



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —



Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής



**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

***“Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση”***

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**“ Επιλογή κατάλληλης μεθοδολογίας για την απομόνωση γενωμικού υλικού από  
εγκεφαλονωτιαίο υγρό ”**

**Μαριάννα Χουσάκου**

**A.M.: 7450382200024**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2024**



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
**Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών**

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —



Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής



**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

*“Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση”*

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

“ Επιλογή κατάλληλης μεθοδολογίας για την απομόνωση γενωμικού υλικού από εγκεφαλονωτιαίο υγρό ”

**Μαριάννα Χουσάκου**

**A.M.: 7450382200024**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**Χρυσταλλένα Σοφοκλέους (Επιβλέπουσα)**

*Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Ιατρική Σχολή Ε.Κ.Π.Α, Νοσοκομείο Παιδων «Η Αγία Σοφία»*

**Χριστίνα Βρεττού**

*PhD, Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (ΕΔΙΠ) Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Ιατρική Σχολή Ε.Κ.Π.Α., Νοσοκομείο Παιδων «Η Αγία Σοφία»*

**Joanne Traeger-Συνοδινού**

*Ομότιμη Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, Ιατρική Σχολή Ε.Κ.Π.Α., Νοσοκομείο Παιδων «Η Αγία Σοφία»*

**ΑΘΗΝΑ**

**ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ, 2024**



HELLENIC REPUBLIC

**National and Kapodistrian  
University of Athens**

EST. 1837



National and Kapodistrian  
University of Athens

Medical School  
Department of Medical Genetics

**School of Health Sciences  
Department of Medicine**

**MASTER PROGRAM IN**

***“Medical Genetics: Clinic & Laboratory Direction”***

**MASTER THESIS**

**“Evaluation of methodologies for isolating genomic material from cerebrospinal  
fluid”**

**Marianna Chousakou**

**Register Number: 7450382200024**

## **Examining Board Members**

### **Chrystallena Sofocleous (Supervisor)**

*Associate Professor of Medical Genetics, Medical School National & Kapodistrian University of Athens, "Agia Sophia" Children's Hospital*

### **Christina Vrettou (Supervisor)**

*PhD, Laboratory Teaching Personnel, Medical School National & Kapodistrian University of Athens, "Agia Sophia" Children's Hospital*

### **Joanne Rachel Traeger-Synodinos (Supervisor)**

*Emeritus Professor of Genetics, Medical School National & Kapodistrian University of Athens, "Agia Sophia" Children's Hospital*

**Athens**

**October, 2024**

© [2024]

Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ)

[Μαριάννα Χουσάκου, Βιολόγος]


*Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, η οποία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. "ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ" αποτελεί συνιδιοκτησία του ΕΚΠΑ και του/της φοιτητή/τριας, ο/η καθένας/μια από τους/τις οποίους/ες έχει το δικαίωμα ανεξάρτητης χρήσης και αναπαραγωγής τους (στο σύνολο ή τμηματικά) για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, σε κάθε περίπτωση αναφέροντας τον τίτλο και τον/την συγγραφέα και το ΕΚΠΑ όπου εκπονήθηκε η Διπλωματική Εργασία καθώς και τον Επιβλέποντα και την άλλα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής.*



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



Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής



## ΒΕΒΑΙΩΣΗ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

«Δηλώνω υπεύθυνα ότι η συγκεκριμένη Διπλωματική Εργασία με τίτλο:

«Επιλογή κατάλληλης μεθοδολογίας για την απομόνωση γενωμικού υλικού από εγκεφαλονωτιαίο υγρό»

για τη λήψη του μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών του **Π.Μ.Σ. “ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ:ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ”**, της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, έχει συγγραφεί από εμένα προσωπικά και δεν έχει υποβληθεί ούτε έχει εγκριθεί στο πλαίσιο κάποιου άλλου μεταπτυχιακού ή προπτυχιακού τίτλου σπουδών, στην Ελλάδα ή στο εξωτερικό.

Η εργασία αυτή αντιπροσωπεύει τις προσωπικές μου απόψεις επί του θέματος.

Κατά τη συγγραφή, ακολούθησα την πρέπουσα ακαδημαϊκή δεοντολογία. Οι πηγές στις οποίες ανέτρεξα για την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής αναφέρονται στο σύνολό τους, δίνοντας πλήρεις αναφορές στους συγγραφείς, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Έχω επίσης αποφύγει οποιαδήποτε ενέργεια που συνιστά παράπτωμα λογοκλοπής. Γνωρίζω ότι η λογοκλοπή μπορεί να επισύρει ποινή ανάκλησης του πτυχίου μου.

Σε κάθε περίπτωση, αναληθούς ή ανακριβούς δηλώσεως, υπόκειμαι στις συνέπειες που προβλέπονται στον Κανονισμό Σπουδών του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών στην

“ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ:ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ”, και στις διατάξεις που προβλέπει η Ελληνική και Κοινοτική Νομοθεσία περί πνευματικής ιδιοκτησίας».

Η ΔΗΛΟΥΣΑ

Υπογραφή:

Όνοματεπώνυμο: *Μαριάννα Χουσάκου*

Αριθμός Μητρώου: 7450382200024

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

|  |    |
|--|----|
| <b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>                           | 8  |
| <b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>                              | 10 |
| <b>ABSTRACT</b>                              | 11 |
| ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ                            | 12 |
| ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ                       | 12 |
| <b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ</b>                     | 13 |
| <b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ</b>                     | 13 |
| <b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>                           | 14 |
| 1.1. Κεντρικό Νευρικό Σύστημα                | 14 |
| 1.2. Φραγμοί Κεντρικού Νευρικού Συστήματος   | 15 |
| 1.3. Εγκεφαλονωτιαίο υγρό                    | 17 |
| 1.3.1. Παραγωγή ENY                          | 18 |
| 1.3.2. Χοριοειδή πλέγματα                    | 18 |
| 1.3.3. Κυκλοφορία του ENY                    | 21 |
| 1.3.4. Απορρόφηση του ENY                    | 22 |
| 1.3.5. Κύτταρα Εγκεφαλονωτιαίου υγρού        | 23 |
| 1.3.6. Λήψη δείγματος εγκεφαλονωτιαίου υγρού | 23 |
| 1.3.7. Υγρή βιοψία                           | 25 |
| 1.3.9. Πρωτόκολλα απομόνωσης DNA από ENY     | 27 |

|   |    |
|---|----|
| <b>2. ΣΚΟΠΟΣ</b>  | 28 |
| <b>3. ΥΛΙΚΟ/ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ</b>   | 29 |
| 3.1. Υλικό  | 29 |
| 3.2. Μεθοδολογία  | 30 |
| 3.2.1. Πρωτόκολλα απομόνωσης DNA  | 30 |
| 3.2.2. Φωτομέτρηση DNA  | 32 |
| 3.2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR   | 33 |
| 3.2.3.1. Αντιδράσεις singleplex PCR   | 34 |
| 3.2.3.1.1. PCR NSD1 εξόνιο 18   | 34 |
| 3.2.3.1.2. PCR CAPN3 εξόνιο 4   | 34 |
| 3.2.3.1.3. PCR SCN1A εξόνιο 22  | 35 |
| 3.2.3.2. Αντιδράσεις Multiplex PCR  | 35 |
| 3.2.3.2.1. PCR AMELX/Y  | 35 |
| 3.2.3.2.2. PCR AMELX/AMELY, STRS B-THAL, STRS SMA   | 36 |
| 3.2.3.2.3. PCR επιλεγμένων αλληλουχιών φυλετικών χρωμοσωμάτων   | 37 |
| 3.2.3.3. Εκκινητές αντιδράσεων  | 37 |
| 3.2.4. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πολλαπλασιασμού PCR  | 38 |
| 3.2.4.1. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης  | 38 |
| 3.2.4.2. Ηλεκτροφόρηση σε γενετικό αναλυτή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (Capillary Electrophoresis)                                       | 39 |
| 3.2.5. Αλληλούχηση DNA  | 40 |
| 3.2.6. Διάγνωση Νωτιαία Μυϊκής Ατροφίας   | 41 |
| 3.2.6.1. Αναγνώριση αλληλομόρφων SMN1/SMN2 με χρήση περιοριστικών ενδοнокλεασών (RFLPs)   | 42 |
| 3.2.6.2. Εξαρτώμενη από τη δράση της λιγάσης πολλαπλή ενίσχυση ανιχνευτών MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA) | 43 |
| 3.2.7. Μελέτη προτύπου μεθυλίωσης DNA   | 44 |
| 3.2.7.1. Μελέτη προτύπου μεθυλίωσης X χρωμοσώματος (HUMARA)   | 44 |
| 3.2.7.2. Μελέτη προτύπου μεθυλίωσης έπειτα από χημική τροποποίηση (PCR SNRPN)   | 45 |
| 3.2.8. Ενίσχυση ολικού γονιδιώματος (Whole Genome Amplification)  | 47 |
| <b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>  | 47 |
| Απομόνωση γενωμικού DNA με δύο πρωτόκολλα και σύγκριση των ποσοτικών και ποιοτικών αποτελεσμάτων που αποδίδουν.                         | 47 |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 4.1. | Έλεγχος της ικανότητας πολλαπλασιασμού επιλεγμένων αλληλουχιών στόχων από δείγματα DNA απομονωμένα από ENY.                                | 50 |
| 4.2. | Αντίδραση πολλαπλών στόχων σε δείγματα απομονωμένα με το πρωτόκολλο που απέδωσε τα καλύτερα ποιοτικά αποτελέσματα.                         | 51 |
| 4.3. | Έλεγχος συσχέτισης ικανότητας πολλαπλασιασμού και μεγέθους προϊόντων. PCR NSD1 εξόνιο 18 και αλληλούχηση κατά Sanger                       | 54 |
| 4.4. | Ενίσχυση ολικού γονιδιώματος (Whole Genome Amplification).   | 58 |
| 4.5. | Επιβεβαίωση της διάγνωσης Νωτιαίας Μυϊκής Ατροφίας από δείγματα ENY των ασθενών.<br>Μελέτη για αναγνώριση βλάβης συνδεόμενη με SMA (RFLPs) | 60 |
| 4.6. | Μελέτη προτύπου μεθυλίωσης DNA.  | 63 |
| 5.   | ΣΥΖΗΤΗΣΗ/ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ   | 69 |
| 6.   | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ   | 72 |

---

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) είναι μέσο ζωτικής σημασίας για το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Παράγεται κυρίως από τα χοριοειδή πλέγματα του εγκεφάλου μέσω επεξεργασίας του πλάσματος και εξασφαλίζει την παροχή θρεπτικών συστατικών, την διακίνηση σηματοδοτικών μορίων και μηχανική προστασία. Το ENY αποτελεί ιδανικό , μέσο μελέτης για τις παθήσεις του ΚΝΣ, για έλεγχο των οποίων απομονώνεται με οσφυονωτιαία παρακέντηση και αναλύεται. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει μελέτες που έχουν αποδείξει την ύπαρξη δεικτών ή/ και σωματικών παραλλαγών στο ENY που σχετίζονται με ασθένειες του ΚΝΣ αλλά δεν ανιχνεύονται στο αίμα. Για τον λόγο αυτό υπάρχει η τάση για ένταξη του ENY στα πρωτόκολλα υγρής βιοψίας. Στην παρούσα εργασία απομονώθηκε DNA από 16 δείγματα ENY 9 ασθενών με Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία, που χαρακτηρίζονται από ομόζυγο έλλειμμα εξονίων 7 και 8 του γονιδίου SMN1 και λαμβάνουν ενδοραχιαία θεραπευτική αγωγή (Spiranza) κατά την οποία αφαιρείται αντίστοιχος όγκος ENY. Η απομόνωση DNA έγινε με χρήση δύο διαφορετικών εμπορικά διαθέσιμων πρωτοκόλλων απομόνωσης γενωμικού DNA (Nucleosprin Tissue XS, Qiagen Mini Blood). Η πλειοψηφία των δειγμάτων φυλασσόταν σε θερμοκρασία -20°C από τα οποία απομονώθηκε DNA χαμηλότερης συγκέντρωσης, σε αντίθεση με 2 δείγματα ασθενών που διατηρήθηκαν σε σωληνάριο με EDTA στους 4°C. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε διπλή φυγοκέντρηση για την κατακρήμνιση του κυτταρικού περιεχομένου (1.000g 10min, 16.000g 20min) και απομονώθηκε DNA με χρήση Nucleosprin Tissue XS. Το πρωτόκολλο Nucleosprin Tissue XS είναι σχεδιασμένο για απομόνωση DNA από δείγματα 20 μl και απέδωσε υψηλότερη συγκέντρωση DNA που χαρακτηρίζεται από λόγο ποιοτικής αξιολόγησης (260/280) υψηλής καθαρότητας DNA σε σχέση με το δεύτερο πρωτόκολλο, το οποίο είναι σχεδιασμένο για απομόνωση DNA από δείγματα 200 μl. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την σημασία των συνθηκών διατήρησης του υλικού. Έπειτα τα δείγματα που

απομονώθηκαν με αμφότερα τα πρωτόκολλα, υποβλήθηκαν σε τεχνικές γενετικής ανάλυσης προκειμένου να ελεγχθεί η δυναμική τους ως διαγνωστικό υλικό. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν singleplex PCR με στόχους τα γονίδια AMELX/Y, NSD1, CAPN3, SCN1A, SMN1/2, multiplex PCR με στόχους, STRs HBB, STRs SMN1, αλληλουχίες φυλετικών χρωμοσωμάτων και τεχνικές μελέτης προτύπου μεθυλίωσης HUMARA, MS-PCR. Φάνηκε πως τα δείγματα και των δύο πρωτοκόλλων μπορούν να αποδώσουν ικανοποιητικά αλλά όχι πάντα σε τεχνικές singleplex PCR, πιθανώς εξαιτίας παρουσίας παρεμποδιστικών παραγόντων. Σε multiplex PCR και σε τεχνικές μελέτης προτύπου μεθυλίωσης τα δείγματα ENY παρουσίαζαν μικρότερο ποσοστό επιτυχίας πιθανόν εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης τους. Η ενίσχυση της ποσότητας DNA με Whole Genome Amplification δεν απέδωσε τα προϊόντα που αναμένονταν στις τεχνικές αυτές, ενώ φαίνεται ότι εξαιρετικά μεγάλες συγκεντρώσεις DNA πιθανόν επιδρούν παρεμποδιστικά, ενώ ευαίσθητες τεχνικές όπως MLPA δεν απέδωσαν αξιόπιστα αποτελέσματα.

### Λέξεις κλειδιά

ENY; Απομόνωση γενωμικού DNA; Τεχνικές γενετικής ανάλυσης

## ABSTRACT

---

Cerebrospinal fluid (CSF) is a vital medium for the Central Nervous System (CNS). It is mainly produced by the choroid plexuses of brain through plasma filtration and ensures supply of nutrients, trafficking of signaling molecules and mechanical protection. CSF is considered ideal for studying CNS diseases, whereby it can be isolated via lumbar puncture and then analyzed. Recent studies have demonstrated the presence of biomarkers and/or somatic variations in the CSF that are associated with CNS diseases, escaping detection in blood. For this reason CSF is becoming more and more common in liquid biopsy protocols. In this study, DNA was isolated from 16 CSF samples of 9 patients with Spinal Muscular Atrophy, characterized by homozygous absence of exon 7 and 8 of SMN1 gene. The patients received intrathecal treatment (Spiranza), where commensurate volume of CSF and drug is removed. Two genomic DNA isolation kits were used for DNA extraction (Nucleospin Tissue XS, Qiagen Mini Blood). The majority of CSF samples were kept at -20°C, yielding lower DNA concentration, in contrast with 2 CSF samples which were kept in EDTA tubes at 4°C. These samples were double centrifugated (1.000g 10min, 16.000g 20min), DNA was isolated with Nucleospin Tissue XS kit and yielded higher DNA concentration. Nucleospin Tissue XS is designed for 20 µl volume samples and yielded higher DNA concentration, characterized by quality control ratio 260/280 indicative for high purity, in contrast with Qiagen Mini Blood which is designed for 200µl volume samples. This fact indicates the importance of the preservation conditions of the material. The samples isolated by both protocols were subsequently subjected to molecular analysis tests to evaluate their dynamics as a diagnostic material. Singleplex PCR of AMELX/Y NSD1, CAPN3, SCN1A, SMN1/2, multiplex PCR of STRs HBB, STRs SMN1, sequences of X/Y chromosomes and methylation specific techniques such as HUMARA, MS-PCR were carried out. It appeared that the samples of both protocols may be adequate for targeted tests (singleplex PCRs), except some cases, where interfering factors seems to inhibit the reaction. In multiplex PCRs and methylation specific techniques CSF samples frequently fail to produce results, possibly due to their low DNA concentration. Whole Genome Amplification failed to provide expected results, despite

high DNA concentration, whereby sensitive techniques such as MLPA presented with poor quality parameters and unreliable results.

### Keywords

CSF; Genomic DNA isolation; Genetic analysis techniques

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

| Ελληνικός όρος            | Αγγλικός όρος           |
|---------------------------|-------------------------|
| 3η/4η κοιλία              | 3rd/4th ventricle       |
| Αιματοεγκεφαλικός φραγμός | Blood-Brain barrier     |
| Άνω οβελιαίος κόλπος      | Sagittal sinus          |
| Αραχνοειδής λάχνη         | Arachnoid villus        |
| Αστροκύτταρα              | Astrocytes              |
| Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία     | Spinal Muscular Atrophy |
| Περικύτταρα               | Pericytes               |
| Πλάγια κοιλία             | Lateral ventricle       |
| Σκληρά μήνιγγα            | Dura mater              |
| Στενοσύνδεσμος            | Tight junction          |
| Τρήμα του Lyschka         | Foramen of Lyschka      |
| Τρήμα του Magendie        | Foramen of Magendie     |
| Τρήματα του Monro         | Foramina of Monro       |
| Υγραγωγός του Sylvius     | Aqueduct of Sylvius     |
| Υγρή βιοψία               | Liquid biopsy           |
| Υπαραχνοειδής χώρος       | Subarachnoid space      |
| Υποσκληρίδιος χώρος       | Subdural space          |
| Χοριοειδές πλέγμα         | Choroid plexus          |
| Χοριοειδής μεμβράνη       | Pial membrane           |
| Χοριοειδής μήνιγγα        | Pia mater               |

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

| Ελληνικές συντομογραφίες | Έννοια                     |
|--------------------------|----------------------------|
| ΑΝΣ                      | Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα   |
| ΕΝΥ                      | Εγκεφαλονωτιαίο υγρό       |
| ΚΝΣ                      | Κεντρικό Νευρικό Σύστημα   |
| ΠΝΣ                      | Περιφερικό Νευρικό Σύστημα |

| Αγγλικές συντομογραφίες | Έννοια   |
|-------------------------|--|
| CfDNA                   | Cell-free DNA                                    |
| CSF                     | Cerebrospinal fluid                              |
| MLPA                    | Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification |

|      |  |
|------|--|
| RFLP | Restriction Fragment Length Polymorphism |
| STRs | Short Tandem Repeat                      |
| WGA  | Whole Genome Amplification               |
| SNV  | Single Nucleotide Variation              |
| CNV  | Copy Number Variation                    |
| VAF  | Variant allele frequency                 |
| ADO  | Allele Drop Out                          |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

---

|  |    |
|--|----|
| Πίνακας 1. Φυσιολογική σύσταση και ιδιότητες του εγκεφαλονωτιαίου υγρού.                     | 17 |
| Πίνακας 2. Κλινικές ενδείξεις ελέγχων σε ENY ανάλογα με την κατηγορία ασθενών.               | 24 |
| Πίνακας 3. Αντιδραστήρια και τελικές τους συγκεντρώσεις σε αντίδραση PCR.                    | 33 |
| Πίνακας 4. Στοιχειομετρία αντίδρασης PCRNSD1 εξόνιο 18.                                      | 34 |
| Πίνακας 5. Στοιχειομετρία αντίδρασης PCR CAPN3 εξόνιο 4.                                     | 34 |
| Πίνακας 6 Στοιχειομετρία αντίδρασης PCR SCN1A εξόνιο 22                                      | 35 |
| Πίνακας 7. Στοιχειομετρία της αντίδρασης PCR AMELX/Y.  | 36 |
| Πίνακας 8 Στοιχειομετρία αντίδρασης PCR AMELX/AMELY, STRs B-THAL, STRs SMA                   | 36 |
| Πίνακας 9. Στοιχειομετρία της αντίδρασης PCR αλληλουχιών φυλετικών χρωμοσωμάτων.             | 37 |
| Πίνακας 10. Αλληλουχίες εκκινήτων  | 38 |
| Πίνακας 11. Αντιδραστήρια Big Dye Terminator kit και όγκος ανά αντίδραση.                    | 41 |
| Πίνακας 12. Στοιχειομετρία αντίδρασης PCR για τα εξόνια 7 και 8.                             | 42 |
| Πίνακας 13. Αντίδραση επώασης με περιοριστική ενδονουκλεάση.                                 | 42 |
| Πίνακας 14. Στοιχειομετρία αντίδρασης πέψης του DNA με HhaI.                                 | 45 |
| Πίνακας 15 Στοιχειομετρία αντίδρασης PCR AR εξόνιο 1.  | 45 |
| Πίνακας 16. Στοιχειομετρία αντίδρασης PCR SNRPN.   | 46 |
| Πίνακας 18. Αποτελέσματα απομόνωσης από δείγματα ENY.  | 48 |
| Πίνακας 19. Αναμενόμενα μεγέθη προϊόντων πολλαπλασιασμού αλληλουχιών AMELX/Y, STRs HBB,SMN1. | 52 |
| Πίνακας 20. Αναμενόμενα μεγέθη προϊόντων πολλαπλασιασμού φυλετικών χρωμοσωμάτων.             | 52 |
| Πίνακας 21. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης και αλληλούχησης προϊόντος PCR NSD1 εξόνιο 18.       | 55 |
| Πίνακας 22 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης nested PCR SCN1A εξόνιο 22.                           | 58 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

---

|  |    |
|--|----|
| Εικόνα 1. Φραγμοί του εγκεφάλου. (a) Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός, (b) Ο φραγμός αίματος-ENY, (c) Ο αραχνοειδής φραγμός.                                    | 16 |
| Εικόνα 2. Απεικόνιση του χοριοειδούς πλέγματος, του επενδυματικού ιστού που καλύπτει τις κοιλίες, του αγγειακού συστήματος και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. | 18 |
| Εικόνα 3. Απεικόνιση δομής χοριοειδούς πλέγματος.  | 20 |
| Εικόνα 4. Δομή αιματοεγκεφαλικού φραγμού.  | 21 |

|  |    |
|--|----|
| Εικόνα 5. Κυκλοφορία εγκεφαλονωτιαίου υγρού.   | 22 |
| Εικόνα 6. Κυκλοφορία του ENY.  | 23 |
| Εικόνα 7. α. Διαδικασία λήψης ENY. β. Ανατομία Επισκληριδίου-Υποσκληριδίου-Υπαραχνοειδή χώρου.             | 25 |
| Εικόνα 8. Στάδια απομόνωσης DNA με χρήση του πρωτοκόλλου Nucleospin Tissue XS.                             | 31 |
| Εικόνα 9 Στάδια απομόνωσης DNA με χρήση του πρωτοκόλλου Qiagen Mini Blood.                                 | 32 |
| Εικόνα 10. Απεικόνιση αρχής μεθόδου MLPA.  | 44 |
| Εικόνα 11. Στάδια χημικής τροποποίησης για μελέτη προτύπου μεθυλίωσης.                                     | 46 |
| Εικόνα 12. Προϊόντα πολλαπλασιασμού AMELX/Y.   | 51 |
| Εικόνα 13. Προϊόντα πολλαπλασιασμού AMELX/Y, STRs SMN1 STRs HBB.   | 53 |
| Εικόνα 14. Προϊόντα από πολλαπλασιασμό τμημάτων φυλετικών χρωμοσωμάτων.                                    | 54 |
| Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πολλαπλασιασμού εξονίου 18/ NSD1.                                       | 56 |
| Εικόνα 16α. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφορήματος αλληλούχησης εξονίου 18/NSD1.                               | 56 |
| Εικόνα 17. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης <i>nested</i> PCR SCN1A εξόνιο 22.                             | 58 |
| Εικόνα 18. PCR SCN1A εξόνιο 22.  | 59 |
| Εικόνα 19. Nested PCR SCN1A εξόνιο 22.   | 60 |
| Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης της αντίδρασης PCR SMN1/2 εξόνιο 7.                               | 61 |
| Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης της αντίδρασης PCR SMN1/2 εξόνιο 8.                               | 61 |
| Εικόνα 22 α. MLPA SMA ανάλυση φυσιολογικού ατόμου. β. MLPA SMA ασθενή.                                     | 63 |
| Εικόνα 23. Προϊόντα από πολλαπλασιασμό εξονίου 1 γονιδίου AR.  | 65 |
| Εικόνα 24. Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης Methylation Specific PCR.   | 67 |
| Εικόνα 25. Αλληλουχία εξονίου α γονιδίου SNRPN.  | 67 |
| Εικόνα 26. Δείγμα ελέγχου, μητρικό μεθυλιωμένο αλληλόμορφο SNRPN μετά από επεξεργασία με διθειώδες νάτριο. | 68 |
| Εικόνα 27. Δείγμα ENY, μητρικό μεθυλιωμένο αλληλόμορφο SNRPN μετά από επεξεργασία με διθειώδες νάτριο.     | 68 |

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

### 1.1. Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

Το Νευρικό Σύστημα χωρίζεται σε Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ) και Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα (ΑΝΣ). Το ΚΝΣ αποτελείται από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό. Το ΠΝΣ αποτελείται από τα μέρη του νευρικού συστήματος που βρίσκονται έξω από την σκληρά μήνιγγα. Το ΑΝΣ αποτελείται από τμήματα του ΚΝΣ και του ΠΝΣ και ρυθμίζει τις σπλαχνικές λειτουργίες. Ο σχηματισμός του ξεκινά ήδη από το στάδιο της γαστριδίωσης της εμβρυογένεσης. Στο στάδιο αυτό παρατηρούνται τρεις πρωτογενείς ιστικές στιβάδες, το ενδόδερμα, το μεσόδερμα και το εξώδερμα. Η προέλευσή του νευρικού συστήματος καθώς και της επιδερμίδας είναι εξωδερμική. Κάτω από το εξώδερμα υπάρχει μία χορδή μεσοδερμικών κυττάρων που ονομάζεται νωτιαία χορδή. Αυτά κατευθύνουν το εξώδερμα να σχηματίσει τον νευρικό σωλήνα, μέσω μίας διαδικασίας που ονομάζεται νευριδίωση. Τα κύτταρα του εξωδέρματος που θα σχηματίσουν τον νευρικό σωλήνα αποτελούν το νευροεξώδερμα. Το πρώτο βήμα της νευριδίωσης είναι ο σχηματισμός της νευρικής πλάκας, η οποία αποτελείται από μία στιβάδα κυττάρων. Αυτά πολλαπλασιάζονται ταχύτατα στα πλάγια χείλη και σχηματίζουν τις νευρικές πτυχές που εγκοιλώνουν την νευρική αύλακα. Οι νευρικές πτυχές τελικά

συνενώνονται και σχηματίζεται ο νευρικός σωλήνας, ο οποίος δίνει γένεση στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό. Ο αυλός αυτού του νευρικού σωλήνα ονομάζεται νευρικός πόρος και σχηματίζει τις τέσσερις κοιλίες του εγκεφάλου και τον κεντρικό σωλήνα του νωτιαίου μυελού. Οι συγγενείς ανωμαλίες του εγκεφάλου προκύπτουν κατά κανόνα από την ατελή ανάπτυξη του νευρικού σωλήνα (Barrett et al., 2014). Ανωμαλίες του νευρικού συστήματος μπορεί να προκαλούνται εξαιτίας γενετικών ή περιβαλλοντικών παραγόντων και εμφανίζουν ευρύ φάσμα φαινοτύπων, που ονομάζονται νευροπάθειες (neuropathies) (Spreafico et al., 2009).

## 1.2. Φραγμοί Κεντρικού Νευρικού Συστήματος

Υπάρχουν τρεις φραγμοί που διαχωρίζουν το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα από το αίμα, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 1.

1ος: Αιματοεγκεφαλικός φραγμός

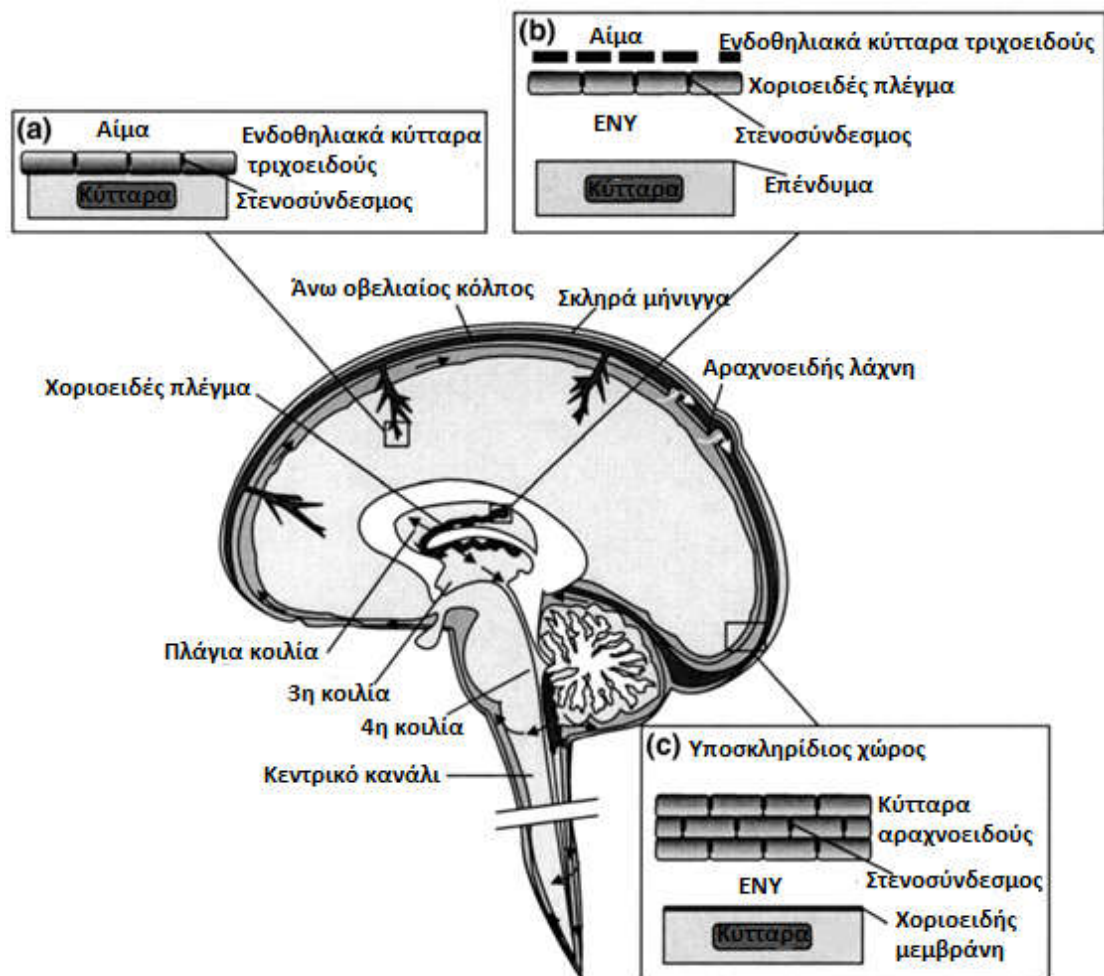
Όλοι οι οργανισμοί που έχουν καλά ανεπτυγμένο Νευρικό Σύστημα, όπως τα θηλαστικά, διαθέτουν αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ο οποίος σχηματίζεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων (Abbott et al., 2010).

2ος: Φραγμός αίματος-εγκεφαλονωτιαίου υγρού

Ο φραγμός αυτός σχηματίζεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του χοριοειδούς πλέγματος. Το ENY εκκρίνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του χοριοειδούς πλέγματος, στις κοιλίες του εγκεφάλου. Το εξωκυττάριο υγρό που περιβάλλει τον εγκέφαλο περιλαμβάνει, εκτός από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και υγρό από την έκκριση των τριχοειδικών ενδοθηλιακών κυττάρων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Διαφορετικές πειραματικές μελέτες έχουν δείξει τη συμβολή του εξωκυττάριου υγρού στο ENY σε ποσοστό 10-60%. Η έκκριση και των δύο καθοδηγείται από την ιοντική και ωσμωτική βαθμίδωση που δημιουργείται από τη δράση  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, που εκφράζεται στην κοιλιακή μεμβράνη του ενδοθηλίου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και στην κορυφαία μεμβράνη του επιθηλίου του χοριοειδούς πλέγματος, με αποτέλεσμα την κίνηση του νερού (Abbott et al., 2010).

3ος: Αραχνοειδής φραγμός

Το αραχνοειδές επιθήλιο που βρίσκεται κάτω από τις μήνιγγες περικλείει πλήρως το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Αυτός ο φραγμός ολοκληρώνει τον έλεγχο διακίνησης εξωκυττάρων υγρών μεταξύ Κεντρικού Νευρικού Συστήματος και του υπόλοιπου σώματος. Σημειώνεται πως σε αυτό τον φραγμό δεν πραγματοποιείται σημαντική ανταλλαγή μεταξύ αίματος και Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, λόγω της μη αγγειακής φύσης του και της μικρής επιφάνειας του (Abbott et al., 2010).



Εικόνα 1. Φραγμοί του εγκεφάλου. (α) Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός δημιουργείται στο επίπεδο των ενδοθηλιακών κυττάρων του εγκεφαλικού τριχοειδούς, τα οποία ενώνονται με στενοσυνδέσμους. (β) Ο φραγμός αίματος-ΕΝΥ βρίσκεται στα χοριοειδή πλέγματα στην πλάγια, τρίτη και τέταρτη κοιλία του εγκεφάλου, όπου σχηματίζονται σφιχτές συνδέσεις μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων στην επιφάνεια του επιθηλίου που βρίσκεται προς την πλευρά του ΕΝΥ (κορυφαία επιφάνεια). (γ) Ο αραχνοειδής φραγμός. Ο εγκέφαλος περιβάλλεται από την αραχνοειδή μεμβράνη που βρίσκεται κάτω από τη μήνιγγα. Το αραχνοειδές είναι μη αγγειακό αλλά βρίσκεται κοντά στον άνω οβελιαίο κόλπο και χωρίζεται από αυτόν με τη μήνιγγα. Το αραχνοειδές είναι ένα πολυστρωματικό επιθήλιο με στενοσυνδέσμους μεταξύ των κυττάρων του. Οι αραχνοειδείς λάχνες προβάλλουν στον οβελιαίο κόλπο μέσω της σκληράς μήνιγγας και παροχετεύεται σημαντική ποσότητα ΕΝΥ από τον εγκέφαλο προς το αίμα, προσαρμογή από Abbott et al., 2010.

Και στις τρεις διεπαφές, η λειτουργία φραγμού προκύπτει από έναν συνδυασμό φυσικού φραγμού, φραγμού μεταφοράς ουσιών και μεταβολικού φραγμού. Ο φυσικός φραγμός αφορά την στενή σύνδεση κυττάρων που μειώνει τη μεταφορά ουσιών μέσω της παρακυτταρικής οδού, ο φραγμός μεταφοράς ουσιών αφορά ειδικούς μηχανισμούς μεταφοράς μέσω πρωτεϊνών, ενώ ο μεταβολικός φραγμός αφορά την παρουσία ενζύμων που μεταβολίζουν μόρια που μεταφέρονται. Η λειτουργία φραγμού ρυθμίζεται και μεταβάλλεται, τόσο στη φυσιολογία όσο και στην παθολογία. Ρόλος αυτών των φραγμών είναι η ρύθμιση της ανταλλαγής ιόντων, της συγκέντρωσης νευροδιαβιβαστών και μακρομορίων, της παροχής θρεπτικών για τον εγκέφαλο και της προστασίας του

εγκεφάλου από τοξικά προϊόντα. Εγκεφαλικές λοιμώξεις, όγκοι, ισχαιμικά επεισόδια ή αυτοανοσία όπως πολλαπλή σκλήρυνση, οδηγούν σε λειτουργικές διαταραχές και εμφάνιση νευρολογικών δυσλειτουργιών (Abbott et al., 2010).

### 1.3. Εγκεφαλονωτιαίο υγρό

Το Εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ), το σωματικό υγρό που περιβάλλει τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό, έχει ζωτική σημασία για το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Είναι διαυγές, ελαφρά αλκαλικό υγρό (7.4) (Πίνακας 1), με ρόλο στη παροχή θρεπτικών στοιχείων, στη διακίνηση σηματοδοτικών μορίων και στην απομάκρυνση παραπροϊόντων του μεταβολισμού στις περιοχές του ΚΝΣ. Συμβάλει στην γενικότερη προστασία του εγκεφάλου, καθώς συμμετέχει στη διατήρηση της σωστής ενδοκρανιακής πίεσης (60-150 mm H<sub>2</sub>O), προσφέρει μηχανική προστασία στον εγκέφαλο και στο νωτιαίο μυελό, σε περίπτωση τραυματισμού και απορροφά τους κραδασμούς (Johnson, 2012). Ακόμη μειώνει το σχετικό βάρος του εγκεφάλου, αφού η πραγματική του μάζα είναι περίπου 1.500 g, αλλά η άνωση που προκαλεί, μειώνει το καθαρό βάρος στα 25-50 γραμμάρια (Bothwell et al., 2019; Vernau et al., 2008).

Πίνακας 1. Φυσιολογική σύσταση και ιδιότητες του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, προσαρμογή από Hrishi & Sethuraman, 2019.

| Χαρακτηριστικά ΕΝΥ           | Φυσιολογικό εύρος          |
|------------------------------|----------------------------|
| Χρώμα                        | Διαυγές                    |
| Ειδική βαρύτητα/ pH          | 1.006-1.007/ 7.4           |
| Πίεση                        | 50-200 mm H <sub>2</sub> O |
| Αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων | -                          |
| Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων  | 0-5 (έως 30 στα νεογνά)    |
| Τύπος λευκών αιμοσφαιρίων    | Λεμφοκύτταρα               |
| Συγκέντρωση πρωτεϊνών        | 15-40 mg/dL                |
| Συγκέντρωση γλυκόζης         | 50-80 mg/dL                |
| Μικροοργανισμοί              | -                          |

Ο εγκέφαλος εκκρίνει περίπου 500 ml εγκεφαλονωτιαίου υγρού καθημερινά (Jerrard et al., 2001), τα οποία διαρκώς ρέουν στο ΚΝΣ και έπειτα διοχετεύονται στη κυκλοφορία του αίματος. Ο όγκος του ΕΝΥ σε ολόκληρο το ΚΝΣ ανά πάσα στιγμή είναι ίσος με 150-160 mL υπό φυσιολογικές συνθήκες (Bothwell et al., 2019). Στα βρέφη η αναλογία ΕΝΥ ανά κιλό σωματικού βάρους του σώματος είναι 4 mL / kg, στα παιδιά 3 mL / kg και στους ενήλικες 1,5-2 mL / kg. Αυτή η μεγαλύτερη συγκέντρωση εγκεφαλονωτιαίου υγρού στα παιδιά σε σχέση με τους ενήλικες, έχει προταθεί ότι μπορεί και να σχετίζεται με τα χαμηλότερα ποσοστά πονοκεφάλων στα παιδιά (Janssens et al., 2003).

Το ΕΝΥ παράγεται έπειτα από επεξεργασία του πλάσματος (Hrishi & Sethuraman, 2019). Περιέχει χαμηλότερα επίπεδα πρωτεϊνών, γλυκόζης, καλίου και ασβεστίου σε σχέση με το πλάσμα, αλλά υψηλότερα επίπεδα χλωρίου, νατρίου και μαγνησίου (Saladin, 2012) . Οι διαφορές αυτές οφείλονται στον μηχανισμό παραγωγής του. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό συνήθως δεν περιέχει ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ περιέχει φυσιολογικά 0-5 λευκά αιμοσφαίρια ανά mm<sup>3</sup>, εκ των οποίων όλα είναι λεμφοκύτταρα (Jerrard et al., 2001).

Η παραγωγή, η έκκριση και ο όγκος του ΕΝΥ είναι αυστηρά καθορισμένα και ρυθμιζόμενα στον εγκέφαλο. Η ισορροπία μεταξύ τους διαταράσσεται σε ορισμένες νευρολογικές παθήσεις, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ενδοκρανιακή πίεση. Το φαινόμενο

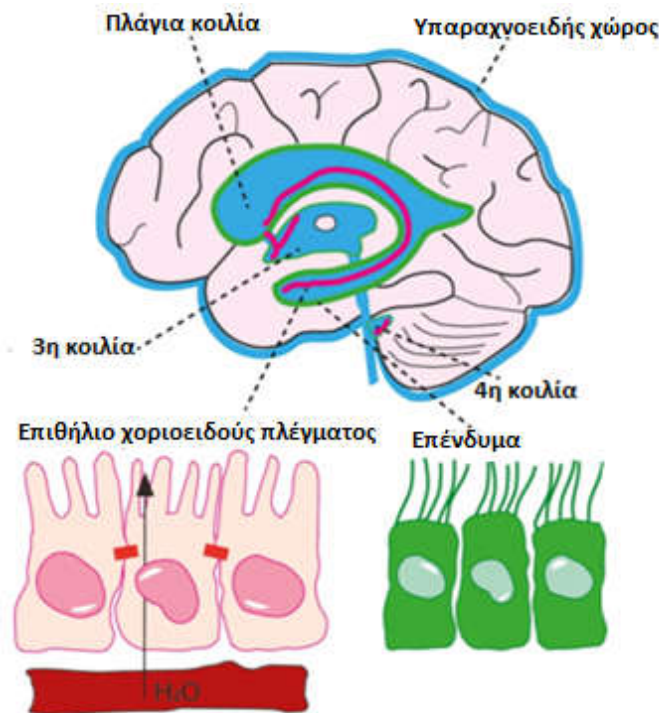
αυτό εμπλέκεται σε παθολογικές καταστάσεις όπως υδροκέφαλος, ιδιοπαθή ενδοκρανιακή υπέρταση, εγκεφαλικό τραύμα, εγκεφαλικό όγκο και αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (Bothwell et al., 2019).

### 1.3.1. Παραγωγή ΕΝΥ

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό παράγεται κυρίως από τα χοριοειδή πλέγματα των πλάγιων κοιλιών, της τρίτης και της τέταρτης κοιλίας του εγκεφάλου (60-80%). Το υπόλοιπο ποσοστό προέρχεται από τα τριχοειδή αγγεία της χοριοειδούς μήνιγγας και το νερό που παράγεται κατά τον μεταβολισμό. Τα χοριοειδή πλέγματα εκκρίνουν εγκεφαλονωτιαίο υγρό ενεργητικά, ενώ υπάρχει και μικρό ποσοστό παθητικής διάχυσης. Το ΕΝΥ παράγεται συνεχώς και διοχετεύεται στη φλεβική κυκλοφορία, μέσω των αραχνοειδών σωματίων και στη λεμφική κυκλοφορία, μέσω των περινευρικών ελύτρων (Johnson, 2012).

### 1.3.2. Χοριοειδή πλέγματα

Τα χοριοειδή πλέγματα είναι αγγειοβριθείς πτυχές που αποτελούνται από επιθηλιακό ιστό μονή στιβάδας και προβάλλουν στο εσωτερικό των κοιλιών του εγκεφάλου και περιμετρικά αυτού (Macaulay & Toft-bertelsen, 2023). Υπάρχουν τέσσερα χοριοειδή πλέγματα, ένα σε κάθε κοιλία, ενώ το μετωπιαίο και ινιακό κέρασ δε περιέχουν χοριοειδή πλέγματα. Τα επιθηλιακά κύτταρα των χοριοειδών πλεγμάτων σχηματίζουν έναν φραγμό ανάμεσα στο αίμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Johnson, 2012) λειτουργώντας ως διηθητικός φραγμός για την παραγωγή του ΕΝΥ.

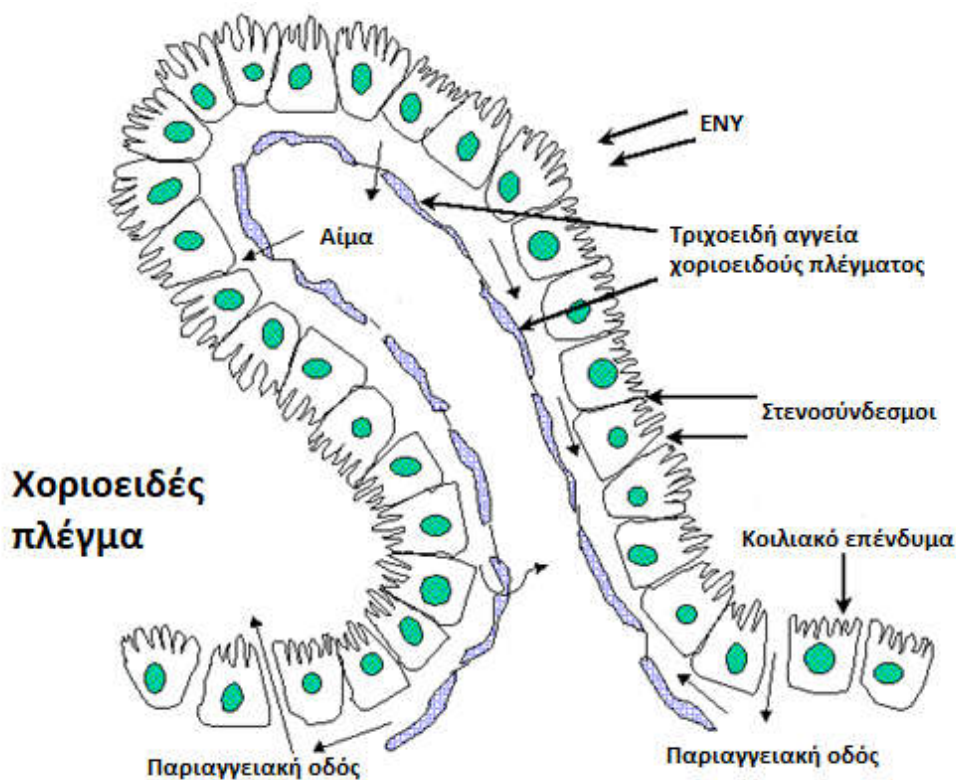


Εικόνα 2. Απεικόνιση του χοριοειδούς πλέγματος, του επενδυματικού ιστού που καλύπτει τις κοιλίες, του αγγειακού συστήματος και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Το γεμάτο με υγρό κοιλιακό σύστημα και ο υπαραχνοειδής χώρος σημειώνονται με μπλε χρώμα, με ένδειξη της πλάγιας, 3ης και 4ης κοιλίας. Το χοριοειδές πλέγμα βρίσκεται σε καθεμία από τις κοιλίες και σημειώνεται με ροζ χρώμα, ενώ το στρώμα των επενδυματικών κυττάρων που καλύπτουν τις κοιλίες σημειώνεται με πράσινο χρώμα. Τα ένθετα απεικονίζουν (αριστερά) τη μονοστιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων του χοριοειδούς πλέγματος (με

ροζ) που συνορεύουν με το αγγειακό σύστημα (με κόκκινο) με σφιχτές συνδέσεις που απεικονίζονται ως ράβδοι και (δεξιά) τη στιβάδα των επενδυματικών κυττάρων με βλεφαρίδες (με πράσινο). (προσαρμογή από Macaulay & Toft-bertelsen, 2023)

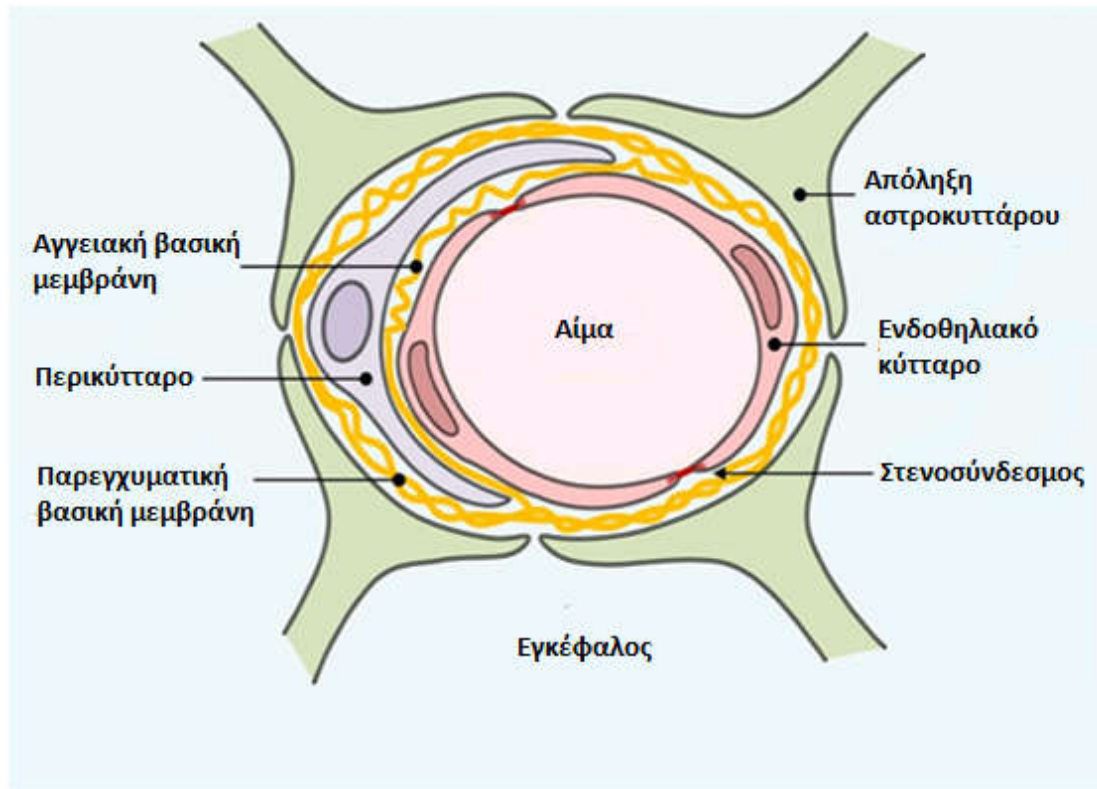
Ο κάθε κλάδος χοριοειδούς πλέγματος αποτελείται από αγγεία, ένα λεπτό δίκτυο ινών κολλαγόνου και μία μονή στιβάδα επενδυματικών κυττάρων, τα οποία διαθέτουν κροσσούς (εικόνα 2). Το ENY σχηματίζεται κυρίως από τα χοριοειδικά πλέγματα, ενώ μικρότερη ποσότητα σχηματίζεται εξωχοριακά. Ο χοριοειδής σχηματισμός περιλαμβάνει πρώτα διήθηση μεταξύ αίματος και τοιχώματος του χοριοειδούς τριχοειδούς και έπειτα έκκριση από το χοριοειδικό επιθήλιο. Μέσα στο χοριοειδές πλέγμα, η υδροστατική πίεση των χοριοειδών τριχοειδών αγγείων επάγει τη μεταφορά νερού και ιόντων στο διάμεσο υγρό και στη συνέχεια στο χοριοειδικό επιθήλιο. Το νερό και τα ιόντα μεταφέρονται στις κοιλίες είτε με ενδοκυτταρική κίνηση κατά μήκος των επιθηλιακών μεμβρανών του χοριοειδούς πλέγματος, είτε με παρακυτταρική κίνηση κατά μήκος των στενοσυνδέσμων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων (εικόνα 3). Και οι δύο αυτές διαδικασίες εξαρτώνται πιθανώς από αντλίες ιόντων. Η έκκριση του ENY προκύπτει από την ενεργή μεταφορά νατρίου, η οποία εξαρτάται από τη μεμβρανοσυνδεδεμένη ΑΤΡάση Na-K που υπάρχει στην κοιλιακή επιφάνεια του χοριοειδούς επιθηλίου. Η παρουσία αυτόνομων νευρικών απολήξεων στο χοριοειδές πλέγμα υποδηλώνει νευρικό έλεγχο της έκκρισης του ENY (Vernau et al., 2008).

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό που παράγεται από τα χοριοειδή πλέγματα, εισέρχεται στον υπαραχνοειδή χώρο και ρέει σε όλο τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό. Τελικά απορροφάται από τις αραχνοειδείς λάχνες (ή αραχνοειδή σωματίδια) στους κόλπους της σκληράς μήνιγγας και επιστρέφει στην φλεβική κυκλοφορία (Johnson, 2012). Η ολοκλήρωση της κυκλικής του πορείας διαρκεί περίπου 1 ώρα (Jerrard et al., 2001). Η έκκρισή του μειώνεται φυσιολογικά κατά το γήρας και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση πρωτεϊνών στο ΚΝΣ. Το φαινόμενο αυτό σχετίζεται με την αυξημένη εναπόθεση β-αμυλοειδών πρωτεϊνών στην νόσο του Alzheimer ή φωσφορυλιωμένων tau πρωτεϊνών στην χρόνια τραυματική εγκεφαλοπάθεια (Bothwell et al., 2019).



Εικόνα 3. Απεικόνιση δομής χοριοειδούς πλέγματος, (προσαρμογή από ιστοσελίδα [https://www.daviddarling.info/encyclopedia/C/choroid\\_plexus.html](https://www.daviddarling.info/encyclopedia/C/choroid_plexus.html))

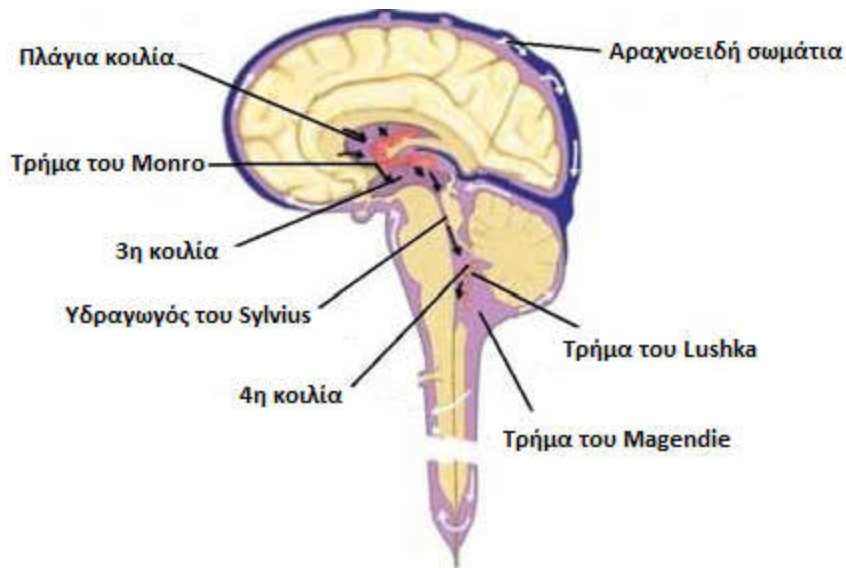
Η υπόλοιπη ποσότητα (20-40%) εγκεφαλονωτιαίου υγρού που δεν παράγεται από τα χοριοειδή πλέγματα ενεργητικά, παράγεται μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Πιο συγκεκριμένα, παράγεται από τα επενδυματικά κύτταρα των τοιχωμάτων των κοιλιών και από την εγκεφαλική ουσία, μέσω των παριαγγειακών χώρων (εικόνα 4). Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός λειτουργεί ως προστατευτικό, εκλεκτικό φράγμα ελέγχου των ουσιών που διαπερνούν τα τριχοειδή αγγεία και οδεύουν στον εγκέφαλο. Τα τοιχώματα των τριχοειδών αγγείων αποτελούνται από ενδοθηλιακά κύτταρα που επικαλύπτονται και συνδέονται με στενοσυνδέσμους. Η βασική μεμβράνη, οι αποφυάδες των αστροκυττάρων και τα περικύτταρα περιβάλλουν τα τοιχώματα των τριχοειδών, σχηματίζοντας τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Το νερό, οι λιποδιαλυτές ουσίες και τα αέρια διέρχονται ελεύθερα από αυτόν. Η γλυκόζη, τα αμινοξέα και οι ηλεκτρολύτες (ιόντα  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) μεταφέρονται με πρωτεΐνες μεταφορείς, καθώς η ελεύθερη διαπερατότητα για τους ηλεκτρολύτες είναι μικρή. Οι πρωτεΐνες του πλάσματος και τα μεγάλα οργανικά μόρια δεν διέρχονται του φραγμού (Johnson, 2012).



Εικόνα 4. Δομή αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Το τοίχωμα των τριχοειδών αγγείων σχηματίζεται από μία λεπτή στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων που ενώνονται μεταξύ τους με σφιχτές διασυνδέσεις. Περιβάλλονται από την αγγειακή βασική μεμβράνη, περικύτταρα, παρεγχυματική βασική μεμβράνη και τα άκρα αστροκυττάρων, προσαρμογή από Neumaier & Zlatorolskiy, 2021.

### 1.3.3. Κυκλοφορία του ΕΝΥ

Μετά την παραγωγή του ΕΝΥ από τα χοριοειδή πλέγματα, αρχίζει η κυκλοφορία του. Εκκρίνεται στις πλάγιες κοιλίες, διαμέσου των μεσοκοιλιακών τρημάτων του Monro, κατευθύνεται στην 3η κοιλία και έπειτα στην 4η κοιλία μέσω του υδραγωγού του Sylvius. Η μεγαλύτερη ποσότητά του διοχετεύεται στις δεξαμενές της βάσης του εγκεφάλου διαμέσου των τρημάτων του Lushka, ενώ η μικρότερη ποσότητα φτάνει στην παρεγκεφαλονωτιαία δεξαμενή, διαμέσου του τρήματος του Magendie. Μέσω των τρημάτων Lushka, καταφθάνει στον υπαραχνοειδή χώρο της κυρτής επιφάνειας του εγκεφάλου, δηλαδή την επιφάνεια των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και έπειτα στον υπαραχνοειδή χώρο του νωτιαίου μυελού. Μέσω του τρήματος Magendie καταφθάνει απευθείας στον υπαραχνοειδή χώρο του νωτιαίου μυελού (εικόνα 5). Η πιο μικρή ποσότητα ΕΝΥ φτάνει στον κεντρικό σωλήνα του προμήκη και του νωτιαίου μυελού (Johnson, 2012).

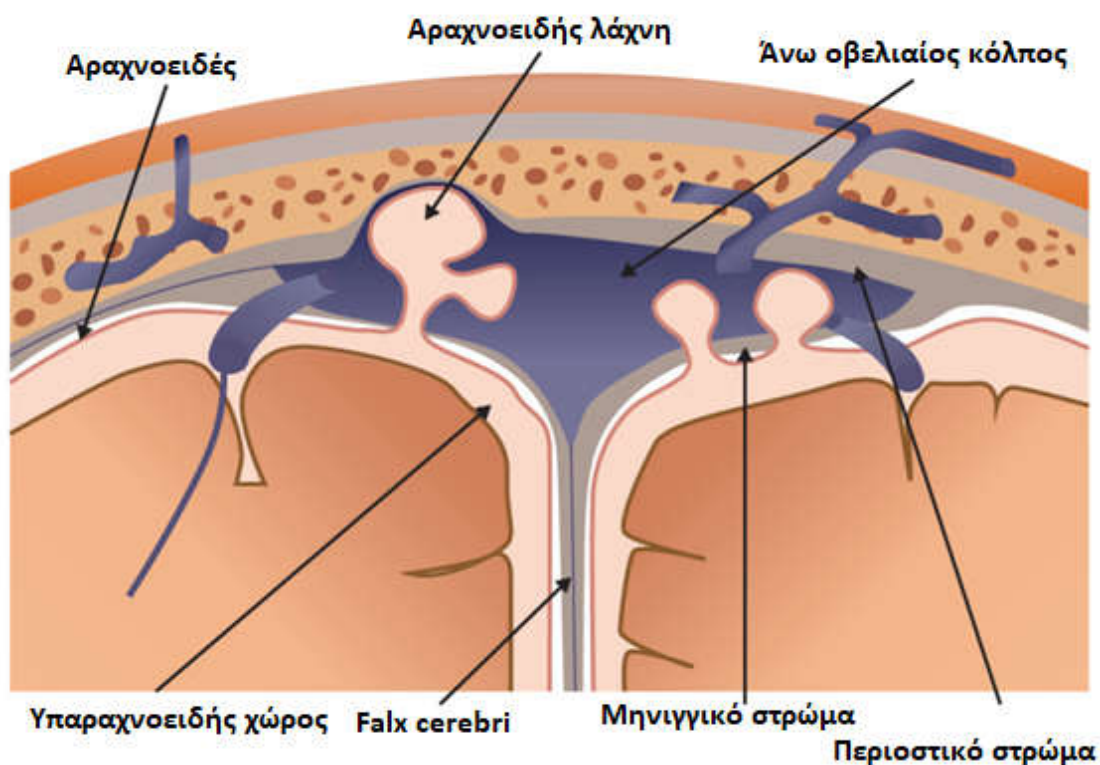


Εικόνα 5. Κυκλοφορία εγκεφαλονωτιαίου υγρού, προσαρμογή από (Pinotti & Maset, 2013)

#### 1.3.4. Απορρόφηση του ΕΝΥ

Η απορρόφηση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού γίνεται κυρίως από τα αραχνοειδή σωματίδια (ή αραχνοειδείς λάχνες), τα οποία αποτελούν ενδιπλώσεις της αραχνοειδούς μήνιγγας και προβάλλουν εντός των φλεβωδών κόλπων της σκληράς μήνιγγας (εικόνα 6). Τα σωματίδια αυξάνονται σε αριθμό και σε μέγεθος με την ηλικία, ενώ στις μεγάλες ηλικίες ασβεστοποιούνται. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό διοχετεύεται κυρίως στον άνω οβελιαίο κόλπο, ενώ μικρότερη ποσότητα απορροφάται από τις φλέβες του υπαραχνοειδή χώρου και από τα περινευρικά λεμφαγγεία των εγκεφαλικών και νωτιαίων νεύρων. Η απορρόφηση γίνεται στα σημεία αυτά εξαιτίας της υψηλής πίεσης στον υπαραχνοειδή χώρο, σε σχέση με την πίεση στους φλεβώδεις κόλπους και της μεγάλης ωσμωτικής πίεσης του φλεβικού αίματος, σε σχέση με του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Εν ολίγοις, η μεταφορά του ΕΝΥ στους φλεβώδεις κόλπους γίνεται όταν η πίεση του είναι μεγαλύτερη από αυτή των κόλπων (Johnson, 2012).

Είναι γνωστό ότι αλλαγές στη φυσιολογία παραγωγής και απορρόφησης του ΕΝΥ, συνεισφέρουν στην αύξηση της ενδοκρανιακής πίεσης και επομένως στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων όπως ο υδροκέφαλος, η ιδιοπαθής ενδοκρανιακή υπέρταση, το εγκεφαλικό τραύμα, όγκο και εγκεφαλικά επεισόδια (Bothwell et al., 2019).



Εικόνα 6. Κυκλοφορία του ΕΝΥ. Απεικόνιση του αραχνοειδούς, της αραχνοειδής λάχνης, του άνω οβελιαίου κόλπου, του υπαραραχνοειδή χώρου, του falx cerebri, του μηνιγγικού στρώματος και του περιοστικού στρώματος (Telano & Baker., 2023).

### 1.3.5. Κύτταρα Εγκεφαλονωτιαίου υγρού

Τα κύτταρα που εντοπίζονται στο ΕΝΥ σε φυσιολογικές συνθήκες είναι αποκλειστικά αιμοποιητικής προέλευσης. Κυρίως εντοπίζονται λεμφοειδή κύτταρα, όπως βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα και ελάχιστα κύτταρα μυελοειδούς σειράς (Kodali et al., 2024), ενώ σε περιπτώσεις όγκων στο ΚΝΣ εντοπίζονται και καρκινικά κύτταρα (Chicard et al., 2023). Παρά την αιμοποιητική προέλευση, το ΕΝΥ έχει ειδική αυστηρά ελεγχόμενη κυτταρική σύνθεση, διαφορετική από αυτή του αίματος. Σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στην πολλαπλή σκλήρυνση, αλλάζει η σύσταση του, εμπλουτίζεται σε μονοκύτταρα και Τ κατασταλτικά κύτταρα. Επιπλέον τα μονοκύτταρα που εντοπίζονται στο ΕΝΥ εμφανίζουν διαφορές στο μεταγράφημα σε σχέση με τα μονοκύτταρα του αίματος, έχουν δηλαδή μοναδική επιγενετική υπογραφή (Schafflick et al., 2020). Διαφορές στη σύσταση και στο μεταγραφικό προφίλ των κυττάρων του ΕΝΥ έχει καταγραφεί και στην ιδιοπαθή ενδοκρανιακή υπέρταση και στη ναρκοληψία (Huth et al., 2024).

### 1.3.6. Λήψη δείγματος εγκεφαλονωτιαίου υγρού

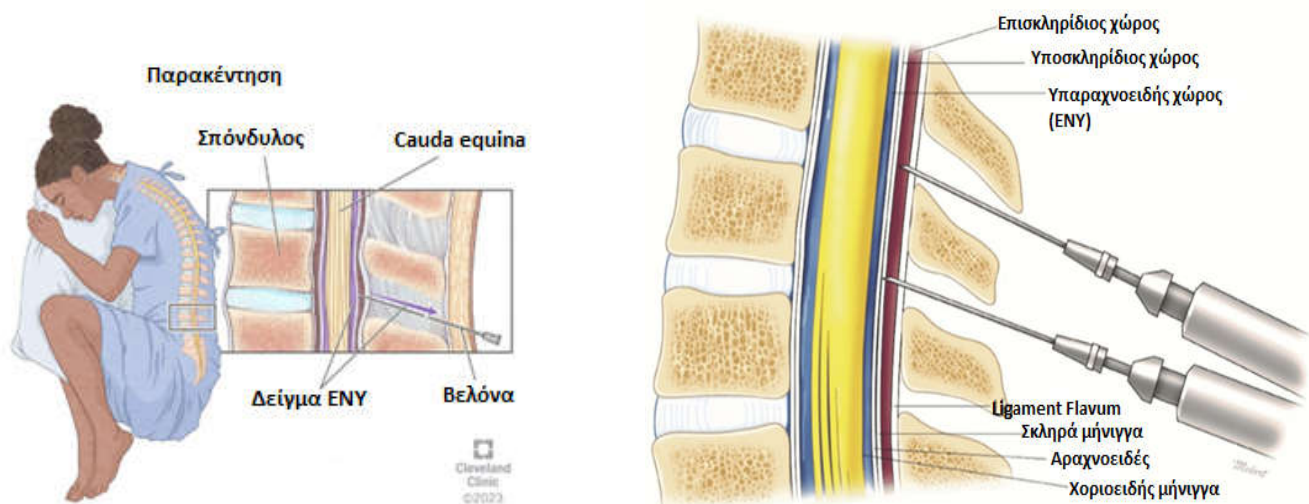
Ως κρίσιμο συστατικό της δομής του ΚΝΣ, οποιαδήποτε αλλαγή στην κυτταρική/βιοχημική σύνθεση, τον όγκο και τη ροή του ΕΝΥ θα μπορούσε να επηρεάσει τη λειτουργία του ΚΝΣ. Αντίστοιχα διαταραχές του ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένων ασθενειών που επηρεάζουν το ΚΝΣ, είτε πρωτίστως, είτε δευτερευόντως, είναι δυνατό να προκαλούν αλλοιώσεις στα χαρακτηριστικά του ΕΝΥ υποδεικνύοντας ότι ανάλυση του ΕΝΥ θα

μπορούσε να βοηθήσει στην κατανόηση της αιτιοπαθογένειας. Ως εκ τούτου το εγκεφαλονωτιαίο υγρό λαμβάνεται και μελετάται σε περιπτώσεις όπου πρέπει να εξετασθεί οποιαδήποτε παθολογία του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Πίνακας 2), όπως λοιμώδεις ασθένειες του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, συμπεριλαμβανομένης της μηνιγγίτιδας και της εγκεφαλίτιδας, αυτοάνοσες διαταραχές, όπως το σύνδρομο Guillain-Barré και η σκλήρυνση κατά πλάκας, αιμορραγία και όγκοι εγκεφάλου, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος Alzheimer και Parkinson και τέλος ασθένειες με επιπτώσεις στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, όπως οι διάφοροι τύποι επιληψίας με ή χωρίς γενετικό υπόβαθρο (Malhotra et al., 2023; Shahan et al., 2021).

Πίνακας 2. Κλινικές ενδείξεις ελέγχων σε ENY ανάλογα με την κατηγορία ασθενών (προσαρμογή από Jerrard et al., 2001).

| Έλεγχος σε ENY                       | Ασθενείς   |
|--------------------------------------|--|
| Γλυκόζη                              | Όλοι   |
| Πρωτεΐνες                            | Όλοι   |
| Λευκά αιμοσφαίρια                    | Όλοι   |
| Κυτταρολογικός έλεγχος για κακοήθεια | Υποψία για καρκινωματώδη μηνιγγίτιδα   |
| Χρώση Gram                           | Όλοι   |
| Καλλιέργεια                          | Όλοι   |
| Πάνελ αντιγόνων μηνιγγίτιδας         | Αρνητικοί στη χρώση Gram<br>Ασθενείς που λάμβαναν αντιβιοτικά πριν την παρακέντηση<br>Ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς με χαμηλό αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων |
| Αντιγόνα κρυπτόκοκκου                | HIV <sup>+</sup> ή υψηλού κινδύνου   |
| Καλλιέργεια μυκήτων                  | HIV <sup>+</sup> ή υψηλού κινδύνου   |

Δείγμα εγκεφαλονωτιαίου υγρού λαμβάνεται με οσφυονωτιαία παρακέντηση από τον υπαραχνοειδή χώρο (Εικόνα 7a). Ο νωτιαίος μυελός τερματίζει στο επίπεδο L1-L2 στους ενήλικες και L2-L3 σε παιδιά. Για τον λόγο αυτό η παρακέντηση γίνεται ανάμεσα στο L4-L5 ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος τραύματος, αλλά να υπάρχει και το περιθώριο επανάληψης της λήψης, στο αμέσως παραπάνω επίπεδο (L3-L4), σε περίπτωση που η πρώτη απόπειρα αποτύχει.



Εικόνα 7. α. Διαδικασία λήψης ENY (προσαρμογή από ιστοσελίδα <https://my.clevelandclinic.org>). β. Ανατομία Επισκληριδίου-Υποσκληριδίου-Υπαραραχνοειδή χώρου. Από τον υπαραραχνοειδή χώρο απομονώνεται το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. (προσαρμογή από Kang et al., 2020).

Το δείγμα συνήθως διαμοιράζεται σε 4 σωληνάκια, με όγκο δείγματος περίπου 1,5 cc στο κάθε ένα. Ακολουθούν έλεγχοι για τη φυσιολογία του, όπως είναι η καταμέτρηση των λευκών αιμοσφαιρίων, τα επίπεδα γλυκόζης και πρωτεϊνών, η χρώση Gram και καλλιέργεια (Jerrard et al., 2001). Ωστόσο, νεότερες μελέτες ανίχνευσης και μελέτης DNA από εγκεφαλονωτιαίο υγρό γίνονται όλο και πιο διαδεδομένες, με σκοπό να ενταχθούν στα πρωτόκολλα ανάλυσης του. Αυτό αποτελεί την λεγόμενη υγρή βιοψία, μια διαδικασία που αφορά τη δειγματοληψία και ανάλυση μη στερεού βιολογικού ιστού που λαμβάνεται συνήθως χωρίς ιδιαίτερα επεμβατικές διαδικασίες. (Iriyama et al., 2023; Malhotra et al., 2023).

### 1.3.7. Υγρή βιοψία

Η υγρή βιοψία αποτελεί την πιο πρόσφατη, συνήθως μη ή ελάχιστα επεμβατική, προσέγγιση για την μελέτη βιοδεικτών πρώιμου σταδίου. Απαιτεί την απομόνωση και την ανάλυση υγρών δειγμάτων όπως αίμα, ορός, πλάσμα, ούρα, σίελος και εγκεφαλονωτιαίο υγρό, προκειμένου να ακολουθήσει διάγνωση ή πρόγνωση νόσου. Στην υγρή βιοψία ανιχνεύονται εξωκυτταρικά κυστίδια, microRNAs (μικρά μη κωδικοποιούντα μόρια RNA (miRNA), cell-freeDNA (cfDNA) μιτοχονδριακής και πυρηνικής προέλευσης, καρκινικά κύτταρα και «καρκινικό» DNA, RNA και κυκλικό DNA ή RNA που πιθανώς να συσσωρεύονται σε σωματικά υγρά. Η εφαρμογή της περιλαμβάνει την έγκαιρη διάγνωση ασθενειών, την παρακολούθηση της δραστηριότητας μιας νόσου και την παρακολούθηση της ανταπόκρισης σε θεραπείες, με αυξανόμενες εφαρμογές στις νεοπλασίες, τις ηπατικές παθήσεις και τις διαταραχές του ΚΝΣ. Σε συνδυασμό δε με τεχνολογίες αιχμής, όπως η αλληλούχηση επόμενης γενιάς σε επίπεδο DNA και RNA τα προϊόντα απομόνωσης γενετικού υλικού από υγρή βιοψία αναμένεται να παρέχουν νέα γνώση. Αναλύσεις επόμενης γενιάς μεταγραφώματος στο ENY με την εφαρμογή RNA-Seq, έχουν ήδη αναφερθεί σε μελέτες για τη σκλήρυνση κατά πλάκας, και τις νόσους Alzheimer και Parkinson και η ανάλυση ενός κυττάρου στο ENY σε γονιδιωμικό και μεταγραφικό επίπεδο έχει προσθέσει πολύτιμες γνώσεις για την κατανόηση και τη διάγνωση της σκλήρυνσης κατά πλάκας,

ενώ παράλληλα υποδεικνύεται ο πιθανός ρόλος των miRNAs ως βιοδεικτών για την εξέλιξη νευρολογικών νοσημάτων. Επιπλέον, και ιδιαίτερα σε ότι αφορά το ENY η υψηλή βιοψία διαφεύγει των εγγενών προβλημάτων της βιοψίας ιστών που συνήθως παρεμποδίζουν την επακόλουθη μοριακή ανάλυση, όπως η παρουσία φορμαλίνης ως σταθεροποιητικού παράγοντα του υλικού βιοψίας, και θα μπορούσε να απεικονίσει την ετερογένεια εντός ενός όγκου πιο ολοκληρωμένα, ιδίως σε σύγκριση με τις μικρές βιοψίες (Tsamis et al., 2021). Σε ότι αφορά επίσης τις νεοπλασίες του ΚΝΣ, έχει ήδη παρατηρηθεί ότι το cfDNA που προέρχεται από τον όγκο και ανιχνεύεται στο πλάσμα είναι πολύ χαμηλό ή απουσιάζει, πιθανώς λόγω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η διερεύνηση του cfDNA σε ένα άλλο δείγμα/ιστό όπως το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) θα μπορούσε να έχει πολλά πλεονεκτήματα (Malhotra et al., 2023). Άλλωστε η ανάλυση cfDNA έχει αποδειχθεί πως έχει μεγαλύτερη ακρίβεια από ότι η ανάλυση των κυττάρων στο ENY, καθώς σε ορισμένες περιπτώσεις καρκίνου, παρά την αποκάλυψη καρκινικών κυττάρων στον κυτταρολογικό έλεγχο δειγμάτων ENY, δεν ανιχνεύονταν παθολογικές παραλλαγές από την αλληλούχηση του γενωμικού DNA. Αντιθέτως παρατηρήθηκε μεγάλο ποσοστό ανίχνευσης παθολογικών παραλλαγών μετά από την ανάλυση cfDNA απομονωμένο από τα ίδια δείγματα. Για το λόγο αυτό το ENY θεωρείται ισχυρό εργαλείο ανίχνευσης και αξιολόγησης παραλλαγών σε περιπτώσεις πρωτοπαθών αλλά και μεταστατικών όγκων του ΚΝΣ, καθώς είναι εμπλουτισμένο σε DNA καρκινικής προέλευσης. Έτσι οι παθολογικές παραλλαγές μπορούν να υπάρχουν σε υψηλή συχνότητα στο cfDNA (Variant Allele Frequency, VAF) (Bale et al., 2021; Hickman et al., 2023). Το cfDNA αυτό μπορεί επίσης περιστασιακά να αποκαλύψει πρόσθετες γενετικές αλλοιώσεις που απουσιάζουν από τα δείγματα ταυτόχρονης βιοψίας αντανακλώντας την ετερογένεια του όγκου και ίσως μια μορφή μωσαϊκισμού .

#### 1.3.8. Μωσαϊκισμός

Ως μωσαϊκισμός ορίζεται η ύπαρξη δύο ή περισσότερων κυτταρικών πληθυσμών με διαφορετικούς γονότυπους που προκύπτουν από ένα γονιμοποιημένο ωάριο. Αφορά σημειακές παραλλαγές (SNV), παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (CNV), αριθμό/μορφολογία χρωμοσωμάτων και επιγενετικά φαινόμενα. Σύμφωνα με το νεότερο σύστημα ταξινόμησης του μωσαϊκισμού λαμβάνεται υπόψη ο προσβεβλημένος ιστός, το μοτίβο και η κατανομή του μωσαϊκισμού, αλλά και η αιτία, η κατεύθυνση της αλλαγής και ο μηχανισμός μετάλλαξης. Χωρίζεται σε 6 κατηγορίες A-F και έπειτα σε υποκατηγορίες (Martínez-Glez et al., 2020):

- A. Προσβεβλημένος ιστός
- B. Σωματική κατανομή
- C. Κατεύθυνση διαφοροποίησης
- D. Μηχανισμός ανάπτυξης
- E. Αιτιολογία
- F. Ποσοστό ιστού που πλήττεται

Στην κατηγορία του προσβεβλημένου ιστού υπάρχουν οι υποκατηγορίες του

- A1. Σωματικός
- A2. Γαμετικός
- A3. Μικτός γαμετικός και σωματικός
- A4. Μωσαϊκισμός περιορισμένος στον πλακούντα

Ο συχνότερος όλων είναι ο σωματικός μωσαϊκισμός ο οποίος μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε κύτταρο εξαιρουμένων των γαμετικών. Εντοπίζεται συχνότερα σε καρκίνους, δερματολογικά νοσήματα, σύνδρομα υπερανάπτυξης, νευροαναπτυξιακές διαταραχές και δυσπλασίες του εγκεφαλικού φλοιού (Martínez-Glez et al., 2020).

Ακόμη υπάρχει και ο λειτουργικός μωσαϊκισμός του Χ χρωμοσώματος, μέσω του οποίου εξισορροπείται η γονιδιακή δόση μεταξύ θήλεων που διαθέτουν δύο Χ φυλετικά χρωμοσώματα και αρρένων που διαθέτουν ένα Χ και ένα πολύ μικρότερου μεγέθους, Υ φυλετικό χρωμόσωμα. Η αδρανοποίηση του ενός Χ χρωμοσώματος γίνεται τυχαία με μεθυλίωση σχεδόν ολόκληρου του χρωμοσώματος με ιστοειδικό τρόπο, με αποτέλεσμα διαφορετικοί ιστοί του ίδιου ατόμου να παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο. Για το λόγο αυτό σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται νόσος θήλεων σε φυλοσύνδετα νοσήματα όταν το παθολογικό αλληλόμορφο είναι ενεργό σε ιστό που σχετίζεται με τη νόσο (Martínez-Glez et al., 2020). Στο ίδιο πλαίσιο εντάσσεται και ο επιγενετικός μωσαϊκισμός που αναφέρεται σε διαφορές στο επιγενετικό προφίλ του γονιδιώματος και την επακόλουθη επίδραση στη γονιδιακή λειτουργία. Ήδη αναφέρθηκε ότι τα μονοκύτταρα που εντοπίζονται στο ENY εμφανίζουν μια μοναδική επιγενετική υπογραφή που θα μπορούσε να αποδώσει πληροφορίες για το λειτουργικό προφίλ του συγκεκριμένου ιστού και του εγκεφάλου.

### 1.3.9. Πρωτόκολλα απομόνωσης DNA από ENY

Τα ελεύθερα κυττάρου νουκλεϊκά οξέα σε βιολογικά υγρά, ιδίως το DNA (cfDNA) και ο ρόλος τους ως υποτιθέμενοι βιοδείκτες ασθενειών έχουν μελετηθεί εκτενώς κατά τη διάρκεια των ετών (Takousis et al., 2022). Οι ραγδαίες εξελίξεις στο πλαίσιο της έρευνας κυρίως για τον καρκίνο, υποδεικνύουν ότι το cfDNA αποτελεί ένα πολύ ευαίσθητο δείκτη των αλλαγών στον ρυθμό κυτταρικού θανάτου και των διαταραχών της ομοιόστασης, ιδιαίτερα λόγω της θεωρίας ότι προέρχεται από κάθε κύτταρο που πεθαίνει στο σώμα. Παρότι, η πλειοψηφία μελετών cfDNA αφορά δείγματα αίματος πρόσφατες μελέτες εστιάζουν στην ανάλυση DNA/cfDNA στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY). Η υγρή βιοψία ENY φαίνεται να είναι η βέλτιστη για τη μέτρηση βιοδεικτών παθολογιών του ΚΝΣ συμπεριλαμβανομένων νεοπλασματικών νόσων και νευροεκφυλιστικών διαταραχών, επειδή το ENY παράγεται στον εγκέφαλο και περιβάλλει τον εγκεφαλικό ιστό. Για τις ασθένειες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό αποτελεί ιδανικό μέσο μελέτης, καθώς είναι το μόνο που πιθανώς αντικατοπτρίζει τα χαρακτηριστικά και τις συνθήκες που παρατηρούνται στο ΚΝΣ. Σε περιπτώσεις νόσου εξαιτίας σωματικών παραλλαγών, δηλαδή παραλλαγών που αποκτήθηκαν τυχαία στην πορεία της ζωής του ατόμου και δεν μεταβιβάστηκαν ή εμφανίστηκαν μέσω της γαμετικής σειράς των γονέων, η διερεύνηση με τις κλασικές και διαδεδομένες μεθόδους προσέγγισης σε δείγμα αίματος, σπύου ή επιχρίσματος παρειών πιθανώς να μην αποκαλύψει τι πραγματικά συμβαίνει στον πάσχοντα ιστό. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί σε όγκους, ασθένειες που σχετίζονται με το γήρας, νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Kennedy et al., 2008; Kim et al., 2021), δυσπλασίες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Nikolaev et al., 2018) και σε επιληψία (Kim et al., 2021). Επίσης η μειωμένη συγκέντρωση μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) στο ENY είναι ένας υποθετικός βιοδείκτης της ήπιας γνωστικής εξασθένησης και της νόσου του Alzheimer που μπορεί λειτουργήσει και προγνωστικά για τα πρώιμα στάδια της νόσου (ανασκόπηση στο Takousis et al., 2022). Η πρόσβαση στους ιστούς του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, όπως ο εγκέφαλος, είναι δύσκολη έως αδύνατη και γίνεται με έντονα επεμβατική μέθοδο. Στις περιπτώσεις αυτές, η ανάλυση εγκεφαλονωτιαίου υγρού είναι απλούστερη και λιγότερο επεμβατική μέθοδος, διευκολύνοντας έτσι την κλινική πράξη. Μελέτες έχουν δείξει πως μπορεί να γίνει ανίχνευση των παραλλαγών που εντοπίζονται στον εγκέφαλο με ανάλυση του DNA που απελευθερώνεται από τα κύτταρα κατά τη διαδικασία της απόπτωσης, της νέκρωσης ή της ενεργού απελευθέρωσης (cfDNA) που απομονώνεται από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και συχνά διαφεύγουν της ανίχνευσης σε δείγμα αίματος (Kim et al., 2021). Δεδομένου ότι το DNA αυτό προέρχεται από κύτταρα του εγκεφάλου, αναμένεται ότι θα φέρει τυχόν

σωματικές παραλλαγές που προέκυψαν μετά τη γέννηση. Αντιθέτως μπορεί να μην εντοπίζονται σε cfDNA του αίματος, λόγω του πολυ-επίπεδου φιλτραρίσματος μεταξύ αίματος –ENY όπως αναλύθηκε.

Ακόμη δεν έχουν καθοριστεί τυποποιημένες μέθοδοι απομόνωσης και ποσοτικοποίησης DNA/cfDNA. Από το ENY μπορεί να απομονωθεί γενωμικόDNA και cfDNA. Για να γίνει απομόνωση DNA πραγματοποιείται σε πρώτο στάδιο φυγοκέντρηση για τον διαχωρισμό των κυττάρων από το υπερκείμενο του υλικού. Δεν υπάρχει επίσημα διαμορφωμένο πρωτόκολλο για την φυγοκέντρηση ENY και παρατηρούνται διαφορές ανάμεσα στις διάφορες μελέτες. Σε ορισμένες μελέτες πραγματοποιείται μία φυγοκέντρηση 1000g για 10 min (Martignano, 2019). Σε άλλες μελέτες πραγματοποιείται διπλή φυγοκέντρηση, όπου η πρώτη έχει χαμηλότερη ταχύτητα και αποσκοπεί στην ομαλή κατακρήμνιση των κυττάρων χωρίς να διαρρηχτούν και η δεύτερη έχει υψηλότερη ταχύτητα και αποσκοπεί στην κατακρήμνιση πιθανόν υπολειμμάτων στο υπερκείμενο. Ενδεικτικά οι ταχύτητες των διπλών φυγοκεντρήσεων μπορεί να είναι 1600g για 10 min, 3000g 10 για min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απομόνωση γενωμικού DNA από το ίζημα των κυττάρων ή cfDNA από το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης με κατάλληλα πρωτόκολλα στην κάθε περίπτωση. Σύμφωνα με τους Bale και συνεργάτες (2021), για την απομόνωση cfDNA ακολουθούνται πρωτόκολλα βασισμένα είτε σε στήλη φίλτρου απομόνωσης DNA, είτε σε μαγνητικά σωματίδια απομόνωσης DNA, ενώ και στη μελέτη των Takousi και συνεργατών (2022) αξιολογήθηκε η καταλληλότητα τεσσάρων μεθόδων εκχύλισης: QIAamp Circulating Nucleic Acid (Qiagen), Quick cfDNA Serum & Plasma (Zymo), NucleoSnap® DNA Plasma (Macherey-Nagel) και Plasma/Serum Circulating DNA Purification Mini (Norgen), για την εκχύλιση cfDNA από το ENY ατόμων ελέγχου και ασθενών με άνοια AD.

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

---

Η μελέτη έγινε διερευνητικά και σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η δοκιμή απομόνωσης DNA από ENY, η ποσοτική και ποιοτική αξιολόγηση του απομονωμένου υλικού και ο έλεγχος της δυναμικής και διαγνωστικής απόδοσής του, όταν χρησιμοποιείται σε διαγνωστικά πρωτόκολλα, όπως αυτά που εφαρμόζονται στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής. Για το λόγο αυτό ακολουθήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα πρωτόκολλα απομόνωσης γονιδιωματικού υλικού (Nucleosprin Tissue XS και Qiagen Mini Blood) και η επακόλουθη εφαρμογή τεχνικών μοριακής ανάλυσης για την μελέτη γενετικών παραλλαγών. Επιπλέον σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αποκάλυψη πρόδρομων στοιχείων ή αποτελεσμάτων που αφορούν την απομόνωση και ανάλυση DNA από ENY. Πραγματοποιήθηκε σειρά αντιδράσεων:

- Στοχευμένου ελέγχου για επιβεβαίωση το φύλου ορισμένων δειγμάτων με χρήση και των δύο πρωτοκόλλων απομόνωσης.
- Πολλαπλών στόχων σε αντιδράσεις βελτιστοποιημένες (optimized) και μη βελτιστοποιημένες σε διαφορετικά δείγματα απομονωμένα από το ίδιο πρωτόκολλο.
- Στοχευμένου ελέγχου γονιδίων NSD1 (εξόνιο 18, 395 bp), CAPN3 (εξόνιο 4, 130 bp) SCN1A (εξόνιο 22, 220 bp), διαφόρων μεγεθών σε δείγματα απομονωμένα με αμφότερα τα πρωτόκολλα.
- Ενίσχυσης ποσότητας του απομονωμένου DNA με Whole Genome Amplification
- Ελέγχου ικανότητας επιβεβαίωσης της διάγνωσης των ασθενών μέσω των δειγμάτων ENY (PCR SMA, MLPA).

- Μελέτης προτύπου μεθυλίωσης με methylation specific PCR (MS-PCR ειδικό για Prader Willi/Angelman) και με πολλαπλασιασμό του εξονίου 1 του γονιδίου AR (Androgen Receptor) (HUMARA)

Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν περιορισμένα δείγματα και όχι το σύνολο αυτών, εξαιτίας της διερευνητικής προσέγγισης που ακολουθήθηκε.

Ο απώτερος στόχος είναι η διαμόρφωση πρωτοκόλλου εργαστηριακής ροής που θα επιτρέπει τη χρήση δειγμάτων ENY για την απομόνωση γονιδιωματικού υλικού από κύτταρα του εγκεφάλου ή cfDNA και του περιβάλλοντα χώρου ώστε να διατίθενται πιθανά ιστοειδικά δεδομένα που διαφεύγουν της ανίχνευσης όταν μελετώνται δείγματα από άλλους ιστούς. Οι αναμενόμενες διαφορές περιλαμβάνουν σωματικές ιστοειδικές παραλλαγές καθώς και επιγενετικές τροποποιήσεις για τις οποίες οι απαιτήσεις σε ποσότητα και ποιότητα απομονωμένου υλικού είναι σημαντικά μεγαλύτερες.

### 3. ΥΛΙΚΟ/ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

---

#### 3.1. Υλικό

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 16 δείγματα ENY, που ελήφθησαν από 9 άτομα (4 άρρενα και 5 θήλεα) με Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία (SMA, Spinal Muscular Atrophy). Η πλειοψηφία των ασθενών στον πληθυσμό φέρει μοριακές διαταραχές που περιλαμβάνουν ομόζυγο έλλειμμα των εξονίων 7 και 8 του γονιδίου SMN1 (Survival Motor Neuron Gene, SMN1) (περιοχή 5q12.2-q13.3), ή σύνθετη ετεροζυγωτία του ελλείμματος με σημειακή παραλλαγή στο γονίδιο SMN1. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί θεραπευτική προσέγγιση που περιλαμβάνει ενδοραχιαία έγχυση θεραπευτικού σκευάσματος Spinraza, INN-nusinersen. Η λήψη και αφαίρεση του ENY (το οποίο θεωρείται απορριφθέν υλικό) γίνεται μέσω οσφυονωτιαίας παρακέντησης προ της έγχυσης του σκευάσματος, ώστε να διατηρηθεί ο όγκος του ENY στην κυκλοφορία. Οι 9 ασθενείς έχουν ομόζυγο έλλειμμα εξονίων 7 και 8 του γονιδίου SMN1, όλα τα δείγματα παραλήφθησαν στο χρονικό διάστημα 21/3/2023-24/5/2024, χρησιμοποιήθηκαν ανώνυμα έπειτα από κωδικοποίηση και η μελέτη υπάγεται σε εγκεκριμένο πρωτόκολλο με αριθμό EU/1/17/1188/001.

Ο όγκος κάθε δείγματος (0,48 ml -1,5 ml) διαφέρει και εξαρτάται από τη δειγματοληψία. Δώδεκα δείγματα (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 16, 17, 36) ήταν διατηρημένα σε σωληνάρια χωρίς αντιπηκτικό (EDTA) σε θερμοκρασία -20°C μέχρι που παρελήφθησαν από το Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής για τους σκοπούς της μελέτης. Τέσσερα δείγματα (13, 35, 40, 41) λήφθηκαν σε σωληνάρια με EDTA σε θερμοκρασία 4°C, έως ότου γίνει η παραλαβή τους την ίδια ημέρα από μέλη του ΕΙΓ. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA αμέσως μετά την παραλαβή τους.

Τα δείγματα που φυλάσσονται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία -20°C είναι γνωστό πως παρατηρείται λύση του κυτταρικού περιεχομένου εξαιτίας του σχηματισμού πάγου. Για το λόγο αυτό φυγοκεντρήθηκαν μία φορά σε ταχύτητα 14.000 rpm 10min και το ίζημα της φυγοκέντρησης χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση DNA. Τα δείγματα που παραλήφθησαν σε σωληνάρια EDTA σε θερμοκρασία 4°C φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο με ταχύτητα 1000g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε για δεύτερη φορά με ταχύτητα 16.000g για 20 min σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο της δεύτερης φυγοκέντρησης φυλάσσεται σε

θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$  για μελλοντική απομόνωση cfDNA. Το κυτταρικό ίζημα των φυγοκεντρήσεων χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση γενωμικού DNA.

Στα δείγματα που απέδωσαν γενετικό υλικό δοκιμάσθηκαν τεχνικές γενετικής ανάλυσης ώστε να αξιολογηθεί η επακόλουθη αξιοποίηση του απομονωθέντος υλικού. Στα πρωτόκολλα που εφαρμόσθηκαν επιλέχθηκαν τεχνικές ποικίλου βαθμού δυσκολίας ώστε να αξιολογηθεί η δυνατότητα μελέτης των απομονωμένων μορίων DNA.

### 3.2. Μεθοδολογία








#### 3.2.1. Πρωτόκολλα απομόνωσης DNA

Λόγω της άμεσης διαθεσιμότητας τους στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα για απομόνωση DNA σύμφωνα με τα αντίστοιχα εμπορικά διαθέσιμα συστήματα:

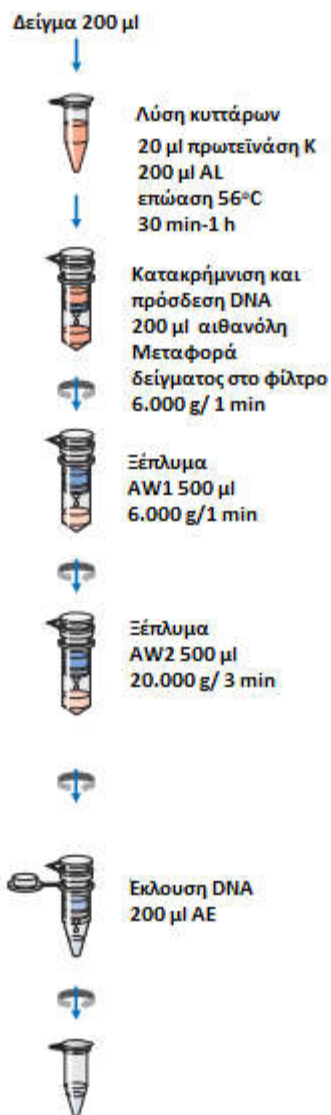
- NucleoSpin Tissue XS, Micro kit for DNA from cells and tissue (Macherey-Nagel)
- QIAamp, DNA Mini Blood (Qiagen)

Η αρχή και των δύο πρωτοκόλλων είναι ίδια και βασίζεται σε μια πρώτη λύση κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών, απελευθέρωση και πρόσδεση του γενετικού υλικού, απομάκρυνση καταλοίπων λύσης και έκλυση DNA. Πιο αναλυτικά τα βήματα περιλαμβάνουν:

- Επώαση του δείγματος σε διάλυμα λύσης παρουσία πρωτεϊνάσης.
- Προσθήκη αιθανόλης 96-100% και φυγοκέντρηση για κατακρήμνιση του DNA.
- Μεταφορά του διαλύματος σε στήλη με ηθμό (πρόσδεση του DNA).
- Διπλός καθαρισμός του ηθμού με ρυθμιστικό διάλυμα (συμπεριλαμβάνεται στο KIT).
- Έκλυση του DNA σε 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ .

|  |   |  |
|--|---|--|
| 1 Προετοιμασία δείγματος                                 |   | έως 2.5 mg ιστό  |
| 2 Δείγμα προ λύσης                                       |    | 80 μL T1<br>8 μL πρωτεϊνάση K<br>επώαση 56°C<br>1-4 ώρες                             |
| 3 Λύση κυττάρων  |    | 80 μL B3<br>επώαση 70°C<br>5 min   |
| 4 Κατακρήμιση DNA  |    | 80 μL αιθανόλη   |
| 5 Πρόσδεση DNA   |    | Μεταφορά διαλύματος<br>στο φίλτρο<br><br>11.000 g<br>1 min                           |
| 6 Ξέπλυμα μεμβράνης                                      |    | 50 μL B5<br>1ο ξέπλυμα 11.000 g<br>1 min<br>2ο ξέπλυμα 50 μL B5<br>11.000 g<br>2 min |
| 7 Έκλουση DNA  |  | 20 μL BE<br><br>11.000 g<br>1 min  |
| 8 Προαιρετικά<br>Αφαίρεση<br>εναπομείνουσας<br>αιθανόλης |  | 90°C<br><br>8 min  |

Εικόνα 8. Στάδια απομόνωσης DNA με χρήση του πρωτοκόλλου Nucleospin Tissue XS από ιστό (προσαρμογή από NucleoSpin Tissue XS Genomic DNA Purification User Manual).



Εικόνα 9. Στάδια απομόνωσης DNA με χρήση του πρωτοκόλλου Qiagen Mini Blood kit από αίμα (προσαρμογή από QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook).

Η διαφορά των δύο πρωτοκόλλων είναι ο αρχικός όγκος του δείγματος. Στο πρωτόκολλο απομόνωσης Nucleospin Tissue XS ο αρχικός όγκος δείγματος είναι 20 µl, ενώ στο Qiagen Mini Blood είναι 200 µL. Μετά την ολοκλήρωση απομόνωσης σύμφωνα με τις οδηγίες του κάθε πρωτοκόλλου έγινε επιπλέον προσθήκη 10 µl H<sub>2</sub>O στο φίλτρο απομόνωσης του DNA, ώστε να απομονωθεί πιθανή εναπομένουσα ποσότητα. Η μέτρηση της συγκέντρωσης DNA κάθε δείγματος και των επόμενων επώασεων των φίλτρων έγινε με χρήση φασματοφωτόμετρου Nanodrop.

### 3.2.2. Φωτομέτρηση DNA

Η φωτομέτρηση του DNA είναι η μέτρηση της οπτικής του απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο με σκοπό τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και την καθαρότητά

του. Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε είναι το Nanodrop-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA).

Το DNA απορροφά σε μήκος κύματος 260nm. Ο λόγος 260/280 για απομονωμένο DNA αναμένεται ιδανικά μεταξύ 1.7-2.0, ενώ ο λόγος 260/230 ιδανικά είναι μεταξύ 2.0-2.2. Ο λόγος 260/280 φανερώνει την πιθανή ύπαρξη πρωτεϊνών, οι οποίες απορροφούν σε μήκος κύματος 280nm. Ο λόγος 260/230 φανερώνει πιθανή ύπαρξη προσμίξεων από οργανικές ενώσεις που παραμένουν από την διαδικασία της απομόνωσης (Thermo-Fisher Scientific).

### 3.2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια μέθοδος ενίσχυσης επιλεγμένων τμημάτων DNA *in vitro* με τη χρήση του ενζύμου Taq πολυμεράση. Η πολυμεράση αυτή μπορεί να διατηρεί την ενεργότητά της σε υψηλές θερμοκρασίες (βέλτιστη 72°C) και να μην μετουσιώνεται ακόμη και σε θερμοκρασίες 95°C, για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Τα δείγματα DNA υποβάλλονται σε κύκλους εναλλαγής θερμοκρασιών, κατά τους οποίους συμβαίνει:

- αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου (95°C),
- υβριδοποίηση των εκκινητών (55-70°C)
- αντιγραφή και επιμήκυνση των νέων μορίων του DNA (72°C).

Με αυτή τη διαδικασία, το συγκεκριμένο τμήμα του DNA για το οποίο έχει σχεδιαστεί η αντίδραση, πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές. Τα όρια του τμήματος ορίζουν οι ειδικοί εκκινητές (primers) που έχουν σχεδιαστεί ώστε να υβριδοποιούνται με μεγάλη ειδικότητα στην αρχή και στο τέλος του τμήματος στόχου. Στο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) της αντίδρασης περιέχονται αντιδραστήρια που παρέχουν ιδανικές συνθήκες λειτουργίας της αντίδρασης πολλαπλασιασμού, π.χ. MgCl<sub>2</sub>, σταθεροποιητικοί παράγοντες, ρυθμιστές pH κ.α. καθώς και δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs. Σε περίπτωση πολλαπλασιασμού αλληλουχίας DNA με υψηλή περιεκτικότητα σε GC χρησιμοποιείται και αντιδραστήριο Q το οποίο μειώνει την θερμοκρασία τήξης του DNA και αποτρέπει την δημιουργία δευτεροταγών δομών.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ειδικές συσκευές, τους θερμικούς κυκλοποιητές, που εξασφαλίζουν ταχείες εναλλαγές θερμοκρασίας. Σε αυτούς ρυθμίζεται κάθε φορά η θερμοκρασία και η διάρκεια κάθε σταδίου της αντίδρασης, ανάλογα με το τμήμα DNA που επιθυμούμε να πολλαπλασιαστεί και τις ιδιότητες των εκκινητών. Οι εκκινητές σχεδιάζονται ώστε να έχουν βέλτιστο μήκος 18-24 βάσεις, σύσταση GC 45-55%, παρόμοιες θερμοκρασίες αποδιάταξης (T<sub>m</sub>) και χαμηλή πιθανότητα συμπληρωματικότητας μεταξύ τους για να αποφευχθεί η δημιουργία διμερών. Ακόμη αντενδείκνυται η ύπαρξη επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών ώστε να μην αποκτούν δευτεροταγείς δομές.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR και οι τελικές τους συγκεντρώσεις ανά αντίδραση παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια και τελικές τους συγκεντρώσεις σε αντίδραση PCR.

| Αντιδραστήρια        | Τελική συγκέντρωση στην αντίδραση   |
|----------------------|---|
| HotStarTaq MasterMix | 2.5 units HotStarTaq polymerase<br>1.5 Mm MgCl <sub>2</sub><br>200μM από κάθε dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) |
| MgCl <sub>2</sub>    | 0-2 Mm  |
| Εκκινητές            | 5 Mm  |

Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις πολλαπλασιασμού singleplex PCR ποικίλων περιοχών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ήπιο βαθμό δυσκολίας.

Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις πολλαπλών στόχων (multiplex PCR). Για όλες υπάρχει προσχεδιασμένο πρωτόκολλο από το Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, τα αναλυτικά βήματα των οποίων παρουσιάζονται παρακάτω. Οι αλληλουχίες όλων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 10.

### 3.2.3.1. Αντιδράσεις singleplex PCR

#### 3.2.3.1.1. PCR NSD1 εξόνιο 18

Στην αντίδραση πολλαπλασιάζεται το εξόνιο 18 του γονιδίου NSD1 (Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1), που σχετίζεται με την εμφάνιση του συνδρόμου Sotos. Το προϊόν πολλαπλασιασμού και αλληλούχησης έχει μέγεθος 395 bp.

Πίνακας 4. Στοιχειομετρία αντίδρασης PCR NSD1 εξόνιο 18.

|                                |            |
|--------------------------------|------------|
| Multiplex PolymeraseMaster mix | 5 $\mu$ l  |
| H <sub>2</sub> O               | 4 $\mu$ l  |
| Q                              | 1 $\mu$ l  |
| Forward primer (10 $\mu$ M)    | 1 $\mu$ l  |
| Reverse primer (10 $\mu$ M)    | 1 $\mu$ l  |
| DNA sample                     | 2 $\mu$ l  |
| Συνολικός όγκος αντίδρασης     | 14 $\mu$ l |

Συνθήκες της αντίδρασης:

95°C, 15 s

95°C, 1 min

58°C, 1 min

72°C, 1 min

72°C, 10 min

4°C, τερματισμός και αποθήκευση

Η ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

} 30 κύκλοι

#### 3.2.3.1.2. PCR CAPN3 εξόνιο 4

Στην αντίδραση πολλαπλασιάζεται το εξόνιο 4 του γονιδίου CAPN3 και αποδίδεται προϊόν πολλαπλασιασμού και αλληλούχησης περίπου 130 bp. Το γονίδιο σχετίζεται με την εμφάνιση μυϊκής δυστροφίας.

Πίνακας 5. Στοιχειομετρία αντίδρασης PCR CAPN3 εξόνιο 4.

|                             |              |
|-----------------------------|--------------|
| Hot Start Taq (HST)         | 6,25 $\mu$ l |
| Forward primer (10 $\mu$ M) | 0,5 $\mu$ l  |
| Reverse primer (10 $\mu$ M) | 0,5 $\mu$ l  |
| H <sub>2</sub> O            | 3,25 $\mu$ l |
| DNA sample                  | 2 $\mu$ l    |
| Συνολικός όγκος αντίδρασης  | 12,5 $\mu$ l |

Συνθήκες της αντίδρασης:

95°C, 5 min

95°C, 1 min

60°C, 1 min

72°C, 2 min 30 sec

72°C, 10 min

32 κύκλοι

4°C, παύση και αποθήκευση

Η ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

### 3.2.3.1.3. PCR SCN1A εξόνιο 22

Στην αντίδραση πολλαπλασιάζεται το εξόνιο 22 του γονιδίου SCN1A και αποδίδεται προϊόν πολλαπλασιασμού και αλληλούχησης περίπου 220 bp. Το γονίδιο σχετίζεται με την εμφάνιση συνδρόμου Dravet.

Πίνακας 6. Στοιχειομετρία αντίδρασης PCR SCN1A εξόνιο 22.

|                            |       |
|----------------------------|-------|
| Hot Start Taq (HST)        | 5 μl  |
| Q                          | 1 μl  |
| Forward primer (10μM)      | 1 μl  |
| Reverse primer (10μM)      | 1 μl  |
| H <sub>2</sub> O           | 2 μl  |
| DNA sample                 | 2 μl  |
| Συνολικός όγκος αντίδρασης | 12 μl |

Συνθήκες της αντίδρασης:

95°C, 5 min

95°C, 1 min

58°C, 1 min

72°C, 1 min

72°C, 10 min

32 κύκλοι

4°C, παύση και αποθήκευση

Η ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

### 3.2.3.2. Αντιδράσεις Multiplex PCR

#### 3.2.3.2.1. PCR AMELX/Y

Οι εκκνητές που χρησιμοποιούνται για τον πολλαπλασιασμό των περιοχών AMELX/Y (πίνακας 10) στοχεύουν στα γονίδια της αμελογενίνης, τα οποία εδράζονται στις ψευδοαυτοσωμικές περιοχές των φυλετικών χρωμοσωμάτων X και Y (Xp22.31–p22/ Yp11. 2). Τα προϊόντα της αντίδρασης από τα δύο φυλετικά χρωμοσώματα εμφανίζουν διαφορετικό μέγεθος (AMELX 111 bp, AMELY 117 bp). Ο οπίσθιος εκκνητής του ζεύγους είναι ιχνηθετημένος με Fam φθορίζουσα χρωστική για ανίχνευση των προϊόντων κατά την ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή. Ως μάρτυρας μεγέθους χρησιμοποιήθηκε εμπορικά διαθέσιμος φθορίζων μάρτυρας, *Gene Scan TM 500 LIZ TM Size Standard*.

Πίνακας 7. Στοιχειομετρία της αντίδρασης PCR AMELX/Y.

|                              |              |
|------------------------------|--------------|
| Hot Start Taq (HST)          | 6,25 $\mu$ l |
| Mg (25 $\mu$ M)              | 1 $\mu$ l    |
| Forward primers (10 $\mu$ M) | 0,5 $\mu$ l  |
| Reverse primer(10 $\mu$ M)   | 0,5 $\mu$ l  |
| H <sub>2</sub> O             | 3,25 $\mu$ l |
| DNA sample                   | 1 $\mu$ l    |
| Συνολικός όγκος αντίδρασης   | 12,5 $\mu$ l |

Συνθήκες της αντίδρασης:

95°C, 5 min

95°C, 1 min

56°C, 1 min

72°C, 1 min 30 sec

72°C, 10 min

10°C, παύση και αποθήκευση



Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε γενετικό αναλυτή ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδή στο αυτοματοποιημένο σύστημα ABI3500 της εταιρίας Applied Biosystems, Thermo-Fischer Scientific

### 3.2.3.2.2. PCR AMELX/AMELY, STRS B-THAL, STRS SMA

Πραγματοποιήθηκε αντίδραση ανίχνευσης Short Tandem Repeats (STRs) που εντοπίζονται στα γονίδια SMN1 και HBB και τμήματος των περιοχών AMELX/Y. Για το γονίδιο HBB χρησιμοποιήθηκε ζεύγος εκκινητών (πίνακας 10) που πολλαπλασιάζει προϊόν 190 bp. Για το γονίδιο SMN1 χρησιμοποιήθηκε ζεύγος εκκινητών (D5S435)(πίνακας 10) που πολλαπλασιάζει προϊόν μεγέθους 140 bp. Για το γονίδιο AMELX/Y χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι εκκινητές που προαναφέρθηκαν (πίνακας 10), τα προϊόντα της οποίας έχουν μέγεθος 111 bp (AMELX) και 117 bp (AMELY). Η αντίδραση επιλέχθηκε ως παράδειγμα αντίδρασης πολλαπλασιασμού πολλαπλών στόχων, συχνά προσαρμοσμένης για την εφαρμογή κατά τη διαδικασία προγεννητικού ελέγχου όπου υπάρχει πιθανότητα πολύ μικρών συγκεντρώσεων εμβρυικού DNA.

Πίνακας 8. Στοιχειομετρία αντίδρασης PCR AMELX/AMELY, STRs B-THAL, STRs SMA.

|                                  |              |
|----------------------------------|--------------|
| Multiplex Taq                    | 5 $\mu$ l    |
| Q                                | 1 $\mu$ l    |
| HBB Forward-FAM(10 $\mu$ M)      | 0,02 $\mu$ l |
| HBB Reverse(10 $\mu$ M)          | 0,02 $\mu$ l |
| D5S435 Forward-FAM(10 $\mu$ M)   | 0,02 $\mu$ l |
| D5S435 Reverse(10 $\mu$ M)       | 0,02 $\mu$ l |
| AMEL X/Y Forward(10 $\mu$ M)     | 0,02 $\mu$ l |
| AMEL X/Y Reverse-FAM(10 $\mu$ M) | 0,02 $\mu$ l |
| H <sub>2</sub> O                 | 1,88 $\mu$ l |
| DNA sample                       | 2 $\mu$ l    |
| Συνολικός όγκος αντίδρασης       | 10 $\mu$ l   |

### 3.2.3.2.3. PCR επιλεγμένων αλληλουχιών φυλετικών χρωμοσωμάτων

Παράλληλα έγινε δεύτερη αντίδραση με μείγμα ζευγών εκκινητών (πίνακας 10) που πολλαπλασιάζουν διαφορετικά τμήματα συμπεριλαμβανομένων και STRs στα φυλετικά χρωμοσώματα. Οι στόχοι περιλάμβαναν τα :

- AmelX/Y, μεγέθους 111/117 bp
- SY 149, μεγέθους 128 bp
- STR 45, μεγέθους 150 bp
- AR 1, μεγέθους 250 bp
- AR 6, μεγέθους 269 bp
- SY 127, μεγέθους 275 bp
- SRY, μεγέθους 340 bp

Ο ένας εκ των δύο εκκινητών κάθε ζεύγους είναι επίσης ιχνηθετημένος με Fam χρωστική. Πίνακας 9. Στοιχειομετρία της αντίδρασης PCR αλληλουχιών φυλετικών χρωμοσωμάτων.

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| HotStar Taq                | 5 μl    |
| Q-solution                 | 1 μl    |
| AMEL/XY Forward(10μM)      | 0.05 μl |
| AMEL/XYReverse Fam(10μM)   | 0.05 μl |
| SY149Forward(10μM)         | 0.05 μl |
| SY149Reverse Fam(10μM)     | 0.05 μl |
| STR-45Forward Fam(10μM)    | 0.1 μl  |
| STR-45Reverse(10μM)        | 0.1 μl  |
| AR-1Forward Fam(10μM)      | 0.05 μl |
| AR-1Reverse(10μM)          | 0.05 μl |
| AR-6Forward(10μM)          | 0.05 μl |
| AR-6Reverse Fam(10μM)      | 0.05 μl |
| SY127Forward(10μM)         | 0.07 μl |
| SY127Reverse Fam(10μM)     | 0.07 μl |
| SRYForward(10μM)           | 0.1 μl  |
| SRYReverse Fam (10μM)      | 0.1 μl  |
| H <sub>2</sub> O           | 2.06 μl |
| Συνολικός όγκος αντίδρασης | 9 μl    |

Συνθήκες αντίδρασης:

95°C, 15 min

95°C, 30 sec

60°C, 1 min

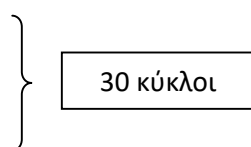
72°C, 30 sec

72°C, 30 sec

72°C, 10 min

0°C, παύση και αποθήκευση

Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε γενετικό αναλυτή ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδή στο αυτοματοποιημένο σύστημα ABI3500.



### 3.2.3.3. Εκκινητές αντιδράσεων

Παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

Πίνακας 10. Αλληλουχίες εκκινητών

| Εκκινητής                                | Αλληλουχία (5'→3')                             |
|--|--|
| NSD1 exon 18 Forward                     | TTTGCCTTTTTTCAGGACGTG                          |
| NSD1 exon 18 Reverse                     | ATCAAGCAACTGCAAAGAGGA                          |
| SCN1A exon 22 Forward                    | GTAAAACGACGGCCAGTCACATTGAATGATGATTCTGTTTAT     |
| SCN1A exon 22 Reverse                    | AATTTTGGCTATATACAATACTTCAGG                    |
| HBB Forward-FAM                          | GGAGTCACTGGATCTACTCTTT                         |
| HBB Reverse                              | TTGCTACTGCCTTGACTGTC                           |
| AMELX/Y Forward                          | CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG                       |
| AMELX/Y Reverse-FAM                      | AGGCCAACCATCAGAGCTTAAACT                       |
| PRADER WILLI/ANGELMAN Paternal 1 Forward | GTAGGTTGGTGTGTATGTTTAGGT                       |
| PRADER WILLI/ANGELMAN Paternal 1 Reverse | ACATCAAACATCTCCCAACAACCA                       |
| PRADER WILLI/ANGELMAN Maternal 1 Forward | TAAATAAGTACGTTTGCGCGGTC                        |
| PRADER WILLI/ANGELMAN Maternal 1 Reverse | AACCTTACCCGCTCCATCGCG                          |
| D5S435 (SMA) Forward-FAM                 | CAAGAGCACAGTTTGGAGTGAG                         |
| D5S435 (SMA) Reverse                     | ACACACATGCACGCTCTCTC                           |
| SMN1 exon 7 Forward                      | CTTCCTTTTATTTTCCTTACAGGGATT                    |
| SMN1 exon 7 Reverse                      | CACTTTCATAATGCTGGCAGACTT                       |
| SMN1 exon 8 Forward                      | ACCAAATGCAATGTGAA                              |
| SMN1 exon 8 Reverse                      | CTACAACACCCTTCTCACAG                           |
| CAPN3 exon 4 Forward                     | GTAAAACGACGGCCAGTGGACACATTTCCCTAACAGTAATTTGAGT |
| CAPN3 exon 4 Reverse                     | CAGGAAACAGCTATGACCTAGCCCCACCTCACATTCTAAAG      |
| AR Forward-FAM                           | CCAGAGCGTGCGCGAAGTGATCCAGAACCCGGG              |
| AR Reverse                               | CTTGGGGGAGAACCATCCTCA                          |
| SY149 Forward                            | TGTCACACTGCCCTAATCCT                           |
| SY149 Reverse-FAM                        | TGGTCATGACAAAAGACGAA                           |
| SY127 Forward                            | GGCTCACAAACGAAAAGAAA                           |
| SY127 Reverse-FAM                        | CTGCAGGCAGTAATAAGGGA                           |
| STR-45 Forward-FAM                       | GAGGCTATAATTCTTTAACTTTGGC                      |
| STR-45 Reverse                           | CTCTTCCCTCTTTATTCATGTTAC                       |
| AR-1 Forward                             | ACCAGGTAGCCTGTGGGGCCTCTACGATGGGC               |
| AR-1 Reverse-FAM                         | CCAGAGCGTGCGCGAAGTGATCCAGAACCCGG               |
| AR-6 Forward                             | CAATCAGAGACATTCCTCTGG                          |
| AR-6 Reverse-FAM                         | AGTGGTCTCTCTGAATCTC                            |
| SRY Forward                              | CAGTGTGAAACGGGAGAAAACAG                        |
| SRY Reverse-FAM                          | ACTTCGCTGCAGAGTACCGAAG                         |

### 3.2.4. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πολλαπλασιασμού PCR

#### 3.2.4.1. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα νουκλεϊκά οξέα έχουν αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών ομάδων στο σκελετό των αλυσίδων τους. Εξαιτίας αυτού μπορούν να διαχωριστούν όταν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο βάσει του μεγέθους τους. Η ηλεκτροφόρηση των

νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιείται σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης ο οποίος πολυμερίζεται στους 100°C και πήζει σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 45°C, σχηματίζοντας πόρους στο εσωτερικό του. Τα μόρια DNA διέρχονται μέσω αυτών των πόρων, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους του. Ακόμη το δίκτυο των πόρων είναι πυκνότερο ή αραιότερο, βάσει της συγκέντρωσης της αγαρόζης σε αυτό. Όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση της αγαρόζης τόσο πυκνότερο είναι το δίκτυο των πόρων, άρα και τόσο δυσκολότερα διέρχεται ένα μόριο DNA μεγαλύτερου μεγέθους σε σχέση με ένα μικρότερου μεγέθους. Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων DNA που πρέπει να διαχωριστούν, χρησιμοποιείται και πήκτωμα αγαρόζης κατάλληλης πυκνότητας, συνήθως 1-2% w/v ή και περισσότερο. Για την παρασκευή του χρησιμοποιήθηκαν αγαρόζη (Certified Molecular Biology Agarose, Cat No 161-3102, Bio-Rad Laboratories), ρυθμιστικό διάλυμα 1xTBE (Tris Borate acid) και βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), ώστε να επιτευχθεί η οπτικοποίηση του DNA, αφού το EtBr παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα του DNA καθιστώντας το ορατό σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV), λόγω φθορισμού. Κατά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων στο ίδιο πήκτωμα τοποθετείται και μάρτυρας μεγέθους προϊόντων (ladder), με ζώνες γνωστού μεγέθους, ώστε να μπορέσει να υπολογιστεί το μέγεθος των ηλεκτροφορούμενων μορίων. Σε όλες τις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μεγέθους DNA φάγου ρhix174 που έχει υποστεί πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση HaeIII (φX174 DNA-HaeIII Digest 1.000 µg/ml, Cat No N3026s (New England Biolabs Inc). Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρέπει να είναι το ίδιο με το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για το πήκτωμα, εν προκειμένω ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE (Tris Borate acid), προκειμένου να εξασφαλιστεί η διατήρηση του pH (ώστε το DNA να διατηρεί το αρνητικό του φορτίο) και η αγωγιμότητα του μέσου.. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται συνήθως σε 140V για 20 min.

#### 3.2.4.2. Ηλεκτροφόρηση σε γενετικό αναλυτή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (*Capillary Electrophoresis*)

Η ηλεκτροφόρηση με τριχοειδή είναι μία τεχνική που επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων ακόμα και με διαφορά μιας μόνο βάσης. Τα θραύσματα γίνονται ορατά και διαθέσιμα προς ανάλυση λόγω των φθορίζουσών ουσιών που έχουν ενσωματώσει κατά τη διαδικασία πολλαπλασιασμού ή αλληλούχησης, με χρήση ιχνηθετημένων εκκινητών ή νουκλεοτιδίων αντίστοιχα και αναγνωρίζονται από ακτίνες laser. Το κάθε φθοριόχρωμα εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος, δίνοντας την ικανότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης διαφορετικών προϊόντων σε μία μόνο αντίδραση. Τα δεδομένα που προκύπτουν μετατρέπονται σε ψηφιακή μορφή και αποθηκεύονται. Το πλεονέκτημα της μεθόδου, σε σχέση με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, είναι ότι μπορεί να γίνει ανίχνευση μορίων DNA μικρού μήκους, αλλά και μορίων που είναι σε μικρή συγκέντρωση και δεν θα ήταν εμφανή σε πήκτωμα αγαρόζης, αλλά θα ανιχνεύονται στον αναλυτή εξαιτίας του φθορισμού καθώς επιτυγχάνεται διαχωρισμός προϊόντων που διαφέρουν σε μέγεθος ακόμα και μόνο κατά ένα νουκλεοτίδιο. Ο γενετικός αναλυτής ABI3500 χρησιμοποιήθηκε και για τις αντιδράσεις αλληλούχησης στις οποίες χρησιμοποιούνται ειδικά σημασμένα διδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs). Τα σημασμένα ddNTPs απορροφούν από τη δέσμη laser και φθορίζουν σε διαφορετικό μήκος κύματος. Με το κατάλληλο λογισμικό γίνεται μετατροπή των

δεδομένων στις 4 χρωστικές που έχουν καθοριστεί για την ανάλυση της πρωτοταγούς δομής (Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide). Με το λογισμικό του συστήματος παράγεται το ηλεκτροφόρημα. Τα απαραίτητα αντιδραστήρια παρέχονται από την κατασκευάστρια εταιρία (BigDye® Terminator (BDT) v3.1 Cycle Sequencing Kit, Thermo-FischerScientific). Ως μάρτυρας μεγέθους των προϊόντων για την ανάλυση θραυσμάτων ή την ανάλυση σύνδεσης χρησιμοποιείται μάρτυρας μεγέθους *GeneScan™-500LIZ™SizeStandard* της εταιρείας Applied Biosystems Thermo-Fischer Scientific.

### 3.2.5. Αλληλούχηση DNA

Τα βήματα για τη μελέτη της αλληλουχίας βάσεων ενός επιλεγμένου τμήματος DNA περιλαμβάνουν:

- Σχεδιασμός εκκινητών, με χρήση κατάλληλων *in silico* εργαλείων (π.χ. εργαλείο σχεδιασμού εκκινητών NCBI Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), χρησιμοποιώντας την αλληλουχία αναφοράς του ανθρώπινου γονιδιώματος μέσω της βάσης δεδομένων Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>).
- PCR για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής στόχο
- Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR
- Καθαρισμός των προϊόντων PCR
- Αντίδραση αλληλούχησης των προϊόντων PCR σύμφωνα με τη μέθοδο Sanger και ακολουθώντας τις οδηγίες του πρωτοκόλλου (BigDye® Terminator (BDT) v3.1 Cycle Sequencing Kit, Thermo-FischerScientific). Η αντίδραση γίνεται σε ειδικά διαμορφωμένα πιάτα (plates) 96 θέσεων.
- Καθαρισμός της αντίδρασης αλληλούχησης
- Ανάλυση της αλληλουχίας βάσεων του τμήματος DNA με χρήση *in silico* προγραμμάτων

Σε πρώτο στάδιο γίνεται η αντίδραση PCR του επιθυμητού γονιδίου. Όλα τα ζεύγη εκκινητών ήταν ήδη διαθέσιμα στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής. Αφού ελεγχθεί η ορθότητα των προϊόντων πολλαπλασιασμού από την ηλεκτροφόρηση της PCR, ακολουθεί καθαρισμός τους και αλληλούχησης τους με μέθοδο Sanger. Ο καθαρισμός γίνεται με χρήση του πρωτοκόλλου ExoSAP-IT PCR Product Clean up Reagent (ExS-Pure by NimaGen) το οποίο περιλαμβάνει αλκαλική φωσφατάση και εξωνουκλεάση I. Σύμφωνα με αυτό προστίθεται 1 μl ExS-Pure σε 2,5 μl αντίδρασης PCR και έπειτα ακολουθεί επώαση σε θερμοκυκλοποιητή σε συνθήκες:

37°C, 4 min

90°C, 1 min

4°C, αποθήκευση

Η ανάλυση της αλληλουχίας βάσεων ενός τμήματος DNA (DNA sequencing) επιτυγχάνεται με τον τερματισμό της σύνθεσης των νέων αλυσίδων με τη χρήση διδεοξυριβονουκλεοτιδίων (ddNTPs) κατά την *in vitro* αντιγραφή. Πιο συγκεκριμένα, κατά την αντιγραφή χρησιμοποιείται η μία αλυσίδα ως εκμαγείο και ένας εκκινητής ομόλογος με την περιοχή στόχο. Κατά την σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας η DNA πολυμεράση τοποθετεί συμπληρωματικά τα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) αλλά θα τοποθετήσει σε τυχαίες θέσεις και κάποιο από τα διδεοξυριβονουκλεοτίδια. Αυτά δεν διαθέτουν υδροξύλιο (OH) στο 3' άκρο τους, το οποίο είναι απαραίτητο για την δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των νουκλεοτιδίων της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας. Έτσι

στο σημείο ενσωμάτωσης διδεοξυριβονουκλεοτιδίου τερματίζει η σύνθεση της αλυσίδας. Το κάθε διδεοξυριβονουκλεοτίδιο είναι ιχνηθετημένο με διαφορετικό φθοριόχρωμα. Αυτό κάνει δυνατό τον προσδιορισμό της αζωτούχου βάσης και του νουκλεοτιδίου στο σημείο τερματισμού της αντίδρασης.

Πίνακας 11. Αντιδραστήρια Big Dye Terminator kit και όγκος ανά αντίδραση.

| Αντιδραστήρια              | Όγκος ανά αντίδραση |
|----------------------------|---------------------|
| H <sub>2</sub> O           | 7,43 μl             |
| Buffer                     | 1 μl                |
| Enzyme                     | 0,25 μl             |
| Primer                     | 0,32 μl             |
| Καθαρισμένο PCR προϊόν     | 1 μl                |
| Συνολικός όγκος αντίδρασης | 10 μl               |

Η αντίδραση γίνεται σε θερμοκυκλοποιητή με τις συνθήκες:

|                  |             |
|------------------|-------------|
| 96°C, 1 min      | } 25 κύκλοι |
| 96°C, 10 sec     |             |
| 55°C, 5 sec      |             |
| 60°C, 4 min      |             |
| 15°C, αποθήκευση |             |

Ακολουθεί καθαρισμός της αντίδρασης αλληλούχησης με κατακρήμνιση του DNA με προσθήκη αιθανόλης 100%, παρουσία άλατος. Μείγμα EtOH/NH<sub>4</sub>Ac (55 μl αιθανόλης/2 μl οξικού αμμωνίου) ετοιμάζεται για την κατακρήμνιση του DNA της αντίδρασης sequencing και τοποθετείται στο ειδικό δοχείο-δεξαμενή από όπου μεταφέρονται 29 μl μείγματος σε κάθε δείγμα της αντίδρασης αλληλούχησης με την πιπέτα 8 καναλιών. Το πιάτο καλύπτεται με μεμβράνη και επωάζεται στους 4 °C για 30 min. Έπειτα φυγοκεντρείται στην ψυχόμενη φυγόκεντρο στην ίδια θερμοκρασία σε ταχύτητα 2210 g για 30 min. Τοποθετείται χάρτινο κάλυμμα πάνω στο πιάτο και αναποδογυρίζεται προκειμένου να φυγοκεντρηθεί ανάποδα στους 4 °C στα 200 g για 2 min και να απομακρυνθεί το μείγμα. Το κατακρημνισμένο DNA θα είναι προσκολλημένο στον πάτο του πιάτου. Μετά τον τέλος της φυγοκέντρωσης προστίθενται 50 μl αιθανόλης 70% ανά δείγμα και ακολουθεί νέα φυγοκέντρωση στους 4 °C στα 2210 g για 3 min και επακόλουθη ανάποδη φυγοκέντρωση όπως προαναφέρθηκε. Το πιάτο παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min προκειμένου να στεγνώσει. Τέλος προστίθενται 10 μl φορμαμίδιο (HIDI) σε κάθε πηγάδι, καλύπτεται με το κατάλληλο κάλυμμα σιλικόνης και αναδεύεται ισχυρά για 10 sec. Γίνεται γρήγορη φυγοκέντρωση και τοποθετείται νέο κατάλληλο κάλυμμα προκειμένου να ακολουθήσει φύλαξη στους 4 °C και στη συνέχεια τριχοειδής ηλεκτροφόρηση στον γενετικό αναλυτή ηλεκτροφόρησης (ABI3500).

### 3.2.6. Διάγνωση Νωτιαία Μυϊκής Ατροφίας

Η ανίχνευση και ο προσδιορισμός του αριθμού αντιγράφων των εξονίων 7 και 8 του γονιδίου SMN1 γίνεται με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (real-time quantitative PCR) ή με Πολλαπλή υβριδο-εξαρτώμενη κλωνοποίηση με ανιχνευτές (MLPA). Η παρουσία του ενός ομόλογου αντιγράφου SMN2 επιβάλλει την εφαρμογή μεθοδολογίας που επιτρέπει τη

διάκριση ανάμεσα στα δύο γονίδια σύμφωνα με τις καταγεγραμμένες νουκλεοτιδικές τους διαφορές.

Στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής ακολουθείται ταχεία μέθοδος ανάλυσης πολυμορφισμών με διαφορετικά μήκη θραυσμάτων έπειτα από επώαση με περιοριστική ενδονουκλεάση (αναγνώριση αλληλομόρφων με χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών, Restriction Fragment Length Polymorphism- RFLPs) για την ανίχνευση του ομόζυγου ελλείμματος στο εξόνιο 7 ή/και 8 (Kekou et al., 2020) καθώς και MLPA για την ποσοτικοποίηση του αριθμού αντιγράφων των εξονίων 7 και 8 στα γονίδια SMN1 και SMN2.

### 3.2.6.1. Αναγνώριση αλληλομόρφων SMN1/SMN2 με χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών (RFLPs)

Η μέθοδος αναγνώρισης αλληλομόρφων με χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών ονομάζεται RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms). Η αντίδραση στηρίζεται στον πολλαπλασιασμό των εξονίων 7 και 8 από αμφότερα τα γονίδια και έπειτα στην πέψη των προϊόντων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν την αλληλουχία του ενός γονιδίου έναντι του άλλου, δεδομένου ότι δύο από τις νουκλεοτιδικές διαφορές που διακρίνουν τα δύο γονίδια δημιουργούν διαφορετικές αλληλουχίες αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών. Σε πρώτο στάδιο πολλαπλασιάζονται τα εξόνια 7 ή 8 των γονιδίων SMN1 και SMN2 σε δύο ξεχωριστές αντιδράσεις. Έπειτα γίνεται πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες Hinf και Ddel. Η πρώτη αναγνωρίζει θέση αναγνώρισης εντός του εξονίου 7 του γονιδίου SMN1, ενώ η δεύτερη στο εξόνιο 8 του γονιδίου SMN2. Οι διαφορές οφείλονται στην παραλλαγή c.840 C>T στο εξόνιο 7 και c.1155 G>A στο εξόνιο 8. Αν το αλληλόμορφο δεν έχει έλλειψη, τότε προκύπτουν τρία θραύσματα, δύο από την πέψη του εξονίου 7 του γονιδίου SMN1 (το ένα θραύσμα είναι πολύ μικρό και δεν είναι ορατό) και ένα από το άκοπο εξόνιο 7 του γονιδίου SMN2 ή δύο από την πέψη του εξονίου 8 του γονιδίου SMN2 και ένα από το άκοπο εξόνιο 8 του γονιδίου SMN1. Αντιθέτως αν υπάρχει ομόζυγη έλλειψη τότε παρατηρείται ένα μόνο προϊόν για το άκοπο SMN2/7 και δύο από το κομμένο SMN2/8. Η πλειοψηφία των ασθενών εμφανίζει έλλειψη και στα 2 εξόνια του γονιδίου SMN1.

Πίνακας 12. Στοιχειομετρία αντίδρασης PCR για τα εξόνια 7 και 8. Οι αντιδράσεις ολοκληρώνονται σε διαφορετικά φιαλίδια.

|                                |          |
|--------------------------------|----------|
| HSTaq                          | 6,25 μl  |
| MgCl <sub>2</sub> (25μM)       | 1 μl     |
| Forward primer exon 7/8 (10μM) | 0,5 μl   |
| Reverse primer exon 7/8(10μM)  | 0,5 μl   |
| H <sub>2</sub> O               | 4 μl     |
| DNA sample                     | 2 μl     |
| Συνολικός όγκος αντίδρασης     | 14,25 μl |

Πίνακας 13. Αντίδραση επώασης με περιοριστική ενδονουκλεάση.

|        |        |
|--------|--------|
| Buffer | 2,5 μl |
|--------|--------|

|                              |             |
|------------------------------|-------------|
| Hinf (exon 7)/ Ddel (exon 8) | 1 $\mu$ l   |
| BSA                          | 0,5 $\mu$ l |
| H <sub>2</sub> O             | 11 $\mu$ l  |
| PCR product                  | 10 $\mu$ l  |
| Συνολικός όγκος αντίδρασης   | 25 $\mu$ l  |

Η αντίδραση ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα 3:1 Nussieve (LE) αγαρόζη: απλή αγαρόζη για να είναι δυνατή η διάκριση τμημάτων με μικρή διαφορά μεγέθους. Τα αναμενόμενα μεγέθη του κάθε προϊόντος είναι τα εξής:

Εξόνιο 7: 101 SMN2/ 77+24 SMN1

Εξόνιο 8: 187 SMN1/ 123+64 SMN2

### 3.2.6.2. Εξαρτώμενη από τη δράση της λιγάσης πολλαπλή ενίσχυση ανιχνευτών MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA*)

Η μέθοδος βασίζεται στον πολλαπλασιασμό πολλαπλών στόχων μέσω PCR μετά από χρήση γενωμικών ανιχνευτών. Επιτρέπει την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πολλαπλών αλληλουχιών σε μία αντίδραση με τη χρήση ενός ζεύγους εκκινητών. Στην τεχνική για κάθε αλληλουχία στόχο υπάρχει ένα ζεύγος ανιχνευτών, οι οποίοι είναι σχεδιασμένοι να υβριδοποιούνται ο ένας δίπλα στον άλλον στην αλληλουχία στόχο στην οποία είναι συμπληρωματικοί. Έχουν μήκος 22-43 νουκλεοτίδια και μια ειδική αλληλουχία πρόσδεσης εκκινητή. Ένας από τους ανιχνευτές διαθέτει μια επιπλέον εσωτερική αλληλουχία μήκους 19-364 νουκλεοτιδίων. Μετά την πρόσδεσή τους στην αλληλουχία στόχο, οι ανιχνευτές ενώνονται μεταξύ τους μετά από αντίδραση της λιγάσης, η οποία καλύπτει το κενό και ενώνει τους ανιχνευτές με φωσφοδιεστερικό δεσμό. Ακολουθεί πρόσδεση των εκκινητών στις καθορισμένες αλληλουχίες των υβριδοποιημένων ανιχνευτών και πολλαπλασιασμός με PCR του τμήματος DNA που προκύπτει από την ένωση των ανιχνευτών. Ο ένας από τους δύο εκκινητές είναι ιχνηθετημένος με φθοριοχρώμα, γεγονός που επιτρέπει τον διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση των προϊόντων της PCR σε αναλυτή DNA με το κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα με την μορφή καμπύλων σε γράφημα.

Η αντίδραση MLPA πραγματοποιείται σε 3 στάδια, σε έναν θερμικό κυκλοποιητή (εικόνα 2):

1. Αποδιάταξη του DNA και υβριδοποίηση των ανιχνευτών στην αλληλουχία στόχο.
2. Αντίδραση σύνδεσης των υβριδοποιημένων ανιχνευτών με το ένζυμο λιγάση
3. PCR με χρήση των κοινών εκκινητών.

Για την αποδιάταξη επωάζεται 1  $\mu$ l DNA τελικής συγκέντρωσης 50-100 ng ανά αντίδραση και αντίστοιχου μάρτυρα στους 98°C για 10 min. Η ποσότητα DNA διαμορφώνεται ανάλογα τη συγκέντρωση του υλικού και φτάνει κατά μέγιστο 2,5  $\mu$ l. Ακολουθεί η υβριδοποίηση των ανιχνευτών, όπου για κάθε δείγμα ισχύει η στοιχειομετρία :

- 0,375  $\mu$ l probe mix,
- 0,375  $\mu$ l MLPA buffer,
- 0,25  $\mu$ l-0  $\mu$ l H<sub>2</sub>O αναλόγως τον όγκο του απομονωμένου DNA που χρησιμοποιήθηκε.

Τέλος η αντίδραση επωάζεται στους 95°C για 1 min και κατόπιν στους 60°C για 3-16 ώρες. Για την αντίδραση σύνδεσης υβριδοποιημένων ανιχνευτών με λιγάση η στοιχειομετρία της αντίδρασης για κάθε δείγμα είναι:

- 0,75  $\mu$ l Ligase-65 buffer A,
- 0,75  $\mu$ l Ligase-65 buffer B,

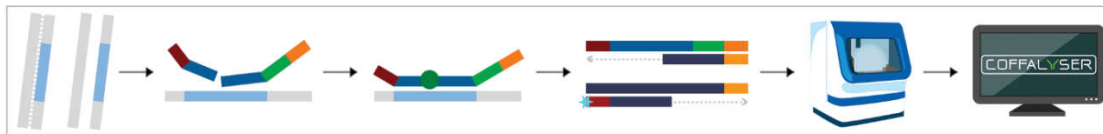
- 0,25 μl Ligase-65 και 6,25 μl H<sub>2</sub>O.

Προστίθενται 8 μl από το μείγμα σε κάθε δείγμα, ενώ τα δείγματα διατηρούνται στους 54°C στον θερμικό κυκλοποιητή. Ακολουθεί επώαση στους 54°C για 15 min και απενεργοποίηση της λιγάσης στους 98°C για 5 min. Τα δείγματα στη συνέχεια παραμένουν σε θερμοκρασία 4°C έως ότου γίνει προετοιμασία του επόμενου σταδίου.

Για την αντίδραση PCR προστίθεται όγκος 2,5 μl μείγματος :

- 1,875 μl H<sub>2</sub>O,
- 0,5 μl primer
- 0,125 μl DNA πολυμεράση.

Ο διαχωρισμός των μορίων επιτυγχάνεται με ηλεκτροφόρηση στο γενετικό αναλυτή ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδή Applied Biosystems 3500 Genetic Analyser (ABI3500). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας το λογισμικό Gene-Marker, έκδοση 1.95 (Softgenetics, StateCollege, PA, USA).



Εικόνα 10. Απεικόνιση αρχής μεθόδου MLPA (προσαρμογή από πρωτόκολλο εταιρίας MRCHolland).

Η ποσοτικοποίηση των προϊόντων προκύπτει από το σχετικό σήμα για κάθε ανιχνευτή. Υπολογίζεται διαιρώντας το εμβαδόν της καμπύλης που καταγράφεται για το προϊόν της PCR του συγκεκριμένου ανιχνευτή, με το σύνολο των εμβαδών των καμπύλων που καταγράφονται για όλους τους ανιχνευτές στο δείγμα, και εκφράζεται ως πολλαπλάσιο του σχετικού σήματος του ίδιου ανιχνευτή σε ένα φυσιολογικό δείγμα ελέγχου. Έτσι, η αναμενόμενη τιμή για ένα φυσιολογικό δείγμα είναι περίπου 2, για ένα δείγμα με ομόζυγη έλλειψη είναι περίπου 0, για ένα δείγμα με ετερόζυγη έλλειψη είναι περίπου 1, ενώ με διπλασιασμό αλληλομόρφων είναι >2.

Η αντίδραση MLPA εμφανίζει σημαντικό βαθμό δυσκολίας και ιδιαίτερη ευαισθησία στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά (συγκέντρωση και καθαρότητα) του υλικού προς μελέτη και επιλέχθηκε για την αξιολόγηση της πιθανή χρήσης του υλικού που απομονώθηκε από ENY σε τεχνικές αυξημένων απαιτήσεων.

### 3.2.7. Μελέτη προτύπου μεθυλίωσης DNA

#### 3.2.7.1. Μελέτη προτύπου μεθυλίωσης Χ χρωμοσώματος (HUMARA)

Στην αντίδραση μελέτης προτύπου μεθυλίωσης γίνεται πολλαπλασιασμός του εξονίου1 του γονιδίου AR (Androgen Receptor, Xq11.2). Στη συγκεκριμένη γενετική θέση εντοπίζεται μια πολυμορφική αλληλουχία (CAG)<sub>n</sub> και μια περιοχή που υπόκειται σε μεθυλίωση κατά τη διαδικασία αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X. Η παρουσία της τρινοκλεοτιδικής αλληλουχίας και της περιοχής μεθυλίωσης επιτρέπει τον χαρακτηρισμό των αλληλομόρφων σε μεθυλιωμένα και μη και προσφέρεται για τη μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X. Σε κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο αντιδράσεις πολλαπλασιασμού, μία έπειτα από πέψη του DNA με ειδική για μεθυλίωση περιοριστική ενδονουκλεάση HhaI και μία σε DNA που δεν έχει υποστεί πέψη. Στα θήλεα άτομα αναμένεται ύπαρξη δύο προϊόντων στη περίπτωση ετεροζυγωτίας, ή ενός προϊόντος σε περίπτωση ομοζυγωτίας. Μετά την πέψη το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο είναι κατακερματισμένο και διαφεύγει του πολλαπλασιασμού με αποτέλεσμα να αποδίδονται προϊόντα μόνο του μεθυλιωμένου αλληλόμορφου. Αντιθέτως στα άρρενα άτομα λόγω

ημιζυγωτίας, αναμένεται ο πολλαπλασιασμός αποκλειστικά ενός προϊόντος στο δείγμα χωρίς πέψη, ενώ μετά την πέψη δεν αναμένεται προϊόν. Σε περιπτώσεις εξαιρετικά επιλεκτικής αδρανοποίησης του ενός εκ των δύο χρωμοσωμάτων X αναμένεται και απουσία προϊόντων πολλαπλασιασμού από το ενεργό (και ευαίσθητο στη πέψη) X. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων γίνεται σε γενετικό αναλυτή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ABI3500.

Πίνακας 14. Στοιχειομετρία αντίδρασης πέψης του DNA με HhaI.

|                            |          |
|----------------------------|----------|
| HhaI                       | 1 μl     |
| Buffer                     | 1 μl     |
| BSA 10%                    | 0,06 μl  |
| H <sub>2</sub> O           | 5 μl     |
| DNA                        | 3 μl     |
| Συνολικός όγκος αντίδρασης | 10,06 μl |

Η αντίδραση επάξεται για 4- 16 ώρες σε θερμοκρασία 37°C. Ακολουθεί η αντίδραση PCR στην οποία ως μάρτυρας χρησιμοποιείται και άπεπτο υλικό για κάθε δείγμα.

Πίνακας 15 Στοιχειομετρία αντίδρασης PCR AR εξόνιο 1.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στον γενετικό αναλυτή ABI3500. Στον πίνακα 10 παρουσιάζονται οι αλληλουχίες εκκινήτων που

|                            |          |
|----------------------------|----------|
| MMTaq                      | 5 μl     |
| Q                          | 1 μl     |
| Deaza                      | 0,25 μl  |
| DMSO                       | 1 μl     |
| H <sub>2</sub> O           | 1 μl     |
| Forward (10μM)             | 0,5 μl   |
| Reverse (10μM)             | 0,5 μl   |
| AR-bFAM                    | 1 μl     |
| DNA                        | 1 μl     |
| Digested product           | 3 μl     |
| Συνολικός όγκος αντίδρασης | 14,25 μl |

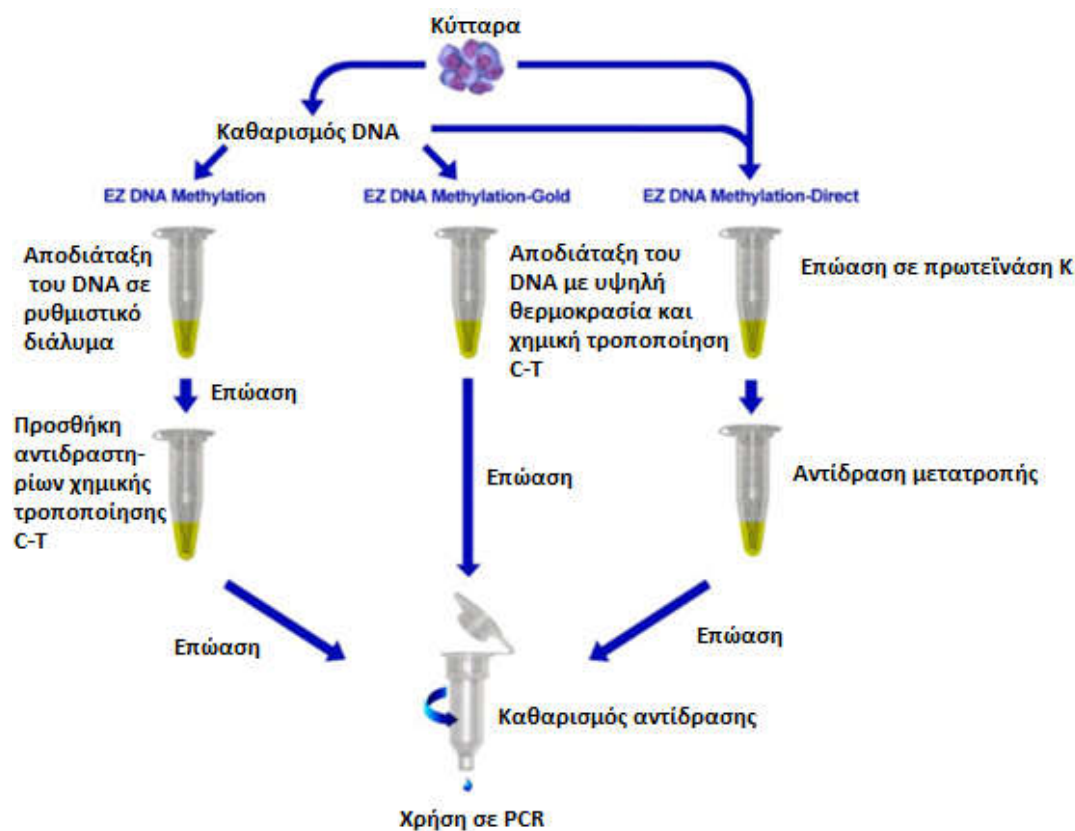
χρησιμοποιήθηκαν.

### 3.2.7.2. Μελέτη προτύπου μεθυλίωσης έπειτα από χημική τροποποίηση (PCR SNRPN)

Η γονιδιακή αποτύπωση αποτελεί μορφή επιγενετικής ρύθμισης σύμφωνα με την οποία η έκφραση ενός γονιδίου εξαρτάται από την γονεϊκή προέλευση του. Εξασφαλίζει μονοαλληλική έκφραση γονιδίων και επιτυγχάνεται με επιγενετικά σήματα (συνήθως μεθυλίωση) που επισημαίνουν τη γονεϊκή προέλευση των αλληλομόρφων και καθορίζουν ποιο από τα δύο αλληλόμορφα θα διατηρηθεί ενεργό.

Το πρότυπο μεθυλίωσης αποτυπωμένων περιοχών στο γονιδίωμα μελετάται έπειτα από χημική επεξεργασία του DNA με διθειώδες νάτριο, που οδηγεί σε απαμίνωση και μετατροπή των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες. Η μετατροπή αυτή οδηγεί αυτόματα στη δημιουργία δύο νέων αλληλουχιών που περιέχουν και ουρακίλη και δύναται να διαφοροποιηθούν μετά από πολλαπλασιασμό ή /και αλληλούχηση. Τα σύνδρομα PraderWilli/ Angelman οφείλονται σε διαταραχές γονιδιακής αποτύπωσης και η διάγνωση

τους γίνεται με πολλαπλασιασμό και μελέτη του γονιδίου SNRPN μετά από χημική τροποποίηση. Το γονίδιο αυτό είναι αποτυπωμένο, εκφράζεται μόνο από το πατρικό αλληλόμορφο, ενώ το μητρικό είναι μεθυλιωμένο και ανενεργό. Χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών που εμφανίζουν ομολογία με τις διαφοροποιημένες αλληλουχίες στο μητρικό και το πατρικό αλληλόμορφο με μία αντίδραση PCR, βάσει των αλλαγών στην αλληλουχία βάσεων του DNA έπειτα από τη χημική τροποποίηση. Στο πατρικό αλληλόμορφο, όλα τα κατάλοιπα κυτοσίνης θα έχουν μετατραπεί σε ουρακίλη, ενώ στο μητρικό αλληλόμορφο οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες θα έχουν διατηρηθεί ως κυτοσίνες και οι ελεύθερες θα έχουν μετατραπεί σεU. Η χημική τροποποίηση πραγματοποιείται βάσει του πρωτοκόλλου του εμπορικά διαθέσιμου συστήματος EZ DNA Methylation (ZYMO Research). Η ελάχιστη ποσότητα DNA που απαιτείται για την πραγματοποίηση του πρωτοκόλλου είναι περίπου 500 ng, και η μέθοδος επιλέχθηκε δοκιμαστικά για να εκτιμηθεί αν υπάρχει δυνατότητα ανάλυσης του DNA από ENY.



Εικόνα 11. Στάδια χημικής τροποποίησης για μελέτη προτύπου μεθυλίωσης (προσαρμογή από <https://www.bioscience.co.uk/cpl/ez-dna-methylation-direct>)

Μετά την ολοκλήρωση της χημικής τροποποίησης ακολουθεί αντίδραση πολλαπλασιασμού με τη χρήση εκκινητών ( δύο ζεύγη) (πίνακας 10) ειδικά σχεδιασμένων να αναγνωρίζουν τις δύο, διαφορετικές γονεϊκές προέλευσης αλληλουχίες του γονιδίου SNRPN.

Πίνακας 16. Στοιχειομετρία αντίδρασης PCR SNRPN.

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Hot Star Taq             | 7,5 μl |
| MgCl <sub>2</sub> (25μM) | 1,5 μl |
| Maternal Forward (10μM)  | 1 μl   |
| Maternal Reverse (10μM)  | 1 μl   |

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Paternal Forward (10μM)    | 0,75 μl |
| Paternal Reverse(10μM)     | 0,75 μl |
| H <sub>2</sub> O           | 1,75 μl |
| DNA                        | 2 μl    |
| Συνολικός όγκος αντίδρασης | 25 μl   |

Συνθήκες της αντίδρασης:

95°C, 10 min

94°C, 30 sec

62°C, 30 sec

72°C, 30 sec

72°C, 10 min

4°C, παύση και διατήρηση



### 3.2.8. Ενίσχυση ολικού γονιδιώματος (Whole Genome Amplification)

Η ποσότητα DNA που απομονώνεται από δείγματα ENY είναι ελάχιστη, δεδομένου ότι περιέχει φυσιολογικά 0-5 κύτταρα ανά μl. Σε ορισμένα από αυτά πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος με χρήση του εμπορικά διαθέσιμου kit REPLI-g Advanced DNA Single Cell kit, Qiagen. Η τεχνική επιτυγχάνει μη επιλεκτικό πολλαπλασιασμό ολόκληρου του γονιδιώματος με χρήση τυχαίων εξαμερών, ως πρωταρχικά τμήματα της αντιγραφής και ειδικής DNA πολυμεράσης Phi 29, η οποία έχει υψηλή πιστότητα και αποτρέπει την δημιουργία δευτεροταγών δομών. Η αντίδραση γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου υπό στείρες συνθήκες. Από κάθε δείγμα χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα >1 ng γενωμικού DNA.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

*Απομόνωση γενωμικού DNA με δύο πρωτόκολλα και σύγκριση των ποσοτικών και ποιοτικών αποτελεσμάτων που αποδίδουν.*

Έξι δείγματα ολικού ENY, εκ των οποίων δύο ήταν διατηρημένα σε σωληνάρια EDTA και δύο δείγματα 200 μl ENY απομονώθηκαν με Nucleospin Tissue XS\_Micro kit for DNA from cells and tissue (Macherey-Nagel): Τα δείγματα αναγράφονται αναλυτικά στον πίνακα 18.

Πέντε δείγματα ολικού ENY και τέσσερα δείγματα 200 μl ENY απομονώθηκαν με QIAamp, DNA Mini Blood (Qiagen): Τα δείγματα αναγράφονται αναλυτικά στο πίνακα 18.

Η ποσότητα του απομονωμένου DNA προσδιορίζεται από τη συγκέντρωση του υλικού. Η ποιότητα προσδιορίζεται από τους λόγους 260/280 και 260/230. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και των λόγων ποιοτικής αξιολόγησης των δειγμάτων DNA πραγματοποιείται σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop (Thermo-Fischer Scientific).

Σε όλα τα δείγματα επαναλήφθηκε η διαδικασία έκλουσης με την προσθήκη 10 μl H<sub>2</sub>O και επώασή τους για 16-18 ώρες (overnight), προκειμένου να απομονωθεί πιθανή εναπομείνουσα ποσότητα DNA από τον ηθμό.

Πίνακας 17. Αποτελέσματα απομόνωσης από δείγματα ENY. Με γκρι σκίαση παρουσιάζονται οι απομονώσεις με το πρωτόκολλο Nucleospin TissueXS ενώ χωρίς σκίαση παρουσιάζονται οι απομονώσεις με το πρωτόκολλο Qiagen Mini Blood. Με κόκκινα γράμματα παρουσιάζονται τα δείγματα εκείνα που είχαν την καλύτερη απόδοση σε ποσότητα και καθαρότητα απομονωμένου DNA.

| Δείγμα/kit  | Φυγοκέντρηση/<br>επαναιώρηση<br>ιζήματος                    | Συγκέντρωση<br>1 <sup>ης</sup> έκλουσης<br>(ng/μl) | 260/280 | 260/230 | Συγκέντρωση<br>επόμενων<br>εκλούσεων<br>(ng/μl) | 260/280 | 260/230 |
|---|---|--|---------|---------|---|---------|---------|
| <b>Απομόνωση από συνολικό όγκο δείγματος</b>                        |   |  |         |         |   |         |         |
| 24-01csfcm1<br>(0,66ml)<br><b>Nucleospin<br/>TissueXS</b>           | 14.000 rpm<br>10min<br>Επαναιώρησησε<br>20μlNaCl            | 4,4  | 1,3     | 0,27    | 3,8   | 1,44    | 0,37    |
| 24-02csfcf3<br>(1,4ml)<br><b>Nucleospin<br/>TissueXS</b>            | 14.000 rpm<br>10min<br>Επαναιώρηση<br>σε 20μlNaCl           | 3,7  | 1,75    | 0,08    | 16,9  | 1,7     | 1,63    |
| 24-04csfcf8<br>(0,48ml)<br><b>Nucleospin<br/>TissueXS</b>           | 14.000 rpm<br>10min<br>Επαναιώρηση<br>σε 20μlNaCl           | 4,5  | 1,7     | 0,09    | 8,77  | 1,63    | 0,54    |
| 24-07csfcf16<br>(0,48ml)<br><b>Nucleospin<br/>Tissue XS</b>         | 14.000 rpm<br>10min<br>Επαναιώρηση<br>σε 20μlNaCl           | 7,1  | 1,46    | 0,19    | 22,4  | 1,7     | 0,66    |
| 24-05csfcm35<br>(1,3 ml)<br><b>Nucleospin<br/>TissueXS<br/>EDTA</b> | 1.000g 10min<br>16.000g 20min<br>Επαναιώρηση<br>σε 20μlNaCl | 27,6   | 1,6     | 0,68    | -   | -       | -       |

|   |   |         |       |      |                                    |                      |                      |
|---|---|---------|-------|------|------------------------------------|----------------------|----------------------|
| 24-06csfcf13<br>(1 ml)<br><b>NucleospinTissu<br/>eXS<br/>EDTA</b> | 1.000g 10min<br>16.000g 20min<br>Επαναιώρηση<br>σε 20µlNaCl | 34      | 1,8   | 0,73 | 4,5                                | 1,2                  | 0,6                  |
| 24-02csfcf4<br>(0,7ml)<br><b>Qiagen Mini<br/>Blood</b>            | 14.000 rpm<br>10min<br>Επαναιώρηση<br>σε 200µlNaCl          | 3,4     | 69,69 | 0,08 | 4,2 (2ης)<br>4,9(3ης)<br>2,2 (4ης) | 2,13<br>1,62<br>3,2  | 0,11<br>0,25<br>0,16 |
| 24-04csfcf9<br>(0,85ml)<br><b>Qiagen Mini<br/>Blood</b>           | 14.000 rpm<br>10min<br>Επαναιώρηση<br>σε 200µlNaCl          | 5,26    | 4,54  | 0,09 | 1,2 (2ης)<br>2,5 (3ης)<br>5,1(4ης) | 3,92<br>2,64<br>2,25 | 0,05<br>0,21<br>0,29 |
| 24-07csfcf17<br>(1,5ml)<br><b>Qiagen Mini<br/>Blood</b>           | 14.000 rpm<br>10min<br>Επαναιώρηση<br>σε 200µlNaCl          | Απέτυχε |       |      |                                    |                      |                      |
| 24-15csfcm40<br><b>Qiagen Mini<br/>Blood<br/>EDTA</b>             | 1.000g 10'<br>16.000g 20'<br>Επαναιώρηση<br>σε 200 µlNaCl   | 4,4     | 8,44  | 0,08 | 6,5                                | 2,56                 | 0,15                 |
| 24-16csfc 41<br><b>Qiagen Mini<br/>Blood<br/>EDTA</b>             | 1.000g 10'<br>16.000g 20'<br>Επαναιώρηση<br>σε 200 µlNaCl   | 7,1     | 2,31  | 0,11 | -                                  | -                    | -                    |
| <b>Απομόνωση από 200 µl δείγματος</b>                             |   |         |       |      |                                    |                      |                      |
| 24-01csfcm2<br><b>Nucleospin<br/>TissueXS</b>                     | 14.000 rpm/10<br>min<br>Επαναιώρηση<br>σε 20 µlNaCl         | 2       | 6,8   | 0,34 | 4,4                                | 1,66                 | 0,51                 |
| 24-02csfcf36<br><b>Nucleospin<br/>TissueXS</b>                    | 14.000 rpm/10<br>min<br>Επαναιώρηση<br>σε 20 µlNaCl         | 4,9     | 2,55  | 0,37 | 3,7                                | 1,21                 | 0,4                  |
| 24-01csfcm2<br><b>Qiagen Mini<br/>Blood</b>                       | -   | 2,9     | 2,75  | 0,09 | 7,6                                | 1,3                  | 0,15                 |
| 24-02csfcf7<br><b>Qiagen Mini<br/>Blood</b>                       | -   | 2,6     | 4,67  | 0,07 | -                                  | -                    | -                    |

|  |   |      |      |      |     |      |      |
|--|---|------|------|------|-----|------|------|
| 24-03csfcm5<br><b>Qiagen Mini Blood</b>  | - | 2,9  | 1,63 | 0,09 | 9,1 | 1,55 | 0,16 |
| 24-04csfcm10<br><b>Qiagen Mini Blood</b> | - | 17,3 | 1,7  | 0,44 | -   | -    | -    |

Παρατηρείται στην πλειοψηφία των απομονωμένων με Nucleospin Tissue XS δειγμάτων, λόγος 260/280 που υποδεικνύει απομονωμένο DNA υψηλής καθαρότητας. Ο λόγος 260/230 είναι χαμηλότερος από το φυσιολογικό αποδεικνύοντας την ύπαρξη μορίων που απορροφούν στο μήκος κύματος 230 nm. Τα μόρια αυτά δεν επηρεάζουν την ποιότητα του DNA, αλλά μπορεί να λειτουργήσουν ως παρεμποδιστικοί παράγοντες σε αντιδράσεις. Στα απομονωμένα με Qiagen Mini Blood δείγματα, επιτυγχάνεται απομόνωση DNA στην πλειοψηφία των περιπτώσεων (4/5 δείγματα ολικού ENY, 4/4 δείγματα 200μl ENY), αλλά χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη ποιότητα και καθαρότητα.

Η χαμηλότερη ποσότητα και ποιότητα του απομονωμένου DNA στην πλειοψηφία των δειγμάτων είναι αναμενόμενη εξαιτίας της ελάχιστης περιεκτικότητας του υλικού σε κύτταρα.

#### 4.1. Έλεγχος της ικανότητας πολλαπλασιασμού επιλεγμένων αλληλουχιών στόχων από δείγματα DNA απομονωμένα από ENY.

Πρώτος στόχος της μελέτης ήταν ο έλεγχος της ικανότητας πολλαπλασιασμού προϊόντος από δείγματα DNA απομονωμένα με αμφότερα τα πρωτόκολλα. Ως αλληλουχίες στόχοι της αντίδρασης επιλέχθηκαν οι περιοχές του ψευδοαυτοσωμικού γονιδίου αμελογενίνης (Χρ22.31–p22/ Υρ11. 2) AMELX/Y. Τα προϊόντα της αντίδρασης εμφανίζουν διαφορετικό μέγεθος προερχόμενα από το Χ σε σχέση με το Υ φυλετικό χρωμόσωμα. Η ανίχνευση των προϊόντων γίνεται σε γενετικό αναλυτή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ABI3500, που επιτρέπει την ανίχνευση προϊόντων χαμηλότερης συγκέντρωσης. Η αντίδραση επιλέχθηκε καθώς μπορεί να γίνει επιβεβαίωση της επιτυχίας και από την επαλήθευση του φύλου των ασθενών, από τους οποίους προέρχονται τα δείγματα ENY.

Στα θήλεα άτομα αναμένεται ένα προϊόν μεγέθους 111bp, εξαιτίας της ύπαρξης μόνο Χ φυλετικών χρωμοσωμάτων, ενώ στα αρρενα αναμένονται δύο προϊόντα μεγέθους 111 και 117 bp, αφού διαθέτουν ένα Χ και ένα Υ φυλετικό χρωμόσωμα. Ως θετικός μάρτυρας της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε δείγμα DNA άρρενος ατόμου, απομονωμένο από αίμα. Η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων έγινε σε γενετικό αναλυτή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ABI3500. Τα δείγματα που υποβλήθηκαν στην αντίδραση ήταν τα εξής:

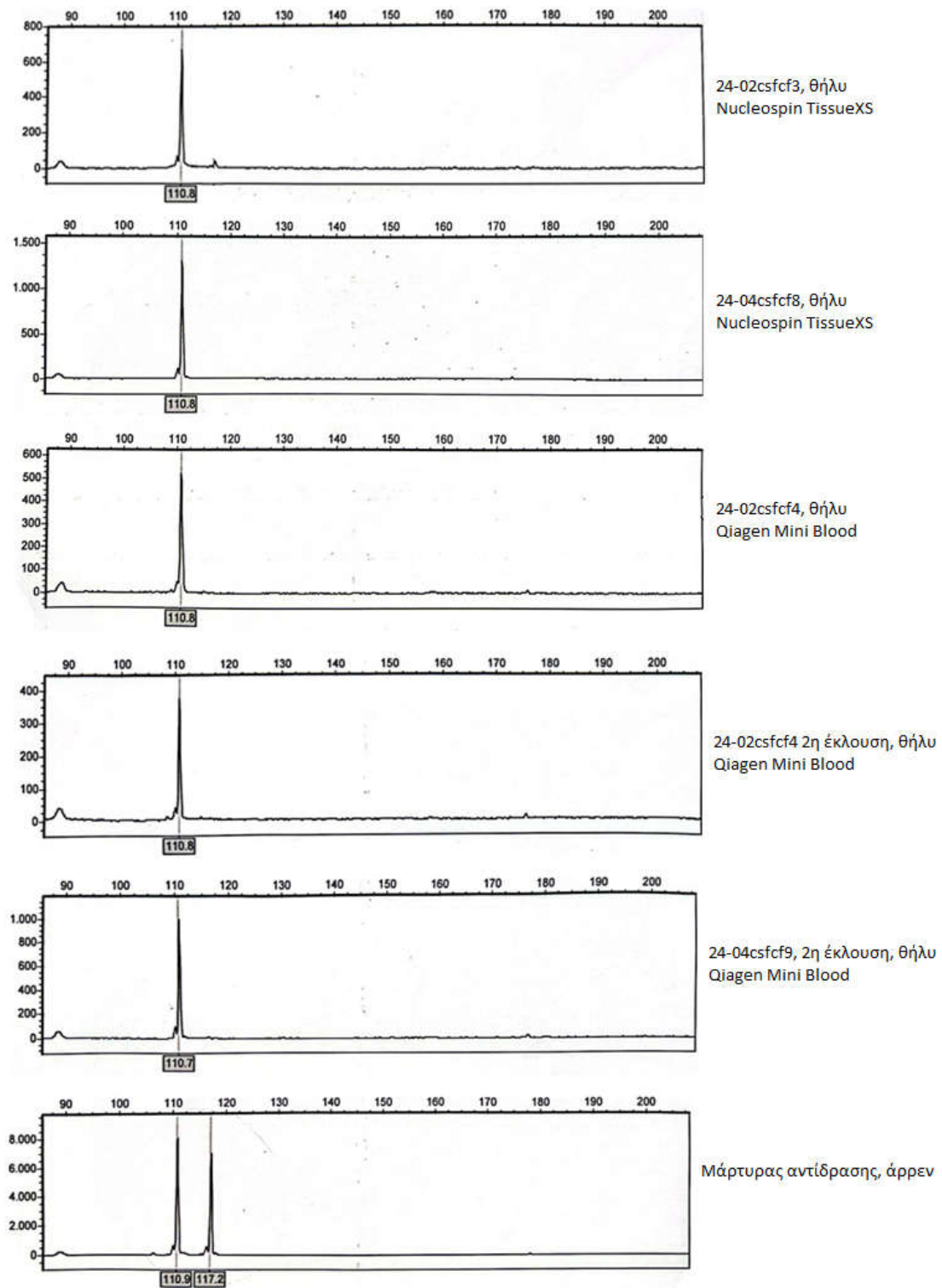
24-02csfcm3, Nucleospin TissueXS

24-04csfcm8, Nucleospin TissueXS

24-02csfcm4, 24-02csfcm4 2η έκδοση, Qiagen Mini Blood

24-04csfcm9, 2η έκδοση, Qiagen Mini Blood

Το φύλο ταυτοποιήθηκε επιτυχώς σε όλα τα δείγματα.



Εικόνα 12. Προϊόντα πολλαπλασιασμού AMELX/Y όπως ανιχνεύονται μετά από ηλεκτροφόρηση σε αυτόματο αναλυτή (ABI3500).

4.2. Αντίδραση πολλαπλών στόχων σε δείγματα απομονωμένα με το πρωτόκολλο που απέδωσε τα καλύτερα ποιοτικά αποτελέσματα.

Δύο δείγματα DNA απομονωμένα με το πρωτόκολλο που απέδωσε τα καλύτερα ποσοτικά και ποιοτικά αποτελέσματα, υποβλήθηκαν σε δύο αντιδράσεις πολλαπλών στόχων που εφαρμόζονται στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής. Ο λόγος που επιλέχθηκαν δείγματα απομονωμένα με το αποδοτικότερο πρωτόκολλο είναι εξαιτίας του υψηλότερου βαθμού δυσκολίας των αντιδράσεων πολλαπλών στόχων και της απαίτησής τους, κατά κανόνα, σε υψηλότερη συγκέντρωση DNA. Η μία αντίδραση πολλαπλών στόχων στην οποία υπεβλήθηκαν τα δείγματα είναι βελτιστοποιημένη (optimized) για δείγματα χαμηλών συγκεντρώσεων, όπως αυτά που προκύπτουν από προγεννητικούς ελέγχους.

Το πρωτόκολλο που απέδωσε τα καλύτερα ποσοτικά και ποιοτικά αποτελέσματα ήταν το Nucleospin Tissue XS. Η πρώτη αντίδραση είχε ως στόχο μικροδορυφορικές αλληλουχίες (STRs) των γονιδίων SMN1, HBB και τμήματα του ψευδοαυτοσωμικού γονιδίου αμελογενίνης AMELX/Y. Τα αναμενόμενα μεγέθη κάθε στόχου αναγράφονται στον πίνακα 3. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε δεύτερη αντίδραση με μείγμα ζευγών εκκινητών που πολλαπλασιάζουν STRs ή και άλλα τμήματα των φυλετικών χρωμοσωμάτων και που χρησιμοποιείται σε προγεννητικούς ελέγχους. Οι περιοχές στόχοι των φυλετικών χρωμοσωμάτων και τα αναμενόμενα μεγέθη τους αναφέρονται στον πίνακα 4. Ως θετικός μάρτυρας της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε δείγμα DNA άρρενος ατόμου, απομονωμένο από αίμα. Η ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων έγινε με χρήση γενετικού αναλυτή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ABI3500.

Τα δείγματα που υποβλήθηκαν στην αντίδραση ήταν τα εξής:

24-01csfcm1, Nucleospin

24-07csfcm16, Nucleospin

Στα δείγματα ENY έγινε επιτυχώς ο πολλαπλασιασμός των προϊόντων STRs SMN1, HBB αλλά όχι των τμημάτων AMELX/Y σε αντίθεση με το θετικό μάρτυρα της αντίδρασης όπου ανιχνεύθηκαν τα προϊόντα όλων των στόχων. Όλες οι αντιδράσεις πολλαπλασιασμού STRs και άλλων τμημάτων των φυλετικών χρωμοσωμάτων ήταν επιτυχείς στα δείγματα και στον θετικό μάρτυρα της αντίδρασης.

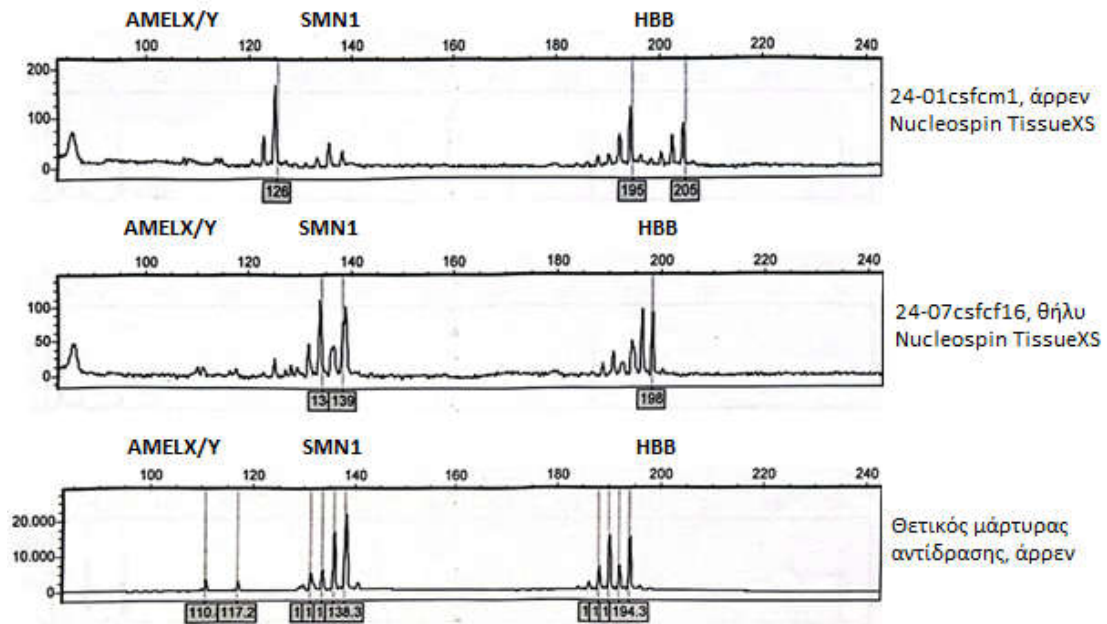
Πίνακας 18. Αναμενόμενα μεγέθη προϊόντων πολλαπλασιασμού αλληλουχιών AMELX/Y, STRs HBB, SMN1.

| Στόχος                         | Μέγεθος προϊόντος |
|--------------------------------|-------------------|
| AMELX/Y (Χρ22.31-p22/ Υρ11. 2) | 111/117 bp        |
| SMN1 (5q12.2-q13.3)            | 140 bp            |
| HBB (11p15.4)                  | 190 bp            |

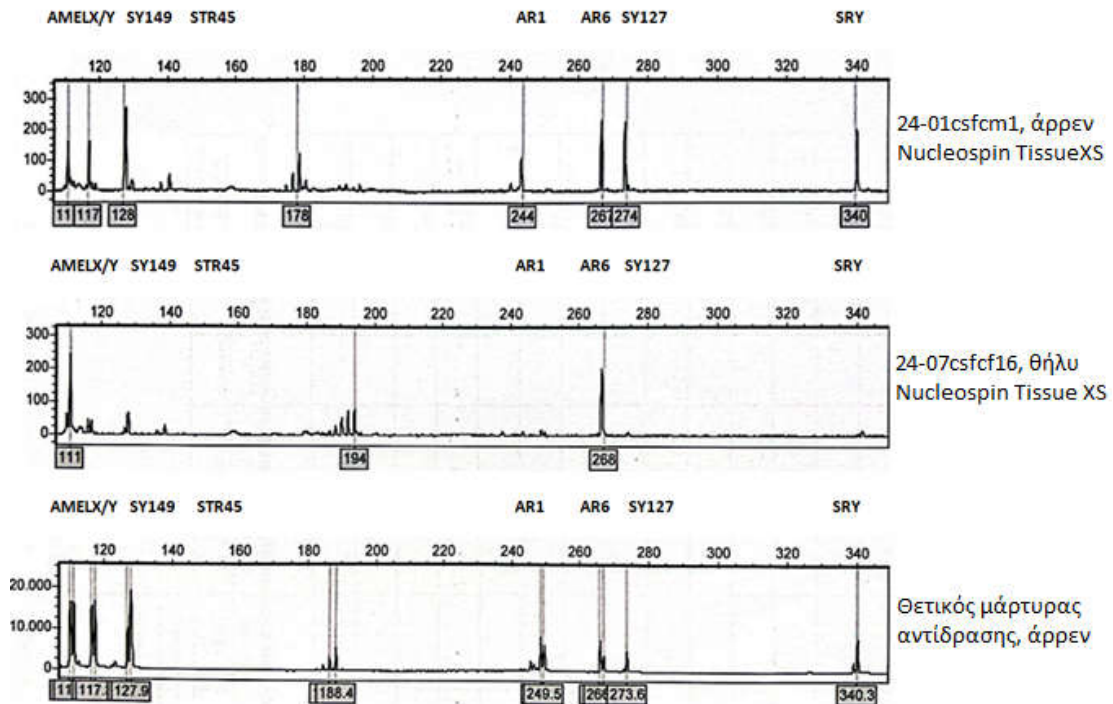
Πίνακας 19. Αναμενόμενα μεγέθη προϊόντων πολλαπλασιασμού φυλετικών χρωμοσωμάτων.

| Στόχος                         | Μέγεθος προϊόντος |
|--------------------------------|-------------------|
| AmelX/Y (Χρ22.31-p22/ Υρ11. 2) | 112/118 bp        |
| SY 149 (Υq11)                  | 128bp             |
| STR 45 (Χρ21.2-p21.1)          | 150 bp            |
| AR 1 (Χq11.2)                  | 250 bp            |

|               |        |
|---------------|--------|
| AR 6 (Xq11.2) | 269 bp |
| SY 127 (Yq11) | 275 bp |
| SRY (Yp11.2)  | 340 bp |



Εικόνα 13. Προϊόντα πολλαπλασιασμού AMELX/Y, STRs SMN1 STRs HBB όπως ανιχνεύονται μετά από ηλεκτροφόρηση σε αυτόματο αναλυτή (ABI3500). Στα δείγματα ENY παρατηρήθηκε αποτυχία πολλαπλασιασμού αλληλουχιών AMELX/Y.



Εικόνα 14. Προϊόντα από πολλαπλασιασμό τμημάτων φυλετικών χρωμοσωμάτων όπως ανιχνεύονται μετά από ηλεκτροφόρηση σε αυτόματο αναλυτή (ABI3500). Στο δείγμα 24-07csf16 παρατηρήθηκε αποτυχία πολλαπλασιασμού περιοχής AR1.

#### 4.3. Έλεγχος συσχέτισης ικανότητας πολλαπλασιασμού και μεγέθους προϊόντων.

Από την πρώτη αντίδραση φάνηκε πως δείγματα DNA απομονωμένα και με τα δύο πρωτόκολλα είναι ικανά να αποδώσουν προϊόντα πολλαπλασιασμού τόσο σε singleplex όσο και multiplex αντιδράσεις. Σε επόμενο στάδιο θελήσαμε να ελέγξουμε αν το μέγεθος του παραγόμενου προϊόντος επηρεάζει την επιτυχία της αντίδρασης. Επιλέχθηκαν στόχοι διαφορετικών μεγεθών και ποικίλου βαθμού δυσκολίας πολλαπλασιασμού, για τους οποίους υπήρχε σχεδιασμένο πρωτόκολλο από το Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής : NSD1 εξόνιο 18 (395bp), CAPN3 εξόνιο 4 (130bp), SCN1A εξόνιο 22 (220bp). Τα προϊόντα πολλαπλασιασμού των αντιδράσεων αυτών ανιχνεύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Ορισμένα προϊόντα πολλαπλασιασμού του γονιδίου NSD1 και όλα τα προϊόντα πολλαπλασιασμού του γονιδίου CAPN3 υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση κατά Sanger.

#### PCR NSD1 εξόνιο 18 και αλληλούχηση κατά Sanger

Στην αντίδραση έγινε πολλαπλασιασμός του εξονίου 18 του γονιδίου NSD1. Το μέγεθος που προϊόντος πολλαπλασιασμού είναι 395 bp. Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Ως μάρτυρας μεγέθους των προϊόντων

χρησιμοποιήθηκε DNA φάγου ρhix174/HaeIII. Έπειτα ακολούθησε αλληλούχηση κατά Sanger για να επιβεβαιωθεί η σωστή αλληλουχία προϊόντος. Τα 6 δείγματα DNA και μετέπειτα εκλούσεις τους που υποβλήθηκαν στην αντίδραση ήταν τα εξής:

24-02csf3, 24-02csf3 (2η έκδοση), Nucleospin Tissue XS

24-04csf8, 24-04csf8 (2η έκδοση), Nucleospin Tissue XS

24-02csf4, 24-02csf4 (2η έκδοση), 24-02csf4 (3η έκδοση), 24-02csf4 (4η έκδοση), Qiagen

24-04csf9, 24-04csf9 (2η έκδοση), 24-04csf9 (3η έκδοση), 24-04csf9 (4η έκδοση), Qiagen

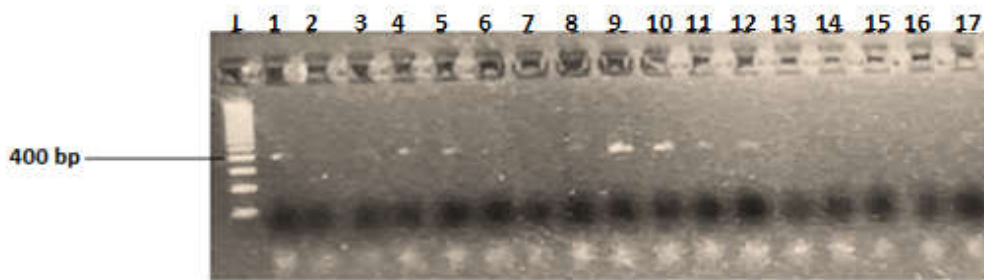
24-01csf1, 24-01csf1 (2η έκδοση), Nucleospin

24-07csf16, 24-07csf16 (2η έκδοση), Nucleospin

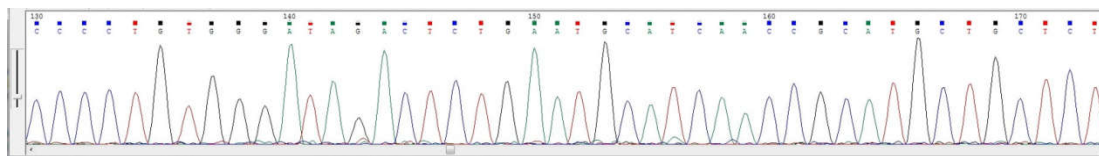
Ορατές ζώνες προϊόντος αναμενόμενου μεγέθους απέδωσαν 4 από τα 6 διαφορετικά δείγματα. Από τις ζώνες αυτές άλλες ήταν πιο ευκρινείς, ενώ άλλες ήταν ασθενέστερης έντασης. Ορισμένες εκλούσεις των δειγμάτων απέδωσαν εξίσου ορατή ζώνη προϊόντος. Εν συνεχεία το κάθε δείγμα υποβλήθηκε σε αντίδραση αλληλούχησης κατά Sanger. Τα 5 από τα 6 δείγματα απέδωσαν προϊόντα αλληλούχησης. Τα αποτελέσματα για κάθε δείγμα παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 11. Μόνο το δείγμα 24-07csf16 απέτυχε να αποδώσει προϊόν πολλαπλασιασμού και αλληλούχησης. Το δείγμα 24-01csf1 απέδωσε προϊόν το οποίο δεν ήταν ανιχνεύσιμο στο πήκτωμα αγαρόζης, αλλά επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του από την αντίδραση αλληλούχησης.

Πίνακας 20. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης και αλληλούχησης προϊόντος PCR NSD1 εξόνιο 18.

| Δείγμα/kit                      | Προϊόν πολλαπλασιασμού στην ηλεκτροφόρηση PCR | Αντίδραση sequencing |
|---------------------------------|---|----------------------|
| 24-02csf3 Nucleospin Tissue XS  | Αχνό  | +                    |
| 24-04csf8 Nucleospin Tissue XS  | Αχνό  | +                    |
| 24-02csf4 Qiagen Mini Blood     | Αχνό  | +                    |
| 24-04csf9 Qiagen Mini Blood     | Έντονο  | +                    |
| 24-01csf1 Nucleospin Tissue XS  | Μη ορατό                                      | +                    |
| 24-07csf16 Nucleospin Tissue XS | Μη ορατό                                      | Κακής ποιότητας      |



Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πολλαπλασιασμού εξονίου 18/ NSD1. Δείγματα κατά σειρά: Ladder, 1: 24-02csfcf3, 2: 24-02csfcf3(2η έκλουση), 3: 24-04csfcf8, 4: 24-04csfcf8(2η έκλουση), 5: 24-02csfcf4, 6: 24-02csfcf4(2η έκλουση), 7: 24-02csfcf4(3η έκλουση), 8: 24-02csfcf4(4η έκλουση), 9: 24-04csfcf9, 10: 24-04csfcf9(2η έκλουση), 11: 24-04csfcf9(3η έκλουση), 12: 24-04csfcf9(4η έκλουση), 13: 24-01csfcm1, 14: 24-01csfcm1(2η έκλουση), 15: 24-07csfcf16, 16: 24-07csfcf16(2η έκλουση), 17: Αρνητικός μάρτυρας αντίδρασης.



Homo sapiens nuclear receptor binding SET domain protein 1 (NSD1), RefSeqGene (LRG\_512) on chromosome 5  
Sequence ID: [gij223972671|NG\\_009821.1](#) Length: 174135 Number of Matches: 1

| Score                     | Expect  | Identities  | Gaps       | Strand         |
|---------------------------|---------|---|------------|----------------|
| 622 bits(689)             | 6e-173  | 348/351(99%)  | 0/351(0%)  | Plus/Plus      |
| Range 1: 152459 to 152809 | GenBank | Graphics  | Next Match | Previous Match |
| CDS: Putative 1           | 1       | V N R P I G R V Q I F                                       |            |                |
| Query                     | 16      | TGCGRGGTACTTTGTGTTACTTTTCCAGGTAACCGTCTATTGGCAGGGTACAGATCTT  | 75         |                |
| Sbjct                     | 152459  | .....GT.....  | 152518     |                |
| CDS:histone-lysine N      | 1875    | V N R P I G R V Q I F                                       |            |                |
| CDS: Putative 1           | 12      | T A D L S E I P R C N C K A T D E N P C                     |            |                |
| Query                     | 76      | CACAGCAGACTTATCTGAAATACCCGTTGCAACTGTAAAGCTACTGATGAGAACCCTG  | 135        |                |
| Sbjct                     | 152519  | ...T.....   | 152578     |                |
| CDS:histone-lysine N      | 1886    | T A D L S E I P R C N C K A T D E N P C                     |            |                |
| CDS: Putative 1           | 32      | G I D S E C I N R M L L Y E C H P T V C                     |            |                |
| Query                     | 136     | TGGGATAGACTCTGAATGCATCAACCCGATGCTGCTCTATGAGTGCCACCCACAGTGTG | 195        |                |
| Sbjct                     | 152579  | .....   | 152638     |                |
| CDS:histone-lysine N      | 1906    | G I D S E C I N R M L L Y E C H P T V C                     |            |                |
| CDS: Putative 1           | 52      | P A G G R C Q N Q C F S K R Q Y P E V E                     |            |                |
| Query                     | 196     | TCCTGCCGAGGGCGCTGTCAAACAGTCTTTTCCAAGCGCCAATATCCAGAGTTGA     | 255        |                |
| Sbjct                     | 152639  | .....   | 152698     |                |
| CDS:histone-lysine N      | 1926    | P A G G R C Q N Q C F S K R Q Y P E V E                     |            |                |
| CDS: Putative 1           | 72      | I F R T L Q R G W G L R T K T D I K K                       |            |                |
| Query                     | 256     | AATTTTCCGCACATTACAGCGGGTTGGGGTCTACGGACAAAACAGATATTA AAAAGGT | 315        |                |
| Sbjct                     | 152699  | .....   | 152758     |                |
| CDS:histone-lysine N      | 1946    | I F R T L Q R G W G L R T K T D I K K                       |            |                |
| Query                     | 316     | TAGAAAAAGCTAAATTACCATATACTTTCTCTCTTTGCAGTTGCTTGATA          | 366        |                |
| Sbjct                     | 152759  | .....   | 152809     |                |
| CDS:histone-lysine N      |         |   |            |                |

Εικόνα 16a. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφορήματος αλληλούχησης εξονίου 18/NSD1.  
b. Ενδεικτική εικόνα στοίχισης αλληλουχίας με γονιδίωμα αναφοράς.

### PCR CAPN3 εξόνιο 4 και αλληλούχηση κατά Sanger

Στην αντίδραση έγινε πολλαπλασιασμός του εξονίου 4 του γονιδίου CAPN3. Το μέγεθος του προϊόντος πολλαπλασιασμού είναι 130 bp. Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Ως μάρτυρας μεγέθους των προϊόντων

χρησιμοποιήθηκε DNA φάγου ρhix174/HaeIII. Τα 4 δείγματα DNA που υποβλήθηκαν στην αντίδραση απομονώθηκαν από 200μl ENY ήταν τα εξής :

24-02csf7, Qiagen

24-04csf10, Qiagen

24-01csf2, Qiagen

24-03csf5, Qiagen

Κανένα δείγμα δεν απέδωσε ορατό προϊόν πολλαπλασιασμού στην ηλεκτροφόρηση, εκτός του θετικού μάρτυρα της αντίδρασης. Ακολούθησε αντίδραση αλληλούχησης για να εξακριβωθεί αν το προϊόν πράγματι απουσιάζει ή δεν ανιχνεύεται εξαιτίας της χαμηλότερης συγκέντρωσης DNA του δείγματος και της χαμηλότερης διακριτικής ικανότητας του πηκτώματος αγαρόζης. Κανένα δείγμα δεν απέδωσε προϊόν αλληλούχησης.

### PCR SCN1A εξόνιο 22

Στην αντίδραση έγινε πολλαπλασιασμός του εξονίου 22 του γονιδίου SCN1A. Το μέγεθος του προϊόντος πολλαπλασιασμού είναι 220 bp. Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Ως μάρτυρας μεγέθους των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε DNA φάγου ρhix174/HaeIII. Τα 10 δείγματα DNA ολικού ENY και 200 μl που υποβλήθηκαν στην αντίδραση ήταν τα εξής:

24-01csf1, Nucleospin Tissue XS

24-02csf3, Nucleospin Tissue XS

24-04csf8, Nucleospin Tissue XS

24-04csf16, Nucleospin Tissue XS

24-06csf13, Nucleospin Tissue XS

24-01csf2 (200μL), Qiagen

24-01csf2 (200μl), Nucleospin Tissue XS

24-04csf10 (200μL), Qiagen

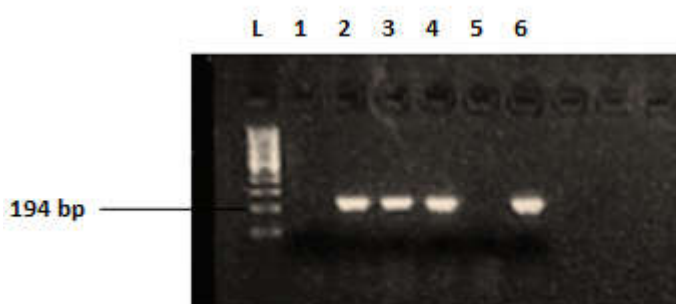
24-02csf36 (200μl), Nucleospin Tissue XS

24-03csf5 (200μL), Qiagen

Κανένα δείγμα δεν απέδωσε ορατό προϊόν πολλαπλασιασμού στην ηλεκτροφόρηση, εκτός του θετικού μάρτυρα της αντίδρασης. Ακολούθησε δεύτερη PCR (*nested*), με μήτρα το προϊόν της πρώτης, προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα προϊόντα πράγματι απουσίαζαν από την πρώτη αντίδραση ή δεν ανιχνεύονταν λόγω πολύ μικρής συγκέντρωσης. Τα δείγματα DNA που υποβλήθηκαν στην αντίδραση ήταν ολικού ENY και 200μl ENY. Όλα απέδωσαν προϊόν πολλαπλασιασμού αναμενόμενου μεγέθους στην ηλεκτροφόρηση της *nested* PCR. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο πίνακα 12 . Από τα 10 δείγματα που υποβλήθηκαν, όλα πλην του δείγματος δεύτερης έκλουσης 24-01csf2 απέδωσαν προϊόντα πολλαπλασιασμού.

Πίνακας 21. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης nested PCR SCN1A εξόνιο 22.

| Δείγμα/kit                              | Προϊόν πολλαπλασιασμού μετά από <i>nested</i> PCR |
|---|---|
| <b>Ολικός όγκος δείγματος</b>           |   |
| 24-01csfcm1 (Nucleospin Tissue XS)      | Αχνό  |
| 24-02csf3 (Nucleospin Tissue XS)        | Αχνό  |
| 24-04csf8 (Nucleospin Tissue XS)        | Έντονο  |
| 24-04csf16 (Nucleospin Tissue XS)       | Έντονο  |
| 24-06csf13 (Nucleospin Tissue XS)       | Αχνό  |
| <b>200 μl όγκος δείγματος</b>           |   |
| 24-01csfcm2 200μl (Qiagen)              | Έντονο  |
| 24-01csfcm2 200μl (Nucleospin TissueXS) | Έντονο  |
| 24-04csf10 200μl (Qiagen)               | Έντονο  |
| 24-02csf36 200μl (Nucleospin TissueXS)  | Έντονο  |
| 24-03csfcm5 200μl (Qiagen)              | Έντονο  |

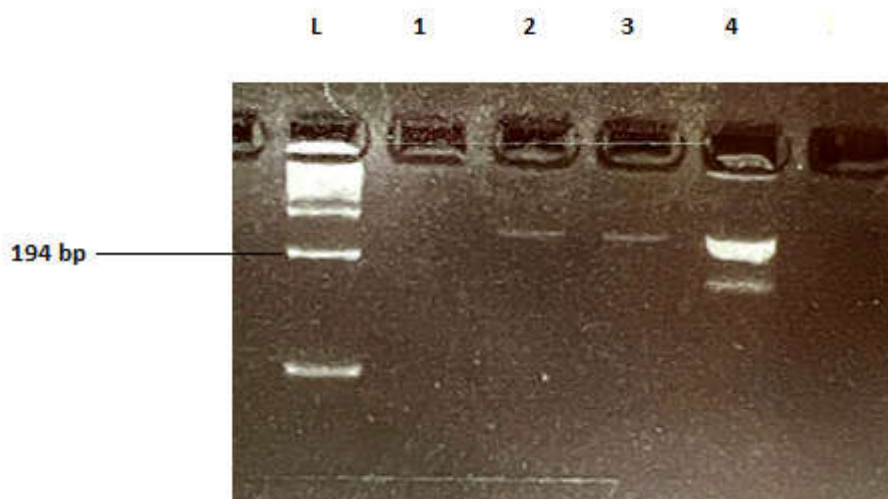


Εικόνα 17. Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης *nested* PCR SCN1A εξόνιο 22. Δείγματα απομόνωσης από 200μl ENY κατά σειρά: Ladder, 1: αρνητικός μάρτυρας αντίδρασης, 2: 24-04csf10 Qiagen, 3: 24-01csfcm2 Qiagen, 4: 24-01csfcm2 Nucleospin, 5: 24-01csfcm2 Nucleospin 2η έκδοση, 6: θετικός μάρτυρας αντίδρασης.

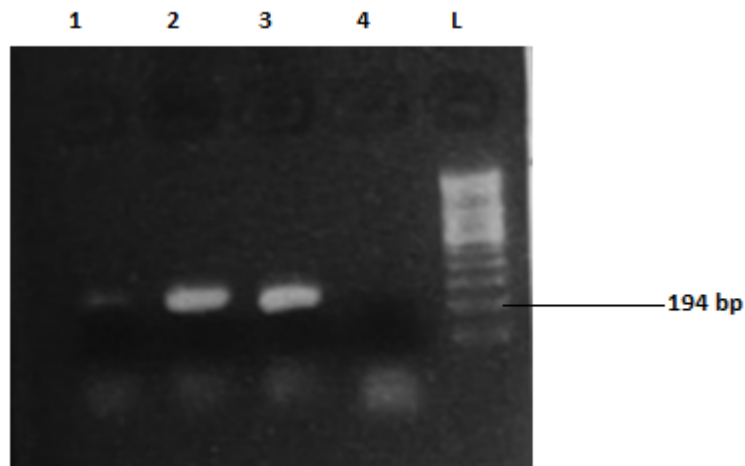
#### 4.4. Ενίσχυση ολικού γονιδιώματος (*Whole Genome Amplification*).

Προκειμένου να εξετασθεί η πιθανότητα να οφείλονται στην χαμηλή συγκέντρωση DNA των δειγμάτων ENY τα αμφιλεγόμενα αποτελέσματα σε διαδοχικές αντιδράσεις PCR, πραγματοποιήθηκε αντίδραση Whole Genome Amplification.

Το δείγμα 24-06csf13 δεύτερης έκλουσης (4,5 ng/μl) υποβλήθηκε σε αντίδραση Whole Genome Amplification (WGA). Εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσης DNA που υπάρχει μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το υλικό αραιώθηκε διαδοχικά σε τελικές αραιώσεις 1:100 και 1:200. Έπειτα υποβλήθηκε στην ίδια αντίδραση PCR SCN1A εξόνιο 22, προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της αντίδρασης WGA. Στην ηλεκτροφόρηση της πρώτης αντίδρασης PCR τα προϊόντα ήταν ελάχιστα εμφανή, εκτός του θετικού μάρτυρα της αντίδρασης, οπότε ακολούθησε *nested* PCR. Η αντίδραση WGA ήταν επιτυχής και αποκαλύφθηκε πως η μεγαλύτερη αραιώση (1:200) είχε εντονότερη ζώνη προϊόντος στην *nested* PCR, άρα και αποδοτικότερη αντίδραση σε σχέση με την μεγαλύτερη συγκέντρωση 1:100.



Εικόνα 18. PCR SCN1A εξόνιο 22. Δείγματα κατά σειρά: Ladder, 1: αρνητικός μάρτυρας αντίδρασης, 2: WGA 24-06csf13 1:100, 3: WGA 24-06csf13 1:200, 4: Θετικός μάρτυρας αντίδρασης.



Εικόνα 19. Nested PCR SCN1A εξόνιο 22. Δείγματα κατά σειρά: 1: WGA 24-06csf13 1:100, 2: WGA 24-06csf13 1:200, 3: Θετικός μάρτυρας αντίδρασης, 4: Αρνητικός μάρτυρας αντίδρασης, Ladder.

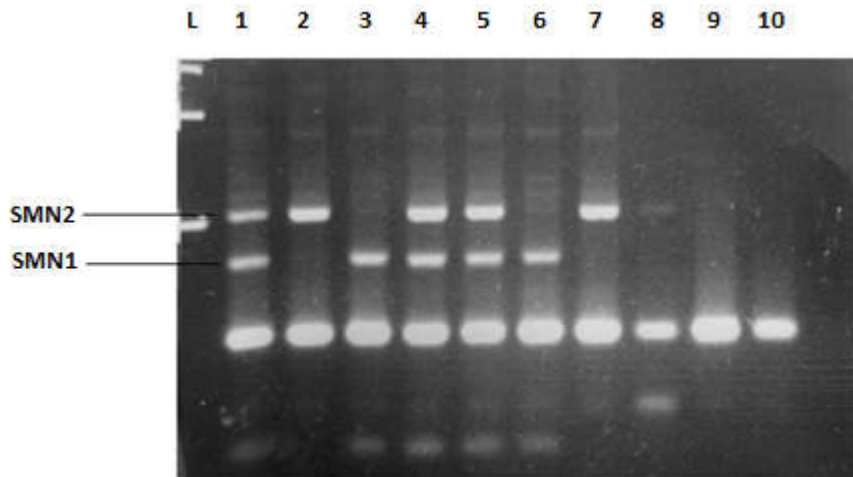
#### 4.5. Επιβεβαίωση της διάγνωσης Νωτιαίας Μυϊκής Ατροφίας από δείγματα ENY των ασθενών.

Στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής πραγματοποιείται μέθοδος ανάλυσης πολυμορφισμών με διαφορετικά μήκη θραυσμάτων, έπειτα από επώαση με περιοριστική ενδονουκλεάση (Restriction Fragment Length Polymorphism- RFLPs) για την ανίχνευση ελλείμματος στο εξόνιο 7 ή/και 8. Η αντίδραση χρησιμοποιείται ως μέθοδος ταχείας ανάλυσης για την άμεση διάγνωση ομόζυγου ελλείμματος σε βρέφη και διενεργείται άμεσα από το ΕΙΓ. Στηρίζεται στον πολλαπλασιασμό των εξονίων 7 και 8 των ομόλογων γονιδίων SMN1 και SMN2, έπειτα ακολουθεί πέψη των προϊόντων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, επιτρέποντας τον χαρακτηρισμό της προέλευσης του κάθε εξονίου και κατά συνέπεια την ανίχνευση ελλείμματος.

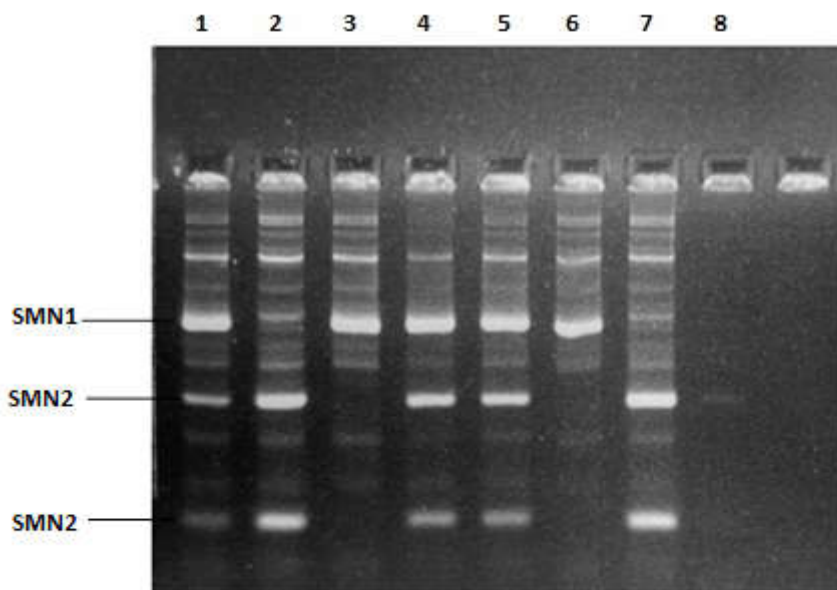
#### Μελέτη για αναγνώριση βλάβης συνδεόμενη με SMA (RFLPs)

Η αντίδραση εφαρμόστηκε σε ένα μόνο δείγμα ENY (24-04csf13, Qiagen) παράλληλα με δείγματα προς διερεύνηση.

Ως μάρτυρας μεγέθους των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε DNA ρhix174/HaeIII και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα LE (Low Melting): Αγαρόζη 3:1. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων πέψης των δύο εξονίων παρουσιάζονται στις εικόνες 28 και 29. Παρά τα χαμηλά ποιοτικά χαρακτηριστικά του δείγματος η παρουσία του ελλείμματος κατέστη ορατή και χωρίς να είναι αναγκαία η πραγματοποίηση *nested* PCR για να ενισχυθεί η ζώνη προϊόντος στο πήκτωμα.



Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης της αντίδρασης PCR SMN1/2 εξόνιο 7. Δείγματα κατά σειρά: Ladder, 1-6: δείγματα προς διερεύνηση(2: ομόζυγο έλλειμμα εξονίου 7 γονιδίου SMN1, 3 και 6: ομόζυγο έλλειμμα εξονίου 7 γονιδίου SMN2), 7: Θετικός μάρτυρας, 8: 24-04csf9 (επιβεβαίωση ελλείμματος), 9-10: αρνητικός μάρτυρας.

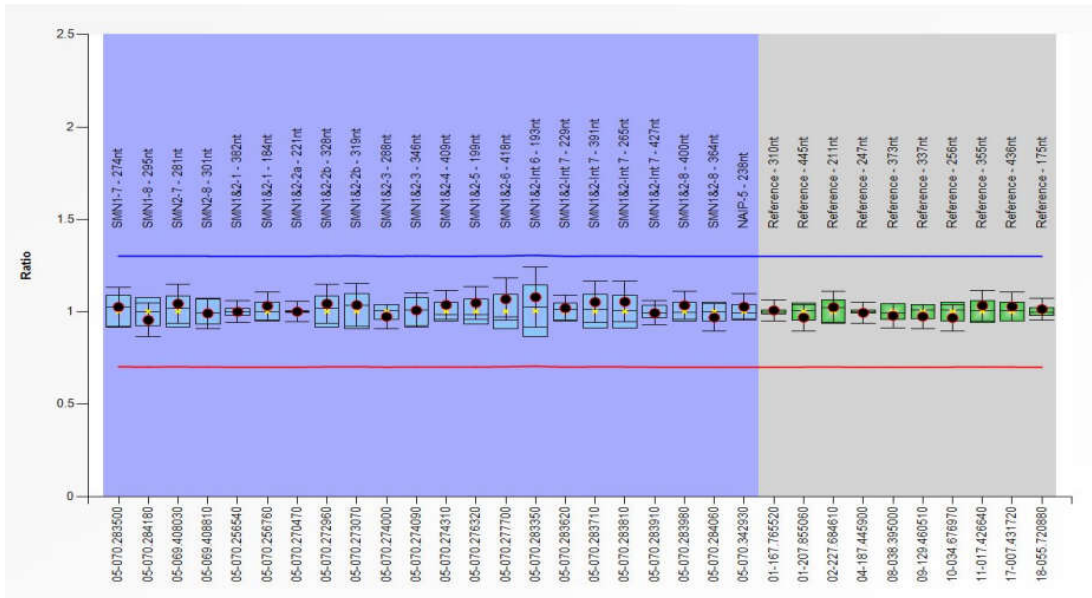


Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης της αντίδρασης PCR SMN1/2 εξόνιο 8. Δείγματα κατά σειρά: 1-6: δείγματα προς διερεύνηση (2: ομόζυγο έλλειμμα εξόνιο 8 γονιδίου SMN1, 3 και 6: ομόζυγο έλλειμμα εξονίου 8 γονιδίου SMN2), 7: Θετικός μάρτυρας, 8: 24-04csf9 (επιβεβαίωση ελλείμματος).

## MLPA

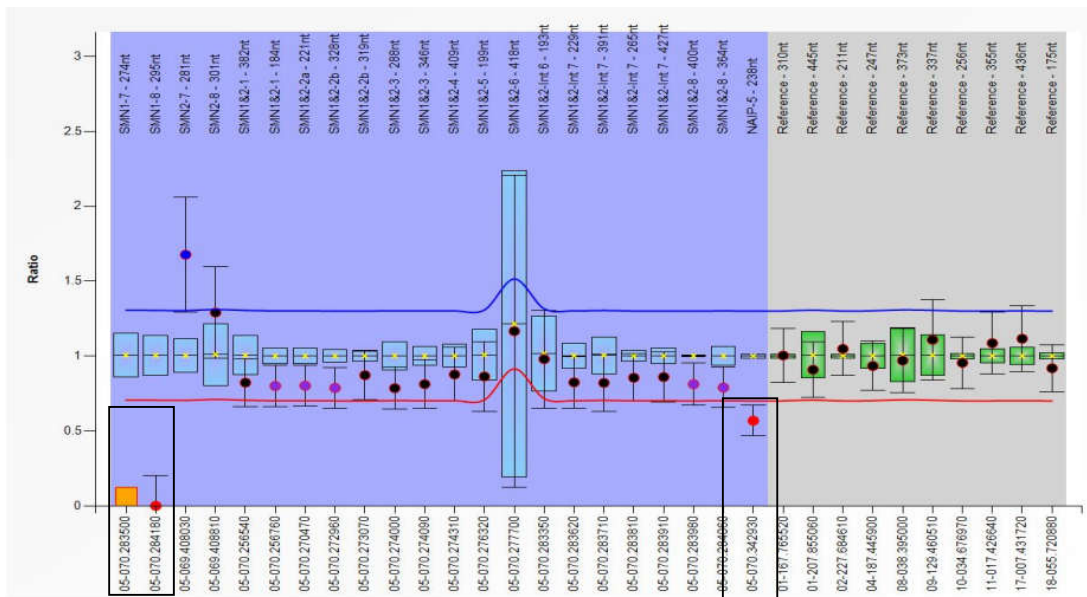
Οι αντιδράσεις MLPA είχαν στόχο τα ελλείμματα εξονίων 7 και 8 των γονιδίων SMN1/2. Ελέγχθηκαν τρία δείγματα 24-04csf9, 24-06csf9 (WGA) σε δύο αραιώσεις 1:10 και 1:50 λόγω του μεγάλου κόστους της αντίδρασης, αλλά κανένα δεν απέδωσε προϊόντα που να επιτρέπουν τον χαρακτηρισμό της περιοχής. Παρουσιάζονται ενδεικτικά αποτελέσματα από επιτυχή αντίδραση MLPA σε φυσιολογικό άτομο και ασθενή με έλλειμμα.

a



| D [nt]                                | Gene-Exon    | Chr.band | hg18 loc.     | Height      | Area         | Ratio       | Stdev       | [REF] | Width     | d[nt]       | [Mut details] |
|---------------------------------------|--------------|----------|---------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------|-----------|-------------|---------------|
| 274                                   | SMN1-7       | 05q13.2  | 05-070.283500 | 4367        | 20913        | 1.03        | 0.05        | =     | 50        | 0.06        | -             |
| 295                                   | SMN1-8       | 05q13.2  | 05-070.284180 | 3346        | 16196        | 0.95        | 0.05        | =     | 36        | 0.07        | -             |
| 281                                   | SMN2-7       | 05q13.2  | 05-069.408030 | 4462        | 20451        | 1.04        | 0.05        | =     | 42        | 0.05        | -             |
| 301                                   | SMN2-8       | 05q13.2  | 05-069.408810 | 6319        | 30678        | 0.99        | 0.04        | =     | 35        | 0.11        | -             |
| 382                                   | SMN1&2-1     | 05q13.2  | 05-070.256540 | 4733        | 24797        | 1           | 0.03        | =     | 57        | 0.00        | -             |
| 184                                   | SMN1&2-1a    | 05q13.2  | 05-070.256760 | 6029        | 25778        | 1.03        | 0.04        | =     | 48        | 0.03        | -             |
| 221                                   | SMN1&2-2a    | 05q13.2  | 05-070.270470 | 4939        | 22019        | 1           | 0.03        | =     | 55        | 0.04        | -             |
| 328                                   | SMN1&2-2b    | 05q13.2  | 05-070.272960 | 4371        | 21509        | 1.04        | 0.05        | =     | 45        | 0.07        | -             |
| 319                                   | SMN1&2-2b    | 05q13.2  | 05-070.273070 | 4958        | 23927        | 1.04        | 0.06        | =     | 35        | 0.05        | -             |
| 288                                   | SMN1&2-3     | 05q13.2  | 05-070.274000 | 5469        | 25512        | 0.97        | 0.03        | =     | 44        | 0.03        | -             |
| 346                                   | SMN1&2-3     | 05q13.2  | 05-070.274090 | 4787        | 23456        | 1.01        | 0.05        | =     | 35        | 0.05        | -             |
| 409                                   | SMN1&2-4     | 05q13.2  | 05-070.274310 | 4350        | 23607        | 1.04        | 0.04        | =     | 49        | 0.01        | -             |
| 199                                   | SMN1&2-5     | 05q13.2  | 05-070.276320 | 4349        | 18912        | 1.05        | 0.04        | =     | 32        | 0.00        | -             |
| 418                                   | SMN1&2-6     | 05q13.2  | 05-070.277700 | 2008        | 11189        | 1.07        | 0.06        | =     | 45        | 0.08        | -             |
| 193                                   | SMN1&2-int 6 | 05q13.2  | 05-070.283350 | 3371        | 14747        | 1.08        | 0.08        | =     | 49        | 0.01        | -             |
| 229                                   | SMN1&2-int 7 | 05q13.2  | 05-070.283620 | 4208        | 18955        | 1.02        | 0.04        | =     | 44        | 0.03        | -             |
| 391                                   | SMN1&2-int 7 | 05q13.2  | 05-070.283710 | 4215        | 24500        | 1.05        | 0.06        | =     | 66        | 0.04        | -             |
| 265                                   | SMN1&2-int 7 | 05q13.2  | 05-070.283810 | 4617        | 21786        | 1.05        | 0.05        | =     | 62        | 0.04        | -             |
| 427                                   | SMN1&2-int 7 | 05q13.2  | 05-070.283910 | 3530        | 19816        | 0.99        | 0.03        | =     | 49        | 0.06        | -             |
| 400                                   | SMN1&2-8     | 05q13.2  | 05-070.283980 | 4784        | 25582        | 1.03        | 0.04        | =     | 43        | 0.01        | -             |
| 364                                   | SMN1&2-8     | 05q13.2  | 05-070.284060 | 5256        | 27314        | 0.97        | 0.04        | =     | 41        | 0.02        | -             |
| 238                                   | NAIP-5       | 05q13.2  | 05-070.342930 | 4706        | 21368        | 1.03        | 0.04        | =     | 43        | 0.04        | -             |
| 310                                   | Reference    | 01q24.2  | 01-167.765520 | 4488        | 22073        | 1.01        | 0.03        | =     | 48        | 0.08        | -             |
| 445                                   | Reference    | 01q32.2  | 01-207.855060 | 4977        | 28724        | 0.97        | 0.04        | =     | 53        | 0.04        | -             |
| 211                                   | Reference    | 02q36.3  | 02-227.684610 | 5595        | 24630        | 1.02        | 0.04        | =     | 51        | 0.07        | -             |
| 247                                   | Reference    | 04q35.2  | 04-187.445900 | 5759        | 26099        | 0.99        | 0.03        | =     | 40        | 0.00        | -             |
| 373                                   | Reference    | 08p12    | 08-038.395000 | 5638        | 29169        | 0.98        | 0.03        | =     | 44        | 0.01        | -             |
| 337                                   | Reference    | 09q34.11 | 09-129.460510 | 3215        | 16077        | 0.97        | 0.03        | =     | 45        | 0.03        | -             |
| 256                                   | Reference    | 10p11.21 | 10-034.676970 | 5364        | 25090        | 0.97        | 0.04        | =     | 42        | 0.06        | -             |
| 355                                   | Reference    | 11p15.1  | 11-017.426640 | 3979        | 19931        | 1.03        | 0.04        | =     | 36        | 0.05        | -             |
| 436                                   | Reference    | 17p13.1  | 17-007.431720 | 3707        | 20546        | 1.03        | 0.04        | =     | 46        | 0.03        | -             |
| 175                                   | Reference    | 18q21.32 | 18-055.720880 | 5731        | 24708        | 1.01        | 0.03        | =     | 57        | 0.01        | -             |
| <b>Median value all probe values:</b> |              |          |               | <b>4662</b> | <b>22764</b> | <b>1.02</b> | <b>0.04</b> |       | <b>45</b> | <b>0.04</b> |               |

b



| D [nt]                                | Gene-Exon    | Chr.band | hg18 loc.     | Height      | Area         | Ratio       | Stdev       | [REF] | Width     | d[nt]       | [Mut details] |
|---------------------------------------|--------------|----------|---------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------|-----------|-------------|---------------|
| 274                                   | SMN1-7       | 05q13.2  | 05-070.283500 | 455         | 2176         | 0%          | 17          | <<*   | 17        | 0.00        | -             |
| 295                                   | SMN1-8       | 05q13.2  | 05-070.284180 | 0           | 0            | 0           | 0           | <<*   | 0         | 0.00        | -             |
| 281                                   | SMN2-7       | 05q13.2  | 05-069.408030 | 11847       | 54081        | 1.68        | 0.19        | >>*   | 26        | 0.02        | -             |
| 301                                   | SMN2-8       | 05q13.2  | 05-069.408810 | 14278       | 68915        | 1.29        | 0.15        | =     | 44        | 0.09        | -             |
| 382                                   | SMN1&2-1     | 05q13.2  | 05-070.256540 | 6812        | 44446        | 0.82        | 0.08        | =     | 44        | 0.10        | -             |
| 184                                   | SMN1&2-1     | 05q13.2  | 05-070.256760 | 7657        | 32366        | 0.8         | 0.07        | <<    | 29        | 0.04        | -             |
| 221                                   | SMN1&2-2a    | 05q13.2  | 05-070.270470 | 6557        | 27515        | 0.8         | 0.07        | <<    | 16        | 0.00        | -             |
| 328                                   | SMN1&2-2b    | 05q13.2  | 05-070.272960 | 6750        | 32659        | 0.79        | 0.07        | <<    | 27        | 0.01        | -             |
| 319                                   | SMN1&2-2b    | 05q13.2  | 05-070.273070 | 7659        | 42945        | 0.87        | 0.08        | =     | 37        | 0.06        | -             |
| 288                                   | SMN1&2-3     | 05q13.2  | 05-070.274000 | 7024        | 33997        | 0.79        | 0.07        | =     | 23        | 0.04        | -             |
| 346                                   | SMN1&2-3     | 05q13.2  | 05-070.274090 | 6491        | 31766        | 0.81        | 0.08        | =     | 15        | 0.07        | -             |
| 409                                   | SMN1&2-4     | 05q13.2  | 05-070.274310 | 6749        | 34681        | 0.88        | 0.09        | =     | 27        | 0.03        | -             |
| 199                                   | SMN1&2-5     | 05q13.2  | 05-070.276320 | 5921        | 38670        | 0.86        | 0.12        | =     | 31        | 0.01        | -             |
| 418                                   | SMN1&2-6     | 05q13.2  | 05-070.277700 | 2704        | 14310        | 1.17        | 0.52        | =     | 24        | 0.06        | -             |
| 193                                   | SMN1&2-int 6 | 05q13.2  | 05-070.283350 | 4800        | 32750        | 0.98        | 0.16        | =     | 38        | 0.02        | -             |
| 229                                   | SMN1&2-int 7 | 05q13.2  | 05-070.283620 | 5540        | 24588        | 0.82        | 0.09        | =     | 24        | 0.02        | -             |
| 391                                   | SMN1&2-int 7 | 05q13.2  | 05-070.283710 | 6028        | 38190        | 0.82        | 0.1         | =     | 55        | 0.06        | -             |
| 265                                   | SMN1&2-int 7 | 05q13.2  | 05-070.283810 | 6299        | 28256        | 0.85        | 0.08        | =     | 25        | 0.01        | -             |
| 427                                   | SMN1&2-int 7 | 05q13.2  | 05-070.283910 | 5792        | 31907        | 0.86        | 0.08        | =     | 29        | 0.00        | -             |
| 400                                   | SMN1&2-8     | 05q13.2  | 05-070.283980 | 6842        | 35788        | 0.81        | 0.07        | <<    | 33        | 0.07        | -             |
| 364                                   | SMN1&2-8     | 05q13.2  | 05-070.284060 | 7529        | 44867        | 0.79        | 0.07        | <<    | 41        | 0.05        | -             |
| 238                                   | NAIP-5       | 05q13.2  | 05-070.342930 | 4467        | 19562        | 0.57        | 0.05        | <<*   | 28        | 0.00        | -             |
| 310                                   | Reference    | 01q24.2  | 01-167.765520 | 7941        | 37496        | 1           | 0.09        | =     | 31        | 0.06        | -             |
| 445                                   | Reference    | 01q32.2  | 01-207.855060 | 8873        | 55110        | 0.91        | 0.09        | =     | 49        | 0.05        | -             |
| 211                                   | Reference    | 02q36.3  | 02-227.684610 | 9524        | 41909        | 1.05        | 0.09        | =     | 21        | 0.01        | -             |
| 247                                   | Reference    | 04q35.2  | 04-187.445900 | 9175        | 55486        | 0.93        | 0.08        | =     | 49        | 0.11        | -             |
| 373                                   | Reference    | 08p12    | 08-038.395000 | 10344       | 53442        | 0.97        | 0.11        | =     | 37        | 0.03        | -             |
| 337                                   | Reference    | 09q34.11 | 09-129.460510 | 6006        | 29341        | 1.11        | 0.14        | =     | 32        | 0.01        | -             |
| 256                                   | Reference    | 10p11.21 | 10-034.676970 | 8712        | 38792        | 0.95        | 0.09        | =     | 17        | 0.06        | -             |
| 355                                   | Reference    | 11p15.1  | 11-017.426640 | 7247        | 35358        | 1.09        | 0.1         | =     | 34        | 0.01        | -             |
| 436                                   | Reference    | 17p13.1  | 17-007.431720 | 7375        | 45735        | 1.12        | 0.11        | =     | 46        | 0.05        | -             |
| 175                                   | Reference    | 18q21.32 | 18-055.720880 | 9019        | 38833        | 0.92        | 0.08        | =     | 22        | 0.10        | -             |
| <b>Median value all probe values:</b> |              |          |               | <b>6842</b> | <b>35788</b> | <b>0.87</b> | <b>0.09</b> |       | <b>29</b> | <b>0.04</b> |               |

Εικόνα 22 α. MLPA SMA ανάλυση φυσιολογικού ατόμου. β. MLPA SMA ασθενή. Παρατηρείται έλλειμμα (εντός τετραγώνων των εξονίων 7 και 8 του γονιδίου SMN1 σε ομοζυγωτία (ratio 0) και του εξονίου 5 του γονιδίου NAIP σε ετεροζυγωτία (ratio 0.5).

#### 4.6. Μελέτη προτύπου μεθυλίωσης DNA.

Δεδομένου ότι ορισμένα νοσήματα οφείλονται σε επιγενετικές αλλοιώσεις που επηρεάζουν την μεθυλίωση του DNA, θελήσαμε να ελέγξουμε τη δυναμική και διαγνωστική απόδοση απομονωμένου υλικού δειγμάτων ENY και για μελέτη προτύπου μεθυλίωσης. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις που εφαρμόζονται στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής:

- Μελέτη προτύπου μεθυλίωσης του Χ χρωμοσώματος (Αντίδραση HUMARA).

- Χημική τροποποίηση DNA με διθειώδες νάτριο και μελέτη γονιδιακά αποτυπωμένων γενετικών περιοχών.
- Methylation Specific MLPA

Μελέτη προτύπου μεθυλίωσης του X χρωμοσώματος (Human Androgen Receptor Assay/HUMARA)

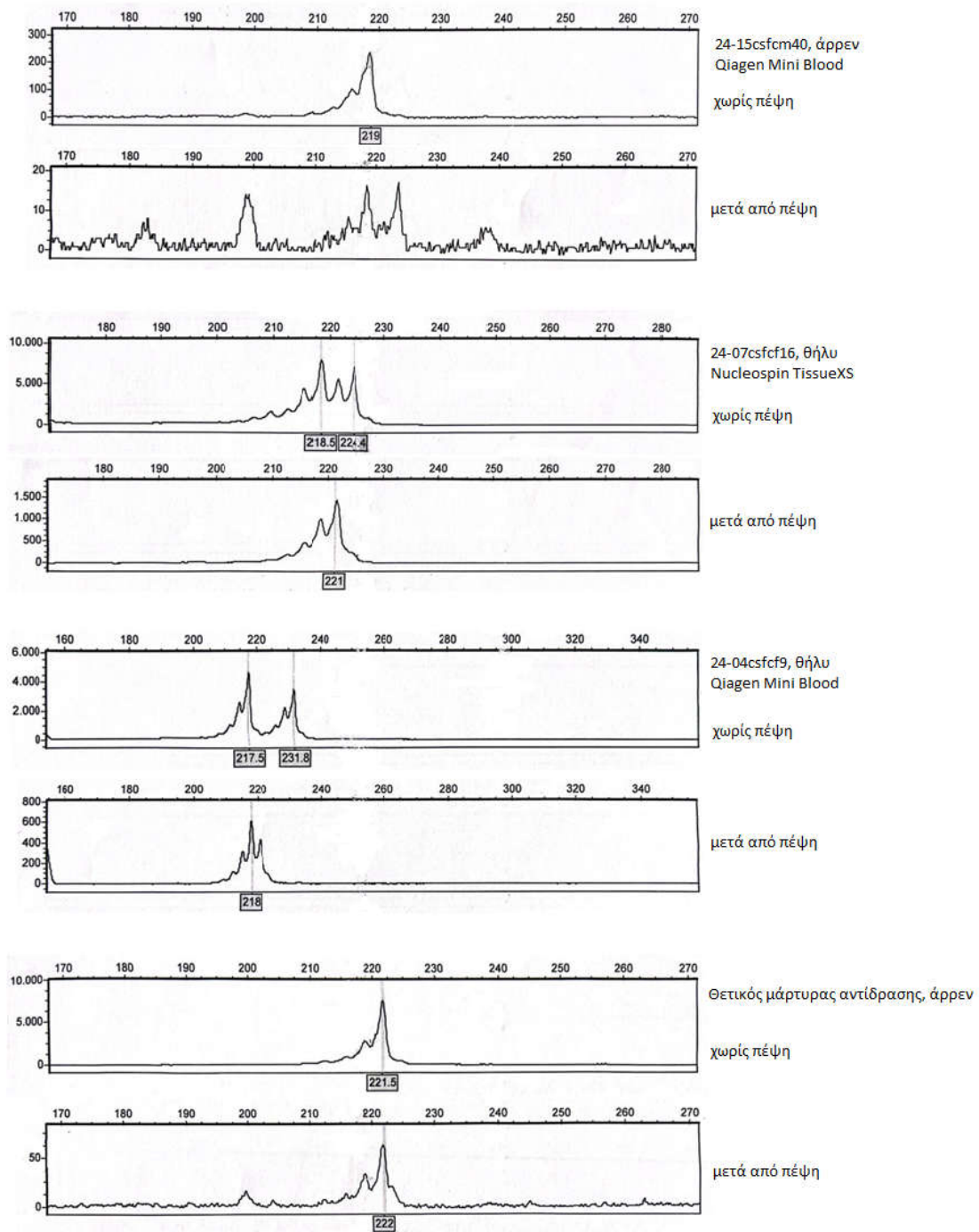
Η αντίδραση HUMARA περιλαμβάνει ένα πρώτο στάδιο επώασης με ειδική για μεθυλίωση περιοριστική ενδονουκλεάση HhaI ακολουθούμενο από αντίδραση PCR για τον πολλαπλασιασμό της πολυμορφικής αλληλουχίας CAG του εξονίου 1 του γονιδίου AR και ηλεκτροφόρηση σε αυτόματο αναλυτή. Στην αντίδραση PCR για κάθε δείγμα πολλαπλασιάζεται και γενωμικό υλικό που δεν έχει υποστεί πέψη.

Τα δείγματα DNA που υποβλήθηκαν στην αντίδραση ήταν τα εξής:

24-15csfcm40, Qiagen  
 24-04csf9 (2η έκλουση), Qiagen  
 24-04csf4 (2η έκλουση), Qiagen  
 24-07csf16, Nucleospin Tissue XS  
 24-05csf35, Nucleospin Tissue XS  
 24-02csf36 (200μl), Nucleospin Tissue XS  
 24-02csf7 (200μl), Qiagen  
 24-04csf10 (200μl), Qiagen  
 24-03csf5 (200μl), Qiagen  
 24-01csf2 (200μl), Qiagen  
 24-06csf13 WGA  
 24-06csf13 genomic

Προϊόντα προερχόμενα από δείγματα ENY δεν ήταν ανιχνεύσιμα στην πρώτη αντίδραση σε αντίθεση με τα προϊόντα των δειγμάτων θετικών μαρτύρων. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε *nested* PCR, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Από τα 12 δείγματα DNA που υποβλήθηκαν στην αντίδραση, 3 απέδωσαν αναμενόμενα προϊόντα στις αντιδράσεις προ και μετά πέψης του DNA με την περιοριστική ενδονουκλεάση.



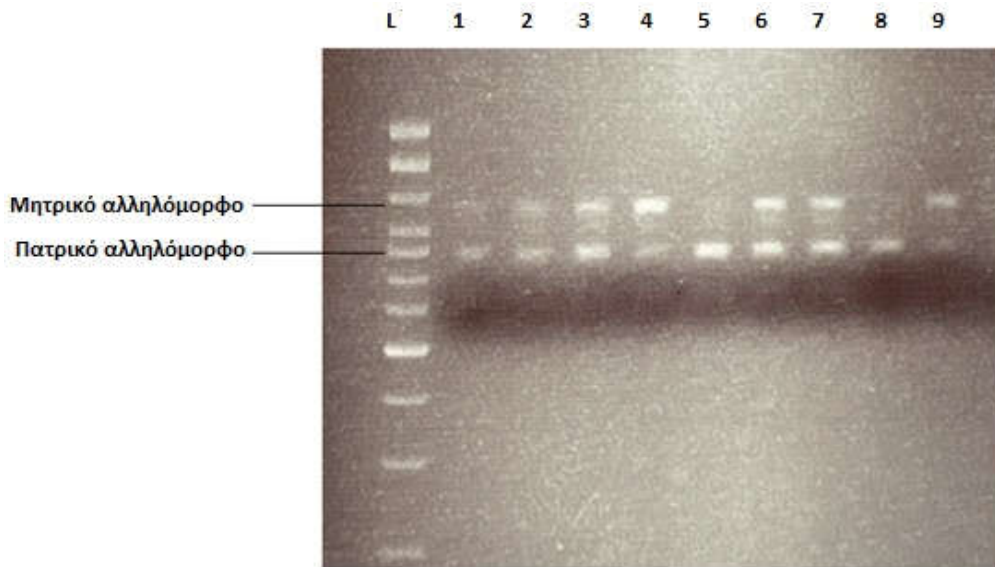
Εικόνα 23. Προϊόντα από πολλαπλασιασμό εξονίου 1 γονιδίου AR, όπως ανιχνεύονται μετά από ηλεκτροφόρηση σε αυτόματο αναλυτή (ABI3500). Η ύπαρξη ενός προϊόντος μετά την πέψη στα θήλεα, υποδεικνύει πιθανή επιλεκτική αδρανοποίηση του ενός αλληλομόρφου ή πιθανή ανικανότητα πολλαπλασιασμού του (Allele Drop Out, ADO). Στο θετικό μάρτυρα της αντίδρασης ανιχνεύεται προϊόν μετά την πέψη πολύ χαμηλότερης συγκέντρωσης συγκρινόμενα με την αντίδραση προ πέψης, για αυτό θεωρείται επιτυχής αντίδραση ελέγχου.

### Χημική τροποποίηση DNA με διθειώδες νάτριο και μελέτη γονιδιακά αποτυπωμένων γενετικών περιοχών

Με τη μέθοδο αυτή μελετάται το πρότυπο μεθυλίωσης αποτυπωμένων γενετικών περιοχών με χρήση διθειώδους νατρίου. Οι μη μεθυλιωμένες C μετατρέπονται σε ουρακίλες λόγω της χημικής τροποποίησης, ενώ οι μεθυλιωμένες C δε μεταβάλλονται. Η χημική τροποποίηση των δειγμάτων DNA πραγματοποιείται με χρήση εμπορικά διαθέσιμου kit EZ DNA Methylation (ZYMO Research). Η αλληλουχία στόχος που επιλέχθηκε ήταν το εξόνιο a του γονιδίου SNRPN. Το μητρικό αλληλόμορφο αυτού του γονιδίου είναι μεθυλιωμένο και ανενεργό, εν αντιθέσει με το πατρικής προέλευσης αλληλόμορφο που είναι μη μεθυλιωμένο και ενεργό. Η εν λόγω γενετική θέση σχετίζεται με τα σύνδρομα γονεϊκής αποτύπωσης Prader Willi/Angelman. Η διαφορά στην αλληλουχία του εκάστοτε αλληλόμορφου, εξαιτίας της χημικής τροποποίησης, επιτρέπει τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό τους σε μία αντίδραση, με χρήση ζευγών εκκινητών που υβριδοποιούν το κάθε αλληλόμορφο με ειδικό τρόπο και παράγουν προϊόντα διαφορετικού μεγέθους. Το μητρικό προϊόν πολλαπλασιασμού έχει μέγεθος 120 bp και το πατρικό προϊόν πολλαπλασιασμού 100 bp.

Εξαιτίας του υψηλού κόστους των αντιδραστηρίων καθώς και της ανάγκης χρήσης κατ' ελάχιστον 500 ng DNA για την πραγματοποίηση της χημικής τροποποίησης, μόνο το δείγμα 24-06csf13 (Nucleospin Tissue XS) υποβλήθηκε στην αντίδραση. Το συγκεκριμένο δείγμα απέδωσε την υψηλότερη συγκέντρωση DNA (34ng/μl) και περιείχε 340 ng DNA, ποσότητα σημαντικά μειωμένη σε σχέση με το προτεινόμενο. Στο φίλτρο έκλουσης του πρωτοκόλλου χημικής τροποποίησης ακολούθησε και πάλι προσθήκη επιπλέον 10 μl H<sub>2</sub>O και ακολούθησε 2η έκλουση. Εξαιτίας της χαμηλότερης ποσότητας DNA από το προτεινόμενο καθώς και της απώλειας προϊόντος που αναμένεται να υπάρχει, το χημικά τροποποιημένο προϊόν υπεβλήθη σε αντίδραση WGA.

Το δείγμα 2ης έκλουσης υποβλήθηκε στην αντίδραση παράλληλα με δείγματα προς διερεύνηση. Η αντίδραση ήταν επιτυχής και απέδωσε προϊόντα πολλαπλασιασμού και των δύο αλληλομόρφων.



Εικόνα 24. Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης Methylation Specific PCR που ακολουθείται για τον πολλαπλασιασμό του εξονίου α του γονιδίου SNRPN μετά από χημική τροποποίηση. Δείγματα κατά σειρά: L, 1: Χημικά τροποποιημένο 24-06csf13 2η έκλυση , 2-7: δείγματα DNA προς διερεύνηση, 8: μάρτυρας συνδρόμου Angelman, 9: μάρτυρας συνδρόμου Prader Willi

Το υλικό που προέκυψε από την αντίδραση Whole Genome Amplification υποβλήθηκε εκ νέου σε αντίδραση πολλαπλασιασμού του εξονίου α γονιδίου SNRPN και εν συνεχεία τα προϊόντα αλληλουχήθηκαν για να ελεγχθεί η επιτυχία της αντίδρασης WGA. Στην αντίδραση υποβλήθηκαν τα χημικά τροποποιημένα δείγματα 24-06csf13 WGA αραιωμένο διαδοχικά 1:200, φυσιολογικού ατόμου, ασθενούς Prader Willi κα ασθενούς Angelman. Τα προϊόντα της αντίδρασης πολλαπλασιασμού του μητρικού αλληλομόρφου ήταν όλα επιτυχή, ενώ τα προϊόντα πατρικού αλληλομόρφου δεν πολλαπλασιάστηκαν σε κανένα δείγμα. Στα προϊόντα της μητρικής αντίδρασης παρατηρήθηκαν οι αναμενόμενες τροποποιήσεις στην αλληλουχία βάσεων. Το μεθυλιωμένο μητρικό αλληλόμορφο έχει διατηρήσει τις C στις μεθυλιωμένες CpG νησίδες, εν αντιθέσει με τις C που βρίσκονται εκτός των CpG νησίδων, οι οποίες τροποποιούνται σε U και ανιχνεύονται ως T στην αλληλούχηση. Στο μη μεθυλιωμένο πατρικό αλληλόμορφο αναμενόταν όλες οι C να μετατραπούν σε T.

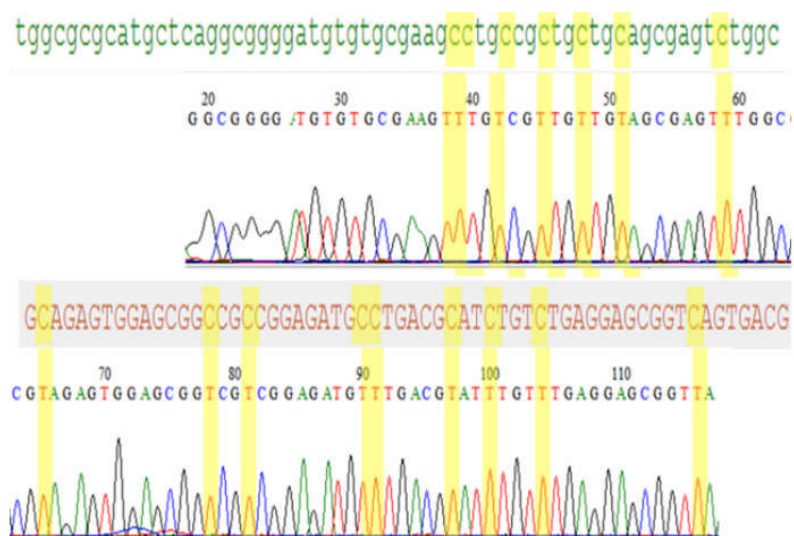
```

tggcgcgcatgctcagggcgggatgtgtgcaagcctgcccgtgctgcagcgagtctggc
GCAGAGTGGAGCGGCCGCCGAGATGCCTGACGCATCTGTCTGAGGAGCGGTCAGTGACC
CGATGGAGCGGGCAAG
gtcagctgtgccggtggcttctctcaagagacagcctggggagcggccacttttattcat

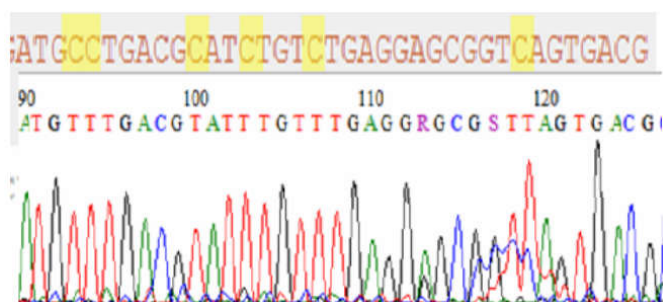
```

Εικόνα 25. Αλληλουχία εξονίου α γονιδίου SNRPN. Στο ενεργό αλληλόμορφο όλες οι κυτοσίνες είναι ελεύθερες μεθυλομάδας και θα μετατραπούν σε ουρακίλες μετά από

επεξεργασία με διθειώδες νάτριο. Στο ανενεργό, μεθυλιωμένο αλληλόμορφο οι κυτοσίνες που βρίσκονται σε δινουκλεοτίδια CG φέρουν μεθυλομάδα και διαφεύγουν της απαμίνωσης, ενώ οι υπόλοιπες (με κίτρινο) μετατρέπονται σε ουρακίλη.



Εικόνα 26. Δείγμα ελέγχου, μητρικό μεθυλιωμένο αλληλόμορφο SNRPB μετά από επεξεργασία με διθειώδες νάτριο. Αλληλούχηση κατά Sanger και αντιπαραβολή με αλληλουχία αναφοράς εξονίου α. Σημειώνονται με κίτρινο οι κυτοσίνες που μετατρέπονται σε ουρακίλη.



Εικόνα 27. Δείγμα ENY, μητρικό μεθυλιωμένο αλληλόμορφο SNRPB μετά από επεξεργασία με διθειώδες νάτριο.

#### Methylation Specific MLPA

Στις αντιδράσεις MS-MLPA πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός πολλαπλών στόχων μέσω PCR στο γονιδίωμα με χρήση ανιχνευτών και μετά από πέψη με ειδική για μεθυλίωση περιοριστική ενδονουκλεάση. Οι στόχοι αποτελούν γενετικές περιοχές που υπόκεινται σε μεθυλίωση και σχετίζονται με σύνδρομα γονεϊκής αποτύπωσης. Η μεθυλίωση του DNA πραγματοποιείται κατά αποκλειστικότητα στις CpG νησίδες, με αποτέλεσμα μη μεθυλιωμένες περιοχές να αναγνωρίζονται και να τέμνονται από την περιοριστική

ενδονουκλεάση HhaI, ενώ οι αντίστοιχες μεθυλιωμένες περιοχές να διαφεύγουν της δράσης της. Πραγματοποιούνται δύο αντιδράσεις σε κάθε δείγμα, μία χωρίς επώαση του δείγματος DNA με HhaI και μία έπειτα από επώαση του δείγματος DNA με HhaI. Φυσιολογικά μία γονεϊκά αποτυπωμένη περιοχή θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από λόγο 1 χωρίς την πέψη και 0,5 μετά τη πέψη, εξαιτίας της θραύσης του μη μεθυλιωμένου αλληλομόρφου και της ανίχνευσης μόνο του μεθυλιωμένου. Στα σύνδρομα γονεϊκής αποτύπωσης που χαρακτηρίζονται από έλλειψη του αλληλομόρφου, έλλειψη μεθυλίωσης του ενός αλληλομόρφου ή μεθυλίωση αμφότερων των αλληλομόρφων, οι λόγοι τροποποιούνται.

Οι αντιδράσεις MS MLPA που πραγματοποιήθηκαν είχαν στόχο τα ελλείμματα και τις αλλαγές του προτύπου μεθυλίωσης της περιοχής 5q11-13 για μελέτη των νοσημάτων Prader Willi/ Angelman και της περιοχής 11p15 για τη μελέτη των νοσημάτων Beckwith Wiedemann/ Silver Russell. Λόγω του υψηλού κόστους των αντιδραστηρίων ελέγχθηκε μόνο το δείγμα 24-06csf13 (WGA) σε τρεις αραιώσεις 1:10, 1:50 και 1:100. Κανένα δεν απέδωσε προϊόντα που να επιτρέπουν τον χαρακτηρισμό της περιοχής.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ/ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

Ο μικρός αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (16), σε συνδυασμό με την μικρή ποσότητα διαθέσιμου απομονωμένου υλικού και τις περιορισμένες, λόγω του κόστους, εφαρμογές που ολοκληρώθηκαν, πιθανώς δεν επιτρέπουν την διεξαγωγή στατιστικά επιβεβαιωμένων αποτελεσμάτων.

Συγκρίνοντας τα δύο πρωτόκολλα απομόνωσης παρατηρήθηκε καλύτερη απόδοση στην απομόνωση DNA με χρήση του πρωτοκόλλου Nucleospin Tissue XS. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο καθώς το συγκεκριμένο πρωτόκολλο είναι σχεδιασμένο για απομόνωση DNA από δείγματα μικρότερου όγκου. Ακόμη παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην ποσότητα DNA που απομονώθηκε με διπλή φυγοκέντρηση του δείγματος. Οι λόγοι ποιοτικής αξιολόγησης εμφάνισαν αποκλίσεις, που αποδόθηκαν στην χαμηλή περιεκτικότητα του ENY σε κύτταρα. Η προσπάθεια απομόνωσης DNA από 200  $\mu$ l είχε στόχο τον έλεγχο του απομονωμένου DNA ακόμη χαμηλότερης συγκέντρωσης, σε κλασσικές μεθόδους διάγνωσης και όχι την παρατήρηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του.

Η σειρά ελέγχων που πραγματοποιήθηκε στα δείγματα DNA που απομονώθηκαν με τη χρήση και των δύο πρωτοκόλλων, απέδειξε πως αποδίδουν ποσότητα DNA σε ικανοποιητική συγκέντρωση και σχετική καθαρότητα. Η δυναμική των δειγμάτων σε διαγνωστικά πρωτόκολλα δεν ήταν η αναμενόμενη σύμφωνα με τη συγκέντρωση και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους. Σε περιπτώσεις που δοκιμάστηκε PCR για μία ή περισσότερες αλληλουχίες στόχους και αλληλούχηση αυτών, η πλειοψηφία των αντιδράσεων ήταν θετικές. Αντιθέτως σε περιπλοκότερες τεχνικές όπως οι MLPA, η χημική τροποποίηση για τη μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης, υπήρξαν αρκετές ανεπιτυχείς αντιδράσεις ή δεν παρατηρήθηκε επαναληψιμότητα των θετικών αντιδράσεων. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στην απαίτηση υψηλής συγκέντρωσης DNA αλλά και στις διαδοχικές επεξεργασίες που ίσως αλλοιώνουν τα αρχικά ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά (π.χ. η μεγάλη μείωση συγκέντρωσης γενωμικού υλικού μετά από χημική τροποποίηση).

Οι αντιδράσεις στοχευμένου ελέγχου όπως οι αντιδράσεις πολλαπλασιασμού περιοχών των γονιδίων NSD1, SCN1A, AMELX/Y, των περιοχών που σχετίζονται με SMA και Prader Willi/Angelman ήταν επιτυχείς. Στην PCR NSD1 έγινε δοκιμή δειγμάτων απομονωμένου DNA από αμφότερα τα πρωτόκολλα και μετέπειτα εκλούσεις τους. Συμπεραίνεται πως ακόμη και η ελάχιστη συγκέντρωση DNA με χαμηλούς ποιοτικούς δείκτες είναι ικανή αποδώσει προϊόν πολλαπλασιασμού. Ακόμη φάνηκε πως προϊόντα που παρότι δεν κατέστησαν εμφανή στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, απέδωσαν προϊόντα στην επακόλουθη αντίδραση αλληλούχησης. Στην PCR SCN1A παρόλο που το προϊόν πολλαπλασιασμού ήταν μικρότερου μεγέθους (220 bp προϊόν SCN1A, 395 bp προϊόν NSD1), δεν ήταν ορατό στην ηλεκτροφόρηση της πρώτη αντίδρασης αλλά στις δεύτερης nested PCR. Συνεπώς μπορεί στα δείγματα ENY να υπάρχουν παρεμποδιστικοί παράγοντες που δεν επιτρέπουν πάντα τον ομαλό πολλαπλασιασμό των προϊόντων και να απαιτείται δεύτερη αντίδραση για περαιτέρω ενίσχυση του προϊόντος ή τροποποίηση των συνθηκών και της στοιχειομετρίας της αντίδρασης. Στις περιπτώσεις που η ανίχνευση των προϊόντων γινόταν σε γενετικό αναλυτή ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδή παρατηρήθηκε εξίσου αυτό το φαινόμενο. Δεν μπορεί βεβαίως να αποκλεισθεί και η πιθανότητα η σύσταση της αλληλουχίας (π.χ. μεγάλη περιεκτικότητα C/G) να οδήγησε στην αποτυχία πολλαπλασιασμού ενός μικρότερου προϊόντος. Στις αντιδράσεις PCR των περιοχών AMELX/Y και STRs των γονιδίων SMN1, HBB τα προϊόντα ανιχνεύονταν από την πρώτη αντίδραση, ενώ αντιθέτως στην περίπτωση της μεθόδου HUMARA, τα προϊόντα πολλαπλασιασμού του γονιδίου AR ανιχνεύονταν έπειτα από *nested* PCR πιθανώς λόγω της απώλειας υλικού κατά τη διαδικασία της πέψης. Στην τελευταία αντίδραση αξίζει να σημειωθεί πως στα ετερόζυγα θήλεα ανιχνεύεται ένα προϊόν μετά την πέψη, έναντι των αναμένων δύο προϊόντων. Αυτό υποδεικνύει πιθανή επιλεκτική αδρανοποίηση του ενός εκ των δύο αλληλομόρφων, ως αποτέλεσμα της επιλεκτικής αδρανοποίησης του ενός X χρωμοσώματος. Ακόμη δεν θα μπορούσε να αποκλεισθεί η ανικανότητα πολλαπλασιασμού του αλληλομόρφου (Allele Drop Out, ADO) εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης DNA και πιθανής απώλειάς του κατά την πέψη.

Η αντίδραση πολλαπλασιασμού πολλαπλών στόχων στα φυλετικά χρωμοσώματα έγινε επιτυχώς σε όλα τα δείγματα ENY, ενώ αντιθέτως η αντίδραση πολλαπλασιασμού των AMELX/Y και STRs των γονιδίων HBB, SMN1 ήταν επιτυχής για δύο από τους τρεις στόχους. Η πρώτη αντίδραση είναι σχεδιασμένη για την μελέτη προγεννητικού ελέγχου στον οποίο εξ ορισμού περιλαμβάνονται δείγματα χαμηλής συγκέντρωσης DNA, καθώς υπάρχει συνήθως υλικό χαμηλότερης συγκέντρωσης. Συμπεραίνεται πως οι μέθοδοι ανάλυσης δείγματος ENY με μεθοδολογίες προσαρμοσμένες για δείγματα χαμηλής συγκέντρωσης DNA όπως αυτά που συχνά προκύπτουν σε προγεννητικούς ελέγχους φαίνεται να λειτουργούν αποτελεσματικά.

Σε τεχνικές όπως το MLPA, η διάγνωση βασίζεται στην συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων των υπό εξέταση δειγμάτων. Είναι αναμενόμενο λοιπόν ένα έλλειμμα δείγματος ENY να μην ανιχνεύεται στο εύρος τιμών που καθορίζουν τα δείγματα DNA περιφερικού αίματος, τα οποία έχουν πολύ υψηλότερη συγκέντρωση. Πιθανόν η διάγνωση να ήταν δυνατή, αν όλα τα υπό εξέταση δείγματα προέρχονταν από ENY και είχαν αντίστοιχη συγκέντρωση. Ακόμη, τεχνικές όπως η χημική τροποποίηση μεθυλίωσης απαιτούν σημαντική αρχική ποσότητα DNA, η οποία ήταν δυνατό να απομονωθεί μόνο από ένα δείγμα ENY (500 ng). Για να επιτύχουν αυτές οι τεχνικές συνεπώς, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί αποδοτικότερη μέθοδος απομόνωσης. Ως μέθοδος ενίσχυσης της απομονωμένης ποσότητας DNA χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο Whole Genome Amplification. Η μέθοδος παρόλο που ήταν επιτυχής, δεν απέδωσε σε όλες τις τεχνικές που υπεβλήθη το υλικό. Ακόμη πιο ενδιαφέρον ήταν το γεγονός πως η μεγάλη συγκέντρωση DNA που δημιουργήθηκε από το WGA, λειτουργεί παρεμποδιστικά ακόμη και για

αντιδράσεις που ήταν επιτυχείς στην χαμηλή αρχική συγκέντρωση απομόνωσης (PCR SCN1A).

Τα δύο δείγματα που παραλήφθηκαν σε σωληνάριο EDTA σε θερμοκρασία 4°C, απέδωσαν σημαντικά αυξημένα ποσοστά DNA σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα που απομονώθηκαν με το πρωτόκολλο Nucleospin Tissue XS. Άρα φαίνεται να είναι σημαντικός ο ρόλος των συνθηκών συντήρησης του δείγματος, καθώς σε θερμοκρασία -20°C ο σχηματισμός πάγου έχει ως συνέπεια τη διάρρηξη των κυττάρων και άρα απώλεια ποσότητας DNA στο υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης.

Τέλος τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται να απομονώνουν DNA από τον πυρήνα των ελάχιστων κυττάρων που περιέχει το ENY που είναι αιμοποιητικής προέλευσης και όχι cfDNA που προέρχεται από κύτταρα του ΚΝΣ. Φυσιολογικά το ENY περιέχει 0-5 κύτταρα/mm<sup>3</sup> (Jerrard et al., 2001), αλλά υπάρχει και πιθανότητα πρόσμιξης κυτταρικού υλικού από τη διαδικασία της παρακέντησης. Το cfDNA είναι αποδεδειγμένο ότι προέρχεται από κύτταρα του ΚΝΣ (Kim et al., 2021), ενώ τα κύτταρα που εντοπίζονται φυσιολογικά είναι αιμοποιητικής προέλευσης, που διαφέρουν όμως ως προς την γονιδιακή τους έκφραση σε σχέση με τα αντίστοιχα λεμφοκύτταρα του αίματος (Schafflick et al., 2020). Επομένως, η χρήση του γενωμικού DNA ως διαγνωστικό υλικό για σωματικές ιστοειδικές παραλλαγές αλλά και για μελέτη επιγενετικών τροποποιήσεων που σχετίζονται με παθήσεις του ΚΝΣ πιθανώς είναι ενδεικτική αλλά όχι απολύτως κατάλληλη. Για το σκοπό αυτό αντιπροσωπευτικότερα αποτελέσματα βιβλιογραφικά φαίνεται να έχει η μελέτη cfDNA.

Συμπερασματικά καταλήξαμε πως το ENY μπορεί να λειτουργήσει ως διαγνωστικό υλικό, από το οποίο απομονώνεται χαμηλή συγκέντρωση DNA. Μέθοδος που αναμένεται να λειτουργήσει αποτελεσματικά και θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον η εφαρμογή της μελλοντικά, είναι η ψηφιακή (digital) PCR. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να γίνει στοχευμένος έλεγχος για οποιαδήποτε παραλλαγή, ενώ η συγκέντρωση DNA δε θα είναι παρεμποδιστική. Θα είχε ενδιαφέρον να γίνει επιβεβαίωση της διάγνωσης των δειγμάτων ENY από ασθενείς με Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία. Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα ακριβής και ευαίσθητη για τον προσδιορισμό αριθμού αντιγράφων, καθώς γίνεται διαμοιρασμός της αντίδρασης σε δεκάδες χιλιάδες μικροσταγονίδια, ώστε σε κάθε μικροσταγονίδιο να υπάρχει μονοψήφιος αριθμός μορίων DNA. Σε κάθε μικροσταγονίδιο η αντίδραση PCR γίνεται ξεχωριστά και αποφεύγεται η ανικανότητα πολλαπλασιασμού της αλληλουχίας στόχου λόγω χαμηλής περιεκτικότητας του στο δείγμα, γεγονός που μπορεί να συμβεί στη συμβατική PCR. Το αποτέλεσμα ποσοτικοποίησης προκύπτει από τον αριθμό μικροσταγονιδίων με θετική αντίδραση και από τον αριθμό μικροσταγονιδίων με αρνητική αντίδραση, εκφράζοντας μία στατιστική συσχέτιση, βασισμένη στην κατανομή Poisson. Παρά τις τεχνικές δυσκολίες στην ανίχνευση και διαχωρισμό των ομόλογων γονιδίων SMN1 και SMN2, έχει αναπτυχθεί digital PCR αντίδραση για την ανίχνευση ελλειμμάτων στα εξόνια 7 και 8 του γονιδίου SMN1, στα οποία οφείλεται η νόσος. Η ανίχνευση γίνεται με χρήση πολλαπλών διαφορετικά σημασμένων ανιχνευτών για αναγνώριση αριθμού αντιγράφων των γονιδίων SMN1, SMN2, άθροισμα γονιδίων SMN1 και SMN2, συγκριτικά με ένα γονίδιο αναφοράς (RPPH1). Τα ομόλογα γονίδια SMN1 και SMN2 διαχωρίζονται εξαιτίας της πρόσδεσης των ανιχνευτών τους στο εξόνιο 7, το οποίο έχει διαφορά ενός νουκλεοτιδίου ανάμεσα στα ομόλογα γονίδια (c.840C στο SMN1, c.840T στο SMN2). Εκτός από την ανίχνευση ελλειμμάτων, με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατός και ο ακριβής προσδιορισμός του αριθμού αντιγράφων των γονιδίων SMN2, που σχετίζεται με την βαρύτητα της νόσου (Jiang et al., 2020).

Ακόμη θα είχε ενδιαφέρον η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης και των επιγενετικών χαρακτηριστικών των κυττάρων του ENY και η σύγκρισή τους με τα λεμφοκύτταρα του αίματος, αφού είναι γνωστή η διαφορετική επιγενετική υπογραφή τους, παρά την κοινή προέλευση τους. Η Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία χαρακτηρίζεται από την απώλεια της πρωτεΐνης SMN η οποία έχει ρυθμιστικό ρόλο στην μεταγραφική ρύθμιση και ωρίμανση, την αναγέννηση τελομερών και την κυτταρική μεταφορά (Singh et al., 2009). Πολύ πιθανόν λοιπόν, η έλλειψη της πρωτεΐνης να επηρεάζει την γονιδιακή έκφραση των νευρικών κυττάρων, αφού επηρεάζει την λειτουργία των κινητικών νευρώνων αλλά και γενικότερα άλλων κυτταρικών τύπων δεδομένης της πολύ-επίπεδης δράσης της. Παραμένει λοιπόν το ερώτημα, αυτές οι πιθανές επιγενετικές διαφορές θα ανιχνεύονται στο cfDNA του ENY και θα είναι ίδιες ή διαφορετικές από αυτές των κυττάρων του;

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Bale, T. A., Yang, S. R., Solomon, J. P., Nafa, K., Middha, S., Casanova, J., Sadowska, J., Skakodub, A., Ahmad, H., Yu, H. A., Riely, G. J., Kris, M. G., Chandarlapaty, S., Rosenblum, M. K., Gavrilovic, I., Karajannis, M. A., Pentsova, E., Miller, A., Boire, A., ... Arcila, M. E. (2021). Clinical Experience of Cerebrospinal Fluid–Based Liquid Biopsy Demonstrates Superiority of Cell-Free DNA over Cell Pellet Genomic DNA for Molecular Profiling. *Journal of Molecular Diagnostics*, 23(6), 742–752. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.03.001>
- Barrett, K., Barman, S., Bollano, S., & Brooks, H. (2014). *Ιατρική Φυσιολογία*. Broken Hill.
- Bothwell, S. W., Janigro, D., & Patabendige, A. (2019). Cerebrospinal fluid dynamics and intracranial pressure elevation in neurological diseases. *Fluids and Barriers of the CNS*, 16(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12987-019-0129-6>
- Chicard, M., Iddir, Y., Masliah Planchon, J., Combaret, V., Attignon, V., Saint-Charles, A., Frappaz, D., Faure-Conter, C., Beccaria, K., Varlet, P., Geoerger, B., Baulande, S., Pierron, G., Bouchoucha, Y., Doz, F., Delattre, O., Waterfall, J. J., Bourdeaut, F., & Schleiermacher, G. (2023). Cell-Free DNA Extracted from CSF for the Molecular Diagnosis of Pediatric Embryonal Brain Tumors. *Cancers*, 15(13). <https://doi.org/10.3390/cancers15133532>
- Darling, D. (n.d.). *choroid plexus*. [https://www.daviddarling.info/encyclopedia/C/choroid\\_plexus.html](https://www.daviddarling.info/encyclopedia/C/choroid_plexus.html)
- Hickman RA, Miller AM, Arcila ME. Cerebrospinal fluid: A unique source of circulating tumor DNA with broad clinical applications. *Transl Oncol*. 2023 Jul;33:101688. doi: 10.1016/j.tranon.2023.101688. Epub 2023 May 15. PMID: 37196447; PMCID: PMC10205485.
- Hrishi, A. P., & Sethuraman, M. (2019). Cerebrospinal fluid (CSF) analysis and interpretation in neurocritical care for acute neurological conditions. *Indian Journal of Critical Care*

*Medicine*, 23, S115–S119. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10071-23187>

- Huth, A., Ayoub, I., Barateau, L., Gerdes, L. A., Severac, D., Krebs, S., Blum, H., Tumani, H., Haas, J., Wildemann, B., Kümpfel, T., Beltrán, E., Liblau, R. S., Dauvilliers, Y., & Dornmair, K. (2024). Single cell transcriptomics of cerebrospinal fluid cells from patients with recent-onset narcolepsy. *Journal of Autoimmunity*, 146(March). <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2024.103234>
- Iriyama, C., Murate, K., Iba, S., Okamoto, A., Goto, N., Yamamoto, H., Kato, T., Mihara, K., Miyama, T., Hattori, K., Kajiya, R., Okamoto, M., Mizutani, Y., Yamada, S., Tsukamoto, T., Hirose, Y., Mutoh, T., Watanabe, H., & Tomita, A. (2023). Utility of cerebrospinal fluid liquid biopsy in distinguishing CNS lymphoma from cerebrospinal infectious/demyelinating diseases. *Cancer Medicine*, 12(16), 16972–16984. <https://doi.org/10.1002/cam4.6329>
- Janssens, E., Aerssens, P., Alliët, P., Gillis, P., & Raes, M. (2003). Post-dural puncture headaches in children. A literature review. *European Journal of Pediatrics*, 162(3), 117–121. <https://doi.org/10.1007/s00431-002-1122-6>
- Jerrard, D. A., Hanna, J. R., & Schindelheim, G. L. (2001). Cerebrospinal fluid. *Journal of Emergency Medicine*, 21(2), 171–178. [https://doi.org/10.1016/S0736-4679\(01\)00360-2](https://doi.org/10.1016/S0736-4679(01)00360-2)
- Jiang, L., Lin, R., Gallagher, S., Zayac, A., Butchbach, M. E. R., & Hung, P. (2020). Development and validation of a 4-color multiplexing spinal muscular atrophy (SMA) genotyping assay on a novel integrated digital PCR instrument. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76893-7>
- Johnson, E. (2012). *Νευροανατομία*. Κωνσταντάρας Ιατρικές Εκδόσεις.
- Kang, S. Y., Kashlan, O. N., Singh, R., Rane, R., Adsul, N. M., Jung, S. C., Yi, J., Cho, H. S., Kim, H. S., Jang, I. T., & Oh, S. H. (2020). Advantages of the combination of conscious sedation epidural anesthesia under fluoroscopy guidance in lumbar spine surgery. *Journal of Pain Research*, 13, 211–219. <https://doi.org/10.2147/JPR.S227212>
- Kekou, K., Svingou, M., Sofocleous, C., Mourtzi, N., Nitsa, E., Konstantinidis, G., Youroukos, S., Skiadas, K., Katsalouli, M., Pons, R., Papavasiliou, A., Kotsalis, C., Pavlou, E., Evangelidou, A., Katsarou, E., Voudris, K., Dinopoulos, A., Vorgia, P., Niotakis, G., ... Traeger-Synodinos, J. (2020). Evaluation of Genotypes and Epidemiology of Spinal Muscular Atrophy in Greece: A Nationwide Study Spanning 24 Years. *Journal of Neuromuscular Diseases*, 7(3), 247–256. <https://doi.org/10.3233/JND-190466>
- Kennedy, S. R., Loeb, L. A., & Herr, A. J. (2008). Somatic mutations in aging, cancer and neurodegeneration. *Mech Ageing Dev*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2011.10.009.Somatic>
- Kim, S., Baldassari, S., Sim, N. S., Chipaux, M., Dorfmueller, G., Kim, D. S., Chang, W. S., Taly, V., Lee, J. H., & Baulac, S. (2021). Detection of Brain Somatic Mutations in Cerebrospinal Fluid from Refractory Epilepsy Patients. *Annals of Neurology*, 89(6), 1248–1252. <https://doi.org/10.1002/ana.26080>
- Kodali, M. C., Antone, J., Alsop, E., Jayakumar, R., Parikh, K., Chiot, A., Sanchez-Molina, P., Ajami, B., Arnold, S. E., Jensen, K., Das, S., & Weinberg, M. S. (2024). Cryopreservation of cerebrospinal fluid cells preserves the transcriptional landscape for single-cell

- analysis. *Journal of Neuroinflammation*, 21(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12974-024-03047-1>
- Macaulay, N., & Toft-bertelsen, T. L. (2023). Dual function of the choroid plexus : Cerebrospinal fluid production and control of brain ion homeostasis. *Cell Calcium*, 116(September), 102797. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2023.102797>
- Malhotra, S., Miras, M. C. M., Pappolla, A., Montalban, X., & Comabella, M. (2023). Liquid Biopsy in Neurological Diseases. *Cells*, 12(14). <https://doi.org/10.3390/cells12141911>
- Martignano, F. (2019). Cell-free DNA: An overview of sample types and isolation procedures. *Methods in Molecular Biology*, 1909, 13–27. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8973-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8973-7_2)
- Martínez-Glez, V., Tenorio, J., Nevado, J., Gordo, G., Rodríguez-Laguna, L., Feito, M., de Lucas, R., Pérez-Jurado, L. A., Ruiz Pérez, V. L., Torrelo, A., Spinner, N. B., Happle, R., Biesecker, L. G., & Lapunzina, P. (2020). A six-attribute classification of genetic mosaicism. *Genetics in Medicine*, 22(11), 1743–1757. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0877-3>
- Neumaier, F., & Zlatopolskiy, B. D. (2021). *Drug Penetration into the Central Nervous System\_Pharmacokinetic Concepts and In Vitro Model Systems*.
- Nikolaev, S. I., Vetiska, S., Bonilla, X., Boudreau, E., Jauhiainen, S., Rezai Jahromi, B., Khyzha, N., DiStefano, P. V., Suutarinen, S., Kiehl, T.-R., Mendes Pereira, V., Herman, A. M., Krings, T., Andrade-Barazarte, H., Tung, T., Valiante, T., Zadeh, G., Tymianski, M., Rauramaa, T., ... Radovanovic, I. (2018). Somatic Activating KRAS Mutations in Arteriovenous Malformations of the Brain . *New England Journal of Medicine*, 378(3), 250–261. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1709449>
- Pinotti, M., & Maset, A. L. (2013). *CEREBROSPINAL FLUID DRAINAGE DEVICES : EXPERIMENTAL CEREBROSPINAL FLUID DRAINAGE DEVICES : EXPERIMENTAL CHARACTERIZATION*. December 2018. <https://doi.org/10.5380/reterm.v12i2.62047>
- Saladin, K. (2012). *Anatomy and Physiology* (6th ed.). McGraw Hill.
- Schafflick, D., Xu, C. A., Hartlehnert, M., Cole, M., Schulte-Mecklenbeck, A., Lautwein, T., Wolbert, J., Heming, M., Meuth, S. G., Kuhlmann, T., Gross, C. C., Wiendl, H., Yosef, N., & Meyer zu Horste, G. (2020). Integrated single cell analysis of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis. *Nature Communications*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14118-w>
- Shahan, B., Choi, E. Y., Army, W., & Bragg, F. (2021). *Cerebrospinal Fluid Analysis*. 103(7).
- Singh, N. N., Shishimorova, M., Lu, C. C., Gangwani, L., & Singh, R. N. (2009). A short antisense oligonucleotide masking a unique intronic motif prevents skipping of a critical exon in spinal muscular atrophy. *RNA Biology*, 6(3), 341–350. <https://doi.org/10.4161/rna.6.3.8723>
- Spreafico, R., Dylgjeri, S., & Garbelli, R. (2009). NEUROPATHOLOGY | Neuropathology of Epilepsy. In *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research* (pp. 1600–1606). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012373961-2.00180-6>
- Takousis P, Devonshire AS, Redshaw N, von Baumgarten L, Whale AS, Jones GM, Fernandez-Gonzalez A, Martin J, Foy CA, Alexopoulos P, Huggett JF, Pernecky R. A standardised

methodology for the extraction and quantification of cell-free DNA in cerebrospinal fluid and application to evaluation of Alzheimer's disease and brain cancers. *N Biotechnol.* 2022 Dec 25;72:97-106. doi: 10.1016/j.nbt.2022.10.001. Epub 2022 Oct 3. PMID: 36202346.

Telano, L. N., & Baker., S. (2023). *Physiology, Cerebral Spinal Fluid*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519007/>

Tsamis KI, Sakkas H, Giannakis A, Ryu HS, Gartzonika C, Nikas IP. Evaluating Infectious, Neoplastic, Immunological, and Degenerative Diseases of the Central Nervous System with Cerebrospinal Fluid-Based Next-Generation Sequencing. *Mol Diagn Ther.* 2021 Mar;25(2):207-229. doi: 10.1007/s40291-021-00513-x. Epub 2021 Mar 1. PMID: 33646562; PMCID: PMC7917176.

Vernau, W., Vernau, K. A., & Bailey, C. S. (2008). *Cerebrospinal fluid* (6th Editio). Clinical Biochemistry of Domestic Animals.