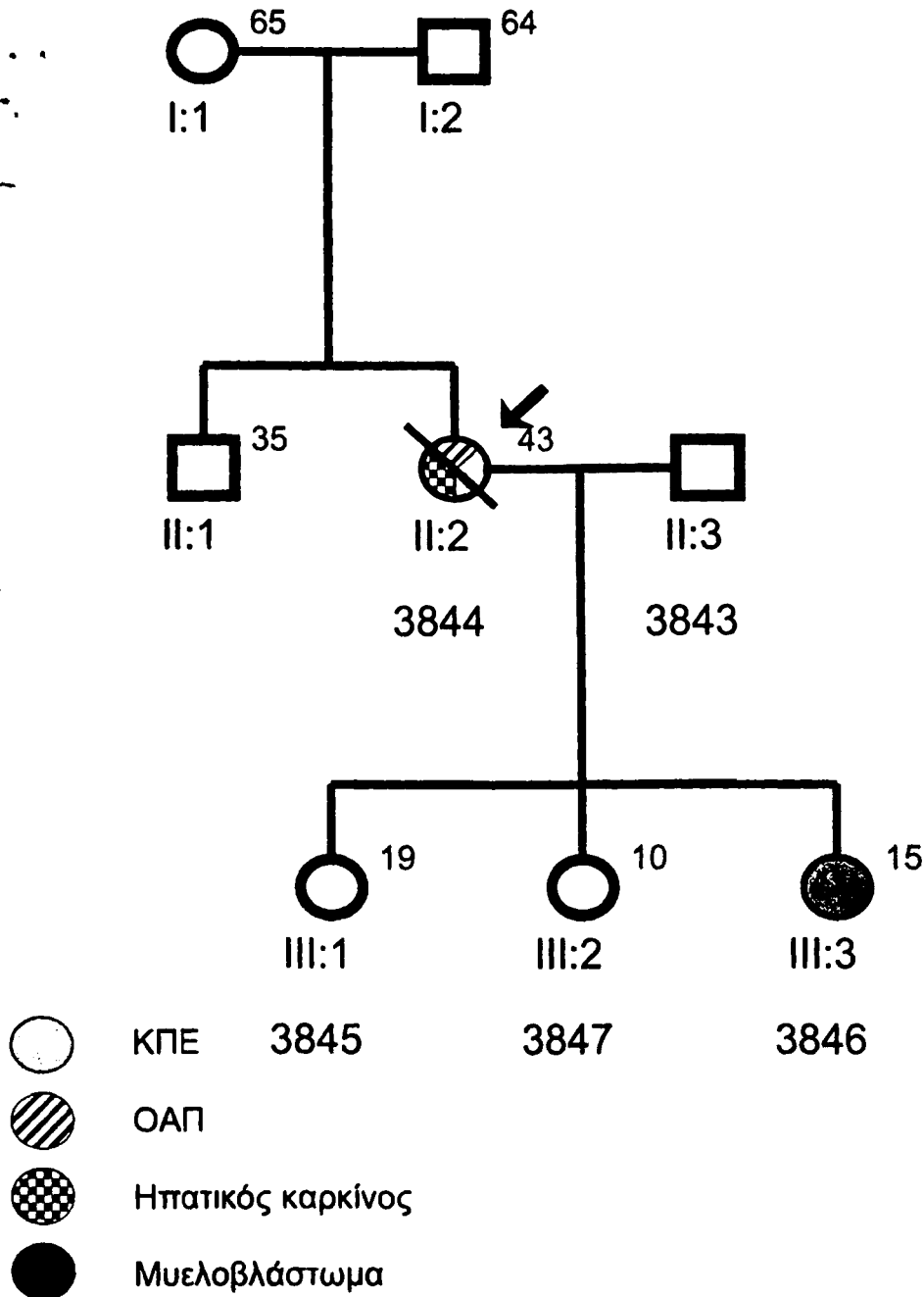
5.2.2 Οικογένειες με εξωεντερικές αλλοιώσεις

5.2.2.1 Οικογένεια 3843

Στην οικογένεια αυτή η II:2 (Εικ. 21) προσήλθε με φαινότυπο ΟΑΠ (περισσότερους από 100 αδενωματώδεις πολύποδες), ΚΠΕ και μετάσταση στο ήπαρ. Η διάγνωση έγινε στα 41 της χρόνια. Ένα χρόνο αργότερα η ασθενής απεβίωσε. Η κόρη της (III:3) σε ηλικία 14 ετών και προτού υποβληθεί σε κολονοσκόπηση διαγνώσθηκε με κακοήθη όγκο στον σκώληκα της παρεγκεφαλίδας, τύπου μυελοβλαστώματος.

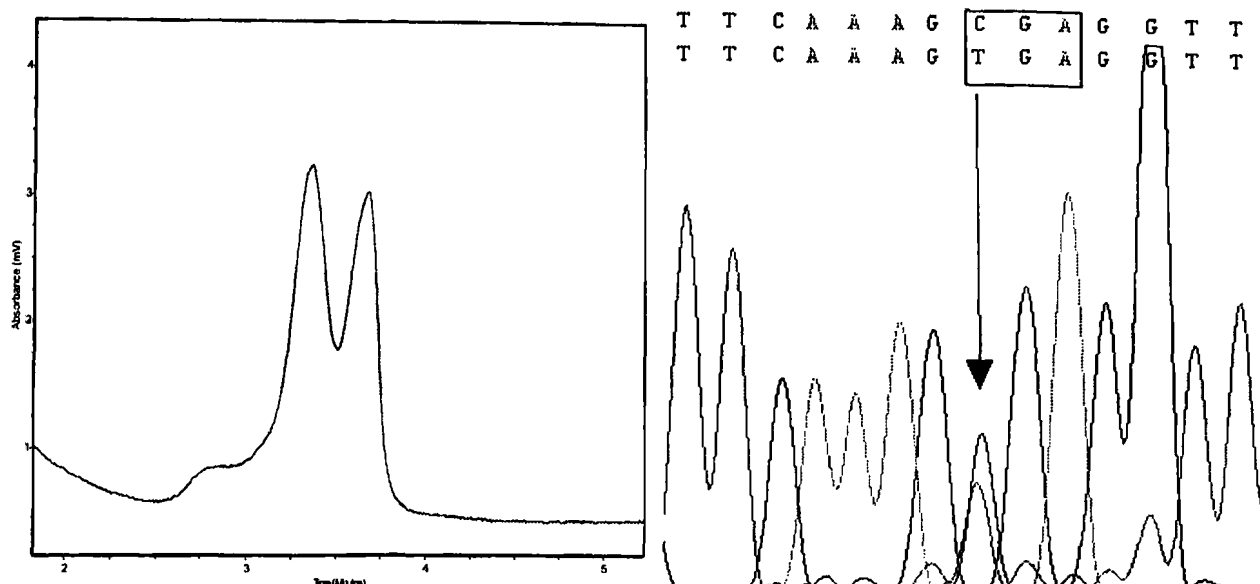


Οι γονείς της μητέρας (II:2) ήταν φυσιολογικοί σε μεγάλη ηλικία, όπως επίσης και ο αδερφός της ήταν φυσιολογικός στην ηλικία των 35 ετών.



Εικόνα 21. Οικογένεια με φαινότυπο ΟΑΠ, ΚΠΕ και με περιστατικό μυελοβλαστώματος σύνδρομο turcot. Η οικογένεια φέρει την R876X μεταλλαγή του APC σε *de-novo* εμφάνιση.

Στις II:2 και III:3 εντοπίστηκε η παθολογική μεταλλαγή APC A2626T σε ετεροζυγωτία (Εικ. 22). Οι III:1 και III:2 δε φέρουν τη μεταλλαγή. Αυτή η μεταλλαγή μετατρέπει το κωδικόνιο 876 της αργινίνης σε κωδικόνιο τερματισμού. Αναμένεται να προκαλεί την παραγωγή ατελούς πρωτεϊνικού προϊόντος. Η συγκεκριμένη μεταλλαγή σχετίζεται με εμφάνιση μυελοβλαστώματος (σύνδρομο turcot). Τέλος εφόσον οι γονείς και ο αδερφός της II:2 είναι φυσιολογικοί, η μεταλλαγή είναι *de-novo*.



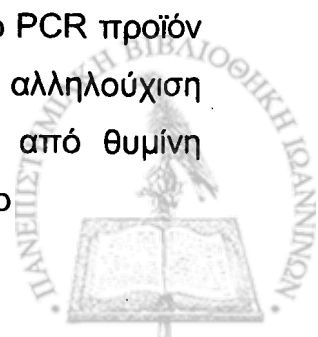
Εικόνα 22. Χρωματογραφήματα dHPLC και αλληλούχισης της APC μεταλλαγής R876X. Επάνω φυσιολογική αλληλουχία κάτω μεταλλαγμένη.

5.2.2.2 Οικογένεια 7416

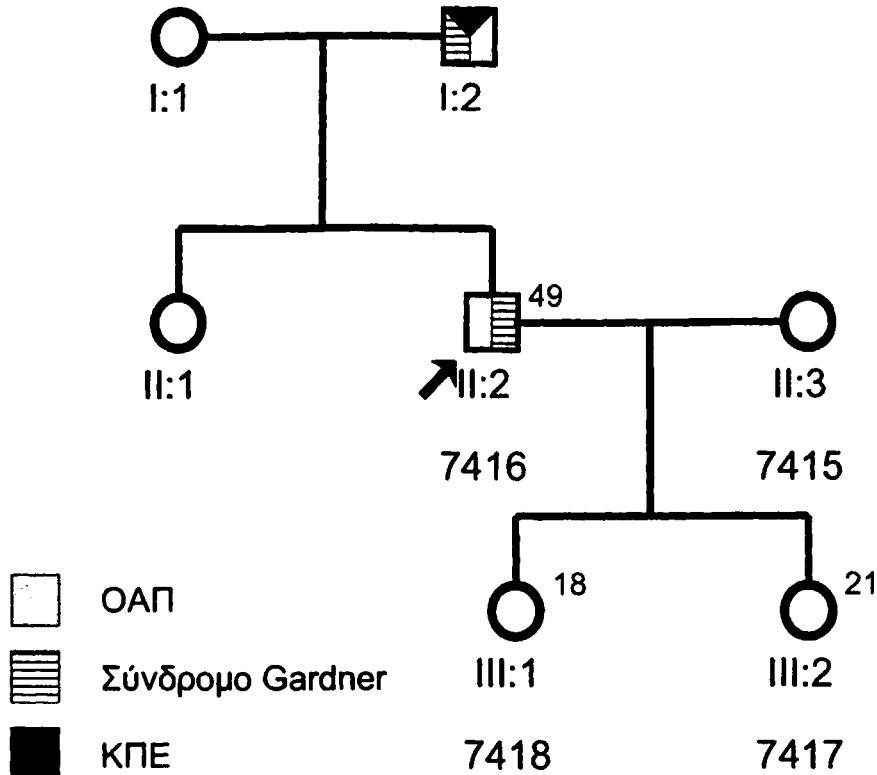
Η οικογένεια αυτή (Εικ. 23) προσήλθε για γενετικό έλεγχο επειδή ο πατέρας είχε τον φαινότυπο της ΟΑΠ και οι δυο κόρες του ήταν στην εφηβεία οπότε και θα έπρεπε να ελεγχθούν με κολonosκόπηση. Μια δεκαετία πριν σε ηλικία 39 ετών ο πατέρας (II:2) διαγνώσθηκε με περισσότερους από 500 αδενωμάτωδεις πολύποδες σε όλο το παχύ έντερο. Οι πολύποδες είχαν μέγεθος μέχρι και 45 χιλιοστά και ήταν έμμισχοι ή άμισχοι. Ιστολογικά ήταν σωληνώδη αδενώματα ήπιας ως μέτριας δυσπλασίας. Ακολούθησε ολική κολεκτομή με ειλεορθική αναστόμωση. Πολύποδες υπήρχαν επίσης στο στομάχι και στο δωδεκαδάκτυλο.

Στον ασθενή δεν εντοπίστηκε ΚΠΕ ή άλλος καρκίνος. Έξι χρόνια αργότερα εμφάνισε δεσμοειδή όγκο κοιλίας στον προϊερό χώρο με ταυτόχρονη διάβρωση του ιερού οστού από τον όγκο. Στις γνωματεύσεις των απεικονιστικών του εξετάσεων γινόταν λόγος για πιθανό σύνδρομο Gardner. Δεν είχαμε πληροφορίες για άλλες εξωεντερικές αλλοιώσεις (οστεώματα, επιδερμικές κύστεις, κλπ) σχετικές με το σύνδρομο. Ο πατέρας (I:2) του ασθενούς έπασχε από το ίδιο σύνδρομο με ΟΑΠ και ΚΠΕ, ενώ η αδερφή (II:1) του ασθενούς ήταν φυσιολογική.

Υλικό για εξέταση μας ήρθε από τους: II:2, II:3, III:1 και III:2. Στο PCR προϊόν του εξωνίου 13 του APC ανιχνεύτηκε μεταλλαγή η οποία με αλληλούχιση ταυτοποιήθηκε. Πρόκειται για αντικατάσταση της κυτοσίνης 1690 από θυμίνη (C1690T) η οποία μετατρέπει το κωδικόνιο της αργινίνης σε κωδικόνιο

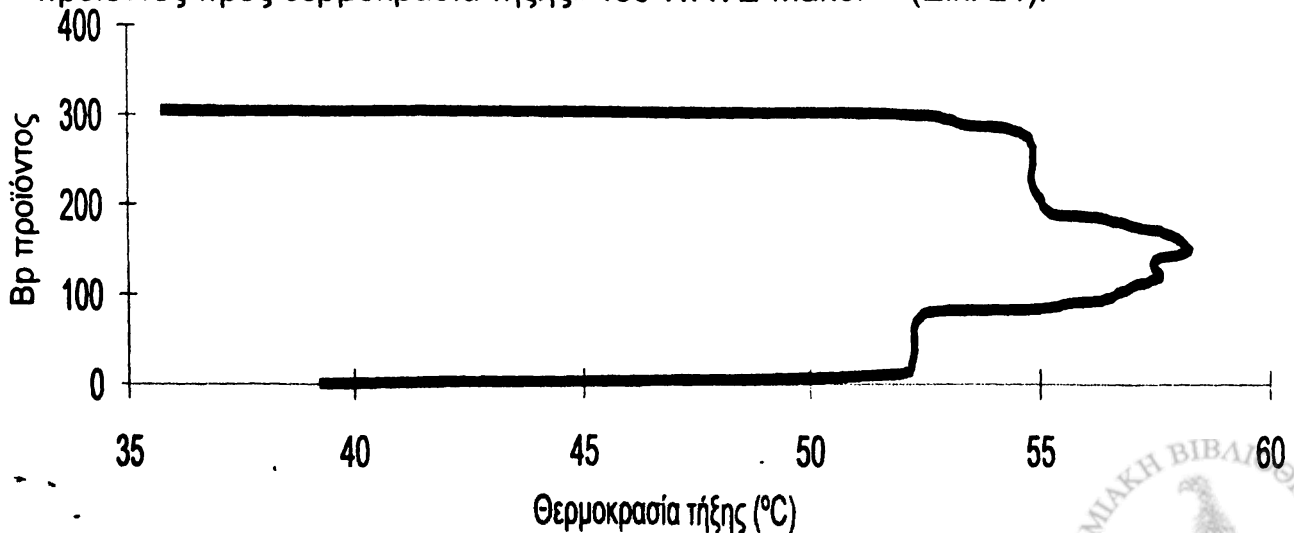


τερματισμού. Αναμένεται να προκαλεί την παραγωγή ατελούς πρωτεϊνικού προϊόντος.



Εικόνα 23. Οικογένεια με σύνδρομο Gardner. Φέρει την παθογόνο APC μεταλλαγή R564X. Με βέλος φαίνεται ο ασθενής από τον οποίο ξεκίνησε η εξέταση.

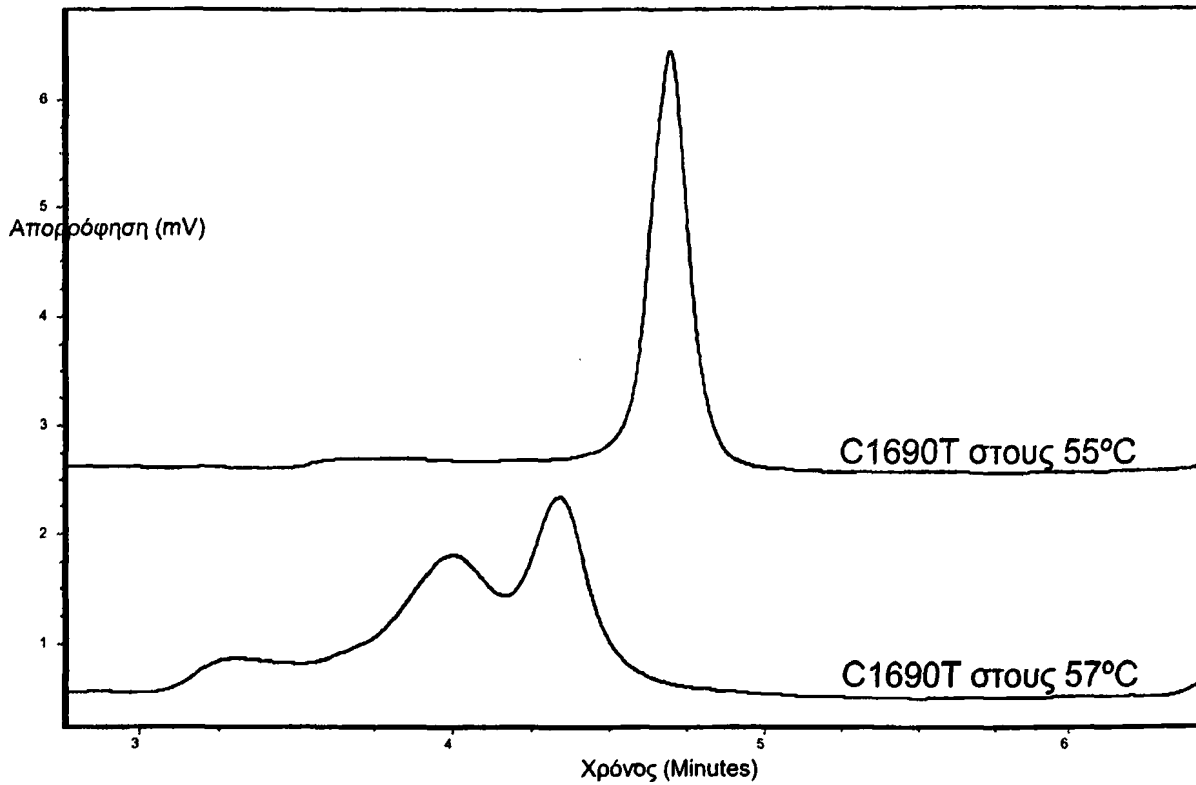
Για την ανίχνευση της μεταλλαγής αυτής στο dHPLC χρειάστηκε να γίνει έλεγχος σε διαφορετική θερμοκρασία από τις προτεινόμενες του λογισμικού WAVE-Maker™ (53, 54 και 55°C) και του αλγορίθμου της δικτυακής θέσης του πανεπιστημίου του Στάνφορντ - <http://insertion.stanford.edu/melt.html> - (50 και 55°C). Η θερμοκρασία των 57°C στην οποία ανιχνεύτηκε η μεταλλαγή C1690T επιλέχθηκε εμπειρικά μετά από μελέτη του πιο λεπτομερούς διαγράμματος «bp προϊόντος προς θερμοκρασία τήξης» του WAVE-Maker™ (Εικ. 24).



Εικόνα 24. Διάγραμμα πρόβλεψης θερμοκρασίας τήξης για κάθε ζεύγος βάσεων του PCR προϊόντος.



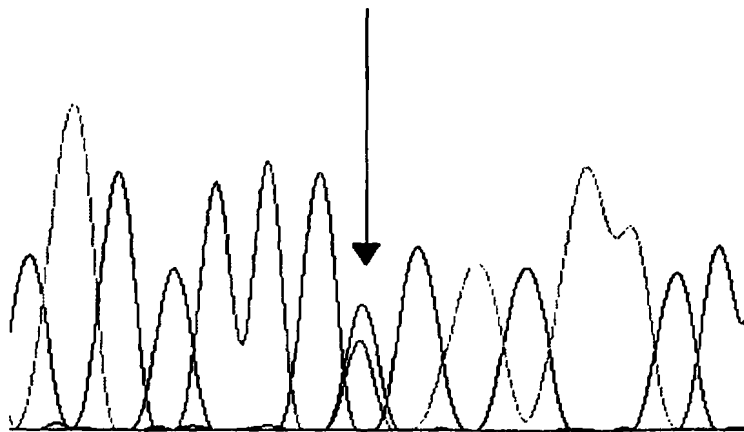
Η μεταλλαγή C1690T δεν ανιχνεύτηκε στις προτεινόμενες θερμοκρασίες παρά μόνο στην εμπειρική των 57°C (Εικ. 25).



Εικόνα 25. Χρωματογραφήματα dHPLC από το ίδιο δείγμα. Η C1690T δεν ανιχνεύεται στους 55°C παρά μόνο στους 57°C.

Στη συνέχεια με αλληλούχιση έγινε η ταυτοποίηση της μεταλλαγής (Εικ. 26).

G A C G T T G C G A G A A G T
G A C G T T G T G A G A A G T



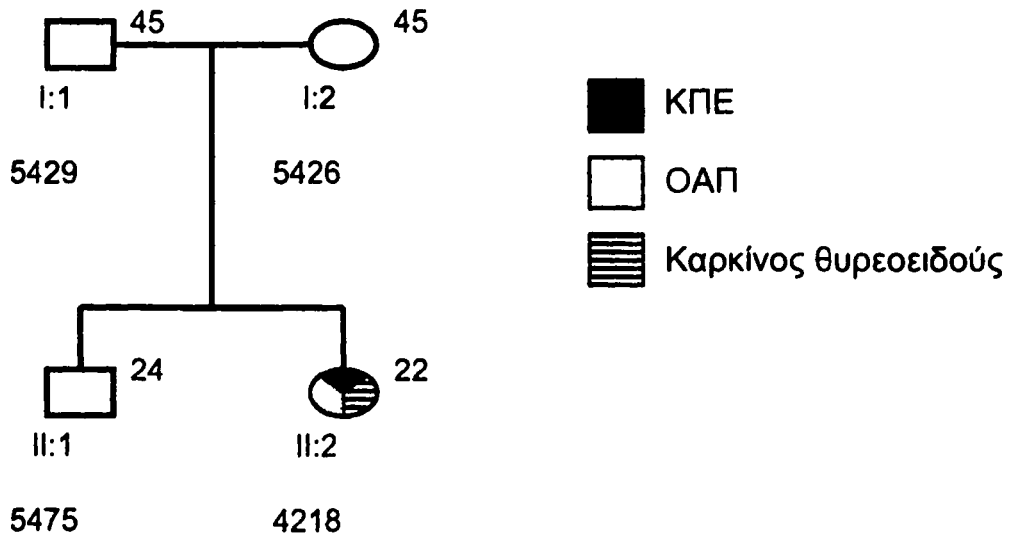
Εικόνα 26. Αλληλούχιση της C1690T μεταλλαγής. Σε κουτί το κωδικόνιο. Επάνω φαίνεται η φυσιολογική αλληλουχία (αργινίνη) και κάτω η μεταλλαγμένη (τερματισμός).

Η μεταλλαγή R564X βρέθηκε σε ετεροζυγωτία στον II:2 και στις δύο κόρες του. Η γυναίκα του, αναμενόμενα, βρέθηκε φυσιολογική.



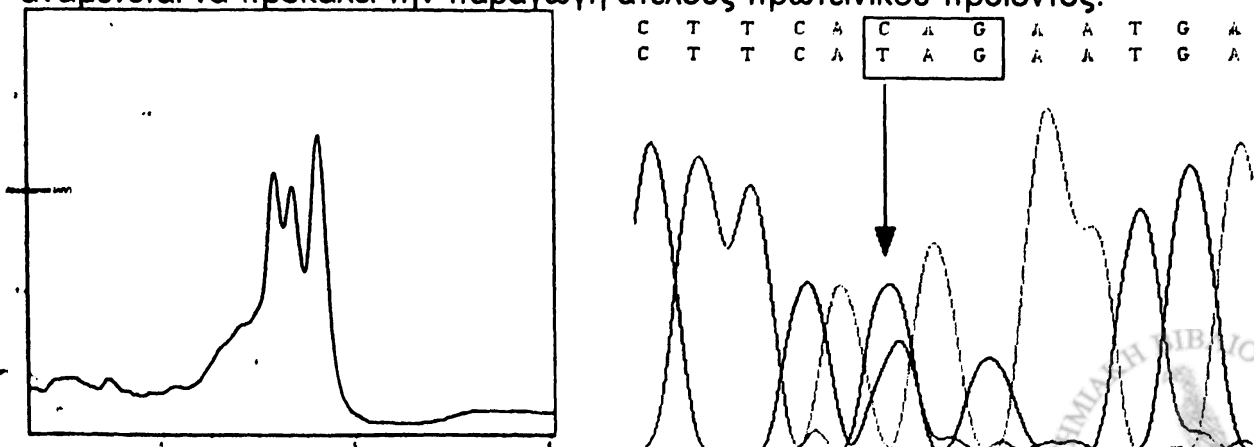
5.2.2.3 Οικογένεια 4218

Η οικογένεια αυτή (Εικ. 27) προσήλθε λόγω φαινοτύπου ΟΑΠ και ΚΠΕ, που παρούσασε η κόρη τους σε νεαρή ηλικία (19 ετών). Η II:2 εμφάνισε περισσότερους από 100 αδενωματώδεις πολύποδες σε όλο το παχύ έντερο και είχε πολύποδες και στο στομάχι. Ακολούθησε ολική κολεκτομή. Τρία χρόνια αργότερα παρουσίασε και καρκίνο θυρεοειδούς (έξω-εντερικό καρκίνο). Οι γονείς της ήταν σε μεγάλη ηλικία (45 ετών) χωρίς συμπτώματα.



Εικόνα 27. Οικογένεια με φαινότυπο ΟΑΠ, ΚΠΕ και με περιστατικό έξω-εντερικού καρκίνου. Η οικογένεια φέρει την C3133T (Q1045X) μεταλλαγή σε *de-novo* εμφάνιση.

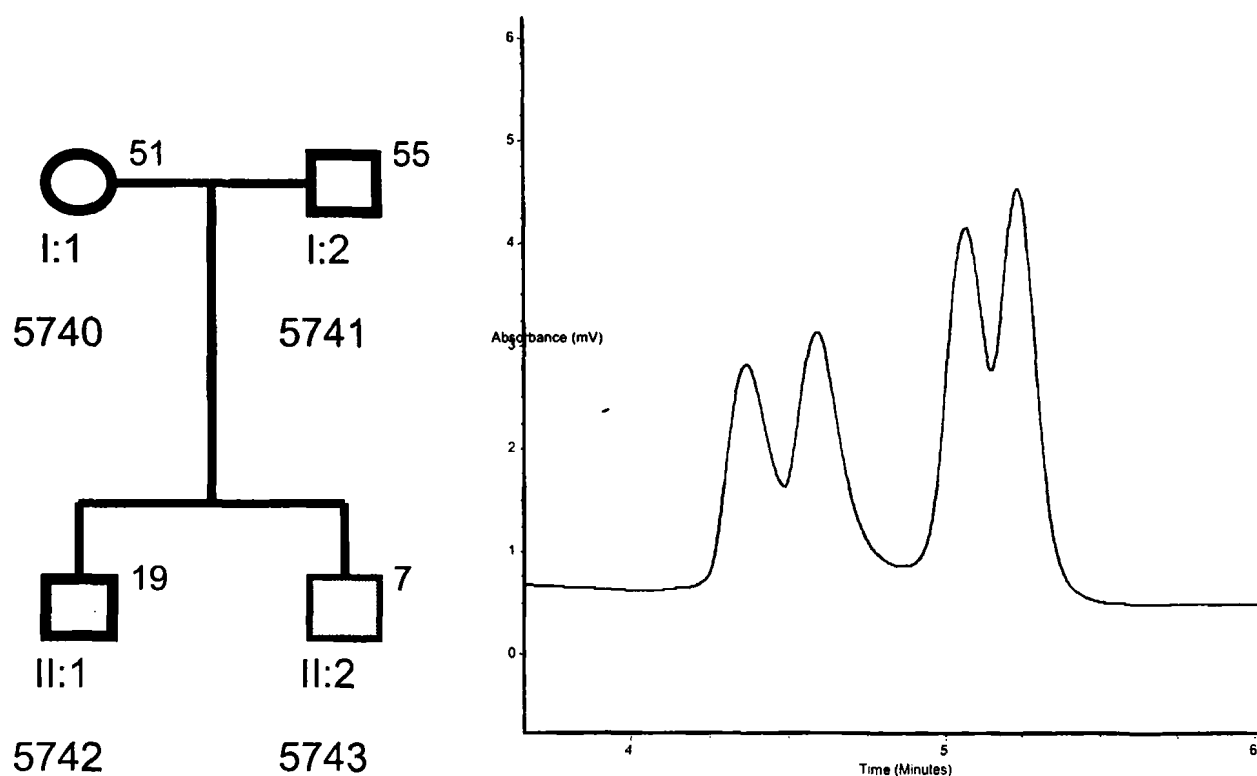
Η εξέταση ταυτοποίησε την παθογόνο APC μεταλλαγή C3133T στο ασθενές μέλος της οικογένειας (II:2), σε ετεροζυγωτία. Ο αδερφός της και οι γονείς της βρέθηκαν φυσιολογικοί, επομένως η μεταλλαγή έχει *de-novo* εμφάνιση. Η αντικατάσταση της κυτοσίνης από θυμίνη στο κωδικόνιο 1045 της γλουταμίνης (Εικ. 28) το μετατρέπει σε κωδικόνιο τερματισμού (Q1045X). Η μεταλλαγή αναμένεται να προκαλεί την παραγωγή ατελούς πρωτεϊνικού προϊόντος.



Εικόνα 28. Χρωματογραφήματα dHPLC και αλληλούχισης της APC μεταλλαγής Q1045X. Επάνω(σε κουτί) φαίνεται η φυσιολογική (Q) και κάτω η μεταλλαγμένη (X) αλληλουχία.

5.2.3 Οικογένεια με μικρή ηλικία έναρξης ΟΑΠ

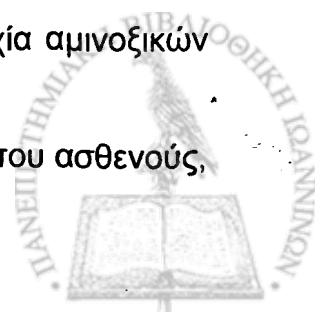
Σε αυτή την οικογένεια (Εικ. 29) το ένα (II:2) από τα δυο παιδιά έπαιτα από αιμορραγία από το ορθό, διαγνώσθηκε στα 7 του χρόνια με ΟΑΠ και περισσότερους από 100 αδενωματώδεις πολύποδες στο παχύ έντερο. Δύο χρόνια αργότερα υποβλήθηκε σε ολική κολεκτομή και ειλεορθική αναστόμωση. Οι γονείς του ήταν φυσιολογικοί στα 55 έτη ο πατέρας και στα 51 η μητέρα. Ο αδερφός (II:1) του παιδιού δεν είχε συμπτώματα και δεν είχε ελεγχθεί με κολονοσκόπηση στην ηλικία των 19 ετών.

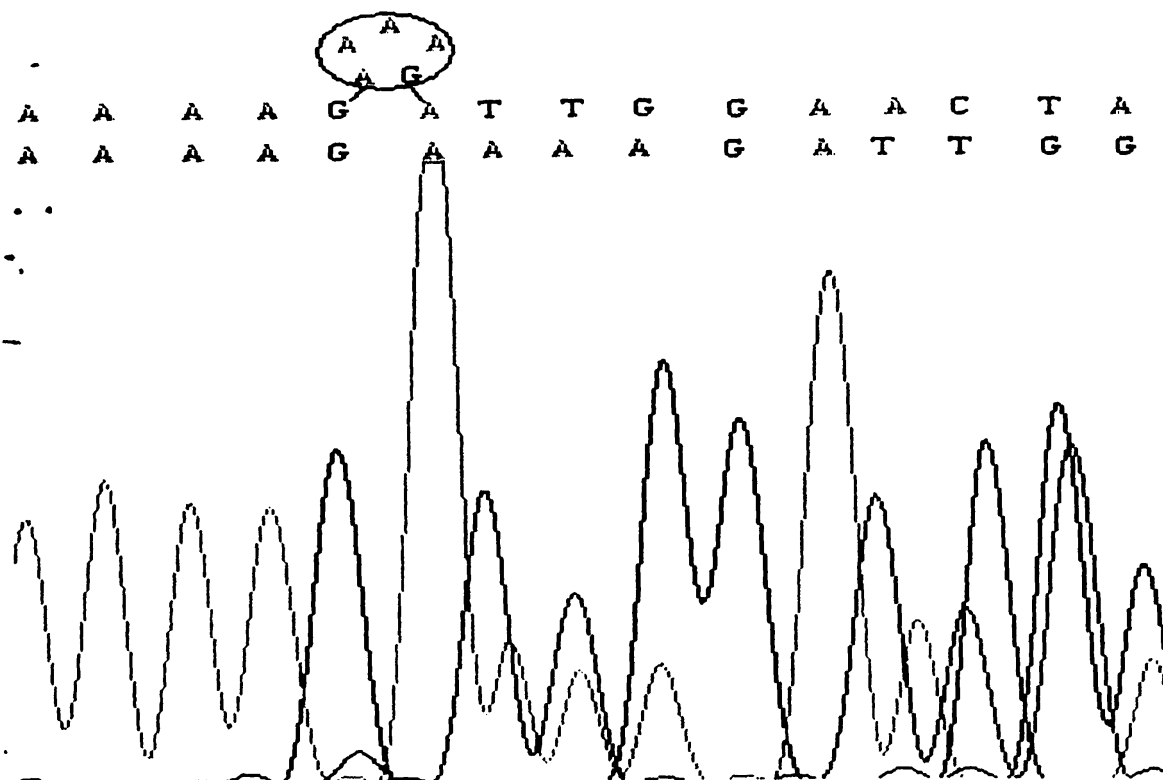


Εικόνα 29. Οικογένεια με την παθογόνο *APC* μεταλλαγή 3927-3931del5. Δεξιά φαίνεται το χρωματογράφημα της μεταλλαγής στο dHPLC. Με γκριζο σκιάζεται το ασθενές μέλος.

Ο έλεγχος του II:2 με dHPLC και αλληλούχηση (Εικ. 30) ταυτοποίησε την παρουσία της 3927-3931del5 παθογόνου *APC* μεταλλαγής σε ετεροζυγωτία. Πρόκειται για απαλοιφή 5 νουκλεοτιδικών βάσεων. Αυτό προκαλεί μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης και δημιουργία κωδικονίου τερματισμού 1535 κωδικόνια μετά. Η πρωτεΐνη που αναμένεται να παράγεται έχει το ίδιο περίπου μοριακό βάρος με τη φυσιολογική. Έχει όμως τελείως διαφορετική αλληλουχία αμινοξικών καταλοίπων από αυτή, με αποτέλεσμα να μην είναι λειτουργική.

Η μεταλλαγή δεν βρέθηκε ούτε στους γονείς ούτε στον αδερφό του ασθενούς, επομένως είναι *de-novo*.





Εικόνα 30. Χρωματογράφημα αλληλούχισης της 3927-3931del5 μεταλλαγής. Σε κύκλο οι βάσεις που διαγράφονται από το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο.

5.2.4 Οικογένειες χωρίς παθογόνο μεταλλαγή στο APC

5.2.4.1 Οικογένεια 7782

Στην οικογένεια αυτή (Εικ. 31) η ασθενής (III:3) είχε περίπου 30 αδενωματώδεις πολύποδες κυρίως στο εγκάρσιο, στο κατιόν, στο σιγμοειδές και στο ορθό σε ηλικία 23 ετών. Το στομάχι και το λεπτό έντερο δεν είχαν πολύποδες.

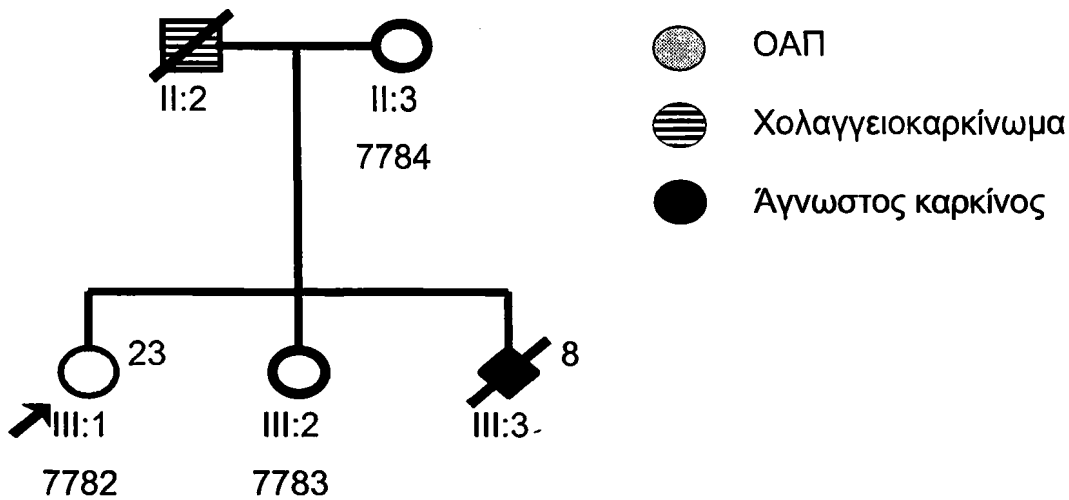
Οι πληροφορίες δεν ήταν ολοκληρωμένες για το ιστορικό της οικογένειας. Η ασθενής είχε ένα μικρό αδερφάκι (III:3) που απεβίωσε από άγνωστο καρκίνο στα 8 του χρόνια, ενώ ο πατέρας της (II:2) απεβίωσε από χολαγγειοκαρκίνωμα.

Ολόκληρο το APC ελέγχθηκε με dHPLC και με αλληλούχιση όπου αυτό κρίθηκε απαραίτητο με βάση τα αποτελέσματα του dHPLC. Ταυτοποιήθηκαν οι παρακάτω πολυμορφισμοί – σιωπηλές μεταλλαγές σε ετεροζυγωτία: C1458T (Y486Y), A1635G (A545A), IVS13+78A>G, G5268T (S1756S) και A5880G (P1960P). Καμιά από αυτές δεν προκαλεί βλάβη στην πρωτεΐνη αφού δεν αλλάζουν αμινοξικά κατάλοιπα.

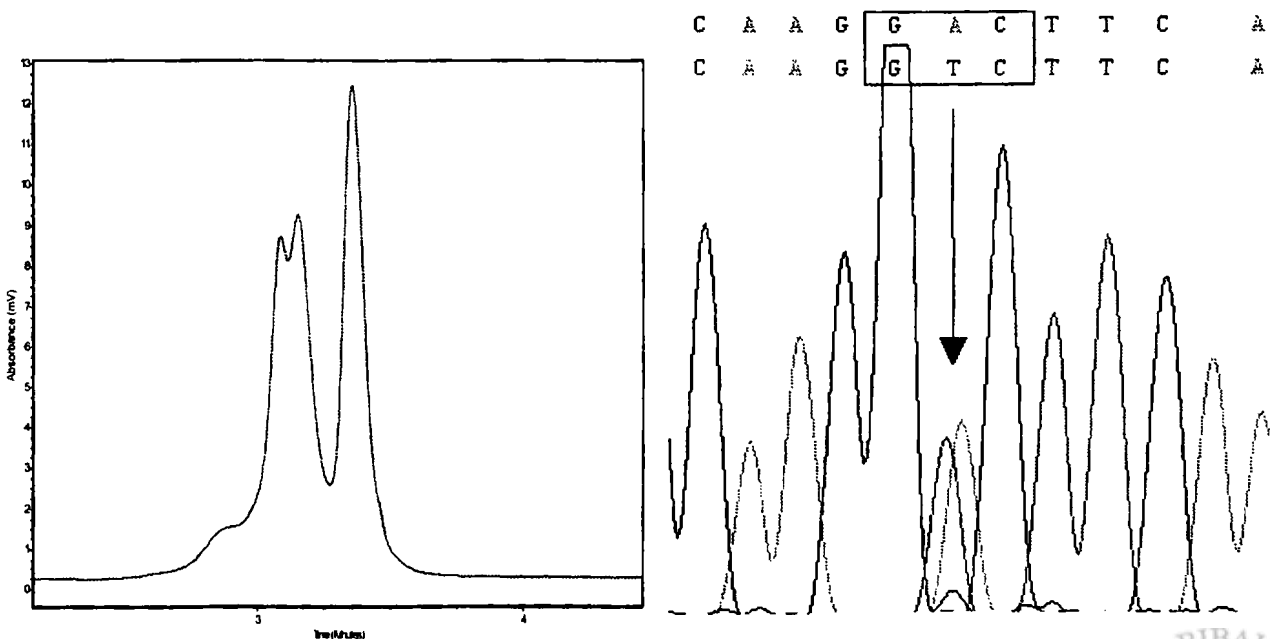
Μόνο μια παρανοηματική μεταλλαγή ταυτοποιήθηκε στην παραπάνω ασθενή. Η μεταλλαγή αυτή είναι η A5465T και βρέθηκε σε ετεροζυγωτία (Εικ 32).

Αλλάζει το κωδικόνιο 1822 του ασπαρτικού σε βαλίνη (D1822V). Η αλλαγή από ασπαρτικό (υδρόφιλο, με αμιδική πλευρική ομάδα) σε βαλίνη (υδρόφοβο με αλειφατική πλευρική ομάδα) είναι μεγάλη. Η θέση 1822 βρίσκεται ανάμεσα στην τέταρτη και στην πέμπτη θέση δέσμευσης της β-κατενίνης (για αποικοδόμηση) και κοντά στη δεύτερη θέση δέσμευσης της αξίνης.

Στη συνέχεια η ασθενής εξετάστηκε για σημειακές μεταλλαγές στο *MYH* όπου βρέθηκε αρνητική και για μεγάλες αναδιατάξεις στο *APC* όπου βρέθηκε φυσιολογική.



Εικόνα 31. Οικογένεια με περιστατικό πολυποδίασης χωρίς παθογόνο μεταλλαγή στο *APC* ή στο *MYH*. Το βέλος δείχνει την ασθενή η οποία εξετάστηκε.



Εικόνα 32. Χρωματογραφήματα dHPLC και αλληλούχησης της A5465T παρανοηματικής μεταλλαγής του *APC*.

5.2.4.2 Οικογένεια 10177

Σε αυτή την οικογένεια το μοναδικό μέλος που βρισκόταν στη ζωή εμφάνισε 20 με 30 πολύποδες σε όλο το παχύ έντερο, σε ηλικία 65 ετών. Ακολούθησε κολέκτομή. Οι πολύποδες ήταν σωληνολαχνωτά αδενώματα ήπιας έως μέτριας δυσπλασίας. Το μέγεθός τους ήταν 10-15 χιλιοστά και ήταν έμμισχοι ή άμισχοι.

Οι γονείς του ασθενούς - πατέρας και μητέρα - απεβίωσαν σε ηλικίες 62 και 74 ετών από καρδιακό επεισόδιο και ανακοπή καρδιάς, αντίστοιχα. Σε ηλικία 40 ετών στον ασθενή είχε εντοπιστεί λέμφωμα στομάχου και είχε γίνει ολική γαστρεκτομή που ακολουθήθηκε από χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία.

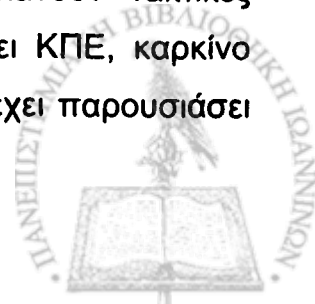
Ολόκληρο το APC ελέγχθηκε με dHPLC και με αλληλούχιση όπου αυτό κρίθηκε απαραίτητο με βάση τα αποτελέσματα του dHPLC. Ταυτοποιήθηκαν οι παρακάτω πολυμορφισμοί – σιωπηλές μεταλλαγές σε ετεροζυγωτία: C1458T (Y486Y), A1635G (A545A), G4479A (T1493T), A5034G (G1678G), G5268T (S1756S), A5880G (P1960P). Καμιά από αυτές δεν προκαλεί βλάβη στην πρωτεΐνη αφού δεν αλλάζουν αμινοξικά κατάλοιπα.

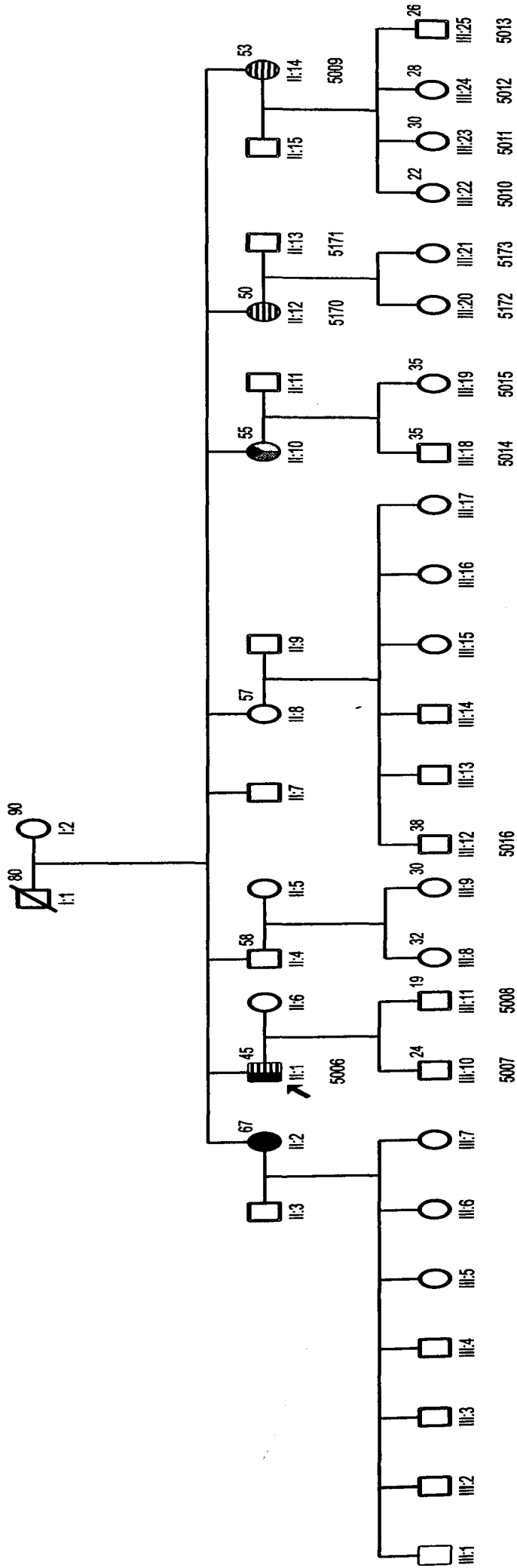
Στον ασθενή εντοπίστηκε η παρανοηματική μεταλλαγή A5465T σε ετεροζυγωτία (Εικ 32).





Καμιά μεταλλαγή δεν βρέθηκε στο MYH και το MLPA ήταν φυσιολογικό.

5.2.5 Οικογένεια με μεταλλαγές στο MYH

Πρόκειται για μια μεγάλη οικογένεια με περισσότερα από 42 μέλη τριών συνεχόμενων γενεών. Ο ασθενής II:2 (Εικ. 33) εμφάνισε πολλαπλούς αλλά λιγότερους από 100 πολύποδες σε όλο το παχύ έντερο σε ηλικία 35 ετών. Ακολούθησε ολική κολεκτομή και ειλεορθική αναστόμωση. Οι πολύποδες ήταν αδενώματα μέτριας έως σοβαρής δυσπλασίας. Ακολούθησαν τακτικές πολυπεκτομές για πολύποδες που εμφανίζονταν στο εναπομείναν ορθό. Τελικά ο ασθενής ανέπτυξε ΚΠΕ σε ηλικία 45 ετών. Οι αδερφές του ασθενούς II:12 και II:14 - ηλικίας 50 και 53 ετών αντίστοιχα - έχουν περίπου 20-30 αδενωματώδεις πολύποδες παχέος εντέρου με έως βαριά δυσπλασία και κάνουν τακτικές πολυπεκτομές. Η II:10 σε ηλικία 55 ετών έχει ήδη παρουσιάσει ΚΠΕ, καρκίνο ενδομητρίου και μετάσταση στο ήπαρ. Η II:2 σε ηλικία 67 ετών έχει παρουσιάσει ΚΠΕ.





-  ΟΑΠ
-  ΚΠΕ
-  Καρκίνος ήπατος
-  Καρκίνος ενδομητρίου

Εικόνα 33. Οικογένεια χωρίς παθολογία στο APC αλλά με τα δυο αλληλόμορφα του ΜΥΗ απενεργοποιημένα από τις μεταλλαγές Q324X και G382D.



Ο πατέρας του ασθενούς II:1 απεβίωσε στα 80 του χρόνια από φυσικά αίτια, ενώ η μητέρα του ζει υγιής και είναι 90 ετών.

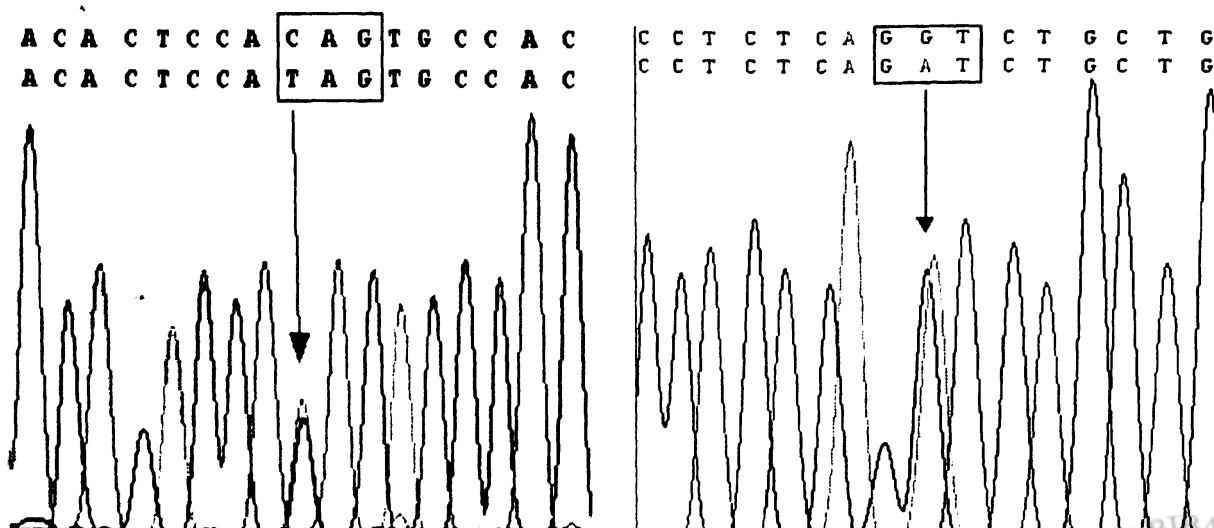
Ολόκληρο το *APC* ελέγχθηκε με αλληλούχηση. Δεν εντοπίστηκε παθογόνος μεταλλαγή. Ταυτοποιήθηκαν μόνο οι παρακάτω πολυμορφισμοί – σιωπηλές μεταλλαγές σε ετεροζυγωτία: C1458T (Y486Y), A1635G (A545A), G4479A (T1493T), A5034G (G1678G), G5268T (S1756S), A5880G (P1960P). Καμιά από αυτές δεν προκαλεί βλάβη στην πρωτεΐνη αφού δεν αλλάζουν αμινοξικά κατάλοιπα.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε το *MYH* με αλληλούχηση. Αρχικά στον ασθενή II:1 και στη συνέχεια και στις II:12 και II:14, ταυτοποιήθηκαν οι παθογόνες μεταλλαγές του *MYH*:

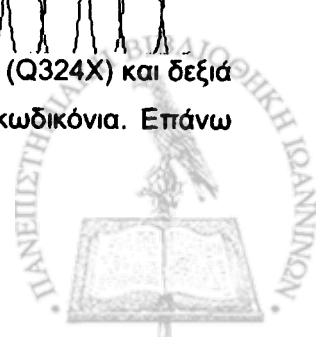
1. C970T (Εικ. 34): αντικατάσταση της κυτοσίνης από θυμίνη και μετατροπή του κωδικονίου 324 της γλουταμίνης σε κωδικόνιο τερματισμού – Q324X (αναμένεται να προκαλεί την παραγωγή ημιτελούς μη λειτουργικής πρωτεΐνης) και

2. G1145A (Εικ. 34): αντικατάσταση της γουανίνης από αδενίνη και μετατροπή του κωδικονίου της γλυκίνης σε κωδικόνιο ασπαρτικού – G382D.

Στην επόμενη γενιά οι μεταλλαγές «διαχωρίστηκαν» η Q324X στους III:11, III:18, III:20 και III:24 ενώ η G382D στους III:10, III:19, III:21, III:22, III:23 και III:25. Αυτό σημαίνει ότι βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα με αποτέλεσμα σε όσους τις φέρουν ταυτόχρονα να είναι απενεργοποιημένα και τα δυο αλληλόμορφα του *MYH*.



Εικόνα 34. Αριστερά φαίνεται το χρωματογράφημα της *MYH* μεταλλαγής C970T (Q324X) και δεξιά της *MYH* μεταλλαγής G1145A (G382D). Σε κουτί περικλείονται τα αντίστοιχα κωδικόνια. Επάνω φαίνεται η φυσιολογική και κάτω η μεταλλαγμένη αλληλουχία.



6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 Γενετικός έλεγχος στην ΟΑΠ

Κρίνοντας από τον αριθμό των 25 οικογενειών, που ελέγχθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, μπορεί να υποστηριχθεί ότι ο γενετικός έλεγχος της ΟΑΠ είναι πλέον εφικτός και στην Ελλάδα.

Ο αλγόριθμος της εξέτασης επιτρέπει την ολοκλήρωσή της σε μικρό χρόνο και με μικρό κόστος. Σε αυτό συμβάλει τα μέγιστα η χρήση της μεθόδου ανίχνευσης μεταλλαγών dHPLC για μια πρώτη γρήγορη σάρωση του γονιδίου APC για μεταλλαγές, προτού αυτές ταυτοποιηθούν με απ'ευθείας αλληλούχιση.

Το dHPLC έχει την ικανότητα ελέγχου μεγάλου αριθμού δειγμάτων στη μονάδα του χρόνου εφόσον κάθε ανάλυση δείγματος σε συγκεκριμένη θερμοκρασία χρειάζεται μόλις 8 λεπτά για να ολοκληρωθεί. Επιπλέον, το κόστος κάθε ανάλυσης μπορεί να κατέλθει ακόμη και στο 1,6 ευρώ (προσωπική επικοινωνία με Σταύρο Παπαδημητρίου – επιστήμονα εφαρμογών της Transgenomic Inc). Δεδομένου ότι το κόστος της αλληλούχισης ανά εκκινήτη ανέρχεται στην αγορά σε περισσότερα από 12 ευρώ (www.invitrogen.com, www.mwg-biotech.com), καταλαβαίνει κανείς την αξία της χρήσης του dHPLC. Αν χρειάζεται κάποιος να ελέγξει για παράδειγμα 10 προϊόντα PCR με αλληλούχιση θα χρειαστεί 120 ευρώ ενώ με dHPLC (με μέσο όρο 2 αναλύσεων ανά προϊόν) θα χρειαστεί μόνο 32 ευρώ.

Αυτά σε συνδυασμό με την αξεπέραστη ευαισθησία του, που ξεπερνά κάθε προγενέστερη μέθοδο ανίχνευσης, το καθιστούν ιδανικό για χρήση στο γενετικό έλεγχο⁷³.

Φυσικά κανείς δεν πρέπει να ξεχνάει ότι πρόκειται για μέθοδο ανίχνευσης και όχι ταυτοποίησης. Έτσι, παρά την υψηλή ευαισθησία του, πάντα υπάρχει η πιθανότητα του ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος. Στην παρούσα μελέτη είχαμε δυο περιπτώσεις (R564X και R876X) όπου η μεταλλαγή ανιχνεύτηκε όχι στις προτεινόμενες από το λογισμικό θερμοκρασίες αλλά σε εμπειρικά επιλεγμένη από τον χρήστη θερμοκρασία⁷³ (σελ. 81). Επομένως, χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή και εμπειρία στη χρήση μεθόδων ανίχνευσης και στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Σε κάθε περίπτωση για την ταυτοποίηση της εκάστοτε, ανιχνευμένης μεταλλαγής η αλληλούχιση είναι μονόδρομος.



Στην περίπτωση της ΟΑΠ ο πολύ χαρακτηριστικός της φαινότυπος επιτρέπει την καλή επιλογή των ασθενών και έτσι την επιτυχή εξακρίβωση της γενετικής βάσης της πάθησης σε μεγάλο ποσοστό των εξεταζομένων. Επιπλέον, η συσσώρευση περίπου του 50% των μεταλλαγών του *APC* στην περιοχή MCR καθιστά εύκολο, γρήγορο και οικονομικό τον γενετικό έλεγχο στην ΟΑΠ. Οκτώ από τις 13 παθογόνες μεταλλαγές του *APC* που εντοπίστηκαν σε αυτή τη μελέτη (Πίνακας 4) βρίσκονται στην αρχή του 15^{ου} εξωνίου (15a-15g).

Εκτός όμως από τις κοινές μεταλλαγές του *APC* (προσθήκες ή απαλοιφές μικρού αριθμού νουκλεοτιδικών βάσεων) υπάρχουν και σπανιότερες βλάβες σε αυτό το γονίδιο. Στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκε μια μεταλλαγή (IVS9+5G>A) που προκαλεί παθολογικό μάτισμα στο μετάγραφο του *APC* καθώς και μια μεγάλη γενωμική έλλειψη 250 χιλιάδων βάσεων που απαλείφει περισσότερο από το μισό γονίδιο σε επίπεδο χρωμοσώματος⁷⁴ (εξώνια 6 έως πέρα από το 15).

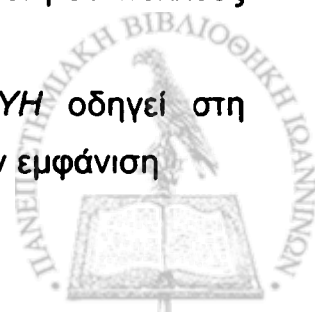
Η πρώτη ταυτοποιήθηκε με χρήση της RT-PCR ενώ η δεύτερη με χρήση του ελέγχου για μεγάλες αναδιατάξεις. Επομένως, το δίδυμο dHPLC και αλληλούχιση δεν είναι πάντα αρκετό για το γενετικό έλεγχο του *APC*. Οι μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις είναι αδύνατο να ελεγχθούν με την απλή PCR. Όταν έχει διαγραφεί ή έχει προστεθεί κάτι μεγαλύτερο από το προϊόν της PCR, τότε το προϊόν της PCR προέρχεται μόνο από το φυσιολογικό αλληλόμορφο, κρύβοντας με αυτόν τον τρόπο το μεγάλο γεγονός που έχει απενεργοποιήσει το δεύτερο αλληλόμορφο.

Ο έλεγχος του μεταγράφου και ο έλεγχος για μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις πρέπει απαραίτητα να συμπληρώνουν το σύστημα PCR-dHPLC-sequencing.

Το ίδιο υποστηρίζουν και οι Varesco *et al* (1994)⁶⁸ για τις μεταλλαγές «ματίσματος» ενώ άλλοι ερευνητές όπως οι Su *et al* (2002)⁴³ και οι Cao *et al* (2001)⁴⁴ αναφέρουν ότι οι μεγάλες αναδιατάξεις στο *APC* αντιστοιχούν στο 13% και 9% των ασθενών με ΟΑΠ, αντίστοιχα.

Τι γίνεται όμως με όσους ασθενείς έχουν λιγότερους από 100 πολύποδες; Σε αυτή την ομάδα των ασθενών, οι πολύποδες εμφανίζονται αργότερα στη ζωή τους, το ίδιο και ο ΚΠΕ. Υπάρχουν μερικές μεταλλαγές στο *APC* οι οποίες δεν τερματίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση αλλά απλώς αλλάζουν ένα αμινοξικό κατάλοιπο. Η D1822V μεταλλαγή ανιχνεύθηκε στην παρούσα μελέτη σε πολλούς ασθενείς ακόμη και σε συνδυασμό με παθογόνες μεταλλαγές.

Τελευταία η ανακάλυψη ότι η απενεργοποίηση του *MYH* οδηγεί στη συσσώρευση σωματικών μεταλλαγών στο *APC* με αποτέλεσμα την εμφάνιση



ΟΑΠ, έρχεται να προσθέσει άλλο ένα γονίδιο που πρέπει να ελέγχεται στους ασθενείς της ΟΑΠ¹⁵.

Ο αλγόριθμος εξέτασης που προτείνεται από αυτή τη μελέτη συμπεριλαμβάνει όλες τις παραπάνω εξετάσεις πέρα από τον κλασσικό έλεγχο του *APC* με ανίχνευση (dHPLC) και αλληλούχιση.

Φυσικά όλα ξεκινούν από ένα καλό ιατρικό και οικογενειακό ιστορικό. Αυτό όπως αποδείχθηκε δεν είναι πάντα εύκολο. Είχαμε οικογένειες όπου το ιστορικό ήταν πλούσιο σε πληροφορίες ενώ σε άλλες οικογένειες οι πληροφορίες ήταν ελάχιστες και συγκεχυμένες με αποτέλεσμα τον κίνδυνο της εσφαλμένης εκτίμησης για την κατάταξη της οικογένειας στην ομάδα κινδύνου για ΟΑΠ.

Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα και την ποσότητα της πληροφορίας είναι το μορφωτικό επίπεδο, το δυσάρεστο της συζήτησης για ασθένειες όπως ο καρκίνος, η νοοτροπία της απόκρυψης του προβλήματος από τον κοινωνικό περίγυρο και η άγνοια ή και αμφισβήτηση των ωφελειών του γενετικού ελέγχου ειδικά για τους ήδη ασθενείς.

Όποτε όμως εξηγήθηκε στους ασθενείς η δυνατότητα γέννησης υγείων απογόνων με εξωσωματική γονιμοποίηση και προ-εμφυτευτικό έλεγχο καθώς και η απαλλαγή των μη-φορέων συγγενών από το άγχος και το κόστος (σωματικό και οικονομικό) της τακτικής κολονοσκόπησης, η γνώμη τους για τον γενετικό έλεγχο ήταν πολύ θετική.

Τέλος, στο σύνολο των 18 οικογενειών στις οποίες εντοπίστηκε η παθογόνος μεταλλαγή (*APC* ή *MYH*), 28 άτομα βρέθηκαν να μη φέρουν τη μεταλλαγή των συγγενών τους. Αυτοί οι 28 άνθρωποι δε θα χρειαστεί να ζουν με το άγχος αλλά και με την ταλαιπωρία των κολονοσκοπήσεων.

6.2 Γονότυπος και μεταλλαγές γονιδίων στην ΟΑΠ

6.2.1 *De-novo* και κανούργιες (*novel*) μεταλλαγές

Τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα του *APC* διατηρούν υψηλή συχνότητα στον ανθρώπινο πληθυσμό, δίνοντας με αυτόν τον τρόπο υψηλή σχετικά συχνότητα και στην πάθηση που προκαλούν.

Όμως η βαρύτητα της νόσου δίνει σοβαρό εξελικτικό μειονέκτημα στα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα, όσο έχει να κάνει με τη διασπορά τους στον πληθυσμό.



Έτσι, αυτό που τελικά διατηρεί υψηλή τη συχνότητά τους δεν είναι άλλο από το υψηλό ποσοστό *de-novo* μεταλλαγών, που υφίσταται συνεχώς το γονίδιο APC και οι οποίες φθάνουν το 30% του συνόλου των μεταλλαγών του¹⁸. Αυτές είτε συμβαίνουν στα γεννητικά κύτταρα είτε στο πρώτο ανθρώπινο κύτταρο, το ζυγώτο.

Στην παρούσα μελέτη το ποσοστό των *de-novo* μεταλλαγών ήταν 35% (6 από 17 οικογένειες). Επόμενο είναι με τέτοια υψηλά ποσοστά να παρατηρείται και υψηλό ποσοστό καινούργιων APC μεταλλαγών σε κάθε νέα μελέτη. Σε αυτή τη μελέτη εντοπίστηκαν 5 καινούργιες μεταλλαγές που δεν έχουν αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία.

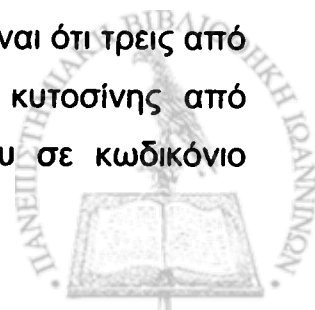
6.2.2 Τύποι και ποσοστά μεταλλαγών

Εντοπίστηκαν 13 μεταλλαγές του APC σε 17 οικογένειες. Κάποιες από τις μεταλλαγές λοιπόν εμφανίζονταν σε περισσότερες της μιας οικογένειες. Η 3927-3931del5 απαντάται σε δυο οικογένειες, το ίδιο και η C3133T. Η C1690T απαντάται σε τρεις από τις 17 οικογένειες (ποσοστό περίπου 18%) και σε καμμία από αυτές δεν είναι *de-novo*. Στη μια οικογένεια την παρακολουθούμε σε να μεταβιβάζεται σε τρεις συνεχόμενες γενιές ενώ στις άλλες δυο οικογένειες σε δυο συνεχόμενες γενιές. Βέβαια για να μιλήσει κανείς για φαινόμενο ιδρυτικής μεταλλαγής χρειάζονται δεδομένα από περισσότερες οικογένειες και δεδομένα του απλοτύπου τους.

Από τις 13 παθογόνες μεταλλαγές (Πίνακας 7) που εντοπίστηκαν στο APC, μια είναι μικρή προσθήκη (7,7%), άλλη μια είναι μεγάλη γενωμική έλλειψη (7,7%), πέντε είναι μικρές απαλοιφές (38,5%) και έξι είναι αντικαταστάσεις βάσεων (46,2%). Αυτά τα ποσοστά συμφωνούν με το γενικό κανόνα⁴² στο APC ότι δηλαδή υπάρχουν περισσότερες μικρές απαλοιφές από μικρές προσθήκες αλλά διαφωνούν στον γενικό κανόνα ότι οι αντικαταστάσεις βάσεων είναι λιγότερες από τις απαλοιφές.

Το δείγμα όμως είναι μικρό και δυο από τις αντικαταστάσεις ευθύνονται για το φαινότυπο πέντε οικογενειών, επομένως οι διαφορές με τον κανόνα μπορούν να εξηγηθούν.

Ένα άλλο σημαντικό που παρατηρούμε στα αποτελέσματα είναι ότι τρεις από τις 13 (23%) παθογόνες μεταλλαγές αφορούν αντικατάσταση κυτοσίνης από θυμίνη σε κωδικόνιο αργινίνης (R = CGA) και μετατροπή του σε κωδικόνιο τερματισμού (X = TGA).



Είναι γνωστό ότι οι θέσεις CpG έχουν συχνά την κυτοσίνης τους μεθυλιωμένη και με αυτόν τον τρόπο είναι εκτεθειμένες σε τυχαία απαμίνωσή της με αποτέλεσμα να εμφανίζουν υψηλό ποσοστό μεταλλαγής⁷⁵.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μια ομάδα πολυμορφισμών τείνουν να εμφανίζονται σε πολλά άτομα ως ομάδα. Πρόκειται για σιωπηλές μεταλλαγές, δηλαδή δεν αλλάζουν το αμινοξικό κατάλοιπο. Είναι οι C1458T (Y486Y), A1635G (A545A), G4479A (T1493T), A5034G (G1678G), G5268T (S1756S), A5880G (P1960P). Όπως συμβαίνει και σε άλλα γονίδια, πιθανόν να βρίσκονται σε ανισοροπία σύνδεσης (linkage disequilibrium) και να αποτελούν έναν συχνό απλότυπο στον ελληνικό πληθυσμό.

Τέλος όσον αφορά τη μεταβίβαση αυτή φαίνεται όντως να ακολουθεί τη μεντελική κληρονομικότητα. Οι μητέρες φορείς μεταβίβασαν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο στο 54% των παιδιών τους (Πίνακας 6). Οι πατέρες μεταβίβασαν στο 62% των παιδιών τους (Πίνακας 6). Η απόκλιση από το 50% προφανώς οφείλεται στο πολύ μικρό δείγμα (4 πατέρες φορείς).

6.2.3 Η παρανοηματική D1822V

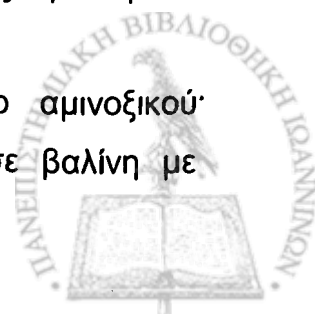
Το ερώτημα αν η D1822V είναι παθογόνος ή όχι έχει απασχολήσει αρκετούς ερευνητές. Γεγονός είναι ότι η συγκεκριμένη μεταλλαγή εμφανίζεται σε υψηλά ποσοστά και στο φυσιολογικό πληθυσμό.

Σε μια γρήγορη δοκιμασία επιλέξαμε 12 άτομα ηλικίας μεγαλύτερης των 60 ετών, χωρίς ιστορικό νεοπλασίας και τα ελέγξαμε για την παρουσία της D1822V με απ'ευθείας αλληλούχιση του PCR προϊόντος 15L. Σε ένα ποσοστό 67% ήταν ετερόζυγοι για την παραπάνω μεταλλαγή και στο 33% φυσιολογικοί.

Από την άλλη μεριά είχαμε δυο διαφορετικών οικογενειών ασθενείς με ΟΑΠ οι οποίοι ήταν αρνητικοί για σημειακές ή μεγάλες μεταλλαγές στο APC και για σημειακές μεταλλαγές στο MYH. Μόνο η παρανοηματική D1822V εντοπίστηκε και στους δυο, σε ετεροζυγωτία.

Υπάρχουν μελέτες που συσχετίζουν την επίδραση της D1822V στο φαινότυπο με τα επίπεδα των λιπιδίων στη διατροφή⁴⁷. Άλλες μελέτες τη θεωρούν απλό πολυμορφισμό⁴⁸.

Αυτή η μεταλλαγή προκαλεί μεγάλη αλλαγή σε επίπεδο αμινοξικού καταλοίπου (ασπαρτικό υδρόφιλο, με αμιδική πλευρική ομάδα σε βαλίνη με αλειφατική πλευρική ομάδα).



Βρίσκεται ανάμεσα στην τέταρτη και στην πέμπτη θέση δέσμευσης της β-κατενίνης (για αποικοδόμηση) και κοντά στη δεύτερη θέση δέσμευσης της αξίνης (κωδικόνιο 1730-1733) που φέρει την «υπογραφή» S-A-M-P (σερίνη, αλανίνη, μεθειονίνη, προλίνη).

Δεδομένου ότι η αξίνη παίζει το ρόλο ικριώματος στο σύμπλοκό της με την APC και τη β-κατενίνη³⁵, θα μπορούσε κάποιος να υποθέσει ότι μια τέτοια αλλαγή όπως η D1822V είναι ικανή να αποσταθεροποιεί σε κάποιο βαθμό το σύμπλοκο ελατώνοντας την ικανότητά του να ρυθμίζει τα επίπεδα της ελεύθερης β-κατενίνης στο κύτταρο.

Η αποσταθεροποίηση μάλλον θα ήταν μετρίου βαθμού έτσι ώστε να ταιριάζει με το φαινότυπο της εξασθενημένης ΟΑΠ που εμφανίζουν οι παραπάνω ασθενείς.

Ενδιαφέρον είναι ότι στην οικογένεια 2963 (Εικ. 10) η ασθενής III:3 ομόζυγη μεταλλαγμένη για τη θέση 1822 εμφανίζει εκτός από πολύποδες και λίπωμα στομάχου σε αντίθεση με την αδερφή της, ασθενή III:4 που είναι ετερόζυγη και έχει μόνο πολύποδες. Το ίδιο περίπου συμβαίνει και στην οικογένεια 3441 (Εικ. 12) όπου ο ασθενής III:2 είναι ετερόζυγος για την D1822V ενώ ο αδερφός του, ασθενής III:1 είναι φυσιολογικός ως προς τη θέση 1822: ο III:2 έχει πολύποδες και στο παχύ έντερο και στο στομάχι ενώ ο III:1 μόνο στο παχύ έντερο.

Επομένως είναι δυνατό η D1822V να έχει μια ελαφρά επίδραση στο φαινότυπο. Μια τέτοια υπόθεση θα χρειαζόταν να στηριχθεί από πειράματα κρυσταλλογραφίας του συμπλόκου καθώς και πειράματα με διαγονιδιακά ζώα.

Τίποτα από αυτά δεν έχει γίνει και θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να γινόταν.

6.2.4 Μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις

Στην οικογένεια 7400 εντοπίστηκε μια μεγάλη γενωμική έλλειψη στο χρωμόσωμα 5q21 που απαλοίζει περισσότερο από το μισό APC σε γενωμικό επίπεδο. Η έλλειψη αυτή ως αναμενόμενο δεν εντοπίστηκε με PCR-dHPLC-sequencing αλλά με MLPA. Τα πειράματα FISH έδειξαν ότι η έλλειψη έχει μήκος 250 χιλιάδων βάσεων.

Ο φαινότυπος του ασθενούς ήταν κλασσικής ΟΑΠ με περισσότερους από 100 πολύποδες γεγονός που συμφωνεί με άλλες μελέτες που αναφέρουν ότι οι μεγάλες αναδιατάξεις προκαλούν κλασσική ΟΑΠ⁷⁶.



Η παρουσία CHRPE σε αυτόν τον ασθενή έρχεται σε αντίθεση με τη γενική παρατήρηση ότι ασθενείς με μεταλλαγές πριν το εξώνιο 9 του APC δεν αναπτύσσουν CHRPE. Οι Davies *et al* (1995)⁷⁷ έχουν επίσης αναφέρει έναν ασθενή με μεταλλαγή ματίσματος στο εσώνιο 4 ο οποίος είχε CHRPE.

Ειδικότερα, οι Wallis *et al* (1994)⁷⁸ υποστηρίζουν ότι η πιθανότητα για CHRPE είναι ανάλογη με το μοριακό βάρος της ημιτελούς πρωτεΐνης APC. Αυτό σε συνδυασμό με το δεδομένο του FISH ότι η έλλειψη περιλαμβάνει και κάτι από το 3' άκρο του γονιδίου MCC, αφήνει ανοικτό το ενδεχόμενο σε αυτόν τον ασθενή να σχηματίζεται μια υβριδική νέα πρωτεΐνη από το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο.

Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να ελεγχθεί με πειράματα 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).

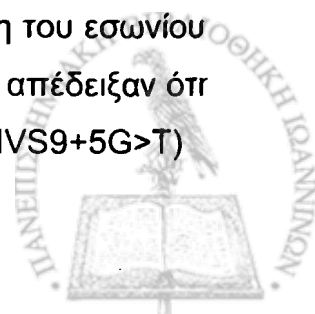
Γεγονός είναι ότι αν η μια στις οκτώ (12,5%) «APC αρνητικές» οικογένειες φέρει μεγάλη γενωμική αναδιάταξη, ο έλεγχος για τέτοιες μεταλλαγές κρίνεται απαραίτητος σε αυτή την ομάδα των ασθενών. Πιθανόν το ποσοστό αυτών των μεταλλαγών να έχει υποεκτιμηθεί μέχρι σήμερα λόγω των συμβατικών μεθόδων ανίχνευσης μεταλλαγών που «βλέπουν» μόνο σημειακές μεταλλαγές ή μικρές προσθήκες και απαισιόφες.

6.2.5 Μεταλλαγές ματίσματος

Στην οικογένεια 8919 ταυτοποιήθηκε η IVS9+5G>A μεταλλαγή που προκαλεί παθολογικό μάτισμα στο μετάγραφο του APC. Ο φαινότυπος του ασθενούς προσομοιάζει περισσότερο στην εξασθενημένη ΟΑΠ, με μικρούς πολύποδες κυρίως στο δεξί κόλον.

Στα λεμφοκύτταρα του ασθενούς εντοπίστηκε ένα παθολογικό μετάγραφο, αποτέλεσμα της απ'ευθείας ένωσης του εξωνίου 8 με το εξώνιο 10, το οποίο προκαλεί μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης μέσα στο εξώνιο 10 και δημιουργία κωδικονίου τερματισμού, επομένως παραγωγή «κολοβής» πρωτεΐνης. Το φυσιολογικό μετάγραφο υπήρχε στον ασθενή αλλά προφανώς σε πολύ μικρότερο ποσοστό αφού έδωσε πολύ λιγότερο προϊόν στην RT-PCR σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες αλλά και με το παθολογικό (Εικ. 20B).

Η συγκεκριμένη μεταλλαγή δεν αλλάζει την αλληλουχία GT δότη του εσωνίου αλλά αλλάζει μια πολύ συντηρημένη βάση. Οι Varesco *et al* (1994)⁶⁸ απέδειξαν ότι η αλλαγή από γουανίνη σε θυμίνη στην ίδια θέση του ίδιου εσωνίου (IVS9+5G>T)



προκαλεί μερική απαλοιφή του εξωνίου 9 από ώριμο μετάγραφο του γονιδίου και επομένως φαινότυπο εξασθενημένης ΟΑΠ. Η απουσία CHRPE από αυτόν τον ασθενή συμφωνεί με την παρατήρηση των Olschwang *et al* (1993)⁷⁹, ότι μεταλλαγές πριν το εξώνιο 9 συνήθως δεν προκαλούν CHRPE.

Οι περισσότερες μεταλλαγές που επηρεάζουν το μάτισμα συμβαίνουν στις θέσεις -1, +1 και +2 των εσωνίων. Λίγες αναφορές υπάρχουν για μεταλλαγές στη θέση +5. Όμως αυτή η θέση όπως και η +1 είναι πολύ σημαντικές για το μάτισμα αφού οι γουανίνες τους ζευγαρώνουν με την αντίστοιχη περιοχή του U1 snRNA. Είναι γνωστό ότι η σωστή σύνδεση του U1 snRNA είναι από τα πιο κρίσιμα βήματα στη σωστή διαμόρφωση του πρώιμου mRNA ώστε να ακολουθήσει η αποκοπή και η συρραφή στο σύμπλοκο του ματίσματος (spliceosome)^{80,81}.

Οι Moisisio *et al* (2002)⁸² επίσης αναφέρουν μεταλλαγή στην +5 θέση του εσωνίου 4 (IVS4+5G>C) του APC να προκαλεί απαλοιφή του εξωνίου 4 και εξασθενημένη ΟΑΠ.

Από όλα αυτά συμπεραίνουμε ότι η μεταλλαγή IVS9+5G>A είναι υπεύθυνη για το φαινότυπο του ασθενούς και ότι η +5 γουανίνη των εσωνίων είναι μια πολύ συντηρημένη και μεγάλης λειτουργικής σημασίας νουκλεοτιδική βάση.

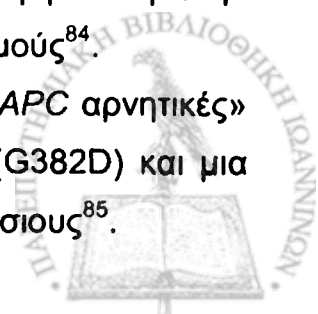
6.2.6 Μεταλλαγές στο MYH και ΟΑΠ

Ακόμη και οι φύλακες (gatekeepers) χρειάζονται φροντίδα από κάποιον (caretakers). Αυτό ταιριάζει απόλυτα στη σχέση APC και MYH.

Η εύστοχη παρατήρηση ότι ασθενείς ΟΑΠ χωρίς κληρονομούμενη μεταλλαγή στο APC έχουν υψηλό ποσοστό σωματικών μεταστροφών του τύπου G:C σε T:A στο APC, έστρεψε την προσοχή των ερευνητών στο σύστημα επιδιόρθωσης οξειδωτικών βλαβών του DNA μέσω εκτομής βάσεων (BER)¹⁵. Έτσι μια σειρά μεταλλαγών του MYH βρέθηκαν σε αυτήν την ομάδα των ασθενών. Η MYH πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για την επιδιόρθωση του κακού ζεύγους αδενίνης με 8-όξο-γουανίνη.

Από μια σειρά ερευνητών παρατηρήθηκε ότι δυο μεταλλαγές στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, η Y165C και η G382D προκαλούν μεγάλη μείωση στην ενεργότητα⁸³ και ότι είναι οι πιο συχνές στους καυκάσιους πληθυσμούς⁸⁴.

Στην παρούσα μελέτη μια (Εικ. 33) από τις οκτώ (12,5%) «APC αρνητικές» οικογένειες βρέθηκε να φέρει τη μια από αυτές τις μεταλλαγές (G382D) και μια μεταλλαγή τερματισμού (Q324X), που επίσης έχει βρεθεί σε καυκάσιους⁸⁵.



Σε αυτή την οικογένεια ο φαινότυπος των ασθενών (που έφεραν και τις δυο μεταλλαγές σε ετεροζυγωτία) ήταν εξασθενημένη ΟΑΠ, με μεγαλύτερη ηλικία έναρξης για τους πολύποδες και για τον καρκίνο. Σε αυτή την οικογένεια οι ετερόζυγοι είτε μόνο για τη μια είτε μόνο για την άλλη μεταλλαγή δεν είχαν νοσήσει ούτε είχαν συμπτώματα μέχρι και την ηλικία των 30 ετών, γεγονός που συμφωνεί με την παρατήρηση ότι η *ΜΥΗ* – πολυποδίαση κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Υπάρχουν όμως πολλές μελέτες όπου αυτό αμφισβητείται από ασθενείς με ΟΑΠ που φέρουν μόνο μια μεταλλαγή στο *ΜΥΗ*.

Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι ο έλεγχος των ασθενών με ΟΑΠ στους οποίους δεν εντοπίζεται παθογόνος σημειακή μεταλλαγή στο *ΑΡC*, πρέπει απαραίτητα να περιλαμβάνει έλεγχο για μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις και έλεγχο του γονιδίου *ΜΥΗ* για τις περιπτώσεις εξασθενημένης ΟΑΠ.

6.3 Γονότυπος και φαινότυπος στην ΟΑΠ

6.3.1 Εξω-εντερικές αλλοιώσεις – συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου

Στην οικογένεια 3843 μια νεαρή φορέας της παθογόνου *ΑΡC* μεταλλαγής R876X εμφάνισε μυελοβλάστωμα παρεγκεφαλίδος σε ηλικία 14 ετών. Πράγματι, οι Hamilton *et al* (1995)²¹ υπολόγισαν ότι οι φορείς παθογόνου μεταλλαγής στο *ΑΡC* έχουν 92 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για ανάπτυξη μυελοβλαστώματος στην παρεγκεφαλίδα. Επιπλέον η παραπάνω μεταλλαγή αποτελεί εξαίρεση στην γενική παρατήρηση ότι οι εξωεντερικές αλλοιώσεις προκαλούνται από μεταλλαγές μετά το κωδικόνιο 1403.

Στην οικογένεια 7416 ο ασθενής φορέας της R564X *ΑΡC* μεταλλαγής εμφάνισε δεσμοειδή όγκο κοιλίας γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με την παρατήρηση ότι οι δεσμοειδείς όγκοι προκαλούνται από μεταλλαγές μεταξύ των κωδικονίων 1310 και 2011⁴⁶. Εμφάνισε επίσης πολύποδες στο δωδεκαδάκτυλο σε αντίθεση με την παρατήρηση για συσχέτιση των πολυπόδων του δωδεκαδακτύλου με μεταλλαγές μεταξύ των κωδικονίων 976 και 1067⁴⁶.



Στην οικογένεια 7552 η ασθενής φορέας της *APC* παθογόνου μεταλλαγής 1577insT εμφάνισε ηπατοβλάστωμα σε πολύ μικρή ηλικία. Αυτό συμφωνεί με την παρατήρηση που συνδέει τις μεταλλαγές στα κωδικόνια από 457 έως 1309 με την εμφάνιση ηπατοβλαστώματος⁴⁶.

Στην οικογένεια 4218 η ασθενής που φέρει την Q1045X μεταλλαγή, εμφάνισε καρκίνο θυρεοειδούς. Αυτό συμφωνεί με την παρατήρηση ότι ο καρκίνος στον θυρεοειδή πλήττει τους ασθενείς ΟΑΠ που φέρουν μεταλλαγή στο *APC* πριν το κωδικόνιο 1220⁴⁶.

Στην οικογένεια 5743 εντοπίστηκε η μεταλλαγή 3927-3931del5. Αυτή η μεταλλαγή είναι γνωστή για τον πολύ επιθετικό φαινότυπο που προσδίδει και για την μικρή ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων⁴⁶. Σε αυτή την οικογένεια ο ασθενής διαγνώσθηκε σε ηλικία μόλις 7 ετών. Η μεταλλαγή ήταν *de-novo*. Μάλιστα πρόκειται για την πιο συχνή μεταλλαγή του *APC*. Σε αυτό σίγουρα συμβάλλει η αλληλουχία των βάσεων στην περιοχή της μεταλλαγής.

Στην περιοχή 3927 υπάρχουν δυο συνεχόμενες επαναλήψεις της αλληλουχίας AAAAG. Αυτό προφανώς έχει σαν αποτέλεσμα να γλιστρά η μήτρα προς τη νεοσυντιθέμενη αλληλουχία DNA κατά τη φάση της αντιγραφής. Έτσι, δημιουργείται θηλιά η οποία περιέχει τη μια επανάληψη με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία της έλλειψης αυτής της μιας επανάληψης. Παρόμοια γεγονότα αναφέρονται και σε άλλα ανθρώπινα γονίδια⁸⁶.

Τέλος σε γενικές γραμμές και σε συμφωνία με τη σχέση βαρύτητας φαινοτύπου και θέσης της μεταλλαγής, είχαμε κλιμάκωση των εκδηλώσεων του φαινοτύπου (αριθμός πολυπόδων, ηλικία έναρξης και εξω-εντερικές αλλοιώσεις) καθώς οι μεταλλαγές εμφανίζονται από την αρχή του 15^{ου} εξωνίου και προχωρώντας προς το τέλος της MCR περιοχής (Πίνακας 7), με αποκορύφωμα την 3927-3931del5 μεταλλαγή στο κωδικόνιο 1309.

Αυτό πιθανόν να έχει να κάνει με το ότι όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος της «κολοβής» πρωτεΐνης, που παράγεται από το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, τόσο πιο σταθερή είναι αυτή. Σαν αποτέλεσμα διμερίζεται ποσοτικά με τη φυσιολογική και την αχρηστεύει και αυτή σε μια διαδικασία που ονομάζεται αρνητική επικράτηση³⁴.

Σε γενικές γραμμές τα αποτελέσματα της μελέτης συμφωνούν με την ήδη προτεινόμενη συσχέτιση φαινοτύπου – γονοτύπου στην ΟΑΠ και οι όποιες αποκλίσεις μάλλον επιβεβαιώνουν παρά αναιρούν τους κανόνες.



7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα, καταλήγει κανείς στο συμπέρασμα ότι ο γενετικός έλεγχος προσφέρει σημαντική πληροφορία σε πολλές οικογένειες με ΟΑΠ. Είναι σημαντικό στο 72% των οικογενειών να μπορεί να δοθεί απάντηση. Όσον αφορά το ποσοστό του 80% σε επίπεδο ασθενών, αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα ποσοστά που αναφέρονται διεθνώς από αντίστοιχες μελέτες³⁵.

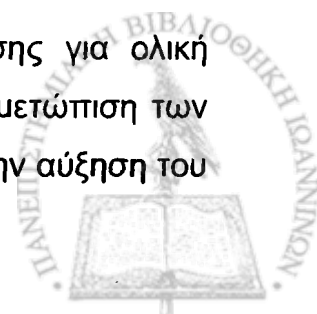
Πέρα από τις όποιες μικρές διαφοροποιήσεις από τα γενικά στατιστικά της ασθένειας όπως για παράδειγμα τις σχέσεις γονοτύπου – φαινοτύπου, που οφείλονται στο μικρό δείγμα των 25 οικογενειών, σε γενικές γραμμές τα αποτελέσματα και οι παρατηρήσεις της παρούσας μελέτης συμφωνούν με όσα έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα για τη γενετική βάση της ΟΑΠ.

Η εκπόνηση της μελέτης ήταν αρκετά διδακτική για τη μεθοδολογία και την ταξινόμηση των πληροφοριών και των αποτελεσμάτων. Ένα από τα πιο σημαντικά, που έγιναν αντιληπτά είναι η αξία της πληροφορίας, που λαμβάνεται από τον ασθενή. Είναι απαραίτητο και κρίσιμο να λαμβάνεται πολύ λεπτομερές οικογενειακό ιστορικό και πλήρες ιατρικό ιστορικό. Έτσι, μπορεί να εκτιμηθεί σωστά ο κίνδυνος να πρόκειται όντως για ΟΑΠ, αλλά στη συνέχεια να κατευθυνθεί και να ξεκινήσει η έρευνα στο σωστό τμήμα του γονιδίου ώστε να γίνει οικονομία χρόνου και χρήματος.

Η χρήση του dHPLC ως μεθόδου ανίχνευσης σε συνδυασμό με την αλληλούχιση (sequencing) για την ταυτοποίηση των μεταλλαγών κρίνεται εξαιρετικά επιτυχής και ήδη χρησιμοποιείται ευρέως διεθνώς. Επιπρόσθετα, μεταλλαγές κοντά στα σημεία σύνδεσης με τα εσώνια, πρέπει οπωσδήποτε να ελέγχονται στο επίπεδο του mRNA με RT-PCR.

Εκείνοι οι ασθενείς στους οποίους δεν εντοπίζεται σημειακή παθογόνος μεταλλαγή είναι πολύ σημαντικό να ελέγχονται για μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις του *APC* και για κληρονομούμενες μεταλλαγές του *MYH*, ανάλογα με τον αριθμό των πολυπόδων. Με τον έλεγχο του *MYH* καλύπτεται ένας σημαντικός αριθμός ασθενών που έχουν λιγότερους από 100 πολύποδες.

Ο γενετικός έλεγχος βοηθά στη σωστή λήψη της απόφασης για ολική κολεκτομή στους φορείς, καθώς και στη σωστή προφυλακτική αντιμετώπιση των ασθενών με αποτέλεσμα τη βελτίωση της ποιότητας ζωής τους και την αύξηση του προσδόκιμου της.



Επιπλέον, τους δίνει τη δυνατότητα να σταματήσουν τη μεταβίβαση της μεταλλαγής στους απογόνους τους με εξωσωματική γονιμοποίηση και προεμφυτευτικό έλεγχο.

Φυσικά απαλλάσει τους μη φέροντες τη μεταλλαγή των συγγενών τους από το προσωπικό βάρος των συνεχών κολονοσκοπήσεων.

Παραμένει όμως ένα ποσοστό ασθενών στους οποίους με κανέναν από τους παραπάνω τρόπους δεν ταυτοποιείται μεταλλαγή στα μέχρι σήμερα γνωστά γονίδια υπεύθυνα για την ΟΑΠ.

Εδώ θα βοηθήσουν έρευνες για τις επιπτώσεις των παρανοηματικών μεταλλαγών στο φαινότυπο όπως είναι η D1822V, έρευνες στους υποκινητές και στην έκφραση των γονιδίων, ακόμη και έρευνες για περισσότερα άγνωστα μέχρι τώρα, γονίδια που θα μπορούσαν να θεωρηθούν και αυτά υπεύθυνα για την ΟΑΠ.

Σύμφωνα με τα παραπάνω η αξία του αρνητικού αποτελέσματος ελαφρώς υποβαθμίζεται, όμως σε σχέση με τα οφέλη του γενετικού ελέγχου αυτό είναι σωστό να λειτουργήσει προς την κατεύθυνση της εντατικοποίησης της έρευνας για τη διαλεύκανση όλο και περισσότερων αιτιών που προκαλούν τη συγκεκριμένη νόσο με απώτερο στόχο την προσφορά προς τον άνθρωπο.



8. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Είναι η καθιέρωση και στην Ελλάδα μιας γρήγορης και αξιόπιστης μοριακής μεθόδου ταυτοποίησης κληρονομούμενων μεταλλαγών του γονιδίου *APC* και η συλλογή και καταγραφή πληροφοριών για τις οικογένειες με Οικογενή Αδενωματώδη Πολυποδίαση (ΟΑΠ) από όλη την Ελλάδα. Η ανεύρεση των μεταλλαγών είναι καθοριστική για τους εξής λόγους:

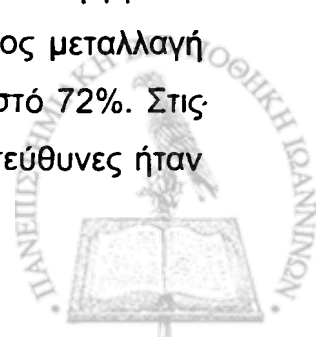
A) Σε όσους ταυτοποιηθεί παθογόνος μεταλλαγή, που σημαίνει και αυξημένη προδιάθεση για καρκίνο του παχέος εντέρου καθώς και άλλες εξω-εντερικές αλλοιώσεις και καρκίνους, παρακολουθούνται συστηματικά.

B) Όσοι είναι αρνητικοί σταματούν να ζουν με το φόβο του αυξημένου κινδύνου και το βάρος της συνεχούς ιατρικής εξέτασης με κολonosκόπηση.

Γ) Έχοντας την πληροφορία της μεταλλαγής δίνεται η δυνατότητα στους φορείς να έχουν υγιείς απογόνους χρησιμοποιώντας τα επιτεύγματα της επιστήμης στον τομέα του προγεννητικού και προεμφυτευτικού ελέγχου και της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Υλικό και Μέθοδοι: Το DNA όσων ατόμων πληρούν τα κριτήρια επιλογής απομονώνεται από λεμφοκύτταρα ολικού περιφερικού αίματος. Τα κριτήρια επιλογής των εξεταζομένων είναι: καρκίνος του παχέος εντέρου ή/και η ύπαρξη πάνω από 100 πολυπόδων στο παχύ έντερο στην ηλικία των 20 με 40 ετών. Η ανίχνευση των μεταλλαγών γίνεται στον αναλυτή WAVE DNA Fragment Analysis System (Transgenomic, Inc., USA) ενώ η ταυτοποίησή τους γίνεται με αλληλούχιση του DNA στον αναλυτή ABI Prism® 310 (Applied Biosystems, USA). Η ανίχνευση μεγάλων γενωμικών αναδιατάξεων γίνεται με τη μέθοδο MLPA (Multiplex Ligation dependent Probe Amplification) ενώ οι μεταλλαγές που επηρεάζουν το μάτισμα του mRNA ελέγχονται με RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction).

Αποτελέσματα και συζήτηση: Σε 25 οικογένειες (σύνολο 105 ατόμων) με φαινότυπο ΟΑΠ εξετάστηκαν 40 ασθενείς με ΟΑΠ και 53 συγγενείς τους. Σε 32 από τους 40 ασθενείς – ποσοστό 80% - εντοπίστηκε η υπεύθυνη μεταλλαγή για το φαινότυπο της ΟΑΠ. Σε επίπεδο οικογένειας η υπεύθυνη παθογόνος μεταλλαγή εντοπίστηκε σε 18 από τις 25 οικογένειες, που εξετάστηκαν, ποσοστό 72%. Στις 17 από αυτές η μεταλλαγή ήταν στο *APC* ενώ σε μια οικογένεια υπεύθυνες ήταν δυο κληρονομούμενες μεταλλαγές στο *MYH*.



Εντοπίστηκαν 13 παθογόνες μεταλλαγές: μια μικρή προσθήκη, μια μεγάλη γενωμική έλλειψη 250 χιλιάδων βάσεων, πέντε μικρές απαλοιφές, έξι αντικαταστάσεις βάσεων εκ των οποίων η μια επηρεάζει το φυσιολογικό μάτισμα του mRNA. Επίσης, εντοπίστηκαν μια παρανοηματική μεταλλαγή και 11 πολυμορφισμοί, δηλαδή σιωπηλές μεταλλαγές. Πέντε από τις παθογόνες μεταλλαγές που ταυτοποιήθηκαν δεν είχαν αναφερθεί ξανά στη διεθνή βιβλιογραφία. Σε έξι από τις 17 οικογένειες - ποσοστό περίπου 35% - με μεταλλαγή στο APC, η μεταλλαγή είχε *de-novo* εμφάνιση. Από τους 40 ασθενείς οι 21 ήταν γυναίκες και οι 19 άντρες. Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών κατά την πρώτη διάγνωση της πάθησης ήταν τα 26 έτη. Η μικρότερη ηλικία εμφάνισης που παρατηρήθηκε ήταν σε ένα αγόρι 7 ετών και η μεγαλύτερη σε έναν άντρα 66 ετών.

Συμπεράσματα: Ο συνδυασμός dHPLC και αλληλούχισης και ο χαρακτηριστικός φαινότυπος της ΟΑΠ επιτρέπουν την επιτυχή, οικονομική και ακριβείας ταυτοποίηση των υπεύθυνων μεταλλαγών σε μεγάλο ποσοστό ασθενών που αγγίζει το 80%. Όσοι ασθενείς ΟΑΠ δεν έχουν σημειακή μεταλλαγή στο APC πρέπει απαραίτητα να ελέγχονται για μεγάλες γενωμικές αναδιατάξεις του APC και για κληρονομούμενες μεταλλαγές του MYH.



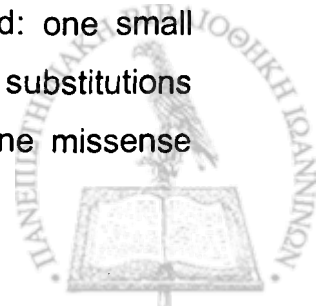
9. ABSTRACT

Purpose: The purpose of this study is the establishment of a fast and reliable molecular method in Greece in order to detect and identify germline mutations of the *APC* gene. Also, the purpose is to collect and record information regarding Familial Adenomatous Polyposis (FAP) from all over Greece. Identification of the mutations is crucial for the following reasons:

- a. Those patients identified as carriers of a pathogenic mutation, means that they carry a predisposition for colorectal cancer and several extra-colonic manifestations including extra-colonic cancers. These carriers are included in a close follow up program.
- b. Those who test negative are relieved from the burden of the disease and the often colonoscopic examinations.
- c. The information for the mutation gives the opportunity to the carriers to give birth to healthy children using prenatal and pre-implantation diagnosis and *in-vitro* fertilization methods.

Materials and Methods: DNA is extracted from peripheral blood lymphocytes from the patients that fulfill the selection criteria. The criteria are colorectal cancer and/or more than a hundred polyps in the colon between the age of 20 to 40. Mutation detection is carried out on the WAVE DNA Fragment Analysis System (Transgenomic, Inc., USA) and identification on the ABI Prism® 310 (Applied Biosystems, USA). Screening for large genomic rearrangements is performed by the MLPA method (Multiplex Ligation dependent Probe Amplification) while splicing affecting mutations are evaluated with RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction).

Results and discussion: In 25 families (105 individuals) with the FAP phenotype, 40 patients were examined and 53 from their relatives. In 32 of the 40 patients (80%) the responsible mutation has been identified. In the family level the mutation has been identified in 18 out of 25 families (72%). In 17 families the mutation was identified in the *APC* gene, while in one family two germline mutations of the *MYH* gene were identified. Thirteen pathogenic mutations were identified: one small insertion, one large deletion of 250 Kbp, five small deletions and six substitutions while one of the was affecting the normal mRNA splicing. Also, one missense mutation and 11 polymorphisms – silent mutations were identified.



Five out of the thirteen pathogenic mutations that were identified had never been reported in the literature. In six out of the 17 families (35%) with an *APC* mutation, the mutation was *de-novo*. In the 40 patients we had 21 women and 19 men. The average age at the first diagnosis of the disease was 26 years old. The earliest age of diagnosis was at a 7 year old boy and the latest in a 66 year old man.

Conclusions: The combination of dHPLC with sequencing and the characteristic FAP phenotype allow the successful, cheap and specific identification of the responsible mutations in a high percentage of the patients – 80%. Those FAP patients that do not carry a point mutation in the *APC* should definitely be examined for large genomic rearrangements of the *APC* and germline mutations of the *MYH*.

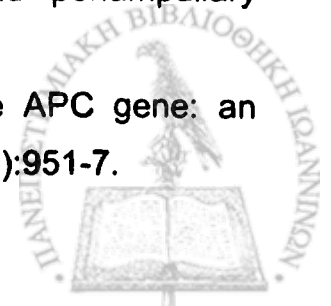


10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Jun 2;91(11):916-32.
2. Jemal A, Thomas A, Murray T, *et al.* Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2002 Jan-Feb;52(1):23-47.
3. Δ.Κ. Χριστοδούλου, Ε.Β. Τσιάνος. Πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου. *Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής* 17(6):566-575.
4. Maskarinec G, Noh JJ. The effect of migration on cancer incidence among Japanese in Hawaii. *Ethn Dis.* 2004 Summer;14(3):431-9.
5. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2002 May;38(7):867-71.
6. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990 Jun 1;61(5):759-67.
7. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, *et al.* APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature.* 1992 Sep 17;359(6392):235-7.
8. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996 Oct 18;87(2):159-70.
9. de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004 Oct;4(10):769-80.
10. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, *et al.* Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991; 66: 589-600.
11. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, *et al.* Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991 Aug 9; 253(5020):661-5.
12. Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, *et al.* Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell.* 1993 Dec 17;75(6):1215-25.
13. Howe JR, Roth S, Ringold JC, *et al.* Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science.* 1998 May 15;280(5366):1086-8.
14. Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, *et al.* A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature.* 1998 Jan 8;391(6663):184-7.



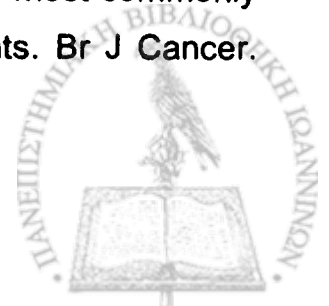
15. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, *et al.* Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet.* 2002 Feb;30(2):227-32.
16. Scott RJ. Familial adenomatous polyposis (FAP) and other polyposis syndromes. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* 2003; 1(1) 19-30.
17. Lockhart – Mummery, A. Cancer and Heredity. *Lancet* 1925; 1: 427 – 429.
18. Bisgaard ML, Fenger K, Bulow S, *et al.* Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Hum Mutat.* 1994;3(2):121-5.
19. Debinski HS, Love S, Spigelman AD, *et al.* Colorectal polyp counts and cancer risk in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology.* 1996 Apr;110(4):1028-30.
20. Gardner EJ. Follow-up study of a family group exhibiting dominant inheritance for a syndrome including intestinal polyps, osteomas, fibromas and epidermal cysts. *Am J Hum Genet.* 1962 Dec;14:376-90.
21. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, *et al.* The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med.* 1995 Mar 30;332(13):839-47.
22. Blair NP, Trempe CL. Hypertrophy of the retinal pigment epithelium associated with Gardner's syndrome. *Am J Ophthalmol.* 1980 Nov;90(5):661-7.
23. Jones IT, Jagelman DG, Fazio VW, *et al.* Desmoid tumors in familial polyposis coli. *Ann Surg.* 1986 Jul;204(1):94-7.
24. Kingston JE, Herbert A, Draper GJ, *et al.* Association between hepatoblastoma and polyposis coli. *Arch Dis Child.* 1983 Dec;58(12):959-62.
25. Herve R, Farret O, Mayaudon H, *et al.* Association of Gardner syndrome and thyroid carcinoma. *Presse Med.* 1995 Feb 25;24(8):415.
26. Kartheuser A, Walon C, West S, *et al.* Familial adenomatous polyposis associated with multiple adrenal adenomas in a patient with a rare 3' APC mutation. *J Med Genet.* 1999 Jan;36(1):65-7.
27. Harned RK, Williams SM. Familial polyposis coli and periampullary malignancy. *Dis Colon Rectum.* 1982 Apr;25(3):227-9.
28. Spirio L, Olschwang S, Groden J, *et al.* Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):951-7.



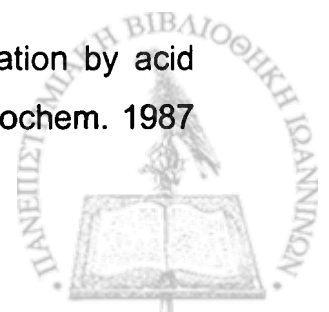
29. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, *et al.* Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*. 1987 Aug 13-19;328(6131):614-6.
30. Sulekova Z, Ballhausen WG. A novel coding exon of the human adenomatous polyposis coli gene. *Hum Genet*. 1995 Oct;96(4):469-71.
31. Lambertz S, Ballhausen WG. Identification of an alternative 5' untranslated region of the adenomatous polyposis coli gene. *Hum Genet*. 1993 Feb;90(6):650-2.
32. van Es JH, Giles RH, Clevers HC. The many faces of the tumor suppressor gene APC. *Exp Cell Res*. 2001 Mar 10;264(1):126-34.
33. Joslyn G, Richardson DS, White R, *et al.* Dimer formation by an N-terminal coiled coil in the APC protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 1;90(23):11109-13.
34. Su LK, Johnson KA, Smith KJ, *et al.* Association between wild-type and mutant APC gene products. *Cancer Res*. 1993;53:2728-2731.
35. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Human Molecular Genetics* 2001;10:721-733.
36. Yost C, Torres M, Miller JR, *et al.* The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev*. 1996 Jun 15;10(12):1443-54.
37. Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, *et al.* Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan 6;101(1):266-71. Epub 2003 Dec 26.
38. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Jun 5;1653(1):1-24.
39. Hinck L, Nelson WJ, Papkoff J. Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing beta-catenin binding to the cell adhesion protein cadherin. *J Cell Biol*. 1994 Mar;124(5):729-41.
40. Lamlum H, Papadopoulou A, Ilyas M, *et al.* APC mutations are sufficient for the growth of early colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 29;97(5):2225-8.
41. Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1996;122(3):135-40.



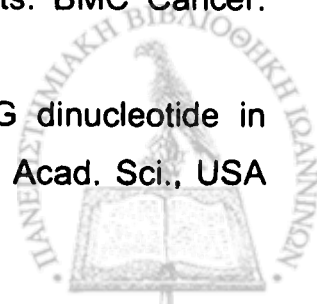
42. Beroud, C. and Soussi, T. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 1996;24:121-124.
43. Su LK, Kohlmann W, Ward PA, *et al.* Different familial adenomatous polyposis phenotypes resulting from deletions of the entire APC exon 15. *Hum Genet* 2002 Jul; 111(1): 88-95.
44. Cao X, Eu KW, Seow-Choen F, *et al.* Topoisomerase-I- and Alu-mediated genomic deletions of the APC gene in familial adenomatous polyposis. *Hum Genet* 2001 May; 108(5): 436-42.
45. Michils G, Tejpar S, Thoelen R, *et al.* Large deletions of the APC gene in 15% of mutation-negative patients with classical polyposis (FAP): a Belgian study. *Hum Mutat.* 2005 Feb;25(2):125-34.
46. Bertario L, Russo A, Sala P, *et al.* Multiple approach to the exploration of genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis. *J Clin Oncol.* 2003 May 1;21(9):1698-707.
47. Slattery ML, Samowitz W, Ballard L, *et al.* A molecular variant of the APC gene at codon 1822: its association with diet, lifestyle, and risk of colon cancer. *Cancer Res.* 2001 Feb 1;61(3):1000-4.
48. Ruiz-Ponte C, Vega A, Conde R, *et al.* The Asp1822Val variant of the APC gene is a common polymorphism without clinical implications. *J Med Genet.* 2001 Oct;38(10):E33.
49. Frayling IM, Beck NE, Ilyas M, *et al.* The APC variants I1307K and E1317Q are associated with colorectal tumors, but not always with a family history. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Sep 1;95(18):10722-7.
50. Lipton L, Tomlinson I. The multiple colorectal adenoma phenotype and MYH, a base excision repair gene. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004 Aug;2(8):633-8.
51. Ao A, Wells D, Handyside AH, *et al.* Preimplantation genetic diagnosis of inherited cancer: familial adenomatous polyposis coli. *J Assist Reprod Genet.* 1998 Mar;15(3):140-4.
52. Apeiros A, Mihalatos M, Danielidis I, *et al.* hMSH2 is the most commonly mutated MMR gene in a cohort of Greek HNPCC patients. *Br J Cancer.* 2005 Jan 31;92(2):396-404.



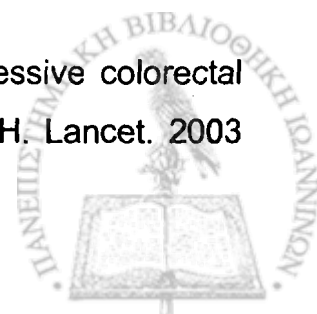
53. Belogianni I, Apeessos A, Mihalatos M, *et al.* Characterization of a novel large deletion and single point mutations in the BRCA1 gene in a Greek cohort of families with suspected hereditary breast cancer. *BMC Cancer* 2004 Sep 7; 4(1): 61.
54. Wong N, Lasko D, Rabelo R, *et al.* Genetic counseling and interpretation of genetic tests in familial adenomatous polyposis and hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2001 Feb;44(2):271-9.
55. Kraus C, Gunther K, Vogler A, *et al.* Rapid RT-PCR-based protein truncation test in the screening for 5' located mutations of the APC gene. *Mol Cell Probes*. 1998 Jun;12(3):143-7.
56. Giarola M, Stagi L, Presciuttini S, *et al.* Screening for mutations of the APC gene in 66 Italian familial adenomatous polyposis patients: evidence for phenotypic differences in cases with and without identified mutation. *Hum Mutat*. 1999;13(2):116-23.
57. Oefner PJ, and Underhill PA. Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Am. J. Hum. Genet.* 57 (Suppl.) : A266, 1995.
58. Gross E, Arnold N, Pfeifer K, *et al.* Identification of specific BRCA1 and BRCA2 variants by DHPLC. *Hum. Mut.* 16: 345-353, 2000.
59. Wu G, Wu W, Hegde M *et al.* Detection of sequence variations in the adenomatous polyposis coli (APC) gene using denaturing high-performance liquid chromatography. *Genet Test*. 5(4): 281-90, 2001.
60. Klein B, Weirich G and Brauch H. DHPLC-based germline mutation screening in the analysis of the VHL tumour suppressor gene: usefulness and limitations. *Hum Genet* 108: 376-384, 2001.
61. Peek RM Jr. Prevention of colorectal cancer through the use of COX-2 selective inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004 Sep;54 Suppl 1:S50-6.
62. Sambrook, I., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *MOLECULAR CLONING: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
63. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.



64. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
65. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, *et al.* Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol.* 1971 Mar 14;56(2):341-61.
66. Panet A, Khorana HG. Studies on polynucleotides. The linkage of deoxyribopolynucleotide templates to cellulose and its use in their replication. *J Biol Chem.* 1974 Aug 25;249(16):5213-21.
67. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* 1976 Sep;127(3):1550-7.
68. Varesco L, Gismondi V, Presciuttini S, *et al.* Mutation in a splice-donor site of the APC gene in a family with polyposis and late age of colonic cancer death. *Hum Genet.* 1994 Mar;93(3):281-6.
69. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7.
70. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, *et al.* Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jun 15;30(12):e57.
71. Mihalatos M, Danielides I, Belogianni J, *et al.* Novel mutations of the APC gene in familial adenomatous polyposis in Greek patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003 Feb;141(1):65-70.
72. Mihalatos M, Apessos A, Papadopoulou E, *et al.* Genetic alterations of the APC gene in familial adenomatous polyposis patients of the hellenic group for the study of colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2003 May-Jun;23(3A):2191-3.
73. Mihalatos M, Apessos A, Triantafillidis JK, *et al.* Evaluation of dHPLC in mutation screening of the APC gene in a Greek FAP cohort. *Anticancer Res.* 2003 May-Jun;23(3B):2691-5.
74. Mihalatos M, Apessos A, Dauwerse H, *et al.* Rare mutations predisposing to familial adenomatous polyposis in Greek FAP patients. *BMC Cancer.* 2005 Apr 15;5(1):40.
75. Sved J., Bird A. The expected equilibrium of the CpG dinucleotide in vertebrate genomes under a mutation model. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1990;87:4692-4696.



76. Sieber OM, Lamlum H, Crabtree MD, *et al.* Whole-gene APC deletions cause classical familial adenomatous polyposis, but not attenuated polyposis or "multiple" colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 Mar 5; 99(5): 2954-8.
77. Davies DR, Armstrong JG, Thakker N, *et al.* Severe Gardner syndrome in families with mutations restricted to a specific region of the APC gene. *Am J Hum Genet* 1995 Nov; 57(5): 1151-8.
78. Wallis YL, Macdonald F, Hulten M, *et al.* Genotype-phenotype correlation between position of constitutional APC gene mutation and CHRPE expression in familial adenomatous polyposis. *Hum Genet* 1994 Nov; 94(5): 543-8.
79. Olschwang S, Tiret A, Laurent-Puig P, *et al.* Restriction of ocular fundus lesions to a specific subgroup of APC mutations in adenomatous polyposis coli patients. *Cell* 1993 Dec 3; 75(5): 959-68.
80. Krainer AR, Maniatis T. Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* 1985 Oct; 42(3): 725-36.
81. Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 1987 Sep 11; 15(17): 7155-74.
82. Moisio AL, Jarvinen H, Peltomaki P. Genetic and clinical characterisation of familial adenomatous polyposis: a population based study. *Gut* 2002 Jun; 50(6): 845-50.
83. Chmiel NH, Livingston AL, David SS. Insight into the functional consequences of inherited variants of the hMYH adenine glycosylase associated with colorectal cancer: complementation assays with hMYH variants and pre-steady-state kinetics of the corresponding mutated E.coli enzymes. *J Mol Biol.* 2003 Mar 21;327(2):431-43.
84. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, *et al.* Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med* 2003 Feb 27; 348(9): 791-9.
85. Sampson JR, Dolwani S, Jones S, *et al.* Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet.* 2003 Jul 5;362(9377):39-41.



86. Fitches AC, May SJ, Olds RJ. A novel antithrombin gene mutation: slippage and mispairing as a mechanism of genetic disease. Pathology. 1996 Nov;28(4):339-42.

