



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Περικεντρική αναστροφή *inv(9)(p23q22.3)* στον ελληνικό
πληθυσμό**

Παυλίνα Κ. Ηλιοπούλου

**Επιβλέπουσες: Μαρία Τζέτη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής
Βούλα Βελισσαρίου, BSc, PhD, Κλινική Κυτταρογενετίστρια,
Επιστημονική Διευθύντρια Τμήματος Κυτταρογενετικής και Μοριακής
Κυτταρογενετικής**

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2018

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Περικεντρική αναστροφή $inv(9)(p23q22.3)$ στον ελληνικό πληθυσμό

Παυλίνα Κ. Ηλιοπούλου
Α.Μ.: 20160640

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΕΣ: **Μαρία Τζέτη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής
Βούλα Βελισσαρίου, BSc, PhD, Κλινική
Κυτταρογενετίστρια, Επιστημονική Διευθύντρια
Τμήματος Κυτταρογενετικής και Μοριακής
Κυτταρογενετικής, Βιοιατρική

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: **Μαρία Τζέτη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής
Ιωάννα Traeger – Συνοδινού, Καθηγήτρια Γενετικής
Ελένη Φρυσίρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής
Γενετικής-Διευθύντρια Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής

Οκτώβριος 2018

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετάται η περικεντρική αναστροφή του χρωμοσώματος 9, *inv(9)(p23q22.3)*, η οποία έχει παρατηρηθεί σε άτομα στα οποία πραγματοποιήθηκε κυτταρογενετικός έλεγχος λόγω προβλημάτων γονιμότητας, σε οικογένειες με μη προφανή συγγενική σχέση. Η συγκεκριμένη αναστροφή δεν έχει περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία και στις βάσεις δεδομένων. Οι ετεροζυγώτες φορείς περικεντρικών αναστροφών έχουν αυξημένο κίνδυνο να αποκτήσουν απογόνους με μη ισοζυγισμένο καρυότυπο και παθολογικό φαινότυπο, καθώς και να εμφανίσουν προβλήματα γονιμότητας. Σε σύνολο 4.700 ατόμων στα οποία πραγματοποιήθηκε κυτταρογενετικός έλεγχος, με παραπομπή προβλημάτων υπογονιμότητας, 11 βρέθηκαν ετεροζυγώτες φορείς της περικεντρικής αναστροφής *inv(9)(p23q22.3)*, το οποίο αντιστοιχεί σε περίπου 0.2% του συνόλου. Με την εφαρμογή της μεθόδου φθορίζουσας *in situ* υβριδοποίησης (FISH: Fluorescence In Situ Hybridization) φαίνεται ότι η παρούσα αναστροφή είναι πανομοιότυπη σε όλες τις οικογένειες οι οποίες εξετάστηκαν. Επίσης, με τη μοριακή μέθοδο ανάλυσης απλοτύπων με βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις (STRs, short and tandem repeats) μελετήθηκε η πιθανή συγγένεια των ατόμων φορέων της αναστροφής. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα άτομα πρέπει να έχουν κοινό πρόγονο, στον οποίο εμφανίστηκε για πρώτη φορά η αναστροφή. Πρόκειται, δηλαδή για το φαινόμενο του ιδρυτή (*founder effect*), γεγονός το οποίο ενισχύεται από την καταγωγή της πλειοψηφίας των εξεταζόμενων από την ευρύτερη γεωγραφική περιοχή της Βορειοδυτικής Ελλάδας.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Κυτταρογενετική, Μοριακή Κυτταρογενετική, Μοριακή Γενετική.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Περικεντρική αναστροφή, υπογονιμότητα, φαινόμενο Ιδρυτή.

ABSTRACT

In the present study, the pericentric inversion of chromosome 9, $inv(9)(p23q22.3)$, which has been observed in individuals with fertility problems in families with no apparent consanguinity, is thoroughly investigated with cytogenetic and molecular methods. So far, the specific inversion has not been described in the literature or the known databases. Heterozygote carriers of pericentric inversions have an increased risk of having offspring with unbalanced karyotype and consequently an abnormal phenotype. They may present with a history of miscarriage or fertility issues. In a total of 4,700 individuals who were tested cytogenetically, 11 were found heterozygote carriers of $inv(9)(p23q22.3)$; this rate corresponds to 0,2% of the total number tested. After the application of the molecular cytogenetic method FISH (FISH: Fluorescence In Situ Hybridization), it was shown that the inversion is identical in all families tested. The possible consanguinity among the people who carry the inversion was studied by STR (Short Tandems Repeats) haplotype analysis. The results showed that the individuals tested must have a common ancestor in whom the inversion first appeared. Therefore, it is a founder effect, also supported by the fact that the majority of the subjects tested originate from a broad geographical region in Northwestern Greece.

SUBJECT AREA: Cytogenetics, Molecular Cytogenetics, Molecular Genetics.

KEYWORDS: Pericentric inversion, subfertility, founder effect.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη μου Δρ. Βελισσαρίου Βούλα, Επιστημονική Διευθύντρια Τμήματος Κυτταρογενετικής και Μοριακής Κυτταρογενετικής του ομίλου Βιοϊατρικής για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον θέμα. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τις βιολόγους του εργαστηρίου για το πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσαν ώστε να με διδάξουν τις τεχνικές του εργαστηρίου και ιδιαίτερα την μοριακή βιολόγο Ράππη Σταματία για την βοήθεια στο εργαστηριακό κομμάτι και την υπομονή της ώστε να πραγματοποιηθεί η συγγραφή της εργασίας αυτής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής Τζέτη Μαρία, και υπεύθυνη της διπλωματικής μου εργασίας από το εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, που με καθοδήγησε και με βοήθησε ώστε να πραγματοποιηθεί η συνεργασία με το εργαστήριο. Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου και το κοντινό μου περιβάλλον που με στηρίζουν και συμβάλλουν ώστε να κάνω τα όνειρά μου πραγματικότητα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	11
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1 Καρυότυπος	12
1.2 Χρωμοσωματικές ανωμαλίες ή χρωμοσωματικές αλλοιώσεις	12
1.2.1 Αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες.....	13
1.2.2 Δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες/αναδιατάξεις.....	13
1.3 Αναστροφές	15
1.3.1 Η συχνότητα των αναστροφών στον ανθρώπινο πληθυσμό και η κλινική τους σημασία	18
1.4 Μηχανισμοί Πρόκλησης Αναστροφών	19
1.4.1 Μη αλληλικός ομόλογος ανασυνδυασμός	19
1.5 Φαινόμενο του ιδρυτή - Ιδρυτικό φαινόμενο	21
1.6 Τρόποι διερεύνησης του Φαινομένου του Ιδρυτή	22
1.6.1 Απλοτυπική ανάλυση STRs ως μέσο διερεύνησης πιθανού founder effect.....	22
2 ΣΚΟΠΟΣ	25
3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
3.1 Περιγραφή Περιστατικών	26
3.2 Κυτταρογενετικός Ελέγχος (Καρυότυπος περιφερικού αίματος)	28
3.2.1 Καλλιέργεια Λεμφοκυττάρων Περιφερικού Αίματος.....	29
3.2.2 Προσθήκη και Ξέπλυμα Θυμιδίνης.....	29
3.2.3 Συγκομιδή Κυττάρων (Harvest)	31
3.2.4 Επίστρωση Μονιμοποιημένων Κυττάρων	32
3.2.5 Χρώση Σε Επίστρωμένα Παρασκευάσματα	33
3.2.6 Ανάλυση και Φωτογράφιση Δείγματος	34
3.3 Ανάλυση FISH	35
3.3.1 Multicolor Banding FISH.....	36
3.4 Απλοτύπηση	37
3.4.1 Απομόνωση Γενετικού Υλικού (DNA Extraction).....	37
3.4.2 Μέτρηση Συγκέντρωσης Γενωμικού DNA	38

3.4.3	Διαδικασία Επιλογής STRs	39
3.4.4	Σχεδιασμός Primers.....	42
3.4.5	Πραγματοποίηση Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction)	42
3.4.6	Απλοτύπηση.....	43
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45
4.1	Κυτταρογενετική ανάλυση.....	45
4.2	Ανάλυση FISH.....	45
4.3	Απλοτυπική Ανάλυση.....	48
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	52
	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	56
	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	58
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	59
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	63
	ΑΝΑΦΟΡΕΣ - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Καρυότυπος άρρενος φυσιολογικού ατόμου, 46,XY (αρχείο εργαστηρίου Κυτταρογενετικής της Βιοϊατρικής).....	12
<i>Εικόνα 2: Παρακεντρική (άνω) και περικεντρική αναστροφή (κάτω) [7].....</i>	<i>16</i>
Εικόνα 3: Μηχανισμοί παραγωγής ανασυνδυασμένων χρωμοσωμάτων από μία περικεντρική (πάνω) και μία παρακεντρική (κάτω) αναστροφή από ανασυνδυασμό (crossing over) σε μία θηλιά αναστροφής (inversion loop) [1].....	18
Εικόνα 4: Ο μη αλληλικός ομόλογος ανασυνδυασμός (NAHR), μεταξύ περιοχών με επαναλήψεις χαμηλών αντιγράφων.	20
<i>Εικόνα 5: Παρουσία του φαινομένου της διολίσθησης της DNA πολυμεράσης και τα παραπροϊόντα PCR με μεγαλύτερο ή μικρότερο κατά μία βάση από το πραγματικό μήκος του αλληλομόρφου [24].....</i>	<i>24</i>
Εικόνα 6: Τεχνική FISH με ειδικό ανιχνευτή συγκεκριμένης χρωμοσωματικής ζώνης που δημιουργήθηκε με την μέθοδο της μικροδιατομής:	36
Εικόνα 7: Ιδεόγραμμα του χρωμοσώματος 9 με απεικόνιση των ακριβών θέσεων των προς μελέτη STRs και των σημείων θραύσης της αναστροφής με βέλη (πρόγραμμα IKAROS της Metasystems).	42
Εικόνα 8: Απεικόνιση της αναστροφής inv(9)(p23q22.3).....	45
Εικόνα 9: Τα μόρια ανιχνευτές τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των σημείων τομής της αναστροφής στο 9p (άνω) και στο 9q (κάτω) με τη μέθοδο MCB-FISH.....	46
Εικόνα 10: Απεικόνιση αποτελεσμάτων της μελέτης της αναστροφής inv(9)(p23q22.3) με MCB- FISH σε 9 διαφορετικά άτομα χωρίς συγγένεια μεταξύ τους.....	48
Εικόνα 11: Απεικόνιση απλοτυπικής ανάλυσης με την χρήση του μικροδορυφορικού δείκτη D9S283 για τους ετεροζυγώτες φορείς της αναστροφής inv(9)(p23q22.3).	60
Εικόνα 12: Απεικόνιση απλοτυπικής ανάλυσης με την χρήση του μικροδορυφορικού δείκτη D9S161 για τους ετεροζυγώτες φορείς της αναστροφής inv(9)(p23q22.3).....	62

Εικόνα 13:Ανάλυση σημείου τομής στο χρωμόσωμα 9 στη θέση 12.245.958-12.247.434 του p βραχίονα. Παρατηρείται απουσία γονιδίων και παρουσία των αλληλουχιών SINEs (GRCh37/hg19).....63

Εικόνα 14: Ανάλυση σημείου τομής στο χρωμόσωμα 9 στη θέση 101.572.585-101.576.250 του q βραχίονα. Παρατηρείται απουσία γονιδίων και παρουσία των αλληλουχιών SINEs και LINEs (GRCh37/hg19).63

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Αλληλουχία και χαρακτηριστικά πρόσθιων (forward-F) και οπίσθιων (reverse-R) εκκινητών (primers) για κάθε έναν μικροδορυφορικό δείκτη (STR) στο χρωμόσωμα 9.....	40
Πίνακας 1 (συνέχεια): Αλληλουχία και χαρακτηριστικά πρόσθιων (forward-F) και οπίσθιων (reverse-R) εκκινητών (primers) για κάθε έναν μικροδορυφορικό δείκτη (STR) στο χρωμόσωμα 9.	41
Πίνακας 2: Χαρακτηρισμός των σημείων θραύσης της αναστροφής μέσω ανάλυσης MCB-FISH.....	46
Πίνακας 3: Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της απλοτυπικής ανάλυσης με την χρήση δεικτών STRs, για την μελέτη του χρωμοσώματος 9 στα άτομα φορείς της αναστροφής.....	49

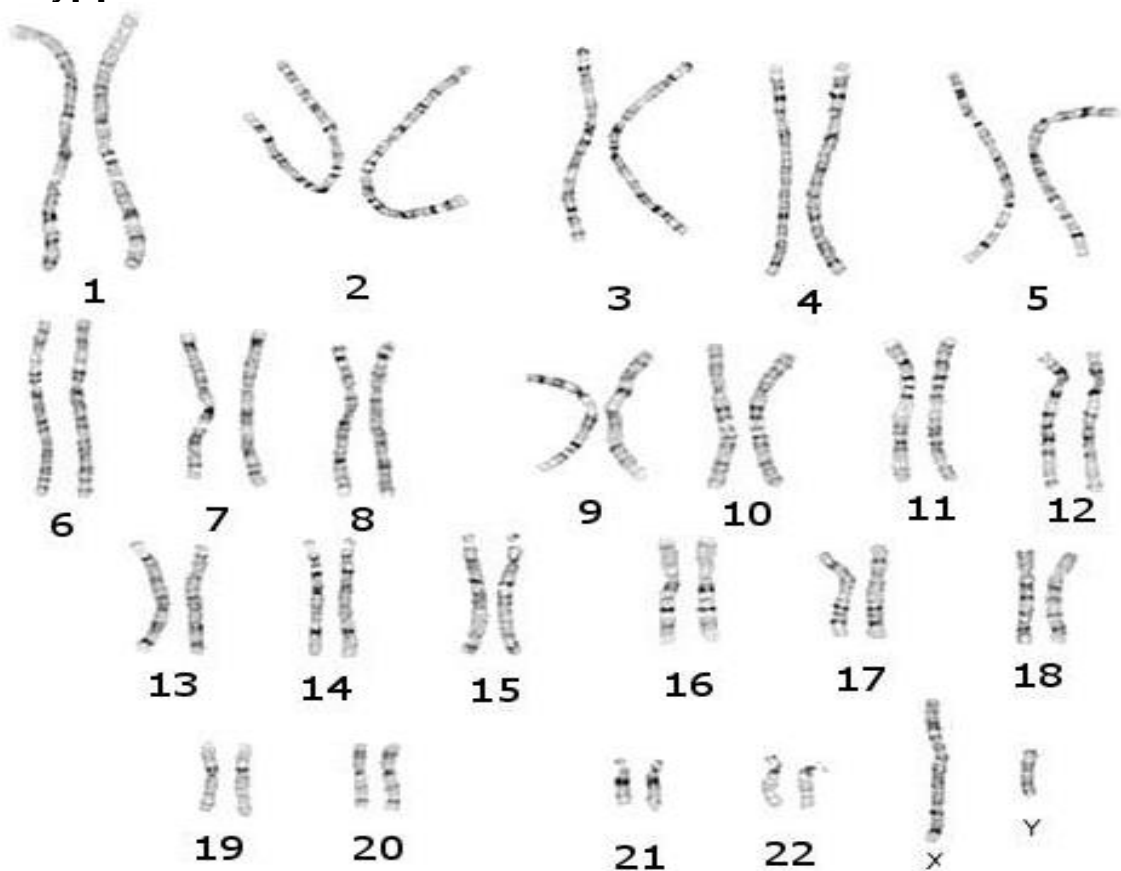
ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών “Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση”. Η εργασία αυτή αποτελεί μέρος της κλινικής μελέτης την οποία διεξάγει το τμήμα Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του ομίλου Βιοϊατρικής. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το εργαστήριο Μοριακής Κυτταρογενετικής, Πανεπιστημίου Jena Γερμανίας, το τμήμα Κυτταρογενετικής και Κυτταρογενωμικής του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου και το εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Επιστημονική υπεύθυνη και συντονίστρια της μελέτης είναι η επιστημονική διευθύντρια του τμήματος Κυτταρογενετικής και Μοριακής Κυτταρογενετικής του ομίλου Βιοϊατρικής, Δρ Βούλα Βελισσαρίου.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καρυότυπος

Η ανάλυση των χρωμοσωμάτων του ανθρώπινου οργανισμού πραγματοποιείται σε διαιρούμενα κύτταρα στο στάδιο της μετάφασης ή προμετάφασης. Στα στάδια αυτά τα χρωμοσώματα είναι ορατά στο οπτικό μικροσκόπιο. Παρόλο που κάθε χρωμόσωμα αποτελείται από τις δύο αδελφές χρωματίδες, αυτές συνήθως δεν είναι ευδιάκριτες επειδή είναι στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους. Η ανάλυση πραγματοποιείται από τους κυτταρογενετιστές παρατηρώντας τα χρωμοσώματα στο οπτικό μικροσκόπιο και μελετώντας τον καρυότυπο (Εικόνα 1). Καρυότυπος (karyotype) ονομάζεται η απεικόνιση των χρωμοσωμάτων ενός κυττάρου ανά ζεύγη και κατά σειρά μειούμενου μεγέθους [1].



Εικόνα 1: Καρυότυπος άρρενος φυσιολογικού ατόμου, 46,XY (αρχείο εργαστηρίου Κυτταρογενετικής της Βιοϊατρικής).

Με τη βοήθεια του συμβατικού καρυότυπου, ο οποίος αποτελεί σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο, εντοπίζονται τα εξής:

1.2 Χρωμοσωματικές ανωμαλίες ή χρωμοσωματικές αλλοιώσεις

Ονομάζονται οι παρεκκλίσεις από τη φυσιολογική κατάσταση στη δομή ή στον αριθμό των χρωμοσωμάτων. Αφορούν είτε στα αυτοσωμικά, είτε στα φυλετικά χρωμοσώματα. Εμφανίζονται τυχαία στη φύση ή προκαλούνται μετά από επίδραση χημικών ενώσεων ή ακτινοβολίας. Μια τέτοια αλλαγή μπορεί να έχει ήπιες, σοβαρές ή και θανατηφόρες

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

συνέπειες για τον οργανισμό. Οι συνέπειες των χρωμοσωματικών ανωμαλιών προκύπτουν κυρίως από τη διακοπή της αλληλουχίας γονιδίων στα σημεία θραύσης των χρωμοσωμάτων, από την τροποποίηση των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης όταν μεταβάλλεται ο αριθμός των αντιγράφων ενός ή περισσότερων γονιδίων, ή από το διαχωρισμό ενός γονιδίου από τα ρυθμιστικά του στοιχεία εξαιτίας κάποιας αναδιάταξης [1].

Οι χρωμοσωματικές ανωμαλίες διακρίνονται σε αριθμητικές και δομικές:

1.2.1 Αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες

Όταν ένα κύτταρο έχει πλήρη σειρά χρωμοσωμάτων ονομάζεται ευπλοειδικό. Οι παρεκκλίσεις στον αριθμό των χρωμοσωμάτων ενός κυττάρου ή ενός οργανισμού περιλαμβάνουν :

α. Ανευπλοειδίες

Ένα χρωμόσωμα ή μικρός αριθμός χρωμοσωμάτων, είτε λείπουν, είτε υπάρχουν σε περισσότερα αντίγραφα σε σχέση με τη φυσιολογική κατάσταση. Τα είδη της ανευπλοειδίας είναι κυρίως η μονοσωμία, η τρισωμία και η τετρασωμία.

β. Μονοπλοειδία

Όλα τα σωματικά κύτταρα του οργανισμού διαθέτουν μόνο μία πλήρη χρωμοσωμική σειρά. Αυτή η περίπτωση δε συναντάται στον άνθρωπο.

γ. Πολυπλοειδίες

Παρατηρούνται περισσότερες από δύο πλήρεις χρωμοσωμικές σειρές, όπως στις τριπλοειδίες και τετραπλοειδίες.

1.2.2 Δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες/αναδιατάξεις

A. Βασικοί τύποι δομικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών:

- **Μετατοπίσεις ή μεταθέσεις (translocations)**

Όταν ένα χρωμοσωματικό τμήμα αλλάζει θέση. Οι πιο κοινές μεταθέσεις είναι αμοιβαίες και αφορούν ανταλλαγή χρωμοσωματικών τμημάτων μεταξύ μη ομόλογων χρωμοσωμάτων. Ειδική κατηγορία μεταθέσεων αποτελούν οι ροβερτσόνιες μεταξύ των ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων 13, 14, 15, 21 και 22.

- **Αναστροφές (inversions)**

Όταν υπάρχει αλλαγή στον προσανατολισμό ενός χρωμοσωματικού τμήματος.

- **Διπλασιασμοί (duplications)**

Όταν ένα τμήμα του χρωμοσώματος και επομένως ένα ή περισσότερα γονίδια που συμπεριλαμβάνονται στο χρωμοσωματικό τμήμα, διπλασιάζεται.

- **Ελλείμματα (deletions)**

Όταν απουσιάζει τμήμα του χρωμοσώματος και κατ' επέκταση υπάρχει απώλεια ενός ή περισσότερων γονιδίων.

- **Ενθέσεις (insertions)**

Αποτελούν τύπο μετατοπίσεων και συγκεκριμένα χαρακτηρίζονται από τη θραύση ενός χρωμοσωματικού τμήματος και την ενσωμάτωσή του σε ένα άλλο χρωμόσωμα.

- **Χρωμοσώματα δείκτες (markers)**

Υπεράριθμα μη φυσιολογικά δομικά χρωμοσώματα, τα οποία δεν είναι πλήρως αναγνωρίσιμα στο συμβατικό καρυότυπο.

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

- **Δακτυλιοειδή χρωμοσώματα (rings)**

Η κλασική μορφή δακτυλιοειδών χρωμοσωμάτων περιλαμβάνει τη θραύση και των δύο βραχιόνων του χρωμοσώματος, σύντηξη των σημείων τομής και με ταυτόχρονη απώλεια των τελικών τμημάτων. Η εναλλακτική μορφή συναντάται όταν υπάρχει θραύση των τελομερών και σύντηξη αυτών [2].

B. Ένας άλλος διαχωρισμός των δομικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών είναι με βάση την απώλεια ή όχι γενετικού υλικού όταν συμβαίνουν αναδιατάξεις:

Ισοζυγισμένες ή μη ισοζυγισμένες χρωμοσωματικές αναδιατάξεις

Ισοζυγισμένες ονομάζονται οι αναδιατάξεις κατά τις οποίες στο σύνολό τους τα χρωμοσώματα περιλαμβάνουν τη σωστή ποσότητα γενετικού υλικού, ενώ μη ισοζυγισμένες ονομάζονται αυτές στις οποίες υπάρχει περισσότερο ή λιγότερο γενετικό υλικό σε σχέση με το φυσιολογικό.

Οι ισοζυγισμένες χρωμοσωματικές αναδιατάξεις δεν έχουν συνήθως επιπτώσεις στον φαινότυπο, διότι υπάρχει ολόκληρη η γενετική πληροφορία, αν και είναι σε διαφορετική διάταξη. Είναι σημαντική η διάκριση μεταξύ των ισοζυγισμένων αναδιατάξεων και αυτών που φαίνονται ισοζυγισμένες κυτταρογενετικά, αλλά δεν είναι ισοζυγισμένες σε μοριακό επίπεδο. Επιπλέον, δεδομένης της μεγάλης συχνότητας των πολυμορφισμών του αριθμού των αντιγράφων στο γονιδίωμα, γεγονός το οποίο συνεπάγεται διαφορές μεγέθους πολλών εκατομμυρίων βάσεων στο γονιδίωμα μεταξύ μη συγγενικών ατόμων, σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δύσκολο να καθοριστεί τι είναι ισοζυγισμένο και τι μη ισοζυγισμένο.

Οι ισοζυγισμένες ανωμαλίες αποκτούν ιδιαίτερη σπουδαιότητα στη διάρκεια της μείωσης, όπου τα ομόλογα χρωμοσώματα συνάπτονται. Συγκεκριμένα τα χρωμοσώματα με αναστροφές συνάπτονται με το ομόλογο χρωμόσωμα σχηματίζοντας μια θηλειά σύνδεσης. Αν συμβεί επιχiasμός μέσα στη θηλειά, τότε τα προϊόντα ανασυνδυασμού (recombinants) θα είναι μη ισοζυγισμένα.

Παρόλο που οι χρωμοσωματικά ισοζυγισμένες ανωμαλίες δεν έχουν φαινοτυπικό αντίκτυπο, υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις:

1. Είναι δυνατό ένα ή περισσότερα σημεία θραύσης να διακόπτουν ένα γονίδιο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της φυσιολογικής λειτουργίας του γονιδίου και πιθανότατα τη δημιουργία προβλημάτων στο άτομο που φέρει τη μετάθεση ή αναστροφή.
2. Το σημείο θραύσης να μην διακόπτει την γονιδιακή ακολουθία αυτή καθαυτή, αλλά να την απομακρύνει από ένα ρυθμιστικό στοιχείο το οποίο βρίσκεται σε παρακείμενη θέση στην ίδια αλυσίδα DNA. Κατ' επέκταση πάλι παρεμποδίζεται η φυσιολογική λειτουργία του γονιδίου.
3. Περιστασιακά, λόγω λάθους του ανασυνδυασμού ή του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA, ενώνονται τμήματα διαφορετικών χρωμοσωμάτων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός νέου γονιδίου από τα τμήματα των δύο γονιδίων που βρίσκονται στα σημεία θραύσεως των διαφορετικών χρωμοσωμάτων.
4. Τέλος, ισοζυγισμένες μεταθέσεις μεταξύ του χρωμοσώματος X και αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων σε θήλεα άτομα είναι δυνατό να δημιουργήσουν σοβαρά προβλήματα λόγω του φαινομένου της αδρανοποίησης του X χρωμοσώματος [3].

1.3 Αναστροφές

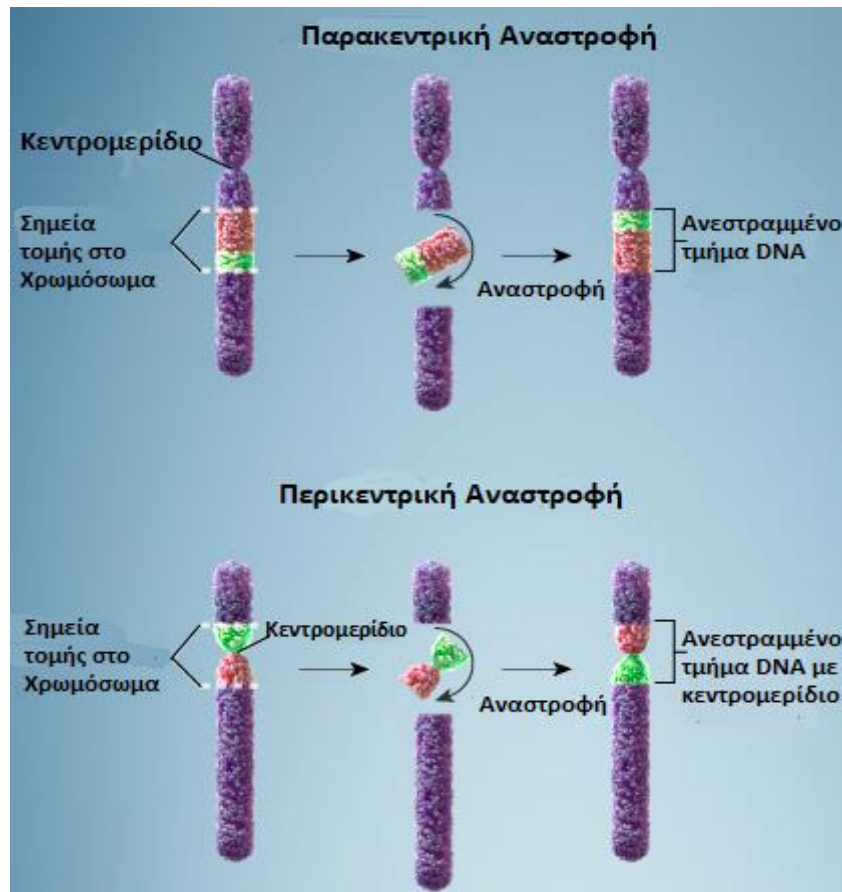
Αναστροφή (inversion) παρατηρείται όταν ένα χρωμόσωμα υποστεί δύο θραύσεις και ακολούθως ανασυσταθεί με ανεστραμμένο το τμήμα, μεταξύ των δύο σημείων θραύσης. Οι γενωμικές αναστροφές είναι μια ολόένα και περισσότερο αναγνωρισμένη πηγή γενετικής ποικιλομορφίας. Συχνά οι αναδιατάξεις αυτές κληρονομούνται από τους γονείς, αν και πιο σπάνια μπορούν να προκύψουν και *de novo* – 8,5% [4]. Δύο σενάρια υπάρχουν για την προέλευση των ανθρώπινων αναστροφών: μπορεί να είναι είτε πανομοιότυπες αναδιατάξεις προερχόμενες από έναν κοινό πρόγονο (identical by descent–IBD), είτε ανεξάρτητα επαναλαμβανόμενα γεγονότα, τα οποία προκύπτουν σε άτομα που δεν έχουν συγγενική σχέση (recurrent independent events) [5].

Συνήθως μία αναστροφή δεν προκαλεί φαινοτυπικές ανωμαλίες στους φορείς διότι αποτελεί μια ισοζυγισμένη αναδιάταξη, αλλά έχει κλινική σημασία για τους απογόνους. Ο φορέας οποιασδήποτε αναστροφής διατρέχει κίνδυνο να παράγει ανώμαλους γαμέτες που μπορεί να δημιουργήσουν απογόνους με μη ισοζυγισμένη χρωμοσωματική σύσταση. Αυτό συμβαίνει γιατί όταν υπάρχει αναστροφή, σχηματίζεται ένας βρόχος κατά τη σύναψη των ομολόγων χρωμοσωμάτων στη μείωση I. Αν και ο ανασυνδυασμός καταστέλλεται μέσα στους βρόχους της αναστροφής, υπάρχουν περιπτώσεις που μπορεί να συμβεί και να οδηγήσει στην παραγωγή μη ισοζυγισμένων γαμετών. Ανάλογα με τη θέση του ανασυνδυασμού μπορούν να σχηματιστούν δύο τύποι γαμετών: ισοζυγισμένοι (φυσιολογικοί ή με αναστροφή) και μη ισοζυγισμένοι. Οι αναστροφές διακρίνονται σε δύο τύπους:

α. Στις παρακεντρικές (paracentric inversions) (που δεν περιλαμβάνουν το κεντρομερίδιο), στις οποίες και τα δύο σημεία θραύσης βρίσκονται στον ίδιο βραχίονα (Εικόνα 2). Επειδή οι παρακεντρικές αναστροφές δεν αλλάζουν την αναλογία μήκους των βραχιόνων, μπορούν στις περισσότερες περιπτώσεις να αναγνωριστούν μόνο με τεχνικές ζώνωσης των χρωμοσωμάτων ή τη μέθοδο FISH χρησιμοποιώντας ανιχνευτές ειδικούς για συγκεκριμένους γενετικούς τόπους που περιλαμβάνονται στην αναστροφή. Στις περιπτώσεις παρακεντρικών αναστροφών, τα ανασυνδυασμένα μη ισοζυγισμένα χρωμοσώματα είναι κατά κανόνα ακεντρικά ή δικεντρικά και εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων, δεν οδηγούν σε βιώσιμο απόγονο (Εικόνα 3). Επομένως, ο κίνδυνος ενός φορέα παρακεντρικής αναστροφής να αποκτήσει απόγονο με παθολογικό καρυότυπο είναι πολύ μικρός.

β. Στις περικεντρικές (pericentric inversions) (που περιλαμβάνουν το κεντρομερίδιο), στις οποίες υπάρχει από ένα σημείο θραύσης σε κάθε βραχίονα (Εικόνα.2). Οι περικεντρικές αναστροφές ταυτοποιούνται ευκολότερα, με κυτταρογενετικές μεθόδους, καθώς στην πλειοψηφία τους μεταβάλουν τόσο την αναλογία των χρωμοσωματικών βραχιόνων όσο και του προτύπου ζώνωσης [6]. Αντίθετα με τις παρακεντρικές, μία περικεντρική αναστροφή μπορεί να οδηγήσει σε μη ισοζυγισμένους γαμέτες, στους οποίους υπάρχει συγχρόνως διπλασιασμός και έλλειμμα συγκεκριμένων χρωματικών τμημάτων (Εικόνα 3). Τα διπλασιασμένα και ελλειμματικά τμήματα είναι εκείνα που βρίσκονται μακριά από την αναστροφή. Γενικά ο κίνδυνος ενός φορέα περικεντρικής αναστροφής να αποκτήσει απόγονο με μη ισοζυγισμένο καρυότυπο είναι 5% με 10%, όμως για κάθε περικεντρική αναστροφή, ο κίνδυνος αυτός είναι διαφορετικός.

Περικεντρική αναστροφή inν(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.



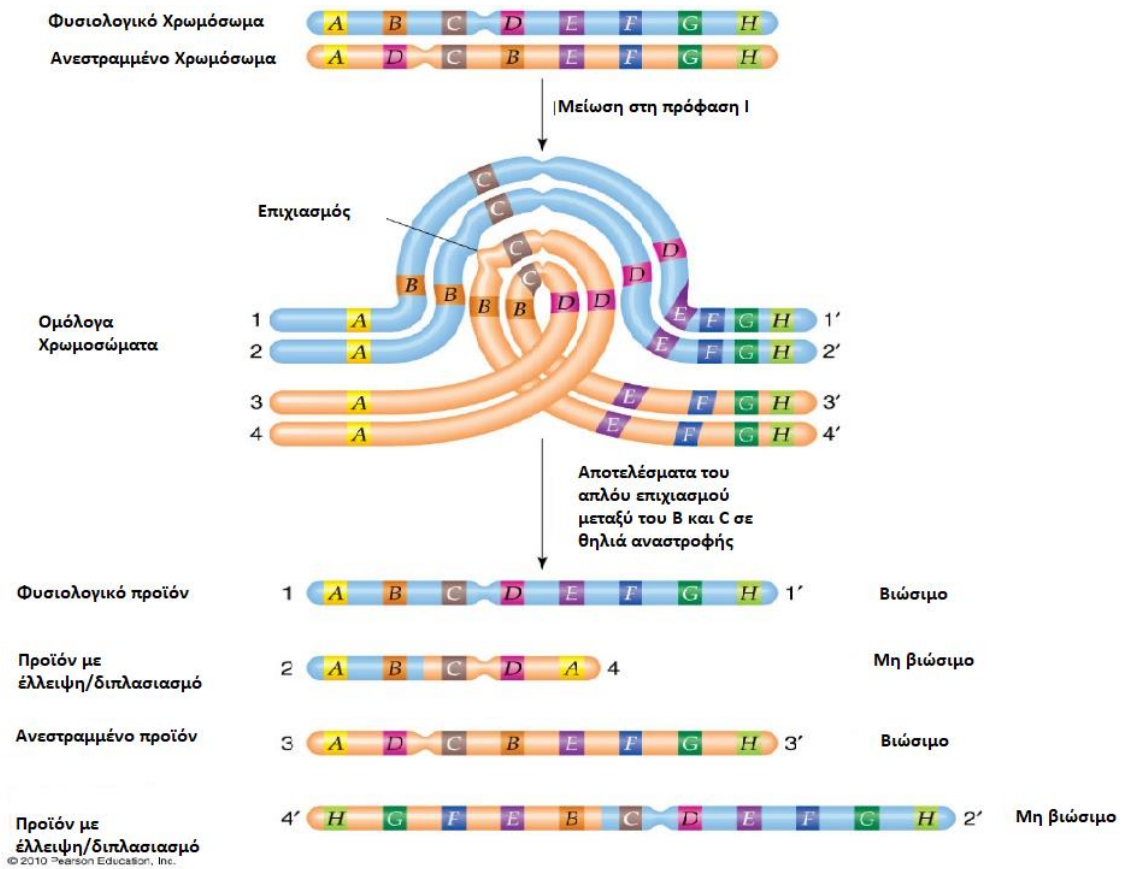
Εικόνα 2: Παρακεντρική (άνω) και περικεντρική αναστροφή (κάτω) [7].

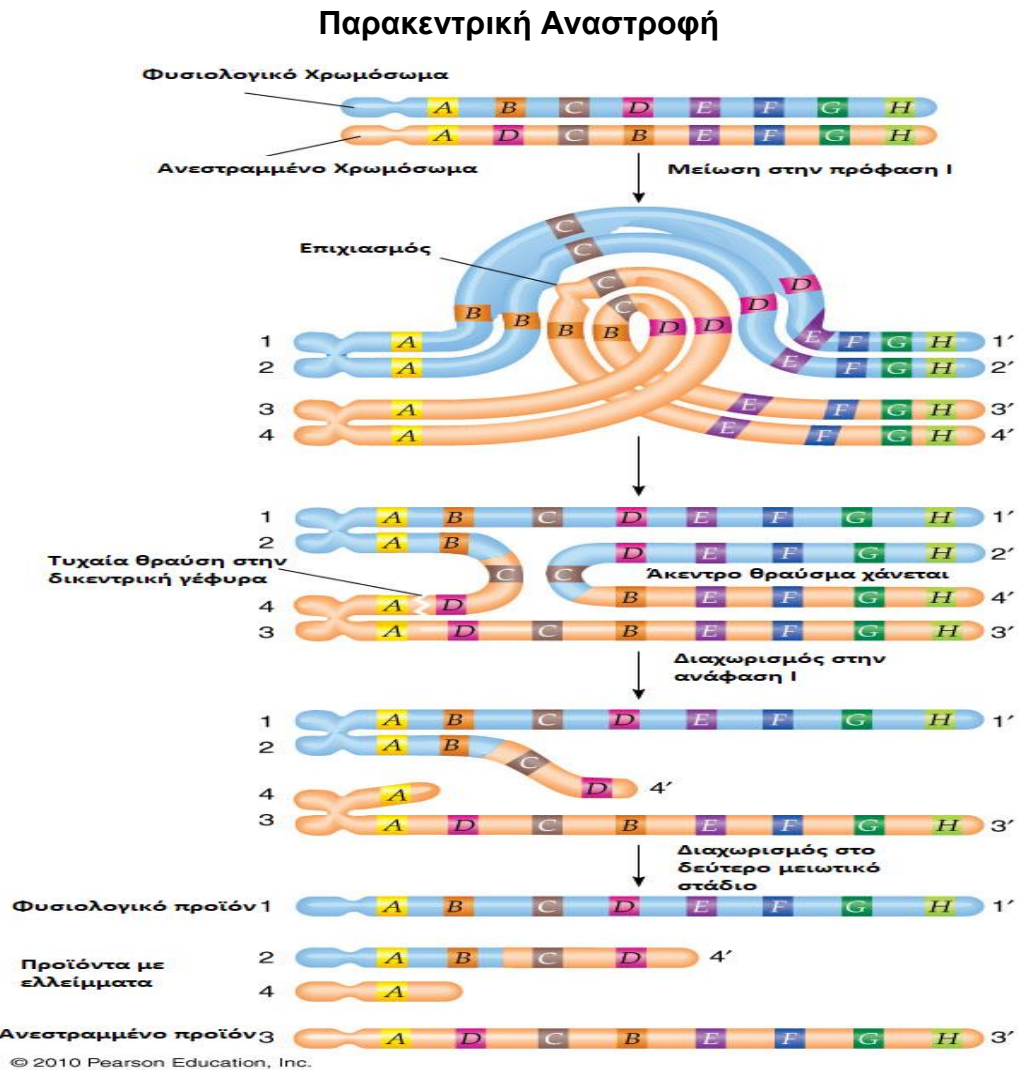
Πολλές ανθρώπινες αναστροφές έχουν αποδειχθεί ότι καταστέλλουν τον ανασυνδυασμό. Ωστόσο, αυτό φαίνεται να μην ισχύει πάντοτε, καθώς οι μεγάλες αναστροφές, όπως για παράδειγμα inν(8)(p23q22) και inν(3)(p25q21) διαχωρίζουν σχετικά μεγάλο αριθμό ανασυνδυασμένων παραγώγων [8], [9]. Όμως, αυτές φαίνονται να αποτελούν την εξαίρεση και όχι τον κανόνα [4].

Οι μεγάλες περικεντρικές αναστροφές έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα σε σχέση με τις μικρές να οδηγήσουν σε βιώσιμους ανασυνδυασμένους απογόνους, επειδή σε αυτές τις περιπτώσεις τα μη ισοζυγισμένα τμήματα σε αυτούς τους απογόνους είναι μικρότερα [10].

Περικεντρική αναστροφή in(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

Περικεντρική Αναστροφή





Εικόνα 3: Μηχανισμοί παραγωγής ανασυνδυασμένων χρωμοσωμάτων από μία περικεντρική (πάνω) και μία παρακεντρική (κάτω) αναστροφή από ανασυνδυασμό (crossing over) σε μία θηλιά αναστροφής (inversion loop) [1].

1.3.1 Η συχνότητα των αναστροφών στον ανθρώπινο πληθυσμό και η κλινική τους σημασία

Οι αναστροφές αποτελούν τη δεύτερη σε συχνότητα ομάδα δομικών αναδιατάξεων μετά τις μεταθέσεις. Υπολογίζεται ότι η συχνότητα τους κυμαίνεται σε ένα εύρος της τάξης 0,12% έως 0,7% για τις περικεντρικές και 0,1% έως 0,5% για τις παρακεντρικές αναστροφές (εξαιρουμένων των πολυμορφισμών) [11].

Ένας μικρός αριθμός κυτταρογενετικά ορατών χρωμοσωματικών αναδιατάξεων θεωρούνται πολυμορφισμοί δηλαδή παραλλαγές που όμως δεν έχουν κλινική σημασία και κατ' επέκταση δεν παρουσιάζουν φαινοτυπικό αποτέλεσμα. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται αρκετές κοινές περικεντρικές αναστροφές. Αυτές οι αναστροφές χωρίζονται σε δύο ομάδες: στη μία εξ αυτών τα σημεία θραύσης εντοπίζονται στις ετεροχρωματικές περιοχές (χρωμοσώματα 1, 3, 9, 16 και Y) ενώ στην άλλη ομάδα τα σημεία θραύσης βρίσκονται στις ευχρωματικές περιοχές (χρωμοσώματα 2, 5 και 10).

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

Οι πρώτες είναι συχνότερες σε σχέση με τις δεύτερες και αυτό μπορεί να είναι συνέπεια των μεταβολών στην ποσότητα και στην κατανομή της ετεροχρωματίνης [12].

Η συχνότερη αναστροφή στα χρωμοσώματα του ανθρώπου είναι μια μικρή περικεντρική αναστροφή του χρωμοσώματος 9, με συχνότητα εμφάνισης 1,98% σε άτομα που έχουν ελεγχθεί κυτταρογενετικά και περιλαμβάνει μόνο ετεροχρωματίνη. Η αναστροφή inv(9)(p11q12) δεν έχει κλινική επίπτωση στο φαινότυπο των φορέων και δεν φαίνεται να σχετίζεται με σημαντικό κίνδυνο αποβολής κατά την κύηση, ή απόκτησης απογόνου με μη ισοζυγισμένη χρωμοσωματική σύσταση. Γενικότερα οι περικεντρικές περιοχές του 9 είναι ιδιαίτερα περίπλοκες γενωμικές δομές, όχι μόνο εξαιτίας του μεγάλου ποσοστού ετεροχρωματίνης αλλά και της ύπαρξης διαδοχικών επαναλήψεων ευχρωματίνης. Το γεγονός αυτό μπορεί να προκαλέσει τη δημιουργία ελλειμμάτων, διπλασιασμών ή ενθέσεων και έτσι να συμβάλει στην ενίσχυση της πολυμορφίας της περικεντρομεριδιακής περιοχής του χρωμοσώματος 9 [13].

1.4 Μηχανισμοί Πρόκλησης Αναστροφών

Οι κύριοι μηχανισμοί οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση αναστροφών είναι οι εξής:

- 'Σπασίματα' διπλής έλικας (Double stranded breaks)
- Κρίσιμες περιοχές (hotspots)
- Μη αλληλικός ομόλογος ανασυνδυασμός (Non-allelic homologous recombination-NAHR)
- Μη ομόλογη σύνδεση άκρων (Non-homologous end joining-NHEJ)
- Επιδιόρθωση των θραυσμάτων διπλής έλικας (Fork stalling and template switching) [14], [15].

Ο μη αλληλικός ομόλογος ανασυνδυασμός αποτελεί το πλέον συνήθη μηχανισμό πρόκλησης αναστροφών.

1.4.1 Μη αλληλικός ομόλογος ανασυνδυασμός

Η πλειοψηφία των αναστροφών, συμπεριλαμβανόμενων των κοινών αναστροφών, αλλά και εκείνων με ευρεία γεωγραφική κατανομή, είναι αποτέλεσμα επαναλαμβανόμενων ανεξάρτητων γεγονότων με προφανώς τα ίδια σημεία τομής [4].

Υποστηρίζεται ότι τα σημεία τομής των αναστροφών αυτών εντοπίζονται σε ένα ανεστραμμένο ζεύγος ανθρώπινων ενδογενών ρετροϊκών στοιχείων εντός μεγάλων επαναλήψεων χαμηλού αριθμού αντιγράφου (low copy repeats-LCRs) [16]. Τα LCRs είναι επίσης γνωστά ως διαδοχικοί διπλασιασμοί (segmental duplications-SDs). Συγκεκριμένα είναι στοιχεία που συνιστούν έως και το 5% του απλοειδικού ανθρώπινου γονιδιώματος. Πρόκειται για αλληλουχίες DNA με μέγεθος 10 έως 500kb, περιέχουν υψηλού βαθμού ομόλογες αλληλουχίες και υπάρχουν σε δύο ή περισσότερα αντίγραφα στο γονιδίωμα.

Όταν δύο αντίγραφα παράλληλων LCRs βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη από 10 Mb μεταξύ τους, είναι δυνατό να οδηγήσουν σε κακή ευθυγράμμιση χρωμοσωμάτων ή χρωματίδων και άνισο επιχιασμό, με αποτέλεσμα την απώλεια ή το διπλασιασμό του μοναδικού τμήματος του γονιδιώματος μεταξύ των LCRs. Αυτό ονομάζεται μη-αλληλικός ομόλογος ανασυνδυασμός (non-allelic homologous recombination-NAHR) και οδηγεί σε επαναλαμβανόμενες αναδιατάξεις, όπως τις αναδιατάξεις που περιλαμβάνουν το ίδιο γενωμικό τμήμα και συμβαίνουν ανεξάρτητα σε μη συγγενικά άτομα [17].

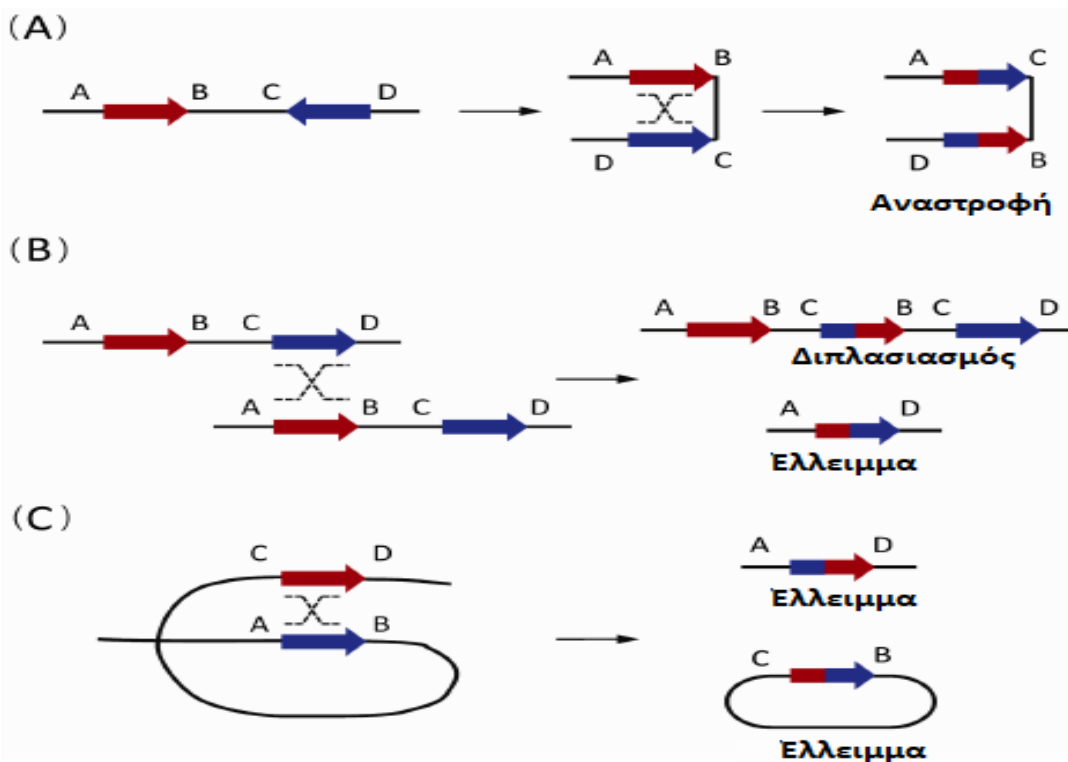
Περικεντρική αναστροφή *inv(9)(p23q22.3)* στον ελληνικό πληθυσμό.

Εάν τα παρακείμενα LCRs εμφανίζονται με ανεστραμμένο προσανατολισμό, τα αποτελέσματα του NAHR οδηγούν σε αναστροφή του γενωμικού τμήματος μοναδικής αλληλουχίας που πλαισιώνεται από αυτά τα LCRs (flanking LCRs).

Η αναστροφή δεν αλλοιώνει τον αριθμό αντιγράφων του αναδιαταγμένου γενωμικού τμήματος, αλλά μπορεί να διαταράξει ένα γονίδιο που εντοπίζεται στα σημεία θραύσης του ανασυνδυασμού, δηλαδή να προκαλέσει ένα αποτέλεσμα λόγω θέσης (position effect) (Εικόνα 4).

Ορισμένα LCRs που βρίσκονται στο ανθρώπινο γονιδίωμα παρουσιάζουν πολύπλοκη δομή. Περιέχουν πολλαπλές μονάδες, με μερικές εξ αυτών σε παράλληλο προσανατολισμό και άλλες μονάδες σε ανεστραμμένο. Ανάλογα με το ποια δομικά στοιχεία χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για τον NAHR, ενδέχεται να προκύψει έλλειμμα/διπλασιασμός (μεταξύ των εν σειρά μονάδων) ή αντίστροφα (μεταξύ των ανεστραμμένων μονάδων).

Παραδείγματα συνδρόμων τα οποία οφείλονται σε NAHR, είναι τα σύνδρομα DiGeorge (22q11.2) (OMIM #188400), Williams – Beuren (7q11.23) (OMIM #194050), Prader Willi (15q12) (OMIM #176270) και Koolen – de Vries (17q21) (OMIM #610443) [18].



Εικόνα 4: Ο μη αλληλικός ομόλογος ανασυνδυασμός (NAHR), μεταξύ περιοχών με επαναλήψεις χαμηλών αντιγράφων. Γενωμικές αναδιατάξεις που προκύπτουν από ανασυνδυασμό μεταξύ LCRs αλληλουχιών στα λεγόμενα θερμά σημεία “hotspots”. Οι LCRs αλληλουχίες απεικονίζονται ως βέλη με προσανατολισμό, όπως δείχνει η κατεύθυνση του βέλους. Τα κεφαλαία γράμματα από τις λεπτές γραμμές αναφέρονται σε μοναδικές παρακείμενες (flanking) αλληλουχίες. (A) Ο ανασυνδυασμός μεταξύ ανεστραμμένων LCRs επαναλήψεων καταλήγει σε αναστροφή (*inv*) μεγάλου μεγέθους. (B) Ο ανασυνδυασμός μεταξύ LCRs επαναλήψεων με τον ίδιο προσανατολισμό καταλήγει σε έλλειμμα (*del*) ή σε διπλασιασμό των παρεμβαλλόμενων αλληλουχιών (*dup*) [19].

Μελέτες για τα σημεία τομής του ανασυνδυασμού μέσα σε LCRs αποκάλυψαν τη συσσώρευση κλώνων σε μικρές περιοχές με απόλυτα πανομοιότυπη αλληλουχία (>300bp), οι οποίες αναφέρονται ως “κρίσιμα” σημεία ανασυνδυασμού (hotspots). Με βάση παλαιότερες μελέτες γνωστών ανασυνδυασμών [18], [20]. Ειδικότερα, ένα μοτίβο 13bp είναι κρίσιμο για την πρόκληση επιχιασμών (crossovers) στο 40% του συνόλου

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

των ανθρώπινων “hotspots”. Αποδεικνύεται έτσι πως για να διευκολυνθεί ο NAHR απαιτούνται περιοχές ομολογίας, ένα ορισμένο μήκος αλληλουχιών με πλήρη αντιστοίχιση, καθώς και “hotspot” περιοχές που να εμφανίζουν γενωμική αστάθεια και ευαισθησία σε διπλά-κλωνικά σπασίματα. Ολόκληρο το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από σημεία τα οποία είναι στόχοι του αλληλικού ομόλογου ανασυνδυασμού (allelic homologous recombination - AHR) κατά τη διάρκεια της μείωσης. Αυτά τα σημεία έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά και είναι δυνατό να συμπίπτουν με τα “hotspots” του NAHR. Έτσι, τα κοινά αρχιτεκτονικά χαρακτηριστικά του ανθρώπινου γονιδιώματος προδιαθέτουν σε γενωμικές αναδιατάξεις.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μετάθεση t(11;22)(q23;q11). Η συγκεκριμένη μετάθεση περιγράφεται σε μη συγγενικά άτομα, παρουσιάζει αξιοσημείωτη προδιάθεση και εμφανίζεται συχνά *de novo* [12]. Τα σημεία θραύσης βρίσκονται μεταξύ παλινδρομικών περιοχών οι οποίες είναι πλούσιες σε επαναλήψεις AT, LCRs, ή διπλασιασμούς και μεσολαβούν στην δημιουργία μικροελλειμμάτων και μικροδιπλασιασμών [21].

1.5 Φαινόμενο του ιδρυτή - Ιδρυτικό φαινόμενο

Στους οργανισμούς που αναπαράγονται με αμφιγονία (φυλετική αναπαραγωγή), η ποικιλομορφία διευρύνεται με τη διαδικασία του επιχιασμού που δίνει τη δυνατότητα του συνδυασμού των μεταλλάξεων στους απογόνους ακόμα και όταν αυτοί προέρχονται από ένα κοινό πρόγονο. Άλλος σημαντικός παράγοντας διαμόρφωσης της γενετικής ποικιλομορφίας αποτελεί η γενετική ροή (genetic flow) που περιλαμβάνει τους μηχανισμούς εισόδου και σταθεροποίησης σε έναν πληθυσμό νέων γενετικών μεταλλάξεων, είτε τυχαία (γενετική παρέκκλιση-genetic drift), είτε μη τυχαία μετά από επιλογή (selection) [22].

Η γενετική παρέκκλιση αφορά στην τυχαία αύξηση ενός μικρού πληθυσμού σε ένα συγκεκριμένο χώρο και μέσα σε μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Μορφές γενετικής παρέκκλισης αποτελούν το φαινόμενο της γενετικής στενωπού (bottle neck) και το φαινόμενο του ιδρυτή (founder effect). Στην γενετική στενωπό έχουμε απότομη καταστροφή ή μείωση ενός πληθυσμού σε μεγάλη κλίμακα και τα άτομα που απομένουν αποτελούν τον αρχικό πληθυσμό για την αύξηση ενός νέου. Παρατηρείται αρχικά μείωση ενός πληθυσμού με ακόλουθη αύξηση του υπολοίπου, προωθώντας τους γονοτύπους που υπάρχουν σε αυτό το μικρό πληθυσμό τη δεδομένη χρονική στιγμή. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται κυρίως μετά από απότομη εξωτερική επέμβαση (όπως φυσικά φαινόμενα, πόλεμο-γενοκτονίες κλπ.). Η γενετική παρέκκλιση μπορεί επίσης να προκαλέσει ένα ιδρυτικό αποτέλεσμα, αν και δεν είναι αυστηρά νέος πληθυσμός.

Στο φαινόμενο του ιδρυτή ο αρχικός πληθυσμός προκύπτει συνήθως από τη μετανάστευση μιας ομάδας ατόμων σε άλλο χώρο από το χώρο που καταλάμβανε ο αρχικός, χωρίς να σημαίνει ότι ο αρχικός πληθυσμός μειώθηκε δραστικά. Ο διαχωρισμός ενός πληθυσμού μπορεί να γίνει και από άλλες αιτίες εκτός της μετανάστευσης όπως διαχωρισμός ομάδων για κοινωνικό-θρησκευτικούς λόγους (π.χ. ομάδες Amish, Roma κα). Όπως είναι κατανοητό και στις δύο περιπτώσεις ο νέος πληθυσμός αποτελεί υποσύνολο του πρώτου, άρα και η γενετική σύσταση του νέου πληθυσμού είναι μέρος της αρχικής γενετικής ποικιλομορφίας με επιπρόσθετες κάποιες εκ νέου μεταλλάξεις (*de novo* mutations). Σε ακραίες περιπτώσεις, το αποτέλεσμα ιδρυτή θεωρείται ότι οδηγεί σε επακόλουθη εξέλιξη νέων ειδών.

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

Η επαναλαμβανόμενη ανίχνευση κάποιων χρωμοσωματικής αναδιάταξης στην κλινική πράξη είναι δυνατό να αποδοθεί στο φαινόμενο του ιδρυτή. Δηλαδή σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζονται μοναδικές αναδιατάξεις που έχουν έναν κοινό πρόγονο-ιδρυτή. Συγκεκριμένα οι αναδιατάξεις αυτές έχουν διαβιβαστεί πανομοιότυπα (identical by descent- IBD) από έναν κοινό πρόγονο ή και ως εκ τούτου εντοπίζονται σε άτομα με κοινή καταγωγή [23].

1.6 Τρόποι διερεύνησης του Φαινομένου του Ιδρυτή

Για την διερεύνηση του ιδρυτικού φαινομένου απαιτείται η δημιουργία ενός “χάρτη” από DNA δείκτες και μελέτη του τρόπου κληρονομής αυτών. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται μελέτη απλοτύπων ή απλοτυπική ανάλυση (haplotype analysis). Η λέξη απλότυπος είναι σύνθετη και προέρχεται από τις λέξεις ‘απλοειδής’, η οποία περιγράφει κύτταρα με μία μόνο ομάδα χρωμοσωμάτων και ‘γενότυπος’, η οποία αναφέρεται στην γενετική σύνθεση ενός οργανισμού. Ο όρος απλότυπος (haplotype) χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια ομάδα αλληλομόρφων σε έναν οργανισμό που κληρονομούνται μαζί από έναν μόνο γονέα. Ένας απλότυπος μπορεί να περιγράψει ένα ζεύγος γονιδίων που κληροδοτήθηκαν μαζί από έναν γονέα σε ένα χρωμόσωμα ή μπορεί να περιγράψει όλα τα γονίδια σε ένα χρωμόσωμα που κληροδοτήθηκαν. Αυτή η ομάδα γονιδίων κληροδοτήθηκε από κοινού λόγω της γενετικής σύνδεσης ή του φαινομένου κατά το οποίο τα γονίδια που βρίσκονται σε κοντινές αποστάσεις στο ίδιο χρωμόσωμα συν κληρονομούνται (ανισοροπία σύνδεσης). Οι δείκτες που επιλέγονται στην απλοτύπηση μπορεί να είναι, είτε πολυμορφικοί, είτε μη.

A) Στους πολυμορφικούς δείκτες περιλαμβάνονται:

- Πολυμορφισμοί μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (Restriction fragment length polymorphisms, RFLPs).
- Βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις (Short Tandem Repeats, STRs).
- Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs).

B) Στους μη πολυμορφικούς δείκτες περιλαμβάνονται:

- Ετικέτες θέσεων αλληλουχίας (Sequence-Tagged Sites, STS).
- Ετικέτες εκφραζόμενων αλληλουχιών (Expressed Sequence Tags, ESTs) [5].

1.6.1 Απλοτυπική ανάλυση STRs ως μέσο διερεύνησης πιθανού founder effect

Μερικές από τις διαδοχικά διατεταγμένες επαναλήψεις που συναντώνται στο γονιδίωμα έχουν μικρό μήκος, από δύο ως επτά ζεύγη βάσεων, και ονομάζονται βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις (STRs, Short Tandem Repeats). Ο αριθμός των επαναλήψεων αυτών είναι ιδιαίτερα μεταβλητός. Εντοπίζονται κυρίως σε ετεροχρωματινικές περιοχές, κοντά στο κεντρομερίδιο και τα τελομερή όπου το DNA είναι ισχυρά περιελιγμένο και δε μεταγράφεται. Σε περιοχές με γονίδια, απαντώνται τόσο σε εσώνια όσο και σε εξώνια και σε περιοχές που πλαισιώνουν τη μεταγραφική μονάδα. Τα STRs ονομάζονται και μικροδορυφορικοί δείκτες DNA [24].

Διακρίνονται τρεις τύποι πολυμορφισμού του μικροδορυφορικού DNA:

A) Πολυμορφισμός ως προς τον αριθμό των επαναλήψεων.

B) Πολυμορφισμός ως προς τη σύνθεση των μη επαναλαμβανόμενων 5' και 3' γειτονικών προς τις επαναλήψεις περιοχών [25].

Γ) Πολυμορφισμός ανάλογα με τη σύνθεση των επαναλήψεων. Οι μικροδορυφορικοί δείκτες μπορεί να είναι τέλειοι, ατελείς, σύνθετοι, πολύπλοκοι ή υπερμεταβλητοί.

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

Οι μικροδορυφορικοί τόποι δεν μεταφράζονται, θεωρούνται επιλεκτικά ουδέτερες περιοχές του γονιδιώματος. Αυτό σημαίνει ότι οι τόποι αυτοί μάλλον δεν υπόκεινται στην εξελικτική πίεση της φυσικής επιλογής αλλά ακολουθούν δικούς τους νόμους όσον αφορά την εξελικτική τους πορεία. Συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις και η τυχαία γενετική παρέκκλιση είναι οι κύριοι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την εξέλιξη των ουδέτερων περιοχών. Οι μεταλλάξεις δρουν ομογενοποιητικά αφού “επανεμφανίζουν” αλληλόμορφα που χάθηκαν στο παρελθόν, ενώ η τυχαία γενετική παρέκκλιση είναι κυρίως υπεύθυνη για την πληθυσμιακή διαφοροποίηση [26].

Κύριο χαρακτηριστικό του μικροδορυφορικού DNA είναι ο πολύ υψηλός ρυθμός μεταλλαξιγένεσης. Πρόκειται για ένα ρυθμό της τάξης του 10^{-5} με 10^{-2} [27], κι αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία νέων αλληλομόρφων και κατ’ επέκταση τα υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού.

Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα τα οποία φαίνεται να επηρεάζουν το ρυθμό μεταλλαξιγένεσης είναι τα εξής [28]:

A) Το μέγεθος του επαναλαμβανόμενου μοτίβου. Όσο μικρότερο είναι το μοτίβο τόσο υψηλότερο ρυθμό μεταλλαξιγένεσης εμφανίζουν οι μικροδορυφορικές περιοχές. Δηλαδή όταν το μοτίβο είναι δινουκλεοτιδικό ο ρυθμός μεταλλαξιγένεσης είναι ο μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν που εμφανίζουν τα τρινουκλεοτιδικά και τετρανουκλεοτιδικά μοτίβα [29].

B) Η σύσταση του επαναλαμβανόμενου μοτίβου. Όσο υψηλότερη είναι η περιεκτικότητα σε αδενίνη - θυμίνη τόσο μεγαλύτερος ο ρυθμός μεταλλαξιγένεσης.

Γ) Το μέγεθος και η σύσταση του αλληλομόρφου. Αυξημένη μεταλλαξιγένεση παρουσιάζουν τα μεγαλύτερα αλληλόμορφα και αυτά με τέλειες επαναλήψεις έναντι των μικρών και ατελών αντίστοιχα [30].

Δ) Η σύνθεση των γειτονικών προς τις επαναλήψεις περιοχών.

Ε) Το χρωμόσωμα. Στο χρωμόσωμα X για παράδειγμα παρατηρήθηκε μειωμένος ρυθμός μεταλλαξιγένεσης σε σχέση με τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα.

ΣΤ) Το φύλο και η ηλικία. Στα αρσενικά άτομα ο ρυθμός μεταλλαξιγένεσης είναι 5-6 φορές μεγαλύτερος. Επίσης βρέθηκε θετική συσχέτιση και με την ηλικία.

Η υψηλή συχνότητά τους στο γονιδίωμα, ο υψηλός βαθμός πολυμορφισμού και τα υψηλά ποσοστά ετεροζυγωτίας αποτελούν κύρια χαρακτηριστικά των STRs και τα καθιστούν σημαντικό εργαλείο στη μελέτη σύστασης πληθυσμών και όχι μόνο.

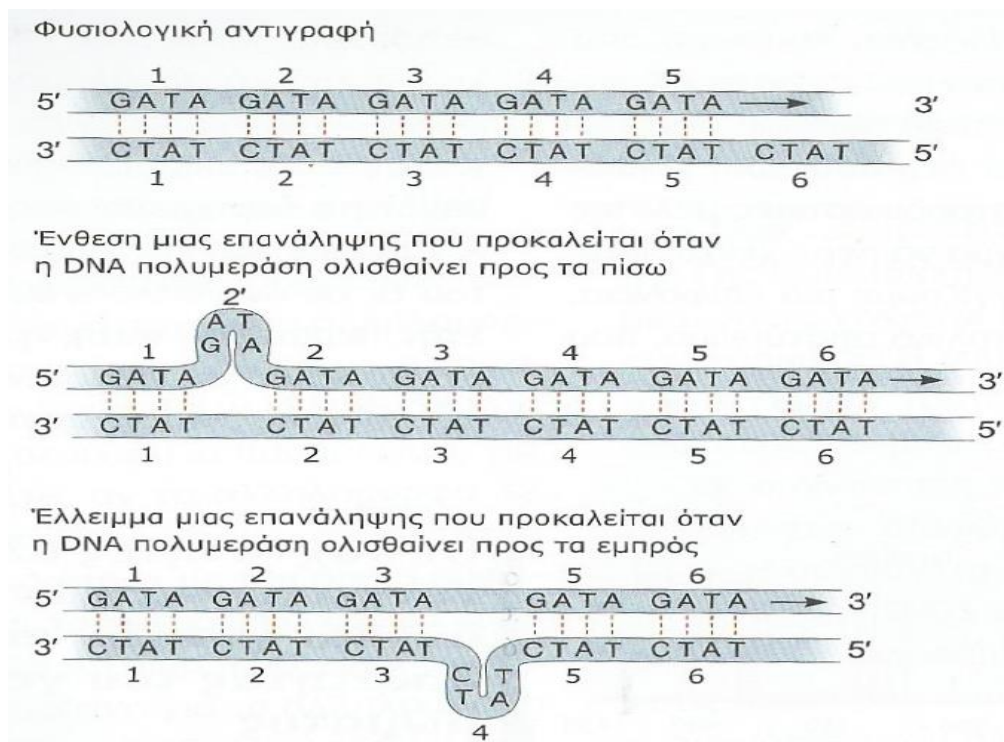
Επειδή τα διαφορετικά αλληλόμορφα των γενετικών τόπων STR έχουν μικρό μήκος, είναι δυνατόν να πολλαπλασιαστούν με PCR, γεγονός που καθιστά εφικτή την γονοτύπηση δειγμάτων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ζεύγη εκκινητών που υβριδοποιούνται εκατέρωθεν των επαναλήψεων. Σε κάθε ζεύγος ο ένας εκκινητής είναι σημασμένος με μία από τις τέσσερις φθορίζουσες ομάδες που αναγνωρίζουν οι γενετικοί αναλυτές. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, τα προϊόντα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε γυάλινα τριχοειδή. Η ανίχνευση τους γίνεται με τη βοήθεια λείζερ ανάλογα με την φθορίζουσα ομάδα με την οποία είναι σημασμένο κάθε προϊόν. Τα δεδομένα αναλύονται με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού, αποτυπώνονται σε πίνακες και γραφικές παραστάσεις. Έτσι προσδιορίζεται το μήκος των προϊόντων κάθε αντίδρασης PCR.

Πρέπει να σημειωθεί ότι σε ορισμένους γενετικούς τόπους STR παρατηρούνται μικροπαραλλαγές (micro-variants), δηλαδή αλληλόμορφα των οποίων το μήκος δεν αντιστοιχεί σε ακέραιο αριθμό των επαναλήψεων και είναι πιθανό να περιπλέξουν την ανάλυση. Ο λόγος για τον οποίο εμφανίζονται αυτές οι μικροπαραλλαγές αλλά και γενικά ο αυξημένος ρυθμός μεταλλαξιγένεσης τους είναι ο πολλαπλασιασμός με DNA

Περικεντρική αναστροφή in(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

πολυμεράση. Συγκεκριμένα όταν η DNA πολυμεράση αντιγράφει μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία, δυσκολεύεται να προχωρήσει ομαλά κατά μήκος της, με αποτέλεσμα ορισμένες φορές να ολισθαίνει είτε προς τα εμπρός είτε προς τα πίσω παραλείποντας ή προσθέτοντας αντίστοιχα μία επανάληψη. Έτσι, το τμήμα DNA που παράγεται είναι, σε σχέση με το πραγματικό, είτε μικρότερο είτε μεγαλύτερο κατά μία επανάληψη. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται διολίσθηση της DNA πολυμεράσης (Εικόνα 5).

Το φαινόμενο αυτό είναι κάτι που μπορεί να συμβεί και κατά την PCR. Κατά την ανάλυσή τους, τα παραπροϊόντα που οφείλονται στη δυσκολία της DNA πολυμεράσης να αντιγράψει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, παράγονται σε ποσοστό το οποίο κυμαίνεται από μικρότερο του 2% έως και 15% του πραγματικού προϊόντος, ανάλογα με το γενετικό τόπο STR, το μήκος του αλληλομόρφου και την ποσότητα του DNA που αναλύεται. Τέτοια παραπροϊόντα εμφανίζονται ως μικρές κορυφές που εντοπίζονται εκατέρωθεν της κύριας κορυφής, η οποία αντιστοιχεί στο πραγματικό προϊόν. Συνήθως, οι μικρές κορυφές αγνοούνται αν είναι μικρότερες από το 15% της πραγματικής κορυφής [24].



Εικόνα 5: Παρουσία του φαινομένου της διολίσθησης της DNA πολυμεράσης και τα παραπροϊόντα PCR με μεγαλύτερο ή μικρότερο κατά μία βάση από το πραγματικό μήκος του αλληλομόρφου [24].

2 ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα μελέτη έχει διπλό στόχο:

1. Τον ακριβή χαρακτηρισμό των σημείων θραύσης της αναστροφής *inv(9)(p23q22.3)* σε κυτταρογενετικό και μοριακό επίπεδο.
2. Τον έλεγχο με ανάλυση απλοτύπων, προκειμένου να διευκρινισθεί αν πρόκειται για ανεξάρτητο επαναλαμβανόμενο συμβάν, λόγω του γεγονότος ότι τα σημεία θραύσης της συγκεκριμένης αναστροφής περιβάλλονται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ή για μοναδικό γεγονός, το οποίο συνέβη σε κοινό πρόγονο (*identical by descent-IBD, founder effect*).

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Περιγραφή Περιστατικών

Κατά το διάστημα 2005-2017, 4.700 ασθενείς παραπέμφθηκαν για κυτταρογενετικό έλεγχο λόγω ιστορικού υπογονιμότητας στο εργαστήριο Κυτταρογενετικής της Βιοιατρικής. Στην παρούσα εργασία συμπεριλήφθηκαν στη μοριακή διερεύνηση και 3 περιπτώσεις με την προς μελέτη αναστροφή από τα συνεργαζόμενα εργαστήρια (Κυτταρογενετικής και Κυτταρογενωμικής του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου και το εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων). Συνολικά μελετήθηκαν 12 περιστατικά με συμπληρωματική διερεύνηση μελών της οικογένειας σε ορισμένα εξ' αυτών. Το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό κάθε περιστατικού παρουσιάζεται αναλυτικά παρακάτω:

Περιστατικά 1, 2a και 2b - Οικογένεια 1

Πραγματοποιήθηκε χρωμοσωματικός έλεγχος με καρυότυπο σε υγιή γυναίκα 34 ετών που αντιμετώπιζε προβλήματα φυσιολογικής σύλληψης (περιστατικό 2a).

Αφού διαγνώστηκε ως ετεροζυγώτης φορέας της αναστροφής inv(9)(p23q22.3), απέκτησε μία φαινοτυπικά υγιή κόρη κατόπιν προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης (Preimplantation Genetic Diagnosis-PGD). Στην ηλικία των 20 μηνών, η κόρη εξετάστηκε στο εργαστήριο μας και διαπιστώθηκε ότι έχει κληρονομήσει την αναστροφή από τη μητέρα της (περιστατικό 2b). Στη συνέχεια η μεγαλύτερη αδερφή της μητέρας, 37 ετών, η οποία αντιμετώπιζε επίσης προβλήματα υπογονιμότητας, βρέθηκε φορέας της ίδιας αναστροφής (περιστατικό 1). Στους γονείς των δύο αδερφών δεν ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί χρωμοσωματικός έλεγχος και δεν διέθεταν άλλα αδέρφια. Η μητέρα τους δεν είχε ιστορικό αποβολών, ούτε προφανή προβλήματα υπογονιμότητας. Η καταγωγή του πατέρα τους είναι από την Βόρεια Ελλάδα και της μητέρας τους από την Πελοπόννησο.

Περιστατικό 3

Ένας 37χρονος άνδρας παραπέμφθηκε για υπογονιμότητα, με ιστορικό ολιγοασθενοσπερμίας. Μετά τη χρωμοσωματική ανάλυση βρέθηκε ότι είναι ετεροζυγώτης φορέας της inv(9)(p23q22.3). Αναφέρθηκε ότι η μητέρα του είχε δύο αποβολές και δεν έχει άλλα παιδιά. Και οι δύο γονείς του κατάγονται από τη Βόρεια Ελλάδα.

Περιστατικό 4

Γυναίκα 34 χρονών με καταγωγή από τη Βόρεια Ελλάδα παραπέμφθηκε με προβλήματα γονιμότητας και επαναλαμβανόμενες αποβολές, μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση (In Vitro Fertilization - IVF). Το αποτέλεσμα της χρωμοσωματικής ανάλυσης έδειξε ότι φέρει την αναστροφή inv(9)(p23q22.3) σε ετεροζυγωτία.

Περιστατικά 5a και 5b - Οικογένεια 2

Γυναίκα ηλικίας 31 χρόνων, η οποία διένυε τη 12^η εβδομάδα κύησης, παραπέμφθηκε για λήψη χοριακών λαχνών για χρωμοσωματικό έλεγχο λόγω αυξημένης αυχενικής διαφάνειας 8.3mm. Τα αποτελέσματα της ταχείας προγεννητικής διάγνωσης των

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

συχνότερων ανευπλοειδιών του εμβρύου με Ποσοτική Φθορίζουσα Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction, QF-PCR) ήταν συμβατά με θήλυ έμβρυο με μονοσωμία του χρωμοσώματος X (σύνδρομο Turner). Κατόπιν γενετικής συμβουλευτικής η κύηση διακόπηκε. Μετά την καλλιέργεια, βρέθηκε ότι ο καρυότυπος του εμβρύου ήταν 45,X,inv(9)(p23q22.3). Η χρωμοσωματική διερεύνηση των γονέων έδειξε ότι η αναστροφή ήταν πατρικής προέλευσης (καρυότυπος εμβρύου: 45,X,inv(9)(p23q22.3)pat). Η ανατροφή στο 9 είχε κληρονομηθεί από τον φαινομενικά υγιή πατέρα (περιστατικό 5a), ο οποίος κατάγεται από τη Βόρεια Ελλάδα. Στη συνέχεια, το ζευγάρι απέκτησε ένα υγιές αγόρι (περιστατικό 5b), του οποίου ο καρυότυπος που διεξήχθη μεταγεννητικά στο εργαστήριο μας, αποκάλυψε ότι είναι επίσης ετεροζυγώτης φορέας της πατρικής αναστροφής inv(9)(p23q22.3).

Περιστατικό 6

40χρονος άντρας παραπέμφθηκε με ιστορικό δύο αποβολών της συζύγου του. Μετά το χρωμοσωματικό έλεγχο βρέθηκε να είναι ετεροζυγώτης φορέας της inv(9)(p23q22.3). Δεν είχε καταγραφεί ιατρικό ιστορικό ή η καταγωγή της οικογένειάς του.

Περιστατικό 7

Γυναίκα ηλικίας 34 χρονών παραπέμφθηκε με ιστορικό τριών αποβολών. Ο χρωμοσωματικός έλεγχος έδειξε ότι είναι ετεροζυγώτης φορέας της inv(9)(p23q22.3). Η καταγωγή και των δύο γονέων της είναι από την Κεντρική Ελλάδα. Κατόπιν ένταξης του ζευγαριού σε πρόγραμμα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής με δότρια ωαρίων απέκτησαν ένα υγιές κορίτσι.

Περιστατικό 8a και 8b - Οικογένεια 3

Μία 32χρονη γυναίκα (8a) παραπέμφθηκε για χρωμοσωματικό έλεγχο λόγω τριών αποβολών και βρέθηκε ετεροζυγώτης φορέας της inv(9)(p23q22.3). Η καταγωγή του πατέρα της είναι από τα Ιωάννινα. Ως οικογενειακό ιστορικό αναφέρθηκε μία αδερφή που είχε διαγνωστεί με δυσπλασία των κάτω άκρων. Στη συνέχεια το ζευγάρι αποφάσισε να πραγματοποιήσει PGD και απέκτησαν ένα φαινοτυπικά υγιές κοριτσάκι, το οποίο εξετάστηκε στην ηλικία των 18 μηνών στο εργαστήριό μας και βρέθηκε να φέρει την ίδια αναστροφή με αυτή της μητέρας της (8b).

Περιστατικό 9

Μία 23χρονη γυναίκα με ιστορικό αποβολών μετά τη χρωμοσωματική ανάλυση βρέθηκε να είναι ετεροζυγώτης φορέας της αναστροφής inv(9)(p23q22.3), που είχε κληρονομήσει από τον πατέρα της. Η καταγωγή των γονέων της είναι από τη Θεσπρωτία. Μετά από PGD, το ζευγάρι απέκτησε δίδυμα (ένα αγόρι-ένα κορίτσι) που φαινομενικά είναι υγιή και έχουν κληρονομήσει την ίδια μητρική αναστροφή. Σήμερα είναι 11 ετών και είναι υγιή.

Περιστατικό 10

Μία γυναίκα 43 ετών με ιστορικό τεσσάρων αποβολών, βρέθηκε ότι είναι ετεροζυγώτης φορέας της inv(9)(p23q22.3) μετά από χρωμοσωματικό έλεγχο. Και οι δύο γονείς της είναι από τη Μακεδονία. Δεν έχει αδέρφια.

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

Περιστατικό 11a και 11b - Οικογένεια 4

Ένα δείγμα ιστών προϊόντος αποβολής (11β) από κύηση 9 εβδομάδων παραπέμφθηκε για χρωμοσωμική ανάλυση σε ένα από τα συνεργαζόμενα εργαστήρια. Ο καρυότυπος του εμβρύου βρέθηκε ανισοζυγισμένος και η μοριακή ανάλυση με Συγκριτικό Γενωμικό Υβριδισμό με Μικροσυστοιχίες (Array-CGH) αποκάλυψε ένα πιθανώς ανασυνδυασμένο χρωμόσωμα 9 [46, XX, rec(9)dup(9q)inv(9)(p23q22.3)]. Ως εκ τούτου, διερευνήθηκαν μέλη της οικογένειας. Η χρωμοσωμική ανάλυση των γονέων αποκάλυψε ότι η μητέρα (11a) ηλικίας 25 ετών είναι ετεροζυγώτης φορέας μιας περικεντρικής αναστροφής του χρωμοσώματος 9 [46,XX,inv(9)(p23q22.3)]. Ακολούθως, εξετάστηκαν οι μητρικοί γονείς καθώς και η αδελφή και διαπιστώθηκε ότι τόσο η μητέρα όσο και η αδελφή της είναι φορείς της ίδιας αναστροφής. Η προγεννητική διάγνωση προσφέρθηκε σε όλες τις μεταγενέστερες εγκυμοσύνες των φορέων και γεννήθηκαν 3 υγιή παιδιά τα οποία φέρουν τη φαινομενικά ισορροπημένη αναστροφή inv(9)(p23q22.3). Καμία άλλη αποβολή δεν σημειώθηκε στην οικογένεια. Η οικογένεια είναι Κυπριακής καταγωγής.

Περιστατικό 12

Ένα 6χρονο αγόρι παραπέμφθηκε για χρωμοσωματική ανάλυση λόγω καθυστέρησης λόγου. Η ανάλυση αποκάλυψε μια φαινομενικά ισοζυγισμένη αναστροφή του χρωμοσώματος 9 [46, XY, inv(9)(p23q22.3)]. Ακολούθησε Συγκριτικός Γενωμικός Υβριδισμός με μικροσυστοιχίες (Array-CGH) με τη χρήση Cytochip Oligoarray (BlueGnome/Illumina Inc-version 1.0) με 105.000 ολιγονουκλεοτίδια και έγινε επιβεβαίωση της ισορροπημένης φύσης της αναστροφής σε πλατφόρμα με διακριτική ικανότητα 100kb. Μεταγενέστερη κυτταρογενετική ανάλυση των γονέων αποκάλυψε την ίδια αναστροφή στον υγιή πατέρα. Δεν υπήρξαν τεκμηριωμένες αποβολές ή προβλήματα υπογονιμότητας στην οικογένεια. Η αναστροφή που ανιχνεύτηκε στο γιο θεωρήθηκε τότε ως συμπτωματικό εύρημα, που δεν σχετίζεται με την αιτία της παραπομπής. Ο πατέρας είναι από τη Βόρεια Ελλάδα και η μητέρα είναι από την Κύπρο.

3.2 Κυτταρογενετικός Ελέγχος (Καρυότυπος περιφερικού αίματος)

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εξέταση βασίζεται στην χρήση μιτωτικών παραγόντων, ώστε να διεγερθούν οι πληθυσμοί των T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα και να αρχίσουν να διαιρούνται. Στην συνέχεια με την βοήθεια ανάλογων ουσιών, οι καλλιέργειες συγχρονίζονται ώστε στο τέλος να υπάρχει ένας ικανοποιητικός αριθμός κυττάρων στο στάδιο της μετάφασης, τα οποία μετά από συλλογή και επεξεργασία καθιστούν δυνατή την ανάλυση των χρωμοσωμάτων στο οπτικό μικροσκόπιο.

Τα βασικά στάδια της μεθόδου περιλαμβάνουν:

1. Τον εμβολιασμό του δείγματος σε ειδικά καλλιεργητικά υλικά σε μορφή υγρής καλλιέργειας (set-up) και τοποθέτηση στους 37°C για συνολικά 72h παρουσία μιτογόνου (PHA) το οποίο επάγει τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων.
2. Την προσθήκη θυμιδίνης 16h πριν τον τερματισμό της καλλιέργειας για συγχρονισμό και ζώνωση υψηλής ευκρίνειας (high resolution).
3. Την προσθήκη κολχικίνης για τη συγκομιδή μεταφάσεων.
4. Την προσθήκη υποτονικού διαλύματος για να ελευθερωθούν τα χρωμοσώματα.

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

5. Τη μονιμοποίηση των χρωμοσωμάτων.
6. Το στρώσιμο σε αντικειμενοφόρες πλάκες.
7. Τη χρώση των χρωμοσωμάτων.
8. Την ανάλυση των χρωμοσωμάτων και την καρυοτύπηση.

3.2.1 Καλλιέργεια Λεμφοκυττάρων Περιφερικού Αίματος

3.2.1.1 Εμβολιασμός (Set up)

Πάγιος Εξοπλισμός

- Επωαστικός κλίβανος (37 °C ±1)(HealForceSmartcell)
- Θάλαμος νηματικής ροής(ESCO Smart Control Class II A/B3)

Αναλώσιμα

- Φιαλίδια Nunc (Nuclon Delta Tubes, flat W/screw cap, Thermo Fisher Scientific, Denmark)
- Αποστειρωμένες πιπέτες Pasteur 3mL, μίας χρήσης (LP Italiana Spa, Italy)
- Σύριγγες ινσουλίνες 1mL(BD Plastipack, Spain)
- Στατό

Καλλιεργητικά Υλικά

- Chromosome Medium P (Euroclone)
- PB-Max karyotyping medium (Gibco)

Διαδικασία

Ο εμβολιασμός των δειγμάτων γίνεται μέσα σε 48h από τη στιγμή της λήψης, υπό στείρες συνθήκες.

1. Για κάθε δείγμα αίματος, δύο φιαλίδια Nunc (ένα για κάθε καλλιέργεια) τοποθετούνται στο στατό.
2. Σε κάθε φιαλίδιο αναγράφονται τα στοιχεία του εξεταζόμενου ατόμου (το επίθετο, το όνομα και το φύλο), ο αριθμός της καλλιέργειας και ο κωδικός του εργαστηρίου.
3. Ανασηκώνοντας κάθε πώμα, 5mL καλλιεργητικού υλικού Medium P και PB-Max (37 °C) προστίθενται σε κάθε φιαλίδιο των καλλιεργείων 1 και 2 αντίστοιχα.
4. Αναρροφώνται με τη σύριγγα 0,9mL από κάθε δείγμα και μοιράζονται στα 2 φιαλίδια Nunc (0,45mL και 0,45mL). Η ποσότητα αίματος μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την ηλικία ή την κατάσταση των εξεταζόμενων ατόμων.
5. Τα φιαλίδια ανακινούνται αργά 1-2 φορές και τοποθετούνται στον κλίβανο.

3.2.2 Προσθήκη και Ξέπλυμα Θυμιδίνης

Προκειμένου να συγχρονιστούν οι καλλιέργειες χρησιμοποιούνται παράγοντες που μπορούν να μπλοκάρουν τον κυτταρικό κύκλο με τρόπο αναστρέψιμο. Ένας από τους αποτελεσματικότερους παράγοντες 'blocking' είναι η θυμιδίνη. Το καλύτερο μπλοκάρισμα για το περιφερικό αίμα επιτυγχάνεται 45-47h μετά τον εμβολιασμό. Ο

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

συγχρονισμός αυτός συμβάλλει ώστε η ζώνωση των χρωμοσωμάτων να είναι υψηλής διακριτικότητας (High Resolution).

Η άρση του 'blocking' επιτυγχάνεται με ξέπλυμα των καλλιιεργειών με καθαρό καλλιιεργητικό χωρίς ΡΗΑ. Ο καλύτερος χρόνος για ξέπλυμα για τα περιφερικά αίματα είναι 4-5h περίπου πριν τη συγκομιδή (harvest).

Εξοπλισμός

- Επωαστικός κλίβανος (37 °C ±1)(Heal Force Smartcell)
- Θάλαμος νηματικής ροής(Esco Smart Control Class II A/B3)
- Μηχανική πιπέτα ακριβείας 1000μL
- Φυγόκεντρος
- Απαγωγός

Αναλώσιμα

- Ρύγγη πιπέτας 1000μL
- Στατό
- Πιπέτες Pasteur 3mL, μίας χρήσης, μη στείρες(LP Italiana Spa, Italy)

Καλλιιεργητικά υλικά και διαλύματα

- RPMI (περιέχει 2mLγλουταμίνη, 1mLPenicillin/Streptomycin και 20mLορού)
- DPBS (Gibco)
- Αντισηπτικό

Διαδικασία

1. 52h μετά τον εμβολιασμό, τα φιαλίδια Nunc μεταφέρονται στο θάλαμο νηματικής ροής.
2. Οι δύο καλλιέργειες διαχωρίζονται.
3. 100μL διαλύματος θυμιδίνης 1, προστίθενται σε κάθε καλλιέργεια 1. Με διαφορετικό ρύγγος προστίθενται 100μL διαλύματος θυμιδίνης 2 σε κάθε καλλιέργεια 2.
4. Τα φιαλίδια Nunc ανακινώνται ελαφρά έως ότου διαλυθεί ξανά το αίμα που έχει καθιζάνει στο υπερκείμενο.
5. Τα φιαλίδια τοποθετούνται και πάλι στον επωαστικό κλίβανο όπου και παραμένουν για 16h.
6. 16 ώρες μετά την προσθήκη της θυμιδίνης, τα φιαλίδια Nunc φυγοκεντρώνονται στις 1700στροφές/min (rpm) για 7min.
7. Τα φιαλίδια μεταφέρονται στον απαγωγό και το υπερκείμενο αφαιρείται και απορρίπτεται σε δοχείο που περιέχει αντισηπτικό με τη χρήση μη στείρας πιπέτας Pasteur.
8. Χτυπώντας ελαφρά το φιαλίδιο με το χέρι, αναδιαλύεται το ίζημα.
9. Με τη χρήση πιπέτας Pasteur, προστίθενται περίπου 10mL PBS σε κάθε φιαλίδιο.
10. Τα φιαλίδια ανακινούνται ελαφρά και φυγοκεντρώνονται και πάλι (1700rpm/7min).

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

11. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο αφαιρείται και απορρίπτεται όπως και πρωτύτερα.
12. Το ίζημα αναδιαλύεται.
13. Με τη χρήση πιπέτας Pasteur, προστίθενται 5mL RPMI complete σε κάθε φιαλίδιο.
14. Τα φιαλίδια ανακινούνται ελαφρά και τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο για 3h και 45 min.

Σημείωση:

Οι συνολικές ποσότητες διαλυμάτων που θα χρειαστούν για το στάδιο των ξεπλυμάτων υπολογίζονται και τοποθετούνται σε φλάσκες, οι οποίες έπειτα τοποθετούνται στον κλίβανο CO₂ (37 °C, 5% CO₂), ώστε την επόμενη ημέρα να ελεγχθεί η στειρότητα των υλικών.

3.2.3 Συγκομιδή Κυττάρων (Harvest)

Πάγιος Εξοπλισμός

- Φυγόκεντρος (HettichRotina 48)
- Κλίβανος CO₂ (Heal Force Smartcell)
- Απαγωγός
- Υδατόλουτρο
- Vortex
- Στατό

Αναλώσιμα

- Σύριγγες ινσουλίνης 1mL (BD Plastipack, Spain)
- Πιπέτες Pasteur 3mL μίας χρήσης, μη στείρες (Βιοδυναμική ΑΕ, Ελλάς)

Διαλύματα

- Κολσεμίδα (Colcemide), 10μg/mL in PBSw/Ca²⁺, Mg²⁺, 25mL (BiochromAG, Germany)
- Υπότονο διάλυμα KCl, 75mM 100mL (Biochrom AG, Germany)
- Methanol Gr for analysis, 2.5 L (Merck, Germany)
- Acetic acid (glacial) 100% anhydrous Gr for analysis, 2.5l (Merck, Germany)
- Μονιμοποιητικό FIX (3 Methanol : 1 Acetic acid)
- Αντισηπτικό

Διαδικασία

1. Δουλεύοντας και πάλι στον απαγωγό, σε κάθε φιαλίδιο προστίθενται 60-80μL Colcemide (2 σταγόνες με σύριγγα ινσουλίνης χωρίς βελόνα).
2. Οι καλλιέργειες αναδεύονται ελαφρά και επανατοποθετούνται στον κλίβανο για 10min.
3. Η ποσότητα FIX που θα χρειαστεί για το σύνολο των δειγμάτων τοποθετείται στην κατάψυξη.

Περικεντρική αναστροφή in(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

4. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται (1700rpm/7min) και χρησιμοποιώντας μη στείρες πιπέτες Pasteur των 3mL, το υπερκείμενο αναρροφάται και απορρίπτεται σε δοχείο που περιέχει αντισηπτικό.
5. Το ίζημα αναδιαλύεται και σε κάθε φιαλίδιο προστίθενται 5mL KCL.
6. Τα φιαλίδια στη συνέχεια τοποθετούνται στο υδατόλουτρο υπό ανάδευση (37 °C) για 25min.
7. Τα δείγματα προμονιμοποιούνται, προσθέτοντας στα τοιχώματα των φιαλιδίων 4 σταγόνες FIX (-20 °C) με πιπέτα Pasteur.
8. Ακολουθεί ήπια ανάδευση των δειγμάτων και φυγοκέντρωση (1700rpm/7min).
9. Το υπερκείμενο αναρροφάται και απορρίπτεται.
10. Το ίζημα αναδιαλύεται με τη βοήθεια του Vortex και το κάθε φιαλίδιο γεμίζεται σταδιακά και σταθερά με FIX μέχρι πάνω, ενώ βρίσκεται πάνω στο Vortex.
11. Τα δείγματα παραμένουν στο ψυγείο για 20min.
12. Ακολουθεί ακόμα ένας κύκλος φυγοκέντρωσης αφαίρεσης του υπερκειμένου, αναδιάλυσης του ιζήματος και γεμίσματος με FIX μέχρι πάνω.
13. Τέλος, τα δείγματα τοποθετούνται στους 4 °C, μέχρι την επόμενη ημέρα

3.2.4 Επίστρωση Μονιμοποιημένων Κυττάρων

Σκοπός της επίστρωσης είναι η μονιμοποίηση των παρασκευασμάτων σε αντικειμενοφόρους πλάκες με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτευχθεί το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα όσον αφορά στο άνοιγμα των μεταφάσεων και στη ποιότητα των χρωμοσωμάτων.

Εξοπλισμός

- Φυγόκεντρος (Hettich Rotina 48)
- Μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης Olympus
- Απαγωγί
- Θερμαινόμενη πλάκα
- Κουτιά αποθήκευσης αντικειμενοφόρων πλακών

Αναλώσιμα

- Πιπέτες Pasteur 1mL, μίας χρήσης, μη στείρες (Βιοδυναμική ΑΕ, Ελλάς)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες Superfrost, 76 x 26mm, ground edges, precleaned (Mensel-Gläser, Germany)

Διαλύματα

- Fix (3 Methanol : 1 Acetic acid)
- Αντισηπτικό

Διαδικασία

Η διαδικασία της επίστρωσης πραγματοποιείται σε απαγωγούς που βρίσκονται σε ειδικό θάλαμο διατήρησης σταθερών συνθηκών υγρασίας και θερμοκρασίας. Οι

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

ευνοϊκότερες συνθήκες για την επίστρωση των «αιμάτων» στο συγκεκριμένο θάλαμο είναι 22-26 °C θερμοκρασία και 43-44% υγρασία.

1. 1-2 ώρες πριν ξεκινήσει η διαδικασία της επίστρωσης, ελέγχονται και καθορίζονται οι συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας στον ειδικό θάλαμο.
2. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται (1700rpm/7min).
3. Το υπερκείμενο των φιαλιδίων απορρίπτεται σε δοχείο που περιέχει αντισηπτικό.
4. Αναδιαλύεται το ίζημα.
5. Προστίθενται 6-7mL διαλύματος FIX και τα δείγματα φυγοκεντρούνται (1700rpm/7min).
6. Στη συνέχεια μεταφέρονται στον απαγωγό του ειδικού θαλάμου.
7. Με τη χρήση πιπέτας 1mL αφαιρείται το υπερκείμενο, απορρίπτοντας σε δοχείο που περιέχει αντισηπτικό.
8. Στα φιαλίδια παραμένει μικρή ποσότητα διαλύματος FIX, ανάλογα με την ποσότητα του ιζήματος.
9. Το ίζημα αναδιαλύεται με προσοχή.
10. Πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα που αναγράφεται το όνομα του εξεταζόμενου, ο αριθμός του δείγματος, ο αριθμός της καλλιέργειας κάτω αριστερά, μέσα σε κύκλο και ο αριθμός της αντικειμενοφόρου πλάκας κάτω δεξιά, ρίχνω μια σταγόνα υλικού με πιπέτα 1mL και 1 σταγόνα fix.
11. Το διάλυμα με τα μονιμοποιημένα κύτταρα αφήνεται να στεγνώσει.
12. Η πλάκα παρατηρείται στο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεως.
13. Για κάθε καλλιέργεια αίματος στρώνονται συνολικά 6 πλάκες.
14. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες μεταφέρονται στην θερμαινόμενη πλάκα σε θερμοκρασία 90 °C, όπου και παραμένουν για 2h (ή στους 60 °C, over night).
15. Στα φιαλίδια προστίθενται 3-4mL διαλύματος FIX.
16. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες συλλέγονται από την θερμαινόμενη πλάκα και τοποθετούνται σε κουτιά αρχειοθέτησης.

3.2.5 Χρώση Σε Επίστρωμένα Παρασκευάσματα

Σκοπός της χρώσης των πλακιδίων είναι η βαφή των χρωμοσωμάτων και κατά συνέπεια η εμφάνιση των χαρακτηριστικών ζωνών τους. Οι βαφές γίνονται με την μέθοδο G-banding, όπου χρησιμοποιείται το ένζυμο θρυψίνη. Κατά την επεξεργασία των πλακιδίων με μια πρωτεάση όπως η θρυψίνη εμφανίζεται χαρακτηριστική εγκάρσια ζώνωση στα χρωμοσώματα, η οποία αντανακλά τη δομική και τη λειτουργική σύνθεση τους. Οι μαύρες ζώνες αντιστοιχούν σε περιοχές DNA πλούσιες σε αδενίνη και θυμίνη, οι οποίες περιέχουν μικρότερο αριθμό γονιδίων από τις λευκές περιοχές.

G-banding

Πάγιος Εξοπλισμός

- Δοχεία Coplin

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

Αναλώσιμα

- Σύριγγες 5mL(Novico, Italy)
- Καλυπτρίδες πλάκες 24 x 50mm, 100 St/pcs

Διαλύματα

- FBS (Fetal Bovine Serum) 100mL (Biochrom AG, Germany)
- Φυσιολογικός ορός NaCl 0.9%, 250mL(Βιοσέρ, Ελλάς)
- Lieshman's eosin methylene blue solution modified for microscopy, 500mL (Merck, Germany)
- PBS Dulbeco 500mL (Biochrom AG, Germany)
- Θρυψίνη/EDTA solution (1:250), 2.5% (w/v), 100mL (Biochrom AG, Germany)
- Buffer tablets "Gurr" Powder, pH approx 6.8 (Invitrogen, Germany)
- Νερό για έγχυση, 1000mL
- Lieshmans's Buffer (1 Buffer tablet "Gurr" Powder in 1 x 1000mL νερό για έγχυση)
- DPX mountant for microscopy, 500mL (BDH, England)

Διαδικασία

1. Τα διαλύματα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για τη χρώση ετοιμάζονται καθημερινά και τοποθετούνται μέσα σε καθαρά δοχεία Corlin.
2. Στο πρώτο δοχείο προστίθενται 47,5mL DPBS και 2,5mL Trypsin 1:250 (θερμοκρασία δωματίου).
3. Στο δεύτερο δοχείο τοποθετούνται περίπου 50mL NaCl 0.9% και μερικές σταγόνες FBS.

Αφού ετοιμαστούν τα διαλύματα, ακολουθεί η χρώση των στρωμένων πλακών.

4. Καθορίζεται ο χρόνος επώασης στο διάλυμα θρυψίνης, ο οποίος ποικίλει κάθε φορά ανάλογα με τις συνθήκες στρωσίματος και αναγράφεται πάνω στην πλάκα.
5. Η πλάκα ξεπλένεται στο δεύτερο δοχείο.
6. Χρησιμοποιώντας τη σύριγγα των 5mL ετοιμάζεται το διάλυμα χρώσης με σύσταση 4 Buffer:1 Lieshmans.
7. Η πλάκα τοποθετείται σε οριζόντια θέση και καλύπτεται με το διάλυμα χρώσης για 40sec περίπου.
8. Η πλάκα αφήνεται να στεγνώσει σε κάθετη θέση.
9. Προστίθενται 3 μικρές σταγόνες Entellan.
10. Τοποθετείται η καλυπτρίδα πάνω στην αντικειμενοφόρο και αφήνεται για λίγο το Entellan να απλώσει.
11. Ακολουθεί παρατήρηση των πλακών στο μικροσκόπιο.

3.2.6 Ανάλυση και Φωτογράφιση Δείγματος

Η διαδικασία της ανάλυσης των δειγμάτων Περιφερικού Αίματος γίνεται σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης Κυτταρογενετιστών (European Cytogeneticists Association-ECA), την Ένωση Κλινικών Κυτταρογενετιστών του Ηνωμένου Βασιλείου (ACC), το ISCN 2016 [31-35]. Ενώ με την διαδικασία της φωτογράφισης δίνεται η δυνατότητα ηλεκτρονικής επεξεργασίας των μεταφάσεων και

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

επιπλέον να απεικονίζεται ο καρυότυπος του/της εξεταζομένου/ης με τη βοήθεια του προγράμματος IKAROS της εταιρείας Metasystems.

Αναλώσιμα

- Κεδρέλαιο Merck για μικροσκόπηση (Irritant)

Μηχανήματα- Πάγιος Εξοπλισμός

- Οπτικό μικροσκόπιο με προσαρμοσμένη κάμερα και αντικειμενικούς φακούς 10× και 100×.
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής που διαθέτει το πρόγραμμα IKAROS (Metasystems) [22, 32].

3.3 Ανάλυση FISH

Η Fluorescence in situ Hybridization (FISH)(Φθορίζουσα Υβριδοποίηση In Situ) αποτελεί μέθοδο της μοριακής κυτταρογενετικής με την οποία είναι δυνατό να ανιχνευθούν υπομικροσκοπικές χρωμοσωματικές ανευπλοειδίες/ανισοζυγίες οι οποίες δεν παρατηρούνται με το συμβατικό καρυότυπο (μικροελλείμματα), να ταυτοποιηθούν υπεράριθμα χρωμοσώματα δείκτες ή να μελετηθούν ανευπλοειδίες όταν δεν είναι διαθέσιμα μεταφασικά κύτταρα. Χρησιμοποιεί ανιχνευτές φθορισμού που δεσμεύονται μόνο σε εκείνα τα μέρη του χρωμοσώματος με υψηλό βαθμό συμπληρωματικότητας αλληλουχίας. Συγκεκριμένα χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον εντοπισμό της παρουσίας ή της απουσίας του αριθμού αντιγράφων και της χρωμοσωματικής θέσης μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA στο χρωμόσωμα. Προκειμένου να αποκτηθεί η πληροφορία για τη χρωμοσωματική θέση, ο στόχος του υβριδισμού είναι χρωμοσωμικό επίχρισμα σε αντικειμενοφόρο πλάκα αντί για απομονωμένο DNA. Στη συνέχεια με προσεκτικούς χειρισμούς, το DNA των χρωμοσωμάτων αποδιατάσσεται, αποφεύγοντας την καταστροφή της χαρακτηριστικής μορφής των χρωμοσωμάτων. Αν και η κάθε αλληλουχία απέχει ελάχιστα από τη συμπληρωματική της, η σύνδεσή τους δεν είναι εφικτή γιατί είναι καθηλωμένες στο πλακίδιο και άρα το χρωμοσωματικό DNA παραμένει μονόκλωνο. Το πλακίδιο εκτίθεται σε διάλυμα που περιέχει σημασμένο ανιχνευτή. Ως ανιχνευτής χρησιμοποιείται ένα κλωνοποιημένο τμήμα του σχετικού DNA, μεγέθους δεκάδων κιλοβάσεων (kb), έτσι ώστε οι μικρές παραλλαγές της αλληλουχίας να μην επηρεάζουν τον υβριδισμό. Ο ανιχνευτής είναι σημασμένος με φθορίζουσα χρωστική. Μετά τον υβριδισμό το πλακίδιο ξεπλένεται και εξετάζεται μικροσκοπικά. Η μικροσκοπία φθορισμού χρησιμοποιείται για να εντοπιστούν τα σημεία στα οποία ο φθορίζων ιχνηθέτης έχει υβριδιστεί. Ένα ζεύγος σημάτων είναι ορατό στο σχετικό χρωμόσωμα.

Η FISH διακρίνεται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με το είδος των ανιχνευτών που χρησιμοποιεί. Ο συνηθέστερος τύπος ανιχνευτών για τη FISH είναι τμήματα DNA που προέρχονται από μοναδιαίες περιοχές των χρωμοσωμάτων. Αυτοί οι ανιχνευτές σηματοδοτούν ένα συγκεκριμένο ζεύγος χρωμοσωμάτων επειδή υβριδοποιούνται στις συμπληρωματικές με αυτούς, θέσεις του χρωμοσωματικού DNA.

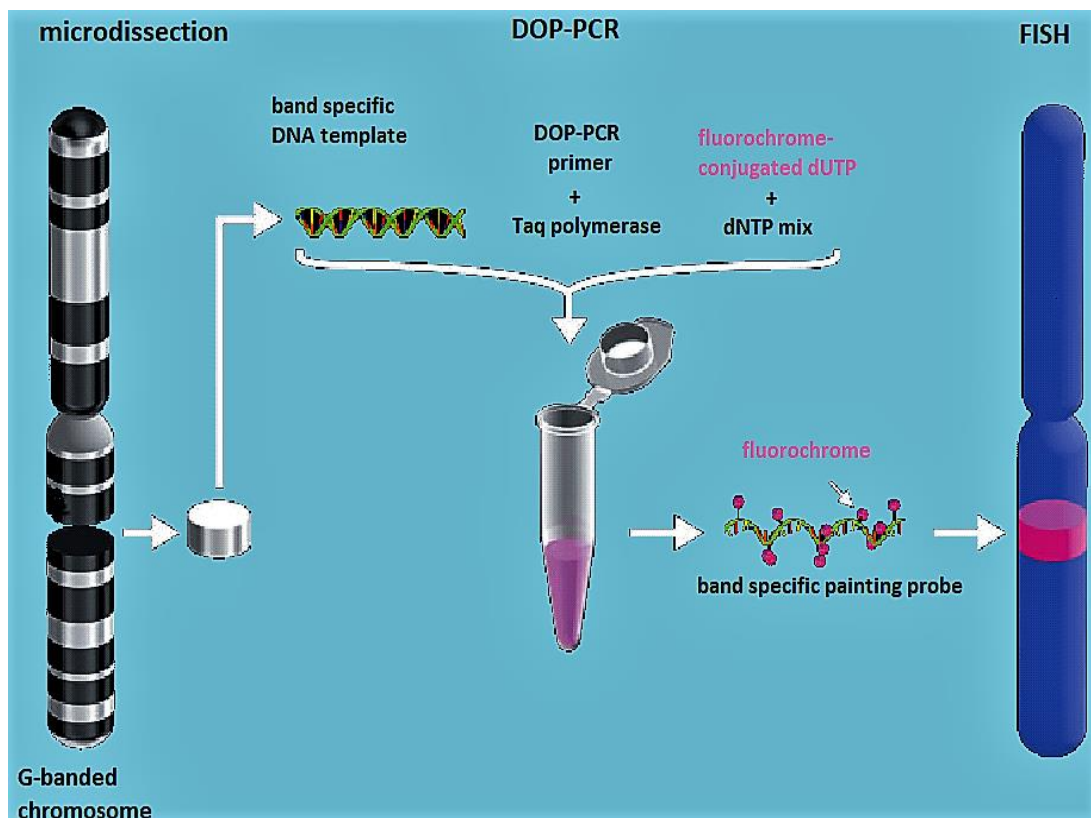
Εναλλακτικά, ένας FISH ανιχνευτής μπορεί να είναι ένα μίγμα τμημάτων DNA που προέρχονται από μία περιοχή ή από ολόκληρο χρωμοσωμικό βραχίονα ή ακόμα και από ένα ολόκληρο χρωμόσωμα και αντίστοιχα, ανάλογα με την σύσταση του φθορίζοντος ανιχνευτή, θα χρωματιστεί ένα τμήμα ή ολόκληρο το χρωμόσωμα. Αυτοί οι ανιχνευτές που αποτελούν μίγματα τμημάτων DNA, ονομάζονται ανιχνευτές 'χρώσης' χρωμοσωμάτων και αυτό το είδος FISH καλείται Multicolor FISH. Σε αυτή την κατηγορία FISH συμπεριλαμβάνονται το Multiplex-FISH (M-FISH) και Spectral Karyotyping (SKY), 24color-FISH, COBRA-FISH (COmbined Binary RATioloabeling-FISH), Color-Changing Karyotyping (CCK) ή IPM-FISH [36].

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

Ωστόσο, όλες αυτές οι μέθοδοι επειδή χρησιμοποιούν ανιχνευτές χρώσης ολόκληρων των χρωμοσωμάτων εμφανίζουν ορισμένα όρια. Συγκεκριμένα στον ακριβή εντοπισμό των σημείων τομής των μεταθέσεων, ή στην περίπτωση ενδοχρωμοσωματικών αναδιατάξεων, όπως ενδιάμεσων ελλείψεων ή αναστροφών.

3.3.1 Multicolor Banding FISH

Η τεχνική Multicolor banding (MCB) είναι μία εναλλακτική λύση υψηλής ανάλυσης σε σχέση με τις προαναφερθείσες προσεγγίσεις της FISH, η οποία επιτρέπει τη διαφοροποίηση των ειδικών περιοχών των χρωμοσωμάτων σε επίπεδο ζώνης και υποζώνης. Το μοτίβο του MCB ευθυγραμμίζεται με το GTG banding ανεξαρτήτως του μήκους του προς ανάλυση χρωμοσώματος και η ικανότητα ανάλυσης ξεπερνά κατά πολύ αυτή που μπορεί να επιτύχει το GTG banding. Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε βιβλιοθήκες που προέκυψαν με τη βοήθεια της τεχνικής μικροδιατομής (microdissection) (Εικόνα 6), οι οποίες είναι ειδικές ανά περιοχή και έχουν τη δυνατότητα να παράγουν διαφοροποιημένους λόγους έντασης φθορισμού κατά μήκος των χρωμοσωμάτων. Συγκεκριμένα χρησιμοποιεί την εισχώρηση διαφορετικών φθοριοχρωμάτων σε συγκεκριμένες χρωμοσωμικές περιοχές [37].



Εικόνα 6: Τεχνική FISH με ειδικό ανιχνευτή συγκεκριμένης χρωμοσωματικής ζώνης που δημιουργήθηκε με την μέθοδο της μικροδιατομής: μετά από απομάκρυνση της συγκεκριμένης ζώνης με μικροδιατομή, γίνεται απομόνωση και καθαρισμός του συγκεκριμένου τμήματος DNA. Ακολουθεί σήμανση με ένα φθοριόχρωμα με την τεχνική του DOP-PCR και ανάλυση FISH σε μεταφασικό χρωμόσωμα στο οποίο η σημασμένη ζώνη είναι η ακριβώς αντίστοιχη της αρχικής [38].

Όλες οι εξειδικευμένες αναλύσεις FISH πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το εργαστήριο Μοριακής Κυτταρογενετικής του Πανεπιστημίου Jena, Γερμανίας. Εφαρμόστηκε η τεχνική MCB-FISH, ώστε αρχικά να πραγματοποιηθεί μοριακή επιβεβαίωση της ισοζυγισμένης αναστροφής, καθώς και επιβεβαίωση των κοινών σημείων τομής σε όλα τα άτομα. Χρησιμοποιήθηκαν BAC ανιχνευτές, δηλαδή

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

ανιχνευτές που έχουν παραχθεί μέσω τεχνητών βακτηριακών χρωμοσωμάτων (Bacterial Artificial Chromosomes, BACs) και επιλέχθηκαν από ένα σύνολο 7000 (UKJ), οι οποίοι αλληλεπικαλύπτονται στα σημεία τομής της αναστροφής.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός “homemade” ανιχνευτών για τον p βραχίονα:

-RP11-10C15 στο 9p23 (hg19: 11,909,073-12,084,271) με

-RP11-187K14 στο 9p23 (hg19: 12,884,920-12,962,270) και pcr9p.

Και ένας συνδυασμός ανιχνευτών για τον q βραχίονα:

-RP11-535C21 στο 9q22.3 (hg19: 100,704,795-100,785,110)

-RP11-96L7 στο 9q22.33 (hg19: 101,849,491-101,955,621) και pcr9p.

Στο περιστατικό 3 δεν χρησιμοποιήθηκαν οι προαναφερθέντες περικεντρικοί ανιχνευτές, αλλά μελετήθηκε με την χρήση των BACs για τον p βραχίονα: MCB 9-1, MCB 9-2, στο q βραχίονα: MCB 9-5, MCB 9-5a. Οι συγκεκριμένοι ανιχνευτές από μικροδιατομή, συνδέονται στις ίδιες περιοχές που θεωρούνται πιθανές ως θέσεις τομής, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούν διαφορετικά φθοριοχρώματα.

Όλοι οι τοποειδικοί ανιχνευτές από βακτηριακά τεχνητά χρωμοσώματα (bacterial artificial chromosomes-BAC) αποκτήθηκαν από το BACPAC Chori (Oakland, USA).

Οι συγκεκριμένοι ανιχνευτές είναι τύπου “break-apart”, δηλαδή σε ένα φυσιολογικό χρωμόσωμα οι ανιχνευτές ανάλογα με το που εντοπίζονται κανονικά βρίσκονται ο ένας δίπλα στο άλλο – στον ίδιο βραχίονα. Στην περίπτωση αναστροφής, όπως στην περίπτωση μας, είτε σε περίπτωση μετάθεσης οι ανιχνευτές απομακρύνονται και είτε βρίσκονται σε διαφορετικό βραχίονα, σε περίπτωση αναστροφής, είτε σε άλλο χρωμόσωμα, σε περίπτωση μετάθεσης.

3.4 Απλοτύπηση

Για τη διερεύνηση πιθανής κοινής καταγωγής των ατόμων που φέρουν την υπό μελέτη αναστροφή inv(9)(p23q22.3) και της θεωρίας του φαινομένου ιδρυτή διεξήχθη απλοτυπική ανάλυση μέσω του προσδιορισμού των γονοτύπων κάθε ατόμου σε επιλεγμένες θέσεις του χρωμοσώματος 9.

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν:

3.4.1 Απομόνωση Γενετικού Υλικού (DNA Extraction)

Η απομόνωση του συνολικού γενετικού υλικού (γενωμικό, μιτοχονδριακό) από ολικό αίμα έγινε με χρήση του συστήματος απομόνωσης της εταιρείας Qiagen και συγκεκριμένα DNA Blood MiniKit.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε βάσει του πρωτοκόλλου είναι η εξής:

1. Μεταφέρονται 20μL από την πρωτεάση QIAGEN (ή πρωτεΐνωση K) στον πυθμένα ενός σωληναρίου μικροφυγοκέντρωσης των 1,5mL.
2. Προσθέτονται 200μL ολικού αίματος στο σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης.
3. Προσθήκη 200μL ρυθμιστικού διαλύματος AL στο δείγμα. Αναδεύουμε με την χρήση vortex για 15sec.
4. Επώαση στους 56 °C για 10min.

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

5. Πραγματοποίηση μιας σύντομης φυγοκέντρησης στο σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης των 1,5mL για την απομάκρυνση των σταγονιδίων από την εσωτερική επιφάνεια του πώματος.
6. Προσθήκη 200μL αιθανόλης (100%) στο δείγμα, και ανάδευση ξανά με τη χρήση vortex για 15sec. Μετά την ανάδευση, πραγματοποιείται μία σύντομη φυγοκέντρηση στο σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης για την απομάκρυνση των σταγονιδίων από το καπάκι.
7. Μεταφέρεται προσεκτικά το μείγμα από το 6^ο βήμα στην στήλη QIAamp Mini (σε ένα σωληνάριο συλλογής των 2mL) χωρίς να βραχεί το χείλος. Ασφαλίζεται το καπάκι, και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για ένα 1 min. Τοποθετούμε την στήλη φυγοκέντρησης QIAamp Mini σε ένα καθαρό σωληνάριο συλλογής των 2mL και απόρριψη του σωληναρίου που περιέχει το διήθημα.
8. Ανοίγεται προσεκτικά η στήλη φυγοκέντρησης QIAamp Mini και γίνεται προσθήκη 500μL ρυθμιστικού διαλύματος AW1 χωρίς να βραχθεί το χείλος. Κλείνεται το καπάκι και φυγοκεντρείται το σωληνάριο στις 10.000 rpm για 1min. Στη συνέχεια τοποθέτηση της στήλη φυγοκέντρησης QIAamp Mini σε ένα καθαρό σωληνάριο συλλογής των 2mL και απόρριψη του σωληναρίου συλλογής που περιέχει το διήθημα.
9. Ανοίγεται προσεκτικά η στήλη φυγοκέντρησης QIAamp Mini και γίνεται προσθήκη 500μL ρυθμιστικού διαλύματος AW2 χωρίς να βραχθεί το χείλος. Κλείνεται το καπάκι και φυγοκεντρείται στη μέγιστη ταχύτητα (14.000 rpm) για 3min.
10. Τοποθετείται η στήλη φυγοκέντρησης QIAamp Mini σε ένα καινούργιο σωληνάριο συλλογής των 2mL και απορρίπτεται το παλιό σωληνάριο συλλογής που περιέχει το διήθημα. Φυγοκεντρείται στη μέγιστη ταχύτητα για 1,5min.
11. Τοποθετείται η στήλη φυγοκέντρησης QIAamp Mini σε νέο σωληνάριο και γίνεται προσθήκη 200μL απεσταγμένου νερού. Επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου (15-25°C) για 5min, και έπειτα φυγοκεντρείται στις 14.000 rpm για 2min. Απορρίπτεται η QIAamp Mini και μέσα στο σωλήνα φυγοκέντρησης περιέχεται το DNA.

3.4.2 Μέτρηση Συγκέντρωσης Γενωμικού DNA

Η μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των διαλυμάτων DNA που απομονώθηκαν, πραγματοποιείται με την βοήθεια της φασματομετρίας υπεριώδους φωτός. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο NanoDrop (ND-1000) της εταιρείας Thermo Scientific. Η λειτουργία του βασίζεται σε ένα ειδικό σύστημα συγκράτησης του δείγματος ανάμεσα σε δύο επιφάνειες εξαιτίας της επιφανειακής τάσης. Απαιτείται μικρή ποσότητα δείγματος (2μL) χωρίς προηγούμενη αραίωση.

Το λογισμικό του Nanodrop είναι το ND-1000 v3.5.2:

1. Επιλέγεται το είδος δείγματος που θα φασματοφωτομετρηθεί στη συγκεκριμένη περίπτωση το Nucleic Acid.
2. Καθαρίζονται με νερό και χειροπετσέτες οι ακροδέκτες του μηχανήματος.
3. Φορτώνονται 2μL νερού ώστε να γίνει μηδενισμός του μηχανήματος και επιλέγεται η εντολή *Blank* → *Reblank*.
4. Δίνεται το όνομα του δείγματος στο πεδίο *sample ID*.
5. Αναδεύεται με την χρήση πιπέτας το διάλυμα του DNA ώστε η μέτρηση να είναι αντιπροσωπευτική και φορτώνονται 2μL DNA.

Περικεντρική αναστροφή inν(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

6. Τέλος επιλέγεται η εντολή *measure*.

7. Από την μέτρηση λαμβάνονται οι εξής πληροφορίες:

Συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται από την απορρόφηση σε μήκος κύματος 260nm σε ng/mL και η καθαρότητα μέσω των λόγων των απορροφήσεων 260nm/280nm και 260nm/230nm. Το RNA και όρισμένες χημικές προσμίξεις απορροφούν ακτινοβολία μήκους κύματος 230 nm ενώ οι πρωτεΐνες στα 280 nm.

Ο λόγος 260nm/280nm κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 1,8-2,0, ενώ ο λόγος 260nm/230nm αναμένεται να είναι >1,5, ώστε η καθαρότητα του απομονωμένου DNA να είναι επαρκής.

Όλα τα δείγματα αραιώθηκαν στα 20ng/mL.

3.4.3 Διαδικασία Επιλογής STRs

Για την πραγματοποίηση της απλοτυπικής ανάλυσης απαιτείται αρχικά η επιλογή των κατάλληλων STRs. Ουσιαστικά από τα αλληλόμορφα τους προκύπτει ο γονότυπος, οπότε πρέπει να πληρούνται ορισμένες προϋποθέσεις. Με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων Probe της NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe>) επιλέχθηκαν 20 STRs δείκτες, οι οποίοι κάλυπταν ολόκληρο το χρωμόσωμα 9. Από αυτούς οι 2 εντοπίζονται στην περιοχή του μικρού βραχίονα 9p πριν από το σημείο τομής της μελετούμενης αναστροφής, 10 μέσα στο ανεστραμμένο τμήμα και τέλος 8 βρίσκονται μετά το σημείο θραύσης στο μακρύ σκέλος 9q (Εικόνα 7).

Στην συνέχεια παρατίθεται πίνακας με όλες τις απαραίτητες πληροφορίες:

Περικεντρική αναστροφή in(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

Πίνακας 1: Αλληλουχία και χαρακτηριστικά πρόσθιων (forward-F) και οπίσθιων (reverse-R) εκκινητών (primers) για κάθε έναν μικροδορυφορικό δείκτη (STR) στο χρωμόσωμα 9.

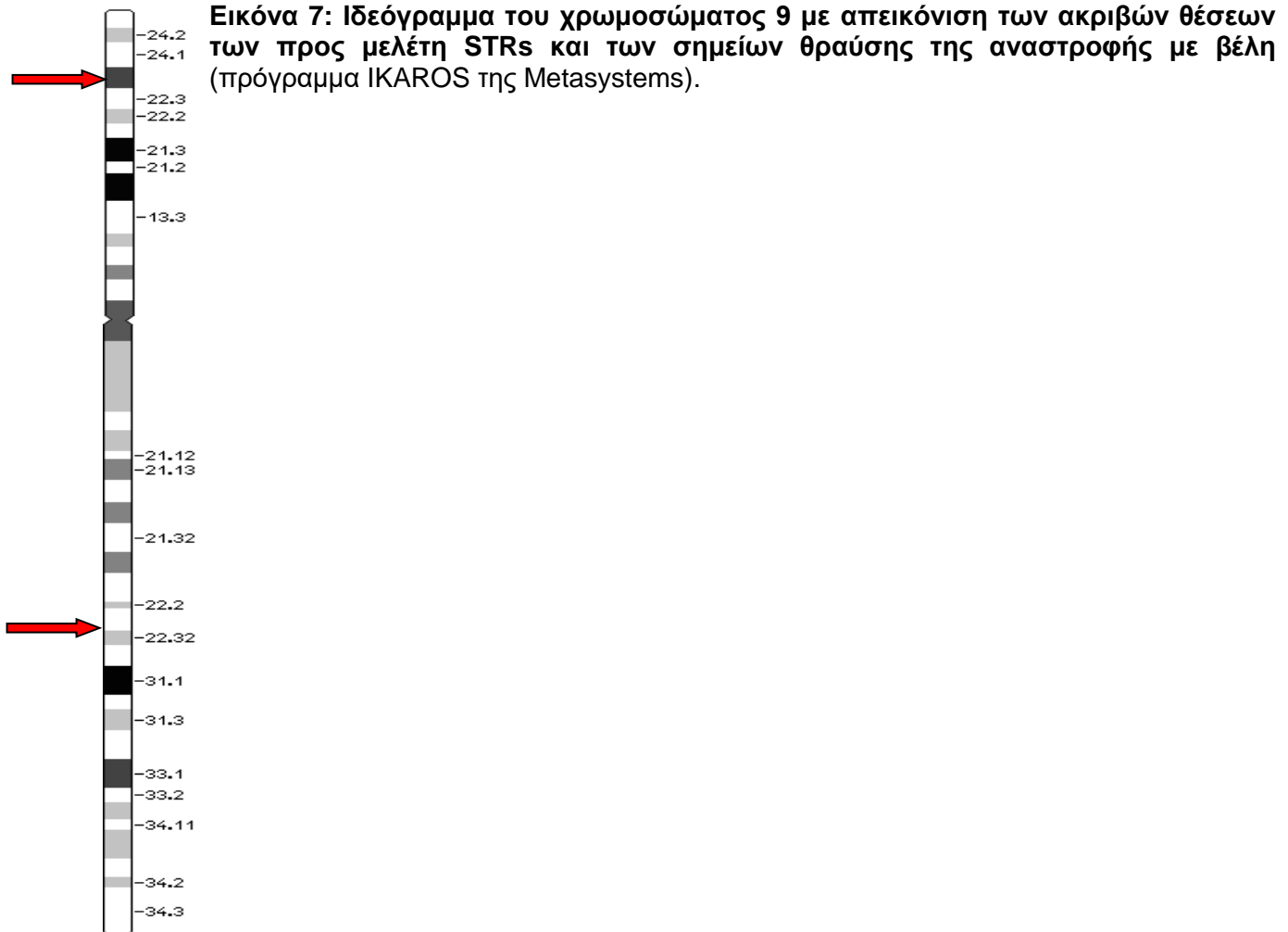
Δείκτες	Αλληλουχίες	Μέγεθος βασικής επανά- ληψης (bp)	T _m (°C)	Επαν άλη- ψη	Θέση GRCh38.p7	Θέση σε επίπεδο ζώνης
D9S288-F	5'-AACCTCAACAGGGAAAAGAG-3'					
D9S288-R	3'-GCTAACCTCAAATCATCCAG-5'	135	55	CA	3951795	9p24.2
D9S286_F	5'-TGCACCTGTACACATATGCTG-3'					
D9S286_R	3'-CTTTGCCTGCATGCTCAC-5'	125	56	AC	8053474	9p24.1
D9S285_F	5'-AAATTTGCCAAGAGAGTAGATCTG-3'					
D9S285_R	3'-TGAGGTAGAACTGACAAAAGTG-5'	206	56	CA	16078010	9p22.3
D9S157_F	5'-AGCAAGGCAAGCCACATTTTC-3'					
D9S157_R	3'-TGGGGATGCCCAGATAACTATATC-5'	145	59	GT	17628528	9p.22.2
D9S171_F	5'- AGCTAAGTGAAACCTCATCTCTGTCT-3'					
D9S171_R	3'CAACCCTAGCACTGATGGTA-5'	177	57	AC	24534211	9p21.3
D9S161_F	5'-TGCTGCATAACAAATTACCACA-3'					
D9S161_R	3'-CATGCCTAGACTCCTGATCCC-5'	121	57	AC	27632329	9p21.2
D9S1817_F	5'-AGCTGTAGTGAGCCCTGAT-3'					
D9S1817_R	3'-CGTTAGGAGCCTTGAGACTT-5'	263	57	TG	33859889	9p13.3
D9S273_F	5'-TTTATGTGAACACACATGCG-3'					
D9S273_R	3'-CAATCCTATTATCATCCCAGG-5'	147	53	GT	69924665	9q21.12
D9S175_F	5'-GTAATGTGCTAAATACCAGAGTTG-3'					
D9S175_R	3'-CCCTTACCTAGAATGCCC-5'	206	56	AC	75332660	9q21.13
D9S167_F	5'-TCCTCCAGTTCAATCCATGC-3'					
D9S167_R	3'-GTATAAGATCAAACAATCCCCTCC- 5'	276	57	AC	83169145	9q21.32
D9S283_F	5'-TGCTGGATTTTCAGGTAGGG-3'					
D9S283_R	3'-ATGGTTATGCGGGTGTATTTCTC-5'	181	56	CA	89762899	9q22.2
D9S287_F	5'-AGGATGCTCCTCACGC-3'					
D9S287_R	3'-ACCACTACATTGTTCAAGGG-5'	176	55	GT	95704009	9q22.32

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

Πίνακας 2 (συνέχεια): Αλληλουχία και χαρακτηριστικά πρόσθιων (forward-F) και οπίσθιων (reverse-R) εκκινητών (primers) για κάθε έναν μικροδορυφορικό δείκτη (STR) στο χρωμόσωμα 9.

Δείκτες	Αλληλουχίες	Μέγεθος βασικής επανά- ληψης (Bp)	Tm (°C)	Επαν- άλη- ψη	Θέση GRCh38.p7	Θέση σε επίπεδο ζώνης
D9S1690_F	5'-GACTGGCCCCGAAATTCT-3'					
D9S1690_R	3'-CTGGCCTCCCATAAAGTT-5'	227	53	AC	101337889	9q31.1
D9S1677_F	5'-CATTTGATGAATATCTGAGGGA-3'					
D9S1677_R	3'-ACATAGCAAGGCCCCA-5'	258	53	CA	109175310	9q31.3
D9S1776_F	5'-GGAAAGCAGACACACAAATG-3'					
D9S1776_R	3'-TGGAGCATTGTCAAGGC-5'	119	55	CA	115197155	9q33.1
D9S1682_F	5'-GCTCATACTCTTGATTTCTAGGC-3'					
D9S1682_R	3'-AAGCAGGTCCTATTGTTATTCC-5'	202	56	CA	122230906	9q33.2
D9S290_F	5'-GCATGCCTGCATCCAT-3'					
D9S290_R	3'-CCAGCCACAGCAAACC-5'	157	55	AC	128765189	9q34.11
D9S164_F	5'-CTGGGCAACCCTGACTTAAA-3'					
D9S164_R	3'-GATTTTTGGCCATTGTGC-5'	162	53	CA	133390175	9q34.2
D9S1826_F	5'-ATGTTGATTGCCGCAGTG-3'					
D9S1826_R	3'-TGCAGAACCAGGTCTTATTCG-5'	135	56	GT	135556612	9q34.3
D9S158_F	5'-ACAACCGTCAAAGTCTCTCTC-3'					
D9S158_R	3'-GTGTGTCTCACAGGCAAAT-5'	127	56	AC	136207336	9q34.3

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.



3.4.4 Σχεδιασμός Primers

Όλες οι προτεινόμενες αλληλουχίες εκκινήτων ελέχθησαν με τη βοήθεια του προγράμματος primer blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Πίνακας 1).

Όσοι θεωρήθηκαν ακατάλληλοι, επανασχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του υπολογιστικού εργαλείου primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

3.4.5 Πραγματοποίηση Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction)

Πραγματοποιήθηκαν 20 διαφορετικές αντιδράσεις PCR για κάθε ένα από τα 9 δείγματα χρησιμοποιώντας την Qiagen Hotstart Taq Mastermix (Qiagen, GmbH Germany). Στον θερμοκυκλοποιητή C1100 Touch της εταιρείας Bio-rad (U.S.A).

Στοιχειομετρία Αντίδρασης:

2 x Master mix	6μL
ddH ₂ O	5μL
Primer_Forward(10pmol/μL)	0.3μL
Primer_Reverse(10pmol/μL)	0.3μL

Συνθήκες PCR:

95 °C για 15min
95 °C για 40sec
53-57* °C για 40sec } 30κύκλοι
72 °C για 45sec
72 °C για 15min
4 °C για ∞

* Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών. Καθορίζεται κυρίως από το T_m τους.

3.4.6 Απλοτύπηση

Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση που πραγματοποιήθηκε στον αυτόματο αναλυτή ABI 3500 της εταιρείας Thermofisher και η ανάλυση των STRs έγινε με την βοήθεια του προγράμματος GeneMapper 5.0/Fragment analysis. Τα προϊόντα της PCR σημάνθηκαν με την χρωστική FAM (μπλε χρώματος) και VIC (πράσινου χρώματος) (Πίνακας 1).

1. Αρχικά συνδυάζονται 0.25μL προτύπου μεγέθους GS500LIZ με 10μL φορμαμίδης Hi-Di (για κάθε δείγμα) και αναμειγνύεται ενδελεχώς το μείγμα.
2. Διανέμονται 10μL του μείγματος σε κάθε βοθρίο του plate των 96 θέσεων.
3. Προσθήκη 1μL προϊόντος PCR στην αντίστοιχη θέση.
4. Καλύπτεται το plate με το ειδικό γκρι καπάκι.
5. Στη συνέχεια γίνεται μια γρήγορη ανάδευση με την βοήθεια του vortex.
6. Πραγματοποίηση γρήγορης φυγοκέντρησης του plate.
7. Τοποθετείται το plate στον γενετικό αναλυτή και εκκινείται η έναρξη της ηλεκτροφόρησης με χειρισμούς από ειδικό λογισμικό (3500 Series Data Collection Software 3, Version 3.1) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Προηγουμένως συμπληρώνεται ηλεκτρονικό φύλλο εργασίας (sample sheet) στο οποίο συμπληρώνονται τα στοιχεία του κάθε δείγματος που ηλεκτροφορείται στις αντίστοιχες θέσεις του 96-well plate.

Το πρόγραμμα ηλεκτροφόρησης για το γενετικό αναλυτή ABI3500 είχε τα εξής χαρακτηριστικά: η λειτουργική μονάδα των τριχοειδών ήταν 50cm, η θερμοκρασία ηλεκτροφόρησης (Run temperature) καθορίστηκε στους 60 °C, η τάση ένεσης (Injection Voltage) στα 1,6V και ο χρόνος ένεσης (Injection Time) ορίστηκε στα 15sec. Επιπλέον η τάση ηλεκτροφόρησης (Run Voltage) ήταν 19,5 kV και ο χρόνος ηλεκτροφόρησης (Run Time) 1500sec.

Στο λογισμικό ανάλυσης GeneMapper 5.0 δημιουργήθηκε πρόγραμμα ανάλυσης βασισμένο στον αλγόριθμο AFLP, το οποίο σχεδιάστηκε για να καλύπτει τις ανάγκες του συγκεκριμένου πειράματος, με τα εξής χαρακτηριστικά:

- Εντοπισμός των κορυφών ανάλογα με την χρωστική του κάθε STR.
- Περιορισμός της ανάλυσης σε ±100nt από το βασικό μέγεθος του STR.

Περικεντρική αναστροφή in(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

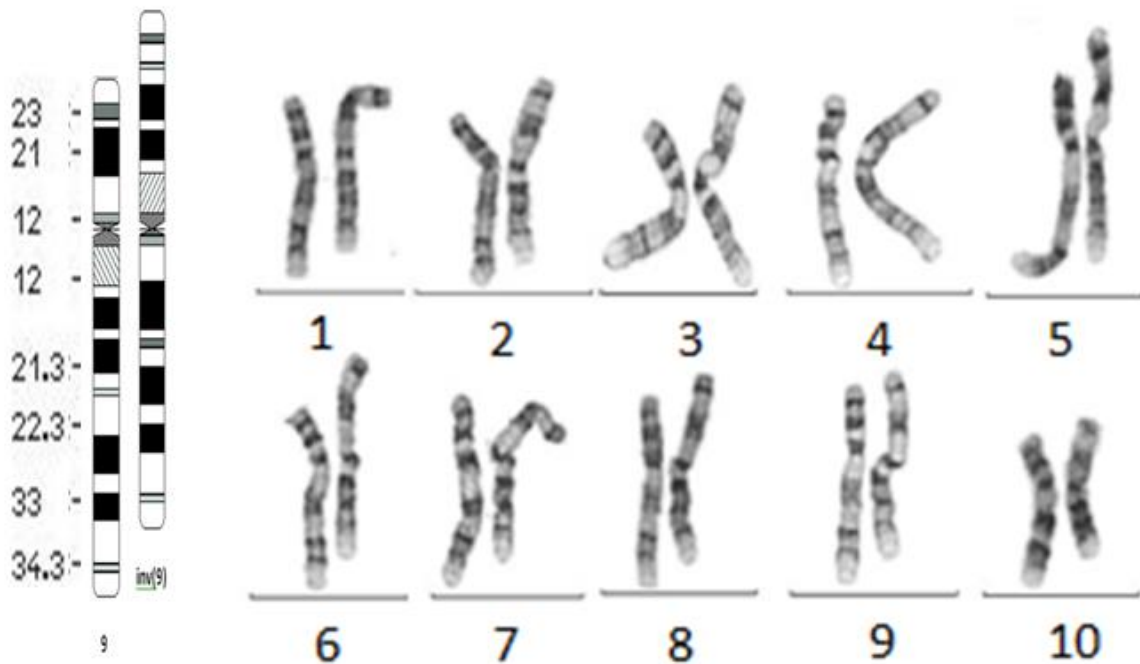
- Ανάλυση ύψους των κορυφών ανάλογα με την απόδοση κάθε αντίδρασης.

Για κάθε γενετικό τόπο πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη ανάλυση όλων των δειγμάτων (Παράρτημα Ι - Εικόνα 11 και 12).

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Κυτταρογενετική ανάλυση

Τα περιστατικά (1-10) που περιεγράφηκαν στο κεφάλαιο 3.1 μελετήθηκαν και αναλύθηκαν κυτταρογενετικά στο εργαστήριο της Βιοϊατρικής, τα υπόλοιπα περιστατικά (11-12) μελετήθηκαν στα εκάστοτε συνεργαζόμενα κέντρα.

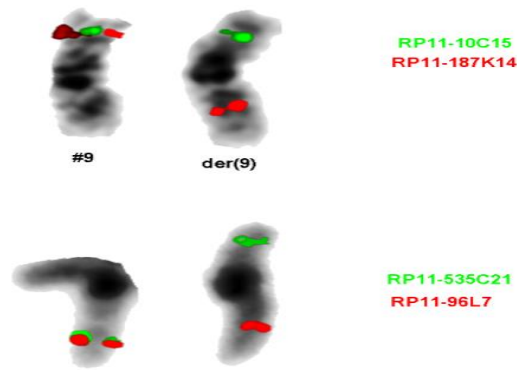


Εικόνα 8: Απεικόνιση της αναστροφής inv(9)(p23q22.3). Αριστερά: Ιδεόγραμμα (Cydas.com) και δεξιά απεικόνιση της αναστροφής σε 10 διαφορετικά άτομα φορείς, χωρίς συγγένεια μεταξύ τους, μετά από κυτταρογενετική μελέτη (Ikaros Metasystems).

4.2 Ανάλυση FISH

Οι εξειδικευμένες αναλύσεις FISH πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μοριακής Κυτταρογενετικής του Πανεπιστημίου Jena, Γερμανίας. Τα περιστατικά (1-10) που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 3.1 μελετήθηκαν με την χρήση της μοριακής κυτταρογενετικής τεχνικής MCB-FISH. Οι ειδικοί BAC ανιχνευτές RP11-10C15, RP11-187K14 και pcr9p για την περιοχή 9p23, οι οποίοι υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι γειτονικοί στο χρωμόσωμα 9 και δίνουν 2 σήματα, πράσινο και κόκκινο αντίστοιχα. Στο ανεστραμμένο χρωμόσωμα 9 εμφανίζονται πάλι 2 σήματα αλλά ο BAC κλώνος RP11-187K14 είναι πλέον ανεστραμμένος και έχει απομακρυνθεί από τον RP11-10C15. Επομένως τα σημεία τομής στο p είναι μεταξύ hg19:12,084,271-12,884,920. Η ίδια διαδικασία εκτελέστηκε και για τον q βραχίονα, με συνδυασμό των BAC κλώνων RP11-535C21 και RP11-96L7, οι οποίοι φυσιολογικά συνδέονται στην χρωμοσωματική ζώνη 9q22.3 σε κοντινές αποστάσεις και δίνουν επίσης πράσινο και κόκκινο σήμα αντίστοιχα. Στο ανεστραμμένο χρωμόσωμα ο BAC κλώνος RP11-535C21 εμφανίζεται ανεστραμμένος. Συνεπώς τα σημεία τομής στο q βρίσκονται μεταξύ της τοποθεσίας hg19:100,785,110-101,849,491 (Εικόνα 9 και 10). Συμπερασματικά τα ανεστραμμένα τμήματα βρίσκονται πιθανόν μεταξύ των θέσεων 12,084,271 και 101,849,491 (Πίνακας 2).

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

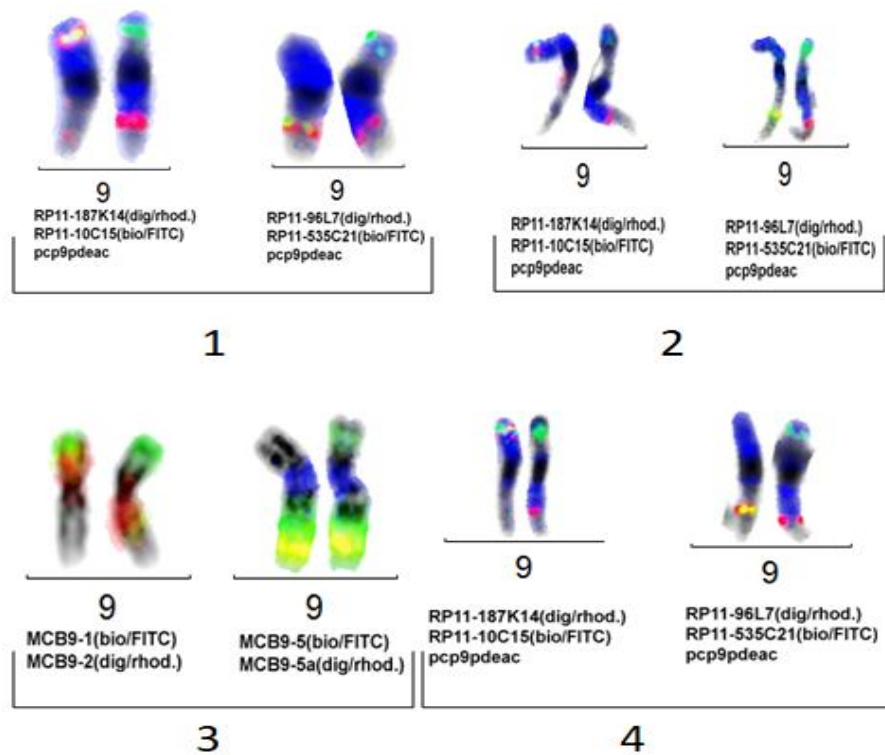


Εικόνα 9: Τα μόρια ανιχνευτές τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των σημείων τομής της αναστροφής στο 9p (άνω) και στο 9q (κάτω) με τη μέθοδο MCB-FISH.

Πίνακας 3: Χαρακτηρισμός των σημείων θραύσης της αναστροφής μέσω ανάλυσης MCB-FISH.

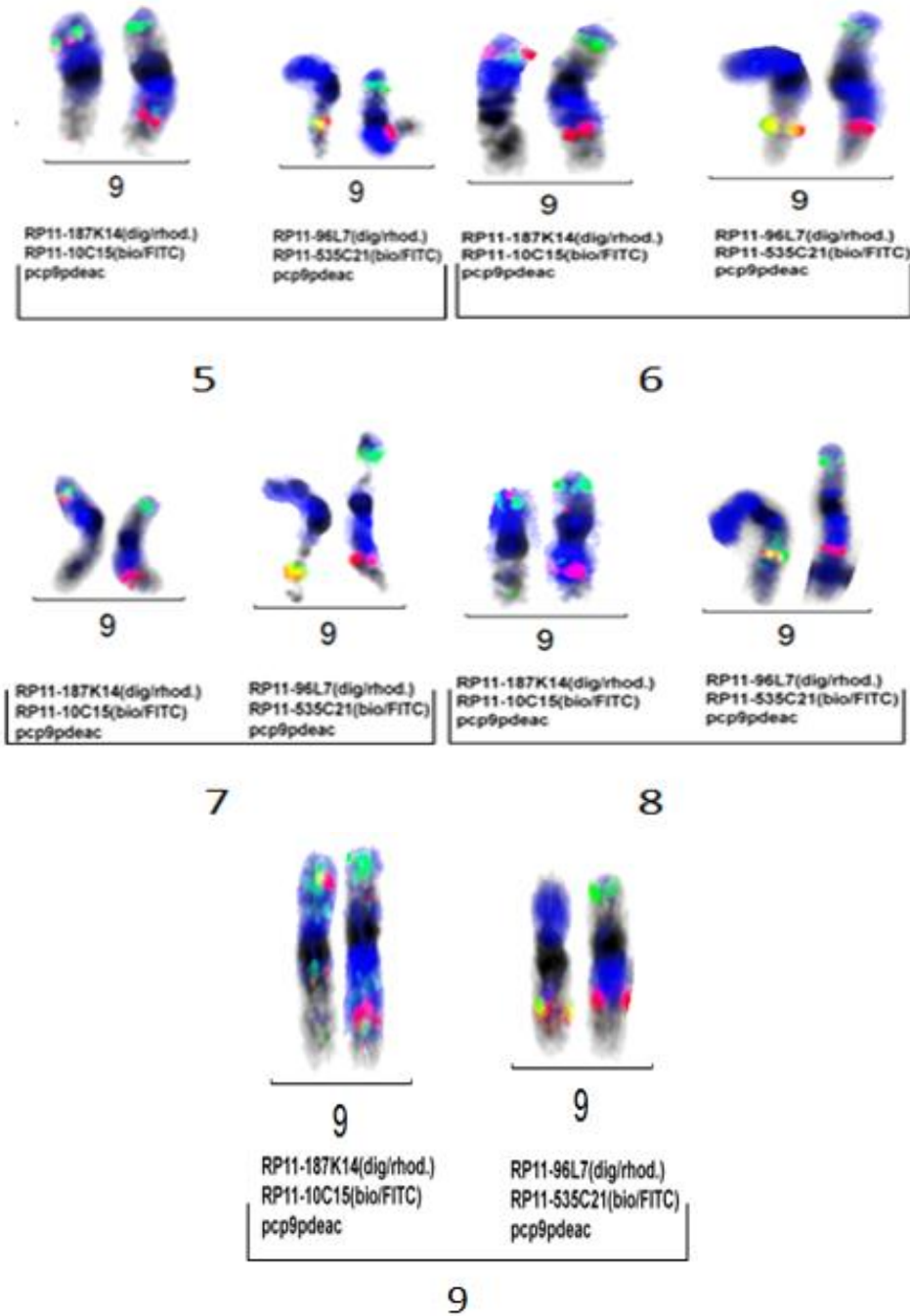
Χρωμοσωματική ζώνη και BAC	Τοποθεσία (kb)	Αποτέλεσμα BAC
A) Για την περιοχή 9p23:		
• RP11-10C15	hg19:11,909,073 - 12,084,271	Μη ανεστραμμένο
• RP11-187K14	hg19:12,884,920 - 12,962,270	Ανεστραμμένο
Άρα τα σημεία τομής στο p είναι μεταξύ 12,084,271-12,884,920		
B) Για την περιοχή 9q22.33:		
• RP11-535C21	hg19:100,704,795 - 100,785,110	Ανεστραμμένο
• RP11-96L7	hg19:101,849,491 - 101,955,621	Μη ανεστραμμένο
Άρα τα σημεία τομής στο q είναι μεταξύ 100,785,110 - 101,849,491		

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.



Σημείωση: Το περιστατικό 3 μελετήθηκε με την χρήση των BACs για τον p βραχίονα: MCB9-1, MCB9-2, στο q βραχίονα: MCB9-5, MCB5a.

Περικεντρική αναστροφή *inv(9)(p23q22.3)* στον ελληνικό πληθυσμό.



Εικόνα 10: Απεικόνιση αποτελεσμάτων της μελέτης της αναστροφής *inv(9)(p23q22.3)* με MCB-FISH σε 9 διαφορετικά άτομα χωρίς συγγένεια μεταξύ τους.

Τα ανεστραμμένα τμήματα βρίσκονται πιθανόν μεταξύ των hg19: 12,084,271 και 101,849,491.

4.3 Απλοτυπική Ανάλυση

Γενετικό υλικό για απλοτυπική ανάλυση ήταν διαθέσιμο τουλάχιστον από 7 ετεροζυγώτες φορείς από τους 10, εκ των οποίων μόνο οι 2 είχαν συγγενική σχέση (5a και 5b). Επιπλέον, από το συνεργαζόμενο κέντρο Κυτταρογενετικής και Κυτταρογενωμικής του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου μας έγινε διαθέσιμο το γενετικό υλικό των περιστατικών 11a και 12.

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

Πίνακας 4: Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της απλοτυπικής ανάλυσης με την χρήση δεικτών STRs, για την μελέτη του χρωμοσώματος 9 στα άτομα φορείς της αναστροφής.

	1		2		3		4		5		6		7	
STR9 MARKER	D9S288		D9S286		D9S285		D9S157		D9S171		D9S161		D9S1817	
CHR band	9p24.2		9p24.1		9p22.3		9p22.2		9p21.3		9p21.2		9p13.3	
g.pos(nt)- GRCh38	3951639- 3951930		8053378- 8053709		16077947- 16078223		17628221- 17628593		24534211- 24534429		27632320- 27632457		33859595- 33859889	
CASE 2a	132	136	121	127	186	203	140	142	167	173	116	128	243	259
CASE 5a	132	134	121	127	186	201	128	142	165	167	116	130	259	263
CASE 5b	132	134	127	137	186	190	132	142	165	167	116	126	259	265
CASE 7	136		137	139	186	201	132	142	167	173	118	130	255	264
CASE 8a	134		133	135	186	192	130	144	167	173	116	126	243	259
CASE 9	140	142	125	137	186	190	142	144	167		116	128	255	259
CASE 10	130	140	127	135	186	201	140	142	167	177	116	126	257	259
CASE 11a	126	140	121	139	186		134	144	167		116	130	255	259
CASE 12	126	128	139		186	203	140	142	167		126		253	255
Probable common allele					186		142		167		116		259	

Σημείωση: Για τον κάθε μικροδορυφορικό τόπο που ελέγχθηκε δίνεται η φυσική του θέση πάνω στο χρωμόσωμα (nt) αλλά και σε επίπεδο χρωμοσωματικής ζώνης. Τα αλληλόμορφα υποδεικνύονται ως το μέγεθος των ζευγών βάσεων του σχετικού προϊόντος/ων PCR. Τα σημεία θραύσης της αναστροφής απεικονίζονται στον πίνακα με την χρήση διπλής γραμμής, με έντονη γραφή έχει σημειωθεί η τυχόν ύπαρξη κοινού αλληλομόρφου εσωτερικά της αναστροφής, και με κίτρινη υπογράμμιση τα αλληλόμορφα που διαφέρουν από το κοινό αλληλόμορφο κατά +4 νουκλεοτίδια.

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

Πίνακας 3 (συνέχεια): Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της απλοτυπικής ανάλυσης με την χρήση δεικτών STRs, για την μελέτη του χρωμοσώματος 9 στα άτομα φορείς της αναστροφής.

	8		9		10		11		12		13		14	
STR9 MARKER	D9S273		D9S175		D9S167		D9S283		D9S287		D9S1690		D9S1677	
CHR band	9q21.12		9q21.13		9q21.32		9q22.2		9q22.32		9q31.1		9q31.3	
g.pos(nt)- GRCh38	69924479- 69924687		75332660- 75332865		83169093- 83169427		89762864- 89763181		95703808- 95703808		101337785- 101338130		109175246- 109175639	
CASE 2a	144		204	206	267		179	185	167	169	223	227	254	264
CASE 5a	134	144	204		267	269	177	179	169		221	225	262	
CASE 5b	144		204	210	263	267	179	200	169		221	229	252	262
CASE 7	138	144	204	217	263	267	179		169		221	223	254	256
CASE 8a	134*	150	207	210	267		179		169	171	223	231	256	264
CASE 9	144		204	212	259	267	179	183	167	169	221	227	256	270
CASE 10	140*	144	221	225	267		179		167	169	221	229	254	256
CASE 11a	144		219	236	263	277	177	192	169	171	229	231	250	266
CASE 12	144		214	216	265	267	179		169	171	229		256	262
Probable common allele	144				267		179		169					

Σημείωση: Για τον κάθε μικροδορυφορικό τόπο που ελέγχθηκε δίνεται η φυσική του θέση πάνω στο χρωμόσωμα(nt) αλλά και σε επίπεδο χρωμοσωματικής ζώνης. Τα αλληλόμορφα υποδεικνύονται ως το μέγεθος των ζευγών βάσεων του σχετικού προϊόντος/ων PCR. Τα σημεία θραύσης της αναστροφής απεικονίζονται στον πίνακα με την χρήση διπλής γραμμής, με έντονη γραφή έχει σημειωθεί η τυχόν ύπαρξη κοινού αλληλομόρφου εσωτερικά της αναστροφής, με αστερίσκο σημειώθηκαν τα αλληλόμορφα που εμφάνιζαν αναλογία 2:1 και με κόκκινη υπογράμμιση σημειώθηκαν τα αλληλόμορφα που αποκλίνουν από την υπόθεση περί κοινής καταγωγής.

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

Πίνακας 3 (συνέχεια): Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της απλοτυπικής ανάλυσης με την χρήση δεικτών STRs, για την μελέτη του χρωμοσώματος 9 στα άτομα φορείς της αναστροφής.

	15		16		17		18		19		20	
STR9 MARKER	D9S1776		D9S1682		D9S290		D9S164		D9S1826		D9S158	
CHR band	9q33.1		9q33.2		9q34.11		9q34.2		9q34.3		9q34.3	
g.pos(nt) - GRCh38	115197144- 115197456		122230905- 122231222		128765173- 128765432		133390147- 133390359		135556422- 135556706		136207202- 136207584	
CASE 2a	112	114	201	203	145	153	145		130		117	119
CASE 5a	114		199	201	149	151	145		130		117	119
CASE 5b	114	116	201	205	151		145	149	130		117	
CASE 7	110	114	201	203	145	153	149	151	130	140	119	
CASE 8a	108		199	205	147	153	145	151	130	140	117	
CASE 9	108	110	199	207	153	155	149		130	140	115	121
CASE 10	108	110	203	205	145	149	147	151	130		121	123
CASE 11a	114	118	201	205	145	149	145	149	130		117	121
CASE 12	108	110	201		147	153	149	151	128	130	117	127
Probable common allele												

Σημείωση: Για τον κάθε μικροδορυφορικό τόπο που ελέγχθηκε δίνεται η φυσική του θέση πάνω στο χρωμόσωμα(nt) αλλά και σε επίπεδο χρωμοσωματικής ζώνης. Τα αλληλόμορφα υποδεικνύονται ως το μέγεθος των ζευγών βάσεων του σχετικού προϊόντος/ων PCR. Τα σημεία θραύσης της αναστροφής απεικονίζονται στον πίνακα με την χρήση διπλής γραμμής, με έντονη γραφή έχει σημειωθεί η τυχόν ύπαρξη κοινού αλληλομόρφου εσωτερικά της αναστροφής.

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι γενωμικές αναστροφές εμπλέκονται στην ειδογένεση [39], στην προσαρμογή και στις ανθρώπινες ασθένειες [40]. Εκτός από την απομάκρυνση των κωδικών αλληλουχιών, είναι δυνατό να επηρεάσουν τη γονιδιακή έκφραση και να διευκολύνουν τα τυχαία συμβάντα ανασυνδυασμού, τα οποία με την σειρά τους αποτελούν αιτία γενωμικών διαταραχών [41]. Ωστόσο, οι αναστροφές καταστέλλουν τον τοπικό ανασυνδυασμό που είναι δυνατό να οδηγήσει σε ευεργετικά ή επιβλαβή αποτελέσματα [42, 43]. Παρόλο που οι αναστροφές αποτελούν μια αναγνωρισμένη πηγή ποικιλότητας, η έλλειψη αξιόπιστης υψηλής απόδοσης μεθόδου προσδιορισμού των γονοτύπων για αυτές τις δομές δυσκολεύουν την πλήρη κατανόηση των φυλογενετικών, φαινοτυπικών και γενετικών ιδιοτήτων τους σε ένα πληθυσμό [44]. Επιπρόσθετα, μεγάλο μέρος των αναστροφών στον άνθρωπο παραμένει μη χαρακτηρισμένο, κυρίως λόγω της δυσκολίας ανάλυσης αυτών των δομών σε πληθυσμιακό επίπεδο [20, 41].

Δύο σενάρια υπάρχουν για την προέλευση των αναστροφών στον άνθρωπο: πρόκειται είτε για ανεξάρτητα επαναλαμβανόμενα γεγονότα (recurrent independent events), ή για πανομοιότυπες αναδιατάξεις με κοινή καταγωγή (identical by descent-IBD).

Στην περίπτωση που η αναστροφή αποτελεί ένα ανεξάρτητο επαναλαμβανόμενο γεγονός πρόκειται συνήθως για *de novo* αναδιατάξη, τα σημεία θραύσης της οποίας εντοπίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος. Συγκεκριμένα, τα στοιχεία επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας (π.χ. LCRs) φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του ρυθμού εμφάνισης επαναλαμβανόμενων αναδιατάξεων, όπως είναι οι αναστροφές. Τα στοιχεία αυτά λειτουργούν ως ενδιάμεσα “υποστρώματα” για τη δράση ορισμένων μοριακών μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα και ευνοούν τον ανασυνδυασμό, ο οποίος με την σειρά του οδηγεί στη δημιουργία αναστροφών. Παράδειγμα αυτής της κατηγορίας αποτελεί η αναστροφή inv(2)(p11q13) [23]. Σύμφωνα με μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 40 ετερόζυγους φορείς με κυτταρογενετικά πανομοιότυπη αναστροφή στο χρωμόσωμα 2, προκύπτει ότι πρόκειται για επαναλαμβανόμενη αναδιάταξη, η οποία όμως εμφανίζει ετερογένεια στα σημεία τομής της. Παρά το γεγονός ότι κυτταρογενετικά εμφανίζει ομοιογένεια, με τη χρήση FISH ταυτοποιήθηκαν 4 διαφορετικοί συνδυασμοί στα σημεία θραύσης. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε απλοτυπική ανάλυση με την χρήση STRs με αποτέλεσμα να αποκλειστεί η πιθανότητα πιθανής συγγένειας των φορέων και κατά συνέπεια του φαινόμενου ιδρυτή.

Στην περίπτωση του δεύτερου σεναρίου, θεωρείται ότι σε έναν πρόγονο-ιδρυτή συνέβη μία αναστροφή και η αναδιάταξη αυτή κληρονομήθηκε πανομοιότυπα στις επόμενες γενεές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα καλά μελετημένης αναστροφής που οφείλεται στο φαινόμενο του ιδρυτή είναι η περικεντρική αναστροφή στο χρωμόσωμα 10, inv(10)(p11.2q21.2) [45]. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 20 μη συγγενικές οικογένειες που έφεραν κυτταρογενετικά πανομοιότυπη την προαναφερθείσα αναστροφή, διαπιστώθηκε ότι όλα τα μέλη προέρχονταν από ένα κοινό πρόγονο. Όλες οι οικογένειες κατάγονταν από τη βόρεια Ευρώπη και οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η ανάλυση FISH και η απλοτυπική ανάλυση με τη χρήση STRs και SNPs.

Στη βιβλιογραφία εντοπίζονται αρκετές αναστροφές στο χρωμόσωμα 9. Η πλέον καλά μελετημένη και συχνότερη αναστροφή είναι αυτή της ετεροχρωματινικής περιοχής του 9, inv(9)(p11q13), η οποία θεωρείται πολυμορφική και επαναλαμβανόμενη αναδιάταξη χωρίς κλινικές επιπτώσεις.

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

Οι περικεντρικές αναστροφές του χρωμοσώματος 9, με εξαίρεση την προαναφερθείσα, είναι δυνατό να οδηγήσουν σε απογόνους με ανασυνδυασμένα χρωμοσώματα 9 (rec), με τελικό έλλειμμα και τελικό διπλασιασμό μετά από συμβάν ανασυνδυασμού στον βρόχο αναστροφής [46-50]. Ο κίνδυνος απόκτησης απογόνου με μη ισοζυγισμένο χρωμοσωματικό υλικό και κατά συνέπεια παθολογικό φαινότυπο, υπολογίζεται κατόπιν λήψης του οικογενειακού ιστορικού του φορέα, μελετώντας τη βιβλιογραφία και αξιολογώντας τον βαθμό ανισορροπίας που ενδεχομένως προκύπτει στα ανασυνδυασμένα προϊόντα. Κατά γενικό κανόνα, όσο μεγαλύτερο είναι το τμήμα αναστροφής και κατά συνέπεια όσο πιο μικρά τα περιφερικά τμήματα, τόσο μεγαλύτερος είναι ο κίνδυνος να παραχθεί βιώσιμος ανασυνδυασμένος γαμέτης. Η διαπίστωση φορείας μέσω ενός ανασυνδυασμένου μη φυσιολογικού παιδιού, το οποίο αποδεικνύει τη βιωσιμότητα τουλάχιστον ενός από τα ανασυνδυασμένα προϊόντα κατά την μείωση, θέτει τον κίνδυνο σε ένα εύρος από 5%-10%. Οι γυναίκες ετεροζυγώτες μπορεί να διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο. Σε μερικές οικογένειες στις οποίες η ταυτοποίηση πραγματοποιείται λόγω άλλης αιτίας παραπομπής, πέρα από την απόκτηση παθολογικού απογόνου, ο συνολικός κίνδυνος είναι δυνατό να είναι πολύ μικρός, περίπου 1%.

Η παρούσα μελέτη αφορά στην περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3), η οποία έχει εντοπιστεί σε άτομα με ιστορικό υπογονιμότητας στον ελληνικό πληθυσμό με μια συχνότητα της τάξης 0,2%. Σε ένα σύνολο 4.700 περιστατικών που ελέγχθηκαν κυτταρογενετικά 11 εξ αυτών βρέθηκαν ετεροζυγώτες φορείς. Η αναστροφή αυτή είναι φαινοτυπικά σιωπηλή και μέχρι σήμερα, δεν έχει περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία και στις βάσεις δεδομένων. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο με χρήση της βάσης δεδομένων 'Wessex Chromosome Abnormality Register', η οποία λειτουργεί από το 1967, δεν υπάρχει καταγραφή. Στη συγκεκριμένη μελέτη εντοπίστηκαν και χαρακτηρίστηκαν 220 αναστροφές εκ των οποίων οι 109 ήταν περικεντρικές και 111 παρακεντρικές [4].

Ο αρχικός εντοπισμός της αναστροφής inv(9)(p23q22.3) πραγματοποιήθηκε σε άτομα που είχαν παραπεμφθεί για χρωμοσωματική ανάλυση με τη χρήση καρυοτύπου λόγω υπογονιμότητας. Εξαιτίας της ιδιομορφίας του προτύπου ζώνωσης του χρωμοσώματος 9 έπειτα από κυτταρογενετική ανάλυση, δύο ήταν τα πιθανά σενάρια για τα σημεία τομής inv(9)(p24q22.3) ή inv(9)(p23q22.3). Ωστόσο οι αναδιατάξεις που φαίνεται να περιλαμβάνουν τις ίδιες ζώνες κυτταρογενετικά ίσως να μη μοιράζονται και τα ίδια ακριβώς σημεία θραύσης και σε μοριακό επίπεδο να υπάρχει μια απόκλιση αρκετών μεγαβάσεων μεταξύ τους. Τα σημεία θραύσης εντοπίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση εξειδικευμένης τεχνικής FISH στις κυτταρογενετικές ζώνες 9p23 και 9q22.3, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα σε ένα τουλάχιστον άτομο από κάθε οικογένεια εφαρμόστηκαν οι κατάλληλοι BAC κλώνοι, όπως περιγράφεται στα αποτελέσματα. Συμπεραίνεται ότι η αναστροφή είναι η inv(9)(p23q22.3).

Αν και η πλειοψηφία των χρωμοσωματικών αναστροφών φαίνεται να αποτελούν μοναδικές αναδιατάξεις, η παρουσία των φαινομενικά ίδιων σημείων τομής σε όλους τους φορείς της αναστροφής inv(9)(p23q22.3), η απουσία προδιαθεσικών παραγόντων, η συχνότητα και η γεωγραφική κατανομή της, υποδεικνύουν την ύπαρξη του φαινομένου ιδρυτή. Δηλαδή, ότι όλες οι οικογένειες μοιράζονται έναν κοινό πρόγονο.

Για να επιβεβαιωθεί η παραπάνω υπόθεση περί φαινομένου του ιδρυτή πραγματοποιήθηκε λεπτομερής απλοτυπική ανάλυση, χρησιμοποιώντας μικροδορυφορικούς δείκτες. Στη συνέχεια, έγινε υπολογισμός του αριθμού των αλληλομόρφων που μοιράζονται οι οικογένειες. Οι 8/10 μικροδορυφορικοί δείκτες που περιλαμβάνονται στο ανεστραμμένο τμήμα εμφάνισαν πανομοιότυπους απλοτύπους σε όλα τα περιστατικά που μελετήθηκαν ή διέφεραν μόνο σε ένα μικρό αριθμό κατά 2 νουκλεοτίδια το πολύ. Αντιθέτως έξω από τα όρια της αναστροφής οι πλευρικοί

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

απλότυποι ήταν αποκλίνοντες. Ο μόνος δείκτης ο οποίος δεν εμφάνισε απόλυτη συμφωνία με την υπόθεση περί κοινής καταγωγής ήταν ο D9S175. Σε 4/9 περιστατικά δεν υπήρχε κανένα κοινό αλληλόμορφο για το συγκεκριμένο δείκτη ενώ σε 5/9 υπήρχε το ίδιο προγονικό αλληλόμορφο (Πίνακας 3). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ο συγκεκριμένος δείκτης πιθανό να έχει υψηλότερο ρυθμό μεταλλαξιγένεσης και κατ'επέκταση να έχει συσσωρευτεί μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων στο μικροδορυφορικό υλικό, με αποτέλεσμα να υπάρχει απώλεια του προγονικού απλοτύπου. Επιπλέον, ένας ακόμη δείκτης ο οποίος παρουσίασε ιδιόμορφη συμπεριφορά ήταν ο D9S1817, όπου σε 2 περιστατικά το αλληλόμορφο που εντοπίστηκε διέφερε από το κοινό αλληλόμορφο κατά +4 νουκλεοτίδια. Αυτό πιθανά να οφείλεται και πάλι στο ρυθμό μεταλλαξιγένεσης των STRs τόπων και πιο συγκεκριμένα στο φαινόμενο της διολίσθησης της DNA πολυμεράσης, η οποία λανθασμένα ολισθαίνει, είτε προς τα εμπρός, είτε προς τα πίσω, παραλείποντας ή προσθέτοντας αντίστοιχα μία επανάληψη, αυξάνοντας την πιθανότητα μετάλλαξης από γενιά σε γενιά [24].

Είναι δύσκολο να γίνει ακριβής εκτίμηση της ηλικίας της αναστροφής εξαιτίας της γεωγραφικής κατανομής των 12 φορέων αλλά και της συσώρευσης των μικροδορυφορικών μεταλλάξεων στο ανεστραμμένο τμήμα, οι οποίες κυμαίνονται από 10^{-2} έως 10^{-4} ανά τόπο και ανά γενιά. Επιπλέον το γεγονός ότι οι επιχιασμοί συμβαίνουν πολύ κοντά στα σημεία τομής 9p23 και 9q22.3 στις περισσότερες, αν όχι σε όλες τις οικογένειες, υποδεικνύει ότι η αναδιάταξη δεν είναι πρόσφατο γεγονός. Αυτό είναι σύμφωνο με τον υπολογισμό της μέσης αναπαραγωγικής προσαρμοστικότητας για τις αναστροφές 0.926 ± 0.085 [51].

Το γεγονός ότι στο συνεργαζόμενο εργαστήριο μελετήθηκε γενετικό υλικό από ανασυνδυασμένο προϊόν (rec) που δημιουργήθηκε κατά την μείωση σε κύηση που παλινδρόμησε (περιστατικό 11b), έδωσε τη δυνατότητα να εντοπισθούν ακριβέστερα τα σημεία τομής της αναστροφής και να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα της απλοτυπικής ανάλυσης στο γενετικό υλικό της μητέρας. Συγκεκριμένα στο υλικό του εμβρύου πραγματοποιήθηκε Συγκριτικός Γενωμικός Υβριδισμός με μικροσυστοιχίες (Array-CGH) ο οποίος υπέδειξε ότι τα σημεία τομής βρίσκονται στις θέσεις hg19:12.245.958-12.247.434 και 101.572.585-101.576.250, στο 9p και 9q βραχίονα, αντίστοιχα. Με τη βοήθεια του προγράμματος περιήγησης γονιδίων UCSC αποδείχθηκε ότι τα σημεία τομής βρίσκονται σε περιοχές που δεν εδράζονται γονίδια. Στο σημείο τομής του 9p βραχίονα εντοπίζονται μόνο βραχείες διάσπαρτες αλληλουχίες (Short Interspersed Nuclear Elements-SINEs), ενώ στο σημείο του 9q βραχίονα εντοπίζονται SINEs και μακρές διάσπαρτες αλληλουχίες (Long Interspersed Nuclear Elements-LINEs) (Παράρτημα II – Εικόνα 13 και 14). Πρόκειται για μικρές και μεγάλες αλληλουχίες οι οποίες εμφανίζονται σε τεράστιο αριθμό αντιγράφων, διασκορπισμένες στο γονιδίωμα [3]. Αυτά τα στοιχεία απαρτίζουν το 13% και το 21% του γονιδιώματος, αντίστοιχα. Η ισχύουσα άποψη είναι ότι αυτά τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία πολλαπλασιάστηκαν και θεωρούνται ως ένα είδος γενωμικού παρασίτου. Αρχικά είχαν την ικανότητα να μεταπηδούν από τη μία χρωμοσωματική θέση σε άλλες θέσεις, εξ' ου και το όνομα τους, μεταθετά στοιχεία. Η πλειοψηφία αυτών έχουν χάσει αυτή την ικανότητα και είναι πλέον αμφισβητήσιμο αν επιτελούν κάποια χρήσιμη λειτουργία.

Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες υψηλού βαθμού ομολογίας πέραν των LCRs, δηλαδή τα στοιχεία Alu, LINEs, SINEs και παλινδρομες αλληλουχίες πλούσιες σε AT, διευκολύνουν μηχανισμούς για την πρόκληση χρωμοσωματικών αναδιατάξεων, όπως αμοιβαίες και ροβερτσόνιες μεταθέσεις, αναστροφές, ισοχρωμοσώματα, καθώς και μικρά χρωμοσώματα-δείκτες. Ο μη αλληλικός ομόλογος ανασυνδυασμός (NAHR) είναι συνήθως ένας από αυτούς τους βασικούς μηχανισμούς, δημιουργίας αναδιατάξεων. Συμβαίνει όταν στην περιοχή εντοπίζονται LCRs. Ο βαθμός ομολογίας όμως μεταξύ δύο αλληλουχιών Alu ή SINEs ή

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

LINEs είναι πολύ μικρότερος από εκείνον μεταξύ δύο LCRs αλληλουχιών, γεγονός το οποίο ενδεχομένως εξηγεί τη χαμηλότερη συχνότητα γεγονότων ανασυνδυασμού σε αυτές τις περιπτώσεις [17, 52]. Παρ' όλα αυτά, θα ήταν δυνατό να υποθέσουμε ότι στη δική μας περίπτωση η παρουσία των LINEs και SINEs στα σημεία τομής συνετέλεσαν στην αρχική δημιουργία της συγκεκριμένης αναστροφής σε ένα άτομο, η οποία στη συνέχεια κληρονομήθηκε στους απογόνους του.

Ιδανικά τα σημεία τομής που προέκυψαν από την ανάλυση του ανασυνδυασμένου προϊόντος με Array-CGH, θα πρέπει να συμπίπτουν με αυτά των φορέων της συγκεκριμένης αναστροφής, αφού πρόκειται για IBD αναδιάταξη. Για να πραγματοποιηθεί αυτή η επιπλέον επιβεβαίωση, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν Long-PCRs και αλληλούχιση (sequencing) των περιοχών που εντοπίζονται τα σημεία τομής. Μελλοντικά θα πραγματοποιηθεί και αυτή η επιβεβαίωση η οποία βρίσκεται σε δοκιμαστικό στάδιο σχεδιασμού. Άλλη πιθανή μεθοδολογία επιβεβαίωσης και ανάλυσης των σημείων τομής στους ετεροζυγώτες φορείς θα ήταν η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing-NGS).

Τέλος, οι περισσότερες οικογένειες με την αναστροφή inv(9)(p23q22.3) που μελετήθηκαν, είχαν καταγωγή από τη Βόρεια Ελλάδα. Θα ήταν ενδιαφέρον να διαπιστωθεί κατά πόσον υπάρχουν άλλες περιπτώσεις σε όλο τον κόσμο, και αν προέρχονται επίσης από τον ίδιο ιδρυτή. Η μελέτη της συγκεκριμένης αναστροφής με το συνδυασμό μεθόδων συμβατικής κυτταρογενετικής, μοριακής κυτταρογενετικής και μοριακής γενετικής καταδεικνύει τη χρησιμότητα τους στη διερεύνηση χρωμοσωματικών αναδιατάξεων οι οποίες απαντώνται στην κλινική πράξη.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
founder effect	φαινόμενο του ιδρυτή
Karyotype	Καρυότυπος
Translocations	Μεταθέσεις
Inversions	Αναστροφές
Duplications	Διπλασιασμοί
Deletions	Ελλείμματα
Insertions	Ενθέσεις
Markers	χρωμοσώματα δείκτες
Rings	δακτυλιοειδή χρωμοσώματα
Recombinants	προϊόντα ανασυνδυασμού
paracentric inversions	παρακεντρικές αναστροφές
pericentric inversions	περικεντρικές αναστροφές
crossing over	Ανασυνδυασμός
inversion loop	θηλιά αναστροφής
double stranded breaks	‘σπασίματα’ διπλής έλικας
Hotspots	κρίσιμες περιοχές
non-allelic homologous recombination	μη αλληλικός ομόλογος ανασυνδυασμός
Non-homologous end joining	Μη ομόλογη σύνδεση άκρων
low copy repeats	επαναλήψεις χαμηλού αριθμού αντιγράφου
segmental duplications	διαδοχικοί διπλασιασμοί
position effect	επίδραση λόγω θέσης
Crossovers	Επιχιασμοί
allelic homologous recombination	αλληλικός ομόλογος ανασυνδυασμός
genetic flow	γενετική ροή
genetic drift	γενετική παρέκκλιση
Selection	Επιλογή
bottle neck	φαινόμενο της γενετικής στενωπού
founder effect	φαινόμενο του ιδρυτή
<i>de novo</i> mutations	νέες μεταλλάξεις
identical by descent	πανομοιότυποι λόγω καταγωγής
haplotype analysis	απλοτυπική ανάλυση
Haplotype	Απλότυπος
Restriction fragment length polymorphisms	Πολυμορφισμοί μήκους περιοριστικών θραυσμάτων
Short Tandem Repeats	Βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις
Single nucleotide polymorphisms	Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί
Sequence-tagged sites	Ετικέτες θέσεων αλληλουχίας
Expressed sequence tags	Ετικέτες εκφραζόμενων αλληλουχιών
micro-variants	μικροπαραλλαγές

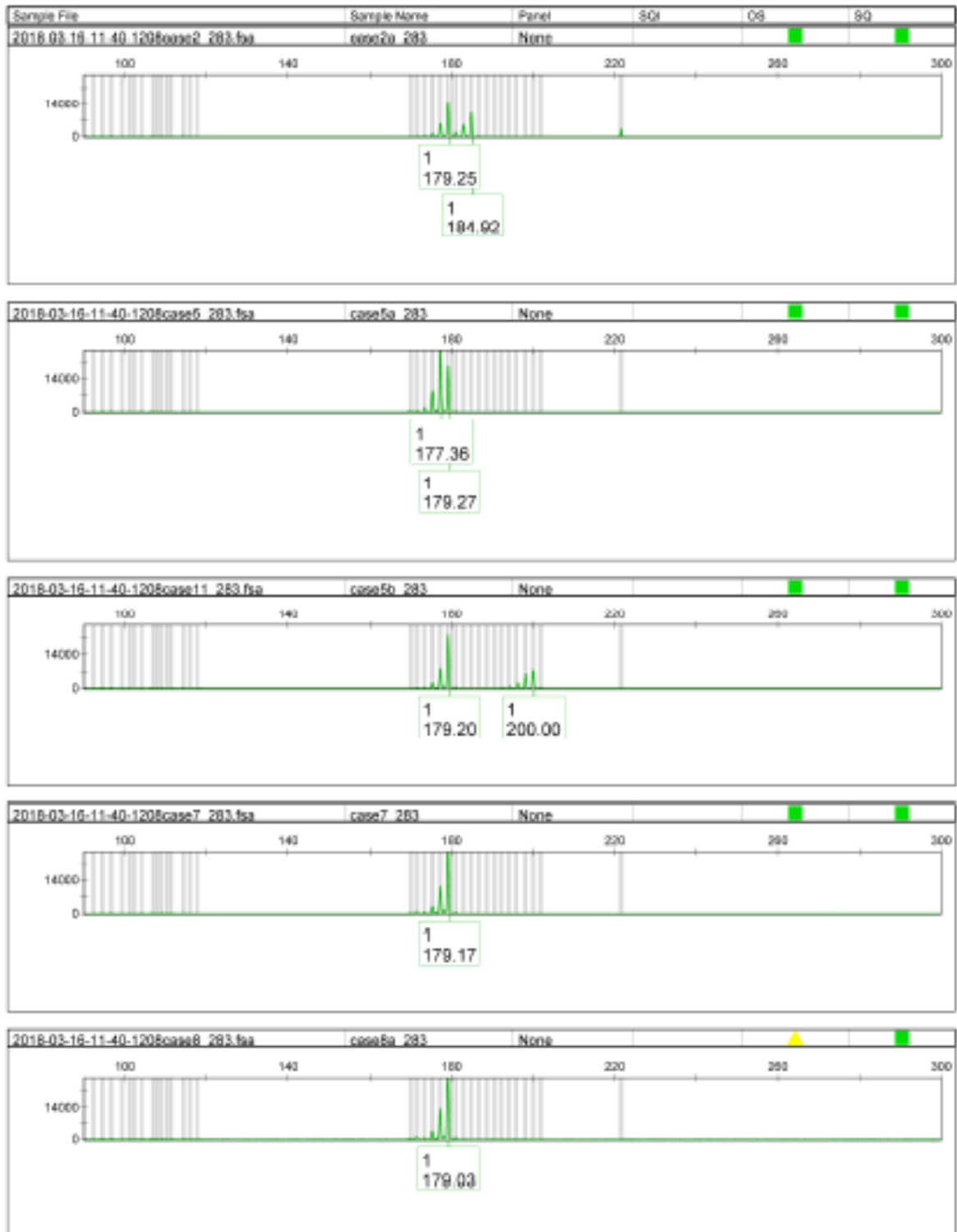
Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

identical by descent	πανομοιότυπες λόγω καταγωγής
Preimplantation Genetic Diagnosis	προεμφυτευτική γενετική διάγνωση
In Vitro Fertilization-	εξωσωματική γονιμοποίηση
Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction	Ποσοτική Φθορίζουσα Αλυσιδωτή Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης
High Resolution	υψηλής ανάλυσης
Harvest	Συγκομιδή
Microdissection	τεχνικής μικροδιατομής
bacterial artificial chromosomes	βακτηριακά τεχνητά χρωμοσώματα
Dna Extraction	Απομόνωση Γενετικού Υλικού

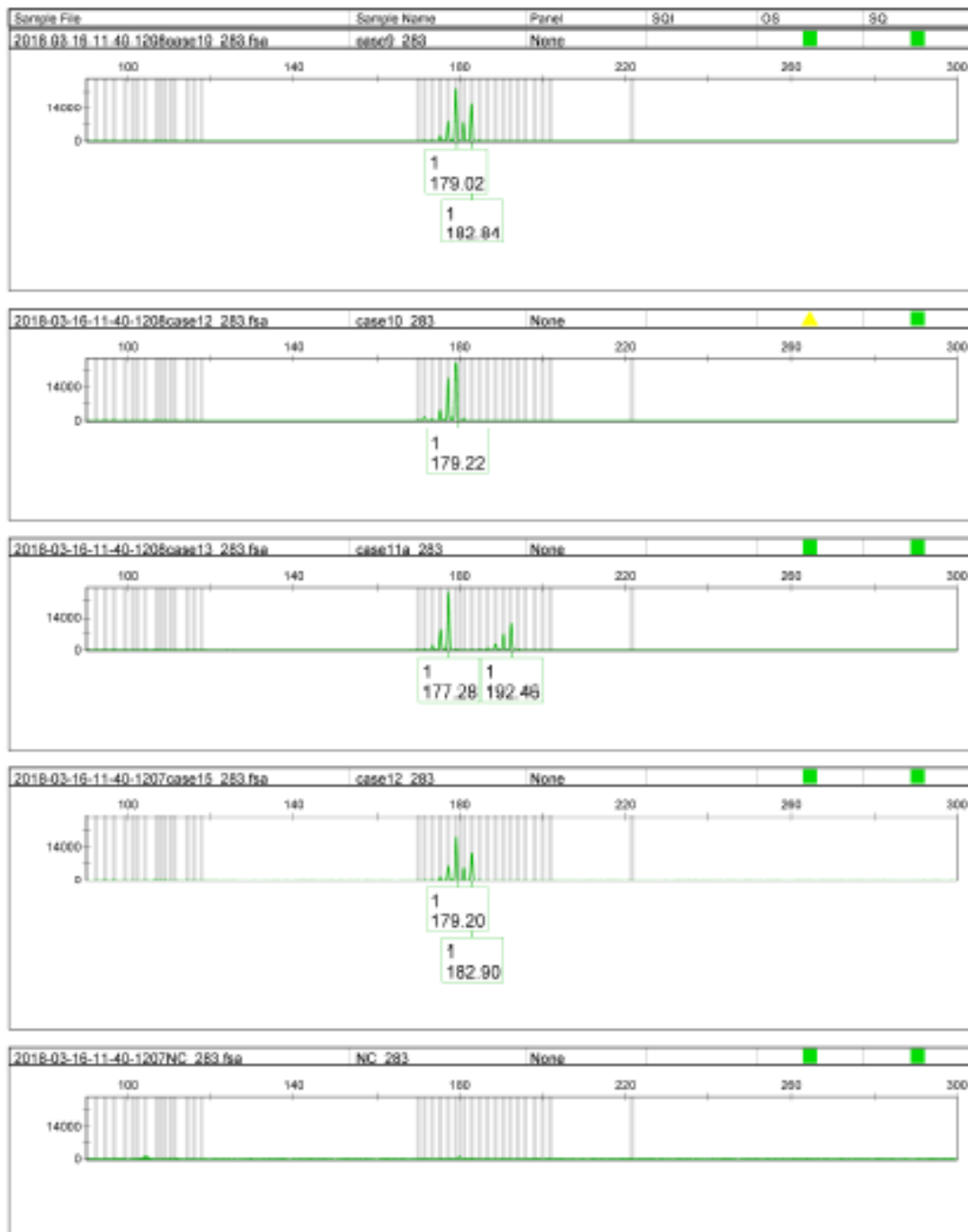
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
STRs	Short and Tandem Repeats
IBD	Identical By Descent
PCP	Partial Chromosome Paint
DOP-PCR	Degenerate Oligonucleotide-Primed Polymerase Chain Reaction
LCRs	Low Copy Repeats
SDs	Segmental Duplications
NAHR	Non-Allelic Homologous Recombination
AHR	Allelic Homologous Recombination
RFLPs	Restriction Fragment Length Polymorphisms
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
STS	Sequence-Tagged Sites
ESTs	Expressed Sequence Tags
PGD	Preimplantation Genetic Diagnosis
IVF	In Vitro Fertilization
PCR	Polymerase Chain Reaction
ECA	European Cytogeneticists Association
ACC	Association for Clinical Cytogenetics
M-FISH	Multiplex-FISH
SKY	Spectral Karyotyping
COBRA-FISH	COmbined Binary RATioloabeling-FISH
CCK	Color-Changing Karyotyping
MCB	MultiColor Banding
BACs	Bacterial Artificial Chromosomes
SINEs	Short Interspersed Nuclear Elements
LINEs	Long Interspersed Nuclear Elements
NGS	Next Generation Sequencing

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

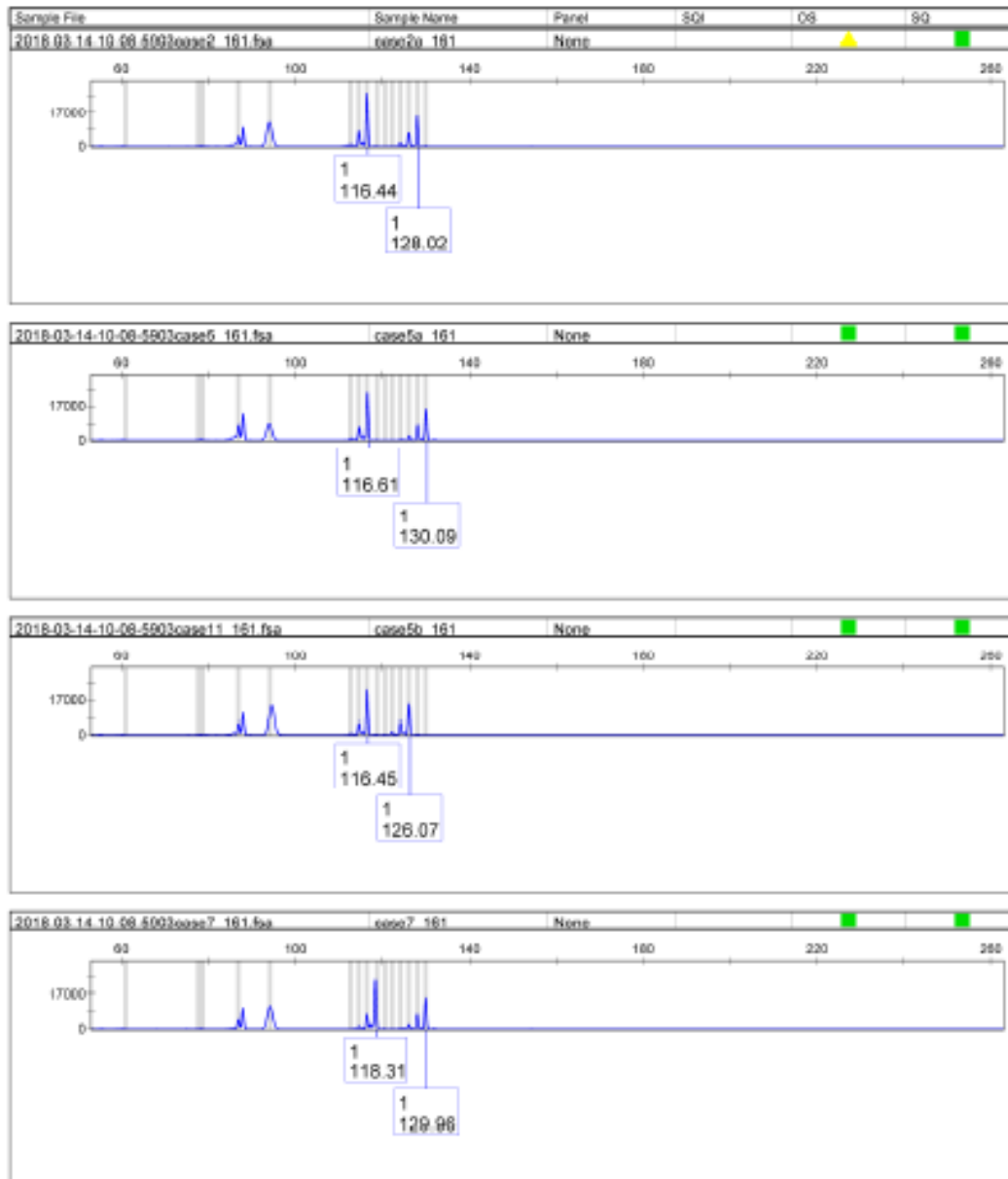


Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

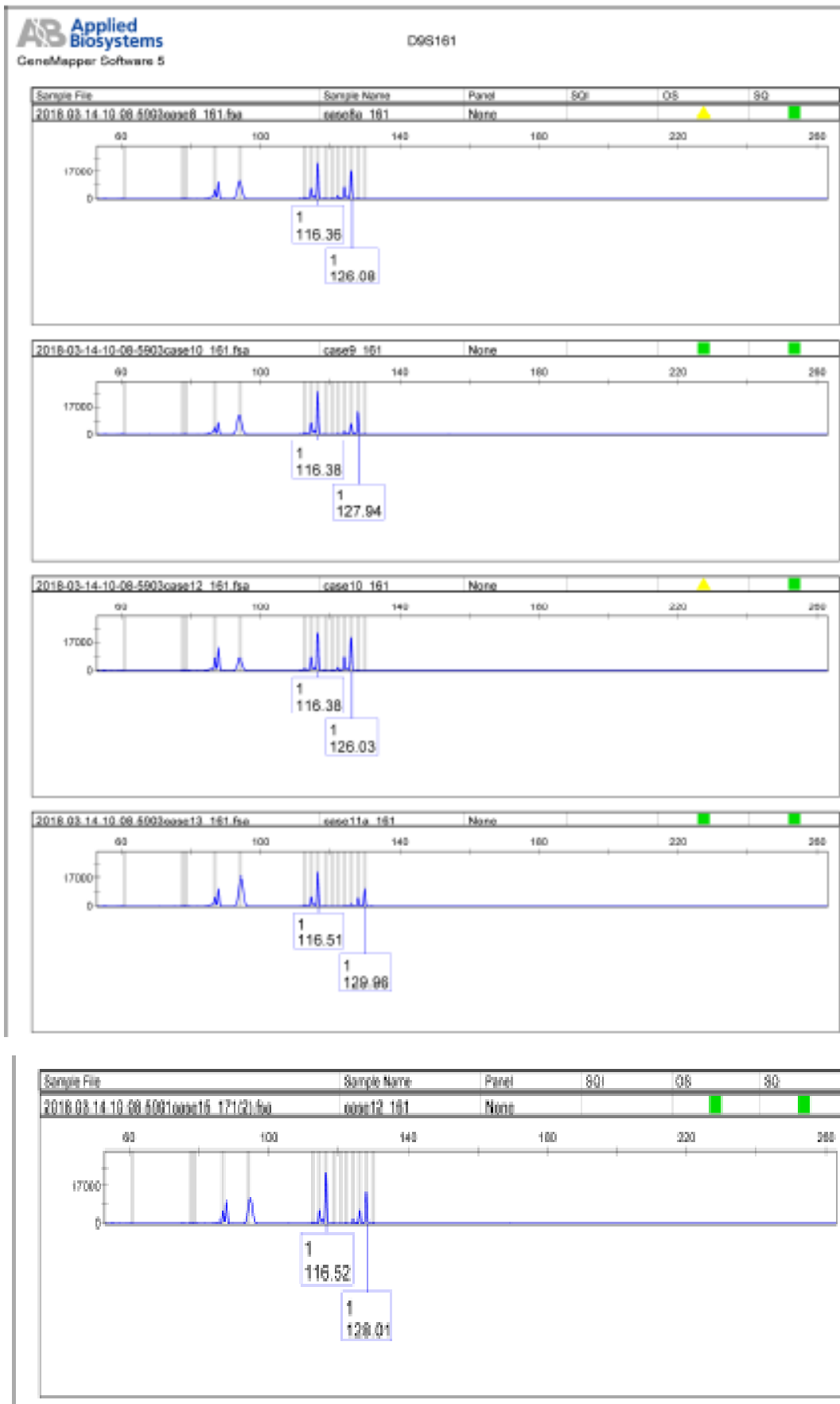


Εικόνα 11: Απεικόνιση απλοτυπικής ανάλυσης με την χρήση του μικροδορυφορικού δείκτη D9S283 για τους ετεροζυγώτες φορείς της αναστροφής inv(9)(p23q22.3).

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

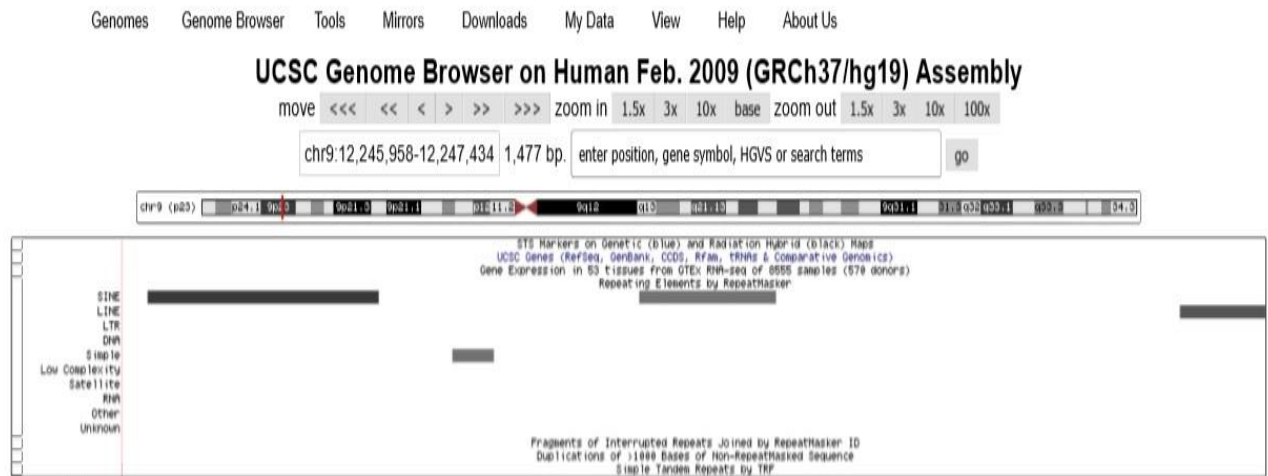


Περικεντρική αναστροφή *inv(9)(p23q22.3)* στον ελληνικό πληθυσμό.

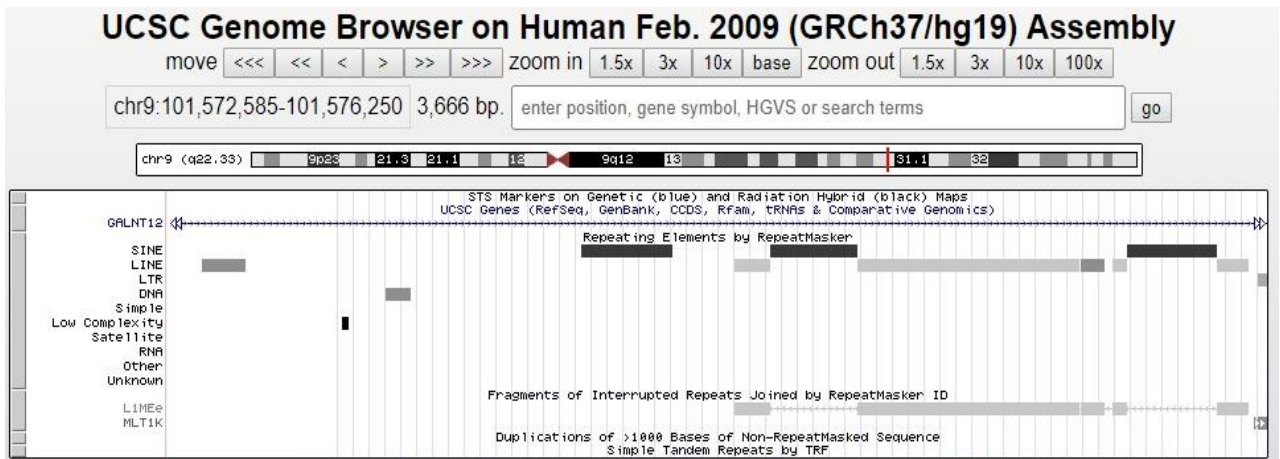


Εικόνα 12: Απεικόνιση απλοτυπικής ανάλυσης με την χρήση του μικροδορυφορικού δείκτη D9S161 για τους ετεροζυγώτες φορείς της αναστροφής *inv(9)(p23q22.3)*

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ



Εικόνα 13: Ανάλυση σημείου τομής στο χρωμόσωμα 9 στη θέση 12.245.958-12.247.434 του p βραχίονα. Παρατηρείται απουσία γονιδίων και παρουσία των αλληλουχιών SINEs (GRCh37/hg19).



Εικόνα 14: Ανάλυση σημείου τομής στο χρωμόσωμα 9 στη θέση 101.572.585-101.576.250 του q βραχίονα. Παρατηρείται απουσία γονιδίων και παρουσία των αλληλουχιών SINEs και LINES (GRCh37/hg19).

ΑΝΑΦΟΡΕΣ - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Russell, P.J., *iGenetics : a molecular approach*. 3rd ed. 2010, San Francisco ; London: Benjamin Cummings. xix, 828 p.
2. Αλαχιώτης, Σ., *Εισαγωγή στη γενετική*. 4η ed. 2011.
3. Read, A.F. and D. Donnai, *New clinical genetics*. 2nd ed. 2011, Banbury: Scion. xvii, 442 p.
4. Youings, S., et al., *A study of reciprocal translocations and inversions detected by light microscopy with special reference to origin, segregation, and recurrent abnormalities*. *Am J Med Genet A*, 2004. **126A**(1): p. 46-60.
5. Strachan, T., A.P. Read, and T. Strachan, *Human molecular genetics*. 4th ed. 2011, New York: Garland Science. xxv, 781 p.
6. Nussbaum, R.L., et al., *Thompson & Thompson : genetics in medicine*. 7th ed. 2007, Philadelphia :: Saunders Elsevier :. xi, 585 p.
7. <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/illustrations/inversion.jpg>.
8. Allderdice, P.W., N. Browne, and D.P. Murphy, *Chromosome 3 duplication q21 leads to qter deletion p25 leads to pter syndrome in children of carriers of a pericentric inversion inv(3) (p25q21)*. *Am J Hum Genet*, 1975. **27**(6): p. 699-718.
9. Smith, A.C., et al., *Genetic risk for recombinant 8 syndrome and the transmission rate of balanced inversion 8 in the Hispanic population of the southwestern United States*. *Am J Hum Genet*, 1987. **41**(6): p. 1083-103.
10. Kaiser, P., *Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics*. *Hum Genet*, 1984. **68**(1): p. 1-47.
11. Gardner, R.J.M. and D.J. Amor, *Gardner and Sutherland's chromosome abnormalities and genetic counseling*. 5 ed. 1 online resource.
12. Kurahashi, H. and B.S. Emanuel, *Long AT-rich palindromes and the constitutional t(11;22) breakpoint*. *Hum Mol Genet*, 2001. **10**(23): p. 2605-17.
13. Joseph-George, A.M., et al., *Euchromatic 9q13-q21 duplication variants are tandem segmental amplifications of sequence reciprocal to 9q13-q21 deletions*. *J Med Genet*, 2011. **48**(5): p. 317-22.
14. Gu, W., F. Zhang, and J.R. Lupski, *Mechanisms for human genomic rearrangements*. *Pathogenetics*, 2008. **1**(1): p. 4.
15. Shaffer, L.G. and J.R. Lupski, *Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans*. *Annu Rev Genet*, 2000. **34**: p. 297-329.
16. Johnson, M.E., *Primate gene and genome evolution driven by segmental duplication on chromosome 16*. Case Western Reserve University, 2007. p. iii , 161 pages.
17. Shaw, C.J. and J.R. Lupski, *Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease*. *Hum Mol Genet*, 2004. **13 Spec No 1**: p. R57-64.
18. Rosenberg, R.N. and J.M. Pascual, *Rosenberg's molecular and genetic basis of neurological and psychiatric disease*. Fifth edition ed. xxxix, 1424 pages.
19. https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC4330246_gni-12-136-g001&req=4.
20. Alkan, C., B.P. Coe, and E.E. Eichler, *Genome structural variation discovery and genotyping*. *Nat Rev Genet*, 2011. **12**(5): p. 363-76.
21. Emanuel, B.S. and T.H. Shaikh, *Segmental duplications: an 'expanding' role in genomic instability and disease*. *Nat Rev Genet*, 2001. **2**(10): p. 791-800.

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

22. Rooney, D.E. and B.H. Czepulkowski, *Human cytogenetics : a practical approach Vol.1, Constitutional analysis*. 2nd ed ed. Practical approach series. 1992, Oxford: IRL Press. xviii,274p.
23. Fickelscher, I., et al., *The variant inv(2)(p11.2q13) is a genuinely recurrent rearrangement but displays some breakpoint heterogeneity*. Am J Hum Genet, 2007. **81**(4): p. 847-56.
24. Watson, J.D., *Recombinant DNA : genes and genomes : a short course*. 3rd ed. 2007, New York: W.H. Freeman : Cold Spring Harbor Laboratory Press. xxi, 474 p.
25. Grimaldi, M.C. and B. Crouau-Roy, *Microsatellite allelic homoplasmy due to variable flanking sequences*. J Mol Evol, 1997. **44**(3): p. 336-40.
26. Palsboll, P.J., M. Berube, and H. Jorgensen, *Multiple levels of single-strand slippage at cetacean tri- and tetranucleotide repeat microsatellite loci*. Genetics, 1999. **151**(1): p. 285-96.
27. Amos, W., et al., *Microsatellites show mutational bias and heterozygote instability*. Nat Genet, 1996. **13**(4): p. 390-1.
28. Fan, H. and J.Y. Chu, *A brief review of short tandem repeat mutation*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2007. **5**(1): p. 7-14.
29. Chakraborty, R., et al., *Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(3): p. 1041-6.
30. Brinkmann, B., et al., *Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat*. Am J Hum Genet, 1998. **62**(6): p. 1408-15.
31. *ISCN 2016 An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016)*. 1. Auflage ed. 140 Seiten.
32. R. Hastings, R.H., F. Dagna Bricarelli, U. Kristoffersson, S. Cavani, *A common European framework for quality assessment for constitutional acquired and molecular cytogenetic investigations*. E.C.A. General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics, 2012.
33. ACC, A.f.C.C.-. *Professional Guidelines for Clinical Cytogenetics: General Best Practice Guidelines*. 1.04 ed. 2007.
34. Rooney, D.E., *Human cytogenetics : constitutional analysis. A practical approach*. 3rd ed ed. Practical approach series. 2001, Oxford: Oxford University Press. xix, 282 p.
35. Wegner, R.-D., *Diagnostic cytogenetics*. Springer lab manual. 1999, Berlin: Springer. 460 S.
36. Rautenstrauss, B.W., *FISH technology*. Lab manual. 2002, Berlin: Springer.
37. Starke, H., et al., *Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements*. Eur J Hum Genet, 2002. **10**(12): p. 790-800.
38. Kakazu, N. and T. Abe, *Multicolor banding technique, spectral color banding (SCAN): new development and applications*. Cytogenet Genome Res, 2006. **114**(3-4): p. 250-6.
39. Lowry, D.B. and J.H. Willis, *A widespread chromosomal inversion polymorphism contributes to a major life-history transition, local adaptation, and reproductive isolation*. PLoS Biol, 2010. **8**(9).
40. Girirajan, S. and E.E. Eichler, *Phenotypic variability and genetic susceptibility to genomic disorders*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(R2): p. R176-87.
41. Feuk, L., *Inversion variants in the human genome: role in disease and genome architecture*. Genome Med, 2010. **2**(2): p. 11.

Περικεντρική αναστροφή inv(9)(p23q22.3) στον ελληνικό πληθυσμό.

42. Hoffmann, A.A. and L.H. Rieseberg, *Revisiting the Impact of Inversions in Evolution: From Population Genetic Markers to Drivers of Adaptive Shifts and Speciation?* Annu Rev Ecol Evol Syst, 2008. **39**: p. 21-42.
43. Joron, M., et al., *Chromosomal rearrangements maintain a polymorphic supergene controlling butterfly mimicry.* Nature, 2011. **477**(7363): p. 203-6.
44. Salm, M.P., et al., *The origin, global distribution, and functional impact of the human 8p23 inversion polymorphism.* Genome Res, 2012. **22**(6): p. 1144-53.
45. Gilling, M., et al., *Breakpoint cloning and haplotype analysis indicate a single origin of the common Inv(10)(p11.2q21.2) mutation among northern Europeans.* Am J Hum Genet, 2006. **78**(5): p. 878-883.
46. Mattei, J.F., et al., *Pericentric inversion, inv(9) (p22 q32), in the father of a child with a duplication-deletion of chromosome 9 and gene dosage effect for adenylate kinase-1.* Clin Genet, 1980. **17**(2): p. 129-36.
47. Mattei, J.F., et al., *Familial pericentric inversion of chromosome 9, INV(9)(p22q32) with recurrent duplication-deletion.* Clin Genet, 1983. **24**(3): p. 220-2.
48. Shapira, S.K., et al., *Constitutional mosaicism for a chromosome 9 inversion resulting in recombinant aneusomy in an offspring.* Am J Med Genet, 1997. **69**(4): p. 360-4.
49. Sonoda, T., et al., *9p deletion and distal 9q duplication due to a paternal pericentric inversion 9(p22q32).* Jinrui Idengaku Zasshi, 1991. **36**(1): p. 111-6.
50. Mundhofir, F.E., et al., *Monosomy 9pter and trisomy 9q34.11qter in two sisters due to a maternal pericentric inversion.* Gene, 2012. **511**(2): p. 451-4.
51. Jacobs, P.A., et al., *The effect of structural aberrations of the chromosomes on reproductive fitness in man. II. Results.* Clin Genet, 1975. **8**(3): p. 169-78.
52. Flint, J., *Genetic basis of cognitive disability.* Dialogues Clin Neurosci, 2001. **3**(1): p. 37-46.