

Δ.1: Διαχείριση και δημοσιότητα του έργου

Εκθέσεις προόδου

Στα πλαίσια του έργου, έχουν κατατεθεί οι εκθέσεις προόδου, οι οποίες παρατίθενται συνολικά σε ένα ξεχωριστό αρχείο.

Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά

Στα πλαίσια του έργου, έχουν γίνει μια σειρά δημοσιεύσεων σε διεθνή έγκριτα επιστημονικά περιοδικά, οι οποίες παρατίθενται ως ξεχωριστά αρχεία.

Ανακοινώσεις σε συνέδρια

Στα πλαίσια του έργου, έχουν γίνει μια σειρά ανακοινώσεων σε επιστημονικά περιοδικά, οι οποίες παρατίθενται ως ξεχωριστά αρχεία.

Δ.2: Ανάπτυξη μεθοδολογιών qReal-Time PCR

Πρωτόκολλο βελτιστοποίησης μεθόδου (Εκθεση)

Σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν ειδικοί εκκινητές με σκοπό την ειδική ενίσχυση των γονιδίων στόχων καθώς και του γονιδίου αναφοράς. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με την βοήθεια του λογισμικού Primer Premier 5.0 και ο έλεγχος της ειδικότητας των σχεδιασμένων εκκινητών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του αλγορίθμου Primer Blast, ο οποίος παρέχεται μέσω του ιστοτόπου του NCBI (National Center for Biotechnology). Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρατίθενται στον Πίνακα 1 που ακολουθεί.

Το γονίδιο *HPRT1*, το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο φωσφοριβοσουλτρανσφεράση 1 της υποξανθίνης, επιλέχθηκε ως το γονίδιο αναφοράς. Το *HPRT1*, χρησιμοποιείται ευρέως ως γονίδιο αναφοράς σε μελέτες γονιδιακής έκφρασης στον καρκίνο του μαστού και του προστάτη, και παρουσιάζει σταθερή έκφραση χωρίς να επηρεάζεται από άλλους βιολογικούς παράγοντες. Σύμφωνα με τη δημοσιευμένη αλληλουχία του mRNA του γονιδίου *HPRT1* (GenBank™ Accession Number: NM_000194.1), σχεδιάστηκε ένας πρόσθιος εκκινητής που προσδένεται σε τμήμα του εξωνίου 2 και ανάστροφος που υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 3, οριοθετώντας ένα προϊόν PCR μήκους 151 bp.

Για τα γονίδια-μέλη της οικογένειας των καλλικρεϊνών (*KLK7,8,11,13* και *KLK15*) σχεδιάστηκαν ειδικοί πρόσθιοι και ανάστροφοι εκκινητές για κάθε ένα εξ' αυτών. Συγκεκριμένα για το γονίδιο *KLK7* (GenBank™ Accession Number: NM_005046.3, NM_139277.2, NM_001207053.1, NM_001243126.1) ο πρόσθιος εκκινητής προσδένεται σε τμήμα του εξωνίου 5 και ο ανάστροφος εκκινητής υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 6, οριοθετώντας ένα προϊόν PCR μήκους 122 bp. Οι εκκινητές για την ενίσχυση του cDNA που αντιστοιχεί στα mRNA μόρια του *KLK8*, σχεδιάστηκαν με βάση τη δημοσιευμένη αλληλουχία mRNA του γονιδίου (GenBank™ Accession Number: NM_007196.3), οριοθετώντας ένα προϊόν PCR μήκους 129 bp. Οι εκκινητές για την ενίσχυση του cDNA που αντιστοιχεί στα mRNA μόρια του *KLK11*, σχεδιάστηκαν με βάση τις δημοσιευμένες αλληλουχίες mRNA του γονιδίου (GenBank™ Accession Numbers: NM_006853.2, NM_144947.1, NM_001167605.1 και NM_001136032.2), οριοθετώντας ένα προϊόν PCR μήκους 139 bp. Οι εκκινητές για την ενίσχυση του cDNA που αντιστοιχεί στα mRNA μόρια του *KLK13*, σχεδιάστηκαν με βάση τη δημοσιευμένη αλληλουχία mRNA του γονιδίου (GenBank™ Accession Number: NM_015596.1), και το μήκος του PCR προϊόντος αντιστοιχεί στα 204 bp. Για τη μελέτη της έκφρασης της *KLK15* (GenBank™ Accession Numbers: NM_001277081.1, NM_017509.3), σχεδιάστηκαν εκκινητές που οριοθετούν ένα προϊόν μήκους 104 bp.

Όσον αφορά το γονίδιο *DDC*, σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές PCR, για την επιλεκτική ενίσχυση κοινού τμήματος cDNA των mRNA μεταγράφων του γονιδίου, που κωδικοποιούν την πλήρους μήκους

αποκαρβοξυλάση της *L*-DOPA, διαφέροντας μόνο στην 5'-μη μεταφραζόμενη περιοχή τους (GenBank™ Accession Number: NM_000790.1 και NM_001082971.1), καθώς και του μετάγραφου που κωδικοποιεί την κατά 38 αμινοξικά κατάλοιπα βραχύτερη *L*-DOPA αποκαρβοξυλάση (GenBank™ Accession Number: NM_001242886.1), χωρίς να μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ αυτών. Ο πρόσθιος εκκινητής υβριδοποιείται σε τμήμα του δέκατου εξωνίου και ο ανάστροφος προσδένεται στη θέση συρραφής εντέκατου και δωδέκατου εξωνίου του cDNA του γονιδίου, οριοθετώντας ένα προϊόν PCR μήκους 90bp.

Για την ενίσχυση τμήματος cDNA μόνο του κύριου μεταγράφου mRNA του γονιδίου *BCL2L12* (GenBank™ Accession Number: NM_138639.1), σχεδιάστηκε πρόσθιος εκκινητής που υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 3 και ανάστροφος εκκινητής που υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 4. Το προϊόν της αντίδρασης PCR έχει μήκος 86 bp.

Για την ενίσχυση τμήματος cDNA μόνο του κύριου μεταγράφου mRNA του γονιδίου *RNASEK* (GenBank™ Accession Number: NM_001004333.1), σχεδιάστηκε πρόσθιος εκκινητής που υβριδοποιείται σε τμήμα της ένωσης των εξωνίων 1 και 2 και ανάστροφος εκκινητής που υβριδοποιείται σε τμήμα του εξωνίου 2. Το προϊόν της αντίδρασης PCR έχει μήκος 124 bp.

Πίνακας 1. Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των ειδικών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη μεθοδολογία qReal-Time PCR για τα cDNAs των υπό μελέτη γονιδίων.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Μήκος (nt)	Ποσοστό GC (%)	T _m (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)
HPRT1 F	5'-TGGAAAGGGTGTATTTCCTCAT-3'	23	39,1	57,7	151
HPRT1 R	5'-ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA-3'	22	45,5	60,0	
KLK7 F	5'-CAGGACTGCACGAAGGTTTACA-3'	22	50,0	60,8	122
KLK7 R	5'-GTACCTCTGCACACCAACGGT-3'	21	57,1	62,6	
KLK8 F	5'-GGAGCCTGGGCAGGACAC-3'	18	72,2	62,4	129
KLK8 R	5'-AAGGACACCGCCACAGAGTAGTT-3'	23	52,2	63,7	
KLK11 F	5'-CCTCTCCTCACGCTGTGTCA-3'	20	60,0	61,5	139
KLK11 R	5'-GTTCTCACACTTCTGGTGCTCAA-3'	23	47,8	61,0	
KLK13 F	5'-CAGCCCCCAGGTGAATTAC-3'	19	57,9	57,8	204
KLK13 R	5'-CAGGAGACGATGCCATACAGT-3'	21	52,4	59,6	
KLK15 F	5'-GCCTGGTGTCCCACAACG-3'	18	66,7	61,0	104
KLK15 R	5'-TGTGTCCGAGATAATGCTGATGT-3'	23	43,5	59,9	
DDC F	5'-GAACAGACTTAACGGGAGCCTTT-3'	23	47,8	60,8	90
DDC R	5'-AATGCCGGTAGTCAGTGATAAGC-3'	23	47,8	60,7	
BCL2L12 F	5'-CCCTCGGCCTTGCTCTCT-3'	18	66,7	61,1	182
BCL2L12 R	5'-TCCGCAGTATGGCTTCCTTC-3'	20	55,0	59,8	
RNASEK F	5'-GATCATGTTGATAATGCTCGGAAT-3'	24	37,5	57,5	124
RNASEK R	5'-TTGCTCGTAAAGGTTGTATATGTTCTG-3'	27	37,0	59,9	

Πολλά από τα μοναδικά χαρακτηριστικά των ώριμων μορίων miRNA, όπως το μικρό μέγεθος και η έλλειψη poly(A) ουράς, θέτουν αρκετές προκλήσεις για την εφαρμογή της συμβατικής μεθοδολογίας της αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR). Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία αρκετές προσεγγίσεις για την αντίστροφη μεταγραφή των miRNAs, οι οποίες έχουν ως βασικό στόχο την αύξηση του μεγέθους των μορίων συμπληρωματικού DNA (cDNA) που παράγονται, ούτως ώστε να είναι εφικτή η περαιτέρω ενίσχυσή τους μέσω ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR).

Το πρώτο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής περιλαμβάνει την πολυαδενυλίωση του ολικού RNA, συμπεριλαμβανομένου και των ώριμων μορίων miRNAs, με τη χρήση του ενζύμου poly(A) πολυμεράση (PAP),

που απομονώνεται από το βακτήριο *E.coli*. Το ένζυμο αυτό καταλύει την προσθήκη μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), στο 3' άκρο του RNA, χωρίς να απαιτεί την παρουσία κάποιου μορίου εκκινητή. Στο δεύτερο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής, χρησιμοποιείται αφενός το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή και ένας τροποποιημένος poly (T) εκκινητής, ο οποίος υβριδοποιείται στην poly (A) ουρά των πολυαδενυλιωμένων μορίων RNA.

Το πρωτόκολλο για την αντίδραση πολυαδενυλίωσης που προηγείται της αντίστροφης μεταγραφής έχει ως εξής: σε μίγμα τελικού όγκου 10 μ L προστίθενται 1 μ g ολικού RNA, 1 mM ATP, 1 \times ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) και 2 U του ενζύμου της PAP (New England Biolabs). Το μίγμα της αντίδρασης επώαζεται για 1 h στους 37°C και αμέσως μετά ακολουθεί η αδρανοποίηση του ενζύμου με επώαση του μίγματος στους 65°C για 10 min. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ειδικό θερμικό κυκλοποιητή και οδηγεί τελικά στην σύνθεση πολυαδενυλιωμένου ολικού RNA, το οποίο στη συνέχεια μεταγράφεται αντίστροφα σε cDNA.

Για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιείται ένας ειδικά σχεδιασμένος εκκινητής με αλληλουχία 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGTTTTTTTTTTTTTVN-3', ο οποίος είναι γνωστός ως poly(T)adapter. Για την εκτέλεση της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής που αποσκοπεί στη σύνθεση των κλώνων cDNA των προς μελέτη μικρών RNA, στο τελικό μίγμα της αντίδρασης πολυαδενυλίωσης, όγκου 10 μ L, προστίθενται απευθείας 0.5 μ M poly(T)adapter, 1 \times RT Buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT], 20 U αναστολέα RNAsών (HT Biotechnology) και 4 U M-MuLV Reverse Transcriptase RNase H⁻ (Finnzymes). Το θερμικό πρωτόκολλο της αντίδρασης περιλαμβάνει δύο στάδια ως εξής: α) επώαση στους 70°C για 5 min, και γρήγορη μεταφορά των μιγμάτων στους 4°C, μετά το τέλος της επώασης και β) επώαση στους 37°C για 55 min και στους 70°C για 15 min. Τα cDNAs που παράγονται, είτε φυλάσσονται στους -20°C είτε χρησιμοποιούνται άμεσα για την αντίδραση PCR.

Για την ενίσχυση των cDNAs που αντιστοιχούν στα miRNAs ενδιαφέροντος, σχεδιάστηκαν διαφορετικοί ειδικοί πρόσθιοι εκκινητές, οι αλληλουχίες των οποίων φαίνονται στον Πίνακα 2. Ο ανάστροφος εκκινητής είναι κοινός για τις όλες τις αντιδράσεις, καθώς υβριδοποιείται στην περιοχή του poly(T) adapter που χρησιμοποιείται στην αντίστροφη μεταγραφή.

Πίνακας 2. Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των ειδικών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη μεθοδολογία qReal-Time PCR για τα miRNAs.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Μήκος (nt)	GC (%)	T _m (°C)	Μέγεθος* προϊόντος (bp)
miR-28 F	5'-AAGGAGCTCACAGTCTATTGAGAA-3'	24	41,7	59,2	66
miR-96 F	5'-TGGCACTAGCACATTTTGTCTAAA-3'	23	34,8	56,2	63
miR-103 F	5'-CAGCATTGTACAGGGCTATGAAA-3'	23	43,5	59,1	65
miR-145 F	5'-CCAGTTTTCCAGGAATCCCTAA-3'	23	47,8	60,0	65
miR-182 F	5'-TGGCAATGGTAGAACTCACACTAA-3'	21	52,4	59,1	60
miR-183 F	5'-TATGGCACTGGTAGAATTCAC-3'	21	42,9	57,6	64
miR-224 F	5'-CAAGTCACTAGTGGTTCCGTTAA-3'	23	43,5	58,4	65
miR-423 F	5'-GGCAGAGAGCGAGACTTTAA-3'	20	50,0	57,3	62
RNU44 F	5'-AGCAAATGCTGACTGAACATGA-3'	22	40,9	58,9	91
RNU48 F	5'-TGATGATGACCCAGGTAAC-3'	23	47,8	60,6	151
Κοινός ανάστροφος εκκινητής (R)	5'-GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3'	22	45,5	57,9	-

* Το μέγεθος προϊόντος υπολογίζεται με χρήση του κοινού ανάστροφου εκκινητή.

Στα πλαίσια ανάπτυξης μεθοδολογίας, έγινε δοκιμή διαφορετικών συγκεντρώσεων (50-500nM) των παραπάνω εκκινητών, προκειμένου να βρεθεί η συγκέντρωση εκείνη που οδηγεί στη σύνθεση της μέγιστης δυνατής ποσότητας του επιθυμητού προϊόντος PCR χωρίς παράλληλο σχηματισμό διμερών των εκκινητών και/ή άλλων μη ειδικών προϊόντων. Για τα πειράματα βελτιστοποίησης των συνθηκών της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο, χρησιμοποιήθηκε cDNA από δείγμα, το οποίο εξέφραζε σε υψηλά επίπεδα τα υπό μελέτη γονίδια. Ακόμα, κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν, για να συνεκτιμηθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

Οι συνθήκες των αντιδράσεων qRT-PCR, οι οποίες επιλέχθηκαν μετά από τα πειράματα βελτιστοποίησης για τα γονίδια *HPRT1*, *KLK7*, *KLK11*, *KLK13*, *KLK15* και *DDC* περιλαμβάνουν 5.0 μL διαλύματος KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix 2× (Kapa Biosystems, Inc) στο οποίο έχει αρχικά προστεθεί η χρωστική αναφοράς ROX Low 50× (Kapa Biosystems, Inc), το ζεύγος εκκινητών σε συγκέντρωση 75 nM, 10ng cDNA και DEPC-H₂O μέχρι τελικού όγκου 10.0 μL. Για τα γονίδια *BCL2L12* και *RNASEK*, το μείγμα της αντίδρασης συνίστατο από 5.0 μL διαλύματος KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix 2×, το ζεύγος εκκινητών σε συγκέντρωση 50 nM, 10ng cDNA και DEPC-H₂O μέχρι τελικού όγκου 10.0 μL.

Η αντίδραση της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) και οι συνθήκες του θερμικού πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνουν, ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης και ενεργοποίησης της KAPA SYBR® DNA πολυμεράσης στους 95°C για 3min και 40 κύκλους δύο διακριτών σταδίων: (α) ένα στάδιο αποδιάταξης στους 95°C για 15 sec και (β) ένα στάδιο υβριδοποίησης και επέκτασης των εκκινητών στους 60°C για 1 min. Επιπλέον, σε κάθε σειρά αντιδράσεων περιλαμβάνονται εκτός από τα άγνωστα δείγματα και ένα δείγμα βαθμονομητή για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων μεταξύ των αντιδράσεων, καθώς και ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου.

Για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών των αντιδράσεων qRT-PCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προς μελέτη μορίων miRNAs, και των υπόλοιπων μικρών RNAs που επιλέχθηκαν ως μόρια αναφοράς (miR-103, miR-28, RNU44 και RNU48), δοκιμάστηκε ένα εύρος συγκεντρώσεων εκκινητών (50 – 350 nM).

Η βελτιστοποιημένη αντίδραση σε κάθε περίπτωση περιλαμβάνει: 5.0 μL διαλύματος KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix 2× (Kapa Biosystems, Inc), 0.2 μL χρωστικής αναφοράς ROX Low 50×, το ζεύγος εκκινητών σε συγκέντρωση 200 nM, 1ng cDNA και DEPC-H₂O μέχρι τελικού όγκου 10.0 μL. Το θερμικό πρωτόκολλο αποτελείται ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης και ενεργοποίησης της KAPA SYBR® DNA πολυμεράσης στους 95°C για 3min και 40 κύκλους δύο διακριτών σταδίων: (α) ένα στάδιο αποδιάταξης στους 95°C για 15 sec και (β) ένα στάδιο υβριδοποίησης και επέκτασης των εκκινητών στους 60°C για 1 min.

Μετά το πέρας της αντίδρασης PCR, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την ύπαρξη διμερών των εκκινητών ή μη ειδικών προϊόντων, μέσω ανάλυσης της καμπύλης τήξης και του προσδιορισμού της θερμοκρασίας τήξης T_m. Έπειτα, ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της αντίδρασης, μέσω της μεθόδου $2^{-\Delta\Delta C_t}$, και ο υπολογισμός των Σχετικών Μονάδων Ποσοτικοποίησης (Relative Quantification Units, RQ= $2^{-\Delta\Delta C_t}$), με τη βοήθεια του λογισμικού SDS v2.0.6 (Applied Biosystems). Τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για βιοστατιστική ανάλυση.

Αναφορά ποιοτικού ελέγχου μεθόδου

Ο ποιοτικός έλεγχος της μεθόδου συνίσταται στον προσδιορισμό της απόδοσης της qReal-Time PCR για την ενίσχυση του γονιδίου αναφοράς και των γονιδίων στόχων, καθώς και στον έλεγχο ειδικότητας της αντίδρασης.

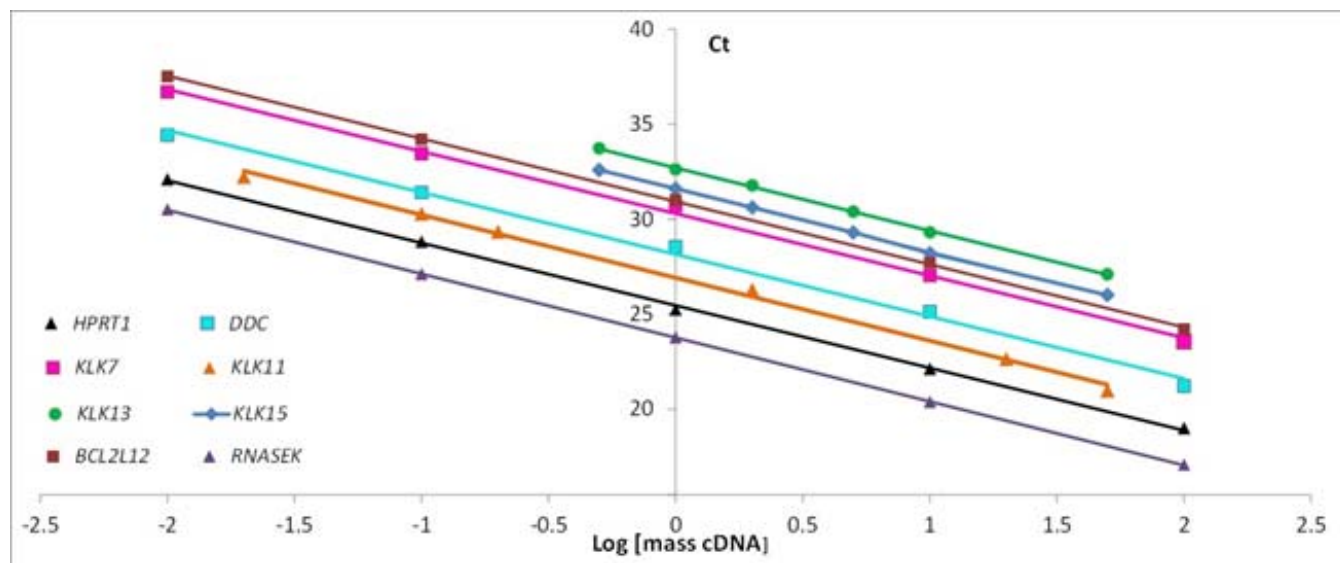
Για την εφαρμογή της μεθόδου σύγκρισης των Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), βασική προϋπόθεση είναι να έχουν οι αντιδράσεις ενίσχυσης των γονιδίων-στόχων και του γονιδίου αναφοράς αποδόσεις που να πλησιάζουν το 100% και να είναι σχεδόν ίσες μεταξύ τους. Επομένως, προτού εξεταστεί η έκφραση των γονιδίων στα δείγματα μαστού και, κρίθηκε απαραίτητο να ελεγχθεί η απόδοση της αντίδρασης ενίσχυσης τόσο του γονιδίου *HPRT1* όσο και των γονιδίων *KLK7*, *KLK11*, *KLK13*, *KLK15*, *DDC*, *BCL2L12* και *RNASEK* με τη βοήθεια πειράματος αξιολόγησης.

Στα πλαίσια του πειράματος αυτού, μετρήθηκαν εις τριπλούν, οι τιμές Ct για τα γονίδια-στόχους και το γονίδιο αναφοράς σε σειριακές αραιώσεις cDNA του θετικού μάρτυρα (cDNA από ένα καρκινικό δείγμα μαστού), καλύπτοντας ένα σημαντικό εύρος συγκεντρώσεων υποστρώματος. Έπειτα, υπολογίστηκε η μέση τιμή

Ct για κάθε ελεγχόμενη αραίωση, και κατασκευάστηκαν οι πρότυπες καμπύλες που αναπαριστούν τη μεταβολή της μέσης τιμής Ct (Av.Ct) ως προς το δεκαδικό λογάριθμο της ποσότητας του cDNA υποστρώματος της αντίδρασης, για κάθε γονίδιο (Εικόνα 1). Με τον τρόπο αυτό και χρησιμοποιώντας τον τύπο Απόδοση % = $[10^{(-1/κλίση)} - 1] \times 100$ κατέστη δυνατός ο υπολογισμός των αποδόσεων των αντιδράσεων, οι οποίες βρέθηκαν να είναι παρόμοιες, όπως φαίνεται άλλωστε και από την παραλληλία των προτύπων καμπυλών, και να εμπίπτουν εντός των αποδεκτών ορίων της μεθόδου (Πίνακας 3). Αντίστοιχα, για τα miRNAs παρουσιάζονται ο Πίνακας 4 και οι Εικόνες 2 και 3.

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά των προτύπων καμπυλών ενίσχυσης των υπό μελέτη γονιδίων.

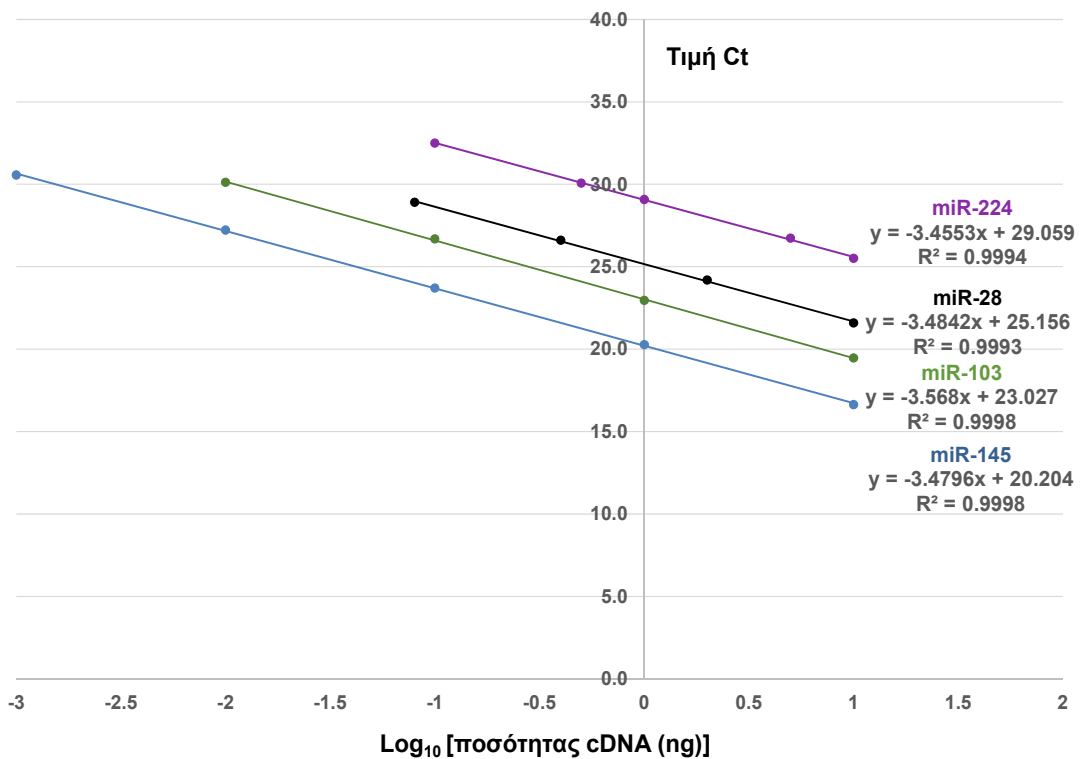
Γονίδιο	Τιμή Κλίσης	Απόδοση αντίδρασης qPCR (%)	Συντελεστής προσδιορισμού (R ²)
<i>HPRT1</i>	-3,390	97,2	0,999
<i>KLK7</i>	-3,420	96,1	0,997
<i>KLK11</i>	-3,452	94,8	0,996
<i>KLK13</i>	-3,368	98,1	0,999
<i>KLK15</i>	-3,428	95,8	0,998
<i>DDC</i>	-3,347	99,0	0,995
<i>BCL2L12</i>	-3,446	95,1	0,999
<i>RNASEK</i>	-3,367	98,2	0,999



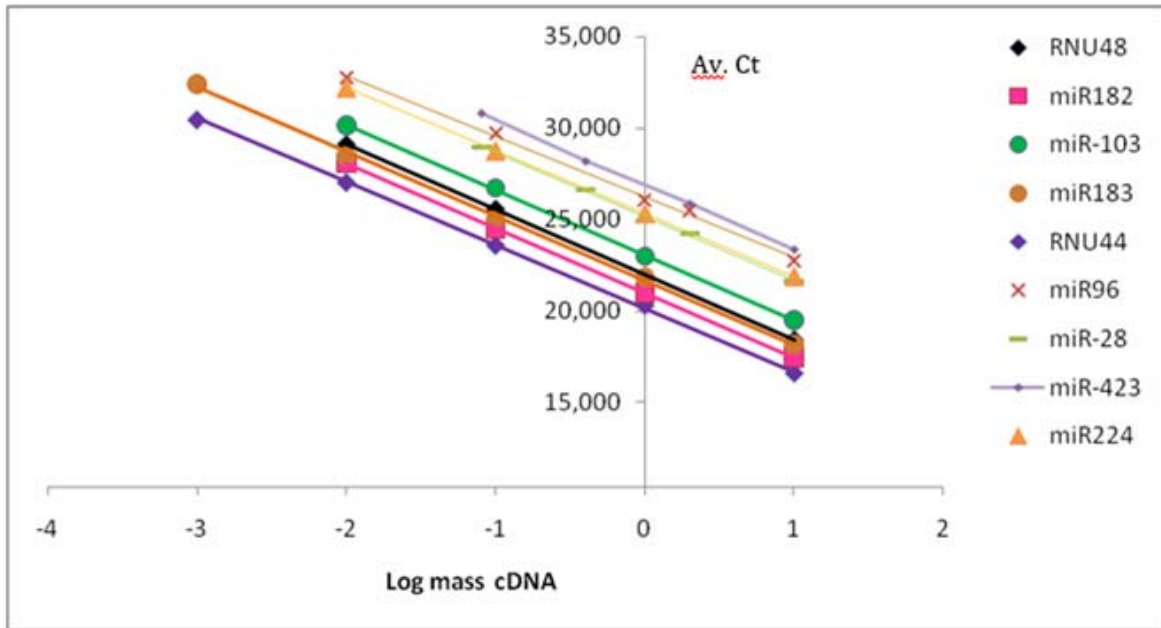
Εικόνα 1. Πρότυπες καμπύλες ενίσχυσης των cDNAs των υπό μελέτη γονιδίων.

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά των πρότυπων καμπυλών ενίσχυσης ορισμένων υπό μελέτη miRNAs.

Γονίδιο	Τιμή Κλίσης	Απόδοση αντίδρασης qPCR (%)	Συντελεστής προσδιορισμού (R ²)
miR-28	-3,484	93,7	0,999
miR-96	-3,501	92,0	0,998
miR-103	-3,568	90,7	0,999
miR-145	-3,480	93,8	0,999
miR-182	-3,536	91,2	0,997
miR-183	-3,534	91,0	0,997
miR-224	-3,455	94,7	0,999
miR-423	-3,497	92,3	0,999
<i>RNU44</i>	-3,456	94,6	0,998
<i>RNU48</i>	-3,592	90,3	0,995



Εικόνα 2. Πρότυπες καμπύλες ενίσχυσης των cDNA των μορίων αναφοράς miR-103 και miR-28 και των μορίων στόχων miR-224 και miR-145.



Εικόνα 3. Πρότυπες καμπύλες ενίσχυσης των cDNA επιλεγμένων μορίων miRNAs.

Ο έλεγχος της ειδικότητας της αντίδρασης έγινε με ανάλυση καμπύλης τήξης και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης, σε πήκτωμα αγαρόζης. Η διάκριση των ειδικών προϊόντων της αντίδρασης από τα πιθανά σχηματιζόμενα παραπροϊόντα πραγματοποιήθηκε μέσω της εκτέλεσης της ανάλυσης καμπύλης τήξης (melting curve analysis). Το θερμικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τη σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από 59°C έως 95°C με ρυθμό 0.1°C/sec και παράλληλη μέτρηση του εκπεμπόμενου φθορισμού για κάθε 0.3 °C αύξησης. Η σχετική δοκιμασία εκτελέστηκε στο θερμικό κυκλοποιητή 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ο οποίος φέρει και το ειδικό λογισμικό μέσω του οποίου πραγματοποιείται αυτόματος σχεδιασμός των καμπυλών τήξης και, εν συνεχεία, υπολογισμός του T_m για κάθε προϊόν της αντίδρασης. Επιπλέον, τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 3.0% w/v, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η ενίσχυση των επιθυμητών και ειδικών προϊόντων στις αντιδράσεις, μέσω της παρατήρησης της ύπαρξης μιας ζώνης στο αναμενόμενο μέγεθος για κάθε γονίδιο, με βάση το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε ανά περίπτωση.

Δ.4: Συλλογή καρκινικών και μη καρκινικών ιστών από ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού με πλήρες ιστορικό και προσδιορισμός mRNA έκφρασης της μελετώμενης ομάδας γονιδίων στους ιστούς αυτούς

Βάση κλινικοπαθολογικών δεδομένων (Αναφορά)

Για τους σκοπούς του συγκεκριμένου ερευνητικού προγράμματος, αφότου έγινε ο υπολογισμός απαιτούμενου στατιστικού μεγέθους δείγματος. Συλλέχθηκαν συνολικά >300 ιστολογικά δείγματα μαστού και ορού, από γυναίκες ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική εξαίρεση πρωτογενούς καρκινώματος μαστού. Η συλλογή και ο χαρακτηρισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από τους Ιατρούς συνεργάτες στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Ιπποκράτειο» και στο Γενικό Αντικαρκινικό-Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών «Άγιος Σάββας». Για την έρευνα χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα που περίσσεψαν από τις εξετάσεις ρουτίνας των

ασθενών και σύμφωνα με τις ηθικές αρχές που διέπουν την ιατρική και κλινική έρευνα. Τα δείγματα διατηρήθηκαν μέχρι την επεξεργασία τους, στους -80°C .

Οι κλινικοπαθολογικές παράμετροι των ασθενών με καρκίνο του μαστού, που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, το στάδιο της νόσου σύμφωνα με το σύστημα TNM, τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας του όγκου όπως προσδιορίστηκε με το σύστημα αξιολόγησης Scarff-Bloom-Richardson (τροποποιημένο κατά Elston-Ellis) και τον τύπο της επικουρικής θεραπείας που χορηγήθηκε στις ασθενείς. Οι ασθενείς που έλαβαν νέο-επικουρική θεραπεία, δηλαδή οποιαδήποτε θεραπεία πριν την χειρουργική εξαίρεση του καρκινώματος του μαστού, δεν συμπεριελήφθησαν στη μελέτη. Η βαθμολόγηση των όγκων όσον αφορά την έκφραση υποδοχέων οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR) γίνεται με το σύστημα H-score (τιμές: 0 – 3), το οποίο στηρίζεται στο συνδυασμό του βαθμού έντασης της χρώσης και του ποσοστού των χρωσθέντων πυρήνων. Για την ογκοπρωτεΐνη HER2 εκτιμάται η ένταση της χρώσης στην μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων, με διαβάθμιση από 0 – 3. Επίσης, αξιολογείται το ποσοστό των θετικά χρωσθέντων πυρήνων των καρκινικών κυττάρων για το πυρηνικό αντιγόνο Ki-67, για το οποίο το όριο θετικότητας ορίζεται στο 14%.

Όσον αφορά τη μετεγχειρητική παρακολούθηση και τη συλλογή δεδομένων επιβίωσης, αυτά περιλαμβάνουν την καταγραφή των γεγονότων τοπικής υποτροπής ή απομακρυσμένης υποτροπής (μετάστασης), καθώς και την καταγραφή θανάτων που προκλήθηκαν από τη συγκεκριμένη νόσο. Έτσι, το διάστημα ελεύθερης νόσου επιβίωσης ορίζεται ως το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου μέχρι το πρώτο καταγεγραμμένο γεγονός τοπικής ή απομακρυσμένης υποτροπής, ή ως τη λήξη της μετεγχειρητικής παρακολούθησης όταν δεν έχει σημειωθεί κανενός είδους υποτροπή. Το διάστημα ολικής επιβίωσης ορίζεται ως το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου μέχρι το θάνατο της ασθενούς από τη νόσο, ή ως τη λήξη της μετεγχειρητικής παρακολούθησης.

Λ.5: Συλλογή καρκινικών και μη καρκινικών ιστών από ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο του προστάτη, με πλήρες ιστορικό, και προσδιορισμός mRNA έκφρασης της μελετώμενης ομάδας γονιδίων στους ιστούς αυτούς

Βάση κλινικοπαθολογικών δεδομένων (Αναφορά)

Για τους σκοπούς του συγκεκριμένου ερευνητικού προγράμματος, αφότου έγινε ο υπολογισμός απαιτούμενου στατιστικού μεγέθους δείγματος, συλλέχθηκαν συνολικά >200 ιστολογικά δείγματα προστάτη και ορού αίματος, από άνδρες ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική εξαίρεση αδενοκαρκινώματος προστάτη ή καλοήθους προστατικής υπερπλασίας. Η συλλογή και ο χαρακτηρισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από τους Ιατρούς συνεργάτες στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό». Για την έρευνα χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα που περίσσεψαν από τις εξετάσεις ρουτίνας των ασθενών και σύμφωνα με τις ηθικές αρχές που διέπουν την ιατρική και κλινική έρευνα. Τα δείγματα διατηρήθηκαν μέχρι την επεξεργασία τους, στους -80°C .

Οι κλινικοπαθολογικές παράμετροι των ασθενών με καρκίνο του προστάτη, που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη περιλαμβάνουν το παθολογοανατομικό στάδιο του όγκου (pT), την παρουσία ή όχι λεμφαδενικών μεταστάσεων (pN), την ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων, τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας (βαθμός αποδιαφοροποίησης) των καρκινικών κυττάρων του όγκου μέσω του προσδιορισμού του Gleason score, την συγκέντρωση του PSA του ορού πριν την ριζική προστατεκτομή και κατά την διάρκεια της μετεγχειρητικής παρακολούθησης των ασθενών, την μέγιστη διάμετρο του όγκου, το αποτέλεσμα της δακτυλικής εξέτασης (Digital Rectal Examination / DRE) των ασθενών και την ηλικία των ασθενών κατά την διάγνωση της νόσου. Οι παράμετροι χρησιμοποιούνται κλινικά τόσο για την επιλογή της θεραπευτικής αντιμετώπισης των ασθενών όσο και για την πρόγνωση της νόσου και την μετεγχειρητική παρακολούθηση των ασθενών. Μεταξύ αυτών, το παθολογοανατομικό στάδιο του όγκου και ο βαθμός κακοήθειας/βαθμός αποδιαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων του όγκου, όπως προσδιορίζεται ιστολογικά από το Gleason score, αποτελούν τους πιο σημαντικούς και ευρέως χρησιμοποιούμενους δείκτες πρόγνωσης των ασθενών. Αντίστοιχα σημαντική προγνωστική αξία εμφανίζουν οι τιμές PSA του ορού του αίματος των ασθενών. Τέλος, στο σύνολο των ασθενών της μελέτης προσδιορίζεται η μετεγχειρητική συγκέντρωση του PSA του ορού με στόχο τυχόν ανίχνευση βιοχημικής

υποτροπής (δηλ. μιας αύξησης στα επίπεδα PSA του αίματος), η οποία προηγείται και είναι σημαντικός δείκτης της κλινικής υποτροπής της νόσου.

Όσον αφορά τη μετεγχειρητική παρακολούθηση και τη συλλογή δεδομένων επιβίωσης, αυτά περιλαμβάνουν την καταγραφή των γεγονότων βιοχημικής υποτροπής, τοπικής (κλινικής) υποτροπής ή απομακρυσμένης υποτροπής (μετάστασης), καθώς και την καταγραφή θανάτων που προκλήθηκαν από τη συγκεκριμένη νόσο. Έτσι, Έτσι, το διάστημα επιβίωσης ελεύθερης από βιοχημική υποτροπή ορίζεται ως το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου μέχρι το πρώτο καταγεγραμμένο γεγονός βιοχημικής υποτροπής, ή ως τη λήξη της μετεγχειρητικής παρακολούθησης όταν δεν έχει σημειωθεί βιοχημική υποτροπή. Επιπλέον, το διάστημα ελεύθερης νόσου επιβίωσης ορίζεται ως το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου μέχρι το πρώτο καταγεγραμμένο γεγονός τοπικής ή απομακρυσμένης (κλινικής) υποτροπής, ή ως τη λήξη της μετεγχειρητικής παρακολούθησης όταν δεν έχει σημειωθεί κανενός είδους υποτροπή. Το διάστημα ολικής επιβίωσης ορίζεται ως το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου μέχρι το θάνατο της ασθενούς από τη νόσο, ή ως τη λήξη της μετεγχειρητικής παρακολούθησης.

Οι Δράσεις Δ.3, Δ.6, Δ.7, Δ.8, Δ.9 και Δ.10 ολοκληρώνονται στις 30/11/2015.