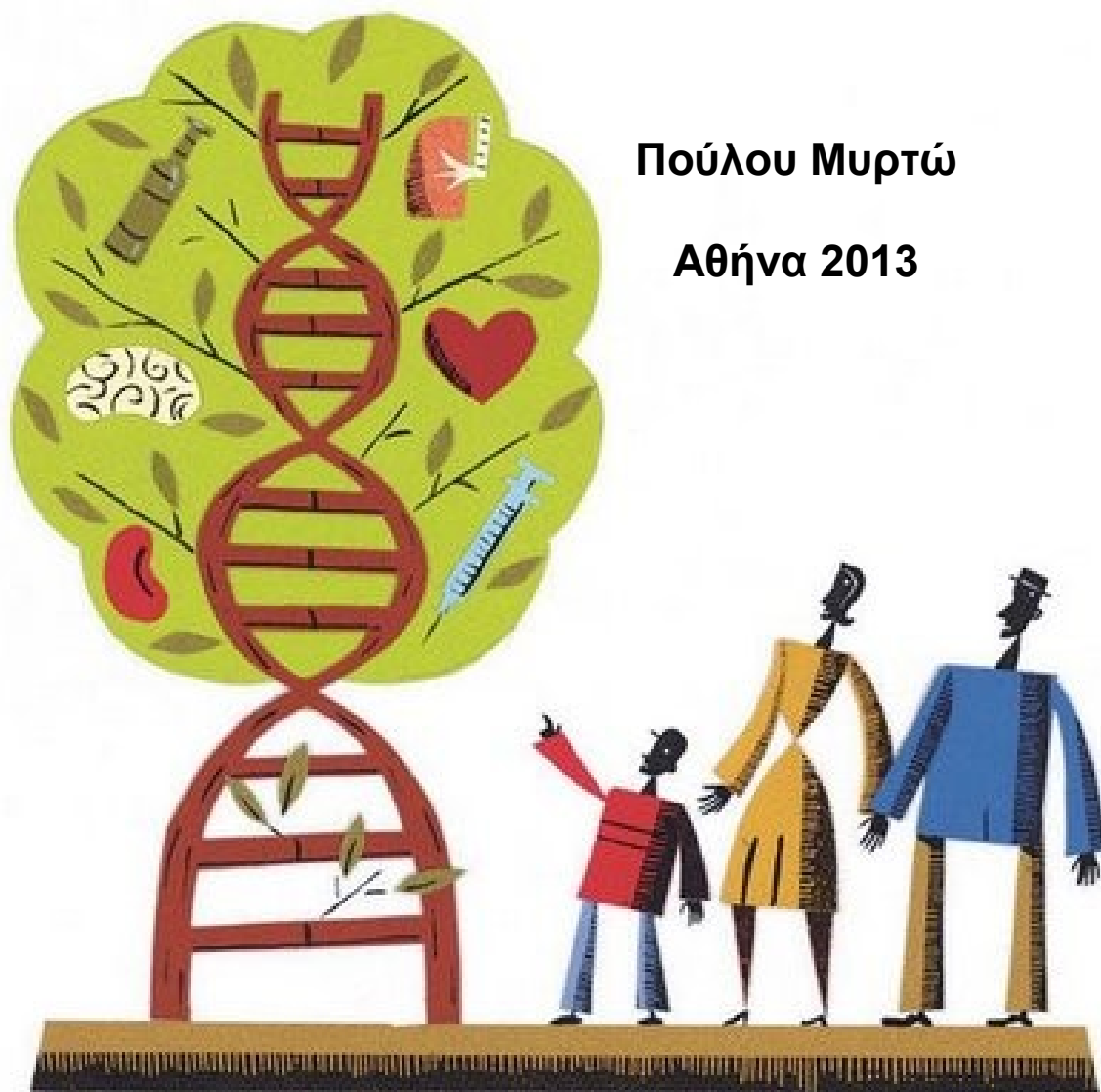


Ιατρική Σχολή
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής
Χωρέμιο Ερευνητικό Εργαστήριο
Νοσοκομείο Παίδων «Αγία Σοφία»
Διευθυντής: Καθηγητής Εμμανουήλ Καναβάκης

Διδακτορική Διατριβή
«Ανάπτυξη Προηγμένης Τεχνολογίας για την ανίχνευση
μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε DNA και RNA»

Πούλου Μυρτώ

Αθήνα 2013



Ιατρική Σχολή
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής
Χωρέμιο Ερευνητικό Εργαστήριο
Νοσοκομείο Παίδων «Αγία Σοφία»
Διευθυντής: Καθηγητής Εμμανουήλ Καναβάκης

Διδακτορική Διατριβή

Πούλου Μυρτώ

Βιολόγος

**«Ανάπτυξη Προηγμένης Τεχνολογίας για την
ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε DNA
και RNA»**

Αθήνα 2013

Ημερομηνία αίτησης για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής:

31 Αυγούστου 2005

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς επιτροπής:

12 Σεπτεμβρίου 2006

Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:

Εμμανουήλ Καναβάκης, Καθηγητής Γενετικής
Αριάδνη Καλπίνη Μαυρου, Καθηγήτρια Γενετικής
Κωνσταντίνος Τρούγκος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Καθορισμός θέματος διδακτορικής διατριβής και κατάθεση πρωτοκόλλου:

22 Σεπτεμβρίου 2006

Ημερομηνία Κατάθεσης Διατριβής:

23 Ιανουαρίου 2013

Μέλη επταμελούς εξεταστικής επιτροπής:

Εμμανουήλ Καναβάκης, Καθηγητής Γενετικής
Αριάδνη Καλπίνη Μαυρου, Καθηγήτρια Γενετικής
Κωνσταντίνος Τρούγκος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας
Σοφία Κίτσιου, Καθηγήτρια Γενετικής
Ασπασία Τσέζου, Καθηγήτρια Γενετικής
Δημήτρης Γουριώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας
Μαρία Τζέτη, Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής

Περιεχόμενα

Ιπποκρατικός Όρκος	6
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	7
Βιογραφικό Σημείωμα.....	9
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	13
SUMMARY	15
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	17
Κυστική ίνωση	18
Κλινική εικόνα κυστικής ίνωσης	19
Μοριακή Διαταραχή στη κυστική ίνωση	22
Νόσος Wilson.....	28
Μοριακή διαταραχή της νόσου	30
Μοριακή μελέτη των επιλεγμένων νοσημάτων στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής.....	36
Σκοπός της διατριβής	39
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	40
NanoChip 400™ (NC400).....	40
Luminex xMAP™	41
Υψηλής Ευκρίνειας Ανάλυση Αποδιάταξης (High Resolution Melting Analysis - HRMA)	43
Υλικό Μελέτης	44
Κυστική Ίνωση	44
Νόσος Wilson.....	44
Απομόνωση DNA	44
NanoChip 400™ (NC400) - Αρχές Λειτουργίας.....	45
Σχεδιασμός για το γονίδιο <i>ATP7B</i> (νόσος Wilson).....	50
Γονοτύπιση στη πλατφόρμα Luminex xMAP™ – Σχεδιασμός για τα γονίδια <i>CFTR</i> (κυστική ίνωση) και <i>ATP7B</i> (νόσος Wilson).....	56
Υψηλής Ευκρίνειας Ανάλυση Αποδιάταξης (High Resolution Melting Analysis - HRMA)	65
Ανάπτυξη πρωτοκόλλου για προγεννητική διάγνωση μεταλλάξεων του γονιδίου <i>CFTR</i> με τη μέθοδο HRM.....	73
Ανάπτυξη πρωτοκόλλου για προεμφυτευτική γενετική διάγνωση μεταλλάξεων του γονιδίου <i>CFTR</i> με τη μέθοδο HRM.....	78
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	81
NanoChip 400™ (NC400) – γονίδιο <i>ATP7B</i>	81

Γονοτύπιση στη πλατφόρμα Luminex xMAP™ – Αποτελέσματα για τα γονίδια <i>CFTR</i> και <i>ATP7B</i>	84
Αποτελέσματα από την ανάλυση των γονιδίων <i>CFTR</i> και <i>ATP7B</i> στη πλατφόρμα LightScanner	89
Προτυποποίηση μη-σημασμένου ανιχνευτή για την μετάλλαξη p.Phe508del	90
Αποτελέσματα της εφαρμογής της μεθόδου HRM στα γονίδια <i>CFTR</i> και <i>ATP7B</i>	94
Αποτελέσματα της εφαρμογής της μεθόδου HRM για προγεννητική διάγνωση (PND) στο γονίδιο <i>CFTR</i>	97
Αποτελέσματα της εφαρμογής της μεθόδου HRM για προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD) στο γονίδιο <i>CFTR</i>	101
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	105
NanoChip 400™ (NC400).....	105
Luminex xMap™	108
LightScanner	111
Αλγόριθμος για την αξιολόγηση των αλλαγών που ανιχνεύονται για πρώτη φορά	115
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	121
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	124
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	131
Π1. Σχεδιασμός εκκινητών του γονιδίου <i>ATP7B</i> για εφαρμογή στο NanoChip400	131
Π2. Σχεδιασμός σταθεροποιητών και ανιχνευτών για ανίχνευση των μεταλλάξεων του γονιδίου <i>ATP7B</i> στο NanoChip400	138
Π3. Σχεδιασμός εκκινητών του γονιδίου <i>CFTR</i> για εφαρμογή στο Luminex xMAP™	141
Π4. Σχεδιασμός εκκινητών για ανίχνευση των ελλειμμάτων 3120+1kdel (8.6Kb) και <i>CFTR</i> dele2,3 (21KB) στη πλατφόρμα Luminex xMAP™	142
Π5. Σχεδιασμός ASPE εκκινητών για την ανίχνευση των μεταλλάξεων του γονιδίου <i>CFTR</i> στη πλατφόρμα Luminex xMap™	143
Π6. Σχεδιασμός εκκινητών του γονιδίου <i>ATP7B</i> για εφαρμογή στο Luminex xMAP™	147
Π7. Σχεδιασμός ASPE εκκινητών για την ανίχνευση των μεταλλάξεων του γονιδίου <i>ATP7B</i> στη πλατφόρμα Luminex xMap™	149
Π7. Σχεδιασμός ASPE εκκινητών για την ανίχνευση των μεταλλάξεων του γονιδίου <i>ATP7B</i> στη πλατφόρμα Luminex xMap™	149
Π8. PCR εκκινητές για το γονίδιο <i>CFTR</i> για την εφαρμογή στη πλατφόρμα LightScanner® (αλληλουχίες από την εργασία των Montogery <i>et. al.</i> 2007)	152
Π9. PCR εκκινητές για το γονίδιο <i>ATP7B</i> για εφαρμογή στη πλατφόρμα LightScanner®	155
Π10. Αποτελέσματα για το γονίδιο <i>CFTR</i> στη πλατφόρμα LightScanner®	156
Π11. Αποτελέσματα του πρωτοκόλλου για προγεννητική διάγνωση στο γονίδιο <i>CFTR</i> με χρήση της πλατφόρμας LightScanner®	157

Ἱπποκρατικός Ὀρκος

Ὅρνυμι Ἀπόλλωνα ἱητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγείαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἱστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὅρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἱητρικῷ, ἄλλω δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἵρξῃν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι συμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω.

Ἀγνῶς δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὁκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ ὃ ἂν ἐν θεραπείῃ ἦ ἴδω, ἦ ἀκούσω, ἦ καὶ ἄνευ θεραπηίης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρήτα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ συγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιπορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η κυστική ίνωση αποτελεί το δεύτερο συχνότερο κληρονομικό νόσημα της Καυκάσιας φυλής και κατ' επέκταση του Ελληνικού πληθυσμού. Η νόσος Wilson είναι ένα παγκοσμίως σπάνιο κληρονομικό νόσημα, που όμως εμφανίζει υψηλά ποσοστά εμφάνισης σε συγκεκριμένες περιοχές της Ελλάδας. Καθώς τα δύο αυτά νοσήματα κληρονομούνται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας, στα πλαίσια πρόληψης, είναι πολύ σημαντική η αποτελεσματική ανίχνευση των φορέων.

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη προηγμένης μεθοδολογίας για την ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών στον Ελληνικό πληθυσμό. Ο απώτατος στόχος ήταν η εφαρμογή των νέων τεχνικών για την ανίχνευση φορέων και την ταυτοποίηση των μεταλλάξεων των ασθενών, οι οποίοι παραπέμπονται για έλεγχο στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Χωρέμιο Ερευνητικό Εργαστήριο, στο Νοσοκομείο Παίδων Αγία Σοφία, υπό την επίβλεψη του Διευθυντή Καθηγητή Εμμανουήλ Καναβάκη .

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Γενετικής Εμμανουήλ Καναβάκη για την εμπιστοσύνη του και την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργασθώ με την αξιόλογη ομάδα που απαρτίζουν όλοι οι συνεργάτες του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής την Καθηγήτρια Γενετικής Αριάδνη Καλπίνη-Μάυρου και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογικής Χημείας Κωνσταντίνο Τρούγκο για τις γνώσεις τους, τη συνεχή τους υποστήριξη και την καθοδήγηση τους στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Γενετικής Μαρία Τζέτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση και την υπομονή της, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές της κατά τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας. Αποτελεί για μένα πρότυπο ερευνητή.

Πολλές ευχαριστίες για τη συμπαράσταση τους οφείλω στους συνεργάτες και φίλους του εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής: την Επίκουρο Καθηγήτρια Jan Traeger-Συνοδινού, Ασπασιά Δεστούνη, Άκη Μεγρέμη, Γεράσιμο Δημησιάνο, Δήμητρα Χριστόπικου, Μαρία Τσίπη, Γεωργία Κάκουρου Ειρήνη Φυλακτού, Χριστίνα Βρεττού, Θανάση Παπαθεοδώρου, Βασίλη Οικονομάκη, Νίκο Βογιατζάκη, Ελένη Παναγιωτακάκη, Μάριο Καλιακάτσο, Σταυρούλα Παπαδοπούλου, Έφη Δανιήλ και Κωνσταντίνα Πούλιου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση τους και την απεριόριστη αγάπη τους όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς τη βοήθεια τους δε θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση αυτής της δουλειάς.

Βιογραφικό Σημείωμα

Όνοματεπώνυμο:	ΠΟΥΛΟΥ ΜΥΡΤΩ
Διεύθυνση Οικίας:	Καραϊσκάκη 125, Γλυκά Νερά 15354
Ημ. Γέννησης:	18 Μαΐου 1980
Τηλέφωνο :	6972010326
Email:	mrpoulou@med.uoa.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- ΝΟΕ.05-ΣΗΜΕΡΑ Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία». Θέμα «Ανάπτυξη προηγμένης μεθοδολογίας για την ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε DNA και RNA»
- ΦΕΒ.05-ΔΕΚ.05 Μεταπτυχιακό Δίπλωμα στη Μοριακή Κυτταρογενετική, European University Diploma in Molecular Cytogenetics, European Cytogenetics Association (E.C.A.) Faculty of Medicine Montpellier-Nîmes, Γαλλία
- ΣΕΠ.02 - ΣΕΠ.03 Μεταπτυχιακό δίπλωμα: MSc in Human Molecular Genetics, Imperial College of Science, Technology and Medicine London, UK. Τίτλος μεταπτυχιακής εργασίας «Characterisation of a mouse model for Familial Hypertrophic Cardiomyopathy (FHC), α -tropomyosin gene mutation.»
- ΣΕΠ.99-ΙΟΥΝ.02 Πτυχιακές σπουδές BSc (Hons) Biomedical Sciences, University of Northumbria at Newcastle, UK. Τίτλος πτυχιακής εργασίας «Cloning of the SCH18.02 gene from *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and overproduction of its encoded protein into *Escherichia coli*.»

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- ΟΚΤ 06-ΣΗΜΕΡΑ **Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής** Πανεπιστημίου Αθηνών. Διενέργεια μοριακών εξετάσεων, προτυποποίηση ερευνητικών πρωτοκόλλων, εκπαίδευση προπτυχιακών και μεταπτυχιακών φοιτητών.
- ΔΕΚ.08-ΙΑΝ.10 **Μετάφραση του βιβλίου “ Σύγχρονη Κλινική Γενετική ”** («New Medical Genetics») των Andrew Read και Dian Donnai. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2010
- ΙΟΥΝ.04-ΣΕΠ.05 **Εκπαίδευση σε τεχνικές κυτταρογενετικής και μοριακής γενετικής**, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία».
- ΙΑΝ.04-ΙΟΥΝ.04 **Parexel International Clinical Pharmacology Phase I Unit**, Northwick Park Hospital, Λονδίνο. Συλλογή και επεξεργασία βιολογικών δειγμάτων για μελέτες κλινικής παθολογίας, φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής.
- ΣΕΠ.03-ΙΟΥΝ.04 **Συνεργάτης σε ερευνητικό πρόγραμμα**. Μελέτη πρωτεϊνών από ιστούς διαγονιδιακών ποντικών με Οικογενή Υπερτροφική Καρδιομυοπάθεια και με αταξία Friedreich's. Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής, Imperial College London

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ - ΒΡΑΒΕΙΑ – ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ – ΟΜΙΛΙΕΣ

20 ΑΠΡ. 2013	13 ^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Γενετικής, Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών «Κυστική ίνωση σύγχρονες απόψεις και μελλοντικές προοπτικές». Ομιλία με θέμα «Μοριακή διάγνωση και προβληματισμοί».
TRAVEL GRANT	34th European Cystic fibrosis Conference, 8 – 11 June 2011, Hamburg, Germany , ECFS Membership for 2011
5 ΦΕΒ. 2011	Ημερίδα του Συνδέσμου Ιατρικών Γενετιστών Ελλάδας με θέμα «Ινοκυστική Νόσος». Ομιλία με τίτλο «Μεθοδολογία ελέγχου και δεδομένα από τον Ελληνικό πληθυσμό»
19 ΝΟΕ. 2010	Ημερίδα στα πλαίσια της Ευρωπαϊκής Ημέρας για την Κυστική Ίνωση της Ελληνικής Εταιρείας για την Κυστική Ινώδη Νόσο. Ομιλία με τίτλο «Προγεννητικός έλεγχος»
9 ΑΠΡ. 2010	10 ^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Γενετικής του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών. Παρουσίαση και συγγραφή του κεφαλαίου «Θεραπευτικές προσεγγίσεις σε γενετικά νοσήματα» στον τόμο που κυκλοφόρησε «Η Γενετική στην καθημερινή ιατρική πράξη», Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
ΜΑΙΟΣ 2007	Hybrid Course in Medical Genetics, ESGM's Remote Training Center of Athens, Αθήνα 5-11 Μαΐου 2007
ΜΑΡΤΙΟΣ 2007	Hybrid Course in Bioinformatics for Molecular Biologists, ESGM's Remote Training Centre of Athens, Αθήνα 18-22 Μαρτίου 2007
ΝΟΕ 2006	Hybrid Course in Genetic Counseling in Practice, ESGM's Remote Training Center of Athens, Αθήνα 9-11 Νοεμβρίου 2006
ΙΟΥΝ.01-ΙΟΥΛ.01	Χορήγηση υποτροφίας από την Ένωση Μικροβιολόγων του Ην. Βασιλείου. «Προσδιορισμός της φωτοτοξικότητας επιλεγμένων χρωστικών σε μικροβιολογικά καλλιεργητικά μέσα.» University of Northumbria at Newcastle.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- **Poulou M**, Destouni A, Fylaktou I, Kanavakis E, Tzetis M. Genotyping Efficiency of 2 Primer Sets and an Unlabeled Oligonucleotide Probe for the p.Phe508del in Exon 10 of the CFTR Gene as Determined with High-Resolution Melting Analysis. Clin Chem. 2012 Oct;58(10):1490-2
- **Poulou M**, Fylaktou I, Fotoulaki M, Kanavakis E, Tzetis M. (2012), «Cystic fibrosis genetic counseling difficulties due to the identification of novel mutations in the CFTR gene.», J Cyst Fibros. 2012 Jul;11(4):344-8.
- Tzifi F, Pons R, Athanassaki C, **Poulou M**, Kanavakis E. (2011) «Congenital cataracts, facial dysmorphism, and neuropathy syndrome.» Pediatr Neurol. 45(3):206-8.
- Makrythanasis P, Tzetis M, Rapti A, Papatheodorou A, Tsiipi M, Kitsiou S, Tsiamouri A, **Poulou M**, Roussos C, Kanavakis E. (2010), « Cystic fibrosis conductance regulator, tumor necrosis factor, interferon alpha-10, interferon alpha-17, and interferon gamma genotyping as potential risk markers in pulmonary sarcoidosis pathogenesis in Greek patients.», Genet Test Mol Biomarkers, **14(4)**:577-84.

- Dimisianos G, Stefanaki I, Nicolaou V, Sypsa V, Antoniou C, **Poulou M**, Papadopoulos O, Gogas H, Kanavakis E, Nicolaidou E, Katsambas AD, Stratigos AJ. (2009), "A study of a single variant allele (rs1426654) of the pigmentation-related gene SLC24A5 in Greek subjects", *Exp Dermatol*. **18(2)**:175-7
- **Poulou M**, Kaliakatsos M, Tsezou A, Kanavakis E, Malizos KN, Tzetis M., (2008), "Association of the CALM1 core promoter polymorphism with knee osteoarthritis in patients of Greek origin", *Genet Test*; **12(2)**:263-5
- Stratigos AJ, Dimisianos G, Nikolaou V, **Poulou M**, Sypsa V, Stefanaki I, Papadopoulos O, Polydorou D, Plaka M, Christofidou E, Gogas H, Tsoutsos D, Kastana O, Antoniou C, Hatzakis A, Kanavakis E, Katsambas AD, (2006), "Melanocortin receptor-1 gene polymorphisms and the risk of cutaneous melanoma in a low-risk southern European population", *J. Invest. Dermatol*; **126(8)**:1842-9

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- «A novel, generic, preimplantation genetic diagnosis protocol applied to cystic fibrosis involving mutation detection through high resolution melting analysis and simultaneous haplotype analysis through QF-PCR», A. Destouni, **M. Poulou**, G. Kakourou, C. Vrettou, J. Traeger-Synodinos, I. Fylaktou, E. Kanavakis and M. Tzetis, **62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics**, San Francisco, 6-10 November 2012
- «Advances in the Use of High Resolution Melting Analysis for Prenatal Diagnosis and Evaluation of p.Phe508del Unlabelled Probe», **Myrto Poulou**, Aspasia Destouni, Emmanuel Kanavakis and Maria Tzetis, **35th European Cystic Fibrosis Conference**, Dublin, Ireland, 06 - 09 June 2012.
- «Difficult Counseling Situations – Lessons From a CF Expertise Laboratory» **Myrto Poulou**, Emmanuel Kanavakis and Maria Tzetis, **Oral presentation, 34th European Cystic fibrosis Conference**, 8 – 11 June 2011, Hamburg, Germany
- «Multicenter Validation Study of a Novel StripAssay for Cystic Fibrosis» Helene Puehringer, Milan Macek, Alexandra Stamborgova, Lenka Dvorakova, Morten Dunø, Burkhard Tümmler, Silke Hedtfeld, Maria Tzetis, **Myrto Poulou**, Christian Oberkanins, **34th European Cystic fibrosis Conference**, 8 – 11 June 2011, Hamburg, Germany
- «p.F508del Homozygosity and the Genotype-phenotype Relationship in Northern Greece», M. Fotoulaki, K. Vasilaki, **M. Poulou**, M. Tzetis, K. Tentzidou, F. Sotiriadou, S. Nousia Arvanitakis, **34th European Cystic fibrosis Conference**, 8 – 11 June 2011, Hamburg, Germany
- «In silico analysis of novel CFTR variants identified in the Greek population», **M. Poulou**, E. Kanavakis, M. Tzetis, **GOLDEN HELIX® SYMPOSIUM** "Genetic Analysis in Translational Medicine" December 1st-4th, 2010 - Athens, Greece.
- «Identification of novel mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene in the Greek population» **M. Poulou**, S. Doudounakis, E. Kanavakis, M. Tzeti, **33rd European CF Conference**, Valencia, Spain, June 2010

- **M. Poulou**, M. Mastrominas, K. Pantos, S. Doudounakis, E. Kanavakis, M. Tzetis, "Identification of novel mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (*CFTR*) gene in the Greek population" **ESHG - Poster Sessions** (P01.031), Clinical genetics, **European Human Genetics Conference 2008** Barcelona May 31 - June 3
- M. Kaliakatsos, **M. Poulou**, A. Tsezou, E. Kanavakis, K. Malizos, M. Tzetis, "Association of the *CALM1* core promoter polymorphism with knee osteoarthritis in patients of Greek origin", **ESHG - Poster Sessions**, (P06.146), Genetic analysis, linkage, and association, **European Human Genetics Conference 2008** Barcelona May 31 - June 3
- M. Tzetis, **M. Poulou**, N. Manolaki, T. Karpathios, K. Lama, E. Kanavakis, "Preliminary results of Neonatal Screening program for Wilson disease in Greece and reporting of novel variants in *ATP7B* gene", **ESHG - Poster Sessions**, (P01.074), Clinical genetics, **European Human Genetics Conference 2008** Barcelona May 31 - June 3
- M. Τζέτη, Α. Παπαθεοδόρου, **Μ. Πούλου**, Ε. Καναβάκης "Έλεγχος μεταλλάξεων Κυστικής Ίνωσης (ΚΙ) σε έμβρυα με Υπερηχογένεια Εντέρου" **14ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής**, 2-4 Μαρτίου 2007
- Dimisianos G, Stefanaki. I, Nikolaou.V, **Poulou M**, Gogas H, Papadopoulos O, Kanavakis E, Katsambas A, Stratigos A. "Mutations of the *golden* gene in a melanoma case/control study" **Perspectives in Melanoma X and the Third International Melanoma Research Congress** Noordwijk, The Netherlands 14 – 16 SEPTEMBER 2006
- P. Makrythanassis, M. Tzetis, A. Papatheodorou, P. Latsi, A. Rapti, I. Kanavakis, **M. Poulou** and E. Kanavakis " TNFa, IFNA10, IFNA17, and IFN-gamma gene SNPs in Sarcoidosis" **European Human Genetics Conference 2006** Amsterdam May 6 - 9 2006
- Δημησιάνος Γ., Στεφανάκη Ε., Νικολάου Β., **Πούλου Μ.**, Σύψα Β., Παπαδόπουλος Ο., Πολυδώρου Δ., Πλάκα Μ., Χριστοφορίδου Ε., Γκόγκα Ε., Τσούτσος Δ., Παναγιώτου Π., Αντωνίου Χ., Χατζάκης Α., Κατσάμπας Α., Καναβάκης Ε., Στρατηγός Α. "Η σχέση των πολυμορφισμών των γονιδίων MC1R (υποδοχέα της μελανοκορτίνης-1) και p53 (κωδικόνιο 72) και του κινδύνου εκδήλωσης μελανώματος στον ελληνικό πληθυσμό", **2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μελανώματος**, 12-14 Ιανουαρίου 2006. (Βραβευθείσα ως καλύτερη εργασία του συνεδρίου)
- Dimisianos G, **Poulou M**, Stefanaki I, Nikolaou V, Sypsa V, Plaka M, Sofocleous C, Papadopoulos O, Katsambas A, Hatzakis A, Kanavakis E, and Stratigos A. J, "Melanocortin 1 Receptor (MC1R) Gene Polymorphisms and the risk of Cutaneous Melanoma in a Case-Control Study", **35th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research (ESDR)**, Tübingen, Germany, 22-24 September 2005

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά επιπέδου Proficiency

Γαλλικά επιπέδου DALF

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή

Οι εξελίξεις στη γενομική και ο διαρκώς αυξανόμενος όγκος δεδομένων από τα προγράμματα ανάλυσης του γονιδιώματος, δημιουργούν την ανάγκη για την ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών για την μοριακή μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται στην εμφάνιση νοσημάτων. Ο σκοπός αυτής της διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάπτυξη και η προτυποποίηση μεθοδολογίας υψηλής τεχνολογίας για την ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών στο επίπεδο του DNA. Επίσης λαμβάνοντας υπ' όψιν τους γρήγορους ρυθμούς στους οποίους πρέπει να λειτουργεί ένα διαγνωστικό εργαστήριο, σκοπός αυτής της μελέτης ήταν και η ανάδειξη ενός αξιόπιστου αλγόριθμου με τον οποίο θα γίνεται η αξιολόγηση των αλλαγών που ανιχνεύονται για πρώτη φορά και το αντίκτυπο τους στην παραγόμενη πρωτεΐνη.

Μέθοδοι

Χρησιμοποιώντας σαν μοντέλα δυο αυτοσωμικά υπολειπόμενα νοσήματα (κυστική ίνωση και Νόσος Wilson) σχεδιάστηκαν τρία διαφορετικά πρωτόκολλα για τις πλατφόρμες NanoChip400™, Luminex xMAP™ και LightScanner. Η αρχή λειτουργίας της πλατφόρμας NanoChip400™ βασίζεται στον ηλεκτρονικό χειρισμό ηλεκτρικού πεδίου και αποτελεί ένα σύστημα ηλεκτρονικών μικροσυστοιχειών. Ο σχεδιασμός έγινε για το γονίδιο *ATP7B*. Η αρχή λειτουργίας της πλατφόρμας Luminex xMAP™ είναι η κυτταρομετρία ροής και αποτελεί ένα σύστημα συστοιχιών με μικροσφαιρίδια. Ο σχεδιασμός έγινε για τα γονίδια *CFTR* και *ATP7B*. Η αρχή λειτουργίας της πλατφόρμας LightScanner είναι η αποδιάταξη του DNA με θέρμανση και αποτελεί ένα σύστημα ανάλυσης αποδιάταξης υψηλής ευκρίνειας. Ο σχεδιασμός έγινε για τα γονίδια *CFTR* και *ATP7B*.

Αποτελέσματα

Με τη πλατφόρμα NanoChip400™ ελέγχθηκαν 144 δείγματα νεογνών από την Κάλυμνο και την Κρήτη και ανιχνεύθηκαν 14 ετεροζυγώτες για την μετάλλαξη p.His1069Gln (6 με καταγωγή την Κάλυμνο και 8 με καταγωγή την Κρήτη), 2 ετεροζυγώτες για την μετάλλαξη

p.Arg969Gln (με καταγωγή την Κρήτη) και 2 προσυμπτωματικοί ασθενείς με γονότυπο p.[His1069Gln] + [His1069Gln] (ομοζυγώτες για την μετάλλαξη με καταγωγή τη Κάλυμνο).

Με τη πλατφόρμα Luminex xMAP™ έγινε προσπάθεια ανίχνευσης των 50 συχνότερων μεταλλάξεων στο γονίδιο *CFTR*. Παρ' όλες τις τροποποιήσεις δεν ήταν δυνατό να επιτύχουμε αποδεκτές τιμές για όλες τις μεταλλάξεις. Το ουσιαστικό αποτέλεσμα όμως ήταν πως ο σχεδιασμός που είχε γίνει ήταν σωστός και γι' αυτό τον λόγο χρησιμοποιήθηκε, εν μέρει από την εταιρία Luminex® για το kit xTAG Cystic Fibrosis 71 kit v2 το οποίο κυκλοφόρησε στην αγορά τον Ιούνιο 2009. Για το γονίδιο *ATP7B*, ο σχεδιασμός αποδείχθηκε σωστός και επετεύχθη γονοτύπηση των 100 δειγμάτων που αναλύθηκαν για τις 26 συχνότερες μεταλλάξεις.

Με τη πλατφόρμα LightScanner στη φάση της πρωτυποποίησης ελέγχθηκαν 100 δείγματα με γνωστούς γονοτύπους και 100 τυφλά δείγματα για κάθε νόσημα. Η ευαισθησία και η ειδικότητα βάσει των πειραμάτων υπολογίστηκε στο 100%. Επίσης πρωτυποποιήθηκε ένα πρωτόκολλο για προγεννητική και ένα για προεμφυτευτική γενετική διάγνωση.

Συζήτηση

Ο έλεγχος που παρέχει ένα εργαστήριο γενετικής, όταν λειτουργεί ως εργαστήριο αναφοράς για κάποιο νόσημα, θα πρέπει να ανιχνεύει το μεγαλύτερο δυνατό ποσοστό μεταλλάξεων. Αυτή η διαπίστωση αποκτάει ιδιαίτερο νόημα όταν αναφερόμαστε σε ένα γενετικό νόσημα με υψηλό βαθμό μοριακής ετερογένειας στον πληθυσμό ελέγχου. Η καταλληλότερη μέθοδος, από τις τρεις διαφορετικές που αναπτύχθηκαν στα πλαίσια αυτής της διατριβής, είναι η υψηλής ευκρίνειας ανάλυση αποδιάταξης καθώς μπορεί να εφαρμοστεί χωρίς να χρειάζεται πρότερη γνώση της γενετικής σύστασης του πληθυσμού ελέγχου και με υψηλή αξιοπιστία να επιτύχουμε το υψηλότερο δυνατό ποσοστό ανίχνευσης.

SUMMARY

Introduction

The progress in genome research as well as the increasing data coming from genome wide analysis programs, dictate the need for development of novel methodologies for molecular analysis of the genes involved in the occurrence of disease. The aim of this PhD thesis was the design and standardization of high throughput technology for the detection of DNA variants. Considering the quick turnaround time of a diagnostic laboratory, another aim was the establishment of a reliable algorithm by which all novel variants could be assessed concerning their effect on the protein produced.

Methods

Using as disease models two autosomal recessive genetic disorders (Cystic Fibrosis – *CFTR* gene and Wilson disease – *ATP7B*) we designed three different protocols for the platforms NanoChip400TM, Luminex xMAPTM and LightScanner. The principle of function for the platform NanoChip400TM is based on the electronic operation of an electrical field and therefore is an electronic microarray system. The design was for *ATP7B* gene. The principle of function for the platform Luminex xMAPTM is flow cytometry and therefore is a system that combines advanced fluidics, optics, and digital signal processing with microsphere technology. The design was for *CFTR* and *ATP7B* genes. The principle of function for the LightScanner platform is the DNA melting due to heating and therefore is a system able to perform High Resolution Melting Analysis. The design was for *CFTR* and *ATP7B* genes.

Results

Using the NanoChip400TM we analysed 144 neonatal samples from the island of Kalymnos and Crete. We detected 14 healthy heterozygotes for the mutation p.His1069Gln (6 from Kalymnos and 8 from Crete), 2 healthy heterozygotes for the mutation p.Arg969Gln (from Kalymnos) and 2 asymptomatic patients with genotype p.[His1069Gln] + [His1069Gln] (from Kalymnos)

Using the Luminex xMAP™ we tried to detect έγινε the 50 most common mutations of the *CFTR* gene in the Greek population. Despite all the modifications of the test protocol, we failed to obtain the adequate signals for all the mutations. For the *ATP7B* gene, we managed to get acceptable values for all the mutations and to genotype correctly 100 samples for 26 mutations.

Using LightScanner, during standarization we tested sucesfully 100 known samples and 100 blind samples for each disease. The sensitivity and specificity was calculated at 100%. Another very important result was the standardzation of a protocol for prenatal diagnosis and for preimplantation genetic diagnosis.

Conclusion

A reference laboratory for a genetic disease should be able to offer the maximum possible mutation detection rate. This assumption takes a special meaning when we are referring to a genetic disorder with a high heterogeneity rate in the test population. Based on the above, the most suitable method out of the three different ones developed during this PhD thesis is High Resolution Melting analysis. This method offers high accuracy and sensitivity, can be applied without the need for prior characterization of the test population and can readily detect any genetic variant allowing for maximum detection rate.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι εξελίξεις στη γενωμική, δηλαδή η μελέτη των γονιδίων και της λειτουργίας τους καθώς και ο διαρκώς αυξανόμενος αριθμός δεδομένων από το πρόγραμμα προσδιορισμού της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project), επιβάλλει την ανάπτυξη υψηλής τεχνολογίας προκειμένου να αναδειχθούν καινούργιοι βιολογικοί στόχοι για το σχεδιασμό νέων θεραπειών και φαρμάκων, καθώς και για τη διαλεύκανση των βιοχημικών μηχανισμών στους οποίους συμμετέχουν τα γονίδια και τους τρόπους με τους οποίους εμπλέκονται σε νοσήματα.

Πολλά γενετικά νοσήματα προκαλούνται από ένα ευρύ φάσμα αλλαγών στο DNA οι οποίες μπορεί να είναι σημειακές αλλαγές, οδηγώντας σε παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις, μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου, μεταλλάξεις ματίσματος ή ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις καθώς και μεγάλα ελλείμματα ή διπλασιασμοί.

Στην εφαρμογή των προγραμμάτων πρόληψης, ιδιαίτερα όταν οι φορείς δεν μπορούν να εντοπιστούν με βιοχημικές ή αιματολογικές εξετάσεις, η μοριακή ανάλυση του DNA αποτελεί τον μοναδικό τρόπο εντοπισμού των φορέων. Η μέθοδος που εφαρμόζεται θα πρέπει να συνδυάζει ευελιξία προσαρμογής στις ιδιαιτερότητες της μοριακής ετερογένειας κάθε πληθυσμιακής ομάδας, σχετικά μικρό κόστος, αξιοπιστία αποτελεσμάτων για κλινική εφαρμογή καθώς και ευκολία στη χρήση. Η επίτευξη αυτών των στόχων απαιτεί ανάπτυξη τεχνολογίας που θα επιτρέπει την ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων (σε επίπεδο mRNA) καθώς και την ανάλυση πολυμορφισμών και μεταλλάξεων (σε επίπεδο DNA).

Ο σκοπός αυτής της διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάπτυξη και η προτυποποίηση μεθοδολογίας υψηλής τεχνολογίας για την ανίχνευση μεταλλάξεων, (σπάνιες παραλλαγές στην αλληλουχία του γονιδιώματος, οι οποίες έχουν φαινοτυπικές επιπτώσεις και αποτελούν το κύριο αίτιο της νόσου στα μονογονιδιακά νοσήματα) και πολυμορφισμών (ποικιλομορφίες στην αλληλουχία των βάσεων σε μια γενετική θέση, που βρίσκονται σε συχνότητα άνω του 10% στο γενικό πληθυσμό και δεν έχουν φαινοτυπικό αντίκτυπο στον οργανισμό) στο επίπεδο του DNA. Επίσης λαμβάνοντας υπ' όψιν τους γρήγορους ρυθμούς στους οποίους πρέπει να λειτουργεί

ένα διαγνωστικό εργαστήριο, σκοπός αυτής της μελέτης είναι και η ανάδειξη ενός αξιόπιστου αλγόριθμου με τον οποίο θα γίνεται η αξιολόγηση των αλλαγών σε μη κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου οι οποίες μπορεί να έχουν αντίκτυπο σε επίπεδο έκφρασης.

Τα μοντέλα νόσων για τις οποίες αναπτύχθηκαν καινούργια πρωτόκολλα ανίχνευσης μεταλλάξεων είναι η κυστική ίνωση (OMIM Cystic fibrosis, (CF) #219700, OMIM *CFTR* *602421) και η νόσος Wilson (Wilson Disease OMIM #277900, OMIM *ATP7b* *606882). Πρόκειται για δύο μονογονιδιακά νοσήματα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τον Ελλαδικό χώρο. Η επιλογή τους έγινε με βάση τη συχνότητα τους στον Ελληνικό πληθυσμό, το πλήθος των υπαίτιων μεταλλάξεων καθώς και τα αποδεδειγμένα οφέλη της έγκαιρης και αξιόπιστης μοριακής διάγνωσης.

Κυστική ίνωση

Η κυστική ίνωση (ΚΙ) ή ινοκυστική νόσος (ΚΙΝ) είναι το συχνότερο κληρονομικό νόσημα στους Καυκάσιους πληθυσμούς. Κληρονομείται με υπολειπόμενο αυτοσωμικό χαρακτήρα και στη χώρα μας εμφανίζει 4-5% συχνότητα φορέων στο γενικό πληθυσμό, κατατάσσοντας το δεύτερο σε συχνότητα μετά τη Μεσογειακή αναιμία. Πρόκειται για μια πολυσυστημική νόσο η οποία παρουσιάζει ποικίλης βαρύτητας συμπτωματολογία. Το κύριο παθογενετικό χαρακτηριστικό της νόσου είναι η δυσλειτουργία των εξωκρινών αδένων η οποία ευθύνεται για το ευρύ φάσμα των κλινικών εκδηλώσεων και επιπλοκών της (1, 2) (Εικόνα 1).

Οι κύριες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου αποδίδονται σε διαταραχή της διαμεμβρανικής διακίνησης ιόντων Cl^- και τη δημιουργία παχύρρευστης βλέννης που οδηγεί σε απόφραξη των πόρων των βλεννοποιών αδένων διαφόρων οργάνων, όπως είναι το βρογχικό δένδρο, η εξωκρινής μοίρα του παγκρέατος, το ηπατοχολικό σύστημα, το έντερο κι οι ιδρωτοποιοί αδένες.



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση ενός λειτουργικού και ενός μη-λειτουργικού καναλιού *CFTR*.

Η συχνότητα της ΚΙ υπολογίζεται σε 1:2.000-2.500 γεννήσεις (1) στην Καυκάσια φυλή και μικρότερη αντίστοιχα στην Ασιατική, Αραβική και Αφρικανική φυλή. Ωστόσο η συχνότητα της νόσου ποικίλλει ευρέως ανάμεσα στις διάφορες χώρες, ακόμη και σε διαφορετικές περιοχές της ίδιας χώρας. Ενδεικτικά ο αριθμός γεννήσεων πασχόντων ατόμων στην Ευρώπη κυμαίνεται από, 1 στις 1350 γεννήσεις στην Ιρλανδία, μέχρι 1 στις 25000 γεννήσεις στην Φινλανδία (3). Ο μέσος όρος γεννήσεων ατόμων με κυστική ίνωση συνολικά για την Ευρώπη υπολογίζεται 1 στις 3500 με το ίδιο ποσοστό να ισχύει και για τη χώρα μας.

Κλινική εικόνα κυστικής ίνωσης

Η κλινική εικόνα της κυστικής ίνωσης περιλαμβάνει εκδηλώσεις από το αναπνευστικό σύστημα, το γαστρεντερικό σύστημα, τους ιδρωτοποιούς αδένες και το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα.

Οι διαταραχές από το αναπνευστικό σύστημα αποτελούν την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνητότητας. Μπορεί να προσβληθούν όλο το ανώτερο και κατώτερο αναπνευστικό σύστημα.

Από το ανώτερο αναπνευστικό ρινικοί πολύποδες παρουσιάζονται στο 10% των ασθενών και σε κάθε παιδί με ρινικό πολύποδα θα πρέπει να γίνεται προσδιορισμός

ηλεκτρολυτών στον ιδρώτα. Χρόνια παραρρινοκολπίτιδα ανθεκτική στη θεραπεία αποτελεί επίσης σύμπτωμα ύποπτο για ΚΙ.

Από το κατώτερο αναπνευστικό η νόσος προβάλλει με χρόνια υποτροπιάζοντα ευρήματα, όπως επιμένουσα ή βαριά βρογχιολίτιδα σε νεογνά και βρέφη, επιμένουσα ή υποτροπιάζουσα πνευμονία, ατελεκτασία, κυρίως του δεξιού άνω λοβού, άσθμα μη ανταποκρινόμενο στη θεραπεία. Το συχνότερο σύμπτωμα είναι ο χρόνιος βήχας, αρχικά ξηρός και παροξυσμικός σε βρέφη και μικρά παιδιά, που με την πάροδο του χρόνου γίνεται παραγωγικός με βλεννοπυώδη απόχρεμψη στους μεγαλύτερους ασθενείς. Η προοδευτικά επιδεινούμενη πνευμονοπάθεια εκδηλώνεται με πληκτροδακτυλία και επιπλοκές, όπως πνευμοθώρακας και αιμόπτυση και τελικά καταλήγει σε πνευμονική καρδιά και αναπνευστική ανεπάρκεια.

Ο κυριότερος παράγοντας επιδείνωσης της χρόνιας πνευμονοπάθειας είναι οι συχνές υποτροπιάζουσες αναπνευστικές λοιμώξεις από ιούς, βακτήρια και μύκητες. Οι ιοί που προκαλούν λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος των ασθενών με ΚΙ είναι οι ιοί *Influenzae A και B*, οι *Parainfluenzae 1 και 3*, οι ρινοϊοί, οι αδενοϊοί, ενώ συχνότερος είναι ο αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (RSV). Οι ιογενείς αυτές λοιμώξεις επηρεάζουν τις λειτουργικές δοκιμασίες και την ακτινολογική εικόνα των πνευμόνων, επιδεινώνουν την αναπνευστική λειτουργία, αυξάνουν την απόχρεμψη και προδιαθέτουν σε βακτηριακές λοιμώξεις.

Οι βακτηριακές λοιμώξεις είναι σοβαρότερες από τις αναπνευστικές λοιμώξεις, εντοπίζονται στους πνεύμονες και σχετίζονται με χρόνιο αποικισμό. Το εύρος των βακτηριακών παραγόντων είναι περιορισμένο, αν και τα τελευταία χρόνια, λόγω αύξησης του προσδόκιμου επιβίωσης, έχει κατά κάποιον τρόπο διευρυνθεί. Συχνότερα βακτηριακά αίτια αποτελούν ο *Staphylococcus aureus*, ο *Haemophilus influenzae* και η *Pseudomonas aeruginosa*.

Οι κλινικές εκδηλώσεις της κυστικής ίνωσης από το πεπτικό σύστημα παρουσιάζουν ευρύτατο φάσμα. Από τις γαστρεντερικές εκδηλώσεις πιο συχνή είναι η ανεπάρκεια της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος, η οποία διαπιστώνεται στο 85-90% των ασθενών με ΚΙ και αφορά τόσο στην έκκριση διττανθρακικών όσο και παγκρεατικών ενζύμων. Εκδηλώνεται με συμπτώματα συνδρόμου πλημμελούς απορρόφησης με ογκώδεις δύσοσμες λιπαρές κενώσεις,

σημεία υποθρεψίας, ελάττωση του υποδόριου λίπους και της μυϊκής μάζας, διάταση της κοιλιάς και ανεπαρκή πρόσληψη βάρους.

Οι υπόλοιποι ασθενείς (10-15%) θεωρούνται ότι έχουν παγκρεατική επάρκεια, επειδή η παγκρεατική τους λειτουργία επαρκεί για την πέψη και απορρόφηση, αν και έχουν διαταραχή στην έκκριση των διπτανθρακικών. Οι ασθενείς αυτοί συχνά εκδηλώνουν επεισόδια υποτροπιάζουσας παγκρεατίτιδας.

Η κυστική ίνωση αποτελεί τη συχνότερη αιτία υποτροπιάζουσας ή χρόνιας παγκρεατίτιδας στην παιδική ηλικία, με αποτέλεσμα την απώτερη εγκατάσταση δευτεροπαθούς παγκρεατικής ανεπάρκειας. Η εκδήλωση παγκρεατίτιδας εξ ορισμού συνεπάγεται επαρκή παγκρεατική λειτουργία και συχνά αποτελεί την αρχική εκδήλωση της νόσου.

Οι συχνότερες εκδηλώσεις της κυστικής ίνωσης από το λεπτό έντερο είναι ο ειλεός από μηκώνιο κατά τη νεογνική ηλικία και το σύνδρομο χαμηλής εντερικής απόφραξης (Distal Intestinal Obstructive Syndrome, DIOS) σε μεγαλύτερες ηλικίες, τα οποία συνυπάρχουν με παγκρεατική ανεπάρκεια. Ο ειλεός από μηκώνιο παρουσιάζεται στο 10-20% των νεογνών με ΚΙ, η απόφραξη του λεπτού εντέρου συμβαίνει κατά τη διάρκεια της κύησης, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις εκδηλώνεται μετά τη γέννηση με διάταση της κοιλιάς, χολώδεις εμετούς και αδυναμία αποβολής μηκωνίου τις πρώτες 24-48 ώρες από τη γέννηση.

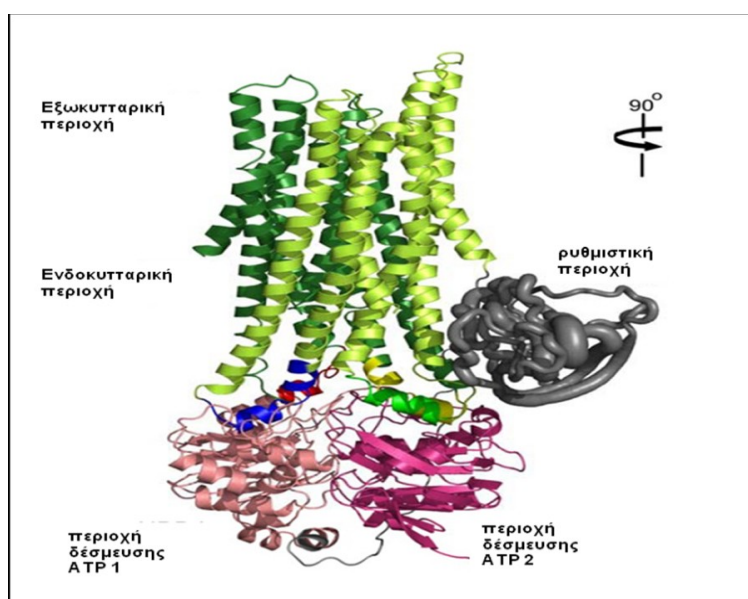
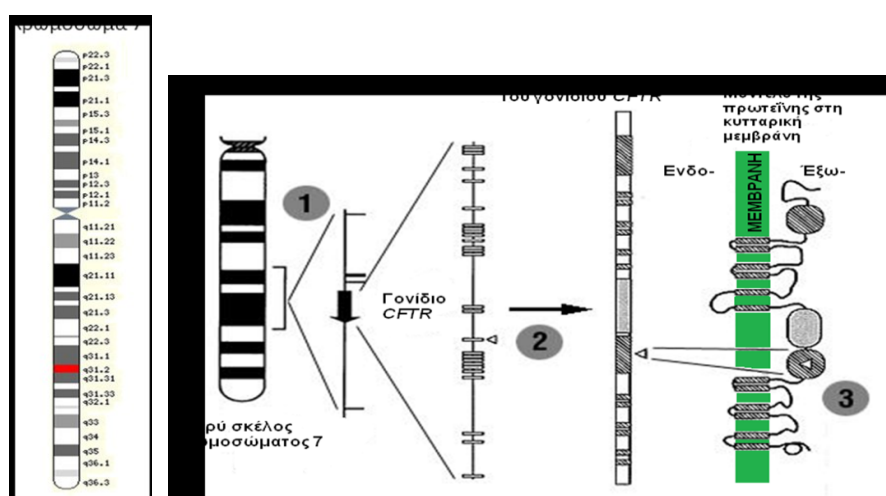
Η ηπατική νόσος αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα αιτία θανάτου στους ασθενείς με ΚΙ μετά τη χρόνια πνευμονοπάθεια. Η αιτιολογία της δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη και πιθανόν να είναι πολυπαραγοντική. Εμφανίζεται συνήθως κατά την πρώτη δεκαετία της ζωής ή στην εφηβική ηλικία. Στους πρώτους μήνες της ζωής χαρακτηριστική είναι η εκδήλωση της ηπατικής προσβολής με εικόνα χολόστασης.

Οι εκδηλώσεις της κυστικής ίνωσης από τους ιδρωτοποιούς αδένες περιλαμβάνουν οξείες ηλεκτρολυτικές διαταραχές, κυρίως σε βρέφη κατά τους θερινούς μήνες, με υποχλωραιμική υπονατρίαιμική αφυδάτωση, υποκαλσιαιμία και μεταβολική αλκάλωση και σπανίως χρόνια μεταβολική αλκάλωση. Τέλος η κυστική ίνωση προσβάλλει το αναπαραγωγικό σύστημα, προκαλώντας αποφρακτική αζωοσπερμία στους άνδρες και διαταραχή της σύστασης της τραχηλικής βλέννης στις γυναίκες(1, 2, 4).

Μοριακή Διαταραχή στη κυστική ίνωση

Σημαντική αλλαγή στο τομέα πρόληψης της νόσου που δημιουργεί ταυτόχρονα και τις προϋποθέσεις για ουσιαστική θεραπευτική αντιμετώπιση στο μέλλον αποτέλεσε η μελέτη της μοριακής διαταραχής της νόσου.

Το γονίδιο, μεταλλάξεις του οποίου ευθύνονται για την εμφάνιση κυστικής ίνωσης, εντοπίστηκε το 1986 στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 7 και συγκεκριμένα στη θέση 7q31.2. Η επιτυχής απομόνωση και μελέτη του γονιδίου απέδειξε ότι πρόκειται για ένα σχετικά μεγάλο γονίδιο 250kb, το οποίο περιλαμβάνει 27 εξόνια και παράγει mRNA μεγέθους 6.5kb (5).



Εικόνα 2. Η χρωμοσωμική θέση του γονιδίου *CFTR*, διάγραμμα του γονιδίου και της πρωτεΐνης.

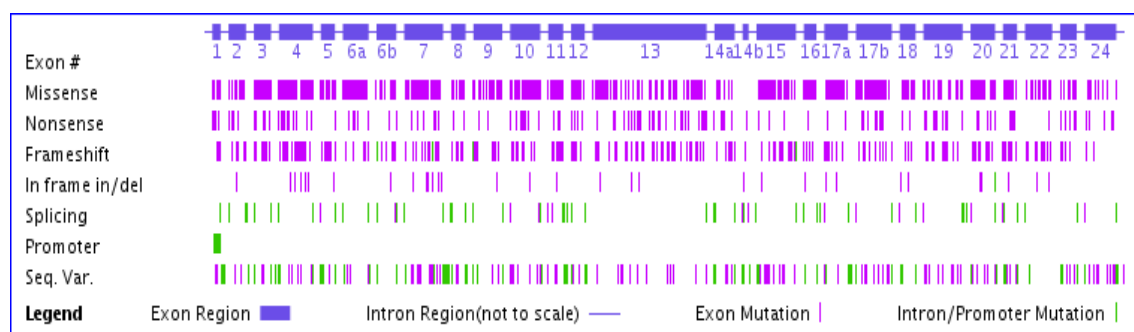
Το πολυπεπτιδικό παράγωγο του γονιδίου ονομάζεται «ρυθμιστής διαμεμβρανικής διακίνησης ιόντων» (CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), έχει μέγεθος 170 kilodaltons και αποτελείται από 1480 αμινοξέα. Η πρωτεΐνη διαχωρίζεται σε 5 περιοχές που σχηματίζουν δύο όμοια επαναλαμβανόμενα τμήματα. Κάθε ένα από τα τμήματα αυτά περιλαμβάνει μία διαμεμβρανική περιοχή (TMD1 & TMD2), με 6 διαμεμβρανικά ελικοειδή τμήματα και μία περιοχή δέσμευσης ATP (NBD1 & NBD2) που παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για τη λειτουργία του μορίου. Τα δύο αυτά τμήματα ενώνονται μέσω μίας ρυθμιστικής περιοχής (R Domain), που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της πρωτεΐνης και χαρακτηρίζεται από περίσσεια θέσεων για φωσφορυλίωση από τις πρωτεϊνικές κινάσες A και C. Το NBD1 κωδικοποιείται από τα εξόνια 9-12 και το αρχικό του τμήμα θεωρείται περιοχή υψηλής δέσμευσης με ATP. Το NBD2 κωδικοποιείται από τα εξόνια 20-22 και η ρυθμιστική περιοχή από το εξόνιο 13 (5-8) (Εικόνα 2).

Η CFTR πρωτεΐνη βρίσκεται στο πάνω τμήμα της μεμβράνης των αναπνευστικών και εκκρινικών επιθηλιακών κυττάρων και παρουσιάζει ποικίλες δραστηριότητες, η κυριότερη των οποίων είναι να αποτελεί κανάλι Cl^- που ενεργοποιείται με την παρουσία cAMP. Υπάρχουν υποθέσεις ότι η CFTR πρωτεΐνη ρυθμίζει τη λειτουργία και άλλων επιθηλιακών αγωγών (ORCC- outward rectifying chloride channel, ENaC- epithelial sodium channel) και επίσης διευκολύνει ή συμβάλλει στη μεταφορά HCO_3^- με την απελευθέρωση ATP (8, 9).

Με τη λεπτομερή ανάλυση DNA ασθενών με ΚΙ έχουν ανιχνευθεί μέχρι σήμερα περισσότερες από 1800 μεταλλάξεις [Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium- <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>] (10) η πλειονότητα των οποίων θεωρούνται παθολογικές και παρουσιάζουν συχνότητα που διαφέρει γεωγραφικά και πληθυσμιακά (11). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι συχνότητες και τα είδη των μεταλλάξεων που έχουν καταγραφεί στο γονίδιο *CFTR* και στην Εικόνα 3 (10) παρουσιάζεται η κατανομή τους κατά μήκος του γονιδίου.

40.8% παρερμηνεύσιμες (756 μεταλλάξεις)	16.03% μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου (297 μεταλλάξεις)	11.98% ματίσματος (222 μεταλλάξεις)
8.53% ανερμηνεύσιμες (158 μεταλλάξεις)	2% ελλείμματα/ενθέσεις εντός πλαισίου ανάγνωσης (37 μεταλλάξεις)	2.59% ανακατατάξεις (48 μεταλλάξεις) & 0.81% μεταλλάξεις υποκινητή (15 μεταλλάξεις)

Πίνακας 1. Τα ποσοστά και τα είδη των μεταλλάξεων του γονιδίου *CFTR*.



Εικόνα 3. Η κατανομή των μεταλλάξεων και το είδος τους κατά μήκος του γονιδίου *CFTR*.

Επεξήγηση: Exon- Εξόνιο, Missense- Παρερμηνεύσιμες, Nonsense- Ανερμηνεύσιμες, Frameshift- Μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου, In frame in/del- Ενθέσεις/Ελλείμματα εντός πλαισίου ανάγνωσης, Splicing- Μάτισμα, Promoter- Υποκινητής, Seq. Var- Πολυμορφισμοί, Exon Region- περιοχές Εξονίων, Intron Region- περιοχές Εσονίων, Exon Mutation- Μετάλλαξη εξονίου, Intron/Promoter Mutation- Μετάλλαξη εσονίου/υποκινητή.

Στο μεγαλύτερο ποσοστό τους (41%) οι μεταλλάξεις αυτές είναι παρερμηνεύσιμες (missense) και περίπου 12% είναι μεταλλάξεις ματίσματος (splicing). Οι υπόλοιπες είναι ανερμηνεύσιμες (8,5%) (nonsense) και μεταλλάξεις μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου (16%) (frameshift). Συνολικά 6 μεταλλάξεις συμπεριλαμβανομένης της συχνότερης p.Phe508del έχουν εντοπισθεί σε όλες τις πληθυσμιακές ομάδες. Η p.Phe508del χαρακτηρίζεται από την έλλειψη 3 βάσεων που έχει ως αποτέλεσμα την αφαίρεση του αμινοξέος φαινυλαλανίνη στο κωδικόνιο 508 της πρωτεΐνης. Η συχνότητα της ανέρχεται στο

οποίες εντοπίζονται στις διαμεμβρανικές περιοχές της πρωτεΐνης (TMD1 & TMD2) και προκαλούν ελαττωματική αγωγιμότητα. Η 5^η ομάδα περιλαμβάνει μεταλλάξεις ματίσματος που οδηγούν σε μειωμένη σύνθεση της CFTR πρωτεΐνης. Ιδιαίτερα με τις μεταλλάξεις ματίσματος μπορεί να υπάρχει μερική παραγωγή ενός μικρού ποσοστού λειτουργικής πρωτεΐνης οδηγώντας σε πιο ήπιους φαινοτύπους. Τέλος η 6^η ομάδα αποτελείται από μεταλλάξεις που επηρεάζουν την ικανότητα ρύθμισης από την CFTR πρωτεΐνη άλλων διαμεμβρανικών αγωγών ή προκαλούν μείωση της σταθερότητας της στην ακραία μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων (14-16)

Η μοριακή διαταραχή της νόσου παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια (17), και σε παγκόσμιο επίπεδο έχουν περιγραφεί περισσότερες από 1800 μεταλλάξεις με διαφορετική γεωγραφική και πληθυσμιακή συχνότητα. Στην Ελλάδα από τη μελέτη 450 ασθενών, η οποία είχε δημοσιευθεί από το εργαστήριο ιατρικής γενετικής το 2003, είχε διαπιστωθεί ότι 83 μεταλλάξεις κάλυπταν το 91% χρωμοσωμάτων, καταλήγοντας σε 103 διαφορετικούς γονότυπους, ενώ αδιευκρίνιστο παρέμενε το 9% των χρωμοσωμάτων (18). Συγκεκριμένα 8 μεταλλάξεις (Πίνακας 2) κάλυπταν το 74% των χρωμοσωμάτων (p.Phe508del → 53.4%), 14 μεταλλάξεις παρουσιάζονταν με ποσοστά 0.5-1% των χρωμοσωμάτων ενώ οι υπόλοιπες 61 εντοπίζονταν σε 1 έως 3 χρωμοσώματα. Καινούργια δεδομένα για τον Ελληνικό πληθυσμό που προέκυψαν κατά τη διάρκεια αυτής της διδακτορικής διατριβής παρουσιάζονται στην ενότητα της συζήτησης.

Μετάλλαξη	Αριθμός Αλληλομόρφων (%)
p.Phe508del	467 (53.4)
621+1G>T	50 (5.72)
2789+5G>A	15 (1.72)
p.G542X	34 (3.9)
p.N1303K	23 (2.63)
2183AA>G	12 (1.38)
p.E822X*	12 (1.38)
p.R1158X	9 (1.03)

Πίνακας 2. Οι συχνότερες μεταλλάξεις στον Ελληνικό πληθυσμό. Η μετάλλαξη p.E822X έχει περιγραφεί μόνο στον Ελληνικό πληθυσμό (18).

Δεδομένου ότι δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία ο ενδεδειγμένος τρόπος αντιμετώπισης είναι η πρόληψη, δηλαδή ο εντοπισμός των φορέων και η παροχή γενετικής συμβουλευτικής για την αποφυγή γέννησης νέων πασχόντων. Ο μοναδικός τρόπος για την ανίχνευση φορέων είναι ο έλεγχος του DNA του γονιδίου *CFTF* με μοριακές τεχνικές καθώς οι ετεροζυγώτες είναι ασυμπτωματικοί με μοναδική εξαίρεση τους άνδρες που εμφανίζουν υπογονιμότητα λόγω συγγενούς αμφοτερόπλευρης (ή μονόπλευρης) έλλειψης σπερματικού πόρου (CBAVD / CAVD) οι οποίοι είναι φορείς μιας ή και δύο μεταλλάξεων σε ποσοστό 30-70% (4, 19, 20).

Ο σκοπός αυτής της μελέτης είναι η ανάπτυξη μεθοδολογίας που θα προσφέρει αξιόπιστα αποτελέσματα, γρήγορα και με χαμηλό κόστος και θα συμβάλλει στη δημιουργία προγράμματος ανίχνευσης φορέων που θα παρέχεται σε όλα τα άτομα αναπαραγωγικής ηλικίας. Με τα σημερινά δεδομένα στη χώρα μας ο ανιχνευτικός έλεγχος θα πρέπει να εφαρμοσθεί σε όλες τις ομάδες υψηλού κινδύνου.

- Τα μέλη οικογενειών με ινοκυστική νόσο (cascade screening). Ο έλεγχος στις περιπτώσεις αυτές είναι απλός και οικονομικότερος επειδή αφορά την ανίχνευση συγκεκριμένης μετάλλαξης που καθορίζεται από τη μοριακή μελέτη των πασχόντων μελών της οικογένειας. Υπολογίζεται από ορισμένους συγγραφείς ότι εάν σε μία κοινωνική ομάδα ελεγχθούν όλοι οι συγγενείς των αρρώστων με ινοκυστική νόσο μέχρι τέταρτα ξαδέλφια, η ανίχνευση των φορέων στον πληθυσμό αυτό θα πλησίαζε το 100% (21-23)
- Στους συντρόφους φορέων και ασθενών της νόσου
- Σε άνδρες με στειρότητα λόγω έλλειψης σπερματικού πόρου, αποφρακτική αζωοσπερμία και ολιγοσπερμία. Στα άτομα αυτά η παρουσία κυστικής ίνωσης σε ετερόζυγη τουλάχιστον μορφή υπολογίζεται σε ποσοστό που κυμαίνεται από 30-70% (24).
- Σε ζευγάρια στα οποία παρουσιάζεται υπερηχογένεια εντέρου κατά το δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης (25).

- Σε άτομα με αδιευκρίνιστη Χρόνια Πνευμονοπάθεια.
- Τέλος θα ήταν ιδιαιτέρως θετικό ο προληπτικός έλεγχος για την ανίχνευση φορέων να προσφέρεται σε όλα τα άτομα αναπαραγωγικής ηλικίας, πριν ή στις αρχές της κύησης (26) και κυρίως στα ζευγάρια που ξεκινούν κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Νόσος Wilson

Η ηπατοφακοειδής εκφύλιση ή νόσος Wilson (WD-ATP7B) είναι μια κληρονομική νόσος που μεταβιβάζεται με υπολειπόμενο αυτοσωματικό χαρακτήρα και οφείλεται στη μείωση της απέκκρισης χαλκού από τα ηπατικά κύτταρα καθώς και τη μειωμένη ενσωμάτωση του στη σερουλοπλασμίνη. Αυτό έχει ως συνέπεια την αύξηση των επιπέδων χαλκού, την συσσώρευση του στον ηπατικό ιστό και στη συνέχεια στα νευρικά κύτταρα, νεφρικά κύτταρα καθώς και κερατοειδή χιτώνα. Η νόσος περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1912 (27).

Η κλινική εικόνα οφείλεται στη τοξικότητα του χαλκού που προκαλεί βλάβη στο ήπαρ κατά τα πρώτα στάδια της νόσου και νευρολογική συμπτωματολογία στα προχωρημένα στάδια. Η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων κυμαίνεται από 8 έως 50 χρόνων (28). Χωρίς θεραπεία ο θάνατος επέρχεται 1-3 χρόνια μετά την έναρξη των νευρολογικών συμπτωμάτων και συνήθως είναι αποτέλεσμα ηπατικής ανεπάρκειας. Σε μεγάλο αριθμό περιπτώσεων ιδιαιτέρως σε μικρά παιδιά, τα αρχικά συμπτώματα από την προοδευτική συσσώρευση του χαλκού στο ήπαρ, μπορεί να είναι ο ίκτερος, ο ασκίτης ή η πυλαία υπέρταση και η νόσος μπορεί να εκλάβει μία ταχεία θανατηφόρο πορεία(29, 30). Η διάγνωση της νόσου βασίζεται σε δύο τουλάχιστον από τα ακόλουθα σημεία(31):

- Χαμηλά επίπεδα σερουλοπλασμίνης (<20mg), μίας α2-σφαιρίνης γλυκοπρωτεϊνικής σύνθεσης, η οποία φυσιολογικά δεσμεύει το 90% του χαλκού στο πλάσμα και το αποδίδει σε ένζυμα που περιέχουν χαλκό.
- Αυξημένη συγκέντρωση χαλκού στο ήπαρ (>250mg/g), που μπορεί να προσδιορισθεί σε παρασκεύασμα βιοψίας ήπατος.
- Αυξημένη απέκκριση χαλκού από τα ούρα (>100mg/24hr)

- Παρουσία του δακτυλίου Kayser-Fleischer, ο οποίος προκαλείται από τη συσσώρευση χαλκού στην περιφέρεια του κερατοειδούς και γίνεται ορατός κατά την εξέταση με σχισμοειδή λυχνία.

Όλοι οι ασθενείς με νόσο Wilson ασυμπτωματικοί ή μη χρειάζονται θεραπεία. Σκοπός της θεραπείας είναι αρχικά να αφαιρεθούν οι τοξικές ποσότητες χαλκού και μετέπειτα να προληφθεί η άθροισή του στους ιστούς. Η νόσος είναι θανατηφόρος χωρίς θεραπεία αλλά αν διαγνωστεί έγκαιρα, θεωρείται ότι σε μεγάλο ποσοστό οι βλάβες είναι αναστρέψιμες ή μπορούν να προληφθούν σε προσυμπτωματικούς ασθενείς. Η εξελικτική πορεία της νόσου προλαμβάνεται με χορήγηση παραγόντων που δεσμεύουν χαλκό, όπως είναι η πενικιλλαμίνη και η τριεντίνη. Η διάγνωση της νόσου είναι εφικτή σε ασυμπτωματικούς ασθενείς οι οποίοι έχουν στενούς πάσχοντες συγγενείς. Ο εντοπισμός των φορέων δεν είναι δυνατός με βιοχημικές μεθόδους αλλά μόνο με ανάλυση DNA του υπεύθυνου γονιδίου. Η μεταμόσχευση ήπατος χρησιμοποιείται σε ασθενείς με πολύ προχωρημένη ηπατική νόσο, η οποία είναι μη αναστρέψιμος, καθώς και σε κεραυνοβόλες μορφές ηπατικής νόσου (32-34).

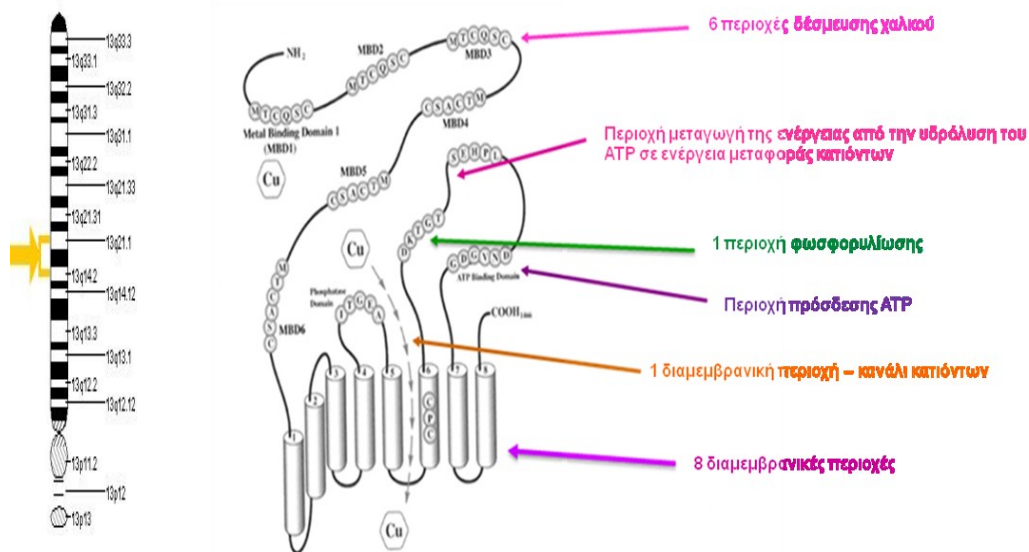
Η νόσος Wilson είναι μία από τις ελάχιστες γενετικές νόσους για τις οποίες υπάρχει θεραπεία, η οποία αποσκοπεί στην αποβολή της περίσσειας του χαλκού από τον οργανισμό και πρέπει να λαμβάνεται δια βίου (35). Το συχνότερα χρησιμοποιούμενο φάρμακο είναι ο χηλικός παράγοντας πενικιλλαμίνη, η οποία λαμβάνεται από του στόματος και αποβάλλεται από τα ούρα. Ανεπιθύμητες αντιδράσεις από τη χρήση της είναι αλλεργικές, κυρίως δερματικές αντιδράσεις και νεφρικές εκδηλώσεις. Άλλο χρησιμοποιούμενο φάρμακο είναι η τριεντίνη που προκαλεί πιθανόν λιγότερες αντιδράσεις, αλλά χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά. Ο ψευδάργυρος μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις όπου οι προηγούμενοι παράγοντες δεν είναι ανεκτοί. Τα άτομα που έχουν τη νόσο αλλά βρίσκονται ακόμα σε ασυμπτωματικό στάδιο (για παράδειγμα τα αδέλφια πασχόντων, που διαγνώστηκαν πολλές φορές με μοριακό έλεγχο) πρέπει επίσης να λαμβάνουν δια βίου θεραπευτική αγωγή. Η μεταμόσχευση ήπατος σε ασθενείς με μη αναστρέψιμη ηπατική βλάβη, αποτελεί την έσχατη λύση βελτίωσης των συμπτωμάτων της νόσου (35).

Η συχνότητα της νόσου παγκοσμίως εκτιμάται ότι είναι από 1 στις 35000 έως 1 στις 100000 γεννήσεις ζώντων νεογνών και συχνότητα φορέων 1 στους 90. Η συχνότητα φορέων στη χώρα μας υπολογίζεται στο 1.2% και αναμένεται κάθε χρόνο η γέννηση 1 έως 3 νέων ασθενών(36-39). Σε κλειστές κοινωνίες όπως αυτή της Σαρδηνίας καθώς και σε κάποιες περιοχές της Ελλάδας (Κάλυμνος, Κρήτη) (40) η συχνότητα της νόσου παρουσιάζεται σημαντικά αυξημένη.

Μοριακή διαταραχή της νόσου

Η μελέτη της μοριακής διαταραχής της νόσου αποτελεί μία σημαντική συνεισφορά στην έγκαιρη και ακριβή διάγνωση, με αποτέλεσμα την άμεση ακόμα και προσυμπτωματική- μετεράστια οφέλη για τους ασθενείς- έναρξη της θεραπείας.

Η χαρτογράφηση του γονιδίου άρχισε το 1985 με μελέτες ανάλυσης γενετικής σύνδεσης. Το υπεύθυνο για τη νόσο γονίδιο εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 13 σε στενή σύνδεση με το γονίδιο του ερυθροκυτταρικού ενζύμου εστεράσης-D. Πιο συγκεκριμένα στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 13, στην περιοχή 13q14-q21 (41, 42). Μερικά χρόνια αργότερα έγινε η απομόνωση και κλωνοποίηση του γονιδίου και ο ακριβής χαρακτηρισμός του. Το γονίδιο έχει μέγεθος 80-100kb, αποτελείται από 21 εξόνια (εικόνα 5). Το προϊόν της μεταγραφής του είναι 7.5Kb, και εκφράζεται ως επί το πλείστον στο ήπαρ και στον εγκέφαλο, σε μικρότερο βαθμό στο νεφρικό, καρδιακό και μυϊκό ιστό.



Εικόνα 5. Χρωμοσωμική θέση του γονιδίου *ATP7B* στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 7 και η στερεοδομή της πρωτεΐνης *ATP7B*

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *ATP7B*, αποτελείται από 1466 αμινοξέα, έχει μέγεθος 160Kda, είναι μία αδενοσινωτριφωσφατάση τύπου P με 54% των αμινοξέων της κοινά με την πρωτεΐνη της νόσου Menkes (29) και εντοπίζεται στο Trans Golgi Network (σωματίδιο Golgi), όπου γίνεται και η ενσωμάτωση του χαλκού σε ένζυμα που χρειάζονται χαλκό για την λειτουργία τους.

Η πρωτεΐνη *ATP7B* περιέχει διάφορους λειτουργικούς τομείς (43): 6 τομείς που δεσμεύουν το χαλκό και βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο, έναν τομέα μεταφοράς ενέργειας από την υδρόλυση του ATP (αμινοξέα 837-864 και συμπεριλαμβάνει το μοτίβο Thr-Gly-Glu), έναν τομέα διαύλου κατιόντων και φωσφορυλίωσης (αμινοξέα 971-1035 και συμπεριλαμβάνει το μοτίβο Asp-Lys-Thr-Gly-Thr αλληλουχία που έχει διατηρηθεί δια μέσου της εξέλιξης), έναν τομέα δέσμευσης του ATP (αμινοξέα 1240-1291) και 8 υδρόφοβες διαμεμβρανικές αλληλουχίες (1-8), σε μία από τις οποίες (περιοχή 6) ανευρίσκεται η αλληλουχία Cys-Pro-Cys, η οποία ανευρίσκεται σε όλες τις ATPάσες τύπου P (Εικόνα 5). Οι 6 αμινοτελικές μεταλλοδεσμευτικές αλληλουχίες είναι ουσιώδεις για τη λειτουργία μεταφοράς του χαλκού. Ανάλυση της δομής του αμινοτελικού άκρου αποκάλυψε ότι μετά τη δέσμευση του χαλκού λαμβάνουν χώρα τόσο δευτεροταγείς όσο και τριτοταγείς δομικές μεταβολές (44). Επιπρόσθετα αποδείχθηκε ότι η

δέσμευση με το χαλκό επάγει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης ATP7B, γεγονός που συμπίπτει με τη διακίνηση της πρωτεΐνης στα κυστιδικά διαμερίσματα (45). Οι μεταλλοδεσμευτικές αλληλουχίες 5 και 6 επαρκούν από μόνες τους να υποστηρίξουν την επανακατανομή της ATP7B στα κυστιδικά διαμερίσματα. Τα πρώτα 3 αμινοτελικά μοτίβα δεν είναι απαραίτητα για την ενδοκυττάρια διακίνηση που εξαρτάται από το χαλκό και δε μπορούν λειτουργικά να αντικαταστήσουν τις θέσεις 4-6 όταν τοποθετηθούν στις θέσεις τους στην αλληλουχία.

Η πρωτεΐνη της νόσου Wilson ATP7B προσλαμβάνει το χαλκό από την κυτοσολική πρωτεΐνη συνοδό του χαλκού HAH1 (η οποία ονομάζεται Atox1) και μετά από το πέρασμα του χαλκού στο σύστημα Golgi, ακολουθεί η ενσωμάτωσή του στη σερουλοπλασμήνη.

Οι Achila και συν, το 2006 (46) συμπέραναν ότι οι μεταλλοδεσμευτικοί τομείς Cu4 και Cu2 του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης ATP7B είναι αποδέκτες του χαλκού (I) από την πρωτεΐνη HAH1 και με κάποιο τρόπο οδηγούν το χαλκό στο σύμπλεγμα των μεταλλοδεσμευτικών τομέων Cu5–6 πριν από την εξαρτώμενη από το ATP μεταφορά δια μέσου της κυστιδιακής μεμβράνης.

Τελευταίες μελέτες εντόπισαν ένα μικρότερο σε μέγεθος προϊόν της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια. Το προϊόν αυτό έχει μέγεθος 140Kda και του λείπει ένα μέρος του 5' αμινοτελικού άκρου όπου υπάρχουν οι περιοχές δέσμευσης χαλκού. Πολλά από τα ένζυμα στα μιτοχόνδρια χρειάζονται χαλκό για την λειτουργία τους με αποτέλεσμα τα μιτοχόνδρια των ασθενών με τη νόσο να παρουσιάζουν αρκετές μορφολογικές αλλοιώσεις. Η ελαττωματική ή η μη έκφραση της πρωτεΐνης στο ήπαρ εμποδίζει την μεταφορά του χαλκού από τα ηπατικά κύτταρα καθώς επίσης και τη δέσμευση του χαλκού από την αποσερουλοπλασμήνη για τη δημιουργία της σερουλοπλασμήνης. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αύξηση των επιπέδων του χαλκού στο κύτταρο πιστεύεται ότι προκαλεί την σύνθεση σερουλοπλασμήνης και συγχρόνως δέσμευση χαλκού από την ATP7B πρωτεΐνη και μετακίνηση της προς τη μεμβράνη του κυττάρου, για την απόδοση του χαλκού (27).

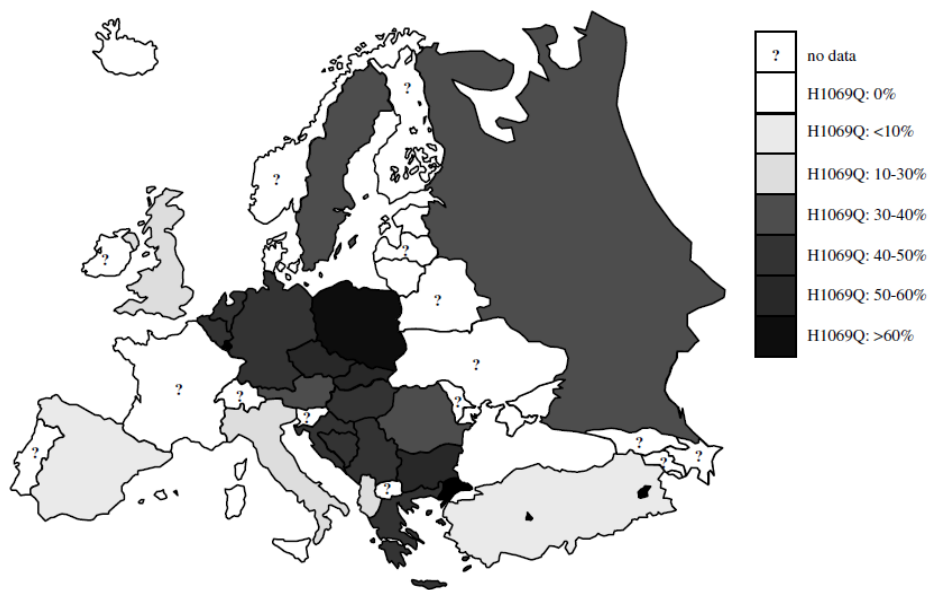
Η ανάλυση των μεταλλάξεων της νόσου αποσαφηνίζει τη μοριακή παθογένεση της νόσου. Μελέτες δείχνουν ειδικές ανωμαλίες στη μεταφορά του χαλκού από την πρωτεΐνη

ATP7B, την ενδοκυττάρια εντόπιση, τη διακίνηση που επάγεται από το χαλκό και την αλληλεπίδραση της ATP7B με την πρωτεΐνη Atox (47-49).

Η φαινοτυπική ετερογένεια που παρατηρείται στη νόσο Wilson θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων που επηρεάζουν την απομάκρυνση του χαλκού από τη μεταλλοθειονίνη, την απελευθέρωση του χαλκού στην εκκριτική οδό από την πρωτεΐνη Atox1 ή την απέκκριση του χαλκού στη χολή από την πρωτεΐνη Murr1.

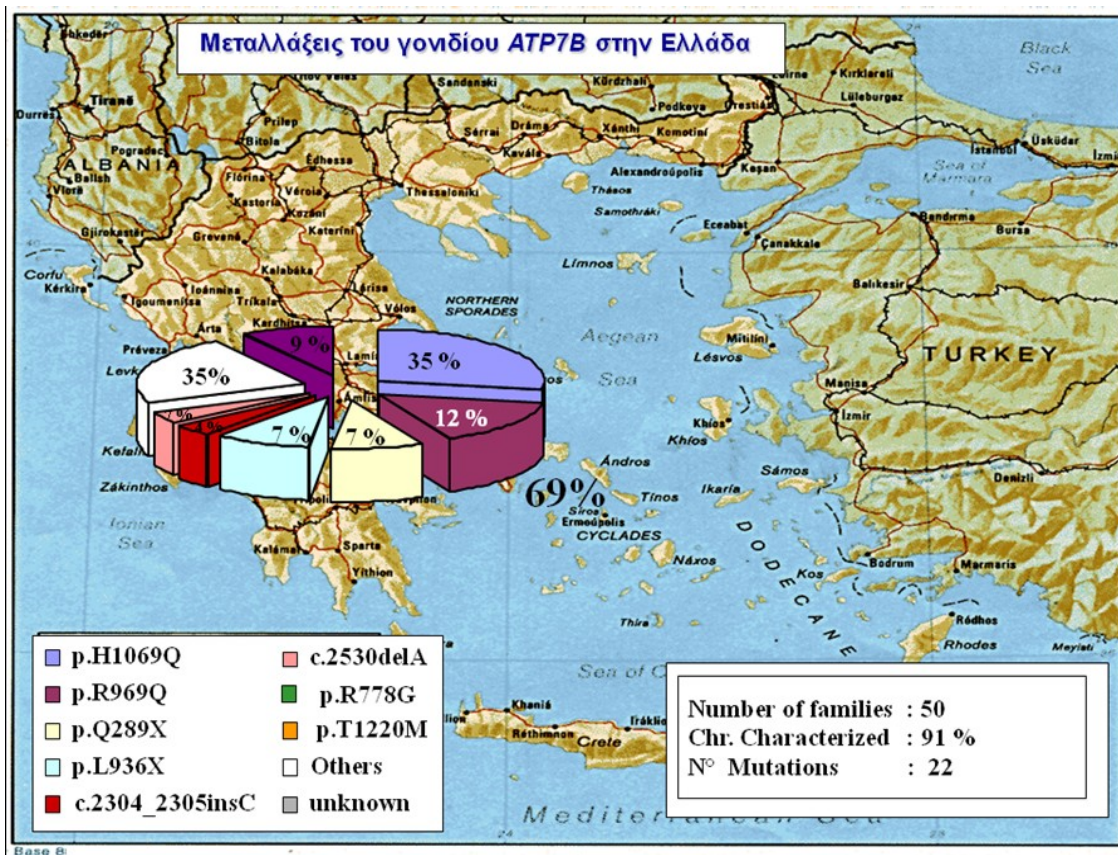
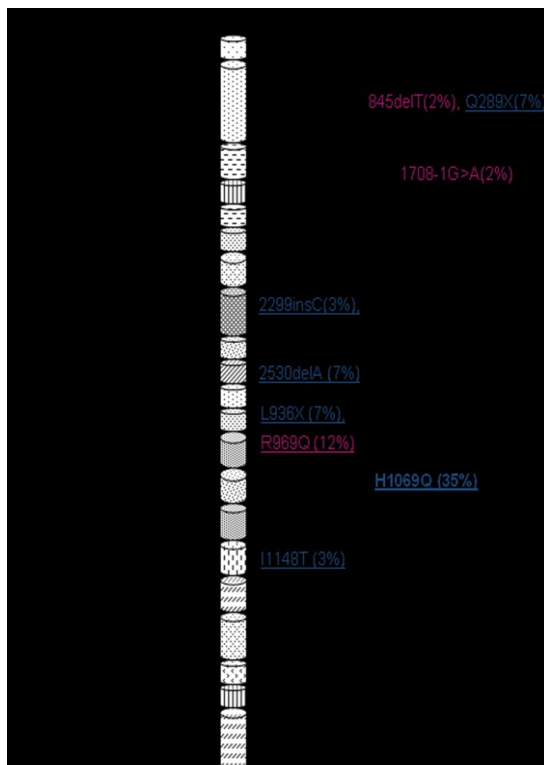
Οι μεταλλάξεις της πρωτεΐνης ATP7B, που διαταράσσουν την εντόπιση και τη διακίνηση της πρωτεΐνης μπορεί να έχουν ένα καταστροφικό αποτέλεσμα στην συνολική λειτουργικότητα της και συνεισφέρουν στην εμφάνιση της νόσου Wilson. Αρκετές μεταλλάξεις συγκεντρώνονται στον τομέα σύνδεσης νουκλεοτιδίων της πρωτεΐνης όπου προβλέπεται ότι διαταράσσουν τη σύνδεση του ATP.

Περισσότερες από 300 (50) μεταλλάξεις υπεύθυνες για τη νόσο έχουν ανιχνευθεί μέχρι σήμερα (38). Αρκετές από τις μεταλλάξεις εμφανίζονται σε μερικούς μόνο ασθενείς και είναι σαφής η εθνική κατανομή τους (συγκεκριμένο είδος μεταλλάξεων σε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες) (36, 51). Η πιο συχνή μετάλλαξη παγκοσμίως είναι η p.His1069Gln με συχνότητα έως και 65% στην κεντρική Ευρώπη και 10-35% σε Μεσογειακές χώρες (39, 52, 53). Στην εικόνα 6 παρουσιάζεται ο χάρτης της Ευρώπης με τις συχνότητες της πιο κοινής μετάλλαξης p.His1069Gln, όπως προκύπτει από τη συλλογή στοιχείων από εργασίες που έχουν δημοσιευτεί για τον Ευρωπαϊκό χώρο (53).



Εικόνα 6. Συχνότητα αλληλομόρφων που φέρουν την μετάλλαξη p.H1069Q στην Ευρώπη. (53)

Στην εικόνα 7 παρουσιάζεται σχηματικά το γονίδιο *ATP7B* καθώς και οι πιο συχνές μεταλλάξεις που ανιχνεύονται σε ασθενείς Ελληνικής καταγωγής.



Εικόνα 7. Είδος και συχνότητα των μεταλλάξεων του γονιδίου *ATP7b* σε έλληνες ασθενείς

Μοριακή μελέτη των επιλεγμένων νοσημάτων στο Εργαστήριο Ιατρικής

Γενετικής

Το εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής αποτελεί κέντρο αναφοράς για τη μελέτη ασθενών με κυστική ίνωση και με νόσο Wilson στην Ελλάδα. Η μοριακή μελέτη της κυστικής ίνωσης ξεκίνησε το 1992 και της νόσου Wilson το 1997. Από τότε που ξεκίνησε η μοριακή μελέτη μέχρι σήμερα έχουν υιοθετηθεί πολλά διαφορετικά πρωτόκολλα, τα οποία αλλάζουν και προσαρμόζονται κάθε φορά ανάλογα με τις ανάγκες του εργαστηρίου.

Οι μέθοδοι ανίχνευσης μεταλλάξεων των γονιδίων μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγορίες. Αυτές που στοχεύουν στην ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων (έλεγχος για την παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων μεταλλάξεων) και αυτές που σαρώνουν περιοχές του γονιδίου (έλεγχος των δειγμάτων για κάθε παρέκκλιση από την τυπική αλληλουχία). Στις τελευταίες συμπεριλαμβάνεται και ο έλεγχος για μεγάλες ανακατατάξεις του γονιδίου (μεγάλα ελλείμματα, ενθέσεις, διπλασιασμοί) με τη χρήση MLPA και ποσοτικού φθορίζοντος PCR.

Για την κυστική ίνωση, καθώς εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα, υπάρχουν πολλά τυποποιημένα αντιδραστήρια που στοχεύουν στην ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων και τα οποία κυκλοφορούν στην αγορά. Στους πίνακες που ακολουθούν (54), παρουσιάζονται οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συχνότερα, στην Ευρώπη.

Methods for the detection of unknown mutations			
DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)	DGGE, DHPLC, SSCP and Sequencing:	High sensitivity (>95%)	Difficult to set up; difficult automation Can miss isostable mutations in the homozygous state
DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography)	Aiming to detect all mutations of small bp in the coding regions and intronic boundaries	High sensitivity (>95%)	Generally miss homozygous mutations Need sequencing of polymorphism-rich regions
SSCP (single strand conformation polymorphism)		Simple and rapid to set up	Sensitivity 80–85%
Sequencing (as a first-line method or confirmation after a scanning technique)		Close to 100% sensitivity	
Quantitative fluorescent multiplex PCR MLPA (multiple ligation-dependent probe amplification)	Aiming to detect deletions, insertions, and duplications All coding regions	Simple and rapid	Sensitive to extraction methods Duplications may be difficult to evidence

Πίνακας 3. Μέθοδοι για σάρωση του γονιδίου.

<i>Methods for the detection of known mutations</i>	<i>Mutations detected</i>	<i>Advantages</i>	<i>Limits and pitfalls</i>
Heteroduplex analysis (strictly speaking a scanning method)	Mainly F508del and I507del Other microinsertions/deletions (2 bp minimum): 394delTT (Northern Europe), 1677delTA (Black Sea countries), 1609delCA (Spain)	Simple and rapid	Migration pattern not specific for a given mutation
Restriction enzyme analysis (restriction sites can be natural or created by the use of modified primers)	Mainly specific individual mutations Possibly a small number of mutations can be combined in one assay	Simple and rapid Useful for cascade carrier testing in case of rare mutations	Not specific, especially if site abolition (eg. G551D and R553X abolish the same <i>Hinc II</i> site, and W1282X and R1283M the same <i>Mnl I</i> site)
Reverse dot blot hybridization	Up to 20 mutations per multiplex	Appropriate for large series	
Innogenetics (Inno LiPA) ^a	36 mutations	Good specificity	
ARMS (amplification refractory mutation system)	Up to 20 mutations	Appropriate for large series	Design of primers is difficult Results are based on the absence of PCR product
Tepnel (Elucigene) ^a	28–30 mutations	Good specificity	
OLA (oligonucleotide ligation assay)		Appropriate for large series	
Abbott Molecular (Cystic Fibrosis Genotyping Assay) ^a	32 mutations	Good specificity	

Πίνακας 4. Μέθοδοι για ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων.

Ο μοριακός έλεγχος βασίζεται κυρίως στην απευθείας ανάλυση του γονιδίου, δηλαδή στην ανίχνευση των παθολογικών μεταλλάξεων βάσει της γνώσης της μοριακής παθολογίας και της διαθεσιμότητας των μεθόδων. Καθώς υπάρχει ευρεία επιλογή μεθόδων δεν υπάρχει η «απόλυτη μέθοδος» ανάλυσης. Όλες απαιτούν δεξιότητα και εμπειρία για την εφαρμογή και την αξιολόγησή τους. Κάθε εργαστήριο που προσφέρει μοριακό έλεγχο θα πρέπει να γνωρίζει τους περιορισμούς της μεθόδου επιλογής καθώς και ποιες μεταλλάξεις δεν ανιχνεύονται. Επίσης θα πρέπει να επιλέγει τη μέθοδο ανίχνευσης βάσει της εμπειρίας, του φόρτου δουλειάς και του σκοπού ελέγχου.

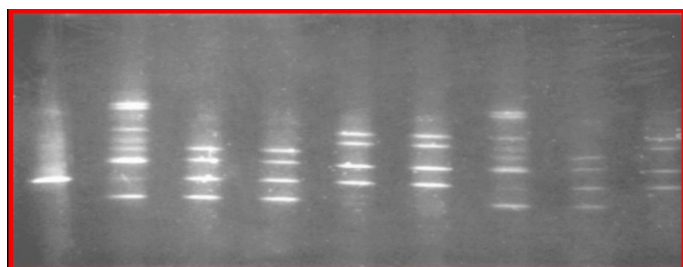
Λόγω της μεγάλης μοριακής ετερογένειας του Ελληνικού πληθυσμού, τα εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια για τον έλεγχο μεταλλάξεων στο γονίδιο *CFTR* καλύπτουν 75-80% των μεταλλάξεων στον πληθυσμό. Σύμφωνα με τις οδηγίες του ομάδας Ευρωπαίων επιστημόνων που μελετούν την κυστική ίνωση, κάθε εργαστήριο που παρέχει μοριακό έλεγχο για τη νόσο, θα πρέπει να καλύπτει το 75-85% (26) των μεταλλάξεων του πληθυσμού.

Το εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, λειτουργεί ως κέντρο αναφοράς για τον μοριακό έλεγχο της κυστικής ίνωσης και της νόσου Wilson. Γι' αυτό το λόγο, η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται θα πρέπει να επιτρέπει την ανίχνευση μεταλλάξεων σε

ποσοστό μεγαλύτερο του 85%, και να μη περιορίζεται στο έλεγχο συγκεκριμένων μόνο αλλαγών.

Η κύρια μέθοδος ανάλυσης που επικράτησε στο εργαστήριο ιατρικής γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, και για τα δύο νοσήματα, είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με αυξανόμενη συγκέντρωση αποδιατακτικού (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE). Η μέθοδος DGGE επιτρέπει το διαχωρισμό μορίων DNA που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους όπως συμβαίνει στην περίπτωση των σημειακών μεταλλάξεων (αντικατάσταση, έλλειμμα ή προσθήκη μικρού αριθμού βάσεων). Βασίζεται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τμημάτων διπλής έλικας DNA σε πήκτωμα πολύακρυλαμίδης που περιέχει μετουσιωτικούς (αποδιατακτικούς) παράγοντες σε προοδευτικά αυξανόμενη συγκέντρωση. Ο διαχωρισμός των φυσιολογικών από τα μεταλλαγμένα τμήματα DNA βασίζεται στα χαρακτηριστικά τήξεως του μορίου.

Η μέθοδος θεωρείται πολύ αξιόπιστη καθώς μπορεί με ακρίβεια να διαχωρίσει προϊόντα με διαφορετική σύσταση και να αποκαλύψει αλλαγές στην αλληλουχία σε ομόζυγη ή ετερόζυγη κατάσταση (εικόνα 8). Τα σαφή μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η δυσκολία σχεδιασμού των κατάλληλων εκκινήτων και η τυποποίηση των συνθηκών του πειράματος καθώς η ευαισθησία της μεθόδου ακόμα και σε μικρές παραλλαγές των τυποποιημένων συνθηκών. Επιπλέον ο χρόνος ανάλυσης ακόμα και για μικρό αριθμό δειγμάτων είναι απαγορευτικός, καθώς η ηλεκτροφόρηση διαρκεί 16 με 18 ώρες.



Εικόνα 8. Αποτελέσματα πειράματος DGGE. Στη κάθε θέση αναλύεται το εξόνιο 10 του γονιδίου *CFTR* διαφορετικού ατόμου. Λόγων των διαφορών στην αλληλουχία το κάθε προϊόν εμφανίζει διαφορετική εικόνα.

Για την επιβεβαίωση των θετικών ευρημάτων και τον καθορισμός του τύπου της μετάλλαξης πραγματοποιείται ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA (sequencing). Επίσης για την ανίχνευση συγκεκριμένων μεταλλάξεων χρησιμοποιείται πέψη με περιοριστικό ένζυμο καθώς και αλληλομορφο-ειδική αντίδραση PCR.

Σκοπός της διατριβής

Ο διαρκώς αυξανόμενος όγκος μοριακών εξετάσεων στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, επέβαλλε την ανάγκη αντικατάστασης της μεθόδου DGGE από κάποια άλλη, εξίσου αξιόπιστη αλλά ταχύτερη με δυνατότητα εφαρμογής σε μεγάλη κλίμακα. Η μεθοδολογία αντικατάστασης θα έπρεπε να παρέχει το πλεονέκτημα ταχείας ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων, με ευαισθησία και αξιοπιστία σε ποσοστά 100%. Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει ως σκοπό την ανάπτυξη προηγμένης τεχνολογίας για την ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε επίπεδο DNA, ικανή να αντικαταστήσει την υπάρχουσα μεθοδολογία του εργαστηρίου.

Προκειμένου να καταλήξουμε στην κατάλληλη μεθοδολογία αντικατάστασης, έγινε σχεδιασμός και πειραματική αξιολόγηση διαφορετικών μεθοδολογιών. Το κριτήριο για την τελική επιλογή ήταν η αξιοπιστία και η ευκολία εφαρμογής, η ευελιξία τροποποίησης του πρωτοκόλλου στα καινούργια δεδομένα και η δυνατότητα εφαρμογής σε μεγάλη κλίμακα.

Παράλληλα σκοπός της διατριβής ήταν ο σχεδιασμός ενός αλγορίθμου ανάλυσης των αλλαγών στη κωδικοποιούσα αλληλουχία που ανιχνεύονται για πρώτη φορά καθώς και των αλλαγών στις περιοχές των εσόνίων, οι οποίες πιθανών να οδηγούν σε ανωμαλίες στο μάτισμα της πρωτεΐνης, με τη χρήση *in silico* προγραμμάτων.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στα πλαίσια της αναζήτησης της καταλληλότερης μεθοδολογίας, έγινε σχεδιασμός και προτυποποίηση πολλών διαφορετικών τεχνικών για καθένα από τα νοσήματα μοντέλα. Συγκεκριμένα οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι:

NanoChip 400™ (NC400)

Ο σχεδιασμός μεθόδου με την τεχνολογία Nanochip έγινε για τη νόσο Wilson. Η συγκεκριμένη τεχνολογία βασίζεται στον ηλεκτρονικό χειρισμό ηλεκτρικού πεδίου σε συσκευή ημιαγωγών. Ένα μικροηλεκτρονικό σύστημα επιτρέπει την ενεργό μεταφορά και ακινητοποίηση ιονισμένων σωματιδίων (μορίων DNA, RNA, ολιγονουκλεοτιδίων) σε συγκεκριμένα προεπιλεγμένα σημεία (pads) στην επιφάνεια μιας μικροσυστοιχείας. Το DNA ασθενών υπόκειται στη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- PCR για επιλεγμένες περιοχές του γονιδίου, κυρίως πολυμορφισμούς μονής βάσης (SNPs) με εκκινητές σημασμένους με βιοτίνη ώστε να προσκολλώνται στην στρεπταβιδίνη που επικαλύπτει την επιφάνεια της μικροσυστοιχείας.

Για τον χαρακτηρισμό κάθε SNP απαιτούνται 3 ολιγονουκλεοτίδια. Τα δύο, ολιγονουκλεοτίδια ανιχνευτές, έχουν την ίδια θερμοκρασία υβριδισμού και είναι συμπληρωματικά με την περιοχή που εντοπίζεται το SNP. Σχεδιάζονται έτσι ώστε το νουκλεοτίδιο που αλλάζει να βρίσκεται στο 3' τελικό άκρο τους ενώ το 5' είναι ιχνηθετημένο με φθορίζουσα ομάδα Cy3 ή Cy5. Το τρίτο ολιγονουκλεοτίδιο είναι συμπληρωματικό με γειτονική περιοχή από αυτή που εντοπίζεται η αλλαγή και χρησιμοποιείται για να εξασφαλίσει γραμμικότητα στην ακινητοποιημένη αλυσίδα του DNA, εμποδίζοντας τον σχηματισμό δευτεροταγών δομών. Το ακινητοποιημένο τμήμα DNA υβριδοποιείται με μίγμα, που περιέχει και τα τρία ολιγονουκλεοτίδια σε διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης αλάτων, και σε θερμοκρασία που αντιστοιχεί στην θερμοκρασία αποδιάταξης των ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνευτών. Μετά τον υβριδισμό οι φθορισμοί και από τις δύο φθορίζουσες ομάδες ανιχνεύονται ανα pad και

υπολογίζεται ο λόγος της έντασης τους. Ο προσδιορισμός των γονοτύπων γίνεται με βάση το λόγο των εντάσεων φθορισμού από τις δύο ομάδες Cy3 και Cy5, συγκρίνοντας με μάρτυρες ετεροζυγώτες για το SNP που ανιχνεύουμε.

Luminex xMAP™

Ο σχεδιασμός μεθόδου με την τεχνολογία Luminex xMAP έγινε τόσο για τη κυστική ίνωση όσο και για τη νόσο Wilson.

Η μέθοδος αυτή είναι τεχνολογία υγρών συστοιχιών με μικροσφαιρίδια- Luminex xMAP™. Για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *CFTR* ο σχεδιασμός βασίστηκε στο ήδη πιστοποιημένο πρωτόκολλο Tm 100 Universal Array της Tm-Bioscience™ για την αξιόπιστη και ταχεία αναγνώριση ευρέως φάσματος μεταλλάξεων και πολυμορφισμών που έχουν εντοπιστεί στη περιοχή της Μεσογείου και στα Βαλκάνια.

Η πλατφόρμα Luminex xMAP™ βασίζεται στην κλασική μέθοδο κυτταρομετρίας ροής. Η ανίχνευση μεταλλάξεων στο σύστημα Luminex περιληπτικά περιλαμβάνει τέσσερα στάδια:

1) Πολλαπλή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Multiplex PCR)

Τα προϊόντα της πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης επεξεργάζονται με αλκαλική φωσφατάση (ένζυμο που υδρολύει τους φωσφοεστερικούς δεσμούς) για την αποφωσφορυλίωση των ελεύθερων νουκλεοτιδίων που βρίσκονται σε περίσσεια και εξωνουκλεάση για την καταστροφή των υπολειμμάτων των εκκινητών από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Η επεξεργασία με αλκαλική φωσφατάση είναι ιδιαίτερα σημαντική για την καταστροφή των dCTP νουκλεοτιδίων, αφού στο επόμενο βήμα θα χρησιμοποιηθούν dCTP νουκλεοτίδια σημασμένα με βιοτίνη.

2) Επέκταση εκκινητών συμπληρωματικών ως προς τα προς ανίχνευση αλληλία (ASPE: Allele Specific Primer Extension)

Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιούνται τα προϊόντα της πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και εκκινητές οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί στο 3' άκρο τους

ως προς τα αλληλία και στο 5' άκρο τους φέρουν μια μη ειδική αλληλουχία-ετικέτα (universal tag). Οι εκκινητές αυτοί μπορούν και διαχωρίζουν τα αλληλία ανάλογα με τη βάση που φέρουν στη θέση της σημειακής μετάλλαξης την οποία εξετάζουμε. Μόνο οι απολύτως συμπληρωματικοί εκκινητές ως προς την αλληλουχία θα συμμετάσχουν στον υβριδισμό και θα δώσουν σημασμένα προϊόντα.

3) Υβριδισμός με Μικροσφαιρίδια (Bead Hybridisation)

Το σύστημα χρησιμοποιεί μικροσφαιρίδια πολυστυρενίου τα οποία περιέχουν δύο φθορίζουσες χρωστικές διαφορετικού φάσματος. Η χρήση αυτών των δύο χρωστικών σε διαφορετικά ποσοστά επιτρέπει τη δημιουργία 100 διαφορετικών μικροσφαιριδίων που ανιχνεύονται σε διαφορετικό φάσμα. Τα μικροσφαιρίδια φέρουν στην επιφάνεια τους συμπληρωματικές αλληλουχίες ως προς τις αλληλουχίες-ετικέτες που βρίσκονται στους εκκινητές (anti-tags) επιτρέποντας τον υβριδισμό τους και εν συνεχεία την ανίχνευσή τους.

Αφού επιτευχθεί ο υβριδισμός στα μικροσφαιρίδια, προστίθεται στην αντίδραση στρεπταβιδίνη και φυκοερυθρίνη για την ποσοτικοποίηση του υβριδισμού των μικροσφαιριδίων και των προϊόντων του ASPE.

4) Λήψη Δεδομένων - Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Το κάθε σύμπλεγμα (complex) μικροσφαιριδίου-αλληλίου εξετάζεται ατομικά και ανιχνεύεται, καθώς περνάει μέσα σε ένα ταχέως κινούμενο υγρό ρεύμα από δύο διαφορετικά laser, στον αναλυτή Luminex100 . Ο αναλυτής έχει τη δυνατότητα να επεξεργάζεται ψηφιακά τα διαφορετικά σήματα και έτσι να κατατάσσει τα μικροσφαιρίδια ανάλογα με το φάσμα στο οποίο ανιχνεύονται και να ποσοτικοποιεί την αντίδραση σε μερικά δευτερόλεπτα ανά δείγμα.

Από τη στιγμή που κάθε μικροσφαιρίδιο υβριδίζεται αποκλειστικά με ένα μόνο αλληλίο, επιτυγχάνουμε την πολύ γρήγορη ανίχνευση μεταλλαγμένων και φυσιολογικών αλληλίων σε κάθε δείγμα.

Υψηλής Ευκρίνειας Ανάλυση Αποδιάταξης (High Resolution Melting Analysis - HRMA)

Ο σχεδιασμός μεθόδου για υψηλής ευκρίνειας ανάλυση αποδιάταξης έγινε τόσο για τη κυστική ίνωση όσο και για τη νόσο Wilson.

Η μέθοδος βασίζεται στην βασική ιδιότητα του DNA να αποδιατάσσεται με θέρμανση, η οποία μπορεί να παρατηρηθεί με τη χρήση φθορίζουσας χρωστικής. Τυπικά αυτή η ανάλυση πραγματοποιούνταν μετά την PCR αντίδραση (post-PCR) σε PCR μηχανήματα πραγματικού χρόνου προκειμένου να διερευνηθεί η καθαρότητα του προϊόντος και οι αλλαγές της αλληλουχίας (με τη χρήση ανιχνευτών υβριδισμού). Οι αλληλουχίες μπορούν να διαχωριστούν βάσει της σύστασής τους, του μήκους τους, του GC περιεχομένου ή της συμπληρωματικότητάς τους.

Η ανάλυση ξεκινά με τον πολλαπλασιασμό με PCR παρουσία μιας χρωστικής που προσδένεται στη διπλή έλικα του DNA. Η χρωστική έχει υψηλό φθορισμό όταν είναι προσδεσμένη και χαμηλό όταν είναι ελεύθερη. Ακολουθεί υψηλής ευκρίνειας ανάλυση αποδιάταξης με τη χρήση μηχανήματος ικανού να καταγράφει μεγάλο αριθμό δεδομένων φθορισμού σε κάθε θερμοκρασία με μεγάλη ακρίβεια. Η μοναδικότητα της μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι επιτρέπει τον ομογενή έλεγχο μεταλλάξεων σε ένα τυπικό πιάτο 96-θέσεων με τη χρήση φθορίζουσας κορεσμένης dsDNA χρωστικής, χωρίς να απαιτείται περεταίρω επεξεργασία.

Υλικό Μελέτης

Κυστική Ίνωση

Για την πιστοποίηση και επαλήθευση του σχεδιασμού των μεθόδων που αφορούν την κυστική ίνωση χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ασθενών και ατόμων γενικού πληθυσμού οι οποίοι είχαν παραπεμφθεί για έλεγχο στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής. Τα δείγματα έχουν συλλεχτεί σε μια χρονική περίοδο 20 ετών, από το 1992 όπου και άρχισε να προσφέρεται μοριακός έλεγχος για τη κυστική ίνωση.

Νόσος Wilson

Για την πιστοποίηση και επαλήθευση του σχεδιασμού των μεθόδων που αφορούν τη νόσο Wilson έγινε συλλογή 150 δειγμάτων νεογνών και απομόνωση γενωμικού DNA από κηλίδες αίματος σε Guthrie cards, καθώς και από τους γονείς τους από περιοχές όπου η νόσος Wilson παρουσιάζει αυξημένη συχνότητα, όπως η περιοχή της Καλύμνου και της Κρήτης. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ασθενών οι οποίοι έχουν ελεγχτεί στο εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής καθώς και μελών της οικογένειάς τους.

Απομόνωση DNA

Τα δείγματα DNA του εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών απομονώθηκαν από 2ml περιφερικού αίματος χρησιμοποιώντας το BioRobot® M48 System (Qiagen, Hilden, Germany) και το εμπορικά διαθέσιμο kit MagAttract® DNA Blood Midi M48 Kit (Qiagen).

Τα δείγματα από τις κάρτες Guthrie απομονώθηκαν χειροκίνητα με τη χρήση του αντιδραστηρίου Blood Midi Kit (Qiagen).

NanoChip 400™ (NC400) - Αρχές Λειτουργίας

Για τη γονοτύπωση των πολυμορφισμών και των μεταλλάξεων στο γονίδιο *ATP7B* χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών NanoChip της εταιρείας Nanogen. Η συγκεκριμένη τεχνολογία βασίζεται στον ηλεκτρονικό χειρισμό ηλεκτρικού πεδίου σε συσκευή ημιαγωγών. Το μικροηλεκτρονικό σύστημα επιτρέπει την ενεργό μεταφορά και συγκέντρωση ιονισμένων σωματιδίων (μόρια DNA, RNA, ολιγονουκλεοτιδίων) σε συγκεκριμένες προεπιλεγμένες θέσεις (pads) στην επιφάνεια της μικροσυστοιχίας. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα της εταιρείας Nanogen, Nanochip 400 (NC400) με 400 pads (εικόνα 9).

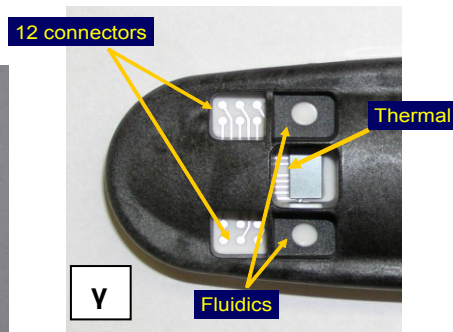
Η πλατφόρμα των μικροσυστοιχιών Nanogen βασίζεται στις αρχές του υβριδισμού. Μέσω του ηλεκτρονικού ελέγχου της αλληλουχίας-στόχου, είναι εφικτός ο προσδιορισμός του γονότυπου με ανίχνευση μέσω φθορισμού. Η πλατφόρμα χαρακτηρίζεται από αυξημένη ευελιξία σε σχέση με παρόμοιες μεθοδολογίες μικροσυστοιχιών. Το chip, που χρησιμοποιείται στην τεχνολογία Nanogen είναι το μοναδικό μέχρι στιγμής στην αγορά, όπου κάθε ιονισμένο σωματίδιο ή pad στην μικροσυστοιχία είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρόδιο έτσι ώστε να είναι δυνατή η εκλεκτική μεταφορά και πρόσδεση του DNA από το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται, σε συγκεκριμένες θέσεις πάνω στο chip.



α



β

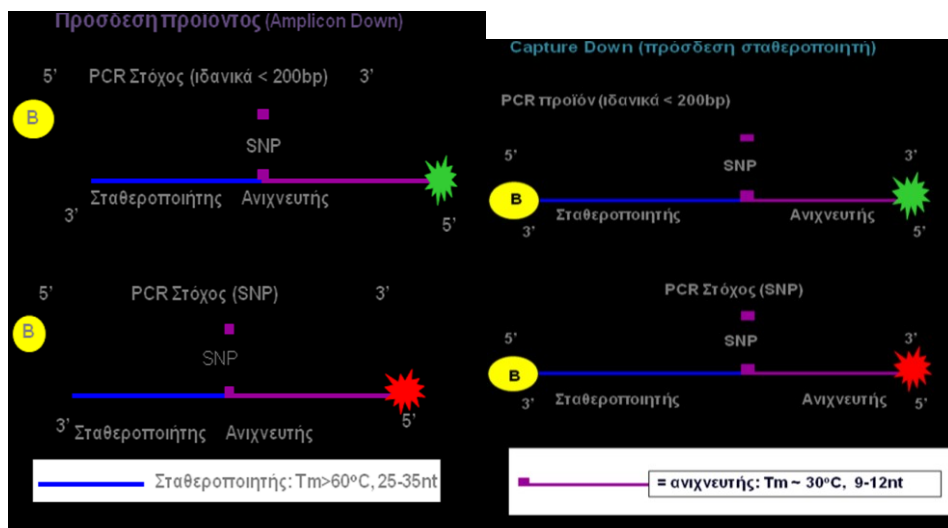


γ

Εικόνα 9. α) Το σύστημα NanoChip 400 (NC400), β) η μικροσυστοιχία (chip) 400 θέσεων του NC400, γ) λεπτομέρειες στη μικροσυστοιχία η οποία περιλαμβάνει 12 ηλεκτρόδια που επιτρέπουν τον εξατομικευμένο έλεγχο κάθεμιας από τις 400 θέσεις καθώς και ειδικό σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας και της μεταφοράς των υγρών σε κάθε θέση ξεχωριστά.

Η συγκεκριμένη τεχνολογία, χρησιμοποιεί το φυσικό αρνητικό φορτίο του DNA και την ισχυρή πρόσδεση βιοτίνης/στρεπταβιδίνης για την ακριβή αντιστοίχιση των δειγμάτων σε καθεμία από τις 400 θέσεις του chip. Η διαδικασία ξεκινά με τον πολλαπλασιασμό με PCR (πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) του ειδικού τμήματος DNA. Στο NanoChip 400 υπάρχει η δυνατότητα επιλογής μεταξύ δύο διαφορετικών πρωτοκόλλων. Το ένα πραγματοποιείται με πρόσδεση του PCR προϊόντος στην αντίστοιχη θέση του chip (**amplicon down**) και το δεύτερο με πρόσδεση του σταθεροποιητή στην αντίστοιχη θέση του chip (**capture down**) (εικόνα 10). Η επιλογή μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες:

- Τον αριθμό των SNP που αναλύονται
- Τον αριθμό των προϊόντων
- Τον επιθυμητό αριθμό θέσεων ανάλυσης ανά δείγμα ασθενούς
- Τον αριθμό των δειγμάτων και τον χρόνο εξέτασης



Εικόνα 10. Σύγκριση των δύο πρωτοκόλλων στη πλατφόρμα NanoChip400.

Το πρωτόκολλο που επιλέχθηκε για την συγκεκριμένη εφαρμογή είναι το capture down. Στο πρωτόκολλο αυτό επιτρέπεται η τοποθέτηση μέχρι και πέντε διαφορετικών σταθεροποιητών ανά θέση του chip καθώς και ο έλεγχος διαφορετικών SNP σε κάθε προϊόν PCR. Σε αυτή τη περίπτωση ο σταθεροποιητής, που είναι σημασμένος με βιοτίνη στο 3' άκρο αραιώνεται, σε διάλυμα Ιστιδίνης 50mM, σε τελική συγκέντρωση $\approx 100\text{nM}$. Το μηχάνημα φορτίζει θετικά ένα rad στο chip, προκαλώντας τοπικά την αύξηση της συγκέντρωσης του αρνητικά φορτισμένου DNA. Ο βιοτινυλιωμένος ανιχνευτής κινείται στη στοιβάδα από πήκτωμα (gel) πολυακρυλαμίδης στην επιφάνεια του rad και συνδέεται με τη στρεπταβιδίνη, η οποία είναι ομοιοπολικά προσδεδεμένη στο gel. Στη συνέχεια προστίθεται το PCR προϊόν, και με τη χρήση ειδικού λογισμικού μεταφέρεται στις προκαθορισμένες θέσεις στο chip. Τα PCR προϊόντα είναι συμπληρωματικά προς τους σταθεροποιητές και βάσει της ιδιότητας του υβριδισμού προσδένονται τελικά στο chip. Η ανίχνευση με φθορισμό των αλληλομόρφων, επιτυγχάνεται μέσω του παθητικού υβριδισμού ανιχνευτών ειδικών για κάθε αλληλόμορφο στα προϊόντα PCR, που είναι προσδεδεμένα στο chip και των αυτοματοποιημένων από το μηχάνημα εκπλύσεων των μη υβριδοποιημένων ανιχνευτών. Αφού προσδεθούν τα δίκλινα προϊόντα PCR στην επιφάνεια του chip, αποδιατάσσονται με ασθενές βασικό διάλυμα (0.3M NaOH) και ακολουθούν εκπλύσεις για την απομάκρυνση των μη προσδεδεμένων αλυσίδων.

Για το καθορισμό του γονοτύπου κάθε δείγματος, τα μονόκλιωνα μόρια DNA ιχνηθετούνται με ολιγονουκλεοτίδια ειδικά για κάθε αλληλόμορφο, τα οποία είναι σημασμένα με Cy3 (φυσικός τύπος) και Cy5 (μετάλλαξη / πολυμορφισμός) φθορίζουσες ομάδες (εικόνα 12). Η ειδικότητα πρόσδεσης αλληλουχίας στόχου – ανιχνευτή, επιτυγχάνεται κάτω από αυστηρές συνθήκες θερμοκρασίας και αλατότητας. Το μηχάνημα μπορεί να προγραμματιστεί για να μειώνει τη θερμοκρασία των εκπλύσεων βαθμιαία και να σαρώνει το chip μεταξύ των εκπλύσεων ώστε να προσδιορίζεται ποσοτικά ο φθορισμός.

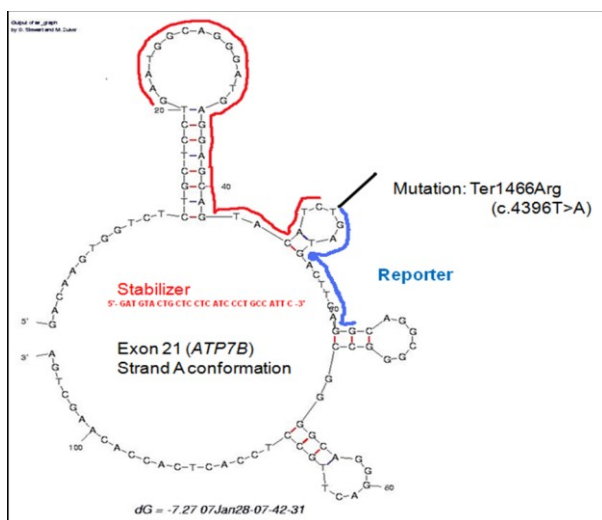
Έτσι καθορίζεται η άριστη θερμοκρασία υβριδισμού για κάθε μετάλλαξη / πολυμορφισμό. Για τον προσδιορισμό των γονοτύπων, το μηχάνημα προγραμματίζεται ώστε να θερμαίνει το chip μέχρι τη θερμοκρασία, που παρέχει την καλύτερη διακριτική ικανότητα για κάθε πολυμορφισμό, να πραγματοποιεί έκπλυση προκειμένου να απομακρυνθούν τα διάφορα παραπροϊόντα της αντίδρασης καθώς και η περίσσεια των αντιδραστηρίων, και στη συνέχεια να επαναφέρει το σύστημα στη θερμοκρασία των 24°C, όπου σαρώνεται από το διχρωματικό σύστημα laser και προσδιορίζεται ποσοτικά ο φθορισμός. Για την εξομάλυνση της αποδοτικότητας του υβριδισμού των σημασμένων ανιχνευτών για κάθε μετάλλαξη / πολυμορφισμό χρησιμοποιούνται δείγματα γνωστών ετεροζυγώτων (προσδιορισμός μέσω sequencing).

Για την περαιτέρω ανάλυση και τον προσδιορισμό των γονοτύπων απαιτείται ο λόγος σήματος προς θόρυβο να είναι μεγαλύτερος από 5:1. Ο προσδιορισμός των γονοτύπων γίνεται με βάση το λόγο των εντάσεων φθορισμού των διαλληλόμορφων. Εντάσεις φθορισμού διαλληλόμορφων $\leq 1:3$ κρίνεται ως ετερόζυγος και λόγος $\geq 1:5$ κρίνεται ως ομόζυγος.

Η μοναδικότητα του συστήματος Nanochip έγκειται στο γεγονός ότι το chip κατά την παραγγελία είναι κενό. Αυτό επιτρέπει στο χρήστη τον εξολοκλήρου σχεδιασμό του πρωτοκόλλου. Για την επιτυχία του πειράματος απαιτείται ο κατάλληλος σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδίων. Τα ολιγονουκλεοτίδια που απαιτούνται είναι εκκινητές για τη αντίδραση PCR, σταθεροποιητές (stabilizers) και ανιχνευτές (reporters).

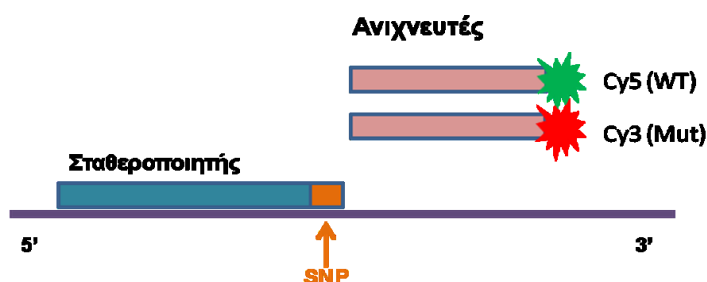
Οι εκκινητές της αντίδρασης PCR: Ιδανικά έχουν μέγεθος 20-24 νουκλεοτίδια (nt), Tm

Οι σταθεροποιητές: Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά πρέπει να έχουν μήκος μεταξύ 25 και



11. Σχεδιασμός σταθεροποιητή για το εξόνιο 21 του γονιδίου *ATP7B* (μετάλλαξη 166Arg). Ο σταθεροποιητής χρησιμεύει ώστε να ευθυγραμμιστεί η αλυσίδα του DNA και η μετάλλαξη να είναι διαθέσιμη για την πρόσδεση του ανιχνευτή. Συγκρίνοντας τη διάταξη των δύο αλυσίδων έχει επιλεγεί η αλυσίδα B για τον σχεδιασμό.

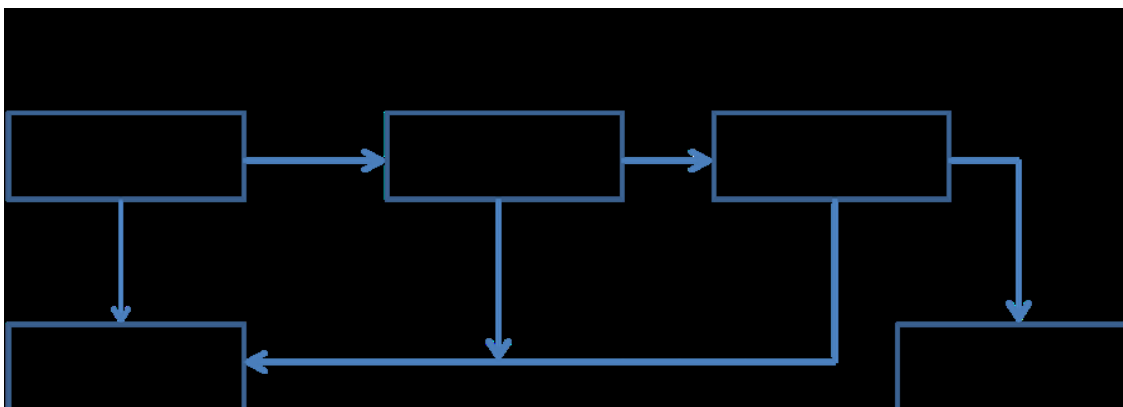
Οι ανιχνευτές (reporters): Για κάθε πολυμορφισμό σχεδιάζονται δύο ανιχνευτές. Στο 3' άκρο τους έχουν το νουκλεοτίδιο που αλλάζει ενώ το 5' άκρο είναι ιχνηθετημένο με φθορίζουσα ομάδα Cy3 ή Cy5. Ο ανιχνευτής με τον πολυμορφισμό φέρει τη φθορίζουσα ομάδα Cy5, ενώ ο ανιχνευτής με το «φυσιολογικό» νουκλεοτίδιο φέρει την ομάδα Cy3. Οι ανιχνευτές σχεδιάζονται έτσι ώστε να έχουν T_m μικρότερη από 45°C , μήκος μικρότερο από 20nt και ιδανικά ίσο με 12nt και ποσοστό βάσεων G και C περίπου 25-70%. Κατά τον σχεδιασμό επιλέγονται οι ανιχνευτές, που έχουν σχεδόν ίδια T_m , ακόμα κι αν δεν έχουν ακριβώς το ίδιο μέγεθος. Επιπρόσθετα, δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην επιλογή των ολιγονουκλεοτιδίων (reporters και stabilizers) έτσι ώστε να αποφευχθεί η ύπαρξη ανεπιθύμητων συμπληρωματικών αλληλουχιών, που θα οδηγούσαν σε διμερή, αλλά και σε δευτεροταγείς δομές (δομές φουρκέτας κλπ).



Εικόνα 12. Απεικόνιση του υβριδισμού των αλληλουχιών DNA στο κλασικό σχεδιασμό. Ο σχεδιασμός για τον προσδιορισμό γονοτύπων με τη χρήση του NanoChir περιλαμβάνει το προϊόν στόχο, τους σταθεροποιητές και δύο ανιχνευτές. Ο ένας ανιχνευτής είναι συμπληρωματικός στη φυσιολογική αλληλουχία (WT) και είναι ιχνηθετημένος με φθορίζουσα ομάδα Cy5 ενώ ο δεύτερος είναι συμπληρωματικός στην υπό διερεύνηση αλλαγή (Mut) και είναι ιχνηθετημένος με φθορίζουσα ομάδα Cy3.

Σχεδιασμός για το γονίδιο *ATP7B* (νόσος Wilson)

Το πρωτόκολλο που σχεδιάστηκε για τη νόσο Wilson ήταν capture down. Η επιλογή έγινε σύμφωνα με το οργανόγραμμα που ακολουθεί (εικόνα 13).



Εικόνα 13. Όταν θέλουμε να αναλύσουμε περισσότερα από 5 SNP's τα οποία βρίσκονται σε περισσότερα από 5 PCR προϊόντα και το πρωτόκολλο θα χρησιμοποιηθεί σε περισσότερες από μια μελέτες, τότε το καταλληλότερο πρωτόκολλο είναι το capture down. Ο σχεδιασμός και η προτυποποίηση είναι πιο χρονοβόρος και δύσκολος όμως έχει σημαντικά οικονομικά οφέλη σε σχέση με το amplicon down.

Για τη νόσο Wilson σχεδιάστηκαν δεκατέσσερα (14) PCR προϊόντα τα οποία περιλαμβάνουν τις είκοσι (20) συχνότερες μεταλλάξεις που ανιχνεύονται στον Ελληνικό πληθυσμό. Οι μεταλλάξεις, τα εξόνια στα οποία βρίσκονται καθώς και οι συχνότητά τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Ο σχεδιασμός των εκκινητών παραθέτεται αναλυτικά στο παράρτημα Π1.

<u>Μετάλλαξη</u>	<u>Εξόνιο</u>	<u>Συχνότητα</u>	<u>Μετάλλαξη</u>	<u>Εξόνιο</u>	<u>Συχνότητα</u>
779insC	2	0.7%	R778G	8	0.7%
845delT	2	2%	2530delA	10	7%
Q289X	2	7%	L936X	12	7%
V456L	3	0.7%	R969Q	13	12%
1707+3insT	Intron 4	0.7%	G1061E	14	0.7%
1708-1G>A	Intron 5	2%	H1069Q	14	35%
1782delT	5	0.7%	G1099S	15	0.7%
2101delAT	7	0.7%	I1148T	16	3%
C703Y	7	0.7%	3904-2A>G	Intron 18	0.7%
2299insC	8	3%	X1466R	21	1%

Πίνακας 5. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *ATP7B* που συμπεριλήφθηκαν στο σχεδιασμό για ανίχνευση με τη χρήση του συστήματος NanoChip400.

Για τη συγκεκριμένη εφαρμογή σχεδιάστηκαν 15 σταθεροποιητές σημασμένοι με βιοτίνη είτε στο 3' ή 5' αναλόγως με την κατεύθυνση που θα επιτυγχανόταν η καλύτερη γραμμικότητα του μορίου DNA που θα προσδενόταν. Αναλυτικά ο σχεδιασμός των σταθεροποιητών καθώς και των ανιχνευτών για κάθε μετάλλαξη παρουσιάζονται στο παράρτημα 2 (Π2). Οι σταθεροποιητές σχεδιάστηκαν ακολουθώντας τις παρακάτω οδηγίες.

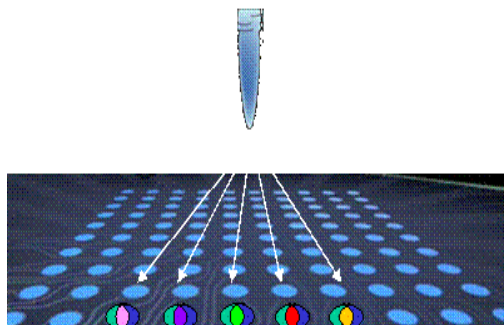
- ❖ Μήκος: 25 – 40 bp, ελάχιστο μήκος 25nt, ιδανικό 30nt, μέγιστο 50nt
- ❖ T_m : $\sim 60^\circ\text{C}$ ($55^\circ\text{C} - 70^\circ\text{C}$)
- ❖ GC-περιεχόμενο: 50%
- ❖ Αποφυγή συνεχόμενων G's (4 ή περισσότερα)
- ❖ Βιοτίνη: 3' ή 5'
- ❖ Συγκέντρωση: $\sim 25 - 100 \text{ nM}$
- ❖ Αποφυγή δευτεροταγών δομών
- ❖ Διμερή $> -9 \text{ kcal/m}$ και δομές φουρκέτας $> -3 \text{ kcal/m}$
- ❖ Καθαρισμός με HPLC

Οι ανιχνευτές σχεδιάστηκαν ακολουθώντας τις παρακάτω οδηγίες.

- ❖ $T_m < 45^\circ\text{C} - 38^\circ\text{C}$ to 42°C ideal
- ❖ $\sim 12 \text{ nt}$ μήκος (< 20)
- ❖ GC περιεχόμενο: 25 – 70 %
- ❖ Αποφυγή συνεχόμενων G's (4 ή περισσότερα)
- ❖ Αποφυγή «περίεργων» αλληλουχιών (ATATATA..., CCCCCGCGG..., TTTTTTTT....AAAAAGCTTTT)
- ❖ Έλεγχος της ειδικότητας για το SNP
- ❖ Ταιριαστά T_m για το φυσιολογικό και μεταλλαγμένο ακόμα και αν δεν έχουν το ίδιο μήκος (μεταξύ 2°C).
- ❖ Αποφυγή συνεχόμενων GC και AT
- ❖ Ενέργεια διμερών $> -9.0 \text{ kcal/m}$ και φουρκέτας $> -3.0 \text{ kcal/m}$

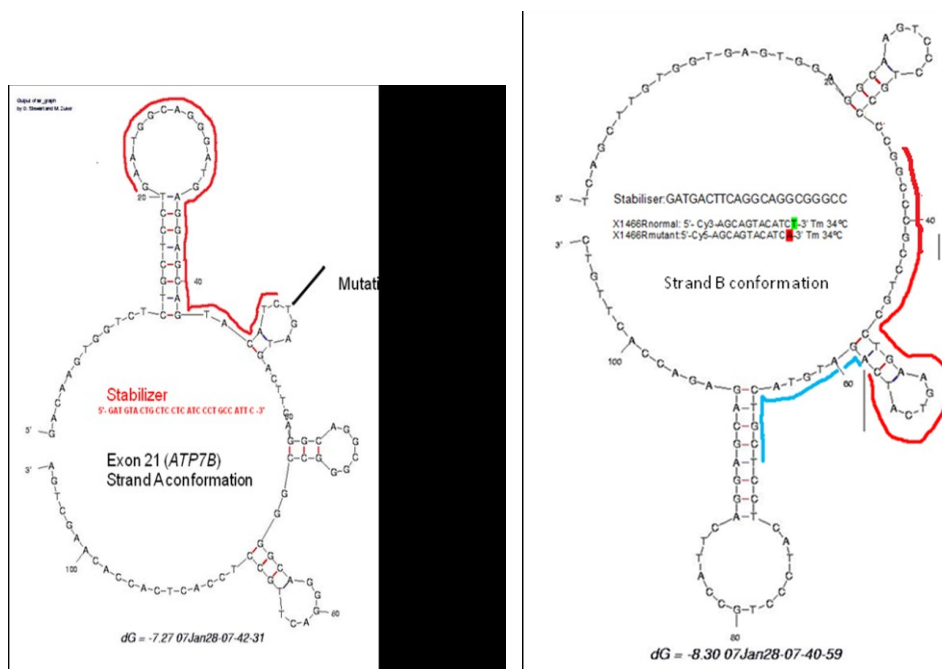
Με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, υπάρχει η δυνατότητα τοποθέτησης περισσότερων του ενός σταθεροποιητή ανά pad, επιτρέποντας ουσιαστικά την ανάλυση και των 20

επιλεγμένων μεταλλάξεων σε έξι pads. Με αυτό τον τρόπο με κάθε μικροσυστοιχία μπορούν να αναλυθούν 66 δείγματα. Στην εικόνα 14 παρουσιάζεται σχηματικά η εφαρμογή.



Εικόνα 14. Σε κάθε pad αντιστοιχούν περισσότεροι του ενός σταθεροποιητές επιτρέποντας την ανίχνευση πολλαπλών SNP ανά δείγμα με την ελάχιστη δυνατή κατανάλωση αναλωσίμων. (Advanced Panel Multiplexing)

Χρησιμοποιώντας το εξόνιο 21 (μετάλλαξη X1466R) ως παράδειγμα θα παρουσιαστεί ο τρόπος με τον οποίο επιλέγουμε την κατάλληλη αλυσίδα, το σταθεροποιητή και τους ανιχνευτές. Στην εικόνα 15 συγκρίνονται οι στερεοδομές των δύο αλυσίδων. Η αλυσίδα A έχει περισσότερες και πιο σταθερές δευτεροταγείς δομές σε σχέση με την αλυσίδα B, έτσι ο σχεδιασμός γίνεται για την αλυσίδα B.



Εικόνα 15. Σύγκριση των δύο αλυσίδων και επιλογή της αλυσίδας με τις λιγότερο σταθερές δευτεροταγείς δομές.

Κατά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου το πρώτο βήμα είναι η πρόσδεση των σταθεροποιητών στις προκαθορισμένες θέσεις στη μικροσυστοιχία. Οι σταθεροποιητές τοποθετούνται όπως φαίνεται στον πίνακα 4. Η τοποθέτηση τους γίνεται διαδοχικά με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (@ 350 nA) για 15-30 δευτερόλεπτα. Ο χρόνος που απαιτείται για την πρόσδεσή τους καθώς και η τελική τους συγκέντρωση ($\approx 25\text{-}10\text{nM}$) εξαρτώνται από τον αριθμό των pads και τον αριθμό των σταθεροποιητών ανά pad.

Ο αριθμός των pads που ενεργοποιείται με κάθε μείγμα σταθεροποιητών είναι ίσο με τον αριθμό των δειγμάτων (αγνώστων και γνωστών μαρτύρων) που θα αναλύσουμε.

Σταθεροποιητής για μετάλλαξη	Pad	Σταθεροποιητής για μετάλλαξη	Pad
H1069Q (G1061E)	Pad 1	Q289X (845delT)	Pad 4
R969Q		1707+3insC	
I1148T		779insC	
X1466R	Pad 2	1708-1G>A (1782delT)	Pad 5
3904-2A>G			
2101delAT (C703Y)	Pad 3	G1099S	Pad 6
R778G (2299insC)		V456L	
2530delA		L936X	

Πίνακας 6. Συνδυασμός των σταθεροποιητών στα αντίστοιχα pads της μικροσυστοιχίας

Το δεύτερο βήμα είναι ο υβριδισμός των προϊόντων PCR. Τα προϊόντα PCR αραιώνονται σε ειδικό διάλυμα 1:10 για την αραιώση των αλάτων προκειμένου να μην επηρεαστεί η μεταφορά τους στα pads (Cap-down Sample buffer A - 114 mM histidine, 142.5 mM alpha thio glycerol, Final Conc.: ~ 100 mM Histidine, ~ 125 mM ATG). Ο υβριδισμός επιτυγχάνεται με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (@ 995 nA) για 120 δευτερόλεπτα και η τελική τους συγκέντρωση είναι $\sim 25\text{-}40$ nM. Όλα τα προϊόντα μεταφέρονται ταυτόχρονα στα έξι pads τα οποία περιλαμβάνουν το πλήρες σετ των σταθεροποιητών. Ο διαχωρισμός τους επιτυγχάνεται με τον ειδικό υβριδισμό μεταξύ των προϊόντων και των προσδεμένων σταθεροποιητών.

Το τρίτο βήμα είναι η εισαγωγή των ανιχνευτών. Οι ανιχνευτές Cy3- (wild-type) και Cy5- (mutant) αναμιγνύονται σε τελική συγκέντρωση $0.5\mu\text{mol/L}$ (ισομοριακές συγκεντρώσεις για wild type / mutant) ο καθένας σε ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής αλατότητας (high-salt buffer

(50 mmol/L sodium phosphate, pH 7.4, και 500 mmol/L NaCl) και υβριδίζονται στη μικροσυστοιχία για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια η μικροσυστοιχία ξεπλένεται και σαρώνεται. Η σάρωση ξεκινάει περίπου 10°C χαμηλότερα από το T_m των ανιχνευτών. Ακολουθούν γύροι ξεπλύματος και σάρωσης με διαρκώς αυξανόμενη θερμοκρασία μέχρι να επιτευχθούν ίσα σήματα από τους δύο ανιχνευτές. Αυτό ελέγχεται βάσει των σημάτων που λαμβάνουμε από το γνωστό ετερόζυγο δείγμα που περικλείεται κάθε φορά στην ανάλυση. Όταν θέλουμε να αυξήσουμε τους λόγους, ώστε η ανίχνευση να γίνει πιο ειδική, ξεπλένουμε ανάμεσα στις σαρώσεις με ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας (low-salt buffer - 50 mmol/L sodium phosphate, pH 7.0). Όταν έχουμε χαμηλό σήμα, τότε ο υβριδισμός γίνεται σε όσο το δυνατό χαμηλότερη θερμοκρασία και για όσο το δυνατόν περισσότερη ώρα. Τα ξεπλύματα σε αυτή τη περίπτωση γίνονται με ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής αλατότητας. Όταν πάρουμε τις τελικές εικόνες για τον πολυμορφισμό, εφαρμόζεται θερμότητα (+10°C του T_m των ανιχνευτών) προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα αντιδραστήρια από τη μικροσυστοιχία και να προχωρήσουμε στην εισαγωγή του επόμενου ζεύγους. Είναι πολύ σημαντικό να είναι αυστηρά ελεγχόμενη η θερμοκρασία που θα εφαρμοστεί ώστε τα PCR προϊόντα να παραμείνουν σε υβριδισμό με τους σταθεροποιητές. Στην εικόνα 16 παραθέτονται σχηματικά τα βήματα του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε.



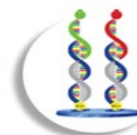
Στάδιο 1: Οι βιοτινυλωμένοι σταθεροποιητές προσδένονται στην μικροσυστοιχία



Στάδιο 2: Τα προϊόντα PCR υβριδίζονται στους αντίστοιχους σταθεροποιητές



Στάδιο 3: Ένα μείγμα ανιχνευτών προστίθεται και υβριδίζεται το αντίστοιχο PCR προϊόν



Οι ανιχνευτές είναι σημασμένοι με cy3 (φυσιολογική αλληλουχία - πράσινο) και Cy5 (μετάλλαξη - κόκκινο)



Στάδιο 4: Έπειτα από εφαρμογή θερμότητας για την απομάκρυνση των ανιχνευτών ακολουθεί δεύτερος γύρος ανίχνευσης για άλλα SNPs



Τελευταίο Στάδιο: Όταν τελειώσουν όλοι οι γύροι ανίχνευσης εφαρμόζεται αντίστροφο ηλεκτρικό πεδίο προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα προϊόντα από τη μικροσυστοιχία ώστε να είναι κενή για επόμενη χρήση

Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση των βημάτων σε ένα πρωτόκολλο capture down.

Γονοτύπιση στη πλατφόρμα LumineX xMAP™ – Σχεδιασμός για τα γονίδια *CFTR* (κυστική ίνωση) και *ATP7B* (νόσος Wilson)

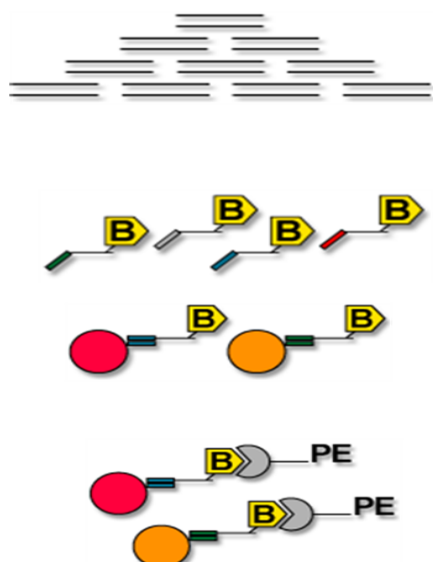
Η πλατφόρμα LumineX xMAP™ (εικόνα 17) βασίζεται στην κλασική μέθοδο κυτταρομετρίας ροής. Η βασική αρχή λειτουργίας είναι η αλληλομορφο-ειδική σήμανση προϊόντων PCR και ο μετέπειτα διαχωρισμός τους βάσει της αλληλουχίας τους. Η μοναδικότητα της μεθόδου έγκειται στη χρήση των 100 μοναδικών 24μερών universal αλληλουχιών DNA. Αυτές οι αλληλουχίες είναι συνθετικές και εξ' ορισμού δεν υπάρχουν στη φύση. Οι αλληλουχίες αυτές ενσωματώνονται στα PCR προϊόντα, αποτελώντας επέκταση της ειδικής αλληλουχίας του εκκινήτη στο 5' άκρο, και στην ουσία επιτρέπουν την μετέπειτα πρόσδεση άλλων αντιδραστηρίων τα οποία φέρουν τις συμπληρωματικές αλληλουχίες.



Εικόνα 17. Η πλατφόρμα LumineX xMAP 100

Ο σχεδιασμός για το γονίδιο CFTR βασίστηκε στο προϋπάρχων πρωτόκολλο της Tm 100 Universal Array της Tm-Bioscience™ (Tag-It™ CFTR 40+4 Mutation Detection Kit). Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο έχει πάρει έγκριση για διαγνωστική χρήση για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο CFTR.

Ο σκοπός ήταν η ενσωμάτωση «Εθνικών μεταλλάξεων» στο kit που ήταν ήδη στην αγορά, έτσι ώστε να ανιχνεύει 85-90% των μεταλλαγών (συνολικά μέχρι 100 μεταλλάξεις) που έχουν χαρακτηριστεί στους πληθυσμούς της Μεσογείου και των Βαλκανίων. Στην εικόνα 18 παρουσιάζεται σχηματικά η αρχή λειτουργίας της μεθόδου.



Στάδιο 1: Πολλαπλή PCR για τον πολλαπλασιασμό των περιοχών – στόχων

Στάδιο 2: Επεξεργασία των PCR προϊόντων Exo-Sap για την απομάκρυνση περίσσειας εκκινητών και νουκλεοτιδίων

Στάδιο 3: Τα PCR προϊόντα υπόκεινται σε αλληλομορφο-ειδική επέκταση. Το 5' άκρο των εκκινητών φέρει την xTAG αλληλουχία

Στάδιο 4: Οι 5' universal tag αλληλουχίες υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους απε-tag αλληλουχίες οι οποίες είναι προσδεμένες σε συγκεκριμένα xMAP σφαίριδια

Στάδιο 5: Η ανίχνευση επιτυγχάνεται με πρόσδεση στρεπταβιδίνης-φυτοκοερυθρίνης και καταγραφεί από τα laser του συστήματος

Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου

Το kit που κυκλοφορεί στην αγορά (Tag-It™ CFTR 40+4 Mutation Detection Kit) περιλαμβάνει τις μεταλλάξεις του πίνακα 7. Το kit στη παρούσα του μορφή καλύπτει το 73% των μεταλλάξεων στον Ελληνικό πληθυσμό.

F508del (ex.10)	A455E (ex.9)	3849+10Kb C>T (int19)	2183AA>G (ex.13)
I507del (ex.10)	1717-1G>A (int.12)	W1282X (ex.20)	2307insA (e.13)
G542X (ex.11)	R560T (ex.12)	N1303K (ex.21)	Y1092X (ex.17b)
G85E (ex.3)	R553X (ex.12)	394delTT (ex.3)	M1101K (ex.17b)
R117C (ex.4)	G551D (ex.12)	Y122X (ex.4)	S1255X (ex.19)
I148T (ex.4)	1898+1G>A (int.12)	R347H (ex.7)	3876delA (ex. 20)
621+1G>T (int.4)	2184delA (ex.13)	V520F (ex.10)	3905insT (ex.20)
711+1G>T (int.5)	2789+5G>A(int.14b)	A559T (ex.11)	5T/7T/9T (int.9)
1078delT (ex.7)	3120+1G>A (int.16)	S549N (ex.11)	F508C (ex.10)
R334W (ex.7)	R1162X (ex.19)	S549R (T>G) (ex.11)	I507V (ex.10)
R347P (ex.7)	3659delC (ex.19)	1898+5G>T (int.12)	I506V (ex.10)

Πίνακας 7. Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύονται με το Tag-It™ CFTR 40+4 Mutation Detection Kit. Οι μεταλλάξεις με έντονη γραφή και οι πολυμορφισμοί με πλάγια γραφή είναι οι 25 μεταλλάξεις και 4 πολυμορφισμοί που συστήνει το Αμερικάνικο κολλέγιο μαιευτήρων και γυναικολόγων για έλεγχο.

Προκειμένου η ανιχνευτική δύναμή του να ανέβει στο επιθυμητό 85-90% σχεδιάστηκαν καινούργιοι εκκινητές, οι οποίοι θα χρησιμοποιούνταν σε συνδυασμό με του υπάρχοντες και θα έδιναν τη δυνατότητα ανίχνευσης επιπρόσθετων μεταλλάξεων (πίνακας 8). Στον πίνακα με έντονη γραφή είναι οι μεταλλάξεις για τις οποίες έπρεπε να σχεδιαστούν καινούργιοι εκκινητές. Οι υπόλοιπες καλύπτονταν από τους υπάρχοντες εκκινητές.

Del of exons 2-3	3199del6 (ex.17a)	3849+4A>G (ex. 19)	E60X (ex.3)
3272-26A>G (ex.17b)	2055del9>A (ex.13)	444delA (ex.4)	G576A (ex.12)
E822X (ex.13)	2184insA (ex.13)	574delA (ex.4)	L346P (ex.7)
M952I (ex.15)	1677delTA (ex.10)	711+3A>G (int. 5)	M348K (ex.7)
W401X (ex.8)	R352Q (ex.7)	F311del (ex.7)	R117C (ex.4)
S945L (ex.15)	S1196X (ex.19)	D565G (ex.12)	R1158X (ex. 19)
Y247X (ex.6a)		S1251N (ex.20)	

Πίνακας 8. Οι επιπλέον 50 μεταλλάξεις του γονιδίου *CFTR* για τις οποίες έγινε ο σχεδιασμός.

1) Πολλαπλή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Multiplex PCR)

Το πρώτο βήμα της μεθόδου αποτελεί μια πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (multiplex PCR). Εφόσον ο σχεδιασμός έγινε βάσει του αντιδραστηρίου Tag-It™ *CFTR* 40+4 Mutation Detection, έπρεπε να σχεδιαστούν εκκινητές για τις περιοχές του γονιδίου που δεν καλύπτονταν από τους ήδη υπάρχοντες. Βάσει των δεδομένων που είχαμε, σχεδιάστηκαν συνολικά 11 ζεύγη εκκινητών (Παράρτημα Π3). Οι εκκινητές για το εξόνιο 13 σχεδιάστηκαν για την ανίχνευση της μετάλλαξης E822X. Οι εκκινητές για το εξόνιο 8 για την μετάλλαξη W401X, για το εξόνιο 6a για την μετάλλαξη Y247X, για το εξόνιο 17b για τις μεταλλάξεις 3272-26A>G και F1052V, για το εξόνιο 10 για τις μεταλλάξεις S466X και 1525-1G>A, για το εξόνιο 17a για τις μεταλλάξεις 3199del6 3152delT και τέλος για το εξόνιο 15 σχεδιάστηκαν για τις μεταλλάξεις M952I, Q890X και S945L. Επιπλέον έγινε σχεδιασμός για δύο μεγάλα ελλείμματα. Το έλλειμμα **3120+1Kbdel (8.6Kb)**, το οποίο αφορά έλλειμμα από το

ιντρόνιο 16 μέχρι το ιντρόνιο 18 (περιλαμβάνει δηλαδή τα εξόνια 16, 17a, 17b & 18) και το έλλειμμα **CFTRdele2,3** (21Kb) το οποίο αφορά 25% του ιντρονίου 1, όλο το εξόνιο και ιντρόνιο 2, το εξόνιο 3 και 45% του ιντρονίου 3. Ο σχεδιασμός για τα δύο μεγάλα ελλείμματα του γονιδίου *CFTR* παρατίθεται αναλυτικά στο παράρτημα 4 (Π4).

Σχεδιάστηκε μια πολλαπλή PCR αντίδραση, προκειμένου να πολλαπλασιαστούν ταυτόχρονα και τα 11 προϊόντα (πίνακας 9 και 10). Παράλληλα πραγματοποιείται και η πολλαπλή PCR του kit Tag-It™ CFTR 40+4 Mutation Detection προκειμένου να πολλαπλασιαστούν τα εξόνια – στόχοι που φέρουν τις υπόλοιπες μεταλλάξεις (η αντίδραση πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή).

Αντιδραστήριο	Προμηθευτής	Τελική Συγκέντρωση στα 25 μ L PCR
DNase-free H ₂ O	Invitrogen	///
10X PCR Buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl)	Invitrogen	1.5x
50 mM MgCl ₂	Invitrogen	2 mM
dNTPs (dA,dC,dG, dT)	Roche	200 μ M
PCR primers	IDT	~7.5 pmol ο καθένας
Platinum Taq DNA polymerase	Invitrogen	4Units για 11-plex

Πίνακας 9. Αντίδραση της πολλαπλής PCR.

1 κύκλος:	95 °C - 5min
35 κύκλοι:	95 °C - 45 sec
	56 °C - 45 sec
	74 °C - 45 sec
1 κύκλος:	72 °C - 8 min
	4 °C – Παύση

Πίνακας 10. Συνθήκες πολλαπλής PCR

Μετά την πολλαπλή PCR τα προϊόντα επεξεργάζονται με αλκαλική φωσφατάση (ένζυμο που υδρολύει τους φωσφοεστερικούς δεσμούς) για την αποφωσφορυλίωση των ελεύθερων νουκλεοτιδίων που βρίσκονται σε περίσσεια και εξωνουκλεάση για την καταστροφή των υπολειμμάτων των εκκινητών (πίνακας 11). Η επεξεργασία με αλκαλική φωσφατάση είναι ιδιαίτερα σημαντική για την καταστροφή των dCTP νουκλεοτιδίων, αφού στο επόμενο βήμα θα χρησιμοποιηθούν dCTP νουκλεοτίδια σημασμένα με βιοτίνη.

<u>Καθαρισμός 7.5 μL PCR αντίδρασης με ExoSAP-IT</u>	<u>Σε θερμικό κυκλοποιητή:</u>
PCR reaction 7.5 μL	Επώαση για 30min στους 37°C
ExoSAP-IT 3.0 μL	Απενεργοποίηση θέρμανση 15 min στους 80°C

Πίνακας 11. Συνθήκες αντίδρασης ExoSAP-IT

2) Επέκταση εκκινητών συμπληρωματικών ως προς τα προς ανίχνευση αλληλία (ASPE: Allele Specific Primer Extension)

Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιούνται τα προϊόντα της πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (μετά τον καθαρισμό) και εκκινητές οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί στο 3' άκρο τους ως προς τα αλληλία που θέλουμε να ανιχνεύσουμε (ένας ASPE εκκινητής για την φυσιολογική αλληλουχία και ένας ASPE εκκινητής για την μετάλλαξη). Οι αλληλουχίες των ASPE εκκινητών παρουσιάζονται στο παράρτημα 5 (Π5). Στο παράρτημα 5 παρουσιάζονται δύο διαφορετικοί ASPE εκκινητές για κάθε θέση. Ο σχεδιασμός έγινε στην forward και στη reverse κατεύθυνση προκειμένου να χρησιμοποιηθεί τελικά ο πιο αποδοτικός συνδυασμός.

Οι ASPE εκκινητές στο 5' άκρο τους φέρουν μια μη ειδική αλληλουχία-ετικέτα (universal tag). Αυτές οι ετικέτες επιτρέπουν τη σήμανση των προϊόντων και αποτελούν την καινοτομία της μεθόδου. Μόνο οι απολύτως συμπληρωματικοί εκκινητές ως προς την αλληλουχία θα συμμετάσχουν στον υβριδισμό και θα δώσουν προϊόντα με ετικέτα. Στο επόμενο βήμα με τη χρήση συμπληρωματικών προς τις ετικέτες αλληλουχίες θα μπορέσουμε να διαχωρίσουμε τα αλληλία ανάλογα με τη βάση που φέρουν στη θέση της σημειακής μετάλλαξης την οποία εξετάζουμε.

Πρέπει να σχεδιαστεί ένας εκκινητής ASPE για κάθε αλληλουχία που θέλουμε να ανιχνεύσουμε. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο, για το γονίδιο CFTR θα ανιχνευτούν 50 μεταλλάξεις γι' αυτό έγινε σχεδιασμός 100 ASPE εκκινητών. Για κάθε μετάλλαξη ο εκκινητής που αντιστοιχεί στη φυσιολογική και μεταλλαγμένη αλληλουχία θα πρέπει να είναι σχεδιασμένος στην ίδια αλυσίδα DNA. Το Tm των εκκινητών θα πρέπει να είναι μεταξύ 51 και 56°C. Στο 3' το τελικό νουκλεοτίδιο θα πρέπει να αντιστοιχεί στη βάση που θέλουμε να

ανιχνεύσουμε. Με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού, σε κάθε ASPE εκκινητή αντιστοιχίζεται μια universal tag αλληλουχία, η οποία ενσωματώνεται στο 5' άκρο.

Η ASPE αντίδραση είναι μια τυπική πολλαπλή PCR αντίδραση με δύο βασικές διαφοροποιήσεις. Η πρώτη είναι παραλλαγή είναι ότι χρησιμοποιούμε σημασμένα με βιοτίνη CTP νουκλεοτίδια, τα οποία είναι απαραίτητα σε επόμενο στάδιο. Το δεύτερο είναι η χρήση ειδικής γενετικά τροποποιημένης πολυμεράσης (Platinum GenoTYPE Tsp DNA polymerase), η οποία δεν έχει exonuclease δραστηριότητα ούτε στο 3', ούτε στο 5' άκρο. Αυτές οι ιδιότητες είναι μοναδικές και επιτρέπουν την επέκταση μόνο των απολύτως συμπληρωματικών αλληλουχιών.

Αντιδραστήριο	Προμηθευτής	Τελική συγκέντρωση ή ποσότητα σε 16μl ASPE
DNase-free water		///
10X PCR Buffer	Invitrogen	1X
50 mM MgCl ₂	Invitrogen	1.25 mM
dATP, dGTP, dTTP	Roche	5 μM each
biotin-14-dCTP	Invitrogen	5 μM
ASPE primers		0.2pmol/μl per primer
Platinum GenoTYPE Tsp DNA polymerase	Invitrogen	2.5 Units
Καθαρισμένο PCR προϊόν		5μl PCR (40+4) product + 2μl 11-plex

Πίνακας 12. Αντίδραση της πολλαπλής ASPE

1 κύκλος:	96 °C - 2min
40 κύκλοι:	95 °C - 30 sec
Ramp rate 1.5°C/sec	56 °C - 50 sec
	74 °C – 1 min 30 sec
	4 °C – Παύση

Πίνακας 13. Συνθήκες της πολλαπλής ASPE

Για το γονίδιο *ATP7B* σχεδιάστηκε ένα πρωτόκολλο που περιλαμβάνει τις 26 συχνότερες μεταλλάξεις που ανιχνεύονται στον Ελληνικό πληθυσμό. Ο σχεδιασμός των εκκινητών για την πολλαπλή PCR και των ASPE εκκινητών για την ανίχνευση των μεταλλάξεων παρουσιάζεται στα παραρτήματα Π6 και Π7 αντίστοιχα. Για το γονίδιο *ATP7B* ήταν αδύνατο να σχεδιαστεί μια μόνο πολλαπλή PCR αντίδραση η οποία θα περιελάμβανε όλα τα επιθυμητά προϊόντα χωρίς την δημιουργία ανεπιθύμητων παραπροϊόντων. Γι' αυτό το λόγο σχεδιάστηκαν τρεις πολλαπλές αντιδράσεις PCR. Η πολλαπλή αντίδραση **A** για τον πολλαπλασιασμό των εξονίων **2, 4, 7, 10, 14 και 21**, η πολλαπλή αντίδραση **B** για τον

πολλαπλασιασμό των εξονίων **3, 8, 12, 15 και 18** και τέλος η πολλαπλή αντίδραση **C** για τον πολλαπλασιασμό των εξονίων **5, 13 και 16**. Οι συνθήκες για τις τρεις πολλαπλές PCR αντιδράσεις ήταν κοινές και περιγράφονται στους πίνακες 14 και 15.

Αντιδραστήριο	Προμηθευτής	Τελική Συγκέντρωση στα 25 μ L PCR
DNase-free H ₂ O	Invitrogen	///
10X PCR Buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl)	Invitrogen	1.5x
50 mM MgCl ₂	Invitrogen	2 mM
dNTPs (dA,dC,dG, dT)	Roche	200 μ M
PCR primers	IDT	5 pmol ο καθένας
Platinum Taq DNA polymerase	Invitrogen	1Unit

Πίνακας 14. Αντίδραση της πολλαπλής PCR.

1 κύκλος:	95 °C - 5min
35 κύκλοι:	95 °C - 30 sec
Ρυθμός αλλαγής της θερμοκρασίας 1.5°C/sec	58 °C - 45 sec
	74 °C - 30 sec
1 κύκλος:	72 °C - 5 min
	4 °C – Παύση

Πίνακας 15. Συνθήκες πολλαπλής PCR

Ακολουθώς τα προϊόντα καθαρίζονται με Exo-Sap και πραγματοποιούνται τρεις ξεχωριστές ASPE αντιδράσεις με τους αντίστοιχους ASPE εκκινητές.

Αντιδραστήριο	Προμηθευτής	Τελική συγκέντρωση ή ποσότητα σε 16 μ l ASPE
DNase-free water		///
10X PCR Buffer	Invitrogen	1X
50 mM MgCl ₂	Invitrogen	1.25 mM
dATP, dGTP, dTTP	Roche	5 μ M each
biotin-14-dCTP	Invitrogen	5 μ M
ASPE primers		0.25 pmol/ μ l per primer
Platinum GenoTYPE Tsp DNA polymerase	Invitrogen	2.5 Units
Καθαρισμένο PCR προϊόν		5 μ l PCR product

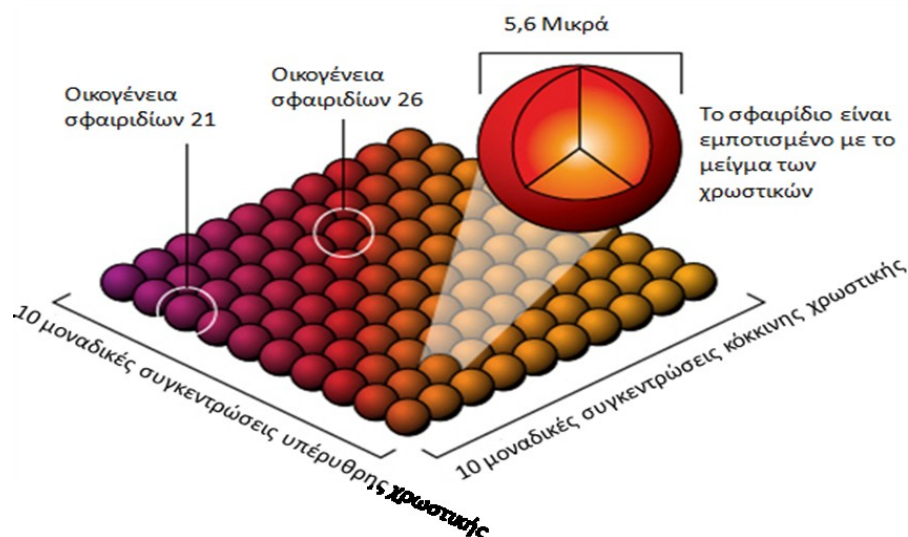
Πίνακας 16. Αντίδραση της πολλαπλής ASPE

1 κύκλος:	96 °C - 2min
40 κύκλοι:	94 °C - 30 sec
Ramp rate 1.5°C/sec	54 °C – 1 min
	74 °C – 2 min
	4 °C – Παύση

Πίνακας 17. Συνθήκες της πολλαπλής ASPE

3) Υβριδισμός με Μικροσφαιρίδια (Bead Hybridisation)

Το σύστημα χρησιμοποιεί μικροσφαιρίδια πολυστυρενίου τα οποία περιέχουν δύο φθορίζουσες χρωστικές διαφορετικού φάσματος. Η χρήση αυτών των δύο χρωστικών σε διαφορετικά ποσοστά επιτρέπει τη δημιουργία 100 διαφορετικών μικροσφαιριδίων που το καθένα ανιχνεύεται σε μοναδικό φάσμα.



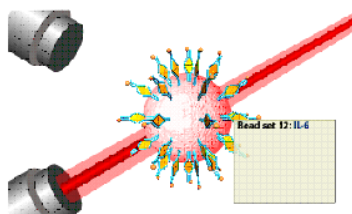
Εικόνα 19. Οι 100 μοναδικές οικογένειες μικροσφαιριδίων για το σύστημα Lumines 100.

Τα μικροσφαιρίδια φέρουν στην επιφάνεια τους συμπληρωματικές αλληλουχίες ως προς τις αλληλουχίες-ετικέτες που βρίσκονται στους εκκινητές (anti-tags) επιτρέποντας τον υβριδισμό τους και εν συνεχεία την ανίχνευσή τους. Αφού επιτευχθεί ο υβριδισμός στα μικροσφαιρίδια, για την ποσοτικοποίηση του υβριδισμού των μικροσφαιριδίων και των προϊόντων του ASPE προστίθεται στην αντίδραση στρεπταβιδίνη και φυκοερυθρίνη.

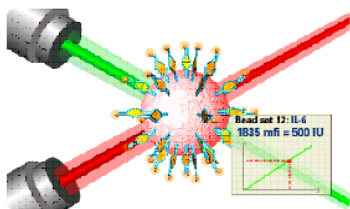
4) Λήψη Δεδομένων - Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Το κάθε σύμπλεγμα (complex) μικροσφαιριδίου-αλληλίου εξετάζεται ατομικά και ανιχνεύεται, καθώς περνάει μέσα σε ένα ταχέως κινούμενο υγρό ρεύμα από δύο διαφορετικά laser, στον αναλυτή Lumines100. Ο ανιχνευτής Lumines συνδυάζει δύο laser, σύστημα ροής και ψηφιακή επεξεργασία σήματος σε αληθινό χρόνο. Αυτά τα στοιχεία, επιτρέπουν τον διαχωρισμό 100 διαφορετικών οικογενειών μικροσφαιριδίων, η καθεμία από τις οποίες

αντιστοιχεί σε διαφορετική θέση μετάλλαξης. Ο ανιχνευτής ανιχνεύει κάθε ξεχωριστή οικογένεια μικροσφαιριδίων με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Κάθε σύμπλοκο σφαιριδίων ASPE προϊόντος εξετάζεται μόνο του για το χρώμα του σφαιριδίου (αναλυόμενη ουσία) και την ένταση του σήματος (στρεπταβιδίνη-φυκοερυθρίνη). Το σύστημα χρησιμοποιεί δύο lasers, ένα που εκπέμπει στα 532 nm (πράσινο) και χρησιμοποιείται για την διέγερση της φυκοερυθρίνης (laser «ποσοτικοποίησης») και το δεύτερο εκπέμπει στα 635 nm και χρησιμοποιείται για την διέγερση των χρωστικών μέσα στο σφαιρίδιο προκειμένου να καθορίσει την οικογένεια στην οποία ανήκει και κατ' επέκταση την αναλυόμενη ουσία (laser «ταξινόμησης»).



Το κόκκινο laser διεγείρει τις χρωστικές του μικροσφαιριδίου αναγνωρίζοντας τον συγκεκριμένο πληθυσμό



Το πράσινο laser διεγείρει τη χρωστική που σχετίζεται με το προς ανάλυση υλικό επιτρέποντας τη ποσοτικοποίηση της αντίδρασης

Εικόνα 20. Τρόπος λειτουργίας των laser του συστήματος Luminex100.

Ο αναλυτής έχει τη δυνατότητα να επεξεργάζεται ψηφιακά τα διαφορετικά σήματα και έτσι να κατατάσσει τα μικροσφαιρίδια ανάλογα με το φάσμα στο οποίο ανιχνεύονται και να ποσοτικοποιεί την αντίδραση σε μερικά δευτερόλεπτα ανά δείγμα. Από τη στιγμή που κάθε μικροσφαιρίδιο υβριδίζεται αποκλειστικά με ένα μόνο αλληλίο, επιτυγχάνουμε την πολύ γρήγορη ανίχνευση μεταλλαγμένων και φυσιολογικών αλληλίων σε κάθε δείγμα.

Υψηλής Ευκρίνειας Ανάλυση Αποδιάταξης (High Resolution Melting Analysis - HRMA)

Ο σχεδιασμός μεθόδου για υψηλής ευκρίνειας ανάλυση αποδιάταξης έγινε τόσο για τη κυστική ίνωση όσο και για τη νόσο Wilson. Το σύστημα που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής είναι το LightScanner® της Idaho Technologies.

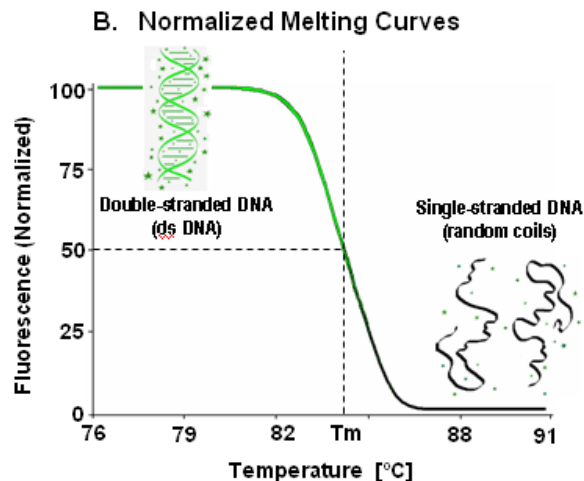
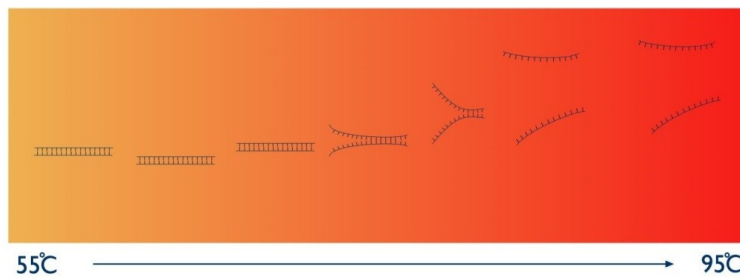


Εικόνα 21. Το σύστημα LightScanner®

Η μέθοδος βασίζεται στην βασική ιδιότητα του DNA να αποδιατάσσεται με θέρμανση, η οποία μπορεί να παρατηρηθεί με τη χρήση φθορίζουσας χρωστικής η οποία ενσωματώνονται στη διπλή έλικα και απελευθερώνονται όταν αυτή ανοίγει. Τυπικά αυτή η ανάλυση πραγματοποιούνται μετά την PCR αντίδραση (post-PCR) σε PCR μηχανήματα πραγματικού χρόνου προκειμένου να διερευνηθεί η καθαρότητα του προϊόντος και οι αλλαγές της αλληλουχίας (με τη χρήση ανιχνευτών υβριδισμού). Οι αλληλουχίες μπορούν να διαχωριστούν βάσει της σύστασής τους, του μήκους τους, του GC περιεχομένου ή της συμπληρωματικότητάς τους. Η HRMA διαφέρει από την τυπική ανάλυση αποδιάταξης σε τρία σημεία:

1. Χημεία – Χρήση πιο φωτεινών χρωστικών σε υψηλότερες συγκεντρώσεις.
2. Μηχανήματα – απαιτεί τη χρήση μηχανημάτων που συλλέγουν δεδομένα φθορισμού υψηλής ευκρίνειας σε μικρές διαφορές θερμοκρασίας.
3. Πρόγραμμα ανάλυσης (software) – απαιτεί τη χρήση εξειδικευμένων προγραμμάτων ανάλυσης των δεδομένων με νέους αλγόριθμους.

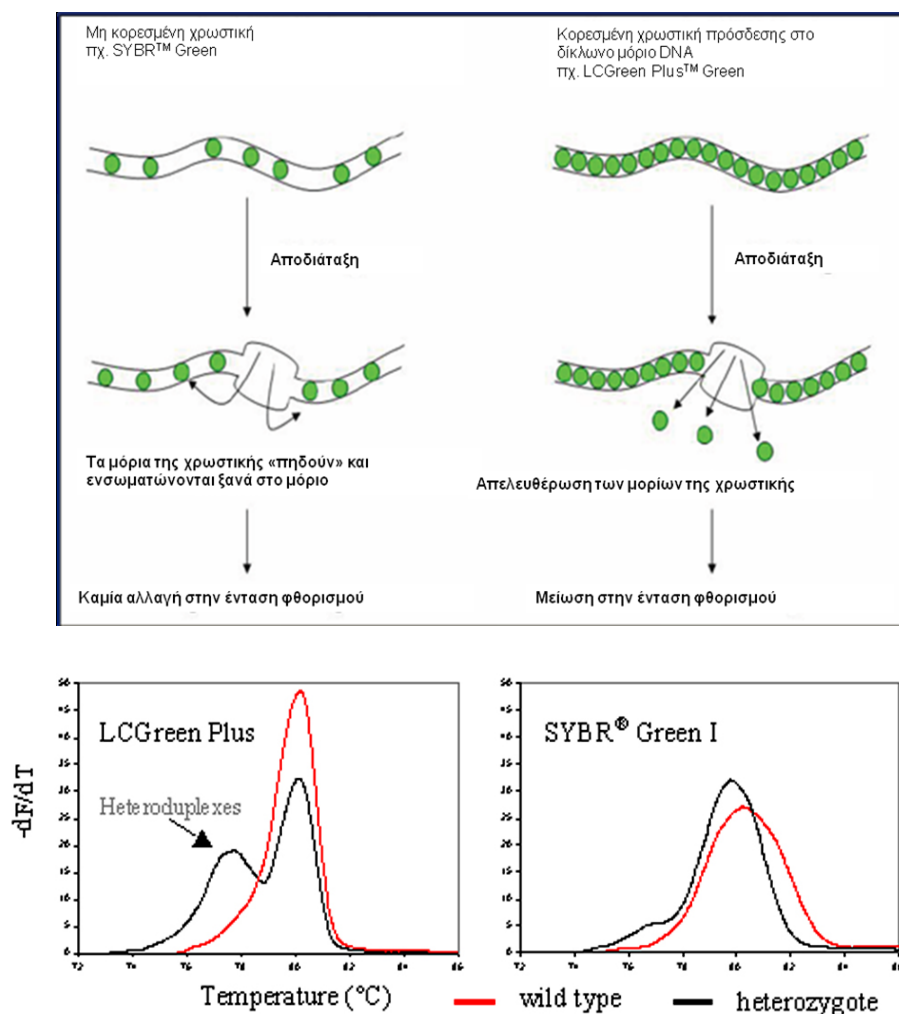
Η ανάλυση ξεκινά με τον πολλαπλασιασμό με PCR παρουσία μιας χρωστικής που προσδένεται στη διπλή έλικα του DNA. Η χρωστική έχει υψηλό φθορισμό όταν είναι προσδεμένη και χαμηλό όταν είναι ελεύθερη.



Εικόνα 22. Με την θέρμανση η διπλή έλικα του DNA ανοίγει οδηγώντας σε μονόκλωνα μόρια. Η ένταση του φθορισμού που ανιχνεύεται λόγω της φθορίζουσας χρωστικής, η οποία είναι ενσωματωμένη στο δίκλωνο μόριο, μειώνεται όσο αυξάνει η θερμοκρασία.

Ακολουθεί υψηλής ευκρίνειας ανάλυση αποδιάταξης με τη χρήση μηχανήματος ικανού να καταγράφει μεγάλο αριθμό δεδομένων φθορισμού σε κάθε θερμοκρασία με μεγάλη ακρίβεια. Η ανάλυση ξεκινάει από τη θερμοκρασία που ορίζει ο χρήστης (συνήθως 60°C) και φτάνει μέχρι τους 98°C. Σε αυτή τη θερμοκρασία τα περισσότερα δίκλωνα μόρια DNA έχουν αποδιαταχθεί πλήρως. Η μοναδικότητα της μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι επιτρέπει τον ομογενή έλεγχο μεταλλάξεων σε ένα τυπικό πιάτο 96-θέσεων με τη χρήση φθορίζουσας κορεσμένης dsDNA χρωστικής (LCGreen) και χωρίς να απαιτείται περεταίρω επεξεργασία. Επιπλέον τα δείγματα που απαιτούν περεταίρω ανάλυση (πχ. sequencing) μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας χωρίς να χρειάζεται καινούργια PCR αντίδραση. Ο σωστός διαχωρισμός των προϊόντων σε αυτά που φέρουν κάποια αλλαγή στην αλληλουχία τους και σε αυτά που έχουν την φυσιολογική αλληλουχία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την χρωστική που χρησιμοποιείται. Η χρήση μιας μη κορεσμένης χρωστικής, σαν την SYBRTM Green, η

οποία δεν καταλαμβάνει όλες τις δυνατές θέσεις στο δίκλωνο μόριο έχει σαν αποτέλεσμα, κατά την αποδιάταξη την εκ νέου ενσωμάτωση των μορίων που απελευθερώνονται στο δίκλωνο DNA και κατ' επέκταση την μικρή αλλαγή στην ένταση του φθορισμού. Η χρήση μιας κορεσμένης χρωστικής, δηλαδή μιας χρωστικής που καταλαμβάνει όλες τις δυνατές θέσεις έχει σαν αποτέλεσμα, κατά την αποδιάταξη, την απότομη πτώση του φθορισμού (εικόνα 23). Η απότομη και μεγάλη αλλαγή στην ένταση του φθορισμού, οδηγεί σε καλύτερα προφίλ διαχωρισμού των προϊόντων PCR μεταξύ άγριου τύπου (wild type) και ετεροζυγωτών (heterozygote).



Εικόνα 23. Σύγκριση μιας μη-κορεσμένης χρωστικής και μιας κορεσμένης σε επίπεδο αλλαγής έντασης φθορισμού καθώς και στην ικανότητα διαχωρισμού προϊόντων άγριου τύπου και αυτών που φέρουν παραλλαγές στην υπό ανάλυση αλληλουχία.

Για το γονίδιο *CFTR* δεν σχεδιάστηκαν καινούργιοι εκκινητές αλλά χρησιμοποιήθηκαν η ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες στην εργασία των Montgomery *et. al.* 2007 και των Zhou *et. al.* 2004 (55, 56) οι οποίες παρουσιάζονται στο παράρτημα 8 (Π8). Στην παρούσα διατριβή ο σκοπός ήταν η εφαρμογή και η αξιολόγηση της μεθόδου για κλινική διαγνωστική χρήση καθώς και η επέκταση των ήδη υπάρχοντων εφαρμογών. Για το γονίδιο *ATP7B* σχεδιάστηκαν καινούργιοι εκκινητές και οι αλληλουχίες τους παρατίθενται στο παράρτημα 9 (Π9). Ο σκοπός και σε αυτή την περίπτωση ήταν η αξιολόγηση και εφαρμογή της μεθόδου για κλινική διαγνωστική χρήση.

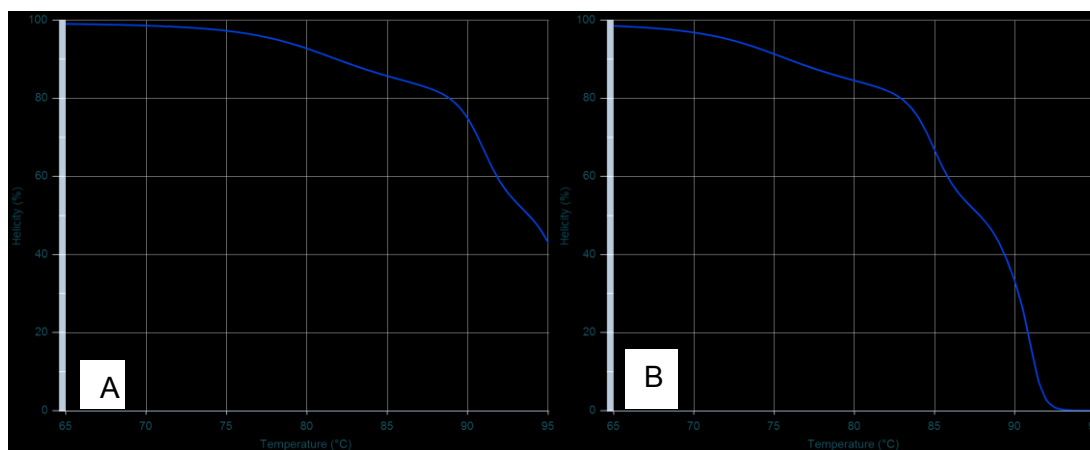
Για την επιτυχή εφαρμογή της μεθόδου HRMA πολύ σημαντικό ρόλο παίζει ο σχεδιασμός των εκκινητών και η ποιότητα του DNA που αναλύεται. Συγκεκριμένα οι εκκινητές θα πρέπει, ιδανικά, να πολλαπλασιάζουν ένα τμήμα DNA μεταξύ 100-300 βάσεων. Κατά τον σχεδιασμό πρέπει να επιβεβαιώσουμε πως οι εκκινητές δεν περιλαμβάνουν κάποιο γνωστό πολυμορφισμό (SNP), γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχία πολλαπλασιασμού. Η ειδικότητα είναι πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό, όπως και σε κάθε μοριακή δοκιμασία, προκειμένου να αποφευχθούν τα μη ειδικά προϊόντα και η λανθασμένη διάγνωση. Η PCR αντίδραση, δηλαδή η συγκέντρωση των εκκινητών, η προσθήκη βελτιωτικών (όπως $MgCl_2$, DMSO) η θερμοκρασία και οι κύκλοι, θα πρέπει να βελτιστοποιηθούν στο μέγιστο δυνατό βαθμό για τον πολλαπλασιασμό μόνο του ειδικού προϊόντος και μάλιστα σε υψηλή συγκέντρωση.

Άλλη σημαντική παράμετρος που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι η συγκέντρωση και η ποιότητα του DNA. Η μέθοδος είναι τόσο ευαίσθητη ώστε ακόμα και μικρές διαφορές στην συγκέντρωση του DNA ή στην απόδοση της PCR αντίδρασης να επηρεάζουν την ανάλυση. Για αυτό το λόγο όλες οι εργασίες που έχουν δημοσιευτεί σχετικά με το HRM, προτείνουν το DNA σε κάθε πείραμα να προέρχεται από το ίδιο αρχικό υλικό (πχ. περιφερικό αίμα), να έχει απομονωθεί με την ίδια μέθοδο και να έχει αραιωθεί στην ίδια αρχική συγκέντρωση.

Για το γονίδιο *ATP7B* οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος LightScanner Primer Design Software 1.0. Με αυτό το πρόγραμμα δίνεται η δυνατότητα στον

χρήστη να εισάγει την αλληλουχία του γονιδίου για το οποίο θέλει να σχεδιάσει τους εκκινητές, να επιλέξει τις περιοχές που θέλει να πολλαπλασιάσει καθώς και τις συνθήκες του πειράματος.

Στη συνέχεια οι εκκινητές ελέγχθηκαν με τη χρήση του προγράμματος uMeltSM v2.0.2 του Πανεπιστημίου της Utah (57). Με αυτό το πρόγραμμα γίνεται προσομοίωση των συνθηκών του HRMA πειράματος. Ο χρήστης εισάγει την αλληλουχία του PCR προϊόντος και το πρόγραμμα προσομοιάζει τις συνθήκες χρησιμοποιώντας θερμοδυναμικά μοντέλα (58). Με το πρόγραμμα αυτό μπορούμε να δούμε το προφίλ αποδιάταξης για κάθε τμήμα DNA που έχουμε εισάγει, καθώς και αν απαιτείται η χρήση κάποιου βελτιωτικού στην PCR αντίδραση. Ενδεικτικά στην εικόνα 24 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα για το εξόνιο 13 του γονιδίου *ATP7B*.



Εικόνα 24. Α) Το προφίλ αποδιάταξης του εξονίου 13 του γονιδίου *ATP7B* χωρίς τη χρήση κάποιου βελτιωτικού. Β) Το προφίλ αποδιάταξης του εξονίου 13 του γονιδίου *ATP7B* με τη προσθήκη 10% DMSO. Στη περίπτωση Α το τμήμα του DNA, λόγω του υψηλού περιεχομένου σε GC, αποτυγχάνει να αποδιαταχθεί μέχρι τους 98°C ενώ στην εικόνα Β με προσθήκη 10% DMSO η θερμοκρασία αποδιάταξης μειώνεται και η αποδιάταξη είναι επιτυχημένη.

Μετά τον έλεγχο, οι εκκινητές παραγγέλθηκαν και ακολούθησε προτυποποίηση των συνθηκών PCR. Για όλες τις εφαρμογές της μεθόδου HRMA τα δείγματα DNA φωτομετρούνται και ακολουθεί αραίωση ώστε να έχουν όλα αρχική συγκέντρωση 10pmol/μl. Ιδανικά θα πρέπει να χρησιμοποιούνται χαμηλές συγκεντρώσεις DNA ώστε να αποφεύγεται ο υψηλός θόρυβος (λόγω της προσθήκης χρωστικής στο DNA) καθώς και να μειώνονται οι διαφορές στις συγκεντρώσεις των αλάτων μεταξύ των δειγμάτων. Οι συνθήκες και το πρόγραμμα της PCR αντίδρασης παρουσιάζονται στους πίνακες 18 και 19.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
LightScanner Master Mix	4
Forward primer (10 pmol)	0.25
Reverse primer (10pmol)	0.25
H ₂ O	3,5

Σε κάθε αντίδραση προστίθενται
2μl DNA (10pmol/μl)
Τελικός όγκος αντίδρασης 10μl

Πίνακας 18. Συνθήκες της PCR αντίδρασης για HRMA ανάλυση.

Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
95°C	2 minutes	1 κύκλος
94°C	30 sec	45 κύκλοι
62°C	30 sec	
95°C	30 sec	1 κύκλος

Πίνακας 19. Πρόγραμμα της PCR αντίδρασης για HRMA ανάλυση. Για επιτυχημένη ανάλυση η απόδοση της PCR αντίδρασης θα πρέπει να φτάσει σε κορεσμό γι' αυτό το λόγο πραγματοποιούνται 45 κύκλοι. Λόγω της υψηλής θερμοκρασίας υβριδισμού η PCR αντίδραση πραγματοποιείται σε δύο βήματα χωρίς να χρειάζεται το βήμα αποδιάταξης (συνήθως στους 72°C).

Προκειμένου να γίνει η προτυποποίηση για διαγνωστική χρήση για κάθε εξόνιο αναλύθηκαν 100 δείγματα τα οποία είχαν ήδη γονοτυπηθεί (με DGGE και sequencing). Ο σκοπός ήταν να υπολογιστεί η αξιοπιστία και η ευαισθησία της μεθόδου. Στα 100 δείγματα που αναλύθηκαν διαπιστώθηκε μία μόνο λανθασμένη διάγνωση ενός δείγματος ομοζυγώτη για την μετάλλαξη p.His1069Gln. Η λανθασμένη διάγνωση σε περιπτώσεις ομοζυγωτών είναι αναμενόμενη, καθώς σε μια τέτοια κατάσταση δεν δημιουργούνται ετεροδιμερή (φυσιολογικού-μεταλλαγμένου). Επειδή η αλλαγή είναι ομόζυγη το προφίλ αποδιάταξης που προκύπτει διαφέρει ελάχιστα από το προφίλ αποδιάταξης της φυσιολογικής αλληλουχίας. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να ξεπεραστεί αν μετά τον πρώτο έλεγχο αποδιάταξης ακολουθήσει ένας δεύτερος όπου διαφορετικά δείγματα έχουν αναμειχθεί σε ισομοριακές ποσότητες. Με αυτό τον τρόπο δημιουργούμε τεχνητά ετερόζυγα δείγματα, τα οποία έχουν διαφορετικό πρότυπο αποδιάταξης και ξεχωρίζουν εμφανώς από τα ομόζυγα (φυσιολογικά και μεταλλαγμένα). Έτσι

οι λανθασμένες διαγνώσεις μηδενίζονται. Άλλος ένας τρόπος για να αποφύγουμε την λάθος διάγνωση, είναι η χρήση ειδικών ανιχνευτών (simple probe) για τις αλλαγές που μας ενδιαφέρουν. Οι ανιχνευτές για την HRM δεν χρειάζονται σήμανση με χρωστική, και μπλοκαρισμένο το 3' άκρο ώστε να μην επιτρέπεται η επέκταση του. Η γονοτύπιση με τη χρήση μη σημασμένου ανιχνευτή μια ομογενής δοκιμασία και πραγματοποιείται σε μια αντίδραση. Ο ανιχνευτής συμπεριλαμβάνεται στην αντίδραση PCR αλλά δεν χρησιμοποιείται κατά τον πολλαπλασιασμό. Η γονοτύπιση επιτυγχάνεται με τον έλεγχο των ετεροδιμερών ανιχνευτή – αλληλουχίας στόχου μετά την PCR αντίδραση. Η επιτυχία της μεθόδου έγκειται στη χρήση ενός εκ των δύο εκκινητών της PCR αντίδρασης σε περίσσεια οδηγώντας σε υπερέκφραση της αλυσίδας στόχου. Για το γονίδιο ATP7B σχεδιάστηκαν μη σημασμένοι ανιχνευτές για τις πιο κοινές μεταλλάξεις, οι οποίες έχουν σημαντική πιθανότητα να βρίσκονται σε ομοζυγωτία.

Ο σχεδιασμός ενός πειράματος με σκοπό τη χρήση μη-σημασμένων ανιχνευτών βασίζεται στις παρακάτω αρχές:

- Αρχικά εντοπίζουμε το SNP που μας ενδιαφέρει και επισημαίνουμε όλους τους πολυμορφισμούς στην περιοχή έτσι ώστε να τους αποφύγουμε στο σχεδιασμό των εκκινητών
- Οι εκκινητές σχεδιάζονται με Tm 60–65 °C
- Ο ανιχνευτής σχεδιάζεται με Tm 65-70 °C (ως γενική αρχή ο ανιχνευτής έχει κατά μέσο όρο 5°C υψηλότερο Tm από τον εκκινητή) και είναι συμπληρωματικός είτε με τη φυσιολογική αλληλουχία είτε με το SNP.
- Το μήκος του ανιχνευτή είναι μεταξύ 20 και 35 βάσεις.
- Το SNP που μας ενδιαφέρει τοποθετείται στο μέσο του ανιχνευτή προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η αστάθεια με την παράταιρη βάση.
- Για να εμποδίζεται η επέκταση του ανιχνευτή χρησιμοποιούμε τροποποιημένη βάση (C3 block) στο 3' άκρο του.

Για το γονίδιο *CFTR* έγινε αρχικά προτυποποίηση των εκκινητών που προτείνονται από τους Montgomery *et al.* (55). Οι εκκινητές δοκιμάστηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με διαφορετικές πολυμεράσες και χρωστικές. Το κύριο μέλημα μας ήταν η θερμοκρασία του PCR

για το κάθε ζεύγος εκκινήτων να είναι κοινή, έτσι ώστε να μπορούν όλες οι περιοχές να αναλύονται στο ίδιο PCR πρόγραμμα. Αυτό εξυπηρετεί κυρίως τη διάγνωση επιτρέποντας τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό όλων των περιοχών του γονιδίου στο ίδιο πιάτο ανάλυσης. Τα τελικά συμπεράσματα της προτυποποίησης παρουσιάζονται στους πίνακες 20 και 21.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
LightScanner Master Mix	4
Forward primer (10 pmol)	0.25
Reverse primer (10pmol)	0.25
H ₂ O	3,5

Σε κάθε αντίδραση προστίθενται
2μl DNA (10pmol/μl)
Τελικός όγκος αντίδρασης 10μl

Πίνακας 20: Συνθήκες της αντίδρασης PCR για το γονίδιο *CFTR*

Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
95°C	2 minutes	1 κύκλος
94°C	30 sec	45 κύκλοι
62°C	30 sec	
95°C	30 sec	1 κύκλος

Πίνακας 21: Πρόγραμμα της αντίδρασης PCR για το γονίδιο *CFTR*

Ταυτόχρονα έγινε αξιολόγηση του μη σημασμένου ανιχνευτή (56) για την ανίχνευση της μετάλλαξης p.Phe508del, η οποία αποτελεί την πιο κοινή μετάλλαξη του γονιδίου *CFTR*. Ο ανιχνευτής που αξιολογήθηκε δημοσιεύτηκε στην εργασία των Zhou *et al.* 2004 (56). Τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν στην εργασία Ρουλίου Μ. *et al.* 2012 (59) και σχολιάζονται στην ενότητα των αποτελεσμάτων.

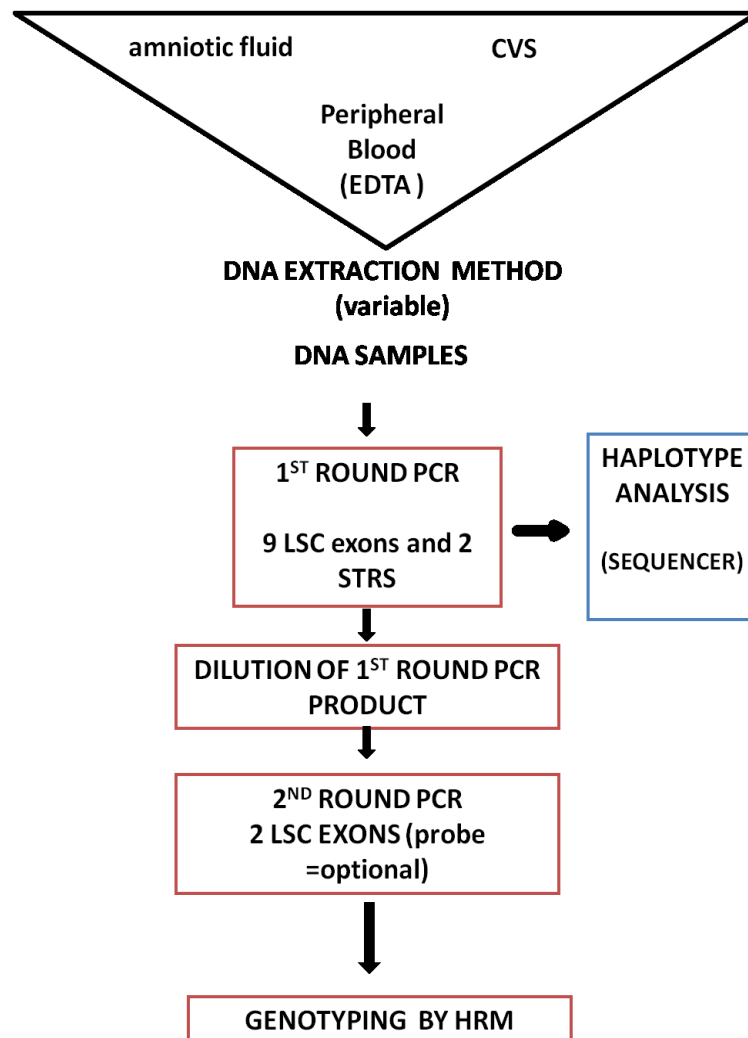
Ανάπτυξη πρωτοκόλλου για προγεννητική διάγνωση μεταλλάξεων του γονιδίου *CFTR* με τη μέθοδο HRM

Το βασικό πρόβλημα που αντιμετωπίζουν τα εργαστήρια που εφαρμόζουν τη μέθοδο HRM, είναι πως τα δείγματα DNA που αναλύονται θα πρέπει να έχουν απομονωθεί με τον ίδιο τρόπο και ιδανικά να προέρχονται από το ίδιο είδος βιολογικού υλικού (π.χ. περιφερικό αίμα, αμνιακό υγρό, κύτταρα τροφοβλάστης). Η HRM είναι μια πολύ ευαίσθητη μέθοδος γι' αυτό το λόγο ακόμα και μικρές διαφορές των ρυθμιστικών διαλυμάτων που έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση του DNA μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της μελέτης αποδιάταξης. Για ένα επιτυχημένο πείραμα HRM είναι προαπαιτούμενο η ανάλυση να ξεκινά με τη φωτομέτρηση των δειγμάτων και αραίωση τους έτσι ώστε να υπάρχει κοινό υπόβαθρο.

Εφ' όσον το εργαστήριο ιατρικής γενετικής είναι εργαστήριο αναφοράς για τη μελέτη του γονιδίου *CFTR* στην Ελλάδα, αυτός ο περιορισμός μας προβλημάτισε ιδιαίτερα καθώς δεν είναι πάντοτε εφικτό όλα τα δείγματα σε κάθε ανάλυση να προκύπτουν από την ίδια μέθοδο απομόνωσης. Είναι αρκετά συχνό φαινόμενο να αποστέλλονται στο εργαστήριο έτοιμα δείγματα DNA από άλλα εργαστήρια (εσωτερικού και εξωτερικού) τα οποία χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση, να πρέπει να χρησιμοποιήσουμε ξανά παλαιότερα δείγματα τα οποία είχαν απομονωθεί με χειροκίνητες μεθόδους (όταν έρχονται για έλεγχο συγγενείς πασχόντων) και φυσικά η ανάγκη για διενέργεια προγεννητικών ελέγχων. Από τη στιγμή που το HRM αντικατέστησε την μέθοδο DGGE, και για τους παραπάνω λόγους, έπρεπε να σχεδιάσουμε ένα πρωτόκολλο προκειμένου να προσπελάσουμε τις διαφορές που προκύπτουν από τις διαφορετικές μεθόδους απομόνωσης καθώς και τις διαφορές στην ποιότητα και πυκνότητα του DNA.

Μια από τις εφαρμογές που αναπτύχθηκαν στη διάρκεια αυτής της διδακτορικής διατριβής, ήταν η ανάπτυξη πρωτοκόλλου για προγεννητική διάγνωση με τη χρήση της πλατφόρμας LightScanner και τη μέθοδο αποδιάταξης υψηλής ευκρίνειας (HRM). Η ανάπτυξη ενός τέτοιου πρωτοκόλλου είναι πολύ σημαντική καθώς είναι η πρώτη φορά που εφαρμόζεται αυτή η τεχνική για την ανάλυση δειγμάτων που έχουν προέλθει με διαφορετική μέθοδο απομόνωσης και από διάφορες πηγές γενετικού υλικού.

Η μέθοδος βασίζεται στην πραγματοποίηση μιας πολλαπλής PCR αντίδρασης, στην οποία πολλαπλασιάζονται όλες οι γενετικές θέσεις του γονιδίου *CFTR* που θέλουμε να αναλύσουμε καθώς και δύο πολυμορφικοί δείκτες. Στην εικόνα 25 παρουσιάζεται διαγραμματικά η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε.



Εικόνα 25. Διάγραμμα απεικόνισης του πρωτοκόλλου που αναπτύχθηκε για τη διενέργεια προγεννητικής διάγνωσης με τη χρήση της μεθόδου HRM.

Στο πρωτόκολλο που βελτιστοποιήθηκε περιλαμβάνονται ανιχνευτές για εννέα εξόνια του γονιδίου *CFTR* καθώς και για δύο ενδογονιδιακούς πολυμορφικούς δείκτες, IVS8 και D7S77. Στον πίνακα 22, παρουσιάζονται εκκινητές που περιλαμβάνονται στην 11-πλή PCR αντίδραση και στους πίνακες 23 και 24 οι συνθήκες και η σύσταση της PCR αντίδρασης. Τα εξόνια που επιλέχθηκαν αντιστοιχούσαν σε οικογένειες για τις οποίες είχε ήδη διενεργηθεί παλαιότερα προγεννητική διάγνωση, καθώς η μελέτη έγινε αναδρομικά.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος (bp)
IVS8 (Intragenic)	TCTATCTCATGTTAATGCTG	181bp
	ACTAAGATATTTGCCCATTTATCAAGT	
D7s677 (Intragenic)	ATCATTCACTATGGGATAGC	279bp
	GAATTACAAGTCACTCTATACAAAA	
Exon 3	TTTGACATGCAACTTATTGG	169
	CAAATGAGATCCTTACCCCTAAA	
Exon 4, Amp. 2	GCGATTTATCTAGGCATAGGCTT	185
	ACATGTACGATACAGAATATATGTGC	
Exon 7, Amp. 1	ATGCTCAGATCTTCCATTCCAA	227
	GTGAATATTTTCCGGAGGATGA	
Exon 10	TTGATAATGACCTAATAATGATGGGTT	277
	GTGAAGGGTTCATATGCATAATCAA	
Exon 11	AGATTGAGCATACTAAAAGTGAC	175
	TGCTTGCTAGACCAATAATTAG	
Exon 13, Amp. 4	AGTCTGTCCTGAACCTGAT	241
	ACTCAATTGCATTCTGTGGG	
Exon 16	TTTTTGAGGAATTTGTCATCTTG	222
	CAGGACTTCAACCCTCAATCA	
Exon 18	TTCATTTACGTCTTTTGTGC	217
	GGTATATAGTTCTTCCTCATGC	
Exon 21	AGAACTTGATGGTAAGTACATG	250
	CATTTCAAGTTAGCAGCCTTA	

Πίνακας 22. Οι εκκινητές της 11-πλής PCR αντίδρασης.

Temperature	Time	Number of cycles
95°C	15 minutes	1 cycle
94°C	30 sec	12 cycles – 0.5°C/cycle
60°C	2 min	
72°C	1 min 30 sec	
94°C	30 sec	
54°C	2 min	32 cycles
72°C	1 min	
72°C	15 min	
		1 cycle

Πίνακας 23. Οι συνθήκες της 1^{ης} PCR αντίδρασης.

Reagent / Concentration (pmol/μl)	Volume (μl)
Qiagen's Multiplex Taq	10
Q buffer	2
D7s677 Forward / (10)	0.4
D7s677 Reverse / (10)	0.4
IVS8 Forward / (10)	0.3
IVS8 Reverse / (10)	0.3
Exon 3 Forward / (10)	0.3
Exon 3 Reverse / (10)	0.3
Exon 4, Amp. 2 Forward / (10)	0.3
Exon 4, Amp. 2 Reverse / (10)	0.3
Exon 7, Amp. 1 Forward / (10)	0.3
Exon 7, Amp. 1 Reverse / (10)	0.3
Exon 10 Forward / (10)	0.3
Exon 10 Reverse / (10)	0.3
Exon 11 Forward / (10)	0.3
Exon 11 Reverse / (10)	0.3
Exon 13, Amp. 4 Forward / (10)	0.3
Exon 13, Amp. 4 Reverse / (10)	0.3
Exon 16 Forward / (10)	0.3
Exon 16 Reverse / (10)	0.3
Exon 18 Forward / (10)	0.3
Exon 18 Reverse / (10)	0.3
Exon 21 Forward / (10)	0.3
Exon 21 Reverse / (10)	0.3

Πίνακας 24. Συνθήκες της 1^{ης} PCR αντίδρασης.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα τα προϊόντα της 1^{ης} πολλαπλής σε πρώτη φάση φορτώνονται σε αυτόματο αναλυτή (MegaBACE 1000 capillary sequencer, Amersham Pharmacia Biotech), και πραγματοποιείται ανάλυση απλοτύπων. Σε δεύτερη φάση αραιώνονται με dH₂O σε αναλογία 1:1000 και χρησιμοποιούνται σε μια δεύτερη PCR αντίδραση ως υπόστρωμα. Η 2^η «nested» PCR αντίδραση πραγματοποιείται με τους ίδιους

εκκινητές με την 1^η αντίδραση, μόνο που τώρα αναλύεται το κάθε εξόνιο ξεχωριστά. Στους πίνακες 25 και 26 παρουσιάζονται οι συνθήκες και το πρόγραμμα της 2^{ης} PCR αντίδρασης.

Reagent (concentration)	Volume (μl)
Light Scanner Master Mix (2.5X)	4
dH ₂ O	3.5
Forward Primer (10pmol/μl)	0.25
Reverse Primer (10pmol/μl)	0.25

Πίνακας 25. Συνθήκες της 2^{ης} PCR αντίδρασης. Για κάθε εξόνιο που θέλουμε να αναλύσουμε χρησιμοποιούνται οι αντίστοιχοι εκκινητές

Temperature	Time	Number of cycles
95°C	2 minutes	1 cycle
94°C	30 sec	45 cycles
62°C	30 sec	
95°C	30 sec	1 cycle

Πίνακας 26. Το πρόγραμμα της 2^{ης} PCR αντίδρασης

Ανάπτυξη πρωτοκόλλου για προεμφυτευτική γενετική διάγνωση μεταλλάξεων του γονιδίου *CFTR* με τη μέθοδο HRM

Μια ακόμη εφαρμογή που αναπτύχθηκε στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής διατριβής ήταν ένα πρωτόκολλο για προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (ΠΓΔ) (Preimplantation Genetic Diagnosis - PGD) με τη χρήση της μεθόδου HRM. Η εφαρμογή αναπτύχθηκε για μεταλλάξεις του γονιδίου *CFTR*. Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση, απευθύνεται σε ζευγάρια φορείς μεταλλάξεων που εμπλέκονται σε κληρονομικά νοσήματα. Η ΠΓΔ εφαρμόζεται σε κύτταρα εμβρύων που έχουν προκύψει από εξωσωματική γονιμοποίηση και απαραίτητη προϋπόθεση είναι να είναι γνωστή η μοριακή διαταραχή για το συγκεκριμένο ζευγάρι.

Στα περισσότερα διαγνωστικά εργαστήρια, που παρέχουν ΠΓΔ για κυστική ίνωση, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν βασίζονται στην εφαρμογή πολλαπλού PCR για ταυτόχρονη ανάλυση συνδεδεμένων πολυμορφικών δεικτών και ανίχνευση της πιο κοινής μετάλλαξης, p.Phe508del. Αυτό γίνεται καθώς υπάρχει πολύ μεγάλη μοριακή ετερογένεια και οι εργαστηριακοί θέλουν να αποφύγουν την ανάπτυξη και προτυποποίηση εξατομικευμένων πρωτοκόλλων για κάθε ζευγάρι. Η μέθοδος αυτή ωστόσο έχει αρκετά μειονεκτήματα καθώς αν το ζευγάρι δεν έχει αρκετούς πληροφοριακούς δείκτες και οι μεταλλάξεις του δεν περιλαμβάνουν τη p.Phe508del, τότε η διάγνωση γίνεται πολύ δύσκολη και η αξιοπιστία της μεθόδου μειώνεται σημαντικά.

Καθώς το εργαστήριο ιατρικής γενετικής του πανεπιστημίου Αθηνών παρέχει σαν υπηρεσία την ΠΓΔ από το 1997 και λαμβάνοντας υπ' όψιν τη μεγάλη μοριακή ετερογένεια των μεταλλάξεων του γονιδίου *CFTR* στον Ελληνικό πληθυσμό, (ενδεικτικά η συχνότερη μετάλλαξη p.Phe508del εμφανίζεται με συχνότητα 53%) η ανάγκη για την ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου που θα μπορούσε με ελάχιστες παραλλαγές να προσαρμόζεται έτσι ώστε να καλύπτει όλους τους πιθανούς συνδυασμούς μεταλλάξεων.

Η λογική είναι κοινή με το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε για τη προγεννητική διάγνωση μόνο που σε αυτή την περίπτωση στην 1^η πολλαπλή PCR αντίδραση περιλαμβάνονται οι εκκινητές για τα εξόνια του γονιδίου *CFTR* που αφορούν το ζευγάρι καθώς

και εκκινητές για έξι συνδεδεμένους πολυμορφικούς δείκτες. Στον πίνακα 27 και 28 παρουσιάζονται οι εκκινητές για τους πολυμορφικούς δείκτες καθώς και οι συνθήκες της PCR αντίδρασης. Τα προϊόντα της 1^{ης} PCR αντίδρασης αραιώνονται με dH₂O (1/1500μL). 2μL του αραιωμένου προϊόντος χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την 2^η nested PCR αντίδραση η οποία στοχεύει στον πολλαπλασιασμό των επιθυμητών εξονίων του γονιδίου *CFTR*. Η γονοτύπηση επιτυγχάνεται με HRM ανάλυση των προϊόντων της 2^{ης} PCR αντίδρασης (Idaho's LightScanner). Παράλληλα γίνεται έλεγχος των πολυμορφικών δεικτών με ανάλυση σε αυτόματο αναλυτή των προϊόντων της 1^{ης} PCR αντίδρασης.

Primer name	Sequence	Tm	Product size		Location relevant to the CFTR gene
D7S677F	ATCATTCACTATGGGATAGC	56	279bp		Intragenic
D7S677R	GAATTACAAGTCACTCTATACAAA	68			
D7S486F	AAAGGCCAATGGTATATCCC	58	142bp	1.2 cM	upstream
D7S486R	GCCCAGGTGATTGATAGTGC	62			
D7S2460F	CACATCCACTGTGTCTCATTT	60	193bp	1 cM	upstream
D7S2460R	TATCTGGGACTTTACGCTTC	58			
IVS1-CA F	TCTGAACCTCAGCTACTCTCGTCA	56	285bp		Intragenic
IVS1 CA R	ACTGGAACATTGACTCTCCTGGGT	57			
IVS8CA F	TCTATCTCATGTTAATGCTG	54	181bp		Intragenic
IVS8CA R	ACTAAGATATTTGCCCATATCAAGT	64			
IVS11CAF	CGTGGTGTCTCATGCCTGTA	62	322bp		Intragenic
IVS11CAR	GGGACATAATTCAATGTGTTCA	62			

Πίνακας 27. Οι αλληλουχίες των πολυμορφικών δεικτών που χρησιμοποιούνται στη 1^η πολλαπλή PCR για την ΠΓΔ. Οι δείκτες D7S486 και D7S2460 είναι εξωγονιδιακοί και γι' αυτό αναφέρεται και η απόστασή τους (σε cM) από το *CFTR* γονίδιο.

Stock conc.	Reagent	Volume /Tube	Final conc. in 50μl reaction
2X	Pre-mixed HotStart Taq	30	1X
10X	Q-solution	5	1X
100μM	AC8 (Cy5.5)	0.15	0.3μM
100μM	AC8	0.15	0.3μM
100μM	D7S2460 (TAMRA)	0.1	0.2μM
100μM	D7S2460	0.1	0.2μM
100μM	D7S486 (Cy5.5)	0.1	0.2μM
100μM	D7S486	0.1	0.2μM
100μM	1CA (TAMRA)	0.2	0.4μM
100μM	1CA	0.2	0.4μM
100μM	D7S677 (FAM)	0.2	0.4μM
100μM	D7S677	0.2	0.4μM
100μM	IVS11 (FAM)	0.1	0.2μM
100μM	IVS11	0.1	0.2μM
100μM	LSC exon1F	0.2	0.4μM
100μM	LSC exon1R	0.2	0.4μM
100μM	LSC exon2F	0.2	0.4μM
100μM	LSC exon2R	0.2	0.4μM

Πίνακας 28. Συνθήκες της 1^{ης} πολλαπλής PCR αντίδραση για το πρωτόκολλο PGD-CF. Το πρόγραμμα της PCR είναι το ίδιο με αυτό που παρουσιάζεται στον πίνακα 23. Τα LSC exon1&2 αντιστοιχούν στα εξόνια στα οποία φέρει μεταλλάξεις το ζευγάρι για το οποίο έγινε η εφαρμογή

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

NanoChip 400™ (NC400) – γονίδιο *ATP7B*

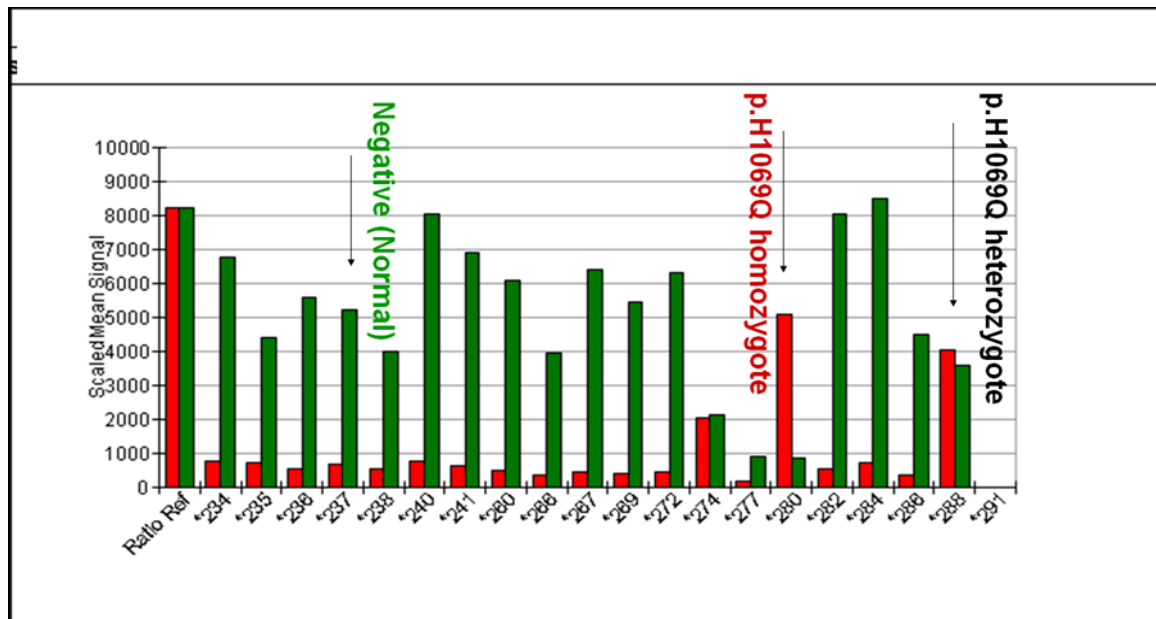
Η μέθοδος που αναπτύχθηκε για χρήση στη πλατφόρμα NanoChip400™ χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των δειγμάτων από νεογνά της περιοχής της Καλύμνου και της Κρήτης. Έγινε συλλογή 150 δειγμάτων νεογνών. Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε ειδικές κάρτες Guthrie και αποστάλθηκαν στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής όπου έγινε η αξιολόγηση της ποιότητας τους και η απομόνωση του DNA. Λόγω λαθών στη συλλογή των κηλίδων (μη επαρκές υλικό, επιμολύνση κατά τη συλλογή και την αποστολή των δειγμάτων) και κακής ποιότητας του DNA που απομονώθηκε, 6 δείγματα αποκλείστηκαν από την μελέτη. Ο τελικός αριθμός των δειγμάτων που ελέγχθηκαν με τη πλατφόρμα NanoChip400 ήταν 144.

Στην Ελληνική επικράτεια η συχνότητα φορέων της νόσου Wilson αναμένεται να είναι 1.2% με συχνότητα μεταλλάξεων όπως φαίνεται στην εικόνα 7. Οι περιοχές της Καλύμνου και της Κρήτης έχουν την ιδιαιτερότητα ότι είναι κλειστές κοινωνίες και γεωγραφικά απομονωμένες. Συνέπεια αυτού είναι ότι η συχνότητα κάποιων αλληλομόρφων να παρουσιάζει σημαντική αύξηση και κατ' επέκταση και η εμφάνιση της νόσου.

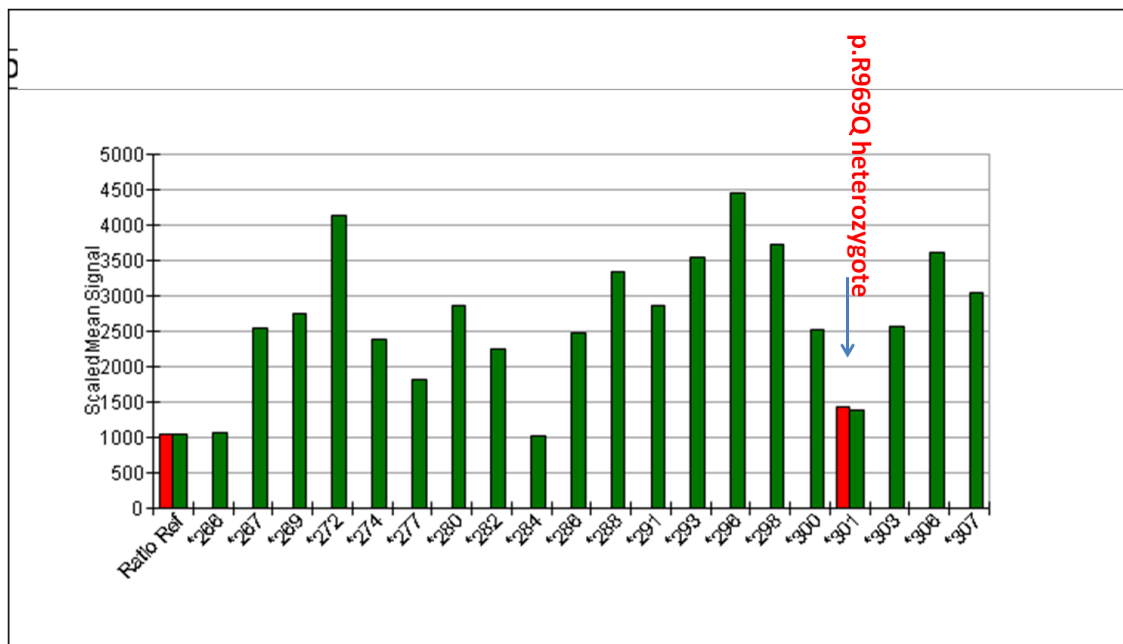
Στα δείγματα που ελέγχθηκαν, τα οποία προέρχονται από την περιοχή της Καλύμνου και της Κρήτης, οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν ήταν αποκλειστικά η p.His1069Gln και p.Arg969Gln. Αυτό το εύρημα είναι αναμενόμενο για τους συγκεκριμένους πληθυσμούς καθώς λόγω της γεωγραφικής απομόνωσης τους παρουσιάζεται το φαινόμενο του ιδρυτή.

Συγκεκριμένα στα 144 δείγματα που ελέγχθηκαν ανιχνευθηκαν 14 ετεροζυγώτες για την μετάλλαξη p.His1069Gln (6 με καταγωγή την Κάλυμνο και 8 με καταγωγή την Κρήτη), 2 ετεροζυγώτες για την μετάλλαξη p.Arg969Gln (με καταγωγή την Κρήτη) και 2 προσυμπτωματικοί ασθενείς με γονότυπο p.[His1069Gln] + [His1069Gln] (ομοζυγώτες για την μετάλλαξη με καταγωγή τη Κάλυμνο).

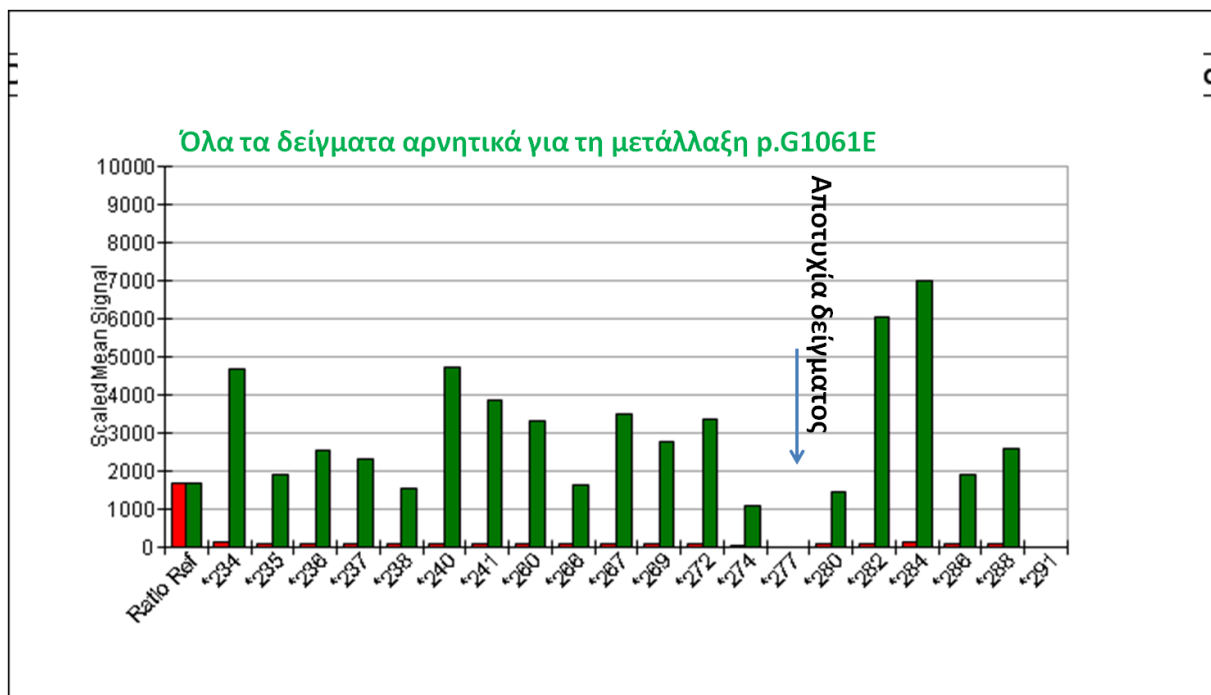
Στις εικόνες 26, 27 και 28 παρουσιάζονται ενδεικτικά αποτελέσματα για τρεις από τις μεταλλάξεις που ελέγχθηκαν.



Εικόνα 26. Αποτελέσματα για την μετάλλαξη p.His1069Gln. Με πράσινο είναι σημεισμένος ο ανιχνευτής για τη φυσιολογική αλληλουχία και με κόκκινο ο ανιχνευτής συμπληρωματικός στη μετάλλαξη. Ενδεικτικά επισημάνεται ένα φυσιολογικό δείγμα, ένα δείγμα ετεροζυγώτη και ένα δείγμα ομοζυγώτη για την μετάλλαξη.



Εικόνα 27 Αποτελέσματα για την μετάλλαξη p.Arg969Gln. Με πράσινο είναι σημεισμένος ο ανιχνευτής για τη φυσιολογική αλληλουχία και με κόκκινο ο ανιχνευτής συμπληρωματικός στη μετάλλαξη. Ενδεικτικά επισημάνεται ένα δείγμα ετεροζυγώτη.



Εικόνα 28. Αποτελέσματα για την μετάλλαξη p.Gly1061Glu. Με πράσινο είναι σημεισμένος ο ανιχνευτής για τη φυσιολογική αλληλουχία και με κόκκινο ο ανιχνευτής συμπληρωματικός στη μετάλλαξη. Ενδεικτικά επισημάνεται ένα φυσιολογικό δείγμα και ένα δείγμα το οποίο απέτυχε να πολλαπλασιαστεί. Δεν βρέθηκε κανένα δείγμα θετικό για αυτή τη μετάλλαξη.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τη συχνότητα φορέων για τον γενικό πληθυσμό (1 στους 90) βλέπουμε ότι στις περιοχές της Καλύμνου και της Κρήτης υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση της συχνότητας φορέων με **p value 0.07** (Pearson's Chi Square).

Γονοτύπιση στη πλατφόρμα Luminox xMAP™ – Αποτελέσματα για τα γονίδια CFTR και ATP7B

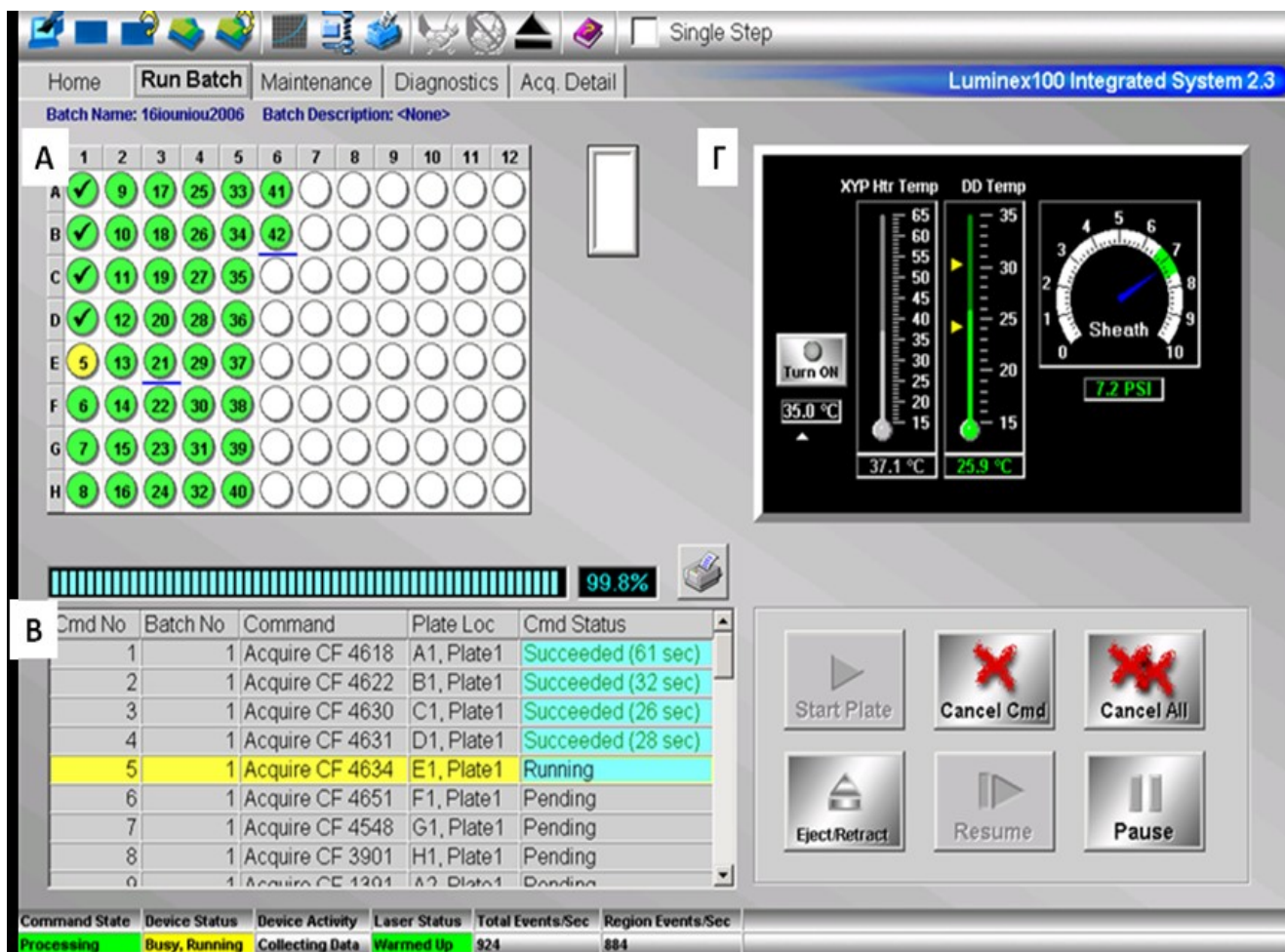
Χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα Luminox xMAP™ έγινε γονοτύπιση σε εκατό δείγματα ασθενών κυστικής ίνωσης και εκατό δείγματα ασθενών νόσου Wilson. Κατά τη προτυποποίηση των πρωτοκόλλων για τη πλατφόρμα Luminox xMAP™ έγιναν πολλές δοκιμές και αλλαγές των πειραματικών συνθηκών προκειμένου να μπορέσουν να αναλυθούν ικανοποιητικά όλες οι μεταλλάξεις για τα δύο νοσήματα. Στη περίπτωση της κυστικής ίνωσης ο σκοπός ήταν σε μια πολλαπλή αντίδραση να επιτύχουμε γονοτύπιση για 50 μεταλλάξεις. Στην περίπτωση της νόσου Wilson ο σκοπός ήταν σε τρεις πολλαπλές αντιδράσεις να επιτύχουμε γονοτύπιση για τις 26 συχνότερες μεταλλάξεις του Ελληνικού πληθυσμού. Ο αρχικός στόχος, κατά τη προτυποποίηση της μεθόδου ήταν ο κάθε ASPE ανιχνευτής να δώσει τιμή MFI (Median Fluorescent Intensity – Μέση ένταση φθορισμού) μεγαλύτερη ή ίση του 300. Αυτή η τιμή είναι ενδεικτική επιτυχημένου πολλαπλασιασμού της υπό διερεύνηση γενετικής θέσης και εκπροσώπησης στο μείγμα ανάλυσης.

Για το γονίδιο CFTR, έπειτα από πολλές δοκιμές και τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου επιτύχαμε τον επιτυχή πολλαπλασιασμό και ανίχνευση 45 από τις 50 μεταλλάξεις που ήταν ο στόχος. Οι μεταλλάξεις οι οποίες δεν έδιναν τα αναμενόμενα αποτελέσματα ήταν η 3152delT, η C276X, η M952I, η 3199del6 και η 2143delT. Το πρόβλημα που αντιμετωπίσαμε ήταν το χαμηλό σήμα για αυτές τις μεταλλάξεις όταν η ανίχνευση γινόταν στο μείγμα των 50 μεταλλάξεων. Όταν οι μεταλλάξεις αυτές δοκιμάστηκαν μόνες τους τα σήματα τους ήταν πολύ υψηλά γεγονός που υποδηλώνει ότι είχαμε επιτυχή πολλαπλασιασμό και αλληλοειδική ανίχνευση. Το πρόβλημα δηλαδή δεν ήταν σχεδιαστικό αλλά εμφανιζόταν όταν βρίσκονταν στο μείγμα με τους υπόλοιπους εκκινητές. Δοκιμάστηκαν διάφορες αλλαγές στο πρωτόκολλο, όπως αύξηση της συγκέντρωσης των αλληλοειδικών εκκινητών για τις συγκεκριμένες αλλαγές (ASPE) στο μείγμα, μείωση των αλληλοειδικών εκκινητών για τις μεταλλάξεις που έδιναν πολύ ισχυρά σήματα, αύξηση του όγκου του διαλύματος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση.

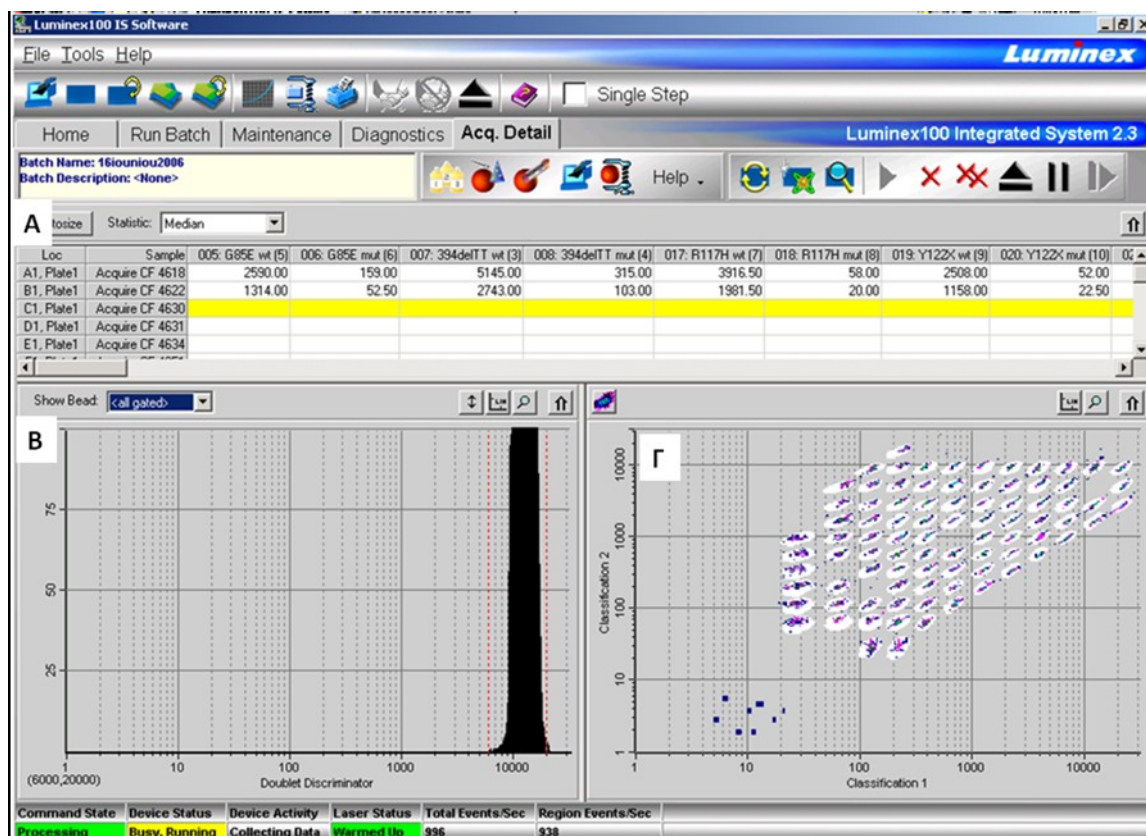
Παρ' όλες τις τροποποιήσεις δεν ήταν δυνατό να επιτύχουμε αποδεκτές τιμές για όλες τις μεταλλάξεις. Το ουσιαστικό αποτέλεσμα όμως ήταν πως ο σχεδιασμός που είχε γίνει ήταν

σωστός και γι' αυτό τον λόγο χρησιμοποιήθηκε, εν μέρει από την εταιρία Luminex® για το kit **xTAG Cystic Fibrosis 71 kit v2** το οποίο κυκλοφόρησε στην αγορά τον Ιούνιο 2009. Το καινούργιο αυτό αντιδραστήριο ανιχνεύει επιπλέον 39 μεταλλάξεις σε σχέση με το αρχικό (40+4) και ο σκοπός είναι να καλύπτει τους πληθυσμούς της ανατολικής Ευρώπης όπου παρατηρείται μεγάλη ετερογένεια μεταλλάξεων του γονιδίου *CFTR*.

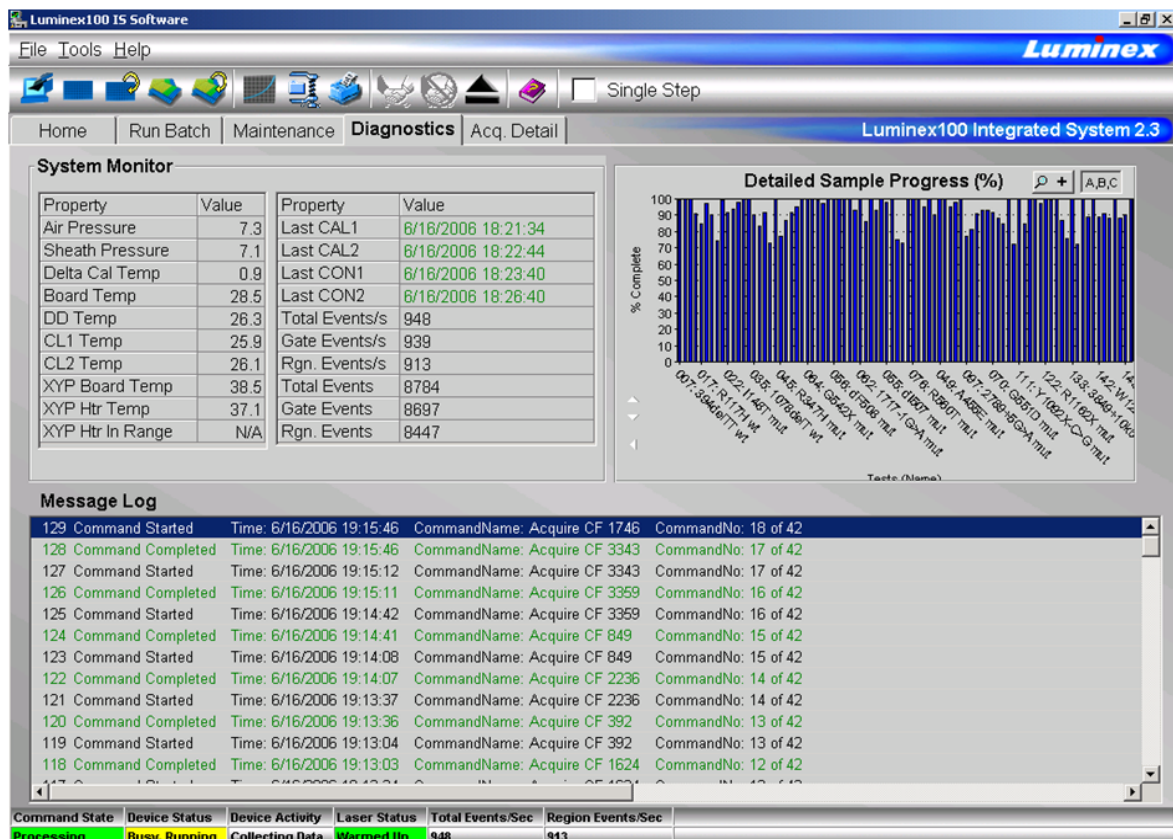
Για το γονίδιο *ATP7B*, ο σχεδιασμός αποδείχθηκε σωστός και επετεύχθη γονοτύπωση των 100 δειγμάτων που αναλύθηκαν. Λόγω του ότι οι 26 μεταλλάξεις είχαν χωριστεί σε τρεις διαφορετικές πολλαπλές αντιδράσεις προκειμένου να ανιχνευτούν, η διαδικασία της προτυποποίησης της μεθόδου ήταν πολύ πιο απλή απ' ό,τι στη περίπτωση του γονιδίου *CFTR*. Χρειάστηκαν μικρές προσαρμογές του πρωτοκόλλου όμως όλες οι μεταλλάξεις έδιναν εξ' αρχής ικανοποιητικά σήματα. Το πρωτόκολλο μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί στη διαγνωστική ρουτίνα ενός εργαστηρίου.



Εικόνα 29. Η αρχική σελίδα του προγράμματος ανάλυσης. Σε αυτή την εικόνα φαίνεται Α) τα δείγματα που έχουν φορτωθεί στο πιάτο ανάλυσης και η θέση τους. Τα δείγματα με (✓) είναι αυτά που έχουν αναλυθεί επιτυχώς. Το δείγμα με κίτρινο είναι αυτό που αναλύεται τη στιγμή που πάρθηκε η φωτογραφία. Β) παρουσιάζεται η λίστα των δειγμάτων προς ανάλυση. Στην μπάρα φαίνεται το ποσοστό της ανάλυσης που έχει επιτευχθεί για το δείγμα. Στα δείγματα που έχουν ήδη αναλυθεί επιτυχώς, σημειώνεται και ο χρόνος που χρειάστηκε. Το σύνθημα είναι η ανάλυση να ολοκληρώνεται σε 30-60 δευτερόλεπτα. Η ανάγκη για παραπάνω χρόνο είναι ενδεικτική κάποιου προβλήματος στο πείραμα. Μπορεί να υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει αρκετό υλικό ή να δηλώνει αποτυχία πολλαπλασιασμού. Το πρόγραμμα είναι σχεδιασμένο έτσι ώστε αν η ανίχνευση των σφαιριδίων δεν έχει ολοκληρωθεί στα 120 δευτερόλεπτα να επισημαίνει αποτυχία ανάλυσης. Γ) Σε αυτό τον πίνακα φαίνονται οι συνθήκες του πειράματος. Η θερμοκρασία του χώρου όπου βρίσκεται το μηχάνημα θα πρέπει να είναι μεταξύ 25°C και 30°C και η πίεση περίπου 7 PSI.



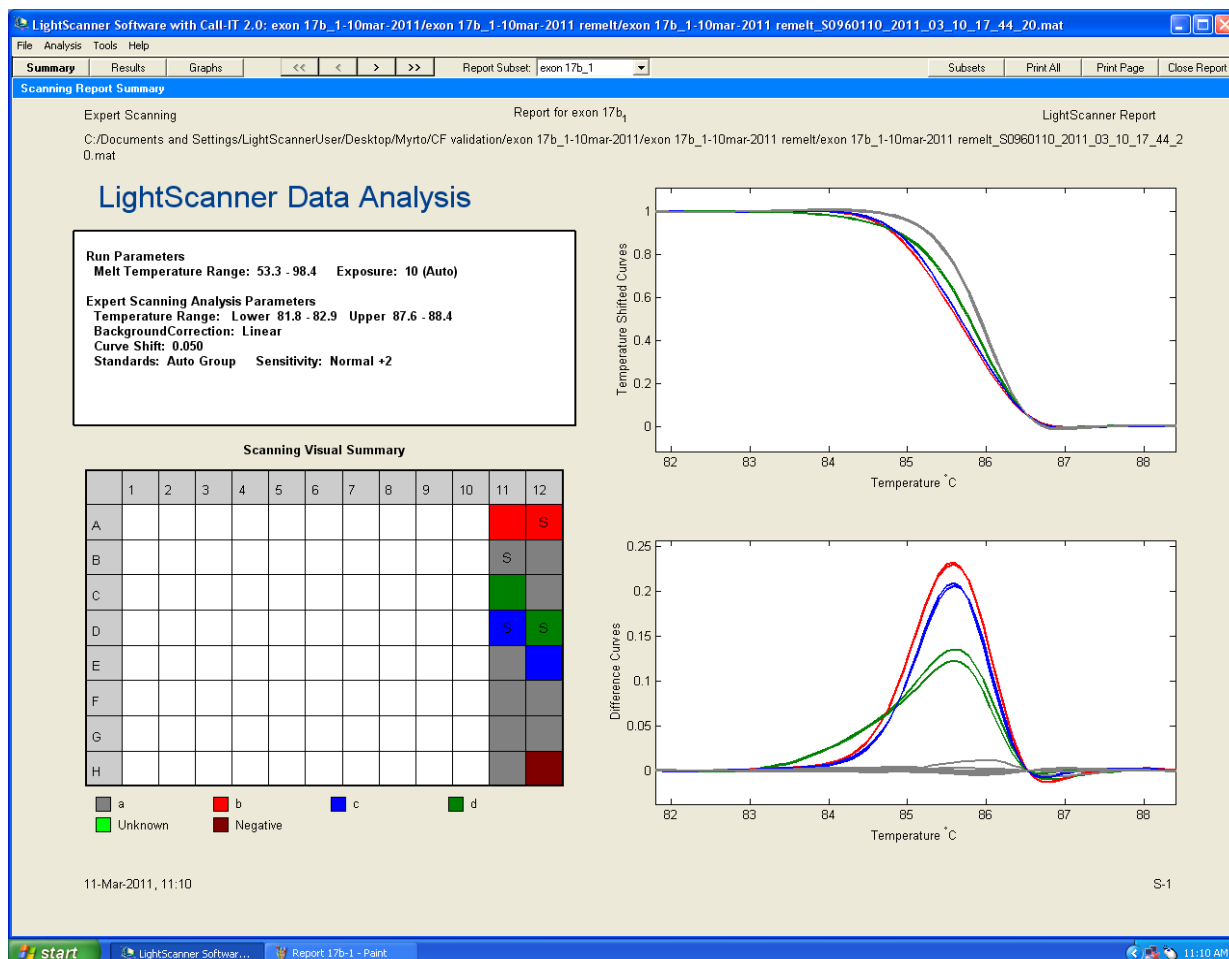
Εικόνα 30. Σε αυτή την εικόνα παρουσιάζεται το πρόγραμμα κατά τη διάρκεια συλλογής των δεδομένων. Α) Στη θέση αυτή φαίνονται τα αποτελέσματα της καταμέτρησης των σφαιριδίων για κάθε δείγμα. Β) Στη θέση φαίνεται η καταμέτρηση των σφαιριδίων. Οι διακεκομμένες κόκκινες γραμμές καθορίζουν το μέγεθος που θα πρέπει να έχει η αναλυόμενη ουσία προκειμένου να καταμετρηθεί. Έτσι δεν προσμετρούνται τα συσσωματώματα των σφαιριδίων που δεν αντιπροσωπεύουν πραγματικά αλληλόμορφα. Γ) Η κάθε θέση (παρουσιάζεται με το λευκό κύκλο) υποδηλώνει μια οικογένεια σφαιριδίων. Προκειμένου να θεωρηθεί επιτυχής η ανάλυση για κάθε δείγμα πρέπει για κάθε οικογένεια σφαιριδίων να μετρηθούν 100 προϊόντα. Τα μη-ειδικά σφαιρίδια δεν ταξινομούνται σε κάποια οικογένεια και φαίνονται κάτω αριστερά.



Εικόνα 31. Στην εικόνα αυτή παρουσιάζεται μια άλλη καρτέλα του προγράμματος ανάλυσης. Σε αυτή την καρτέλα μπορούμε να δούμε όλες τις λεπτομέρειες για την κατάσταση του μηχανήματος κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, καθώς και τα μηνύματα που αφορούν την εξέλιξη της ανάλυσης. Παράλληλα μπορούμε να παρακολουθήσουμε την πρόοδο της συλλογής δεδομένων για κάθε οικογένεια σφαιριδίων.

Αποτελέσματα από την ανάλυση των γονιδίων *CFTR* και *ATP7B* στη πλατφόρμα LightScanner

Για το γονίδιο *CFTR* δοκιμάστηκαν οι ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες των εκκινήτων (55) στα διαγνωστικά δείγματα. Επετεύχθη γονοτύπωση σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν με ευαισθησία και ειδικότητα 100%.



Εικόνα 32. Στην εικόνα παρουσιάζονται αποτελέσματα από την ανάλυση του εξονίου 17b-1 του γονιδίου *CFTR*. Σε αυτό το πείραμα είχαμε δείγματα με τρεις διαφορετικές μεταλλάξεις και μπορούμε να διακρίνουμε με κόκκινο το πρότυπο αποδιάταξης για την μετάλλαξη G1069R, με πράσινο το πρότυπο της μετάλλαξης F1052V και με μπλε το πρότυπο της μετάλλαξης R1070Q. Η ισχύς της μεθόδου είναι φανερή, ειδικά στην περίπτωση των μεταλλάξεων G1069R και F1052V όπου είναι δυνατή η διάκριση παρόλο που τα πρότυπα τους έχουν ελάχιστες διαφορές.

Προκειμένου να γίνει προτυποποίηση της μεθόδου για κλινική χρήση, αναλύθηκαν 100 δείγματα με γνωστούς γονοτύπους σε κάθε εξόνιο. Εφ' όσον πιστοποιήθηκε η αξιοπιστία και η ευαισθησία της μεθόδου, ακολούθησε ανάλυση 100 τυφλών δειγμάτων. Τα δείγματα αυτά δεν είχαν γονοτυπηθεί προηγουμένως και η ανάλυσή τους με τη μέθοδο High Resolution Melting

(HRM), έγινε παράλληλα με ταυτόχρονη ανάλυση με Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) η οποία αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς για το εργαστήριο ιατρικής γενετικής. Η μελέτη αυτή απέδειξε ότι όντως η HRM αποτελεί μια πολύ αξιόπιστη μεθοδολογία με απόδοση παρόμοια με τη μέθοδο DGGE. Η μέθοδος DGGE, αν και είναι πολύ χρονοβόρα και δύσκολα χρησιμοποιείται για ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, αποτελεί ουσιαστικά το “gold standard” για την ανίχνευση μεταλλάξεων. Η HRM, παρέχει την αξιοπιστία του DGGE, με το πλεονέκτημα της ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε πολύ μικρό χρόνο. Τα αποτελέσματα ήταν τόσο ενθαρρυντικά που η μέθοδος HRM αποτελεί πλέον την βασική μέθοδο ανάλυσης του γονιδίου *CFTR* για το εργαστήριο ιατρικής γενετικής. Πλέον από τότε που εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριο μας έχουν αναλυθεί περίπου 4000 δείγματα χωρίς να παρατηρηθεί κάποιο σφάλμα.

Προτυποποίηση μη-σημασμένου ανιχνευτή για την μετάλλαξη p.Phe508del

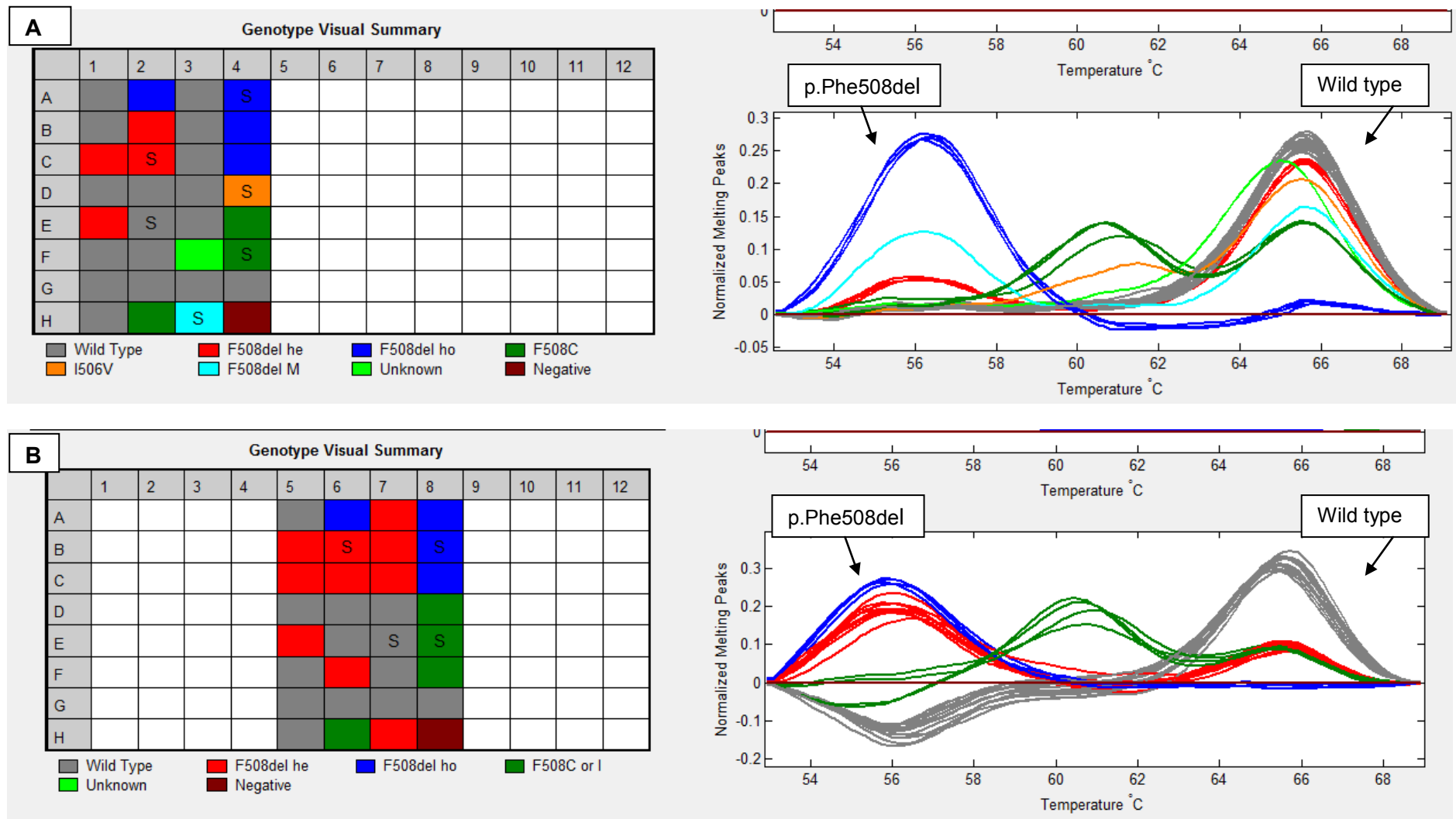
Κατά τη διαδικασία προτυποποίησης της μεθόδου για κλινική διαγνωστική χρήση, δοκιμάστηκε και ο μη-σημασμένος ανιχνευτής (unlabelled probe) για την πιο κοινή μετάλλαξη του γονιδίου *CFTR*, p.Phe508del, όπως είχε δημοσιευτεί (56) ο οποίος σύμφωνα με τους συγγραφείς θα έπρεπε να χρησιμοποιείται με τους εκκινητές για το εξόνιο 10 του γονιδίου *CFTR* που δίνει προϊόν 201 βάσεων (55, 56). Κατά τη διάρκεια της προτυποποίησης διαπιστώσαμε ένα πολύ σοβαρό σφάλμα στο σχεδιασμό αυτών των εκκινητών που είχε σαν αποτέλεσμα σε συγκεκριμένες περιπτώσεις να μην ανιχνεύεται η μετάλλαξη. Στην εικόνα 33 παρουσιάζεται ο σχεδιασμός για το PCR προϊόν των 201 βάσεων καθώς και η αλληλουχία του ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκε.

Γονίδιο <i>CFTR</i> , εξόνιο 10 (201bp)		
A(C>T)TTCTAATG(A>G)TGATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGGGTAAAATTAAGCA CAGTGGAAGAATTTCAATTCTGTTCTCAGTTTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTA AAGAAAATATCATCTTTGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCATCA AAGCATGCCAACTAGAAGA(G>A)GTAAGAAACTATGT		
Exon 10, ΔF508 locus	201 (bp)	ACTTCTAATGGTGATTATGGG Forward primer
		ACATAGTTTCTTACCTCTTC Reverse primer
AAAGAAAATATCATCTTTGGTGTTCCTA Ανιχνευτής για την μετάλλαξη p.Phe508del (συμπληρωματικός στη φυσιολογική αλληλουχία)		

Εικόνα 33. Με πράσινο είναι σημειωμένος ο forward εκκινητής και με κίτρινο ο reverse. Με κόκκινο είναι σημειωμένος ο μη – σημασμένος ανιχνευτής για την μετάλλαξη. Σε παρενθέσεις παρουσιάζονται οι πολυμορφισμοί που εντοπίζονται στους εκκινητές ενώ με κόκκινα γράμματα επισημαίνεται η θέση της μετάλλαξης p.Phe508del.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 33, ο forward εκκινητής περικλείει δύο πολύ κοινούς πολυμορφισμούς. Ο πρώτος είναι ο p.Leu467Phe και ο δεύτερος ο p.Met470Val. Ο εκκινητής είναι συμπληρωματικός για τη λευκίνη στη θέση 467 (C) και τη βαλίνη στη θέση 470 (G). Η λευκίνη και η βαλίνη σε αυτές τις θέσεις, στη μεγαλύτερη πλειοψηφία των περιπτώσεων σχετίζονται με το φυσιολογικό αλληλόμορφο, ενώ η φαινυλαλανίνη και η μεθειονίνη συγκληρονομούνται σχεδόν αποκλειστικά με τη μετάλλαξη p.Phe508del.

Όταν χρησιμοποιούμε τους εκκινητές για το εξόνιο 10 που δίνουν προϊόν 201 βάσεων για την ανίχνευση της μετάλλαξης p.Phe508del και το δείγμα φέρει τον πολυμορφισμό p.Leu467Phe *in cis* με την μετάλλαξη, τότε παρατηρείται πολλαπλασιασμός μόνο του φυσιολογικού αλληλομόρφου με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύεται η μετάλλαξη. Λόγω του πολυμορφισμού ο forward εκκινητής δε μπορεί να προσδεθεί και γι' αυτό πολλαπλασιάζεται μόνο το φυσιολογικό αλληλόμορφο. Στην εικόνα 34 παρουσιάζονται τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης.



Εικόνα 34. Αποτελέσματα γονοτύπωσης με χρήση μη-σημασμένου ανιχνευτή για τη μετάλλαξη p.Phe508del. Α) με τους εκκινητές που δίνουν προϊόν 201 βάσεις Β) με τους εκκινητές που δίνουν προϊόν 277 βάσεις. Στη περίπτωση Α τα θετικά δείγματα που φέρουν και τον πολυμορφισμό p.Leu457Phe γονοτυπούνται λανθασμένα ως φυσιολογικά. Ο αληθινός γονότυπος και το αποτέλεσμα της γονοτύπωσης για κάθε ζεύγος εκκινητών παρουσιάζεται στον Πίνακα 29. Τα δείγματα που δεν έχουν αποτέλεσμα, φέρουν πολυμορφισμούς στη περιοχή που καλύπτει ο ανιχνευτής γι' αυτό και δε μπορεί να προσδεθεί και δεν δίνει σήμα.

Πίνακας 29

Column	Row	True Genotype	Call using exon10 ΔF508 locus (201bp)	Call using exon 10 primer set (277bp)
1 and 5	A	E528E M470	Wild Type	Wild Type
1 and 5	B	Phe508del M470V L467F	Wild Type	Phe508del heterozygote
1 and 5	C	Phe508del M470V	Phe508del heterozygote	Phe508del heterozygote
1 and 5	D	V470	Wild Type	Wild Type
1 and 5	E	Phe508del M470V	Phe508del heterozygote	Phe508del heterozygote
1 and 5	F	M470V	Wild Type	Wild Type
1 and 5	G	S519S M470V	Wild Type	Wild Type
1 and 5	H	E528E M470V	Wild Type	Wild Type
2 and 6	A	Phe508del/Phe508del M470	Phe508del homozygote	Phe508del homozygote
2 and 6	B	Phe508del M470V	Phe508del heterozygote	Phe508del heterozygote
2 and 6	C	Phe508del M470V	Phe508del heterozygote	Phe508del heterozygote
2 and 6	D	E528E M470V	Wild Type	Wild Type
2 and 6	E	1677delTA V470	Wild Type	Wild Type
2 and 6	F	Phe508del M470V L467F	Wild Type	Phe508del heterozygote
2 and 6	G	C524X V470	Wild Type	Wild Type
2 and 6	H	I506V M470	No call	No call
3 and 7	A	Phe508del M470V L467F	Wild Type	Phe508del heterozygote
3 and 7	B	Phe508del M470V L467F	Wild Type	Phe508del heterozygote
3 and 7	C	Phe508del M470V L467F	Wild Type	Phe508del heterozygote
3 and 7	D	M470V	Wild Type	Wild Type
3 and 7	E	M470V	Wild Type	Wild Type
3 and 7	F	M470	Wild Type	Wild Type
3 and 7	G	M470	Wild Type	Wild Type
3 and 7	H	Phe508del M470	Phe508del heterozygote	Phe508del heterozygote
4 and 8	A	Phe508del/Phe508del M470	Phe508del homozygote	Phe508del homozygote
4 and 8	B	Phe508del/Phe508del M470	Phe508del homozygote	Phe508del homozygote
4 and 8	C	Phe508del/Phe508del M470	Phe508del homozygote	Phe508del homozygote
4 and 8	D	I506V M470V	No call	No call
4 and 8	E	F508C V470	No call	No call
4 and 8	F	F508C V470	No call	No call
4 and 8	G	V470	Wild Type	Wild Type
4 and 8	H	Blank	Negative	Negative

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την ανίχνευση της p.Phe508del (56) δεν είναι κατάλληλοι καθώς μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένη διάγνωση. Αντίθετα αν χρησιμοποιηθεί το εναλλακτικό ζευγάρι εκκινητών που δίνει προϊόν 277 βάσεων (55) η γονοτύπωση γίνεται σωστά καθώς δεν υπάρχουν πολυμορφισμοί στις θέσεις που προσδένονται οι εκκινητές. Στην εικόνα 34 (Α) φαίνεται επίσης πως τα δείγματα με γονότυπο p.Phe508del *in cis* p.Met470Val έχουν πολύ χαμηλότερο σήμα για την μετάλλαξη γεγονός που οφείλεται σε προνομιακό πολλαπλασιασμό (preferential amplification) του φυσιολογικού αλληλομόρφου που είναι απολύτως συμπληρωματικό με τον εκκινητή στη θέση 470 (59).

Αποτελέσματα της εφαρμογής της μεθόδου HRM στα γονίδια *CFTR* και *ATP7B*

Με τη χρήση της μεθόδου HRM έχουν ελεγχθεί μέχρι σήμερα περίπου 4000 δείγματα στα πλαίσια του διαγνωστικού ελέγχου που παρέχει το εργαστήριο ιατρικής γενετικής για το γονίδιο *CFTR* και 150 για το γονίδιο *ATP7B*. Ο συνήθης έλεγχος για το γονίδιο *CFTR* είναι ικανός να αποκαλύψει το 90% των μεταλλάξεων που έχουν ανιχνευτεί στο Ελληνικό πληθυσμό και περιλαμβάνει των έλεγχο των εξονίων 3, 4, 7, 10, 11, 12, 13, 14b, 15, 16, 17b, 19, 20 και 21. Σε 750 δείγματα εξ' αυτών έχει γίνει έλεγχος όλων των κωδικοποιουσών περιοχών καθώς και έλεγχος για ελλείμματα και πολλαπλασιασμούς του γονιδίου *CFTR* με χρήση της μεθόδου MLPA καλύπτοντας με αυτό τον έλεγχο το 97% των μεταλλάξεων που έχουν ανιχνευτεί στον Ελληνικό πληθυσμό. Με τον περαιτέρω έλεγχο ανιχνεύτηκαν 36 φορείς. Οι μεταλλάξεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 30. Παράλληλα με τη μέθοδο MLPA σε έξι ασθενείς ανιχνεύτηκαν ελλείμματα του γονιδίου *CFTR*. Συγκεκριμένα ανιχνεύτηκαν ένα έλλειμμα ολόκληρου του γονιδίου, ένα έλλειμμα των εξονίων 2 και 3 σε ομοζυγωτία, ένα έλλειμμα του εξονίου 2, ένα έλλειμμα των εξονίων 16-17a-17b, ένα έλλειμμα 40Kb που περιλαμβάνει τα εξόνια 4 έως 11 και τέλος ένα έλλειμμα των εξονίων 4 έως 8.

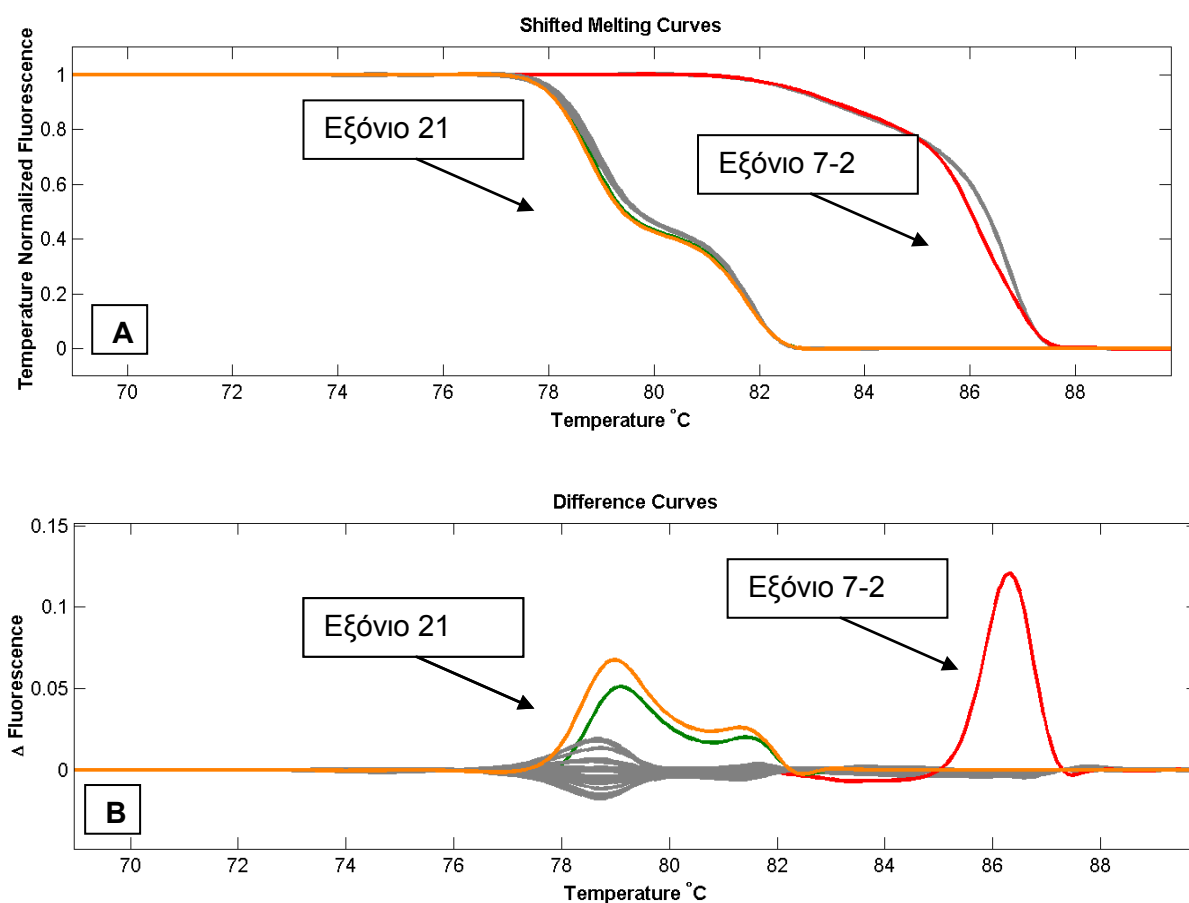
Εξόνιο	Μετάλλαξη	Συχνότητα
1	p.Q2X(R3W)	0,14
1	P5L	0,14
2	R31C	0,28
2	A46D	0,14
5	711+3A>G	0,28
6a	E217G	0,14
6a	G239R	0,14
6a	C276X	0,14
6b	E279D	0,14
9	Q452X	0,14
9	1497delGG	0,28
14a	C866Y	0,28
17a	L997F	0,85
17a	A1009T	0,28
17a	I1027T	0,14
17a	c.2997delA	0,14
18	c.3368-2A>G	0,14
18	D1152H	0,57
Intron 19	3849+10Kb T>C	0,14
exon 24	S1455X	0,14

Πίνακας 30. Οι μεταλλάξεις που έχουν ανιχνευτεί και οι συχνότητες τους με την εφαρμογή της μεθόδου HRM. Οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίζονται στα εξόνια που δεν περιλαμβάνονται στο τυπικό έλεγχο του γονιδίου *CFTR*.

Η ειδικότητα και ευαισθησία της μεθόδου έχει υπολογιστεί στο 100% από την αρχική μελέτη που είχαμε κάνει με έλεγχο 100 γνωστών και 100 τυφλών δειγμάτων σε όλα τα εξόνια. Παρόλο που η μέθοδος HRM είναι πολύ ευαίσθητη και κάθε μετάλλαξη έχει μοναδικό πρότυπο αποδιάταξης, δεν παύει να είναι μέθοδος σάρωσης και όχι γονοτύπισης. Έτσι προκειμένου να αποφευχθούν οι λανθασμένες διαγνώσεις όλα τα θετικά ευρήματα επιβεβαιώνονται με sequencing.

Ο έλεγχος που παρέχεται για τη νόσο Wilson καλύπτει το 88% των μεταλλάξεων που έχουν ανιχνευτεί στον Ελληνικό πληθυσμό και περιλαμβάνει τον έλεγχο των εξονίων 2, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16 και 21. Και σε αυτή τη περίπτωση κατά τη διαδικασία προτυποποίησης της μεθόδου ελέγχθηκαν για κάθε εξόνιο 100 δείγματα με γνωστούς γονοτύπους και 100 τυφλά δείγματα χωρίς πρότερη γνώση του γονοτύπου. Η ειδικότητα και η ευαισθησία της μεθόδου, βάσει των δοκιμών έχει υπολογιστεί στο 100%.

Στα πλαίσια της προτυποποίησης της μεθόδου HRM θελήσαμε να δούμε αν μπορεί να εφαρμοστεί ταυτόχρονη ανάλυση δύο διαφορετικών PCR προϊόντων τα οποία έχουν πολλαπλασιαστεί σε μια PCR αντίδραση. Ο σχεδιασμός των εκκινήτων επιτρέπει όλα τα προϊόντα PCR να πολλαπλασιάζονται στην ίδια θερμοκρασία. Έτσι προκειμένου να διαπιστώσουμε ποια προϊόντα μπορούν να αναλυθούν μαζί έπρεπε να διευκρινίσουμε ποια έχουν εντελώς ξεχωριστές θερμοκρασίες αποδιάταξης έτσι ώστε να έχουν ξεχωριστά προφίλ τα οποία δεν συμπίπτουν.



Εικόνα 35. Στην εικόνα A φαίνονται οι καμπύλες αποδιάταξης για τα εξόνια 21 και 7-2 του γονιδίου *CFTR*. Όπως φαίνεται στην εικόνα το εξόνιο 21 αποδιατάσσεται σε διαφορετική θερμοκρασία απ' ότι το εξόνιο 7-2. Στην εικόνα B φαίνονται οι ομαλοποιημένες καμπύλες αποδιάταξης. Από την εικόνα είναι φανερό ότι τα δύο αυτά εξόνια μπορούν να αναλυθούν μαζί στο ίδιο πείραμα χωρίς να υπάρχει πρόβλημα στην ανάλυση.

Η μελέτη που περιγράφεται στην εικόνα 35 πραγματοποιήθηκε για όλα τα εξόνια του γονιδίου *CFTR*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ζευγάρια εξονίων που μπορούσαν να αναλυθούν μαζί ήταν τα ακόλουθα: 1-2, 5-6a, 6b-24_2, 8-9, 7_2-16, 17a-24_1, 20-21 και Intron

19-22. Στο παράρτημα 10 παρουσιάζονται εικόνες από την ανάλυση πολλαπλών εξονίων σε ένα πείραμα. Είναι πολύ σημαντικό να τονίσουμε επίσης ότι τα δείγματα που έχουν πολλαπλασιαστεί σε πολλαπλή PCR αντίδραση μπορούν να αναλυθούν εν συνεχεία με sequencing χωρίς να χρειάζεται καινούργια PCR αντίδραση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση στην αντίδραση sequencing των εκκινητών που αντιστοιχούν στο κάθε προϊόν. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αλληλούχιση μόνο του τμήματος που μας ενδιαφέρει μειώνοντας σημαντικά το κόστος.

Αποτελέσματα της εφαρμογής της μεθόδου HRM για προγεννητική διάγνωση (PND) στο γονίδιο *CFTR*

Η μελέτη για την προτυποποίηση ενός πρωτοκόλλου για προγεννητική διάγνωση έγινε αναδρομικά σε δείγματα τα οποία είχαν ήδη αναλυθεί στο εργαστήριο ιατρικής γενετικής. Με αυτό τον τρόπο είχαμε ήδη ως δεδομένο το αποτέλεσμα για κάθε περιστατικό και παράλληλα μπορέσαμε να διαπιστώσουμε την δύναμη της μεθόδου στην ανάλυση παλαιών δειγμάτων τα οποία έχουν απομονωθεί με τελείως διαφορετικές μεθόδους. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη παρουσιάζονται στον πίνακα 31.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των εξονίων που ελέχθησαν με τη μέθοδο HRM καθώς και ένα παράδειγμα ανάλυσης των πολυμορφικών δεικτών για μια οικογένεια παρουσιάζονται στο παράρτημα 11.

Προκειμένου να καθορίσουμε την διαγνωστική απόδοση του πρωτοκόλλου HRM-PND υπολογίστηκε η ευαισθησία (sensitivity (Se)), η ειδικότητα (specificity (Sp)), το ποσοστό ψευδώς αρνητικών (false negative (FN)) και ψευδώς θετικών (false positive (FP)) αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του πίνακα 32. Οι γονότυποι των δειγμάτων αμνιακού υγρού και τροφοβλάστης που είχαν προέλθει από την εφαρμογή διαπιστευμένων εργαστηριακών μεθόδων (DGGE and sequencing) καθορίστηκαν ως «αληθινοί γονότυποι» και οι γονότυποι για τα ίδια δείγματα που προέκυψαν από την εφαρμογή του υπό διερεύνηση πρωτοκόλλου καθορίστηκαν ως «γονότυποι μελέτης HRM-PND». Για απλοποίηση των υπολογισμών οι

γονότυποι των δειγμάτων χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες: πάσχων και φυσιολογικό. Αυτό έγινε γιατί δυνητικά οι γονότυποι των εμβρύων μπορεί να αντιστοιχούν σε πέντε κατηγορίες: (i) φυσιολογικό, (ii) ετερόζυγο για τη μητρική μετάλλαξη, (iii) ετερόζυγο για την πατρική μετάλλαξη (iv) διπλός ετεροζυγώτης ή ομοζυγώτης (σε περιπτώσεις όπου οι γονείς φέρουν την ίδια μετάλλαξη). Έτσι ο όρος πάσχων καλύπτει τους διπλούς ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες για μια μετάλλαξη ενώ ο όρος φυσιολογικό αντιστοιχεί στους ετεροζυγώτες και φυσιολογικούς.

Οικογένεια	Μεταλλάξεις (εξόνιο)	Ημ. Παραλαβής (μ/χ)	Οικογένει α	Μεταλλάξεις (εξόνιο)	Ημ. Παραλαβής (μ/χ)
1	p.Glu826Lys (13) p.Phe508del (10)	3/2010	11	p.Arg74Trp (3) p.Phe508del (10)	9/2003
2	621+1G>T (intr.4) p.Gly85Glu (3)	7/2003	12	p.Asn1303Lys (21) p.Asn1303Lys (21)	7/2007
3*	p.Phe508del (10) p.Tyr301Cys (7)	1/2008	13*	p.Asn1303Lys (21) p.Phe508del (10)	5/2009
4	p.Trp496X (10) p.Gly469X (11)	9/2005	14	p.Phe508del (10) p.Phe305Val (7)	9/2006
5*	p.Gly542X (11) p.Phe508del (10)	6/2004	15	p.Phe508del (10) p.Phe508del (10)	9/2011
6	p.Phe508del (10) p.Phe508del (10)	2/2002	16	621+1G>T (intr.4) p.Phe508del (10)	11/2003
7	p.Phe508del (10) p.Phe508del (10)	3/2006	17	p.Phe508del (10) 3500-2A>G (intr.17b)	4/2010
8	p.Gly542X (11) p.Gly542X (11)	6/2012	18	p.Phe508del (10) p.Phe508del (10)	8/2011
9	p.Phe508del (10) 3500-2A>G (intr.17b)	9/2008	19	p.Phe508del (10) p.Phe508del (10)	8/2009
10*	p.Asn1303Lys (21) 621+1G>T (intr. 4)	6/2008	20*	1525-1G>A (intron 9) 3120+1G>A (intr. 16)	6/2010

Πίνακας 31. Περιστατικά προγεννητικού ελέγχου που αναλύθηκαν στην αναδρομική μελέτη. Για τις οικογένειες σημειωμένες με αστερίσκο παρελήφθησαν έτοιμα δείγματα DNA

Αληθινόι Γονότυποι (DGGE και sequencing)			
Γονότυποι Μελέτης HRM-PND	Πάσχων	Φυσιολογικό	Σύνολο
Πάσχων	a (αληθώς θετικό)	b (ψευδώς θετικό)	a + b
Φυσιολογικό	c (ψευδώς αρνητικό)	d (αληθώς αρνητικό)	c + d
Σύνολο	a + c	b + d	N
Ευαισθησία (Se); Αναλογία a/(a+c) Ειδικότητα (Sp); Αναλογία d/(b+d) Ψευδώς Αρνητικό (FN); Αναλογία c/(a+c) Ψευδώς Θετικό (FP); Αναλογία b/(b+d)		Αρνητική διαγνωστική αξία; Αναλογία d/(c+d) Θετική διαγνωστική αξία; Αναλογία a/(a+b)	

Πίνακας 32

Ικανότητα πολλαπλασιασμού και γονοτύπησης για την 1^η και 2^η PCR αντίδραση

Με τη χρήση αυτού του πρωτοκόλλου ελέγξαμε, αναδρομικά, 20 περιπτώσεις προγεννητικού ελέγχου για μεταλλάξεις του γονιδίου *CFTR* (συνολικά 76 δείγματα). Ο αριθμός των δειγμάτων περιλαμβάνει τα δείγματα μητέρα-πατέρα-έμβρυο καθώς και προηγούμενα παιδιά της οικογένειας όταν αυτά ήταν διαθέσιμα. Όλες οι αλληλουχίες στόχοι πολλαπλασιάστηκαν επιτυχώς στη 1^η αντίδραση PCR σε όλα τα δείγματα (76/76). Η γονοτύπηση καθώς και η ανάλυση των πολυμορφικών δεικτών ήταν επιτυχής σε όλα τα δείγματα. Γι' αυτό η 1^η 11-πλη και η 2^η 'nested' PCR αντίδραση έχουν ικανότητα πολλαπλασιασμού 100%.

Η επιτυχημένη ανάλυση όλων των δειγμάτων της μελέτης καταδεικνύει τη δύναμη της μεθόδου και την ευελιξία της καθώς τα δείγματα DNA που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από διαφορετικά βιολογικά υλικά (κύτταρα αμνιακού υγρού, κύτταρα τροφοβλάστης και περιφερικό αίμα) με την εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων απομόνωσης (αυτοματοποιημένη: Qiagen's MagAttract DNA Blood Kit και χειροκίνητη: Qiagen's QIAamp DNA Blood Mini Kit και τη μέθοδο Salting Out) και είχαν φυλαχθεί σε καταψύκτη -80°C. Η ανάλυση ήταν επιτυχής ακόμα και για τα δείγματα που είχαν σταλεί ως έτοιμο DNA στο εργαστήριο χωρίς πρότερη γνώση της μεθόδου απομόνωσης.

Η μέθοδος HRM-PND αποτελεί ένα αποτελεσματικό ισχυρό διαγνωστικό εργαλείο όπως φαίνεται από τον υπολογισμό των παραμέτρων που ορίζουν την διαγνωστική ικανότητα. Η μέθοδος εμφανίζει 100% ευαισθησία και ειδικότητα με μηδενικά ποσοστά ψευδώς θετικών και ψευδώς αρνητικών δειγμάτων.

Τα δείγματα που αναλύθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη φέρουν μεταλλάξεις σε εννιά διαφορετικά εξόνια. Το πρωτόκολλο επιτρέπει τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό όλων των εξονίων καθώς και 2 ενδογενών πολυμορφικών δεικτών για ανάλυση απλοτύπων. Είναι πολύ σημαντικό να τονίσουμε ότι η δυνατότητα εφαρμογής της πολλαπλής 1^{ης} PCR αντίδρασης επιτρέπουν στο εργαστήριο να προβεί σε ταυτόχρονη ανάλυση όλων των προγεννητικών που μπορεί να ζητηθούν χωρίς να υπάρχει περιορισμός από το συνδυασμό μεταλλάξεων που φέρει η κάθε οικογένεια. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης είναι υπό δημοσίευση.

Αποτελέσματα της εφαρμογής της μεθόδου HRM για προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD) στο γονίδιο *CFTR*

Προτού το πρωτόκολλο μπει σε κλινική εφαρμογή, η μέθοδος δοκιμάστηκε σε απομονωμένα λεμφοκύτταρα τα οποία είχαν απομονωθεί από το περιφερικό αίμα των αντίστοιχων ζευγαριών φορέων μεταλλάξεων στο γονίδιο *CFTR*. Συνολικά έχουν ελεγχθεί 34 βλαστομερίδια. Πέντε δείγματα απέτυχαν να δώσουν αποτέλεσμα σε όλους τους γενετικούς τόπους και γονοτύπηση επετεύχθη σε 29 από 29 δείγματα. 17 έμβρυα ήταν κατάλληλα για εμβρυομεταφορά βάσει των γονοτύπων. Οι γονότυποι της ΠΓΔ επιβεβαιώθηκαν σε τρεις εγκυμοσύνες (2 δίδυμες κυήσεις και μια μονή) με προγεννητική διάγνωση (λήψη κυττάρων αμνιακού υγρού ή λήψη κυττάρων τροφοβλάστης).



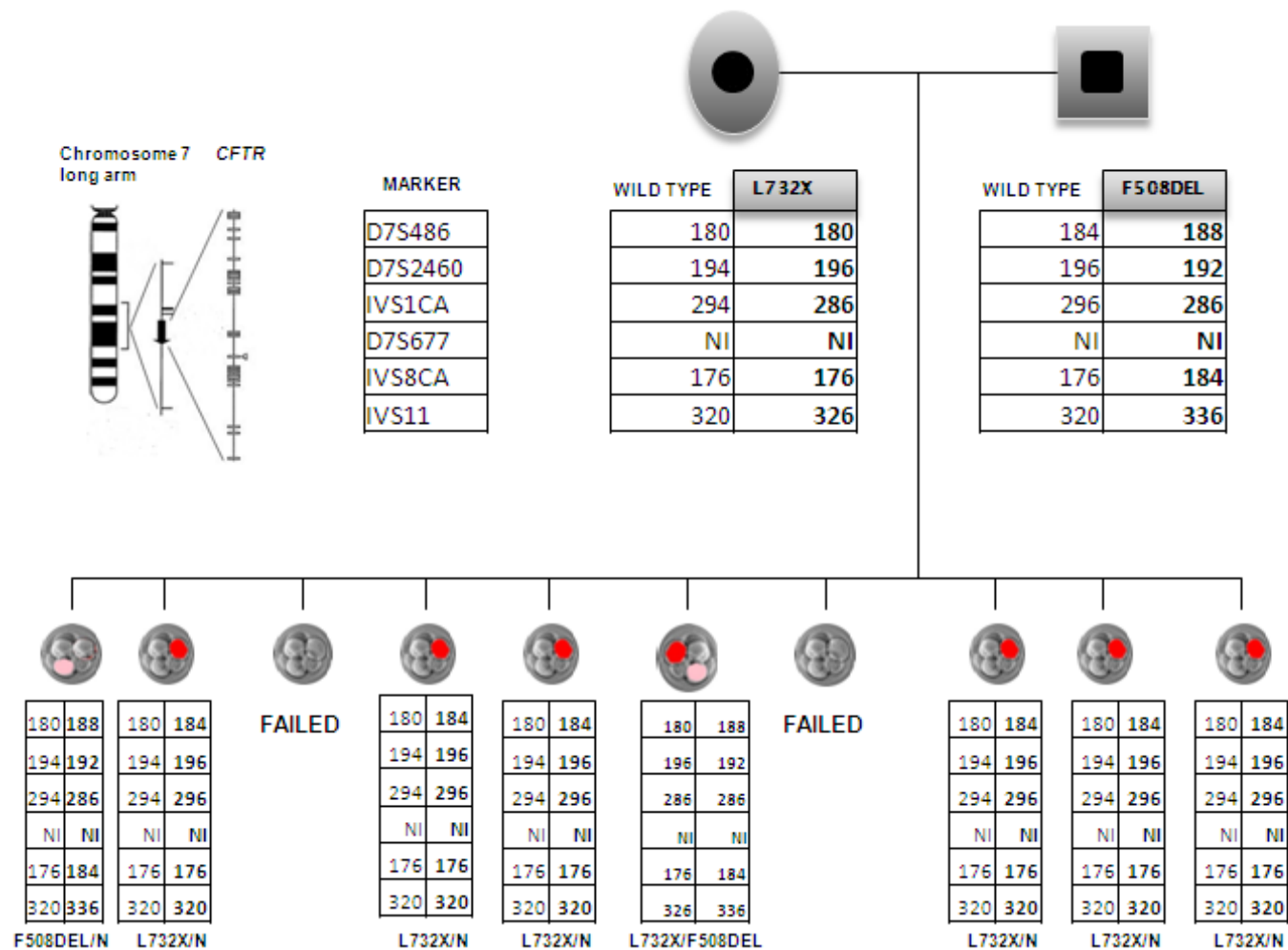
Εικόνα 36. Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας προτυποποίησης του πρωτοκόλλου για ΠΓΔ. Το πρωτόκολλο δοκιμάζεται και τυποποιείται σε πρώτο στάδιο σε απομονωμένα, λεμφοκύτταρα φορέων προκειμένου να υπολογιστεί το ποσοστό αποτυχίας πολλαπλασιασμού

Μέχρι σήμερα το πρωτόκολλο έχει εφαρμοστεί σε τέσσερις κύκλους προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης. Οι συνδυασμοί των μεταλλάξεων που έφεραν τα συγκεκριμένα ζευγάρια καθώς και τα αποτελέσματα της εφαρμογής παρουσιάζονται στον πίνακα 33.

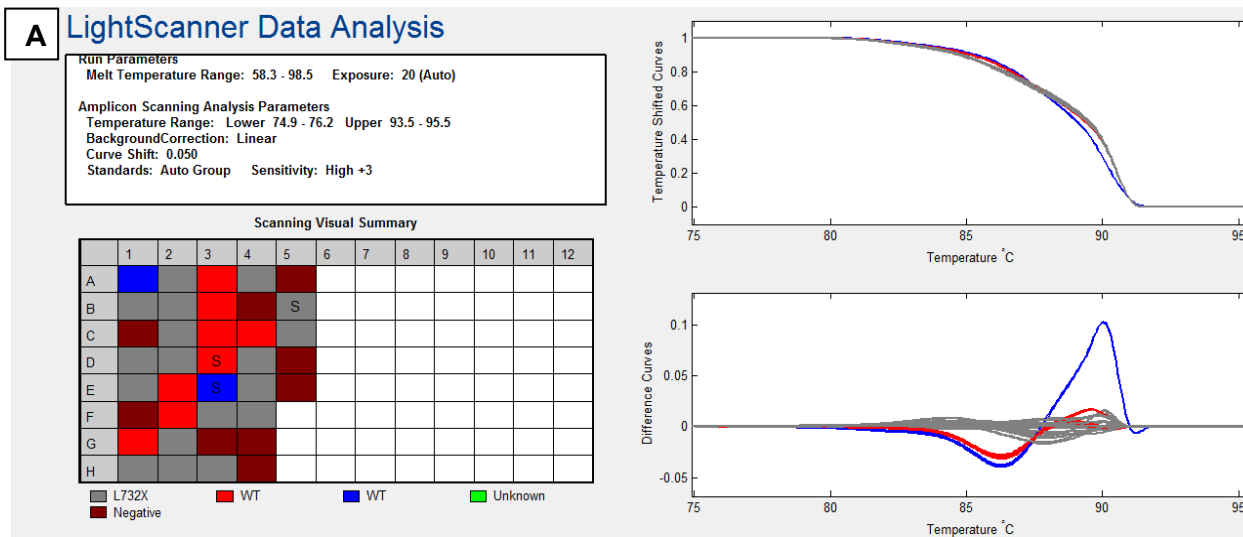
Στην εικόνα 37 και 38 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της ΠΓΔ για το περιστατικό 4. Το συγκεκριμένο ζευγάρι φέρει τις μεταλλάξεις p.Phe508del και p.Leu732X. Η διάγνωση έγινε σε βιοψίες 10 βλαστομεριδίων τα οποία αντιστοιχούσαν σε έμβρυα 3^{ης} ημέρας. Δύο από τα δέκα κύτταρα απέτυχαν να πολλαπλασιαστούν σε κάθε γενετική θέση, πιθανότερα λόγω κακής ποιότητας εμβρύου. Σε κανέναν από τους γενετικούς τόπους που αναλύθηκαν δεν παρατηρήθηκε αποτυχία πολλαπλασιασμού από το ένα αλληλόμορφο (allele drop out- ADO).

Περιστατικό	Συνδυασμός μεταλλάξεων	Εξόνια	# βλαστομεριδίων που αναλύθηκαν	# βλαστομεριδίων που πολλαπλασιάστηκαν	# βλαστομεριδίων που γονοτυπήθηκαν	# φυσιολογικών βλαστομεριδίων για εμβρυομεταφορά	Επίτευξη εγκυμοσύνης	Επιβεβαίωση του αποτελέσματος της ΠΓΔ με προγεννητικό έλεγχο
1	p.Arg334Gln c.480+3A>G	7-2 & 4-2	5	4	4	2	όχι	όχι
2	p.Phe508del p.Phe508del	10	11	10	10	6	ναι	ναι
3	p.Phe508del c.480+1G>T	10 & 4-2	8	7	7	4	ναι	ναι
4	p.Phe508del p.Leu732X	10 & 13-3	10	8	8	5	ναι	ναι

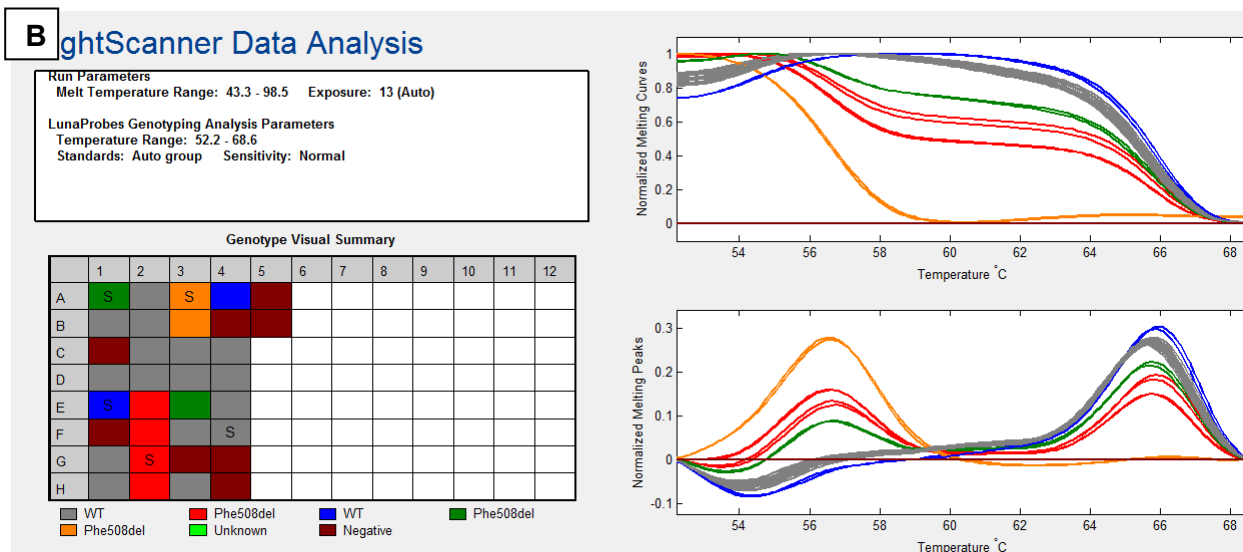
Πίνακας 33. Συνδυασμός μεταλλάξεων για τα 4 ζευγάρια στα οποία εφαρμόστηκε η μέθοδος HRM-PGD. Ο πολλαπλασιασμός για πέντε δείγματα απέτυχε σε όλες τις γενετικές θέσεις, πιθανόν λόγω κακής ποιότητας του κυττάρου. Στις 3 από τις 4 περιπτώσεις επιτεύχθηκε εγκυμοσύνη και τα αποτελέσματα της προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης επιβεβαιώθηκαν με προγεννητικό έλεγχο.



Εικόνα 37. 10 Απλότυποι του ζευγαριού και των εμβρύων στο περιστατικό 4. Αρχικά έγινε έλεγχος των μεγεθών των πολυμορφικών δεικτών για το ζευγάρι και του υλικού από προηγούμενη παθολογική κύηση για να καθοριστεί η φάση και η πληροφοριακότητα των δεικτών. Ο δείκτης D7S677 δεν ήταν πληροφοριακός (NI). Το σχήμα παρουσιάζει το φυσιολογικό και παθολογικό απλότυπο για τους 6 δείκτες (εξωγονιδιακοί: D7S486, D7S2490, ενδογονιδιακοί: IVS1CA, IVS8CA, D7S677, IVS11CA).



Εικόνα 38. Στην εικόνα Α παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προεμφυτευτικού ελέγχου για τη μετάλλαξη p.Leu732X (εξόνιο 13-3) και στην εικόνα Β τα αποτελέσματα για την μετάλλαξη p.Phe508del με τη χρήση μη-σημασμένου ανιχνευτή. Εικόνα Α: Οι γκρι καμπύλες αντιστοιχούν στη μετάλλαξη ενώ οι κόκκινες και οι μπλε αντιστοιχούν στη φυσιολογική αλληλουχία.



Εικόνα Β: οι μπλε και οι γκρι καμπύλες αντιστοιχούν στη φυσιολογική αλληλουχία, οι κόκκινες και οι πράσινες στους ετεροζυγώτες p.Phe508del και οι πορτοκαλί στους ομοζυγώτες για την μετάλλαξη p.Phe508del. Το δείγμα του ομοζυγώτη δεν ανήκει σε κάποιο μέλος της οικογένειας αλλά χρησιμοποιείται ως δείγμα ελέγχου για μεθοδολογία.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο διαρκώς αυξανόμενος όγκος μοριακών εξετάσεων στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, δημιούργησε την ανάγκη για την εφαρμογή τεχνικών υψηλής αξιοπιστίας με κύρια χαρακτηριστικά την ταχύτητα και τη δυνατότητα εφαρμογής σε μεγάλη κλίμακα. Η μεθοδολογία αντικατάστασης θα έπρεπε να παρέχει το πλεονέκτημα ταχείας ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων, με ευαισθησία και αξιοπιστία σε ποσοστά 100%. Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει ως σκοπό την ανάπτυξη προηγμένης τεχνολογίας για την ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε επίπεδο DNA, ικανή να αντικαταστήσει την υπάρχουσα μεθοδολογία του εργαστηρίου.

Προκειμένου να καταλήξουμε στην κατάλληλη μεθοδολογία αντικατάστασης, έγινε σχεδιασμός και πειραματική αξιολόγηση διαφορετικών μεθοδολογιών. Το κριτήριο για την τελική επιλογή ήταν η αξιοπιστία και η ευκολία εφαρμογής, η ευελιξία τροποποίησης του πρωτοκόλλου στα καινούργια δεδομένα και η δυνατότητα εφαρμογής σε μεγάλη κλίμακα.

Επίσης λαμβάνοντας υπ' όψιν τους γρήγορους ρυθμούς στους οποίους πρέπει να λειτουργεί ένα διαγνωστικό εργαστήριο, σκοπός αυτής της μελέτης είναι και η ανάδειξη ενός αξιόπιστου αλγόριθμου με τον οποίο θα γίνεται η αξιολόγηση των αλλαγών σε κωδικοποιούσες και μη κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου, οι οποίες μπορεί να έχουν αντίκτυπο σε επίπεδο έκφρασης, και για τις οποίες δεν υπάρχει πρότερη καταγραφή.

NanoChip 400™ (NC400)

Η πρώτη μέθοδος που αναπτύχθηκε στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής διατριβής ήταν ένα πρωτόκολλο για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *ATP7B*, μεταλλάξεις του οποίου ευθύνονται για την εμφάνιση της νόσου Wilson στην πλατφόρμα Nanogen, Nanochip 400 (NC400). Η αρχή λειτουργίας αυτής της πλατφόρμας είναι οι ηλεκτρονικές μικροσυστοιχίες.

Με τη χρήση αυτής της τεχνολογίας έγινε η ανίχνευση των 20 πιο κοινών μεταλλάξεων του γονιδίου *ATP7B*. Ο έλεγχος έγινε σε 144 δείγματα αίματος νεογνών από το Νοσοκομείο της Καλύμνου και του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης. Στα δείγματα αυτά

ανιχνεύτηκαν οι μεταλλάξεις p.His1069Gln (με συχνότητα 34,5% στο γενικό πληθυσμό) και p.Arg969Gln (με συχνότητα 13% στο γενικό πληθυσμό) οι οποίες αποτελούν και τις πιο συχνές μεταλλάξεις στον Ελληνικό πληθυσμό. Συγκεκριμένα στα 144 δείγματα που ελέχθηκαν ανιχνεύθηκαν 14 ετεροζυγώτες για την μετάλλαξη p.His1069Gln (6 με καταγωγή την Κάλυμνο και 8 με καταγωγή την Κρήτη), 2 ετεροζυγώτες για την μετάλλαξη p.Arg969Gln (με καταγωγή την Κρήτη) και 2 προσυμπτωματικοί ασθενείς με γονότυπο p.[His1069Gln] + [His1069Gln] (ομοζυγώτες για την μετάλλαξη με καταγωγή τη Κάλυμνο). Ειδικότερα για την περιοχή της Καλύμνου η μετάλλαξη p.His1069Gln είναι αυτή που ανιχνεύεται στο 70% των φορέων και των ασθενών της νόσου και σε συνδυασμό με τη p.Arg969Gln το ποσοστό ανίχνευσης αγγίζει το 75%.

Ο έλεγχος αυτών των δειγμάτων έγινε στα πλαίσια πιλοτικού προγράμματος ανίχνευσης φορέων και προσυμπτωματικών ασθενών σε περιοχές της Ελλάδος όπου παρουσιάζεται αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της νόσου. Οι δύο ασθενείς που διαγνώστηκαν στα πλαίσια του πιλοτικού προγράμματος λαμβάνουν τακτική ιατρική παρακολούθηση και έχουν ήδη ξεκινήσει θεραπεία, προτού εμφανίσουν συμπτώματα. Έτσι αναμένεται να έχουν τη καλύτερη δυνατή εξέλιξη. Η αξία αυτού του προγράμματος διαφαίνεται ξεκάθαρα σε αυτή τη περίπτωση καθώς ελαχιστοποιούνται οι εκδηλώσεις της νόσου.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη πιλοτική εφαρμογή του προγράμματος καταδεικνύουν ότι η περιοχή της Καλύμνου, καθώς και άλλες περιοχές με υψηλή συχνότητα της νόσου Wilson, θα επωφελούνταν ιδιαίτερα από την εφαρμογή ενός επισήμου προγράμματος ανίχνευσης φορέων.

Η πλατφόρμα της εταιρίας Nanogen – NanoChip 400TM (NC400) ήταν από τις πρώτες πλατφόρμες που κυκλοφόρησαν με αρχή λειτουργίας της ηλεκτρονικές μικροσυστοιχίες. Το σημαντικότερο στοιχείο για την εφαρμογή της μεθόδου είναι ο σχεδιασμός του πρωτοκόλλου. Είναι πολύ σημαντικό κατά τον σχεδιασμό, να ληφθούν υπ' όψιν οι ιδιαιτερότητες της κάθε μετάλλαξης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε έτσι ώστε να επιλεχθεί η καταλληλότερη αλυσίδα, ο σταθεροποιητής και ο τύπος του ανιχνευτή.

Τα προτερήματα της μεθόδου είναι ότι μπορούμε σε μικρό σχετικά χρόνο να ελέγξουμε μέχρι και 384 δείγματα (χρησιμοποιώντας 1 πιάτο 384 θέσεων) για μια μετάλλαξη ή όπως στο πρωτόκολλο που σχεδιάστηκε σε αυτή τη περίπτωση 64 δείγματα για 20 μεταλλάξεις με μια μόνο μικροσυστοιχία. Τα αποτελέσματα είναι ξεκάθαρα, θετικό ή αρνητικό για την αλλαγή που ελέγχουμε και καθώς αποτελεί μέθοδο γονοτύπησης δεν απαιτείται επιβεβαίωση του αποτελέσματος με sequencing.

Τα δύο πιο σημαντικά μειονεκτήματα της μεθόδου είναι το κόστος και η δυσκολία τροποποίησης του πρωτοκόλλου. Τόσο τα αποκλειστικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στη πλατφόρμα NanoChip 400TM (μικροσυστοιχία, ρυθμιστικά διαλύματα) όσο και τα μη ειδικά (εκκινητές, σταθεροποιητές και ανιχνευτές) είναι πολύ ακριβά λόγω των τροποποιήσεων που απαιτούν.

Ειδικότερα, η μικροσυστοιχία μπορεί να εισαχθεί στο μηχάνημα μόνο δέκα φορές και αυτό πρέπει να γίνει σε συγκεκριμένο χρόνο από την πρώτη εισαγωγή. Κατά συνέπεια αν δεν χρησιμοποιηθούν όλες οι θέσεις την κατάλληλη χρονική στιγμή, αχρηστεύονται αυξάνοντας υπερβολικά το κόστος της μεθόδου. Σε ένα διαγνωστικό εργαστήριο, δεδομένου ότι το αποτέλεσμα του μοριακού ελέγχου έχει ιδιαίτερη σημασία για τον ασθενή, δεν είναι πάντα εφικτό να περιμένουμε για τη συμπλήρωση του αριθμού των δειγμάτων που θα ελεγχθούν. Έτσι ο περιορισμός στο πόσες φορές μπορεί να εισαχθεί η μικροσυστοιχία στο μηχάνημα μπορεί να καταλήξει σε αχρήστευσή της, χωρίς να έχουν καλυφθεί όλες οι θέσεις.

Η τροποποίηση του πρωτοκόλλου δεν είναι μια απλή διαδικασία. Οποιαδήποτε αλλαγή γίνει, είτε προστεθεί ή αφαιρεθεί κάποια μετάλλαξη το πρωτόκολλο θα πρέπει να προτυποποιηθεί εξ' αρχής. Αυτό απαιτεί ειδικές γνώσεις από τον χειριστή καθώς και αρκετό χρόνο. Ως εκ τούτου αν η μέθοδος εφαρμοστεί σε διαγνωστικό πλαίσιο, θα πρέπει να ακολουθείται ως έχει, ουσιαστικά χωρίς τη δυνατότητα εισαγωγής καινούργιων μεταλλάξεων.

Luminex xMap™

Η λειτουργία της πλατφόρμας Luminex xMap™ βασίζεται στη κυτταρομετρία ροής. Όλες οι αναλυόμενες ουσίες βρίσκονται σε διάλυμα και η ανίχνευση τους επιτυγχάνεται χάρις των laser που μπορούν να ανιχνεύσουν τις προσδεσμένες στα αντιδραστήρια, χρωστικές.

Ο στόχος για την συγκεκριμένη εφαρμογή ήταν να ενσωματωθούν στο αντιδραστήριο που κυκλοφορούσε στην αγορά (Tag-It™ CFTR 40+4 Mutation Detection Kit της Tm-Bioscience™) οι «εθνικές μεταλλάξεις» για την Ελλάδα και την ευρύτερη περιοχή της Νότιας Ευρώπης.

Ο στόχος όταν σχεδιάζουμε ένα τέτοιο πρωτόκολλο είναι να επιτύχουμε αξιόπιστη ανίχνευση όλων των μεταλλάξεων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο σχεδιασμός στόχευε στην ανίχνευση των 50 συχνότερων μεταλλάξεων της Νότιας Ευρώπης. Αυτό σημαίνει ότι στο τελικό μείγμα θα έπρεπε να ανιχνευτούν με υψηλή αξιοπιστία 100 διαφορετικά προϊόντα (50 που αντιστοιχούν στα φυσιολογικά αλληλόμορφα και 50 που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις).

Και σε αυτή τη περίπτωση ο σχεδιασμός του πρωτοκόλλου, έτσι ώστε να επιτύχουμε μέγιστη απόδοσή και ιδανικές συνθήκες για όλες τις μεταλλάξεις που θέλουμε να ανιχνεύσουμε, είναι μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία. Από τη στιγμή που έχει προτυποποιηθεί, αν θέλουμε να προσθέσουμε μια νέα μετάλλαξη ή να αφαιρέσουμε κάποια από τις υπάρχουσες, θα πρέπει να γίνει ο σχεδιασμός και η προτυποποίηση από την αρχή καθιστώντας την οποιαδήποτε αλλαγή ουσιαστικά αδύνατη.

Το σύστημα Luminex είναι ένα κλειστό σύστημα και από τη στιγμή που θέλουμε να κάνουμε οποιαδήποτε τροποποίηση στο πρωτόκολλο που έχει σχεδιαστεί και εφαρμόζεται, πρέπει να γίνει όλος ο σχεδιασμός και η προτυποποίηση εξ' αρχής. Το κόστος και γι' αυτό το σύστημα είναι υψηλό καθώς απαιτεί εξειδικευμένα αντιδραστήρια. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ο συνδυασμός των αντιδραστηρίων κατά την προετοιμασία ενός πειράματος. Το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε ήταν «in house», αυτό σημαίνει ότι τα αντιδραστήρια δεν κυκλοφόρησαν στη αγορά ως έτοιμο kit, και πως κάθε φορά ο χρήστης πρέπει να προετοιμάσει τα μείγματα των εκκινητών για την PCR, για την αλληλομορφοειδική PCR καθώς και για τα σφαιρίδια. Αυτή η προετοιμασία περιλαμβάνει πολλά στάδια για τα οποία απαιτείται

ιδιαίτερη προσοχή. Λάθος χειρισμός σε οποιοδήποτε στάδιο της προετοιμασίας των αντιδραστηρίων οδηγεί σε αποτυχία του πειράματος. Το γεγονός αυτό καθιστά πολύ δύσκολη την εφαρμογή της μεθόδου στα πλαίσια της διάγνωσης.

Στα πλαίσια της προτυποποίησης της μεθόδου διαπιστώθηκε ότι για κάποιες μεταλλάξεις δεν μπορούσε να γίνει ανίχνευση ούτε του φυσιολογικού ούτε του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου (3152delT, C276X, M952I, 3199del6 και 2143delT). Δυστυχώς αυτό το πρόβλημα δεν ξεπεράστηκε παρ' όλες τις προσαρμογές που επιχειρήθηκαν. Έτσι ενώ οι υπόλοιπες μεταλλάξεις μπορούσαν να ανιχνευτούν, η αποτυχία ανίχνευσης για τις πέντε που προαναφέραμε οδήγησε σε αποτυχία όλου του πρωτοκόλλου.

Το ουσιαστικό αποτέλεσμα της ανάπτυξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου *CFTR* με τη πλατφόρμα Luminox, ήταν η συνεργασία με την εταιρεία Luminox corp. στον σχεδιασμό του νέου αντιδραστηρίου που τελικά κυκλοφόρησε στην αγορά και καλύπτει κάποιες από τις «Εθνικές μεταλλάξεις» της Νότιας Ευρώπης. Η εταιρεία χρησιμοποίησε εν μέρει τον σχεδιασμό που είχε γίνει στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής διατριβής προκειμένου να ενσωματώσει τις «Εθνικές μεταλλάξεις» της νότιας Ευρώπης στο kit που κυκλοφόρησε το 2009.

Ο σχεδιασμός που έγινε στη πλατφόρμα Luminox για το γονίδιο *ATP7B* ήταν επιτυχημένος. Η ανίχνευση για όλες τις μεταλλάξεις που στοχεύαμε ήταν επιτυχής, όμως τα προβλήματα που αναφερθήκαν παραπάνω ισχύουν και σε αυτή την περίπτωση. Προκειμένου να αξιοποιηθεί ο σχεδιασμός, προσπαθήσαμε να βρούμε μια άλλη παρόμοια μέθοδο, πιο απλή και πιο οικονομική.

Έτσι σε συνεργασία με το τμήμα Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών σχεδιάστηκε ένα σύστημα ταινίας ξηρών αντιδραστηρίων για την ανίχνευση των μεταλλάξεων. Η μέθοδος περιλαμβάνει αρχικά την ενίσχυση με πολλαπλή PCR των τμημάτων του γονιδίου που περιέχουν τις εξεταζόμενες μεταλλάξεις. Το προϊόν της αντίδρασης PCR υποβάλλεται σε αντίδραση επέκτασης εκκινητή (PEXT) και η οπτική ανίχνευση πραγματοποιείται με ταινία ξηρών αντιδραστηρίων με τη βοήθεια νανοσφαιριδίων χρυσού συζευγμένων με αντίσωμα έναντι βιοτίνης. Η ανίχνευση στην ταινία είναι οπτική και βασίζεται στην εμφάνιση ερυθρών

κηλίδων που δημιουργούνται λόγω αλληλεπίδρασης και συσσώρευσης των νανοσφαιριδίων χρυσού που φέρουν αντίσωμα έναντι βιοτίνης με τα προϊόντα επέκτασης που ακινητοποιούνται σε συγκεκριμένες περιοχές της μεμβράνης μέσω υβριδισμού.

Αρχικά η μέθοδος εφαρμόστηκε για τις πέντε πιο κοινές μεταλλάξεις H1069Q, R969Q, Q289X, L936X και 2530delA. Πραγματοποιήθηκαν βελτιστοποιήσεις στην αντίδραση PEXT για να επιτευχθεί καλύτερη απόδοση και εκλεκτική οπτική διάκριση των αλληλόμορφων. Για την αξιολόγηση της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε ανάλυση 20 χαρακτηρισμένων και 14 μη χαρακτηρισμένων κλινικών δειγμάτων. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των χαρακτηρισμένων δειγμάτων βρέθηκαν σε πλήρη συμφωνία με τον γονότυπο τους.



Εικόνα 39. Ειδικότητα των εκκινητών της αντίδρασης PEXT, όπου N και M εκκινητές: αλληλοειδικοί εκκινητές για φυσιολογικά και μεταλλαγμένα αλληλόμορφα, 1: αντίδραση παρουσία δείγματος φυσιολογικού ομοζυγώτη, 2: αντίδραση παρουσία συνθετικού δείγματος που φέρει και τις πέντε μεταλλάξεις και 3: αντίδραση παρουσία δείγματος διπλά ετερόζυγου για τις μεταλλάξεις L936X/H1069Q.

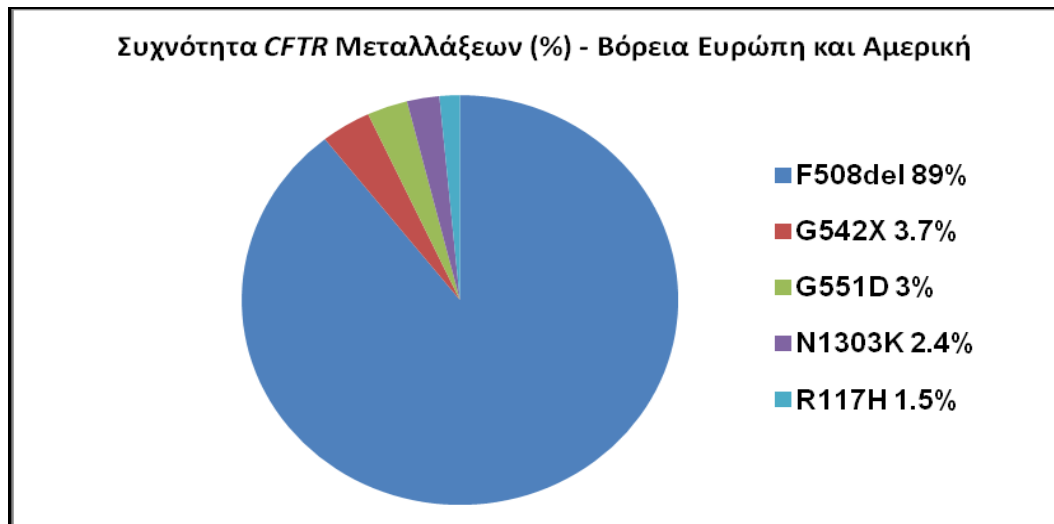
Τα ενθαρρυντικά πρώτα αποτελέσματα, οδήγησαν στην επέκταση του πρωτοκόλλου ώστε να ελεγχθούν επιπλέον 5 μεταλλάξεις και συγκεκριμένα οι I1148T, 845delT, X1466R, 2299insC και 1708-1G>A. Παρόλο που οι δοκιμές είναι σε πρώιμο στάδιο τα αποτελέσματα είναι και σε αυτή τη περίπτωση πολύ ενθαρρυντικά. Εφόσον πιστοποιηθεί η μέθοδος ανίχνευσης μεταλλάξεων με τη χρήση ταινιών ξηρών αντιδραστηρίων για διαγνωστική χρήση, θα αποτελέσει μια πολύ ελκυστική διαγνωστική επιλογή καθώς είναι εύκολη, γρήγορη, οικονομική και δεν απαιτεί εξειδικευμένα μηχανήματα.

LightScanner

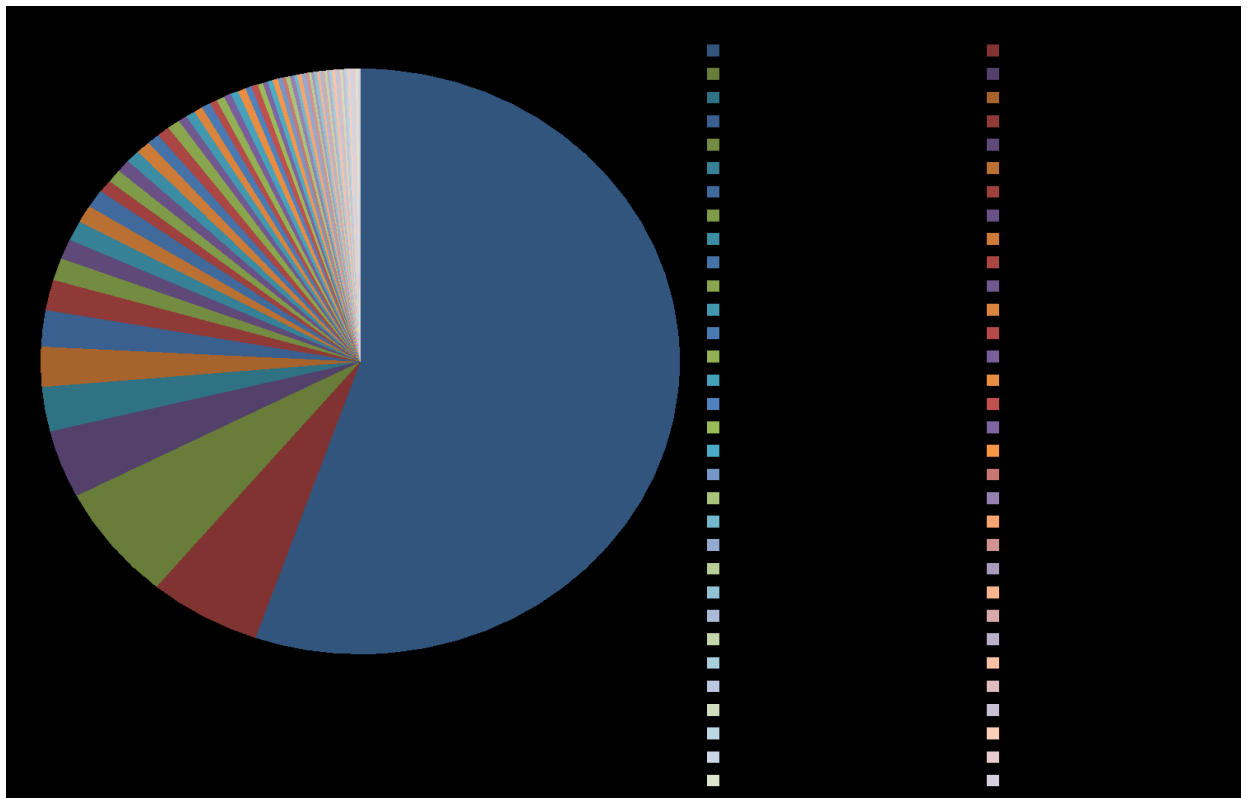
Η κυστική ίνωση αποτελεί ένα νόσημα πρόκληση για το σχεδιασμό πρωτοκόλλων μοριακής διάγνωσης, κυρίως λόγω της μεγάλης μοριακής ετερογένειας που παρουσιάζεται. Στη χώρα μας καθώς και σε άλλες Μεσογειακές χώρες (Ισπανία, Ιταλία) παρατηρείται η μεγαλύτερη μοριακή ετερογένεια στην Ευρώπη η οποία αποδίδεται στην μεγάλη ιστορία μετανάστευσης πληθυσμών από την Μέση Ανατολή προς την Ευρώπη μέσω αυτών των χωρών. Σε αυτές τις χώρες, κατά μέσο όρο 25 μεταλλάξεις εντοπίζονται στο 85% των αλληλομόρφων και η μετάλλαξη p.Phe508del, εμφανίζεται με ποσοστό 50-60%.

Στη διάρκεια αυτής της διδακτορικής διατριβής και κατά τα χρόνια λειτουργίας του εργαστηρίου ιατρικής γενετικής, από το 1992 έως σήμερα έχει ελεγχθεί η πλειοψηφία των Ελλήνων ασθενών με κυστική ίνωση. Από το 2003 όπου δημοσιεύτηκε η πρώτη μελέτη για τον Ελληνικό πληθυσμό (18) ο αριθμός των ασθενών που έχουν ελεγχθεί είναι πλέον 810 και ο έλεγχος έχει επεκταθεί σε όλες τις κωδικοποιούσες περιοχές καθώς στην ανίχνευση μεγάλων ελλειμμάτων ή διπλασιασμών του γονιδίου με την τεχνική MLPA. Τα καινούργια δεδομένα (αδημοσίευτα στοιχεία) καταδεικνύουν ακόμα πιο έντονα την ετερογένεια του Ελληνικού πληθυσμού καθώς στους 810 ασθενείς που ελέγχθηκαν σε 1535 χρωμοσώματα, (σύνολο 1620 χρωμοσωμάτων) εντοπίστηκαν 135 διαφορετικές μεταλλάξεις ενώ 88 χρωμοσώματα παρέμειναν αδιευκρίνιστα.

Στις εικόνες 40 και 41 παρουσιάζονται τα γραφήματα με τις πιο κοινές μεταλλάξεις στην Βόρεια Ευρώπη – Αμερική και στην Ελλάδα αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί πως λόγω του πλήθους των μεταλλάξεων στον Ελληνικό πληθυσμό στο γράφημα παρουσιάζονται μόνο αυτές που εμφανίζονται με συχνότητα μεγαλύτερη του 0.1% (64 μεταλλάξεις σε σύνολο 135). Οι υπόλοιπες 71 μεταλλάξεις έχουν ανιχνευτεί σε μικρότερο ποσοστό και οι περισσότερες μόνο σε μια περίπτωση.



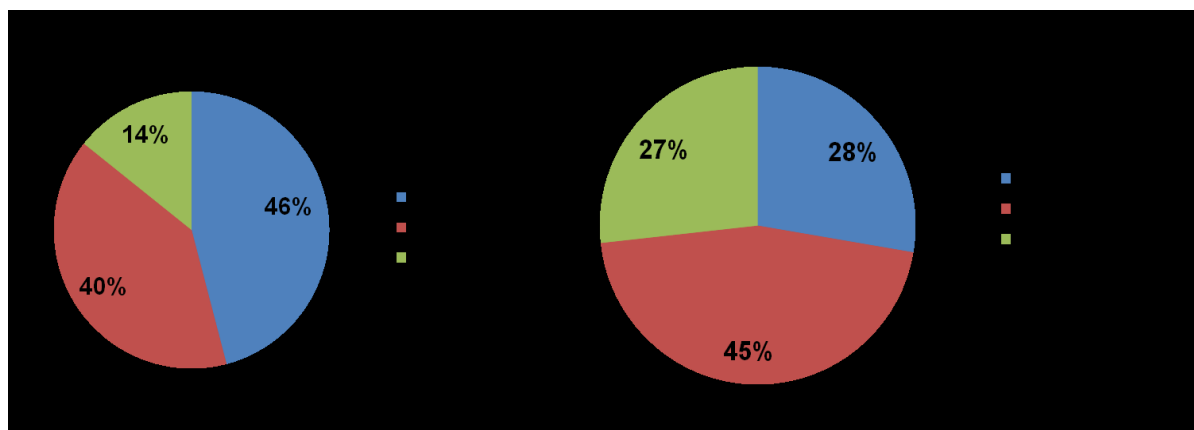
Εικόνα 40. Οι πέντε πιο κοινές μεταλλάξεις καλύπτουν το 95% των μεταλλάξεων στη Βόρεια Ευρώπη και στους πληθυσμούς της Αμερικής.



Εικόνα 41. Οι 64 πιο κοινές μεταλλάξεις που ανιχνεύονται στον Ελληνικό πληθυσμό από σύνολο 135 μεταλλάξεων. Στο γράφημα παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις με συχνότητα 0.1% ή μεγαλύτερη.

Αντιστοίχως ο πιο κοινός γονότυπος στην Ευρώπη είναι οι ομοζυγώτες για την μετάλλαξη p.Phe508del (46%), με δεύτερο συχνότερο γονότυπο τους σύνθετους ετεροζυγώτες όπου μια τουλάχιστον μετάλλαξη είναι η p.Phe508del (40%) και τέλος οι γονότυποι στους

οποίους δεν εμφανίζεται η p.Phe508del (14%). Στην Ελλάδα ο πιο συχνός γονότυπος είναι οι σύνθετοι ετεροζυγώτες με τουλάχιστον μια μετάλλαξη να είναι η p.Phe508del (45%) και σε ίδια ποσοστά εμφανίζονται οι ομοζυγώτες για την p.Phe508del (28%) και οι γονότυποι στους οποίους δεν εμφανίζεται η p.Phe508del (27%). Τα γραφήματα για αυτά τα στοιχεία παρουσιάζονται στην εικόνα 42.



Εικόνα 42. Κατανομή των πιο κοινών γονοτύπων σε ασθενείς με κυστική ίνωση στην Ευρώπη σε αντιπαράθεση με τους ασθενείς στην Ελλάδα.

Στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής διατριβής σχεδιάστηκαν τρία διαφορετικά πρωτόκολλα ανίχνευσης μεταλλάξεων στο γονίδιο *CFTR*. Ο στόχος ήταν να προτυποποιηθεί μια μεθοδολογία η οποία θα μπορεί να εφαρμοστεί στα πλαίσια ενός διαγνωστικού εργαστηρίου και να καλύπτει με αξιοπιστία υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων. Σύμφωνα με τα παραπάνω είναι φανερό πως η μεγάλη μοριακή ετερογένεια των μεταλλάξεων στο γονίδιο *CFTR* στον Ελληνικό πληθυσμό, δεν επιτρέπει σε ένα εργαστήριο αναφοράς να χρησιμοποιεί μέθοδο ανίχνευσης συγκεκριμένων μόνο μεταλλάξεων.

Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας δείχνουν ότι η καταλληλότερη μέθοδος για ένα εργαστήριο αναφοράς είναι η ανάλυση αποδιάταξης υψηλής ευκρίνειας. Αυτή η μεθοδολογία επιτρέπει την ανίχνευση όλων των μεταλλάξεων που βρίσκονται στο τμήμα του DNA που αναλύουμε και ως εκ τούτου είναι ιδανική για την μεγάλη μοριακή ετερογένεια του Ελληνικού πληθυσμού. Το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε είναι απλό και ευέλικτο, μπορούμε εύκολα να

προσθέσουμε ή να αφαιρέσουμε περιοχές του γονιδίου που θέλουμε να ελέγξουμε. Από άποψης κόστους είναι οικονομικό, αφού το ίδιο PCR προϊόν μπορεί μετέπειτα να χρησιμοποιηθεί σε αντίδραση αλληλούχισης περιορίζοντας το κόστος.

Η καινοτομία που προέκυψε στα πλαίσια αυτής της έρευνας είναι η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου για προγεννητική διάγνωση και ενός πρωτοκόλλου για προεμφυτευτική γενετική διάγνωση με τη χρήση της πλατφόρμας Light Scanner. Μέχρι σήμερα η χρήση DNA δειγμάτων από διαφορετικές πηγές, διαφορετικά πρωτόκολλα απομόνωσης και με τόσο μεγάλες διαφορές στις συγκεντρώσεις σε ένα πείραμα μελέτης αποδιάταξης υψηλής ευκρίνειας ήταν απαγορευτική. Το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε ξεπερνάει όλα τα προβλήματα που αναφέραμε και ειδικά στη περίπτωση της προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης τα αποτελέσματα είναι θεαματικά.

Πλέον η μεγάλη μοριακή ετερογένεια των μεταλλάξεων του γονιδίου *CFTR* και οι πολλοί διαφορετικοί συνδυασμοί μεταλλάξεων στα ζευγάρια που απευθύνονται στο εργαστήριο ιατρικής γενετικής για ΠΓΔ δεν αποτελούν πρόβλημα όταν σχεδιάζουμε το εξατομικευμένο πρωτόκολλο για κάθε ζευγάρι. Αυτό που ισχύει μέχρι σήμερα για τη ΠΓΔ της κυστικής ίνωσης στα περισσότερα διαγνωστικά εργαστήρια είναι η διάγνωση να βασίζεται σε μελέτη σύνδεσης καθώς είναι πολύ δύσκολο να σχεδιάζονται συνεχώς καινούργια πρωτόκολλα προσαρμοσμένα στις μεταλλάξεις κάθε ζευγαριού. Πλέον, όμως έχουμε τη δυνατότητα να προσφέρουμε εξατομικευμένο πρωτόκολλο για κάθε πιθανό συνδυασμό μετάλλαξης, με απευθείας ανίχνευση της παθολογικής αλλαγής και την τόσο πολύτιμη ανάλυση σύνδεσης να λειτουργεί επικουρικά στην επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

Αλγόριθμος για την αξιολόγηση των αλλαγών που ανιχνεύονται για πρώτη φορά

Η ταυτοποίηση των γονιδίων, μεταλλάξεις των οποίων ευθύνονται για την εμφάνιση μονογονιδιακών νοσημάτων και η ανάπτυξη των τεχνικών μοριακής ανάλυσης, έδωσε την δυνατότητα στους ερευνητές να πραγματοποιούν μοριακούς ελέγχους για την διερεύνηση των ασθενών και την ανίχνευση των φορέων. Εφόσον ο έλεγχος δεν περιορίζεται σε συγκεκριμένες καταγεγραμμένες αλλαγές, αλλά χρησιμοποιούνται πρωτόκολλα σάρωσης γονιδίων, είναι αναμενόμενο να ανιχνεύονται κάποιες αλλαγές για πρώτη φορά. Σε τέτοιες περιπτώσεις δημιουργείται πρόβλημα με το χαρακτηρισμό αυτών των αλλαγών, ως παθολογικές ή ουδέτερες, και την παροχή γενετικής συμβουλευτικής.

Ιδανικά, η δράση κάθε τέτοιας αλλαγής θα πρέπει να καθορίζεται με την διενέργεια λειτουργικών μελετών και μελετών έκφρασης. Στα πλαίσια όμως ενός διαγνωστικού εργαστηρίου κάτι τέτοιο είναι πρακτικά αδύνατον τόσο από άποψη κόστους όσο και από άποψη χρόνου. Σε ένα διαγνωστικό εργαστήριο, όπως το εργαστήριο ιατρικής γενετικής, απευθύνονται για μοριακό έλεγχο των γονιδίων *CFTR* και *ATP7B* διαφορετικές ομάδες. Η μια ομάδα είναι ασθενείς στους οποίους δεν έχει τεθεί μοριακή διάγνωση καθώς και οι συγγενείς τους. Μια δεύτερη ομάδα είναι άτομα γενικού πληθυσμού τα οποία προσέρχονται για έλεγχο φορείας. Ειδικά για το γονίδιο *CFTR*, υπάρχουν άλλες δύο σημαντικές ομάδες που απευθύνονται για μοριακό έλεγχο. Οι ασθενείς με μονοσυμπτωματικές μορφές της νόσου (νόσος σχετιζόμενη με το *CFTR* - *CFTR* related disease) καθώς και ζευγάρια σε προχωρημένα στάδια κύησης και στα οποία έχει παρατηρηθεί υπερηχογένεια εντέρου στο έμβρυο κατά τον υπέρηχο δευτέρου τριμήνου (60-62). Δυστυχώς λόγω της απουσίας κατοχυρωμένου προγράμματος πρόληψης, πολλά ζευγάρια προσέρχονται για προληπτικό έλεγχο, χωρίς δηλαδή κάποια ευρήματα, ενώ ήδη υπάρχει εγκυμοσύνη περιορίζοντας σημαντικά τα χρονικά περιθώρια για την διενέργεια λειτουργικών μελετών.

Για τους λόγους που προαναφέρθηκαν είναι πολύ σημαντικό να δημιουργηθεί ένας αλγόριθμος, σύμφωνα με τον οποίο θα μπορούμε με υπολογιστικά προγράμματα να αξιολογούμε τις αλλαγές για τις οποίες δεν υπάρχει πρότερη καταγραφή. Το πρόβλημα

εντοπίζεται κυρίως στις καινούργιες αλλαγές που ανιχνεύονται στο γονίδιο *CFTR*. Ο αλγόριθμος μπορεί να εφαρμοστεί για κάθε αλλαγή που εμφανίζεται σε γονίδιο που εμπλέκεται σε μονογονιδιακό νόσημα.

Η χρήση των μεθόδων σάρωσης του γονιδίου μπορεί να οδηγήσει στην ανίχνευση αλλαγών οι οποίες δεν έχουν πρότερη καταγραφή. Όταν ανιχνεύονται τέτοιες αλλαγές θα πρέπει να πραγματοποιείται διεξοδικός έλεγχος για την ανίχνευση σύνθετων αλληλομόρφων (63). Κάποιες αλλαγές μπορούν αδιαμφισβήτητα να χαρακτηριστούν παθολογικές. Αυτές είναι κυρίως ανερμηνεύσιμες αλλαγές (εισαγωγή πρώιμου κωδικονίου τερματισμού), ελλείμματα ή προσθήκες βάσεων με αποτέλεσμα την μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης καθώς και μεταλλάξεις των συντηρημένων νουκλεοτιδίων GT / AT στις θέσεις ματίσματος. Τέτοιες αλλαγές μπορούν με υψηλή βεβαιότητα να χαρακτηριστούν παθολογικές καθώς αναμένεται να επηρεάζουν την λειτουργικότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης.

Η ανάγκη δημιουργίας ενός αλγορίθμου αξιολόγησης, δημιουργείται από αλλαγές οι οποίες δεν εμπίπτουν στις παραπάνω περιπτώσεις και είναι:

1. Παρερμηνεύσιμες αλλαγές
2. Συνώνυμες αλλαγές και αλλαγές στα εσόνια

Αυτή τη στιγμή έχουμε στη διάθεση μας μια πληθώρα υπολογιστικών προγραμμάτων με τα οποία μπορούμε να εξετάσουμε τις παρερμηνεύσιμες αλλαγές και να τις κατατάξουμε σε παθολογικές και ουδέτερες. Τα δεδομένα που λαμβάνονται υπόψη σε αυτά τα προγράμματα είναι η αλληλουχία των αμινοξέων και η δομή της πρωτεΐνης, δηλαδή ο τύπος και η σειρά των καταλοίπων, οι φυσικοχημικές ιδιότητες των αλλαγών όπως είναι η πολικότητα, το φορτίο και η υδροφοβικότητα. Πολύ σημαντικό δεδομένο είναι κατά πόσο το αμινοξύ που διερευνούμε είναι συντηρημένο εξελικτικά σε ομόλογες πρωτεΐνες άλλων οργανισμών. Οι συγκρίσεις γίνονται βάσει της παραδοχής πως αν ένα αμινοξύ στη πρωτεΐνη είναι σημαντικό, τότε θα είναι συντηρημένο σε όλες τις ομόλογες πρωτεΐνες στα υπόλοιπα είδη και ως εκ τούτου αλλαγές σε τέτοιες θέσεις είναι συχνά παθολογικές. Τέλος άλλη μια παράμετρος είναι η εμπλοκή της πρωτεΐνης σε κάποιο δίκτυο πρωτεϊνών και αν η αλλαγή οδηγεί σε αποτυχία σύνδεσης της με άλλες πρωτεΐνες του δικτύου.

Όταν αναλύουμε μια αλλαγή θα πρέπει πάντα να χρησιμοποιούμε τουλάχιστον τρία διαφορετικά υπολογιστικά προγράμματα και να λαμβάνουμε υπόψη μας τους περιορισμούς τους. Ιδανικά θα πρέπει να περιλαμβάνουμε προγράμματα που αναλύουν διαφορετικά δεδομένα. Τα προγράμματα που χρησιμοποιούμε στο εργαστήριο ιατρικής γενετικής είναι το PolyPhen-2 (64), το SIFT (Shorting Intolerant From Tolerant) (65), το AGVGD (Align Grantham Variation-Grantham Deviation) (66, 67).

Το **PolyPhen-2** είναι ένα αυτοματοποιημένο εργαλείο για την πρόβλεψη της πιθανής συνέπειας που μπορεί να έχει η αλλαγή ενός αμινοξέος στην δομή και την λειτουργία μιας πρωτεΐνης. Η πρόβλεψη βασίζεται σε αρκετές παραμέτρους όπως είναι η αλληλουχία, φυλογενετικές και δομικές πληροφορίες που χαρακτηρίζουν την αλλαγή. Οι αλλαγές χαρακτηρίζονται ως ουδέτερες (benign), δυνατόν να είναι παθολογικές (possibly damaging) και πιθανόν παθολογικές (probably damaging). Αν τα δεδομένα δεν επιτρέπουν την ασφαλή πρόβλεψη, τότε το αποτέλεσμα της αναζήτησης είναι άγνωστο (unknown).

Το **SIFT** είναι ένα υπολογιστικό πρόγραμμα που στοχεύει στην αξιολόγηση μιας παρερμηνεύσιμης αλλαγής εξετάζοντας κατά πόσο αφορά μια συντηρημένη θέση σε ομόλογες πρωτεΐνες άλλων ειδών. Ο αλγόριθμος έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να υποθέτει ότι οι σημαντικές θέσεις στη πρωτεΐνη έχουν διατηρηθεί δια μέσου της εξέλιξης. Έτσι αλλαγές σε αυτές τις θέσεις το πιθανότερο είναι να επηρεάζουν τη λειτουργία της. Οι συγκρίσεις γίνονται με όσο το δυνατό περισσότερες αλληλουχίες και η πρόβλεψη αφορά κάθε θέση στη πρωτεΐνη και κάθε πιθανό συνδυασμό. Το αποτέλεσμα δίνεται ως ανεκτό (tolerated) ή μη ανεκτό (non tolerated) και συνοδεύεται από ένα σκορ από το 1 (ανεκτό – ουδέτερο) έως το 0 (μη-ανεκτό – παθολογικό). Όλες οι προβλέψεις με σκορ 0.05 και μεγαλύτερο χαρακτηρίζονται ως ανεκτές, ενώ οι προβλέψεις με σκορ 0.05 και μικρότερο μη-ανεκτές.

Το **AGVGD** είναι ένα εργαλείο που αναπτύχθηκε με τη χρήση ευθυγράμμισης πολλαπλών αλληλουχιών. Για να προβλέψει τη φύση των παρερμηνεύσιμων αλλαγών αρχικά υπολογίζει την ποικιλομορφία κατά Grantham (GV), η οποία μετρά το βαθμό βιοχημικής ποικιλομορφίας μεταξύ των καταλοίπων σε μια δεδομένη θέση των αλληλουχιών. Έπειτα υπολογίζει την παρέκκλιση κατά Grantham (GD), μετρώντας τη βιοχημική απόσταση του

αλλαγμένου κατάλοιπου από τη δεδομένη θέση βάσει του GV. Αυτές οι τιμές συνδυάζονται προκειμένου να προβλεφθεί η δράση της αλλαγής. Το αποτέλεσμα αποτελείται από μια γκάμα διαβαθμίσεων, ξεκινώντας από το πιο πιθανό να παρεμποδίζει τη λειτουργία της πρωτεΐνης μέχρι το πιο απίθανο.

Όταν η καινούργια αλλαγή είναι συνώνυμη (δηλαδή δεν αλλάζει το αμινοξύ που κωδικοποιεί) ή εντοπίζεται σε θέση ιντρονίου πρέπει να αξιολογηθεί με βάση τις πιθανές της επιπτώσεις στο μάτισμα. Το μάτισμα, δηλαδή η αποκοπή των εσόνιων και η συρραφή των κωδικοποιουσών περιοχών προκειμένου να προκύψει το ώριμο mRNA, το οποίο θα δώσει το τελικό πρωτεϊνικό προϊόν, είναι μια πολύ δυναμική διαδικασία κατά την οποία ενεργοποιούνται πολλοί κυτταρικοί μηχανισμοί και λαμβάνουν μέρος μια πληθώρα πρωτεϊνών και παραγόντων που καθοδηγούν όλη τη διαδικασία. Είναι πολύ σημαντικό να ελέγχουμε τόσο τις αλλαγές στα εσόνια όσο και τις αλλαγές εντός των εξονίων (συνώνυμες και μη) για πιθανές επιπτώσεις στο μάτισμα.

Οι πληροφορίες που καθοδηγούν το κυτταρικό μηχανισμό του ματίσματος καθορίζεται από την αλληλουχία του pre-mRNA καθώς αυτό περιέχει συγκεκριμένα μοτίβα τα οποία αναγνωρίζονται από απομακρυσμένα ρυθμιστικά στοιχεία. Οι απόλυτοι μηχανισμοί και κανόνες σύμφωνα με τους οποίους ο μηχανισμός του ματίσματος αναγνωρίζει τα όρια των εξονίων και των εσόνιων δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί.

Είναι γνωστό ότι τα όρια των εξονίων και των εσόνιων καθορίζονται από αλληλουχίες που ονομάζονται 5' και 3' θέσεις ματίσματος στις οποίες προσδένονται ριβονουκλεοπρωτεΐνες. Επιπλέον οι αλληλουχίες που θα γίνουν εξόνια ή εσόνια καθορίζονται και από άλλα μοτίβα όπως είναι οι θέσεις των σημείων διακλάδωσης (branch point), οι πολυπυριμιδικές αλληλουχίες, οι εξονικοί ενισχυτές ματίσματος (exonic splicing enhancers), οι εξονικοί αποσιωπητές ματίσματος (exonic splicing silencers), οι εσονικοί ενισχυτές ματίσματος (intronic splicing enhancers) και οι εσονικοί αποσιωπητές ματίσματος (intronic splicing silencers). Βέβαια η ύπαρξη όλων αυτών των παραγόντων και η αναγνώρισή τους σε μια αλληλουχία δε δίνει όλες τις απαντήσεις καθώς ακόμα δεν γνωρίζουμε πως γίνεται η επιλογή των

παραγόντων που θα συμμετάσχουν στο μάτισμα σε περίπτωση που υπάρχουν πολύ κοντινά ή αλληλεπικαλυπτόμενα τέτοια μοτίβα.

Οι αλλαγές στην αλληλουχία μπορούν να τροποποιήσουν την διαδικασία του ματίσματος αποδυναμώνοντας, ενδυναμώνοντας, καταστρέφοντας ή δημιουργώντας μοτίβα που ρυθμίζουν το μάτισμα, οδηγώντας σε αλλαγή του προτύπου ματίσματος. Το αποτέλεσμα τέτοιων αλλαγών μπορεί να είναι η παραγωγή μη λειτουργικών τελικών προϊόντων. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω καταλαβαίνουμε πόσο σημαντική είναι η αξιολόγηση όλων των αλλαγών για τις πιθανές επιπτώσεις τους στους παράγοντες ματίσματος.

Η αξιολόγηση γίνεται με τρία διαφορετικά προγράμματα το Human Splicing Finder 2.4.1(68), NNSplice (69) και το SpliceAid2 (70).

Το **Human Splicing Finder** είναι ένα εργαλείο με το οποίο μπορούμε να προβλέψουμε τις επιπτώσεις των μεταλλάξεων στους παράγοντες ματίσματος καθώς να αναγνωρίσουμε παράγοντες ματίσματος σε κάθε ανθρώπινη αλληλουχία. Περιλαμβάνει όλες τα διαθέσιμα υποστρώματα για πρόβλεψη των βοηθητικών αλληλουχιών όπως οι Serine-Arginine (SR) πρωτεΐνες, οι 9G8 και Tra2-b G-πρωτεΐνες και οι hnRNP A1 ριβονουκλεοπρωτεΐνες. Επίσης έχει τη δυνατότητα αξιολόγησης της ικανότητας των 3' και 5' θέσεων ματίσματος καθώς και των θέσεων branch point. Το **NNSplice** (Splice site prediction by Neural Networks) είναι ένα πρόγραμμα με το οποίο μπορεί να γίνει αξιολόγηση των 3' και 5' θέσεων ματίσματος που υπάρχουν στην αλληλουχία μας και πως αυτές επηρεάζονται από την ύπαρξη της αλλαγής που εξετάζουμε. Όταν από την ανάλυση με αυτά τα προγράμματα, προβλέπεται μια καινούργια θέση ματίσματος, θεωρείται ότι θα μπορούσε να παρεμβαίνει στο φυσικό μηχανισμό ματίσματος όταν το σκορ του είναι υψηλότερο από το σκορ της φυσικής θέσης ματίσματος άγριου τύπου.

Το **SpliceAid2** είναι ένα εργαλείο με το οποίο μπορούμε να γνωρίζουμε ποιες πρωτεΐνες μπορούν να προσδεθούν σε μια RNA αλληλουχία και ως εκ τούτου να την οδηγήσουν στην ωρίμανση. Αυτές οι πληροφορίες μπορούν να βοηθήσουν στην κατανόηση των αλλαγών που προκύπτουν λόγω των μεταλλάξεων. Τα σκορ που προκύπτουν όταν αναλύουμε τη φυσιολογική αλληλουχία και την αλληλουχία με την αλλαγή, συγκρίνονται και οι

αλλαγές κατατάσσονται ως σημαντικές ή ασήμαντες για το μάτισμα. Αυτό που μας ενδιαφέρει είναι η ύπαρξη ή η απουσία των παραγόντων ματίσματος και όχι το επίπεδο έκφρασης τους. Δυστυχώς δεν γνωρίζουμε τι ποσοστό έκφρασης απαιτείται για κάθε παράγοντα ματίσματος ώστε να έχει αντίκτυπο στο μάτισμα.

Όταν αναλύουμε μια αλλαγή για την επίδραση που μπορεί να έχει στο μάτισμα μας ενδιαφέρει αν **(1)** δημιουργούνται καινούργιες θέσεις ματίσματος ή ενδυναμώνονται κρυφές θέσεις ματίσματος καθώς τέτοιες αλλαγές μπορούν να επιμηκύνουν ή να βραχύνουν το εμπλεκόμενο εξόνιο ή εσόνιο, **(2)** αποδυναμώνονται οι 5' κρυφές θέσεις ματίσματος στα εσόνια καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει στην διατήρηση των εσονίων στο ώριμο mRNA (71), **(3)** αποδυναμώνονται οι φυσικές θέσεις ματίσματος καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει στη παραγωγή μη λειτουργικών ισομορφών της πρωτεΐνης **(4)** ενδυναμώνονται οι φυσικές θέσεις ματίσματος καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει στην εξαφάνιση των εναλλακτικών ισομορφών της πρωτεΐνης και τέλος **(5)** δημιουργούνται ή καταργούνται θέσεις πρόσδεσης στα εξόνια για παράγοντες ματίσματος που λειτουργούν ως εξονικοί αποσιωπητές ματίσματος καθώς αυτό αποτελεί συνήθως σημαντικό γεγονός που οδηγεί στην παράλειψη εξονίων κατά το σχηματισμό του ώριμου mRNA (72, 73).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η πρόοδος της γενωμικής, η ταυτοποίηση των γονιδίων που εμπλέκονται στην εμφάνιση γενετικών νοσημάτων καθώς και η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών για την ανάλυση του γονιδιώματος δημιουργούν συνεχώς καινούργιες προκλήσεις στο πεδίο της γενετικής. Ο κλάδος της μοριακής διαγνωστικής είναι ένας από του πιο δυναμικούς καθώς διαρκώς προκύπτουν νέα δεδομένα τα οποία πρέπει με γρήγορο ρυθμό να ενσωματωθούν στην καθημερινή πράξη. Χαρακτηριστικά μπορούμε να αναφέρουμε πως σταθερά από το 2000 έως το 2012, κάθε χρόνο δημοσιεύονται περίπου 700 επιστημονικές εργασίες με θέμα τις τεχνικές μοριακής διάγνωσης.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ως σκοπό την ανάπτυξη προηγμένης τεχνολογίας για την ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών στο DNA. Από το 2006 έως σήμερα τα δεδομένα έχουν αλλάξει τόσο ώστε οι τεχνικές που θεωρούνταν τότε αιχμή της τεχνολογίας τώρα να είναι σχεδόν ξεπερασμένες.

Ο αρχικός σχεδιασμός της μελέτης περιελάμβανε τη χρήση δύο πλατφορμών γενετικής ανάλυσης, του Luminox xMAP και του NanoChip400, στις οποίες έγινε σχεδιασμός για την ανίχνευση μεταλλάξεων για δύο μονογονιδιακά νοσήματα, τη κυστική ίνωση και τη νόσο Wilson. Ο σκοπός ήταν το πρωτόκολλο να ανιχνεύει τις πιο κοινές μεταλλάξεις, για κάθε νόσημα, στον Ελληνικό πληθυσμό. Το στάδιο του σχεδιασμού των πρωτοκόλλων αποδείχθηκε ιδιαίτερα απαιτητικό καθώς έπρεπε να ληφθούν υπόψη πολλοί διαφορετικοί παράγοντες. Η επιτυχία των πρωτοκόλλων εξαρτιόταν από την ικανότητα να ανιχνεύσουμε κάθε διαφορετική μετάλλαξη στις ίδιες συνθήκες. Έπρεπε κάθε μετάλλαξη να ανιχνεύεται με σταθερή απόδοση και αξιοπιστία σε κάθε εφαρμογή του πρωτοκόλλου. Κατά τη διάρκεια της εφαρμογής επιβεβαιώθηκε ο επιτυχής σχεδιασμός καθώς επετεύχθη επιτυχής γονοτύπηση των δειγμάτων που ελέγχθηκαν. Το πραγματικό μειονέκτημα των δυο αυτών μεθόδων, όταν εφαρμόζονται σε ένα εργαστήριο αναφοράς, είναι η ουσιαστική αδυναμία τροποποίησης τους. Θεωρητικά είναι δυνατή η τροποποίηση τους, ώστε να εισάγουμε ή να αφαιρέσουμε τις μεταλλάξεις που ανιχνεύουν, πρακτικά όμως αδύνατη.

Στη διάρκεια διεξαγωγής της διδακτορικής διατριβής, ο διαγνωστικός μοριακός έλεγχος για την νόσο Wilson και την κυστική ίνωση πραγματοποιούνταν με τη μέθοδο DGGE, η οποία είναι ικανή να ανιχνεύσει οποιαδήποτε αλλαγή στην αλληλουχία στο τμήμα του DNA που εξετάζουμε. Με τη χρήση αυτής της μεθόδου, επιβεβαιώθηκε η πολύ μεγάλη μοριακή ετερογένεια του Ελληνικού πληθυσμού και για τα δύο νοσήματα, ιδιαιτέρως όμως για τη κυστική ίνωση. Πολύ συχνά ανιχνεύαμε καινούργιες μεταλλάξεις (17) ή σπάνιες μεταλλάξεις που είχαν βρεθεί μόνο μια ή δυο φορές σε προηγούμενα περιστατικά.

Αυτή η πολύ σημαντική διαπίστωση οδήγησε στην ανάγκη σχεδιασμού μιας καινούργιας μεθόδου η οποία θα επέτρεπε την σάρωση ολόκληρων περιοχών και κατά επέκταση την ανίχνευση οποιασδήποτε αλλαγής υπήρχε. Επιπλέον θα έπρεπε να είναι ευέλικτη στην τροποποίηση, με υψηλή αξιοπιστία και ευαισθησία και ικανή να αναλύει μεγάλο αριθμό δειγμάτων σε μικρό χρονικό διάστημα. Μια τέτοια μέθοδος θα ήταν ικανή να αντικαταστήσει την υπάρχουσα μεθοδολογία σε ένα εργαστήριο αναφοράς. Γι' αυτό το λόγο, στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής διατριβής, προστέθηκε η χρήση μιας ακόμα πλατφόρμας του LightScanner. Σε αυτή τη πλατφόρμα σχεδιάστηκαν πρωτόκολλα ανίχνευσης μεταλλάξεων για τη κυστική ίνωση και νόσο Wilson. Η αρχή λειτουργίας της είναι η ανάλυση αποδιάταξης υψηλής ευκρίνειας (High Resolution Melting Analysis – HRM). Ουσιαστικά με τη χρήση αυτής της μεθόδου μπορούμε να σαρώσουμε όποια αλληλουχία μας ενδιαφέρει και να διαπιστώσουμε κάθε παρέκκλιση από την φυσιολογική αλληλουχία. Η ταυτοποίηση της αλλαγής πραγματοποιείται στη συνέχεια με sequencing ή με τη χρήση ανιχνευτών. Με αυτή τη μέθοδο μπορούμε να ελέγχουμε, οικονομικά, με υψηλή αξιοπιστία και ευαισθησία όλες τις κωδικοποιούσες περιοχές που μας ενδιαφέρουν για τα δύο, υπό εξέταση γονίδια, αυξάνοντας το ποσοστό ανίχνευσης για το γονίδιο *CFTR* στο 95% και για το γονίδιο *ATP7B* στο 90%.

Τελικά η μέθοδος HRM, όπως σχεδιάστηκε στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής εργασίας, αντικατέστησε την μεθοδολογία DGGE, καθώς μπορεί να προσφέρει πολύ υψηλό ποσοστό ανίχνευσης, ζητούμενο για ένα εργαστήριο αναφοράς, σε χαμηλό κόστος και με δυνατότητα ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε μικρό χρόνο. Παράλληλα σχεδιάστηκαν και προτυποποιήθηκαν πρωτόκολλα για εφαρμογή της μεθόδου HRM για προγεννητική και

προεμφυτευτική γενετική διάγνωση. Αυτές οι μέθοδοι εφαρμόστηκαν για πρώτη φορά από το εργαστήριο ιατρικής γενετικής και αποτελούν καινοτομία στον τομέα της μοριακής διάγνωσης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*. 1993 Jul 2;73(7):1251-4.
2. Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science*. 1992 May 8;256(5058):774-9.
3. Farrell PM. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cyst Fibros*. 2008 Sep;7(5):450-3.
4. Schwarzer JU, Schwarz M. Significance of CFTR gene mutations in patients with congenital aplasia of vas deferens with special regard to renal aplasia. *Andrologia*. 2012 Feb 17.
5. Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, et al. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*. 1991 May;10(1):214-28.
6. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989 Sep 8;245(4922):1073-80.
7. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989 Sep 8;245(4922):1066-73.
8. Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros*. 2002 Mar;1(1):13-29.
9. Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev*. 1999 Jan;79(1 Suppl):S23-45.
10. Cystic Fibrosis Mutation Database
<http://www.genet.sickkids.on.ca>. Accessed May 2012.

11. Bobadilla JL, Macek M, Jr., Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002 Jun;19(6):575-606.
12. Estivill X, Bancells C, Ramos C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat.* 1997;10(2):135-54.
13. Gaskin KJ. CFTR gene and cystic fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004 Feb;19(2):228.
14. Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet.* 2003 Sep;67(Pt 5):471-85.
15. Koch C, Cuppens H, Rainisio M, Madessani U, Harms H, Hodson M, et al. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF): comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. *Pediatr Pulmonol.* 2001 Jan;31(1):1-12.
16. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration.* 2000;67(2):117-33.
17. Poulou M, Fylaktou I, Fotoulaki M, Kanavakis E, Tzetis M. Cystic fibrosis genetic counseling difficulties due to the identification of novel mutations in the CFTR gene. *J Cyst Fibros.* 2012 Jul;11(4):344-8.
18. Kanavakis E, Efthymiadou A, Strofalis S, Doudounakis S, Traeger-Synodinos J, Tzetis M. Cystic fibrosis in Greece: molecular diagnosis, haplotypes, prenatal diagnosis and carrier identification amongst high-risk individuals. *Clin Genet.* 2003 May;63(5):400-9.
19. Yu J, Chen Z, Ni Y, Li Z. CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2012 Jan;27(1):25-35.
20. Tomaiuolo R, Fausto M, Elce A, Strina I, Ranieri A, Amato F, et al. Enhanced frequency of CFTR gene variants in couples who are candidates for assisted reproductive technology treatment. *Clin Chem Lab Med.* 2011 Aug;49(8):1289-93.

21. Grosse SD, Rogowski WH, Ross LF, Cornel MC, Dondorp WJ, Khoury MJ. Population screening for genetic disorders in the 21st century: evidence, economics, and ethics. *Public Health Genomics*. 2010;13(2):106-15.
22. McClaren BJ, Metcalfe SA, Aitken M, Massie RJ, Ukoumunne OC, Amor DJ. Uptake of carrier testing in families after cystic fibrosis diagnosis through newborn screening. *Eur J Hum Genet*. 2010 Oct;18(10):1084-9.
23. Roberts T, Schwarz MJ, Kerr-Liddell R, Hinks JL, Super M. Cascade carrier-testing in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2003 Dec;4(4):293-8.
24. Lissens W, Liebaers I. The genetics of male infertility in relation to cystic fibrosis. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1997 Dec;11(4):797-817.
25. de Becdelievre A, Costa C, Jouannic JM, LeFloch A, Giurgea I, Martin J, et al. Comprehensive description of CFTR genotypes and ultrasound patterns in 694 cases of fetal bowel anomalies: a revised strategy. *Hum Genet*. 2011 Apr;129(4):387-96.
26. Castellani C, Macek M, Jr., Cassiman JJ, Duff A, Massie J, ten Kate LP, et al. Benchmarks for cystic fibrosis carrier screening: a European consensus document. *J Cyst Fibros*. 2010 May;9(3):165-78.
27. Pfeiffer RF. Wilson's Disease. *Semin Neurol*. 2007 Apr;27(2):123-32.
28. Ferenci P, Steindl-Munda P, Vogel W, Jessner W, Gschwantler M, Stauber R, et al. Diagnostic value of quantitative hepatic copper determination in patients with Wilson's Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005 Aug;3(8):811-8.
29. de Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp LW. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J Med Genet*. 2007 Nov;44(11):673-88.
30. Huster D. Wilson disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010 Oct;24(5):531-9.
31. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol*. 2012 Mar;56(3):671-85.
32. Weiss KH, Stremmel W. Evolving perspectives in Wilson disease: diagnosis, treatment and monitoring. *Curr Gastroenterol Rep*. 2012 Feb;14(1):1-7.

33. Kodama H, Fujisawa C, Bhadhprasit W. Inherited copper transport disorders: biochemical mechanisms, diagnosis, and treatment. *Curr Drug Metab*. 2012 Mar;13(3):237-50.
34. Bruha R, Marecek Z, Pospisilova L, Nevsimalova S, Vitek L, Martasek P, et al. Long-term follow-up of Wilson disease: natural history, treatment, mutations analysis and phenotypic correlation. *Liver Int*. 2011 Jan;31(1):83-91.
35. Roberts EA, Schilsky ML. Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology*. 2008 Jun;47(6):2089-111.
36. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Altuntas B, Giacchino R, et al. Mutation analysis in patients of Mediterranean descent with Wilson disease: identification of 19 novel mutations. *J Med Genet*. 1999 Nov;36(11):833-6.
37. Manolaki N, Nikolopoulou G, Daikos GL, Panagiotakaki E, Tzetis M, Roma E, et al. Wilson disease in children: analysis of 57 cases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009 Jan;48(1):72-7.
38. Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nat Genet*. 1995 Feb;9(2):210-7.
39. Zappu A, Magli O, Lepori MB, Dessi V, Diana S, Incollu S, et al. High incidence and allelic homogeneity of Wilson disease in 2 isolated populations: a prerequisite for efficient disease prevention programs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2008 Sep;47(3):334-8.
40. Dedoussis GV, Genschel J, Sialvera TE, Bochow B, Manolaki N, Manios Y, et al. Wilson disease: high prevalence in a mountainous area of Crete. *Ann Hum Genet*. 2005 May;69(Pt 3):268-74.
41. Bowcock AM, Farrer LA, Cavalli-Sforza LL, Hebert JM, Kidd KK, Frydman M, et al. Mapping the Wilson disease locus to a cluster of linked polymorphic markers on chromosome 13. *Am J Hum Genet*. 1987 Jul;41(1):27-35.
42. Gupta A, Maulik M, Nasipuri P, Chattopadhyay I, Das SK, Gangopadhyay PK, et al. Molecular diagnosis of Wilson disease using prevalent mutations and informative single-nucleotide polymorphism markers. *Clin Chem*. 2007 Sep;53(9):1601-8.
43. Ferenci P. Wilson's Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005 Aug;3(8):726-33.

44. Lepori MB, Lovicu M, Dessi V, Zappu A, Incollu S, Zancan L, et al. Twenty-four novel mutations in Wilson disease patients of predominantly Italian origin. *Genet Test*. 2007 Fall;11(3):328-32.
45. Lovicu M, Dessi V, Lepori MB, Zappu A, Zancan L, Giacchino R, et al. The canine copper toxicosis gene MURR1 is not implicated in the pathogenesis of Wilson disease. *J Gastroenterol*. 2006 Jun;41(6):582-7.
46. Achila D, Banci L, Bertini I, Bunce J, Ciofi-Baffoni S, Huffman DL. Structure of human Wilson protein domains 5 and 6 and their interplay with domain 4 and the copper chaperone HAH1 in copper uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 11;103(15):5729-34.
47. Hamza I, Schaefer M, Klomp LW, Gitlin JD. Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 9;96(23):13363-8.
48. Payne AS, Kelly EJ, Gitlin JD. Functional expression of the Wilson disease protein reveals mislocalization and impaired copper-dependent trafficking of the common H1069Q mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep 1;95(18):10854-9.
49. Tsivkovskii R, Efremov RG, Lutsenko S. The role of the invariant His-1069 in folding and function of the Wilson's disease protein, the human copper-transporting ATPase ATP7B. *J Biol Chem*. 2003 Apr 11;278(15):13302-8.
50. Cox DW, Prat L, Walshe JM, Heathcote J, Gaffney D. Twenty-four novel mutations in Wilson disease patients of predominantly European ancestry. *Hum Mutat*. 2005 Sep;26(3):280.
51. Rodriguez-Granillo A, Sedlak E, Wittung-Stafshede P. Stability and ATP binding of the nucleotide-binding domain of the Wilson disease protein: effect of the common H1069Q mutation. *J Mol Biol*. 2008 Nov 28;383(5):1097-111.
52. Vrabelova S, Letocha O, Borsky M, Kozak L. Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease. *Mol Genet Metab*. 2005 Sep-Oct;86(1-2):277-85.
53. Ferenci P. Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing. *Hum Genet*. 2006 Sep;120(2):151-9.

54. Girodon-Boulandet E, Cazeneuve C, Goossens M. Screening practices for mutations in the CFTR gene ABCC7. *Hum Mutat.* 2000;15(2):135-49.
55. Montgomery J, Wittwer CT, Kent JO, Zhou L. Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting analysis. *Clin Chem.* 2007 Nov;53(11):1891-8.
56. Zhou L, Myers AN, Vandersteen JG, Wang L, Wittwer CT. Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. *Clin Chem.* 2004 Aug;50(8):1328-35.
57. <http://www.dna.utah.edu/umelt/um.php>. uMelt - DNA Melting Curve Prediction - 2010- Wittwer DNA Lab.
58. SantaLucia J, Jr. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Feb 17;95(4):1460-5.
59. Poulou M, Destouni A, Fylaktou I, Kanavakis E, Tzetis M. Genotyping Efficiency of 2 Primer Sets and an Unlabeled Oligonucleotide Probe for the p.Phe508del in Exon 10 of the CFTR Gene as Determined with High-Resolution Melting Analysis. *Clin Chem.* 2012 Oct;58(10):1490-2.
60. Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations. *Eur J Hum Genet.* 2009 Jan;17(1):51-65.
61. Simon-Bouy B, Satre V, Ferec C, Malinge MC, Girodon E, Denamur E, et al. Hyperechogenic fetal bowel: a large French collaborative study of 682 cases. *Am J Med Genet A.* 2003 Sep 1;121A(3):209-13.
62. Tzetis M, Kaliakatsos M, Fotoulaki M, Papatheodorou A, Doudounakis S, Tsezou A, et al. Contribution of the CFTR gene, the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (SPINK1) and the cationic trypsinogen gene (PRSS1) to the etiology of recurrent pancreatitis. *Clin Genet.* 2007 May;71(5):451-7.

63. Raynal C, Baux D, Theze C, Bareil C, Taulan M, Roux AF, et al. A Classification Model Relative to Splicing for Variants of Unknown Clinical Significance: Application to the CFTR Gene. *Hum Mutat.* 2013 May;34(5):774-84.
64. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013 Jan;Chapter 7:Unit7 20.
65. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul 1;31(13):3812-4.
66. Tavtigian SV, Byrnes GB, Goldgar DE, Thomas A. Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic- and molecular-epidemiology applications. *Hum Mutat.* 2008 Nov;29(11):1342-54.
67. Tavtigian SV, Greenblatt MS, Lesueur F, Byrnes GB. In silico analysis of missense substitutions using sequence-alignment based methods. *Hum Mutat.* 2008 Nov;29(11):1327-36.
68. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009 May;37(9):e67.
69. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol.* 1997 Fall;4(3):311-23.
70. Piva F, Giulietti M, Burini AB, Principato G. SpliceAid 2: a database of human splicing factors expression data and RNA target motifs. *Hum Mutat.* 2012 Jan;33(1):81-5.
71. Pagani F, Stuani C, Tzetis M, Kanavakis E, Efthymiadou A, Doudounakis S, et al. New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. *Hum Mol Genet.* 2003 May 15;12(10):1111-20.
72. Goina E, Skoko N, Pagani F. Binding of DAZAP1 and hnRNPA1/A2 to an exonic splicing silencer in a natural BRCA1 exon 18 mutant. *Mol Cell Biol.* 2008 Jun;28(11):3850-60.
73. Goina E, Fernandez-Alanis E, Pagani F. Approaches to study CFTR pre-mRNA splicing defects. *Methods Mol Biol.* 2011;741:155-69.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Π1. Σχεδιασμός εκκινητών του γονιδίου ATP7B για εφαρμογή στο NanoChip400

Exon 2

CGGTTACAAAGCACTAACCCAAAGAGACCTTTATCTTCTGCTAACCA GAATTTTAATAATTCTGAGACCTTGGGG CACCAAGGAAGCCATGTGGTCACCCTCCA(insC)ACTGAGAATAGATGGAATGCATTGTAAGTCTTGCGTCTTGAATATTGAAGAAAATATTGGCCAGCTCCTAGGGGTTCAAAGTATTCAAGTGTCTTGGAGAACA AAAACTGCCCAAGTAAAGTATGACCCTTCTGTACCA GCCCAGTGGCTCTGCAGAGGGCTATCGA

Μεταλλάξεις: 779insC, 845delT and Q289X (865C>T)

Forward Primer Sequence:	TTTAATAATTCTGAGACCTTGGG
Primer Tm:	50.1 °C
Primer GC %:	34.8 %
Reverse Primer Sequence:	TGGTACAAGAAGGGTCATAC
Primer Tm:	51 °C
Primer GC %:	45 %
Primer Product Size:	193 bp

Exon 3

AACTACAGATGGTACACCTACATCTGTGCAGGAAGTGGCTCCCCACACTGGGAGGCTCCCTGCAAACCATGCCCCGVGACATCTTGGCAAAGTCCCCACAATCAACCAGAGCAGTGGCA CCGCAGAAAGTGCTTCTTACAGATCAAAGGCA TGACCTGTGCATCCTGTGTGTCTAACATA GAAAGGAATCTGCAGAAAGAAG

Μετάλλαξη: V456L (1365G>C)

Forward Primer Sequence:	AACTACAGATGGTACACCTACAT
Primer Tm:	59.2°C
Primer GC %:	50 %
Reverse Primer Sequence:	TAGACACACAGGATGCACAGGTCA
Primer Tm:	59.6°C
Primer GC %:	50 %
Primer Product Size:	164 bp

Intron 4

TCATCCAGC**CCCTCGAGATAGCTCAGTTCA**TCCAGGACC**TGGGTTTTGAGGCAGCAGTC**
 ATGGAGGACTACGCAGGCTCCGATGGCAACATTGAGCTGACAGT**A(insT)**AGTACTGTGG
 GTGCGTTACGGGGTTACAGGCTTCTGACAG**TTTGCATT****TTGGACACATCCATCTTTGTGA**
 TTAGTAAATTTCCCCATCTTGGACGT

Μετάλλαξη: 1707+3insT

Forward Primer Sequence:	AGATAGCTCAGTTCATCCAGGACC
Primer Tm:	57.6°C
Primer GC %:	50%
Reverse Primer Sequence:	TCACAAAGATGGATGTGTCCAA
Primer Tm:	54.1°C
Primer GC %:	40.9%
Primer Product Size:	159 bp

Exon 5

TCCCTGG**ACTGGCTTTCACAGGCTTTCCTTG**ATCCTGGGTCTGTGGGATTCTTGCCATCC
 TGTGTTGCA**G**ATCACAGGGATGACCTGCGCGTCCTGTGTCCACAACATAGAGTCCAAACT
 CACGAGGACAAATGGCATCACTTA**T**GCCTCCGTTGCCCTTGCCACCAGCAAAGCCCTTGT
 TAAGTTTGACCC**GGAAATTATCGGTCCACGGGAT**ATTATCAAAAT

Μεταλλάξεις 1708-1G>A, 1782delT

Forward Primer Sequence:	TCGAGATAGCTCAGTTCATCCAGG
Primer Tm:	57.5°C
Primer GC %:	50 %
Reverse Primer Sequence:	ACAAACCAGACACGTCCAAGATGG
Primer Tm:	59.1°C
Primer GC %:	50 %
Primer Product Size:	199 bp

Exon 7

GTGTTTGGCATCCCTGTCATGGCCTTAATGATCTATATGCTGATACCCAGCAACGAGCCC
CACCAGTCCATGGTCCTGGACCACAACATCATTCCAAGGACTGTCCATTCTAAATCTCATCT
TCTTTATCTTGTGTACCTTTGTCCAGGTATAATGAGAAAGTGGGCAGACCTCTCCCTTCC
ATGCTGTGTGTGGCCCTCAGATATCTGCCCCGCTAA

Μετάλλαξη: 2101delAT

Forward Primer Sequence:	GTCCTGGACCACAACATCATTCCA
Primer Tm:	58.8°C
Primer GC %:	50 %
Reverse Primer Sequence:	GAGAGGTCTGCCCCACTTTCTCATA
Primer Tm:	57.7°C
Primer GC %:	50 %
Primer Product Size:	104 bp

Exon 8

GCTGCGAGCCTTCACTGTCCTTGTCTTCAGCTCCTCCGTGGGTGGTACTTCTACGTTCA
GGCCTACAAATCTCTGAGACACAGGTCAGCCAACATGGACGTGCTCATCGTCCTGGCCA
CAAGCATTGCTTATGTTTATTCTCTGGTCATCCTGGTGGTTGCTGTGGCTGAGAAGGCGG
AGAGGAGCCCTGTGACATTCTTCGACACGCCCCCATGCTCTTTGTGTTCAATTGCCCTGG
GCCGGTGGCTGGAACACTTGGCAAAGGTAACAGCAGCTTCAGGTTTCAGAAAAGAGCTGC
TCCTTCAGTAAACAAATCTCACTTCCTCTGAAC

Μεταλλάξεις: 2299insC, R778G (2332C>G)

Forward Primer Sequence:	ATTCTCTGGTCATCCTGGTGGTTG
Primer Tm:	58.5°C
Primer GC %:	50 %
Reverse Primer Sequence:	AGATTTGTTTACTGAAGGAGCAGC
Primer Tm:	55.2°C
Primer GC %:	41.7 %
Primer Product Size:	180 bp

Exon 10

TAAGTGGCGTTTGTTCAGGGAGGAGCAAGTCCCCATGGAGCTGGTGCAGCGGGGCGAT
ATCGTCAAGGTGGTCCCTGGGGGAAAGTTTCCAGTGGATGGGAAGTCCTGGAAGGCAA
TACCATGGCTGATGAGTCCCTCATCACAGGTGAGATGGCTTGTTCATGTTCCCTCAGGAG
GGATATCA

Μετάλλαξη: 2530delA

Forward Primer Sequence:	TTTGTTCAGGGAGGAGCAAGT
Primer Tm:	59.1°C
Primer GC %:	50 %
Reverse Primer Sequence:	CCTGAGGGAACATGAAACAAGCCA
Primer Tm:	59.3°C
Primer GC %:	50 %
Primer Product Size:	168 bp

Exon 12

ATCCCAATCTTTATCCATGCTTGTGGTGTTTATTTCTTCATAGGTTGTAATTTCCCATGGT
CTTGGTGTTTTATTTTCATAGGCACCCATTTCAGCAGCTGGCTGACCGGTTTAGTGGATATT
TTGTCCCATTTATCATCATCATGTCAACTTTGACGTTGGTGGTATGGATTGTAATCGGTTTT
ATCGATTTTGGTGTGTTTCAGAGATACTTTCTGTAAAGTTGAATGCCTTGGGCTATATGGT
GGTTGTGTTTTAAATAATCTACTGACATTGATCCTGTTC

Μεταλλάξεις: L936X (2807T>A), G943S (2827G>A)

Forward Primer Sequence:	GCTGGCTGACCGGTTTAGTGGATATT
Primer Tm:	60.4°C
Primer GC %:	50 %
Reverse Primer Sequence:	CAACCACCATATAGCCCAAGGCAT
Primer Tm:	59.1°C
Primer GC %:	50 %
Primer Product Size:	154 bp

Exon 13

TGATTAGAGTTCTGGGAGCTTCCTTATTGAACTCTCAACCTGCCTCTGACTCTGTCCTGTT
TTCAGAAACCCCAACAAGCACATCTCCAGACAGAGGTGATCATCCGTTTGCTTTCCAGA
CGTCCATCACGGTGCTGTGCATTGCCTGCCCCTGCTCCCTGGGGCTGGCCACGCCCACG
GCTGTCATGGTGGGCAACCGGGGTGGCCGCGCAGAACGGCATC

Μετάλλαξη: R969Q (2906G>A)

Forward Primer Sequence:	AACTCTCAACCTGCCTCTGACTCT
Primer Tm:	59.2°C
Primer GC %:	50 %
Reverse Primer Sequence:	TGCCCACCATGACAGCCGTG
Primer Tm:	62.8°C
Primer GC %:	65 %
Primer Product Size:	167 bp

Exon 14

AAAGACTGTGATGTTTGACAAGACTGGCACCATTACCCATGGCGTCCCCAGGGTCATGCG
GGTGCTCCTGCTGGGGGATGTGGCCACACTGCCCTCAGGAAGGTTCTGGCTGTGGTGG
GACTGCGGAGGCCAGCAGTGAACAACCTTGGGCGTGGCAGTCACCAAATACGTAAAGAGGTACGTGGACTTGGGCGTGGCCCTGCCCTCCCCGCCAAT

Μεταλλάξεις: G1061E, H1069Q

Primer Sequence:	GATGTTTGACAAGACTGGCACC
Primer Tm:	56.2°C
Primer GC %:	50 %
Reverse Primer Sequence:	CCCAAGTCCACGTACCTCTTTACA
Primer Tm:	58°C
Primer GC %:	50 %
Primer Product Size:	187 bp

Exon 15

TGGCTTACAGTTTCCTCTTCCTCTCTTTCCACCTTCCCAGGAACTTGGAACAGAGACCTTG
GGATACTGCACGGACTTCCAGGCAGTGCCAAGGCTGTGGAATTGGGTGCAAAGTCAGCAA
CGTGGAAGGCATCCTGGCCCCACAGTGAGCG

Μετάλλαξη: G1099S (3295G>A)

Primer Sequence:	GGCTTACAGTTTCCTCTTCCTCTC
Primer Tm:	56.6°C
Primer GC %:	50%
Reverse Primer Sequence:	AGGATGCCTTCCACGTTGCTGA
Primer Tm:	60.9°C
Primer GC %:	54.5%
Primer Product Size:	134 bp

Exon 16

GGACCATTTAGAAATAACCACAGCCTCTTTTGAATAGATGCAGTCCCCCAGACCTTCTCTG
TGCTGATTGGAAACCGTGAGTGGCTGAGGCGCAACGGTTTAACCATTCTAGCGATGTCA
GTGACGCTATGACAGACCACGAGATGAAAGGACAGACAGCCATCCTG

Μετάλλαξη: I1148T

Forward Primer Sequence:	GGACCATTTAGAAATAACCACAGCCT
Primer Tm:	56.8°C
Primer GC %:	42.3%
Reverse Primer Sequence:	ATCTCGTGGTCTGTCATAGCGTCA
Primer Tm:	59.3°C
Primer GC %:	50%
Primer Product Size:	146 bp

Exon 19

GGCAGACATGGGTGTGGCCATTGGCACCGGCACGGATGTGGCCATCGAGGCAGCCGAC
GTCGTCCATTATCAGAGTGAGCGTGGCTGCAGCCAGGCTGTGGGTGCTGGGAGGGCAATG
GGCAGACCCCTTCCTCACTGTGTGCTCCTCTCCATCAAGATGATTTGCTGGATGTGGTGG
CTAGCATTACCTTTCCAAGAGGACTGTCCGAAGGATACGCATCAACCT

Μετάλλαξη: 3904-2 A>G

Forward Primer Sequence:	GCAGACATGGGTGTGGCCATT
Primer TM:	60.4 °C
Primer GC %:	57.1 %
Reverse Primer Sequence:	AGGTTGATGCGTATCCTTCGGACA
Primer TM:	59.8 °C
Primer GC %:	50.0 %
Primer Product Size:	225

Exon 21

GCACAGCGCTGCAGCAGACGATGATGGGACACAAGTGGTCTCTGCTCCTGAATGGCAGGG
ATGAGGAGCAGTACATCTGATgacttcaggcaggcgggcggggcagggacttgccctccactcaccacaagctgag
caggacagccagcagcaggatgggctgagctagcctccagcttggggactccgctccctggatatgt

Μετάλλαξη: X1466R

Primer Sequence:	GACAAGTGGTCTCTGCTCCTGAAT
Primer Tm:	58.3°C
Primer GC %:	50%
Reverse Primer Sequence:	TCAGCTTGTGGTGAGTGGAGGCAA
Primer Tm:	62.4°C
Primer GC %:	54.2%
Primer Product Size:	106 bp

Π2. Σχεδιασμός σταθεροποιητών και ανιχνευτών για ανίχνευση των μεταλλάξεων του γονιδίου ATP7B στο NanoChip400

Q289X

Strand B as target

Q289Xstab: 5'-CCCAGTATGAAATGAACCCGTCAAAACAAGAGGTTTCCT-3'Biotin Tm 64.5 °C

ASO design for reporters

Q289Xnormal: 5'-Cy3-ATT **C**AA GTG-3' Tm36.8°C

Q289Xmutant: 5'-Cy5-ATT **T**AA GTG-3' Tm36.4°C

779insC

Strand A as target

779insCstab: 5'- TGG AGG GTG ACC ACA TGG CTT CCT T -3' Tm 64.1°C

779insCnormal: 5'- Cy3-CCA TCT ATT CTC AGT **T** -3' Tm: 39.6 °C

779insCmutant: 5'- Cy5-CAT CTA TTC TCA GT **G** -3'Tm: 38.3 °C

845delT

Strand B as target

Stabilizer όπως και για την Q289X

ASO design for reporters

845delTnormal: 5'- Cy3-TAG **G**AG CTG GC -3' Tm 39.6 °C

845delTmutant: 5'- Cy5- TAG **G**GC TGG C -3' Tm 38.5 °C

V456L

Strand B as target

V456Lstab: 5'- TGC AGG AAG TGG CTC CCC AC -3'Biotin Tm 62.5°C

V456Lnormal: 5'-Cy3-ACA CCT ACA TCT **G** -3' Tm37.8 °C

V456Lmutant: 5'-Cy5-ACA CCT ACA TCT **C** -3' Tm37.4 °C

1703+3insT

Strand A as target

1703+3insTstab: 5'-CTG TCA GCT CAA TGT TGC CAT CGG AGC CTG - 3'Biotin Tm: 65.6 °C

1703+3insTnormal: 5'-Cy3-ACC CAC AGT ACT **TA** -3' Tm 40.3°C

1703+3insTmutant: 5'-Cy5-CCC ACA GTA CTT **AA** -3' Tm 39 °C

1708-1G>A

Strand B as target

1708-1G>A stab: 5'-GTCTGTGGGATTCTTGCCATCCTGTGTTGC-3' (Biotin 5') Tm: 63.6°C

1708-1G>Anormal: 5'- Cy3-CCCTGTGATC **G** -3' Tm: 35 °C

1708-1G>Amutant: 5'- Cy5-CCCTGTGATT **T** -3' Tm: 34 °C

1782delT

Strand B as target

Stabilizer όπως και για την 1708-1G>A

ASO design for reporters

1782delTnormal: 5'-Cy3- CTTATGCCTC-3' Tm: 33 °C

1782delTmutant: 5'-Cy5- CTTA **T**GCCTC-3' Tm: 31 °C

C703Y

Strand A as target

C703Ystab 5'-GAGAGGTCTGCCCACCTTTCTCATATATACCTGG-3' biotin at 5'

Tm 61.8 °C

ASO design for reporters

C703Ynormal: 5'- Cy3-CAA AGG TAC AC-3' Tm 28.8 °C

C703Ymutant: 5'- Cy5- CAA AGG TAT ACA -3' Tm 29.3 °C

2101delAT

Strand A as target

Stabilizer όπως και για την C703Y

ASO design for reporters

2101delATnormal:5'- Cy3-AGA TAA AGA AGA TGA GA -3' Tm 40.0°C

2101delATmutant:5'- Cy5- AGA AAG AAG ATG AGA T -3' Tm 39.7°C

R778G

Strand A as target

R778Gstab: 5'-GCCCAGGGCAATGAACACAAAGA-3' 5'biotin Tm: 70°C

R778Gnormal: 5'- Cy3-CCAGCCACCG-3' Tm: 36 °C

R778Gmutant: 5'- Cy5-CCAGCCACCG-3' Tm: 36°C

2299insC

Strand A as target

Stabilizer όπως και για την R778G

2299insCnormal: 5'- Cy3-AGCATGGGGG-3' Tm 34°C

2299insCmutant: 5'- Cy5-CATGGGGG-3' Tm 33°C

2530delA

Strand A as target

2530delAstab: 5'-CCAGGGACCCCCTTTCAAAGGTCACCTACCC-3' Biotin Tm 72°C

2530delAnormal: 5'- Cy3-CCTTCCAGGAC TT-3' Tm: 36°C

2530delmutant: 5'- Cy5-CCTTCCAGGAC TTC-3' Tm 35°C

L936X

Strand A as target

L932Xstab: 5'-CAGGGTAAATAGTAGTAGTACAGTTGAAACTGCA-3' Biotin Tm 69°C

L932Xnormal: 5'- Cy3-CAA TCC ATA CCA CCA-3' Tm: 34°C

L932Xmutant: 5'- Cy5-CAA TCC ATA CCA CC-3' Tm: 34°C

R969Q

Strand B as target

R969QSTAB: 5'-GTTTGCTTTCCAGACGTCCATCAC-3'Biotin Tm 72°C

ASO design for reporters

R969Qnormal: 5'-Cy3-GGTGATCATCCG-3' Tm 38°C

R969Qmut: 5'-Cy5-AGGTGATCATCCA-3' Tm 38°C

H1069Q

Strand B as target

H1069QSTAB: 5'-CCCTTGGGCGTGGCAGTCACCAAATACTGTAAA- 3'Biotin Tm 70°C

H1069Q normal: 5'-Cy3-GCAGTGAACAC-3' Tm 34°C

H1069Q mutant: 5'-Cy5-AGCAGTGAACA-3' Tm 34°C

G1061E

Strand B as target

Stabilizer όπως και για την H1069Q

G1061E normal: 5'-Cy3-GTG GGG ACT G-3' Tm34°C

G1061E mutant: 5'-Cy5-GTG GAG ACT GC- 3' Tm 36°C

G1099S

Strand B as target

G1099Sstab: 5'-GCT GTG GAA TTG GGT GCA AAG TCA GCA AC- 3' biotin Tm 63,8°C

G1099Snormal: 5'- GCA GTG CCA G -3' Tm 38.5°C

G1099Smutant: 5'-G GCA GTG CCA A -3 Tm36.7°C

I1148T

Strand A as target

I1148Tstab:

5'- TCA GCA CAG AGA AGG TCT GGG GGA CTG CAT CTA TTC AA- 3'Biotin

Tm 67°C

I1148Tnormal: 5'-Cy3-CAC GGT TTC CAA -3' Tm39.2°C

I1148Tmutant: 5'-Cy5-CAC GGT TTC CAG -3' Tm 40.6°C

3904-2A>G

Strand B as target

3904-2A>Gstab: 5'-GAGTACCGATTCCGGTTGGTTTTCTGTT-3' (biotin 5') Tm 71°C

3904-2A>Gnormal: 5'- Cy3-ATCGGAAGG T -3' Tm 37 °C

3904-2A>Gmutant: 5'- Cy5- ATCGGAAGG C -3' Tm 37 °C

X1466R

Strand B as target

X1466Rstab: 5'- GATGACTTCAGGCAGGCGGGCC- 3' biotin Tm: 74°C

X1466Rnormal: 5'- Cy3-AGCAGTACATC T -3' Tm 34°C

X1466Rmutant:5'-Cy5-AGCAGTACATCA -3' Tm 34°C

Π3. Σχεδιασμός εκκινητών του γονιδίου *CFTR* για εφαρμογή στο Luminex

xMAP™

Oligo Name	Oligo Sequence (5'-3')	Location in CFTR gene	TM	Product Size
Exon 13 Forward	ACAACAGCATCCACACGAAA	Exon 13	60	127bp
Exon 13 Reverse	AAA TAC CCC CAA GCG ATG TA	Intron 13	59	
Exon 8 Forward	TGCTCTCTTTTATAAATAGGATTTC	Exon 8	54.8	205bp
Exon 8 Reverse	TTCTAATTTTATTTCGCCATTAGG	Exon 8	56.8	
Exon6a Forward	GGGGCTAATCTGGGAGTTGT	Exon 6a	59	195bp
exon6a Reverse	TGC ATA GAC AGT CCT GGT TTT	Intron 6a	57.3	
Exon 17b forward	CAATGACATTTGTGATATGATTATTCT	Intron17b	57.6	184bp
Exon 17b reverse	GGCAGTATGTAAATTCAGAGCTTTGTGG	Exon 17b	61.8	
Exon 17a Forward	ATGTGAAAATGTTTACTCACCAA	Intron 16	56.3	200bp
Exon 17a Reverse	ATACCTTCAGATTCCAGTTGTTT	Intron 17a	56	
Exon 15 Forward	GACTCAAGTTTAGTTCCATTTACA	Intron 14b	55	396bp
Exon 15 Reverse	AAC CAC AGG CCC TAT TGA TG	Intron15	60	
Exon 10 forward	AGGATGATAATTGGAGGCAAG	Intron9	58.1	181bp
Exon 10 Reverse	ACTGTGCTTAATTTTACCCTCTGAAGG	exon10	59.8	
DELETION 3120+1kdel18.6Kb				
Forward	AACCAGACTGTCAGTTTGCC	Intron16	57.7	298bp
Reverse	TCACAATCAAGTTAAGAGGTTCACA	Intron 16	60.8	
Forward	GCCTTTCATCTTGTGGCATT	Intron 18	60.8	330bp
Reverse	AAACGTAAAATTTGAGGGCATA	Intron 18	57.7	
Exon 2,3 Deletion				
Intron 1 Forward	TTGACCACTTTAATGGTGTTTAC	Intron 1	55.9	246bp
Intron 1 Reverse	AAGTTACTAATTTCCCCTCCTCT	Intron1	55.9	
Intron 3 Forward	AGTGGATTAAGCGTGAATATGT	Intron 3	55.5	218bp
Intron 3 Reverse	ACTCAGAACCCATCATAGGATAC	Intron 3	56.2	

Π4. Σχεδιασμός εκκινητών για ανίχνευση των ελλειμμάτων 3120+1kdel (8.6Kb) και CFTRdele2,3 (21KB) στη πλατφόρμα Luminex xMAP™

3120+1Kbdel (8.6kb), GAP - PCR

Σε αυτό το έλλειμμα απαλείφονται τα εξόνια 16, 17a, 17b & 18. Για την ανίχνευση ύπαρξης αυτού του ελλείμματος σχεδιάστηκαν 4 εκκινητές, ο forward και ο reverse στο ιντρόνιο 16 και ο forward και reverse στο ιντρόνιο 18, οι οποίοι δίνουν προϊόντα 298 και 330 βάσεων αντίστοιχα εφ' όσον δεν υπάρχει το έλλειμμα. Αν το έλλειμμα είναι παρόν τότε συνδυάζεται ο forward εκκινητής του ιντρονίου 16 και ο reverse εκκινητής του ιντρονίου 18 και δίνουν προϊόν 235 βάσεων.

Για το ASPE σχεδιάστηκαν εκκινητές συμπληρωματικοί με τη φυσιολογική αλληλουχία του ιντρονίου 16 και του ιντρονίου 18, καθώς και ένας ASPE εκκινητής για ανίχνευση της σύνδεσης του ιντρονίου 16 -18.

CFTRdele2,3 (21KB) GAP - PCR

Σε αυτό το έλλειμμα απαλείφεται το 25% του ιντρονίου 1 ολόκληρα τα εξόνια 2 και 3, ολόκληρο το ιντρόνιο 2 καθώς και 45% του ιντρονίου 3. τα εξόνια 16, 17a, 17b & 18. Για την ανίχνευση ύπαρξης αυτού του ελλείμματος σχεδιάστηκαν 4 εκκινητές, ο forward και ο reverse στο ιντρόνιο 1 και ο forward και reverse στο ιντρόνιο 3, οι οποίοι δίνουν προϊόντα 246 και 218 βάσεων αντίστοιχα εφ' όσον δεν υπάρχει το έλλειμμα. Αν το έλλειμμα είναι παρών τότε συνδυάζεται ο forward εκκινητής του ιντρονίου 1 και ο reverse εκκινητής του ιντρονίου 3 και δίνουν προϊόν 196 βάσεων.

Για το ASPE σχεδιάστηκαν εκκινητές συμπληρωματικοί με τη φυσιολογική αλληλουχία του ιντρονίου 1 και του ιντρονίου 3, καθώς και ένας ASPE εκκινητής για ανίχνευση της σύνδεσης του ιντρονίου 3.

Π5. Σχεδιασμός ASPE εκκινήτων για την ανίχνευση των μεταλλάξεων του γονιδίου *CFTR* στη πλατφόρμα Luminex xMap™

Μετάλλαξη	Εκκινήτες ASPE	bp	Tm
2184insA	TGGACAGAAACAAAAAAAC ASPE Forward WT (2184insA)	19	46.4°C
	TGGACAGAAACAAAAAAAC ASPE Forward MUT (2184insA)	20	47.2°C
L732X	AGAGGATTCTGATGAGCCTTT ASPE Forward WT (L732X)	21	53.4°C
	AGAGGATTCTGATGAGCCTTG ASPE Forward MUT (L732X)	21	54.2°C
E822X	AGTCTTCTTCGTTAATTTCTTC ASPE REVERSE WT (E822X)	22	48.4°C
	AGTCTTCTTCGTTAATTTCTTA ASPE REVERSE MUT (E822X)	22	47.1°C
E822X	AGAAACTGGCTTGGAATAAGTG ASPE Forward WT (E822X)	23	53.5°C
	AGAAACTGGCTTGGAATAAGTT ASPE Forward MUT (E822X)	25	52.8°C
457TAT>G	GGAAGAATCATAGCTTCCTAT ASPE Forward WT (457TAT>G)	21	49.1°C
	GGAAGAATCATAGCTTCCG ASPE Forward MUT (457TAT>G)	19	50.2°C
D110H	CTCCTTGTTATCCGGGTC ASPE Reverse WT (D110H)	18	52.1°C
	CTCCTTGTTATCCGGGTG ASPE Reverse MUT (D110H)	18	52.4°C
D110H	CTGGGAAGAATCATAGCTTCCTATG ASPE Forward WT (D110H)	25	54.9°C
	CTGGGAAGAATCATAGCTTCCTATC ASPE Forward MUT (D110H)	25	54.7°C
I148T	TAGCTATTCTCATCTGCATTCCAA ASPE Reverse WT (I148T)	24	53.9°C
	TAGCTATTCTCATCTGCATTCCAG ASPE Reverse MUT (I148T)	24	54.3°C
621+1A>G	GGCCTGTGCAAGGAAGTATT ASPE Reverse WT (621+1A>G)	23	55.4°C
	GGCCTGTGCAAGGAAGTATC ASPE Reverse MUT (621+1A>G)	23	55.9°C
711+3A>G	GCCTAAAAGATTAAATCAATAGGTACAT ASPE Reverse WT (711+3A>G)	28	55.9°C
	GCCTAAAAGATTAAATCAATAGGTACAC ASPE Reverse MUT (711+3A>G)	28	52.5°C
S1235R	GAGAACATTTCTTCTCAATAAGT ASPE Forward WT (S1235R)	24	50.9°C
	GAGAACATTTCTTCTCAATAAGG ASPE Forward MUT (S1235R)	24	51.5°C
3849+4A>G	AAAGCAAGCAGTGTTCAAATCT ASPE Reverse WT (3849+4A>G)	22	53.5°C
	AAAGCAAGCAGTGTTCAAATCC ASPE Reverse MUT (3849+4A>G)	22	54.5°C

R352Q	TACAGCCCAGGGAAATTGCC ASPE Reverse WT (R352Q)	20	57.8°C
	TACAGCCCAGGGAAATTGCT ASPE Reverse MUT (R352Q)		56.7°C
R352Q	TCTGCGCATGGCGGTCACTCG ASPE Forward WT (R352Q)	21	64.8°C
	TCTGCGCATGGCGGTCACTCA ASPE Reverse MUT (R352Q)	21	64.8°C
R352W	TACAGCCCAGGGAAATTGCCG ASPE Reverse WT (R352W)	21	60.1°C
	TACAGCCCAGGGAAATTGCCA ASPE Reverse MUT (R352W)	21	59.2°C
R352W	CGCATGGCGGTCACTC ASPE Forward WT (R352W)	21	56.9°C
	CGCATGGCGGTCACTT ASPE Forward MUT (R352W)	21	56.2°C
L346P	ACCATCTCATTCTGCATTGTTCT ASPE Forward WT (L346P)	23	54.6°C
	ACCATCTCATTCTGCATTGTTCC ASPE Forward MUT (L346P)	23	55.5°C
L346P	AGTGACCGCCATGCGCA ASPE Reverse WT (L346P)	17	60.9°C
	AGTGACCGCCATGCGCG ASPE Reverse MUT (L346P)	17	62.1°C
M348K	ATTCTGCATTGTTCTGCGCAT ASPE Forward WT (M348K)	21	55.9°C
	ATTCTGCATTGTTCTGCGCAA ASPE Forward MUT (M348K)	21	56°C
M348K	AAATTGCCGAGTGACCGCCA ASPE Reverse WT (M348K)	20	60.1°C
	AAATTGCCGAGTGACCGCCT ASPE Reverse MUT (M348K)	20	59.9°C
S945L	GTGCATACTCTAATCACAGTGTC ASPE Forward WT (S945L)	23	53.2°C
	GTGCATACTCTAATCACAGTGTT ASPE Forward MUT (S945L)	23	52.7°C
S945L	CATTTTGTGGTGTAATAATTTTCG ASPE Reverse WT (S945L)	23	49.6°C
	CATTTTGTGGTGTAATAATTTTCAASPE Reverse MUT (S945L)	23	48.7°C
M952I	GTGCTTGAAGAACAGAATGTAAC ASPE Reverse WT (M952I)	23	52.3°C
	GTGCTTGAAGAACAGAATGTAAG ASPE Reverse MUT (M952I)	23	52.1°C
4040delA	TTTTCTGGAACATTTAGAAAAAAC ASPE Forward WT (4040delA)	24	48.6°C
	TTTTCTGGAACATTTAGAAAAAAC ASPE Forward MUT (4040delA)	23	48°C
4040delA	ATTTTTCTGGAACATTTAGAAAAAAS ASPE Forward WT(4040delA)	27	50.1°C
	ATTTTTCTGGAACATTTAGAAAAAAS ASPE Forward MUT (4040delA)	26	49.5°C

1525-1G>A	CATAATCATCATTAGAAAGTGAAGTC ASPE Reverse WT (1525-1G>A)	25	49.6°C
	CATAATCATCATTAGAAAGTGAAGTT ASPE Reverse MUT(1525-1G>A)	25	49.2°C
S466X	TCCCATAATCATCATTAGAAAGTG ASPE Reverse WT (S466X)	23	50°C
	TCCCATAATCATCATTAGAAAGTC ASPE Reverse MUT (S466X)	23	49.8°C
W496X	TTCATTCTGTTCTCAGTTTTCTG ASPE Forward WT (W496X)	24	53.3°C
	TTCATTCTGTTCTCAGTTTTCTA ASPE Forward MUT (W496X)	24	52°C
W496X	TTAATGGTGCCAGGCATAATCC ASPE Reverse WT (W496X)	22	55°C
	TTAATGGTGCCAGGCATAATCT ASPE Reverse MUT (W496X)	22	54.4°C
D565G	TTCTTTTAGAGCAGTATACAAAGA ASPE Forward WT (D565G)	24	49.7°C
	TTCTTTTAGAGCAGTATACAAAGG ASPE Forward MUT (D565G)	24	50.6°C
D565G	GAGTCTAATAAATACAAATCAGCAT ASPE Reverse WT (D565G)	25	49.3°C
	GAGTCTAATAAATACAAATCAGCAC ASPE Reverse MUT (D565G)	25	50°C
G576A	GTATTATTAGACTCTCCTTTTGG ASPE Forward WT (G576A)	24	49.0°C
	GTATTATTAGACTCTCCTTTTGC ASPE Forward MUT (G576A)	24	49.5°C
G576A	TTTTCTGTAAAACATCTAGGTATC ASPE Reverse WT (G576A)	25	49.3°C
	TTTTCTGTAAAACATCTAGGTATG ASPE Reverse MUT (G576A)	25	49.4°C
1898+1G>T	ATTATAAGTAAGGTATTCAAAGAACATAC ASPE Reverse WT (1898+1G>T)	29	50°C
	ATTATAAGTAAGGTATTCAAAGAACATAA ASPE Reverse MUT(1898+1G>T)	29	49.5°C
C276X	ATCCAATCTGTAAAGGCATACTGC ASPE Forward WT (C276X)	24	55.2°C
	ATCCAATCTGTAAAGGCATACTGA ASPE Forward MUT (C276X)	24	53.9°C
C276X	ATTTTTTCCATTGCTTCTTCCCAG ASPE Reverse WT (C276X)	24	54.4°C
	ATTTTTTCCATTGCTTCTTCCCAT ASPE Reverse MUT (C276X)	24	53.8°C
W401X	ATGGAGAATGTAACAGCCTTCTGG ASPE Forward WT (W401X)	24	56.8°C
	ATGGAGAATGTAACAGCCTTCTGA ASPE Forward MUT (W401X)	24	56°C
W401X	TTTTTAAAAATTCTGACCTCCTCC ASPE Reverse WT (W401X)	23	51°C
	TTTTTAAAAATTCTGACCTCCTCT ASPE Reverse MUT (W401X)	24	50.6°C
3152delT	ATTGTGATTGGAGCTATAGCAGTT ASPE Forward WT (3152delT)	24	54.3°C
	ATTGTGATTGGAGCTATAGCAGTG ASPE Forward MUT (3152delT)	24	55°C

3152delT	GTAGGGTTGTAAAAC TGC GACAAC ASPE Reverse WT (3152delT)	24	56.3°C
	GTAGGGTTGTAAAAC TGC GACAC ASPE Reverse MUT (3152delT)	23	56.1°C
Y247X	AGGGAGAATGATGATGAAGTAC ASPE Forward WT (Y247X)	22	51.7°C
	AGGGAGAATGATGATGAAGTAG ASPE Forward MUT (Y247X)	22	51.5°C
Y247X	GTTATGAAAATAGGTTGCTACCTG ASPE Reverse WT (Y247X)	24	51.8°C
	GTTATGAAAATAGGTTGCTACCTC ASPE Reverse MUT (Y247X)	23	51.6°C
3272-26A>G	ACATTTTGTGTTTATGTTATTTGCAA ASPE Forward WT (3272-26A>G)	26	51.2°C
	ACATTTTGTGTTTATGTTATTTGCAG ASPE Forward MUT(3272-26A>G)	26	51.6°C
3272-26A>G	CTGTGAAATATTTCCATAGAAAACAT ASPE Reverse WT (3272-26A>G)	26	50.2°C
	CTGTGAAATATTTCCATAGAAAACAC ASPE Reverse MUT (3272-26A>G)	26	50.6°C
F1052V	TTCACAGGCAGGAGTCCAATTT ASPE Forward WT (F1052V)	22	56.8°C
	TTCACAGGCAGGAGTCCAATTG ASPE Forward MUT (F1052V)	22	57.5°C
F1052V	TAAGCTTGTAAACAAGATGAGTGAA ASPE Reverse WT (F1052V)	24	52.2°C
	TAAGCTTGTAAACAAGATGAGTGAC ASPE Reverse MUT (F1052V)	24	52.8°C
G1069R	TATGGACACTTCGTGCCTTCG ASPE Forward WT (G1069Q)	21	57.1°C
	TATGGACACTTCGTGCCTTCA ASPE Forward MUT (G1069Q)	21	56.2°C
R1070Q	ACAGAGTTTCAAAGTAAGGCTGCC ASPE Reverse WT (R1070Q)	24	57.5°C
	ACAGAGTTTCAAAGTAAGGCTGCT ASPE Reverse MUT (R1070Q)	24	56.7°C
DEL 3120+1Kbde l18.6Kb	TCAAAGAAACATGTGAGTGATTTC Junction ASPE for 3120+1Kbde l (8.6Kb)	24	51.6°C
	TGTTAAGAGTGTAATAACTGGTCC Intron 16 WT ASPE	25	52.6°C
	GGGCATTTATCTGGTTAATGATTC Intron 18 WT ASPE	24	52.2°C
1525-1G>A	CCTAATAATGATGGGTTTTATTCCAG ASPE Forward WT 1525-1G>A	27	52.4°C
	CCTAATAATGATGGGTTTTATTCCAA ASPE Forward MUT 1525-1G>A	27	52.1°C
S1251N	AGAACTGGATCAGGGAAGAG ASPE Forward WT (S1251N)	20	53.5°C
	AGAACTGGATCAGGGAAGAA ASPE Forward MUT (S1251N)	20	52.9°C

Π6. Σχεδιασμός εκκινητών του γονιδίου *ATP7B* για εφαρμογή στο Luminex

xMAP™

	Primer Sequence	Tm	%GC content	Product size	Mutation in Fragment
Exon 2					
Forward Primer :	GAGCGGTTACAAAGCACTAACCCA	59.1 °C	50 %	252 bp	779insC, 845delT, Q289X
Reverse Primer :	TGGGCTGGTACAAGAAGGGTCATA	59.4 °C	50 %		
Exon 3					
Forward Primer :	CTTGAAACCACAGTGCTGGGAAT	59.5 °C	50 %	208 bp	V456L
Reverse Primer :	TAGACACACAGGATGCACAGGTCA	59.6 °C	50 %		
Intron 4					
Forward Primer :	AGATAGCTCAGTTCATCCAGGACC	57.6 °C	50 %	159 bp	1703+3insT
Reverse Primer :	TCACAAAGATGGATGTGTCCAA	54.1 °C	40.9 %		
Exon 5					
Forward Primer :	TCGAGATAGCTCAGTTCATCCAGG	57.5 °C	50 %	199 bp	1708-1G>A 1782delT
Reverse Primer :	ACAAACCAGACACGTCCAAGATGG	59.1 °C	50 %		
Exon 7					
Forward Primer :	GTCCTGGACCACAACATCATTCCA	58.8 °C	50 %	134bp	2101delAT, C703Y
Reverse Primer :	AATATCTGAGGGCCACACACAGCA	60.2 °C	50 %		
Exon 8					
Forward Primer :	GCAGCCTTCACTGTCCTTGTCTTT	59.3 °C	50 %	316bp	2299insC, G710S, R778G
Reverse Primer :	GTGAGATTTGTTTACTGAAGGAGCAGC	57.7 °C	44.4 %		
Exon 10					
Forward Primer :	TTTGTTGCAGGGAGGAGCAAGT	59.1 °C	50 %	168bp	2495A>G 2530delA
Reverse Primer :	CCTGAGGGAACATGAAACAAGCCA	59.3 °C	50 %		
Exon 12					
Forward Primer :	CCCAATCTTTATCCATGCTTGTGGTG	58 °C	46.20%	250 bp	L936X, G943S, R919W
Reverse Primer :	CAACCACCATATAGCCCAAGGCAT	59.1 °C	50 %		
Exon 13					
Forward Primer :	TGAACTCTCAACCTGCCTCTGACTCT	60.7 °C	50 %	169bp	R969Q
Reverse Primer :	TGCCACCATGACAGCCGTG	62.8 °C	65 %		

Exon 14					
Forward Primer :	GATGTTTGACAAGACTGGCACC	56.2 °C	50 %	187bp	G1061E H1069Q
Reverse Primer :	CCCAAGTCCACGTACCTCTTTACA	58 °C	50 %		
Exon 15					
Forward Primer :	GGCTTACAGTTTCCTCTTCCTCTC	56.6 °C	50 %	134bp	G1099S
Reverse Primer :	AGGATGCCTTCCACGTTGCTGA	60.9 °C	54.5 %		
Exon 16					
Forward Primer :	GGACCATTTAGAAATAACCACAGCCT	56.8 °C	42.3 %	221 bp	I1148T, M1169T, G1186S
Reverse Primer :	ATTTCTGAGAGAGCGGAAGGAAGG	58.2 °C	50 %		
Intron 18					
Forward Primer :	GCAGACATGGGTGTGGCCATT	60.4	57.10%	225	3904-2A>G
Reverse Primer :	AGGTTGATGCGTATCCTTCGGACA	59.8	50%		
Exon 21					
Forward Primer :	GACAAGTGGTCTCTGCTCCTGAAT	58.3 °C	50 %	106bp	Ter1466Arg
Reverse Primer :	TCAGCTTGTGGTGAGTGGAGGCAA	62.4 °C	54.2 %		

Π7. Σχεδιασμός ASPE εκκινητών για την ανίχνευση των μεταλλάξεων του γονιδίου *ATP7B* στη πλατφόρμα Luminex xMap™

MUTATION NAME	ASPE PRIMERS	bp	T _m (°C)
779insC	CCA TGT GGT CAC CCT CCA A - ASPE Forward WT	19	57,3
	CCA TGT GGT CAC CCT CCA C - ASPE Forward MUT	19	58,1
845delT	CAC TTG AAT ACT TTG AAC CCC TAG GA - ASPE REVERSE WT	26	56,4
	CAC TTG AAT ACT TTG AAC CCC TAG GG - ASPE REVERSE MUT	26	57,2
Q289X (865C>T)	CAG TTT TGT TCT CCA AGG ACA CTT G - ASPE REVERSE WT	25	56,4
	GCA GTT TTG TTC TCC AAG GAC ACT TA - ASPE REVERSE MUT	26	57,4
1707+3insT	GAT GGC AAC ATT GAG CTG ACA GTA - ASPE Forward WT	24	57,4
	GAT GGC AAC ATT GAG CTG ACA GTTA - ASPE Forward MUT	25	57,5
1708-1G>A	TTC TTG CCA TCC TGT GTT GCA G - ASPE Forward WT	22	58,1
	TTC TTG CCA TCC TGT GTT GCA A - ASPE Forward MUT	22	57,7
1708-1G>A	CGC AGG TCA TCC CTG TGA TC - ASPE reverse WT	20	57,9
	CGC AGG TCA TCC CTG TGA TT - ASPE reverse MUT	20	57,4
1782delT	CAC GAG GAC AAA TGG CAT CAC TTA T - ASPE Forward WT	25	57,4
	CAC GAG GAC AAA TGG CAT CAC TTA G - ASPE Forward MUT	25	57,9
V456L (1365 G>C)	CAA ACT ACA GAT GGT ACA CCT ACA TCT G - ASPE Forward WT	28	56,7
	CAA ACT ACA GAT GGT ACA CCT ACA TCT C - ASPE Forward MUT	28	56,5
V456L (1365 G>C)	GGA GCC ACT TCC TGC AC - ASPE REVERSE WT	17	56,2
	GGA GCC ACT TCC TGC AG - ASPE REVERSE MUT	17	56
2101deAT	GGA CTG TCC ATT CTA AAT CTC ATC TTC TTT AT - ASPE Forward WT	32	56,4
	GGA CTG TCC ATT CTA AAT CTC ATC TTC TTT C - ASPE Forward MUT	31	57
C703Y (2108G>A)	CAC TTT CTC ATA TAT ACC TGG ACA AAG GTA C - ASPE REVERSE WT	31	56,5
	CAC TTT CTC ATA TAT ACC TGG ACA AAG GTA T - ASPE REVERSE MUT	31	56,1

2299insC	ACA AAG AGC ATG GGG GGC - ASPE REVERSE WT	18	58.4
	CAA AGA GCA TGG GGG GGC - ASPE REVERSE MUT	18	59.4
R778G (2332C>G)	CCA AGT GTT CCA GCC ACC G - ASPE REVERSE WT	19	59
	CCA AGT GTT CCA GCC ACC C - ASPE REVERSE MUT	19	58,9
2530delA	TGG TAT TGC CTT CCA GGA CTT TC - ASPE REVERSE WT	23	57
	TGG TAT TGC CTT CCA GGA CTT C - ASPE REVERSE MUT	22	56,8
R919W (2755C>T)	TTC AGC AGC TGG CTG ACC - ASPE Forward WT	18	58,1
	CAT TCA GCA GCT GGC TGA CT - ASPE Forward MUT	20	57,9
L936X (2807T>A)	ATC ATC ATC ATG TCA ACT TTG ACG TT - ASPE Forward WT	26	55,3
	ATC ATC ATC ATG TCA ACT TTG ACG TA - ASPE Forward MUT	26	54,7
G943S (2827G>A)	CTC TGA ACA ACA CCA AAA TCG ATA AAA CC - ASPE REVERSE WT	29	56,7
	CTC TGA ACA ACA CCA AAA TCG ATA AAA CA - ASPE REVERSE MUT	29	56,3
R969Q (2906G>A)	CCA GAC AGA GGT GAT CAT CCG - ASPE Forward WT	21	57
	CCC AGA CAG AGG TGA TCA TCC A - ASPE Forward MUT	22	58,3
G1061E (3182G>A)	GGT TCT GGC TGT GGT GGG - ASPE Forward WT	18	58,9
	GGT TCT GGC TGT GGT GGA - ASPE Forward MUT	18	57,6
H1069Q (3207C>A)	GGA GGC CAG CAG TGA ACA C - ASPE Forward WT	19	58,8
	GGA GGC CAG CAG TGA ACA A - ASPE Forward MUT	19	58
G1099S (3295 G>A)	ACT TCC AGG CAG TGC CAG - ASPE Forward WT	18	57,9
	ACT TCC AGG CAG TGC CAA - ASPE Forward MUT	18	57,2
I1148T (3443T>C)	CCC AGA CCT TCT CTG TGC TGA T - ASPE Forward WT	22	58,7
	CCA GAC CTT CTC TGT GCT GAC - ASPE Forward MUT	21	57,4
M1169T (3506T>C)	AGC GAT GTC AGT GAC GCT AT - ASPE Forward WT	20	56,2
	AGC GAT GTC AGT GAC GCT AC - ASPE Forward MUT	20	57,1
G1186S (3556 G>A)	CCA TCC TGG TGG CTA TTG ACG - ASPE Forward WT	21	57,9
	CCA TCC TGG TGG CTA TTG ACA - ASPE Forward MUT	21	56,9

3904-2 A>G	ACT GTG TGC TCC TCT CCA TCA -ASPE Forward WT	21	58
	CTG TGT GCT CCT CTC CAT CG - ASPE Forward MUT	20	57.5
3904-2 A>G	CCA CCA CAT CCA GCA AAT CAT TCT - ASPE REVERSE WT	24	57.7
	CAC CAC ATC CAG CAA ATC ATT CC - ASPE REVERSE MUT	23	56.7
Ter1466Arg (4379 T>G)	CGC CTG CCT GAA GTC ATC A - ASPE REVERSE WT	19	57,7
	CGC CTG CCT GAA GTC ATC C - ASPE REVERSE MUT	19	58,6
Ter1466Arg (4379 T>G)	GGG ATG AGG AGC AGT ACA TCT - ASPE Forward WT	21	55,9
	GGG ATG AGG AGC AGT ACA TCG - ASPE Forward MUT	21	57,1
G710S (2128G>A)	GAA CGT AGA AGT ACC ACC CAC C - ASPE REVERSE WT	22	57.1
	GAA CGT AGA AGT ACC ACC CAC T - ASPE REVERSE MUT	22	56.1
G710R (2128G>C)	O WT ανιχνευτής είναι κοινός με τον ανιχνευτή για την G710S GAA CGT AGA AGT ACC ACC CAC G - ASPE REVERSE MUT	22	57.2

Π8. PCR εκκινητές για το γονίδιο *CFTR* για την εφαρμογή στη πλατφόρμα *LightScanner*[®] (αλληλουχίες από την εργασία των *Montogery et. al. 2007*)

Amplicon	Product size (bp)	Tm	Sequence
Exon 1	146	60,7 °C	GTCTTTGGCATTAGGAGCTTGA
		62,3 °C	TTTCCGAAGCTCGGTTGG
Exon 2	210	54,9 °C	TCCAAATCTGTATGGAGACC
		55,2 °C	TGAATTTCTCTCTTCAACTAAACA
Exon 3	169	59,6 °C	TTTGCACATGCAACTTATTGG
		58,6 °C	CAAATGAGATCCTTACCCCTAAA
Exon 4, Amp. 1	191	61,6 °C	TCTCAGGGTATTTTATGAGAAATAAATGAA
		59,0 °C	TCCTCACAATAAAGAGAAGGCA
Exon 4, Amp. 2	185	60,1 °C	GCGATTTATCTAGGCATAGGCTT
		56,5 °C	ACATGTACGATACAGAATATATGTGC
Exon 5	188	61,2 °C	TTTGTTTGTTGAAATTATCTAACTTTCCAT
		60,2 °C	TCCAGTTGTATAATTTATAACAATAGTGCC
Exon 6a	256	58,1 °C	TTTCTAGGGGTGGAAGATACAAT
		58,8 °C	TTTTAAACTTTCAAGTTATGAAAATAGGT
Exon 6b	200	56,8 °C	GATTGATTGATTGATTGATTTACAG
		57,7 °C	AATTAAGGACAGAATTACTAACAATATTGA
Exon 7, Amp. 1	227	61,0 °C	ATGCTCAGATCTTCCATTCCAA
		60,2 °C	GTGAATATTTTCCGGAGGATGA
Exon 7, Amp. 2	189	59,7 °C	TGCTTCCCTATGCACTAATCAA
		59,2 °C	AAATCATAGTATATAATGCAGCATTATGG
Exon 8	189	59,1 °C	ATTCTGATTCTATAATATGTTTTTGCTCTC
		58,3 °C	CAAAGAAGAAAACAGTTAGGTGTTTAG
Exon 9	258	54,4 °C	TGGGGAATTATTTGAGAAAG
		55,7 °C	CTTCCAGCACTACAACTAGAAA
Exon 10	277	60,1 °C	TTGATAATGACCTAATAATGATGGGTT
		61,2 °C	GTGAAGGGTTCATATGCATAATCAA
Exon 10, ΔF508 locus	201	53,3 °C	ACTTCTAATGGTGATTATGGG
		45,1 °C	ACATAGTTTCTTACCTCTTC
Exon 11	175	52,4 °C	AGATTGAGCATACTAAAAGTGAC
		54,3 °C	TGCTTGCTAGACCAATAATTAG

Exon 12	169	60,2 °C	AAATAGAGAGGAAATGTAATTTAATTTCCA
		58,9 °C	TTAGCATGAGCATTATAAGTAAGGTATTC
Exon 13, Amp. 1	206	58,8 °C	CTAAAATACGAGACATATTGCAATAAAGT
		60,3 °C	TTTGGAGTTCTGAAAATGTCCC
Exon 13, Amp. 2	322	54,8 °C	GCATGAAGGTAGCAGCTATT
		62,4 °C	CTCTTCGATGCCATTTCATTTGTAA
Exon 13, Amp. 3	254	62,4 °C	TATTCTCAATCCAATCAACTCTATACGAAA
		60,3 °C	GGTGAATGTTCTGACCTTGGTTA
Exon 13, Amp. 4	241	51,7 °C	AGTCTGTCCTGAACCTGAT
		58,6 °C	ACTCAATTGCATTCTGTGGG
Exon 14a	232	54,6 °C	AACTGTACTGTCTTATTGTAATAGCC
		59,5 °C	CCCCAACTATCTTAATTTAACTTTAAATC
Exon 14b	212	59,9 °C	GCATGGGAGGAATAGGTGAA
		59,2 °C	TGCTTGGGAGAAATGAAACA
Exon 15, Amp. 1	193	59,1 °C	TTGGCTGCCAAATAACGAT
		52,7 °C	ACCAGTGGTAGACCTCTGA
Exon 15, Amp. 2	182	58,4 °C	GACACTTTGCTTGCTATGGG
		55,9 °C	GATGGTGGATCAGCAGTTT
Exon 16	222	58,3 °C	TTTTTGAGGAATTTGTCATCTTG
		60,1 °C	CAGGACTTCAACCCTCAATCA
Exon 17a	250	61,2 °C	TGACACACTTTGTCCACTTTGC
		59,7 °C	CAAGATGAGTATCGCACATTCAC
Exon 17b, Amp. 1	183	61,1 °C	TGTGTTTATGTTATTTGCAATGTTTTCTA
		55,6 °C	GGTACAAGAACCAGTTGGC
Exon 17b, Amp. 2	174	58,8 °C	TCCACAAAGCTCTGAATTTACATAC
		57,5 °C	TACTTAAATGCTTAGCTAAAGTTAATGAGT
Exon 18	217	54,0 °C	TTCATTTACGTCTTTTGTGC
		52,4 °C	GGTATATAGTTCTTCCTCATGC
Exon 19, Amp. 1	204	59,9 °C	ATCAAATAATTGTGAAATTGTCTGC
		54,7 °C	ATGTCATCTTTCTTCACGTGT
Exon 19, Amp. 2	196	57,5 °C	GCCAACTCTCGAAAGTTATGAT
		53,8 °C	GTCTAACAAAGCAAGCAGTG
Intron 19	206	60,1 °C	TGATTTCTGGAGACCACAAGG
		59,6 °C	CTCCTCCCTGAGAATGTTGG
Exon 20	206	54,5 °C	TGATCCCATCACTTTTACCT

		54,9 °C	TTTCTGGCTAAGTCCTTTTG
Exon 21	250	51,2 °C	AGAACTTGATGGTAAGTACATG
		53,5 °C	CATTTTCAGTTAGCAGCCTTA
Exon 22	251	57,0 °C	TCTGTGGTATCTGAACTATCTTCTCT
		53,6 °C	CTGTTCCCACTGTGCTATT
Exon 23	196	56,0 °C	TACTGTTCTGTGATATTATGTGTGG
		59,9 °C	GAATTACAAGGGCAATGAGATCTTA
Exon 24, Amp. 1	166	59,8 °C	CCTTCTGTCCCAGATCTCACTAA
		60,8 °C	TTGCTTGAGTTCCGGTGG
Exon 24, Amp. 2	151	60,6 °C	CCCTCCGACAGGGTGAA
		58,4 °C	AGCAAATGTCCCATGTCAAC

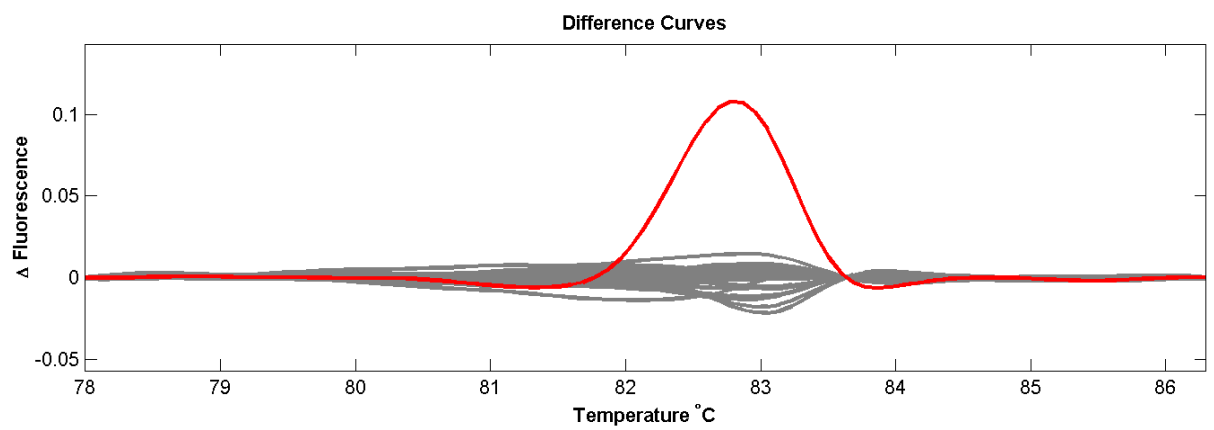
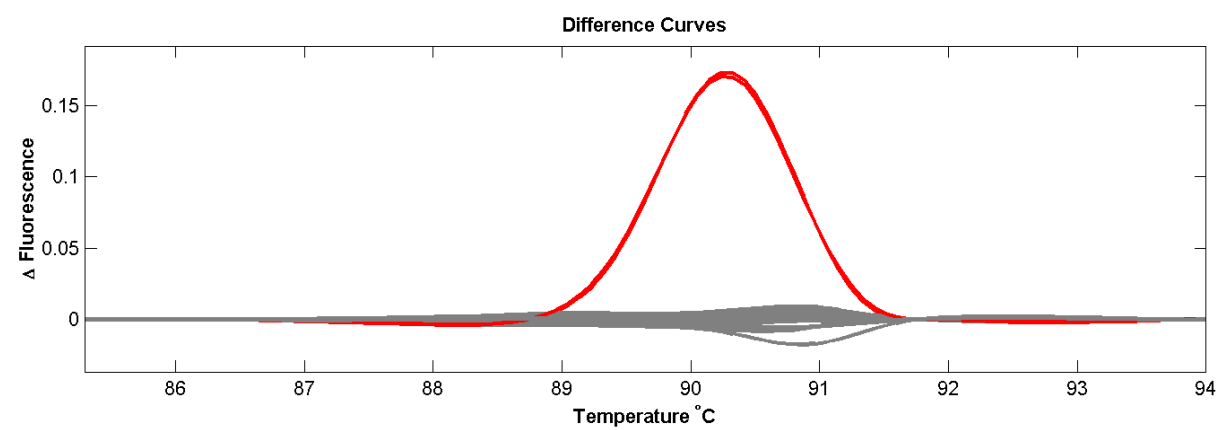
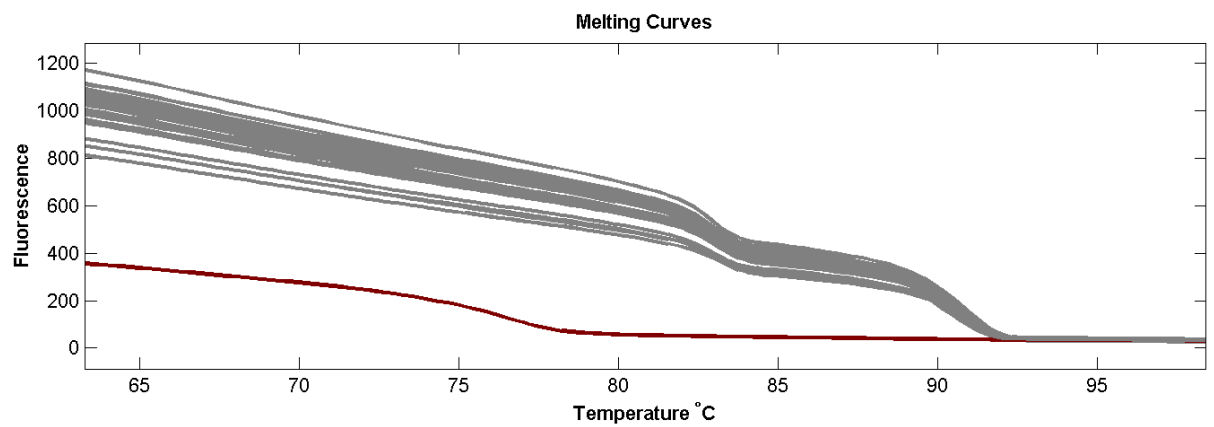
Η αλληλουχία του απλού ανιχνευτή για την ανίχνευση της μετάλλαξης p.Phe508del (Zhou *et. al.* 2004)

5'-TAAAGAAAATATCATCTTTGGTGTTCCTA-P-3' (συμπληρωματικός στη φυσιολογική αλληλουχία). Το P-3' συμβολίζει την χημική προσθήκη ενός φωσφόρου στη θέση 3'.

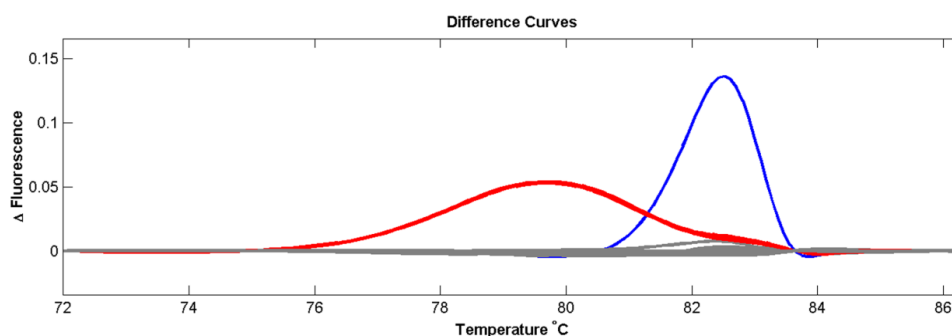
**Π9. PCR εκκινητές για το γονίδιο *ATP7B* για εφαρμογή στη πλατφόρμα
LightScanner®**

HRM primers for <i>ATP7B</i>			
Exon	Forward primer	Reverse primer	bp
1	TCCTCTCCCGGACTTTAAC	GGCGAGTAAGCGCCGAA	232
2i	GGCCCTTCTTCTCAGGTG	CCTTGCCTTCAATGGAGC	340
2ii	AAAGAGACCTTTATCTTCTGCTAAC	CTCCCTTCGGCTCCATCA	306
3	TTGCTCTTCTAATTTGAATATTTTCTGAC	ATACGCAGCATTCTTAAGTT	342
4	CTGCCACCCAGAGTGTTA	TAATCACAAAGATGGATGTGTCCAA	282
5	GCTTTCCTTGATCCTGGG	CATTTTTCTTCACTGATTATATATTACTGT	281
6	GTGCTTCTGCCAATGCATA	AGAGTTGGGCCAGGTA	219
7	GAGTGGCTTGTATCCAGGTGA	ACACAGCATGGAAGGGAG	285
8	CATTGAACTCTCCTCCCTAC	AGAGGAAGTGAGATTTGTTTACTG	349
9	TTCGATAGCTCTCATTTACATTC	CATCTGATGCAGCTCACAC	196
10	AGTGGCCATGTGAGTGATAA	CTATGATATCCTCCTGAGGGAAC	206
11	GGTCACATGAGTGCTGGA	CCCAGAACTCTTCACATAATTTCTA	281
12	TGTGGTGTTTTATTTCTTCATAGGT	AAGAACAGGATCAATGTCAGTAG	266
13	GAGCTTCCTTATTGAACTCTCAAC	CAATGTGAAATAGTAAACAGATACTACTT	314
14	AGGAGTGTGACTATGGAAGC	AGAAGGACATGGTGAGGAATAA	316
15	CCCTCTTGGCTTACAGTTTC	TGGTTTGACCCACCTCTAC	269
16	TCACAGTGAAATTGGACCATTTAG	AAACTGTATTTCTGAGAGAGCG	241
17	ACTTGTGTAGCTGCTGATG	CTGGTGCTTACTTTTGTCTCTAAC	249
18	TTTGCCAACACTAGGCATT	GAAGGGGTCTGCCATT	298
19	CACTGTGTGCTCCTCTC	TTCTCATTTAAAGACATATAAAGCAGGG	311
20	CCTAGGTGTGAGTGCGAG	GGAGCCTCCACAGATG	173
21	TAGAATGGCTCAGATGCTGTT	GTGGTGAGTGGAGGCAA	360

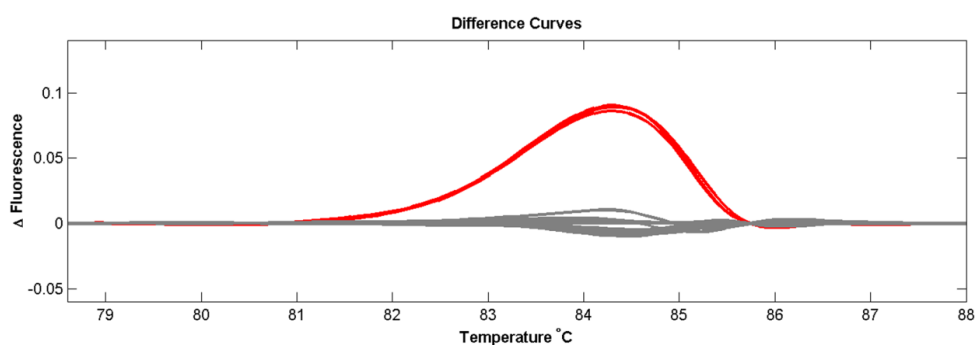
Π10. Αποτελέσματα για το γονίδιο *CFTR* στη πλατφόρμα LightScanner®



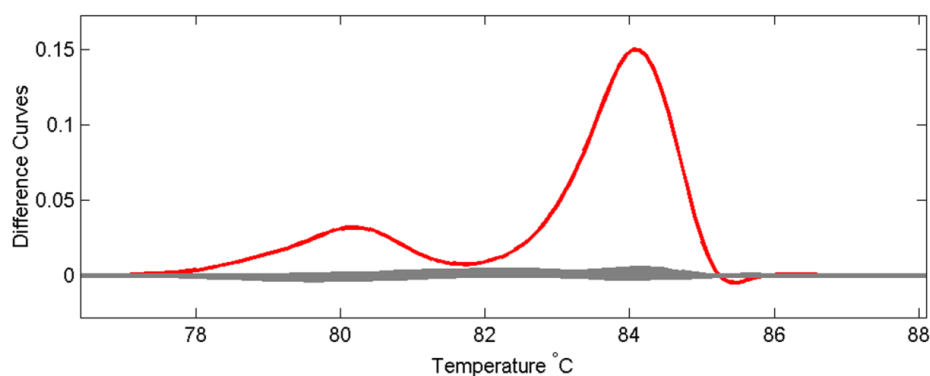
Π11. Αποτελέσματα του πρωτοκόλλου για προγεννητική διάγνωση στο γονίδιο CFTR με χρήση της πλατφόρμας LightScanner®



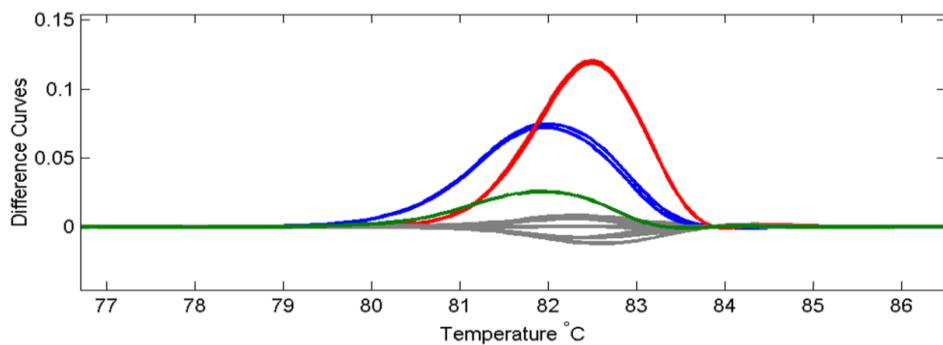
Π11 εικόνα 1. HRM ανάλυση του εξονίου 3 – οι καμπύλες με μπλε αντιστοιχούν στη μετάλλαξη p.Arg74Trp, οι καμπύλες με κόκκινο στη μετάλλαξη p.Gly85Glu και οι καμπύλες με γκρι στη φυσιολογική αλληλουχία



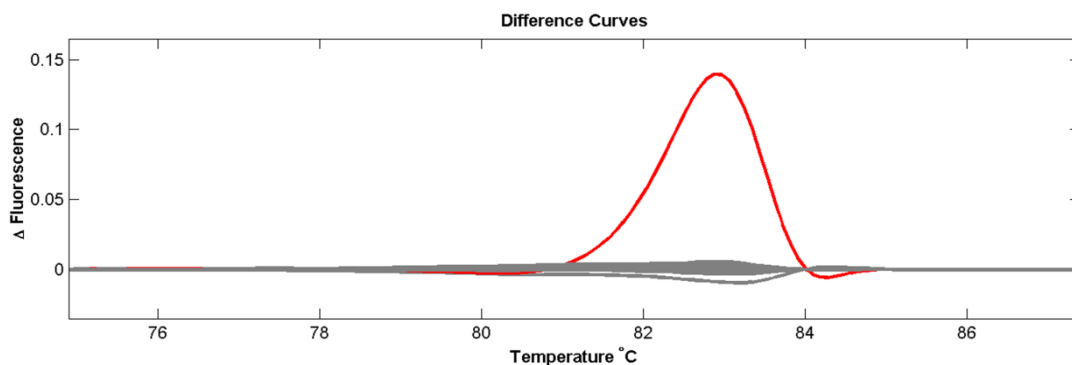
Π11 εικόνα 2. HRM ανάλυση του εξονίου 4_2 – Οι καμπύλες με κόκκινο αντιστοιχούν στη μετάλλαξη 621+1G>T οι καμπύλες με γκρι στη φυσιολογική αλληλουχία



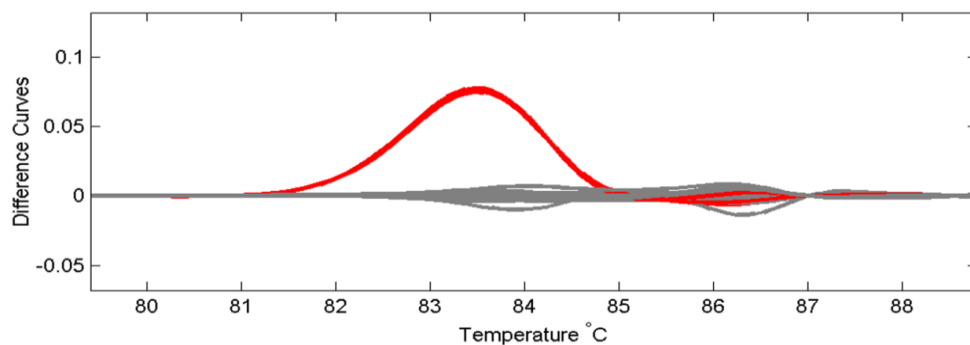
Π11 εικόνα 3. HRM ανάλυση του εξονίου 7_1 – οι καμπύλες με κόκκινο αντιστοιχούν στη μετάλλαξη p.Tyr301Cys και οι καμπύλες με γκρι στη φυσιολογική αλληλουχία



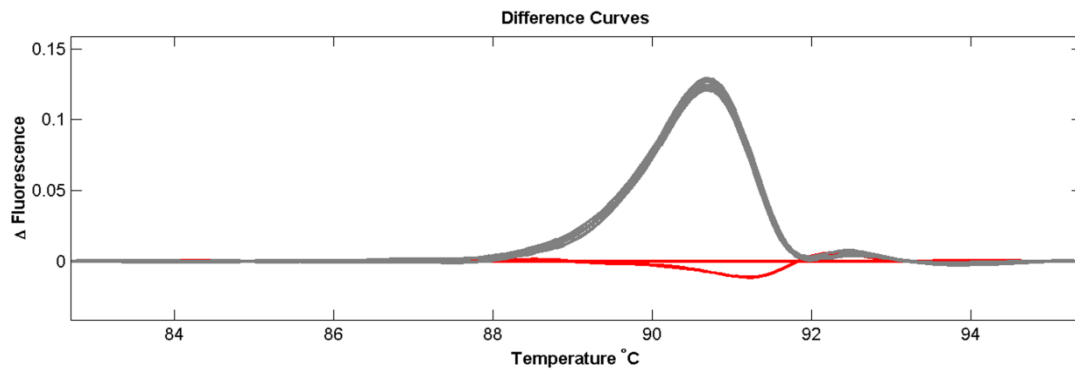
Π11 εικόνα 4. HRM ανάλυση του εξονίου 10 (277bp προϊόν) – οι καμπύλες με κόκκινο αντιστοιχούν στη μετάλλαξη p.Trp496X–p.Met470, οι καμπύλες με μπλε στη μετάλλαξη p.Phe508del–p.Met470, οι καμπύλες με πράσινο στη μετάλλαξη p.Phe508del–p.Met470Val και οι καμπύλες με γκρι στη φυσιολογική αλληλουχία p.Met470Val



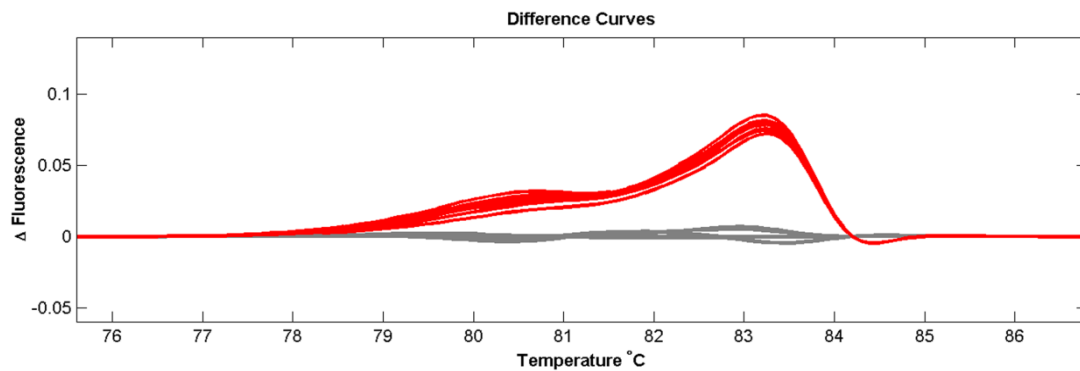
Π11 εικόνα 5. HRM ανάλυση του εξονίου 11 – οι καμπύλες με κόκκινο αντιστοιχούν στη μετάλλαξη p.Gly542X οι καμπύλες με γκρι στη φυσιολογική αλληλουχία



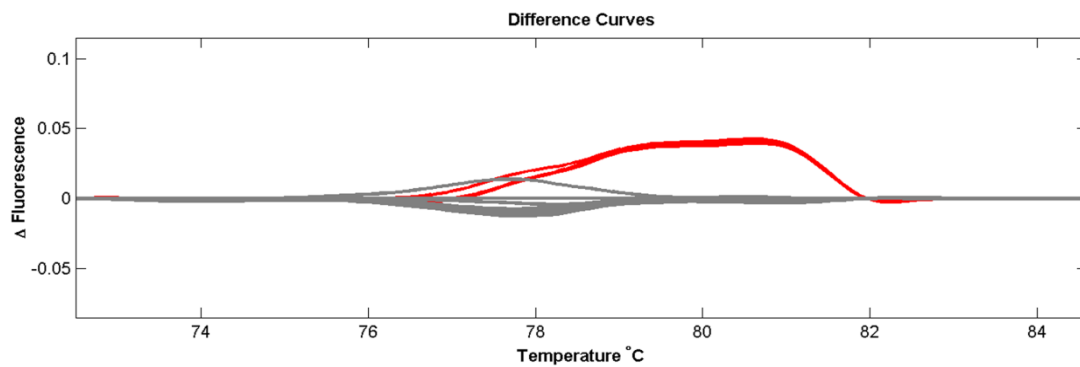
Π11 εικόνα 6. HRM ανάλυση του εξονίου 13_1 – οι καμπύλες με κόκκινο αντιστοιχούν στη μετάλλαξη p.Glu826Lys οι καμπύλες με γκρι στη φυσιολογική αλληλουχία



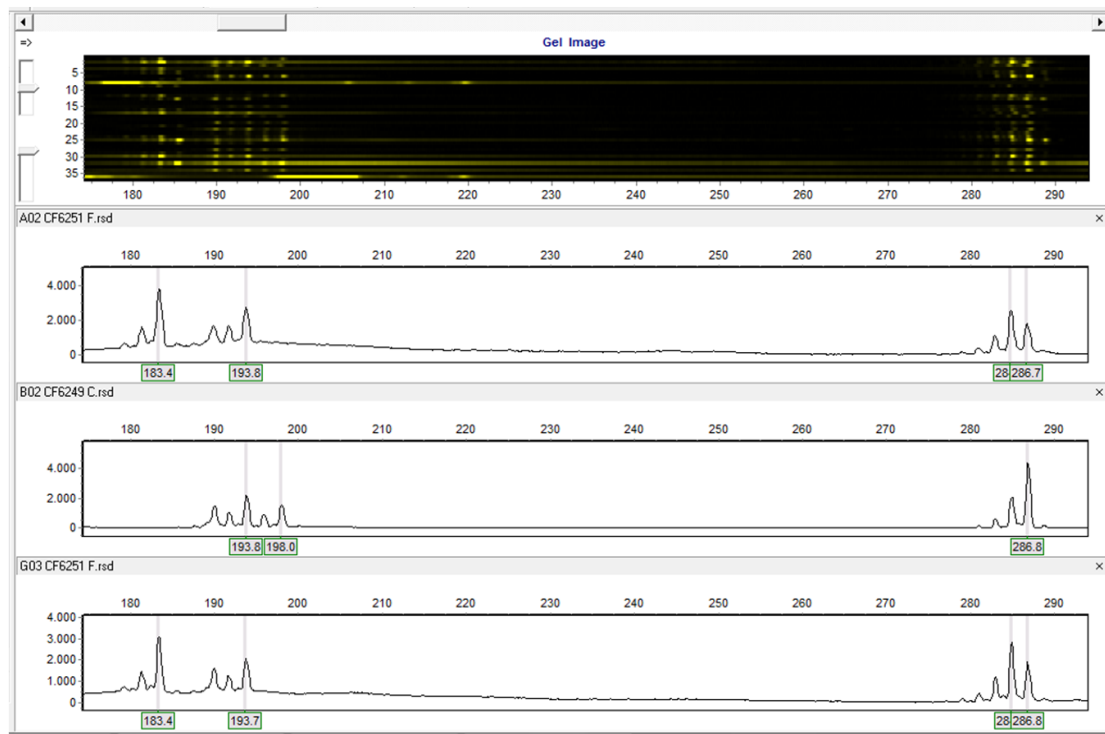
Π11 εικόνα 7. HRM ανάλυση του εξονίου 16 – οι καμπύλες με γκρι αντιστοιχούν στη μετάλλαξη 3120+1G>A οι καμπύλες με κόκκινο στη φυσιολογική αλληλουχία



Π11 εικόνα 8. HRM ανάλυση του εξονίου 18 – οι καμπύλες με κόκκινο αντιστοιχούν στη μετάλλαξη 3500-2A>G και οι καμπύλες με γκρι στη φυσιολογική αλληλουχία



Π11 εικόνα 9. HRM ανάλυση του εξονίου 21 – οι καμπύλες με κόκκινο αντιστοιχούν στην μετάλλαξη p.Asn1303Lys και οι καμπύλες με γκρι στη φυσιολογική αλληλουχία



Π11 εικόνα 10. Ανάλυση πολυμορφικών δεικτών σε μια οικογένεια προγεννητικής διάγνωσης.
 – Το πρώτο δείγμα είναι το μητρικό, το δεύτερο το πατρικό και το τρίτο του εμβρύου. Ο πρώτος δείκτης είναι ο IVS8 και ο δεύτερος ο D7s677.