



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



«Διερεύνηση των υπεύθυνων μεταλλαγών που σχετίζονται με γενετικά νοσήματα μέσω της μελέτης του γονιδιώματος με νέες τεχνολογίες υψηλής απόδοσης: ανάλυση μεταλλαγών/πολυμορφισμών σε νέα γονίδια και συσχέτιση με κλινικοεργαστηριακά ευρήματα»

ΣΤΥΛΙΟΣ Δ. ΙΩΑΝΝΗΣ (ΒΙΟΛΟΓΟΣ)

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΚΟΛΛΙΑ ΠΑΝΑΓΟΥΛΑ (ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ)

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: ΠΑΠΑΔΑΚΗΣ ΜΑΝΟΥΣΟΣ (ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ “EuroGenetica”)

2017

ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Διερεύνηση των υπεύθυνων μεταλλάγων που σχετίζονται με γενετικά νοσήματα μέσω της μελέτης του γονιδιώματος με νέες τεχνολογίες υψηλής απόδοσης: ανάλυση μεταλλάγων/πολυμορφισμών σε νέα γονίδια και συσχέτιση με κλινικοεργαστηριακά ευρήματα»

ΣΤΥΛΙΟΣ Δ. ΙΩΑΝΝΗΣ (ΒΙΟΛΟΓΟΣ)

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΚΟΛΛΙΑ ΠΑΝΑΓΟΥΛΑ (ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ)

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: ΠΑΠΑΔΑΚΗΣ ΜΑΝΟΥΣΟΣ (ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ “EuroGenetica”)

ΤΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ: ΠΡΟΤΥΠΟ ΚΕΝΤΡΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ “EuroGenetica”

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- κ. Κόλλια Παναγούλα,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου
- κ. Αλεπόρου Βασιλική,
Καθηγήτρια Βιοχημικής και Μοριακής Γενετικής
- κ. Παπασιδέρη Ισιδώρα,
Καθηγήτρια Κυτταρικής και Αναπτυξιακής Βιολογίας

2017

**Στην μνήμη της πολυαγαπημένης μου γιαγιάς, πρεσβυτέρας Ανθής
και
του πολυαγαπημένου μου παππού, πρεσβύτερου Ιωάννη.**

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε το ακαδημαϊκό έτος 2015-2016 στο πρότυπο Κέντρο Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρογενετικής “EuroGenetica” σε συνεργασία με τον Τομέα Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, στα πλαίσια των σπουδών μου σε μεταπτυχιακό επίπεδο στο διατμηματικό Μ.Δ.Ε. «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» του Τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α. Θα ήθελα από αυτή την θέση να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην επιτυχή περάτωση της εργασίας καθώς και των σπουδών μου συνολικά.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην Επιβλέπουσα Καθηγήτρια μου κ. Κόλλια Παναγούλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, η οποία μου έδωσε την δυνατότητα να ασχοληθώ με το τόσο σημαντικό και ενδιαφέρον θέμα των γενετικών νοσημάτων και συγκεκριμένα της νόσου της Κυστικής Ίνωσης, καθώς και της νέας τεχνολογίας αλληλούχισης, NGS. Οι πολύτιμες συμβουλές της και η καθοδήγηση της αποτέλεσαν οδηγό για την επιτυχή περάτωση τόσο της διπλωματικής εργασίας όσο και του μεταπτυχιακού διπλώματος εν γένει.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον κ. Παπαδάκη Μανούσο, διευθυντή του πρότυπου Κέντρου Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρογενετικής “EuroGenetica”, ο οποίος αποτέλεσε με την στάση του πρότυπο μίμησης τόσο ως άνθρωπος αλλά και ως επιστήμων ειδικότερα. Η συνεχής παρότρυνση του για εμβάθυνση σε επίπεδο γνώσεως τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο, καθώς και οι εις βάθος συζητήσεις μας συνέβαλλαν θετικά στην διαμόρφωση μιας συστημικής θεώρησης της βιολογίας, αναζητώντας υπό την καθοδήγηση του τα «Μονοπάτια της Ζωής».

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Παπανικολάου Βασίλειο, την βιολόγο κ. Dubos Stephanie, τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Μαρούλη Βασίλειο και την προπτυχιακή φοιτήτρια βιολογίας κ. Ρούσσου Σταματίνα για την φιλία τους και τις πολύτιμες στιγμές που περάσαμε μαζί κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη Δ.Ε.Π. για τις πολύτιμες γνώσεις και την αμέριστη βοήθεια που μου πρόσφεραν κατά τη διάρκεια των δύο χρόνων του μεταπτυχιακού προγράμματος, καθώς και την γραμματέα του μεταπτυχιακού προγράμματος κ. Αναγνωστοπούλου Δήμητρα για την προθυμία και την ευγένεια με την οποία ανταποκρινόταν σε κάθε απορία μου.

Τέλος, εκ βάθους καρδιάς ευχαριστώ την οικογένεια μου, τη σύντροφο μου, καθώς και τους φίλους μου που με στήριξαν με ποικίλους τρόπους στην επιτυχή περάτωση των σπουδών μου.

Στύλιος Δ. Ιωάννης

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο : Στύλιος Δ. Ιωάννης
Ημερομ. Γέννησης : 12 - 03 - 1985
Τόπος Γέννησης : Ρόδος - Δωδεκάνησα
Στρατ. Υποχρεώσεις : Εκπληρωμένες (Υγειονομικό Σώμα)

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ

E -mail : Johnstiliος@hotmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- Τελειόφοιτος του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» του Τμήματος Βιολογίας και της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.)
- Απόφοιτος του Τμήματος Βιολογίας, της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.)
Βαθμός Πτυχίου : Έξι και Τριάντα Πέντε Εκατοστά (6,35) «Καλώς»
- 2^ο Ενιαίο Λύκειο Ρόδου «Καζούλλειο»
Βαθμός Απολυτηρίου : Δέκα Επτά και Τρία Δέκατα (17 3/10) «Λίαν Καλώς»

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

1. Αγγλικά : Πολύ Καλά
 - 1.1. First Certificate in English (FCE), University of Cambridge
 - 1.2. Certificate of Competency in English (ECCE), University of Michigan
2. Γαλλικά : Βασικό Επίπεδο

ΓΝΩΣΕΙΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗ

- Λειτουργικά Συστήματα : Windows
- Γλώσσες Προγραμματισμού : Perl
- Πολύ Καλή Χρήση Προγραμμάτων Microsoft : Word, Excel, Powerpoint
- Πολύ Καλή Χρήση Διαδικτύου (Internet)

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 02/06/2013 - 19/12/2013
Βοηθός Μικροβιολογικού Εργαστηρίου στο 95° Τ.Υ.ΕΘ.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

- 18/03/2016
Παρουσίαση των πρωτοκόλλων απομόνωσης και επεξεργασίας του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA (cffDNA) από το πλάσμα της μητέρας στα πλαίσια της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας στην επιστημονική ομάδα του πρότυπου Κέντρου Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρογενετικής «EUROGENETICA A.E.»
- 04/02/2016
Παρουσίαση της μεθόδου NIPD με τη χρήση NGS για τη νόσο της Κυστικής Ύψωσης και των τρόπων μίμησης του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA (cffDNA) στα πλαίσια της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας στην επιστημονική ομάδα του πρότυπου Κέντρου Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρογενετικής «EUROGENETICA A.E.»
- 01/10/2015 – 31/12/2015
Συμμετοχή στο έργο «Καταγραφή, εποπτεία και αξιολόγηση της κατάστασης διατήρησης των Τύπων Οικοτόπων και των Ειδών Χλωρίδας, Πανίδας και Ιχθυοπανίδας του Φορέα Διατήρησης Λίμνης Παμβώτιδας» ως επιστημονικός συνεργάτης που εξειδικεύεται σε θέματα μελέτης, προστασίας και διαχείρισης ειδών Χειροπτέρων που ανατέθηκε στην εταιρεία Ecostudies P.C.
- 22/12/2015
Παρουσίαση εργαλείων λογισμικού Βιοπληροφορικής με τίτλο «In silico Εργαλεία Πρόγνωσης Παθολογικών Πρωτεϊνών» στα πλαίσια της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας στην επιστημονική ομάδα του πρότυπου Κέντρου Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρογενετικής «EUROGENETICA A.E.»
- 02/10/2015
Παρουσίαση της αρχής μεθόδου της πλατφόρμας Αλληλούχισης Νέας Γενιάς (Next Generation Sequencing) Ion Torrent PGM στα πλαίσια της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας στην επιστημονική ομάδα του πρότυπου Κέντρου Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρογενετικής «EUROGENETICA A.E.»
- 2012 – 2013
Διπλωματική εργασία με θέμα: «Ανάλυση Υπερήχων Νυχτερίδων» με Επιβλέπων Καθηγητή τον κ. Λεγάκι Αναστάσιο, Αναπληρωτή Καθηγητή Ζωϊκής Ποικιλότητας
Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάλυση υπερήχων νυχτερίδων που καταγράφηκαν στα πλαίσια μελετών της Ελληνικής Ζωολογικής Εταιρείας, της Εταιρείας Μελέτης Χειροπτέρων και του Τμήματος Βιολογίας Ε.Κ.Π.Α., στην οποία επιτεύχθηκε η ταξινόμηση – ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους – των νυχτερίδων σε περιοχές εντός και εκτός Αττικής.

Βαθμός Αξιολόγησης : Δέκα (10)

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ – WORKSHOP

- 12/10/2015 - 16/11/2015
Θέμα : “Introduction to the Science of Cancer”
Φορέας : The Ohio State University Comprehensive Cancer Center μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας μάθησης Coursera
- 10/10/2015 – 11/10/2015
Θέμα : Bionian Academy: «Σπάνια Νοσήματα και Ορφανά Φάρμακα: Επί Ενδείξεων Βασίζόμενες Προσεγγίσεις»
Φορέας : Αστική Εταιρεία Βιοτεχνολογίας, Βιοεπιστημών και Πολιτισμού Bionian Cluster
- 22/09/2015
Θέμα : “Ion World Tour 2015”
Φορέας : Thermo Fisher Scientific
- 28/04/2015
Θέμα : «Μοριακή Βιολογία στην Εξωσωματική Γονιμοποίηση»
Φορέας : Β΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Αρεταίειο

Μόρια (Credits): Ένα (1) Μόριο παρακολούθησης από την Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογική Εταιρεία και την Ένωση Μαιευτήρων – Γυναικολόγων
- 23/03/2015
Θέμα : «Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση (Preimplantation Genetic Diagnosis PGD/Preimplantation Genetic Screening PGS)»
Φορέας : Β΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Αρεταίειο

Μόρια (Credits): Ένα (1) Μόριο παρακολούθησης από την Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογική Εταιρεία και την Ένωση Μαιευτήρων – Γυναικολόγων
- 27/01/2015
Θέμα : «Υαλοποίηση (Vitrification) ωαρίων - εμβρύων»
Φορέας : Β΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Αρεταίειο

Μόρια (Credits): Ένα (1) Μόριο παρακολούθησης από την Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογική Εταιρεία και την Ένωση Μαιευτήρων – Γυναικολόγων
- 13/01/2015
Θέμα : «Μέθοδος time-lapse: Κριτήρια εντοπισμού εμβρύων με υψηλό δυναμικό ανάπτυξης»
Φορέας : Β΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Αρεταίειο
Μόρια (Credits): Ένα (1) Μόριο παρακολούθησης από την Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογική Εταιρεία και την Ένωση Μαιευτήρων – Γυναικολόγων
- 16/12/2014
Θέμα : «Μικρογονιμοποίηση: Επεξήγηση της τεχνικής IMSI (Intra-cytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection)»
Φορέας : Β΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Αρεταίειο

Μόρια (Credits): Ένα (1) Μόριο παρακολούθησης από την Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογική Εταιρεία και την Ένωση Μαιευτήρων – Γυναικολόγων
- 02/12/2014
Θέμα : «Φιλοσοφικές, κοινωνικές, οικονομικές, αναπαραγωγικές και σεξουαλικές θεωρήσεις που αφορούν την κάθοδο των όρχεων στα θηλαστικά»
Φορέας : Α΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Αλεξάνδρα»

Μόρια (Credits): Ένα (1) Μόριο παρακολούθησης από την Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογική Εταιρεία και την Ένωση Μαιευτήρων – Γυναικολόγων
- 02/12/2014
Θέμα : «Καλλιέργεια εμβρύων έως το στάδιο της βλαστοκύστης»
Φορέας : Β΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Αρεταίειο

Μόρια (Credits): Ένα (1) Μόριο παρακολούθησης από την Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογική Εταιρεία και την Ένωση Μαιευτήρων – Γυναικολόγων

- 28/11/2014
Θέμα : «Κλινικό Φροντιστήριο Φοιτητών για το AIDS»
Φορέας : Ελληνική Εταιρεία Μελέτης και Αντιμετώπισης του AIDS στα πλαίσια του 26^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου AIDS
- 18/11/2014
Θέμα : «IVF/ICSI – Έλεγχος Γονιμοποίησης»
Φορέας : Β΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Αρεταίειο

Μόρια (Credits): Ένα (1) Μόριο παρακολούθησης από την Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογική Εταιρεία και την Ένωση Μαιευτήρων – Γυναικολόγων
- 04/11/2014
Θέμα : «Συμβουλευτική στην Παιδική και Εφηβική Γυναικολογία»
Φορέας : Β΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Αρεταίειο

Μόρια (Credits): Ένα (1) Μόριο παρακολούθησης από την Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογική Εταιρεία και την Ένωση Μαιευτήρων – Γυναικολόγων
- 04/11/2014
Θέμα : «Ωοληψία – Καθαρισμός Ωαρίων. In vitro ωρίμανση ωαρίων»
Φορέας : Β΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Αρεταίειο
Μόρια (Credits): Ένα (1) Μόριο παρακολούθησης από την Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογική Εταιρεία και την Ένωση Μαιευτήρων – Γυναικολόγων
- 07/07/2014 - 18/07/2014
Θέμα : «49^ο Θερινό Σχολείο Δημόκριτος»
Φορέας : Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος»
- 19/05/2014 - 14/07/2014
Θέμα : “Introduction to Forensic Science”
Φορέας : Nanyang Technological University, Singapore μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας μάθησης Coursera
- 22/04/2013 - 16/06/2013
Θέμα : “Genes and the Human Condition: From Behavior to Biotechnology”
Φορέας : University of Maryland, College Park μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας μάθησης Coursera
- 22/04/2013 - 24/05/2013
Θέμα : Μαθήματα Ειδικής Εκπαίδευσης: «Βοηθός Μικροβιολογικού Εργαστηρίου»
Φορέας : 401 Γ.Σ.Ν.Α. στα πλαίσια της στρατιωτικής θητείας στο Υγειονομικό σώμα
- 28/01/2013 - 04/03/2013
Θέμα : “Astrobiology & the Search for Extraterrestrial Life”
Φορέας : University of Edinburgh(UK) μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας μάθησης Coursera
- Σεπτέμβριος 2012 - Δεκέμβριος 2012
Θέμα : «Εισαγωγή στην Ομοιοπαθητική»
Φορέας : Εθνική Εταιρεία Ομοιοπαθητικής Ιατρικής Συνεργασίας
- 18/05/2012 - 20/05/2012
Θέμα : 2ο Θερινό Σχολείο Πρωτεϊνών «Από το Γονίδιο στην Πρωτεΐνη και όχι μόνο...»
Φορέας : Τμήμα Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α., Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας
- 07/05/2011
Θέμα : 11^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Γενετικής «Προκλήσεις της Σύγχρονης Γενετικής»
Φορέας : Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών
- 17/09/2010
Θέμα : “Modeling Workshop: From Structural Biology to Drug Discovery”
Φορέας : Schrödinger, Inc & Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α.
- Μάρτιος 2010 - Μάιος 2010
Θέμα : «Προχωρημένα μαθήματα σε θέματα βιοχημείας, βιοτεχνολογίας & βιοϊατρικής»
Φορέας : Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών & Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
- Εαρινό εξάμηνο του ακαδημαϊκού έτους 2008-2009 (Διάρκεια 42 ώρες)
Θέμα : «Διδακτική Μεθοδολογία των Βιολογικών Μαθημάτων»
Φορέας : Τμήμα Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α. σε συνεργασία με το TEΑΠΗ-Ε.Κ.Π.Α.

ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 18/11/2016 – 20/11/2016
Θέμα : 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Π.Ε.Β. «Βιοεπιστήμες στον 21^ο Αιώνα»
Φορέας : Πανελλήνια Ένωση Βιοεπιστημόνων, υπό την αιγίδα του Υπουργείου Παιδείας, Έρευνας και Θρησκευμάτων
- 19/10/2016
Θέμα : «Αξιοπρέπεια του Ανθρώπου και Ανθρώπινα Δικαιώματα»
Φορέας : Ελληνικό Κλιμάκιο της Έδρας Βιοηθικής της UNESCO (Haifa) σε συνεργασία με το Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Φιλοσοφίας του Τμήματος Φιλοσοφίας, Παιδαγωγικής, Ψυχολογίας του Ε.Κ.Π.Α.
- 07/10/2016
Θέμα : «Ο Καρκίνος Πέρα από το Σωματικό Πάθος»
Φορέας : Κέντρο για την Υποστήριξη, την Εκπαίδευση και την Έρευνα στην Ψυχοκοινωνική Ογκολογία, της Ελληνικής Αντικαρκινικής Εταιρείας σε συνεργασία με την Ιερά Αρχιεπισκοπή Αθηνών
- 06/10/2016
Θέμα : «Εξατομικευμένη Θεραπεία»
Φορέας : Health Daily της Boussias Communications
- 16/01/2015 – 17/01/2015
Θέμα : «Ιατρική Ευθύνη και Βιοηθική 2015: Σύγχρονες προσεγγίσεις και προοπτικές του μέλλοντος – Το ανθρώπινο πρόσωπο»
Φορέας : Τμήμα Αρχαιολογίας, Βιβλιοθηκονομίας και Μουσειολογίας του Ιονίου Πανεπιστημίου, Ερευνητική Ομάδα Πληροφορία: Ρύθμιση, Ιστορία και Πολιτισμός (IHRC) και Νομική Βιβλιοθήκη, με τη συνεργασία της E-THEMIS
- 29/10/2014
Θέμα : «Νευροβιολογία της Μάθησης»
Φορέας : Ινστιτούτο Μοριακής Ιατρικής και Βιοϊατρικής Έρευνας, Ίδρυμα Ευγενίδου
- 06/06/2014
Θέμα : «Ανθρώπος Περιβάλλον Διάστημα»
Φορέας : Ιατρική Σχολή Ε.Κ.Π.Α. σε σύμπραξη με την Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Τ.Ε.Ι. Αθηνών στα πλαίσια του ΠΜΣ «Περιβάλλον και Υγεία. Διαχείριση περιβαλλοντικών θεμάτων με επιπτώσεις στην Υγεία»
- 07/04/2014
Θέμα : «Πρόληψη και Προαγωγή της Υγείας»
Φορέας : Δήμος Αθηναίων
- 13/03/2014
Θέμα : «Βιολογικά Συστήματα: Εξέλιξη και Πολυπλοκότητα»
Φορέας : ΠΕ04 Δ' ΔΔΕ Αθήνας, 4^ο ΓΕΛ Γλυφάδας, Πανελλήνια Ένωση Βιοεπιστημόνων, υπό την αιγίδα του ΥΠΑΙΘ, της Δ' ΔΔΕ Αθήνας και του Δήμου Γλυφάδας
- 10/03/2014
Θέμα : «Εγκέφαλος και Γλώσσα»
Φορέας : Ελληνική Εταιρεία για τις Νευροεπιστήμες, Ίδρυμα Ευγενίδου, Πανελλήνια Ένωση Βιοεπιστημόνων, υπό τον συντονισμό της Παγκόσμιας Οργάνωσης Dana Alliance for the Brain
- 01/11/2012 - 3/11/2012
Θέμα : "Progress in combination therapy of cancer using novel immunomodulators"
Φορέας : Τμήμα Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α. σε συνεργασία με το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ στα πλαίσια του ευρωπαϊκού προγράμματος INSPIRE
- 03/12/2011 - 04/12/2011
Θέμα : 8^ο Ετήσιο Συμπόσιο της Γ' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών «Υποβοηθούμενη αναπαραγωγή : το σήμερα και το αύριο»
Φορέας : Γ' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Π.Γ.Ν. «Αττικόν»

Μόρια (Credits) : Δεκατρία (13) μόρια αμοιβαία αναγνωρίσιμα από την UEMS-EACCME, στο πλαίσιο της Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης και δύο (2) μόρια Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης από την Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογική Εταιρεία
- 19/02/2010 - 20/02/2010
Θέμα : «Η Βιολογία συναντά την σύγχρονη κοινωνία»
Φορέας : Πανελλήνια Ένωση Βιοεπιστημόνων & Ράλλειο Πειραματικό Γενικό Λύκειο Θηλέων Πειραιά

- 22/01/2010
Θέμα : «Ηλεκτρομαγνητικές Ακτινοβολίες και Άνθρωπος»
Φορέας : Ένωση Ελλήνων Φυσικών
 - 30/10/2009 - 31/10/2009
Θέμα : “Structural Biology and Chemistry Symposium”
Φορέας : Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
 - 09/10/2009 - 10/10/2009
Θέμα : «Θέματα Αιχμής στην Σύγχρονη Ογκολογία. Σημερινές Απαντήσεις και Μελλοντικές Προοπτικές»
Φορέας : Εταιρεία Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδας & Εταιρεία Μελέτης της Μεταστατικής Νόσου του Ήπατος & Ελληνική Εταιρεία Χειρουργικής Πεπτικού
- Μόρια (Credits) : Εννέα (9) C.M.E. C.P.D. Credits
- 08/01/2008 - 29/01/2008
Θέμα : «Νέες Τάσεις της Βιοτεχνολογίας και Βιοασφάλεια», στα πλαίσια των μορφωτικών εκδηλώσεων «Επιστήμης Κοινωνία»
Φορέας : Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας του Ε.Ι.Ε. & Ελληνική Εταιρεία Βιοτεχνολογίας
 - 28/11/2007 - 02/12/2007
Θέμα : “3rd International Congress on Brain and Behaviour” & “16th Thessaloniki Conference”
Φορέας : International Society on Brain and Behaviour & South-East European Society for Neurology and Psychiatry
- Μόρια (Credits) : Δώδεκα (12) C.M.E. Credits
- 05/05/2007
Θέμα : “1st International Symposium in Genetics and Assisted Reproduction Techniques”
Φορέας : EuroGene Genetics Laboratory & Biogenetics, Molecular Biology Laboratory, υπό την αιγίδα του Ελληνικού Υπουργείου Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης
 - 14/03/2007
Θέμα : «Κρίση στην Βιοϊατρική Έρευνα»
Φορέας : Διαγνωστικό και Θεραπευτικό Κέντρο Αθηνών **ΥΓΕΙΑ** σε συνεργασία με τη Γενική, Μαιευτική-Γυναικολογική και Παιδιατρική Κλινική **ΜΗΤΕΡΑ**

ΕΘΕΛΟΝΤΙΣΜΟΣ – ΚΟΙΝΩΝΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

- 04/03/2006 - 05/03/2006
Συνδιοργανωτής του τουρνουά καλαθοσφαίρισης «1^ο Φιλικό Τουρνουά Κυπριάδου» που πραγματοποιήθηκε στο γήπεδο Κυπριάδου στα Πατήσια
- 01/08/2005 - 31/08/2005
Συμμετοχή στο πρόγραμμα «Εθελοντισμός και Διακοπές»
Φορέας : Γενική Γραμματεία Νέας Γενιάς & ΕΛ.ΤΑ.

Πίνακας περιεχομένων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	14
1.1 Κυστική Ίνωση: Μια Ιστορική Προσέγγιση.....	14
1.2 Φυσιολογική Δομή του Γονιδίου της Κυστικής Ίνωσης	17
1.3 Δομή και Λειτουργία της Πρωτεΐνης	20
1.4 Τάξεις Μεταλλάξεων του <i>CFTR</i> γονιδίου και Συχνότητες Μεταλλάξεων ..	24
1.5 Ρύθμιση της Έκφρασης του Γονιδίου από Γονίδια-Τροποποιητές/Επιγενετικές Τροποποιήσεις	30
1.6 Συσχέτιση Γονοτύπου και Φαινοτύπου.....	33
1.7 Ετεροζυγώτες Φορείς Μεταλλάξεων και το Εξελικτικό τους Πλεονέκτημα	36
1.8 Διαγνωστική προσέγγιση Κυστικής Ίνωσης	37
1.8.1 Προσδιορισμός Cl ⁻ στον Ιδρώτα (Δοκιμασία-Τεστ Ιδρώτα)	38
1.8.2 Μέτρηση Ρινικών Δυναμικών	38
1.8.3 Μοριακές Τεχνικές Ανίχνευσης Κυστικής Ίνωσης	39
1.8.3.1 Allele-Specific Oligonucleotide (ASO) PCR	40
1.8.3.2 Μέθοδος Ηλεκτροφόρησης σε Πήκτωμα με Κλίση Αποδιατακτικού (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis (DGGE))	40
1.8.3.3 Μέθοδοι Αλληλούχισης	41
1.8.3.3.i Αλληλούχιση με τη Μέθοδο Sanger	41
1.8.3.3.ii Αλληλούχιση με Next Generation Sequencing (NGS) πλατφόρμες.	43
1.9 Μη Επεμβατική Προγεννητική Διάγνωση (NIPD: Non Invasive Prenatal Diagnosis).....	52
1.9.1 Μέθοδοι Προσομοίωσης του Ελεύθερου Εμβρυικού DNA.....	56

1.10 Η Γενετική Συμβουλευτική στην Εποχή του NGS και Βιοηθικοί Προβληματισμοί.....	57
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	60
2.1 Υλικό της Μελέτης	60
2.2 Μεθοδολογία.....	61
2.2.1 Πρωτόκολλο Απομόνωσης Γενωμικού DNA	61
2.2.2 Πρωτόκολλο Αλληλούχισης Νέας Γενιάς με τη χρήση της πλατφόρμας Ion Torrent™ Personal Genome Machine® (PGM) System.....	63
2.2.2.i Δημιουργία Βιβλιοθήκης (Library Preparation)	67
2.2.2.ii Δημιουργία Εκμαγείου (Template Preparation).....	72
2.2.2.iii Αλληλούχιση και αξιολόγηση του «τρεξίματος» (Run)	77
2.2.2.iv Ανάλυση Δεδομένων	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	89
3.1 Ανάλυση Αποτελεσμάτων.....	89
3.1.1 Ανάλυση Αποτελεσμάτων Κατηγορίας Δειγμάτων α	89
3.1.2 Ανάλυση Αποτελεσμάτων Κατηγορίας Δειγμάτων β	97
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	100
4.1 Συμπεράσματα – Συζήτηση	100
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	105
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	124

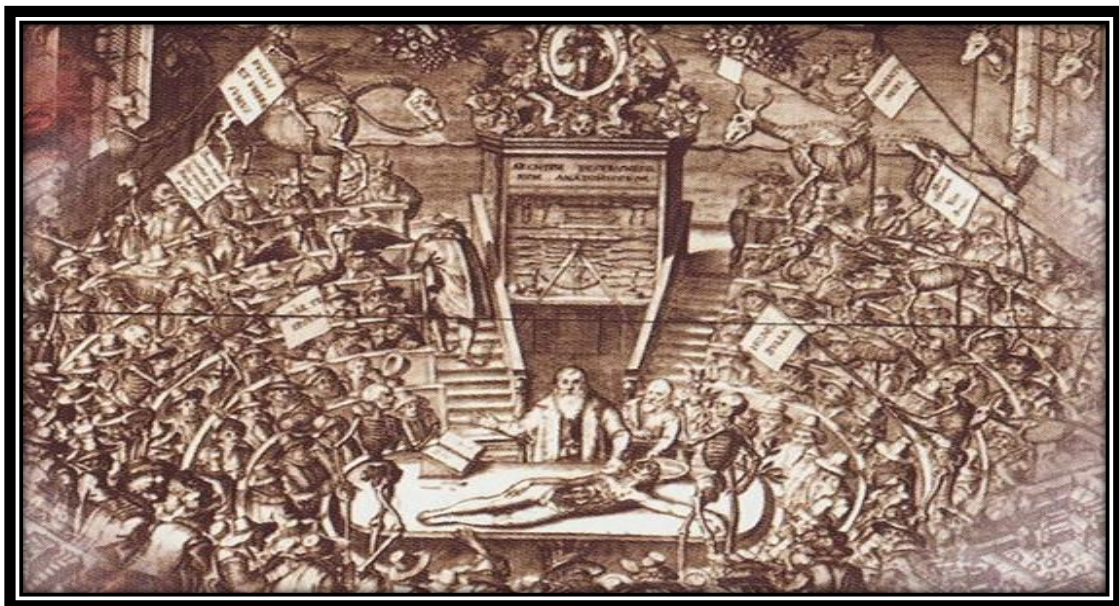
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Κυστική Ίνωση: Μια Ιστορική Προσέγγιση

Η Κυστική Ίνωση είναι μια κληρονομική πολυσυστηματική νόσος, αυτοσωμικού υπολειμματικού χαρακτήρος, με κύριο παθογενετικό χαρακτηριστικό τη δυσλειτουργία των εξωκρινών αδένων που ευθύνεται και για το ευρύ φάσμα των κλινικών εκδηλώσεων και πολυπλοκών της. Θεωρείται ως το σημαντικότερο κληρονομικό νόσημα στη λευκή φυλή, αν και η συχνότητα της δεν είναι ομοιόμορφη ανάμεσα σε Καυκάσιους πληθυσμούς (Kerem *et al.*, 1989). Η συχνότητα της νόσου ποικίλλει ανάμεσα στους διάφορους πληθυσμούς, και απαντάται με υψηλότερο ποσοστό σε άτομα Βορειοευρωπαϊκής καταγωγής, όπου 1 στα 2500 νεογέννητα νοσεί, κατατάσσοντας βάσει συχνότητας εμφάνισης την Κυστική Ίνωση στο δίκτυο σπάνιων παθήσεων Orphanet (Αριθμός Orphanet: 586). Στους πληθυσμούς αυτούς η συχνότητα ετεροζυγωτίας υπολογίζεται ότι είναι 1 στα ~25 άτομα. Η Κυστική Ίνωση παρατηρείται σε μικρότερη συχνότητα και σε άλλους πληθυσμούς, αλλά σημαντικός αριθμός νοσούντων ατόμων απαντάται και στην Νότια Ευρώπη, στους Εβραίους Ashkenazi και στους Μαύρους της Αμερικής (Collins, 1992).

Στην Ελλάδα γεννιούνται με Κυστική Ίνωση συνολικά 50-60 παιδιά το χρόνο (1 παιδί ανά εβδομάδα περίπου). Το 4-5% του γενικού πληθυσμού, δηλαδή 1 στα 20 έως 25 άτομα θεωρείται ότι είναι φορέας του παθολογικού γονιδίου (περίπου 500.000 Έλληνες είναι φορείς) (Kanavakis *et al.*, 1995). Στην χώρα μας εκτιμάται ότι υπάρχουν πάνω από 800 ασθενείς ενώ η συχνότερη γονιδιακή μετάλλαξη που παρατηρείται στον ελλαδικό χώρο είναι η χαρακτηριζόμενη ως F508del ή ΔF508, η οποία θεωρείται από τις βαρύτερες σε συμπτωματολογία μεταλλάξεις. Συγκριτικά αναφέρεται ότι, παρόλο που, στην Ελλάδα και σε άλλες μεσογειακές χώρες, η Μεσογειακή Αναιμία εμφανίζει ποσοστό φορέων περίπου διπλάσιο (8-10%), λόγω της ενημέρωσης και του εκτεταμένου προγράμματος προγεννητικού ελέγχου που έχει εφαρμοσθεί τα τελευταία 20 χρόνια, οι γεννήσεις ασθενών παιδιών δεν ξεπερνούν τις 5 κάθε χρόνο. Επομένως, από την άποψη της γέννησης νέων πασχόντων, η Κυστική Ίνωση είναι μακράν η πιο διαδεδομένη κληρονομική νόσος στην Ελλάδα. Κατά εντελώς παράδοξο τρόπο, είναι μια πάθηση μάλλον άγνωστη στην κοινή γνώμη, ενώ, ακόμη και μεταξύ των ιατρών, η εικόνα για τη νόσο είναι ασαφής ή παρωχημένη (Πανελλήνιος Σύλλογος Κυστικής Ίνωσης, 2016).

Η Κυστική Ίνωση οφείλει τη θέση της στο «ιατρικό πάνθεον» ως ξεχωριστό νόσημα στις προόδους που σημείωσε η επιστήμη της ιατρικής του 20^{ου} αιώνα. Ωστόσο, πολλές αναφορές σε βρέφη και παιδιά με ειλεό από μηκόνιο και τυπική παγκρεατική και πνευμονική νόσο υπάρχουν διάσπαρτες στη βιβλιογραφία από πολύ παλαιότερες χρονολογίες, που φτάνουν μέχρι το 1650. Η πρώτη περιγραφή παγκρέατος σε παιδί που σχεδόν σίγουρα απεβίωσε έχοντας νοσήσει από Κυστική Ίνωση, αποδίδεται στον καθηγητή Pieter Pauw (1564 – 1617), καθηγητή Βοτανικής και Ανατομίας στο πανεπιστήμιου του Leiden (Ιστοσελίδα www.cfmedicine.com, 2016).



Εικ.1.1. Γραφική απεικόνιση του καθηγητή Pieter Pauw, όπου πραγματοποιεί μια αυτοψία, σε ένα θέατρο ανατομίας στο Leiden. (Ανατύπωση από την ιστοσελίδα www.cfmedicine.com, 2016)

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν αναφορές από τον Ευρωπαϊκό χώρο, που συσχετίζουν την αλμυρότητα του δέρματος με πρόωρο θάνατο (Warner, 1992). Το 1705 σε ένα βιβλίο λαογραφικού περιεχομένου αναφέρεται ότι ένα παιδί με αλμυρή γεύση είναι μαγεμένο. Αντίστοιχο περιεχόμενο είχε και ένα μεσαιωνικό γνωμικό όπου αναφέρεται το εξής:

«Αλλοίμονο στο παιδί που το φιλά στο μέτωπο του έχει γεύση αλμυρή, γιατί είναι μαγεμένο και σύντομα θα πεθάνει.»

Ο Archibald Garrod, ο οποίος καθιέρωσε τον όρο «σύμφυτες διαταραχές του μεταβολισμού», περιέγραψε το 1905 μια οικογένεια στην Αγγλία με αριθμό παιδιών που παρουσίαζαν στεατόρροια και πέθαναν από βρογχοπνευμονία. Υπέθεσε πιθανό αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Η Κυστική Ίνωση περιγράφηκε ως ξεχωριστό νόσημα στη δεκαετία του 1930. Ο Fanconi το 1936 ανέφερε ένα περιστατικό με σύνδρομο κοιλιοκάκης και παγκρεατική διαταραχή, το οποίο στην πραγματικότητα διέφερε από τη νόσο κοιλιοκάκη (Warner, 1992). Το 1938 η Dorothy Anderson περιέγραψε λεπτομερώς τη νόσο στην Αγγλία και συνέδεσε τον ειλεό από μηκόνιο με αυτή, καθώς και τη θεραπευτική προσέγγιση και κυρίως τη χορήγηση παγκρεατικών ενζύμων. Ο Farber το 1950, παρατηρώντας το πόσο παχύρευστες ήταν οι εκκρίσεις, καθιέρωσε τον όρο «mucoviscidosis». Το 1953 ο Di Sant' Agnese παρατήρησε τη μεγάλη συγκέντρωση Na^+ και Cl^- στον ιδρώτα των ασθενών και το 1958 οι Gibson και Cooke, παρακινούμενοι από τον Agnese, δημοσίευσαν μέθοδο συλλογής του ιδρώτα, μετά από ιοντοφόρηση με πιλοκαρπίνη και μέτρηση της περιεκτικότητας του σε Cl^- . Η μέθοδος αυτή αποτελεί μέχρι σήμερα τον κλασσικό τρόπο διάγνωσης της νόσου. Περίπου δέκα χρόνια αργότερα, η δυσλειτουργία στη μεταφορά του άλατος επιβεβαιώθηκε από τον Quinton, ο οποίος έδειξε παρατεινόμενη μεταφορά χλωρίου σε αγωγούς ιδρώτα, καθώς και από τους Knowles, Boucher και των συνεργατών τους οι οποίοι έδειξαν την ύπαρξη παρόμοιας δυσλειτουργίας στο αναπνευστικό επιθήλιο. Το 1956 ο Shwachman πρώτος δημοσίευσε περιστατικό Κυστικής Ίνωσης με παγκρεατική επάρκεια. Το 1958 ο Shwachman και ο Kulczycki περιέγραψαν σύστημα βαθμολόγησης, για αξιολόγηση της γενικής κατάστασης των ασθενών (Shwachman *et al.*, 1958), το οποίο χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα και περιλαμβάνει:

1. Κλινικά σημεία και συμπτώματα από το αναπνευστικό σύστημα
2. Θρέψη – συμπτώματα από το γαστρεντερικό σύστημα
3. Ακτινολογικά ευρήματα στους πνεύμονες.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1950, η Κυστική Ίνωση, περιγράφεται περιστασιακά σε μεγαλύτερα παιδιά καθώς και σε νέους ενήλικες. Ουσιαστικό βήμα προς την κατεύθυνση της κατανόησης της παθοφυσιολογίας και του γενετικού υποστρώματος

της νόσου, απετέλεσε η μελέτη της μοριακής διαταραχής της νόσου, μετά την ταυτοποίηση και κλωνοποίηση του γονιδίου της Κυστικής Ίνωσης από τους Tsui, Collins και τους συνεργάτες τους το 1992 (Welsch *et al.*, 1995).

Η πορεία της νόσου που χάνεται μέσα στο βάθος του χρόνου, αγγίζοντας τον 21^ο αιώνα, μας οδηγεί στο συμπέρασμα, μέσω των επιπτώσεων που την χαρακτηρίζουν στο ψυχοκοινωνικό και οικονομικό πλαίσιο λόγω των βιολογικών επιπτώσεων, ότι είναι πλέον του απαραίτητου η διερεύνηση της ως νόσου εις βάθος. Το ανθρώπινο πρόσωπο, ως βιοψυχοκοινωνική οντότητα ή κατά Winnicott ως ψυχοσωματική οντότητα του οποίου οι ανάγκες αναδύονται σε: βιολογικές, συναισθηματικές και κοινωνικές (Winnicott, 1965), «καλεί» τη σύγχρονη βιολογία, δια μέσου της διεπιστημονικότητας, να διερευνήσει ενδελεχώς το μοριακό υπόβαθρο που χαρακτηρίζει τη νόσο της Κυστικής Ίνωσης ως γενετικό νόσημα.

1.2 Φυσιολογική Δομή του Γονιδίου της Κυστικής Ίνωσης

Το γονίδιο της Κυστικής Ίνωσης, *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), εντοπίζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 7, στην περιοχή q31 – q32 (Zielenski *et al.*, 1991). Είναι ένα μεγάλο γονίδιο μεγέθους 250 kb, του οποίου το μετάγραφο είναι 6.5 kb (το πλήρους μήκους *CFTR* mRNA αριθμεί 6128 νουκλεοτίδια (Tsui and Dorfman, 2013)).

Πολλαπλές θέσεις έναρξης της μεταγραφής έχουν περιγραφεί για το γονίδιο της Κυστικής Ίνωσης. Οι πρώτες μελέτες πρότειναν την έναρξη της μεταγραφής από θέσεις κοντά στην +1 θέση της cDNA αλληλουχίας (Riordan *et al.*, 1989), ενώ μεταγενέστερες αναλύσεις έδειξαν την ύπαρξη επιπρόσθετων θέσεων έναρξης της μεταγραφής, οι οποίες εντοπίζονται στις θέσεις +60, +70 και +100 (Koh *et al.*, 1993). Μελέτες αλλογονιδιωματικής λοίμωξης (transfection) του DNA έδειξαν ότι ο βασικός εκκινητής του γονιδίου της Κυστικής Ίνωσης βρίσκεται μεταξύ των νουκλεοτιδικών θέσεων -228 και +48, αν και πιθανότατα υπάρχουν πολλά θετικά και αρνητικά στοιχεία που συνδέονται με τη ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου (Chou *et al.*, 1991). Η ύπαρξη πολλαπλών θέσεων έναρξης της μεταγραφής αντανακλά την έλλειψη μιας TATA αλληλουχίας στην περιοχή του εκκινητή, η οποία είναι σχετικά

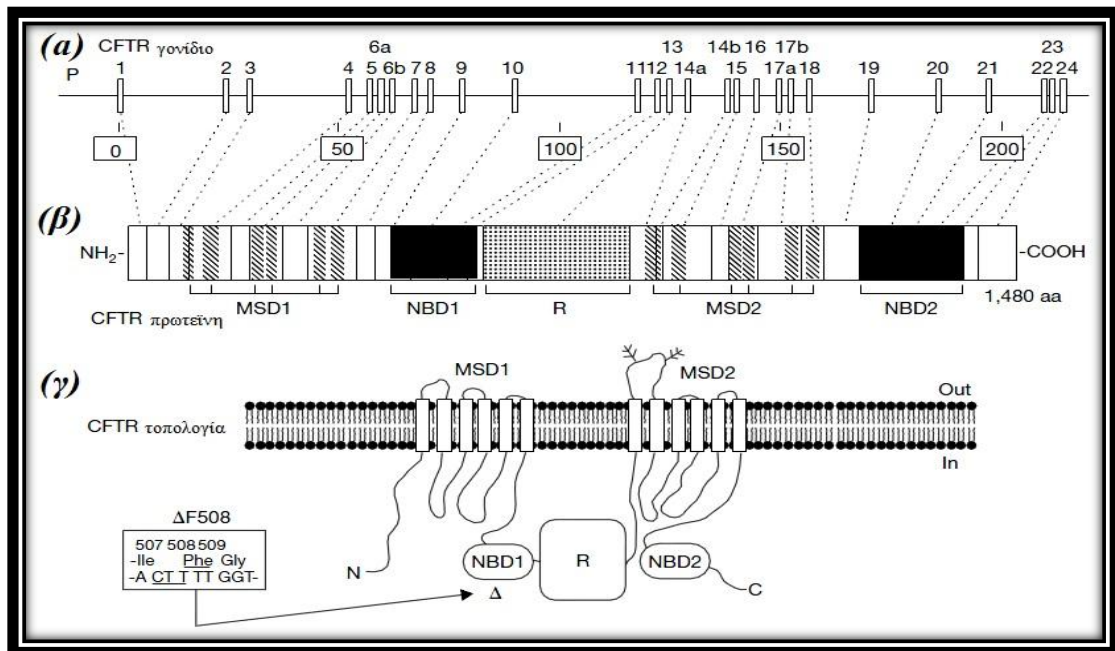
υψηλή σε ποσοστό GC, αν και γενικώς δεν είναι μεθυλιωμένη (Tsui and Dorfman, 2013).

Όπως όλα τα γονίδια των ανώτερων οργανισμών, αποτελείται από περιοχές που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη (εξώνια) και αριθμούν τις 27 και περιοχές που παρεμβάλλονται στις προηγούμενες (εσώνια) και αριθμούν τις 26 (Marx, 1989). Τα όρια εξωνίων – εσωνίων καθορίστηκαν με ευθυγράμμιση του cDNA και των ανταποκρινόμενων αλληλουχιών του γενωμικού DNA, μια διαδικασία που οδήγησε στην μη χρήση πλέον του Legacy Name του γονιδίου που αριθμούσε 24 εξώνια. Τρία από τα 24 αναφερθέντα εξώνια, τα 6, 14 και 17, βρέθηκε ότι διακόπτονταν από προηγουμένως άγνωστες μεσολαβούσες αλληλουχίες. Προκειμένου να μην επανονομαστούν όλα τα εξώνια, τα τελευταία εξώνια ονομάστηκαν 6a, 6b, 14a, 14b, 17a και 17b αντίστοιχα. Σαν αποτέλεσμα της τελευταίας αναφοράς, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ενός μοναδικού ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης 4440 bp, ικανού να κωδικοποιήσει μια πρωτεΐνη 1480 αμινοξικών καταλοίπων (Zielenski *et al.*, 1991).

Τα 27 εξώνια του γονιδίου της Κυστικής Ίνωσης παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές ως προς το μέγεθος τους, με μικρότερο να εντοπίζεται το εξώνιο 14b (38 bp) και μεγαλύτερο το εξώνιο 13 (724 bp). Σε 9 από τα εξώνια (4, 5, 8, 9, 10, 14a, 19, 20 και 21), παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των ζευγών βάσεων που περιλάμβανε το καθένα, ήταν πολλαπλάσιο του 3. Αυτό το γεγονός μπορεί να οδηγήσει στην υπόθεση ότι αφαίρεση αυτών των εξωνίων δεν θα προκαλεί πρόωμο τερματισμό της πρωτεϊνικής σύνθεσης, εξαιτίας της μετακίνησης του πλαισίου ανάγνωσης, αν και μη φυσιολογικά προϊόντα θα αναμένονταν. Έχει παρατηρηθεί απουσία εξωνίων (εξώνια 4, 9, 10 και ένα τμήμα του εξωνίου 13) από κλάσμα του mRNA το οποίο έχει απομονωθεί από ιστούς και κυτταρικές σειρές (Chu *et al.*, 1992). Μια ευρύτατη απόκλιση στη σχετική ισοδυναμία των αντιγράφων όπου υπάρχει έλλειψη του εξωνίου 9, έχει ανιχνευθεί ανάμεσα σε φυσιολογικά άτομα. Η διαφορά οφείλεται στο μήκος της πολυθυμιδικής περιοχής στον εσώνιο 8 στη θέση σύνδεσης branch/acceptor site (Chu *et al.*, 1993). Έχει προταθεί ότι οι εναλλακτικές θέσεις αποκοπής και επανασύνδεσης (alternative splicing) είναι ένας πιθανός μηχανισμός παράκαμψης των μεταλλάξεων χωρίς νόημα (nonsense mutations) και των μεταλλάξεων μετακίνησης πλαισίου (frameshifting mutations) σε ειδικές

κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου αν και δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα να στηρίζουν την υπόθεση (Cutting *et al.*, 1990).

Τα εσώνια ποικίλουν σε μέγεθος, από 1.1 kb για το εσώνιο 6a, σε 40 kb για το εσώνιο 3 (Zielenski *et al.*, 1991). Εντός των περιοχών των εσωνίων αλλά και κοντά στα σύνορα εσωνίων – εξωνίων, έχει εντοπιστεί ένας αριθμός μικρών και μεγαλύτερων διασκορπισμένων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (elements) (Singer and Skowronski, 1985). Παράδειγμα τέτοιων επαναλήψεων αποτελούν τέσσερις Alu επαναλήψεις (Alu repeats), που βρέθηκαν στην κατεύθυνση μεταγραφής του γονιδίου, στα εσώνια 2, 8, 14a και 23, ενώ μια βρέθηκε στο εσώνιο 6a, με αντίθετη κατεύθυνση (Schmid and Jelinek, 1982). Επίσης, ένας αριθμός απλών επαναλήψεων αλληλουχίας (simple sequence repeats: microsatellites) ανιχνεύθηκε κατά τον έλεγχο των εσωνίων. Παράδειγμα τέτοιας αλληλουχίας αποτελεί η επανάληψη τεσσάρων βάσεων, η (GATT)₇, η οποία προηγείται του εξωνίου 6b. Όλες αυτές οι απλές επαναλήψεις χρησιμεύουν σαν πολυμορφικοί DNA δείκτες, με πολύ σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματική γενετική διάγνωση (Zielenski *et al.*, 1991).



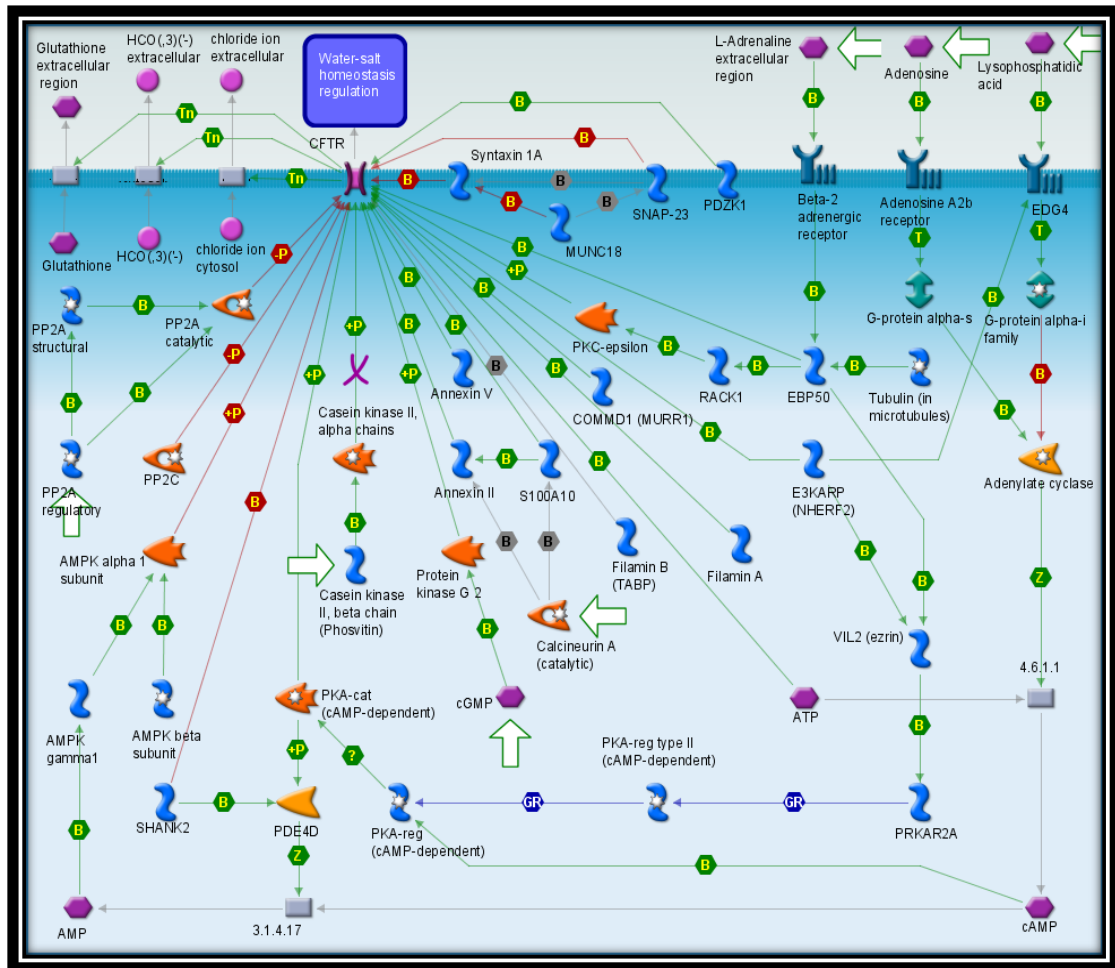
Εικ.1.2. Γραφική απεικόνιση του γονιδίου *CFTR*. (α) Δομή του γονιδίου, όπου εικονίζεται ο εκκινητής (P) και τα 27 εξώνια. (β) Το παραγόμενο πολυπεπτίδιο και οι προβλεπόμενες περιοχές. (γ) Τοπολογία της πρωτεΐνης *CFTR* σε σχέση με τη κυτταροπλασματική μεμβράνη και θέση της πιο συχνής μεταλλαγής, της ΔF508. (Ανατύπωση από Zielenski, 2000)

1.3 Δομή και Λειτουργία της Πρωτεΐνης

Το γονίδιο της Κυστικής Ίνωσης *CFTR* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CFTR 170 kD, τον «ρυθμιστή διαμεμβρανικής διακίνησης ιόντων» (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), του οποίου ο βασικός ρόλος είναι η μετακίνηση των ιόντων Cl⁻. Αριθμεί 1480 αμινοξικά κατάλοιπα, και όπως έχει αναφερθεί προέρχεται από ένα μετάγραφο 6.5 kb (το πλήρους μήκους CFTR mRNA αριθμεί 6128 νουκλεοτίδια (Tsui and Dorfman, 2013)). Η δομή της πρωτεΐνης που προβλέφθηκε από την νουκλεοτιδική αλληλουχία, έδειξε ότι πρόκειται για μια πρωτεΐνη, με δομή παρόμοια με αυτήν μιας ποικιλίας πρωτεϊνών βακτηρίων, ζυμομυκήτων και θηλαστικών που εμπλέκονται σε ενεργό μεταφορά διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών (Tizzano and Buchwald, 1992). Ο διάυλος ιόντων Cl⁻ CFTR, παρουσιάζει επιλεκτικότητα μεταφοράς ανιόντων έναντι κατιόντων, ενώ η σειρά διαπερατότητας των ιόντων είναι: I⁻>Br⁻>Cl⁻>F⁻ (Zeitlin, 1999). Επίσης, συμβάλλει στην μεταφορά ιόντων HCO₃⁻ με την απελευθέρωση ATP (Vankeerberghen *et al.*, 2002). Εντοπίζεται στην κορυφαία μεμβράνη των εξωκρινών επιθηλιακών κυττάρων (Riordan *et al.*, 1989). Στο ανθρώπινο έμβryo έχει ανιχνευθεί στους αεραγωγούς του επιθηλίου του πνεύμονα (McCray *et al.*, 1992). Με τη μέθοδο της RT-PCR έχουν ανιχνευθεί CFTR μετάγραφα σε λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα και ινοβλάστες, αν και η βιολογική καθώς και η κλινική σπουδαιότητα της έκφρασης της πρωτεΐνης σε αυτά τα κύτταρα δεν είναι σαφής. Τέλος, έχει εντοπιστεί και σε άλλους ιστούς, όπως ο καρδιακός μυς (Nagel *et al.*, 1992). Σύμφωνα με στοιχεία έρευνας των Haggie και Verkman το 2008, η πρωτεΐνη CFTR εντοπίζεται ως μονομερές στην επιφάνεια των ζώντων κυττάρων, απορρίπτοντας έτσι προγενέστερες θεωρίες στις οποίες δεν ήταν σαφές αν η πρωτεΐνη εντοπιζόταν ως μονομερές, διμερές ή υψηλής τάξεως ολιγομερές.

Το εν λόγω πολυπεπτιδικό παράγωγο του γονιδίου *CFTR*, αποτελείται από 5 περιοχές που σχηματίζουν δύο όμοια επαναλαμβανόμενα τμήματα (Εικ.1.2). Κάθε ένα από τα τμήματα αυτά περιλαμβάνει μια διαμεμβρανική περιοχή (TMD1 και TMD2: Transmembrane Domain 1&2), με έξι διαμεμβρανικά ελικοειδή τμήματα και μια περιοχή δέσμησης ATP (NBD1 και NBD2: Nucleotide Binding Domain 1&2) που παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για τη λειτουργία του μορίου. Τα δύο αυτά όμοια τμήματα ενώνονται μέσω της ρυθμιστικής περιοχής R (Regulator Domain), που

διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της πρωτεΐνης και χαρακτηρίζεται από περίσσεια θέσεων για φωσφορυλίωση από την cAMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση A (PKA) που αποτελεί το βασικό μόριο που επιδρά στην ενεργότητα του διαύλου CFTR (Guggino and Stanton, 2006) και την πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Το NBD1 κωδικοποιείται από τα εξόνια 9-12 και το αρχικό του τμήμα θεωρείται περιοχή υψηλής δέσμησης με ATP. Το NBD2 κωδικοποιείται από τα εξόνια 20-22 και η ρυθμιστική περιοχή από το εξόνιο 13 (Vankeerberghen *et al.*, 2002).

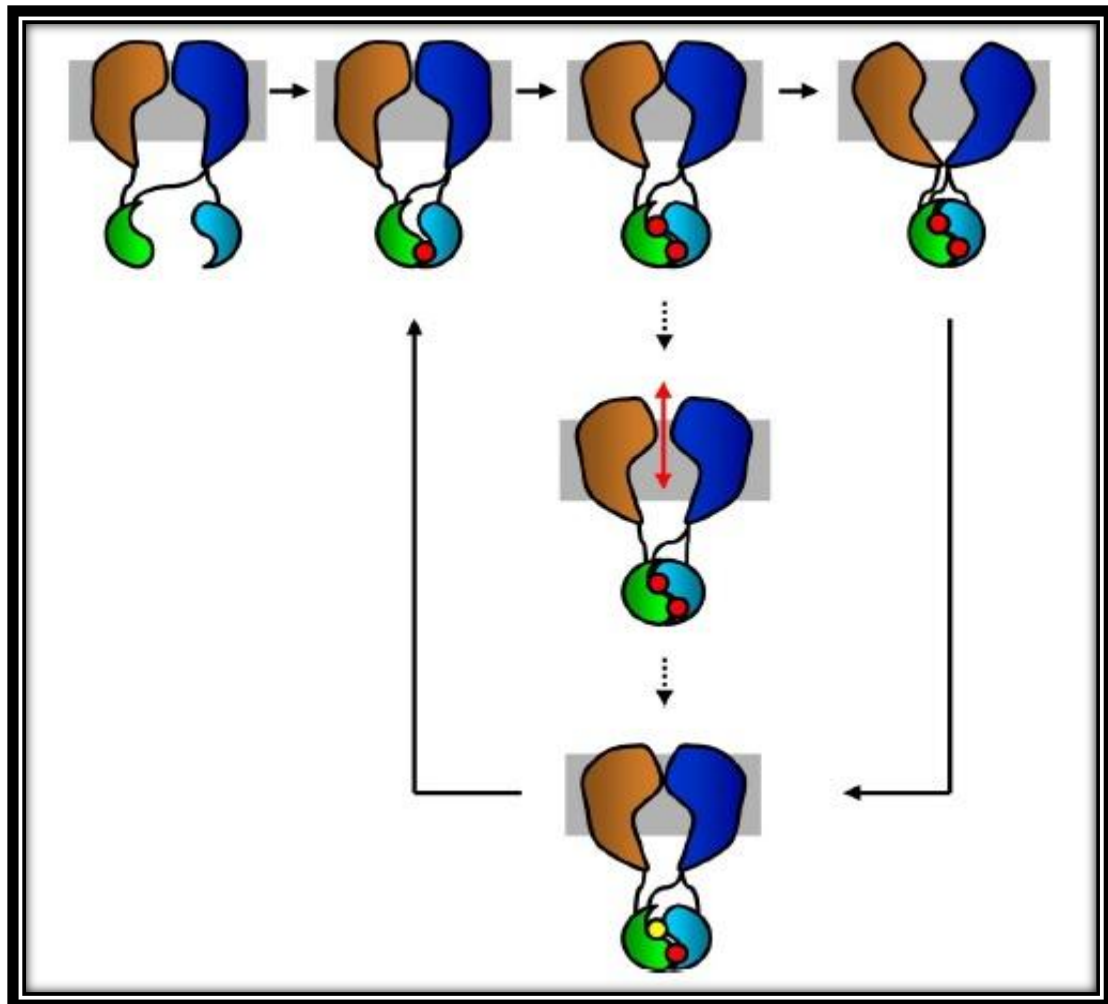


Εικ.1.3. Γραφική απεικόνιση του δικτύου ρύθμισης της ενεργότητας της CFTR. (Ανατύπωση από την ιστοσελίδα <http://lsresearch.thomsonreuters.com>, 2016)

Η πρωτεϊνική δομή που περιγράφηκε, υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη CFTR είναι μέρος της υπερικογένειας των πρωτεϊνών μεταφορέων ABC (ATP-binding cassette), κάτι το οποίο δηλώνει και η συνώνυμη ονομασία της πρωτεΐνης, η οποία είναι η ABCC7. Η πρωτεΐνη CFTR θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ιδιαίτερο μέλος των

πρωτεϊνών ABC λόγω της δράσεως της ως ιοντικός διάυλος, καθώς κανένα άλλο μέλος τους δεν είναι γνωστό να εμφανίζει δραστηριότητα διαύλου. Ως ιοντικός διάυλος, μπορεί να λάβει δύο καταστάσεις διαμόρφωσης: τον διάυλο κλειστής διαμόρφωσης όπου το μονοπάτι μεταφοράς του υποστρώματος μπλοκάρεται σε μία ή σε πολλαπλές θέσεις και στον διάυλο ανοιχτής διαμόρφωσης όπου το μονοπάτι είναι εξ' ολοκλήρου ανοιχτό επιτρέποντας την ηλεκτροδιάχυση. Η ελεγχόμενη αυτή μετάβαση από τη μια διαμόρφωση στην άλλη καλείται gating (Jordan *et al.*, 2015). Το gating του διαύλου ελέγχεται από τα NBD1 και NBD2, με την πρόσδεση και την υδρόλυση του ATP. Μέσω του διμερισμού των δύο NBD με διαμόρφωση κεφαλής-ουράς (head-to-tail), δομούνται δύο ATP-binding pockets (ABP1 και ABP2) (Vergani *et al.*, 2005). Κάθε ABP έχει έναν ξεχωριστό ρόλο στο CFTR gating: το ABP2 αποτελεί την κρίσιμη περιοχή για το ATP-εξαρτώμενο άνοιγμα του διαύλου, ενώ το ABP1 θεωρείται ότι συνεισφέρει στην σταθερότητα της ανοικτής διαμόρφωσης του διαύλου (Zhou *et al.*, 2006). Η πρόσδεση του ATP οδηγεί στο άνοιγμα του διαύλου, ενώ η υδρόλυση προωθεί το κλείσιμο. Η φωσφορυλίωση δρα ως διακόπτης που «οδηγεί» το gating του διαμεμβρανικού ιοντικού πόρου (Basso *et al.*, 2003). Οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και οι αλληλεπιδράσεις με αρκετές πρωτεΐνες, αποτελούν κύρια γεγονότα ρύθμισης επηρεάζοντας την ενεργότητα και την σταθερότητα στη μεμβράνη της CFTR πρωτεΐνης, π.χ. η πρωτεΐνη Syntaxin 1A η οποία βοηθάει στην τοποθέτηση της CFTR στη σωστή της θέση στην κυτταρική μεμβράνη (Guggino and Stanton, 2006).

Επιπλέον, η πρωτεΐνη CFTR φαίνεται ότι αποτελεί ρυθμιστή και άλλων διαύλων ιόντων, όπως του ευαίσθητου στην αμιλορίδη διαύλου νατρίου των επιθηλιακών κυττάρων (amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel: ENaC) στον οποίο έχει φυσιολογικά ανασταλτική δράση. Αναφέρεται επίσης ότι η πρωτεΐνη CFTR ενισχύει τη δράση του καναλιού ύδατος AQP3, το οποίο εντοπίζεται και στα κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος. Συγκεκριμένα, έχει φανεί ότι η διαπερατότητα του ύδατος στα αναπνευστικά επιθηλιακά κύτταρα αυξάνεται όταν ο διάυλος CFTR παραμένει ενεργός (Wright *et al.*, 2010).



Εικ.1.4. Γραφική απεικόνιση της αρχιτεκτονικής των δομών της CFTR και σχηματική αναπαράσταση των διαμορφώσεων gating των μεταφορέων ABC. Τα συμπαγή βέλη δείχνουν την δραστηριότητα του μεταφορέα κατά τη διάρκεια ενός μηχανισμού εναλλακτικής πρόσβασης, ενώ τα διακοπτόμενα βέλη δείχνουν τον θεωρητικό κύκλο ενεργότητας της CFTR, κατά τη διάρκεια του οποίου το μονοπάτι διαπερατότητας είναι ανοιχτό τόσο στα εξωκυττάρια όσο και στα ενδοκυττάρια διαλύματα επιτρέποντας έτσι την κίνηση των μορίων βάσει ηλεκτροχημικής διαβάθμισης. Απεικονίζονται τα εξής: Γκρίζο χρώμα: Μembrάνη, Καφέ και σκούρο μπλε: TMD1&TMD2, Πράσινο και ανοιχτό μπλε: ABC domains, Κόκκινο: ATP, Κίτρινο: ADP. Το R-domain δεν απεικονίζεται για διευκόλυνση. (Ανατύπωση από Jordan *et al.*, 2015)

1.4 Τάξεις Μεταλλάξεων του *CFTR* γονιδίου και Συχνότητες Μεταλλάξεων

Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (CFGAC), ευρέως γνωστής και ως SickKids CFTR, ~2000 μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί ως τώρα στο γονίδιο *CFTR* με τον αριθμό τους να αυξάνεται συνεχώς μέσω καταχωρήσεων (Ιστοσελίδα <http://www.genet.sickkids.on.ca/> , 2016). Όλων των τύπων οι μεταλλαγές έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς Κυστικής Ίνωσης, όπως είναι οι παρερμηνεύσιμες, ανερμηνεύσιμες, ματίσματος, μικρές και μεγάλες αναδιατάξεις, πλαισιοτροποποιητικές και εντός του πλαισίου ανάγνωσης ελλείψεις και ενθέσεις (Tian *et al.*, 2015). Μία μετάλλαξη, η p.F508del ή ΔF508, έχει ανιχνευθεί σε ποσοστό ~70% σε αλληλόμορφα *CFTR* ασθενών Κυστικής Ίνωσης Καυκάσιας φυλής (Bobadilla *et al.*, 2002). Παρόλα αυτά, η συχνότητα της διαφέρει αισθητά ανάμεσα στους ανθρώπινους πληθυσμούς. Εκτός της μετάλλαξης ΔF508, ~20 μεταλλαγές απαντούν σε συχνότητα >0.1, όπου μαζί αντιπροσωπεύουν το ~15-20% των αλληλόμορφων των Καυκάσιων (Tian *et al.*, 2015). Υπάρχει και ένας αριθμός σιωπηλών ή μη σιωπηλών αλλαγών στην κωδικοποιούσα περιοχή οι οποίες εκ πρώτης όψεως δεν φαίνεται να προκαλούν δυσλειτουργία στην πρωτεΐνη CFTR, οπότε και θεωρούνται πολυμορφισμοί του γονιδίου. Για κάποιες εξ' αυτών, ο χαρακτηρισμός τους ως πολυμορφισμός τείνει να αναθεωρηθεί καθώς φαίνεται να τροποποιούν την βαρύτητα της ασθένειας. Παράδειγμα αποτελεί ο αριθμός των επαναλήψεων TG στην περιοχή IVS8, η οποία σχετίζεται με την παράκαμψη (skipping) του εξωνίου 9 (Groman *et al.*, 2004). Αντιστοίχως, η R668C φάνηκε να επιδρά στο εξώνιο 12 (Pagani *et al.*, 2003). Επιπλέον, η M470V φαίνεται να έχει επίδραση στην ενεργότητα του διαύλου CFTR και συσχετίζεται έτσι με την βαρύτητα της ασθένειας (Cuppens *et al.*, 1998). Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι πολυμορφισμοί έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς με συσχετιζόμενες με την Κυστική Ίνωση ασθένειες (CF-RD: Cystic Fibrosis Related Diseases), χωρίς να έχουν εντοπιστεί άλλες μεταλλαγές στο γονίδιο *CFTR*, κάτι που μας οδηγεί στο να χαρακτηριστούν αυτές οι αλλαγές από πολυμορφισμοί σε μεταλλαγές που προκαλούν CF-RD (Bolliger *et al.*, 2006).

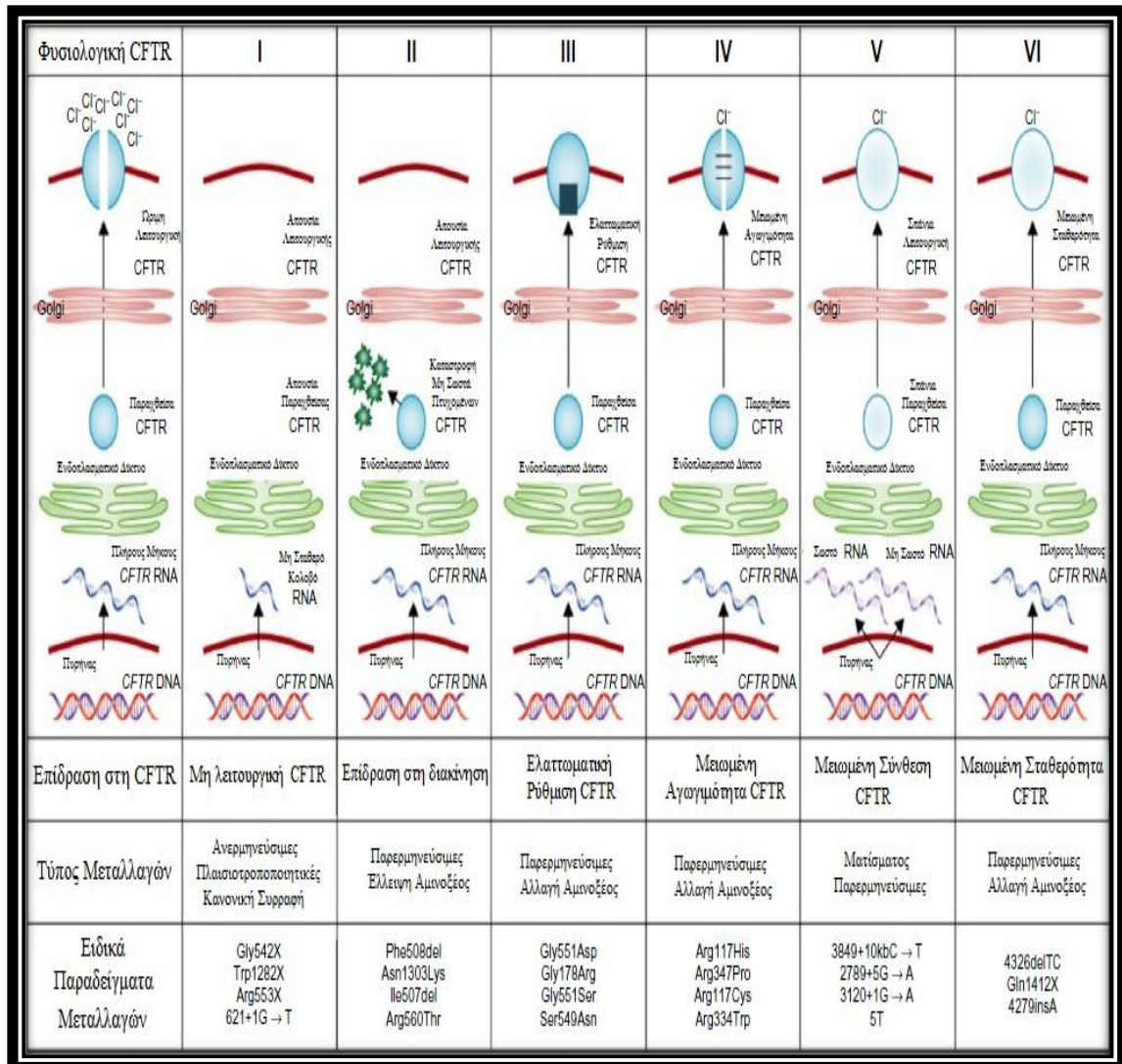
Πιν.1.1.1. Περιληπτικά στατιστικά των τύπων μεταλλαγών του *CFTR* που καταγράφηκαν στην CFMDB τον Ιανουάριο του 2011. (Ανατύπωση από Tsui and Dorfman, 2013)

Τύπος Μετάλλαξης	Αριθμός	Συχνότητα (%)
Παρερμηνεύσιμες	765	40.41
Πλαισιοτροποποιητικές	303	16.01
Ματίσματος	225	11.89
Ανερμηνεύσιμες	160	8.45
Εντός πλαισίου προσθήκες.ελλείψεις	37	1.95
Μεγάλες προσθήκες.ελλείψεις	49	2.59
Εκκινητής	15	0.79
Ποικιλότητα αλληλουχίας	269	14.21
Άγνωστα	70	3.7
Συνολικά	1893	100

Ανάλογα με τον μοριακό μηχανισμό που προκαλεί τη δυσλειτουργία του πρωτεϊνικού μορίου CFTR, με το ποσοστό της ενεργούς φυσιολογικής πρωτεΐνης που παράγεται από το παθολογικό γονίδιο και την περιοχή της πρωτεΐνης που επηρεάζεται, οι διάφορες μεταλλαγές στο γονίδιο διακρίνονται σε έξι τάξεις-κλάσεις I-VI (Estivili, 1996 και Vallieres and Elborn, 2014). Πρέπει να επισημανθεί ότι η ταξινόμηση αυτή είναι εν πολλοίς σχηματική διότι σε πολλές περιπτώσεις ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο προκαλείται η δυσλειτουργία της πρωτεΐνης είναι άγνωστος, ενώ σε άλλες περιπτώσεις μια μετάλλαξη μπορεί να οδηγεί σε δυσλειτουργία της πρωτεΐνης κατά τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτεται από περισσότερες από μια κατηγορίες. Αποδεικνύεται όμως ισχυρά σημαντική στην κλινική πρακτική μέσω της συσχέτισης φαινοτύπου και γονοτύπου που θα αναλυθεί αργότερα.

- Οι μεταλλάξεις τάξεως I καταργούν την παραγωγή της πρωτεΐνης και οδηγούν σε πλήρη έλλειψη, άρα και πλήρη απουσία λειτουργικότητας της πρωτεΐνης. Περιλαμβάνει ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις και μεταλλάξεις πλαισιοτροποποιητικές. Τέτοιες μεταλλάξεις είναι η G542X και η W1282X με συχνότητα αλληλομόρφων ~10%.

- Οι μεταλλάξεις τάξεως II χαρακτηρίζονται από ελαττωματική ενδοκυτταρική διακίνηση της CFTR πρωτεΐνης και κατά συνέπεια την έλλειψη λειτουργικής πρωτεΐνης στην μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων. Περιλαμβάνει παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις και ελλείψεις αμινοξέων. Τέτοιες μεταλλάξεις είναι η ΔF508 και η N1303K.
- Οι μεταλλάξεις τάξεως III διαταράσσουν την ενεργοποίηση και την ρύθμιση μεταλλαγμένων CFTR οι οποίες είναι ορθά τοποθετημένες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Έτσι μπορεί η βιοσύνθεση, η μεταφορά και η επεξεργασία να μην διαταράσσονται αλλά η πρωτεΐνη μπορεί να είναι ελαττωματική σε ότι αφορά την φωσφορυλίωση ή την περαιτέρω ρύθμιση της διάνοιξης των διαύλων ιόντων Cl⁻. Περιλαμβάνει παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις που τοποθετούνται κυρίως στις περιοχές δέσμευσης ATP (NBD1 και NBD2). Η συχνότερη μετάλλαξη αυτής της κατηγορίας είναι η G511D με συχνότητα αλληλομόρφου ~2%.
- Οι μεταλλάξεις τάξεως IV χαρακτηρίζονται από ελαττωμένη ή ελαττωματική διέλευση ιόντων Cl⁻ μέσα από μια ορθά τοποθετημένη πρωτεΐνη. Περιλαμβάνει παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις οι οποίες εντοπίζονται στις διαμεμβρανικές περιοχές της πρωτεΐνης (TMD1 και TMD2). Η συχνότερη τέτοια μετάλλαξη είναι η R117H.
- Οι μεταλλάξεις τάξεως V μειώνουν την ποσότητα φυσιολογικής CFTR πρωτεΐνης ενδοκυττάρια και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, μέσω μείωσης αλλά όχι εξάλειψης της παραγωγής πρωτεΐνης. Περιλαμβάνει μεταλλάξεις ματίσματος (splicing). Παράδειγμα τέτοιας μετάλλαξης αποτελεί η 3849 bp 10 kb C→T, η οποία μειώνει την αποτελεσματικότητα του ματίσματος του mRNA του CFTR στο 8% του φυσιολογικού (Highsmith *et al.*, 1994).
- Οι μεταλλάξεις τάξεως VI, όπως οι μεταλλάξεις τάξεως V, ελαττώνουν την ποσότητα της λειτουργικής CFTR πρωτεΐνης στην κυτταρική μεμβράνη, η οποία αντίθετα με την τάξη V δεν οφείλεται σε μειωμένη παραγωγή αλλά σε αυξημένο ρυθμό απομάκρυνσης. Οι μεταλλάξεις αυτής της τάξης είναι σπάνιες και περιλαμβάνουν την N287Y (Silvis *et al.*, 2003), καθώς και μεταλλάξεις που οδηγούν σε εξάλειψη του καρβοξυτελικού άκρου της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.



Εικ.1.5. Γραφική απεικόνιση των τάξεων μεταλλαγών της πρωτεΐνης CFTR. (Ανατύπωση από Boyle and Boeck, 2013)

Στον κάτωθι πίνακα 1.2 αναφέρονται οι συχνότητες των μεταλλαγών σε επίπεδο φυλής/έθνους καθώς και στον πανεθνικό πληθυσμό των Ηνωμένων Πολιτειών.

Πιν.1.2. Συχνότητα Μεταλλαγών Ανάμεσα σε Άτομα Κλινικά Διαγνωσθέντα με ΚΙ(%). (Ανατύπωση από Watson <i>et al.</i> , 2004)						
Μετάλλαξη	Καυκάσιοι (Μη- Ισπανοί)	Καυκάσιοι (Ισπανοί)	Αφροαμερικανοί	Ασιάτες Αμερικάνοι	Εβραίοι Ashkenazi	Πανεθνικός Πληθυσμός
delF508	72.42	54.38	44.07	38.95	31.41	66.31
G542X	2.28	5.10	1.45	0.00	7.55	2.64
W1282X	1.50	0.63	0.24	0.00	45.92	2.20
G551D	2.25	0.56	1.21	3.15	0.22	1.93
621+1G>T	1.57	0.26	1.11	0.00	0.00	1.30
N1303K	1.27	1.66	0.35	0.76	2.78	1.27
R553X	0.87	2.81	2.32	0.76	0.00	1.21
dell507	0.88	0.68	1.87	0.00	0.22	0.90
3849+10kbC>T	0.58	1.57	0.17	5.31	4.77	0.85
3120+1G>T	0.08	0.16	9.57	0.00	0.10	0.86
R117H	0.70	0.11	0.06	0.00	0.00	0.54
1717-1G>T	0.48	0.27	0.37	0.00	0.67	0.44
2789+5G>A	0.48	0.16	0.00	0.00	0.10	0.38
R347P	0.45	0.16	0.06	0.00	0.00	0.36
711+1G>T	0.43	0.23	0.00	0.00	0.10	0.35
R334W	0.14	1.78	0.49	0.00	0.00	0.37
R560T	0.38	0.00	0.17	0.00	0.00	0.30
R1162X	0.23	0.58	0.66	0.00	0.00	0.30
3569delC	0.34	0.13	0.06	0.00	0.00	0.28
A455E	0.34	0.05	0.00	0.00	0.00	0.26
G85E	0.29	0.23	0.12	0.00	0.00	0.26
2184delA	0.17	0.16	0.05	0.00	0.10	0.15
1898+1G>A	0.16	0.05	0.06	0.00	0.10	0.13
I148T	0.09	0.09	0.05	0.00	0.10	0.08
1078delT	0.02	0.09	0.00	0.00	0.00	0.03
Σύνολο	88.40	71.90	64.51	48.93	94.14	84.00

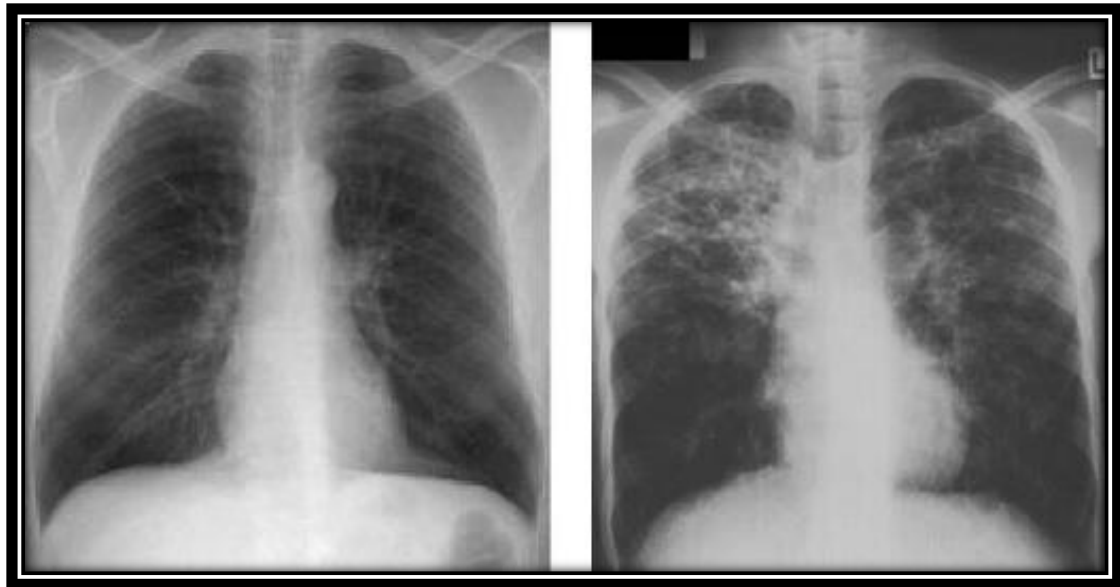
Στον κάτωθι πίνακα 1.3 αναφέρονται οι συχνότητες των μεταλλάξεων στον Ελληνικό πληθυσμό.

Πιν.1.3. Μεταλλάξεις ΚΙ στον Ελληνικό Πληθυσμό. (Σημειώνονται με έντονα κόκκινα γράμματα οι πιο συχνές) (Ανατύπωση από Kanavakis <i>et al.</i> , 2003)					
Μετάλλαξη	Εντόπιση Εξόνιο(E) /Εσώνιο(I)	Αριθμός Χρωμοσωμάτων (Συχνότητα %)	Μετάλλαξη	Εντόπιση Εξόνιο(E) /Εσώνιο(I)	Αριθμός Χρωμοσωμάτων (Συχνότητα %)
Q2X+R3W	E1	1 (0.11)	G551D	E11	3 (0.34)
A46D*	E2	2 (0.23)	D565G*	E12	1 (0.11)
296+1G>C*	I2	1 (0.11)	1898+1G>A	I12	1 (0.11)
G85E	E3	7 (0.8)	1898+1G>T	I12	1 (0.11)
R75X	E3	1 (0.11)	2183AA>G	E13	12 (1.38)
R75L	E3	1 (0.11)	E822X*	E13	12 (1.38)
574delA	E4	5 (0.57)	S813P*	E13	2 (0.23)
D110E*	E4	3 (0.34)	2118del4	E13	1 (0.11)
L137P*	E4	2 (0.23)	E725K	E13	1 (0.11)
R117H	E4	2 (0.23)	L723X	E13	1 (0.11)
P140L	E4	1 (0.11)	2184delA	E13	1 (0.11)
D110H	E4	4 (0.46)	E823X*	E13	2 (0.23)
457TAT>G	E4	1 (0.11)	2751+2T>A*	I14a	1 (0.11)
444delA	E4	1 (0.11)	2752-26A>G*	I14a	1 (0.11)
621+1G>T	I4	50 (5.72)	2789+5G>A	I14b	15 (1.72)
621+3A>G	I4	5 (0.57)	2790-1G>C	I15	2 (0.23)
R117C	E4	2 (0.23)	S945L	I15	1 (0.11)
525delT	E4	1 (0.11)	3120+1G>A	I16	5 (0.57)
K162E*	E4	1 (0.11)	P1021A*	E17a	1 (0.11)
547insTA	E4	1 (0.11)	3152delT*	E17a	2 (0.23)
A120T	E4	1 (0.11)	3272-A>GA46D*	I17a-E2	1 (0.11)
I148T	E4	1 (0.11)	3272-26A>G	I17a	7 (0.81)
711+3A>G	I5	6 (0.69)	R1070Q	E17b	8 (0.92)
Y247X*	E6a	1 (0.11)	R1066L	E17b	1 (0.11)
C276X	E6b	3 (0.34)	F1052V	E17b	2 (0.23)
R334W	E7	7 (0.81)	L1093P	E17b	1 (0.11)
R347P	E7	1 (0.11)	L1065F*	E17b	1 (0.11)
M348K	E7	2 (0.23)	D1152H	E17b	1 (0.11)
R352W	E7	1 (0.11)	R1158X	E19	9 (1.03)
Q378R*	E8	1 (0.11)	R1162X	E19	1 (0.11)
1497delGG	E9	1 (0.11)	3849+4A>G	I19	1 (0.11)
1525-1G>A	I9	1 (0.11)	3849+10kbC>T	I19	1 (0.11)

F508del	E10	467 (53.4)	W1282X	E20	6 (0.67)
I507del	E10	6 (0.69)	G1244V	E20	1 (0.11)
1677delTA	E10	8 (0.92)	N1303K	E21	23 (2.63)
W496X	E10	7 (0.81)	4040delA	E21	1 (0.11)
I521F*	E10	1 (0.11)	4382delA	E24	3 (0.34)
1716+1G>A*	I10	2 (0.23)	D1455N*	E24	1 (0.11)
C524X	E10	2 (0.23)	CFTRdel 2, 3(21kb)	Del of exons 2&3	3 (0.34)
G542X	E11	34 (3.9)	3120+1kdel8.6kb	I16	3 (0.34)
Σύνολο χρωμοσωμάτων			874 (437 ασθενείς)		
Σύνολο με γνωστές μεταλλάξεις			794 (90.85%) (83 μεταλλάξεις)		
Σύνολο με άγνωστες μεταλλάξεις			80 (9.15)		

1.5 Ρύθμιση της Έκφρασης του Γονιδίου από Γονίδια-Τροποποιητές/Επιγενετικές Τροποποιήσεις

Η σημαντική φαινοτυπική ετερογένεια που χαρακτηρίζει την Κυστική Ίνωση οφείλεται σε ένα μέρος στην παρουσία των ειδικών CFTR γονοτύπων, και σε ένα εξίσου σημαντικά συμβαλλόμενο μέρος, τους περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες που επιδρούν και καθορίζουν την κλινική πορεία των ασθενών. Παράδειγμα τέτοιων παραγόντων που συμβάλλουν σημαντικά στην διαμόρφωση της πνευμονικής νόσου είναι το παθητικό κάπνισμα, η εισπνοή ποικίλων ατμοσφαιρικών ρύπων και οι λοιμογόνοι οργανισμοί. Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί βαρύτητα στη μελέτη δευτερογενών γενετικών παραγόντων που τροποποιούν την κλινική βαρύτητα της Κυστικής Ίνωσης. Εν γένει, η συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου στην Κυστική Ίνωση είναι όργανο-ειδική, κάτι που παρατηρείται έντονα στο πάγκρεας. Παρ' όλα αυτά, αυτή η συσχέτιση στον πνεύμονα φαίνεται να είναι αρκετά κακή, κάτι που οφείλεται πιθανά στην σημαντική συνεισφορά άλλων γενετικών παραγόντων και/ή του περιβάλλοντος. Στη διαλεύκανση του εν λόγω ζητήματος σημαντικό ρόλο έχουν διαδραματίσει και θα διαδραματίσουν μελέτες σε μονοζυγωτικά και διζυγωτικά δίδυμα άτομα, όπως διετέλεσε η European Twin and Sibling Study η οποία κατέδειξε ότι η Κυστική Ίνωση φαίνεται να ρυθμίζεται από τροποποιητικά γονίδια (Bolliger *et al.*, 2006).



Εικ.1.6. Απεικόνιση ακτινογραφιών δύο ενήλικων ατόμων ομόζυγων για τη μετάλλαξη ΔF508. Ο ασθενής αριστερά δεν είχε χρόνια μόλυνση, είχε φυσιολογική πνευμονική λειτουργία και η ακτινογραφία δείχνει μόνο ήπια υπερδιάταση. Σε αντίθεση, ο ασθενής της δεξιάς ακτινογραφίας ο οποίος είχε χρόνια λοίμωξη από *P.aeruginosa* και σημαντικά μειωμένη πνευμονική λειτουργία, παρουσίαζε εκτεταμένες βρογχιεκτασίες και βλενώδη απόφραξη. (Ανατύπωση από Bolliger *et al.*, 2006)

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εμφάνιση ειλεού από μηκόνιο που αρχικά είχε συσχετισθεί με ένα τροποποιητικό παράγοντα στην περιοχή CFM1 στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 19, ο οποίος θα μπορούσε να δράσει τοπικά και να προκαλέσει ειλεό από μηκόνιο σε ασθενείς με δύο βαριές *CFTR* μεταλλάξεις μέσω ενός αυστηρά εντερικού μηχανισμού (Zielenski *et al.*, 1999). Νεότερα δεδομένα όμως έχουν καταρρίψει αυτήν την θεωρία και έχουν καταδείξει την ύπαρξη περισσότερων του ενός τροποποιητικών γονιδίων σε συγκεκριμένες χρωμοσωμικές θέσεις που δρουν είτε ενισχυτικά (4q35.1, 8p23.1, 11q25) είτε προστατευτικά (20p11.22, 21q22.3) για την πρόκληση ειλεού από μηκόνιο (Blackman *et al.*, 2006).

Η πνευμονική νόσος στην Κυστική Ίνωση παρουσιάζει εξαιρετικά πολύπλοκη παθοφυσιολογία και μεγάλη ποικιλομορφία, ακόμη και μεταξύ ασθενών με τις ίδιες μεταλλάξεις. Εκτός από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που προαναφέρθηκαν, φαίνεται ότι υπάρχουν και επιπρόσθετοι τροποποιητικοί γενετικοί παράγοντες που συμβάλλουν στον τελικό καθορισμό του φαινοτύπου. Ένας από τους ισχυρότερους

και καλύτερα τεκμηριωμένους τροποποιητικούς γενετικούς παράγοντες είναι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί στο γονίδιο του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα TGFβ1, οι οποίοι ισχυρώς συσχετίζονται με σοβαρή έκπτωση της πνευμονικής λειτουργίας στην Κυστική Ίνωση (Drumm *et al.*, 2005). Αμφιλεγόμενη φαίνεται να είναι η δράση του γονιδίου της α1 αντιθρυψίνης στην τροποποίηση του φαινοτύπου της Κυστικής Ίνωσης, καθώς υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι αυξημένη παραγωγή α1 αντιθρυψίνης σε ασθενείς με Κυστική Ίνωση σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση, ενώ άλλες μελέτες αναφέρουν ότι η ανεπάρκεια της α1 αντιθρυψίνης φαίνεται να ασκεί προστατευτική δράση στην πνευμονική νόσο (Drumm *et al.*, 2005). Μεγάλος αριθμός των τροποποιητικών γονιδίων της πνευμονοπάθειας της Κυστικής Ίνωσης σχετίζονται με τη συγγενή και την επίκτητη ανοσολογική απάντηση του οργανισμού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο της λεκτίνης που συνδέεται με τη μαννόζη (*MBL-2*), όπου ανιχνεύθηκε ότι μεταλλάξεις που μειώνουν τα επίπεδα της *MBL*, συνδυάζονται με σημαντική έκπτωση της πνευμονικής λειτουργίας, ιδιαίτερα σε ασθενείς με Κυστική Ίνωση και χρόνια αποικισμό με *Pseudomonas aeruginosa* (Drumm *et al.*, 2005).

Μερικοί επιπλέον δευτερογενείς γενετικοί παράγοντες που έχουν συσχετισθεί με την επίδραση τους στον φαινότυπο της Κυστικής Ίνωσης είναι οι εξής: ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF-α), το αντιγόνο ιστοσυμβατότητας DR7, η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (*GSTM1*), ο β αδρενεργικός υποδοχέας (*ADRB2*) και το γονίδιο σύνθεσης νιτρικού αζώτου (*NOS1*) (Drumm *et al.*, 2005).

Πιν.1.4. Τροποποιητικά Γονίδια ΚΙ (Ανατύπωση από Bolliger <i>et al.</i> , 2006)	
Κατηγορία	Παράδειγμα
Φλεγμονώδη/Αντιφλεγμονώδη Γονίδια	Κυτοκίνες (TNFα, IL-8, IL-10)
Μεταφορά Ιόντων/Νερού	Εναλλακτικοί Δίαυλοι Cl ⁻ , ENaC
Ανοσοποιητικό/Άμυνα Αναπνευστικού	MBL, HLA locus, NO synthase
Πρωτεάσες/Αντι-Πρωτεάσες	Neutrophil elastase, α ₁ -AT
Μετα-μεταφραστική Επεξεργασία/Πρωτεΐνες Συνοδοί	Heat shock proteins (hsp70)
Αυξητικοί Παράγοντες	TGF-β
Οξειδωτικά/Αντι-οξειδωτικά	Τρανσφεράση της Γλουταθειόνης
Αντιδραστικότητα Αεραγωγών	β ₂ -AR
Μουκίνες	Muc5A

Εν κατακλείδι, διαπιστώνεται ότι η συσχέτιση του κλινικού φαινοτύπου με τις γονοτυπικές διαταραχές του γονιδίου είναι εξαιρετικά πολύπλοκη. Ο τελικός φαινότυπος της νόσου είναι ένας συνδυασμός από ποικίλα κλινικά χαρακτηριστικά που αναδύονται από τον υποκείμενο γονότυπο με ένα μοναδικό και ειδικό για κάθε όργανο τρόπο, αλλά υφίστανται και την επίδραση δευτερογενών γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Η έρευνα για τον εντοπισμό και άλλων τροποποιητικών παραγόντων της Κυστικής Ίνωσης συνεχίζεται, με σκοπό τόσο τη διευκρίνιση της παθοφυσιολογίας της νόσου, όσο και το σχεδιασμό νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

1.6 Συσχέτιση Γονοτύπου και Φαινοτύπου

Γενικά, οι μεταλλάξεις των τάξεων I, II και III σχετίζονται με απουσία λειτουργικότητας της CFTR πρωτεΐνης. Ως συνέπεια αυτής της απουσίας, κάθε άτομο με Κυστική Ίνωση που είναι ομόζυγο για κάποια μετάλλαξη που εντοπίζεται σε αυτές τις τρεις τάξεις ή είναι σύνθετος ετεροζυγώτης για οποιονδήποτε συνδυασμό μεταλλάξεων από τις τρεις αυτές τάξεις, αναμένεται να εκδηλώσει έναν φαινότυπο πλήρους έλλειψης λειτουργίας της CFTR. Αυτή η περίπτωση χαρακτηριστικά καταλήγει στον ονομαζόμενο «βαρύ» ή «κλασσικό» φαινότυπο Κυστικής Ίνωσης που περιλαμβάνει εξωκρινή παγκρεατική ανεπάρκεια, ηπατική νόσο, διαβήτη, προχωρημένη πνευμονική νόσο (Bolliger *et al.*, 2006) και απαντάται στο 85-90% των ασθενών με Κυστική Ίνωση.

Περαιτέρω απόπειρες συσχετισμού φαινοτύπου-γονοτύπου στο εσωτερικό της υποομάδας αυτής δεν έχουν καταλήξει σε σημαντική επιτυχία πιθανόν διότι το 50% των πασχόντων από Κυστική Ίνωση είναι ΔF508 και επιπλέον περίπου ένα τρίτο είναι ΔF508 σύνθετοι ετεροζυγώτες. Εξάλλου, ακόμα και ανάμεσα στους ΔF508 ομοζυγώτες πάσχοντες από Κυστική Ίνωση, υπάρχει τεράστια ποικιλία σε ότι αφορά τον φαινότυπο και την κλινική εξέλιξη της νόσου. Αυτή η παρατήρηση έχει οδηγήσει στην υπόθεση, και στη συνέχεια στην απόδειξη, ότι ο πολυμορφισμός άλλων γονιδίων σχετίζεται σημαντικά στην διαφοροποίηση της κλινικής εξέλιξης της νόσου και του φαινοτύπου (Drumm *et al.*, 2005).

Οι μεταλλάξεις των τάξεων IV και V, σχετίζονται με τη διατήρηση σημαντικής υπολειπόμενης λειτουργίας της CFTR πρωτεΐνης ακόμα και αν συνδυάζονται με κάποια μετάλλαξη στην οποία δεν διασώζεται καθόλου η λειτουργία της CFTR (τάξεις I, II και III). Η λειτουργία αυτή που διασώζεται οδηγεί κλινικά σε ηπιότερη εμφάνιση της νόσου, όπου συχνά υπάρχει εξωκρινής παγκρεατική επάρκεια και λιγότερη συμπτωματολογία από το αναπνευστικό σύστημα. Αυτός ο «ηπιότερος» φαινότυπος εμφανίζεται στο εναπομένον 10-15% των πασχόντων.

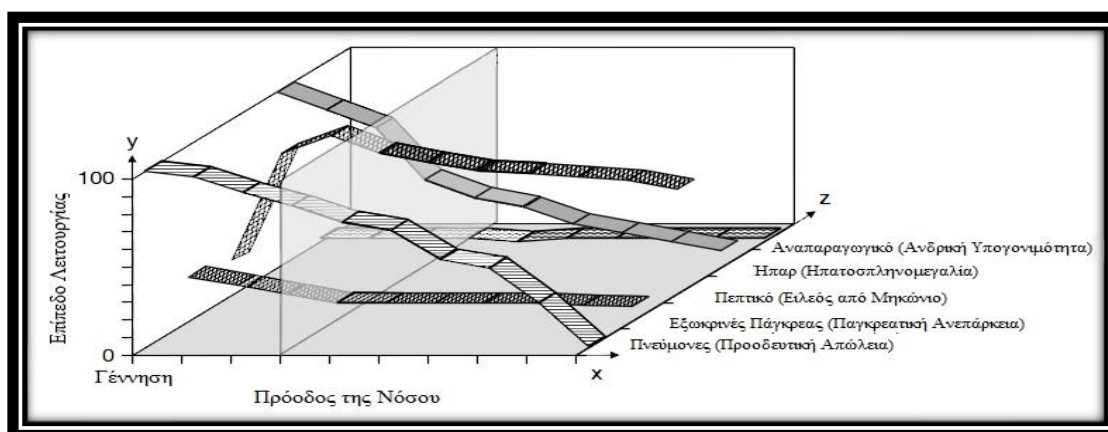
Οι επιπτώσεις των μεταλλάξεων της τάξης VI στον φαινότυπο δεν έχουν περιγραφεί με αντίστοιχη σαφήνεια. Η N287Y έχει συσχετιστεί με φαινότυπο εξωκρινούς παγκρεατικής επάρκειας (Silvis *et al.*, 2003), αλλά αντίθετα μεταλλάξεις που εξαλείφουν το καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης πιθανόν να σχετίζονται με μεγαλύτερη απώλεια της λειτουργίας της πρωτεΐνης και με παγκρεατική ανεπάρκεια.

Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί αυξημένο ποσοστό μεταλλάξεων Κυστικής Ίνωσης σε ένα ευρύ φάσμα ασθενειών που εμφανίζουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όμοια με την Κυστική Ίνωση και χαρακτηρίζονται ως μονοσυμπτωματικές μορφές (CF-RD: Cystic Fibrosis Related Diseases), με παραδείγματα την ανδρική στειρότητα με αμφοτερόπλευρη ή μονόπλευρη έλλειψη σπερματικού πόρου (CBAVD ή CAVD), την ιδιοπαθή χρόνια και την οξεία υποτροπιάζουσα παγκρεατίτιδα (ICP και ARP), την άτυπη παραρρινοκολπίτιδα, την αλλεργική βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση, τις διάχυτες βρογχιεκτασίες, τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και στο άσθμα (Ευθυμιάδου, 2008).

Αναφέρονται κάτωθι μερικά παραδείγματα συσχέτισης συγκεκριμένων μεταλλαγών και της φαινοτυπικής τους έκφρασης. Έχει φανεί ότι οι ασθενείς που φέρουν «ήπιες» μεταλλάξεις όπως η A455E, που εντάσσονται στις τάξεις IV και V, έχουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα Cl⁻ στον ιδρώτα, σε σύγκριση με τους ασθενείς που φέρουν «βαριές» μεταλλάξεις όπως οι ΔF508, R553X, G542X και άλλες (Καναβάκης, 2002). Έχει βρεθεί ότι οι μεταλλάξεις G551S (Strong *et al.*, 1995), 2789+5G>A (Welsh *et al.*, 1995), 3849+10kb C>T (Augarten *et al.*, 1993) σχετίζονται με φυσιολογικές ή πολύ κοντά στις φυσιολογικές τιμές ηλεκτρολυτών στον ιδρώτα, σε ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με Κυστική Ίνωση. Με παγκρεατική επάρκεια φαίνεται να συσχετίζονται οι μεταλλαγές G91R, E92K, R117H, R334W, R347P, A455E, Y563N, P574H, P205S, R347H, G551S και 3849+10kb C>T

(Αντωνιάδη, 1997). Η μετάλλαξη G511D βρέθηκε να έχει αρνητική σχέση με τον ειλεό από μηκόνιο, ενώ ασθενείς με G511D εμφανίζουν παγκρεατική ανεπάρκεια σε μεγαλύτερη από τη μέση εμφανιζόμενη ηλικία (Welsh *et al.*, 1995). Η μετάλλαξη R117H σχετίζεται με παγκρεατική επάρκεια και ήπια πνευμονοπάθεια (The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium, 1993), και έχει παρατηρηθεί ότι ανάλογα με το πώς συνδυάζεται με τα διάφορα μήκη της πολυθυμιδικής περιοχής μέσα στο εσώνιο 8 (περιοχή γνωστή ως πολυ-T αλληλουχία (poly-T sequence), η οποία περιέχει 5,7 ή 9 θυμιδίνες) καθώς και την ύπαρξη ή όχι άλλης μετάλλαξης σε trans θέση προκαλεί είτε Κυστική Ίνωση είτε αμφοτερόπλευρη ή μονόπλευρη έλλειψη του σπερματικού πόρου (CBAVD ή CAVD) (Costes *et al.*, 1995). Η πλειοψηφία των ανδρών με Κυστική Ίνωση (>95%) παρουσιάζει υπογονιμότητα αυτής της μορφής, γεγονός που δείχνει την μεγάλη ευαισθησία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος σε *CFTR* μεταλλάξεις (Zielenski, 2000).

Πρέπει να σημειωθεί η συμβολή των βάσεων δεδομένων της Κυστικής Ίνωσης, όπως η ήδη προαναφερθείσα Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (CFGAC), ευρέως γνωστή και ως SickKids *CFTR* και ιδιαιτέρως η *CFTR2*, στις οποίες εντοπίζονται καταχωρημένα στοιχεία συσχέτισης γονοτύπου με τον φαινότυπο σύμφωνα και με την πρόσφατη διεθνή βιβλιογραφία, συμβάλλοντας σε μέγιστο βαθμό στην παροχή στοχευμένης εξειδικευμένης γνώσεως στην καθημερινή κλινικοεργαστηριακή πρακτική.



Εικ.1.7. Σχηματική αναπαράσταση ενός υποθετικού φαινοτύπου Κυστικής Ίνωσης. Ο φαινότυπος περιγράφεται ως διαμόρφωση των εκδηλώσεων, της σοβαρότητας τους (σε επίπεδο λειτουργίας) και την εξέλιξη τους στο χρόνο. Ο φαινότυπος σε ένα δεδομένο χρονικό σημείο είναι εμφανής κατά την εγκάρσια διατομή (άξονες y-z). (Ανατύπωση από Bolliger *et al.*, 2006)

Μέχρι πρόσφατα ήταν γενικά αποδεκτό ότι οι ετεροζυγώτες φορείς των μεταλλάξεων του *CFTR* είναι υγιή άτομα, μη προσβεβλημένα από την ύπαρξη του ενός ελαττωματικού γονιδίου *CFTR*. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι υπάρχει αυξημένος κίνδυνος κλινικά εμφανούς νόσου σε ετεροζυγώτες φορείς της μετάλλαξης σε ιστούς όπου η πρωτεΐνη *CFTR* διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα επιθηλιακά κύτταρα. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι άτομα με χρόνια παρραρινοκολπίτιδα ανευρίσκονται συχνότερα να είναι φορείς Κυστικής Ίνωσης σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό (Wang *et al.*, 2000). Παρομοίως, οι ετεροζυγώτες φορείς Κυστικής Ίνωσης έχουν υψηλότερη επίπτωση άσθματος σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό (Dahl *et al.*, 1998). Η συσχέτιση αυτή φαίνεται να επεκτείνεται και πέρα από το αναπνευστικό επιθήλιο, αφού άτομα με μεταλλάξεις του *CFTR*, έχουν βρεθεί με αυξημένη συχνότητα ανάμεσα σε ασθενείς με χρόνια ιδιοπαθή παγκρεατίτιδα (Cohn *et al.*, 1998), πρωτοπαθή σκληρυντική χολαγγειίτιδα (Sheth *et al.*, 2003) ή συγγενή έλλειψη σπερματικών πόρων (Dumur *et al.*, 1996) (Δάσιος, 2012).

Η μεγάλη συχνότητα της ΔF508 στη λευκή φυλή, καθώς και η μοναδική καταγωγή αυτής της μετάλλαξης, θα μπορούσε να πιθανολογήσει ότι η μεγάλη επικράτηση της Κυστικής Ίνωσης στη λευκή φυλή οφείλεται σε πλεονέκτημα των ετεροζυγωτών ή σε γενετική παρέκκλιση. Εκτιμάται ότι αν απουσίαζε η μετάλλαξη ΔF508, η Κυστική Ίνωση θα εμφανιζόταν με συχνότητα 1/30000 γεννήσεις, το οποίο υποστηρίζει την υπόθεση της τυχαίας παρέκκλισης (drift) της πιο συχνής μετάλλαξης (Tsui, 1990). Επιλεκτικά προτερήματα θα μπορούσε να παρέχουν οι μεταλλάξεις. Επειδή τα επιθηλιακά κύτταρα επιδεικνύουν ανώμαλη έκκριση Cl⁻, προτάθηκε ότι οι ετεροζυγώτες για τις μεταλλάξεις της Κυστικής Ίνωσης μπορεί να ευνοούνται, λόγω της ανθεκτικότητας σε εκκριτικές διάρροιες (Quinton, 1983), συμπεριλαμβανομένης και της χολέρας (Bramanti *et al.*, 2000). Εναλλακτικά η συσχέτιση της ΔF508 και τουλάχιστον τριών ακόμα σχετικά συχνών μεταλλάξεων με τον ίδιο ενδογονιδιακό απλότυπο, υποδηλώνει ότι επιλεκτικό προτέρημα θα μπορούσε να παρέχεται από το γενετικό υπόστρωμα, στο οποίο οι μεταλλάξεις εμφανίζονται (Sereth *et al.*, 1992).

1.8 Διαγνωστική προσέγγιση Κυστικής Ίνωσης

Η διάγνωση της Κυστικής Ίνωσης είναι κατ' αρχήν κλινική και στη συνέχεια επιβεβαιώνεται μέσω εργαστηριακών δοκιμασιών. Βασίζεται σε λεπτομερείς αλγόριθμους που συνδυάζουν κλινικά, βιοχημικά και γενετικά στοιχεία (Δάσιος, 2012). Τα κριτήρια διάγνωσης της νόσου βασίζονται στα εξής στοιχεία:

- Στην παρουσία ενός ή περισσότερων τυπικών κλινικών χαρακτηριστικών Κυστικής Ίνωσης (π.χ. χρόνια αναπνευστική νόσο με επίμονο αποικισμό/λοίμωξη από *S. aureus*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia* με χρόνια παραγωγικό βήχα και επίμονα παθολογικά ευρήματα στην ακτινογραφία θώρακος όπως βρογχιεκτασίες κ.τ.λ., γαστρεντερικές διαταραχές και προβλήματα θρέψης όπως ειλεό από μηκόνιο, παγκρεατική ανεπάρκεια, χρόνια ηπατική νόσο και υποθρεψία, ηλεκτρολυτικές διαταραχές όπως οξεία αφυδάτωση και μεταβολική αλκάλωση και αποφρακτική αζωοσπερμία για τους άνδρες) ή στο θετικό οικογενειακό ιστορικό Κυστικής Ίνωσης ή στο θετικό αποτέλεσμα του ανιχνευτικού ελέγχου νεογνών.
- Στην εργαστηριακή επιβεβαίωση της νόσου είτε με αυξημένα επίπεδα CI στον ιδρώτα είτε με παθολογικές μετρήσεις της διαφοράς ηλεκτρικού δυναμικού στον ρινικό βλεννογόνο είτε τέλος με την ανεύρεση δύο μεταλλάξεων στο γονίδιο της Κυστικής Ίνωσης (Ευθυμιάδου, 2008).

Ως “gold standard” μέθοδος διάγνωσης της Κυστικής Ίνωσης θεωρείται η δοκιμασία-τεστ ιδρώτα. Τα πράγματα είναι απλά όταν η κλινική εικόνα είναι τυπική και η δοκιμασία ιδρώτα θετική. Υπάρχουν όμως περιπτώσεις μη τυπικές που εκδηλώνονται σε μεγάλη ηλικία με βρογχιεκτασίες ή με στειρότητα, όπου ακόμη και η δοκιμασία ιδρώτα είναι αρνητική. Σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να βοηθήσει η μέτρηση της διαφοράς δυναμικού και εκείνο που τελικά θέτει τη διάγνωση είναι ο γονοτυπικός έλεγχος (Πούλιου, 2000).

Η μέση ηλικία διάγνωσης παιδιών με Κυστική Ίνωση είναι περίπου έξι μήνες για την περίπτωση της κλασσικής Κυστικής Ίνωσης, ενώ στην περίπτωση της μη-κλασσικής Κυστικής Ίνωσης η διάγνωση μπορεί να καθυστερήσει αρκετά. Σε ένα ποσοστό 5-10% οι ασθενείς με Κυστική Ίνωση θα παρουσιάσουν με άτυπη συμπτωματολογία και αβέβαια αποτελέσματα εξετάσεων και η διάγνωση θα

καθυστερήσει. Καθώς επεκτείνεται η χρήση των προγραμμάτων μαζικής ανίχνευσης στην νεογνική περίοδο (Newborn Screening), φαίνεται ότι η άτυπη μορφή δυσλειτουργίας της CFTR θα καταστεί η συχνότερη μορφή της νόσου που θα διαγιγνώσκεται εκτός της νεογνικής περιόδου (Farrell *et al.*, 2008).

1.8.1 Προσδιορισμός Cl⁻ στον Ιδρώτα (Δοκιμασία-Τεστ Ιδρώτα)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των Cl⁻ στον ιδρώτα μετά από ιοντοφόρηση με πιλοκαρπίνη (μέθοδος Gibson-Cooke) είναι, όπως αναφέρθηκε, ο κύριος τρόπος διάγνωσης της Κυστικής Ίνωσης. Είναι μια γρήγορη και φθηνή εξέταση, η οποία είναι θετική στο 98% των ασθενών. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων θα πρέπει πάντα να συνδυάζεται με την κλινική εικόνα και την ηλικία του ασθενούς, καθώς και την κλινική εμπειρία του γιατρού. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση Cl⁻ στον ιδρώτα πάνω από 60 mmol/L είναι συμβατή με τη διάγνωση Κυστικής Ίνωσης. Τιμές Cl⁻ 40-60 mmol/L θεωρούνται οριακές και θα πρέπει να αξιολογηθούν σε συνδυασμό με την κλινική εικόνα και την ηλικία του ασθενούς. Τέλος, συγκέντρωση Cl⁻ <40 mmol/L απομακρύνει από τη διάγνωση της Κυστικής Ίνωσης (Rosenstein and Cutting, 1998).

Το ποσοστό των ψευδών αποτελεσμάτων της δοκιμασίας ιδρώτα είναι ένας παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν, καθώς μπορεί να αγγίζει τις τάξεις του 10-15%. Συνήθως, τα περισσότερα λάθη αφορούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα, αλλά και τα ψευδώς αρνητικά αποτελούν πρόβλημα. Τα περισσότερα λάθη οφείλονται σε κακή μέθοδο, σε ανεπαρκή ποσότητα ιδρώτα, σε τεχνικά λάθη και σε κακή ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι πλήθος νοσημάτων εκτός της Κυστικής Ίνωσης εμφανίζουν παθολογική δοκιμασία ιδρώτα αλλά συνήθως δεν αποτελούν πρόβλημα στην διαφορική διάγνωση. Μερικά τέτοια παραδείγματα αποτελούν η νευρογενής ανορεξία, η ατοπική δερματίτις, ο οικογενής υποπαραθυρεοειδισμός, η υποθρεψία, η υπογαμμασφαιριναιμία κ.ά. (Πούλιου, 2000).

1.8.2 Μέτρηση Ρινικών Δυναμικών

Η διαφορά ρινικού δυναμικού εκφράζει τη διαφορά δυναμικού στο αναπνευστικό επιθήλιο. Η αύξηση των ρινικών δυναμικών είναι ενδεικτική Κυστικής

Ίνωσης. Εκείνο όμως που θέτει τη διάγνωση είναι ο τρόπος μεταβολής του ρινικού δυναμικού μετά την έκπλυση του βλεννογόνου με διάφορα διαλύματα (τοπική εφαρμογή αμιλορίδης, προσθήκη διαλύματος ελεύθερο από χλώριο και στη συνέχεια προσθήκη ισοπροτερενόλης) (Ευθυμιάδου, 2008).

Τα ρινικά δυναμικά αποτελούν τη μόνη *in vivo* μέθοδο εκτίμησης της CFTR πρωτεΐνης στο αναπνευστικό σύστημα και χρησιμοποιούνται στις περιπτώσεις που ο προσδιορισμός των CI στον ιδρώτα και ο γονοτυπικός έλεγχος αδυνατούν να θέσουν τη διάγνωση (Rosenstein and Cutting, 1998). Στους ασθενείς με Κυστική Ίνωση κατά μέσο όρο είναι -36 mV, ενώ στους φυσιολογικούς η διαφορά δυναμικού εντοπίζεται στο -19 mV (Πούλιου, 2000).

1.8.3 Μοριακές Τεχνικές Ανίχνευσης Κυστικής Ίνωσης

Η επιβεβαίωση της διάγνωσης της Κυστικής Ίνωσης με την ανεύρεση δύο παθολογικών μεταλλαγών στο γονίδιο της Κυστικής Ίνωσης παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλή ειδικότητα, αλλά έως τώρα μικρότερη ευαισθησία, λόγω της πληθώρας των μεταλλάξεων καθώς π.χ. η γονοτυπική ανάλυση ενός ασθενούς με άτυπη κλινική εικόνα και οριακή δοκιμασία συχνά δεν είναι ιδιαίτερα χρήσιμη λόγω ότι οι ασθενείς φέρουν μεταλλάξεις οι οποίες δεν υπάρχουν στα διαγνωστικά πάνελ για μαζικό έλεγχο φορέων (Πούλιου, 2000). Η εισαγωγή στο χώρο της διάγνωσης της Αλληλούχισης Νέας Γενιάς (Next Generation Sequencing) φαίνεται ότι θα αλλάξει αυτό το πεδίο δυναμικά. Η ανεύρεση μιας μετάλλαξης σε ασθενείς πρέπει να αξιολογηθεί σε συνδυασμό με τις κλινικές εκδηλώσεις και τις υπόλοιπες εργαστηριακές δοκιμασίες για να τεθεί η διάγνωση Κυστικής Ίνωσης. Η αδυναμία ανίχνευσης οποιασδήποτε μετάλλαξης Κυστικής Ίνωσης δεν αποκλείει την νόσο (Ευθυμιάδου, 2008).

Ο γονοτυπικός έλεγχος είναι απαραίτητος να πραγματοποιείται σε όλους τους ασθενείς με Κυστική Ίνωση, καθώς και στους γονείς και τα άτομα του οικογενειακού περιβάλλοντος, γιατί εκτός από την επιβεβαίωση της διάγνωσης, παρέχει τη δυνατότητα να δοθούν κατάλληλες γενετικές οδηγίες για την πρόληψη της νόσου (Rosenstein and Cutting, 1998).

1.8.3.1 Allele-Specific Oligonucleotide (ASO) PCR

Η Allele Specific Oligonucleotide (ASO) PCR αποτελεί μια μέθοδο ανίχνευσης μεταλλαγών στην οποία μόνον η τέλεια συμπληρωματική ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία μπορεί να δράσει ως εκκινητής (primer) για ενίσχυση. Το πλεονέκτημα της ASO PCR είναι ότι είναι μια ταχεία, απλή και μη-ραδιενεργή μέθοδος. Η ASO PCR, αλλιώς γνωστή και ως Amplification Refractory Mutation System (ARMS) περιγράφηκε πρώτα για την ανίχνευση μεταλλαγών στο γονίδιο της α_1 -αντιθρυψίνης (Newton *et al.*, 1989). Έκτοτε, έχει εφαρμοστεί στη μελέτη ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων, στα οποία συμπεριλαμβάνεται η προγεννητική διάγνωση της Κυστικής Ίνωσης (Newton *et al.*, 1989). Σε αυτή την τεχνική σχεδιάζονται ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers) ώστε να είναι συμπληρωματικοί είτε στη φυσιολογική (wild-type) είτε στη μεταλλαγμένη αλληλουχία, όπου και οι δύο χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με έναν κοινό εκκινητή (primer). Επειδή η DNA πολυμεράση δεν διαθέτει ενεργότητα 3'έξωνουκλεάσης, δεν μπορεί να επιδιορθώσει μια μη-συμπληρωματικότητα μιας βάσεως (single-base mismatch) ανάμεσα στον εκκινητή (primer) και το εκμαγείο στο 3'άκρο των DNA εκκινητών (primers). Βάσει αυτού, αν οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers) έχουν σχεδιαστεί στο να εμφανίζουν μη-συμπληρωματικότητα κοντά ή στο τέλος στο 3'άκρο, τότε ο εκκινητής (primer) θα επεκταθεί ή όχι, αναλόγως του ποιός πολυμορφισμός μιας βάσεως είναι παρών στην αλληλουχία στόχο. Ως εκ τούτου, υπό τις καταλλήλως αυστηρές συνθήκες, μόνο το στοχευόμενο DNA που είναι ακριβώς συμπληρωματικό με τον εκκινητή (primer) θα ενισχύεται (Theophilus and Rapley, 2002).

1.8.3.2 Μέθοδος Ηλεκτροφόρησης σε Πήκτωμα με Κλίση Αποδιατακτικού (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis (DGGE))

Η μέθοδος αυτή που αρχικά περιγράφηκε από τον Myers και τους συνεργάτες του (Myers *et al.*, 1989), είναι μια γρήγορη, αποτελεσματική και χωρίς ραδιενεργά μέθοδος, που επιτρέπει την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων (αντικατάσταση, έλλειψη ή προσθήκη βάσεων στην αλληλουχία του DNA). Βασίζεται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τμημάτων διπλής έλικας DNA μετά από ενίσχυση με

PCR, σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που περιέχει μετουσιωτικούς (denaturing) παράγοντες σε προοδευτικά αυξανόμενη συγκέντρωση. Ο διαχωρισμός των φυσιολογικών και μεταλλαγμένων τμημάτων του DNA βασίζεται στα χαρακτηριστικά τήξεως του DNA.

Ιδίου μεγέθους τμήματα DNA που διαφέρουν σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο αρχικά μεταναστεύουν στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με σταθερό ρυθμό. Καθώς μεταναστεύουν μέσα από αυστηρά καθορισμένες συνθήκες μετουσίωσης, ορισμένες περιοχές μέσα στα πολλαπλασιασμένα τμήματα του DNA που καλούνται «κύριες περιοχές» (Domains, ~25-500 bp), τήκονται σε T °C ίση με το T_m της κύριας περιοχής και προκαλούν μερική αποδιάταξη των ελίκων τους, με συνέπεια την επιβράδυνση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του συγκεκριμένου τμήματος του DNA. Με αυτόν τον τρόπο δύο μόρια διπλής έλικας που διαφέρουν σε ένα νουκλεοτίδιο, μπορούν να διαχωριστούν, επειδή η θερμοκρασία τήξεως (T_m) της κύριας περιοχής είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη ακόμη και σε αλλαγές ενός νουκλεοτιδίου.

Με τις συνθήκες αυτές δεν είναι δυνατόν να διαχωριστούν τμήματα DNA που διαφέρουν σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο αν διαθέτουν «κύριες περιοχές» με υψηλή θερμοκρασία τήξεως (T_m). Αυτό το μειονέκτημα μπορεί να ξεπεραστεί αν κατά τη διαδικασία ενίσχυσης του DNA προστεθούν περιοχές πλούσιες σε GC αλληλουχίες (GC clamps: 40-50 bp), στο 5' άκρο της μιας από τις δύο αλληλουχίες εκκινητές (primers) που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση PCR (Αντωνιάδη, 1997).

1.8.3.3 Μέθοδοι Αλληλούχισης

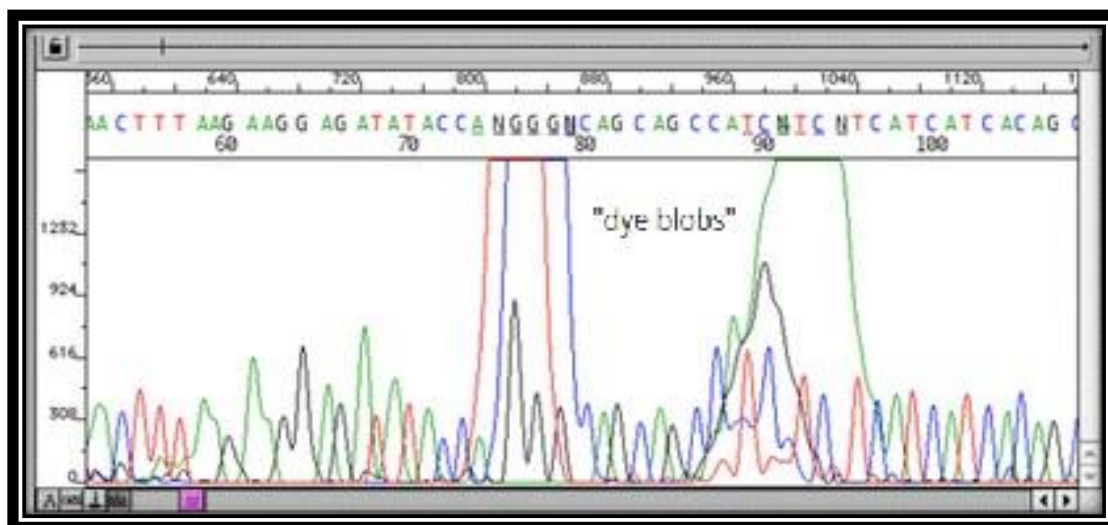
1.8.3.3.i Αλληλούχιση με τη Μέθοδο Sanger

Η μέθοδος Sanger, η οποία παρουσιάστηκε το 1977, είναι μια μέθοδος προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA που χρησιμοποιεί μονόκλωνο ενισχυμένο DNA ως υπόστρωμα για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας, κατά τη σύνθεση της οποίας τα κανονικά νουκλεοτίδια αντικαθίστανται από τριφωσφορικά δι-δεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs), τα οποία αποτελούν τροποποιημένα νουκλεοτίδια καλούμενα terminators. Τα ddNTPs διαφέρουν από τα dNTPs στο ότι δεν έχουν την ομάδα -OH στο 3' άκρο τους, οπότε κατά τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας

του DNA όταν προστεθεί ένα ddNTP σταματάει η σύνθεση στη συγκεκριμένη βάση καθότι δεν υπάρχει ελεύθερη –OH ομάδα στο 3' άκρο για να προστεθεί το επόμενο νουκλεοτίδιο (Sanger *et al.*, 1977). Αρχικά, αυτή η μέθοδος πραγματοποιείτο σε τέσσερις διαφορετικούς σωλήνες, ο καθένας εκ των οποίων περιείχε την κατάλληλη ποσότητα ενός εκ των τεσσάρων terminators. Αφού και οι τέσσερις αντιδράσεις είχαν ολοκληρωθεί, το μίγμα των DNA τμημάτων ποικίλου μεγέθους διαχωριζόταν με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό gel πολυακρυλαμίδης, σε τέσσερις παράλληλες γραμμές. Το μοτίβο των ζωνών έδειχνε την κατανομή του τερματισμού στην συντιθέμενη αλυσίδα του DNA και η άγνωστη αλληλουχία μπορούσε να διαβαστεί με αυτοραδιογραφία. Η μέθοδος αυτή έφερε την επανάσταση στο πεδίο της γενωμικής και ήταν αρχικά γνωστή ως chain-termination method ή dideoxynucleotide method. Αποδείχτηκε πιο αποτελεσματική ως μέθοδος σε σχέση με την χημική μέθοδο Maxam-Gilbert, απαιτώντας λιγότερα τοξικά χημικά και χαμηλότερες ποσότητες ραδιενέργειας. Δύο διαφορετικές προσεγγίσεις της μεθόδου Sanger είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες, η Shotgun και η Primer Walking Sequencing (Franca *et al.*, 2002).

Η μέθοδος Sanger πλέον έχει αυτοματοποιηθεί και πραγματοποιείται σε συσκευές καλούμενες DNA sequencers, όπου μπορούν να αλληλουχηθούν έως και 384 δείγματα DNA σε μια παρτίδα. Οι DNA sequencers διαχωρίζουν τις αλυσίδες βάσει μεγέθους ή μήκους χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή (capillary electrophoresis) και ανιχνεύουν και καταγράφουν χρωστικές φθορισμού που είναι προσαρτημένες στα ddNTPs, παρέχοντας ως τελικά δεδομένα κορυφές ιχνών φθορισμού σε χρωματογράφημα. Ένας περιορισμός που χαρακτηρίζει τη μέθοδο είναι η επίδραση των χρωστικών λόγω των διαφορών στην ενσωμάτωση των προσαρτημένων με χρωστική ddNTPs εντός του τμήματος DNA, οδηγώντας σε άνισες κορυφογραμμές και σχήματα στο παρεχόμενο χρωματογράφημα. Αυτός ο περιορισμός περιορίζεται με τη χρήση τροποποιημένων DNA ενζυμικών συστημάτων πολυμεράσης και χρωστικών, καθώς και μέσω μεθόδων εξάλειψης των “dye blobs”. Τέλος, άλλη μια πρόκληση που αναδύεται είναι η φτωχή ποιότητα που εντοπίζεται στις αρχικές 15-40 βάσεις της αλληλουχίας λόγω της πρόσδεσης του εκκινήτη (primer) και της επιδείνωσης της ποιότητας των ιχνών της αλληλουχίας μετά από 700-900 βάσεις. Προγράμματα αναφοράς βάσης όπως το Phred παρέχουν μια τυπική

εκτίμηση της ποιότητας βοηθώντας στην απομάκρυνση των περιοχών αλληλούχισης χαμηλής ποιότητας (Ledergerber and Dessimoz, 2010).



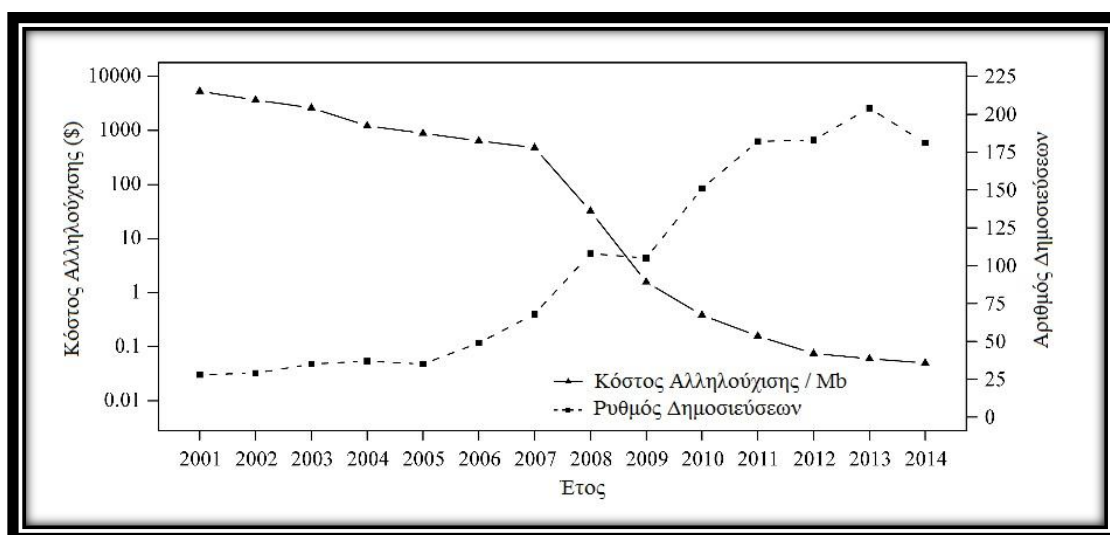
Εικ.1.8. Απεικόνιση χρωματογραφήματος όπου εμφανίζονται τα artifacts “dye blobs”. (Ανατύπωση από την ιστοσελίδα <https://www.roswellpark.edu>, 2016)

1.8.3.3.ii Αλληλούχιση με Next Generation Sequencing (NGS) πλατφόρμες

Το περίφημο Πρόγραμμα Ανθρωπίνου Γονιδιώματος (Human Genome Project), διάρκειας 13 ετών και κόστους \$3.000.000.000, ολοκληρώθηκε το 2003 με τη χρήση της λεγόμενης πρώτης γενιάς αλληλούχισης, της μεθόδου Sanger. Έκτοτε, εξαιτίας εγγενών περιορισμών στην απόδοση, την ταχύτητα, την επεκτασιμότητα και την ανάλυση της πρώτης γενιάς αλληλούχισης, μια δευτέρας γενιάς μέθοδος αλληλούχισης καλούμενη Επόμενη Γενιά Αλληλούχιση (NGS: Next Generation Sequencing) έχει αναπτυχθεί για να καλύψει την υψηλή ζήτηση για φθηνότερη αλλά επίσης και ταχύτερη τεχνολογία αλληλούχισης (Khalid and Sabahuddin, 2016).

Το NGS του οποίου η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε στα τέλη του 20^{ου} αιώνα και τις αρχές του 21^{ου}, αποτελεί μια ριζικά διαφορετική προσέγγιση για την αλληλούχιση, κάτι που οδήγησε σε διάφορες πρωτοποριακές ανακαλύψεις και έφερε μια επανάσταση στην γονιδιωματική έρευνα αποκαλύπτοντας απεριόριστες πτυχές σχετιζόμενες με το γονιδίωμα., μεταγράφομα και το επιγονιδίωμα διαφόρων ειδών.

Ως εκ τούτου, η τεχνολογία NGS έχει φέρει μια νέα επανάσταση στην ευημερία της ανθρώπινης κοινωνίας. Η κύρια ιδέα πίσω από το NGS είναι παρόμοια με την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE: Capillary Electrophoresis) που βασίζεται στην μέθοδο Sanger, αλλά το NGS επεκτείνει την ιδέα στο ότι πραγματοποιείται μαζική παράλληλη αλληλούχιση (MPS: Massive Parallel Sequencing), όπου εκατομμύρια τμήματα DNA από ένα δείγμα αλληλουχούνται με ακρίβεια. Το NGS επιτρέπει την αλληλούχιση μεγάλου αριθμού βάσεων του DNA, παράγοντας εκατοντάδες gigabases (Gb) δεδομένων εντός ενός μόνο τρεξίματος (run). Η τεχνολογία αυτή πλέον επιτρέπει το πλήρες γονιδίωμα του ανθρώπου να προσδιορίζεται σε λιγότερο από μια ημέρα (Khalid and Sabahuddin, 2016).



Εικ.1.9. Γραφική απεικόνιση του κόστους αλληλούχισης με NGS και της αύξησης του ρυθμού δημοσιεύσεων μελετών στον κλάδο της Γενετικής: Invasion Genetics. (Ανατύπωση από Rius *et al.*, 2015)

Η τεχνολογία του NGS αποτελεί ένα ισχυρό, ευέλικτο, απαραίτητο και καθολικό «βιολογικό εργαλείο» που διεισδύει σε αρκετούς τομείς της βιολογικής μελέτης μέσω εφαρμογών της όπως π.χ. Whole Genome Sequencing, Exome Sequencing, Targeted Resequencing, Chromatin Immunoprecipitation Sequencing, RNA Sequencing. Αναφέρονται κάτωθι μερικές εκ των προοπτικών και εφαρμογών της τεχνολογίας NGS:

- Παρέχει μια πολύ φθηνότερη και ταχύτερη εναλλακτική λύση της μεθόδου Sanger. Οι ερευνητές μπορούν να αλληλουχίσουν ολόκληρο ένα μικρό γονιδίωμα σε μια ημέρα. Το κόστος αλληλούχισης ενός ανθρωπίνου γονιδιώματος έχει σπάσει το φράγμα των \$1000 (<https://www.veritasgenetics.com/mygenome>, 2016).
- Η υψηλής απόδοσης αλληλούχιση του ανθρωπίνου γονιδιώματος μας επιτρέπει να ανακαλύψουμε γονίδια και ρυθμιστικά μονοπάτια που συσχετίζονται με ασθένειες (Grada and Weinbrecht, 2013).
- Η στοχευόμενη αλληλούχιση (Targeted Sequencing) συγκεκριμένων γονιδίων ή γενωμικών περιοχών συμβάλλει στην αναγνώριση μεταλλάξεων που προκαλούν ασθένειες. Συμβάλλει στην ταχύτερη διάγνωση και το αποτέλεσμα της στοχευόμενης αλληλούχισης για ασθένειες συνδράμει στην βέλτιστη θεραπευτική απόφαση για πολλές γενετικές ασθένειες, στις οποίες συμπεριλαμβάνεται και ο καρκίνος (Grada and Weinbrecht, 2013).
- Το RNA Sequencing παρέχει πληροφορίες για ολόκληρο το μεταγράφομα ενός δείγματος χωρίς να απαιτείται προηγούμενη γνώση με την γενετική αλληλουχία ενός οργανισμού. Παρέχει έτσι μια ισχυρή εναλλακτική λύση για τα Microarrays για μελέτες γονιδιακής έκφρασης και επιτρέπει στους επιστήμονες να οπτικοποιήσουν την γονιδιακή έκφραση υπό τη μορφή αλληλουχίας (Grada and Weinbrecht, 2013).
- Συμβάλλει στην μελέτη των αλληλομόρφων η οποία είναι κοινή στην Ιατρική Γενετική, όπου αλληλουχίες DNA και δεδομένα συγκρίνονται με μια αλληλουχία αναφοράς και ανιχνεύονται τυχόν διαφορές. Αυτές οι διαφορές μπορεί να ποικίλουν από ένα SNP (Single Nucleotide Polymorphism) έως και πολύπλοκες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις (Nekrutenko and Taylor, 2012).

Πιν.1.5. Προετοιμασία Δειγμάτων στην CE-based Sanger Αλληλούχιση και στο NGS. (Ανατύπωση από Khalid and Sabahuddin, 2016)

Εφαρμογές	CE-based Sanger Αλληλούχιση	Next Generation Sequencing
Whole Genome Sequencing	Περίπλοκη προετοιμασία της βιβλιοθήκης. Κάθε δείγμα πρέπει να περιέχει ένα μόνο εκμαγείο, απαιτώντας τον καθαρισμό του δείγματος.	Εύχρηστη προετοιμασία βιβλιοθήκης, π.χ. ένα δείγμα μπορεί να αποτελείται από έναν πληθυσμό μορίων DNA τα οποία δεν χρειάζονται κλωνικό καθαρισμό (clonal purification).
	Χρονοβόρα προετοιμασία των δειγμάτων που εξαρτάται από το μέγεθος του	Ολοκληρώνεται εντός ωρών, ανεξαρτήτως του μεγέθους

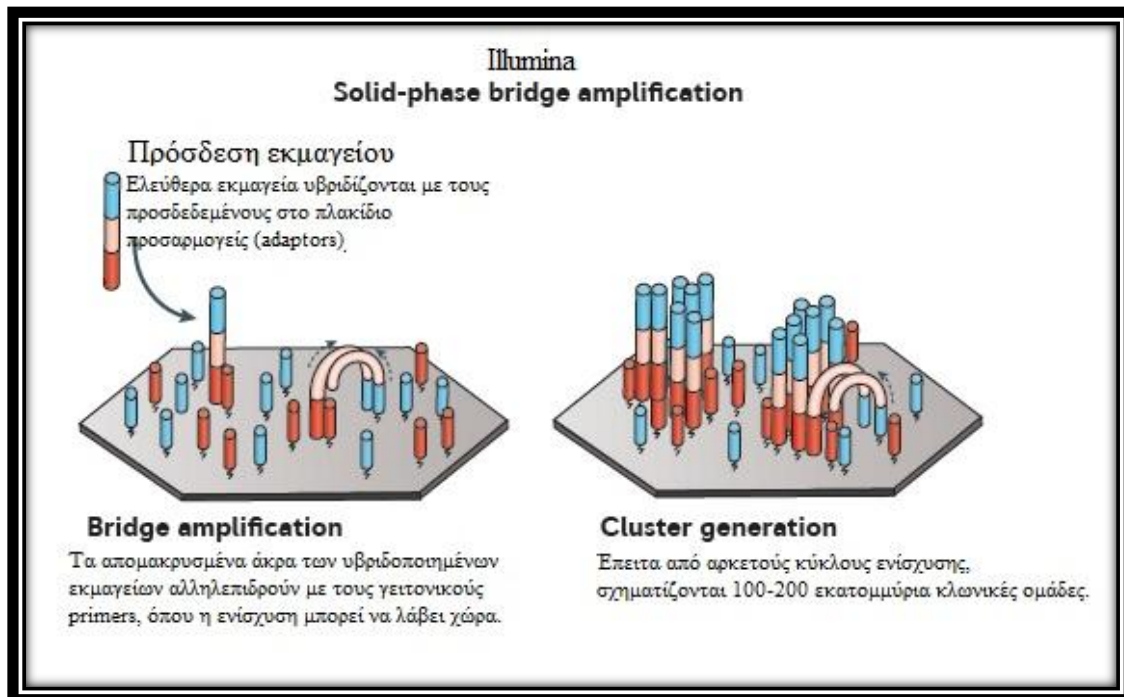
	γονιδιώματος.	γονιδιώματος.
Targeted Sequencing	Περίπλοκη προετοιμασία βιβλιοθήκης.	Εύχρηστη προετοιμασία βιβλιοθήκης.
	Κατάλληλο για αλληλούχιση αμπλικονίων και έλεγχο κλώνων (clone checking).	Κατάλληλο για αλληλούχιση αμπλικονίων και έλεγχο κλώνων (clone checking).
	Η διαδικασία πραγματοποιείται από μερικές ημέρες έως εβδομάδες, αναλόγως του μεγέθους του γονιδιώματος.	Ολοκληρώνεται εντός ωρών.

Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι το NGS παρά τη δυναμική που παρουσιάζει ως μια φθηνή και ταχεία μέθοδος σε σχέση με την παραδοσιακή αλληλούχιση κατά Sanger, εμφανίζει και περιορισμούς οι οποίοι πιθανά στο μέλλον να αντιμετωπισθούν επιτυχώς. Παράδειγμα τέτοιων περιορισμών αποτελεί η χρονοβόρα ανάλυση των δεδομένων που προκύπτουν από το NGS, η οποία απαιτεί επαρκή γνώση βιοπληροφορικής ώστε να «εξορυχθεί» ακριβής και χρήσιμη πληροφορία. Τα βήματα ανάλυσης μέσω της βιοπληροφορικής αποτελούν ένα μεγάλο ζήτημα όσον αφορά την εφαρμογή της τεχνολογίας NGS (Daber *et al.*, 2014).

Κάτωθι αναφέρονται οι πλατφόρμες NGS που χρησιμοποιούνται ευρέως καθώς και η βασική αρχή λειτουργίας τους:

- **Illumina Sequencing:** Η πλατφόρμα της Illumina αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες πλατφόρμες που χρησιμοποιούνται στο NGS. Η συγκεκριμένη τεχνολογία παράγει διαβάσματα (reads) μήκους 50-300 bp. Σχετικά μακρά τμήματα από τη βιβλιοθήκη των εκμαγείων συνδέονται μέσω ligation με γενικούς προσαρμογείς (generic adaptors). Έπειτα, αυτά τα τμήματα προσκολλούνται σε ένα γυάλινο πλακίδιο. Στο επόμενο στάδιο, διεξάγεται μια PCR με σκοπό την ενίσχυση (solid-phase bridge amplification) και τη δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων μιας αλληλουχίας-read. Αργότερα, τα ενισχυμένα αντίγραφα των αλληλουχιών-reads διαχωρίζονται σε μονούς κλώνους, οι οποίοι και θα αλληλουχηθούν. Στη συνέχεια, το πλακίδιο «πλημμυρίζεται» με σημασμένα με φθορίζοντα μόρια νουκλεοτίδια και DNA πολυμεράση. Κάθε ένα νουκλεοτίδιο έχει ένα μοναδικό χρώμα το οποίο το καθορίζει. Η παρουσία terminators εξασφαλίζει ότι μόνο μια βάση προστίθεται κάθε φορά. Το φθορίζον σήμα καταγράφεται υπό μορφή εικόνας, δεικνύοντας ποιά βάση έχει προστεθεί. Σε αυτό το στάδιο, το πλακίδιο

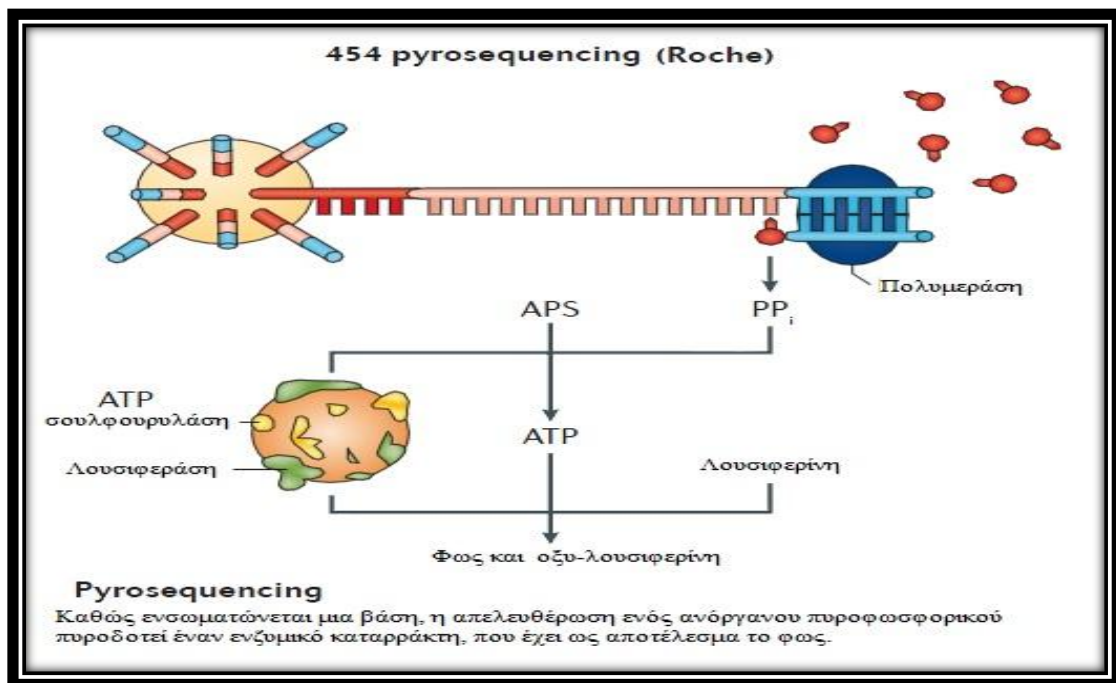
ετοιμάζεται για τον επόμενο κύκλο. Οι terminators απομακρύνονται, επιτρέποντας στην επόμενη βάση να προστεθεί κατά την διαδικασία. Ταυτόχρονα, το φθορίζον σήμα αφαιρείται, προκειμένου να αποφευχθούν μελλοντικές επιμολύνσεις των σημάτων. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με την προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου την φορά και της διαδικασία απεικόνισης στο ενδιάμεσο. Κάνοντας χρήση υπολογιστή, οι βάσεις ανιχνεύονται σε κάθε περιοχή και δομείται η εξεταζόμενη αλληλουχία (Khalid and Sabahuddin, 2016).



Εικ.1.10. Γραφική απεικόνιση του solid-phase bridge amplification και της δημιουργίας Cluster. (Ανατύπωση από Goodwin *et al.*, 2016)

- 454 Pyrosequencing (Roche): Το πρώτο όργανο NGS το οποίο αναπτύχθηκε ήταν η συσκευή 454 Pyrosequencing (Margulies *et al.*, 2005). Έχει την ιδιότητα να αλληλουχεί αρκετά μεγαλύτερα τμήματα εν συγκρίσει με την Illumina. Η βασική αρχή της είναι ίδια με της Illumina, όπου τα οπτικά σήματα διαβάονται με την προσθήκη των βάσεων. Παρά του ότι η αλληλούχιση με 454 εμπεριέχει την θραυσματοποίηση (fragmentation) του DNA ή RNA, σε αυτή την περίπτωση, η θραυσματοποίηση οδηγεί σε διαβάσματα (reads) 1 kb σε μήκος. Κατά την διαδικασία της ενίσχυσης της

βιβλιοθήκης, τα τμήματα-θραύσματα προσδένονται σε μικροσφαιρίδια (microbeads). Με τη διαδικασία της PCR τα τμήματα αυτά ενισχύονται. Το δείγμα φορτώνεται σε πλακίδιο (PicoTiterPlate) με κελιά που υποδέχονται τα μικροσφαιρίδια, τα οποία περιέχουν επίσης DNA πολυμεράση και διαλύματα αλληλούχισης (sequencing buffers). Στο επόμενο στάδιο, το πλακίδιο «πλημμυρίζεται» με κάθε ένα από τα τέσσερα νουκλεοτίδια. Η προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου παράγει ένα οπτικό σήμα. Οι θέσεις των σημάτων προσδιορίζουν το σφαιρίδιο στο οποίο προστίθενται τα νουκλεοτίδια. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μετά την έκλυση του mix. Η πλατφόρμα 454 παράγει γραφήματα για κάθε διάβασμα αλληλουχίας, το οποίο αντανακλά την πυκνότητα του σήματος για κάθε πλύση νουκλεοτιδίου. Μέσω υπολογιστικής προσέγγισης, η πυκνότητα των σημάτων σε κάθε πλύση οδηγεί στην ανάκτηση της αλληλουχίας (Khalid and Sabahuddin, 2016).

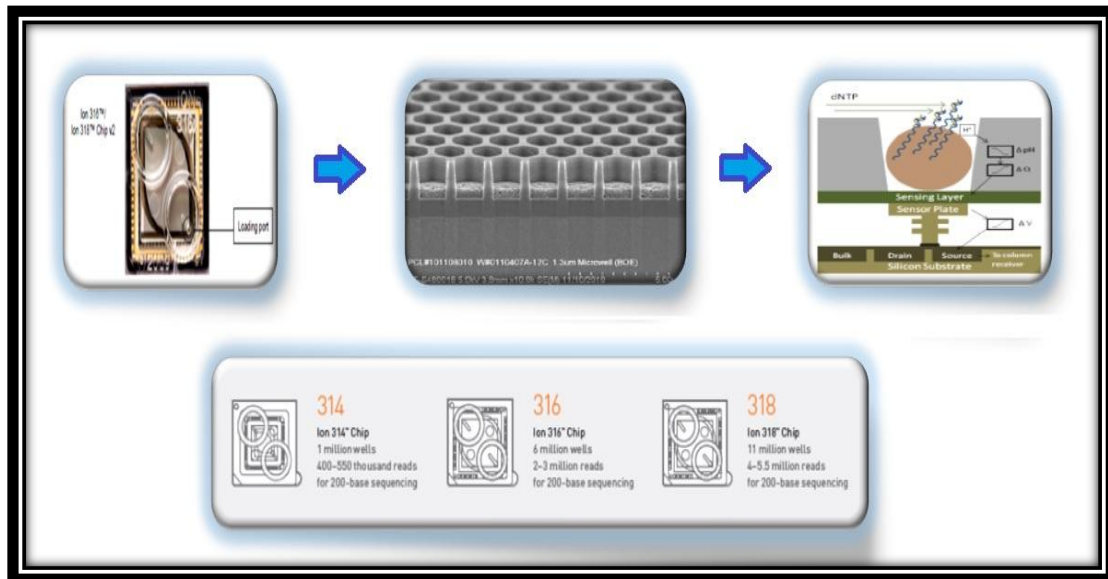


Εικ.1.11. Γραφική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας της πλατφόρμας 454 Pyrosequencing (Roche). (Ανατύπωση από Goodwin *et al.*, 2016)

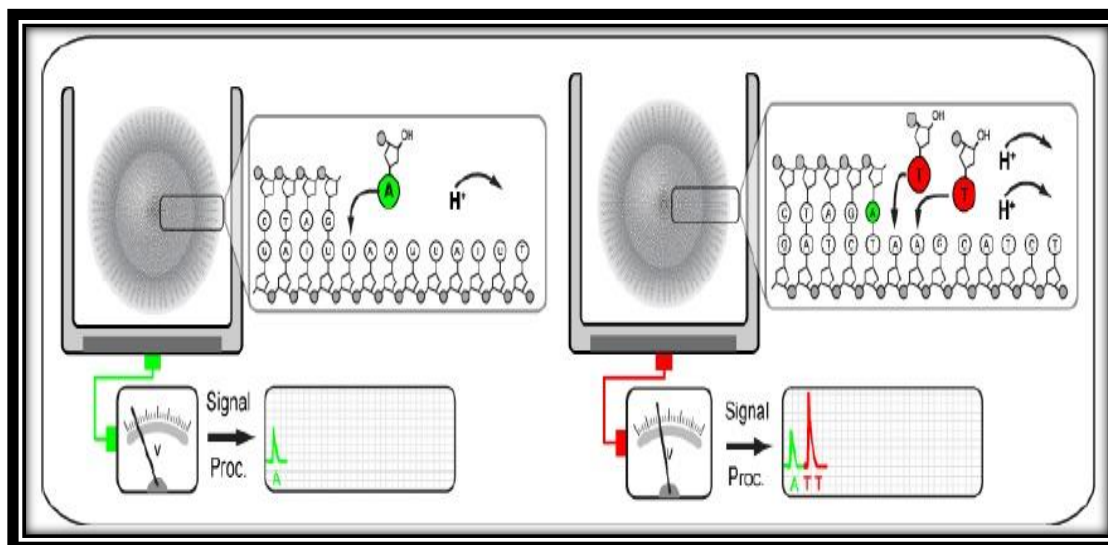
- **Ion Torrent PGM:** Οι πλατφόρμες αλληλούχισης της Ion Torrent έκαναν το ντεμπούτο τους το 2011 (Rothberg *et al.*, 2011), ακολουθώντας μια τελείως διαφορετική φιλοσοφία αλληλούχισης από αυτή της Illumina και της 454 Pyrosequencing (Roche) καθώς δεν γίνεται χρήση οπτικών σημάτων. Γίνεται

χρήση «φυσικής χημείας», όπου η προσθήκη ενός dNTP στο DNA πολυμερές απελευθερώνει ένα H^+ . Δημιουργούνται εκμαγεία που φέρουν ειδικούς προσαρμογείς (adaptors) και μοναδικούς κωδικούς για κάθε δείγμα. Το εκμαγείο του DNA ή RNA που χρησιμοποιείται είναι μεγέθους ~200 bp. Μέσω μιας PCR γαλακτώματος (emulsion PCR) πραγματοποιείται η ενίσχυση της βιβλιοθήκης των δημιουργημένων εκμαγείων. Η ενισχυμένη και εμπλουτισμένη βιβλιοθήκη, που αποτελείται από σφαιρίδια που ιδανικά φέρουν έναν κλώνο, φορτώνονται σε ένα ειδικό chip στο οποίο μέσω της πλατφόρμας θα πραγματοποιηθεί η αλληλούχιση εντός των πολυάριθμων κελιών που χαρακτηρίζουν κάθε τύπο chip. Για την πλατφόρμα Ion Torrent PGM είναι διαθέσιμα τρία chip (314, 316 και 318) με διαφορετικά τεχνικά χαρακτηριστικά, που προσδίδουν στον ερευνητή την δυνατότητα να επιλέξει το εύρος της δυναμικής της αλληλούχισης που επιθυμεί, κάτι το οποίο εκφράζεται με την ρήση της εταιρείας: “The chip is the machine”. Κατά τη διαδικασία της αλληλούχισης, όπως στην περίπτωση του 454 Pyrosequencing (Roche), το chip «πλημμυρίζεται» με ένα τύπο dNTP, μαζί με ρυθμιστικά διαλύματα. Η πολυμεράση προσδένεται σε ξεχωριστό βήμα πριν την τοποθέτηση του chip στην πλατφόρμα. Το H^+ που απελευθερώνεται με την προσθήκη του dNTP στο DNA πολυμερές οδηγεί στην μείωση του pH (Khalid and Sabahuddin, 2016). Οι μεταβολές του pH ανιχνεύονται και καταγράφονται από κάθε κελί μέσω ενός ολοκληρωμένου CMOS (Complementary Metal-Oxide Semiconductor) και ενός ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor), το οποίο επιτρέπει τον καθορισμό των βάσεων καθώς και τον αριθμό τους σε αυτό το κελί. Η μεταβολή του pH που ανιχνεύεται από τον αισθητήρα είναι ατελώς ανάλογη ως προς τον αριθμό των ανιχνευόμενων νουκλεοτιδίων, επιτρέποντας περιορισμένη ακρίβεια στις μετρήσεις μηκών ομοπολυμερών (homopolymers) (Goodwin *et al.*, 2016). Το πρόβλημα των ομοπολυμερών εντοπίζεται και στην 454 Pyrosequencing (Roche) και εκδηλώνεται ως ψευδείς προσθήκες ή ελλείψεις (indels) (Meldrum *et al.*, 2011). Η κατάλληλη υπολογιστική προσέγγιση μέσω της βελτίωσης των παρεχόμενων αλγορίθμων επεξεργασίας των δεδομένων, όπως αποτελεί το Torrent Suite, είναι ικανή να μεγιστοποιήσει τόσο την ευαισθησία όσο και την ειδικότητα στο επίπεδο της μιας βάσης, ανοίγοντας το δρόμο για τη χρήση της

τεχνολογίας με ασφάλεια σε μελλοντικά κλινικά γενετικά τεστ (Yeo *et al.*, 2014). [Αναλυτική περιγραφή του τρόπου λειτουργίας της πλατφόρμας Ion Torrent PGM εμπεριέχεται στο Κεφάλαιο: Υλικά και Μέθοδοι.]



Εικ.1.12. Απεικόνιση του chip (αριστερά), των πολυάριθμων κελιών που το αποτελούν (κέντρο) και της δομής του κελιού (γραφική απεικόνιση δεξιά). Γραφική απεικόνιση των τριών διαθέσιμων chip για την πλατφόρμα Ion Torrent PGM. (Ανατύπωση από Rothberg *et al.*, 2011 και ThermoFisher Scientific Inc, 2014)

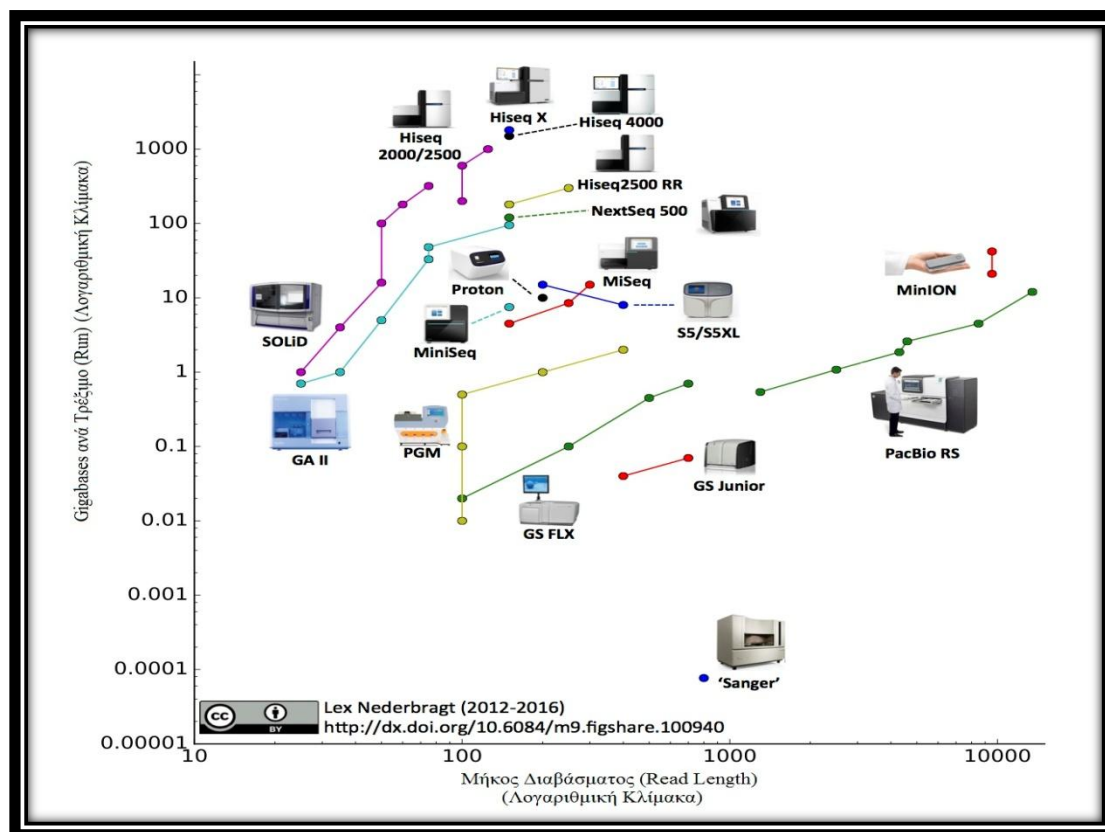


Εικ.1.13. Γραφική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας των πλατφόρμων Ion Torrent. (Ανατύπωση από Rothberg *et al.*, 2011)

Η τελευταία λέξη της τεχνολογίας στον τομέα του Sequencing ήρθε με την άφιξη της λεγόμενης τρίτης γενιάς τεχνολογιών αλληλούχισης (Third Generation Sequencing ή Single-Molecule Sequencing Technologies), όπου εν αντιθέσει με της δευτέρας γενιάς αλληλουχητών που μπορούν να διαβάσουν μικρά τμήματα μήκους μερικών εκατοντάδων βάσεων, οι αλληλουχητές τρίτης γενιάς μπορούν να διαβάσουν πάνω από 10,000 bp η να χαρτογραφήσουν μόρια πάνω από 100,000 bp. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι αυτής της γενιάς αποτελούν:

- Pacific Biosciences (PacBio) Single Molecule Real Time (SMRT) Sequencing
- Illumina Tru-seq Synthetic Long-Read Technology
- Oxford Nanopore Technologies Sequencing Platform (Lee *et al.*, 2016).

Χαρακτηριστικό είναι ότι η πρώτη αλληλούχιση που πραγματοποιήθηκε στο διάστημα, το καλοκαίρι του 2016 από τη μοριακή βιολόγο Kate Rubins, έκανε χρήση της τεχνολογίας MiniON της Oxford Nanopore Technologies (http://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/news/dna_sequencing, 2016).

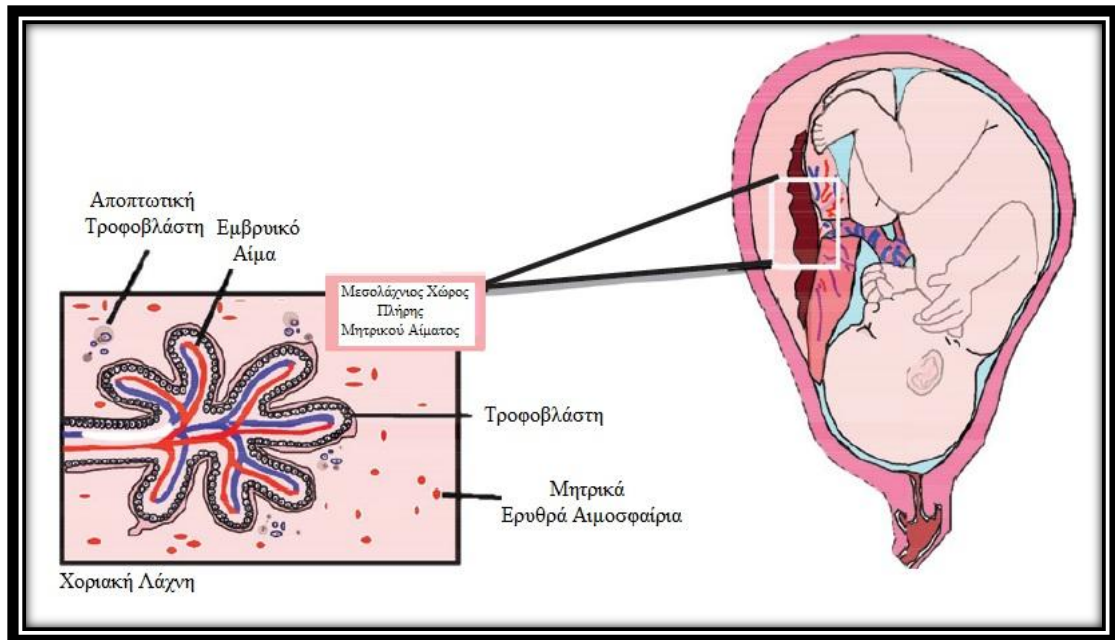


Εικ.1.14. Απεικόνιση της ανάπτυξης του Sequencing Υψηλής Απόδοσης (High-Throughput Sequencing) (Ανατύπωση από Nederbragt, 2016)

1.9 Μη Επεμβατική Προγεννητική Διάγνωση (NIPD: Non Invasive Prenatal Diagnosis)

Τα τελευταία χρόνια, η μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση (NIPD: Non Invasive Prenatal Diagnosis) έχει βρει ένα νέο πεδίο εφαρμογής, αυτό της διάγνωσης μονογονιδιακών ασθενειών για πατρικώς κληρονομούμενες μεταλλάξεις (Chan, 2014). Η διάγνωση μέσω NIPD αποτελεί μια ασφαλή εναλλακτική επιλογή προγεννητικής διάγνωσης εν αντιθέσει με τις επεμβατικές μεθόδους, όπως η λήψη χοριακών λαχνών που πραγματοποιείται στη 10^η-15^η εβδομάδα κύησης ή της αμνιοπαρακέντησης που πραγματοποιείται την 16^η εβδομάδα κύησης και έπειτα (Gil *et al.*, 2014), οι οποίες συνοδεύονται από ένα σημαντικό ρίσκο αποβολής (0.5%-1%) (Mujezinovic and Alfirevic, 2007). Πρέπει να σημειωθεί ότι σε πολλές χώρες δεν υπάρχουν εθνικές κατευθυντήριες γραμμές για το εφαρμοζόμενο screening και οι μεμονωμένοι επαγγελματίες προσφέρουν μια ποικιλία μεθόδων διάγνωσης για το πρώτο και/ή το δεύτερο τρίμηνο συχνά καθοδηγούμενοι από τις δυνάμεις της αγοράς και τους κανόνες της προσφοράς και ζήτησης. Σε ορισμένα μέρη της Ευρώπης, το ποσοστό της εφαρμογής των επεμβατικών μεθόδων υπερβαίνει το 20% (CeDAP, 2008).

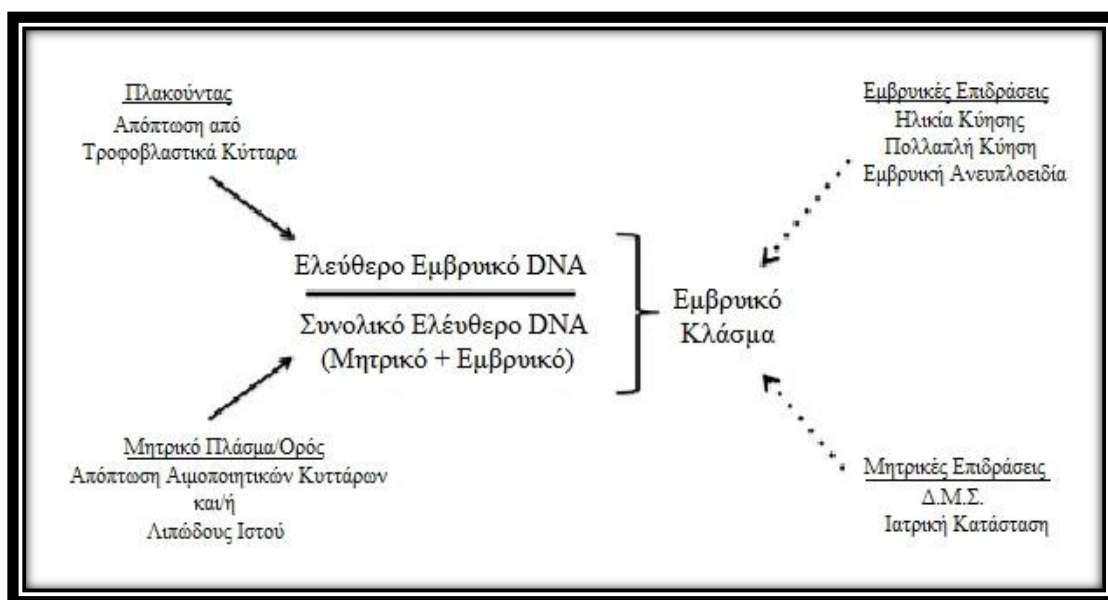
Η εκτίμηση της γενετικής κατάστασης του εμβρύου με τη χρήση του εμβρυικού DNA μέσω μη επεμβατικών μεθόδων παρέμενε ένα όνειρο για πολλά χρόνια (Boon and Faas, 2013). Το 1997, ο Dennis Lo και οι συνεργάτες του για πρώτη φορά ανέφεραν την παρουσία του κυκλοφορούντος ελεύθερου από κύτταρα εμβρυικού DNA (ccffDNA: circulating cell-free fetal DNA) εντός του μητρικού πλάσματος και του ορού (Lo *et al.*, 1997). Ο κύριος μηχανισμός που ελέγχει την απελευθέρωση του στην κυκλοφορία της μητέρας θεωρείται ότι είναι η απόπτωση (Taglauer *et al.*, 2014). Το ccffDNA μπορεί να ανιχνευθεί από την 5^η εβδομάδα κύησης (Honda *et al.*, 2002) και η κύρια πηγή προέλευσης του είναι ο πλακούντας (Alberry *et al.*, 2007).



Εικ.1.15. Γραφική απεικόνιση της προέλευσης του cffDNA. (Ανατύπωση από Kotsopoulou *et al.*, 2015)

Το cffDNA αποτελείται από μικρά τμήματα DNA κυρίως μικρότερα από 200 bp (Chan *et al.*, 2004) και αντιπροσωπεύει ένα μεσαίο υπο-κλάσμα της τάξεως του 9.7%, 9.0% και 20.4% του συνολικού ελεύθερου DNA (cell-free DNA) που είναι παρών στο μητρικό πλάσμα ή ορό το πρώτο, δεύτερο και τρίτο τρίμηνο αντιστοίχως (Lun *et al.*, 2008). Το κλάσμα του cffDNA μπορεί να πάρει τιμές από 2% έως και 40%, με ένα μέσο όρο 10% του συνολικού ελεύθερου DNA να χαρακτηρίζει τις διάφορες ηλικίες κύησης (Ehrich *et al.*, 2011). Συγκεκριμένα, στις 10 εβδομάδες κύησης το μέσο κλάσμα cffDNA ήταν 10.2% και τα επίπεδα του αύξαναν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, με μια αρχική αύξηση του 0.1% ανά εβδομάδα για τη 10^η έως και την 20^η εβδομάδα, ακολουθούμενη έπειτα από μια τάχιστη αύξηση του 1% ανά εβδομάδα μετά την 21^η εβδομάδα κύησης έως και το τέλος της (Barra *et al.*, 2014). Με τη γέννηση, το cffDNA απομακρύνεται ταχέως από την κυκλοφορία της μητέρας με μέσο χρόνο ημιζωής (half-life) περίπου 16 min (Lo *et al.*, 1999). Με τη χρήση ειδικής εμβρυικής γονιδιακής αλληλουχίας, της *SRY* στα άρρενα έμβρυα, εντοπίστηκε ότι τα τμήματα του εμβρυικού DNA είναι μικρότερα από τα τμήματα του ελεύθερου DNA της μητέρας. Συγκεκριμένα, τα τμήματα του cffDNA εντοπίζονται κάτω από 313 bp (Chan *et al.*, 2004). Τα εν λόγω τμήματα υπάρχουν σε μεγαλύτερο ποσοστό σε μεγέθη <150 bp και σπανίως εντοπίζονται μεγαλύτερα από

250 bp (Fan *et al.*, 2010). Τόσο το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA, όσο και το μητρικό DNA τείνουν να παρουσιάζουν μια σειρά από κορυφές όσον αφορά τις κατανομές τους βάσει μεγέθους. Συγκεκριμένα, συμπεριλαμβανομένου της κύριας κορυφής που εντοπίζεται στα 166 bp, παρουσιάζεται μια μικρότερη κορυφή στις 143 bp και μια περιοδικότητα 10 bp κάτω από τις 143 bp (Lo *et al.*, 2010). Χαρακτηριστική όμως διαφορά μεταξύ του εμβρυϊκού και του μητρικού DNA στο μητρικό πλάσμα είναι ότι το εμβρυϊκό DNA εμφανίζει μειωμένο ποσοστό των μορίων 166 bp και ένα αυξημένο ποσοστό των μορίων κάτω από 150 bp (Lo *et al.*, 2010).



Εικ.1.16. Απεικόνιση της σχέσεως που αποδίδει το εμβρυϊκό κλάσμα και αναφορά στην προέλευση και στις εμβρυϊκές και μητρικές επιδράσεις σε αυτό. (Ανατύπωση από Taglaouer *et al.*, 2014)

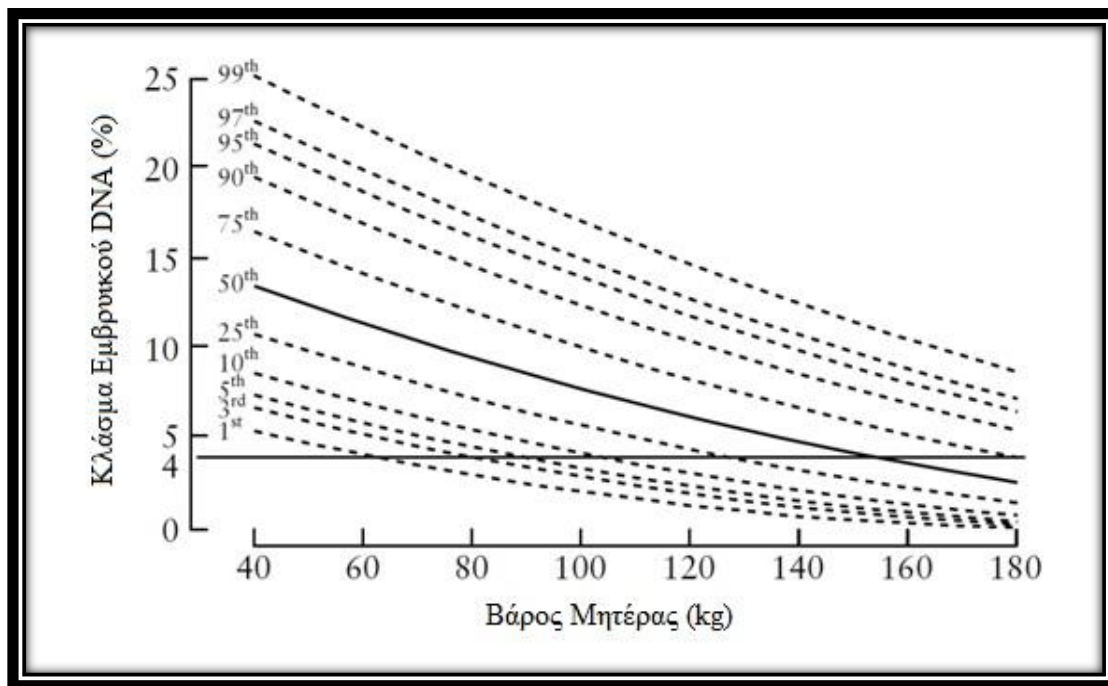
Το κλάσμα του cfDNA τείνει να επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες. Χαρακτηριστικοί παράγοντες που συσχετίζονται με την μείωση του είναι:

- Ο αυξημένος Δείκτης Μάζας Σώματος (Δ.Μ.Σ.)
- Η Αφρο-Καραϊβική καταγωγή.

Χαρακτηριστικοί παράγοντες που συσχετίζονται με την αύξηση του είναι:

- Το εμβρυϊκό κεφαλουραίο μήκος
- Η πρωτεΐνη PAPP-A
- Η ελεύθερη β-HCG

- Το κάπνισμα
- Η παρουσία Τρισωμίας 21 (Σύνδρομο Down) (Ashoor *et al.*, 2013).



Εικ.1.17. Γραφική απεικόνιση που συσχετίζει το κλάσμα του εμβρυικού DNA με το βάρος της μητέρας. (Ανατύπωση από Ashoor *et al.*, 2013)

Το cfDNA αποτελεί έναν ιδανικό στόχο για το NIPD, αλλά η ανίχνευση του παραμένει πολύ δύσκολη λόγω της υπεροχής του μητρικού κυκλοφορούντος ελεύθερου DNA (maternal cell-free DNA) καθώς και λόγω εγγενών περιορισμών των μοριακών μεθόδων. Το NIPD εξαρτάται από την επαρκή ενίσχυση του cfDNA και ως εκ τούτου οποιαδήποτε κλινικά εφαρμόσιμη προσέγγιση απαιτεί την χρήση ποιοτικού ελέγχου για την επιβεβαίωση της παρουσίας του στο προς μελέτη δείγμα (Guissart *et al.*, 2015). Το NIPD παραμένει μια πρόκληση σε τεχνικό επίπεδο για την εφαρμογή του στη διάγνωση αυτοσωμικών υπολειπόμενων διαταραχών. Καθώς τα μητρικώς κληρονομούμενα αλληλόμορφα του εμβρύου είναι γενετικά πανομοιότυπα με το μητρικό DNA, η κληρονόμηση του εμβρύου μιας μητρικής μετάλλαξης δεν μπορεί να βασίζεται σε απλή ανίχνευση της στο μητρικό πλάσμα. Ως εκ τούτου, το NIPD στηρίζεται στον αποκλεισμό της νόσου σε ζευγάρια που φέρουν μη πανομοιότυπες μεταλλαγές (Guissart *et al.*, 2015). Μια πρόταση για επίλυση του συγκεκριμένου περιορισμού είναι η χρήση της μεθόδου RHDO (Relative Haplotype

Dosage Analysis) όπου γίνεται χρήση απλοτύπων και πληροφοριακών SNPs (Lam *et al.*, 2012).

Αρκετές μεθοδολογικές προσεγγίσεις έχουν αναπτυχθεί για εφαρμογή του NIPD σε μονογονιδιακές διαταραχές. Για την ανίχνευση αλληλομόρφων που δεν υπάρχουν στο μητρικό γονιδίωμα, οι περισσότερες μέθοδοι βασίζονται στην ανίχνευση μιας αντικατάστασης βάσεως, μιας ένθεσης ή έλλειψης και μπορεί να γίνει χρήση ανιχνευτή (probe) ή εκκινητή (primer), κάνοντας χρήση της μεθόδου PCR για να παραχθεί ένα συγκεκριμένο αμπλικόνιο. Η διάκριση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου έναντι του φυσικού-wild type αλληλομόρφου μπορεί να βασίζεται στο μήκος των τμημάτων, στην ανίχνευση φθορισμού μέσω της ενσωμάτωσης διαφόρων φθορίζοντων ουσιών ή με άμεση αλληλούχιση DNA του PCR αμπλικονίου (Guissart *et al.*, 2015).

1.9.1 Μέθοδοι Προσομοίωσης του Ελεύθερου Εμβρυικού DNA

Το ελεύθερο εμβρυικό DNA (cffDNA) μπορεί να προσομοιωθεί μέσω της μίμησης των βασικών του χαρακτηριστικών τα οποία είναι το μικρό μήκος του σε σχέση με το μητρικό και οι αναλογίες που αντιπροσωπεύει το εμβρυικό έναντι του μητρικού στο πλάσμα της μητέρας. Βιβλιογραφικά αναφέρονται δύο τρόποι που μπορούν να οδηγήσουν στην προσομοίωση του cffDNA, το οποίο αναφέρεται και ως Artificial cffDNA, οι οποίοι είναι οι εξής:

- Χρήση Υπερήχων (Sonication): Γίνεται χρήση υπερήχων για θραύση του DNA δύο ατόμων, ώστε να ληφθούν τμήματα που θα προσομοιώνουν σε μέγεθος το ελεύθερο εμβρυικό και το ελεύθερο μητρικό DNA (π.χ. το DNA που προσομοιώνει το εμβρυικό είναι συνήθως άρρενος και θραυσματοποιείται σε ~200 bp όπου τα τμήματα που είναι μικρότερα από 100 bp απομακρύνονται (Srinivasan *et al.*, 2013) ή σε μέσο όρο 150 bp (με εύρος 50-400 bp) και το DNA που προσομοιώνει το μητρικό θραυσματοποιείται σε ~800 bp (με εύρος 100-1600 bp) (Holmberg *et al.*, 2013).
- Πέψη με MNase (micrococcal nuclease): Σε μια προσπάθεια μίμησης του ενδογενούς μηχανισμού παραγωγής ελεύθερου DNA που λαμβάνει χώρα

λόγω της απόπτωσης, γίνεται χρήση μιας μικρόκοκκης νουκλεάσης (MNase), η οποία έχει μια παρόμοια βιοχημική δραστηριότητα με τις ενδογενείς νουκλεάσες, δρώντας μεταξύ των νουκλεοσωμάτων. Η πέψη με τη χρήση MNase δημιουργεί τμήματα των οποίων το μήκος αντιπροσωπεύει πιο πιστά το φυσικό ελεύθερο DNA από αυτό που προκύπτει από τη χρήση των υπερήχων (Babiarz *et al.*, 2015).

Η σύνθεση της αναλογίας των μορίων ποικίλει, αλλά εντοπίζεται πάντα κοντά στο 10% (π.χ. 5% και 10% w/w σύμφωνα με Srinivasan *et al.*, 2013 και 3%, 6%, 9% και 12% σύμφωνα με Babiarz *et al.*, 2015).

1.10 Η Γενετική Συμβουλευτική στην Εποχή του NGS και Βιοηθικοί Προβληματισμοί

Κάθε γονιδίωμα το οποίο αλληλουχείται είναι ετερόζυγο για 50-100 αλληλόμορφα τα οποία κατηγοριοποιούνται βάσει της Human Gene Mutation Database (HMGD) ως πηγή πρόκλησης κληρονομούμενων διαταραχών και συχνά παρουσιάζονται επιπλέον νέα αλληλόμορφα σε ομόζυγη ή ετερόζυγη κατάσταση σε γονίδια που εμπλέκονται σε Μενδελικές ασθένειες. Εν ολίγοις, όποια και αν είναι η πιθανολογούμενη γενετική ασθένεια που διερευνάται, και ακόμα και αν η μετάλλαξη που την προκαλεί εντοπιστεί βάσει πειστικών στοιχείων, θα παραχθούν και πληροφορίες σχετικά με έναν μεγάλο αριθμό άλλων γενετικών αλληλομόρφων, άσχετα με τη προς διερεύνηση ασθένεια, που είναι γνωστό ή υπάρχουν υπόνοιες ότι είναι παθογόνα και μπορεί να προσδίδουν κίνδυνο στο μέλλον. Επιπλέον, πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι πάντοτε υπάρχει πιθανότητα για γονοτυπικά λάθη (genotyping errors), καθώς και ότι μερικές από τις «παθογόνες» μεταλλάξεις θα έχουν χαρακτηριστεί εσφαλμένα ως αίτιο της νόσου. Πράγματι, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το 27% μιας ευρείας επιλογής των καταχωρήσεων στην HMGD ήταν στην πραγματικότητα πολυμορφισμοί ή λανθασμένα χαρακτηρισμένες (misannotated) (Bell *et al.*, 2011).

Για τους άνωθεν αναφερόμενους λόγους, ο κάθε ασθενής ο οποίος δίνει τη συγκατάθεση του για τη χρήση NGS πρέπει να ενημερώνεται προσεκτικά σχετικά με τις δυνατότητες της τεχνολογίας, οι οποίες μπορεί να σχετίζονται με την αποκάλυψη πληροφοριών που αφορούν τον κίνδυνο μελλοντικών ασθενειών, καθώς και το πώς

διαχειρίζεται αυτή η πληροφορία. Αυτά τα ζητήματα δεν έχουν τεθεί σε εκτεταμένο έλεγχο στην κλινική διαγνωστική «αρένα», αν και οι απαραίτητες μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη. Ωστόσο, μια έρευνα που αφορούσε την ταχεία υιοθέτηση της τεχνολογίας του NGS κατέστησε αναγκαία την προσεκτική εξέταση βασικών ερωτημάτων. Τι πληροφορίες και τι σχόλια πρέπει να λάβει κάποιος που υπόκειται στην εξέταση περιεχομένου του γονιδιώματος του; Έχει ο ερευνητής την υποχρέωση να διερευνήσει για δυνητικά κλινικώς σχετικά ευρήματα σε κάθε γονιδίωμα; Αν εντοπίζονται κάποια ευρήματα πρέπει ο ερευνητής να τα αναφέρει; Τι συνιστά την εν επιγνώσει συναίνεση στους συμμετέχοντες στην έρευνα; Σε ποιόν «ανήκουν» τα δεδομένα NGS και ποιοι θα πρέπει να έχουν πρόσβαση σε αυτά; (Raffan and Semple, 2011).

Αποτελεί το NIPD μια επίφαση και μια συγκάλυψη για τη σύγχρονη ευγονική; (Leach, 2011) Η υιοθέτηση της διακοπής της κύησης εμβρύων που είναι φορείς ανιάτων ασθενειών μπορεί σε ένα δικτατορικό καθεστώς να οδηγήσει σε μαζικές εκκαθαρίσεις, προκειμένου να αποφευχθεί η οικονομική επιβάρυνση την οποία συνεπάγεται η υποστήριξη των ανθρώπων που θα προέλθουν από τα έμβρυα αυτά. Το πώς, ωστόσο, θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί ο εφιάλτης αυτός είναι ζήτημα όχι της επιστήμης, αλλά της κοινωνίας. Η τελευταία αυτή, ορισμένως, οφείλει εκλαμβάνοντας τον κίνδυνο αυτόν ως μια προειδοποίηση, να φροντίσει να οργανωθεί κατά τέτοιο τρόπο και να καταστήσει τους πολίτες της σε τόσο βαθμό ευαίσθητους, ώστε να αποκλεισθεί η εκτροπή της σε δικτατορικές μορφές διακυβέρνησης τους. Δεδομένου ότι στην ιστορία εξέχουσες προσωπικότητες όπως ο Πασκάλ ή ο Μότσαρτ, κατόρθωσαν, αν και η ζωή τους υπήρξε σύντομη, να παραγάγουν σημαντικό έργο, εύλογα υπάρχει λοιπόν η υποψία μήπως η διακοπή της κύησης ενός εμβρύου, με το αιτιολογικό ότι εξαιτίας μιας αγιάτρευτης πάθησης του δεν πρόκειται μετά την είσοδο του στον κόσμο να ζήσει πολύ, αφαιρέσει από το πρόσωπο που αναμένεται να γεννηθεί την δυνατότητα να παραγάγει αξιόλογο έργο, το οποίο, σε τελευταία ανάλυση, θα στερηθεί η ανθρωπότητα. Έχει, όμως, το ηθικό δικαίωμα να στερήσει κανείς από την ανθρωπότητα την δυνατότητα να γίνει καλύτερη; (Πελεγρίνης, 2009)

Σκοπός της Μελέτης

Ο σκοπός της εν λόγω διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση των γενετικών νοσημάτων και ιδιαιτέρως της νόσου της Κυστικής Ίνωσης με μια τεχνολογία αλληλούχισης DNA επόμενης γενιάς (NGS: Next Generation Sequencing). Η ανάδειξη νέων ευρημάτων και η ανίχνευση συχνότητας ήδη καταγεγραμμένων σε βιβλιογραφικά δεδομένα αλλαγών πραγματοποιήθηκε με την χρήση ενός εμπορικού panel που στοχεύει στο γονίδιο *CFTR* μέσω της πλατφόρμας Ion Torrent PGM. Εφαρμόστηκε μια *in silico* προσέγγιση για τα νέα ευρήματα, αποδίδοντας τους έναν πρώτο χαρακτηρισμό τους είτε ως μεταλλάξεις είτε ως πολυμορφισμοί. Επίσης, πραγματοποιήθηκε προσομοίωση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο πλάσμα εγκυμονούσης σε ποσοστά 10%, 6% και 3% με σκοπό την διερεύνηση των δυνατοτήτων ανίχνευσης των μεταλλαγών, αποτελώντας ένα από τα πρώτα βήματα για ανάπτυξη in-house NIPD.

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικό της Μελέτης

Το υλικό το οποίο χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μπορεί να χωριστεί σε δύο κατηγορίες:

α) Γενομικό DNA που απομονώθηκε από περιφερικό αίμα από δείγματα εξεταζομένων (άρρενες και θήλεις, που ανήκουν στην ενήλικη αναπαραγωγική ηλικιακή κλάση) οι οποίοι προσήλθαν στα εργαστήρια του πρότυπου Κέντρου Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρογενετικής «EUROGENETICA A.E.». Οι εξετάσεις πραγματοποιήθηκαν κατόπιν ιατρικής παραπομπής του εκάστοτε εξεταζομένου για μοριακό έλεγχο Κυστικής Ίνωσης με Αλληλούχιση Νέας Γενιάς (NGS) για πραγματοποίηση προληπτικής εξέτασης στα πλαίσια προγεννητικού ελέγχου σε προσπάθειες τεκνοποίησης ή τρέχουσας εγκυμοσύνης είτε σε περιπτώσεις δοτριών ωαρίων. Η εν λόγω κατηγορία αριθμούσε 692 δείγματα.

β) Γενομικό DNA από τρία επιλεγμένα δείγματα που ανήκουν στην πρώτη κατηγορία με εσωτερικούς κωδικούς: 82598, 82601 και ELE, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως αρχικό υλικό για την προσομοίωση ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο πλάσμα της μητέρας. Ως εμβρυϊκό DNA θεωρήθηκε το δείγμα ELE, το οποίο έφερε την παθολόγο μεταλλαγή F508del καθώς και επτά (7) πολυμορφισμούς. Τα δείγματα 82598 και 82601 αντιπροσώπευαν το μητρικό DNA. Το δείγμα 82598 έφερε την παθολόγο μεταλλαγή F508del καθώς και έξι (6) πολυμορφισμούς, ενώ το δείγμα 82601 δεν έφερε κάποιο πολυμορφικό εύρημα ή μεταλλαγή.

Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν οι εξής προσομοιώσεις ελεύθερου εμβρυϊκού DNA:

- i. 82598-ELE και 82601-ELE σε ποσοστό 90%-10%.
- ii. 82601-ELE σε ποσοστό 94%-6% και 97%-3%.

2.2 Μεθοδολογία

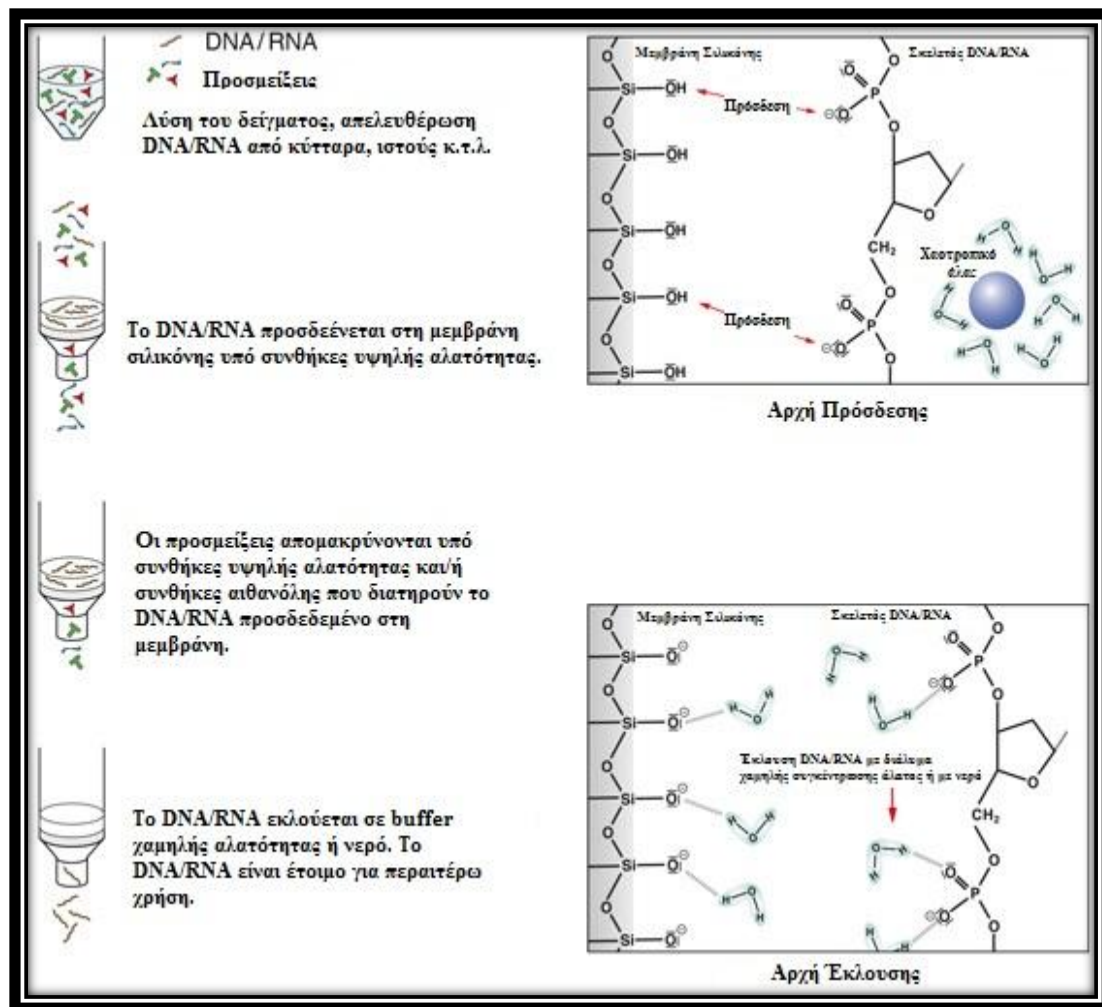
2.2.1 Πρωτόκολλο Απομόνωσης Γενωμικού DNA

Κατόπιν της αιμοληπτικής διαδικασίας των εξεταζομένων όπου έχει γίνει λήψη περιφερικού αίματος σε σωληνάριο αιμοληψίας EDTA πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του γενωμικού DNA από λευκά αιμοσφαίρια με τη χρήση του NucleoSpin[®] Blood Kit της εταιρείας MACHEREY-NAGEL. Συγκεκριμένα, το πρωτόκολλο είναι το εξής:

- Προετοιμασία υδατόλουτρου στους 70 °C.
- Τοποθέτηση του Elution Buffer BE στους 70 °C.
- Λύση δείγματος αίματος:
 - Προσθήκη 200 μ L αίματος σε Eppendorf[®] σωλήνα των 1.5 ml.
 - Προσθήκη 20 μ L Proteinase K.
 - Προσθήκη 200 μ L Buffer B3 και καλή ανάδευση με τη χρήση vortex για 10-20 s.
 - Επάωση των δειγμάτων στους 70 °C για 10-15 min.
- Προσαρμογή των συνθηκών πρόσδεσης του DNA στη μεμβράνη σιλικόνης της στήλης NucleoSpin[®] Blood:
 - Προσθήκη 210 μ L αιθανόλης (96-100%) στο δείγμα και καλή ανάδευση με τη χρήση vortex.
- Πρόσδεση του DNA:
 - Φόρτωση όλου του δείγματος που βρίσκεται στο Eppendorf[®] στη στήλη NucleoSpin[®] Blood.
 - Φυγοκέντρηση για 1 min σε 11,000 x g. Σε περίπτωση που το δείγμα δεν έχει διαπεράσει το φίλτρο της στήλης πλήρως, τότε επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση σε υψηλότερες δυνάμεις βαρύτητας g (<15,000 x g).
 - Απορρίπτεται ο σωλήνας συλλογής με το διήθημα και τοποθετείται νέος στη στήλη.
- Έκπλυση μεμβράνης σιλικόνης:
 - 1^η έκπλυση: Προσθήκη 500 μ L Buffer BW και φυγοκέντρηση για 1 min σε 11,000 x g. Απορρίπτεται ο σωλήνας συλλογής με το διήθημα και τοποθετείται νέος στη στήλη.

- 2^η έκπλυση: Προσθήκη 600 μL Buffer B5 και φυγοκέντρωση για 1 min σε 11,000 x g. Απορρίπτεται το διήθημα και επαναχρησιμοποιείται ο σωλήνας συλλογής.
- Στέγνωμα μεμβράνης σιλικόνης:
 - Φυγοκέντρωση για 1 min σε 11,000 x g. Σε αυτό το βήμα απομακρύνονται τυχόν κατάλοιπα αιθανόλης.
- Έκλυση υψηλής καθαρότητας DNA:
 - Η στήλη NucleoSpin[®] Blood τοποθετείται σε Eppendorf[®] σωλήνα των 1.5 mL και προστίθενται 150 μL του προθερμασμένου Buffer BE (70 °C).
 - Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 1 min.
 - Φυγοκέντρωση για 1 min σε 11,000 x g.
 - Διαχωρισμός του τελικού προϊόντος έκλυσης σε δύο (2) Eppendorf[®] από 75 μL , όπου το ένα χρησιμοποιήθηκε στην εξέταση και το δεύτερο αποθηκεύθηκε ως stock DNA.
- Τα δείγματα που δεν χρησιμοποιήθηκαν άμεσα για ανάλυση αποθηκεύθηκαν στους -20 °C.

Ακολουθεί κάτωθι, η γραφική απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας της στήλης NucleoSpin[®].

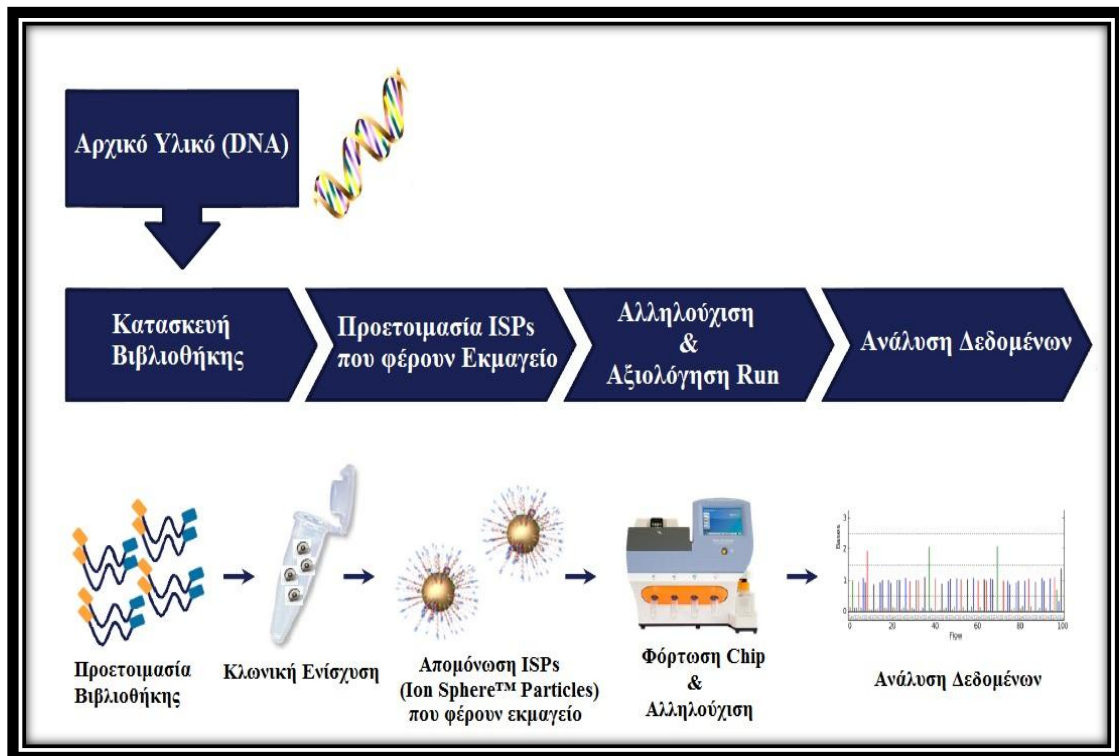


Εικ.2.1. Γραφική απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας της στήλης NucleoSpin[®]. (Ανατύπωση από την ιστοσελίδα της εταιρείας MACHERY-NAGEL, 2016)

2.2.2 Πρωτόκολλο Αλληλούχισης Νέας Γενιάς με τη χρήση της πλατφόρμας Ion Torrent[™] Personal Genome Machine[®] (PGM) System

Η πλατφόρμα Αλληλούχισης Νέας Γενιάς Ion Torrent[™] Personal Genome Machine[®] (PGM) η οποία παρουσιάστηκε το 2011 «δαμάζει τη δύναμη της τεχνολογίας ημιαγωγού» ανιχνεύοντας πρωτόνια (ιόντα υδρογόνου) τα οποία απελευθερώνονται κατά την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων κατά τη διάρκεια της σύνθεσης (Rothberg *et al*, 2011). Το πλήρες πρωτόκολλο της πλατφόρμας Αλληλούχισης Νέας Γενιάς Ion Torrent[™] Personal Genome Machine[®] (PGM) χαρακτηρίζεται από μια πολύ απλή ροή εργασίας (workflow) (Life Technologies Corporation, 2011) όπως απεικονίζεται και στην εικόνα 2.2. Αποτελείται από τέσσερα (4) βήματα τα οποία είναι τα εξής:

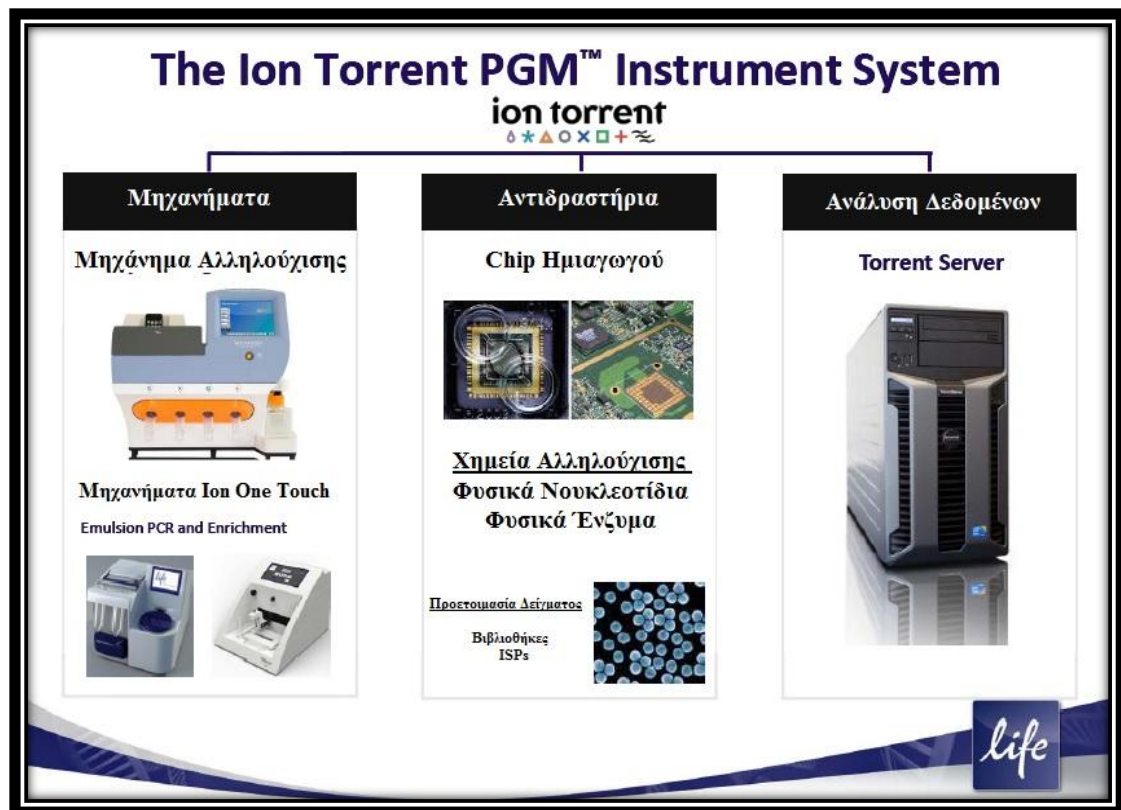
- i. Δημιουργία Βιβλιοθήκης (Library Preparation)
- ii. Δημιουργία Εκμαγείου (Template Preparation)
- iii. Αλληλούχιση και αξιολόγηση του «τρεξίματος» (Run)
- iv. Ανάλυση δεδομένων



Εικ.2.2. Γραφική απεικόνιση της ροής εργασίας (workflow) που ακολουθείται στην πλατφόρμα Ion Torrent™ Personal Genome Machine® (PGM). (Ανατύπωση από Life Technologies Corporation, 2013)

Εν συντομία, στα τέσσερα (4) βήματα της ροής εργασίας του πρωτοκόλλου πραγματοποιούνται τα εξής: Τμήματα DNA ενισχύονται με τη χρήση διαθέσιμου εμπορικού Panel ή προσωπικά σχεδιασμένου Panel μέσω του Ion AmpliSeq™ Designer, στοχεύοντας και ενισχύοντας τις επιθυμητές προς εξέταση αλληλουχίες μέσω μιας multiplex PCR. Στις αλληλουχίες αυτές προστίθενται ειδικοί προσαρμογείς (P1-adapter και Barcodes) και έπειτα ενισχύονται μέσω emulsion PCR στην επιφάνεια σφαιριδίων διαμέτρου 3 μm, γνωστά ως Ion Sphere™ Particles. Τα σφαιρίδια που φέρουν το εκμαγείο φορτώνονται σε ευαίσθητα σε πρωτόνια κελιά μιας «γκοφρέτας» πυριτίου (ion Chip) και η αλληλούχιση ξεκινά από μια συγκεκριμένη θέση στην αλληλουχία του προσαρμογέα (adapter). Κάθε ion Chip

περιέχει εκατομμύρια κελιά-αισθητήρες τρανζίστορ ευαίσθητων σε ιόντα (ion-sensitive field-effect transistor [ISFET] sensors) επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την παράλληλη ανίχνευση πολλαπλών αντιδράσεων αλληλούχισης (Meldrum *et al.*, 2011). Καθώς η αλληλούχιση προχωρά, κάθε μια εκ των τεσσάρων (4) βάσεων εισάγεται διαδοχικά. Η εισαγωγή μιας βάσης αποτελεί ένα (1) flow, ενώ με την ολοκλήρωση εισαγωγής τεσσάρων βάσεων ολοκληρώνεται ένα (1) cycle. Στις νεότερες πλατφόρμες PGM ένα (1) cycle έχει τροποποιηθεί ώστε να έχει μια περίοδο 32 βάσεων (TACGTACGTCTGAGCATCGATCGATGTACAGC), γνωστή ως αλληλουχία Samba. Η αλληλουχία ξεκινά με επαναλήψεις των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (TACG), αλλά μετά από δύο τέτοια μοτίβα μερικά νουκλεοτίδια επαναλαμβάνονται σε περίοδο μικρότερη των τεσσάρων. Αυτή η τροποποίηση τέθηκε σε εφαρμογή για τη βελτίωση του συγχρονισμού των κλωνικών εκμαγείων, διευκολύνοντας έτσι την ακριβή αναφορά βάσης (base calling) (Bragg *et al.*, 2013). Αν κάποιες βάσεις ενσωματωθούν, τότε απελευθερώνονται πρωτόνια και ανιχνεύεται ένα σήμα ανάλογο με τον αριθμό των βάσεων που έχουν ενσωματωθεί (Quail *et al.*, 2012). Η στρατηγική αλληλούχισης αυτή αναφέρεται ως αλληλούχιση με σύνθεση (sequencing-by-synthesis[SBS]) (Meldrum *et al.*, 2011). Τα μήκη των αλληλουχιών που διαβάζονται στη ρουτίνα απόκτησης είναι στις 100 βάσεις και τα «τέλεια» μήκη είναι άνω των 200 βάσεων (Rothberg *et al.*, 2011). Τα δεδομένα της ανάλυσης επεξεργάζονται με το λογισμικό Ion Torrent Suite™ ver.5.0.4 και ο Torrent Server χρησιμοποιείται για να στοιχίσει επιτυχώς την αποκτηθείσα αλληλουχία του run στην αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος (GRCH37/hg19) με τη χρήση του Torrent Mapping Alignment Program το οποίο είναι βελτιστοποιημένο για δεδομένα Ion Torrent™ (Nishio *et al.*, 2015).



Εικ.2.3. Απεικόνιση του Ion Torrent™ Personal Genome Machine® (PGM) System. (Ανατύπωση από Life Technologies Corporation, 2012)

Ακολουθεί αναλυτική περιγραφή του πρωτοκόλλου Αλληλούχισης Νέας Γενιάς με τη χρήση της πλατφόρμας Ion Torrent™ Personal Genome Machine® (PGM) System:

Κατόπιν της απομονώσεως του γενωμικού DNA από το περιφερικό αίμα πραγματοποιείται φωτομέτρηση με το σύστημα Qubit® 2.0 Fluorometer της εταιρείας Invitrogen® το οποίο χρησιμοποιεί φθοριοχρώματα τα οποία προσδέονται ειδικά σε dsDNA (Simbolo *et al.*, 2013).

- Για κάθε δείγμα αναμιγνύεται: 199 µL Qubit® Buffer με 1 µL Qubit® Reagent (working solution).
- Μοιράζεται σε assay tubes 199 µL από το working solution και προστίθεται 1 µL από το δείγμα.
- Καλή ανάδευση με τη χρήση Vortex.
- Επάωση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 2 min.
- Φωτομέτρηση και καταγραφή των συγκεντρώσεων των δειγμάτων.

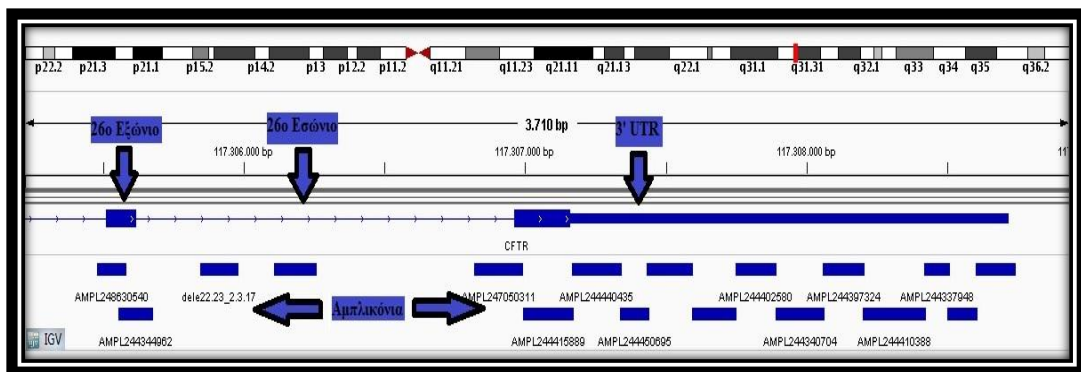
- Αραίωση όλων των δειγμάτων σε συγκέντρωση 5 ng/μL.



Εικ.2.4. Απεικόνιση του Qubit[®] 2.0 Fluorometer. (Ανατύπωση από Life Technologies Corporation, 2010)

2.2.2.i Δημιουργία Βιβλιοθήκης (Library Preparation)

- Ελέγχεται η συγκέντρωση των primer pool που θα χρησιμοποιηθούν. Το Ion AmpliSeq[™] CFTR Panel που χρησιμοποιείται περιέχει δύο (2) primer pools που αριθμούν συνολικά 102 αμπλικόνια (amplicons) (Pool 1: 50, Pool 2: 52) μεγέθους 8.49 kb καλύπτοντας όλες τις εξωνικές περιοχές, τα όρια μεταξύ εξονίων και εσωνίων και τις περιοχές UTR, συμπεριλαμβάνοντας >160 μεταλλάξεις της βάσεως δεδομένων CFTR2.org.



Εικ.2.5. Απεικόνιση τμήματος του CFTR Panel όπου σημειώνονται με βέλη το 26^ο εξώνιο και εσώνιο, η περιοχή 3' UTR και τα αμπλικόνια που καλύπτουν τις εν λόγω περιοχές. (Προσωπική λήψη με χρήση του προγράμματος IGV)

- Ενίσχυση των αλληλουχιών στόχων DNA (Η διαδικασία γίνεται για το κάθε primer pool, όπου αναλόγως του αριθμού των δειγμάτων επιλέγεται η χρήση 96 well plate ή tube strip):

5xION Ampliseq HiFi mix	2μL x αριθμό δειγμάτων
2xION Ampliseq Primer Pool	5μL x αριθμό δειγμάτων
Nuclease-free water	2μL x αριθμό δειγμάτων
Total volume: 9 μL → μοιράζεται σε Plate ή 0,2μL tubes	
DNA (5ng/μL):	1μL

- Για το CFTR Panel απαιτούνται 19 κύκλοι PCR (ο αριθμός των κύκλων εξαρτάται από τον αριθμό των primers/pool). Ο θερμοκυκλοποιητής που χρησιμοποιείται είναι ο Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler της εταιρείας Applied Biosystems™.

Πρόγραμμα PCR (AMPLISEQ)		
99°C	2 min	19 κύκλοι
99°C	15 sec	
60°C	4 min	
10°C	Έως και 1h	

- Ενώνονται τα προϊόντα της PCR του κάθε δείγματος μεταξύ τους.
- Προσθήκη 2 μL FUPA σε κάθε δείγμα για μερική πέψη των αλληλουχιών των εκκινητών (primers) και πραγματοποίηση πολύ καλής ανάδευσης.

Πρόγραμμα PCR (FUPA)	
50°C	10 min
55°C	10 min
60°C	20 min
10°C	Έως και 1h

- Κατά τη διάρκεια της πέψης με το FUPA, ετοιμάζεται το adapter-barcode mix με το οποίο «μαρκάρονται» τα δείγματα λαμβάνοντας το καθένα ένα μοναδικό κωδικό-αλληλουχία που συμβάλλει στο διαχωρισμό των δειγμάτων κατά την ανάλυση (demultiplexing). Ο κωδικός-αλληλουχία που προστίθεται είναι μοναδικός για κάθε δείγμα και αριθμεί δέκα (10) νουκλεοτίδια (π.χ. Barcode 1: CTAAGGTAAC).

Ion P1 Adapter	0.7 μ L
Ion Xpress Barcode X	0.7 μ L
Nuclease free water	1.4 μ L

- Στο τέλος της πέψης, σε κάθε δείγμα προστίθεται (μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε mix):

Swich Solution	4 μ L
Adapter-barcode mix	2 μ L
Ligase	2 μ L

- Πραγματοποιείται PCR για την προσθήκη των adapter-barcode.

Πρόγραμμα PCR (LIGASE)	
22°C	30 min
72°C	10 min
10°C	Έως και 1h

Με το πέρας της διαδικασίας της PCR επιλέγεται η συνέχιση του πρωτοκόλλου την ίδια ημέρα ή η αποθήκευση των δειγμάτων στους -20°C για συνέχιση των εργασιών την επομένη.

- Αφαίρεση των beads καθαρισμού (Agencourt AMPure XP Reagent) από τη συντήρηση για να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
- Ετοιμάζεται διάλυμα 70% αιθανόλης.

- Πολύ καλή ανάδευση με χρήση Vortex των beads και προσθήκη Agencourt AMPure XP Reagent σε κάθε δείγμα, πραγματοποιώντας πολύ καλή ανάδευση.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 min.
- Τοποθέτηση του plate (ή tube strip) στο μαγνήτη για τουλάχιστον 2 min ή έως το διάλυμα να φαίνεται διαυγές.
- Προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου (SN), χωρίς να έρθει σε επαφή το ακροφύσιο (tip) της πιπέτας με τα beads.
- Προσθήκη σε κάθε δείγμα 150 μ L 70% αιθανόλης.
- Μετακίνηση του plate στο μαγνήτη αριστερά-δεξιά, τουλάχιστον 5 φορές.
- Προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου (SN).
- Προσθήκη σε κάθε δείγμα 150 μ L 70% αιθανόλης.
- Μετακίνηση του plate στο μαγνήτη αριστερά-δεξιά, τουλάχιστον 5 φορές.
- Αφαίρεση πλήρως του υπερκείμενου (SN).
- Το plate πρέπει να στεγνώσει για 5 min στον μαγνήτη, στη διάρκεια του οποίου μπορεί να πραγματοποιηθεί η προετοιμασία του προαιρετικού βήματος: Qubit Quantification.
- Απομάκρυνση του plate από το μαγνήτη και προσθήκη (μπορεί να πραγματοποιηθεί και mix):

Platinum PCR Supermix HiFi	50 μ L
Library amplification primer mix	2 μ L

- Πολύ καλή ανάδευση και τοποθέτηση του plate στον μαγνήτη για τουλάχιστον 2 min.
- Προσεκτική μεταφορά του υπερκείμενου (SN) σε διπλανά πηγαδάκια (wells) ή σε νέο plate.
- Πραγματοποιείται PCR για την ενίσχυση των βιβλιοθηκών.

Πρόγραμμα PCR (LIBAMP)		
98°C	2 min	
98°C	15 sec	5 κύκλοι

64°C	1 min	
10°C	Έως και 1h	

Με το πέρας της διαδικασίας της PCR επιλέγεται η συνέχιση του πρωτοκόλλου την ίδια ημέρα ή η αποθήκευση των δειγμάτων στους -20°C για συνέχιση των εργασιών την επομένη.

- 1^{ος} κύκλος καθαρισμών:
 - Προσθήκη 25 µL Agencourt AMPure XP Reagent σε κάθε δείγμα, πραγματοποιώντας πολύ καλή ανάδευση.
 - Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 min.
 - Τοποθέτηση του plate στο μαγνήτη για τουλάχιστον 5 min ή έως το διάλυμα να φαίνεται διαυγές.
 - Προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου (SN) ~75 µL σε διπανάπηγαδάκια.
- 2^{ος} κύκλος καθαρισμών:
 - Απομάκρυνση του plate από το μαγνήτη.
 - Προσθήκη 60 µL Agencourt AMPure XP Reagent σε κάθε δείγμα, πραγματοποιώντας πολύ καλή ανάδευση.
 - Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 min.
 - Τοποθέτηση του plate στο μαγνήτη για 3 min ή έως το διάλυμα να φαίνεται διαυγές.
 - Προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου (SN), χωρίς να έρθει σε επαφή το ακροφύσιο (tip) της πιπέτας με το pellet.
 - Προσθήκη σε κάθε δείγμα 150 µL 70% αιθανόλης.
 - Μετακίνηση του plate στο μαγνήτη αριστερά-δεξιά, τουλάχιστον 5 φορές.
 - Προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου (SN).
 - Προσθήκη σε κάθε δείγμα 150 µL 70% αιθανόλης.
 - Μετακίνηση του plate στο μαγνήτη αριστερά-δεξιά, τουλάχιστον 5 φορές.
 - Αφαίρεση πλήρως του υπερκείμενου (SN).
 - Το plate πρέπει να στεγνώσει για 5 min στον μαγνήτη.

- Απομάκρυνση του plate από τον μαγνήτη και προσθήκη 50 μL Low TE στο ίζημα, πραγματοποιώντας πολύ καλή ανάδευση.
- Τοποθέτηση του plate στον μαγνήτη για τουλάχιστον 2 min και μεταφορά του κάθε υπερκείμενου (SN) σε Eppendorf.
- Φθορισμομέτρηση στο Qubit[®] 2.0 Fluorometer:
 - Για κάθε δείγμα αναμιγνύεται: 199 μl Qubit[®] Buffer με 1 μl Qubit[®] Reagent (working solution).
 - Μοιράζεται σε assay tubes 190 μL από το working solution και προστίθεται 10 μL από το δείγμα.
 - Καλή ανάδευση με τη χρήση Vortex.
 - Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 2 min.
 - Φωτομέτρηση και καταγραφή των συγκεντρώσεων των δειγμάτων.
 - Αραίωση όλων των δειγμάτων σε συγκέντρωση 22 ng/mL.

2.2.2.ii Δημιουργία Εκμαγείου (Template Preparation)

Στο στάδιο της δημιουργίας του εκμαγείου γίνεται χρήση του συστήματος Ion OneTouch[™] System το οποίο αποτελείται από τις εξής δύο συσκευές: Ion OneTouch[™] 2 Instrument και Ion OneTouch[™] ES.



Εικ.2.6. Απεικόνιση του Ion OneTouch[™] System. (Ανατύπωση από την ιστοσελίδα της εταιρείας ThermoFisher, 2016)

- Ενεργοποίηση της συσκευής Ion OneTouch™ 2.
- Ανοίγεται το καπάκι της συσκευής πατώντας την ένδειξη OPEN LID και τοποθετούνται τα Recovery tubes και το Recovery Router. Ακολουθεί κλείσιμο του καπακιού της φυγοκέντρου.
- Αφαιρείται το προηγούμενο cleaning adapter.
- Ανοίγεται το heat block σπρώχνοντας προς τα πίσω τον μοχλό.
- Τοποθετείται νέο amplification plate.
- Ακολουθεί κλείσιμο του heat block ώστε το disposable tubing να βρίσκεται κάτω από το μοχλό και κάτω από όλες τις ειδικές υποδοχές.
- Τοποθετείται ο disposable injector στην είσοδο της φυγοκέντρου.
- Ανάδευση των δοχείων Oil και Recovery Solution 3 φορές.
- Πληρούται το αριστερό reagent tube με το διάλυμα Oil μέχρι τη μέση και το δεξί με Recovery Solution μέχρι το ¼.
- Αφαιρείται τυχόν διάλυμα από το waste container και επανατοποθετείται στην θέση του.
- Προετοιμάζεται το amplification solution:
 - ION PGM Template OT2 Reagent mix: τοποθετείται σε θερμοκρασία δωματίου (RT), Vortex 30 sec, φυγοκέντρωση 2 sec.
 - ION PGM Template OT2 Reagent B: Vortex 1 min, φυγοκέντρωση 2 sec.
 - ION PGM Template OT2 Enzyme mix: φυγοκέντρωση 2 sec και τοποθέτηση στο κρυοστατώ.
 - ION PGM Template OT2 Ion Sphere particles: τοποθετείται σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
- Ενώνονται 10 µL από την κάθε βιβλιοθήκη σε ξεχωριστό tube. Πραγματοποιείται Vortex για 5 sec και φυγοκέντρωση για 5 sec.
 - Προστίθενται 2 µL από το mix σε ξεχωριστό tube και προστίθενται 23 µL Nuclease Free Water.
 - Πραγματοποιείται Vortex για 5 sec, φυγοκέντρωση για 2 sec και τοποθέτηση στο κρυοστατώ.
 - Σε Eppendorf 1.5 mL προστίθενται τα εξής:

Nuclease free water	25 μ L
ION PGM Template OT2 Reagent mix	500 μ L
ION PGM Template OT2 Reagent B	300 μ L
ION PGM Template OT2 Enzyme mix	50 μ L
Αραιωμένη Βιβλιοθήκη	25 μ L

- Πραγματοποιείται Vortex για 5 sec και φυγοκέντρηση για 2 sec.
- Ετοιμάζονται τα ISPs (Ion Sphere™ Particles): Vortex για 1 min, φυγοκέντρηση για 2 sec και ανάδευση με την πιπέτα.
- Προσθήκη 100 μ L ISPs στα 900 μ L του προηγούμενου mix.
- Πραγματοποιείται Vortex για 5 sec και φυγοκέντρηση για 2 sec.
- Το ανωτέρω Amplification Solution τοποθετείται στο ειδικό sample port του Reaction Filter Assembly, το οποίο τοποθετείται σε tube 15 mL για ασφαλείς χειρισμούς.
- Προστίθεται 1.5 mL Reaction Oil στο ίδιο sample port.
- Γίνεται εμφανής ο σχηματισμός δύο φάσεων.
- Το Reaction Filter Assembly μετά την πλήρωση του αναποδογυρίζεται με αργό αλλά σταθερό ρυθμό από αριστερά προς τα δεξιά και τοποθετείται ανάποδα στη συσκευή.
- Ακολουθούνται οι οδηγίες που παρέχονται στην οθόνη αφής της συσκευής και επιλέγεται η ένδειξη RUN. (Ο χρόνος περάτωσης του τρεξίματος είναι ~5.5 ώρες, αλλά μπορεί να μείνει στη συσκευή έως και 16 ώρες. Αν το run πραγματοποιηθεί στις 5.5 ώρες εντός του ωραρίου λειτουργίας του εργαστηρίου, ακολουθείται η συνέχεια του πρωτοκόλλου. Διαφορετικά, την επομένη ημέρα επιλέγεται η ένδειξη NEXT στην οθόνη της συσκευής ώστε να πραγματοποιηθεί η διαδικασία του FINAL SPIN διάρκειας 10 min.)
- Ανοίγεται το καπάκι της συσκευής πατώντας OPEN LID.
- Αφαιρούνται προσεκτικά τα Recovery Tubes από τη φυγόκεντρο και τοποθετούνται σε στατώ.

- Από τα 2 Recovery Tubes αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο (SN), χωρίς να διαταραχθεί το σχηματισμένο ίζημα μαύρου χρώματος, αφήνοντας μόνο 50 μL . Γίνεται χρήση ενός παρόμοιου Recovery Tube ως οδηγού που έχει μαρκαριστεί ο όγκος των 50 μL .
- Πραγματοποιείται πολύ καλή ανάδευση για να ξεκολλήσουν τα σφαιρίδια και ενώνονται τα περιεχόμενα των 2 tubes ($\sim 100 \mu\text{L}$) σε νέο Eppendorf 0.2 mL.
- Επιλέγεται ένα καινούριο 8well strip σχεδιασμένο για χρήση στη συσκευή Ion OneTouch™ ES, στο οποίο μεταφέρονται τα 100 μL στο well No1 (με την τετράγωνη προεξοχή να βρίσκεται στα αριστερά). Μια ποσότητα της τάξεως $\sim 2 \mu\text{L}$ χρησιμοποιείται ως aliquot για ενδεχόμενο troubleshooting.

- Προετοιμασία Melt Off Solution:

Tween Solution	280 μL
NaOH 1 M	40 μL

- Μεταφέρονται 300 μL από το Melt Off Solution στο well No7 του 8well strip.
- Πραγματοποιείται ξέπλυμα και επαναδιάλυση των Dynabeads® MyOne™ Streptavidin beads.
 - Πραγματοποιείται Vortex για 30 sec και φυγοκέντρηση για 2 sec.
 - Ανάδευση με την πιπέτα και μεταφορά 13 μL σε νέο Low Bind 1.5 mL Eppendorf.
 - Τοποθέτηση του Eppendorf στον μεγάλο μαγνήτη για 2 min.
 - Προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου (SN), χωρίς να χωρίς να έρθει σε επαφή το ακροφύσιο (tip) της πιπέτας με το pellet των Dynabeads.
 - Προσθήκη 130 μL MyOne™ beads Wash Solution.
 - Αφαίρεση από τον μαγνήτη και πραγματοποίηση Vortex για 30 sec και φυγοκέντρηση για 2 sec.
 - Τοποθέτηση των Dynabeads (130 μL) στο well No2 του 8well strip.
- Στα wells No3, No4, No5 προστίθενται από 300 μL Ion OneTouch™ Wash Solution.
- Τοποθετείται το 8well strip στη συσκευή Ion OneTouch™ ES με την τετράγωνη προεξοχή να βρίσκεται στα αριστερά.

- Τοποθετείται νέο ακροφύσιο (tip) στο tip loader.
- Σε ένα Eppendorf 0.2 ml προστίθενται 10 μ L Neutralization Solution και έπειτα τοποθετείται ανοικτό στην ειδική υποδοχή πίσω από το tip loader.
- Ενεργοποίηση της συσκευής Ion OneTouch™ ES.
- Ανάδευση του περιεχομένου του well No2, αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων.
- Πραγματοποιείται εκκίνηση της διαδικασίας πατώντας την ένδειξη START/STOP.
- Με το πέρας του run, διάρκειας ~35 min, το Eppendorf το οποίο περιέχει πλέον τα Enriched ISPs αναδύεται χειροκίνητα 5 φορές. Ακολουθεί έπειτα η διαδικασία του Sequencing.
- Απορρίπτεται το tip καθώς και το 8well strip από τη συσκευή. Πραγματοποιείται επίβλεψη της συσκευής για τυχόν υγρά σε επιφάνειες της και απενεργοποίηση της.
- Στη διάρκεια του run, καθαρίζεται το Ion OneTouch™ 2 Instrument:
 - Έλεγχος του επιπέδου του αριστερού Reagent Tube (Oil) το οποίο πρέπει να είναι >20mL.
 - Απορρίπτεται το Ion PGM One Touch Plus Reaction Filter Assembly.
 - Το Ion PGM One Touch 2 Plate αφήνεται στην θέση του.
 - Σε ένα στατώ δεξιά από τη συσκευή τοποθετείται ένα άδειο falcon 50 mL.
 - Τοποθετείται ένα νέο cleaning adapter.
 - Αφαιρείται το disposable injector από το injector hub και το disposable tubing από τη βαλβίδα.
 - Τοποθετείται η βελόνα στο falcon και επιλέγεται η ένδειξη CLEAN.
 - Ακολουθούνται οι οδηγίες που εμφανίζονται στην οθόνη αφής της συσκευής. Η διαδικασία καθαρισμού διαρκεί ~ 20 min.
 - Η συσκευή δεν απενεργοποιείται έως και την επιτυχή ολοκλήρωση της διαδικασίας του Sequencing.
- Στη διάρκεια του run, πραγματοποιείται ο καθαρισμός με νερό του Sequencer.

2.2.2.iii Αλληλούχιση και αξιολόγηση του «τρεξίματος» (Run)

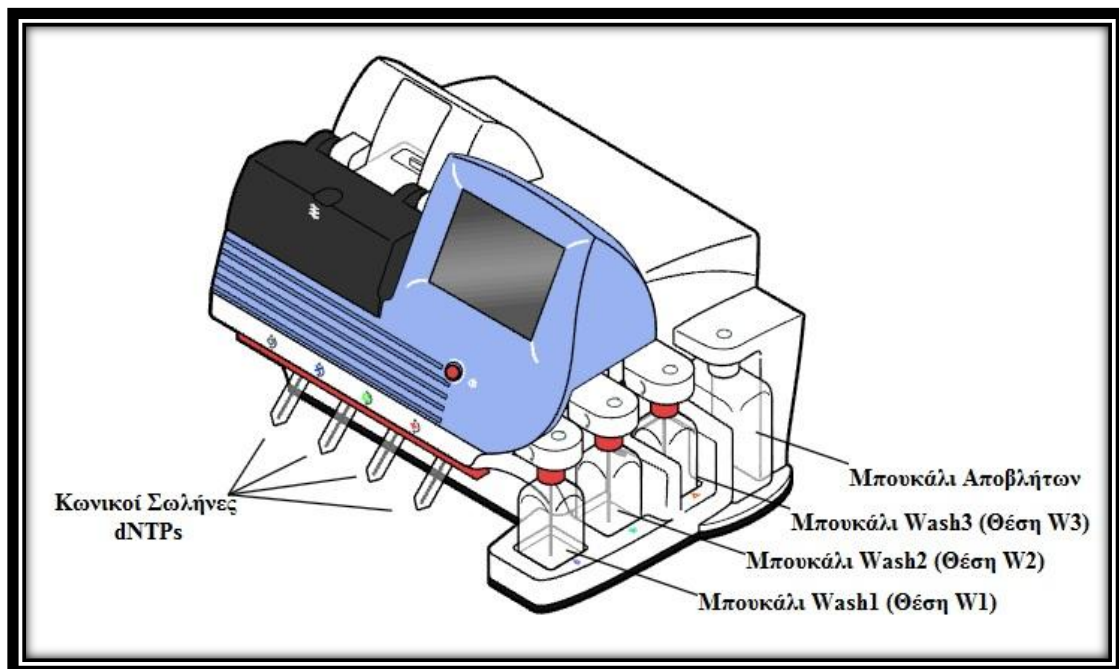
Η συσκευή Ion PGM™ Sequencer, σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή πρέπει να χρησιμοποιείται σε εσωτερικούς χώρους όπου η επιθυμητή θερμοκρασία εντοπίζεται μεταξύ του εύρους τιμών 20–25°C και η υγρασία μεταξύ 40-60%. Το υψόμετρο που πραγματοποιείται χρήση της συσκευής πρέπει να εντοπίζεται κάτω από τα 2,000 m. Ο Sequencer συνοδεύεται από τον Ion PGM™ Torrent Server, έναν υπολογιστή με λειτουργικό σύστημα Ubuntu™, ο οποίος φέρει επεξεργαστή Dual 8-core 2.6 GHz CPUs, με μνήμη RAM 64 GB και δυνατότητα αποθήκευσης 18 TB. Τα τεχνικά χαρακτηριστικά του Torrent Server συμβάλλουν ενεργά στην επεξεργασία του λαμβανόμενου σήματος από τον Sequencer, την αναφορά βάσης (base calling), την στοίχιση των διαβασμάτων και την αναφορά των αλληλομόρφων (variant calling) αποδίδοντας τα δεδομένα σε “Industry-standard” μορφές αρχείων όπως: FASTQ, SFF, BAM και VCF (ThermoFisher Scientific Inc., 2015).



Εικ.2.7. Απεικόνιση του Ion PGM™ Sequencer. (Ανατύπωση από ThermoFisher Scientific Inc., 2016)

- Πραγματοποιείται καθαρισμός με νερό του Sequencer:
 - Τα cleaning bottles αδειάζονται από το περιεχόμενο του και ξεπλένεται το καθένα 2 φορές με 100 mL 18 MΩ νερό.
 - Στην οθόνη αφής του Sequencer επιλέγεται η ένδειξη CLEAN και επιλέγεται το 18 MΩ water cleaning checkbox.

- Προστίθενται 250 mL 18 MΩ νερό στο μπουκάλι με την ένδειξη Water.
- Ξεπλένεται το sipper tube της θέσης W1 με 18 MΩ νερό και τοποθετείται το μπουκάλι με τα 250 mL 18 MΩ νερό στην πρώτη θέση.
- Ακολουθώντας τις οδηγίες της οθόνης, τοποθετείται το άδειο W2 μπουκάλι στη θέση του (3^η θέση) και το άδειο μπουκάλι στη δεύτερη θέση (W3).
- Βεβαιώνεται η ύπαρξη δοχείων συλλογής κάτω από τα reagent sipper tubes και επιλέγεται η ένδειξη NEXT για να πραγματοποιηθεί εκκίνηση της διαδικασίας καθαρισμού.
- Με το πέρας της διαδικασίας, αφαιρούνται όλα τα μπουκάλια και τα sipper tubes από τη δεξιά πλευρά του Sequencer και επιλέγεται η ένδειξη NEXT για την επιστροφή στο αρχικό μενού.



Εικ.2.8. Γραφική απεικόνιση του Ion PGM™ Sequencer με τις ενδείξεις των μπουκαλιών και των κωνικών σωλήνων των dNTPs. (Ανατύπωση από Life Technologies Corporation, 2011)

- Διαδικασία Initialization
 - Πριν την πραγματοποίηση του Initialization πραγματοποιούνται:

- Ξεπάγωμα των dNTPs στο κρυοστατώ.
 - Έλεγχος της πίεσης N₂ (Σύνθεσης: grade 4.5, 99.995% ή καλύτερο) η οποία πρέπει να εντοπίζεται μεταξύ του εύρους τιμών 35-45 psi.
 - Ξεπλένονται τα 3 μπουκάλια 3 φορές με 100 mL 18 MΩ νερό.
 - Το μεγάλο μπουκάλι πληρούται μέχρι τη γραμμή με 2 L 18 MΩ νερό.
 - Στο ίδιο μπουκάλι προστίθεται όλο του μπουκάλι του Ion PGM Sequencing 200 v2 W2 Solution και 70 μL φρέσκου 100 mM NaOH.
 - Τοποθετείται το καπάκι του μπουκαλιού και ακολουθεί ανάδευση 5 φορές.
 - Στο μπουκάλι Wash1 προστίθενται 350 μL φρέσκου διαλύματος 100 μM NaOH το οποίο κλείνεται.
 - Στο μπουκάλι Wash3 προστίθεται το Ion PGM Sequencing 200 v2 1X W3 Solution μέχρι τα 50 μL το οποίο κλείνεται.
- Πραγματοποίηση του Initialization:
- Βεβαιώνεται η ύπαρξη cleaning chip στον Sequencer.
 - Επιλογή της ένδειξης INITIALIZE στην οθόνη αφής του Sequencer.
 - Στην επόμενη οθόνη πρέπει να είναι επιλεγμένο το Ion PGM Sequencing 200 kit v2, διαφορετικά σκανάρω το barcode του Ion PGM Sequencing 200 v2 W2.
 - Επιλέγεται η ένδειξη NEXT και βεβαιώνεται η παρουσία cleaning chip, reagent bottle, sipper tubes και collection trays στη συσκευή και επιλέγεται η ένδειξη NEXT.
 - Με χρήση νέων γαντιών τοποθετούνται νέα sipper tubes στις άλλες 2 θέσεις και τα αντίστοιχα μπουκάλια και επιλέγεται η ένδειξη NEXT.
 - Η διαδικασία προσαρμογής του pH, μπορεί να διαρκέσει έως και 30 min και κάποιες φορές ίσως και περισσότερο. Ως βέλτιστη τιμή pH θεωρείται το 7.55.
- Ετοιμασία διαλυμάτων dNTPs:

- Πραγματοποιείται Vortex και Spin σε κάθε tube dNTP.
 - Σε falcon 50 mL του kit, τοποθετούνται οι αντίστοιχες ετικέτες dNTPs και προστίθενται σε κάθε ένα το αντίστοιχο dNTP όγκου 20 µL με τη σειρά G, C, A, T.
 - Αφαιρούνται τα παλιά reagent sipper tubes και τοποθετούνται με νέα γάντια τα καινούρια.
 - Τοποθετούνται τα falcon που περιέχουν τα dNTPs στις σωστές θέσεις και σφίγγονται καλά.
 - Ακολουθούνται οι οδηγίες της οθόνης για την ολοκλήρωση του Initialization. Η διαδικασία διαρκεί ~20 min. Στο τέλος της διαδικασίας πρέπει να εμφανιστεί μια πράσινη οθόνη με την ένδειξη PASSED.
- Διαδικασία του Plan Run:
 - Ανοίγεται ο Torrent Server: IP address 192.168.50.55 για χρήση εντός του εργαστηρίου.
 - Καταχωρούνται οι κωδικοί του εργαστηρίου (username και password).
 - Ανοίγει ο Server και πραγματοποιούνται οι εξής ενέργειες:
 - Επιλογή του tab PLAN.
 - Επιλογή του Templates.
 - Ανοίγει σελίδα → Επιλογή Ampliseq DNA
 - Ανοίγει λίστα πρωτοκόλλων → Επιλογή CFTR Panel
 - Ανοίγει μια σελίδα για την επιλογή των χαρακτηριστικών του run:
 - Ion Reporter → account: NONE, επιλογή NEXT
 - Application → DNA & AmpliseqDNA, επιλογή NEXT
 - Kits → Library kit type: Ion Ampliseq 2.0 Lib kit
 - Template kit: Ion PGM Template OT2 200 kit

→ Sequencing kit: Ion PGM Sequencing 200 kit v2

→ Chip Type: Ion 314 chip v2

→ Barcode Set: Ion Xpress, επιλογή NEXT

- Pluggins: Coverage Analysis & Variant Caller, επιλογή NEXT
- Projects: CFTR, επιλογή NEXT
- Plan:

→ Template Name: CFTR Panel

→ Run Plan Name: CFTR Panel

→ Number of barcodes:n 1-16

→ Καταχωρείται ο κωδικός του κάθε δείγματος

→ Επιλογή PLAN RUN

→ Εμφανίζεται ένας μοναδικός κωδικός που θα χρησιμοποιηθεί για να επιλεγθεί το σχεδιασμένο run στη συσκευή του Sequencer.

- Sequencing Protocol:

- Επιλέγεται το πρωτόκολλο Sequencing ανάλογα με το είδος του Chip που θα φορτωθεί. Συνήθως, για την Κυστική Ίνωση, το Chip που χρησιμοποιείται είναι το 314 όπου μπορούν να τρέξουν έως 6 δείγματα.
- Μεταφέρεται ο μισός όγκος από τα Enriched ISPs σε νέο Eppendorf.
- Πραγματοποιείται Vortex και Spin των Control Ion Sphere Particles.

- Προσθήκη 5 μL Control Ion Sphere Particles στον μισό όγκο από τα Enriched ISPs και πραγματοποιείται πολύ καλή ανάδευση.
- Φυγοκέντρωση για 2 min σε 15,500xg.
- Αφαίρεση υπερκειμένου, αφήνοντας $\sim 3 \mu\text{L}$.
- Προσθήκη 3 μL Sequencing Primer και πραγματοποιείται πολύ καλή ανάδευση (Ο συνολικός όγκος πρέπει να είναι $\sim 6 \mu\text{L}$).
- Πραγματοποιείται PCR για την πρόσδεση των εκκινητών (primers):

Πρόγραμμα PCR (Ionseq)	
95°C	2 min
37°C	2 min

○ Chip Check:

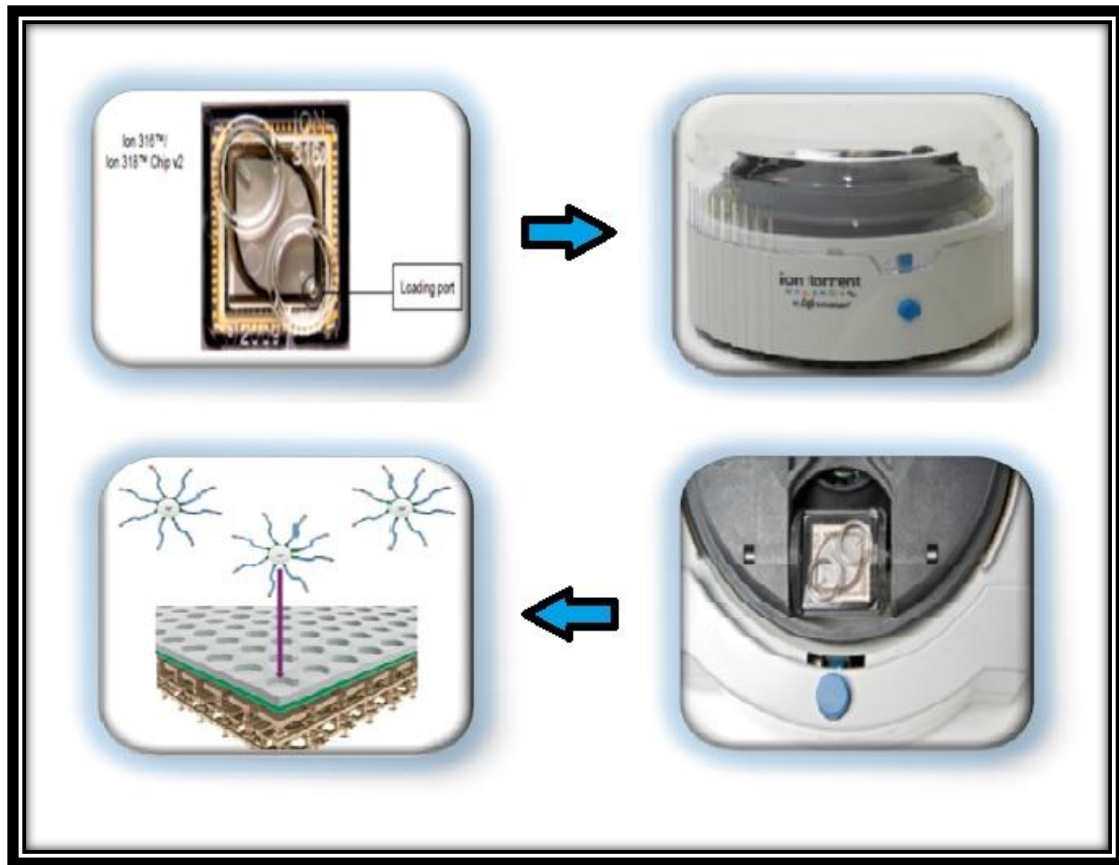
- Αφαιρείται το Chip που θα χρησιμοποιηθεί από τη συσκευασία, η οποία φυλάγεται καθώς αναγράφεται σε αυτή το barcode του Chip, και σημειώνεται σε επιφάνεια του Chip η ημερομηνία του run.
- Επιλογή της ένδειξης RUN στην οθόνη του Sequencer.
- Με το cleaning Chip στην ειδική θέση, επιλέγεται το NEXT για να πραγματοποιηθεί η ενέργεια: cleaning fluidic lines, διάρκειας $\sim 20 \text{ sec}$.
- Ακολουθούνται οι οδηγίες της οθόνης. Χωρίς γάντια πραγματοποιείται γείωση με την επαφή των δαχτύλων σε ειδική επιφάνεια του Sequencer με σκοπό να αποφευχθούν ηλεκτροστατικές εκφορτίσεις που μπορούν να επηρεάσουν την λειτουργικότητα του. Το νέο Chip τοποθετείται στην ειδική υποδοχή αφαιρώντας το cleaning Chip.



Εικ.2.9. Απεικόνιση της τοποθέτησης του Chip στη συσκευή Ion PGM™ Sequencer με γυμνά χέρια. (Ανατύπωση από ThermoFisher Scientific Inc, 2014)

- Σύμφωνα με τις οδηγίες της οθόνης, σκανάρεται το barcode του Chip θα χρησιμοποιηθεί και επιλέγεται η ένδειξη Chip Check.
 - Όταν η διαδικασία ολοκληρωθεί, μετά από ~2 min, αν το Chip έχει γίνει δεκτό επιλέγεται η ένδειξη NEXT.
 - Αφαιρείται το Chip από την ειδική υποδοχή, ξανατοποθετείται το cleaning Chip και αδειάζεται εντελώς το waste.
 - Ακολουθεί το φόρτωμα του Chip.
 - Απομακρύνεται το δείγμα από τη συσκευή PCR και προστίθεται 1 μL Ion PGM Sequencing 200 v2 Polymerase για ένα τελικό όγκο ~7 μL .
 - Πραγματοποιείται πολύ καλή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 min.
- Φόρτωμα του Chip:
- Χωρίς γάντια, το Chip τοποθετείται σε γωνία 45° και αδειάζεται το εναπομείναν υγρό από το loading port.
 - Για να αδειάσει εντελώς, τοποθετείται το Chip στην ειδική φυγόκεντρο γυρισμένο ανάποδα και με την στρογγυλή προεξοχή προς το κέντρο της φυγοκέντρου και φυγοκεντρείται για 5 sec.

- Αφαιρείται το Chip από τη φυγόκεντρο και σκουπίζεται ότι υγρό υπάρχει.
- Τοποθετείται το Chip στο bucket και στον πάγκο.
- Ολόκληρη η ποσότητα του δείγματος (~7 μL) συγκεντρώνεται σε πιπέτα και φορτώνεται σιγά σιγά στο loading port του Chip, αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων.
- Τοποθετείται στη φυγόκεντρο με την στρογγυλή προεξοχή προς το κέντρο της φυγοκέντρου και φυγοκεντρείται για 30 sec.
- Ρυθμίζεται η πιπέτα στα 5 μL και αναδεύεται το περιεχόμενο του Chip 3 φορές κρατώντας το σε γωνία 45° , αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων.
- Τοποθετείται στη φυγόκεντρο με την στρογγυλή προεξοχή προς τα έξω και φυγοκεντρείται για 30 sec.
- Ρυθμίζεται η πιπέτα στα 5 μL και αναδεύεται το περιεχόμενο του Chip 3 φορές κρατώντας το σε γωνία 45° , αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων.
- Τοποθετείται στη φυγόκεντρο με την στρογγυλή προεξοχή προς το κέντρο της φυγοκέντρου και φυγοκεντρείται για 30 sec.
- Υπό γωνία 45° , αδειάζεται όλο το υγρό σιγά σιγά από το loading port. Αν παραμείνει ποσότητα υγρού, μπορεί να ξαναπραγματοποιηθεί φυγοκέντρωση για 5 sec με την στρογγυλή προεξοχή προς τα έξω, αφαιρώντας έπειτα τυχόν εναπομείναν υγρό.



Εικ.2.10. Απεικόνιση του Chip με την ένδειξη του loading port και της τοποθέτησης του στην ειδική φυγόκεντρο. Γραφική απεικόνιση των Enriched ISPs που τοποθετούνται στα ειδικά κελιά του Chip. (Ανατύπωση από ThermoFisher Scientific Inc, 2014)

- Επιλογή Planned Run:
 - Επιλέγεται το Browse δίπλα στο Planned Run και ακολουθεί επιλογή του ονόματος του run που έχει δημιουργηθεί. Επιλέγεται η ένδειξη NEXT.
 - Πραγματοποιείται έλεγχος των settings και επιλέγεται η ένδειξη NEXT.
 - Τοποθετείται το Chip στη συσκευή και επιλέγεται η ένδειξη NEXT. Το run διαρκεί ~2 ½ ώρες και η πορεία του μπορεί να παρακολουθηθεί στη σελίδα του server.



Εικ.2.11. Απεικόνιση του Run Report που λαμβάνεται με το πέρας του run και το οποίο παρέχει στοιχεία αξιολόγησης του. (Ανατύπωση από ThermoFisher Scientific Inc, 2014)

2.2.2.iv Ανάλυση Δεδομένων

- Όταν τελειώσει το run, στην ένδειξη DATA επιλέγεται το run που μόλις τελείωσε.
- Στο κάτω μέρος της σελίδας επιλέγεται το Select plugins to run.
- Εμφανίζεται η λίστα Select plugin.
- Επιλέγεται το Ion Reporter Uploader.
- Στο Select Ion Reporter Account επιλέγεται το Eurogenetica, που αποτελεί λογαριασμό του εργαστηρίου.
- Upload option: Επιλογή VCF και BAM.
- Launch IRU (Είναι έτοιμο μετά από μερικές ώρες).
- Στον Ion Reporter μπαίνουμε με τους κωδικούς του εργαστηρίου.
- Επιλέγεται το tab analyses.

- Εμφανίζεται λίστα δειγμάτων, όπου φαίνονται όλα τα δείγματα, αναλυμένα και μη που έχουν δουλευτεί.
- Επιλέγεται δεξιά στην σελίδα το Launch Analyses και Manual.
- Ανοίγει νέα σελίδα όπου επιλέγεται το Workflow: Ampliseq CFTR single sample 4.4 και έπειτα επιλέγεται η ένδειξη NEXT.
- Επιλέγονται τα δείγματα που θέλουμε να αναλυθούν και επιλέγεται η ένδειξη NEXT.
- Στα Plugins δεν πραγματοποιείται κάποια ρύθμιση. Επιλέγεται η ένδειξη NEXT.
- Σε αυτό το στάδιο μπορεί να πραγματοποιηθεί μετονομασία των δειγμάτων διαφορετική από την προτεινόμενη. Επιλέγεται το Launch Analyses.
- Πραγματοποιείται επιστροφή στη σελίδα των δειγμάτων, όπου φαίνεται η πορεία της ανάλυσης.
- Όταν ολοκληρωθεί η ανάλυση, μπορεί να επιλεγθεί ένα από τα δείγματα και να ανοίξει νέα σελίδα με πίνακα όπου εμφανίζονται οι τυχόν υπάρχουσες μεταλλάξεις.
- Επιλέγεται το tab Download:
 - Current Results TSV
 - Ανοίγει το TSV File
 - Copy & Paste το σύνολο του κειμένου σε αρχείο Excel.
- Πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία για κάθε δείγμα.
- Πραγματοποιείται σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα αρχικά, αλλά και οπτική διαδραστική παρατήρηση των δεδομένων στο υψηλής απόδοσης απεικονιστικό εργαλείο γονιδιωματικής Integrative Genomic Viewer (IGV) του Broad Institute, το οποίο διατίθεται δωρεάν ως “open-source software”(Thorvaldsdottir H, 2013).

Η ανεύρεση αλλαγών στο γονίδιο *CFTR* απαιτεί αξιολόγηση τους και χαρακτηρισμό τους ως μεταλλάξεις ή πολυμορφικά ευρήματα, κάτι το οποίο διερευνάται με την αναζήτηση των εν λόγω αλλαγών σε ειδικές βάσεις δεδομένων που αφορούν την νόσο της Κυστικής Ίνωσης, οι οποίες είναι οι εξής:

- CFTR2: <http://cftr2.org/>
- Cystic Fibrosis Mutation Database: <http://www.genet.sickkids.on.ca>

Πραγματοποιείται επίσης ενδεδειγμένη αναζήτηση της διεθνούς βιβλιογραφίας μέσω του ιστότοπου PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Σε περίπτωση όπου κάποιο εύρημα δεν εντοπίζεται καταχωρημένο, πραγματοποιείται πρόγνωση της επίδρασης της αλλαγής στη δομή και στη λειτουργικότητα του πρωτεϊνικού μορίου με τη χρήση ειδικών βιοπληροφορικών εργαλείων-αλγορίθμων. Ο Ion Reporter παρέχει μέσω των δεδομένων την ανάλυση αλγορίθμων όπως: PhyloP, SIFT, Grantham και PolyPhen. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται οι εξής αλγόριθμοι προς αξιολόγηση των νέων ευρημάτων:

- MutationTaster: <http://www.mutationtaster.org/>
- Human Splicing Finder: <http://www.umd.be/HSF/>
- PredictSNP: <http://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp/>
- I-Mutant: <http://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html>

Η πλειονότητα των αλγορίθμων αναδεικνύει τους φυσικοχημικούς περιορισμούς ως ένα σημαντικό καθοριστή της πρωτεϊνικής βλάβης, όπου μέσω της ποικιλότητας που παρουσιάζεται εξελικτικά επιτρέπεται η ποσοτική εκτίμηση των βλαβών. Η ποικιλότητα που παρατηρείται ανάμεσα στα ορθόλογα γονίδια στην επηρεαζόμενη θέση είναι ένδειξη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων που είναι «ανεκτές» στη συγκεκριμένη θέση. Η «παραβίαση» αυτών των περιορισμών οδηγεί σε εμφάνιση ασθένειας μέσω της διαταραχής της λειτουργίας της πρωτεΐνης (Stone and Sidow, 2005).

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

3.1 Ανάλυση Αποτελεσμάτων

3.1.1 Ανάλυση Αποτελεσμάτων Κατηγορίας Δειγμάτων α

Κατόπιν πραγματοποίησης της εφαρμογής του πρωτοκόλλου για τα ληφθέντα δείγματα της κατηγορίας α, που αποτελείται από γενωμικό DNA εξεταζομένων (όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2), και δια της χρήσεως των κατάλληλων διαθέσιμων εργαλείων βιοπληροφορικής (όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2) πραγματοποιήθηκε ανάλυση και μέτα-ανάλυση των δεδομένων με σκοπό την αξιολόγηση των ευρημάτων και τον σχολιασμό τους.

Κάτωθι, παρατίθεται ο συνολικός πίνακας (Πιν. 3.1) των δεδομένων που λήφθησαν, ο οποίος περιλαμβάνει: την χρωμοσωμική θέση της εντοπιζόμενης αλλαγής, την εντόπιση σε εξωνική (E) ή εσωνική περιοχή (I), τον τύπο της αλλαγής (π.χ. SNV: Single Nucleotide Variation, MNV: Multi-Nucleotide Variation, InDel: Insertion-Deletion, Ref: Reference), την ονομασία της αλλαγής (π.χ. F508del) και τον χαρακτηρισμό ως πολυμορφικό εύρημα ή μετάλλαξη βάσει της βιβλιογραφίας ή των εργαλείων βιοπληροφορικής όπου κάποια σχετική πληροφορία δεν είναι διαθέσιμη, τον αριθμό χρωμοσωμάτων και την συχνότητα % στην οποία συναντάται. Αν πρόκειται για νέα αλλαγή (ως τέτοια ορίζεται αυτή η οποία δεν αναφέρεται στις διαθέσιμες βάσεις δεδομένων, ειδικών αλλά και γενικών, ή αυτή η οποία δεν εντοπίζεται σε βιβλιογραφικές πηγές) τότε παρατίθενται τα προαναφερόμενα χαρακτηριστικά εντός χρωματιστών κελιών. Ακολουθεί έπειτα ο Πιν. 3.2 στον οποίο παρατίθενται για τις νέες αλλαγές τα δεδομένα που προκύπτουν από τους αλγόριθμους πρόγνωσης της επίδρασης των εν λόγω αλλαγών στην πρωτεΐνη, βάσει των οποίων πραγματοποιείται και ο χαρακτηρισμός ως πολυμορφικό εύρημα ή μετάλλαξη του Πιν.3.1.

Πιν.3.1. Συνολικός Πίνακας Ευρημάτων που Εντοπίστηκαν κατά την Εφαρμογή του Πρωτοκόλλου. (Με χρωματιστά κελιά παρατίθενται τα νέα ευρήματα.)

Χρωμοσωμική Θέση	Εντόπιση Εξώνιο(E) /Εσώνιο(I)	Τύπος Αλλαγής	Ονομασία Αλλαγής (Πράσινο: Πολυμορφισμός, Κόκκινο: Μετάλλαξη)	Αριθμός Χρωμοσωμάτων (Συχνότητα %)
chr7:117120141	5' UTR	SNV	c.-8G>C	46 (3.23)
chr7:117143718	I1	SNV	c.54-589A>G	145 (10.48)
chr7:117143782	I1	SNV	g.37945A>C (c.54-525A>C)	1 (0.07)
chr7:117144344	E2	SNV	R31C	1 (0.07)
chr7:117144378	E2	SNV	S42F	1 (0.07)
chr7:117144418	I2	SNV	c.164+1G>C	1 (0.07)
chr7:117144429	I2	SNV	c.164+12T>C	1 (0.07)
chr7:117144435	I2	SNV	g.38598G>A (c.164+18G>A)	1 (0.07)
chr7:117145779	I2	SNV	c.164+1362G>A	2 (0.14)
chr7:117145873	I2	INDEL	c.164+1457 delT	10 (0.72)
chr7:117148671	I2	SNV	g.42834A>G (c.165-417A>G)	1 (0.07)
chr7:117149125	E3	SNV	K68E	1 (0.07)
chr7:117149130	E3	SNV	p.(=)	1 (0.07)
chr7:117149147	E3	SNV	R75Q	6 (0.43)
chr7:117149177	E3	SNV	G85E	1 (0.07)
chr7:117149925	I3	SNV	g.44088A>G (c.273+728A>G)	2 (0.14)
chr7:117159081	I3	SNV	g.53244A>G (c.273+9884A>G)	1 (0.07)
chr7:117170947	I3	SNV	c.274-6T>C	2 (0.14)
chr7:117171014	E4	SNV	D112G	1 (0.07)
chr7:117171037	E4	SNV	A120T	2 (0.14)
chr7:117171096	E4	SNV	p.(=) (Δυνητική Τροποποίηση Ματίσματος)	1 (0.07)
chr7:117171122	E4	SNV	I148T	1 (0.07)
chr7:117171169	I4	SNV	c.489+1G>T	3 (0.22)
chr7:117171171	I4	SNV	c.489+3A>G	9 (0.65)
chr7:117171259	I4	SNV	c.489+91A>G	22 (1.59)
chr7:117171320	I4	SNV	g.65483G>T (c.489+152G>T)	1 (0.07)
chr7:117174214	I4	SNV	c.490-116A>G	1 (0.07)
chr7:117174349	E5	SNV	R170H	2 (0.14)
chr7:117174387	E5	SNV	L183I	1 (0.07)
chr7:117174422	I5	SNV	c.579+3A>G	1 (0.07)
chr7:117175188	I5	SNV	c.580-114C>T	1 (0.07)

chr7:117175210	I5	SNV	c.580-92T>A	3 (0.22)
chr7:117175273	I5	SNV	c.580-29C>T	1 (0.07)
chr7:117175323	E6	SNV	V201M	1 (0.07)
chr7:117175372	E6	SNV	E217G	3 (0.22)
chr7:117175505	I6	SNV	c.743+40A>G	84 (6.07)
chr7:117176568	I6	INDEL	c.744-33_744-30del	246 (17.8)
chr7:117176738	I7	SNV	c.869+11C>T	139 (10.04)
chr7:117176815	I7	SNV	c.869+88T>A	23 (1.66)
chr7:117179059	I7	SNV	c.870-1095A>C	1 (0.07)
chr7:117180174	E8	SNV	R297Q	3 (0.22)
chr7:117180186	E8	SNV	Y301C	1 (0.07)
chr7:117180196	E8	SNV	Y304*	1 (0.07)
chr7:117180211	E8	SNV	p.(=) (Δυνητική Τροποποίηση Ματίσματος)	1 (0.07)
chr7:117180256	E8	SNV	p.(=) (Δυνητική Τροποποίηση Ματίσματος)	1 (0.07)
chr7:117180327	E8	SNV	M348K	2 (0.14)
chr7:117182052	I8	SNV	c.1117-18G>T	1 (0.07)
chr7:117182116	E9	SNV	T388M	1 (0.07)
chr7:117182190	I9	SNV	c.1209+28C>T	1 (0.07)
chr7:117182241	I9	SNV	c.1209+79C>T	1 (0.07)
chr7:117188660	I9	INDEL	IVS8_7T	577 (41.69)
chr7:117188849	E10	INDEL	A455E	2 (0.14)
chr7:117199457	I10	SNV	c.1393-61A>G	245 (17.7)
chr7:117199517	I10	SNV	c.1393-1G>A	1 (0.07)
chr7:117199524	E11	SNV	L467F	4 (0.29)
chr7:117199533	E11	SNV	M470V	452 (32.66)
chr7:117199597	E11	SNV	C491F	1 (0.07)
chr7:117199641	E11	SNV	I506V	5 (0.36)
chr7:117199644	E11	INDEL	F508del	27 (1.95)
chr7:117199648	E11	SNV	F508C	1 (0.07)
chr7:117199666	E11	INDEL	Y515*	2 (0.14)
chr7:117199709	E11	SNV	p.(=) (Πολύ Πιθανή Τροποποίηση Ματίσματος)	20 (1.45)
chr7:117199793	I11	SNV	g.93956C>T (c.1584+84C>T)	1 (0.07)
chr7:117227805	E12	SNV	F533V	1 (0.07)
chr7:117227830	E12	SNV	L541P	2 (0.14)
chr7:117227832	E12	SNV	G542X	1 (0.07)
chr7:117227865	E12	SNV	R553G	2 (0.14)

chr7:117229536	I12	MNV	c.1680-871A>G & c.1680-870T>A	9 (0.65)
chr7:117229537	I12	SNV	c.1680-870T>A	444 (32.08)
chr7:117229563	I12	INDEL	g.123726_123727insTA (c.1680-844_1680-843insTA)	1 (0.07)
chr7:117230454	E13	SNV	G576A	6 (0.43)
chr7:117230457	E13	SNV	Y577C	1 (0.07)
chr7:117230566	I13	SNV	g.124729T>G	1 (0.07)
chr7:117231992	E14	SNV	V591L	1 (0.07)
chr7:117232171	E14	SNV	p.(=) (Δυνητική Τροποποίηση Ματίσματος)	1 (0.07)
chr7:117232223	E14	SNV	R668C	6 (0.43)
chr7:117232431	E14	SNV	S737F	3 (0.22)
chr7:117232466	E14	SNV	p.(=) (Δυνητική Τροποποίηση Ματίσματος)	3 (0.22)
chr7:117232481	E14	SNV	V754M	4 (0.29)
chr7:117232697	E14	SNV	E826K	1 (0.07)
chr7:117232755	I14	SNV	c.2490+44A>C	3 (0.22)
chr7:117234995	E15	SNV	F834L	1 (0.07)
chr7:117234999	E15	SNV	D836Y	2 (0.14)
chr7:117235052	E15	SNV	p.(=)	2 (0.14)
chr7:117235055	E15	SNV	p.(=) (Δυνητική Τροποποίηση Ματίσματος)	350 (25.29)
chr7:117235090	E15	SNV	C866Y	2 (0.14)
chr7:117242865	I15	SNV	c.2620-15C>G	21 (1.52)
chr7:117242922	I16	SNV	c.2657+5G>A	2 (0.14)
chr7:117243565	I16	SNV	c.2658-21G>T	1 (0.07)
chr7:117243663	E17	SNV	S912L	1 (0.07)
chr7:117243670	E17	SNV	p.(=)	1 (0.07)
chr7:117243684	E17	SNV	Y919C	1 (0.07)
chr7:117243686	E17	SNV	V920L	1 (0.07)
chr7:117243741	E17	SNV	V938G	1 (0.07)
chr7:117243826	E17	SNV	p.(=)	14 (1.01)
chr7:117243929	I17	SNV	c.2908+93C>T	2 (0.14)
chr7:117246657	I17	SNV	c.2909-71G>C	26 (1.88)
chr7:117246841	I17	SNV	g.141004T>C (c.2988+34T>C)	1 (0.07)
chr7:117250575	E19	SNV	L997F	13 (0.94)
chr7:117250679	E19	SNV	Y1032S	1 (0.07)
chr7:117250684	E19	SNV	L1034F	1 (0.07)

chr7:117250741	I19	SNV	c.3139+18C>T	1 (0.07)
chr7:117250765	I19	SNV	c.3139+42A>T	10 (0.72)
chr7:117250776	I19	SNV	g.144939T>C (c.3139+53T>C)	5 (0.36)
chr7:117250824	I19	SNV	c.3139+101C>G	1 (0.07)
chr7:117250861	I19	SNV	g.145024A>T (c.3139+138A>T)	1 (0.07)
chr7:117251543	I19	SNV	c.3140-92T>C	38 (2.75)
chr7:117251649	E20	SNV	F1052V	4 (0.29)
chr7:117251700	E20	SNV	G1069R	3 (0.22)
chr7:117251704	E20	SNV	R1070Q	1 (0.07)
chr7:117251717	E20	SNV	F1074L	1 (0.07)
chr7:117251780	E20	SNV	p.(=) (Δυνητική Τροποποίηση Ματίσματος)	3 (0.22)
chr7:117251899	I20	SNV	c.3367+37G>A	3 (0.22)
chr7:117254527	I20	SNV	c.3368-140A>C	282 (20.38)
chr7:117254688	E21	SNV	G1130A	1 (0.07)
chr7:117254708	E21	SNV	M1137V	1 (0.07)
chr7:117254753	E21	SNV	D1152H	1 (0.07)
chr7:117254800	I21	SNV	g.148963A>G (c.3468+33A>G)	1 (0.07)
chr7:117254818	I21	SNV	c.3468+51C>A	2 (0.14)
chr7:117267465	I21	SNV	c.3469-111G>C	8 (0.58)
chr7:117267476	I21	SNV	g.161639C>G (c.3469-100C>G)	1 (0.07)
chr7:117267511	I21	SNV	c.3469-65C>A	282 (20.36)
chr7:117267592	E22	SNV	R1162L	8 (0.58)
chr7:117267697	E22	SNV	H1197L	1 (0.07)
chr7:117267741	E22	SNV	V1212F	1 (0.07)
chr7:117267812	E22	SNV	S1235R	2 (0.14)
chr7:117267953	I22	INDEL	c.3717+130_3717+131delAT	4 (0.29)
chr7:117282620	E23	SNV	W1282X	2 (0.14)
chr7:117282644	E23	SNV	p.(=)	41 (2.96)
chr7:117282646	E23	SNV	Q1291R	1 (0.07)
chr7:117282764	I23	SNV	c.3873+117T>G	16 (1.16)
chr7:117292852	I23	SNV	g.187015T>C	2 (0.14)
chr7:117292899	E24	SNV	V1293I	1 (0.07)
chr7:117292919	E24	SNV	p.(=) (Δυνητική Τροποποίηση Ματίσματος)	8 (0.58)
chr7:117292931	E24	SNV	N1303K	1 (0.07)

chr7:117292957	E24	SNV	D1312G	3 (0.22)
chr7:117293022	I24	SNV	c.3963+39A>G	1 (0.07)
chr7:117293087	I24	SNV	g.187250G>C (c.3963+102G>C)	1 (0.07)
chr7:117304641	I24	SNV	g.198804G>A (c.3964-101G>A)	1 (0.07)
chr7:117304870	E25	SNV	p.(=) (Δονητική Τροποποίηση Ματίσματος)	1 (0.07)
chr7:117305631	I26	SNV	c.4242+13A>G	9 (0.65)
chr7:117306150	I26	SNV	c.4242+532C>T	2 (0.14)
chr7:117306258	I26	SNV	g.200421A>G (c.4242+639A>G)	2 (0.14)
chr7:117306850	I26	SNV	g.201013T>G (c.4243-112T>G)	1 (0.07)
chr7:117306991	E27	SNV	p.(=)	20 (1.45)
chr7:117307025	E27	SNV	L1436V (Δονητική Τροποποίηση Ματίσματος)	1 (0.07)
chr7:117307098	E27	SNV	S1460F	1 (0.07)
chr7:117307108	E27	SNV	p.(=)	309 (22.33)
chr7:117307145	E27	SNV	Q1476E	1 (0.07)
chr7:117307371	3'UTR	SNV	g.201534A>T (c.*4443+209A>T)	1 (0.07)
chr7:117307487	3'UTR	SNV	c.*325A>G	2 (0.14)
chr7:117307802	3'UTR	SNV	g.201965G>A (c.*4443+640G>A)	1 (0.07)
chr7:117308000	3'UTR	INDEL	g.202164_202164delA (c.*4443+839delA)	3 (0.22)
chr7:117308064	3'UTR	SNV	g.202227G>A (c.*4443+902G>A)	1 (0.07)
chr7:117308205	3'UTR	SNV	c.*1043A>C	10 (0.72)
chr7:117308413	3'UTR	SNV	c.*1251C>T	308 (22.25)
chr7:117308456	3'UTR	SNV	c.*1294G>A	6 (0.43)
chr7:117308480	3'UTR	SNV	g.202643T>C (c.*4443+1318T>C)	1 (0.07)
Σύνολο Χρωμοσωμάτων				1384 (692 Εξεταζόμενοι)
Σύνολο Γνωστών Αλλαγών				132
Σύνολο Νέων Άγνωστων Αλλαγών				26
Σύνολο Γνωστών και Νέων Άγνωστων Αλλαγών				158

Ακολουθεί κάτωθι ο Πιν.3.2 στον οποίο αναφέρονται οι νέες άγνωστες αλλαγές και τα score – χαρακτηρισμοί που αποδίδονται σε αυτές βάσει των εργαλείων βιοπληροφορικής. Συγκεκριμένα, έχει γίνει χρήση των αλγορίθμων που προσφέρονται από τον Ion Reporter, οι οποίοι είναι οι εξής:

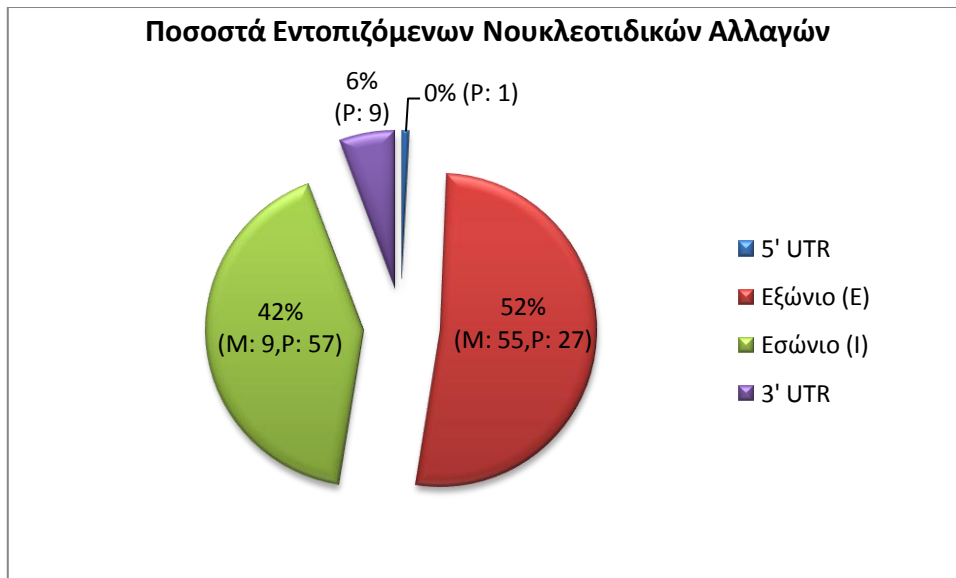
- PhyloP: Ο εν λόγω αλγόριθμος αναδεικνύει την συντήρηση θέσεων εξελικτικά. Παίρνει θετικές τιμές για συντηρημένες θέσεις και αρνητικές για θέσεις που εξελίσσονται ταχέως.
- SIFT: Ο εν λόγω αλγόριθμος αναλύει αν αμινοξικές αντικαταστάσεις που πραγματοποιούνται είναι «ανεκτές» ή όχι. Ως ανεκτές χαρακτηρίζονται αυτές που έχουν score >0.05 , ενώ ως μη ανεκτές αυτές που έχουν score ≤ 0.05 .
- Grantham: Ο εν λόγω αλγόριθμος εξετάζει τις διαφορές στις φυσικοχημικές ιδιότητες των αμινοξέων που αντικαθιστώνται. Το εύρος τιμών είναι από 5 έως 215, με τις υψηλότερες τιμές να λαμβάνονται όταν παρουσιάζονται ριζικές αλλαγές στις ιδιότητες των αμινοξέων.
- PolyPhen: Ο εν λόγω αλγόριθμος πραγματοποιεί σύγκριση των ιδιοτήτων του φυσικού αλληλομόρφου και των αντίστοιχων ιδιοτήτων του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου. Παίρνει τις τιμές 0.0-0.15: benign, 0.15-1: possibly damaging for function, 0.85-1: more confidently damaging for function.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δεδομένων με προσφερόμενους από ερευνητικά και πανεπιστημιακά ιδρύματα αλγορίθμων, οι οποίοι είναι οι εξής:

- MutationTaster: Ο εν λόγω αλγόριθμος αποδίδει άμεσα χαρακτηρισμό στο εξεταζόμενο εύρημα και παραθέτει πληθώρα σχετικών στοιχείων.
- Human Splicing Finder (HSF): Ο εν λόγω αλγόριθμος πραγματοποιεί διερεύνηση στο αν επηρεάζεται ή όχι κάποιο splicing site και δύναται να εντοπίσει cryptic splicing sites.
- PredictSNP: Ο εν λόγω αλγόριθμος κάνει χρήση άλλων αλγορίθμων και στηριζόμενος στα αποτελέσματά τους αποδίδει ένα τελικό πόρισμα.
- I-Mutant: Ο εν λόγω αλγόριθμος εξετάζει αν η αμινοξική αλλαγή επηρεάζει τη σταθερότητα του πρωτεϊνικού μορίου.

Πιν.3.2. Οι Νέες Αλλαγές και οι Χαρακτηρισμοί – Score των Εργαλείων Βιοπληροφορικής. (Πράσινο: Καμία επίδραση του ευρήματος, Κόκκινο: Αρνητική επίδραση του ευρήματος, ---: Δεν παρέχεται πληροφορία μέσω του προγράμματος)

Όνομασία Αλλαγής	Εργαλεία Βιοπληροφορικής							
	PhyloP	SIFT	Grantham	Poly Phen	Mutation Taster	HSF	Predict SNP	I-Mutant
g.37945A>C (c.54-525A>C)	-0.31	---	---	---				---
g.38598G>A (c.164+18G>A)	0.67	---	---	---				---
g.42834A>G (c.165-417A>G)	0.01	---	---	---				---
g.44088A>G (c.273+728A>G)	-1.4	---	---	---				---
g.53244A>G (c.273+9884A>G)	-1.27	---	---	---				---
g.65483G>T (c.489+152G>T)	-0.91	---	---	---				---
g.93956C>T (c.1584+84C>T)	-0.62	---	---	---				---
g.123726_123727insTA (c.1680-844_1680-843insTA)	0.16	---	---	---			---	---
V591L	0.76	0.17	32.0	0.0				
g.141004T>C (c.2988+34T>C)	0.38	---	---	---				---
L1034F	2.94	0.0	22.0	1.0				
g.144939T>C (c.3139+53T>C)	-0.38	---	---	---				---
g.145024A>T (c.3139+138A>T)	-1.05	---	---	---				---
g.148963A>G (c.3468+33A>G)	2.17	---	---	---				---
g.161639C>G (c.3469-100C>G)	-0.05	---	---	---				---
g.187250G>C (c.3963+102G>C)	1.05	---	---	---				---
g.198804G>A (c.3964-101G>A)	-0.14	---	---	---				---
g.200421A>G (c.4242+639A>G)	0.44	---	---	---				---
g.201013T>G (c.4243-112T>G)	0.07	---	---	---				---
L1436V	0.06	0.14	32.0	0.0				
Q1476E	2.73	0.01	29.0	0.133				
g.201534A>T(c.*4443+209A>T)	0.51	---	---	---		---		---
g.201965G>A(c.*4443+640G>A)	-0.7	---	---	---		---		---
g.202164_202164delA(c.*4443+839delA)	0.82, 0.55	---	---	---		---	---	---
g.202227G>A(c.*4443+902G>A)	-0.36	---	---	---		---		---
g.202643T>C(c.*4443+1318T>C)	0.4	---	---	---		---		---



Διαγ.3.1. Διαγραμματική απεικόνιση σε ποσοστά των εντοπιζόμενων αλλαγών στις περιοχές του γονιδίου *CFTR*. (M: Μεταλλάξεις, P: Πολυμορφισμοί)

3.1.2 Ανάλυση Αποτελεσμάτων Κατηγορίας Δειγμάτων β

Τα δείγματα της κατηγορίας β, αποτελούνται από το γενωμικό DNA τριών επιλεγμένων δειγμάτων που ανήκουν στην πρώτη κατηγορία με εσωτερικούς κωδικούς: 82598, 82601 και ELE, και τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως αρχικό υλικό για την προσομοίωση ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο πλάσμα της μητέρας (όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2). Το δείγμα ELE έφερε την παθολόγο μεταλλαγή F508del καθώς και επτά (7) πολυμορφικά ευρήματα, εκ των οποίων έξι (6) είναι ίδια με του δείγματος 82598 που αντιπροσωπεύει ένα από τα δύο μητρικά DNA. Τα δείγματα 82598 και 82601 αντιπροσώπευαν το μητρικό DNA. Το δείγμα 82598 έφερε την παθολόγο μεταλλαγή F508del καθώς και έξι (6) πολυμορφικά ευρήματα, ενώ το δείγμα 82601 δεν έφερε κάποιο πολυμορφικό εύρημα ή μεταλλαγή. Στα δείγματα αυτά ανιχνεύθηκε το ποσοστό % των μεταλλάξεων και των πολυμορφισμών του καθοριζόμενου ως ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στις εξής παρασκευασθέντες προσομοιώσεις:

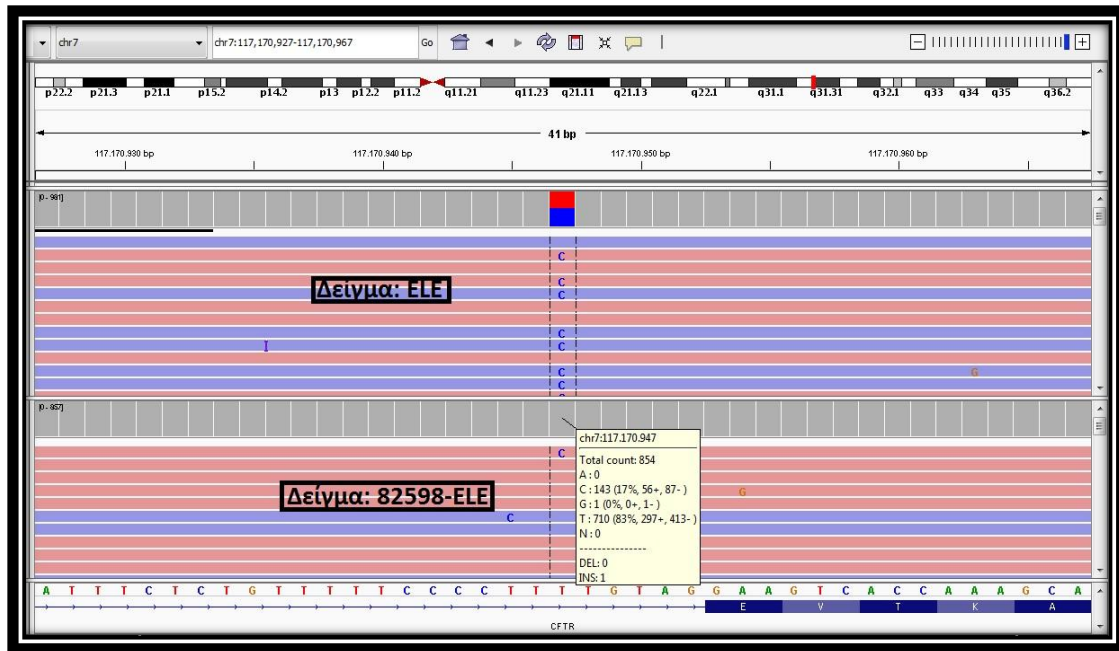
- iii. 82598-ELE και 82601-ELE σε ποσοστό 90%-10%.
- iv. 82601-ELE σε ποσοστό 94%-6% και 97%-3%.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι μεταλλάξεις και οι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν στα δείγματα ELE, 82598 και 82601 ήταν σε ετερόζυγη μορφή.

Πιν.3.3. Προσομοιώσεις εμβρυικού DNA σε μητρικό σε ποσοστό 10%.				
Μεταλλάξεις/ Πολυμορφισμοί Δείγματος ELE (Εμβryo)	Μεταλλάξεις/ Πολυμορφισμοί Δείγματος 82598 (Μητέρα I)	Μεταλλάξεις/ Πολυμορφισμοί Δείγματος 82601 (Μητέρα II)	% Εντοπιζόμενες Μεταλλάξεις/ Πολυμορφισμοί 82598-ELE 10%	% Εντοπιζόμενες Μεταλλάξεις/ Πολυμορφισμοί 82601-ELE 10%
chr7:117143718 (c.54-589A>G)	chr7:117143718 (c.54-589A>G)	---	A: 46%, G: 54%	A: 87%, G: 13%
chr7:117170947 (c.274-6T>C)	---	---	T: 83%, C: 17%	T: 92%, C: 8%
chr7:117176568 (c.744- 33_744-30delGATT)	chr7:117176568 (c.744- 33_744-30delGATT)	---	GATT: 51%, delGATT: 49%	GATT: 88%, delGATT: 12%
chr7:117176738 (c.869+11C>T)	chr7:117176738 (c.869+11C>T)	---	C: 51%, T: 49%	C: 90%, T: 10%
chr7:117199457 (c.1393-61A>G)	chr7:117199457 (c.1393-61A>G)	---	A: 52%, G: 48%	A: 92%, G: 8%
chr7:117199533 (M470V, c.1408G>A)	chr7:117199533 (M470V, c.1408G>A)	---	G: 52%, A: 48%	G: 91%, A: 9%
chr7:117199644 (F508del, c.1520_1522delTCT)	chr7:117199644 (F508del, c.1520_1522delTCT)	---	TCT: 49%, delTCT: 51%	TCT: 92%, delTCT: 8%
chr7:117229537 (c.1680-870T>A)	chr7:117229537 (c.1680-870T>A)	---	T: 38%, A: 63%	T: 93%, A: 7%

Το δείγμα 82598-ELE εμφάνιζε ένα μέσο βάθος διαβάσματος (depth of coverage) της τάξεως των ~700 διαβασμάτων. Εξαίρεση αποτελεί το εσώνιο 12, όπου εντοπίζεται το πολυμορφικό εύρημα chr7:117229537 (c.1680-870T>A), στο οποίο δεν λειτούργησε η βιβλιοθήκη και λήφθηκε βάθος διαβάσματος των 16 μόνο αμπλικονίων.

Το δείγμα 82601-ELE εμφάνιζε ένα μέσο βάθος διαβάσματος (depth of coverage) της τάξεως των ~800 διαβασμάτων.



Εικ.3.1. Απεικόνιση της chr7:117170947 (c.274-6T>C) στα δείγματα ELE και 82598-ELE. (Προσωπική λήψη με χρήση του προγράμματος IGV)

Πιν.3.4. Προσομοιώσεις εμβρυικού DNA σε μητρικό σε ποσοστό 6% και 3%.

Μεταλλαγές/ Πολυμορφισμοί Δείγματος ELE (Εμβryo)	Μεταλλαγές/ Πολυμορφισμοί Δείγματος 82601 (Μητέρα II)	% Εντοπιζόμενες Μεταλλαγές/ Πολυμορφισμοί 82601-ELE 6%	% Εντοπιζόμενες Μεταλλαγές/ Πολυμορφισμοί 82601-ELE 3%
chr7:117143718 (c.54-589A>G)	---	A: 94%, G: 6%	A: 90%, G: 10%
chr7:117170947 (c.274-6T>C)	---	T: 94%, C: 6%	T: 94%, C: 6%
chr7:117176568 (c.744-33_744-30delGATT)	---	GATT: 94%, delGATT: 6%	GATT: 95%, delGATT: 5%
chr7:117176738 (c.869+11C>T)	---	C: 95%, T: 5%	C: 94%, T: 6%
chr7:117199457 (c.1393-61A>G)	---	A: 93%, G: 7%	A: 95%, G: 5%
chr7:117199533 (M470V, c.1408G>A)	---	G: 94%, A: 6%	G: 95%, A: 5%
chr7:117199644 (F508del, c.1520_1522delTCT)	---	TCT: 96%, delTCT: 4%	TCT: 91%, delTCT: 9%
chr7:117229537 (c.1680-870T>A)	---	T: 95%, A: 5%	T: 95%, A: 5%

Το δείγμα 82601-ELE 6% εμφάνιζε ένα μέσο βάθος διαβάσματος (depth of coverage) της τάξεως των ~540 διαβασμάτων.

Το δείγμα 82601-ELE 3% εμφάνιζε ένα μέσο βάθος διαβάσματος (depth of coverage) της τάξεως των ~180 διαβασμάτων.

Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα – Συζήτηση

4.1 Συμπεράσματα – Συζήτηση

Μέσω της εφαρμογής του πρωτοκόλλου NGS, για την αλληλούχιση του γονιδίου *CFTR*, προκύπτουν σωρεία αποτελεσμάτων τόσο σε επίπεδο καθημερινής διαγνωστικής ρουτίνας (που χαρακτηρίζει τα δείγματα κατηγορίας α), όσο και σε επίπεδο έρευνας στο πεδίο του NIPD (που χαρακτηρίζει τα δείγματα κατηγορίας β).

Συγκεκριμένα, μέσω της εφαρμογής του πρωτοκόλλου NGS για τα δείγματα της κατηγορίας α, που αφορούν δείγματα καθημερινής διαγνωστικής ρουτίνας, εντοπίστηκαν αλλαγές ήδη υπάρχουσες και καταχωρημένες σε διεθνείς βάσεις δεδομένων που αφορούν τη νόσο της Κυστικής Ίνωσης αλλά και σε παγκόσμια βιβλιογραφία. Αυτές αριθμούσαν τις εκατό τριάντα δύο (132) εκ των εκατό πενήντα οχτώ (158) εντοπιζόμενων αλλαγών. Ως νέα εντοπιζόμενα ευρήματα, αναφέρονται είκοσι έξι (26) εκ των εκατό πενήντα οχτώ (158) εντοπιζόμενων αλλαγών, τα οποία χαρακτηρίζονται ως VOUS (Variant Of Unknown Significance) και είναι αυτά τα οποία μετά από ενδελεχή αναζήτηση των προαναφερόμενων πηγών δεν φαίνεται να έχουν αναφερθεί και περιγραφεί (βλέπε Πιν.3.1).

Η κατάλληλη χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων συνέβαλλε σε μια *in silico* προσέγγιση όλων των ευρημάτων, αποδίδοντας τους τον χαρακτηρισμό είτε της μεταλλάξεως είτε του πολυμορφισμού βάσει της επίπτωσης που είχε κάθε νουκλεοτιδική αλλαγή σε επίπεδο δομής - λειτουργίας του πρωτεϊνικού μορίου *CFTR* ή της δυνητικής τροποποίησης θέσεως ματίσματος. Μια εις βάθος προσέγγιση εφαρμόστηκε ιδίως για τα νέα ευρήματα (βλέπε Πιν.3.2). Προκύπτει ότι εκ του συνόλου των εντοπιζόμενων ευρημάτων, το 52% (82 εκ των 158 ευρημάτων) ευρίσκεται σε εξωνικές περιοχές όπου ως μεταλλάξεις χαρακτηρίζονται οι 55/82 και ως πολυμορφισμοί οι 27/82 εκ των οποίων ευρημάτων έντεκα (11) (δέκα (10)

συνώνυμες και μία (1) αλλαγή αμινοξέος) αποτελούν δυνητικές θέσεις τροποποίησης ματίσματος (βάσει του αλγορίθμου HSF ο οποίος δύναται να ανιχνεύει κρυπτικές περιοχές ματίσματος αναφερόμενες βιβλιογραφικά ως cryptic splicing sites, δίνοντας μια νέα διάσταση στις ως πλέον χαρακτηριζόμενες «ακίνδυνες» σιωπηλές-συνώνυμες μεταλλάξεις). Το 42% (66 εκ των 158 ευρημάτων) ευρίσκεται σε εσωνικές περιοχές όπου ως μεταλλάξεις χαρακτηρίζονται οι 9/66 και ως πολυμορφισμοί οι 57/66. Στην περιοχή 3'UTR εντοπίστηκε μία (1) αλλαγή η οποία χαρακτηρίζεται ως πολυμορφικό εύρημα, ενώ στην 5'UTR εντοπίστηκαν εννιά (9) ευρήματα που χαρακτηρίστηκαν ως πολυμορφισμοί.

Όπως φαίνεται, το μεγαλύτερο ποσοστό αλλαγών εντοπίζεται σε εξωνικές περιοχές, κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο βάσει του σχεδιασμού του εμπορικού panel το οποίο χρησιμοποιήθηκε, το οποίο στοχεύει κατά κύριο λόγο σε αυτές και δευτερευόντως σε εσωνικές περιοχές. Παρ' όλα αυτά το ποσοστό των εντοπιζόμενων εσωνικών ευρημάτων είναι αρκετά υψηλό· της τάξεως του 42% όπου το μεγαλύτερο ποσοστό τους χαρακτηρίζονται πολυμορφισμοί, μια τάξη μεγέθους που μπορεί να αιτιολογηθεί βάσει του μεγάλου μεγέθους του γονιδίου *CFTR*, του οποίου τα εσώνια κατέχουν την μεγαλύτερη έκταση. Μπορεί να θεωρηθεί ότι αυτό μπορεί να προσδίδει ενός είδους προστασία στις σημαντικές περιοχές του γονιδίου. Εν αντιθέσει με τις εσωνικές περιοχές, οι εξωνικές αριθμούν μεγαλύτερο αριθμό χαρακτηριζόμενων ως μεταλλάξεων ευρημάτων λόγω ότι αποτελούν τις κωδικοποιούσες περιοχές βάσει των οποίων τοποθετούνται τα αμινοξικά κατάλοιπα στο πρωτεϊνικό μόριο. Η επικείμενη τροποποίηση τους οδηγεί συνήθως σε αλλαγές των φυσικοχημικών ιδιοτήτων που χαρακτηρίζουν συντηρημένες θέσεις του πρωτεϊνικού μορίου, οδηγώντας σε «παραβίαση» περιορισμών, διαταράσσοντας τη λειτουργία του. Οι δώδεκα (12) πιο συχνές εντοπιζόμενες μεταλλάξεις σε εξωνικές περιοχές είναι οι εξής: **F508del**, **L997F**, **R1162L**, **R668C**, **G576A**, **F1052V**, **V754M**, **E217G**, **S737F**, **D1312G**, **R297Q**, **G1069R**. Η **F508del** εμφανίζεται να κατέχει την υψηλότερη συχνότητα μεταξύ των εντοπιζόμενων χαρακτηριζόμενων μεταλλάξεων, κάτι που συμφωνεί με τα διεθνή και εθνικά βιβλιογραφικά δεδομένα (βλέπε Πιν.1.2 και Πιν.1.3). Ως συχνότερο πολυμορφικό εύρημα εντοπιζόμενο σε εξωνική περιοχή αποτελεί η **M470V**.

Η εφαρμογή του NGS στην καθημερινή διαγνωστική ρουτίνα της νόσου της Κυστικής Ύψωσης αναδεικνύει τη δυναμική της εν λόγω τεχνολογίας. Μια τεχνολογία αιχμής, που αποκαλύπτει «μυστικά» ενός γονιδίου που θεωρείται γνωστό εδώ και περίπου τρεις δεκαετίες. Τα νέα αυτά εντοπιζόμενα ευρήματα απαιτούν πλέον την επαλήθευση τους ως προς την πρόγνωση που προσδόθηκε σε αυτά βάσει της *in silico* προσέγγισης, κάτι το οποίο μπορεί να επιτευχθεί με *in vitro* πειραματικές διαδικασίες που μιμούνται κατά κύριο λόγο το αναπνευστικό επιθήλιο καθώς και *in vivo* προσεγγίσεις όπως π.χ. χρήση διαγονιδιακών ποντικών. Η επίδραση αλλαγών σε περιοχές εκτομής δύναται να μελετηθεί με την προσέγγιση *mini-gene*. Η μελέτη λοιπών γονιδίων που δύναται να τροποποιούν την έκφραση του γονιδίου *CFTR*, μεταβάλλοντας τον συσχετισμό γονοτύπου-φαινοτύπου, αποτελεί μια μελλοντική προοπτική που εντάσσεται στα πλαίσια της εξατομικευμένης ιατρικής προσέγγισης.

Η εφαρμογή του πρωτοκόλλου του NGS στο πεδίο του NIPD πραγματοποιήθηκε με την χρήση προσομοιώσεων του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο ελεύθερο DNA της μητέρας στο πλάσμα του περιφερικού αίματος σε συγκεντρώσεις της τάξεως του 10%, 6% και 3%, με σκοπό την διερεύνηση της δυναμικής της ανίχνευσης στοχευόμενα μεταλλάξεων πατρικής προέλευσης. Τα εν λόγω ποσοστά επιλέχθηκαν βάσει διερεύνησης της σχετικής βιβλιογραφίας (βλέπε Υποκεφάλαιο 1.9.1). Το δείγμα (ELE) το οποίο χρησιμοποιήθηκε για να προσομοιάσει το έμβρυο έφερε επτά (7) πολυμορφισμούς και μία (1) μετάλλαξη, την **F508del**. Ως μητέρες ορίστηκαν δύο δείγματα για το ποσοστό των 10%, μια μητέρα (82598) η οποία έφερε έξι (6) ίδια πολυμορφικά ευρήματα και την ίδια μετάλλαξη με το εμβρυϊκό DNA και μια μητέρα (82601) η οποία δεν έφερε κανένα εύρημα.

Στο ποσοστό 10% παρατηρείται ότι στο δείγμα 82598-ELE η δυνατότητα ανίχνευσης του αναφερόμενου ως εμβρυϊκού DNA καθίσταται αδύνατη για τις αλλαγές που είναι κοινές μεταξύ του εμβρύου και της μητέρας 82598. Οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται δεν αποτελούν σαφή εικόνα που θα μπορούσε να συμβάλει στον χαρακτηρισμό ενός ποσοστού ως ανήκων στο εμβρυϊκό DNA, καθώς εντοπίζονται εντός του εύρους των διακυμάνσεων που παρουσιάζονται στις αλληλουχίσεις και απλών δειγμάτων. Ο πολυμορφισμός που δεν είναι κοινός μεταξύ του εμβρύου ELE και της μητέρας 82598, που προσομοιώνει ένα πατρικής

προέλευσης στοιχείο, εντοπίζεται με επιτυχία σε ένα ποσοστό 17% του συνολικού αριθμού των διαβασμάτων που αφορούν την εν λόγω θέση. Το ποσοστό αυτό ξεπερνά το 10%, κάτι που μπορεί να οφείλεται σε σφάλμα (bias) του ερευνητή κατά την διεξαγωγή της αραίωσης ή πιθανής απορρύθμισης της χρησιμοποιούμενης πιπέτας. Στο δείγμα της μητέρας 82601 στο ποσοστό 10% παρατηρούμε ότι ανιχνεύεται το προσομοιωθέν πατρικό αλληλόμορφο του εμβρύου σε ποσοστό ~9.38%. Αντιστοίχως, στο ποσοστό 6% της μητέρας 82601, ανιχνεύονται επιτυχώς όλοι οι πατρικοί πολυμορφισμοί καθώς και η μετάλλαξη σε ποσοστό ~5.63%. Στο ποσοστό 3% της μητέρας 82601, το ποσοστό που ανιχνεύεται είναι ~6.38%, κάτι που μπορεί να οφείλεται σε σφάλμα (bias) του ερευνητή κατά την διεξαγωγή της αραίωσης ή άλλα τεχνικά προβλήματα. Η επιτυχής ανίχνευση του προσομοιωθέντος εμβρυϊκού DNA στα αναφερόμενα ποσοστά αποτελεί το πρώτο βήμα στην διαδικασία της εφαρμογής της εν λόγω τεχνολογίας στο πεδίο του NIPD.

Ως μελλοντική προοπτική της εν λόγω πειραματικής διαδικασίας προτείνεται ο σχεδιασμός εκκινητών (primers) που στοχεύουν σε συγκεκριμένες μεταλλάξεις και η εφαρμογή τους σε πραγματικά δείγματα από γυναίκες που κυοφορούν. Ο βιολογικός πατέρας θα πρέπει να φέρει μετάλλαξη που δεν θα φέρει όμοια της η μητέρα ώστε να καθίσταται εύκολος ο εντοπισμός της. Η στοχευόμενη προσέγγιση της μετάλλαξης πρέπει κατά προτίμηση να παρουσιάζει υψηλά ποσοστά διαβάσματος (depth of coverage) διασφαλίζοντας την ποιότητα του αποτελέσματος.

Όπως διαφάνηκε από την κατηγορία δειγμάτων α της καθημερινής διαγνωστικής ρουτίνας, ομοίως και στα δείγματα της κατηγορίας β, αυτά που αφορούν το NIPD, αναδεικνύεται το NGS ως ένα πολύτιμο εργαλείο στα χέρια του κλινικού γενετιστή και ερευνητή παρουσιάζοντας ένα νέο πεδίο εφαρμογών. Ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος μέσω του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA οδηγεί την διάγνωση ένα βήμα μπροστά στο μέλλον. Η εισαγωγή του NIPD στην καθημερινή πρακτική ρουτίνα είναι κάτι το οποίο σύντομα θα χαρακτηρίζεται πλέον ως δεδομένο. Η δυνατότητα ανάπτυξης της όλης διαδικασίας ως μιας in-house μεθόδου θα μειώσει σημαντικά το κόστος της. Απαραίτητο βήμα προς αυτήν την κατεύθυνση είναι η επικύρωση της μεθόδου. Η γνώση της αλληλουχίας και των δύο γονέων είναι κάτι το οποίο είναι απαραίτητο για να εφαρμοστεί ο μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος. Δυσκολία υπάρχει όπως φάνηκε στην περίπτωση όπου συμπίπτουν οι πατρικές με τις

μητρικές αλλαγές, κάτι το οποίο μπορεί να αντιμετωπιστεί με την χρήση πληροφοριακών πολυμορφισμών που θα οδηγήσουν στην αναφερόμενη RHDO analysis (Relative Haplotype DOSage analysis), μια διαδικασία ανίχνευσης των πατρικά κληρονομούμενων αλλαγών βάσει ποσόστωσης των ευρισκόμενων απλοτύπων.

Εν κατακλείδι, η νόσος της Κυστικής Ίνωσης και εν γένει τα γενετικά νοσήματα αποκτούν μια άλλη διάσταση στην αναφερόμενη ως NGS-era. Μια πληθώρα αναδυόμενων πληροφοριών μεγάλου όγκου, καλεί τους επιστήμονες να αναπτύξουν νέους τρόπους διαχείρισης και αξιοποίησης της προσληφθείσας πληροφορίας προς όφελος της ανθρωπότητας. Σημείο αναφοράς αυτής της περιόδου πρέπει να αποτελεί η διερεύνηση των βιοηθικών προεκτάσεων που εγείρονται δια μέσω της χρήσεως αυτής της τεχνολογίας αιχμής, ώστε δια της ορθής εφαρμογής της να γίνει πραγματικότητα η ρήση του Thomas H.Huxley:

«Το γνωστό είναι πεπερασμένο, το άγνωστο ατελείωτο. Στεκόμαστε πάνω σε ένα νησί στη μέση ενός απεριόριστου, ανεξήγητου ωκεανού. Το καθήκον κάθε γενιάς είναι να αποκτήσει λίγη περισσότερη γη...»

Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, *et al.* (2007): Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn*, 27:415-8.

Ashoor G, Syngelaki A, Poon LCY, Rezende JC, Nicolaides KH (2013): Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 41: 26-32.

Augarten A, Kerem BS, Yavah Y, Noiman S, Rivlin Y, Tal A, Blau H, Ben-Tur L, Szeinberg A, Kerem E, Gazit E (1993): "Mild cystic fibrosis and normal or borderline sweat test in patients with the 3849+10kbC>T mutation". *Lancet*; 342: 25.

Babiarz *et al.* (2015): Cell free DNA diagnostic testing standards, *Patent Application Publication: WO2015048535 A1*

Barra GB, *et al.* (2014): Fetal male lineage determination by analysis of Y-chromosome STR-haplotype in maternal plasma. *Forensic Sci. Int. Genet.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.11.006>

Basso C, Vergani P, Nairn AC, Gadsby DC (2003): Prolonged nonhydrolytic interaction of nucleotide with CFTR's NH2-terminal nucleotide binding domain and its role in channel gating. *The Journal of general physiology*; 122(3):333-48.

Bell CJ, Dinwiddie DL, Miller NA *et al.* (2011): Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. *Sci Transl Med*; 3:65ra4.

Blackman SM, Deering-Brose R, McWilliams R, Naughton K, Coleman B, Lai T, Algire M, Beck S, Hoover-Fong J, Hamosh A, Fallin MD, West K, Arking DE, Chakravati A, Cutler DJ, Cutting GR (2006): Relative contribution of genetic and non-genetic modifiers to intestinal obstruction in cystic fibrosis. *Gastroenterology*; 131: 1030-1039.

Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM (2002): Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*; 19: 575–606.

Bolliger CT *et al.* (2006): Cystic Fibrosis in the 21th Century. *Progress in Respiratory Research*, Vol.34

Boon EMJ and Faas BHW (2013): Benefits and limitations of whole genome versus targeted approaches for noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidies. *Prenatal Diagnosis*, 33, 563-568.

Boyle MP, De Boeck K (2013): A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *The Lancet Respiratory Medicine*, 158–163

Bragg ML, Stone G, Butler M, Hugenholtz P, Tyson GW (2013): Shining a light on Dark Sequencing: Characterising Errors in Ion Torrent PGM Data. *PLoS, Comput Biol* 9(4): e1003031. doi:10.1371/journal.pcbi.1003031

Bramanti, B., Sineo, L., Vianello, M. *et al.* (2000): The selective advantage of cystic fibrosis heterozygotes tested by aDna analysis: A preliminary investigation. *Int. J. Anthropol.*, 15: 255. doi:10.1007/BF02445136

CeDAP: Certificato di assistenza al parto (2008): Analisi dell'evento nascita – Anno 2008. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1551_allegato.pdf.

Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, *et al.* (2004): Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*; 50:88-92.

Chan KC (2014): Clinical applications of the latest molecular diagnostics in noninvasive prenatal diagnosis. *Top Curr Chem*;336: 47-65.

Chou JI, Rozmahel R, Tsui LC (1991): "Characterization of the promoter region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene". *J Biol Chem*; 266: 24471.

Chu CS, Trapnell BC, Murtagh JJJr, Moss J, Dalemans W, Jallat S, Mercenier a, Pavirani A, Lecocq JP, Cutting GR, Guggino WB, Crystal RG (1992): "Cystic

fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene transcripts". *EMBO J*; 11: 379.

Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG (1993): "Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA". *Nat Genet*; 3:151.

Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, *et al.* (1998): Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med*, 339(10):653–658.

Collins FS (1992): Cystic Fibrosis: Molecular Biology and Therapeutic Implications. *Science*; 256: 774-779.

Costes B, Girodon E, Ghanem N, Fiori E, Jardin A, Soufir JC, Goossens M (1995): "Frequent occurrence of the CFTR intron 8 (TG)_n5T allele in men with congenital bilateral absence of the vas deferens". *Eur J Hum Genet*; 3: 285-293

Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, Jorissen M, Droogmans G, Reynaert I, Goossens M, Nilius B, Cassiman JJ (1998): Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)_m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest*;101: 487–496.

Cutting GR, Kasch LM, Rosenstein BJ, Tsui LC, Kazazian HHJr, Antonarakis SE (1990): "Two patients with cystic fibrosis, nonsense mutations in each cystic fibrosis gene, and mild pulmonary disease". *N Engl J Med*; 323: 1685.

Daber R, Sukhadia S and Morrissette JJ (2013): Understanding the limitations of next generation sequencing informatics, an approach to clinical pipeline validation using artificial data sets. *Cancer Genetics*, 206(12), 441-448

Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Lange P, *et al.* (1998): DeltaF508 heterozygosity in cystic fibrosis and susceptibility to asthma. *Lancet*, 351(9120):1911–1913.

Drumm M, Konstan M, Schlunchter M, Handler A, Pace R, Zou F, Zariwala M, *et al.* (2005): Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med*: 353:1443-53.

- Dumur V, Gervais R, Rigot JM, *et al.* (1996): Congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD) and cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR): correlation between genotype and phenotype. *Hum Genet*, 97(1):7–10.
- Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, *et al.* (2011): Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *American journal of Obstetrics and Gynecology*, 204:205.e1-11.
- Estivili X (1996): "Complexity in a monogenic disease". *Nat Genet*; 12: 348-350.
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR (2010): Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing, *Clin. Chem.*, 56; 1279–1286.
- Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, *et al.* (2008): Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J Pediatr*, 153:S4–S14.
- Franca LTC, Carrilho E, Kist TBL (2002): A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of biophysics*, 35, 2, pp. 169-200.
- Gil MM, Akolekar R, Quezada MS, Bregant B, Nicolaides KH (2014): Analysis of Cell-Free DNA in Maternal Blood in Screening for Aneuploidies: Meta-Analysis. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 35; 156-173.
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR (2016): Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews: Genetics*, Vol.17, 333-351
- Grada A and Weinbrecht K (2013): Next-generation sequencing: methodology and application. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(8), e11.
- Groman JD, Hefferon TW, Casals T, Bassas L, Estivill X, Des Georges M, Guittard, Koudova M, Fallin MD, Nemeth K, Fekete G, Kadasi L, Friedman K, Schwarz M, Bombieri C, Pignatti PF, Kanavakis E, Tzetis M, Schwartz M, Novelli G, D'Apice MR, Sobczynska-Tomaszewska A, Bal J, Stuhmann M, Macek M Jr, Claustres M, Cutting GR (2004): Variation in a repeat sequence determines whether a common variant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is pathogenic or benign. *Am J Hum Genet*;74:176–179.

Guggino WB, Stanton Ba (2006): New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nature reviews, Molecular Cell Biology*; 7(6): 426-36.

Guissart C, Debant V, Desgeorges M *et al.* (2015): Non-invasive prenatal diagnosis of monogenic disorders: an optimized protocol using MEMO qPCR with miniSTR as internal control. *Clin Chem Lab Med*, 53(2): 205-215.

Haggie MP, Verkman AS (2008): Monomeric CFTR in Plasma Membrane in Live Cells Revealed by Single Molecule Fluorescence Imaging. *J. Biol. Chem.*, 283:23510-23513.

Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z, *et al.* (1994): A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. *N Engl J Med*, 331(15):974–980.

Holmberg RC, Gindlesperger A, Stokes T *et al.* (2013): Akonni TruTip and Qiagen Methods for Extraction of Fetal Circulating DNA – Evaluation by Real-Time and Digital PCR. *PLoS ONE*, 8(8): e73068.

Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Samura O, Kinutani M, Hara T, *et al.* (2002): Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet*; 110:75-9.

Jordan IK, Karthik CK, Guiying C, Thompson CH, McCarty NA (2015): Evolutionary and functional divergence between the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and related ATP-binding cassette transporters. *PNAS*, vol.105, no 48, 18865-18870

Kanavakis E, Tzetis M, Antoniadis Th *et al.* (1995): Mutations analysis of exons of the CFTR gene in Greek cystic fibrosis patients: characterization of 74.5% of CF alleles including a novel mutation. *Hum Genet*; 96: 364-366.

Kanavakis E, Efthymiadou A, Strofalis S, Doudounakis S, Traeger-Synodinos J and Tzetis M (2003): Cystic fibrosis in Greece: molecular diagnosis, haplotypes, prenatal diagnosis and carrier identification amongst high-risk individuals. *Clin Genet*, 63:400-409

Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. (1989): Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis, *Science*; 245: 1073-1080.

Khalid R and Sabahuddin A (2016): Principle, analysis, application and challenges of next-generation sequencing: a review. *Cornell University Library*: <https://arxiv.org/abs/1606.05254>

Koh J, Sferra TJ, Collins FS (1993): "Characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator promoter region: Chromatin context and tissue specificity". *J Biol Chem*; 268: 15912.

Kotsopoulou I, Tsoplou P, Mavrommatis K, Kroupis C (2015): Non-invasive prenatal testing (NIPT): limitations on the way to become diagnosis. *Diagnosis*, 2(3): 141-158.

Lam KW, Jiang P, Chan KC, Leung TY, Chiu RW, Lo YM (2012): Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by targeted massively parallel sequencing of maternal plasma: application to β -thalassemia. *Clin Chem*, 58(10): 1467-75.

Leach MW (2011): Abortions on Disabled Babies: The Prenatal Testing Sham, *LIFENEWS.COM*, <http://www.lifenews.com/2011/05/25/abortions-on-disabled-babies-the-prenatal-testing-sham/>

Ledergerber C and Dessimoz C (2010): Base-calling for next-generation sequencing platforms. *Briefings in Bioinformatics*, doi:10.1093/bib/bbq077

Lee H, Gurtowski J, Yoo S, Nattestad M, Marcus S, Goodwin S, McCombie WR, Schatz MC (2016): Third-generation sequencing and the future of genomics. *Cornell University Library*: <http://dx.doi.org/10.1101/048603>

Life Technologies Corporation (2010): Qubit[®] 2.0 Fluorometer User Manual

Life Technologies Corporation (2011a): Ion Sequencing Kit v2.0 User Guide

Life Technologies Corporation (2011b): Ion Torrent Amplicon Sequencing Brochure

Life Technologies Corporation (2012): Human Identification Applications on Ion Torrent PGM, Ion Academy

Life Technologies Corporation (2013): Best Practices: Ion Workflow QC for Ion Ampliseq™ Products, Ion Academy

Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF *et al.* (1997): Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*; 350:485–7.

Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM (1999): Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*; 64:218–24.

Lo YMD, *et al.* (2010): Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med*, 2(61):61ra91.

Lun FM, Chiu RW, Allen Chan KC, Yeung Leung T, Kin Lau T, Dennis Lo YM (2008): Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*; 54:1664–72.

Margulies M *et al.* (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437, 376–380.

Marx JL (1989): "The Cystic Fibrosis Gene is Found", *Science*; 245:923-925.

McCray PBJ, Wohlford-Lenane CL, Snyder JM (1992): "Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA in human fetal lung tissue by in situ hybridization". *J Clin Invest*; 90: 619.

Meldrum C, Doyle MA, Tothill RW (2011): Next-Generation Sequencing for Cancer Diagnostics: a Practical Perspective, *Clin Biochem Rev*, Vol32, 177-195

Mujezinovic F, Alfirovic Z (2007): Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol*;110:687–94.

Myers RM, Sheffield VC, Cox DR (1989): "Mutation detection by PCR, GCclamps, and denaturing gradient gel electrophoresis". PCR Technology:Erlich HA ed., *Stockton Press*, pp71-78.

Nagel G, Hwang T-C, Nastiuk KL, Nairn C, Gadsby DC (1992): "The protein kinase A-regulated cardiac CI⁻ channel resembles the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator". *Nature*; 360: 81

- Nekrutenko A and Taylor J (2012): Next-generation sequencing data interpretation: enhancing reproducibility and accessibility. *Nature Reviews Genetics*, 13(9),667–672.
- Newton, C. R., Graham, A., Heptinsall, L. E., Powell, S. J., Kalsheker, K., Smith, J. C. *et al.* (1989): Analysis of point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucl. Acids. Res.* **17**, 2503–2516.
- Newton, C. R., Summers, C., Schwarz, M., Graham, A., Heptinstall, LE., Super, M., *et al.* (1989): Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assessment in cystic fibrosis. *Lancet* **II**, 1481–1483.
- Nishio S, Hayashi Y, Watanabe M, Usami S (2015): Clinical Application of a Custom AmpliSeq Library and Ion Torrent PGM Sequencing to Comprehensive Mutation Screening for Deafness Genes. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 19, 4:209-217
- Pagani F, Stuani C, Tzetis M, Kanavakis E, Efthymiadou A, Doudounakis S, Casals T, Baralle FE (2003): New type of disease causing mutations: The example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. *Hum Mol Genet*;12: 1111–1120.
- Quail *et al.* (2012): A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 13:341
- Quinton PM (1983): Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*, 301:421-422.
- Raffan E and Semple R (2011): Next generation sequencing – implications for clinical practice. *British Medical Bulletin*, 99: 53-71.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm M, Iannuzzi MC, Collins SF, Tsui LC (1989): "Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA". *Science*; 245: 1066-1073.
- Rius M, Bourne S, Hornsby HG, Chapman MA (2015): Applications of next-generation sequencing to the study of biological invasions. *Current Zoology*, 61 (3): 488–504

Rosenstein B, Cutting G (1998): The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement. *Journal of Pediatrics*;132: 589-595.

Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M, *et al.* (2011): An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475(7356):348–352

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): "DNA sequencing with chain termination inhibitors". *Proc Natl Acad Sci USA*; 74: 5463.

Schmid CW, Jelinek WR (1982): "The Alu sequence of dispersed repetitive segments" *Science*; 216: 1065-1070.

Sereth H, Shoshani T, Bashan N, Kerem BS (1992): The selective advantage hypothesis for CF mutations and variable intragenic haplotype. *Pediatr Pulmonol Suppl.*,8:245A.

Sheth S, Shea JC, Bishop MD, *et al.* (2003): Increased prevalence of CFTR mutations and variants and decreased chloride secretion in primary sclerosing cholangitis. *Hum Genet*, 113(3): 286–292.

Shwachman H, Kulczycki L (1958): Long term study of one hundred five patients with cystic fibrosis. *Am J Dis Child*, 96:6-15.

Silvis MR, Picciano JA, Bertrand C, *et al.* (2003): A mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator generates a novel internalization sequence and enhances endocytic rates. *J Biol Chem*, 278(13):11554–11560.

Simbolo M, Gottardi M, Corbo V, Fassan M, Mafficini A, Malpeli G, *et al.* (2013): DNA Qualification Workflow for Next Generation Sequencing of Histopathological Samples. *PLoS ONE* 8(6): e62692

Singer MF, Skowronski J (1985): "Making sense out of LINES: Long interspersed repeat sequences in mammalian genome". *Trends Biochem Sci*; 10: 119-122.

Srinivasan A, Bianchi DW, Huang H *et al.* (2013): Noninvasive Detection of Fetal Subchromosome Abnormalities via Deep Sequencing of Maternal Plasma. *Am J Hum Genet*, 92(2): 167-176.

Stone AE and Sidow A (2005): Physicochemical constraint violation by missense substitutions mediates impairment of protein function and disease severity. *Genome Res.* 15: 978-986

Strong TV, Smit LS, Turpin SV, Cole JL, Hon CT, Markiewicz D, Petty TL, Craig MW, Rosenow EC, Tsui LC, Iannuzzi MC, Knowles MR, Collins FS (1991): "Cystic fibrosis gene mutation in two sisters with mild disease and normal sweat electrolyte levels". *N Engl J Med*; 325: 1630.

Taglauer ES, Wilkins-Haug L, Bianchi DW (2014): Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease, *Placenta*, 35 (Suppl.) S64–S68.

The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium (1993): "Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis". *N Engl J Med*; 329: 1308

Theophilus BDM and Rapley R (2002): PCR Mutation Detection Protocols. *Humana Press Inc.*, Totowa, New Jersey

ThermoFisher Scientific Inc. (2014a): Everything you Ever Wanted to Know About Next Generation Sequencing, but were Afraid to Ask, HID University

ThermoFisher Scientific Inc. (2014b): Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit User Manual

ThermoFisher Scientific Inc. (2014c): Targeted Sequencing Solutions Brochure

ThermoFisher Scientific Inc. (2015): The Ion PGM System Specification Sheet

Thorvaldsdottir H, Robinson TJ, Mesirov JP (2013): Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics* 14. 178-192

Tian X, Liu Y, Yang J, Wang H, Liu T, Xu W, Zhu Y, Xu K, Zhang X (2015): p.G970D is the most frequent *CFTR* mutation in Chinese patients with cystic fibrosis. *Human Genome Variation*, 3, 15063; doi:10.1038/hgv.2015.63

Tizzano EF, Buchwald M (1992): "Cystic Fibrosis: Beyond the gene to therapy". *J Pediatr*; 120(3): 337-349.

Tsui L (1990): Population analysis of the major mutation in cystic fibrosis. *Hum Genet.*,85:391-392.

Tsui L and Dorfman R (2013): The Cystic Fibrosis Gene: A Molecular Genetic Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Med*; 3:a009472

Vallieres E, Elborn JS (2014): Cystic fibrosis gene mutations evaluation and assessment of disease severity. *Advances in Genomics and Genetics*:4 161–172

Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ (2002): The Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cystic Fibrosis*: 1: 13-29.

Vergani P, Lockless SW, Nairn AC, Gadsby DC (2005): CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide binding domains. *Nature*, 24;433(7028):876-80

Wang X, Moylan B, Leopold DA, *et al.* (2000): Mutation in the gene responsible for cystic fibrosis and predisposition to chronic rhinosinusitis in the general population. *JAMA*, 284(14): 1814–1819.

Warner JO (1992): Cystic Fibrosis, *British Medical Bulletin* ;48:717-731.

Watson MS *et al.* (2004): Cystic Fibrosis Population Carrier Screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics Mutation Panel., *Genetics In Medicine*, Vol.6, No.5

Welsh MJ, Tsui LC, Boat TF *et al.* (1995): "Cystic fibrosis". *The metabolic and the molecular bases of inherited disease*. Vol.3, 7th edition, Chapter 127, 3799-3876.

Winnicott DW (1965): The Family and Individual Development. *Tavistock Publications Limited*.

Wright JM, Joseloff E, Nikolsky Y, Serebriyskaya T, Wetmore D (2010): Interactions between an inflammatory response to infection and protein trafficking pathways favor correction of defective protein trafficking in Cystic Fibrosis. *Bioinformation*, 5(6):228-233

Yeo ZX, Wong JCL, Rozen SG, Lee ASG (2014): Evaluation and optimization of indel detection workflows for ion torrent sequencing of the *BRCA1&BRCA2* genes.*BMC Genomics*, 15: 516

Zeitlin LP (1999): Novel pharmacologic therapies for cystic fibrosis. *J.Clin.Invest.*; 103: 447-452.

Zhou Z, Wang X, Liu HY, Zou X, Li M, Hwang TC (2006): The two ATP binding sites of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) play distinct roles in gating kinetics and energetics. *The Journal of general physiology*, Oct;128(4):413-22

Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzeczak Z, Riordan JR, Rommens J, Tsui LC. (1991): "Genomic DNA Sequence of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gene". *Genomics*; 10:214-218.

Zielenski J, Corey M, Rosmahel R, Markiewicz D, Aznarez J, Casals T, Larriba S *et al.*(1999): Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nat Genet*. 22: 128-129.

Zielenski J (2000): Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*; 67:117–133.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Αντωνιάδη Θ (1997): Ανίχνευση των μεταλλάξεων της Κυστικής Ινώδους νόσου στον Ελληνικό πληθυσμό. *Διδακτορική Διατριβή Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.*

Δάσιος Θ (2012): Μυϊκή ισχύς και κόπωση αναπνευστικών μυών σε παιδιά με Κυστική Ίνωση. *Διδακτορική Διατριβή Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Πατρών*

Ευθυμιάδου Α (2008): Συσχέτιση των μοριακών διαταραχών του γονιδίου της Κυστικής Ίνωσης (CFTR) με άτυπες κλινικές μορφές της νόσου. *Διδακτορική Διατριβή Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.*

Καναβάκης Ε (2002): Συσχέτιση του γονότυπου με τον φαινότυπο της Ινοκυστικής Νόσου. 'Ινοκυστική Νόσος', Έκδοση του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών, σελ.65-85

Πελεργίνης Θ (2009): Ιατρική Ηθική, *Εκδόσεις «Ελληνικά Γράμματα Α.Ε.»*, Αθήνα

Πούλιου Ε (2000): Η κινητική του οξυγόνου κατά την πρόιμη ανάκαμψη μετά από μέγιστη καρδιοαναπνευστική κόπωση σε ενήλικες ασθενείς με Κυστική Ίνωση. *Διδακτορική Διατριβή Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.*

Σταυρινάδης Η (2006): Ο ρόλος της υποβιταμίνωσης Κ στην παθογένεια της οστεοπόρωσης σε παιδιά με Ινώδη Κυστική νόσο. *Διδακτορική Διατριβή Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.*

Στρόφαλης Σ (2001): Συσχέτιση των γονοτυπικών παραλλαγών της Κυστικής Ινώδους νόσου με τον κλινικό φαινότυπο και το θεραπευτικό αποτέλεσμα της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης DNase (Pulmozyme). *Διδακτορική Διατριβή Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.*

Πηγές από το Διαδίκτυο (Internet)

CFTR2: <http://cftr2.org/>

Cystic Fibrosis Data Network: <http://www.cysticfibrosisdata.org>

Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium: <http://www.genet.sickkids.on.ca/>

Cystic Fibrosis Medicine: <http://www.cfmedicine.com>

Life Sciences Research: <http://lsresearch.thomsonreuters.com>

MACHEREY-NAGEL: <http://www.mn-net.com>

NASA: http://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/news/dna_sequencing

Orphanet: <http://www.orpha.net>

ThermoFisher: <https://www.thermofisher.com>

Veritas Genetics: <https://www.veritasgenetics.com/mygenome>

Πανελλήνιος Σύλλογος Κυστικής Ίνωσης: <http://www.cysticfibrosis.gr>

Εικονογραφία

Εικ.1.1. Γραφική απεικόνιση του καθηγητή Pieter Pauw, όπου πραγματοποιεί μια αυτοψία, σε ένα θέατρο ανατομίας στο Leiden. (Ανατύπωση από την ιστοσελίδα www.cfmedicine.com, 2016) [Πηγή: <http://www.cfmedicine.com>]

Εικ.1.2. Γραφική απεικόνιση του γονιδίου *CFTR*. (α) Δομή του γονιδίου, όπου εικονίζεται ο εκκινητής (P) και τα 27 εξόνια. (β) Το παραγόμενο πολυπεπτίδιο και οι προβλεπόμενες περιοχές. (γ) Τοπολογία της πρωτεΐνης CFTR σε σχέση με τη κυτταροπλασματική μεμβράνη και θέση της πιο συχνής μεταλλάξης, της ΔF508. (Ανατύπωση από Zielenski, 2000)) [Πηγή: Zielenski J (2000): Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*; 67:117–133.]

Εικ.1.3. Γραφική απεικόνιση του δικτύου ρύθμισης της ενεργότητας της CFTR. (Ανατύπωση από την ιστοσελίδα <http://lsresearch.thomsonreuters.com> , 2016) [Πηγή: <http://lsresearch.thomsonreuters.com>]

Εικ.1.4. Γραφική απεικόνιση της αρχιτεκτονικής των δομών της CFTR και σχηματική αναπαράσταση των διαμορφώσεων gating των μεταφορέων ABC. Τα συμπαγή βέλη δείχνουν την δραστηριότητα του μεταφορέα κατά τη διάρκεια ενός μηχανισμού εναλλακτικής πρόσβασης, ενώ τα διακοπτόμενα βέλη δείχνουν τον θεωρητικό κύκλο ενεργότητας της CFTR, κατά τη διάρκεια του οποίου το μονοπάτι διαπερατότητας

είναι ανοιχτό τόσο στα εξωκυττάρια όσο και στα ενδοκυττάρια διαλύματα επιτρέποντας έτσι την κίνηση των μορίων βάσει ηλεκτροχημικής διαβάθμισης. Απεικονίζονται τα εξής: Γκρίζο χρώμα: Μembrάνη, Καφέ και σκούρο μπλε: TMD1&TMD2, Πράσινο και ανοιχτό μπλε: ABC domains, Κόκκινο: ATP, Κίτρινο: ADP. Το R-domain δεν απεικονίζεται για διευκόλυνση. (Ανατύπωση από Jordan *et al.*, 2015) [Πηγή: Jordan IK, Karthik CK, Guiying C, Thompson CH, McCarty NA (2015): Evolutionary and functional divergence between the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and related ATP-binding cassette transporters. *PNAS*, vol.105, no 48, 18865-18870]

Εικ.1.5. Γραφική απεικόνιση των τάξεων μεταλλαγών της πρωτεΐνης CFTR. (Ανατύπωση από Boyle and Boeck, 2013) [Πηγή: Boyle MP, De Boeck K (2013): A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *The Lancet Respiratory Medicine*, 158–163]

Εικ.1.6. Απεικόνιση ακτινογραφιών δύο ενήλικων ατόμων ομόζυγων για τη μετάλλαξη ΔF508. Ο ασθενής αριστερά δεν είχε χρόνια μόλυνση, είχε φυσιολογική πνευμονική λειτουργία και η ακτινογραφία δείχνει μόνο ήπια υπερδιάταση. Σε αντίθεση, ο ασθενής της δεξιάς ακτινογραφίας ο οποίος είχε χρόνια λοίμωξη από *P.aeruginosa* και σημαντικά μειωμένη πνευμονική λειτουργία, παρουσίαζε εκτεταμένες βρογχιεκτασίες και βλεννώδη απόφραξη. (Ανατύπωση από Bolliger *et al.*, 2006) [Πηγή: Bolliger CT *et al.* (2006): Cystic Fibrosis in the 21st Century. *Progress in Respiratory Research*, Vol.34]

Εικ.1.7. Σχηματική αναπαράσταση ενός υποθετικού φαινοτύπου Κυστικής Ίνωσης. Ο φαινότυπος περιγράφεται ως διαμόρφωση των εκδηλώσεων, της σοβαρότητας τους (σε επίπεδο λειτουργίας) και την εξέλιξη τους στο χρόνο. Ο φαινότυπος σε ένα δεδομένο χρονικό σημείο είναι εμφανής κατά την εγκάρσια διατομή (άξονες y-z). (Ανατύπωση από Bolliger *et al.*, 2006) [Πηγή: Bolliger CT *et al.* (2006): Cystic Fibrosis in the 21st Century. *Progress in Respiratory Research*, Vol.34]

Εικ.1.8. Απεικόνιση χρωματογραφήματος όπου εμφανίζονται τα artifacts “dye blobs”. (Ανατύπωση από την ιστοσελίδα <https://www.roswellpark.edu>, 2016) [Πηγή: <https://www.roswellpark.edu>]

Εικ.1.9. Γραφική απεικόνιση του κόστους αλληλούχισης με NGS και της αύξησης του ρυθμού δημοσιεύσεων μελετών στον κλάδο της Γενετικής: Invasion Genetics. (Ανατύπωση από Rius *et al.*, 2015) [Πηγή: Rius M, Bourne S, Hornsby HG, Chapman MA (2015): Applications of next-generation sequencing to the study of biological invasions. *Current Zoology*, 61 (3): 488–504]

Εικ.1.10. Γραφική απεικόνιση του solid-phase bridge amplification και της δημιουργίας Cluster. (Ανατύπωση από Goodwin *et al.*, 2016) [Πηγή: Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR (2016): Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews: Genetics*, Vol.17, 333-351]

Εικ.1.11. Γραφική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας της πλατφόρμας 454 Pyrosequencing (Roche). (Ανατύπωση από Goodwin *et al.*, 2016) [Πηγή: Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR (2016): Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews: Genetics*, Vol.17, 333-351]

Εικ.1.12. Απεικόνιση του chip (αριστερά), των πολυάριθμων κελιών που το αποτελούν (κέντρο) και της δομής του κελιού (γραφική απεικόνιση δεξιά). Γραφική απεικόνιση των τριών διαθέσιμων chip για την πλατφόρμα Ion Torrent PGM. (Ανατύπωση από Rothberg *et al.*, 2011 και ThermoFisher Scientific Inc, 2014)) [Πηγή: Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M, *et al.* (2011): An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475(7356):348–352 και ThermoFisher Scientific Inc. (2014): Everything you Ever Wanted to Know About Next Generation Sequencing, but were Afraid to Ask, HID University]

Εικ.1.13. Γραφική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας των πλατφόρμων Ion Torrent. (Ανατύπωση από Rothberg *et al.*, 2011) [Πηγή: Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M, *et al.* (2011): An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475(7356):348–352]

Εικ.1.14. Απεικόνιση της ανάπτυξης του Sequencing Υψηλής Απόδοσης (High-Throughput Sequencing) (Ανατύπωση από Nederbragt, 2016) [Πηγή: https://figshare.com/articles/developments_in_NGS/100940]

Εικ.1.15. Γραφική απεικόνιση της προέλευσης του cfDNA. (Ανατύπωση από Kotsopoulou *et al.*, 2015) [Πηγή: Kotsopoulou I, Tsoplou P, Mavrommatis K, Kroupis C (2015): Non-invasive prenatal testing (NIPT): limitations on the way to become diagnosis. *Diagnosis*, 2(3): 141-158.]

Εικ.1.16. Απεικόνιση της σχέσεως που αποδίδει το εμβρυικό κλάσμα και αναφορά στην προέλευση και στις εμβρυικές και μητρικές επιδράσεις σε αυτό. (Ανατύπωση από Taglauer *et al.*, 2014) [Πηγή: Taglauer ES, Wilkins-Haug L, Bianchi DW (2014): Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease, *Placenta*, 35 (Suppl.) S64–S68.]

Εικ.1.17. Γραφική απεικόνιση που συσχετίζει το κλάσμα του εμβρυικού DNA με το βάρος της μητέρας. (Ανατύπωση από Ashoor *et al.*, 2013)) [Πηγή: Ashoor G, Syngelaki A, Poon LCY, Rezende JC, Nicolaides KH (2013): Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 41: 26-32.]

Εικ.2.1. Γραφική απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας της στήλης NucleoSpin[®]. (Ανατύπωση από την ιστοσελίδα της εταιρείας MACHEREY-NAGEL, 2016) [Πηγή: <http://www.mn-net.com>]

Εικ.2.2. Γραφική απεικόνιση της ροής εργασίας (workflow) που ακολουθείται στην πλατφόρμα Ion Torrent[™] Personal Genome Machine[®] (PGM). (Ανατύπωση από Life Technologies Corporation, 2013) [Πηγή: Life Technologies Corporation (2013): Best Practices: Ion Workflow QC for Ion Ampliseq[™] Products, Ion Academy 2013]

Εικ.2.3. Απεικόνιση του Ion Torrent[™] Personal Genome Machine[®] (PGM) System. (Ανατύπωση από Life Technologies Corporation, 2012) [Πηγή: Life Technologies Corporation (2012): Human Identification Applications on Ion Torrent PGM, Ion Academy]

Εικ.2.4. Απεικόνιση του Qubit[®] 2.0 Fluorometer. (Ανατύπωση από Life Technologies Corporation, 2010) [Πηγή: Life Technologies Corporation (2010): Qubit[®] 2.0 Fluorometer User Manual]

Εικ.2.5. Απεικόνιση τμήματος του CFTR Panel όπου σημειώνονται με βέλη το 26^ο εξώνιο και εσώνιο, η περιοχή 3'UTR και τα αμπλικόνια που καλύπτουν τις εν λόγω περιοχές. (Προσωπική λήψη με χρήση του προγράμματος IGV)

Εικ.2.6. Απεικόνιση του Ion OneTouch™ System. (Ανατύπωση από την ιστοσελίδα της εταιρείας ThermoFisher, 2016) [Πηγή: <https://www.thermofisher.com>]

Εικ.2.7. Απεικόνιση του Ion PGM™ Sequencer. (Ανατύπωση από ThermoFisher Scientific Inc., 2016) [Πηγή: ThermoFisher Scientific Inc. (2014): Targeted Sequencing Solutions Brochure]

Εικ.2.8. Γραφική απεικόνιση του Ion PGM™ Sequencer με τις ενδείξεις των μπουκαλιών και των κωνικών σωλήνων των dNTPs. (Ανατύπωση από Life Technologies Corporation, 2011) [Πηγή: Life Technologies Corporation (2011): Ion Sequencing Kit v2.0 User Guide]

Εικ.2.9. Απεικόνιση της τοποθέτησης του Chip στη συσκευή Ion PGM™ Sequencer με γυμνά χέρια. (Ανατύπωση από ThermoFisher Scientific Inc, 2014) [Πηγή: ThermoFisher Scientific Inc. (2014): Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit User Manual]

Εικ.2.10. Απεικόνιση του Chip με την ένδειξη του loading port και της τοποθέτησης του στην ειδική φυγόκεντρο. Γραφική απεικόνιση των Enriched ISPs που τοποθετούνται στα ειδικά κελιά του Chip. (Ανατύπωση από ThermoFisher Scientific Inc, 2014) [Πηγή: ThermoFisher Scientific Inc. (2014): Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit User Manual & ThermoFisher Scientific Inc. (2014): Everything you Ever Wanted to Know About Next Generation Sequencing, but were Afraid to Ask, HID University]

Εικ.2.11. Απεικόνιση του Run Report που λαμβάνεται με το πέρας του run και το οποίο παρέχει στοιχεία αξιολόγησης του. (Ανατύπωση από ThermoFisher Scientific Inc, 2014) [Πηγή: ThermoFisher Scientific Inc. (2014): Everything you Ever Wanted to Know About Next Generation Sequencing, but were Afraid to Ask, HID University]

Εικ.3.1. Απεικόνιση της chr7:117170947 (c.274-6T>C) στα δείγματα ELE και 82598-ELE. (Προσωπική λήψη με χρήση του προγράμματος IGV)

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματεύεται την μοριακή διερεύνηση μονογονιδιακών νοσημάτων και ιδιαιτέρως ενός μονογονιδιακού νοσήματος, της Κυστικής Ύψωσης, με την τεχνολογία αλληλούχισης DNA νέας γενιάς (NGS: Next Generation Sequencing). Η Κυστική Ύψωση είναι μια κληρονομική πολυσυστηματική νόσος, αυτοσωμικού υπολειμματικού χαρακτήρος, η οποία θεωρείται ως το σημαντικότερο κληρονομικό νόσημα στη λευκή φυλή. Στην Ελλάδα γεννιούνται με Κυστική Ύψωση συνολικά 50-60 παιδιά το χρόνο (1 παιδί ανά εβδομάδα περίπου). Το 4-5% του γενικού πληθυσμού, θεωρείται ότι είναι φορέας του παθολογικού γονιδίου και η συχνότερη γονιδιακή μετάλλαξη που παρατηρείται στον Ελλαδικό χώρο είναι η F508del ή ΔF508, η οποία θεωρείται από τις βαρύτερες σε συμπτωματολογία μεταλλάξεις.

Η χρήση της τεχνολογίας NGS μέσω της πλατφόρμας αλληλούχισης Ion Torrent PGM, οδήγησε στην αλληλούχιση του γονιδίου *CFTR* σε 692 εξεταζόμενους και ανιχνεύθηκαν 158 ευρήματα εκ των οποίων σε 155 βρέθηκαν 60 μεταλλαγές και 26 αποτελούν ευρήματα που χαρακτηρίζονται ως VOUS (Variant Of Unknown Significance). Μια *in silico* προσέγγιση των νέων ευρημάτων μας οδήγησε στον χαρακτηρισμό 4 εξ' αυτών ως παθολογικά. Πραγματοποιήθηκαν, επίσης, πειράματα προσομοίωσης του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο πλάσμα εγκυμονούσας σε ποσοστά 10%, 6% και 3% με σκοπό την διερεύνηση των δυνατοτήτων του sequencer, τα οποία και ανιχνεύτηκαν, αποτελώντας ένα από τα πρώτα βήματα για ανάπτυξη in-house NIPD.

Η νόσος της Κυστικής Ύψωσης και εν γένει τα γενετικά νοσήματα αποκτούν μια άλλη διάσταση στην αναφερόμενη ως NGS-era. Το NGS αναδεικνύεται ως ένα πολύτιμο εργαλείο που έχει να προσφέρει και η σωστή αξιοποίηση του θα αλλάξει την εικόνα της μελλοντικής ιατρικής γενετικής.

Abstract

The current Master Thesis deals with the molecular exploration of the genetic diseases and especially a monogenic, Cystic Fibrosis, using a high throughput technology, NGS. Cystic Fibrosis is an inherited multisystemic disease of autosomal recessive character, which is considered as the most important hereditary disease in the white race. In Greece, 50-60 children are born with Cystic Fibrosis per year (about 1 child per week). 4-5% of the general population is considered to be carriers of the abnormal gene and the most frequent mutation observed in Greece is F508del or $\Delta F508$, which is considered to be the heaviest in symptomatology mutation.

The use of the sequencing platform Ion Torrent PGM for sequencing *CFTR* gene in 692 subjects led to the detection of 168 findings out of which 26 were designated as VOUS (Variant Of Unknown Significance). An *in silico* approach of the new findings led to the annotation of four them as pathological. A simulation of cell free fetal DNA detected at plasma of pregnant women also took place at rates 10%, 6% and 3% in order to investigate the sequencer capabilities. All rates were detected successfully. This is considered to be one of the first steps in developing an in-house NIPD.

The disease of Cystic Fibrosis and genetic diseases in general acquire another dimension in the NGS-era. NGS is emerging as a valuable tool that has to offer a lot and its proper use of it will change the future of medical genetics.

