



Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Ιατρική Σχολή- Σχολή Επιστημών Υγείας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“Κληρονομούμενος Καρκίνος Μαστού: Ευρήματα
από πολυγονιδιακό έλεγχο σε πάνω από 1800
ασθενείς πέραν των *BRCA1* και *BRCA2*.”**

Επιβλέπων: Μιχαήλ Κουτσιλιέρης

Νικόλαος Τσούλος

Βιοχημικός

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	3
Κληρονομούμενος Καρκίνος.....	3
2. Μέθοδοι	5
Πληθυσμός	5
Επιλογή Γονιδίων.....	5
Κατηγοριοποίηση Γονιδίων	6
Εργαστηριακή ανάλυση.....	8
Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα.....	10
Έλεγχος ποσότητας / καθαρότητας του απομονωμένου DNA με φωτομέτρηση	10
Παρασκευή των βιβλιοθηκών προς αλληλούχιση.....	11
Προετοιμασία των βιβλιοθηκών για αλληλούχιση	33
Ανάλυση στο γενετικό αναλυτή.....	34
Ανάλυση-αξιολόγηση αποτελεσμάτων	35
3. Αποτελέσματα	36
Δημογραφικά Ασθενών	36
Παθολόνα Ευρήματα	38
Μη-Παθολόνα Ευρήματα	39
5. Συζήτηση	40
6. Βιβλιογραφικές Αναφορές	43

1. Εισαγωγή

Κληρονομούμενος Καρκίνος

Τα σύνδρομα προδιάθεσης για κληρονομούμενο καρκίνο ευθύνονται για περίπου το 5–10% όλων των διαγνωσμένων καρκίνων (Nagy R, 2004). Η ταυτοποίηση αυτών των περιστατικών είναι σημαντική τόσο για τον ίδιο τον ασθενή όσο και για τους συγγενείς του για την κλινική διαχείριση των υγείων αλλά και των νοσούντων φορέων. Στους φορείς παθογόνων μεταλλάξεων που νοσούν, ο καθορισμός των γενετικών αλλαγών που προκαλούν την κληρονομούμενη νόσο μπορεί να καθοδηγήσει τη χειρουργική διαχείρισή τους καθώς και τη συστηματική τους θεραπεία. Επιπροσθέτως, η ταυτοποίηση του συνδρόμου μπορεί να εξατομικεύσει το πρόγραμμα παρακολούθησης των ασθενών αλλά και των συγγενών τους που έχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου ως φορείς της παθογόνου μετάλλαξης, προκειμένου να συμπεριληφθούν στρατηγικές αποτροπής δευτερευουσών κακοηθειών που σχετίζονται με το συγκεκριμένο σύνδρομο. Στο παρελθόν, η ταυτοποίηση των κληρονομούμενων γενετικών νοσημάτων σε συγκεκριμένες οικογένειες γινόταν με ανάλυση ενός ή το πολύ δύο γονιδίων υψηλού κινδύνου. Η επιλογή των γονιδίων γινόταν κυρίως βάσει του ατομικού και του οικογενειακού ιστορικού και περιελάμβανε κυρίως τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* σε οικογένειες με ιστορικό καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών, τα γονίδια αναντιστοιχίας του DNA (DNA mismatch repair genes-MMR), *MLH1*, *MSH2* και *MSH6* για οικογένειες με υποψία για σύνδρομο Lynch και το γονίδιο *APC* για ασθενείς με οικογενή πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis-FAP).

Στις μέρες μας, η έλευση της Αλληλούχισης Επόμενης Γενιάς (Next Generation Sequencing-NGS), επιτρέπει την ανάλυση πολλών γονιδίων ταυτόχρονα πράγμα το οποίο χρησιμοποιείται πλέον ευρέως στην κλινική πράξη για την ταυτοποίηση ατόμων με κληρονομούμενη προδιάθεση για καρκίνο (Slavin TP N.-S. M., Corrigendum: clinical application of multigene panels: challenges of next-generation counseling and Cancer risk management., 2015) (Susswein LR, 2016) Αυτά τα πολυγονιδιακά πάνελ συνήθως περιλαμβάνουν γονίδια υψηλής και ενδιάμεσης διείσδυσης και σε κάποιες περιπτώσεις και γονίδια χαμηλής ή ακόμη και άγνωστης διείσδυσης. Ο αριθμός των οικογενειών που εξετάζονται με τέτοια πάνελ είναι αυξανόμενος και κατά συνέπεια τα δεδομένα που σχετίζονται με τη συνεισφορά τους στον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου αυξάνουν και

επιτρέπουν την καλύτερη και πιο ακριβής κατηγοριοποίηση της διεισδυτικότητάς τους. Η παρούσα πολυγονιδιακή μελέτη NGS εκπονήθηκε σε συνεχόμενους ασθενείς που προσήλθαν στο εργαστήριό μας για να κάνουν την εξέταση. Ο σκοπός της μελέτης είναι η ταυτοποίηση σημαντικών γονιδιακών αλλαγών που σχετίζονται με την κληρονομική μετάδοση του καρκίνου και η χρησιμότητά τους για αυτά τα άτομα.

2. Μέθοδοι

Πληθυσμός

Στη μελέτη αυτή αναλύονται άτομα που παραπέμφθηκαν στο εργαστήριό μας για γενετική εξέταση με πολυγονιδιακό πάνελ και με διάγνωση καρκίνου μαστού από τον Ιούνιο του 2014 έως τον Ιούνιο του 2020. Κατά τη μελέτη αυτή, όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν από τους παραπέμποντες ιατρούς. Καθώς αυτή η μελέτη έλαβε χώρα σε διαγνωστικό εργαστήριο, δε χρησιμοποιήθηκαν αυστηρά κριτήρια επιλογής των εξεταζόμενων ασθενών και όλοι οι εξεταζόμενοι έλαβαν γνώση για την αξία της μοριακής ανάλυσης, έδωσαν πληροφορίες για το προσωπικό και οικογενειακό τους ιστορικό και έχουν υπογράψει συναίνεση πριν εκτελεστεί η εξέτασή τους προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ανώνυμα τα δεδομένα που προκύπτουν από την ανάλυσή τους αυτή και σκοπούς έρευνας και δημοσίευσης.

Επιλογή Γονιδίων

Η ανάλυση των γονιδίων που μεταδίδουν κληρονομικά τον καρκίνο έγινε με τη χρήση ενός πάνελ 36 γονιδίων. Τα γονίδια που αναλύθηκαν επιλέχθηκαν βάσει της σχέσης τους με την κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο. Στην πλειοψηφία των καρκινικών συνδρόμων η κληρονομικότητα είναι επικρατής και συνεπώς ένα μόνο παθογόνο αλληλόμορφο σε ετεροζυγωτία είναι σε ένα από αυτά τα γονίδια μπορεί να είναι η αιτία ύπαρξης προδιάθεσης για καρκίνο. Πολλά από αυτά τα γονίδια έχουν επίσης αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα ή προκαλούν κλινικά διακριτές αυτοσωμικές υπολοιπόμενες νόσους. Τα γονίδια *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2*, και *RAD51C* σχετίζονται με αναιμία Fanconi. Τα γονίδια *ATM* και *MRE11A* σχετίζονται με ataxia- telangiectasia. Τα γονίδια *MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, και *MSH6* σχετίζονται με την ανεπάρκεια επισκευής αναντιστοιχίας βάσεων (mismatch repair deficiency-MMR-D). Το γονίδιο *MUTYH* σχετίζεται με MUTYH- πολυποδίαση (MAP). Τα γονίδια *NBN* και *RAD50* σχετίζονται με το σύνδρομο Nijmegen. Σε αυτή τη μελέτη οι εξεταζόμενοι είχαν προσωπικό και οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού ή/και ωοθηκών και συνεπώς η πλειοψηφία των γονιδίων που αναλύονται σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου μαστού και ωοθηκών.

Κατηγοριοποίηση Γονιδίων

Τα γονίδια κατηγοριοποιήθηκαν ως υψηλής, ενδιάμεσης ή χαμηλής διείσδυσης βάσει του σχετικού τους κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου που προσδίδουν στους φορείς τους. Υψηλής διείσδυσης (ή υψηλού κινδύνου) γονίδια νοούνται τα γονίδια αυτά το οποία όταν είναι μεταλλαγμένα προσδίδουν μεγάλο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου (μεγαλύτερο από 4 φορές αυτόν του γενικού πληθυσμού). Επιπλέον, συμπεριλαμβάνονται σε κατευθυντήριες οδηγίες για τον έλεγχο για προδιάθεση καρκίνου και για συγκεκριμένη κλινική διαχείριση ασθενών φορέων παθογόνων μεταλλάξεων που έχουν δημιουργηθεί από μεγάλες ομάδες εργασίας (Okur V, 2017) (Price KS, 2018) (Network., 2020).

Παθογόνες μεταλλάξεις σε γονίδια ενδιάμεσης διείσδυσης ή (ενδιάμεσου κινδύνου) προσδίδουν έναν κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου 2-4 φορές αυτού του γενικού πληθυσμού. Και τα γονίδια χαμηλής διείσδυσης (ή χαμηλού κινδύνου) σχετίζονται με κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου μικρότερο από 2 φορές αυτού του γενικού πληθυσμού ή είναι γονίδια με περιορισμένα ή ανεπαρκή δεδομένα για τη σχέση τους με την ανάπτυξη καρκίνου. Παρόλο που αυτή η κατηγοριοποίηση αλλάζει συνεχώς καθώς οι κλινικές πληροφορίες για πολλά από αυτά τα γονίδια αυξάνει, στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) υπάρχει περίληψη των γονιδίων βάσει των πιο πρόσφατων δημοσιεύσεων. (Slavin TP N.-S. M., 2015) (Plichta JK, 2016) (Tung N L. N., 2016) (Tung N B. C., 2015)

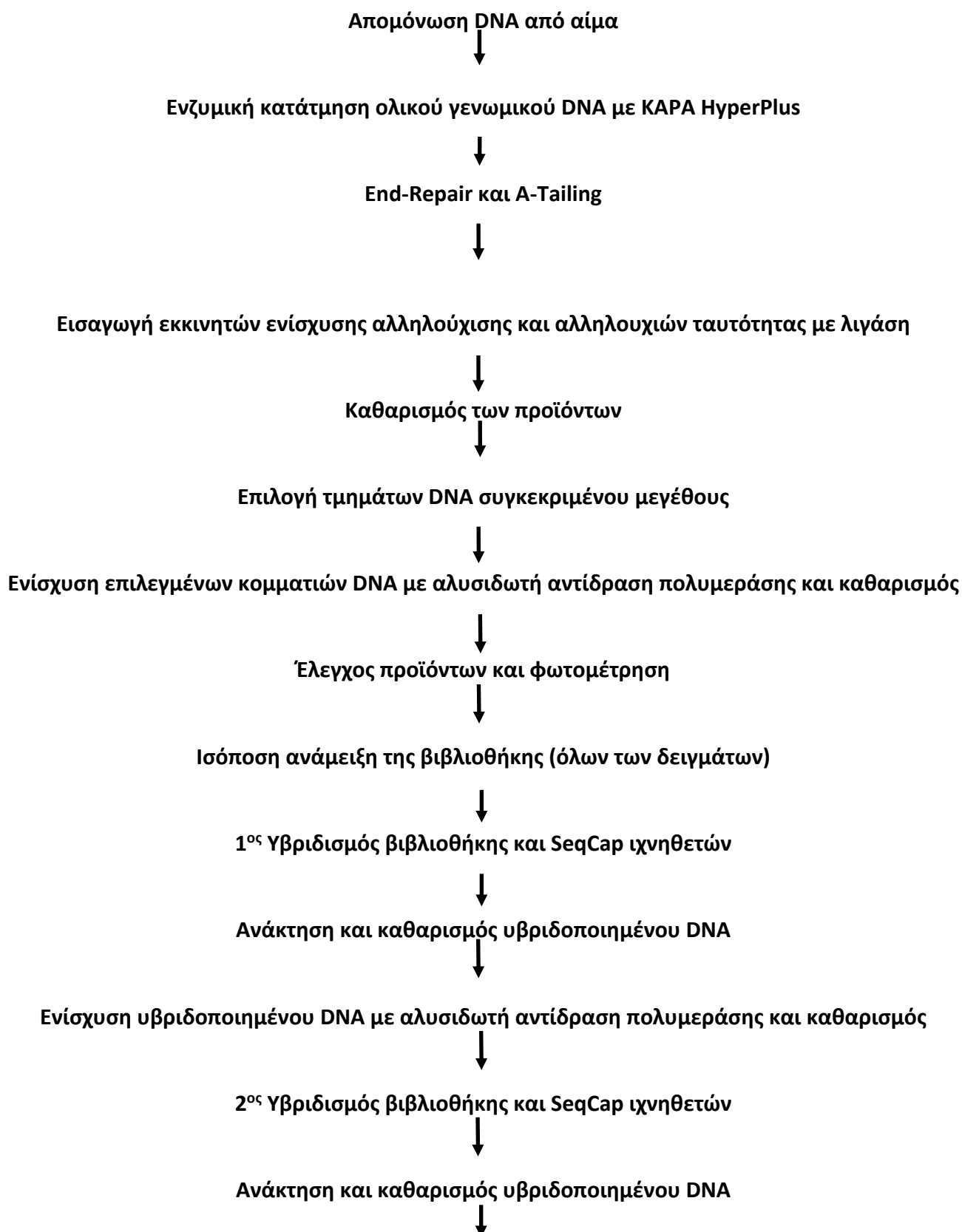
Πίνακας 1. Κατάλογος γονιδίων που αναλύονται στο Πάνελ Κληρονομούμενου καρκίνου και η συσχέτισή τους με διάφορους τύπους καρκίνου και σύνδρομα.

Gene ^a	Transcript	Breast	Ovarian	Colorectal	Endometrial	Melanoma	Pancreatic	Gastric	Prostate	Endocrine	Other	Associated Syndrome
High Risk (***)												
<i>APC</i>	NM_000038.5			***			*	*		*	*	Familial Adenomatous Polyposis (FAP)
<i>BMPR1A</i>	NM_004329.2			***				**			*	Juvenile Polyposis Syndrome (JPS)
<i>BRCA1</i>	NM_007294.2	***	***				*		**		*	Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome (HBOC)
<i>BRCA2</i>	NM_000059.3	***	**			*	*		**		*	Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome (HBOC)
<i>CDH1</i>	NM_004360.4	***						***				Hereditary Diffuse Gastric Cancer (HDGC)
<i>CDK4</i>	NM_000075.3					***						
<i>CDKN2A</i>	NM_000077.4					***	*					Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrome, Melanoma-Pancreatic Cancer Syndrome
<i>EPCAM</i>	NM_002354.2	*	*	***	**		*	*	*		*	Lynch Syndrome (LS)
<i>MEN1</i>	NM_000244.3						*			***		Multiple Endocrine Neoplasia Type 1
<i>MLH1</i>	NM_000249.3	*	**	***	**		*	*	*			Lynch Syndrome (LS)
<i>MSH2</i>	NM_000251.2	*	**	***	**		*	*	*			Lynch Syndrome (LS)
<i>MSH6</i>	NM_000179.2	*	*	***	***		*	*	*			Lynch Syndrome (LS)
<i>MUTYH</i>	NM_001128425.1	*		***	*			*			*	MUTYH-associated polyposis (MAP)
<i>PALB2</i>	NM_024675.3	***	*				*		*			Fanconi anemia (FA-N) (recessive)
<i>PMS2</i>	NM_000535.5		*	***	***		*	*	*		*	Lynch Syndrome (LS)
<i>PTEN</i>	NM_000314.4	***		*	*	*				**	**	Cowden Syndrome (CS)
<i>RET</i>	NM_020975.4									***		Multiple Endocrine Neoplasia Type 2
<i>SMAD4</i>	NM_005359.5			***				**				Juvenile Polyposis Syndrome (JPS)
<i>STK11</i>	NM_000455.4	***	*	**	*		**	**				Peutz-Jeghers Syndrome (PJS)
<i>TP53</i>	NM_000546.5	***	*	**	*	*	**	**	*			Li-Fraumeni Syndrome (LFS)
<i>VHL</i>	NM_000551.3						*			*	***	Von Hippel-Lindau Syndrome
Moderate Risk (**)												
<i>ATM</i>	NM_000051.3	**					*		*			Ataxia-Telangiectasia (recessive)
<i>BRIP1</i>	NM_032043.2	*	**						*			Fanconi anemia (FA-J) (recessive)
<i>CHEK2</i>	NM_007194.3	**	*	*					*			
<i>NBN</i>	NM_002485.4	**							*			Nijmegen Breakage Syndrome (NBS)
<i>RAD51C</i>	NM_058216.2	*	**									Fanconi anemia (FA-C) (recessive)
<i>RAD51D</i>	NM_002878.3	*	**									Fanconi anemia (FA) (recessive)
Low risk/insufficient data (*)												
<i>BARD1</i>	NM_000465.2	*	*									
<i>BLM</i>	NM_000057.2	*		*								Bloom Syndrome (BS)
<i>CHEK1</i>	NM_001114121.2	*										
<i>ABRAXAS1 (FAM175A)</i>	NM_139076.2	*										
<i>MRE11 (MRE11A)</i>	NM_005591.3	*										Ataxia-Telangiectasia-like disorder
<i>NF1</i>	NM_000267.3	*								*	*	Neurofibromatosis type 1
<i>RAD50</i>	NM_005732.3	*										Nijmegen breakage syndrome-like disorder (NBSLD)
<i>RAD51B</i>	NM_133509.3	*										
<i>XRCC2</i>	NM_005431.1	*										

^a *BRCA1, BRCA2, CDH1, EPCAM, MEN1, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PALB2, PMS2, PTEN, STK11, TP53, ATM, BRIP1, CHEK2, NBN, RAD51C, RAD51D, BARD1, BLM, ABRAXAS1, MRE11, RAD50, XRCC2* were included in the first version of the HeredIGENE panel (26 gene panel) whereas *APC, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, CDH1, CDK4, CDKN2A, EPCAM, MEN1, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PALB2, PMS2, PTEN, RET, SMAD4, STK11, TP53, VHL, ATM, BRIP1, CHEK2, NBN, RAD51C, RAD51D, BARD1, CHEK1, MRE11, NF1, RAD50, RAD51B* were included in the second version of the HeredIGENE panel (33 gene panel)

Εργαστηριακή ανάλυση

Διεθνώς καθιερωμένη μέθοδος ανάλυσης αλληλουχίας γονιδίων για ανίχνευση μεταλλάξεων, η οποία αναπαρίσταται σχηματικά παρακάτω



Ενίσχυση υβριδοποιημένου DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και καθαρισμός



Έλεγχος και ποσοτικοποίηση βιβλιοθήκης



Αλληλούχηση με σύνθεση (sequence by synthesis) στον αυτόματο αναλυτή MiSeq (Illumina)



Ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας το λογισμικό SeqNext (JSI medical systems)

Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα

Για την απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα χρησιμοποιείται το αυτόματο σύστημα απομόνωσης MagCore Nucleic Acid Extractor (DNA-EX-02) βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή χρησιμοποιώντας το MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit (Speedy Installation). Τοποθέτηση cartridges, tips, φιαλίδια με το ολικό περιφερικό αίμα και φιαλίδια έκλουσης στις προκαθορισμένες από τον κατασκευαστή θέσεις. Επιλέγεται το πρόγραμμα Cartridge Code 101. Το γενωμικό DNA αποθηκεύεται στους 4°C για άμεση χρήση (μέχρι 30 ημέρες) ή στους -20°C για πιο μακρόχρονη αποθήκευση.

Έλεγχος ποσότητας / καθαρότητας του απομονωμένου DNA με φωτομέτρηση

Η ανάλυση απαιτεί συνολικά 350-600 ng γενωμικού DNA καθαρότητας (OD_{260/280}) μεταξύ 1,8 και 2,0. Για το λόγο αυτό, πριν τη χρήση απαιτείται φωτομέτρηση. Χρησιμοποιείται το φωτόμετρο nanodrop ND-01. Αρχικά γίνεται μηδενισμός χρησιμοποιώντας 2 μl Elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0). Στη συνέχεια λαμβάνονται 3 μετρήσεις για το κάθε DNA (χρησιμοποιώντας 2 μl) και υπολογίζεται ο μέσος όρος όσον αφορά τη συγκέντρωση και την καθαρότητα.

Παρασκευή των βιβλιοθηκών προς αλληλούχιση

ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΚΑΤΑΤΜΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΜΕ KAPA HYPERPLUS

Όλη η διαδικασία εκτελείται σε πάγο

- Αρχικά, 12 μl ολικού γενωμικού DNA (τελική ποσότητα 350-600 ng) αναμιγνύονται με 18 μl Buffer AE (10 mM Tris·Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0, Qiagen). Καθώς το DNA που απομονώνεται από ολικό περιφερικό αίμα μπορεί να φέρει υπολείμματα EDTA τα οποία παρεμποδίζουν τη λειτουργία του μείγματος ενζύμων κατάτμησης, προστίθενται 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος αραιωμένου κατά 8X με νερό (molecular grade) (12,4 μl Conditioning Solution, KAPA, σε 100 μl τελικό όγκο).
- Η κατάτμηση πραγματοποιείται με την προσθήκη 10 μl KAPA Frag Enzyme και 5 μl KAPA Frag Buffer ανά δείγμα. Τα σωληνάρια μεταφέρονται σε κεφαλή θερμικού κυκλοποιητή προψυγμένου σε 4°C. Ακολουθεί επώαση, στους 37°C, 27 λεπτά.

End-Repair και A-tailing

- Παρασκευάζεται μείγμα αποτελούμενο από 7 μl End Repair & A-Tailing Buffer και 3 μl End Repair & A-Tailing Enzyme για κάθε δείγμα, τα οποία προστίθενται στα δείγματα σε πάγο.
- Τα δείγματα μεταφέρονται σε κεφαλή θερμικού κυκλοποιητή προψυγμένου σε 4°C. Ακολουθεί επώαση, στους 65°C, 30 λεπτά.

8B3. Εισαγωγή εκκινητών ενίσχυσης αλληλούχισης και αλληλουχιών ταυτότητας με λιγάση

- Στη συνέχεια απαιτείται η εισαγωγή εκκινητών ενίσχυσης αλληλούχισης και αλληλουχιών ταυτότητας (Multiplex Identifiers – MID) σε όλα τα δείγματα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται αντίδραση λιγάσης. Οι εκκινητές ενίσχυσης αλληλούχισης και αλληλουχιών ταυτότητας παρέχονται από την Nimblegen (Roche) ως μερικώς δίκλωνο τμήμα DNA έκαστος και με προεξέχον νουκλεοτίδιο θυμίνης στο δίκλωνο άκρο. Είναι σε λυοφιλοποιημένη μορφή και πρέπει να ανασυσταθούν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή με νερό. Συνολικά, υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμοι 24 διαφορετικοί “adapters” (που φέρουν τις αλληλουχίες

πρόσδεσης των εκκινητών και τις αλληλουχίες “ταυτότητες”), επιτρέποντας την παράλληλη ανάλυση 24 δειγμάτων.

- Προετοιμάζεται μείγμα που περιλαμβάνει για κάθε δείγμα (Πίνακας 2):

Πίνακας 2: Αντίδραση Λιγάσης για Εισαγωγή εκκινητών και αλληλουχιών ταυτότητας

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl)
Νερό διπλής απόσταξης	5 (+/-0.2μl)
Ligation Buffer	30 (+/-0.2μl)
DNA Ligase	10 (+/-0.2μl)
Τελικός όγκος	45

- Σε κάθε δείγμα από την αντίδραση 8B2 προστίθενται 45 μl από το παραπάνω μείγμα και 5 μl “adapter” (Nimblegen, Roche), διαφορετικό για κάθε δείγμα και λαμβάνοντας υπόψη τους συνδυασμούς που επιτρέπονται από την χημεία της Illumina όταν πρόκειται να αναμειχθούν λιγότερα από 4 δείγματα στην τελική βιβλιοθήκη.
- Τα δείγματα μεταφέρονται σε κεφαλή θερμικού κυκλοποιητή προψυγμένου σε 4°C. Ακολουθεί επώαση, στους 20°C, 15 λεπτά.

Καθαρισμός των προϊόντων

- Στη συνέχεια πρέπει να απομακρυνθούν “adapters” που δεν έχουν ενσωματωθεί στο DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων σε διάλειμμα (Agencourt AMPure XP ή KAPA Pure beads).
- Σε κάθε δείγμα (110 μl τελικός όγκος) προστίθενται 88 μl (0.8X) AMPure XP ή KAPA Pure σφαιρίδια τα οποία έχουν έρθει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 30 λεπτά και έχουν ανακατευθεί καλά μηχανικά. Τα μείγματα ανακατεύονται καλά με την πιπέττα και επώάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Κατόπιν τα δείγματα τοποθετούνται στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί καλά η υδάτινη φάση από το DNA που είναι προσδεμένο στα μαγνητικά σφαιρίδια.

- Απορρίπτεται το υγρό και προστίθενται 200 μl φρέσκιας 80% αιθανόλης. Μετά από επώαση 30 δευτερολέπτων απορρίπτεται και πάλι το υγρό και επαναλαμβάνεται ο καθαρισμός με 200 μl 80% αιθανόλης. Μετά από νέα επώαση 30 δευτερολέπτων απορρίπτεται και πάλι το υγρό και το DNA, προσδεμένο στα μαγνητικά σφαιρίδια, επωάζεται για 5 λεπτά περίπου σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να στεγνώσει.
- Στη συνέχεια τα σωληνάκια απομακρύνονται από τη μαγνητική βάση και τα σφαιρίδια με το προσδεμένο DNA αναδιαλύονται σε 53 μl Elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, Qiagen). Ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τα σωληνάκια μεταφέρονται και πάλι στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί καλά η υδατινή φάση, η οποία τώρα περιέχει το DNA, από τα μαγνητικά σφαιρίδια.
- 50 μl από την υδατινή φάση μεταφέρονται σε νέα σωληνάκια.

Επιλογή τμημάτων DNA συγκεκριμένου μεγέθους

- Η κατάτμηση του DNA δημιουργεί κομμάτια ποικίλου μήκους. Για την καλύτερη απόδοση του υβριδισμού και της ακόλουθης αλληλούχισης, τα τμήματα του DNA πρέπει να έχουν παρόμοιο μέγεθος. Για το λόγο αυτό γίνεται επιλογή των τμημάτων 200-450 bp χρησιμοποιώντας και πάλι σφαιρίδια AMPure XP ή KAPA Pure.
- Προστίθενται 35 μl (0.7X) σφαιρίδια AMPure XP ή KAPA Pure σε κάθε σωληνάριο που περιέχει τα 50 μl καθαρισμένης βιβλιοθήκης. Τα σφαιρίδια έχουν έρθει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 30 λεπτά και έχουν ανακατευθεί καλά μηχανικά. Τα μείγματα ανακατεύονται καλά με την πιπέττα και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά ούτως ώστε κομμάτια >450 bp να δεσμευτούν στα σφαιρίδια.
- Κατόπιν τα σωληνάρια τοποθετούνται στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί καλά η υδάτινη φάση, η οποία περιέχει κομμάτια DNA <450 bp, από τα μαγνητικά σφαιρίδια.
- Προσεχτικά, μεταφέρονται σε νέο σωληνάριο 80 μl της υδάτινης φάσης.
- Μετά από μηχανικό ανακάτεμα των AMPure σφαιριδίων, 10 μl προστίθενται στο σωληνάριο που περιέχει 80 μl από το προηγούμενο βήμα.
- Τα μείγματα ανακατεύονται καλά με την πιπέττα και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά ούτως ώστε κομμάτια >200 bp να δεσμευτούν στα σφαιρίδια.
- Κατόπιν τα σωληνάρια τοποθετούνται στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί καλά η υδάτινη φάση από τα σφαιρίδια όπου είναι δεσμευμένα κομμάτια DNA >200 bp.
- Απορρίπτεται το υγρό και προστίθενται 200 μl φρέσκιας 80% αιθανόλης. Μετά από επώαση 30 δευτερολέπτων απορρίπτεται και πάλι το υγρό και επαναλαμβάνεται ο καθαρισμός με 200 μl 80% αιθανόλης. Μετά από νέα επώαση 30 δευτερολέπτων απορρίπτεται και πάλι το υγρό και το DNA, προσδεμένο στα μαγνητικά σφαιρίδια, επωάζεται για 1 λεπτό περίπου σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να στεγνώσει.
- Στη συνέχεια τα σωληνάρια απομακρύνονται από τη μαγνητική βάση και τα σφαιρίδια με το προσδεμένο DNA αναδιαλύονται σε 23 μl Elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, Qiagen).

Ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τα σωληνάκια μεταφέρονται και πάλι στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί καλά η υδάτινη φάση, η οποία τώρα περιέχει το DNA, από τα μαγνητικά σφαιρίδια.

- 20 μl από την υδάτινη φάση μεταφέρονται σε νέα σωληνάκια.

Ενίσχυση επιλεγμένων κομματιών DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και καθαρισμός

- Ετοιμάζεται μείγμα αντιδραστηρίων για κάθε δείγμα όπως φαίνεται στον πίνακα 3:

Πίνακας 3: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης Pre-Capture LM-PCR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl)
KAPA HiFi HotStart Ready Mix 2X (KAPA Hyper Plus kit – thaw on ice, mix without vortexing)	25 (+/-0.2μl)
Library Amplification Primer Mix 10X (KAPA Hyper Plus kit)	5 (+/-0.2μl)
Τελικός όγκος	30

- Σε κάθε δείγμα από το βήμα 8B5 προστίθενται 30 μl από το παραπάνω μείγμα
- Στη συνέχεια οι αντιδράσεις PCR τοποθετούνται σε προθερμασμένο στους 98°C θερμικό κυκλοποιητή και υποβάλλονται στο πρόγραμμα το οποίο εμφανίζεται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4: Πρόγραμμα PCR

Θερμοκρασία	Χρόνος
98°C	0:45
98°C	0:15
60 °C	0:30
72°C	0:30
72°C	1:00
4°C	Max 72 h

} X5* κύκλοι

* Ο αριθμός των κύκλων μπορεί να μεταβληθεί ανάλογα με την αρχική ποσότητα DNA που έχει χρησιμοποιηθεί: αν η αρχική ποσότητα ήταν >600 ng οι κύκλοι μειώνονται σε 4.

- Μετά την ολοκλήρωση της PCR, το προϊόν για κάθε δείγμα προς ανάλυση πρέπει να καθαριστεί από υπολειπόμενους εκκινητές και τμήματα DNA μικρού μοριακού μεγέθους.

Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων σε διάλειμμα (Agencourt AMPure XP ή KAPA Pure).

- Σε κάθε δείγμα (50 μl τελικός όγκος) προστίθενται 90 μl (1.8X) AMPure XP ή KAPA Pure σφαιρίδια τα οποία έχουν έρθει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 30 λεπτά και έχουν ανακατευθεί καλά μηχανικά. Τα μείγματα ανακατεύονται καλά με την πιπέττα και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Κατόπιν τα δείγματα τοποθετούνται στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί καλά η υδάτινη φάση από το DNA που είναι προσδεμένο στα μαγνητικά σφαιρίδια.
- Απορρίπτεται το υγρό και προστίθενται 200 μl φρέσκιας 80% αιθανόλης. Μετά από επώαση 30 δευτερολέπτων απορρίπτεται και πάλι το υγρό και επαναλαμβάνεται ο καθαρισμός με 200 μl 80% αιθανόλης. Μετά από νέα επώαση 30 δευτερολέπτων απορρίπτεται και πάλι το υγρό και το DNA, προσδεμένο στα μαγνητικά σφαιρίδια, επωάζεται για 5 λεπτά περίπου σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να στεγνώσει.
- Στη συνέχεια τα σωληνάρια απομακρύνονται από τη μαγνητική βάση και τα σφαιρίδια με το προσδεμένο DNA αναδιαλύονται σε 53 μl νερού (molecular grade). Ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τα σωληνάρια μεταφέρονται και πάλι στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί καλά η υδάτινη φάση, η οποία τώρα περιέχει το DNA, από μαγνητικά σφαιρίδια.
- 50 μl από την υδάτινη φάση μεταφέρονται σε νέα σωληνάρια.

Έλεγχος προϊόντων και φωτομέτρηση και ισόποση ανάμειξη της βιβλιοθήκης (όλων των δειγμάτων)

- Μετά τον καθαρισμό απαιτείται έλεγχος του μεγέθους των προϊόντων προς αλληλούχιση και ισόποση ανάμειξη των βιβλιοθηκών (όλων των δειγμάτων) ούτως ώστε η τελική βιβλιοθήκη να είναι συνολικά 1 μg .
- Ο έλεγχος του μεγέθους των βιβλιοθηκών γίνεται με την ανάλυση 1/20^{ου} των προϊόντων στον αναλυτή LabChip, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το kit που χρησιμοποιείται είναι το HT DNA HS Rgt Kit (Perkin Elmer Inc). Η διαδικασία κρίνεται επιτυχής αν οι βιβλιοθήκες έχουν μέση κατανομή μεγέθους 150-500 bp.
- Ο έλεγχος της συγκέντρωσης και καθαρότητας των βιβλιοθηκών γίνεται με την χρήση του φωτόμετρου nanodrop ND-01. Αρχικά γίνεται μηδενισμός χρησιμοποιώντας 2 μl νερού (molecular grade). Στη συνέχεια λαμβάνονται 3 μετρήσεις για την κάθε βιβλιοθήκη (χρησιμοποιώντας 2 μl) και υπολογίζεται ο μέσος όρος όσον αφορά τη συγκέντρωση και την καθαρότητα. Κάθε βιβλιοθήκη πρέπει να είναι >1 μg και ο λόγος A260/A280 (καθαρότητα) πρέπει να είναι μεταξύ 1,7 και 2,0.

1^{ος} Υβριδισμός βιβλιοθήκης και SeqCap ιχνηθετών

- Μετά τον έλεγχο των βιβλιοθηκών γίνεται ισόποση ανάμειξή τους ούτως ώστε να έχουμε μία βιβλιοθήκη τελικού όγκου 1 μg .
- Σε αυτήν προστίθενται 5 μl 1 mg/ml COT-1 DNA (Nimbelgen, Roche) και ολιγονουκλεοτίδια ενίσχυσης του υβριδισμού (Hybridization Enhancing: HE-oligos) σε τελικό όγκο 2000 pmol. Τα HE oligo που χρησιμοποιούνται παρέχονται σε λυοφιλοποιημένη μορφή και πρέπει να ανασυσταθούν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνολικά, υπάρχουν 24 διαφορετικά εμπορικά διαθέσιμα HE oligos τα οποία αντιστοιχούν σε κάθε έναν από τους “adaptors” (αλληλουχίες ταυτότητας) που χρησιμοποιούνται στο βήμα 8B3. Επιπλέον, υπάρχει ένα «καθολικό» HE oligo, το οποίο χρησιμοποιείται σε ποσότητα 1000 pmol, ενώ τα υπόλοιπα HE oligos αναμιγνύονται ισόποσα ώστε συνολικά να έχουν ποσότητα 1000 pmol. Τα HE oligo που χρησιμοποιούνται σε αυτό το στάδιο είναι αντίστοιχης ταυτότητας με αυτά που έχουν χρησιμοποιηθεί στο βήμα 8B3 για την σήμανση της κάθε βιβλιοθήκης.

- Υπολογίζεται ο τελικός όγκος του μείγματος όπως φαίνεται στον πίνακα 5:

Πίνακας 5. Μείγμα προς υβριδισμό.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl)
1 mg/ml COT-1 DNA	5 (+/-0.2μl)
1 μg βιβλιοθήκη	-
SeqCap HE oligo pool (2000 pmol)	11 (+/-0.2μl)
Τελικός όγκος	-

- Στο μείγμα από τον πίνακα 5 προστίθενται 2X AMPure XP ή KAPA Pure σφαιρίδια τα οποία έχουν έρθει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 30 λεπτά και έχουν ανακατευθεί καλά μηχανικά. Το μείγμα ανακατεύεται καλά με την πιπέττα και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Κατόπιν τοποθετείται στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί καλά η υδάτινη φάση από το DNA που είναι προσδεμένο στα μαγνητικά σφαιρίδια.
- Απορρίπτεται το υγρό και προστίθενται 190 μl φρέσκιας 80% αιθανόλης. Μετά από επώαση 30 δευτερολέπτων απορρίπτεται και πάλι το υγρό και το DNA, προσδεμένο στα μαγνητικά σφαιρίδια, επωάζεται για 5 λεπτά περίπου σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να στεγνώσει.
- Στη συνέχεια τα σωληνάρια απομακρύνονται από τη μαγνητική βάση και τα σφαιρίδια με το προσδεμένο DNA αναδιαλύονται σε 7,5 μl 2X Hybridization Buffer και 3 μl Hybridization Component A (Nimblegen, Roche). Ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τα σωληνάρια μεταφέρονται και πάλι στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί καλά η υδάτινη φάση, η οποία τώρα περιέχει το DNA, από τα μαγνητικά σφαιρίδια.
- 10.5 μl από την υδάτινη φάση μεταφέρονται σε 0.2 ml σωληνάριο που περιέχει 2,25 μl του μείγματος βιοτινυλιωμένων ιχνηθετών. Σε αυτό προστίθενται 2,25 μl νερού (molecular

grade). Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται 4,5 μl του μείγματος βιοτινυλιωμένων ιχνηθετών και πραγματοποιείται ένας μόνο υβριδισμός, η δοκιμασία δηλαδή δεν περιλαμβάνει 8B10-8B12.

- Το μείγμα βιβλιοθήκης και βιοτινυλιωμένων ιχνηθετών μεταφέρεται σε κεφαλή θερμικού κυκλοποιητή συνδεδεμένου στο δίκτυο UPS και προθερμασμένου στους 95°C.
- Ακολουθεί αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά και επώαση στους 47°C για 16-20 ώρες.

Ανάκτηση και καθαρισμός υβριδοποιημένου DNA

- Μετά την ολοκλήρωση της επώασης πρέπει να απομακρυνθούν τα τμήματα DNA τα οποία δεν υβριδοποιηθεί με τους βιοτινυλιωμένους ιχνηθέτες. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση παραμαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη (Capture Beads - Nimglegen, Roche). Ακολουθούν διαδοχικές εκπλύσεις μη δεσμευμένων/μη ειδικών στόχων και υπολειμάτων γενωμικού DNA με διαλύματα αλάτων/Θειικού δωδεκυλικού νατρίου διαβαθμισμένης αυστηρότητας
- Αρχικά παρασκευάζονται αραιώσεις των πλυστικών διαλυμάτων βάση του πίνακα 6 και των οδηγιών του κατασκευαστή:

Πίνακας 6. Πλυστικά διαλύματα.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα αντιδραστηρίου (μl)	Ποσότητα νερού (Molecular Grade) (μl)	Τελικός όγκος (μl)
10X Stringent Wash Buffer (vial 4)	80 μl	720 μl	800 μl
10X Wash Buffer I (vial 1)	60 μl	540 μl	600 μl
10X Wash Buffer II (vial 2)	40 μl	360 μl	400 μl
10X Wash Buffer III (vial 3)	40 μl	360 μl	400 μl
2.5X Bead Wash Buffer (vial 7)	400 μl	300 μl	1000 μl

Παρασκευάζονται διαλύματα και για τους δύο υβριδισμούς. Τα διαλύματα μπορούν να φυλαχθούν σε θερμοκρασία δωματίου έως και 2 εβδομάδες μετά την αραιώση τους.

- Αρχικά ετοιμάζονται τα Capture Beads τα οποία έχουν έρθει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 30 λεπτά και έχουν ανακατευθεί καλά μηχανικά.
- 50 μl Capture Beads μεταφέρονται σε καθαρό 0,2 ml ή 1,5 ml σωληνάριο το οποίο τοποθετείται στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'').
- Απορρίπτεται το υγρό και τα σφαιρίδια αναδιαλύονται σε 100 μl 1X Bead Wash Buffer.
- Το σωληνάριο τοποθετείται και πάλι στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'').
- Απορρίπτεται το υγρό και τα σφαιρίδια αναδιαλύονται σε 100 μl 1X Bead Wash Buffer.

- Το σωληνάριο τοποθετείται και πάλι στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'').
- Απορρίπτεται το υγρό και τα σφαιρίδια αναδιαλύονται καλά σε 50 μl 1X Bead Wash Buffer. Τα 50 μl μείγματος σφαιριδίων / 1X Bead Wash Buffer μεταφέρονται σε νέο 0,2 ml σωληνάριο.
- Το σωληνάριο τοποθετείται στη μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'').
- Το σωληνάριο μεταφέρεται στην κεφαλή του κυκλοποιητή όπου γίνεται η επώαση και τα 15 μl υβριδισμού χρησιμοποιούνται για την αναδιάλυση των σφαιριδίων. Η διαδικασία πρέπει να γίνει γρήγορα ούτως ώστε να μην στεγνώσουν τα σφαιρίδια και να μην πέσει η θερμοκρασία του υβριδισμού κάτω από 43°C. Ακολουθεί επώαση στους 47°C, 15 λεπτά.
- Προστίθενται 100 μl 1X Wash Buffer I. Το σωληνάριο μεταφέρεται στη μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'') τα οποία αναδιαλύονται στον κυκλοποιητή στους 47°C σε 200 μl 1X Stringent Wash Buffer. Ακολουθεί επώαση στους 47°C, 5 λεπτά.
- Το σωληνάριο μεταφέρεται στη μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'') τα οποία αναδιαλύονται στον κυκλοποιητή στους 47°C σε 200 μl 1X Stringent Wash Buffer. Ακολουθεί επώαση στους 47°C, 5 λεπτά.
- Το σωληνάριο μεταφέρεται στη μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'') τα οποία αναδιαλύονται σε 200 μl 1X Wash Buffer I. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.
- Το σωληνάριο μεταφέρεται στη μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'') τα οποία αναδιαλύονται σε 200 μl 1X Wash Buffer II. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.
- Το σωληνάριο μεταφέρεται στη μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'') τα οποία αναδιαλύονται σε 200 μl 1X Wash Buffer III. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.

- Το σωληνάριο μεταφέρεται στη μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδατινή βάση από τα σφαιρίδια (<math><5''</math>) τα οποία αναδιαλύονται σε 15 μl νερού (molecular grade).

Ενίσχυση υβριδοποιημένου DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και καθαρισμός

- Ετοιμάζεται μείγμα αντιδραστηρίων για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σύμφωνα με τον πίνακα 7:

Πίνακας 7: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης Mid-Capture LM-PCR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl)
KAPA HiFi HotStart Ready Mix 2X (KAPA Hyper Plus kit – thaw on ice, mix without vortexing)	25 (+/-0.2μl)
Post-LM-PCR Oligos 1 & 2 (5 μM)	5 (+/-0.2μl)
Τελικός όγκος	30

- Το δείγμα από το βήμα 8B9 αναδεύεται μηχανικά για να ανακατευτούν καλά τα σφαιρίδια με το νερό και ογκομετρείται. Εφ' όσον χρειάζεται συμπληρώνεται νερό (molecular grade) έως τα 20 μl. Σε αυτό προστίθενται 30 μl από το παραπάνω μείγμα.
- Στη συνέχεια οι αντιδράσεις PCR τοποθετούνται σε προθερμασμένο στους 98°C θερμικό κυκλοποιητή και υποβάλλονται στο πρόγραμμα το οποίο εμφανίζεται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8: Πρόγραμμα PCR

Θερμοκρασία	Χρόνος
98°C	0:45
98°C	0:15
60 °C	0:30
72°C	0:30
72°C	1:00
4°C	Max 72 h

} X5 κύκλοι

- Μετά την ολοκλήρωση της PCR, το προϊόν για κάθε δείγμα προς ανάλυση πρέπει να καθαριστεί από υπολειπόμενους εκκινητές και τμήματα DNA μικρού μοριακού μεγέθους. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων σε διάλειμμα (Agencourt AMPure XP ή KAPA Pure beads).

- Σε κάθε δείγμα (50 μl τελικός όγκος) προστίθενται 90 μl (1.8X) AMPure XP ή KAPA Pure σφαιρίδια τα οποία έχουν έρθει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 30 λεπτά και έχουν ανακατευθεί καλά μηχανικά. Τα μείγματα ανακατεύονται καλά με την πιπέττα και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Κατόπιν τα δείγματα τοποθετούνται στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί καλά η υδάτινη φάση από το DNA που είναι προσδεμένο στα μαγνητικά σφαιρίδια.
- Απορρίπτεται το υγρό και προστίθενται 200 μl φρέσκιας 80% αιθανόλης. Μετά από επώαση 30 δευτερολέπτων απορρίπτεται και πάλι το υγρό και επαναλαμβάνεται ο καθαρισμός με 200 μl 80% αιθανόλης. Μετά από νέα επώαση 30 δευτερολέπτων απορρίπτεται και πάλι το υγρό και το DNA, προσδεμένο στα μαγνητικά σφαιρίδια, επωάζεται για 5 λεπτά περίπου σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να στεγνώσει.
- Στη συνέχεια τα σωληνάρια απομακρύνονται από τη μαγνητική βάση και τα σφαιρίδια με το προσδεμένο DNA αναδιαλύονται σε 53 μl νερού (molecular grade). Ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τα σωληνάρια μεταφέρονται και πάλι στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί καλά η υδάτινη φάση, η οποία τώρα περιέχει το DNA, από μαγνητικά σφαιρίδια.
- 50 μl από την υδάτινη φάση μεταφέρονται σε νέα σωληνάρια.

2^{ος} Υβριδισμός βιβλιοθήκης και SeqCap ιχνηθετών

- Στα 50 μl βιβλιοθήκης που προκύπτουν από το βήμα 8B10 προστίθενται 5 μl 1 mg/ml COT-1 DNA (Nimbelgen, Roche) και ολιγονουκλεοτίδια ενίσχυσης του υβριδισμού (HE-oligos) σε τελική ποσότητα 2000 pmol. Όπως περιγράφεται στο βήμα 8B8.
- Υπολογίζεται ο τελικός όγκος του μείγματος όπως φαίνεται στον πίνακα 9:

Πίνακας 9. Μείγμα προς υβριδισμό.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl)
1 mg/ml COT-1 DNA	5 (+/-0.2μl)
Βιβλιοθήκη	50
SeqCap HE oligo pool (2000 pmol)	11 (+/-0.2μl)
Τελικός όγκος	66

- Στο μείγμα από τον πίνακα 4 προστίθενται 132 μl (2X) AMPure XP ή KAPA Pure σφαιρίδια τα οποία έχουν έρθει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 30 λεπτά και έχουν ανακατευθεί καλά μηχανικά. Το μείγμα ανακατεύεται καλά με την πιπέττα και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Κατόπιν τοποθετείται στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί καλά η υδάτινη φάση από το DNA που είναι προσδεμένο στα μαγνητικά σφαιρίδια.
- Απορρίπτεται το υγρό και προστίθενται 190 μl φρέσκιας 80% αιθανόλης. Μετά από επώαση 30 δευτερολέπτων απορρίπτεται και πάλι το υγρό και το DNA, προσδεμένο στα μαγνητικά σφαιρίδια, επωάζεται για 5 λεπτά περίπου σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να στεγνώσει.

- Στη συνέχεια τα σωληνάκια απομακρύνονται από τη μαγνητική βάση και τα σφαιρίδια με το προσδεμένο DNA αναδιαλύονται σε 7,5 μl 2X Hybridization Buffer και 3 μl Hybridization Component A (Nimblegen, Roche). Ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τα σωληνάκια μεταφέρονται και πάλι στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί καλά η υδάτινη φάση, η οποία τώρα περιέχει το DNA, από μαγνητικά σφαιρίδια.
- 10.5 μl από την υδάτινη φάση μεταφέρονται σε 0.2 ml σωληνάριο που περιέχει 2,25 μl του μείγματος βιοτινυλιωμένων ιχνηθετών. Σε αυτό προστίθενται 2,25 μl νερού (molecular grade).
- Το μείγμα βιβλιοθήκης και βιοτινυλιωμένων ιχνηθετών μεταφέρεται σε κεφαλή θερμικού κυκλοποιητή συνδεδεμένου στο δίκτυο UPS και προθερμασμένου στους 95°C.
- Ακολουθεί αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά και επώαση στους 47°C για 16-20 ώρες.

Ανάκτηση και καθαρισμός υβριδοποιημένου DNA

- Μέτα την ολοκλήρωση της επώασης πρέπει να απομακρυνθούν τα τμήματα DNA τα οποία δεν υβριδοποιηθεί με τους βιοτινυλιωμένους ιχνηθέτες. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση παραμαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη (Capture Beads - Nimglegen, Roche). Ακολουθούν διαδοχικές εκπλύσεις μη δεσμευμένων/μη ειδικών στόχων και υπολειμάτων γενωμικού DNA με διαλύματα αλάτων/Θειικού δωδεκυλικού νατρίου διαβαθμισμένης αυστηρότητας. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι αυτά που είχαν αριαωθεί στο βήμα 8B9.
- Αρχικά ετοιμάζονται τα Capture Beads τα οποία έχουν έρθει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 30 λεπτά και έχουν ανακατευθεί καλά μηχανικά.
- 50 μl Capture Beads μεταφέρονται σε καθαρό 0,2 ml ή 1,5 ml σωληνάριο το οποίο τοποθετείται στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'').
- Απορρίπτεται το υγρό και τα σφαιρίδια αναδιαλύονται σε 100 μl 1X Bead Wash Buffer.
- Το σωληνάριο τοποθετείται και πάλι στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'').
- Απορρίπτεται το υγρό και τα σφαιρίδια αναδιαλύονται σε 100 μl 1X Bead Wash Buffer.
- Το σωληνάριο τοποθετείται και πάλι στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'').
- Απορρίπτεται το υγρό και τα σφαιρίδια αναδιαλύονται καλά σε 50 μl 1X Bead Wash Buffer. Τα 50 μl μείγματος σφαιριδίων / 1X Bead Wash Buffer μεταφέρονται σε νέο 0,2 ml σωληνάριο.
- Το σωληνάριο τοποθετείται στη μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'').
- Το σωληνάριο μεταφέρεται στην κεφαλή του κυκλοποιητή όπου γίνεται η επώαση και τα 15 μl υβριδισμού χρησιμοποιούνται για την αναδιάλυση των σφαιριδίων. Η διαδικασία πρέπει

να γίνει γρήγορα ούτος ώστε να μην στεγνώσουν τα σφαιρίδια και να μην πέσει η θερμοκρασία του υβριδισμού κάτω από 43°C. Ακολουθεί επώαση στους 47°C, 15 λεπτά.

- Προστίθενται 100 μl 1X Wash Buffer I. Το σωληνάριο μεταφέρεται στη μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'') τα οποία αναδιαλύονται στον κυκλοποιητή στους 47°C σε 200 μl 1X Stringent Wash Buffer. Ακολουθεί επώαση στους 47°C, 5 λεπτά.
- Το σωληνάριο μεταφέρεται στη μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'') τα οποία αναδιαλύονται στον κυκλοποιητή στους 47°C σε 200 μl 1X Stringent Wash Buffer. Ακολουθεί επώαση στους 47°C, 5 λεπτά.
- Το σωληνάριο μεταφέρεται στη μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'') τα οποία αναδιαλύονται σε 200 μl 1X Wash Buffer I. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.
- Το σωληνάριο μεταφέρεται στη μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'') τα οποία αναδιαλύονται σε 200 μl 1X Wash Buffer II. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.
- Το σωληνάριο μεταφέρεται στη μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'') τα οποία αναδιαλύονται σε 200 μl 1X Wash Buffer III. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.
- Το σωληνάριο μεταφέρεται στη μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί η υδάτινη βάση από τα σφαιρίδια (<5'') τα οποία αναδιαλύονται σε 15 μl νερού (molecular grade).

Ενίσχυση υβριδοποιημένου DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και καθαρισμός

- Ετοιμάζεται μείγμα αντιδραστηρίων για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σύμφωνα με τον πίνακα 10:

Πίνακας 10: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης Post-Capture LM-PCR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μl)
KAPA HiFi HotStart Ready Mix 2X (KAPA Hyper Plus kit – thaw on ice, mix without vortexing)	25 (+/-0.2μl)
Post-LM-PCR Oligos 1 & 2 (5 μM)	5 (+/-0.2μl)
Τελικός όγκος	30

- Το δείγμα από το βήμα 8B12 αναδεύεται μηχανικά για να ανακατευτούν καλά τα σφαιρίδια με το νερό και ογκομετρείται. Εφ' όσον χρειάζεται συμπληρώνεται νερό (molecular grade) έως τα 20 μl. Σε αυτό προστίθενται 30 μl από το παραπάνω μείγμα.
- Στη συνέχεια οι αντιδράσεις PCR τοποθετούνται σε προθερμασμένο στους 98°C θερμικό κυκλοποιητή και υποβάλλονται στο πρόγραμμα το οποίο εμφανίζεται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11: Πρόγραμμα PCR

Θερμοκρασία	Χρόνος
98°C	0:45
98°C	0:15
60 °C	0:30
72°C	0:30
72°C	1:00
4°C	Max 72 h

} Χ14 κύκλοι

- Μετά την ολοκλήρωση της PCR, το προϊόν για κάθε δείγμα προς ανάλυση πρέπει να καθαριστεί από υπολειπόμενους εκκινητές και τμήματα DNA μικρού μοριακού μεγέθους.

Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων σε διάλειμμα (Agencourt AMPure XP ή KAPA Pure beads).

- Σε κάθε δείγμα (50 μl τελικός όγκος) προστίθενται 90 μl (1.8X) AMPure XP ή KAPA Pure σφαιρίδια τα οποία έχουν έρθει σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 30 λεπτά και έχουν ανακατευθεί καλά μηχανικά. Τα μείγματα ανακατεύονται καλά με την πιπέττα και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Κατόπιν τα δείγματα τοποθετούνται στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί καλά η υδάτινη φάση από το DNA που είναι προσδεμένο στα μαγνητικά σφαιρίδια.
- Απορρίπτεται το υγρό και προστίθενται 200 μl φρέσκιας 80% αιθανόλης. Μετά από επώαση 30 δευτερολέπτων απορρίπτεται και πάλι το υγρό και επαναλαμβάνεται ο καθαρισμός με 200 μl 80% αιθανόλης. Μετά από νέα επώαση 30 δευτερολέπτων απορρίπτεται και πάλι το υγρό και το DNA, προσδεμένο στα μαγνητικά σφαιρίδια, επωάζεται για 5 λεπτά περίπου σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να στεγνώσει.
- Στη συνέχεια τα σωληνάρια απομακρύνονται από τη μαγνητική βάση και τα σφαιρίδια με το προσδεμένο DNA αναδιαλύονται σε 53 μl νερού (molecular grade). Ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τα σωληνάρια μεταφέρονται και πάλι στην μαγνητική βάση έως ότου διαχωριστεί καλά η υδάτινη φάση, η οποία τώρα περιέχει το DNA, από μαγνητικά σφαιρίδια.
- 50 μl από την υδάτινη φάση μεταφέρονται σε νέα σωληνάρια.

Έλεγχος και ποσοτικοποίηση βιβλιοθήκης

- Μετά τον καθαρισμό απαιτείται έλεγχος του μεγέθους και της συγκέντρωσης της βιβλιοθήκης
- Ο έλεγχος του μεγέθους των βιβλιοθηκών γίνεται με την ανάλυση 1/20^{ου} των προϊόντων στον αναλυτή LabChip, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το kit που χρησιμοποιείται είναι το HT DNA HS Rgt Kit (Perkin Elmer Inc). Η διαδικασία κρίνεται επιτυχής αν οι βιβλιοθήκες έχουν μέση κατανομή μεγέθους 150-500 bp.
- Ο έλεγχος της συγκέντρωσης και καθαρότητας των βιβλιοθηκών γίνεται με την χρήση του φωτόμετρου nanodrop ND-01. Αρχικά γίνεται μηδενισμός χρησιμοποιώντας 2 μl νερού (molecular grade). Στη συνέχεια λαμβάνονται 3 μετρήσεις για την κάθε βιβλιοθήκη (χρησιμοποιώντας 2μl) και υπολογίζεται ο μέσος όρος όσον αφορά τη συγκέντρωση και την καθαρότητα. Η τελική βιβλιοθήκη πρέπει να είναι > 500 ng και ο λόγος A260/A280 (καθαρότητα) πρέπει να είναι μεταξύ 1,7 και 2,0.
- Η συγκέντρωση σε nM του κάθε δείγματος υπολογίζεται με τον παρακάτω τύπο:
Συγκέντρωση δείγματος από την φωτομέτρηση (ng/μl)×10⁶ / 656.6 x μέγεθος βιβλιοθήκης

Προετοιμασία των βιβλιοθηκών για αλληλούχιση

Αφού ολοκληρωθεί η ποσοτικοποίηση της βιβλιοθηκών προστίθεται Elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, Qiagen) προκειμένου η βιβλιοθήκη να είναι σε συγκέντρωση 4 nM. Η βιβλιοθήκη αυτή πρέπει να αποδιαταχτεί για την μετέπειτα αλληλούχιση αναμειγνύοντας 5 μl με 5 μl φρέσκου 0,2 N NaOH. Μετά από επώαση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου η αποδιαταγή σταθεροποιείται με την προσθήκη 990 μl buffer HT1, ο οποίος χορηγείται με το MiSeq Reagent Kit v2 ή v3 από την Illumina. Η βιβλιοθήκη που προκύπτει έχει τώρα συγκέντρωση 20 pM και πρέπει να αραιωθεί περαιτέρω σε συγκέντρωση 10 pM αναμειγνύοντας 300 μl της βιβλιοθήκης με 300 μl buffer HT1. Το μείγμα φυλάσσεται στον πάγο έως ότου φορτωθεί στο μηχάνημα.

Όταν τα δείγματα προς αλληλούχιση περιλαμβάνουν πολλές φορές τα ίδια αμπλικώνια, όπως στην συγκεκριμένη ανάλυση οι βιβλιοθήκη χαρακτηρίζεται ως χαμηλής ποικιλότητας (low diversity). Στην περίπτωση αυτή το μηχάνημα δυσκολεύεται να διαχωρίσει τις αλληλουχίες που προκύπτουν και να αποδώσει την κάθε αλληλουχία στο σωστό δείγμα. Στις περιπτώσεις αυτές κάνουμε spike την βιβλιοθήκη με 5% μάρτυρα PhiX που παρέχει η Illumina. Ο μάρτυρας πρέπει επίσης να αραιωθεί και να αποδιαταχθεί πριν την προσθήκη του στην βιβλιοθήκη. Αρχικά πρέπει να γίνει αραιώση του 10 nM PhiX μάρτυρα σε συγκέντρωση των 4 nM, αναμειγνύοντας 2 μl με 3 μl 10 mM Tris-HCl σε 0,1% Tween 20, pH8.5. Η αποδιάταξη γίνεται όπως και για την βιβλιοθήκη προσθέτοντας στον 4 nM PhiX 5 μl φρέσκου 0,2 N NaOH. Μετά από επώαση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου η αποδιαταγή σταθεροποιείται με την προσθήκη 990 μl buffer HT1 ώστε να καταλήξουμε με τον αποδιαταγμένο PhiX σε συγκέντρωση 20 pM. Στη συνέχεια 375 μl πρέπει να αναμειχθούν με 225 μl buffer HT1 και να καταλήξουμε με τον PhiX σε συγκέντρωση 12,5 pM. Το μείγμα φυλάσσεται στον πάγο έως ότου φορτωθεί στο μηχάνημα.

Τέλος αναμειγνύουμε 570 μl της αποδιαταγμένης βιβλιοθήκης με 30 μl αποδιαταγμένου PhiX για να καταλήξουμε στο επιθυμητό ποσοστό spiking που χρειαζόμαστε.

Ανάλυση στο γενετικό αναλυτή

Η αλληλούχιση στο γενετικό αναλυτή MiSeq πραγματοποιείται αυτόματα από το μηχάνημα. Όλα τα απαιτούμενα αντιδραστήρια παρέχονται μοιρασμένα στις κατάλληλες θέσει μίας κασέτας η οποία φυλάσσεται σε θερμοκρασία μεταξύ -20 με -25°C. Τα αντιδραστήρια αυτά πρέπει να ξεπαγώσουν σταδιακά τοποθετώντας την κασέτα σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία δωματίου μία ώρα πριν την χρήση. Μόλις όλα τα αντιδραστήρια ξεπαγώσουν η κασέτα ανακινείται 10 φορές ούτως ώστε να γίνει σωστή ανάμειξη όλων των αντιδραστηρίων. 600 μl από την αποδιαταγμένη βιβλιοθήκη φορτώνονται στη θέση "Load Samples" της κασέτας.

Στη συνέχεια η κασέτα τοποθετείται στο γενετικό αναλυτή. Για την λειτουργία του αναλυτή χρησιμοποιείται το πρωτόκολλο Small Genome Sequencing, και υποκατηγορία Resequencing.

Οι ρυθμίσεις που ορίζονται συνοψίζονται στον πίνακα 12.

Πίνακας 12. Ρυθμίσεις MiSeq

Library Prep Kit	TruSeq LT
Index Reads	1
Read Type	Paired End
Cycles Read 1	151
Cycles Read 2	151

Ανάλυση-αξιολόγηση αποτελεσμάτων

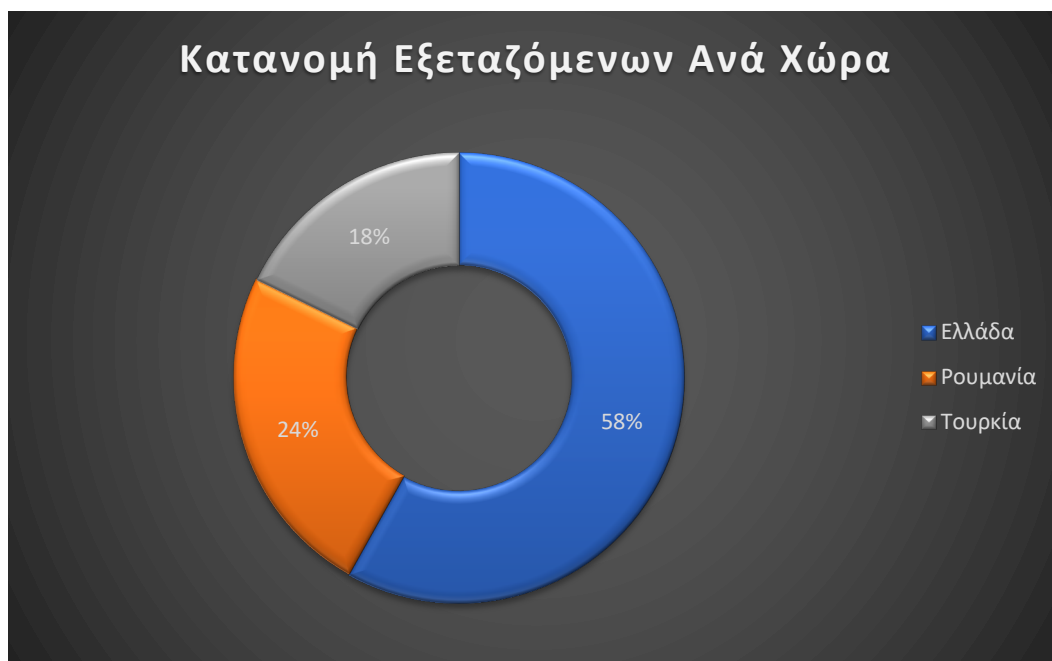
Η πρωταρχική ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται αυτόματα με το περάς της αντίδρασης από το λογισμικό MiSeq Reporter (Illumina). Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης από το MiSeq Reporter γίνεται αξιολόγηση της κάλυψης που έχει επιτευχθεί για κάθε περιοχή των γονιδίων υπό ανάλυση για κάθε δείγμα. Προκειμένου να κριθεί ικανοποιητική η ποιότητα των αποτελεσμάτων προσβλέπουμε σε κάλυψη της κάθε περιοχής προς αλληλούχιση τουλάχιστον 60 φορές και Q30.

Η απεικόνιση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων γίνεται με το λογισμικό SeqNext (JSI) του γενετικού αναλυτή ανοίγουν με το λογισμικό SeqScape v4.2.1 (JSI medical systems GmbH). Το εν λόγω πρόγραμμα επιτρέπει την απεικόνιση ενός ψευδοχρωματογραφήματος, την άμεση σύγκριση όλων των αλληλουχιών με αλληλουχίες αναφοράς από την βάση δεδομένων hg19 (UCSC), καθώς την αντιστοίχισή των γενετικών αλλαγών που πιθανών να υπάρχουν με τη βάση δεδομένων dbSNP (NCBI). Έτσι, αφενός μεν οι οποιοσδήποτε διαφορές σε σύγκριση με την αλληλουχία αναφοράς είναι ξεκάθαρα διακριτές, αφετέρου δε ο αναλυτής μπορεί να προχωρήσει σε ενδεδειγμένη αξιολόγηση των εκάστοτε ευρημάτων σε επίπεδο γενετικού υλικού και πρωτεΐνης, πληροφορίες ιδιαίτερα σημαντικές για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων όπως αυτά παρατίθενται στην τελική έκθεση αξιολόγησης.

3. Αποτελέσματα

Δημογραφικά Ασθενών

Κατά την περίοδο μεταξύ του Ιουνίου του 2014 και του Ιουνίου το 2020 1814 άτομα με καρκίνο μαστού ήρθαν στο εργαστήριό μας για γενετική ανάλυση με πολυγονιδιακό πάνελ. Πιο συγκεκριμένα, 1054 από Ελλάδα (58,1%), 437 από Ρουμανία (24,1%) και 323 από Τουρκία (17,8%) (εικόνα 1). Η μέση ηλικία των εξεταζόμενων ήταν 45 έτη και η πλειοψηφία τους ήταν γυναίκες (99%, 1803/1814) ενώ μόνο το 1% (11/1814) ήταν άνδρες. Όλοι οι επιλεγμένοι εξεταζόμενοι έχουν διάγνωση καρκίνου μαστού. Ο μέσος χρόνος μεταξύ διάγνωσης και εξέτασης είναι 1 έτος και ο βασικός λόγος για παραπομπή για την εξέταση ήταν το οικογενειακό ιστορικό. Οι εξεταζόμενοι από την Ελλάδα είχαν πιο συχνά βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό 87.3% (920/1054) ενώ στην Τουρκία και στη Ρουμανία, 84.7% (274/323) και 78.2% (342/437) αντίστοιχα (εικόνα 2).



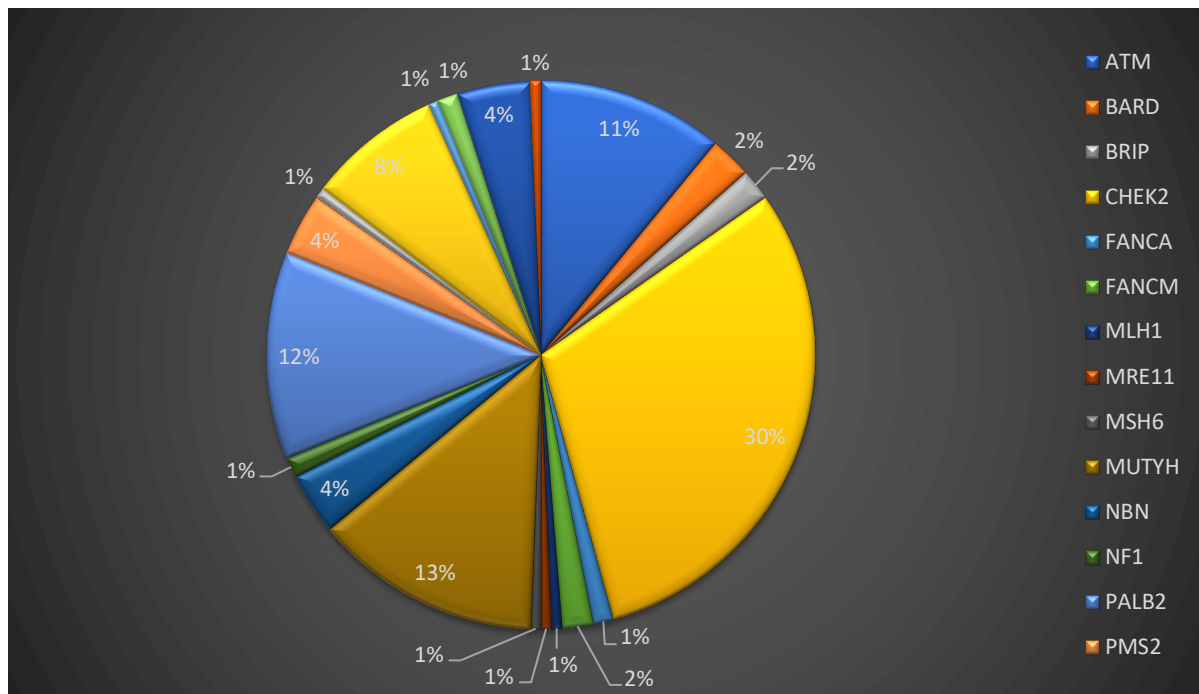
Εικόνα 1 Κατανομή Ασθενών Ανά Χώρα



Εικόνα 2 Βεβαρημένο Ιστορικό Ανά Χώρα

Παθογόνα Ευρήματα

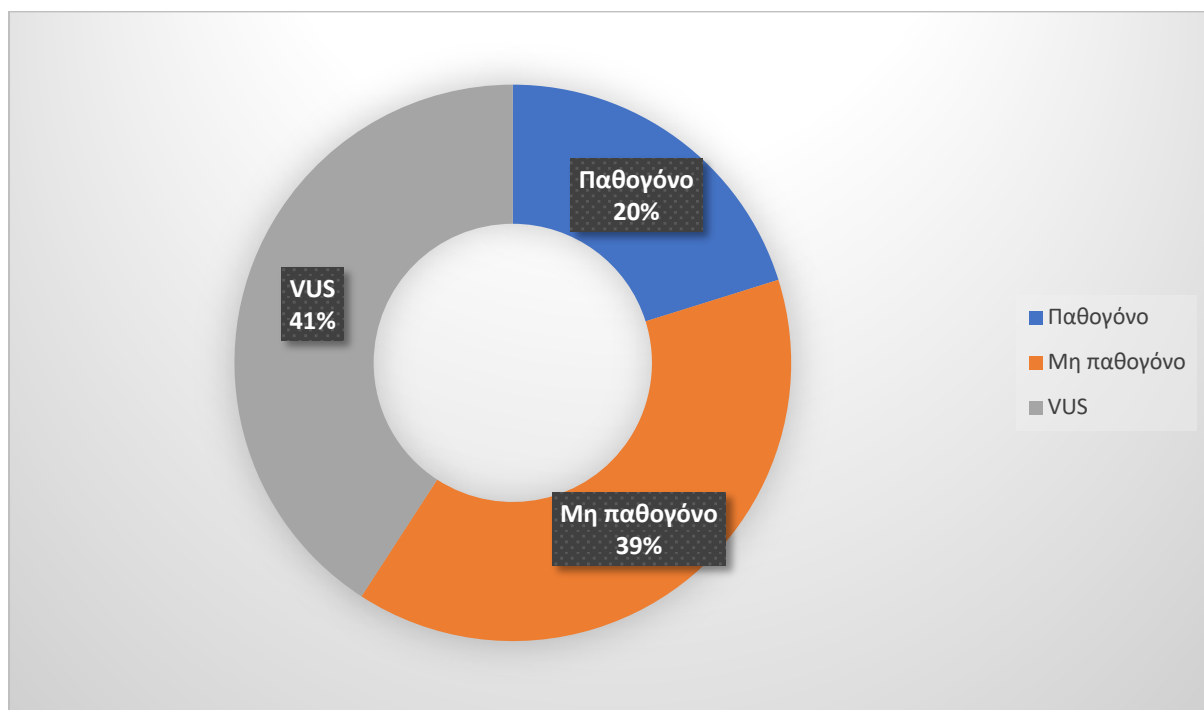
Από τους 1814 εξεταζόμενους, το 20% έφερε παθογόνες ή πιθανόν παθογόνες μεταλλάξεις (366/1814). Από αυτές, το 50% (183/366) ήταν στα γονίδια *BRCA1* ή *BRCA2*. Ενώ το υπόλοιπο 50% ήταν σε άλλα γονίδια (εικόνα 3) και 9 ασθενείς είχαν πάνω από μια παθογόνο μετάλλαξη.



Εικόνα 3 Ποσοστό θετικών γονιδίων non-BRCA

Μη-Παθογόνα Ευρήματα

Το 79,8% (1448/1814) των εξεταζόμενων είχαν μη παθογόνα ευρήματα. Από αυτά το 51,2% (741/1448) των ασθενών είχαν ευρήματα αγνώστου κλινικής σημασίας και το υπόλοιπο 48,8% (707/1448) δεν είχαν παθογόνα ευρήματα.

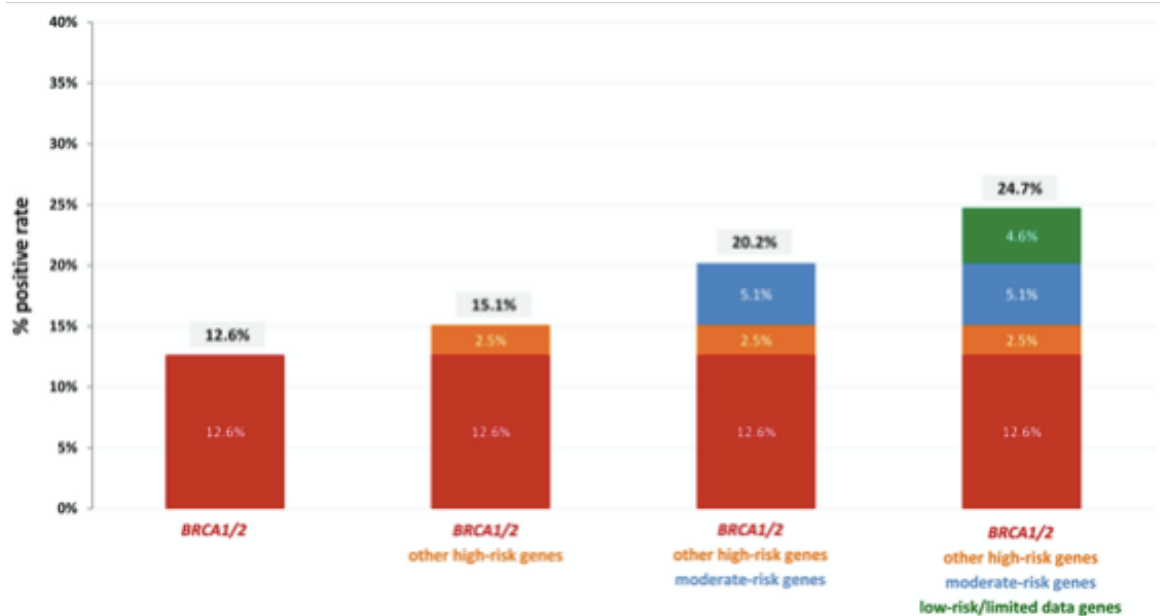


Εικόνα 4. Κατανομή ευρημάτων

5. Συζήτηση

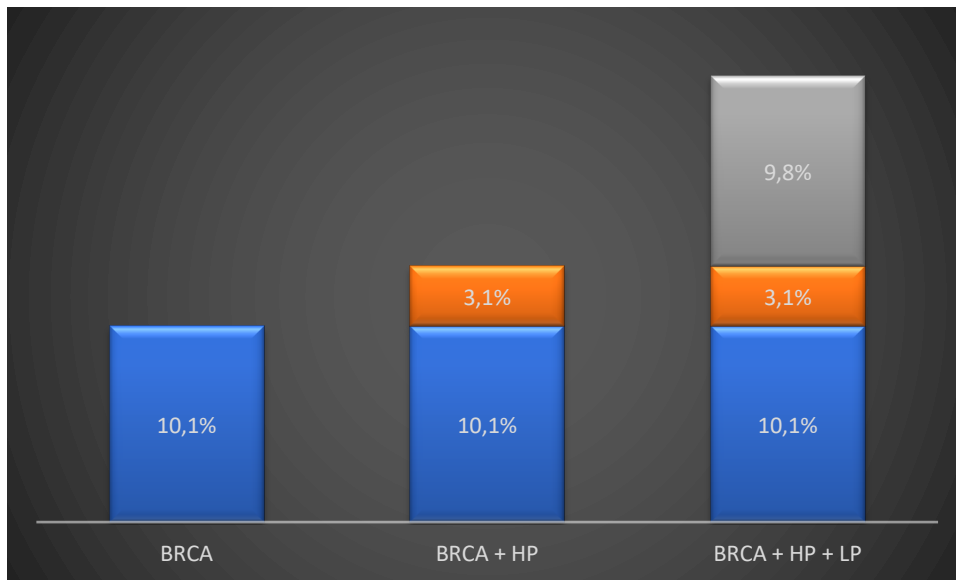
Σε αυτή τη μελέτη εφαρμόστηκε πολυπαραγοντική ανάλυση πολλών γονιδίων με τη χρήση τεχνολογίας NGS για την ανίχνευση παθογόνων μεταλλάξεων που σχετίζονται με τον κληρονομούμενο καρκίνο. Σε ένα σύνολο 1814 ασθενών με καρκίνο μαστού το 85,5% (1501/1814) μας είχε προμηθεύσει με το οικογενειακό ιστορικό τους και εξετάστηκαν κατά μέσο όρο 1 έτος από τη διάγνωσή τους. Αυτό είναι ενδεικτικό της αυξημένης επίγνωσης για τη προληπτική σημασία της εξέτασης αυτής στον καρκίνο μαστού και ωοθηκών, ειδικά μετά από τη δημοσιότητα που έλαβαν τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* από τη γνωστή ηθοποιό Αντζελίνα Τζολί γνωστό και ως “Jolie effect” (Evers C, 2017).

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* αποτελούν τα πιο κοινά ευρήματα με το 50% των θετικών παθογόνων μεταλλάξεων να είναι σε αυτά τα γονίδια παρόλα αυτά όμως η συνεισφορά των υπολοίπων γονιδίων παραμένει σημαντική καθώς το υπόλοιπο 50% των παθογόνων ευρημάτων εντοπίζονται σε αυτά. Συνεπώς, η ανάλυση μόνο των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2* θα εξηγούσε μόλις το 10,1% (183/1814) της γενετικής αιτιολογίας των ασθενών στη μελέτη αυτή. Η ανάλυση κι άλλων γονιδίων υψηλής διείσδυσης του πάνελ που χρησιμοποιήθηκε αύξησε αυτό το ποσοστό κατά 4.5%. Η περαιτέρω ανάλυση γονιδίων ενδιάμεσης/χαμηλής διείσδυσης αύξησε το ποσοστό αυτό κατά ένα 7% επιπλέον.



Εικόνα 5. Συνεισφορά Γονιδίων στη Διάγνωση Κληρονομούμενου Καρκίνου

Η συνεισφορά των υπολοίπων γονιδίων πέραν των *BRCA1*, *BRCA2* φαίνεται εμφανώς στον καρκίνο μαστού. Επιπλέον των *BRCA1* και *BRCA2* άλλα γονίδια με συχνές μεταλλάξεις ήταν το *PALB2* (12,2%), *CHEK2* (30.5%), *MUTYH* (13.4%) και το *ATM* (11%). *BRCA1* και *BRCA2* παθογόνες μεταλλάξεις ανιχνεύτηκαν στο 10,1% των ασθενών, ενώ 2.5% των ασθενών είχαν μια μετάλλαξη σε άλλο γονίδιο υψηλής διείσδυσης και το 9,8% σε ένα γονίδιο ενδιάμεσης ή χαμηλής διείσδυσης (εικόνα 6).



Εικόνα 6. Επίπτωση γονιδίων ανά επίπεδο διείσδυσης. HP= υψηλής διείσδυσης, LP= χαμηλής διείσδυσης

Είναι προφανές ότι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να βρεθεί θετικός ένας ασθενής σε ένα γονίδιο ενδιάμεσης ή χαμηλής διείσδυσης. Για κάποια από αυτά τα γονίδια τα δεδομένα που υπάρχουν είναι για τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου είναι περιορισμένα έως σήμερα. Παρόλα αυτά η ανάλυση αυτών των γονιδίων στα πάνελ που εξετάζονται, μας δίνει τη δυνατότητα να συλλέξουμε πληροφορίες για τα γονίδια αυτά και κάποια μάλιστα έχουν ήδη συμπεριληφθεί σε διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες για την κλινική διαχείριση των ασθενών φορέων όπως οι κατευθυντήριες οδηγίες του NCCN (NCCN, 2020)

6. Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Nagy R, S. K. (2004). Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*, 6445–70.
- Slavin TP, N.-S. M. (2015). Corrigendum: clinical application of multigene panels: challenges of next-generation counseling and Cancer risk management. *Front Oncology*, 271.
- Susswein LR, M. M. (2016). Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing. *Genet Med*, 823-32.
- Okur V, C. W. (2017). The impact of hereditary cancer gene panels on clinical care and lessons learned. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.*, 3(6).
- Price KS, S. A. (2018). Inherited Cancer in the age of next-generation sequencing. *Biol Res Nurs*, 192-204.
- Network., T. N. (2020). Ανάκτηση από <https://www.nccn.org>.
- Slavin TP, N.-S. M. (χ.χ.).
- Slavin TP, N.-S. M. (2015). Corrigendum: clinical application of multigene panels: challenges of next-generation counseling and Cancer risk management. *Front Oncol*, 271.
- Slavin TP, N.-S. M. (2015). Corrigendum: clinical application of multigene panels: challenges of next-generation counseling and Cancer risk management. . *Front Oncology*, 271.
- Plichta JK, G. M. (2016). What's new in genetic testing for Cancer susceptibility? *Oncology (Williston Park).*, 787-799.
- Tung N, L. N. (2016). Frequency of germline mutations in 25 Cancer susceptibility genes in a sequential series of patients with breast Cancer. . *Journal of Clinical Oncology*, 1460-8.
- Tung N, B. C. (2015). Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA1 and BRCA2 testing using next- generation sequencing with a 25-gene panel. *Cancer*, 25-33.
- Evers C, F. C. (2017). Familial breast cancer: genetic counseling over time, including patients expectations and initiators considering the Angelina Jolie effect. *PLoS One*, 12(5).
- NCCN. (2020). *The National Comprehensive Cancer Network. Genetic/Familial High- Risk Assessment: Breast and Ovarian*. Ανάκτηση από https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_screening.pdf.