



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ΣΧΟΛΗ  
ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ  
ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ**

ΓΚΙΟΥΛΑΦΕΝΤΗ Δ. ΛΑΜΠΡΙΝΗ-ΕΛΠΙΔΑ

A.M: 1113201400016

Επιβλέπουσα: Μαριάννα Αντωνέλου, Επίκουρη καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Επιστημονική υπεύθυνη: Κατερίνα Ζώη, Ειδική Λειτουργική Επιστήμονας (ΕΛΕ) Β΄  
βαθμίδος

Εργαστήριο Αιματολογίας, Κέντρο Κλινικής Έρευνας, Πειραματικής Χειρουργικής και  
Μεταφραστικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών  
(ΙΙΒΕΑΑ)

Διευθυντής: Καθηγητής Δημήτρης Λουκόπουλος

ΑΘΗΝΑ 2020



# Πρόλογος

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αιματολογίας του Κέντρου Κλινικής Έρευνας, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών κατά την διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2018-2019.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Αιματολογίας Ομότιμο Καθηγητή κ. Δημήτρη Λουκόπουλο για την δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την Διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του.

Επίσης, ένα τεράστιο ευχαριστώ στην επιστημονική μου υπεύθυνη κ. Κατερίνα Ζώη που με εμπιστεύτηκε στο εργαστήριο της τόσο κατά την περίοδο πραγματοποίησης της πρακτικής μου άσκησης όσο και κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας καθώς και για την βοήθεια, την υπομονή και τις παρατηρήσεις της όλο αυτό το διάστημα, που είχαν πάντα σκοπό στο να με βοηθήσουν να γίνω καλύτερη.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Μαριάννα Αντωνέλου που με ένταξε στους διπλωματικούς της φοιτητές και ήταν πάντα πρόθυμη να βοηθήσει κατά την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας σε οποιοδήποτε κομμάτι.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ σε όλα τα άτομα του εργαστηρίου. Αρχικά στον Ανδρέα Γιαννόπουλο, διδακτορικό φοιτητή του εργαστηρίου, που είχε τεράστια υπομονή να με μάθει ότι χρειαζόταν να ξέρω, με έκανε μέρος του εργαστηρίου και που ήταν πάντα πρόθυμος να βοηθήσει σε όλη την πορεία εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Θεόδωρο Λούπη, μεταπτυχιακό φοιτητή του εργαστηρίου, που αρχικά είχε αναλάβει μεγάλο κομμάτι της εκπαίδευσης μου αλλά και είχε καθοριστικό ρόλο της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας και που πάντα είχε την υπομονή και τη διάθεση να με βοηθήσει.

Τέλος, να ευχαριστήσω την Γεωργία Αρβανίτη που συνέβαλε εξίσου στην εκπαίδευση μου και αποτέλεσε καλή παρέα μου κατά τη κοινή μας παραμονή στο εργαστήριο. Ενώ παράλειψη θα ήταν αν δεν ευχαριστήσω σε αυτό το σημείο την καλή μου φίλη Μαρία Γιαννούλη, που είχαμε κοινή πορεία στο εργαστήριο καθ' όλη τη διάρκεια και που βοήθησε πολύ όλο αυτό το διάστημα.

# Περιεχόμενα

1.	Εισαγωγή.....	7
1.1	Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.....	8
1.1.1	Ορισμός.....	8
1.1.2	Ταξινόμηση.....	8
	Ταξινόμηση από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.). Αναθεώρηση του 2016.....	8
1.1.3	Επιδημιολογία.....	10
1.1.4	Αιτιολογία.....	11
1.1.5	Παθογένεση.....	12
1.1.5.1.	Κυτταρογενετικές βλάβες στα ΜΔΣ.....	12
1.1.5.2.	Μοριακές βλάβες στα ΜΔΣ.....	13
1.1.5.2.1	Επιγενετικές τροποποιήσεις- Μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στο μηχανισμό επιγενετικής ρύθμισης του κυττάρου. ....	14
1.1.5.2.1.1	Το γονίδιο DNMT3A.....	14
1.1.5.2.1.2	Το γονίδιο TET2.....	15
1.1.5.2.1.3	Τα γονίδια IDH1 και IDH2.....	16
1.1.5.2.1.4	Τα γονίδια ASXL1 και EZH2.....	17
1.1.5.2.2	Συρραφή του RNA- Γονίδια που συμμετέχουν στον μηχανισμό συρραφής.....	18
1.1.5.2.2.1	Το γονίδιο SF3B1.....	20
1.1.5.2.2.2	Το γονίδιο U2AF1.....	20
1.1.5.2.2.3	Το γονίδιο SRSF2.....	21
1.2	Μεθυλίωση.....	22
1.2.1	Διαγονιδιακές περιοχές.....	23
1.2.1.1.	LINE 1.....	23
1.2.1.2.	Νησίδες CpG.....	25
2.	Σκοπός.....	29
3.	Υλικά και μέθοδοι.....	31
3.1	Αντιδραστήρια.....	31
3.2	Αναλυτικός εργαστηριακός εξοπλισμός.....	33

3.3	Κλινικό υλικό.....	34
3.4	Βασικές τεχνικές.....	36
3.4.1	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction , PCR).....	36
3.4.2	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Διαβαθμισμένης Θερμοκρασίας Υβριδισμού (Gradient PCR).....	40
3.4.3	Σύστημα Ανίχνευσης Μεταλλάξεων Ανθεκτικών στην Ενίσχυση (Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction, ARMS-PCR).....	41
3.4.4	Αλληλοειδική PCR (Allele Specific Polymerase Chain Reaction, AS-PCR).....	42
3.4.5	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR).....	43
3.4.5.1.	Φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται μη-ειδικά στο υπόστρωμα.....	44
3.4.5.2.	Φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται ειδικά επί συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής ακολουθίας του υποστρώματος.....	45
3.4.6	Υψηλής διακριτικής ικανότητας ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων PCR πραγματικού χρόνου (Post Real Time PCR High Resolution Melting curve Analysis, HRMA).....	47
3.4.6.1.	Παραλλαγές της μεθόδου - Μεθυλοειδική HRMA (Methylation specific HRMA, MS-HRMA).....	48
3.4.7	Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων μέσω πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing).....	50
3.4.7.1.	Αρχή λειτουργίας της μεθόδου.....	50
3.5	Τεχνικές Επεξεργασίας Νουκλεϊκών Οξέων.....	53
3.5.1	Απομόνωση γενωμικού DNA.....	53
3.5.1.1.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA σε φασματοφωτόμετρο μάζας.....	54
3.5.2	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για ανάδειξη των προϊόντων των αντιδράσεων PCR τελικού σημείου.....	54
3.5.3	Ανίχνευση μεταλλάξεων με την τεχνική της Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας Ανάλυση της Καμπύλης Τήξης προϊόντων PCR Πραγματικού Χρόνου (post Real Time PCR HRMA).....	56
3.5.4	Επεξεργασία του DNA με δισουλφίδιο του νατρίου.....	64
3.5.5	Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης των εκκινήτων με gradient PCR.....	65
3.5.6	Ανάδειξη των προϊόντων της gradient PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	67

3.5.7	MS-HRMA .....	70
3.5.8	MSP .....	70
4	Αποτελέσματα .....	71
4.1	Ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης V617F στην περιοχή της κινάσης JAK2 με την τεχνική της ARMS PCR σε ασθενείς με ΜΔΣ. ....	72
4.2	Προσδιορισμός της κατάστασης μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1 .....	77
4.2.1	Μεθυλοειδική HRMA (MS-HRMA).....	78
4.2.1.1.	Κλινικό υλικό .....	78
4.2.1.2.	Σχεδιασμός εκκινητών για MS-HRMA και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας.....	78
4.2.1.3.	Πρότυπη καμπύλη αναφοράς .....	79
4.2.1.4.	Αποτελέσματα MS-HRMA .....	81
4.2.1.5.	Στατιστική ανάλυση των δεδομένων.....	81
4.2.2	Μεθυλοειδική Πυροαλληλούχιση (MSP).....	84
4.2.2.1.	Κλινικό υλικό.....	84
4.2.2.2.	Σχεδιασμός εκκινητών για MSP και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας.....	84
συγκριτικά με τον ορθό. ....		85
4.2.2.3.	Προετοιμασία των δειγμάτων για MSP .....	85
4.2.2.4.	Αποτελέσματα MSP .....	86
4.2.2.5	Στατιστική ανάλυση των δεδομένων.....	87
5	Συζήτηση .....	89
5.1	Γενικά συμπεράσματα μελλοντικές προοπτικές .... <b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>	
6	Βιβλιογραφία .....	95
	Περίληψη .....	100
7	Παραρτήματα.....	102
	Παράρτημα I - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για HRMA .....	103
	Παράρτημα II - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για MS-HRMA .....	104
	Παράρτημα III - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για PCR ενίσχυση πριν από πυροαλληλούχιση .....	104
	Παράρτημα IV - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για πυροαλληλούχιση .....	104

# **1. Εισαγωγή**

## 1.1 Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα

### 1.1.1 Ορισμός

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα ΜΔΣ αποτελούν μια ετερογενή ομάδα κλωνικών αιμοποιητικών νεοπλασμάτων που χαρακτηρίζονται από μορφολογικές δυσμορφίες, μη φυσιολογική διαφοροποίηση και κυτταροπενίες του αίματος. Άτομα που πάσχουν εμφανίζουν εκτενή απόπτωση των προδρόμων αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό, κοινές χρωμοσωμικές ανωμαλίες και σωματικές μεταλλάξεις, καθώς και αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης προς οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ). Τα διαγνωστικά κριτήρια για τα ΜΔΣ περιλαμβάνουν τη δυσπλασία σε μια ή περισσότερες κυτταρικές αιμοποιητικές σειρές, που είναι πιθανό να οδηγήσουν σε εκτενή απόπτωση στα μεταγενέστερα στάδια της ωρίμανσης.<sup>1</sup>

### 1.1.2 Ταξινόμηση

#### Ταξινόμηση από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.). Αναθεώρηση του 2016

Τα ΜΔΣ ταξινομήθηκαν αρχικά το 2001 από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) το 2001 και πραγματοποιήθηκε και μια αναθεώρηση το 2008. Σύμφωνα με την ταξινόμηση αυτή διακρίνονται έξι κύριοι υποτύποι βάσει των μεταξύ τους διαφορών στον τύπο και στον αριθμό των δυσπλαστικών σειρών, το ποσοστό των μη διαφοροποιημένων κυττάρων του μυελού και σε έναν συγκεκριμένο υποτύπο ή ύπαρξη της χρωμοσωμικής ανωμαλίας del (5q). Όπως φαίνεται στην εικόνα 1, οι υπότυποι καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό, βάσει των κλινικών χαρακτηριστικών, ενώ περιλαμβάνουν από κυτταροπενίες (ανθεκτική αναιμία), μέχρι και ολιγοβλαστική μυελογενή λευχαιμία. Στις περιπτώσεις εκείνες που οι μυελοβλάστες ξεπερνούν το ποσοστό του 20% ή υπάρχουν συγκεκριμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, αναφερόμαστε σε ΟΜΛ. Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι υπάρχουν και περιπτώσεις που δεν είναι εφικτό να ταξινομηθούν. Η ταξινόμηση του 2008 συμπληρώθηκε με πρόσφατα δεδομένα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA πολλών ασθενών με ΜΔΣ, με τεχνολογίες αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS).<sup>2</sup>

Η αναθεώρηση του 2016 βελτίωσε ουσιαστικά την ταξινόμηση μέσω της βαθύτερης κατανόησης των μορφολογικών χαρακτηριστικών και της κυτταροπενίας, αλλά και με την ανάδειξη πληθώρας γενετικών πληροφοριών που συνδράμουν τόσο στη διάγνωση, όσο και στην ταξινόμηση.<sup>2</sup>



Όνομασία	Δυσπλαστική γενεολογική σειρά	Κυτταροπενία	Δακτυλιωτοί σιδηροβλάστες ως % ποσοστό των ερυθρών στοιχείων του μυελού	Αριθμός βλαστών στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών	Αριθμός βλαστών στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών
ΜΔΣ με δυσπλασία μιας σειράς	1	1 ή 2	<15%/<5%†	ΜΟ <5%, ΠΑ<1%, χωρίς ραβδία Auer	Οποιοδήποτε, εκτός εάν πληροί όλα τα κριτήρια για ΜΔΣ με απομονωμένο del (5q)
ΜΔΣ με δυσπλασία περισσότερων σειρών	2 ή 3	1 με 3	<15%/<5%†	ΜΟ <5%, ΠΑ<1%, χωρίς ραβδία Auer	Οποιοδήποτε, εκτός εάν πληροί όλα τα κριτήρια για ΜΔΣ με απομονωμένο del (5q)
<b>ΜΔΣ με δακτυλιωτους σιδηροβλάστες (ΜΔΣ-ΔΣ)</b>					
MDS-RS με δυσπλασία μιας σειράς	1	1 ή 2	<15%/<5%†	ΜΟ <5%, ΠΑ<1%, χωρίς ραβδία Auer	Οποιοδήποτε, εκτός εάν πληροί όλα τα κριτήρια για ΜΔΣ με απομονωμένο del (5q)
MDS-RS με δυσπλασία περισσότερων σειρών	2 ή 3	1 με 3	<15%/<5%†	ΜΟ <5%, ΠΑ<1%, χωρίς ραβδία Auer	Οποιοδήποτε, εκτός εάν πληρεί όλα τα κριτήρια για ΜΔΣ με απομονωμένο del (5q)
ΜΔΣ με διαγραφή του 5q (del 5q)	1 με 3	2 με 2	Μηδενικό ποσοστό	ΜΟ <5%, ΠΑ<1%, χωρίς ραβδία Auer	del (5q) μόνο ή με 1 επιπλέον ανωμαλία πλιν της 27 ή del (7q)
<b>ΜΔΣ με περίσσεια βλαστών (ΜΔΣ-ΠΒ)</b>					
MDS-ΠΒ-1	0 με 3	1 με 3	Μηδενικό ποσοστό	ΜΟ <10%-19%, ΠΑ<5%-19%, χωρίς ραβδία Auer	Οποιαδήποτε
MDS-ΠΒ-2	1 με 3	1 με 3	Μηδενικό ποσοστό	ΜΟ <5%-9%, ΠΑ<2%-4%, χωρίς ραβδία Auer	Οποιαδήποτε
<b>ΜΔΣ αταξινόμητα</b>					
Με 1% βλάστες στο αίμα	1 με 3	1 με 3	Μηδενικό ποσοστό	ΜΟ <5%, ΠΑ 5 1%, ‡ χωρίς ραβδία Auer	Οποιαδήποτε
Με δυσπλασία μιας σειράς και πανκυτταροπενία	1	3	Μηδενικό ποσοστό	ΜΟ <5%, ΠΑ<1%, χωρίς ραβδία Auer	Οποιαδήποτε
Βασιζόμενα σε κυτταρογενετικές ανωμαλίες	0	1 με 3	<15%§	ΜΟ <5%, ΠΑ<1%, χωρίς ραβδία Auer	Οποιαδήποτε σχετιζόμενη με ΜΔΣ
Παιδική ανθεκτική κυτταροπενία	1 με 3	1 με 3	Καμία	ΜΟ <5%, ΠΑ<2%	Οποιαδήποτε

Πίνακας 1. Η ταξινόμηση των ΜΔΣ σύμφωνα με ΠΟΥ 2016. Arber et al, Blood 2016.

Η κυτταροπενία αποτελεί βασικό γνώρισμα για τη διάγνωση των ΜΔΣ. Ωστόσο, η ταξινόμηση κατά τον ΠΟΥ στηρίζεται κυρίως στο ποσοστό δυσπλασίας και στον αριθμό των βλαστών, λιγότερο δε στο βαθμό και στο είδος της κυτταροπενίας. Σε μεμονωμένα περιστατικά ασθενών με σημαντική μορφολογική δυσπλασία, δεν παρατηρείται συγκεκριμένη κυτταροπενία.

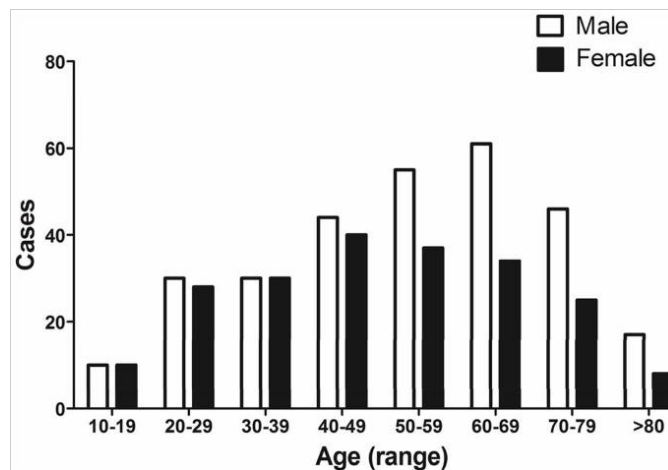
Πέρα από την αντικατάσταση του όρου «ανθεκτική αναιμία» σε «ανθεκτική κυτταροπενία», σε ενήλικες ασθενείς, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον τροποποιήσεις, όπως είναι η διάκριση της δυσπλασίας μίας ή περισσότερων κυτταρικών σειρών, δακτύλιοι σιδηροβάστων, περίσσεια βλαστών, ή η κυτταρογενετική ανωμαλία del (5q).

Πρόκληση παραμένει ο διαχωρισμός των περιπτώσεων ΜΔΣ που χαρακτηρίζονται από κυτταροπενία και δυσπλασία. Το κατώτερο όριο της δυσπλασίας παραμένει σε ποσοστό δυσπλαστικών κύτταρων 10% ανά αιμοποιητική σειρά, αν και είναι πιθανό σε φυσιολογικά άτομα ή σε μη νεοπλασματικές κυτταροπενίες το ποσοστό της δυσπλασίας να υπερβεί το 10%.

Η ταυτοποίηση της δυσπλασίας δεν είναι εύκολη υπόθεση. Η παρουσία μικρομεγακαρουκυττάρων και άλλων δυσπλαστικών μεταβολών είναι αρκετά συνήθης στα ΜΔΣ. Κρίσιμος παράγοντας στη διάγνωση παραμένει το ποσοστό των βλαστικών κυττάρων στο μυελό. Πιο συγκεκριμένα, ποσοστό παρουσίας βλαστικών κυττάρων πάνω από το 1% στο περιφερικό αίμα σχετίζεται με ΜΔΣ.<sup>2</sup>

### 1.1.3 Επιδημιολογία

Έρευνες έχουν αναδείξει τα ΜΔΣ ως τις πιο κοινές αιματολογικές κακοήθειες. Για το λόγο αυτό και έγιναν προσπάθειες να διευκρινιστεί η επιδημιολογία αυτών των νοσημάτων παρά την υψηλή τους ετερογένεια.<sup>3</sup> Αποδείχτηκε λοιπόν, ότι η εμφάνιση των ΜΔΣ συσχετίζεται έως ένα βαθμό με την ηλικία. Πιο συγκεκριμένα, παρόλο που δεν έχει οριστεί ένα ηλικιακό πλαίσιο εμφάνισης της νόσου, τα ποσοστά φαίνεται να αυξάνονται εκθετικά μετά την ηλικία των 40 ετών, όπως φαίνεται στην εικόνα 2. Σε χώρες της Δυτικής Ευρώπης και στις ΗΠΑ ο μέσος όρος εμφάνισης είναι τα 72 έτη, ενώ σε χώρες της Ανατολικής Ευρώπης και της Ασίας ο μέσος όρος είναι νεαρότερες ηλικίες. Επίσης, τα ποσοστά εμφάνισης διαφορετικών υπότυπων ΜΔΣ διαφέρουν ανά χώρα. Πιθανολογείται ότι πολλοί ηλικιωμένοι ασθενείς με ανεξήγητες κυτταροπενίες πάσχουν από ΜΔΣ, χωρίς να έχει αξιολογηθεί πλήρως η κλινική τους κατάσταση. Η πιθανότητα ένα άτομο να νοσήσει πριν την ηλικία των 50 ετών είναι αρκετά σπάνια και φαίνεται να σχετίζεται με έκθεση σε ακτινοβολίες ή διάφορους χημικούς παράγοντες, όπως κυτταροτοξικές ουσίες για την αντιμετώπιση άλλης κακοήθειας.<sup>4-7</sup>



**Εικόνα 1.** Κατανομή ηλικίας και φύλου σε ασθενείς με ΜΔΣ. Παρόμοια ποσοστά εμφάνισης ΜΔΣ παρατηρούνται σε νεαρότερες ηλικίες, ανεξαρτήτως φύλου. Το ποσοστό ασθενών με ΜΔΣ αυξάνεται σταδιακά με το γήρας, μάλιστα οι άντρες φαίνεται να νοσούν με υψηλότερη συχνότητα.

Οι ασθενείς με ηλικία μικρότερη των 60 ετών εμφανίζουν συχνότερα προβλήματα στον μυελό των οστών, χρωμοσωμικές ανωμαλίες τύπου τρισωμίας 8, αλλά και χαμηλότερα ποσοστά προηγούμενης προσβολής από τη νόσο και μικρότερες πιθανότητες πάθησης, σε σχέση με τους ασθενείς άνω των 60 ετών.<sup>8</sup>

Πέρα από τον ηλικιακό παράγοντα έρευνες έχουν δείξει ότι η πιθανότητα προσβολής εξαρτάται από το φύλο. Οι άντρες έχουν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης του del(5q) συνδρόμου, κατά 1.5 φορές, συγκριτικά με τις γυναίκες.<sup>9</sup>

Τέλος έρευνες έχουν συνδέσει την εμφάνιση των ΜΔΣ με την έκθεση μιας πληθώρας χημικών παραγόντων, όπως το βενζόλιο, συνήθειες όπως το κάπνισμα αλλά και την παρουσία ενός βεβαρυμμένου οικογενειακού ιστορικού.<sup>10,11</sup>

#### 1.1.4 Αιτιολογία

Τα ΜΔΣ είναι κλωνικές διαταραχές του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου (AAK). Πέρα από την μεγάλη ετερογένεια των νοσημάτων αυτών ως προς την κλινική εικόνα, η παθοφυσιολογία των συγκεκριμένων νεοπλασμάτων είναι κοινή και αφορά τον ανεξέλικτο πολλαπλασιασμό πολυδύναμων προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, τα οποία έχουν υποστεί μεταλλάξεις. Εάν μια ορισμένη στιγμή εμφανισθεί μια βλάβη τότε είναι πιθανό να μην δεσμευτεί με σκοπό την εξέλιξη του προς μια μυελική σειρά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα της βλάβης τον σχηματισμό ενός βραχύβιου, δυσλειτουργικού και δύσμορφου κυττάρου, που εμφανίζει ανταγωνιστικό πλεονέκτημα συγκριτικά με τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα. Εν συνεχεία, τα δυσπλαστικά αυτά κύτταρα σταδιακά κατακλύζουν τον μυελό και οδηγούμεστε στην εμφάνιση κλωνικών διαταραχών.<sup>12</sup>

### 1.1.5 Παθογένεση

Η μεγάλη φαινοτυπική και κλινική ετερογένεια των ΜΔΣ υποδηλώνει ότι ενδεχομένως να ευθύνονται σε μια εξίσου ετερογενή ομάδα παθογενετικών μηχανισμών. Πράγματι έχει αποδειχθεί ότι η εμφάνιση των ΜΔΣ οφείλεται τόσο σε μια πληθώρα χρωμοσωμικών ανωμαλιών, όσο και σε στοχευμένες μοριακές βλάβες, συγκεκριμένων γονιδίων. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι τυχαίες κατά κύριο λόγο και σπάνια οφείλονται σε περιβαλλοντικές επεμβάσεις όπως είναι η έκθεση σε μεταλλαξογόνα (ιονίζουσα ακτινοβολία, καπνός του τσιγάρου ή άλλες πηγές βενζολίου), διάφορες χημειοθεραπευτικές ουσίες όπως είναι οι αλκυλιωτικοί παράγοντες και αναστολείς των τοποϊσομερασών. Οι τελευταίοι αναστέλλουν τη δράση ενζύμων που επιδιορθώνουν το DNA, επηρεάζοντας έτσι την ακεραιότητα των χρωμοσωμάτων. Τέλος, η εμφάνιση των ΜΔΣ μπορεί να θεωρηθεί αποτέλεσμα διάφορων κληρονομήσιμων μεταλλάξεων, οι οποίες προδιαθέτουν για την ανάπτυξη διαταραχών της μυελικής σειράς.<sup>1</sup>

#### 1.1.5.1. Κυτταρογενετικές βλάβες στα ΜΔΣ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η παθογένεια των ΜΔΣ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από κυτταρογενετικές βλάβες. Συγκριτικά με άλλες αιματολογικές κακοήθειες, στα ΜΔΣ ανιχνεύονται κατά κύριο λόγο ανευπλοειδίες (π.χ μονοσωμία 5/7, τρισωμία 8 κ.α.), μη ισορροπημένες μεταθέσεις, αναστροφές και ελλείψεις ή προσθήκες χρωμοσωμικού υλικού (έλλειψη 5q, 7q κ.α.) ή/και συνδυασμό αυτών. Στα πρωτοπαθή ΜΔΣ η συχνότητα εμφάνισης τους ανέρχεται στο 50% με την συχνότητα στα δευτεροπαθή ΜΔΣ να φθάνει το 90%.<sup>12</sup> Οι ελλείψεις συνήθως αφορούν ογκοκατασταλτικά γονίδια. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι μεταλλάξεις αυτές πλέον στοχεύονται θεραπευτικά, όπως στην περίπτωση της απώλειας του μακριού βραχίονα του χρωμοσώματος 5 (del5q), η οποία αποτελεί μια κοινή γενετική ανωμαλία που παρατηρείται στα ΜΔΣ (15%).

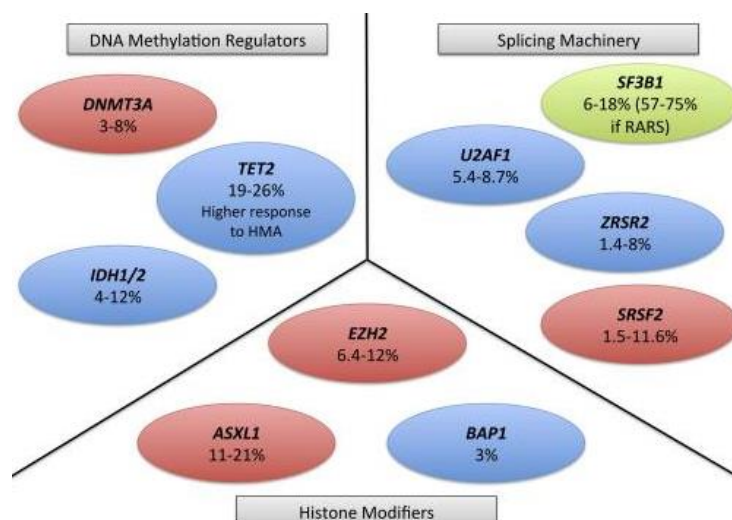
Επίσης πρέπει να αναφερθεί ότι τα ΜΔΣ σχετίζονται τόσο με αυξημένη πιθανότητα εξέλιξης προς ΟΜΛ όσο και με άλλα νεοπλάσματα της μυελικής σειράς και μερικά μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα. Τέλος, υπάρχει συσχετισμός μεταξύ των αλλοιώσεων του γονιδιώματος και των κλινικών φαινοτύπων αλλά και άλλων παραμέτρων, όπως είναι η ανταπόκριση στη θεραπεία, η προδιάθεση εξέλιξης σε ΟΜΛ και η συνολική επιβίωση του ασθενούς.<sup>1</sup>

### 1.1.5.2. Μοριακές βλάβες στα ΜΔΣ

Περιορισμένες σε έκταση μοριακές βλάβες, σε μεμονωμένα γονίδια, παρατηρούνται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 80% των ασθενών με ΜΔΣ. Όταν οι μεταλλάξεις αυτές επηρεάζουν την κωδική αλληλουχία των γονιδίων επηρεάζουν τα σχετιζόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια και ενδεχομένως συμμετέχουν σε εκδήλωση της νόσου. Υπάρχουν πάνω από 50 ταυτοποιημένα γονίδια στα οποία ανιχνεύονται μεταλλάξεις στους ασθενείς με ΜΔΣ. Στην πλειοψηφία τους, αυτά, εμφανίζονται μεταλλαγμένα σε χαμηλό ποσοστό ασθενών (1-5%), ωστόσο ορισμένα παρουσιάζουν υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων (35%).

Είναι γεγονός πως στα ΜΔΣ εμφανίζονται συχνά μεταλλάξεις, σε γονίδια που συμμετέχουν σε διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες. Τα βασικά εμπλεκόμενα γονίδια αναγράφονται παρακάτω στην εικόνα 3. Αυτό υποδηλώνει πως τα νοσήματα αυτά οφείλονται σε ποικίλους παθογενετικούς μηχανισμούς. Οι μεταλλάξεις αυτές συνήθως είναι πολυάριθμες ανά ασθενή, μάλιστα συνδυάζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε προσδίδουν διαφορετικά πιθανά γενετικά προφίλ. Η πολυπλοκότητα αυτή μπορεί να εξηγήσει την κλινική ετερογένεια της νόσου.

Η κλινική σημασία όλων των μεταλλάξεων δεν είναι πάντα γνωστή εκ των προτέρων. Επηρεάζεται δε, τόσο από τον τύπο της μετάλλαξης, όσο και από το ποσοστό του μεταλλαγμένου κυτταρικού πληθυσμού, τυχόν συνυπάρχουσες μεταλλάξεις ανεξάρτητα από το εάν αυτές εμφανίζονται στον ίδιο ή σε διαφορετικούς κλώνους κυττάρων. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ακόμη, η ηλικία εμφάνισης της νόσου, καθώς και το ποσοστό των βλαστικών κυττάρων στο μυελό.<sup>13-16</sup>

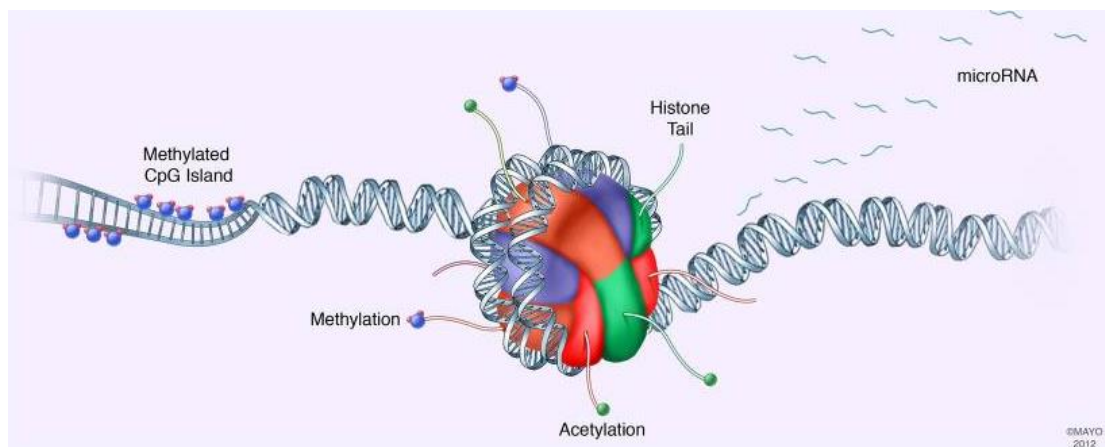


**Εικόνα 2.** Γονίδια, που ανιχνεύονται συχνά μεταλλαγμένα στα ΜΔΣ, καθώς και οι συχνότητα εμφάνισης αυτών, ομαδοποιημένα με βάση την κυτταρική τους λειτουργία. Με κόκκινο και πράσινο χρώμα απεικονίζονται γονίδια που έχουν σχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση και καλύτερη πρόγνωση, αντίστοιχα, ενώ με μπλε χρώμα εκείνα με ασαφή προγνωστική αξία.<sup>17</sup>

### 1.1.5.2.1 Επιγενετικές τροποποιήσεις- Μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στο μηχανισμό επιγενετικής ρύθμισης του κυττάρου.

Ως επιγενετικές θεωρούνται οι κληρονομήσιμες, μέσω διαδοχικών κυτταρικών διαιρέσεων<sup>18</sup>, τροποποιήσεις της χρωματίνης, οι οποίες δεν μεταβάλουν την νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA, ωστόσο μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη μυελικών νεοπλασιών, αλλά και συμπαγών όγκων.

Οι ρυθμιστές της μεθυλίωσης του DNA και της τροποποίησης των ιστονών, όπως επίσης τα ATP-εξαρτώμενα ένζυμα αναδιαμόρφωσης της δομής της χρωματίνης, αποτελούν τους κύριους τελεστές του επιγενετικού ελέγχου, ενώ παράλληλα αλληλεπιδρούν με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, όπως μεταγραφικοί παράγοντες<sup>18</sup>. Όπως προαναφέρθηκε η εκδήλωση των ΜΔΣ οφείλεται στην συσσώρευση στοχευμένων μοριακών βλαβών. Ένας επιγενετικός μηχανισμός που είναι γνωστό πως εμπλέκεται στην εκδήλωση ΜΔΣ, είναι η μεθυλίωση των καταλοίπων κυτοσίνης στο DNA. Πιο συγκεκριμένα, συχνά, οι ασθενείς με ΜΔΣ, εμφανίζουν καθολική υπομεθυλίωση, ή υπερμεθυλίωση σε σημαντικές περιοχές, όπως οι νησίδες CpG (περιοχές πλούσιες σε δινουκλεοτίδια κυτοσίνης και γουανίνης), οι οποίες εντοπίζονται σε υποκινητές γονιδίων, ή στις εγγύς περιοχές και εμφανίζονται διασκορπισμένες σε όλο το γονιδίωμα. Οι αλλαγές αυτές σχετίζονται με τροποποιήσεις στη δομή της χρωματίνης, η οποία συνοδεύεται από αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης.<sup>1,19</sup>



**Εικόνα 3.** Εν συντομία οι κυριότεροι επιγενετικοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στην παθογένεση. Αυτοί είναι οι εξής: μεθυλίωση του DNA, επιγενετική βλάβη της τροποποίησης των ιστονών και τα microRNAs.<sup>20</sup>

#### 1.1.5.2.1.1 Το γονίδιο DNMT3A

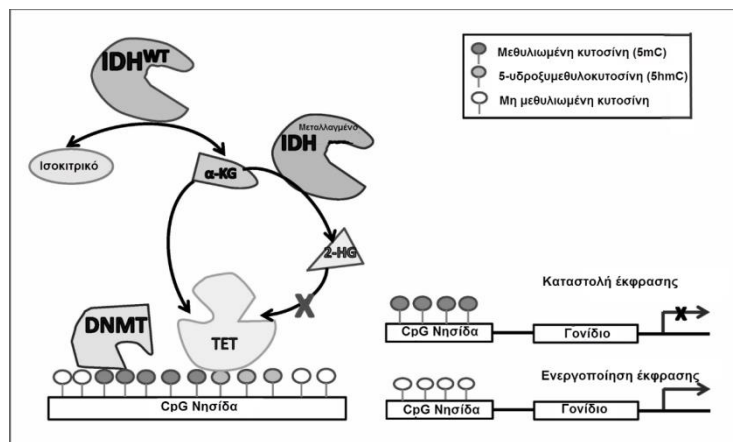
Το γονίδιο *DNMT3A* ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων *DNMT*, τα οποία κωδικοποιούν μεθυλοτρανσφεράσες του DNA, που έχουν σκοπό την μεθυλίωση του DNA και πιο συγκεκριμένα την μετατροπή βάσεων κυτοσίνης προς 5-μεθυλο-

κυτοσίνη όπως αναφέρθηκε και παραπάνω και εντοπίζεται στο γενετικό τόπο 2p23. Σημαντικό ρόλο για τον άνθρωπο έχουν τα ένζυμα DNMT1, DNMT3A και DNMT3B.<sup>19</sup> Το DNMT3A καθώς και το DNMT3B έχουν την δυνατότητα *de novo* μεθυλίωσης του DNA, ενώ το DNMT1 διατηρεί το υπάρχον πρότυπο μεθυλίωσης των νησίδων CpG.<sup>19</sup> Μεταλλάξεις στο *DNMT3A* έχουν βρεθεί σε ποσοστό 8-10% των περιπτώσεων ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.<sup>19</sup> Στην πλειοψηφία τους οι μεταλλάξεις του *DNMT3A* είναι παρανοηματικές μεταλλάξεις (missense mutations) και κατά κύριο λόγο εντοπίζονται στο εξώνιο 23 σε επίπεδο DNA στο εξώνιο 23 με τις πιο συχνές να είναι οι c.2645G>A, c.2644C>T και c.2644C>A, όπου σε πρωτεϊνικό επίπεδο προκαλούν αλλαγή στο αμινοξικό κατάλοιπο της αργινίνης στην θέση 882 (p.R882H, p.R882C και p.R882S αντίστοιχα) πλησίον του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα στην λειτουργική/δομική περιοχή (domain) με ενεργότητα μεθυλο-τρανσφεράσης.<sup>21</sup> Σχεδόν σε κάθε περίπτωση οι μεταλλάξεις εμφανίζονται σε ετεροζυγωτία. Νέα δεδομένα φανερώνουν πως το προϊόν της μετάλλαξης R882 αναστέλλει τη φυσιολογική πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα την αποτροπή του σχηματισμού των τετραμερών μορίων DNMT3A που είναι απαραίτητα για την ενεργότητα της *de novo* μεθυλίωσης και ίσως για το λόγο αυτό η συγκεκριμένη μετάλλαξη εμφανίζεται σε υψηλό ποσοστό σε ασθενείς με ΜΔΣ.<sup>21</sup>

#### 1.1.5.2.1.2 Το γονίδιο *TET2*

Το γονίδιο *TET2* (Ten-Eleven Translocation 2) ανήκει στην οικογένεια των *TET* γονιδίων και εντοπίζεται στο γενετικό τόπο 4q24. Οι *TET* πρωτεΐνες είναι ένζυμα τα οποία δρουν ως υδροξυλάσες και καταλύουν την μετατροπή της 5-μεθυλοκυτοσίνης (5mC) προς 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη (5hmC) με αποτέλεσμα την απομεθυλίωση του DNA.<sup>22</sup> Για την πραγματοποίηση της παραπάνω μετατροπής απαιτείται η παρουσία α-Κετογλουταρικού (α-KG) και δισθενών κατιόντων σιδήρου (Fe<sup>2+</sup>). Οι μεταλλάξεις στο *TET2* θεωρούνται από τις πλέον κοινές μεταλλάξεις που σχετίζονται με τα ΜΔΣ, καθώς ανιχνεύονται στο 30% των περιπτώσεων. Οι *TET2* μεταλλαγές εντοπίζονται σε καταλυτικές περιοχές του γονιδίου κατά κύριο λόγο, κάτι που οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας. Παρουσιάζουν συχνά ετεροζυγωτία λόγω επίκτητης μονογονεϊκής δισωμίας (acquired uniparental disomy, aUPD) στην περιοχή του χρωμοσώματος 4q. Ωστόσο, οι μεταλλαγές αυτές δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πρόγνωση, είτε αρνητική είτε θετική.<sup>1</sup> Επίσης, ο δυσπλαστικός φαινότυπος των ΜΔΣ δεν οφείλεται αποκλειστικά μεταλλάξεις του *TET2*, καθώς πειράματα σε μοντέλα ποντικών έδειξαν πως απώλεια του *TET2* οδηγεί σε αυξημένη αυτο-ανανέωση του πληθυσμού των ΑΑΚ με ελάχιστη

συχνότητα δυσπλασίας και άρα μεταλλάξεις του *TET2* στα ΜΔΣ συνυπάρχουν με μεταλλάξεις άλλων γονιδίων.<sup>23</sup>



**Εικόνα 4.** Ο ρόλος των DNMT, TET και IDH πρωτεϊνών στη μεθυλίωση και απομεθυλίωση του DNA. Τροποποίηση από Connie A. et al., 2013.

### 1.1.5.2.1.3 Τα γονίδια *IDH1* και *IDH2*

Τα γονίδια *IDH1* και *IDH2* κωδικοποιούν ένζυμα με λειτουργία NADP<sup>+</sup>-εξαρτώμενων ισοκιτρικών αφυδρογονασών (Isocitrate Dehydrogenase; IDH) τα οποία καταλύουν την μετατροπή του ισοκιτρικού σε α-Κετογλουταρικό, με ταυτόχρονη παραγωγή NADPH και CO<sub>2</sub>. Η προαναφερόμενη αντίδραση έχει σημαντικό ρόλο στον κύκλο του κιτρικού οξέος (κύκλος Krebs) και στην μεθυλίωση του DNA. Το α-Κετογλουταρικό (αKG) ή αλλιώς 2-οξογλουταρικό μαζί με οξυγόνο (O<sub>2</sub>) και κατιόντα δισθενούς σιδήρου (Fe<sup>2+</sup>) είναι απαραίτητα για την λειτουργία του ενζύμου TET2.

Κατά τις μεταλλάξεις των γονιδίων αυτών πραγματοποιείται οξείδωση του NADPH σε NADP<sup>+</sup>, κατά την μετατροπή του α-κετογλουταρικού σε 2-υδροξυγλουταρικό. Το παραγόμενο 2-υδροξυγλουταρικό επηρεάζει τις εξαρτώμενες από το α-κετογλουταρικό οξυγονάσες, προλυλ- υδροξυλάσες, ένζυμα σύνθεσης κολλαγόνου και ένζυμα που επηρεάζουν την απομεθυλίωση των ιστονών.<sup>24</sup> Σε ασθενείς με μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1* και *IDH2* συνήθως παρατηρείται καθολική υπομεθυλίωση<sup>24</sup>, ωστόσο η κλινική σημασία των μεταλλαγών των *IDH1* και *IDH2* ποικίλει και εξαρτάται από την εκάστοτε μεταλλαγή.<sup>24</sup>

Μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1/IDH2* ανευρίσκονται σε ασθενείς ΜΔΣ μόλις σε ποσοστό 5%.<sup>24</sup> Για το γονίδιο *IDH1*, η πιο συχνή μετάλλαξη οδηγεί στην αντικατάσταση του αμινοξέος αργινίνη (R) από το αμινοξύ ιστιδίνη (H) στη θέση 132 της αμινοξικής αλληλουχίας (p.R132H). Για το γονίδιο *IDH2*, οι μεταλλάξεις με την μεγαλύτερη συχνότητα είναι οι p.R140Q και p.R172K.<sup>25</sup> Και οι τρεις αυτές μεταλλάξεις είναι μεταλλάξεις απόκτησης λειτουργικότητας (gain-of-function mutations). Συνέπεια αυτών των μεταλλαγών είναι η μετατροπή από τα IDH1/2, του αKG, προς 2-υδροξυγλουταρικό (2HG). Η συσσώρευση του 2HG με την



αντίστοιχη μείωση των επιπέδων του αKG επηρεάζει την λειτουργία του ενζύμου TET2, του οποίου η δράση εξαρτάται από το αKG και συγκεκριμένα εμποδίζει την σύνδεση του με τον δισθενή σίδηρο. Ως συνέπεια τα επίπεδα 5hmC μειώνονται, λόγω της μετατροπής 5mC προς 5hmC, με αποτέλεσμα την υπερμεθυλίωση του DNA, γεγονός που επιδρά σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Οι λειτουργίες αυτές στην προκειμένη περίπτωση επηρεάζονται πιθανότατα λόγω αποσιώπησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων και γονιδίων που προάγουν την διαφοροποίηση των κυττάρων.<sup>26</sup>

#### 1.1.5.2.1.4 Τα γονίδια ASXL1 και EZH2

Το γονίδιο ASXL1 (Additional sex combs-like 1) εντοπίζεται στο γενετικό τόπο 20q11 και ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων ASXL (ASXL1, ASXL2 ASXL3) των θηλαστικών.<sup>27</sup> Η πρωτεΐνη ASXL1 σχετίζεται με την ρύθμιση της έκφρασης σημαντικών γονιδίων, όπως είναι τα γονίδια HOX και πιο συγκεκριμένα δρα ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας τα ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης ή των ιστό στον οποίο αυτή εκφράζεται.<sup>28</sup>

Μεταλλάξεις του γονιδίου ASXL1 έχουν ανιχνευθεί σε ένα ευρύ φάσμα νεοπλασιών του μυελού των οστών, συμπεριλαμβανόμενων και των ΜΔΣ.<sup>29</sup> Οι μεταλλάξεις κατά κύριο λόγο εμφανίζονται σε ετεροζυγωτία και αποτελούν μεταλλαγές μη νοηματικές-ανερμηνεύσιμες (nonsense) που έχουν ως αποτέλεσμα την μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης και την πρόωρη λήξη. Ως επί τω πλείστον ανιχνεύονται στο καρβοξυτελικό άκρο του ASXL1 και κυρίως στο τελευταίο εξώνιο, κοντά στην περιοχή PHD (PHD domain).<sup>29</sup> Μεταλλάξεις του γονιδίου συνυπάρχουν με μεταλλάξεις άλλων γονιδίων, όπως των SRSF2, U2AF1, TET2 και NRAS και συνδέεται, όμως, με πτωχή πρόγνωση. Τέλος, μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο γονίδιο συσχετίζονται με υψηλότερες πιθανότητες εξέλιξης προς ΟΜΛ.<sup>15,30</sup>

Η πρωτεΐνη ASXL1 φαίνεται να συμμετέχει ενεργά στην ρύθμιση της έκφρασης των ομοιοτικών γονιδίων, όπως τα γονίδια HOX, ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας τα ανάλογα με τον ιστό που εκφράζονται και με το στάδιο ανάπτυξης.<sup>28</sup> Στην παραπάνω διαδικασία συμβάλλει η πρωτεΐνη ASXL1 μέσω της συγκρότησης των πρωτεϊνικών συμπλόκων PRC (Polycomb-group repressor complex) και TRXG (trithorax-group, activator complex) αλλά και μέσω της αλληλεπίδρασης της με υποδοχείς ορμονών και άλλων μορίων, όπως επιγενετικούς ρυθμιστές του DNA και των ιστονών.<sup>27</sup>

Τα συμπλέγματα πρωτεϊνών PRC και TRXG έχουν ως βασικό σκοπό την διατήρηση της γονιδιακής έκφρασης στο στάδιο της εμβρυογένεσης και της ανάπτυξης αλλά και τη διατήρηση των επιγενετικών τροποποιήσεων. Πιο συγκεκριμένα, μέσω των

PRC επιτυγχάνεται καταστολή της γονιδιακής έκφρασης ενώ μέσω των TRXG επιτυγχάνεται διατήρηση της επαγωγής της μεταγραφής τροποποιώντας τις ιστόνες. Το σύμπλοκο PRC2 συμπεριλαμβάνει τις υπομονάδες E(z) (Enhancer of zeste), Su(z)12 (Suppressor of zeste 12), Esc (Extra sec combs), Jarid2 (jumonji, AT rich interactive domain 2) και p55 που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *EZH1/2*, *SUZ12*, *EED*, *JARID2* και *RBAP46/48*, αντίστοιχα. Το παραπάνω σύμπλοκο καταλύει την τριπλή μεθυλίωση της λυσίνης στη θέση 27 της ιστόνης 3 (H3K27me3) μέσω της δράσης της E(z) υπομονάδας, ενώ η υπομονάδα Su(z)12 ενισχύει την δράση της E(z). Αποτέλεσμα αυτής της τροποποίησης είναι η καταστολή της διαδικασίας της μεταγραφής μέσω πρόσδεσης της υπομονάδας Esc του PRC2 στην τριολά μεθυλιωμένη ιστόνη.<sup>31</sup>

Μεταλλάξεις του γονιδίου *EZH2* έχουν ως αποτέλεσμα την πλήρη απώλεια της λειτουργικότητας της υπομονάδας E(z) του συμπλόκου PRC2, που όπως προαναφέρθηκε, καταλύει την τριπλή μεθυλίωση της λυσίνης στη θέση 27.<sup>32</sup>

#### **1.1.5.2.2 Συρραφή του RNA- Γονίδια που συμμετέχουν στον μηχανισμό συρραφής**

Ως συρραφή (splicing), ή ωρίμανση του πρόδρομου mRNA (pre-mRNA), ορίζουμε την αποκοπή των εσωνίων του πρόδρομου μορίου mRNA και στην συνέχεια την συρραφή των εξωνίων αυτού, που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ώριμου μορίου mRNA. Σε ανώτερους ευκαριωτικούς οργανισμούς η παραπάνω διαδικασία μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό πολλών διαφορετικών μορίων mRNA, καθώς υπάρχει η δυνατότητα εναλλακτικής συρραφής ενός πρόδρομου mRNA, με αποτέλεσμα την παραγωγή διαφόρων ισόμορφων πρωτεϊνών ενός γονιδίου.<sup>33</sup>

Η ωρίμανση του pre-mRNA πραγματοποιείται από το σωματίο συρραφής (spliceosome), το οποίο αποτελεί ένα μεγαλομοριακό ριβονουκλεοπρωτεϊνικό (RNP) σύμπλοκο που περιλαμβάνει συμπλέγματα μικρών πυρηνικών RNA (small nuclear RNA, snRNA) και πρωτεϊνών (ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια-snRNP), αλλά και άλλων πρωτεϊνών, όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 6. Τα επιμέρους στοιχεία που προαναφέρθηκαν συνδέονται στα σημεία συνένωσης εξωνίων και εσωνίων προκειμένου να σχηματιστεί το σωματίο ματίσματος.<sup>34</sup>

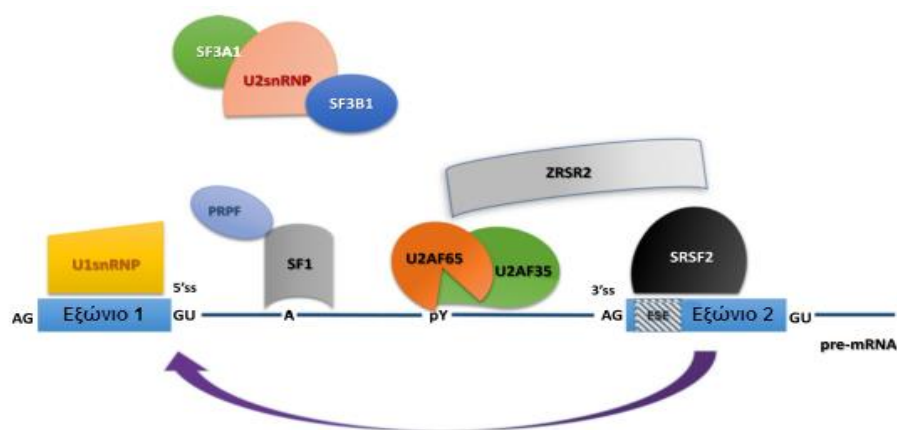
Τα δύο κύρια είδη σωματίων συρραφής που εντοπίζονται στα ευκαριωτικά κύτταρα είναι τα εξής:

1. Το U2-εξαρτώμενο σωματίο, το οποίο καταλύει την απομάκρυνση των εσωνίων τύπου U2 (απομακρύνει σχεδόν το 99% των εσωνίων) και απαρτίζεται από τα snRNPs U1, U2, U5, και U4/U6 αλλά και από πολυάριθμες non-snRNP πρωτεΐνες.

2. Το U12-εξαρτώμενο σωματίο, καταλύει την απομάκρυνση των λιγότερο συχνών εσώνίων τύπου U12 (απομακρύνει το υπόλοιπο 1% των εσώνίων) και απαρτίζεται από τα snRNPs U11, U12, U5, και U4atac/U6atac.<sup>35 34</sup>

Στη διαδικασία της συρραφής συμμετέχουν trans και cis στοιχεία του πρώιμου mRNA, όπως η 3' θέση ματίσματος που φέρει το εσώνιο και αποτελείται από μια χαρακτηριστική αλληλουχία AG και η 5' θέση ματίσματος που φέρει αλληλουχία GU και που και οι δύο εντοπίζονται στα σημεία ένωσης με τα γειτονικά εξώνια.

.Το σωματίο συρραφής συναρμολογείται στο pre-mRNA μέσω επαναλαμβανόμενων προσδέσεων snRNPs και η διαδικασία ξεκινά με την αναγνώριση της 5' θέσης μέσω του U1 snRNP και της 3' θέσης μέσω του παράγοντα U2AF<sup>35</sup> (U2-auxiliary factor 1) που αποτελεί μέρος του ετεροδιμερούς βοηθητικού παράγοντα U2AF. Στην συνέχεια πραγματοποιείται πρόσδεση του παράγοντα συρραφής 1 (splicing factor 1-SF1) στο σημείο διακλάδωσης του pre-mRNA με τη βοήθεια του SF3B1 και προστατεύει το εσώνιο πριν από την έναρξη της ωρίμανσης λειτουργώντας σαν ένα είδος γέφυρας μεταξύ των θέσεων 3' και 5'. Κατόπιν, πραγματοποιείται πρόσδεση στην πολυπυριμιδική αλληλουχία του συμπλόκου που έχει σχηματιστεί από τους εξής παράγοντες: το U2AF, την πρωτεΐνη Zinc finger RNA binding motif and serine/arginine rich 2 (ZRSR2) και έναν παράγοντα συρραφής πλούσιο σε κατάλοιπα σερίνης/αργινίνης (serine/arginine rich splicing factors) SRSF1 ή SRSF2.<sup>32</sup>



**Εικόνα 5.** Οργάνωση σωματίου ματίσματος. Τροποποίηση από Zoi K., 2014.

Η αφαίρεση των εσώνίων από το pre-mRNA πραγματοποιείται από δυο αντιδράσεις τρανσ-εστεροποίησης μέσω του σωματίου συρραφής. Πιο συγκεκριμένα, ο σωματίο σχηματίζει τα σύμπλοκα E, A, B και C πάνω στο pre-mRNA, όμως μόνο το σύμπλοκο C καταλύει τις δυο αντιδράσεις.

Μεταλλάξεις στα γονίδια που εμπλέκονται στο μηχανισμό της ωρίμανσης του mRNA ανιχνεύονται στα 2/3 των ασθενών με ΜΔΣ.<sup>36,37</sup>

#### 1.1.5.2.2.1 Το γονίδιο *SF3B1*

Το γονίδιο *SF3B1* εντοπίζεται στο γενετικό τόπο 2q33 και κωδικοποιεί την υπομονάδα 1 του παράγοντα ματίσματος. Σχηματίζει snRNP U2 του σωματίου ματίσματος μαζί με τον παράγοντα ματίσματος 3α και ένα 12S RNA, το οποίο προσδένεται στο pre-mRNA.<sup>38</sup>

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *SF3B1* εμφανίζονται σε ασθενείς με ΜΔΣ σε ποσοστό 20%,<sup>39</sup>. Ωστόσο, σε ασθενείς με ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RARS) το ποσοστό των μεταλλάξεων το 65%-80%,<sup>39</sup> γεγονός που μας οδηγεί στο να θεωρούμε τα *SF3B1*-RARS θετικά ως ξεχωριστή κλινική οντότητα λόγω των υψηλών αυτών ποσοστών.<sup>40</sup>

Οι μεταλλάξεις αυτές κατά κύριο λόγο αποτελούν παρανοηματικές σημειακές μεταλλάξεις (missense mutations) και εντοπίζονται κυρίως στο συντηρημένο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης.<sup>41</sup> Ωστόσο, δεν έχουν καταγραφεί μεταλλάξεις πρόωρης λήξης (nonsense) και μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift), πρόωρης λήξης (nonsense). Επίσης, δεν εμφανίζονται σε σημαντικά για την λειτουργία της πρωτεΐνης και *in silico* έχει καταγραφεί ότι φέρουν λιγότερες επιπτώσεις συγκριτικά με άλλες τυχαίες μεταλλαγές. Όλα τα παραπάνω μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι διατηρείται η δομική ακεραιότητα της πρωτεΐνης.<sup>39</sup>

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού επηρεάζουν το μηχανισμό του ματίσματος και της μεταγραφής, καθώς το μάτισμα του pre-mRNA πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την μεταγραφή. Θεωρείται ότι αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη έκφραση (down-regulation) σημαντικών γονιδίων.<sup>38</sup>

Έχει παρατηρηθεί ότι ασθενείς με *SF3B1* έχουν λιγότερες πιθανότητες να εμφανίσουν κυτταρογενετικές ανωμαλίες ενώ παράλληλα μειώνονται οι πιθανότητες εμφάνισης άλλων μεταλλαγών που σχετίζονται με αρνητική πρόγνωση. Οι μεταλλαγές στο *DNMT3A* είναι οι μοναδικές που συνυπάρχουν με εκείνες του *SF3B1* σε μεγάλο βαθμό, κάτι που υποδηλώνει αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών. Οι μεταλλαγές στο *SF3B1* θα μπορούσαν να αποτελούν ξεχωριστή κατηγορία, βάσει των κλινικών τους χαρακτηριστικών.<sup>15,42</sup>

#### 1.1.5.2.2.2 Το γονίδιο *U2AF1*

Το γονίδιο *U2AF1* εντοπίζεται στο γενετικό τόπο 21q22 και κωδικοποιεί την μικρή υπομονάδα του U2AF (U2 auxiliary factor), μεγέθους 35kD γνωστή ως U2AF1 ή U2AF<sup>35</sup>. Το U2AF<sup>35</sup> σχηματίζει το ετεροδιμερές U2AF μαζί με την μεγάλη υπομονάδα U2AF<sup>65</sup>. Το ετεροδιμερές αυτό συμβάλλει τόσο στην οργάνωση του σωματίου ματίσματος όσο και στην ίδια τη διαδικασία του ματίσματος καθώς αναγνωρίζει σημαντικά cis στοιχεία του ματίσματος.<sup>43</sup>

Μεταλλάξεις στο γονίδιο *U2AF1* έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ΜΔΣ σε ποσοστό περίπου 12%<sup>1</sup> και οι μεταλλάξεις αυτές συσχετίζονται με κακή πρόγνωση και πιθανότητα εκτροπής της νόσου σε ΟΜΛ.<sup>36 44</sup>

Μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού εντοπίζονται σε δυο περιοχές με δομή δακτύλου ψευδαργύρου (Zinc fingers) σημαντικές για την πρόσδεση του στην 3' ss και πιο συγκεκριμένα προκύπτουν αλλαγές στο συντηρημένο κατάλοιπο σερίνης στην θέση 34 της πρωτεΐνης (S34) στο πρώτο δάκτυλο ψευδαργύρου και στα κατάλοιπα R156, Q157 του δεύτερου δακτύλου.<sup>44</sup>

Οι μεταλλαγές αυτές σχετίζονται με τον καρκίνο, εμφανίζονται κυρίως σε ετεροζυγωτία και δεν συνυπάρχουν με άλλες μεταλλάξεις γονιδίων που σχετίζονται με το μάτισμα, καθώς ο συνδυασμός τους φαίνεται να οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο.<sup>45</sup>

#### 1.1.5.2.2.3 Το γονίδιο *SRSF2*

Το γονίδιο *SRSF2* εντοπίζεται στο γενετικό τόπο 17q25 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της οικογένειας των πρωτεϊνών SR (serine/arginine rich) που μέσω της πρόσδεσης τους σε ρυθμιστικές περιοχές ματίσματος του RNA οδηγούν στην αναγνώριση των εξωνίων από το σωματίο ματίσματος. Η πρωτεΐνη *SRSF2* ενισχύει αναγνώριση της 3' περιοχής ματίσματος από την υπομονάδα *U2AF1* και βοηθά στην πρόσδεσή της στο δινουκλεοτίδιο AG, καθώς συνδέεται στις αλληλουχίες ESE (exonic splicing enhancers).

Μεταλλάξεις του γονιδίου *SRSF2* αποτελούν τις δεύτερες πιο συχνές μοριακές βλάβες σε ασθενείς με ΜΔΣ και εντοπίζονται σε πληθώρα κατηγοριών, όπως ΧΜΜΛ, ΟΜΛ, RARS κ.α. Ως επί τω πλείστον εμφανίζονται σε ετεροζυγωτία και αποτελούν παρανοηματικές μεταλλάξεις, του αμινοξέως προλίνης, στην θέση 95 της πρωτεΐνης, γεγονός που οδηγεί σε συσσώρευση βλαβών στο DNA και αποδιοργάνωση του.<sup>23</sup>

Τέλος, η συνύπαρξη των μεταλλαγών του *SRSF2* με άλλες αρκετών γονιδίων (*TET2*, *ASXL1*, *CUX1*, *IDH2* και *STAG2*) αποτελεί σύνηθες φαινόμενο σε ασθενείς με ΜΔΣ και συσχετίζεται με κακή πρόγνωση.<sup>15</sup>

## 1.2 Μεθυλίωση

Η μεθυλίωση του DNA είναι ένας επιγενετικός ρυθμιστικός μηχανισμός απαραίτητος για την κυτταρική διαφοροποίηση και για τη διατήρηση της γονιδιακής έκφρασης εξειδικευμένων κυτταρικών πληθυσμών οι οποίοι διαθέτουν το δικό τους χαρακτηριστικό προφίλ μεθυλίωσης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, σε καλά καθορισμένα ώριμα κύτταρα, τα επίπεδα μεθυλίωσης παραμένουν σταθερά. Σημαντικές αλλαγές στο πρότυπο της μεθυλίωσης παρατηρούνται κατά τη κυτταρική ωρίμανση και διαφοροποίηση.<sup>46</sup>

Κατά την αιμοποίηση, η μεθυλίωση του γονιδιώματος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων, αλλά και στον καθορισμό των ποικίλων διαφορετικών τύπων κυττάρων που απαρτίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα.<sup>47</sup>

Επιπλέον, ένας βασικός ρόλος της μεθυλίωσης είναι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, όπως είναι η περίπτωση της απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X, προκειμένου να επιτευχθεί αποσιώπηση των μεταθετών ρετροϊικών στοιχείων, που σταδιακά έχουν εδραιωθεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα καθώς και για άλλες διεργασίες.<sup>48</sup>

Κατά την ρύθμιση των επιπέδων μεθυλίωσης του DNA πραγματοποιείται μια πολύπλοκη βιολογική διεργασία, στην οποία εμπλέκεται πληθώρα γονιδίων, που συχνά όπως προαναφέρθηκε εμφανίζουν μεταλλάξεις σε ασθενείς με ΜΔΣ, σε άλλες μυελικές νεοπλασίες, ή και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις. Τα γονίδια αυτά εμπλέκονται στις επιγενετικές ρυθμίσεις των ιστονών, με σκοπό την εναλλαγή μεταξύ ευχρωματινής και ετεροχρωματινής, γονίδια που συμμετέχουν στη διαδικασία ωρίμανσης του mRNA και σε άλλες σημαντικές διεργασίες του κυττάρου.<sup>1</sup>

Ενδεικτικά, το επιγενετικό σημάδι της μεθυλίωσης του γονιδιώματος εισάγεται από εξειδικευμένες πρωτεΐνες γνωστές ως μεθυλοτρανσφεράσες (DNA methyltransferases, DNMTs) και συμβάλει στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και στη χρωμοσωμική σταθερότητα.<sup>18</sup>

Διάφορες περιβαλλοντικές (π.χ. διατροφή, το κάπνισμα ή η φλεγμονή, διαδικασία φυσικής γήρανσης) και φυσιοπαθολογικές πιέσεις μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA.<sup>47</sup>

Η απορρύθμιση της μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης του DNA οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις, είτε μέσω αποσιώπησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων, είτε μέσω ενισχυμένης έκφρασης ογκογονιδίων. Συμπερασματικά, η εξέλιξη του όγκου μπορεί να έχει αιτιώδη σχέση με το προφίλ μεθυλίωσης.

Ένας μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων έχουν αποκαλύψει τη θεμελιώδη σύνδεση μεταξύ της επιγενετικής απορρύθμισης και της ανθρώπινης ασθένειας. Ως εκ τούτου, η μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδιώματος αποκτά επαυξημένη σημασία

ως βιοδείκτης, ενώ παράλληλα η διατήρηση ή επαναφορά των φυσιολογικών επιπέδων μεθυλίωσης μπορεί να αποτελέσει πιθανό θεραπευτικό πεδίο.<sup>47</sup>

Ήδη, υπάρχουν υπομεθυλιωτικοί παράγοντες, που συμβάλουν σε αναστολή της δράσης των DNMTs. Ως αποτέλεσμα, αναστρέφεται η αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

### 1.2.1 Διαγονιδιακές περιοχές

Περίπου το 45% του γονιδιώματος των θηλαστικών αποτελείται από μεταθετά στοιχεία ιικής ή άλλης προέλευσης. Στην πλειονότητά τους, τα στοιχεία αυτά απενεργοποιούνται μέσω DNA μεθυλίωσης, ή μέσω απόκτησης μεταλλάξεων, ως αποτέλεσμα της απαμίνωσης των 5mC. Σε περίπτωση που τα στοιχεία αυτά αντιγραφούν και εισηχθούν σε άλλες γενομικές θέσεις, μπορεί να επηρεάσουν τη γονιδιακή έκφραση.<sup>48</sup>

#### 1.2.1.1. LINE 1

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία μεγάλου (LINEs) και μικρού μήκους (SINEs), συνεισφέρουν σε μεγάλο βαθμό στη δυναμική, την πλαστικότητα και την ακεραιότητα του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Τα LINEs είναι τα μοναδικά εν ενεργεία, αυτόνομα, κινητά στοιχεία του ανθρώπινου γονιδιώματος. Υπολογίζεται πως υπάρχουν τουλάχιστον 100 αντίγραφα σε κάθε διπλοειδές γονιδίωμα. Με την πάροδο του χρόνου τα στοιχεία αυτά έχουν εξαπλωθεί σε όλη την έκταση του γονιδιώματος, μάλιστα πλέον εντοπίζονται περίπου 500.000 αντίγραφα ανά διπλοειδές γονιδίωμα καταλαμβάνοντας περίπου το 17% σε συνολική έκταση.

Στα SINEs ανήκουν τα στοιχεία Alu, με περίπου ένα εκατομμύριο αντίγραφα στο γονιδίωμα. Σε αυτά απουσιάζει η κωδική αλληλουχία ενώ παράλληλα στηρίζονται στην ενεργοποίηση των LINE-1 για να μετακινηθούν στο γονιδίωμα. Τα στοιχεία LINE-1 μετατίθενται μέσω μηχανισμού “αντιγραφής-επικόλλησης” όπου εμπλέκεται μια DNA ενδονουκλεάση. Τα ενεργά στοιχεία LINE-1 και Alu θεωρείται ότι συμβάλλουν σε ένα σημαντικό ποσοστό γενετικών παθήσεων και στην εμφάνιση και εξέλιξη του καρκίνου, μέσω καταστολής της έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων.<sup>50</sup>

Η μεθυλίωση των ρετρομεταθετών στοιχείων προστατεύει τη λειτουργική ακεραιότητα του γονιδιώματος. Σε ποσοστό πάνω από 90%, οι περιοχές CpGs των

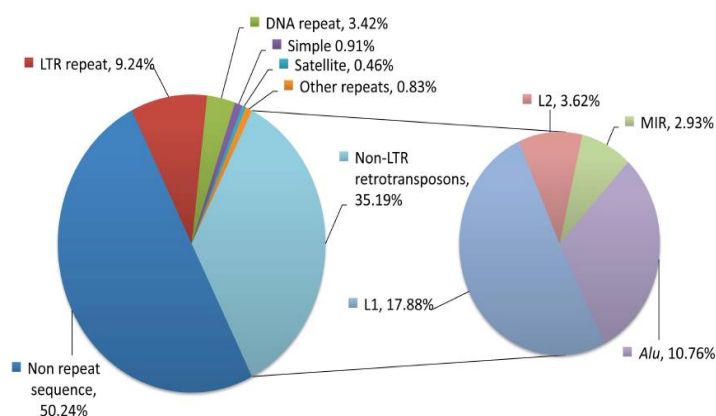
των μεταθετών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, συμπεριλαμβανόμενου των LINE-1 και Alu στοιχείων, παραμένουν μεθυλιωμένες. Η μεθυλίωση προστατεύει έναντι της μετάθεσης των LINE-1.<sup>50</sup>

### Δυνητικοί κίνδυνοι

Η ενεργοποίηση και μετάθεση των στοιχείων LINE1 στο γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων μπορεί να επηρεάσει την οργάνωση του γονιδιώματος, τοπικά ή ακόμη και καθολικά, οδηγώντας σε γενετικό ανασυνδυασμό που εκδηλώνεται υπό μορφή θραύσεων, ελλείψεων, μετατοπίσεων και ανασυνδυασμού χρωμοσωμάτων. Εναλλακτικά μπορεί να διαταράξει τις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων, οδηγώντας σε απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης ή και σε σχηματισμό νέων μεταγραφών. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, εικάζεται, πως τα στοιχεία LINE1 που διατηρούν τη δομική τους ακεραιότητα και κατά συνέπεια μπορούν να επιφέρουν αρνητική επίδραση, είναι λιγότερα από 100.<sup>51</sup>

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην μετατόπιση των στοιχείων LINE1 έχουν μελετηθεί εκτενώς. Τα δομικά άκερεια στοιχεία LINE1 διαθέτουν δύο ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης. Το ORF1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη P40 που δεσμεύει μόρια RNA τα οποία λειτουργούν ως μοριακοί συνοδοί (chaperones) των LINE1. Το ORF2 κωδικοποιεί μία ενδονουκλεάση και μία αντίστροφη μεταγραφάση.<sup>51</sup> Η ενδονουκλεάση, επάγει μονόκλιωνα θραύσματα στις AT-πλούσιες περιοχές του γονιδιώματος. Εν συνεχεία, η RNA poly-A αλληλουχία δημιουργεί ζεύγος με oligo-dT αλληλουχίες μέσα στο DNA στόχο, που έχει ως αποτέλεσμα την εκκίνηση της αντίστροφης μεταγραφής από το ORF2 του LINE1.<sup>51</sup>

Στην πλειονότητα των ασθενών με καρκίνο, έχουν αναφερθεί μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης των αλληλουχιών LINE1, στα πλαίσια γενικευμένης αλλαγής στο πρότυπο της μεθυλίωσης του γονιδιώματος που συνοδεύουν την καρκινογένεση σε πολλούς ανθρώπινους ιστούς. Αυτά πραγματοποιούνται μέσω ενός επιγενετικού μηχανισμού που συμβάλλει στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου.



**Εικόνα 6.** Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Περίπου το 50% του ανθρώπινου γονιδιώματος φέρει ομολογία με γνωστές κατηγορίες επαναλήψεων (αριστερό γράφημα). Η μεγαλύτερη τάξη



επαναλήψεων είναι τα non-LTR ρετροτρανσποζόνια, στα οποία συγκαταλέγονται τα LINEs (L1, L2, MIRs και Alu (δεξιό διάγραμμα)). Οι αλληλουχίες ως επί των πλείστον είναι ανενεργές, όμως συγκεκριμένες υποκατηγορίες L1 (17,88%), Alu (10,76%) και SVA (που δεν φαίνονται, 0,1%) παρουσιάζουν κινητικότητα στο ανθρώπινο γονιδίωμα και αποτελούν πηγές γενετικών πολυμορφισμών. Τα LTR ρετροτρανσποζόνια θεωρούνται τερματικές επαναλήψεις μεγάλου μήκους. Τα SVA, ένα σύνθετα ρετροτρανσποζόνια που αποτελείται από μικρές επαναλαμβανόμενες επαναλήψεις (SINE-R), Alu, ένα διάσπαρτο στοιχείο μικρού μήκους που ονομάζεται ένζυμο περιορισμού AluI, μεταβλητή αλληλουχία διαδοχικών επαναλήψεων (VNTR) και τμήματα ακολουθίας τύπου Alu.<sup>50</sup>

### 1.2.1.2. Νησίδες CpG

Οι νησίδες CpG είναι τμήματα του γονιδιώματος που απαρτίζονται από περίπου 1000 ζεύγη βάσεων, τα οποία εμφανίζουν αυξημένο ποσοστό διουκλεοσιδίων κυτοσίνης-γουανίνης, συγκριτικά με το υπόλοιπο γονιδίωμα και τα οποία σπάνια είναι μεθυλιωμένα. Η πλειοψηφία των υποκινητών των γονιδίων, σε ποσοστό σχεδόν 70%, εντοπίζεται σε νησίδες CpG.<sup>48</sup>

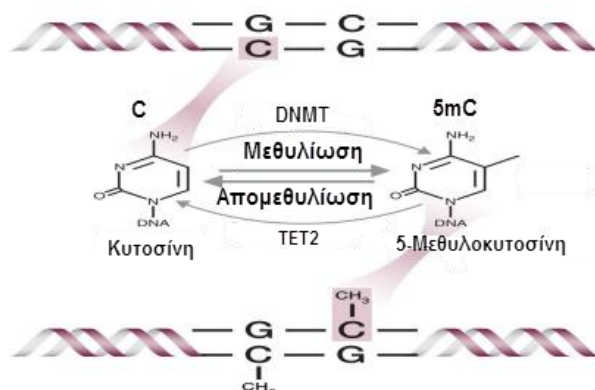
Οι νησίδες CpG είναι υψηλά συντηρημένες θέσεις. Κατά την εξελικτική διαδικασία, το γονιδίωμα των θηλαστικών έχει απωλέσει την πλειονότητα των νησίδων CpG. Ως αποτέλεσμα, περίπου τα μισά γονίδια φέρουν νησίδες CpG στους υποκινητές τους, οι οποίες πλέον αποτελούν περίπου το 1% του ανθρώπινου γονιδιώματος.<sup>48, 52</sup>

Οι περισσότερες νησίδες CpG στους υποκινητές είναι μη-μεθυλιωμένες, υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ωστόσο, σε γενομικές περιοχές που παραμένουν αποσιωπημένες, όπως το ανενεργό X-χρωμόσωμα στις γυναίκες, οι νησίδες CpG που σχετίζονται/ εντοπίζονται στον υποκινητή, είναι μεθυλιωμένες σε υψηλό ποσοστό, με στόχο τη διατήρηση ανενεργής γονιδιακής έκφρασης. Οι υπόλοιπες θέσεις CpG, οι οποίες δεν εντοπίζονται σε υποκινητές γονιδίων, παραμένουν μεθυλιωμένες σε φυσιολογικά επίπεδα, στα ώριμα κύτταρα.<sup>52</sup>

Φαίνεται ότι οι νησίδες CpG έχουν διατηρηθεί εξελικτικά για να προάγουν την γονιδιακή έκφραση ρυθμίζοντας τη δομή της χρωματίνης και τη δέσμευση του παράγοντα μεταγραφής. Γνωρίζουμε ότι, το DNA τυλίγεται γύρω από ιστόνες σχηματίζοντας νουκλεοσώματα. Το νουκλεόσωμα εντοπίζεται σε δύο μορφές, μία αρκετά συσπειρωμένη (ετεροχρωματίνη) και μία ελεύθερη δομή (ευχρωματίνη), μάλιστα η τελευταία προάγει τη γονιδιακή έκφραση.

Οι νησίδες CpG γενικότερα περιέχουν λιγότερα νουκλεοσώματα, σε σχέση με άλλες γενομικές περιοχές. Τα νουκλεοσώματα περιέχουν τροποποιημένες ιστόνες που ενισχύουν τη γονιδιακή έκφραση. Παρόλο που περίπου το 50% των νησίδων CpG περιέχουν γνωστές θέσεις έναρξης της μεταγραφής, συχνά στερούνται κοινών υποκινητών, όπως τα στοιχεία TATA. Καθώς πολλές θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα είναι πλούσιες σε GC, οι νησίδες CpG είναι πιθανό να ενισχύσουν τη πρόσδεση σε θέσεις μεταγραφής. Παρά την έλλειψη κοινών

υποκινητών, οι περιοχές CpG ενισχύουν την προσβασιμότητα του DNA και προάγουν τη δέσμευση μεταγραφικών παραγόντων.<sup>48</sup>



**Εικόνα 7.** Μεθυλίωση CpG δινουκλεοτιδίων. Τροποποίηση από DNA Methylation: Fingerprints of the (epi)genome by May O.

Η μεθυλίωση των νησίδων CpG οδηγεί σε σταθερή αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης. Κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης και της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης, οι νησίδες CpG υποβάλλονται σε διαφοροποιημένη μεθυλίωση. Η ικανότητα της μεθυλίωσης να ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση μέσω των νησίδων CpG είναι ιδιαίτερα σημαντική για την διατήρηση ένος σταθερού μεταγραφικού προφίλ. Πέρα από τα παραπάνω γονίδια, η μεθυλίωση των νησίδων CpG ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση στα στάδια της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης. Καθώς οι νησίδες CpG συνδέονται με τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, θα αναμενόταν ότι θα μπορούσαν να εμφανίσουν διαφορετικό προφίλ ανά ιστό. Παρόλο που σε πολλές περιοχές πράγματι υπάρχει συγκεκριμένο ιστολογικό προφίλ, οι νησίδες που συνδέονται με τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής, σπάνια εμφανίζουν κάποιο πρότυπο μεθυλίωσης, ειδικά ανά ιστό.<sup>48</sup>

Μέχρι και σήμερα δεν έχουμε κατανοήσει πλήρως τον ρόλο των νησίδων CpG στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Γενικότερα η μεθυλίωση των νησίδων μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων, στη προσέλκυση κατασταλτικών πρωτεϊνών που δεσμεύουν μεθυλομάδες και σε σταθερή καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Αξίζει να αναφερθεί ότι δεν γνωρίζουμε ακόμα με ακρίβεια το απαιτούμενο ποσοστό της μεθυλίωσης των CpG νησίδων που επηρεάζει την γονιδιακή έκφραση.<sup>48</sup>

Είναι ευρέως γνωστό ότι αν και οι περισσότερες θέσεις CpG έχουν χαθεί από τα γονιδιώματα των θηλαστικών κατά το πρίσμα της εξέλιξης. Επίσης, νησίδες CpG αποτελούν το 1% του ανθρώπινου γονιδιώματος και περίπου το ήμισυ των γονιδίων φέρουν νησίδες CpG στη θέση του υποκινητή τους. Οι περισσότερες από τις υπολειπόμενες θέσεις CpG είναι φυσιολογικά μεθυλιωμένες στα ενήλικα κύτταρα. Οι περισσότερες νησίδες CpG στους υποκινητές είναι φυσιολογικά μη

μεθυλιωμένες, ανεξάρτητα από την κατάσταση έκφρασης του κάθε γονιδίου. Ωστόσο, σε περιοχές που δεν εκφράζονται, όπως το ανενεργό X-χρωμόσωμα στις γυναίκες, οι CpG νησίδες που σχετίζονται/ εντοπίζονται στον υποκινητή, είναι μεθυλιωμένες και αυτό στοχεύει στο να διατηρηθεί η ανενεργή κατάσταση του γονιδίου. Η μεθυλίωση προκαλεί τη σύνδεση συγκεκριμένων πρωτεϊνών πρόσδεσης, ειδικές για μεθυλιωμένο DNA σε θέσεις CpG, προσελκύοντας ένζυμα τροποποίησης ιστονών τα οποία, τα οποία με τη σειρά τους εδρεώνουν την ανενεργή μορφή της χρωματίνης.<sup>52</sup>

Στο παρελθόν έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί που συσχετίζονται με την καρκινογένεση και αφορούν ένα μη φυσιολογικό de novo πρότυπο μεθυλίωσης, με βάση το πρότυπο συμπεριφοράς συγκεκριμένων CpG νησίδων. Ένας πιθανός μηχανισμός είναι η μεμονωμένη και τυχαία μεθυλίωση που προκύπτει κατά το progressive proliferation. Ένας δεύτερος μηχανισμός είναι η στοχευμένη στρατολόγηση των DNA μεθυλοτρανσφερασών σε θέσεις- στόχους τη μεθυλίωσης βάσει ενός cis-acting παράγοντες και των μεθυλοτρανσφερασών ιστόνης ( π.χ. G9a ). Ο τρίτος πιθανός μηχανισμός περιλαμβάνει την απώλεια των μονωτών ή των ιστικών παραγόντων TF, ή οποία οδηγεί σε εξάπλωση της μεθυλίωσης του DNA σε CpG νησίδες που έχουν προσβληθεί. Υπάρχουν ενδείξεις που υποδεικνύουν ότι η υπομεθυλιωμένη κατάσταση του χρωμοσωμικού DNA σταθεροποιείται μέσω των DNA – binding πρωτεϊνών. Μελέτες υποστηρίζουν ότι οι CpG νησίδες που παραμένουν υπομεθυλιωμένες τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε καρκινικά κύτταρα περιέχουν συγκεκριμένο μοτίβο αλληλουχιών που είναι πανομοιότυπα στις ομόλογες αλληλουχίες των TF. Περιοχές στις οποίες οι παραπάνω παράγοντες προσδέονται ισχυρά σε φυσιολογικά κύτταρα παρουσιάζουν υψηλή αντίσταση στην de novo μεθυλίωση. Επιπλέον γονίδια που στις νησίδες CpG βρίσκονται προσδεμένοι παράγοντες TF, κατά κανόνα εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα mRNA σε σχέση με τα φυσιολογικά.<sup>53</sup>

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί κορμό για την ανώμαλη επιγενετική του καρκίνου. Όπως περιγράφεται σε πρόσφατες έρευνες, τα καρκινικά κύτταρα έχουν συχνά απώλεια γενικής μεθυλίωσης, αλλά και κέρδος μεθυλίωσης στους υποκινητές επιλεγμένων CpG νησίδων, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αποσιώπηση εκατοντάδων γονιδίων ανά καρκινικό κύτταρο, συμπεριλαμβανομένων και των ογκοκαταστολέων. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η μεθυλίωση του DNA αποτελεί χρήσιμο δείκτη του κινδύνου της νόσου, της δραστηριότητας/ εξέλιξης και της πρόγνωσης. Υπάρχει μια μικρή αύξηση στη δραστικότητα της DNA-μεθυλοτρανσφεράσης στον καρκίνο και μελέτες ανοσοϊστοχημείας επιβεβαίωσαν την υπερέκφραση της DNA (κυτοσίνη-5) -μεθυλοτρανσφεράσης 1 (DNMT1) σε πρώιμα καρκινικά κύτταρα, αν και παρουσιάζεται ετερογένεια. Αποτελεί ακόμα ερώτημα αν η ανώμαλη μεθυλίωση του DNA είναι μια σπάνια τυχαία διαδικασία που είναι επιλεκτική για τα νεοπλαστικά κύτταρα ή προκύπτει από συγκεκριμένα

σφάλματα κατά τη διαδικασία της μεθυλίωσης. Η ανακάλυψη πολλαπλών μεταλλαγμένων φαινότυπων στον καρκίνο, που είναι αποτέλεσμα των σφαλμάτων στην επιδιόρθωση του DNA, αλλά οι επιγενετικές μεταβολές που (και πιο συγκεκριμένα η μεθυλίωση του DNA) είναι ένα ζήτημα που είναι αμφιλεγόμενο. Τα γεγονότα που εξελίσσονται κατά τη διαδικασία της μεθυλίωσης των νησιδίων CpG στον καρκίνο περιγράφηκαν για πρώτη φορά σχεδόν πριν από δύο δεκαετίες, αλλά οι περισσότερες από τις πρώτες μελέτες επικεντρώθηκαν στην εξέταση απομονωμένων γονιδίων. Πριν από μερικά χρόνια, καθώς εντοπίστηκαν όλο και περισσότερα γονίδια που επηρεάστηκαν από τη διαδικασία, προέκυψαν στοιχεία που δείχνουν ότι σε μερικούς όγκους, ομάδες γονιδίων είχαν αυξησει σταθερά τη μεθυλίωση. Επομένως, η κυρίαρχη «αιτία» της μεθυλίωσης στον καρκίνο είναι στην πραγματικότητα η μεθυλίωση σε φυσιολογικούς ιστούς που προκύπτει ως συνάρτηση της ηλικίας. Ωστόσο, όταν η σχετιζόμενη με την ηλικία μεθυλίωση βγήκε από το προσκήνιο, κατέστη προφανές ότι η μεθυλίωση τείνει να περιορίζεται στους νεοπλαστικούς ιστούς, και έτσι συγκεντρώθηκε ένα συγκεκριμένο υποσύνολο περιπτώσεων. Σύμφωνα με πρόσφατες ανακαλύψεις στο συγκεκριμένο επιστημονικό πεδίο και με πολλούς ερευνητές να το υποστηρίζουν, προκύπτει ότι η μεθυλίωση του DNA προκύπτει από τον νεοπλασματικό μετασχηματισμό. Πράγματι, είναι πολύ πιθανό ότι η μεθυλίωση του DNA είναι ένα υποπροϊόν της νεοπλασματικής διαδικασίας, και ίσως μια επέκταση της διαδικασίας της μεθυλίωσης που σχετίζεται με την ηλικία.<sup>52</sup>

## **2. Σκοπός**

Δεδομένα υποδεικνύουν ότι ένας από τους δυνητικούς υποκείμενους παθογενετικούς μηχανισμούς που χαρακτηρίζει τα ΜΔΣ είναι η διαταραχή του επιγενετικού μηχανισμού ρύθμισης του κυττάρου. Κατά κύριο λόγο, οι ασθενείς με ΜΔΣ εμφανίζουν καθολική υπομεθυλίωση του γονιδιώματος τους, παρόλο που συγκεκριμένες περιοχές, όπως οι νησίδες CpG (περιοχές που είναι πλούσιες σε δινουκλεοτίδια CG) που εντοπίζονται σε ή κοντά σε υποκινητές γονιδίων, μπορεί να εμφανίζονται υπερμεθυλωμένες.

Παρόλο που υπάρχουν φαρμακευτικές αγωγές που ακολουθούν οι ασθενείς με ΜΔΣ (κυρίως με υπομεθυλιωτικούς παράγοντες), καμία από αυτές δεν είναι θεραπευτική και η όποια απόκριση δεν μπορεί να προβλεφθεί. Επιπλέον, λόγω της υψηλής ετερογένειας που χαρακτηρίζουν τα ΜΔΣ, υπάρχουν προβλήματα σχετικά με την πρόγνωση της νόσου. Είναι προφανές ότι, η ανεύρεση κατάλληλων βιοδεικτών, που θα στοχεύουν τόσο στην βέλτιστη δυνατή πρόγνωση, όσο και στην πρόβλεψη απόκρισης σε θεραπείες, είναι υψίστης σημασίας.

Δεδομένου ότι ο μηχανισμός της μεθυλίωσης του DNA είναι ένας βασικός μηχανισμός που αλλοιώνεται κατά την εμφάνιση της νόσου, αλλά και αποτελεί βασικό στόχο των φαρμάκων (αζακιτιδίνη και δεσιταβίνη) που χορηγούνται στους ασθενείς με ΜΔΣ, πιθανό να ήταν ωφέλιμη η μελέτη των επιπέδων της μεθυλίωσης κατά την εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου με στόχο την ανάδειξη πιθανών προτύπων προγνωστικής αξίας.

Σκοπός της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας είναι η μοριακή διερεύνηση των επιπέδων της καθολικής μεθυλίωσης του γονιδιώματος, μέσω προσδιορισμού των επιπέδων μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων που εντοπίζονται διάσπαρτα στο γονιδίωμα, με την τεχνική της HRM Real-time PCR ανάλυσης σε ασθενείς με ΜΔΣ.

## 3. Υλικά και μέθοδοι

### 3.1 Αντιδραστήρια

Εταιρεία	Κωδικός	Αντιδραστήριο
Merck	P4417	Phosphate buffered saline (PBS) Tablets

<b>Merck</b>	T1503-1KG	Trizma base
<b>Merck</b>	B6768	Boric Acid
<b>PanReac- AppliChem</b>	A1104	EDTA disodium
<b>Panreac- Applichem</b>	A4969,0100	Ficoll® 400 Molecular Biology grade
<b>Panreac- Applichem</b>	A2331,0025	Bromophenol blue
<b>DEMO</b>	4328	Water Vial
<b>Panreac- Applichem</b>	A0889,0500	Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1
<b>Panreac- Applichem</b>	A2610,0500	Isoamyl Alcohol, for molecular biology
<b>VWR Int. GmbH</b>	20821	Ehtanol Absolute
<b>Merck</b>	10771-500ML	Histopaque-1077, aseptically filled
<b>Merck</b>	T9424-200ML	TRI-Reagent
<b>Merck</b>	C2432- 500ML	Chloroform
<b>Panreac- Applichem</b>	CR131090	Propanol-2 Molecular Biology Grade/5Lt
<b>Qiagen</b>	51206	FlexiGene blood genomic DNA isolation kit
<b>Qiagen</b>	28706	Qiaquick gel extraction
<b>Macherey-Nagel</b>	744970.5	NucleoMag NGS Clean-up and Size Select (150-800 bp)
<b>Biotium</b>	31006-T	AccuBlue High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit (0,2-100 ng)
<b>Agilent Tech.</b>	5067-4626	Agilent High Sensitivity Kit
<b>Merck</b>	72068-100ML	Sodium hydroxide solution (BioUltra, Mol. Biol., 10 M in H <sub>2</sub> O)
<b>Thermo-Fischer</b>	EP0091	phi29 DNA Polymerase (10 U/μL)
<b>Thermo-Fischer</b>	EF0221	Pyrophosphatase, Inorganic (0.1 U/μL)
<b>Thermo-Fischer</b>	SO181	Exo-Resistant Random Primer
<b>NEB</b>	M0348L	dsDNA Fragmentase (250 Rxns)
<b>Macrogen Inc.</b>	-	Oligo synthesis (50 nmol), MOPC purified (up to 30 bases)
<b>Thermo-Fischer</b>	-	TruSeqPCR1: AATGATACGGCGACCACCGA[*]G (*=phosphorothioate)
<b>Thermo-Fischer</b>	-	TruSeqPCR2: CAAGCAGAAGACGGCATAACGA[*]G (*=phosphorothioate)
<b>Promega</b>	M6101	RQ1 RNase-Free Dnase (1u/uL)
<b>Thermo-Fischer</b>	48190-011	Random Primers (3 μg/μL in 3 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.2 mM EDTA)
<b>Thermo-Fischer</b>	28025-013	M-MLV RT (200 U/uL, 50 Rxns)
<b>Thermo-Fischer</b>	10297-018	100mM (4x25μmol) dNTP Set, PCR Grade
<b>Thermo-Fischer</b>	10777-019	RNAse Out (requires 1 mM DTT to maintain activity)



<b>Thermo-Fischer</b>	10966-026	Platinum Taq DNA Polymerase
<b>Qiagen</b>	203205	Qiagen HotStart DNA Polymerase
<b>NEB</b>	N3231S	100 bp DNA ladder (0.1 to 1.5 kb) 500µg/mL
<b>Merck</b>	A9539-500GR	Agarose Molecular Biology Reagent
<b>Mo-Bio</b>	15005-100	UltraClean® Low Melt Agarose
<b>Bioline</b>	BIO-21111	MyTaq HS DNA Polymerase
<b>Biotium</b>	31000	Evagreen Dye, 20X in water
<b>KAPA Biosystems</b>	KK4203	KAPA HRM Fast Kit/1000 reactions (20uL)
<b>Roche</b>	04909631001	LightCycler 480 HRM Master (2x)
<b>Thermo-Fischer</b>	15585-011	Ethidium Bromide (10mg/ml)
<b>Merck</b>	4311320	Formamide
<b>Thermo-Fischer</b>	4316357	3100 POP-6 TM Performance Optimized Polymer
<b>Thermo-Fischer</b>	4337450	ABIPrism BigDye Terminator v1.1
<b>Thermo-Fischer</b>	402824	Genetic Analyzer 10x Running Buffer with EDTA
<b>NEB</b>	M0226L	CpG Methyltransferase (M.SssI) 4,000 units/mL
<b>NuGen</b>	0337-32	Ovation Human Blood RNA-Seq Multiplex System
<b>NuGen</b>	-	Ovation Target Enrichment custom panel
<b>Illumina</b>	MS-102-2003	MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles) (15M reads)
<b>Promega</b>	M6101	RQ1 RNase-Free DNase
<b>NuGen</b>	0337	Ovation® Human Blood RNA-Seq Library Systems
<b>Illumina</b>	FC-402-4022	HiSeq Rapid SBS Kit v2 (50 cycles) (G reads)

**Πίνακας 2.** Χημικά αντιδραστήρια, βιολογικά αντιδραστήρια και ολοκληρωμένα συστήματα αντιδραστηρίων.

## 3.2 Αναλυτικός εργαστηριακός εξοπλισμός.

Εταιρεία	Συσκευή	Λειτουργία
<b>Roche</b>	LightCycler® 480	Real Time PCR, HRMA
<b>Bio-Rad</b>	T100 Thermal Cycler for PCR	PCR
<b>Grant</b>	Grant Sub waterbath	Υδατόλουτρο
<b>Thermo-Fischer</b>	Owl EasyCast Gel Electrophoresis	Συσκευή Ηλεκτροφόρησης
<b>Thermo-Fischer</b>	EC1000-90	Τροφοδοτικό Ηλεκτροφόρησης
<b>Thermo-Fischer</b>	Eppendorf centrifuge 5804	Φυγόκεντρος σωληναρίων τύπου Falcon
<b>Thermo-Fischer</b>	Biofuge pico Heraeus	Φυγόκεντρος σωληναρίων τύπου Eppendorf
<b>Merck</b>	Eppendorf concentrator 5301	Περιστροφική εξάτμιση διαλυμάτων υπό κενό
<b>Thermo-Fischer</b>	ABI 3100 Genetic Analyzer	Ποσοδιορισμός αλληλουχίας κατά Sanger
<b>Illumina</b>	MiSeq System	Σύστημα προσδιορισμού αλληλουχίας
<b>Illumina</b>	HiSeq2500 System	Σύστημα προσδιορισμού αλληλουχίας

<b>Agilent Genomics</b>	2100 Bioanalyzer	Ανάλυση μεγέθους νουκλεϊκών οξέων
<b>Thermo-Fischer</b>	Qubit Fluorometer	Ποσοτικός προσδιορισμός DNA
<b>Thermo-Fischer</b>	NanoDrop	Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού RNA
<b>Thermo-Fischer</b>	Biomate3 UV-Vis Spectrometer	Ποσοτικός προσδιορισμός ολικού DNA

**Πίνακας 3.** Αναλυτικός εργαστηριακός εξοπλισμός.

### 3.3 Κλινικό υλικό

Αρχικά επιλέχθηκαν, βάσει των κριτηρίων WHO 2016, 60 ασθενείς με ΜΔΣ για έλεγχο μεταλλάξεων σε γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου, όπως τα *ASXL1*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *SRSF2*, *SETBP1*, *CSF3R*.

Η μοριακή ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω τεχνικών διερεύνησης μεμονωμένων γενωμικών περιοχών, συγκεκριμένα PCR τελικού σημείου, HRMA και κατά Sanger προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων.

Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν 15 ασθενείς που πληρούσαν τα κριτήρια WHO 2016 και δεν είχαν λάβει θεραπεία και προσδιορίστηκε η κατάσταση μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 μέσω MS-HRMA και MSP, σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα.

#### Φυσιολογικά Δείγματα Αναφοράς (normal control samples)

α) Για τις αναλύσεις του προτύπου της καμπύλης τήξης, των προϊόντων της αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (post Real-Time PCR HRMA), ως δείγματα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε DNA ατόμων χωρίς αιματολογικές διαταραχές, χωρίς άλλο νόσημα ή θεραπεία και φυσιολογικό γονότυπο όσον αφορά στα υπό μελέτη γονίδια.

β) Για τον προσδιορισμό των επιπέδων μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, μέσω MS-HRMA και MPS, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα DNA από 6 και 7 υγιή άτομα, αντίστοιχα, με φυσιολογικό γονότυπο, ως αντιπαραβολή.

Σημειώνεται πως για όλους τους υγιείς δότες που μελετήθηκαν υπάρχει έγγραφη συγκατάθεση, σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι.

### Παθολογικά Δείγματα Αναφοράς (mutated control samples)

α) Ως παθολογικά δείγματα, για τη διερεύνηση και ταξινόμηση των μεταλλάξεων, μέσω HRMA, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα DNA από άτομα με αιματολογικές διαταραχές στα οποία, ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις, στους εκάστοτε υπό μελέτη γονιδιακούς στόχους.

Σημειώνεται πως για όλους τους ασθενείς που μελετήθηκαν υπάρχει έγγραφη συγκατάθεση, σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι.

### Δείγματα Αναφοράς για Μελέτες Μεθυλίωσης (methylation control samples)

α) Ο προσδιορισμός των επιπέδων μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1 πραγματοποιήθηκε μέσω παρασκευής ενός τεχνητού πλήρως μη μεθυλιωμένου (0% 5'-mC) γονιδιώματος ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε τεχνητή (*in vitro*) επέκταση μέσω PCR, ολόκληρου του γονιδιώματος (multiple displacement-whole genome amplification, WGA), με χρήση του ενζύμου phi29 DNA Polymerase (Thermo-Fischer), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τυχαίες εξαμερείς αλληλουχίες (Exo-Resistant Random Primer, Thermo-Fischer), οι οποίες ανθίστανται της 3'-5' δράσης εξονουκλεάσης του ενζύμου, ενσωματώνονται σε πολλαπλές θέσεις στο γονιδίωμα, με τον τρόπο αυτό επεκτείνεται έως και 1000 φορές. Καθώς το ένζυμο δεν έχει τη δυνατότητα να εισαγάγει μεθυλομάδες στο γονιδίωμα που συνθέτει, σχηματίζεται πλήρως μη-μεθυλιωμένου υποστρώματος (0% 5'-mC), το οποίο χρησιμοποιείται ως δείγμα αναφοράς (Hughes and Jones 2007).

β) Ο προσδιορισμός των επιπέδων μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, πραγματοποιήθηκε μέσω παρασκευής ενός τεχνητά κατασκευασμένου πλήρως μεθυλιωμένου (100% 5'-mC) γονιδίωμα ανθρώπου, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ενζυμική μεταφορά μεθυλομάδων στη θέση 5, του δακτυλίου της κυτοσίνης (5mC), όταν η τελευταία ακολουθείται από μία βάση γουανίνης (CpG), επιτελείται από το ένζυμο CpG μεθυλοτρανσφεράση (M.SssI, NEB).

Σημειώνεται πως για τα δείγματα αναφοράς, που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες της μεθυλίωσης, υπάρχει έγγραφη συγκατάθεση, σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι.

### Προέλευση Δειγμάτων Ασθενών

Οι ασθενείς που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία προέρχονται από συνεργαζόμενες Αιματολογικές Κλινικές και Τμήματα Νοσοκομείων της Αττικής και

της Περιφέρειας, συγκεκριμένα, από την Αιματολογική Κλινική της Ευρωκλινικής Αθηνών, την Αιματολογική Κλινική και το Αιματολογικό Τμήμα της Κλινικής Παθολογικής Φυσιολογίας του ΠΓΝ Αθηνών "Λαϊκό, την Αιματολογική Κλινική του ΠΓΝ Αλεξανδρούπολης και την Αιματολογική Κλινική του ΠΓΝ Ιωαννίνων

Η διαχείριση των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι. Εν συνεχεία, με ενημέρωση από τον θεράποντα ιατρό, ζητήθηκε και ελήφθη, έγγραφη συγκατάθεση, από όλους τους ασθενείς που μελετήθηκαν.

## 3.4 Βασικές τεχνικές

### 3.4.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction , PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια εργαστηριακή μέθοδος κατά την οποία παράγεται ένας μεγάλος αριθμός αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA με καθορισμένο μήκος και αλληλουχία, χρησιμοποιώντας μια μικρή μόνο ποσότητα αρχικού υποστρώματος (gDNA, cDNA, cfDNA, mtDNA, πλασμιδιακό ή βακτηριακό DNA κτλ.). Η αντίδραση ολοκληρώνεται μέσα στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων σε 1,5-4 ώρες. Το μήκος του DNA που μπορεί να πολλαπλασιαστεί με PCR κυμαίνεται από 50 έως και 2.000 ζεύγη βάσεων. Ως πηγή DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε κλινικό, εργαστηριακό, ιατροδικαστικό ή αρχαιολογικό δείγμα.

Η τεχνική βασίζεται στην δράση του ενζύμου DNA πολυμεράση I, με την αντίδραση να μιμείται τον τρόπο αντιγραφής του DNA μέσα στα κύτταρα με τη χρήση θερμοανθεκτικών αντιδραστηρίων. Τα 6 κύρια αντιδραστήρια για την PCR είναι:

#### 1. Το DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο (template)

Το DNA μπορεί να είναι μονόκλωνο, δίκλωνο, γραμμικό ή κυκλικό και να αποτελείται από συγκεκριμένα τμήματα DNA, ή ακόμη και από ολόκληρο το γενωμικό υλικό ενός οργανισμού. Η ποσότητα που απαιτείται είναι ελάχιστη και κυμαίνεται ανάλογα με τον τύπο του DNA από λίγα νανογραμμάρια (nanogram; ng ή  $10^{-9}$ g, έως ορισμένα πικογραμμάρια (picogram; pg ή  $10^{-12}$ g).<sup>[48]</sup>

2. Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση για την κατάλυση της αντίδρασης  
Η ανακάλυψη της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Ταq πολυμεράση) από το θερμόφιλο βακτηριακό είδος *Thermus aquaticus*, αύξησε σημαντικά την απόδοση της PCR και οδήγησε στην αυτοματοποίηση της. Το ένζυμο αυτό έχει βέλτιστη θερμοκρασία τους 75-80 °C, με διάρκεια ημιζωής στους 95 °C μεγαλύτερη των 40 λεπτών και μέση ταχύτητα αντιγραφής 1000 ζεύγη βάσεων, σε λιγότερο από 10 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία 72 °C.<sup>[49]</sup> Πλέον υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών οι οποίες χρησιμοποιούνται με βάση την πιστότητα, την ταχύτητα και το μέγεθος του κομματιού προς πολλαπλασιασμό που το πείραμα απαιτεί.<sup>[48]</sup>
  
3. Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια/Εκκινητές (oligos/primers)  
Η σύνθεση του νέου τμήματος DNA από την πολυμεράση γίνεται μόνο με την επέκταση ήδη συνδεδεμένων στο εκμαγείο μικρών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών-εκκινητών με κατεύθυνση 5'→ 3'. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην PCR είναι μικρά συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια με μήκος 15-30 ζ.β. και με αλληλουχία συμπληρωματική, το καθένα, για τη μια μόνο από τις δυο αλυσίδες του εκμαγείου DNA. Οι εκκινητές είναι άκρως σημαντικοί για την ευαισθησία, την ακρίβεια και την αποδοτικότητα μιας PCR, έτσι ο σχεδιασμός τους και η συγκέντρωσή τους στο διάλυμα της αντίδρασης πρέπει να είναι ακριβής.<sup>[48]</sup>
  
4. Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)  
Το ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για την δημιουργία και διατήρηση ενός ιδανικού περιβάλλοντος αλάτων και pH για τη δράση του ενζύμου, καθόλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Το pH κυμαίνεται στο 7.2, σε θερμοκρασία επέκτασης 72 °C.
  
5. Διοσθενή κατιόντα μαγνησίου (Mg<sup>2+</sup>)  
Όλες οι θερμοανθεκτικές DNA πολυμεράσες απαιτούν για την λειτουργία τους διοσθενή κατιόντα, συνήθως μαγνησίου, τα οποία προστίθενται στο διάλυμα υπό την μορφή MgCl<sub>2</sub>. Η συγκέντρωσή τους στο διάλυμα της αντίδρασης έχει σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του ενζύμου, την ευαισθησία και την ειδικότητά του. Η βέλτιστη συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου είναι διαφορετική για κάθε μείγμα ενζύμου, DNA και εκκινητών για αυτό και κάθε φορά προσδιορίζεται εκ νέου.<sup>[48]</sup>

6. Τα 4 τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Αδενίνη; A, Θυμίνη; T, Γουανίνη; G, Κυτοσίνη; C) (deoxynucleotide triphosphates; dNTPs)

Τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια A, T, G, C είναι απαραίτητα για την σύνθεση της συμπληρωματικής περιοχής από την DNA πολυμεράση καθώς αποτελούν τους δομικούς λίθους του DNA. Η συγκέντρωσή τους στο διάλυμα οφείλει να είναι ισομοριακή και σε επάρκεια για την ενίσχυση των προϊόντων, χωρίς όμως να υπερβαίνει συγκεκριμένα επίπεδα, καθώς ενδέχεται να δράσουν ως ανασταλτικοί παράγοντες.<sup>[48]</sup>

Η PCR περιλαμβάνει την κυκλική επανάληψη τριών απλών αντιδράσεων, όπως φαίνεται και στην εικόνα 10, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την θερμοκρασία και εκτελούνται στο ίδιο σωληνάκι (PCR tube).

1<sup>ο</sup> Στάδιο

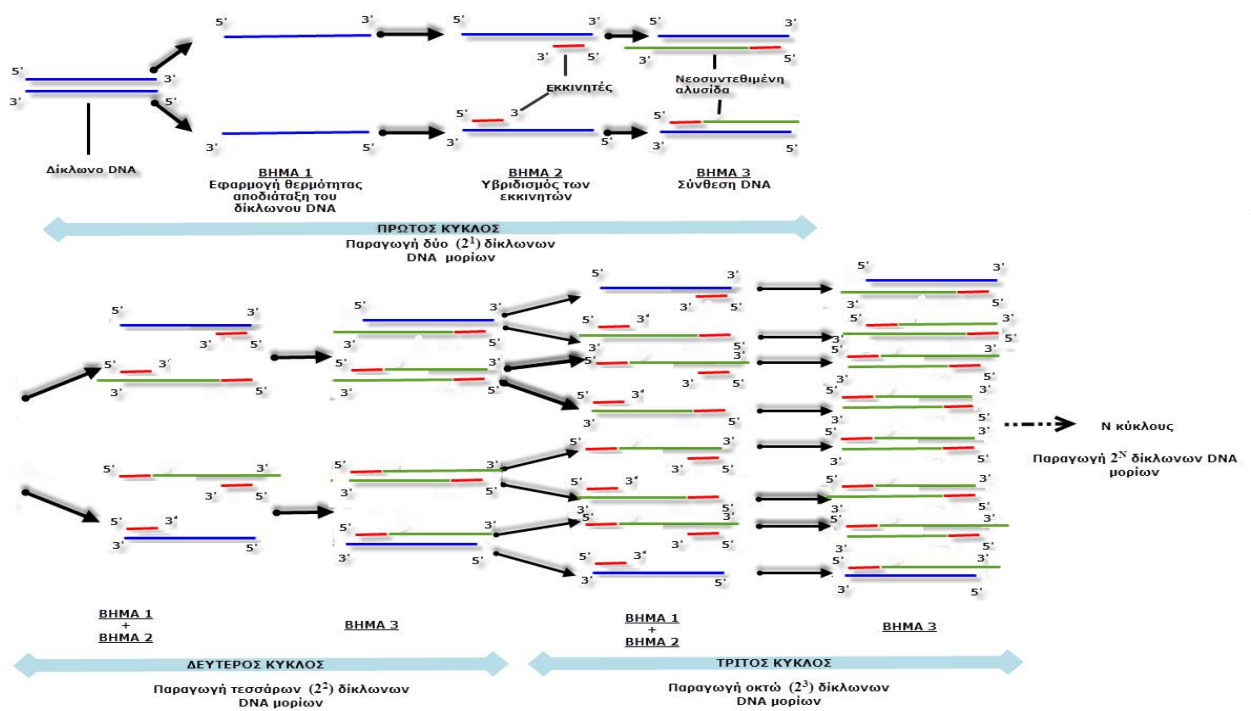
Το πρώτο στάδιο του κύκλου είναι η αποδιάταξη του εκμαγείου DNA (template denaturation). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε υψηλή θερμοκρασία (94 °C-96°C για 20-60 δευτερόλεπτα) και έχει ως αποτέλεσμα διάσπαση των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν το δίκλωνο DNA και τελικά τον αποχωρισμό των δυο αλυσίδων.

2<sup>ο</sup> Στάδιο

Κατά το δεύτερο στάδιο οι εκκινητές συνδέονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες. Η σύνδεση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία μεταξύ 37°C - 70°C. Η ακρίβεια με την οποία συνδέονται οι εκκινητές στη συμπληρωματική τους ακολουθία, είναι καθοριστική για την ειδικότητα της τελικής αντίδρασης.

3<sup>ο</sup> Στάδιο

Στο τρίτο στάδιο του κύκλου πραγματοποιείται επιμήκυνση των υβριδοποιημένων εκκινητών και αντιγραφή του DNA σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο Taq DNA πολυμεράση συνήθως στους 72°C με διάρκεια ανάλογη του μήκους του τμήματος που συντίθενται, με κατεύθυνση 5'→3' και πάντα με την προσθήκη νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο του εκκινητή.



**Εικόνα 9.** Σχηματική αναπαράσταση των τριών πρώτων κύκλων της PCR και των προϊόντων της. Loupis T., 2016.

Η πιστότητα της DNA πολυμεράσης και τελικά της αντίδρασης εξαρτάται από τις παρακάτω παραμέτρους.

### pH και συγκέντρωση dNTPs

Η πιστότητα της DNA πολυμεράσης μειώνεται όσο αυξάνεται η τιμή pH και η συγκέντρωση των ελεύθερων νουκλεοτιδίων, ή όταν τα τέσσερα νουκλεοτίδια δεν έχουν ισομοριακή συγκέντρωση.

### Συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου

Διατήρηση του μαγνησίου σε χαμηλά επίπεδα αυξάνει την ειδικότητα της αντίδρασης, ενώ αντίθετα αύξηση αυτής της τιμής ενισχύει την ικανότητα της πολυμεράσης να προσδένεται στο υπόστρωμα και να συνθέτει προϊόντα, ορισμένες φορές με λιγότερη ειδικότητα από το αναμενόμενο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση επιπρόσθετων μη ειδικών τμημάτων, έως και μη σύνθεση προϊόντος εάν η τιμή υπερβαίνει κάποια όρια. Το τελευταίο μπορεί να συμβεί και στην περίπτωση όπου η συγκέντρωση του μαγνησίου είναι ιδιαίτερα χαμηλή.

### Χρονική διάρκεια και θερμοκρασία πρόσδεσης του εκκινητή και επιμήκυνσής αυτού

Αύξηση της θερμοκρασίας και μείωση του χρόνου αυξάνουν την πιστότητα της PCR αλλά μειώνουν την απόδοση της.

### Αριθμός κύκλων

Η ειδικότητα της DNA πολυμεράσης αυξάνεται αντιστρόφως ανάλογα με τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης.

## 3.4.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Διαβαθμισμένης Θερμοκρασίας Υβριδισμού (Gradient PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Διαβαθμισμένης Θερμοκρασίας Υβριδισμού χρησιμοποιείται για την ανεύρεση της ιδανικής θερμοκρασίας υβριδισμού εξ αρχής σχεδιασμένων εκκινητών. Κατά την τεχνική αυτή, η ίδια αντίδραση PCR πραγματοποιείται ταυτόχρονα σε ένα εύρος διαφορετικών θερμοκρασιών. Αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση ενός θερμικού κυκλοποιητή με δυνατότητα εφαρμογής διαφορετικών θερμοκρασιακών τιμών σε κάθε στήλη (1-12) (βλ. Εικόνα 12). Έτσι, ίδια ποσότητα από ένα κύριο μείγμα αντίδρασης (Master Mix), όπου εμπεριέχεται ήδη κατάλληλη ποσότητα υποστρώματος, διαμοιράζεται σε σωληνάκια (PCR tubes) τα οποία τοποθετούνται κατά μήκος μίας εκ των σειρών της συσκευής (A-H).

Τέλος, πραγματοποιείται ανάδειξη των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης και επιλογή της θερμοκρασίας με το βέλτιστο αποτέλεσμα για περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες. Η ανάλυση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μία γρήγορη και οικονομική διαδικασία η οποία θα αναλυθεί εκτενώς παρακάτω.

Η διαλογή των κατάλληλων θερμοκρασιακών επιπέδων πρόσδεσης των εκκινητών προϋποθέτει την ύπαρξη μοναδιαίας ζώνης για κάθε ζευγάρι εκκινητών, η οποία θα είναι ειδική μόνο για το τμήμα, για το οποίο έχει σχεδιαστεί να ενισχύει.

Το τελευταίο προϋποθέτει την παράλληλη χρήση τμημάτων DNA γνωστού Μοριακού Βάρους, άρα γνωστού μεγέθους σε νουκλεοτίδια, κατά την ανάλυση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.



### 3.4.3 Σύστημα Ανίχνευσης Μεταλλάξεων Ανθεκτικών στην Ενίσχυση (Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction, ARMS-PCR)

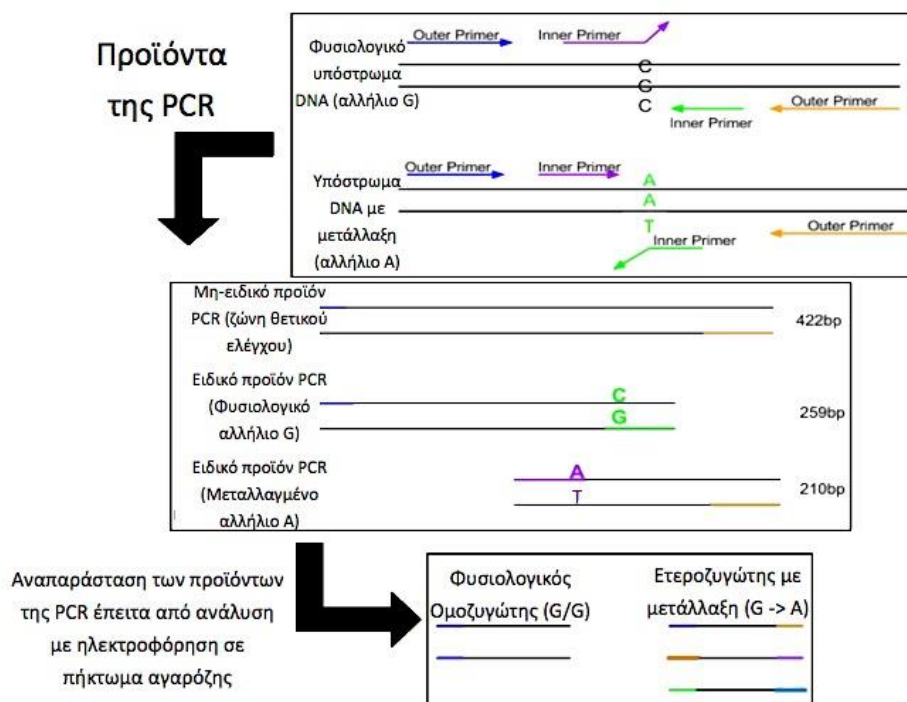
Το 1989, περιγράφηκε η εφαρμογή της PCR για την ανάλυση γνωστών σημειακών μεταλλάξεων στο DNA και για τη διάκριση μεταξύ φυσιολογικών, ετεροζυγωτών και ομοζυγωτών μεταλλαγμένων γονότυπων.

Η μέθοδος αναφέρεται ως σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση (Amplification Refractory Mutation System, ARMS-PCR) και εμπλέκει δύο ζεύγη εκκινητών. Οι δύο εξωτερικοί μη-ειδικοί εκκινητές (outer primers) ενισχύουν μία ευρύτερη ζώνη θετικού ελέγχου, ενώ οι δύο εσωτερικοί αλληλοειδικοί εκκινητές (inner primers), οι οποίοι καταλήγουν στο ίδιο υπό διερεύνηση νουκλεοτίδιο, χρησιμεύουν υπό περιπτώσεις όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

Η τεχνική βασίζεται στη διαπίστωση ότι η ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων με PCR έχει μικρή απόδοση ή και αποτυγχάνει πλήρως εάν υπάρχει ασυμφωνία ζευγαρώματος ανάμεσα στο 3' τελικό νουκλεοτίδιο του εκκινητή και της αντίστοιχης μήτρας.

Ως εκ τούτου, η επιλογή ενός εσωτερικού φυσιολογικού εκκινητή, ο οποίος είναι συμπληρωματικός με το φυσιολογικό αλληλόμορφο, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζει ασυμφωνία βάσεως στο 3' άκρο του, με το αντίστοιχο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, θα οδηγήσει σε επιλεκτική ενίσχυση του πρώτου, σε συνδυασμό πάντα με τον αντιπαράλληλο εξωτερικό μη-ειδικό εκκινητή. Ομοίως, ο μεταλλαγμένος εσωτερικός εκκινητής θα ενισχύσει μόνο το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, με το οποίο παρουσιάζει συμπληρωματικότητα στο 3' άκρο του, σε συνδυασμό με τον αντιπαράλληλο εξωτερικό μη-ειδικό εκκινητή.

Η τοποθέτηση των εξωτερικών μη-ειδικών εκκινητών σε διαφορετική απόσταση από το προς διερεύνηση νουκλεοτίδιο επιτρέπει τον ευδιάκριτο διαχωρισμό των συντιθέμενων προϊόντων κατά την ανάδειξη αυτών σε πηκτή αγαρόζης, καθότι διαφέρουν σε μέγεθος .<sup>54</sup>



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση ARMS-PCR (με χρήση διπλού ζεύγους εκκινήτων).<sup>55</sup>

### 3.4.4 Αλληλοειδική PCR (Allele Specific Polymerase Chain Reaction, AS-PCR)

Πρόκειται για παραλλαγή της ARMS-PCR, η οποία βασίζεται στο σχεδιασμό ενός μόνο εσωτερικού εκκινήτη, του οποίου το 3' άκρο, είναι πλήρως συμπληρωματικό με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (specific allele), φέρει όμως δυσαρμονία ενός νουκλεοτιδίου σε σχέση με το φυσιολογικό (non-specific allele). Ο εσωτερικός εκκινήτης συνθέτει προϊόν σε συνδυασμό με τον αντιπαράλληλό του, εξωτερικό μη-ειδικό εκκινήτη, μόνον στην περίπτωση όπου υπάρχει μετάλλαξη.

Παράλληλα οι δύο εξωτερικοί εκκινήτες είναι υπεύθυνοι για την ενίσχυση μίας ζώνης θετικού ελέγχου. Η αντίδραση ελέγχου πραγματοποιείται προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η έλλειψη προϊόντος από την εκάστοτε αντίδραση, οφείλεται στην απουσία μετάλλαξης και όχι σε αποτυχία διεξαγωγής της αντίδρασης πολυμεράσης, όπως απεικονίζεται και παρακάτω στην Εικόνα 12.



**Εικόνα 11.** Βασική αρχή της μεθόδου AS-PCR. Αριστερά: Απουσία μετάλλαξης συντίθενται μόνο ένα προϊόν που αφορά στη ζώνη θετικού ελέγχου. Δεξιά: Όταν υπάρχει μετάλλαξη, τότε αναδεικνύονται δύο προϊόντα κατά την ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζη, η ζώνη θετικού ελέγχου, καθώς και ένα μικρότερο προϊόν, ειδικό του πολυμορφισμού.

### 3.4.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR), αποτελεί παραλλαγή της PCR τελικού σταδίου. Ωστόσο οι δύο τεχνικές παρουσιάζουν εμφανείς, άλλα και ουσιαστικότερες διαφορές, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

1) Η προφανής διαφορά έγκειται στον τρόπο με τον οποίο παραλαμβάνονται και αναλύονται τα δεδομένα από τις δύο τεχνικές.

Η PCR τελικού σταδίου απαιτεί περαιτέρω χειρισμούς, όπως η ανάδειξη των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζη, ενώ παράλληλα, στηρίζεται σε οπτικά μέσα για την ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Αντίθετα, στη Real Time PCR, το σύστημα είναι κλειστό, από τη στιγμή που ξεκινά η αντίδραση και μέχρι την ολοκλήρωσή αυτής. Η επέκταση των προϊόντων βασίζεται σε φθοριοχρώματα τα οποία προσδένονται στα δίκλινα προϊόντα της αντίδρασης που σωρεύονται σταδιακά. Η διαδικασία αυτή παρακολουθείται καθόλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω υπολογιστικού συστήματος. Ακολουθεί επεξεργασία των δεδομένων με κατάλληλα λογισμικά προγράμματα, ανάλογα με το πρωτόκολλο που έχει εφαρμοσθεί και το σκοπό που εξυπηρετεί η εκάστοτε πειραματική διαδικασία.

Οι φθορίζουσες χρωστικές διεγείρονται μέσω ακτινοβολίας και εκπέμπουν φθορίζοντα σωματίδια διαφορετικού μήκους κύματος, τα οποία γίνονται αντιληπτά από μία κάμερα υψηλής ανάλυσης που καταγράφει τη σταδιακή αύξηση του σήματος που προκύπτει.

2) Η ουσιαστική ωστόσο διαφορά, των δύο τεχνολογιών, έγκειται στην ανάλυση την οποία δύναται να επιτύχει καθεμιά εξ αυτών.

Η PCR τελικού σταδίου μπορεί να ανιχνεύσει συγκεκριμένες πολυμορφικές θέσεις, μικρές διαγραφές ή προσθήκες νουκλεοτιδίων, καθώς και μεγάλες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις με σχετική ευκολία, εφαρμόζοντας το κατάλληλο πρωτόκολλο.

Αντίστοιχα, η PCR πραγματικού χρόνου, αναγνωρίζει τα παραπάνω συμβάματα, πιο σύντομα και με μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία, ενώ παράλληλα απαιτεί λιγότερους χειρισμούς και μικρότερη ποσότητα υποστρώματος.

Παράλληλα όμως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επιπρόσθετους αναλυτικούς σκοπούς, όπως είναι η παρακολούθηση της ελάχιστης υπολειματικής νόσου στη ΧΜΛ και σε άλλες ομάδες ασθενών, μέσω απόλυτης ποσοτικής ανάλυσης (absolute quantification) χιμαιρικών μεταγράφων, ή ακόμη ο έλεγχος των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων, μέσω σχετικής ποσοτικής ανάλυσης (relative quantification), καθώς και άλλες αναλύσεις.<sup>56</sup>

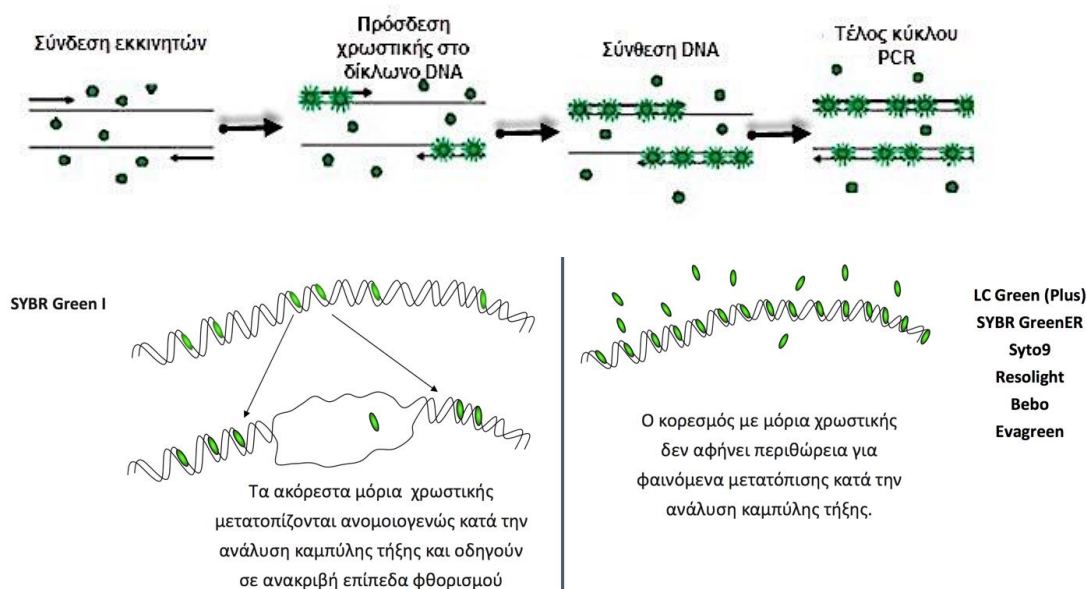
#### 3.4.5.1. Φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται μη-ειδικά στο υπόστρωμα

Υπάρχουν δύο ειδών φθορίζουσες χρωστικές. Οι πρώτες αφορούν σε μη-ειδικά μόρια που κυκλοφορούν ελεύθερα στο διάλυμα της αντίδρασης και προσδένονται με υψηλή συγγένεια σε όλο το μήκος των δίκλωνων τμημάτων DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση PCR, όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί. Τότε φθορίζουν με ένταση πολλές φορές ισχυρότερη, απ' ότι όταν βρίσκονται ελεύθερες στο διάλυμα, με αποτέλεσμα να γίνονται ανιχνεύσιμες απο την κάμερα της συσκευής.

Το βασικό μειονέκτημα αυτών, είναι πως συνδέονται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο, ακόμη και σε ανεπιθύμητα μη-ειδικά προϊόντα και διμερή εκκινητών, που ενδέχεται να προκύψουν κατά τη διαδικασία της ενίσχυσης. Το σήμα που εκπέμπουν αυτά, συνυπολογίζεται σε εκείνο που παρέχεται απο τα υπο διερεύνηση, ειδικά προϊόντα της αντίδρασης, οδηγώντας σε ψευδή αποτελέσματα.

Ωστόσο, με κατάλληλο σχεδιασμό εκκινητών και βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης, το μειονέκτημα αυτό μπορεί να καμφθεί, αφού έτσι ουσιαστικά προκύπτει αποκλειστικά το επιθυμητό προϊόν ενίσχυσης της αντίδρασης.

Προκειμένου να εκτιμηθεί ο σχηματισμός μη-ειδικών προϊόντων, μετά το πέρας της αντίδρασης, μπορεί να ακολουθήσει επιπρόσθετη ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων της Real Time PCR (post-Real Time PCR melting curve analysis), η οποία θα περιγραφεί εκτενέστερα στη συνέχεια (Κεφάλαιο 3.5.2), αφού δυνητικά μπορεί να αποτελέσει ξεχωριστή μεθοδολογία, με δική της παραμετροποίηση, που σήμερα χρησιμοποιείται ως τεχνική ταχείας ανίχνευσης νουκλεοτιδικών αλλαγών.



**Εικόνα 12.** PCR πραγματικού χρόνου με μη-ειδικά φθοριοχρώματα. Οι μη-ειδικές φθορίζουσες χρωστικές προσδένονται κατά τρόπο ανεξάρτητο της αλληλουχίας του προϊόντος που επεκτείνεται κατά τη Real Time PCR (Τροποποίηση από van der Velden et al. 2003).

### 3.4.5.2. Φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται ειδικά επί συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής ακολουθίας του υποστρώματος.

Η δεύτερη κατηγορία φθορίζουσων χρωστικών αποτελείται από τεχνητά ολιγονουκλεοτίδια με συγκεκριμένη αλληλουχία, τα οποία είναι ειδικά για το υποστρώμα και αναφέρονται ως ιχνηθέτες (probes). Αυτά τα μόρια είναι σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες, ενώ έχουν παρόμοιες λειτουργικές ιδιότητες με τα μη-ειδικά φθοριοχρώματα.

Οι ιχνηθέτες της αντίδρασης δεν συμμετέχουν λειτουργικά στη διαδικασία της επέκτασης των προϊόντων, αφού ο ρόλος τους περιορίζεται στην παρακολούθηση αυτής. Η αλληλουχία του εκάστοτε ιχνηθέτη, είναι κατάλληλα σχεδιασμένη για να προσδένεται συμπληρωματικά, με μία νουκλεοτιδική ακολουθία, οπουδήποτε εντός της περιοχής που επεκτείνεται κατά την PCR.

Τα δύο πιο διαδεδομένα ειδικά φθοριοχρώματα, αφορούν στους ιχνηθέτες υδρόλυσης και στους ιχνηθέτες υβριδοποίησης.

1) Οι ιχνηθέτες υδρόλυσης είναι διπλά σημασμένοι, αφού στο ένα άκρο της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας, φέρουν ένα φθορίζον μόριο-δότη (reporter fluorochrome, π.χ. FAM, VIC, JOE), ενώ στο άλλο άκρο, ένα μόριο-δέκτη (quencher fluorochrome, π.χ. TAMRA) που απορροφά την ακτινοβολία που εκπέμπει το πρώτο (Εικόνα 14 Α).

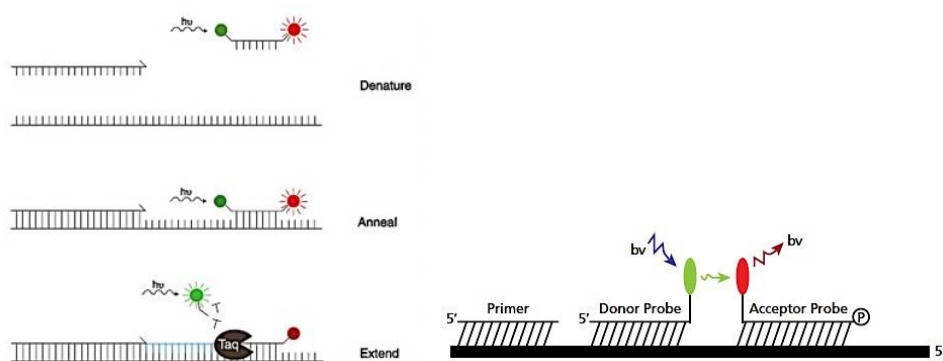
Όταν ο ιχνηθέτης είναι άθικτος και σε ελεύθερη κατάσταση στο διάλυμα τότε τα μόρια δότης και δέκτης είναι πλησίον. Ο συνδυασμός αυτός οδηγεί σε αποσιώπηση του εκπεμπόμενου σήματος.

Εφόσον ο ιχνηθέτης προσδεθεί στην συμπληρωματική του αλληλουχία εντός της περιοχής ενίσχυσης, τότε κατά το στάδιο της επέκτασης του προϊόντος της αντίδρασης, αυτός κατακερματίζεται από την πολυμεράση, μέσω της δράσης 5'-3' εξωνουκλεάσης που διαθέτει η τελευταία. Σε αυτή την περίπτωση τα μόρια δότης και δέκτης απομακρύνονται μεταξύ τους, έτσι το πρώτο κυκλοφορεί ελεύθερο στο διάλυμα και παράγει φθορίζουσα σήμανση που γίνεται αντιληπτή από τη συσκευή.

2) Οι ιχνηθέτες υβριδοποίησης προστίθενται σε ζευγάρια ανά αντίδραση. Σε αυτή τη διάταξη ο φθορισμός επιτυγχάνεται κατόπιν πρόσδεσης και των δύο μορίων, σε παραπλήσια σημεία επί του νουκλεϊκού οξέος που ενισχύεται με PCR (Εικόνα 14 Β).

Ο ένας ιχνηθέτης εκπέμπει φθορισμό συγκεκριμένου μήκους κύματος ώστε διεγείρει το ζευγάρι του, το οποίο εκπέμπει ακτινοβολία διαφορετικού μήκους κύματος, η οποία γίνεται αντιληπτή και προσμετράται από την κάμερα της συσκευής. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται ως αρχή συντονισμένης μεταφοράς της ενέργειας φθορισμού (fluorescence resonance energy transfer, FRET).

Η διάταξη αυτή παρέχει ένα σημαντικό πλεονέκτημα, συγκριτικά με τους ιχνηθέτες υδρόλυσης, αφού η μη αποικοδόμηση των ολιγονουκλεοτιδίων που μεταφέρουν τα φθοριοχρώματα, καθιστά εφικτή την επιπρόσθετη ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων της PCR πραγματικού χρόνου, μετά το πέρας της αντίδρασης.

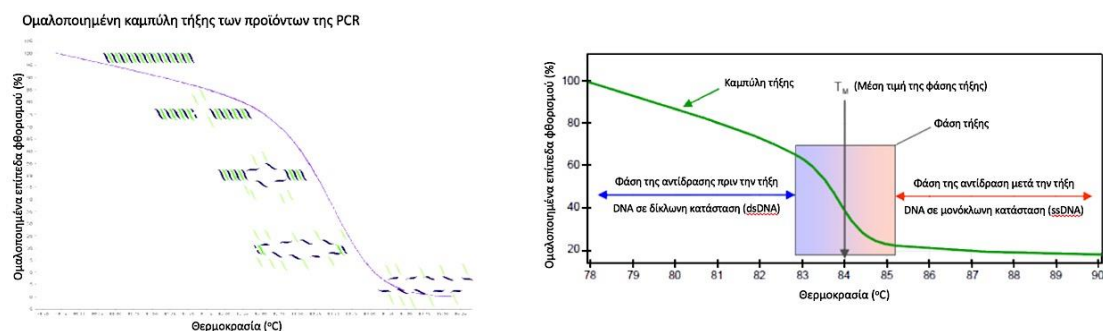


**Εικόνα 13.** PCR πραγματικού χρόνου με ειδικά φθοριοχρωμάτα. Ιχνηθέτες υδρόλυσης (εικόνα αριστερά) και ιχνηθέτες υβριδοποίησης (εικόνα δεξιά).<sup>57</sup>

### 3.4.6 Υψηλής διακριτικής ικανότητας ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων PCR πραγματικού χρόνου (Post Real Time PCR High Resolution Melting curve Analysis, HRMA)

Η ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων της PCR, είναι μία διαδικασία διακρίβωσης της ειδικότητας μίας αντίδρασης ενίσχυσης. Κατά την ανάλυση, η θερμοκρασία αυξάνεται αργά από τους 50-60°C, μέχρι τους 99°C, με ταυτόχρονη συνεχή παρακολούθηση της εκπομπής φθορισμού.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα που ακολουθεί, υπο φυσιολογικές συνθήκες, κατά την ανάλυση, ο φθορισμός των προϊόντων διατηρείται σε υψηλά επίπεδα στις χαμηλές θερμοκρασίες, όπου το σύνολο του DNA είναι δίκλωνο. Τα επίπεδα φθορισμού μειώνονται κατά τη φάση τήξης της ανάλυσης, οπότε και τα προϊόντα της PCR αποδιατάσσονται σταδιακά, ενώ σταματούν να εκπέμπουν φθορισμό όταν πλέον ανιχνεύονται σε μονόκλωνη κατάσταση, στις πιο υψηλές θερμοκρασίες.



**Εικόνα 14.** Η καμπύλη τήξης. Αριστερά: Ανάλυση του προτύπου φθορισμού των προϊόντων PCR. Δεξιά: Η καμπύλη τήξης προκύπτει από την ανάλυση των επιπέδων φθορισμού ανά το χρόνο.<sup>58</sup>

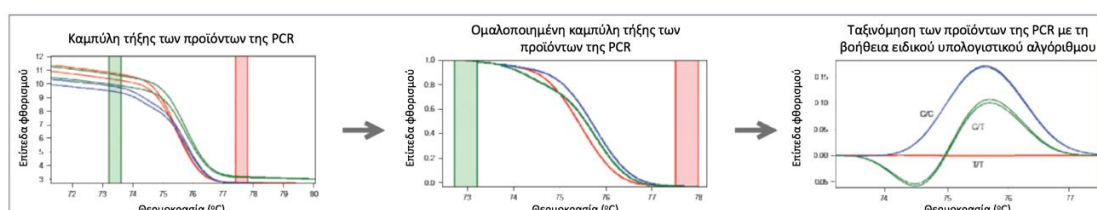
Όταν τα προϊόντα που προκύπτουν από την ενίσχυση με PCR, έχουν διαφορετικό μήκος λόγω προσθήκης ή διαγραφής νουκλεοτιδίων (Indels), ή έχουν διαφορετική αλληλουχία λόγω σημειακών αλλαγών (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), σε σχέση με πρότυπα δείγματα φυσιολογικού γονότυπου, τότε όλα μεταξύ τους παρουσιάζουν ελαφρώς διαφοροποιημένο πρότυπο τήξης.

Έτσι, σε διάγραμμα με συντεταγμένες τα επίπεδα φθορισμού σε σχέση με τις θερμοκρασιακές αλλαγές, τα διαφορετικής αλληλουχίας δείγματα, εμφανίζονται ως διακριτές καμπύλες με διαφορετικό περίγραμμα και παραπλήσια ή όμοια κορυφή, η οποία αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή της φάσης τήξης (melting temperature,  $T_m$ ), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 15.

Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στη διερεύνηση της ύπαρξης επιπρόσθετων κορυφών, σε θερμοκρασίες που αποκλείουν από την προαναφερθείσα μέση τιμή. Αυτές ενδέχεται να οφείλονται στο σχηματισμό επιπρόσθετων μη-εδικών προϊόντων της αντίδρασης, που μπορεί να επηρεάσουν τόσο την ενίσχυση της υπο μελέτη γενωμικής περιοχής, όσο και την ίδια την αναλυτική διαδικασία.

Με κατάλληλες συσκευές, υψηλής διακριτικής ικανότητας (π.χ. LightCycler 480, Roche), οι ιδιότητες αυτής της μεθοδολογίας, χρησιμεύουν στην ταχεία ανίχνευση πολυμορφικών θέσεων σε συγκεκριμένα γονίδια-στόχους, στην ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων μεθυλίωσης σε υποκινητές γονιδίων, καθώς και για άλλους πειραματικούς σκοπούς.

Η τεχνική αυτή είναι ευρύτερα γνωστή ως υψηλής διακριτικής ικανότητας ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων της Real Time PCR (post-Real Time PCR High Resolution Melting curve Analysis, HRMA).



Εικόνα 15. Η ανάλυση της καμπύλης τήξης. Το πρότυπο καμπύλης τήξης στην HRMA, τροποποιείται, ανάλογα με το γονότυπο κάθε δείγματος.<sup>58</sup>

### 3.4.6.1. Παραλλαγές της μεθόδου - Μεθυλοειδική HRMA (Methylation specific HRMA, MS-HRMA)

Τα επίπεδα μεθυλίωσης είναι ήδη γνωστό ότι τροποποιούνται με το γήρας, καθώς και σε πληθώρα παθολογικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, τα αυτοάνοσα νοσήματα και οι καρδιολογικές παθήσεις. Ανεξάρτητα από τον προσδιορισμό των πολυμορφικών θέσεων, η μεθυλοειδική HRMA (MS-HRMA) και άλλες τεχνικές χρησιμεύουν στον προσδιορισμό των επιπέδων μεθυλίωσης μεμονωμένων γενωμικών περιοχών (local

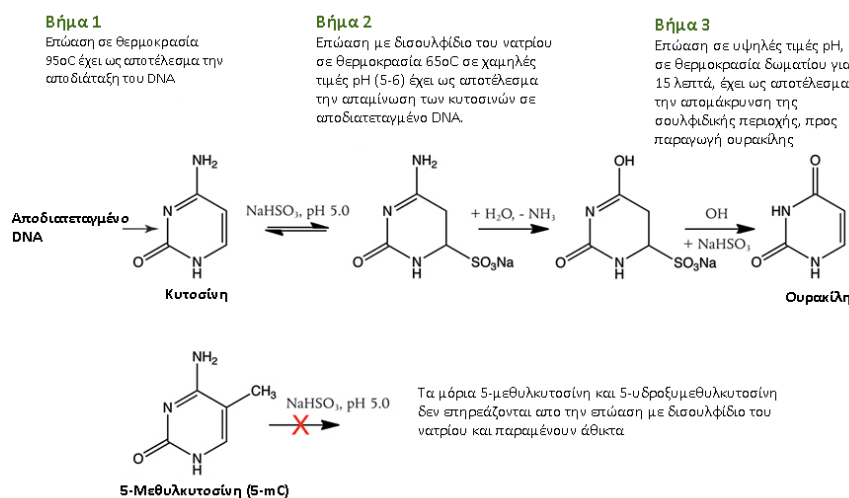


methylation levels), ή ακόμη και σε κατά προσέγγιση εκτίμηση αυτών των επιπέδων για ολόκληρο το γονιδίωμα (global methylation levels), μέσω της μελέτης διάσπαρτων πολυ-επαναλαμβανόμενων μικρών ή μεγάλων μεταθετών στοιχείων, όπως οι αλληλουχίες SINE (short interspersed nucleotide elements, π.χ. Alu repetitive elements) και LINE (long interspersed nucleotide elements), αντίστοιχα, αφού το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται κατά 45% από τέτοια στοιχεία, τα οποία μάλιστα, υπό φυσιολογικές συνθήκες, είναι μεθυλιωμένα σε μεγάλο ποσοστό.

Η απώλεια μεθυλίωσης των στοιχείων, μπορεί να οδηγήσει ανεξάρτητα σε ενεργοποίηση αυτών και γενετική αστάθεια, που εκδηλώνεται μέσω της μετάθεσής τους σε περιοχές του γονιδιώματος οι οποίες είναι μεταγραφικά ενεργές, με αποτέλεσμα την απορρύθμιση της έκφρασης σημαντικών γονιδίων, γεγονός που μπορεί να συμβάλλει στην καρκινογένεση ή σε άλλες παθολογικές καταστάσεις.

Για τις αναλύσεις μεθυλίωσης, συνήθως απαιτείται ένα επιπρόσθετο προ-παρασκευαστικό στάδιο, κατά το οποίο πραγματοποιείται επεξεργασία του DNA με δισουλφίδιο του νατρίου (sodium bisulfite treatment). Η χημική αυτή κατεργασία, οδηγεί σε σχηματισμό τεχνητών πολυμορφικών θέσεων στο υπόστρωμα, αφού τα νουκλεοτίδια κυτοσίνης, τα οποία δεν ακολουθούνται από γουανίνη, μετατρέπονται σε ουρακίλη.

Αντίθετα, τα νουκλεοτίδια κυτοσίνης που ακολουθούνται από γουανίνη (CpG), ενδέχεται να είναι μεθυλιωμένα. Εάν ισχύει αυτό, τότε προστατεύονται από τη χημική μετατροπή λόγω της πλευρικής ομάδας που φέρουν, έτσι διατηρούνται ως νουκλεοτίδια κυτοσίνης. Εάν όχι, τότε μετατρέπονται και αυτά σε ουρακίλη, όπως παρουσιάζεται στη γραφική αναπαράσταση που ακολουθεί.<sup>59</sup>



Εικόνα 16. Η επίδραση του δισουλφιδίου του νατρίου στις κυτοσίνες.<sup>59</sup>

Κατά την ανάλυση της καμπύλης τήξης, τα δείγματα με διαφορετικό ποσοστό μεθυλίωσης αποδιατάσσονται με διαφορετικό ρυθμό. Τα νουκλεοτίδια κυτοσίνης δεσμεύονται στα αντιπαράλληλά τους, νουκλεοτίδια γουανίνης, με τρεις φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, οι οποίοι απαιτούν δαπάνη μεγαλύτερης ποσότητας ενέργειας υπό μορφή θερμότητας, ώστε να επιτευχθεί αποδιάταξη, συγκριτικά με τα ζεύγη θυμίνης-αδενίνης που φέρουν δύο δεσμούς. Έτσι, τα προϊόντα ενίσχυσης των δειγμάτων με αυξημένο ποσοστό μεθυλίωσης, τήκονται σε υψηλότερη θερμοκρασία, αφού φέρουν περισσότερες κυτοσίνες, σε σχέση με τα υπομεθυλιωμένα δείγματα, στα οποία οι μη-μεθυλιωμένες κυτοσίνες έχουν μετατραπεί σε ουρακίλες και στη συνέχεια κατά την ενισχυτική διαδικασία, σε θυμίνες, λόγω της χημικής κατεργασίας με δισουλφίδιο του νατρίου.

Κατά τη μεθυλοειδική HRMA, το ποσοστό της μεθυλίωσης των υπό διερεύνηση δειγμάτων, προσδιορίζεται μέσω αντιπαραβολής με μία καμπύλη αναφοράς. Αυτή καθορίζεται μέσω παράλληλης ανάλυσης, τεχνητά παρασκευασμένων πρότυπων δειγμάτων, με εκ των προτέρων γνωστά επίπεδα μεθυλίωσης, 0% και 100%. Τα δύο δείγματα με ακραίες τιμές μεθυλίωσης, αναμειγνύονται μεταξύ τους σε διαφορετικές αναλογίες και με τον τρόπο αυτό προκύπτουν οι ενδιάμεσες τιμές της πρότυπης καμπύλης.

Το μη-μεθυλιωμένο πρότυπο (0%) παρασκευάζεται μέσω PCR επέκτασης ολόκληρου του γονιδιώματος (multiple displacement-whole genome amplification, WGA), με χρήση του ενζύμου phi29 DNA Polymerase. Το πλήρως μεθυλιωμένο πρότυπο (100%) παρασκευάζεται μέσω ενζυμική μεταφοράς μεθυλομάδων στη θέση 5 του δακτυλίου της κυτοσίνης (5mC), όταν αυτή ακολουθείται από μία βάση γουανίνης (CpG), διεργασία που επιτελείται από το ένζυμο CpG μεθυλοτρανσφεράση (M.SssI).

### 3.4.7 Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων μέσω πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing)

#### 3.4.7.1. Αρχή λειτουργίας της μεθόδου

Με την τεχνική αυτή, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας μίας νουκλεοτιδικής αλυσίδας επιτελείται ενόσω αυτή συντίθεται (sequence-by-synthesis, SBS).

Η διαδικασία της σύνθεσης παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο μέσω της μέτρησης των μορίων πυροφωσφορικού οξέος, τα οποία εκλύονται κατά την πρόσδεση νουκλεοτιδίων στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, ενώ ανιχνεύονται ως σωματίδια φωτεινής ακτινοβολίας μέσω κατάλληλων διαδοχικών ενζυμικών και χημικών αντιδράσεων.<sup>60</sup>

## **Πειραματική και αναλυτική διαδικασία**

### Προετοιμασία της αντίδρασης

Το στάδιο της προετοιμασίας της αντίδρασης περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 1) Η αντίδραση αρχίζει με την ενίσχυση μίας ευρύτερης γενωμικής περιοχής, στην οποία περιλαμβάνεται και η υπό διερεύνηση νουκλεοτιδική αλληλουχία, μέσω αντίδρασης PCR.
- 2) Ένας από τους εκκινητές της PCR, φέρει ένα μόριο βιοτίνης στο 5' άκρο του. Κατά συνέπεια, στο δίκλωνο προϊόν της αντίδρασης, οι αλυσίδες που προέχρονται από τον παραπάνω εκκινητή θα είναι σημασμένες με βιοτίνη.
- 3) Έπειτα, το δίκλωνο προϊόν της PCR προσκολλάται σε μαγνητικά σφαιρίδια, μέσω του βιοτυνιλιωμένου άκρου της σημασμένης αλυσίδας, το οποίο συνδέεται με μόρια στρεπταβιδίνης που επαλείφουν τα σφαιρίδια. Κάθε σφαιρίδιο μπορεί να δεσμεύσει πολλές βιοτυνιλιωμένες αλυσίδες.
- 4) Με εφαρμογή μαγνητικού πεδίου, τα σφαιρίδια συγκεντρώνονται σε ειδικές κυψέλες, όπου αποδιατάσσονται χημικά, σε μονόκλωνες αλυσίδες.
- 5) Ακολουθεί έκπλυση κατά την οποία η μη-βιοτυνιλιωμένη αλυσίδα απομακρύνεται, αφού δεν μπορεί να συνδεθεί με τη στρεπταβιδίνη των σφαιριδίων. Ο χειρισμός αυτός εξασφαλίζει την απόλυτη καθαρότητα του υλικού.<sup>61</sup>

### Κυρίως αντίδραση

Σε συνέχεια της προετοιμασίας για πυροαλληλούχιση, ακολουθεί η κυρίως αντίδραση:

- 6) Ένας εκκινητής, με καθορισμένη νουκλεοτιδική ακολουθία, προσδένεται στη συμπληρωματική του αλληλουχία, στη βιοτυνιλιωμένη αλυσίδα.
- 7) Με την προσθήκη της κατάλληλης DNA πολυμεράσης (Klenow fragment), ξεκινά από το ελεύθερο 3' άκρο του εκκινητή, η προσθήκη dNTPs, στη νέα αλυσίδα, σε

διαδοχικούς γύρους. Σε κάθε γύρο, τα τέσσερα διαφορετικά dNTPs απελευθερώνονται μεμονωμένα, σε επαναλαμβανόμενους κύκλους.

8) Εφόσον το dNTP που προστίθεται στο διάλυμα δεν είναι συμπληρωματικό προς το νουκλεοτίδιο της αλυσίδας που αντιγράφεται, τότε αυτό αποικοδομείται από το ένζυμο απυράση (apyrase), που υπάρχει ήδη στο περιβάλλον της αντίδρασης.

9) Αντίθετα, όταν υπάρχει συμπληρωματικότητα, τότε το dNTP συνδέεται, μέσω της πολυμεράσης, στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, ενώ ταυτόχρονα, απελευθερώνεται ένα μόριο ανόργανου πυροφωσφορικού οξέος (pyrophosphate inorganic, PPI) και ένα πρωτόνιο.

10) Το PPI μετατρέπεται σε τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate, ATP), από την ATP θειουλάση (ATP sulfurylase), παρουσία 5'-φωσφοθειϊκής αδενοσίνης (adenosine 5' phosphosulfate, APS).

11) Το ATP δρα ως υπόστρωμα για τη μετρατροπή της λουσιφερίνης (luciferin), προς οξυ-λουσιφερίνη (oxyluciferin), από το ένζυμο λουσιφεράση (luciferase). Ταυτόχρονα, με την ενζυμική αυτή μετατροπή, απελευθερώνεται ορατό φώς.

12) Το ATP και τα dNTPs που δεν ενσωματώθηκαν στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, αποικοδομούνται από το ένζυμο απυράση για να ξεκινήσει ένας νέος γύρος διαδοχικής προσθήκης καθενός από τα τέσσερα διαφορετικά dNTPs, προκειμένου να ανιχνευθεί εκείνο που είναι συμπληρωματικό με το επόμενο στη σειρά νουκλεοτίδιο της αλυσίδας-μήτρας.<sup>61</sup>

#### Ανάγνωση του αποτελέσματος

Τέλος, αναλύονται τα δεδομένα που προκύπτουν από την αντίδραση της πυροαλληλουχίσης.

13) Η καταγραφή της φωτεινότητας που εκλύεται σε σχέση με το νουκλεοτίδιο που προστίθεται σε κάθε βήμα της αντίδρασης αποδίδει την αλληλουχία των νουκλεοτιδικών βάσεων στην αλυσίδα-μήτρα.

14) Και επειδή η ακτινοβολία είναι ανάλογη προς τον αριθμό των μορίων PPI που θα εκλυθούν, όταν στην αλυσίδα-μήτρα υπάρχουν κατά σειρά, δύο ή τρία όμοια νουκλεοτίδια, τότε προστίθενται ισόποσα συμπληρωματικά dNTPs, ενώ παράλληλα, η φωτεινή ακτινοβολία που εκλύεται είναι δύο ή τρεις φορές πιο ισχυρή, αντίστοιχα.<sup>61</sup>

## Παραλλαγές της μεθόδου - Μεθυλοειδική πυροαλληλούχιση (Methylation specific pyrosequencing, MSP)

Όπως έχει περιγραφεί ήδη για τις περισσότερες μελέτες μεθυλίωσης, έτσι και για τη μεθυλοειδική πυροαλληλούχιση το αρχικό στάδιο περιλαμβάνει επεξεργασία του DNA με δισουλφίδιο του νατρίου, με στόχο τη μετατροπή των νουκλεοτιδίων κυτοσίνης, τα οποία δεν ακολουθούνται από γουανίνη, σε ουρακίλη και κατ'επέκταση σε θυμίνη. Ταυτόχρονα, τα μεθυλωμένα νουκλεοτίδια κυτοσίνης που ακολουθούνται από γουανίνη (CpG), προστατεύονται από τη χημική μετατροπή και διατηρούνται ως νουκλεοτίδια κυτοσίνης. Ωστόσο, εάν δε φέρουν μεθυλομάδες, τότε μετατρέπονται και αυτά σε ουρακίλη.

Ακολούθως, σχεδιάζονται PCR εκκινητές, κατάλληλοι για το χημικά τροποποιημένο υπόστρωμα. Οι ελεύθερες βάσεις κυτοσίνης, που εμπεριέχονται στην αλληλουχία του εκκινητή, αντιμετωπίζονται ως ουρακίλη, ωστόσο, η κατάσταση μεθυλίωσης των δινουκλεοτιδίων κυτοσίνης-γουανίνης (CpG) είναι άγνωστη, για το λόγω αυτό κρίνεται σκόπιμο να αποφεύγονται. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, συντίθεται μεικτός πληθυσμός εκκινητών, για τη συγκεκριμένη θέση, που αφορά στην εκάστοτε περίπτωση.

Παράλληλα, ένας από τους εκκινητές φέρει μία ομάδα βιοτίνης, για πρόσδεση στην επικάλυψη με στρεπταβιδίνη, που φέρουν τα μαγνητικά σφαιρίδια, τα οποία συμμετέχουν στα στάδια καθαρισμού και αποδιάταξης των προϊόντων της αντίδρασης πυροαλληλούχισης, η οποία δε διαφέρει ως διαδικασία, σε σχέση με ό,τι περιγράφηκε προηγουμένως.<sup>63</sup>

## **3.5 Τεχνικές Επεξεργασίας Νουκλεϊκών Οξέων**

### **3.5.1 Απομόνωση γενωμικού DNA**

Η απομόνωση γενωμικού DNA μεγάλου μοριακού βάρους από εμπύρνα κύτταρα περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών, πραγματοποιήθηκε με το ολοκληρωμένο σύστημα FlexiGene DNA Kit, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Qiagen).

### 3.5.1.1. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA σε φασματοφωτόμετρο μάζας

#### Διαδικασία

1. Προηγείται 1:100 αραίωση του διαλύματος DNA, σε ddH<sub>2</sub>O.
2. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 260nm και 280nm. Οι τιμές είναι αποδεκτές όταν το πηλίκο της οπτικής πυκνότητας (optical density, O.D.), σε μήκος κύματος 260nm, προς την αντίστοιχη τιμή στα 280nm, κυμαίνεται μεταξύ 1.6 και 2.0 ( $O.D._{260}/O.D._{280}=1.6-2.0$ ). Η τιμή αυτή είναι ενδεικτική της καθαρότητας του διαλύματος από προσμείξεις, αλλά και της πυκνότητας του DNA.
3. Η συγκέντρωση του DNA προκύπτει από την παρακάτω εξίσωση, έχοντας υπόψιν το δεδομένο πως σε μήκος κύματος 260nm, ένα δείγμα DNA, με συγκέντρωση 50mg/mL, έχει οπτική πυκνότητα που ισούται με τη μονάδα:

$$\text{Συγκέντρωση DNA} = (1/\text{αραίωση}) \times 50 \times O.D._{260}$$

### 3.5.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για ανάδειξη των προϊόντων των αντιδράσεων PCR τελικού σημείου

#### Παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκτροφορητική ικανότητα νουκλεϊκών οξέων

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθορισμό των τμημάτων του DNA με βάση το μέγεθός τους. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στην πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από τους ακόλουθους παράγοντες:

#### α) Μοριακό μέγεθος DNA

Η ταχύτητα μετακίνησης (απομάκρυνσης από την κάθοδο του ηλεκτρικού πεδίου μέσα στο οποίο διενεργείται η ηλεκτροφόρηση) είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των κλασμάτων DNA που ηλεκτροφορούνται.

#### β) Συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης

Η κινητικότητα ενός τμήματος DNA διαφέρει σε πηκτώματα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης. Η ταχύτητα μετακίνησης είναι αντιστρόφως ανάλογη της πυκνότητας της πηκτής. Χρησιμοποιώντας πηκτές διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA. Συνήθως για τον διαχωρισμό των προϊόντων επώασης διενεργείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης από 1% έως 3%.

% Αγαρόζης στην πηκτή	Διαχωρισμός γραμμικών DNA
<b>0.5</b>	1Kb - 30Kb
<b>0.7</b>	800bp - 12Kb
<b>1.0</b>	500bp - 10Kb
<b>1.2</b>	400bp - 7Kb
<b>1.5</b>	200bp - 3Kb
<b>2.0</b>	50bp - 2Kb
<b>3.0</b>	5bp - 1Kb

**Πίνακας 4.** Η αναλογική σχέση της διαχωριστικής ικανότητας της πηκτής αγαρόζης με την πυκνότητα.

#### γ) Στερεοδιάταξη του DNA (κλειστό κυκλικό, ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό)

Η κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή, η ανοιχτή κυκλική μορφή και το γραμμικό DNA του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτή αγαρόζης. Οι σχετικές κινητικότητες των τριών μορφών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στην πηκτή, αλλά επηρεάζονται επίσης από την ένταση του ρεύματος, την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και το βαθμό υπερελίκωσης της κλειστής κυκλικής μορφής του DNA.

#### δ) Τάση του ηλεκτρικού πεδίου

Η ταχύτητα με την οποία κινείται το DNA στο πήκτωμα κατά την ηλεκτροφόρηση είναι ανάλογη με την τάση που εφαρμόζεται, δηλαδή ανάλογη με την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος, που διαπερνά το πήκτωμα. Η αύξηση της τάσης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του κάθε τμήματος DNA με διαφορετικό συντελεστή, ο οποίος εξαρτάται από το μοριακό βάρος του κομματιού DNA. Για το λόγο αυτό, καθώς αυξάνεται η τάση μειώνεται η αξιοπιστία και η διαχωριστική ικανότητα των πηκτωμάτων αγαρόζης. Ο καλύτερος διαχωρισμός επιτυγχάνεται, όταν το DNA ηλεκτροφορείται σε τάση μικρότερη ή ίση με 5 Volts ανά εκατοστό μήκους πεδίου.

#### Ανάδειξη των προϊόντων των αντιδράσεων ARMS-PCR και AS-PCR, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3.0%

#### **Παρασκευή πηκτής αγαρόζης 3.0%**

- Ζυγίζονται 3.0g αγαρόζης

- Διαλύονται σε 100mL ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1x (90mM Tris / 100mM Boric Acid, 2mM EDTA, pH8.0)
- Η φιάλη θερμαίνεται με ταυτόχρονη ανάδευση μέχρι να διαλυθεί τελείως η αгарόζη
- Προστίθενται 3uL βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr 0.5μg/mL)
- Το διάλυμα ρίχνεται σε κατάλληλα προετοιμασμένο εκμαγείο, στο οποίο έχει τοποθετηθεί ειδική "χτένα", για τη δημιουργία των θέσεων (slots), στις οποίες θα τοποθετηθούν τα δείγματα.

### Τεχνική

Τα προϊόντα των ARMS-PCR και AS-PCR αναλύονται μέσω ηλεκτροφόρησης, σε πηκτή αгарόζης 3.0% πυκνή (Agarose Molecular Biology Reagent, Sigma-Aldrich), όπου εμπεριέχεται βρωμιούχο αιθίδιο (0.5μg/mL). Μόλις 10uL προϊόντος περιέχουν αρκετή ποσότητα νουκλεϊκών οξέων για την ανάλυση. Ως μάρτυρας μεγέθους, ηλεκτροφορούνται παράλληλα 500ng τεχνητών τμημάτων DNA διαφορετικών μεγεθών (100bp DNA ladder, Invitrogen).

### 3.5.3 Ανίχνευση μεταλλάξεων με την τεχνική της Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας Ανάλυση της Καμπύλης Τήξης προϊόντων PCR Πραγματικού Χρόνου (post Real Time PCR HRMA)

Παραλλαγή της κλασικής PCR (PCR) αποτελεί η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR), όπου η ενίσχυση των προϊόντων της αντίδρασης καταγράφεται σε υπολογιστικό σύστημα, καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

Αυτό επιτυγχάνεται μέσω κάμερας υψηλής ευκρίνειας (CCD), η οποία ανιχνεύει τα διαρκώς αυξανόμενα επίπεδα φθορίζουσας ακτινοβολίας, συγκεκριμένου μήκους κύματος, που εκπέμπονται καθ' όλη τη διαδικασία ενίσχυσης, από ειδικά φθοριοχρώματα.

Οι φθορίζουσες αυτές χρωστικές, είτε κυκλοφορούν στο διάλυμα της αντίδρασης ως μη-δεσμευμένα μόρια, οπότε προσδένονται στα δίκλινα προϊόντα της αντίδρασης κατά τρόπο μη-ειδικό, είτε προσαρτώνται επί τροποποιημένων ολιγονουκλεοτιδικών



αλληλουχιών, όπως οι ιχνηθέτες υβριδοποίησης (hybridization probes) και οι ιχνηθέτες υδρόλυσης (hydrolysis probes).

1) Η πρώτη κατηγορία αφορά σε φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται μη-ειδικά στο δίκλωνο DNA (dsDNA) και όταν διεγείρονται αποδίδουν ακτινοβολία ανιχνεύσιμου μήκους κύματος. Μάλιστα, η ένταση της ακτινοβολίας είναι ισχυρότερη όταν η χρωστική είναι προσδεσμένη σε δίκλιωνα μόρια DNA, συγκριτικά με την ελεύθερη μορφή αυτής, στο διάλυμα, οπότε τα επίπεδα φθορισμού (background signal) είναι ιδιαιτέρως χαμηλά και δεν επηρεάζουν τις μετρήσεις κατά την ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων της PCR πραγματικού χρόνου (HRMA).

Βασικό μειονέκτημα αυτής της κατηγορίας χρωστικών αποτελεί η μη-ειδική πρόσδεση, σε οποιαδήποτε δίκλιωνα νουκλεοτιδική αλληλουχία συντεθεί, κατά την αντίδραση πολυμεράσης. Συνεπώς απαιτείται ιδιαίτερα προσεκτικός σχεδιασμός εκκινητών και επιλογή κατάλληλων συνθηκών αντίδρασης, ώστε να αυξηθεί η ειδικότητα αυτής (specificity) και να αποφευχθεί η σύνθεση μη αναμενόμενων προϊόντων.

Ωστόσο, πλεονέκτημα αποτελεί η δυνατότητα παρατήρησης οποιασδήποτε αλλαγής στην υπό διερεύνηση νουκλεοτιδική ακολουθία, που ορίζεται από τους εκκινητές της αντίδρασης. Με τον τρόπο αυτό, είναι δυνατόν να ανιχνευθούν επιπρόσθετες μεταλλάξεις, ανεξάρτητες εκείνων που είναι ήδη γνωστές και για τι οποίες πραγματοποιείται η ανάλυση εξ αρχής.

2) Στον αντίποδα, οι φθορίζοντες ιχνηθέτες, ανιχνεύουν συγκεκριμένες μόνον μεταλλάξεις, αφού ουσιαστικά αποτελούν ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά με το υπόστρωμα, τα οποία προσδένονται μόνον παρουσία της μετάλλαξης που διερευνά το εκάστοτε πρωτόκολλο. Ωστόσο, η ευαισθησία και η ειδικότητα αυτού του τύπου των ανιχνευτών είναι ιδιαίτερα αυξημένη.

Η τεχνική της υψηλής διακριτικής ικανότητας, ανάλυσης της καμπύλης τήξης των προϊόντων PCR πραγματικού χρόνου (post Real Time PCR HRMA), επιλέχθηκε για τη συγκεκριμένη μελέτη, τόσο για την ευαισθησία και την αξιοπιστία που παρέχει, όσο και για την ταχύτητα ανάκτησης των δεδομένων, για το χαμηλό της κόστος, καθώς και για την ευκολία σχεδιασμού πρωτοκόλλων και εκτέλεσης των πειραματικών διαδικασιών, κυρίως όμως για τη δυνατότητα να ανιχνεύει και πιο σπάνιες μεταλλάξεις στις υπό διερεύνηση γενωμικές περιοχές.

Συνοπτικά, τα προϊόντα της PCR με το πέρας της ενίσχυσης, εντοπίζονται σε δίκλιωνα κατάσταση εκπέμποντας μέγιστα επίπεδα φθορισμού. Ακολουθεί σταδιακή αποδιάταξη αυτών, με βαθμιαία αύξηση της θερμοκρασίας, οπότε και ο φθορισμός

φθίνει, φτάνοντας σε μηδενικά επίπεδα όταν πλέον όλα τα μόρια εντοπίζονται σε μονόκλωνη κατάσταση.

Η καμπύλη τήξης προκύπτει από την ανάλυση των επιπέδων φθορισμού ανά το χρόνο, μετά από κανονικοποίηση των δεδομένων. Η ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού LightCycler 480 Gene Scanning Software v.1.5.1.74.

Με την τεχνική αυτή, στην παρούσα μελέτη, ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στα γονίδια *CALR*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *SETBP1*, *SRSF2*, *CSF3R* και *KIT*.

- Το πρότυπο της καμπύλης στα φυσιολογικά δείγματα διαφέρει σε σύγκριση με τα δείγματα που φέρουν μεταλλάξεις σε ετερόζυγη ή ομόζυγη κατάσταση, αλλά και στις δύο αυτές καταστάσεις μεταξύ τους.
- Παράλληλα με τα δείγματα προς ταυτοποίηση, σε κάθε αναλυτική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε, ίση ποσότητα από πρότυπα δείγματα αναφοράς (control samples), από φυσιολογικούς δότες, αλλά και από ασθενείς με μεταλλάξεις στις υπό μελέτη γενωμικές περιοχές, ο γονότυπος των οποίων χαρακτηρίστηκε σταδιακά μέσω HRMA, ακολουθούμενης από προσδιορισμό αλληλουχίας κατά Sanger.
- Δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκαν απροσδιόριστες αποκλίσεις στην καμπύλη τήξης, συγκριτικά με τα δείγματα αναφοράς, αναλύθηκαν εκ νέου με προσδιορισμό αλληλουχίας κατά Sanger, για ταυτοποίηση των πολυμορφικών θέσεων.

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με κατάλληλα λογισμικά, συγκεκριμένα τα Oligo Primer Analysis Software v. 7 (Molecular Biology Insights), PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen) και Tm Calculator (Applied Biosystems).

Σε κάθε περίπτωση, η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα (annealing temperature,  $T_a$ ), για τη σύνθεση προϊόντων υψηλής ειδικότητας, ανιχνεύτηκε πειραματικά μέσω PCR διαβαθμιζόμενων θερμοκρασιών (gradient PCR), σε συσκευή Bio-Rad T100 Thermal Cycler, συνοδευόμενη από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή.

#### Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης των εκκινητών με gradient PCR

Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf παρασκευάζεται διάλυμα προσθέτοντας διαδοχικά τα απαραίτητα αντιδραστήρια, όπως φαίνεται στα πρωτόκολλα που ακολουθούν. Το εκάστοτε πρωτόκολλο αφορά σε οκτώ αντιδράσεις gradient PCR.

A.	<i>CALR</i> εξόνιο 9	<i>CSF3R</i> εξόνιο 14	<i>DNMT3A</i> εξόνιο 23	<i>IDH2</i> εξόνιο 4	<i>SETBP1</i> εξόνιο 4	<i>SF3B1</i> εξόνιο 14	<i>SF3B1</i> εξόνιο	<i>SRSF2</i> εξόνιο 1
----	-------------------------	---------------------------	----------------------------	-------------------------	---------------------------	---------------------------	------------------------	--------------------------

Υπόστρωμα	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL
DNA (5ng/uL)	(1.25 ng/uL)	(1.25 ng/uL)	(1.25 ng/uL)	(1.25 ng/uL)	(1.25 ng/uL)	(1.25 ng/uL)	(1.25 ng/uL)	(1.25 ng/uL)
HRM mix (2x)*	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	8uL (2.5mM)	8.0uL (2.5mM)	8.0uL (2.5mM)	9.6uL (3.0mM)	8.0uL (2.5mM)	9.6uL (3.0mM)	8.0uL (2.5mM)	8.0uL (2.5mM)
Εκκινητής 1 (25uM)	3.2uL (1.0uM) CALR. e9.HF	1.6uL (0.5uM) CSF3R. e14.HF	1.6uL (0.5uM) DNMT3A. e23.HF	1.12uL (0.35uM) IDH2. e4.HF	1.28uL (0.4uM) SETBP1. e4.HF	3.2uL (1.0uM) SF3B1. e14.HF	1.6uL (0.5uM) SF3B1. e15.HF	1.6uL (0.5uM) SRSF2. e1.HF
Εκκινητής 2 (25uM)	1.6uL (0.5uM) CALR. e9.HR	1.6uL (0.5uM) CSF3R. e14.HR	1.6uL (0.5uM) DNMT3A. e23.HR	1.12uL (0.35uM) IDH2. e4.HR	1.28uL (0.4uM) SETBP1. e4.HR	3.2uL (1.0uM) SF3B1. e14.HR	1.6uL (0.5uM) SF3B1. e15.HR	1.6uL (0.5uM) SRSF2. e1.HR
ddH <sub>2</sub> O	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL

A.	<i>U2AF1</i> εξόνιο 2	<i>U2AF1</i> εξόνιο 6	B.	<i>ASXL1</i> εξόνιο 12	<i>IDH1</i> εξόνιο 4	<i>KIT</i> εξόνιο 17
Υπόστρωμα	20uL	20uL	Υπόστρωμα	20uL	20uL	20uL
DNA (5ng/uL)	(1.25 ng/uL)	(1.25 ng/uL)	DNA (5ng/uL)	(1.25 ng/uL)	(1.25 ng/uL)	(1.25 ng/uL)
HRM mix (2x)*	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)	HRM mix (2x)**	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	8.0uL (2.5mM)	6.4uL (2.0mM)	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	8uL (2.5mM)	9.6uL (3.0mM)	8.0uL (2.5mM)
Εκκινητής 1 (25uM)	1.6uL (0.5uM) U2AF1. e2.HF	0.96uL (0.3uM) U2AF1. e6.HF	Εκκινητής 1 (25uM)	1.28uL (0.4uM) ASXL1. e12.HF	0.64uL (0.2uM) IDH1. e4.HF	0.96uL (0.3uM) KIT. e17.HF
Εκκινητής 2 (25uM)	1.6uL (0.5uM) U2AF1. e2.HR	0.96uL (0.3uM) U2AF1. e6.HR	Εκκινητής 2 (25uM)	1.28uL (0.4uM) ASXL1. e12.HR	2.56uL (0.8uM) IDH1. e4.HR	0.96uL (0.3uM) KIT. e17.HR
ddH <sub>2</sub> O	Έως 80uL	Έως 80uL	ddH <sub>2</sub> O	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια για 8 αντιδράσεις gradient PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των HRMA ειδικών εκκινητών, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης στο υπόστρωμα, για καθεμιά από τις υπο διερεύνηση γενωμικές περιοχές. MgCl<sub>2</sub>: Δισθενή Κατιόντα Μαγνησίου ddH<sub>2</sub>O: Νερό \* Χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα LightCycler 480 High Resolution Melting Master (Roche Diagnostics, USA), το οποίο περιέχει ήδη ένζυμο (πολυμεράση), φθορίζουσα χρωστική υψηλής διακριτικής ικανότητας (ResoLight HRM dye), καθώς και όλα τα υπόλοιπα απαραίτητα στοιχεία της αντίδρασης πλην των ιόντων μαγνησίου, τα οποία προστίθενται ξεχωριστά. \*\* Χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα KAPA HRM FAST Master Mix (Kapa Biosystems, USA), το οποίο περιέχει ήδη ένζυμο (πολυμεράση), φθορίζουσα χρωστική υψηλής διακριτικής ικανότητας (EvaGreen HRM dye), καθώς και όλα τα υπόλοιπα απαραίτητα στοιχεία της αντίδρασης πλην των ιόντων μαγνησίου, τα οποία προστίθενται ξεχωριστά.

Καθ όλη τη διαδικασία τα υλικά διατηρούνται στον πάγο. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση. Το διάλυμα που παρασκευάστηκε, διαμοιράζεται ισόποσα, σε οκτώ ανεξάρτητα σωληνάρια τύπου Eppendorf, καθένα εκ των οποίων

τοποθετείται σε διαφορετική σειρά (row) της συσκευής PCR, ώστε πραγματοποιούνται οκτώ διαφορετικές αντιδράσεις πολυμερισμού.

Σε κάθε αντίδραση, η ικανότητα πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα, καθορίζεται από τις διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες που επικρατούν στην εκάστοτε θέση του block της συσκευής. Η παράμετρος που τροποποιείται σε κάθε περίπτωση, αφορά στη θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα (annealing temperature,  $T_a$ ), η οποία κυμαίνεται σε διαφορετικά επίπεδα ανάλογα με τη σειρά (row) του block της συσκευής, όπου τοποθετείται το σωληνάριο στο οποίο πραγματοποιείται ο εκάστοτε πολυμερισμός.

Οι υπόλοιπες συνθήκες παραμένουν όμοιες μεταξύ τους. Για τις αντιδράσεις που περιγράφονται χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Bio-Rad T100 Thermal Cycler.

Συνθήκες αντίδρασης gradient PCR
<ul style="list-style-type: none"><li>• Αρχική αποδιάταξη: 95oC - 10'</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Κυρίως αντίδραση: Διεξάγεται σε 47 κύκλους.</li></ul>
Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
<ul style="list-style-type: none"><li>• Αποδιάταξη: 95°C - 15''</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Πρόσδεση εκκινητών: 52-67°C - 30''</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Επέκταση αλληλουχίας: 72°C - 15'' και μέτρηση επιπέδων φθορισμού</li></ul>

Πίνακας 6. Συνθήκες αντιδράσεων gradient PCR για τους HRMA ειδικούς εκκινητές, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης στο υπόστρωμα.

Ανάδειξη των προϊόντων της gradient PCR, μέσω ανάλυση καμπύλης τήξης και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Τα προϊόντα της gradient PCR χαρακτηρίζονται αρχικά μέσω ανάλυσης καμπύλης τήξης (HRMA), όπου διεξάγονται συνεχόμενες μετρήσεις των επιπέδων φθορισμού.

Συνθήκες ανάλυσης καμπύλης τήξης
<ul style="list-style-type: none"><li>• Αποδιάταξη των προϊόντων: 95oC - 1'</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Επαναδιάταξη των προϊόντων: 40oC - 1'</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Θερμοκρασιακή σταθεροποίηση πρίν την έναρξη των μετρήσεων: 65oC - 1''</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Συνεχόμενες μετρήσεις επιπέδων φθορισμού (17 μετρήσεις ανά oC):</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Αρχική θερμοκρασία: 65oC</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Τελική θερμοκρασία: 99oC</li></ul>

Πίνακας 7. Συνθήκες ανάλυσης καμπύλης τήξης, των προϊόντων των αντιδράσεων gradient PCR, για τους HRMA ειδικούς εκκινητές, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης στο υπόστρωμα

Τα προϊόντα της gradient PCR αναδεικνύονται επιπροσθέτως με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή.

## Ανίχνευση μεταλλάξεων με post Real Time PCR HRMA

Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf παρασκευάζεται διάλυμα προσθέτοντας διαδοχικά τα απαραίτητα αντιδραστήρια, όπως φαίνεται στα πρωτόκολλα που ακολουθούν. Κάθε πρωτόκολλο αφορά σε μία αντίδραση Real-Time PCR ακολουθούμενη από HRMA. Με κατάλληλες αναγωγές υπολογίζεται η ποσότητα που απαιτείται για περισσότερες αντιδράσεις.

A1.	<i>CALR</i> εξόνιο 9	<i>CSF3R</i> εξόνιο 14	<i>DNMT3A</i> εξόνιο 23	<i>IDH2</i> εξόνιο 4	<i>SETBP1</i> εξόνιο 4	<i>SF3B1</i> εξόνιο 14	<i>SF3B1</i> εξόνιο 15	<i>SRSF2</i> εξόνιο 1
HRM mix (2x)*	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.0uL (2.5mM)	1.0uL (2.5mM)	1.0uL (2.5mM)	1.2uL (3.0mM)	1.0uL (2.5mM)	1.2uL (3.0mM)	1.0uL (2.5mM)	1.0uL (2.5mM)
Εκκινητής 1 (25uM)	0.4uL (1.0uM) <i>CALR</i> . e9.HF	0.2uL (0.5uM) <i>CSF3R</i> . e14.HF	0.2uL (0.5uM) <i>DNMT3A</i> . e23.HF	0.14uL (0.35uM) <i>IDH2</i> . e4.HF	0.16uL (0.4uM) <i>SETBP1</i> . e4.HF	0.4uL (1.0uM) <i>SF3B1</i> . e14.HF	0.2uL (0.5uM) <i>SF3B1</i> . e15.HF	0.2uL (0.5uM) <i>SRSF2</i> . e1.HF
Εκκινητής 2 (25uM)	0.2uL (0.5uM) <i>CALR</i> . e9.HR	0.2uL (0.5uM) <i>CSF3R</i> . e14.HR	0.2uL (0.5uM) <i>DNMT3A</i> . e23.HR	0.14uL (0.35uM) <i>IDH2</i> . e4.HR	0.16uL (0.4uM) <i>SETBP1</i> . e4.HR	0.4uL (1.0uM) <i>SF3B1</i> . e14.HR	0.2uL (0.5uM) <i>SF3B1</i> . e15.HR	0.2uL (0.5uM) <i>SRSF2</i> . e1.HR
ddH <sub>2</sub> O	0.9uL	1.1uL	1.1uL	1.02uL	1.18uL	0.5uL	1.1uL	1.1uL
Συνολικός όγκος αντίδρασης	7.5uL	7.5uL	7.5uL	7.5uL	7.5uL	7.5uL	7.5uL	7.5uL

A2.	<i>U2AF1</i> εξόνιο 2	<i>U2AF1</i> εξόνιο 6	B.	<i>ASXL1</i> εξόνιο 12	<i>IDH1</i> εξόνιο 4	<i>KIT</i> εξόνιο 17
HRM mix (2x)*	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	HRM mix (2x)**	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.0uL (2.5mM)	0.8uL (2.0mM)	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.0uL (2.5mM)	1.2uL (3.0mM)	1.0uL (2.5mM)
Εκκινητής 1 (25uM)	0.2uL (0.5uM) <i>U2AF1</i> . e2.HF	0.12uL (0.3uM) <i>U2AF1</i> . e6.HF	Εκκινητής 1 (25uM)	0.16uL (0.4uM) <i>ASXL1</i> . e12.HF	0.08uL (0.2uM) <i>IDH1</i> . e4.HF	0.12uL (0.3uM) <i>KIT</i> . e17.HF
Εκκινητής 2 (25uM)	0.2uL (0.5uM) <i>U2AF1</i> . e2.HR	0.12uL (0.3uM) <i>U2AF1</i> . e6.HR	Εκκινητής 2 (25uM)	0.16uL (0.4uM) <i>ASXL1</i> . e12.HR	0.32uL (0.8uM) <i>IDH1</i> . e4.HR	0.12uL (0.3uM) <i>KIT</i> . e17.HR
ddH <sub>2</sub> O	1.1uL	1.46uL	ddH <sub>2</sub> O	1.68uL	0.9uL	1.26uL
Συνολικός όγκος αντίδρασης	7.5uL	7.5uL	Συνολικός όγκος αντίδρασης	8.0uL	7.5uL	7.5uL

Πίνακας 8. Αντιδραστήρια για 1 αντίδραση Real-Time PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των HRMA ειδικών εκκινητών, σε καθεμιά από τις υπο διερεύνηση γενωμικές περιοχές. MgCl<sub>2</sub>: Δισθενή Κατίοντα Μαγνησίου ddH<sub>2</sub>O: Νερό \* Χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα LightCycler 480 High Resolution Melting Master (Roche

Diagnostics, USA), το οποίο περιέχει ήδη ένζυμο (πολυμεράση), φθορίζουσα χρωστική υψηλής διακριτικής ικανότητας (ResoLight HRM dye), καθώς και όλα τα υπόλοιπα απαραίτητα στοιχεία της αντίδρασης πλην των ιόντων μαγνησίου, τα οποία προστίθενται ξεχωριστά. \*\* Χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα KAPA HRM FAST Master Mix (Kapa Biosystems, USA), το οποίο περιέχει ήδη ένζυμο (πολυμεράση), φθορίζουσα χρωστική υψηλής διακριτικής ικανότητας (EvaGreen HRM dye), καθώς και όλα τα υπόλοιπα απαραίτητα στοιχεία της αντίδρασης πλην των ιόντων μαγνησίου, τα οποία προστίθενται ξεχωριστά.

Καθ' όλη τη διαδικασία τα υλικά διατηρούνται στον πάγο. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση. Το διάλυμα ισοκατανέμεται σε ειδικά διαμορφωμένα ξεχωριστά κελιά μίας πλάκας μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων, σε ποσότητα ίση με εκείνη που αναφέρεται στον πίνακα ως συνολικός όγκος αντίδρασης. Κατόπιν, στις διαφορετικές θέσεις της πλάκας, διαμοιράζεται ποσότητα διαλύματος DNA με συγκέντρωση 5ng/uL, μέχρι τελικού όγκου 10uL. Στη συνέχεια, η πλάκα καλύπτεται με διαφανή μεμβράνη (sealing film) για αποφυγή εξάτμισης του μείγματος κατά την αντίδραση. Έπεται σύντομη φυγοκέντρηση της πλάκας (90", 1500rpm) και αντίδραση πολυμερισμού ακολουθούμενη από ανάλυση καμπύλης τήξης των προϊόντων σε κλειστό σύστημα LightCycler480 Real Time PCR, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

#### Συνθήκες αντίδρασης Real-Time PCR

- **Αρχική αποδιάταξη: 95oC - 10'**
- **Κυρίως αντίδραση: Διεξάγεται σε 47 κύκλους.**

#### Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

- **Αποδιάταξη: 95°C - 15"**
- **Πρόσδεση εκκινητών: x°C - 30"**  
x°C = 52°C (*SF3B1* εξόνιο 14)  
x°C = 59°C (*IDH1* εξόνιο 4, *IDH2* εξόνιο 4, *SF3B1* εξόνιο 15, *U2AF1* εξόνιο 2, *KIT* εξόνιο 17)  
x°C = 67°C (*CALR* εξόνιο 9, *ASXL1* εξόνιο 12, *DNMT3A* εξόνιο 23, *U2AF1* εξόνιο 6, *SETBP1* εξόνιο 4, *SRSF2* εξόνιο 1, *CSF3R* εξόνιο 14)
- **Επέκταση αλληλουχίας: 72°C - 15'' και μέτρηση επιπέδων φθορισμού**

#### Συνθήκες HRMA

- **Αποδιάταξη των προϊόντων: 95oC - 1'**
- **Επαναδιάταξη των προϊόντων: 40°C - 1'**
- **Θερμοκρασιακή σταθεροποίηση πρίν την έναρξη των μετρήσεων: 65°C - 1''**
- **Συνεχόμενες μετρήσεις επιπέδων φθορισμού (17 μετρήσεις ανά °C):**
  - **Αρχική θερμοκρασία: 65°C**
  - **Τελική θερμοκρασία: 99°C**

Πίνακας 9. Συνθήκες αντίδρασεων Real-Time PCR ενίσχυσης και ανάλυσης καμπύλης τήξης για τους HRMA ειδικούς εκκινητές.

Η καταγραφή της αύξησης των επιπέδων φθορισμού ανά το χρόνο, που οφείλεται στη συνθετική διαδικασία, καθώς και η καταγραφή των επιπέδων φθορισμού για το σχεδιασμό της καμπύλης τήξης των προϊόντων της Real Time PCR, πραγματοποιείται

σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού (LightCycler 480 Gene Scanning Software v.1.5.1.74, Roche Diagnostics, USA), όπου αποθηκεύονται τα δεδομένα της αντίδρασης

#### Ανάλυση των δεδομένων της post Real Time PCR HRMA

Μετά την HRMA, ακολουθεί ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν με το λογισμικό LightCycler 480 Gene Scanning Software v.1.5.1.74 (Roche Diagnostics, USA).

Αρχικά προσδιορίζεται ο χρόνος ανάδειξης των προϊόντων (cycling point, Cp), οπότε και χαρακτηρίζεται η αριθμητική επάρκεια αυτών για περαιτέρω αναλύσεις.

Έπειτα προσδιορίζεται η θερμοκρασία κατά την οποία το 50% των προϊόντων της αντίδρασης έχει αποδιαταχθεί (melting temperature, Tm).

Ακολουθεί καθορισμός των ακραίων τιμών επιπέδων φθορισμού, 100% και 0%. Η πρώτη τιμή χαρακτηρίζει προϊόντα σε δίκλωνη κατάσταση, τα οποία ανιχνεύονται κατά την έναρξη της ανάλυσης καμπύλης τήξης, ενώ η τελευταία αφορά σε μονόκλινα προϊόντα, τα οποία έχουν αποδιαταχθεί λόγω έντονης θερμοκρασιακής αύξησης και τα οποία ανιχνεύονται μετά το πέρας της ανάλυσης καμπύλης τήξης.

Αμέσως μετά καθορίζονται τα επίπεδα θορύβου του φθορισμού (background fluorescence), πραγματοποιείται κανονικοποίηση των δεδομένων, ενώ τέλος γίνεται ομαδοποίηση (grouping) των διαφορετικών γονότυπων που έχουν ανιχνευθεί.

#### Μέτρα ελέγχου ακρίβειας της post Real Time PCR HRMA (PCR controls)

##### **α) Αποκλεισμός των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων**

Παράλληλα με τα προς έλεγχο δείγματα DNA, εξετάζονται δύο δείγματα φυσιολογικών ατόμων χωρίς μεταλλάξεις στα επι μέρους εξόνια των υπο διερεύνηση γονιδίων ("αρνητικός μάρτυρας").

##### **β) Αποκλεισμός ανεπιθύμητης πρόσμειξης (contamination) των υλικών**

Σε κάθε πείραμα συμπεριλαμβάνονται δύο αντιδράσεις οι οποίες περιέχουν όλα τα αντιδραστήρια όχι όμως DNA. Η απαραίτητη υπολειπόμενη ποσότητα αντίδρασης μέχρι τα 10uL, καλύπτεται με την προσθήκη 2.5uL HPLC grade H<sub>2</sub>O.

##### **γ) Επιβεβαίωση της λειτουργικότητας της αντίδρασης και ομαδοποίηση των δεδομένων (αληθώς θετικά αποτελέσματα)**

Σε κάθε ξεχωριστή πειραματική διαδικασία, συμπεριλαμβάνονται δείγματα ασθενών, που φέρουν μεταλλάξεις επι μέρους εξόνια των γονιδίων που αναλύονται

(“θετικός μάρτυρας”). Τα δείγματα αυτά έχουν αναλυθεί εκ των προτέρων στο εργαστήριο, ενώ παράλληλα έχει επιβεβαιωθεί και ταυτοποιηθεί η εκάστοτε μετάλλαξη μέσω ανάλυσης πρωτοδιάταξης νουκλεϊκών οξέων (DNA Sequencing).

Προσδιορισμός της κατάστασης μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1 με MS-HRMA και MSP.

### 3.5.4 Επεξεργασία του DNA με δισουλφίδιο του νατρίου

Η επεξεργασία του DNA με δισουλφίδιο του νατρίου έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή των μη-μεθυλιωμένων βάσεων κυτοσίνης (C), σε νουκλεοτίδια ουρακίλης (U), τα οποία καταλήγουν σε θυμίνη (T), έπειτα από ενίσχυση μέσω αντίδρασης πολυμεράσης. Ωστόσο, τα τροποποιημένα μόρια μεθυλοκυτοσίνης (5'-mC) και υδροξυμεθυλοκυτοσίνης (5'-hmC), που προηγούνται μίας γουανίνης δεν επηρεάζονται από τη χημική κατεργασία. Ως αποτέλεσμα, οι γενωμικές περιοχές με μεθυλιωμένα μόρια κυτοσίνης, διαφέρουν σε αλληλουχία, συγκριτικά με όμοιες τους περιοχές χωρίς επιγενετική τροποποίηση.

Αυτή η διαφορά στη νουκλεοτιδική ακολουθία γίνεται ανιχνεύσιμη τόσο μέσω μεθυλοειδικής HRMA (MS-HRMA), όσο και μέσω μεθυλοειδικής πυροαλληλούχισης (MSP), τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως σε μελέτες μεθυλίωσης του γονιδιώματος.

Στην παρούσα εργασία, προσδιορίστηκε το πρότυπο μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, σε φυσιολογικά άτομα πληθυσμού, καθώς και σε ασθενείς με MI και με ΜΔΣ/MYN, τόσο μέσω MS-HRMA, σε συσκευή LightCycler480 (Roche), όσο και μέσω MSP, σε συσκευή PyroMark Q96 (Qiagen). Η κατάσταση μεθυλίωσης των διάσπαρτων στοιχείων LINE-1, παρέχει μία κατά προσέγγιση εκτίμηση των επιπέδων μεθυλίωσης στο σύνολο του γονιδιώματος. Τα αποτελέσματα της μελέτης αναλύθηκαν συγκριτικά για τις τρεις κοορτές, για κάθε τεχνική ξεχωριστά.

Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα DNA, επεξεργασμένα με δισουλφίδιο του νατρίου, με το εμπορικά διαθέσιμο EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.



### 3.5.5 Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης των εκκινητών με gradient PCR

Ο σχεδιασμός των εκκινητών για τις δύο διαφορετικές πειραματικές διαδικασίες, έγινε μέσω κατάλληλων λογισμικών προγραμμάτων (Oligo 7; Qiagen PyroMark Assay Design 2.0, Applied Biosystems Tm Calculator). Η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα (annealing temperature, Ta), για τη σύνθεση προϊόντων υψηλής ειδικότητας, ανιχνεύτηκε πειραματικά μέσω PCR διαβαθμιζόμενων θερμοκρασιών (gradient PCR), σε συσκευή Bio-Rad T100 Thermal Cycler. Για έξι αντιδράσεις gradient PCR χρησιμοποιήσαμε τις ακόλουθες αναλογίες.

<b>Αντιδραστήρια gradient PCR για τους MS-HRMA LINE-1 εκκινητές</b>	
<b>Υπόστρωμα DNA (6ng/uL)</b>	60.0uL (3ng/uL)
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα (10x) *</b>	12.0uL (1x)
<b>MgCl<sub>2</sub> (50mM) **</b>	6.0uL (2.5mM)
<b>dNTPs (40mM)</b>	3.0uL (1.0mM)
<b>Εκκινητής h.LINE-1.1 (25.0uM)</b>	1.92uL (0.4nM) pF
<b>Εκκινητής h.LINE-1.2 (25.0uM)</b>	1.92uL (0.4nM) pR
<b>Ένζυμο (5U/uL) ***</b>	0.6uL (3.0U)
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Έως 120uL

**Πίνακας 10.** Αναλώσιμα για 6 αντιδράσεις gradient PCR ενίσχυσης του υποστρώματος, των MS-HRMA ειδικών εκκινητών, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης στα στοιχεία LINE-1. \* Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος 10x: 200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl. \*\* Platinum Taq DNA Polymerase. Προέλευση: Thermo-Fischer.

<b>Αντιδραστήρια gradient PCR για τους MSP LINE-1 εκκινητές</b>	
<b>Υπόστρωμα DNA</b>	18.0uL
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα (10x) *</b>	18.0uL (1x)
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM) **</b>	4.5uL (0.625mM)
<b>dNTPs (5mM)</b>	7.2uL (200nM)
<b>Εκκινητής p.LINE-1.1 (11.25uM)</b>	2.4uL (150nM) pF
<b>Εκκινητής p.LINE-1.2 (11.25uM)</b>	4.8uL (300nM) pR
<b>Ένζυμο (5U/uL) ***</b>	0.9uL (1.25U)
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Έως 180uL

**Πίνακας 11.** Αναλώσιμα για 6 αντιδράσεις gradient PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MSP ειδικών εκκινητών, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης στα στοιχεία LINE-1. \* Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος 10x: Tris-HCl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.7. \*\* Η συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου που περιέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα, υπολογίζεται σε 1.5mM, κατόπιν προσθήκης αυτού στην αντίδραση σε τελική συγκέντρωση 1x. Η συγκέντρωση αυτή του μαγνησίου συνυπολογίζεται εκ των προτέρων, κατά το σχεδιασμό της αντίδρασης, στη συνολική ποσότητα ιόντων που επιθυμούμε τελικώς στην αντίδραση. \*\*\* HotStarTaq DNA Polymerase. Προέλευση: Qiagen.

Καθόλη τη διαδικασία τα υλικά διατηρούνται στον πάγο. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση. Κατόπιν, το διάλυμα που παρασκευάστηκε, διαμοιράζεται ισόποσα, σε έξι ανεξάρτητα σωληνάρια τύπου Eppendorf, καθένα εκ των οποίων τοποθετείται σε διαφορετική σειρά (row) της συσκευής PCR, προκειμένου να πραγματοποιηθούν έξι διαφορετικές αντιδράσεις πολυμερισμού.

Σε κάθε αντίδραση η ικανότητα πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα καθορίζεται από τις διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες που επικρατούν στην εκάστοτε θέση του block της συσκευής. Η παράμετρος που τροποποιείται σε κάθε περίπτωση, αφορά στη θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα (annealing temperature, Ta), η οποία κυμαίνεται σε διαφορετικά επίπεδα ανάλογα με τη σειρά (row) του block της συσκευής, όπου τοποθετείται το σωληνάριο στο οποίο πραγματοποιείται ο εκάστοτε πολυμερισμός. Οι υπόλοιπες συνθήκες παραμένουν όμοιες μεταξύ τους. Για τις αντιδράσεις που περιγράφονται χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Bio-Rad T100 Thermal Cycler. Οι συνθήκες της αντίδρασης, που ακολουθούνται για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό των επιλεγμένων τμημάτων, περιγράφονται στη συνέχεια.

<b>Συνθήκες αντίδρασης gradient PCR για τους MS-HRMA LINE-1 εκκινητές</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αρχική αποδιάταξη: 94°C - 15'</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Κυρίως αντίδραση: Διεξάγεται σε 45 κύκλους.</li> </ul>
<b>Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αποδιάταξη: 94°C - 15''</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Πρόσδεση εκκινητών: 50-67°C - 30''</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Επέκταση αλληλουχίας: 72°C - 15''</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Τελική επέκταση των συντιθέμενων τμημάτων DNA: 72°C - 10'</li> </ul>

**Πίνακας 12.** Συνθήκες αντιδράσεων gradient PCR ενίσχυσης του υποστρώματος, των MS-HRMA ειδικών εκκινητών, για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης επί των LINE-1.

<b>Συνθήκες αντίδρασης gradient PCR για τους MSP LINE-1 εκκινητές</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αρχική αποδιάταξη: 95°C - 15'</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Κυρίως αντίδραση: Διεξάγεται σε 40 κύκλους.</li> </ul>
<b>Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αποδιάταξη: 95°C - 20''</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Πρόσδεση εκκινητών: 50-60°C - 40''</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Επέκταση αλληλουχίας: 72°C - 30''</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Τελική επέκταση των συντιθέμενων τμημάτων DNA: 72°C - 10'</li> </ul>

**Πίνακας 13.** Συνθήκες αντιδράσεων gradient PCR ενίσχυσης του υποστρώματος, των MSP ειδικών εκκινητών, για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης επί των LINE-1.

### 3.5.6 Ανάδειξη των προϊόντων της gradient PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Τα προϊόντα gradient PCR αναδεικνύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης . Η αγαρόζη είναι γραμμικός πολυσακχαρίτης ουδέτερου φορτίου που απομονώνεται από θαλάσσια φύκη. Όταν μετατρέπεται σε πήκτωμα, δημιουργεί πόρους κατάλληλου μεγέθους για το διαχωρισμό μεγάλων μακρομορίων, με βάση το μέγεθός τους.

Στην πηκτή προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο, μια αρωματική ένωση που παρεμβάλλεται στα δίκλινα μόρια νουκλεϊκών οξέων, προσδένεται σε αυτά και, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, αποδίδει ορατό φως, που μπορεί να καταγραφεί, αναδεικνύοντας την θέση τους, μετά την ηλεκτροφόρηση.

Η θέση αυτή αποτελεί ένδειξη για το μέγεθός τους , το οποίο μάλιστα μπορεί να καθορισθεί με σύγκριση προς ένα “μάρτυρα μεγέθους” που ηλεκτροφορείται παράλληλα. Ο μάρτυρας μεγέθους αποτελεί μία τεχνητά παρασκευασμένη ομάδα καταταμημένων τμημάτων DNA συγκεκριμένων μεγεθών.

#### PCR για ενίσχυση των υπό διερεύνηση περιοχών

Ακολούθησε ενίσχυση μέσω PCR, πριν από διερεύνηση της κατάστασης μεθυλίωσης των γενωμικών περιοχών, τόσο μέσω HRMA, όσο και μέσω MSP. Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf προστίθενται διαδοχικά τα απαραίτητα αντιδραστήρια, όπως φαίνεται στο πρωτόκολλο που ακολουθεί και το οποίο αφορά σε μία αντίδραση. Με κατάλληλες αναγωγές υπολογίζεται η ποσότητα των αναλωσίμων που απαιτείται για περισσότερες αντιδράσεις.

<i>Αντιδραστήρια για PCR ενίσχυση με τους MS-HRMA LINE-1 εκκινητές</i>	
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα (10x) *</b>	2.0uL (1x)
<b>MgCl<sub>2</sub> (50mM) **</b>	1.0uL (2.5mM)
<b>dNTPs (40mM)</b>	0.5uL (1.0mM)
<b>Εκκινητής h.LINE-1.1 (25.0uM)</b>	0.32uL (0.4nM) pF
<b>Εκκινητής h.LINE-1.2 (25.0uM)</b>	0.32uL (0.4nM) pR
<b>Ένζυμο (5U/uL) ***</b>	0.1uL (0.5U)
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Έως 10uL

**Πίνακας 14.** Αντιδραστήρια για 1 αντίδραση PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MS-HRMA ειδικών εκκινητών, για προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των LINE-1. \* Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος 10x: 200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl. \*\* Platinum Taq DNA Polymerase. Προέλευση: Thermo-Fischer

<b>Αντιδραστήρια για PCR ενίσχυση με τους MSP LINE-1 εκκινητές</b>	
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα (10x) *</b>	3.0uL (1x)
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM) **</b>	0.75uL (0.625mM)
<b>dNTPs (5mM)</b>	1.2uL (200nM)
<b>Εκκινητής p.LINE-1.1 (11.25uM)</b>	0.4uL (150nM) pF
<b>Εκκινητής p.LINE-1.2 (11.25uM)</b>	0.8uL (300nM) pR
<b>Ένζυμο (5U/uL) ***</b>	0.15uL (1.25U)
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Έως 27uL

**Πίνακας 15.** Αντιδραστήρια για 1 αντίδραση PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MSP ειδικών εκκινητών, για προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των LINE-1. \* Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος 10x: Tris-HCl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.7. \*\* Η συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου που περιέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα, υπολογίζεται σε 1.5mM, κατόπιν προσθήκης αυτού στην αντίδραση σε τελική συγκέντρωση 1x. Η συγκέντρωση αυτή του μαγνησίου συνυπολογίζεται εκ των προτέρων, κατά το σχεδιασμό της αντίδρασης, στη συνολική ποσότητα ιόντων που επιθυμούμε τελικώς στην αντίδραση. \*\*\* HotStarTaq DNA Polymerase. Προέλευση: Qiagen.

Καθ όλη τη διαδικασία τα υλικά διατηρούνται στον πάγο. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση. Το διάλυμα ισοκατανέμεται σε ξεχωριστά σωληνάρια τύπου Eppendorf για κάθε δείγμα, σε ποσότητα ίση με εκείνη που αναφέρεται στον πίνακα ως συνολικός όγκος αντίδρασης.

- Κατόπιν, για την MS-HRM σε κάθε προσημειωμένο σωληνάριο, διαμοιράζονται συνολικά 10uL διαλύματος DNA προ-επεξεργασμένου με δισουλφίδιο του νατρίου και αραιωμένου σε συγκέντρωση (6ng/uL), τόσο από τα προς ανάλυση δείγματα, όσο και από τα δειγμάτα αναφοράς, μέχρι τελικού όγκου αντίδρασης 20uL. Τα δείγματα αναφοράς διαμοιράζονται σε ποσότητες όπως αυτές περιγράφονται στον πιο κάτω πίνακα, ώστε να σχηματιστεί μία πρότυπη καμπύλη αναφοράς, που αφορά σε διαβαθμιζόμενα ποσοστά μεθυλίωσης. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση κάθε σωληναρίου, τα οποία έπειτα τοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή για *in vitro* αντίδραση πολυμερισμού. Για τις αντιδράσεις που περιγράφονται χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Roche LightCycler480.

Ποσοστό μεθλίωσης που αντιστοιχεί σε κάθε σημείο της πρότυπης καμπύλης	Απαιτούμενη ποσότητα από πλήρως μεθυλιωμένο δείγμα αναφοράς (uL) (100%)	Απαιτούμενη ποσότητα από πλήρως μη-μεθυλιωμένο δείγμα αναφοράς (uL) (0%)
100 %	10.0	0.0
90 %	9.0	1.0
70 %	7.0	3.0
50 %	5.0	5.0
30 %	3.0	7.0
10 %	1.0	9.0
0 %	0.0	10.0

Πίνακας 16. Ποσοστό μεθλίωσης δειγμάτων για σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης.

- Αντίστοιχα για την MSP σε κάθε προσημειωμένο σωληνάριο, διαμοιράζονται 3uL διαλύματος DNA προηγουμένως επεξεργασμένου με διθειοβιταμίνη του νατρίου, μέχρι τελικού όγκου αντίδρασης 30uL. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση κάθε σωληναρίου, τα οποία έπειτα τοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή για *in vitro* αντίδραση πολυμερισμού. Για τις αντιδράσεις που περιγράφονται χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Bio-Rad T100 Thermal Cycler.

Οι συνθήκες της αντίδρασης για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό των στοιχείων LINE-1 περιγράφονται στη συνέχεια.

Συνθήκες αντίδρασης PCR ενίσχυσης με τους MS-HRMA LINE-1 εκκινητές
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αρχική αποδιάταξη: 94°C - 8'</li> <li>• Κυρίως αντίδραση: Διεξάγεται σε 45 κύκλους.</li> </ul>
Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αποδιάταξη: 94°C - 15"</li> <li>• Πρόσδεση εκκινητών: 60°C - 30"</li> <li>• Επέκταση αλληλουχίας: 72°C -15"</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Τελική επέκταση των συντιθέμενων τμημάτων DNA: 72°C -10'</li> </ul>

Πίνακας 17. Συνθήκες αντίδρασης PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MS-HRMA ειδικών εκκινητών, για προσδιορισμό της κατάστασης μεθλίωσης των στοιχείων LINE-1.

Συνθήκες αντίδρασης PCR ενίσχυσης με τους MSP LINE-1 εκκινητές
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αρχική αποδιάταξη: 95°C - 15'</li> <li>• Κυρίως αντίδραση: Διεξάγεται σε 40 κύκλους.</li> </ul>
Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αποδιάταξη: 95°C - 20"</li> <li>• Πρόσδεση εκκινητών: 53°C - 40"</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Επέκταση αλληλουχίας: 72°C - 30''</b></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Τελική επέκταση των συντιθέμενων τμημάτων DNA: 72°C - 10'</b></li> </ul>

**Πίνακας 18.** Συνθήκες αντίδρασης PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των MSP ειδικών εκκινήτων, για προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1.

### 3.5.7 MS-HRMA

Η διερεύνηση της κατάστασης μεθυλίωσης μέσω MS-HRMA, των υπό μελέτη δειγμάτων, τα οποία επεξεργάστηκαν με δισουλφίδιο του νατρίου και ενισχύθηκαν μέσω PCR, πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Roche LightCycler480. Συγκεκριμένα, στο ενισχυμένο προϊόν προστέθηκαν 5uL φθορίζουσας χρωστικής EvaGreen συγκέντρωσης 5x (Biotium), σε τελική συγκέντρωση 1x, η οποία προσδένεται μη-ειδικά σε δίκλινα υποστρώματα και είναι κατάλληλη για τέτοιου είδους αναλύσεις.

<b>Συνθήκες ανάλυσης καμπύλης τήξης των στοιχείων LINE-1</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Αποδιάταξη των προϊόντων: 95°C - 1'</b></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Επαναδιάταξη των προϊόντων: 40°C - 1'</b></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Θερμοκρασιακή σταθεροποίηση πριν την έναρξη των μετρήσεων: 65°C - 1''</b></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Συνεχόμενες μετρήσεις επιπέδων φθορισμού (17 μετρήσεις ανά °C):</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Αρχική θερμοκρασία: 65°C</b></li> <li>• <b>Τελική θερμοκρασία: 99°C</b></li> </ul> </li> </ul>

**Πίνακας 19.** Συνθήκες ανάλυσης καμπύλης τήξης, των προϊόντων των αντιδράσεων PCR ενίσχυσης, για τους MS-HRMA ειδικούς εκκινήτες, για προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1.

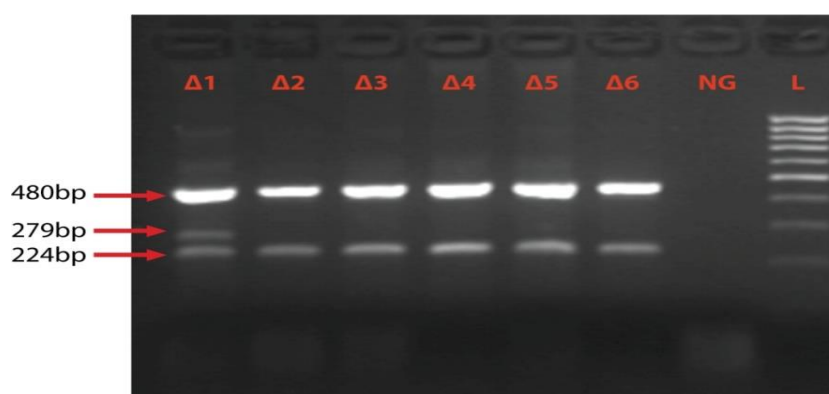
### 3.5.8 MSP

Η διερεύνηση της κατάστασης μεθυλίωσης μέσω MSP, των υπό μελέτη δειγμάτων, που υπέστησαν επεξεργάστηκαν με δισουλφίδιο του νατρίου και ενισχύθηκαν μέσω PCR, πραγματοποιήθηκε σε συσκευή PyroMark Q96, με τυπικές συνθήκες σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Qiagen). Της MSP προηγήθηκε ανάδειξη μικρής ποσότητας του ενισχυμένου προϊόντος, προκειμένου να διαπιστωθεί η επάρκεια αυτού για περαιτέρω ανάλυση.

## **4 Αποτελέσματα**

## 4.1 Ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης V617F στην περιοχή της κινάσης JAK2 με την τεχνική της ARMS PCR σε ασθενείς με ΜΔΣ.

Η ύπαρξη ή μη της σημειακής μετάλλαξης V617F ανιχνεύθηκε με την τεχνική της ARMS PCR. Η ανίχνευση της μετάλλαξης γίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3%, όπου στην περίπτωση θετικού δείγματος για την JAK2V617F μετάλλαξη εμφανίζεται μια ζώνη ενίσχυσης 279b.p. του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου ανάμεσα στην ζώνη ελέγχου των 480b.p. και της ζώνης του φυσιολογικού αλληλομόρφου των 224b.p. με τον τρόπο που φαίνεται στην εικόνα 25. Κατά τον έλεγχο η σημειακή μετάλλαξη V617F δεν ανιχνεύθηκε σε καμία από τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν.



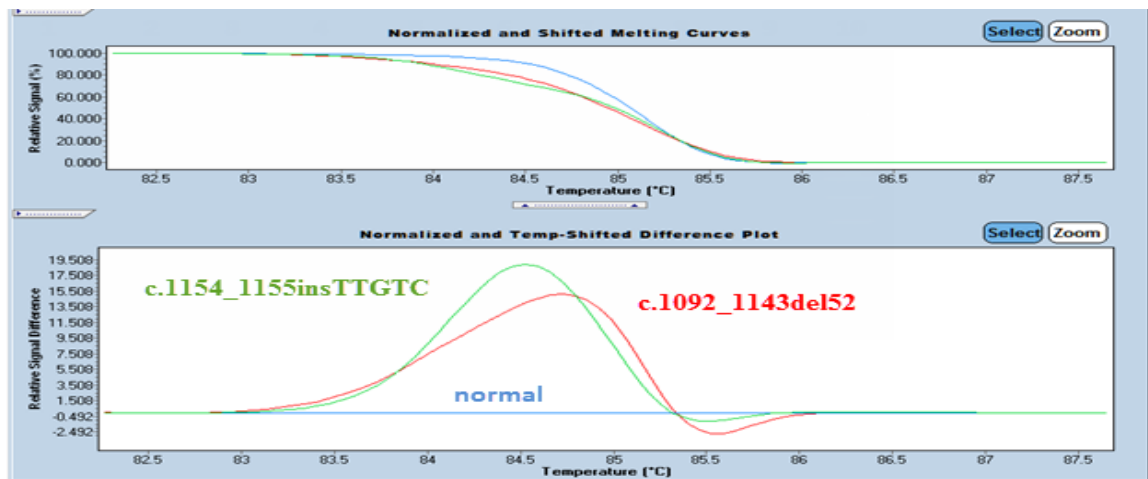
**Εικόνα 17.** Ενδεικτικά αποτελέσματα της ανίχνευσης της μετάλλαξης JAK2 V617F (αντικατάσταση μιας γουανίνης από θυμίνη στη θέση 1849 κωδικής αλληλουχίας (c.1849G>T) του γονιδίου JAK2. Δείγματα που φέρουν τη μετάλλαξη εμφανίζουν τρεις ζώνες (Δ1) ενώ δείγματα που δε φέρουν τη μετάλλαξη εμφανίζουν δύο ζώνες (Δ2-6). Δ: δείγμα, NG: αρνητικός μάρτυρας, L: μοριακός μάρτυρας DNA μεγέθους 100bp.

Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων στις κωδικές περιοχές των προς μελέτη γονιδίων. Σε πρώτο στάδιο μελετήθηκαν 60 ασθενείς, από τους οποίους επιλέχθηκαν οι 15 πιο καλά χαρακτηρισμένοι για περαιτέρω μελέτες του προτύπου της μεθυλίωσης.



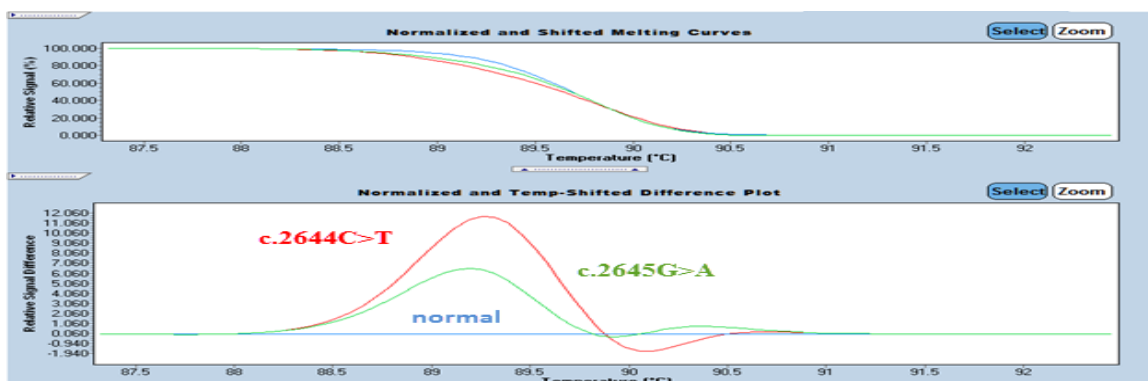
4.1.1 Η διερεύνηση μεταλλάξεων στις κωδικές των γονιδίων που μελετήθηκαν έγινε με την τεχνική της HRM ανάλυσης μετά από Real-time PCR.

- Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων στην κωδική περιοχή c.1074-c.1236 του γονιδίου *CALR*



**Εικόνα 18.** Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων στη κωδική περιοχή c.1074-c.1236 του γονιδίου *CALR*. Διακρίνονται τρεις (3) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με κόκκινο φαίνεται δείγμα που φέρει την τύπου I μετάλλαξη διαγραφής 52 b.p (c.1092\_1143del52) ενώ με πράσινο φαίνεται δείγμα που φέρει την τύπου II μετάλλαξη προσθήκης 5 b.p (c.1154\_1155insTTGTC). Οι μεταλλάξεις αυτές επιβεβαιώθηκαν με ανάλυση αλληλουχίας κατά Sanger.

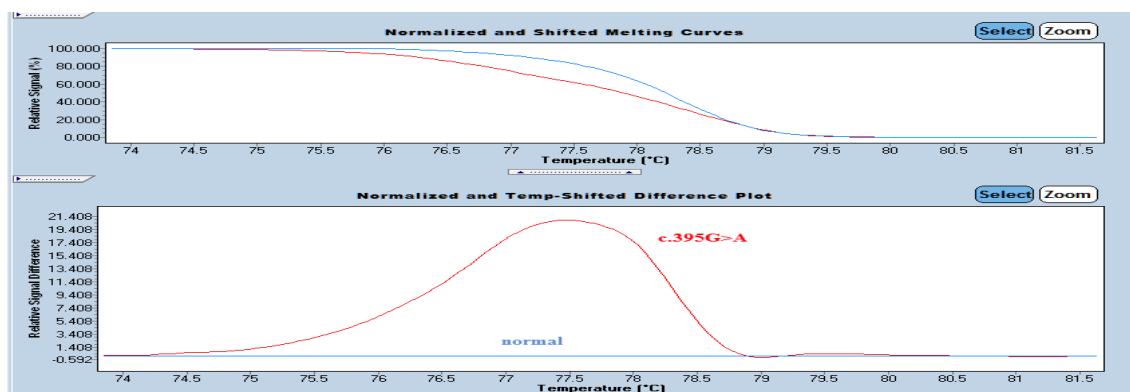
- Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων στη κωδική περιοχή c.2598-c.2686 του γονιδίου *DNMT3A*.



**Εικόνα 19.** Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων της κωδικής περιοχής c.2598-c.2686 του γονιδίου *DNMT3A*. Διακρίνονται τρεις (3) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με κόκκινο φαίνεται δείγμα που φέρει την μετάλλαξη αντικατάστασης μιας κυτοσίνης από μια θυμίνη στην θέση 2644 της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου (c.2644C>T) ενώ με πράσινο φαίνεται δείγμα που φέρει μετάλλαξη αντικατάστασης

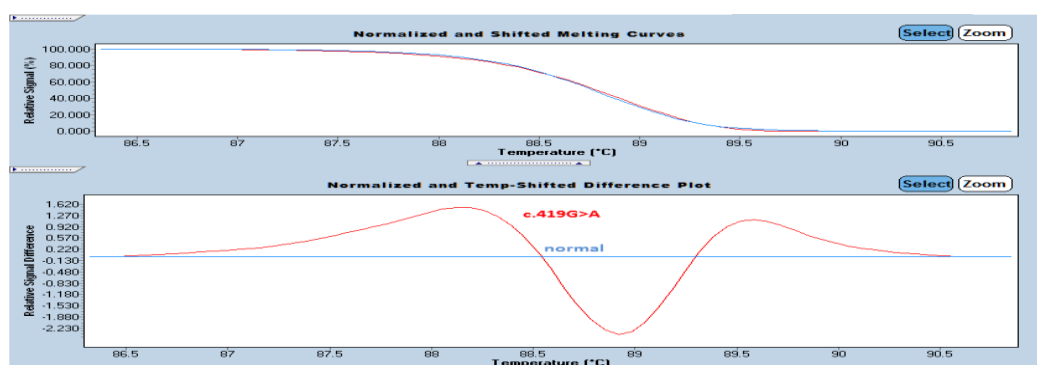
μιας γουανίνης από μια αδενίνη στην θέση 2645 της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου (c.2645G>A). Οι μεταλλάξεις αυτές επιβεβαιώθηκαν με ανάλυση αλληλουχίας κατά Sanger.

- Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων στη κωδική περιοχή c.378-c.411 του γονιδίου *IDH1*.



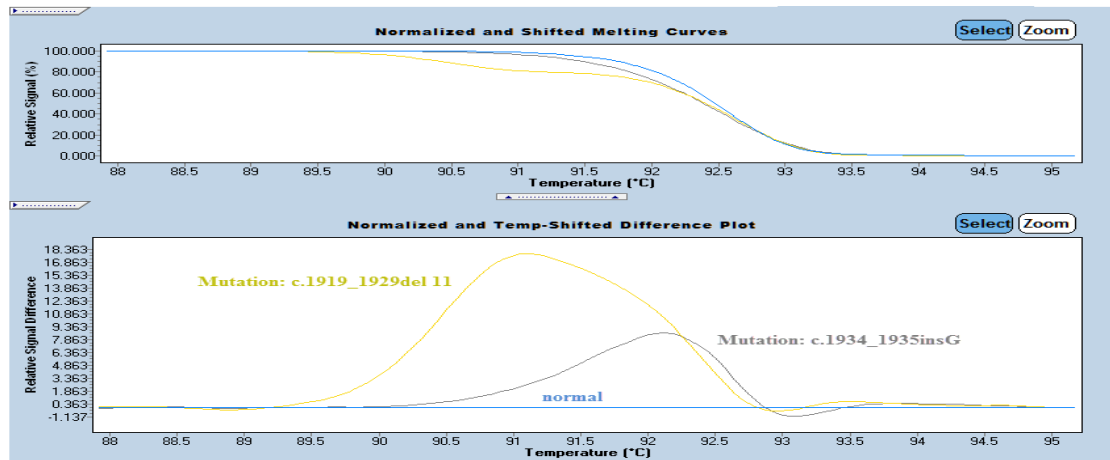
**Εικόνα 20.** Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων στην κωδική περιοχή c.2598-c.2686 του γονιδίου *IDH1*. Διακρίνονται δύο (2) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με κόκκινο φαίνεται δείγμα που φέρει την μετάλλαξη αντικατάστασης μιας γουανίνης από μια αδενίνη στην θέση 395 της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου (c.395G>A).

- Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων στη κωδική περιοχή c.402-c.526 του γονιδίου *IDH2*.



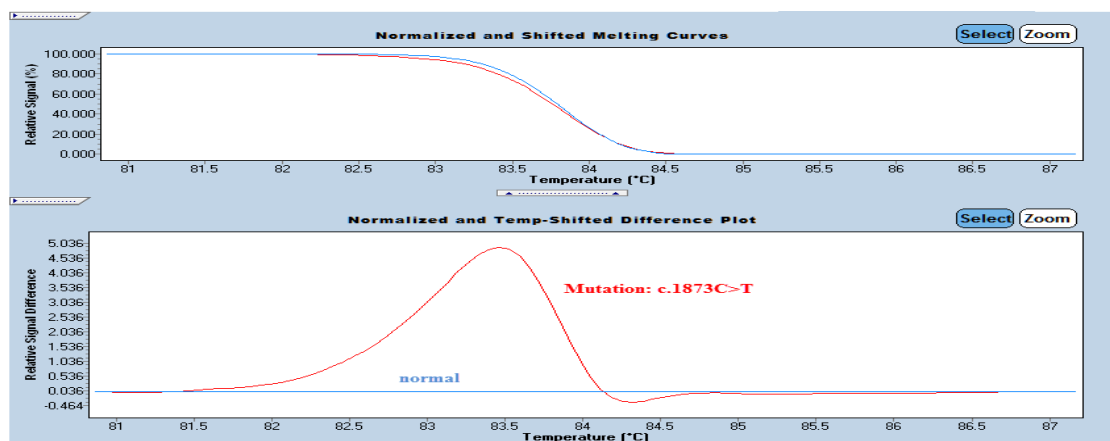
**Εικόνα 21.** Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων στην κωδική περιοχή c.402-c.526 του γονιδίου *IDH2*. Διακρίνονται δύο (2) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με κόκκινο φαίνεται δείγμα που φέρει την μετάλλαξη αντικατάστασης μιας γουανίνης από μια αδενίνη στην θέση 419 της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου (c.419G>A).

- Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων στη κωδική περιοχή c.1850-c.1963 του γονιδίου *ASXL1*.

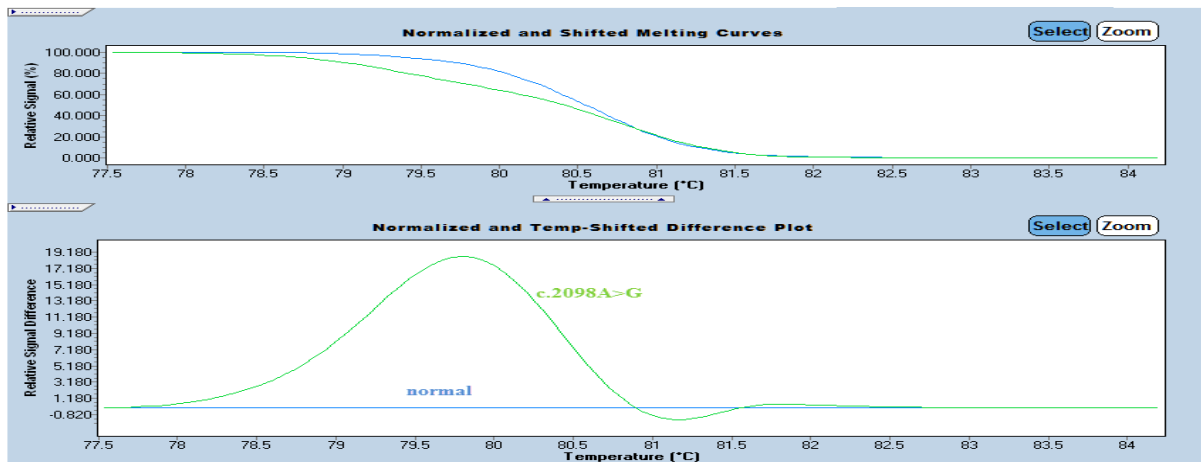


**Εικόνα 22.** Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων στην κωδική περιοχή c.1850-c.1963 του γονιδίου *ASXL1*. Διακρίνονται τρεις (3) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με κίτρινο φαίνεται δείγμα που φέρει μετάλλαξη διαγραφής 11 b.p από τη θέση 1919 έως την 1929 της κωδικής αλληλουχίας (c.1919\_1929del11) του γονιδίου *ASXL1* ενώ με γκρι φαίνεται δείγμα που φέρει μετάλλαξη προσθήκης μιας βάσης γουανίνης (G) ανάμεσα στις θέσεις 1934 και 1935 της κωδικής αλληλουχίας (c.1934\_1935insG) του γονιδίου *ASXL1*. Οι μεταλλάξεις αυτές επιβεβαιώθηκαν με ανάλυση αλληλουχίας κατά Sanger και οδηγούν στην μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου.

- Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων στις κωδικές περιοχές c.1858-c.2007 και c.2078-c.2101 του γονιδίου *SF3B1*.

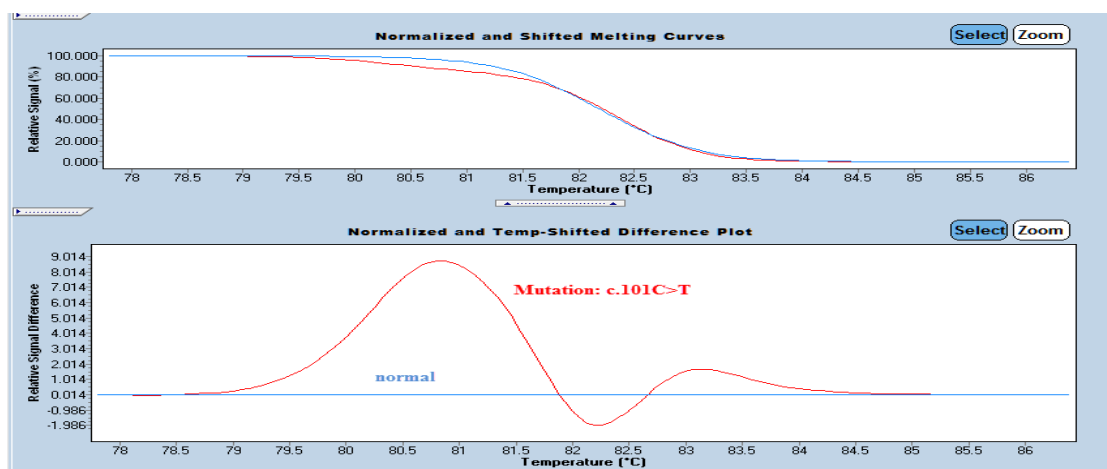


**Εικόνα 23.** Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων στην κωδική περιοχή c.1858-c.2007 του γονιδίου *SF3B1*. Διακρίνονται δύο (2) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με κόκκινο φαίνεται δείγμα που φέρει την μετάλλαξη αντικατάστασης μιας κυτοσίνης από μια θυμίνη στην θέση 1873 της κωδικής αλληλουχίας (c.1873C>T).

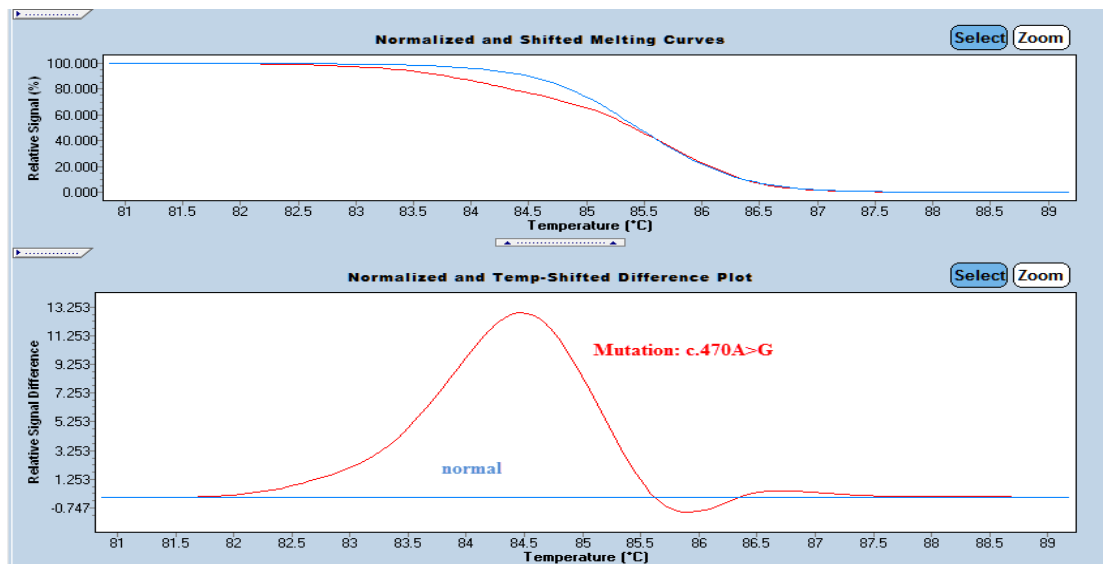


**Εικόνα 24.** Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων στην κωδική περιοχή c.2078-c.2101 του γονιδίου SF3B1.. Διακρίνονται δύο (2) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με πράσινο φαίνεται δείγμα που φέρει την μετάλλαξη αντικατάστασης μιας αδενίνης από μια γουανίνη στην θέση 2098 της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου (c.2098A>G).

- Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων στις κωδικές περιοχές c.85-122 και c.436-473 του γονιδίου U2AF1.



**Εικόνα 25.** Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο του U2AF1. Διακρίνονται δύο (2) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με κόκκινο φαίνεται δείγμα που φέρει την μετάλλαξη αντικατάστασης μιας κυτοσίνης από μια θυμίνη στην θέση 101 της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου (c.101C>T).



**Εικόνα 26.** Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο του U2AF1. Διακρίνονται δύο (2) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με κόκκινο φαίνεται δείγμα που φέρει την μετάλλαξη αντικατάστασης μιας αδενίνης από μια γουανίνη στην θέση 470 της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου (c.470A>G).

## 4.2 Προσδιορισμός της κατάστασης μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1

Τα επίπεδα μεθυλίωσης των διάσπαρτων επαναλαμβανομένων μικρών ή μεγάλων μεταθετών στοιχείων, όπως οι αλληλουχίες SINE (short interspersed nucleotide elements, π.χ. Alu repetitive elements) και LINE (long interspersed nucleotide elements), σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, εμφανίζουν διαφορές μεταξύ φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με πολλούς τύπους καρκίνου, γεγονός που συμβάλλει στη γενετική αστάθεια και πρόοδο της νόσου.<sup>64</sup>

Όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1 τα ένζυμα DNMT, TET και IDH1/2 είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση των επιπέδων μεθυλίωσης του γονιδιώματος και συνεργάζονται με ένζυμα τροποποίησης ιστονών, όπως τα ASXL1 και EZH2 με στόχο τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων της καθολικής μεθυλίωσης του γονιδιώματος (global methylation levels) μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες τεχνικές μέσω ανάλυσης των μεταθετών στοιχείων LINE-1. Τα διάσπαρτα επαναλαμβανόμενα μικρά ή μεγάλα μεταθετά στοιχεία αποτελούν το 45% του ανθρώπινου γονιδιώματος και κατά κύριο λόγο εμφανίζονται έντονα μεθυλιωμένα.<sup>65</sup>

Προκειμένου να εντοπίσουμε πιθανές αλλαγές στο πρότυπο της μεθυλίωσης του γονιδιώματος σε ασθενείς με μυελικές νεοπλασίες και μεταλλάξεις σε γονίδια σχετικά με διάφορες διεργασίες του κυττάρου, μελετήσαμε τα επίπεδα μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, σε φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα, τόσο μέσω μεθυλοειδικής HRMA (MS-HRMA) (LightCycler480, Roche), όσο και μέσω μεθυλοειδικής πυροαλληλούχισης (MSP) (PyroMark Q96, Qiagen).

## 4.2.1 Μεθυλοειδική HRMA (MS-HRMA)

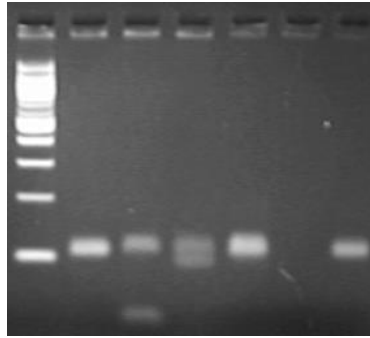
### 4.2.1.1. Κλινικό υλικό

Χρησιμοποιήσαμε MS-HRMA με σκοπό τον προσδιορισμό πιθανών αποκλίσεων στο πρότυπο της μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, σε ασθενείς με ΜΔΣ, σε σχέση με άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού. Με την τεχνική αυτή μελετήθηκαν συνολικά 15 ασθενείς με ΜΔΣ και 6 άτομα με φυσιολογική αιμοποίηση.

### 4.2.1.2. Σχεδιασμός εκκινήτων για MS-HRMA και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας

Για την ανάλυση με MS-HRMA σχεδιάστηκαν εκκινήτες κατάλληλοι για επεξεργασμένα με δισουλφίδιο του νατρίου υποστρώματα (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research).

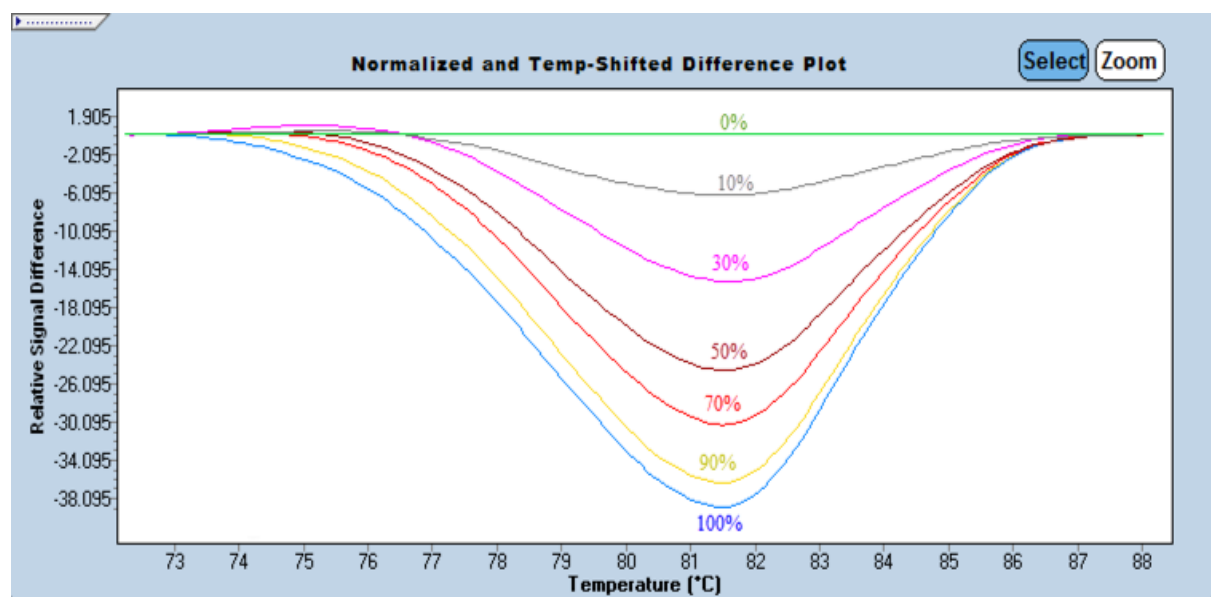
Η θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινήτων στο προηγουμένως επεξεργασμένα υποστρώματα καθορίστηκε μέσω ταυτόχρονης ενίσχυσης, σε κυμαινόμενες τιμές θερμοκρασίας (gradient PCR) (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad). Στην συνέχεια, τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή.



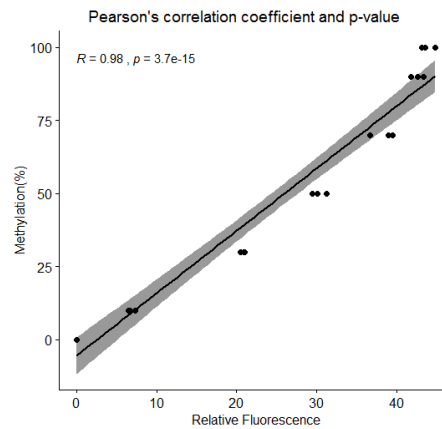
**Εικόνα 27.** Gradient PCR για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης των MS-HRMA ειδικών εκκινητών, προς ανάλυση των στοιχείων LINE-1 και ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή. Από αριστερά προς δεξιά οι θερμοκρασίες πρόσδεσης κυμαίνονται, από τους 50 έως τους 67 βαθμούς κελσίου.

#### 4.2.1.3. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

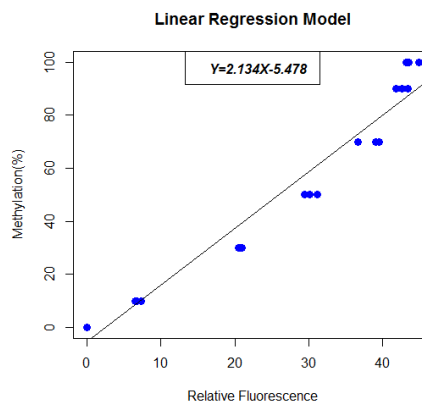
Η πρότυπη καμπύλη βασίστηκε στην παρασκευή δειγμάτων αναφοράς με ακραίες τιμές μεθυλίωσης 0% και 100%, μέσω WGA και τεχνητής μεταφοράς μεθυλομάδων, αντίστοιχα. Έπειτα, τόσο τα δείγματα αναφοράς, όσο και τα προς ανάλυση δείγματα, επεξεργάστηκαν με δισουλφίδιο του νατρίου, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research). Τα δείγματα αναφοράς αναμείχθηκαν σε διαφορετικές αναλογίες. Με τον τρόπο αυτό παρασκευάστηκαν πρότυπα που προσομοιάζουν διάφορα επίπεδα μεθυλίωσης, τα οποία αναλύθηκαν παράλληλα με τα προς διερεύνηση δείγματα, σε συσκευή Real Time PCR (LightCycler480, Roche).



**Εικόνα 28.** Πρότυπη καμπύλη μεθυλίωσης. Καμπύλες φθορισμού των πρότυπων δειγμάτων μεθυλίωσης όπως προκύπτουν από κανονικοποίηση των δεδομένων, έπειτα από ανάλυση με το λογισμικό LightCycler 480 Gene Scanning Software v.1.5.1.74 (Roche Diagnostics, USA). Ως σημείο αναφοράς (baseline) χρησιμοποιήθηκε το μη-μεθυλωμένο πρότυπο δείγμα (0%).



**Εικόνα 29.** Υπολογισμός του συντελεστή συσχέτισης μεθυλίωσης και επιπέδων φθορισμού ( $R=0.98$ ,  $p\text{-value}=3.7 \times 10^{-15}$ ), προκειμένου να διαπιστωθεί η αξιοπιστία των δεδομένων (Pearson's correlation coefficient).



**Εικόνα 30.** Τα επίπεδα φθορισμού στο σημείο τήξης, όπου τα μισά προϊόντα ενίσχυσης, κάθε πρότυπου δείγματος, εντοπίζονται σε μονόκλωνη κατάσταση (50%), χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό της καμπύλης αναφοράς μέσω γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression model)



#### 4.2.1.4. Αποτελέσματα MS-HRMA

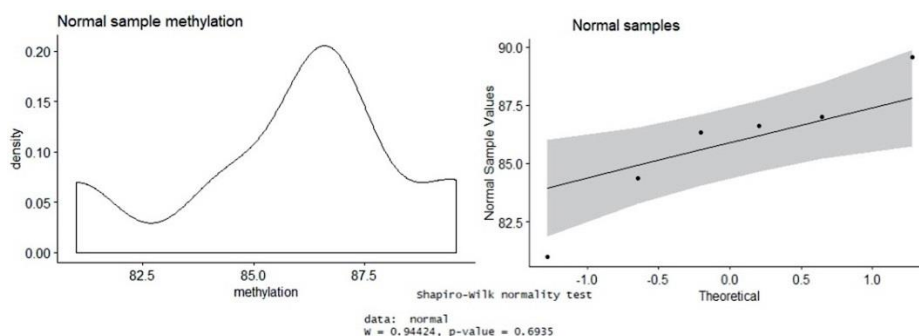
Τα αποτελέσματα της μελέτης συνοψίζονται στον Πίνακα που ακολουθεί.

Δείγμα	Ιστός	Φύλο	Ποσοστό μεθυλίωσης	Κύρια μετάλλαξη	Τροποποιητικά γονίδια
1	PB	F	88,07194	NEG	<i>SF3B1</i>
2	PB	F	88,76684	NEG	<i>DNMT3A</i>
3	PB	F	84,11129	NEG	<i>DNMT3A</i>
4	PB	M	84,26269	NEG	<i>DNMT3A</i>
5	PB	M	85,99445	NEG	<i>SF3B1</i>
6	PB	M	87,59665	NEG	<i>IDH1</i>
7	PB	M	86,88054	NEG	<i>DNMT3A</i>
8	PB	M	83,85039	NEG	<i>U2AF1</i>
9	PB	M	84,81578	NEG	NEG
10	PB	M	88,303	NEG	NEG
11	PB	F	90,94886	NEG	<i>U2AF1</i>
12	PB	M	89,49111	NEG	<i>ASXL1</i>
13	BM	F	83,86067	NEG	<i>ASXL1</i>
14	BM	M	79,68841	NEG	<i>SRSF2</i>
15	BM	M	79,50917	NEG	<i>SRSF2</i>
Φυσιολογικά	PB	M	86,9929	NEG	NEG
Φυσιολογικά	PB	M	84,37886	NEG	NEG
Φυσιολογικά	PB	M	86,61851	NEG	NEG
Φυσιολογικά	PB	M	81,00075	NEG	NEG
Φυσιολογικά	PB	F	86,32132	NEG	NEG
Φυσιολογικά	PB	F	89,56705	NEG	NEG

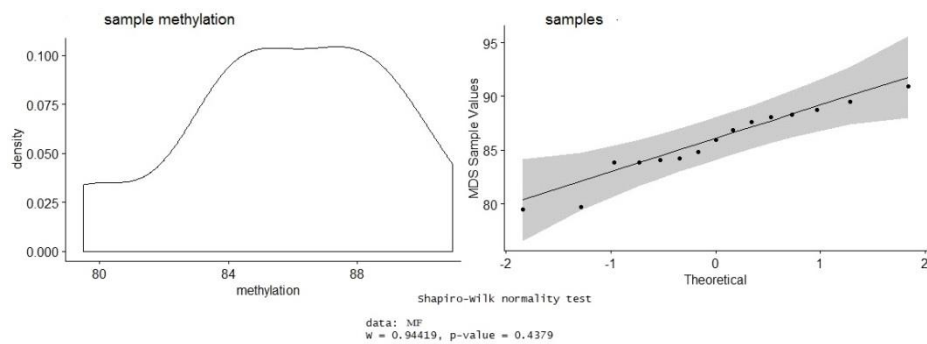
Πίνακας 20. Δείγματα που αναλύθηκαν με MS-HRMA και τα σχετικά ποσοστά μεθυλίωσης.

#### 4.2.1.5. Στατιστική ανάλυση των δεδομένων

α)

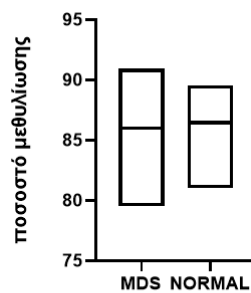


β)



**Εικόνα 31.** Ανάλυση της κατανομής των δεδομένων, όπως προκύπτουν από MS-HRMA. Τόσο, η κοορτή των ατόμων του φυσιολογικού πληθυσμού (α), όσο και εκείνη των ασθενών με ΜΔΣ(β), παρουσιάζουν τιμές μεθυλίωσης που ακολουθούν κανονική κατανομή, η οποία επιτρέπει την εφαρμογή παραμετρικών στατιστικών αναλύσεων.

P value	0.9648
P value summary	ns

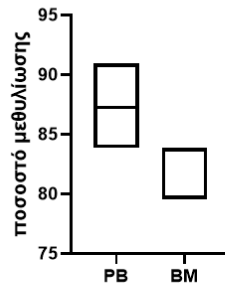


Mean of column A	85.74
Mean of column B	85.81

**Εικόνα 32.** Στατιστική ανάλυση των δεδομένων μεθυλίωσης, όπως προκύπτουν από MS-HRMA. Εφαρμόστηκε παραμετρικός έλεγχος (t-test) για συγκριτική ανάλυση των τιμών μεθυλίωσης μεταξύ των ασθενών ΜΔΣ, με άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού, ξεχωριστά.

Βάσει των παραπάνω δεδομένων συμπεραίνουμε ότι δεν εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $p\text{-value}=0.9648$ ), στα επίπεδα μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, μεταξύ των ασθενών με ΜΔΣ (85.74%) και των ατόμων με φυσιολογική αιμοποίηση (85.81%).

P value	0.0018
P value summary	**

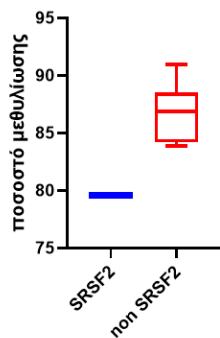


Mean of column A	86.92
Mean of column B	81.02

**Εικόνα 33.** Στατιστική ανάλυση των δεδομένων μεθυλίωσης, όπως προκύπτουν από MS-HRMA. Εφαρμόστηκε παραμετρικός έλεγχος (t-test) για συγκριτική ανάλυση των τιμών μεθυλίωσης μεταξύ δειγμάτων των ασθενών ΜΔΣ που προέρχονται από περιφερικό αίμα, με τα δείγματα των ασθενών ΜΔΣ που προέρχονται από μυελό των οστών.

Βάσει των παραπάνω δεδομένων συμπεραίνουμε ότι εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $p$ -value=0.0018), στα επίπεδα μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, μεταξύ των δειγμάτων που προέρχονται από περιφερικό αίμα (86.92%) και μυελό των οστών (81.02%), αντίστοιχα.

P value	0.0013
P value summary	**



Mean of column A	79.60
Mean of column B	86.69

**Εικόνα 34.** Στατιστική ανάλυση των δεδομένων μεθυλίωσης, όπως προκύπτουν από MS-HRMA. Εφαρμόστηκε παραμετρικός έλεγχος (t-test) για συγκριτική ανάλυση των τιμών μεθυλίωσης μεταξύ δειγμάτων των ασθενών ΜΔΣ είχε ανιχνευτεί μετάλλαξη στο γονίδιο *SRSF2* και τα υπόλοιπα δείγματα των ασθενών.

Βάσει των παραπάνω δεδομένων συμπεραίνουμε ότι εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $p$ -value=0.0013), στα επίπεδα μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, μεταξύ των δειγμάτων που έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο *SRSF2* (79.60%) και των δειγμάτων με μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια (86.69%).

Στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν επίσης για τα υπόλοιπα γονίδια που συμπεριλαμβάνονται στην μελέτη, μεταξύ φύλου αλλά και πλήθος μεταλλάξεων ανά ασθενή. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές.

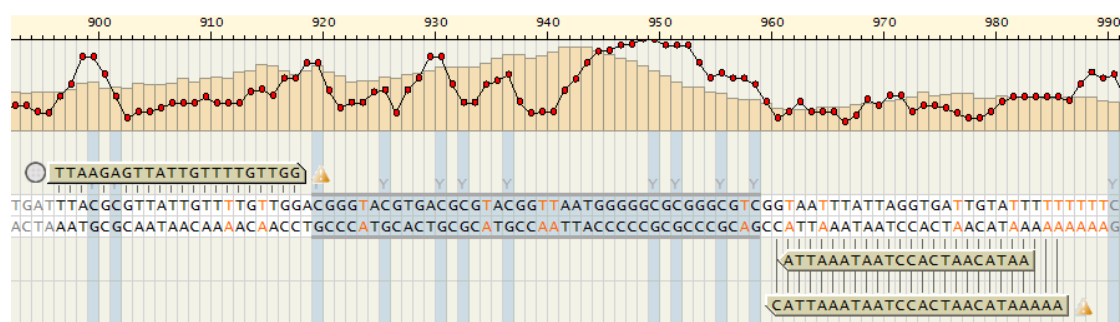
## 4.2.2 Μεθυλοειδική Πυροαλληλούχιση (MSP)

### 4.2.2.1. Κλινικό υλικό

Προκειμένου να επαληθευτούν τα δεδομένα της MS-HRMA χρησιμοποιήσαμε MSP. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 28 ασθενείς με ΜΔΣ, των οποίων το πρότυπο μεθυλίωσης προσδιορίστηκε κατά προσέγγιση μέσω ανάλυσης των επιπέδων μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, σε σχέση με 7 άτομα τα οποία παρουσίαζαν φυσιολογική αιμοποίηση.

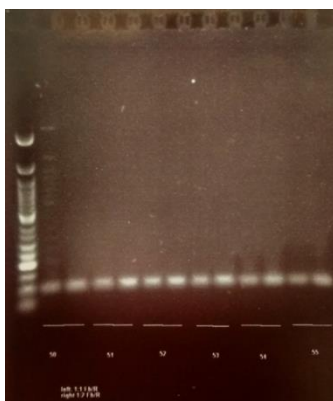
### 4.2.2.2. Σχεδιασμός εκκινητών για MSP και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας

Για την ανάλυση με MSP σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές, ειδικοί για επεξεργασμένα με δισουλφίδιο του νατρίου υποστρώματα (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research).



**Εικόνα 35.** Σχεδιασμός εκκινητών για MSP. Ο μοναδικός αριστερά εκκινητής σε συνδυασμό με τον δεξιά κάτω εκκινητής, ενισχύουν την περιοχή που εσωκλείουν μέσω PCR. Ο πρώτος φέρει μία ομάδα βιοτίνης (biotin group) στο 5' άκρο του, χημική τροποποίηση που χρησιμεύει στη δέσμευση της συγκεκριμένης συντιθέμενης αλυσίδας, σε μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (streptavidin beads). Τα σφαιρίδια διατηρούν την αλληλουχία που φέρει την ομάδα της βιοτίνης σε μονόκλωνη κατάσταση, ενώ παράλληλα η συμπληρωματική αλυσίδα απορρίπτεται. Κατά την MSP ο δεξιά επάνω εκκινητής προσδένεται συμπληρωματικά στην απομονωθείσα αλυσίδα και ενισχύει το προς ανάλυση τμήμα DNA.

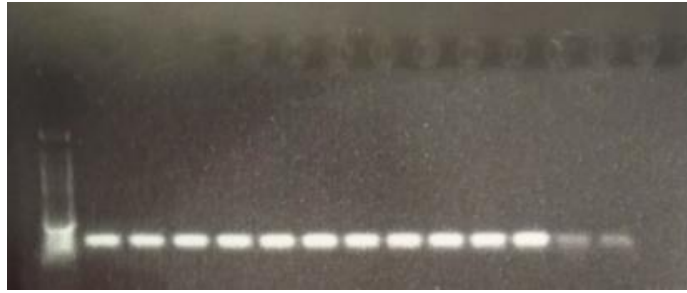
Προκειμένου να καθοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στα υποστρώματα που έχουν υποστεί επεξεργασία με δισουλφίδιο του νατρίου (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research), πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη ενίσχυση σε κυμαινόμενες τιμές θερμοκρασίας (gradient PCR) (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad) και εν συνεχεία τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή.



**Εικόνα 36.** Gradient PCR για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης των MSP ειδικών εκκινητών προς ανάλυση των στοιχείων LINE-1 και ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή. Από αριστερά προς τα δεξιά αναλύθηκε η ικανότητα ενίσχυσης των εκκινητών, σε κυμαινόμενες θερμοκρασίες πρόσδεσης, από τους 50 έως τους 60 βαθμούς κελσίου. Σε κάθε θερμοκρασία, οι εκκινητές δοκιμάστηκαν στη μία περίπτωση σε ισομοριακές συνθήκες, στη δεύτερη περίπτωση, ο ανάστροφος εκκινητής σε διπλάσια ποσότητα συγκριτικά με τον ορθό.

#### 4.2.2.3. Προετοιμασία των δειγμάτων για MSP

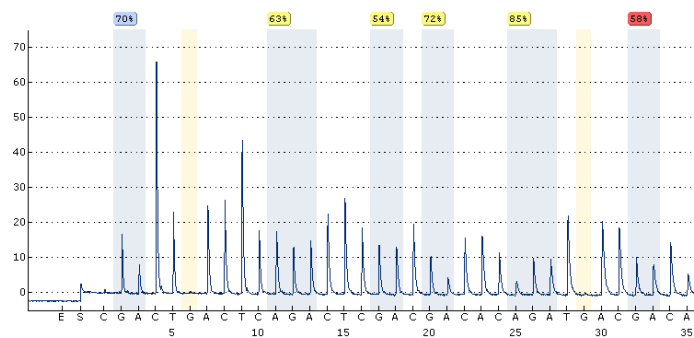
Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε επεξεργασία τόσο των υποστρωμάτων, όσο και των δειγμάτων αναφοράς, με δισουλφίδιο του νατρίου, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research). Έπειτα ενισχύθηκαν μέσω PCR και πραγματοποιήθηκε προετοιμασία των δειγμάτων για ανάλυση και προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων με MSP.



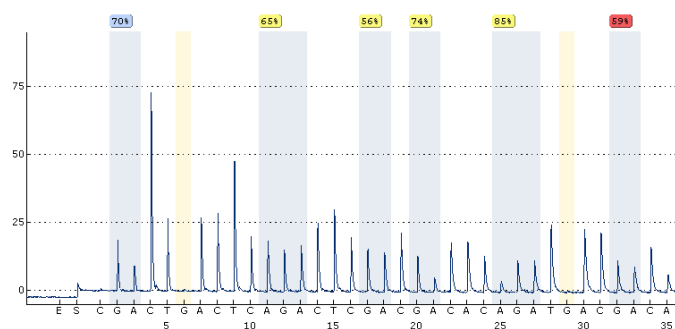
**Εικόνα 37.** PCR ενίσχυση του υποστρώματος των MSP ειδικών εκκινήτων προς ανάλυση της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 και ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή. Τα υπό διερεύνηση δείγματα, τα οποία υπέστησαν επεξεργασία με δισουλφίδιο του νατρίου και PCR, αναλύθηκαν κατόπιν σε πηκτή αγαρόζης, για να επιβεβαιωθεί η ικανοποιητική ενίσχυση.

#### 4.2.2.4. Αποτελέσματα MSP

α)

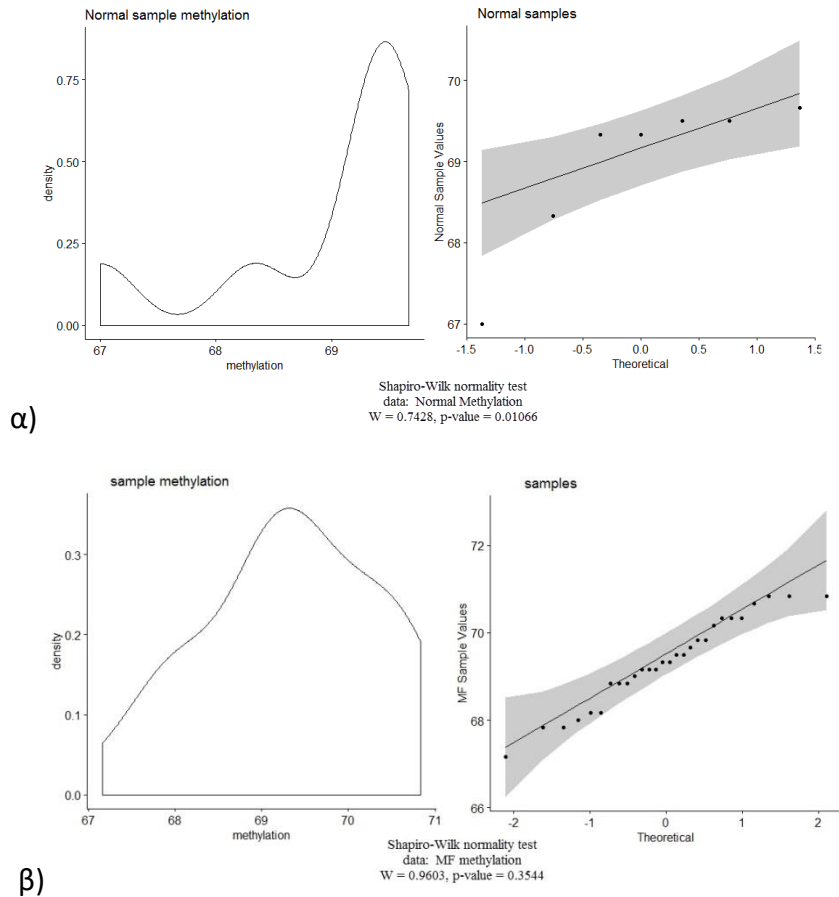


β)

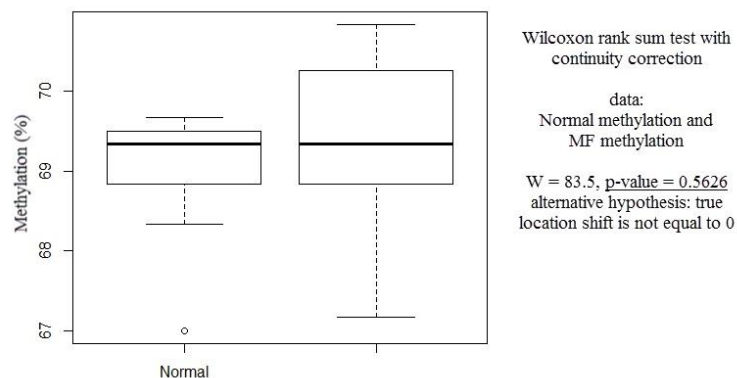


**Εικόνα 38.** Χρωματογραφήματα από ανάλυση της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1. Από επάνω προς τα κάτω παρουσιάζονται, ένα δείγμα ατόμου από το φυσιολογικό πληθυσμό (α), ένα δείγμα ασθενούς με ΜΔΣ (β). Τα επίπεδα μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 στα ΜΔΣ και φυσιολογικά δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές, καθώς οι δύο κοορτές που μελετήθηκαν παρουσιάζουν παραπλήσια επίπεδα της συγκεκριμένης επιγενετικής τροποποίησης.

#### 4.2.2.5 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων



**Εικόνα 39.** Ανάλυση της κατανομής των δεδομένων, όπως προκύπτουν από MSP. Η κοορτή των ατόμων του φυσιολογικού πληθυσμού (α) παρουσιάζει τιμές μεθυλίωσης που ακολουθούν μη κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων, παρόλο που η κοορτή των ασθενών με ΜΔΣ (β) ακολουθεί κανονική κατανομή.



**Εικόνα 40.** Στατιστική ανάλυση των δεδομένων μεθυλίωσης, όπως προκύπτουν από MSP. Εφαρμόστηκε μη παραμετρικός έλεγχος (Mann-Whitney-Wilcoxon) για συγκριτική ανάλυση των τιμών μεθυλίωσης μεταξύ των ασθενών με ΜΔΣ με άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού.

Τα πειράματα με MSP επιβεβαίωσαν όσα προέκυψαν από τις αναλύσεις MS-HRMA, ότι τα στοιχεία LINE-1 των ασθενών με ΜΔΣ δεν εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ( $p$ -value=0.5626) στα επίπεδα μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, σε σχέση με εκείνα των ατόμων με φυσιολογική αιμοποίηση.



## 5 Συζήτηση

## 5.1 Γενικά συμπεράσματα - μελλοντικές προοπτικές

Τα Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα αποτελούν μια ετερογενή ομάδα κλωνικών διαταραχών του αρχέγονων αιμοποιητικού κυττάρου και χαρακτηρίζονται από αυξημένη τάση μετασχηματισμού προς οξεία λευχαιμία. Πρόσφατες μελέτες γενωμικής ανάλυσης έδειξαν ότι οι ασθενείς με ΜΔΣ χαρακτηρίζονται από πληθώρα επίκτητων μεταλλαγών σε γονίδια του επιγενετικού μηχανισμού, της συρραφής του RNA, της μεταγωγής σήματος και άλλων.

Η υψηλή ετερογένεια που χαρακτηρίζει τα ΜΔΣ αντανakλάται σε πολλούς παράγοντες (μορφολογία, κυτταρογενετικές ανωμαλίες και κυτταροπενίας), που επηρεάζουν τον ρυθμό εξέλιξης της νόσου.<sup>32 41</sup>

Βασικό χαρακτηριστικό των ΜΔΣ, αποτελούν οι κυτταροπενίες του περιφερικού αίματος, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ο μυελός των οστών χαρακτηρίζεται κατά βάση ως υπερκυτταρικός ή νορμοκυτταρικός, γεγονός που οφείλεται στην αναποτελεσματική αιμοποίηση.<sup>66</sup> Συγκεκριμένα, η κυτταρική του μυελού των οστών αυξάνεται σε περιπτώσεις ασθενών με ΜΔΣ, κατά τη διάγνωση, καθώς παρατηρείται υπερπλασία της ερυθράς σειράς ή της κοκκιοειδούς, ή και των δυο. Σε ποσοστό 30 έως 40% παρατηρείται φυσιολογική κυτταρική ποσοτικά, ενώ σε περίπου 10% των ασθενών, χαρακτηρίζονται από υποκυτταρική του μυελού των οστών.<sup>67</sup>

Η εκτεταμένη κυτταροπενία στο περιφερικό αίμα, σε συνδυασμό με τον αυξημένο κίνδυνο λευχαιμικού μετασχηματισμού (30% των περιπτώσεων), οδηγεί σε πληθώρα επιπλοκών κατά την κλινική πορεία των ασθενών με ΜΔΣ. Ωστόσο καμία από τις πλέον διαθέσιμες φαρμακευτικές αγωγές δεν είναι θεραπευτική, γεγονός που οφείλεται στην εξαιρετικά ετερογενή κλινική πορεία των ασθενών με ΜΔΣ.<sup>66</sup> Επιπλέον, καθώς τα ΜΔΣ προσβάλλουν το γηραιότερο πληθυσμό, οι ασθενείς δεν μπορούν να υποβληθούν σε πιο εντατικές θεραπείες, όπως είναι η αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιματοποιητικών κυττάρων.<sup>68</sup>

Οι παράγοντες υπομεθυλίωσης (HMTs), όπως είναι η αζακυτιδίνη (5-azacytidine, 5-aza-CR, AZA) και η δεσιταβίνη (5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-CdR, DAC) θεωρούνται θεραπευτικά πρότυπα για τα ΜΔΣ<sup>69</sup> και φαίνεται ότι έχουν αντι-νεοπλασματική δράση μέσω απομεθυλίωσης που έχει ως αποτέλεσμα την επανενεργοποίηση μερικώς μεθυλιωμένων γονιδίων.<sup>70</sup> Οι παράγοντες αυτοί ενσωματώνονται σε μόρια DNA κυττάρων που πολλαπλασιάζονται, όπου δεσμεύονται μη αναστρέψιμα και 'μπλοκάρουν' τις μεθυλοτρανσφεράσες του DNA (DNMTs), γεγονός που οδηγεί σε καθολική υπομεθυλίωση.<sup>71</sup> Χορηγούνται τόσο σε ασθενείς χαμηλότερου κινδύνου,

όπως περιπτώσεις με αυξημένη κυτταροπενία, όσο και σε ασθενείς υψηλότερου. Ωστόσο πρόσφατη βιβλιογραφία θεωρεί ότι η θεραπεία είναι πιο αποτελεσματική σε ασθενείς υψηλού κινδύνου με ποσοστό βλαστών 20-30%.<sup>70</sup>

Ωστόσο η αδυναμία πρόβλεψης της απόκριση στη θεραπεία με παράγοντες υπομεθυλίωσης και η πιθανότητα επιβίωσης, εν συνεχεία αποτελεί ένα μείζον ζήτημα.<sup>72</sup> Συγκεκριμένα, η ανταπόκριση σε αυτούς τους παράγοντες ανέρχεται σε ποσοστό περίπου ίσο με 50% σε σχέση με το σύνολο των ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία και η διάρκεια της απόκρισης είναι παροδική.<sup>69</sup> Παρά τη χαμηλή τοξικότητα, την αιματολογική ανταπόκριση και την παράταση της επιβίωσης, ακόμα και σε ηλικιωμένοι ασθενείς, τα ΗΜAs δεν είναι θεραπευτικά χωρίς μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCT).<sup>69</sup> Μέχρι σήμερα έχουν σχεδιαστεί πολλά προγνωστικά συστήματα που στοχεύουν στην εκτίμηση της επιλογής της θεραπευτικής αγωγής, ωστόσο, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην περίπτωση των ΗΜΑ και καταβάλλεται προσπάθεια για τον εντοπισμό κλινικών χαρακτηριστικών που μπορούν να προβλέψουν καλύτερη ανταπόκριση.<sup>72</sup>

Πρόσφατα, έχουν πραγματοποιηθεί εκτενείς έρευνες για τους προγνωστικούς παράγοντες που συσχετίζονται με την ανταπόκριση σε ΗΜAs. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι εξής κλινικοί παράμετροι: η ηλικία, το φύλο, κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά, ποσοστό βλαστών, υποβολή σε προηγούμενη θεραπεία, κατάσταση της μεθυλίωσης του DNA, μεταλλάξεις γονιδίων, γονιδιακή έκφραση, έκφραση των micro-RNA και έκφραση των σχετικών πρωτεϊνών. Ωστόσο, τα συμπεράσματα είναι αμφιλεγόμενα και πολλές από αυτές τις παραμέτρους σχετίζονται με πτωχή πρόγνωση.<sup>70</sup>

Η μεθυλίωση του DNA, καθώς και η διατήρηση ενός ορισμένου προτύπου αυτής, αποτελεί έναν βασικό κυτταρικό μηχανισμό, που συσχετίζεται με την κυτταρική διαφοροποίηση και τη διατήρηση ενός σταθερού προφίλ γονιδιακής έκφρασης. Οποιαδήποτε απόκλιση από τα φυσιολογικά επίπεδα μεθυλίωσης είναι συνήθης τόσο σε διάφορους τύπους καρκίνου, όσο και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η νόσος Alzheimer's. Στην περίπτωση του καρκίνου, η υπερμεθυλίωση των υποκινητών των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι ένας παράγοντας που συμβάλλει στην ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου.

Στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, η μεθυλίωση του DNA φέρει σημαντικό ρόλο, αφού συμβάλλει στην διαφοροποίηση τους προς όλες τις κατηγορίες των κυττάρων του αίματος. Επιπλέον, συμβάλλει στην διαμόρφωση των υποπληθυσμών Τ-βοηθητικών και Τ-κυττάρων μνήμης και ρυθμίζει την έκφραση κυτταρολυτικών

ενζύμων (περφορίνες και γκρανένζυμα) στα κύτταρα φυσικούς φονείς (natural killer cells, NK cells) και στα ενεργοποιημένα T-κυτταροτοξικά κύτταρα.

Τόσο περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η διατροφή, το κάπνισμα και η σωματική άσκηση, όσο και άλλοι παράγοντες, όπως η φλεγμονή, μπορούν να επηρεάσουν το πρότυπο της μεθυλίωσης του DNA. Η μελέτη του προτύπου της μεθυλίωσης αποσκοπεί στην ανάδειξη του ως βιοδείκτη και ως στόχο θεραπείας, παρόλο που αποτελεί πρόσφατο εύρημα.

Γενικά, έχουν πραγματοποιηθεί και άλλες μελέτες της μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1. Η σημασία των στοιχείων αυτών είναι ότι αφού εντοπίζονται σε υψηλό ποσοστό διάσπαρτα στο γονιδίωμα, μπορούν να δώσουν, κατά προσέγγιση, μια εκτίμηση των συνολικών επιπέδων της μεθυλίωσης του ως προς μελέτη ιστού.

Υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες σχετικά με το πρότυπο της μεθυλίωσης, χωρίς να αμφισβητούν ότι η όποια αλλαγή του είναι παράγοντας αστάθειας. Ωστόσο περαιτέρω αναλύσεις είναι απαραίτητες προκειμένου να απαντηθούν τα ερωτήματα.<sup>73</sup>

Μελέτες υποδεικνύουν ότι το πρότυπο της μεθυλίωσης διαφέρει ανάλογα με την μετάλλαξη. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις στο γονίδιο *DNMT3A* συνεπάγεται με καθολική υπομεθυλίωση, ενώ μεταλλάξεις στα γονίδια *TET2* και *IDH1/2* με καθολική υπερμεθυλίωση.<sup>71</sup>

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το πρότυπο της μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1 συνολικά 15 ασθενών με ΜΔΣ, καθώς και 6 υγιή ατόμων. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με προσδιορισμό της κατάστασης της μεθυλίωσης των LINE-1 μέσω MSP, σε 28 ασθενείς με ΜΔΣ, εν συγκρίσει με 7 άτομα με φυσιολογική αιμοποίηση.

Οι δύο τεχνικές αποκάλυψαν μη στατιστικά σημαντικές (p-value ίσο με 0.9648) ανιχνεύσιμες διαφορές στο πρότυπο της μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, στους ασθενείς με ΜΔΣ σε σύγκριση με υγιείς δότες.

Επίσης παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (p-value =0.0018) στο πρότυπο της μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, μεταξύ των δειγμάτων ασθενών με ΜΔΣ που προέρχονται από περιφερικό αίμα και από μυελό των οστών.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος της σχέσης του προτύπου της μεθυλίωσης και άλλων παραγόντων όπως είναι το φύλο και οι τροποποιητικές μεταλλάξεις του κάθε ασθενούς. Δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί έλεγχος βάσει του αριθμού

των μεταλλάξεων καθώς τα συγκεκριμένα δείγματα που επιλέχθηκαν έφεραν είτε μια είτε καμία γνωστή μετάλλαξη. Ωστόσο, δεν εμφανίστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ( $p\text{-value}>0.05$ ) στο πρότυπο της μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1 όσο αφορά το φύλο και την πλειονότητα των προς μελέτη γονιδίων. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί το γονίδιο *SRSF2*. Συγκεκριμένα ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές ( $p\text{-value}=0.013$ ) ανιχνεύσιμες διαφορές στο πρότυπο της μεθυλίωσης μεταξύ των ασθενών που έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο *SRSF2* και στους υπόλοιπους ασθενείς με μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια.

Τέλος, παρατηρήθηκε αισθητή διαφορά στην τιμή της μεθυλίωσης μεταξύ δύο ασθενών που έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο *ASXL1* και το ένα δείγμα προερχόταν από περιφερικό αίμα ενώ το δεύτερο από μυελό των οστών. Συγκεκριμένα, στην πρώτη περίπτωση το ποσοστό της μεθυλίωσης ήταν αρκετά πάνω από το μέσο όρο και ανέρχονταν σε τιμή πάνω από το 89% ενώ στη δεύτερη ήταν 83%. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι θα ήταν προτιμότερο ο έλεγχος σε ασθενείς με ΜΔΣ να πραγματοποιείται σε δείγματα που προέρχονται από το μυελό των οστών και όχι από το περιφερικό αίμα ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες σφαλμάτων. Ωστόσο, παρόλο την εμφανή αυτή διαφορά απαιτείται μελέτη παραπάνω δειγμάτων για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Η διαφορά που ανιχνεύτηκε μεταξύ των δειγμάτων ασθενών με ΜΔΣ που προέρχονται από περιφερικό αίμα και από μυελό των οστών αλλά και το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των φυσιολογικών δειγμάτων και των δειγμάτων των ασθενών με ΜΔΣ από περιφερικό αίμα, που αποτελούν και την πλειοψηφία των δειγμάτων επιβεβαιώνεται και από άλλες έρευνες. Συγκεκριμένα, έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε πληθώρα ασθενών με ΜΔΣ υποστηρίζουν ότι, στην συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων (11 στις 12 περιπτώσεις) ανιχνεύονταν οι ίδιες μεταλλάξεις σε δείγματα που προέρχονταν από περιφερικό αίμα και από μυελό των οστών, αντίστοιχα. Ωστόσο, στα δείγματα που προέρχονταν από περιφερικό αίμα, παρατηρούνταν αρκετά χαμηλότερο φορτίο αλληλομόρφου/κλώνου, συγκριτικά με αυτά που προέρχονταν από μυελό των οστών, τόσο για κυτταρογενετικές ανωμαλίες, όσο και για μεταλλάξεις.<sup>74</sup> Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες προκειμένου να το επιβεβαιώσουμε αυτό.

Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές στο ποσοστό της μεθυλίωσης που εμφανίστηκαν μεταξύ των δειγμάτων των ασθενών που είχαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *SRSF2* και των υπολοίπων δειγμάτων υποδηλώνει ίσως ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του μηχανισμού της μεθυλίωσης και της ωρίμανσης του mRNA και χρειάζεται να μελετηθεί περαιτέρω. Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω το γονίδιο *SRSF2* συσχετίζεται με τη διαδικασία ματίσματος. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό έχουν ως αποτέλεσμα τη μη φυσιολογική ωρίμανση του pre-mRNA, γεγονός

που κατ' επέκταση επηρεάζει τις σχηματιζόμενες πρωτεΐνες. Έρευνες έχουν δείξει ότι, όντως, η επιγενετική κατάσταση του κυττάρου και πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα της μεθυλίωσης επηρεάζουν το μηχανισμό του ματίσματος, ίσως εμποδίζοντας τη δράση των RNARII. <sup>75</sup>

Πρόσφατες έρευνες στρέφουν την προσοχή τους στην αναγνώριση προγνωστικών βιοδεικτών στην απόκριση σε θεραπείες με αζανουκλεοσίδια. Τα αζανουκλειζίδια αποτελούν το πρότυπο θεραπευτικής αγωγής για την πλειονότητα των ασθενών με ΜΔΣ, που ανήκουν στην κατηγορία υψηλότερου κινδύνου, παρόλο που τα ποσοστά απόκρισης της 5-αζακιτιδίνης με την δεσιταβίνη είναι παρόμοια, μόνο η πρώτη συσχετίζεται με βελτίωση των ποσοστών επιβίωσης. Επειδή οι ουσίες αυτές έχουν την ικανότητα να προκαλούν υπομεθυλίωση στο DNA, είναι υψίστης σημασίας η αναγνώριση των προτύπων της μεθυλίωσης που θα προβλέπουν την απόκριση. <sup>67</sup> Οπότε, ο σχεδιασμός μίας δοκιμασίας που θα μπορεί να υπολογίσει με σχετική ακρίβεια και χαμηλό κόστος το πρότυπο μεθυλίωσης των ασθενών, όπως πραγματοποιήθηκε στην προκειμένη εργασία, μπορεί να συμβάλει μακροπρόθεσμα σε μεγάλο βαθμό στο σκοπό αυτό.

Ανεξάρτητα, η μελέτη της μεθυλίωσης αυτών των γενωμικών περιοχών, θα πρέπει να διευρυνθεί σε περεταίρω σε μεγαλύτερες, αλλά και πιο ετερογενείς κοορτές καλά χαρακτηρισμένων ασθενών με μυελικές νεοπλασίες, ώστε να επιβεβαιωθούν αυτά τα αποτελέσματα και να μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

## 6 Βιβλιογραφία

1. Kaushansky K, Josef T, Marcel M. L, Oliver W. P, Linda J. B, Caligiuri M. Williams Hematology, 9th ed. 9th ed: McGraw-Hill; 2016.
2. Arber, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
3. High rate of uncaptured myelodysplastic syndrome cases and an improved method of case ascertainment. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24280283>.
4. Stary J, Baumann I, Creutzig U, et al: Getting the numbers straight in pediatric MDS: Distribution of subtypes after exclusion of down syndrome. *Pediatr Blood Cancer* 50(2):435–436, 2008.

5. Risk of myelodysplastic syndromes in people exposed to ionizing radiation: a retrospective cohort study of Nagasaki atomic bomb survivors. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21149671>.
6. Characteristics of US patients with myelodysplastic syndromes: results of six cross-sectional physician surveys. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18957672>.
7. Myelodysplastic syndromes in patients under 50 years old: a single institution experience. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15927670>.
8. Li, X. et al. Distinct Clinical and Experimental Characteristics in the Patients Younger than 60 Years Old with Myelodysplastic Syndromes. *PLoS ONE* **8**, (2013).
9. Daily practice management of myelodysplastic syndromes in France: data from 907 patients in a one-week cross-sectional study by the Groupe Francophone des Myélodysplasies. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2878785/>.
10. Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16167059>.
11. Acute myeloid and chronic lymphoid leukaemias and exposure to low-level benzene among petroleum workers. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24357793>.
12. Λουκόπουλος Δ. , Πολίτου Μ. Κεφ. 6, Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα. Μαθήματα Αιματολογίας, 2015.
13. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22417201>.
14. Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23443460>.
15. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24030381>.
16. Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24970933>.
17. Bravo, G. M., Lee, E., Merchan, B., Kantarjian, H. M. & García-Manero, G. Integrating Genetics and Epigenetics In MDS: Advances in Pathogenesis and Disease Evolution. *Br. J. Haematol.* **166**, 646–659 (2014).
18. Khavari, D. A., Sen, G. L. & Rinn, J. L. DNA methylation and epigenetic control of cellular differentiation. *Cell Cycle Georget. Tex* **9**, 3880–3883 (2010).
19. Walter, M. J. et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **25**, 1153–1158 (2011).
20. McCleary-Wheeler, A. L. et al. Insights into the Epigenetic Mechanisms Controlling Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer Lett.* **328**, 212–221 (2013).
21. Russler-Germain, D. A. et al. The R882H DNMT3A mutation associated with AML dominantly inhibits wild-type DNMT3A by blocking its ability to form active tetramers. *Cancer Cell* **25**, 442–454 (2014).
22. Tahiliani, M. et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**, 930–935 (2009).
23. The Changing Mutational Landscape of Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4123851/>.



24. Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20376084>.
25. Figueroa, M. E. et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* **18**, 553–567 (2010).
26. (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23393090>.
27. Katoh, M. Functional and cancer genomics of ASXL family members. *Br. J. Cancer* **109**, 299–306 (2013).
28. Inoue, D. et al. Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation–altering ASXL1 mutations. *J. Clin. Invest.* **123**, 4627–4640 (2013).
29. Boultonwood, J. et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **24**, 1062–1065 (2010).
30. Collaborating constitutive and somatic genetic events in myeloid malignancies: ASXL1 mutations in patients with germline GATA2 mutations. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24497555>.
31. Geisler, S. J. & Paro, R. Trithorax and Polycomb group-dependent regulation: a tale of opposing activities. *Dev. Camb. Engl.* **142**, 2876–2887 (2015).
32. Zoi, K. & Cross, N. C. P. Molecular pathogenesis of atypical CML, CMML and MDS/MPN-unclassifiable. *Int. J. Hematol.* **101**, 229–242 (2015).
33. Will, C. L. & Lührmann, R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
34. Abdel-Wahab, O. & Levine, R. The spliceosome as an indicted conspirator in myeloid malignancies. *Cancer Cell* **20**, 420–423 (2011).
35. Patel, A. A. & Steitz, J. A. Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 960–970 (2003).
36. Yoshida, K. et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64–69 (2011).
37. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutar... - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171147>.
38. Cazzola, M., Rossi, M., Malcovati, L. & Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative. Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms. *Blood* **121**, 260–269 (2013).
39. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21995386>.
40. Harada, H. & Harada, Y. Recent advances in myelodysplastic syndromes: Molecular pathogenesis and its implications for targeted therapies. *Cancer Sci.* **106**, 329–336 (2015).
41. Wan, Y. & Wu, C. J. SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **121**, 4627–4634 (2013).

42. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22869879>.
43. Wu, S., Romfo, C. M., Nilsen, T. W. & Green, M. R. Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature* **402**, 832–835 (1999).
44. Graubert, T. A. et al. Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* **44**, 53–57 (2011).
45. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22323480>.
46. Bocker, M. T. et al. Genome-wide promoter DNA methylation dynamics of human hematopoietic progenitor cells during differentiation and aging. *Blood* **117**, e182-189 (2011).
47. Rodriguez, R. M. et al. DNA methylation dynamics in blood after hematopoietic cell transplant. *PloS One* **8**, e56931 (2013).
48. Moore, L. D., Le, T. & Fan, G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **38**, 23–38 (2013).
49. Jeong, M. & Goodell, M. A. New answers to old questions from genome-wide maps of DNA methylation in hematopoietic cells. *Exp. Hematol.* **42**, 609–617 (2014).
50. Erichsen, L. et al. Genome-wide hypomethylation of LINE-1 and Alu retroelements in cell-free DNA of blood is an epigenetic biomarker of human aging. *Saudi J. Biol. Sci.* **25**, 1220–1226 (2018).
51. Schulz, W. A. L1 Retrotransposons in Human Cancers. *J. Biomed. Biotechnol.* **2006**, (2006).
52. Issa, J.-P. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 988–993 (2004).
53. Gebhard, C. et al. General transcription factor binding at CpG islands in normal cells correlates with resistance to de novo DNA methylation in cancer cells. *Cancer Res.* **70**, 1398–1407 (2010).
54. Hu et al. 2012, Landsverk and Wong 2013.
55. <http://35.9.122.10/inquiriesS2013/FOP/figure.jpg>.
56. Zipper et al. 2004, Hu et al. 2012.
57. Sigma-Aldrich 2008.
58. Bio-Rad Laboratories Inc. 2010.
59. New England Biolabs 2015, Delaney et al. 2015.
60. Nyrén 1987, Hyman 1988.
61. Fundamentals of pyrosequencing. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23991743>.
62. Hunja CW 2012.
63. Delaney C, Garg SK, Yung R. Analysis of DNA Methylation by Pyrosequencing. In: Shaw AC (ed.) *Methods in Molecular Biology; Immunosenescence Methods and Protocols*. New York (US): Humana Press. 2015;Vol:1343;pp:249-264.
64. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365388/>.

65. A refined, rapid and reproducible high resolution melt (HRM)-based method suitable for quantification of global LINE-1 repetitive element methylation. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22204640>.
66. Gangat, N., Patnaik, M. M. & Tefferi, A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. *Am. J. Hematol.* **91**, 76–89 (2016).
67. Montalban-Bravo, G. & Garcia-Manero, G. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.* **93**, 129–147 (2018).
68. Treatment of MDS | Blood | American Society of Hematology. <https://ashpublications.org/blood/article-abstract/133/10/1096/272732/Treatment-of-MDS?redirectedFrom=fulltext>.
69. How I treat MDS after hypomethylating agent failure | Blood | American Society of Hematology. <https://ashpublications.org/blood/article/133/6/521/260537/How-I-treat-MDS-after-hypomethylating-agent>.
70. Predictors of clinical responses to hypomethylating agents in acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30084010>.
71. Epigenetic therapies in acute myeloid leukaemia: where to from here? | Blood | American Society of Hematology. <https://ashpublications.org/blood/article-abstract/doi/10.1182/blood.2019003262/387149/Epigenetic-therapies-in-acute-myeloid-leukaemia?redirectedFrom=fulltext>.
72. Jung, S.-H. et al. Somatic mutations predict outcomes of hypomethylating therapy in patients with myelodysplastic syndrome. *Oncotarget* **7**, 55264–55275 (2016).
73. H3K4me1 marks DNA regions hypomethylated during aging in human stem and differentiated cells. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271306>.
74. High concordance of genomic and cytogenetic aberrations between peripheral blood and bone marrow in myelodysplastic syndrome (MDS). - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25943179>.
75. Coordinated alterations in RNA splicing and epigenetic regulation drive leukaemogenesis | Nature. <https://www.nature.com/articles/s41586-019-1618-0>.

## Περίληψη

**Σκοπός:** Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) αποτελούν μια ετερογενή ομάδα κλωνικών διαταραχών του αρχέγονων αιμοποιητικού κυττάρου και χαρακτηρίζονται από αυξημένη τάση μετασχηματισμού προς οξεία λευχαιμία. Σε μεγάλο ποσοστό των ασθενών συχνά ανιχνεύονται σημειακές ή άλλες μεταλλάξεις μικρής κλίμακας σε γονίδια που συμμετέχουν στην κυτταρική σηματοδότηση, στη ρύθμιση της επιγενετικής κατάστασης του κυττάρου (*TET2* και *IDH1/2*), στην ωρίμανση του RNA (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*). Σκοπός της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας ήταν η κατά προσέγγιση εκτίμηση της μεθυλίωσης του γονιδιώματος μέσω ανάλυσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, τα οποία απαντώνται διάσπαρτα στο γονιδίωμα, με την τεχνική post Real-time PCR HRMA σε δείγματα από ασθενείς με ΜΔΣ.

**Υλικά και Μέθοδοι:** Σε αυτή την εργασία επιλέχθηκαν 60 ασθενείς που πληρούσαν τα κριτήρια του WHO 2016 για τα ΜΔΣ και σύμφωνα με το μοριακό τους προφίλ, εντάχθηκαν 15 ασθενείς με ΜΔΣ κατά τη διάγνωση για περαιτέρω μέλετη του προτύπου μεθυλίωσης. Ακολούθησε προσδιορισμός της κατάστασης μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, και δημιουργία πρότυπης της καμπύλης αναφοράς, με τα επίπεδα μεθυλίωσης που προσδιορίστηκαν σε 6 δείγματα DNA υγιεινών δοτών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MS-HRMA και η μέθοδος MSP για την επαλήθευση των δεδομένων.

**Αποτελέσματα:** Τα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1, εμφανίζουν στατιστικώς μη σημαντικά μη σημαντικές διαφορές ( $p$ -value=0.9648), μεταξύ των ασθενών με ΜΔΣ (85.74%) και των υγιεινών δοτών (85.81%). Στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $p$ -value=0.0018), παρατηρείται στα επίπεδα μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, μεταξύ των δειγμάτων που προέρχονται από περιφερικό αίμα (86.92%) σε σχέση με δείγματα που προέρχονται από μυελό των οστών (81.02%), αντίστοιχα. Επίσης, εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $p$ -value=0.0013), στα επίπεδα μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, μεταξύ των δειγμάτων που έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο *SRSF2* (79.60%) και των δειγμάτων με μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια (86.69%). Τα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν με τη μέθοδο MSP.

**Συμπεράσματα:** Στην παρούσα εργασία, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά των επιπέδων μεθυλίωσης ( $p$ -value=0.9628), μεταξύ των ασθενών με ΜΔΣ και των φυσιολογικών δειγμάτων. Ωστόσο, στατιστικώς σημαντική ήταν η διαφορά στο πρότυπο της μεθυλίωσης ( $p$ -value=0.0013), μεταξύ των ασθενών που έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο *SRSF2* και στους υπόλοιπους ασθενείς. Η διαφορά αυτή πιθανόν να υποδηλώνει ότι οι ασθενείς αυτοί ενδεχομένως να ωφεληθούν από θεραπεία με υπομεθυλιωτικούς παράγοντες (HMA). Ωστόσο, περαιτέρω αναλύσεις είναι απαραίτητες προκειμένου να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

## Abstract

**Objective:** Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of myeloid clonal disorders characterized by peripheral blood and/or bone marrow cytopenias and increased risk of transformation to acute myelogenous leukemia. Mutations in genes involved in cell signaling, epigenetic regulation (*TET2* and *IDH1 / 2*) and RNA splicing (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*) are commonly detected in a large proportion of patients. The aim of this thesis was to estimate the gene methylation by analyzing the LINE-1 retrotransposon elements that are dispersed in the genome utilizing a post-Real-Time PCR HRMA technique in samples of patients with MDS.

**Methods:** In this study, 60 patients that fulfilled the WHO 2016 criteria for MDS were included and according to their molecular profile, 15 patients were selected for methylation analysis. To determine the methylation status of the LINE-1, a standard curve was prepared using 6 DNA samples from healthy donors. For methylation analysis MS-HRMA method was used and the MSP method was used to verify the data.

**Results:** The LINE-1 retrotransposon elements of MDS patients did not show statistically significant differences (p-value = 0.9648), in methylation levels in DNA of MDS patients (85.74%) and healthy donors (85.81%). However, differences in methylation levels of the LINE-1 transposons were observed in bone marrow DNA samples (81.02%) in comparison to peripheral blood DNA samples (86.92%) from MDS patients (p-value = 0.0018). Also, in patients who carried mutations in *SRSF2* gene showed reduced methylation levels (79.60%) in comparison to corresponding levels of patients with all other mutations (86.69%; p-value = 0.0013). These results were verified with the MSP method.

**Conclusions:** In this study, we did not observe any statistically significant differences in the methylation levels of LINE-1 retrotransposon elements (p-value = 0.9648) in patients with MDS compared to the normal population. However, in patients who with mutations in *SRSF2* gene reduced methylation levels (79.60%) were observed in comparison to corresponding levels of patients with all other mutations (86.69%; p-value = 0.0013), suggesting a possible therapeutic benefit from treatment with hypomethylating agents (HMA). Further analysis should be performed in larger cohorts of patients to confirm these results.

## **7 Παραρτήματα**

## Παράρτημα Ι - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για HRMA

Ονομασία	Εμπρόσθιος εκκινητής	nt	Ονομασία	Ανάστροφος εκκινητής	nt	Μέγεθος προϊόντος (nt)	Αντιπρόσωπος HRM mix	Ta (°C)
<b>CALRe9HF</b>	CAGCAGAGAAACAAAT GAATCA	22	CALRe9HR	ACAGCTCGTCCTTG GCTCT	19	204	ROCHE	67
<b>ASXL1e12HF</b>	GGACCTCGCAGACAC TG	18	ASXL1e12HR	GCCACCTCCCTCAT CGGTCT	20	152	KAPA	67
<b>DNMT3Ae23HF</b>	TGTGGTTAGACGGCTTC CCA	20	DNMT3Ae23HR	AGGTGGCGGATGA CTGACA	19	184	ROCHE	67
<b>IDH1e4HF</b>	TTGTGAGTGGATGGGT AAAAAG	22	IDH1e4HR	TTATTGCCAACATG ACTTACTTGAAG	26	82	KAPA	59
<b>IDH2e4HF</b>	CTGAAGAAGATGTGGA AAAGGGC	23	IDH2e4HR	GCCTACCTGGTCGC CAT	17	165	ROCHE	59
<b>SF3B1e14HF</b>	CCTGATATAGATAACTG T	18	SF3B1e14HR	AAGAATAGCTATCT GCTG	18	186	ROCHE	52
<b>SF3B1e15HF</b>	AGGTCTTGTGGATGAA GA	18	SF3B1e15HR	GGCAAAGCACTG ATGGC	18	55	ROCHE	59
<b>U2AF1e2HF</b>	ATTGGAGCATGTCGTAT C	18	U2AF1e2HR	AAACAACTGGCT AAACAAT	21	77	ROCHE	59
<b>U2AF1e6HF</b>	CACGCCGAGCTGTCAA AT	18	U2AF1e6HR	CCTCACTCACCCCA TCTCATCCG	23	78	ROCHE	67
<b>CSF3Re14HF</b>	ACAGTACAGTCCTCACT AA	19	CSF3Re14HR	CTCTCCCCTTACCTG ACT	18	54	ROCHE	67
<b>SETBP1e4HF</b>	AGGAAATCACGCTGTC CCCTGTCCA	25	SETBP1e4HR	GAGCAGAAATCAA AAGAGTACCTTTC	26	154	ROCHE	67
<b>KITe17HF</b>	TCCTTACTCATGGTCCG A	18	KITe17HR	CTTTAACCACATAA TTAGAAAGG	23	90	KAPA	59
<b>SRSF2e1HF</b>	CGCTGAGGACGCTATT CC	18	SRSF2e1HR	GGCTGTGGTGTGA GTGGC	18	110	ROCHE	67
<b>JAK2 FO</b>	TCAGAACGTTGATGGC AGTGG	21	JAK2 RO	TTTCCTTTTTCACAA GATATTGC	23			
<b>JAK2 Fwt</b>	CAGGCATTTGGTTTTAA ATTATGGAGTAT	29	JAK2 Rmt	TACTTACCTCGTCTC CACAAAAGTTA	27			

**Πίνακας 21.** Εκκινητές που σχεδιάστηκαν για Real-Time PCR ενίσχυση των γενομικών περιοχών ενδιαφέροντος, προκειμένου αυτές να αναλυθούν μέσω HRMA. Συντημήσεις: nt = πλήθος νουκλεοτιδίων, HRM mix = προπαρασκευασμένο διάλυμα πολυμεράσης, Ta = θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα σε βαθμούς κελσίου (°C).

## Παράρτημα II - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για MS-HRMA

Όνομασία	Εμπρόσθιος εκκινητής	nt	Όνομασία	Ανάστροφος εκκινητής	nt	Μέγεθος προϊόντος (nt)	Ta (°C)
<b>LINE1hF</b>	TAGGGAGTGTTAGATAGTGG	20	LINE1hR	AAACTCCCTAACCCCTTAC	19	109	60

**Πίνακας 22.** Εκκινητές για PCR ενίσχυση του υποστρώματος πριν από προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 μέσω MS-HRMA. Συντμήσεις: nt = πλήθος νουκλεοτιδίων, Ta = θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα σε βαθμούς κελσίου (°C).

## Παράρτημα III - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για PCR ενίσχυση πριν από πυροαλληλούχιση

Όνομασία	Εμπρόσθιος εκκινητής	nt	Όνομασία	Ανάστροφος εκκινητής	nt	Μέγεθος προϊόντος (nt)	Ta (°C)
<b>LINE1psPF</b>	TTAAGAGTTATTGTTTGTGG	22	LINE1psPR	TTATGTTAGTGGATTATTTAAT	22	90	53

**Πίνακας 23.** Εκκινητές για PCR ενίσχυση του υποστρώματος πριν από προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 μέσω MSP. Συντμήσεις: nt = πλήθος νουκλεοτιδίων, Ta = θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα σε βαθμούς κελσίου (°C).

## Παράρτημα IV - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για πυροαλληλούχιση

Όνομασία	Εμπρόσθιος εκκινητής	nt	Κατεύθυνση	Μέγεθος διαβάσματος (nt)
<b>LINE1psSR</b>	TTTTATGTTAGTGGATTATTTAATG	26	Reverse	65

**Πίνακας 24.** Εκκινητές για προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 μέσω MSP. Συντμήσεις: nt = πλήθος νουκλεοτιδίων.