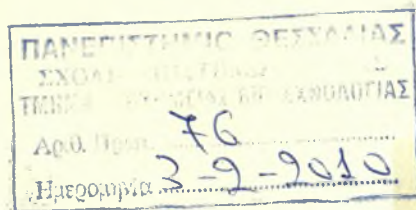


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Διπλωματική Εργασία

ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΙΑΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΜΕ
ΑΥΤΟΣΩΜΙΚΗ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΣΑ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ ΜΥΟΣΙΤΙΔΑ
ΜΕ ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ (H1BM)

Κίμωνος Παναγιώτα

Φεβρουάριος 2010



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 8233/1
Ημερ. Εισ.: 28-04-2010
Δωρεά:
Ταξίθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2010
ΚΙΜ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

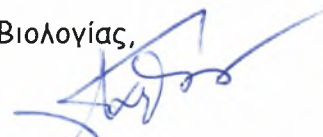


004000087080

Τριμελής Επιτροπή:

1. Κυπρούλα Χριστοδούλου, Γενετίστρια, Διευθύντρια Τμήματος Νευρογενετικής, Ινστιτούτο Νευρολογίας & Γενετικής Κύπρου
2. Κωνσταντίνος Μαθιόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κ.Α.



Η παρούσα Διπλωματική Εργασία υποβλήθηκε προς μερική εκπλήρωση των απαιτήσεων για την απόκτηση του Πτυχίου Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας στο Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στη Λάρισα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

Εισαγωγή.....	- 4 -
ΜΥΟΠΑΘΕΙΕΣ.....	- 5 -
Μυοσίνη.....	- 10 -
ΜΥΟΣΙΤΙΔΑ ΜΕ ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ (IBM).....	- 12 -
IBM ₃	- 13 -
Κλινικά Χαρακτηριστικά	- 13 -
Γενετική Αιτιολογία	- 15 -
Γονίδιο MYH2.....	- 16 -
Μεταλλάξεις.....	- 18 -
Υλικά και Μέθοδοι	- 20 -
ΥΛΙΚΑ.....	- 21 -
Αντιδραστήρια.....	- 21 -
DNA Πολυμεράσες	- 21 -
Συσκευές	- 21 -
ΜΕΘΟΔΟΙ	- 22 -
Λήψη δειγμάτων DNA.....	- 23 -
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης	- 24 -
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	- 29 -
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου	- 32 -
Ανάλυση με μικροδορυφορικούς δείκτες	- 34 -
Αλληλούχιση DNA ακολουθιών σε αυτόματο αναλυτή.....	- 37 -
Αποτελέσματα.....	- 42 -
Συζήτηση.....	- 47 -
Βιβλιογραφία	- 50 -

Εισαγωγή

ΜΥΟΠΑΘΕΙΕΣ

Η λειτουργία των σκελετικών μυών μπορεί να επηρεασθεί από ποικίλες παθολογικές διεργασίες, είτε γενετικά καθορισμένες, είτε επίκτητες. Οι παθήσεις των μυών που οφείλονται σε διαταραχή της ίδιας της μυϊκής ίνας καλούνται μυοπάθειες.

Οι μυοπάθειες διακρίνονται σε 9 κατηγορίες:

α) Μυϊκές δυστροφίες: Κληρονομικές εκφυλιστικές παθήσεις των σκελετικών μυών με προοδευτικό χαρακτήρα. Η συχνότερη και ταχύτερα εξελισσόμενη μυϊκή δυστροφία είναι η μυϊκή δυστροφία Duchenne (ψευδοϋπερτροφική ή κακοήθης φυλοσύνδετη μυϊκή δυστροφία).

β) Μυϊκές παθήσεις με μυοτονία: N. Steinert, N. Thomsen

γ) Περιοδικές παραλύσεις: Στις συγκεκριμένες παραλύσεις περιλαμβάνονται διάφορα σύνδρομα με κύριο χαρακτηριστικό την περιοδική μυϊκή αδυναμία, η οποία οφείλεται σε περιοδική χαλαρή παράλυση των σκελετικών μυών διάρκειας λεπτών έως εβδομάδων.

δ) Κακοήθης υπερθερμία: Θανατηφόρο σύνδρομο που εμφανίζεται κυρίως σε ασθενείς με γενετική προδιάθεση και οφείλεται σε μια κεραυνοβόλο υπερμεταβολική κατάσταση η οποία επιταχύνεται από την εφαρμογή πτητικών και μη αναισθητικών παραγόντων όπως η σουκινιλοχολίνη, το σεβοφλουράνιο κ.α.

ε) Μεταβολικές μυοπάθειες: Σ' αυτές ανήκουν οι γλυκαγονώσεις, οι διαταραχές του μεταβολισμού των λιπιδίων κ.α.

στ) Μιτοχονδριακές μυοπάθειες: Οφείλονται στην πρωτοπαθή διαταραχή της δομής και της λειτουργίας των μιτοχονδρίων. Παρά το γεγονός ότι χαρακτηρίζονται ως μυοπάθειες, κατ' ουσία εμπλέκουν όλους τους ιστούς και

κυρίως το νευρικό ιστό, με αποτέλεσμα παράλληλα με τα μυοπαθητικά φαινόμενα να συνυπάρχουν διαταραχές της εγκεφαλικής λειτουργίας, διαταραχές της λειτουργικότητας των περιφερικών νεύρων, μεταβολικές διαταραχές καθώς και δυσλειτουργικά φαινόμενα από τα ζωτικά όργανα.

ζ) Συγγενείς μυοπάθειες: central core disease κ.α.

η) Ενδοκρινικές μυοπάθειες: παθήσεις υπόφυσης, επινεφριδίων, θυρεοειδούς, παραθυρεοειδούς.

θ) Φλεγμονώδεις μυοπάθειες: Σ' αυτό τον τύπο μυοπαθειών θα επεκταθούμε λίγο περισσότερο λόγω του ότι σ' αυτές ανήκει και η μυοσίτιδα με έγκλειστα. Χαρακτηρίζονται από μεγάλη αιτιολογική και κλινική ετερογένεια και ανάλογα με την αιτιολογία τους διακρίνονται σε φλεγμονώδεις μυοπάθειες που οφείλονται σε γνωστούς λοιμώδεις παράγοντες και στις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις μυοπάθειες, η αιτιολογία των οποίων παραμένει άγνωστη.

- Φλεγμονώδεις μυοπάθειες που οφείλονται σε γνωστούς λοιμώδεις παράγοντες: Φλεγμονώδης μυοπάθεια γενικευμένη ή εντοπισμένη σε μια ομάδα μυών μπορεί να προκληθεί από τη δράση ποικίλων παραγόντων. Οι ιοί μπορεί να προκαλέσουν επιδημική πλευροδυνία, καλοήθεις οξείες πολυμυοσίτιδες ή οξεία ραβδομύωση. Μικρόβια, όπως ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος και ο στρεπτόκοκκος, μπορεί να προκαλέσουν μυοσίτιδα αιματογενώς ή κατ' επινέμησιν ιστού. Μπορεί επίσης να παρατηρηθούν φυματιώδεις, συφιλιδικές ή λεπρωματώδεις μυοσίτιδες. Εστιακή ή γενικευμένη φλεγμονώδης μυοπάθεια είναι σπάνια και μπορεί να προκληθεί από την εγκατάστατη στους μυς παρασίτων, όπως πρωτόζωα, κεστώδη και νηματώδη. Οι μυκητιασικές μυοσίτιδες είναι σπανιότατες.

- Ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις μυοπάθειες: Αποτελούν ομάδα επίκτητων νοσημάτων, η αιτιολογία των οποίων παραμένει άγνωστη. Οι παθογενετικοί

μηχανισμοί των ιδιοπαθών φλεγμονωδών μυοπαθειών είναι ανοσολογικοί χωρίς να έχουν, προς το παρόν, αναγνωρισθεί τα αντιγόνα προς τα οποία κατευθύνεται η ανοσολογική αντίδραση. Σ' αυτές τις μυοπάθειες ανήκουν οι δερματομυοσίτιδα, πολυμυοσίτιδα και μυοσίτιδα με έγκλειστα, στην οποία θα αναφερθούμε εκτενέστερα παρακάτω.

Η διάγνωση γενικά των μυοπαθειών γίνεται συναρτήσει πολλών παραγόντων. Απαραίτητη είναι η μελέτη των κλινικών εκδηλώσεων / συμπτωματολογίας του ασθενή σε συνδυασμό με τα ευρήματα του εργαστηριακού και μορφολογικού ελέγχου (βιοχημικός έλεγχος και νευροφυσιολογικός). Επίσης, χρήσιμο εργαλείο στη διάγνωση της ασθένειας αποτελεί η λήψη οικογενειακού ιστορικού.

Οι κυριότερες κλινικές εκδηλώσεις των μυοπαθειών είναι:

- Μυϊκή αδυναμία με χαρακτηριστική κεντρομελική κατανομή. Εξαιρέση στον κανόνα αποτελούν η μυοτονική δυστροφία και οι περιφερικές μυοπάθειες. Στοιχεία της μυϊκής αδυναμίας, που πρέπει να συνεκτιμηθούν, είναι ο τρόπος εγκατάστασης, η πορεία της και η βαρύτητά της.
- Ατροφία μυών: Η μυϊκή αδυναμία συνοδεύεται από ατροφία των μυών που είναι συνήθως ανάλογης κατανομής. Η συσχέτιση μυϊκής αδυναμίας και ατροφίας δεν είναι αναγκαία σε όλα τα μυϊκά νοσήματα.
- Υπερτροφία ή ψευδοϋπερτροφία μυών ή και μυϊκών ομάδων χαρακτηρίζει ορισμένες μυοπάθειες (φιλοσύνδετη μυϊκή δυστροφία, συγγενής μυοτονία).
- Μυαλγίες: Αξιολογούνται σε σχέση με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες εκδηλώνονται και με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του άλγους. Μυαλγίες κατά την ανάπαυση, με ευαισθησία στην πίεση του μυός, υποδηλώνουν

φλεγμονή, ενώ οι μυαλγίες που εκδηλώνονται κατά την άσκηση υποδηλώνουν μεταβολική διαταραχή.

- **Επώδυνη μυϊκή σύσπαση (κράμπα):** Ακούσια, επώδυνη σύσπαση του μυός που συνοδεύεται από τη μεταβολή της στάσης της άρθρωσης. Ηλεκτρομυογραφικά χαρακτηρίζεται από υψηλής συχνότητας, φυσιολογικής μορφολογίας δυναμικά κινητικών μονάδων. Παρατηρούνται σε διαταραχές του περιφερικού κινητικού νευρώνα. Επώδυνες μυϊκές συσπάσεις, που εμφανίζονται μόνο μετά από άσκηση και είναι σιωπηλές ηλεκτρομυογραφικά, σχετίζονται με μεταβολικές διαταραχές του μυός.
- **Μυοτονικό φαινόμενο:** Παράταση της αποσύσπασης (χάλασης) του μυός, που χαρακτηρίζει τις μυοτονικές παθήσεις. Παράγεται είτε εκούσια, είτε με μηχανικό ή ηλεκτρικό ερέθισμα.

Η διερεύνηση της λειτουργίας του μυϊκού συστήματος βασίζεται στο βιοχημικό, νευροφυσιολογικό και μορφολογικό έλεγχο.

- **Βιοχημικός έλεγχος**

Κρεατινική κινάση (CK): Τα επίπεδα της CK στον ορό αποτελούν τον πλέον αξιόπιστο βιοχημικό δείκτη της διαταραχής του μυός. Μεγάλη αύξηση των επιπέδων της CK παρατηρείται στην οξεία ραβδομύωση, στις φλεγμονώδεις και φαρμακογενείς μυοπάθειες, στην υποθυρεοειδική μυοπάθεια και στις μυϊκές δυστροφίες. Η τυχαία ανεύρεση αυξημένης CK σε άτομα χωρίς κλινικές εκδηλώσεις νευρομυϊκής νόσου αποτελεί ένδειξη για περαιτέρω διερεύνηση. Μικρή, παροδική αύξηση της CK μπορεί να είναι αποτέλεσμα έντονης σωματικής άσκησης ή μικρού τραυματισμού του μυός.

Γαλακτικό οξύ: Αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος κατά την ανάπαυση παρατηρούνται σε ασθενείς με μιτοχονδριακή διαταραχή. Αντίθετα, η αδυναμία

παραγωγής γαλακτικού οξέος με την κόπωση είναι ενδεικτική μεταβολικής μυοπάθειας οφειλόμενης σε διαταραχές της γλυκογονόλυσης ή της γλυκόλυσης.

Άλλες βιοχημικές εξετάσεις: Ο έλεγχος των ηλεκτρολυτών και της λειτουργίας του θυροειδούς είναι απαραίτητος για τη διερεύνηση ασθενών με συμπτωματολογία από τους μυς. Δεν πρέπει επίσης να παραλείπονται οι βασικές βιοχημικές εξετάσεις και ο συνήθης αιματολογικός έλεγχος.

➤ Νευροφυσιολογική μελέτη

Ένα σύνηθες εύρημα που μπορεί να οδηγήσει στην κλινική διάγνωση των μυοπαθειών είναι η εικόνα που δίνει το ηλεκτρομυογράφημα (ΗΜΓ), κατά την οποία εμφανίζεται κατά την εκούσια σύσπαση άφθονα πολυφασικά δυναμικά κινητικών μονάδων με μικρή διάρκεια και χαμηλό ύψος, λόγω του μειωμένου αριθμού μυϊκών ινών των κινητικών μονάδων.

Μια δεύτερη ένδειξη στην κλινική διάγνωση των μυοπαθειών είναι η παρουσία αυτόματης δραστηριότητας (ινιδικά δυναμικά και θετικά κύματα), Αυτό υποδεικνύει την παρουσία νευρογενούς βλάβης του μυός, η οποία μπορεί να παρατηρηθεί και σε πρωτοπαθείς μυοπάθειες λόγω λειτουργικής απονεύρωσης τμημάτων της μυϊκής ίνας, ως αποτέλεσμα νεκρωτικής βλάβης.

Σε αντίθεση με άλλες παθήσεις του νευρομυϊκού συστήματος, στις μυοπάθειες δεν παρατηρούνται συνήθως διαταραχές της αγωγιμότητας των νευρών.

➤ Βιοψία μυός

Η βιοψία μυός παρέχει τη δυνατότητα της άμεσης, σχετικά, μελέτης του παθολογοανατομικού εδάφους της νευρομυϊκής νόσου. Για να είναι η βιοψία χρήσιμη στη διάγνωση θα πρέπει:

- Να έχει προηγηθεί συστηματική κλινική και εργαστηριακή μελέτη του ασθενούς.
- Ο μυς που θα επιλεγεί για βιοψία πρέπει να είναι μέτρια προσβεβλημένος.
- Να μην κακοποιηθεί ή συνθλιβεί το δείγμα του μυός που λαμβάνεται για μελέτη.

Εκτός από τις κλασσικές ιστολογικές χρώσεις, η μελέτη του μυός περιλαμβάνει ιστοχημικές, ανοσοϊστοχημικές και υπερμικροσκοπικές τεχνικές¹.

Η λήψη λεπτομερούς οικογενειακού ιστορικού από τον ασθενή μπορεί να δώσει άμεσες ενδείξεις ως προς τη διάγνωση. Σε περιπτώσεις πιθανής μυοπάθειας, στοιχεία που έχουν ιδιαίτερη σημασία στη λήψη του οικογενειακού ιστορικού των ασθενών είναι τα ακόλουθα: κληρονομικότητα, λήψη φαρμάκων, χρήση οινόπνευματος ή άλλων τοξικών ουσιών, ενδοκρινική διαταραχή, κακόηθες νεόπλασμα, νόσος του συνδετικού ιστού και ανοσοανεπάρκεια.

Μυοσίνη

Είναι το κύριο συστατικό των σκελετικών μυϊκών χοντρών ινών που αποτελούν το 15-25% της συνολικής πρωτεΐνης του σώματος. Είναι ετεροεξαμερές και αποτελείται από δύο ίδιες βαριές αλυσίδες (MHC) και δύο ζεύγη ανόμοιων ελαφριών αλυσίδων μυοσίνης.



Η μυοσίνη μετατρέπει τη χημική ενέργεια, που απελευθερώνεται από την υδρόλυση ATP, σε μηχανική δύναμη. Η MyHC είναι υψηλά ασυμμετρική πρωτεΐνη με μια μακριά ραβδωτή περιοχή και μια σφαιρική κεφαλή.

Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί πολλά γονίδια που βρέθηκαν να κωδικοποιούν την MyHC:

- Τρία από αυτά βρίσκονται στο χρωμόσωμα 14 και συγκεκριμένα στο βραχίονα 14q και είναι τα: α) alpha καρδιακά, β) slow/beta καρδιακά και γ) το γονίδιο MYH6.

- Υπάρχουν επίσης ακόμα 6 MHC σκελετικά μυϊκά γονίδια - εμβρυικά, περιγεννητικά και ενήλικα fast γονίδια (2A, 2X και πιθανόν 2B), MYH1, 2, 3, 4, 8, 13 στο χρωμόσωμα 17 και συγκεκριμένα στο γενετικό τόπο 17p13.1. Στο ίδιο χρωμόσωμα υπάρχει ακόμα ένα γονίδιο, το οποίο δεν έχει ακόμα αναγνωρισθεί.

- Στο χρωμόσωμα 14 βρίσκονται τα γονίδια MYH6 και MYH7, τα οποία κωδικοποιούν ισομορφές καρδιακής μυοσίνης.

- Το γονίδιο MYH11, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16, κωδικοποιεί μυοσίνη λείου μυός.

- Οι μυοσίνες IIA και IIB, οι οποίες ανήκουν στη μη μυϊκή τυπική κλάση II, κωδικοποιούνται από τα γονίδια MYH9 και MYH10.

Οι τρεις κύριες ισομορφές των MyHC, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα, είναι οι εξής:

α) MyHCI ή slow/beta καρδιακή MyHC (κωδικοποιείται από το MYH7): εκφράζεται σε μυϊκές ίνες τύπου 1.

β) MyHCIIa (κωδικοποιείται από το MYH2): εκφράζεται σε μυϊκές ίνες τύπου 2A.

γ) MyHCIIx (κωδικοποιείται από το MYH1): εκφράζεται σε μυϊκές ίνες τύπου 2B.

Myosin heavy chain isoforms expressed in human muscle

Protein	Gene	OMIM	Muscle fiber type
MyHC IIx/d	<i>MYH1</i>	160730	Type 2B
MyHC IIa	<i>MYH2</i>	160740	Type 2A
Embryonic MyHC	<i>MYH3</i>	160720	Fetal development Muscle regeneration
α -Cardiac MyHC	<i>MYH6</i>	160710	Heart atria
MyHC I, β -Cardiac MyHC	<i>MYH7</i>	160760	Skeletal muscle Type I Heart ventricles
Perinatal MyHC	<i>MYH8</i>	160741	Fetal development Muscle regeneration
Smooth muscle MyHC	<i>MYH11</i>	160745	Smooth muscle
Extraocular MyHC	<i>MYH13</i>	603487	Extraocular muscle

ΜΥΟΣΙΤΙΔΑ ΜΕ ΕΓΚΛΕΙΣΤΑ (INCLUSION BODY MYOSITIS / IBM)

Η μυοσίτιδα με έγκλειστα ανήκει στις φλεγμονώδεις μυοπάθειες. Η IBM (Inclusion Body Myositis) συμβολίζεται και ως hIBM (Hereditary Inclusion Body Myositis)² αφού είναι κληρονομική ασθένεια και μεταβιβάζεται στις επόμενες γενεές. Είναι σπάνιο νόσημα που αποτελείται από ετερογενή ομάδα παθήσεων με ποικίλα συμπτώματα και κύριο χαρακτηριστικό τη μυϊκή αδυναμία. Κληρονομείται είτε με αυτοσωμικό επικρατή είτε με υποτελή τρόπο³.

Η IBM χωρίζεται σε πολλούς τύπους οι περισσότεροι από τους οποίους παραμένουν ακόμη άγνωστοι ως προς το γενετικό τους υπόστρωμα. Δύο τύποι έχουν μελετηθεί περισσότερο και είναι γνωστά και τα γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεση τους:

- IBM₂, που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο GNE και κληρονομείται με αυτοσωμικό υποτελή τρόπο.
- IBM₃, που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο MYH2 και κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο.

Η IBM έχει χαρακτηριστεί στους τετρακέφαλους μύες. Θεωρείται η συνηθέστερη φλεγμονώδης μυοπάθεια των νεαρών ενηλίκων. Η έναρξη της

νόσου είναι ήπια και η πορεία της βραδέως προοδευτική. Συνήθως εμφανίζεται ανάμεσα στην 4^η και 5^η δεκαετία της ζωής⁶ και προσβάλλει συχνότερα τους άνδρες σε αναλογία 2:1. Τα προσβεβλημένα άτομα καθίστανται κινητικά ανάκανα περίπου 20 χρόνια μετά την εμφάνιση της ασθένειας, κυρίως ως αποτέλεσμα της αδυναμίας να περπατήσουν και τότε καθλώνονται συνήθως σε αναπηρική καρέκλα⁷.

IBM₃

➤ Κλινικά Χαρακτηριστικά^{1,8,9}:

Με βάση τα συμπτώματα των ασθενών της οικογένειας που διερευνήσαμε καταλήξαμε στον τύπο IBM₃. Τα συμπτώματα αυτά είναι τα εξής:

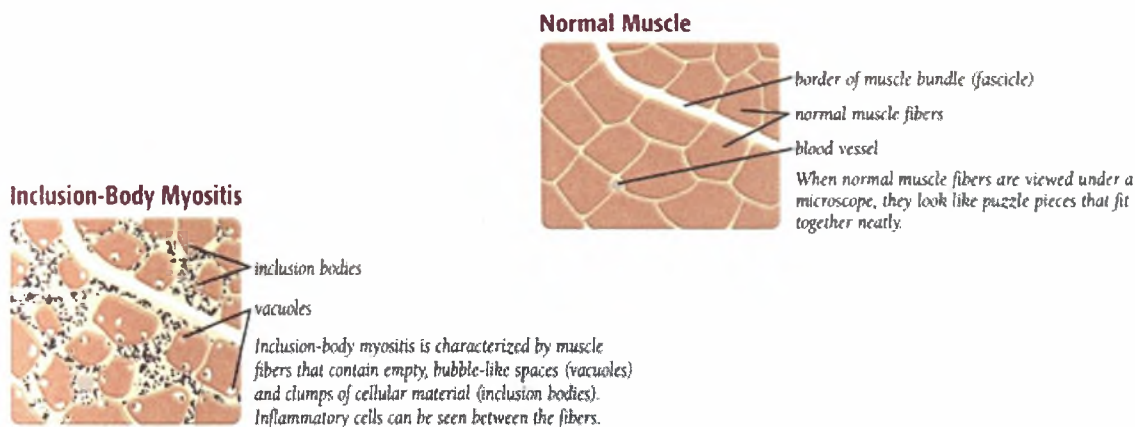
- Ασύμμετρη προσβολή των τετρακέφαλων μυών και των μυών του αντιβραχίου (καμπτήρων καρπού και δακτύλων)
- Αδυναμία της ραχιαίας κάμψης του πέλματος
- Δυσφαγία
- Ενδείξεις πολυνευροπάθειας
- Κρεατινική κινάση (CK) φυσιολογική ή μέτρια αυξημένη
- Εκ γενετής σύσπαση αρθρώσεων
- Εξωτερική οφθαλμοπληγία
- Επικρατούσα κεντρική μυϊκή αδυναμία με ασυνήθιστη μυϊκή παθολογία, περιλαμβανομένων περιγεγραμμένων κενοτοπίων 15-20nm με νηματοειδή έγκλειστα (κυτοπλασματικά και ενδοπυρηνικά)
- Κεντροαξονική μυϊκή αδυναμία



- Δυστροφικές μυϊκές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένου της διακύμανσης του μεγέθους των ινών
- Εστιακή αποδιοργάνωση των μυϊκών ινών μυοσίνης στους σκελετικούς μυς στην παιδική ηλικία
- Τρέμουλο χεριών
- Συχνοί κεντρικοί πυρήνες
- Αύξηση του ενδιάμεσου συνδετικού ιστού
- Περιστασιακά έγκλειστα congenital
- Συσσώρευση ουβικουιτίνη
- Έγκλειστα που δείχνουν ανοσοαντίδραση με ένα αντίσωμα σε υπερφωσφορυλιωμένο ταυ (SMI-31)

Στο ΗΜΓράφημα καταγράφονται μυοπαθητικά και απονευρωτικά ευρήματα. Η βιοψία μυός εμφανίζει φλεγμονώδεις διηθήσεις, ηωσινόφιλα κυτταροπλασματικά έγκλειστα και περιγεγραμμένα κενοτόπια με βασεόφιλη παρυφή. Η νόσος, που η παθογένειά της παραμένει αδιευκρίνιστη, δεν ανταποκρίνεται ικανοποιητικά στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή, ανοσοκατασταλτικά ή ενδοφλέβια γ-σφαιρίνη.

Για να παρατηρηθούν οι διαφορές στους μύες ανάμεσα σε φυσιολογικά άτομα και σε άτομα με IBM βάφονται τομές χαλαρωμένων μυών με διάφορες διαδικασίες. Πραγματοποιείται ανάλυση με έμμεσο ανοσοφθορισμό και ανοσοσύπωμα σκελετικών μυών και το αποτέλεσμα παρατηρείται με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο¹⁰.



Η συγκεκριμένη πάθηση έχει παρόμοια συμπτώματα με άλλες κληρονομικές μυοπάθειες, όπως¹¹:

- Οφθαλμοφαρυγγική μυϊκή δυστροφία
- Οφθαλμοφαρυγγική μυϊκή δυστροφία με distal μυοπάθεια
- Περιφερική μυοπάθεια Welander
- Κνημιαία μυϊκή δυστροφία
- Περιφερική μυοπάθεια με περιγεγραμμένα κενोटόπια (DMRV)

➤ Γενετική Αιτιολογία

Μετά την παρατήρηση των εξωτερικών συμπτωμάτων στον ασθενή γίνεται έλεγχος των ινών τύπου 2A. Οι μη φυσιολογικές ίνες αποτελούν κύρια ένδειξη για διερεύνηση του γονιδίου MYH2A, αφού είναι η κύρια ισομορφή στις συγκεκριμένες ίνες.

Γενετική ανάλυση των ασθενών που ανήκαν στον τύπο IBM₃ έδειξαν ότι ο τύπος αυτός οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο MYH2. Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί μυοσίνη βαριάς αλυσίδας IIa (myosin, heavy polypeptide 2, skeletal muscle, adult)⁴. Συνώνυμα σύμβολα του είναι: MYH2A, MYHSA2, MYHAS8, MyHC-2A, MyHC-IIa, MHC-IIa⁵.

Γονίδιο MYH2

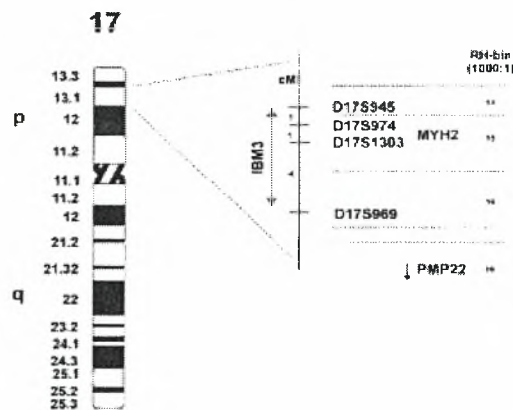
Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17, στην περιοχή 17p13.1. Έχει μέγεθος 26,77kb και αποτελείται από 38 εξόνια. Το γονίδιο αυτό εκφράζεται σε διαφορετικά συστήματα και όργανα: πεπτικό σύστημα (στόμα, γλώσσα και φάρυγγας), αναπνευστικό σύστημα (αναπνευστικά όργανα και λάρυγγας). Επίσης, εκφράζεται στο μυϊκό σύστημα στους ραβδωτούς και σκελετικούς ιστούς³.

Η περιοχή του γονιδίου που συνδέθηκε με το χρωμοσωμικό τόπο της IBM₃ είναι η περιοχή από το δείκτη D17S1353 μέχρι το δείκτη D17S921. Μετά την ανάλυση του απλοτύπου της οικογένειας για την περιοχή D17S1353-D17S921 (linkage analysis), η ερευνητική ομάδα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο IBM₃ βρίσκεται σε μια περιοχή μεταξύ των δεικτών D17S945 και D17S969. Η περιοχή αυτή υπολογίστηκε περίπου 6cM, σύμφωνα με το γενετικό χάρτη.

Ο χρωμοσωμικός τόπος της IBM₃ βρίσκεται σε μια χρωμοσωμική περιοχή 2-Mb και το σύμπλεγμα MHC, το οποίο αποτελείται από έξι τουλάχιστον γονίδια, βρίσκεται επίσης στην ίδια περιοχή. Έτσι η πιθανότητα ένα από τα MHC γονίδια, που δεσμεύονται σ' αυτή την περιοχή, να σχετίζεται με τη συγκεκριμένη πάθηση ήταν αυξημένη.

Έγινε ανάλυση τεσσάρων πολυμορφικών δεικτών: D17S969, D17S1303, D17S974 και D17S945. Στην ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν STS δείκτες για ένα μέλος των γονιδίων μωσίνης βαριάς αλυσίδας (MHC), το MYH2, και για το γονίδιο PMP22 (εμπλέκεται στην ασθένεια Charcot-Marie-Tooth, χρησιμοποιείται σαν control). Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι η απόσταση μεταξύ των δεικτών D17S969 και D17S945 είναι περίπου 2Mb και ανάμεσα στους δείκτες αυτούς βρίσκονται οι δείκτες D17S1303 και D17S974. Το γονίδιο PMP22

βρέθηκε πολύ πιο χαμηλά από την περιοχή αυτή, όπως φαίνεται και από την παρακάτω εικόνα⁹.



Πρέπει να αναφέρουμε ότι εκτός από το MYH2, το οποίο σχετίζεται με τη μυοπάθεια με έγκλειστα, και κάποια άλλα γονίδια MHC σχετίζονται με πολλές άλλες ασθένειες. Για παράδειγμα, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα, το γονίδιο MYH3¹² συνδέεται με τα σύνδρομα Freeman Sheldon (FSS)¹³ και Sheldon-Hall (SHS)¹⁴ και το γονίδιο MYH8¹⁵ συνδέεται με το Carney complex associated to trismus-pseudocamptodactyly (CNCTP)¹⁶ και το σύνδρομο Trismus-pseudocamptodactyly (TPCS)¹⁷.

Diseases associated with mutations in skeletal muscle myosin heavy chains

Protein Gene	Disease	Major clinical characteristics	Skeletal muscle morphology
MyHC IIa MYH2	Autosomal dominant myopathy with congenital joint contractures, ophthalmoplegia and rimmed vacuoles	Congenital joint contractures Ophthalmoplegia Mild proximal muscle weakness in childhood Progressive course in adults	Small and few type 2 fibers with structural alterations in childhood Dystrophic changes and rimmed vacuoles in adults with progressive course
Embryonic MyHC MYH3	Freeman Sheldon syndrome Sheldon Hall syndrome	Congenital joint contractures with predominant distal involvement (Distal arthrogryposis) and facial dysmorphism	Not described
MyHC I (β-cardiac MyHC) MYH7	Familial hypertrophic/dilated cardiomyopathy	Cardiac failure Sudden cardiac death	Irregular staining in NADH-TR in some individuals
	Lainig early onset distal myopathy	Onset in childhood. Slowly progressive with initial weakness of ankle dorsiflexion and "hanging big toe" sign	Variable Hypotrophic type I fibers Dystrophic changes and rimmed vacuoles in some cases
	Myosin storage myopathy	Onset from childhood to middle age. Weakness of limb girdle, scapulothoracic or distal muscles. Mild weakness or severe weakness affecting ambulation	Subsarcolemmal accumulation in type I fibers of hyaline material that reacts with antibodies to myosin but not to desmin The inclusions are unstained in NADH-TR
Perinatal MyHC MYH8	Trismus and pseudocamptodactyly syndrome	Congenital contractures of hands, feet and jaws with trismus and hand and foot deformities with pseudocamptodactyly	Not described

Μεταλλάξεις:

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου MYH2 που έχουν ανακαλυφθεί και δημοσιευτεί μέχρι σήμερα αναφέρονται στον πίνακα που ακολουθεί¹⁸:

Αύξον αριθμός	Αλλαγή κωδικονίου	Αλλαγή αμινοξέος	Αριθμός κωδικονίου	Φαινότυπος	Βιβλιογραφία
CM003157	gGAA-AAA	Glu-Lys	706 (ex.17)	IBM	Martinsson (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97, 14614
CM051560	gGTT-ATT	Val-Ile	970 (ex.21)	IBM	Tajsharghi (2005) Eur J Hum Genet 13, 617
CM051561	aCTT-GTT	Leu-Val	1061 (ex.23)	IBM	Tajsharghi (2005) Eur J Hum Genet 13, 617

- Η πρώτη μετάλλαξη είναι ετερόζυγη μη συνώνυμη στο εξόνιο 17, νουκλεοτίδιο 2116, G → A, μετατροπή Glu-706 (αρνητικό-όξινο γλουταμινικό οξύ) → Lys (θετική-αλκαλική λυσίνη) (E706K). Η Glu-706 βρίσκεται στην περιοχή SH1 της έλικας στον πυρήνα της κεφαλής της μυοσίνης. Η περιοχή αυτή έχει κύρια σημασία για τη λειτουργία της μυοσίνης. Η μετάλλαξη αυτή οδηγεί σε αυτοσωμική επικρατούσα μυοπάθεια¹⁹.
- Η δεύτερη μετάλλαξη είναι μετατροπή της αζωτούχας βάσης G → A στο κωδικόνιο 970 και κατ' επέκταση μετατροπή του αμινοξέος Βαλίνη (ουδέτερο αμινοξύ) → Ισολευκίνη (ουδέτερο αμινοξύ).
- Και τέλος, η τρίτη μετάλλαξη είναι μετατροπή της αζωτούχας βάσης C → G στο κωδικόνιο 1061 και κατ' επέκταση μετατροπή του αμινοξέος Λευκίνη (ουδέτερο αμινοξύ) → Βαλίνη (ουδέτερο αμινοξύ)²⁰.

- Οι μη συνώνυμες μεταλλάξεις των MyHC γονιδίων μπορούν να προκαλέσουν αρνητικά επικρατείς επιπτώσεις στην λειτουργία των μυών με διάφορους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένων της παρεμβολής με συναρμολόγηση ινών και δομής σαρκομεριδίου, λειτουργικές ανωμαλίες στη δραστηριότητα της ΑΤΡάσης, μειωμένη αλληλεπίδραση μυοσίνης-ακτίνης και διατάραξη των δομικών αλλαγών κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης ΑΤΡ.

Υλικά και Μέθοδοι

ΥΛΙΚΑ

Αντιδραστήρια

- Πηκτές αγαρόζης -
πολυακρυλαμιδίου:

Polyacrylamide

Acrylamide Solution

TBE

APS

TEMED

Agarose

bioAtlas - PCR marker

PhiX - marker

Bromophenol Blue

Xylene Cyanol

Ethidium Bromide

Tris Base

- Ανάλυση αλληλουχίας

DNA/Fragment reagents

Beckman Coulter:

Chloroform

SDS

Ready mix

EDTA

Glycogen

Sodium Acetate

Ethanol 100%

Size Standard 400

SLS

- Ανάλυση PCR:

PCR Buffer

dNTPs mix

Primers

DMSO 100%

DNA Πολυμεράσες

AmpliTaq

AmpliTaq-Gold

ExoSAP-IT

Συσκευές

Gradient Biometra

MJR PCR Machine

Biometra PCR Machine

Centrifuge

Beckman Coulter 8000

Συσκευές ηλεκτροφόρησης αγαρόζης
και πολυακρυλαμιδίου

ΜΕΘΟΔΟΙ

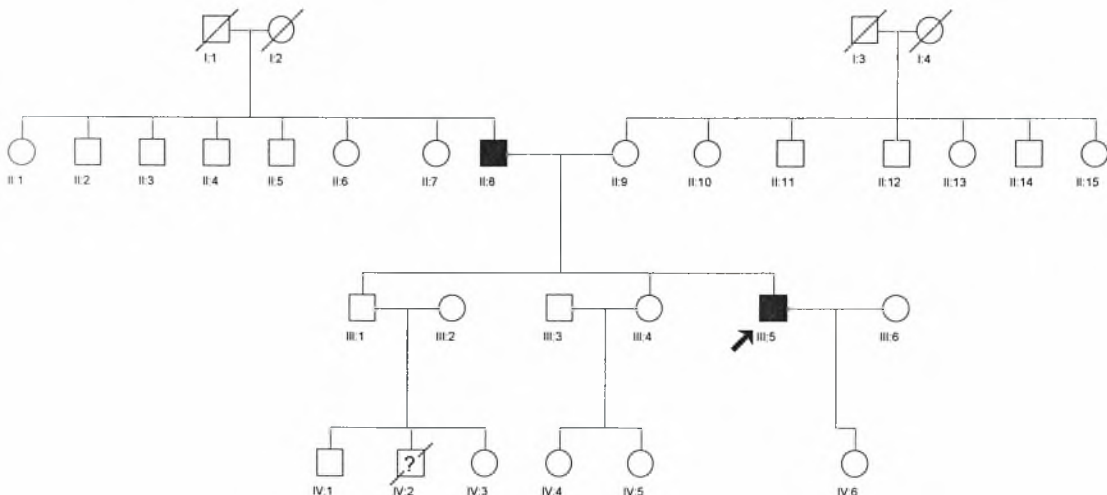
1. Λήψη δειγμάτων DNA
2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Agarose Gel Electrophoresis)
4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
5. Ανάλυση με μικροδορυφορικούς δείκτες (Fragment Analysis)
6. Αλληλούχιση DNA ακολουθιών σε αυτόματο αναλυτή (Sequencing)

Λήψη δειγμάτων DNA

Η οικογένεια που μελέτησα κατάγεται από την Κύπρο και συγκεκριμένα από την επαρχία της Πάφου. Στη μελέτη μου έγινε διερεύνηση πέντε ατόμων της οικογένειας: του proband που πάσχει από IBM, του πατέρα του που επίσης πάσχει από την ίδια ασθένεια, καθώς και της μητέρας, του αδερφού και της αδερφής του, οι οποίοι είναι υγιείς.

Η διαδικασία που ακολούθησα για τη μοριακή διερεύνηση της συγκεκριμένης οικογένειας, ουσιαστικά ήταν:

- λήψη δειγμάτων DNA των πέντε μελών της οικογένειας από την τράπεζα DNA του Τμήματος Νευρογενετικής του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου.
- ενίσχυση μικροδορυφορικών δεικτών, οι οποίοι συνδέονται με το γονίδιο MYH2, με χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).
- ανάλυση των μικροδορυφορικών δεικτών (fragment analysis) και δημιουργία των απλοτύπων των πέντε συγκεκριμένων ατόμων.
- ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου MYH2 για την εύρεση μεταλλάξεων, στις οποίες πιθανόν οφείλεται ο φαινότυπος των ασθενών.



Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR - Polymerase Chain Reaction)²¹

Η PCR είναι μία τεχνική η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη μοριακή βιολογία και στη βιοχημεία²². Έχει πάρει το όνομά της από ένα αντιδραστήριο που λαμβάνει μέρος στην αντίδραση αυτή, την DNA πολυμεράση, η οποία είναι ένζυμο που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση ενός τμήματος DNA. Η PCR είναι μία in vitro μέθοδος. Οδηγεί στην απομόνωση και στον πολλαπλασιασμό μιας γνωστής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μέχρι και δισεκατομμύρια φορές μετά από 30-40 κύκλους²³. Οι περισσότερες εφαρμογές της PCR χρησιμοποιούν θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση - Taq DNA πολυμεράση - και θερμοκυκλοποιητή²⁴.

Για την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης PCR απαιτούνται τα εξής συστατικά και αντιδραστήρια²⁵:

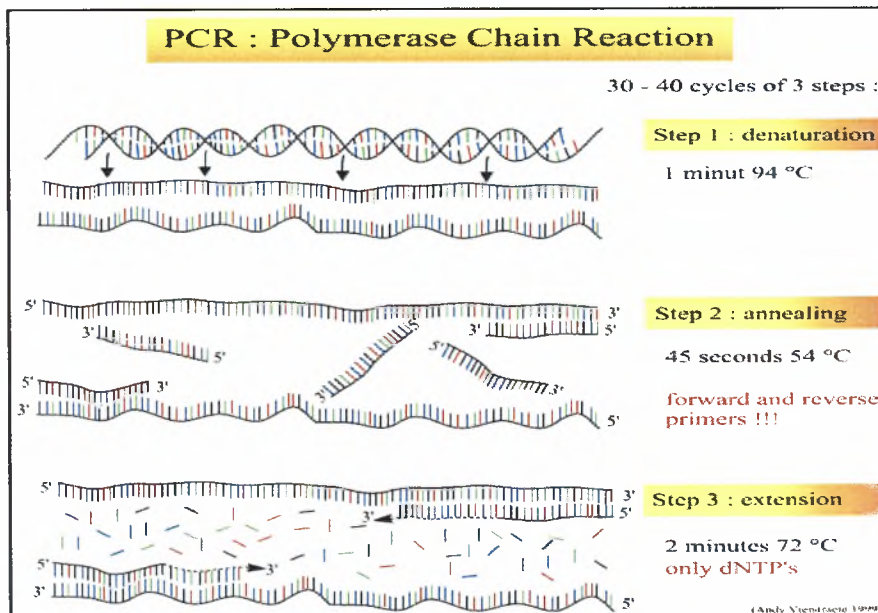
- μία αλυσίδα DNA, στην οποία περιέχεται η περιοχή που μας ενδιαφέρει και θα ενισχυθεί. Χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο για την εκθετική αναπαραγωγή του συγκεκριμένου κομματιού.
- δύο εκκινητές, εμπρόσθιος και ανάστροφος, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί στα 5' και 3' άκρα της αλληλουχίας που θα ενισχυθεί
- θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, όπως η Taq DNA πολυμεράση
- τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)
- ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο παρέχει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη διεξαγωγή της PCR
- κατιόντα μαγνησίου Mg^{2+} , τα οποία ενισχύουν τη δράση της DNA πολυμεράσης

- DMSO, το οποίο λειτουργεί ως σταθεροποιητής της πολυμεράσης κατά την αντιγραφή του DNA

Η PCR πραγματοποιείται σε όγκο αντίδρασης 15-100μl σε μικρούς σωλήνες Eppendorf™, μέσα σε θερμοκυκλοποιητές. Ο θερμοκυκλοποιητής επιτρέπει τη θέρμανση και ψύξη των σωλήνων στους οποίους πραγματοποιείται η αντίδραση, ρυθμίζοντας τη θερμοκρασία σε κάθε στάδιο της αντίδρασης. Η PCR συνήθως πραγματοποιείται σε 20-35 κύκλους.

Ένας πλήρης κύκλος μιας αντίδρασης PCR περιλαμβάνει τρία στάδια²²:

1. Αποδιάταξη του DNA
2. Υβριδοποίηση των εκκινητών στο DNA εκμαγείο
3. Επιμήκυνση των εκκινητών



Τα στάδια της PCR²⁵

Σε μια τυπική αντίδραση, πραγματοποιείται αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στο στάδιο έναρξης με θέρμανση στους 94-96°C για 1-9 λεπτά. Το στάδιο της αποδιάταξης, που αποτελεί το πρώτο βήμα των κυκλικών γεγονότων θέρμανσης και ψύξης, γίνεται σε θερμοκρασία 94-98°C για 30 δευτερόλεπτα-1 λεπτό. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται σπάσιμο των υδρογονικών δεσμών και κατ' επέκταση αποδιάταξη της δίκλωνης αλυσίδας του DNA. Στη συνέχεια, στο στάδιο υβριδισμού εκκινητών, οι εκκινητές σε περίσσια υβριδίζονται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με ψύξη του δείγματος στους 50-65°C για 30 δευτερόλεπτα-1 λεπτό. Η πολυμεράση συνδέεται στο υβρίδιο του εκκινητή και της μονόκλωνης αλυσίδας και αρχίζει τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA χρησιμοποιώντας το 3' ελεύθερο άκρο του εκκινητή. Ακολουθεί επώαση στους 72°C για το στάδιο επιμήκυνσης των εκκινητών από μία θερμοάντοχη πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων. Η πολυμεράση συνθέτει μια νέα αλυσίδα DNA, προσθέτοντας dNTPs, τα οποία είναι συμπληρωματικά στη μονόκλωνη αλυσίδα του DNA, με κατεύθυνση 5' → 3'. Το επόμενο στάδιο είναι το στάδιο τελικής επιμήκυνσης, το οποίο λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία επίσης 72°C για 5-15 λεπτά και συμβαίνει μετά τον τελευταίο κύκλο της PCR, επιβεβαιώνοντας ότι οποιαδήποτε μονόκλωνη αλυσίδα DNA θα επεκταθεί πλήρως. Τέλος, έχουμε το τελικό στάδιο σε θερμοκρασία 4°C για ακαθόριστο χρονικό διάστημα, επιτρέποντας την προσωρινή αποθήκευση της αντίδρασης²⁶.

Πρόγραμμα PCR:

Αρχική αποδιάταξη DNA: 94°C για 5 λεπτά

Αποδιάταξη DNA: 94°C για 45 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός: 56-59°C (ανάλογα με τους εκκινητές) για 45 δευτερόλεπτα

Επέκταση: 72°C για 1 λεπτό

Τελική επέκταση για ολοκλήρωση: 72°C για 7 λεπτά

Διατήρηση: 4°C → pause

Ποσότητα DNA: 1μl

Κύκλοι: ανάλογα με τα αντιδραστήρια

Βασικοί παράγοντες για την επιτυχία της αντίδρασης της PCR είναι οι εκκινητές, οι οποίοι θα σχεδιαστούν ώστε να υβριδίζονται σε συγκεκριμένα σημεία του DNA, καθώς και η θερμοκρασία υβριδοποίησης.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η πολύ μεγάλη ευαισθησία της αλλά και η ταχύτητά της. Τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά καθώς και η ευρωστία της, κάνουν την PCR σημαντική μέθοδο κλωνοποίησης²⁷. Θεωρητικά, ένα μόριο DNA στο υπό διερεύνηση υλικό αρκεί για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Ωστόσο, αυτό είναι και το μειονέκτημα της μεθόδου, καθώς η παρουσία στο βιολογικό υλικό ελάχιστης ποσότητας προσμίξεων από ξένο γενετικό υλικό αρκεί για να δώσει η αντίδραση PCR ψευδές αποτέλεσμα²⁸.

Οι εφαρμογές της PCR εκτείνονται από την ανίχνευση και τυποποίηση παθογόνων παραγόντων, με ιδιαίτερη έμφαση στους ιούς και την ανίχνευση μεταλλάξεων σε κρίσιμα γονίδια που σχετίζονται με την καρκινογένεση ή την κληρονομική προδιάθεση ασθενειών, μέχρι και τη μελέτη έκφρασης γονιδίων, τη γονοτυπική ανάλυση αντιγόνων ιστοσυμβατότητας και άλλα.

Η PCR αποτελεί μια πρόσφατη επαναστατική ανακάλυψη της Μοριακής Βιολογίας, η οποία σταδιακά αποκτά συνεχώς διευρυνόμενες κλινικές και

διαγνωστικές εφαρμογές. Εφαρμόστηκε αρχικά από τον εφευρέτη Kary Mullis το 1983, ο οποίος τιμήθηκε με το βραβείο Nobel Χημείας το 1993.

Εκκινητές

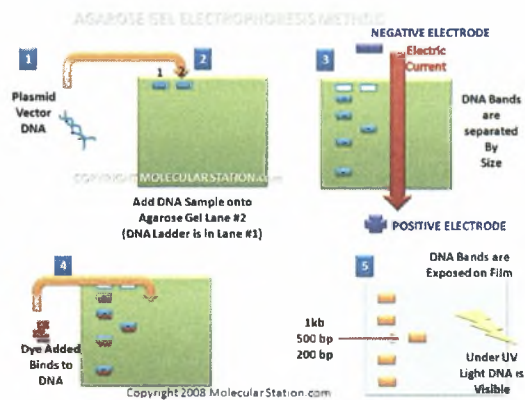
Οι κατάλληλοι εκκινητές για κάθε περιοχή σχεδιάστηκαν με τη χρήση διαδικτυακών αλγορίθμων, όπως Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), NCBI - BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) και ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html>).

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού μορίων ή σωματιδίων με πολλές εφαρμογές στην μοριακή βιολογία, βιοχημεία, πρωτεϊνική χημεία, φαρμακολογία, εγκληματολογία κ.α. Χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό της καθαρότητας ενός δείγματος, ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο, προσδιορισμό μοριακού βάρους (Μ.Β.) ενώ ως δείγματα μπορεί να είναι οτιδήποτε μπορεί να κουβαλάει φορτίο - από ολόκληρα κύτταρα έως πρωτεΐνες, πεπτίδια, νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA), αμινοξέα, φαρμακευτικές ουσίες, οργανικά οξέα και βάσεις και πολλά άλλα.

Η βασική αρχή στηρίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, μέσα σε υδατίνα διαλύματα και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (κινητικότητα). Η κινητικότητα αυτή εξαρτάται από την σταθερά ρK και το μοριακό βάρος του φορτισμένου σωματιδίου ενώ άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα είναι το pH και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, η θερμοκρασία καθώς και η φύση του υλικού μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση²⁹.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης αποτελεί μια διαδικασία που ακολουθεί τις αντιδράσεις PCR, για ποιοτικό προσδιορισμό των συγκεκριμένων



αντιδράσεων. Χρησιμοποιείται για επιβεβαίωση της ενίσχυσης προϊόντων που χρησιμοποιούσαμε κατά την αλληλούχιση.

Η πηκτή, που περιείχε βρωμιούχο αιθύλιο (EtBr), εισαγόταν σε οριζόντιες δεξαμενές. Μέσα από την πηκτή, διαπερνούσε ηλεκτρικό ρεύμα 130Volts, το οποίο ανάγκαζε το αρνητικά φορτισμένο DNA, να μετακινηθεί από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο. Η ηλεκτροφόρηση αυτή οδηγούσε σε διαχωρισμό των τμημάτων του DNA ανάλογα με το μέγεθός τους. Κομμάτια DNA μικρότερου μεγέθους κινούνται γρηγορότερα από κομμάτια μεγαλύτερου μεγέθους³⁰. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με βάση κάποιο μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA.

Στη συνέχεια, με τη χρήση συσκευής με UV ακτινοβολία, η οποία ανιχνεύει το βρωμιούχο αιθύλιο, οπτικοποιούσαμε το DNA και αποτυπώναμε τα αποτελέσματά μας σε φωτογραφικό χαρτί. Το DNA οπτικοποιείται στην πηκτή αгарόζης με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιλίου. Το αντιδραστήριο αυτό συνδέεται ισχυρά με το DNA παρεμβαίνοντας ανάμεσα στις βάσεις και είναι φθορίζον, δηλαδή απορροφά το αόρατο υπεριώδες φως και εκπέμπει την ενέργεια ως ορατό πορτοκαλί φως³¹.

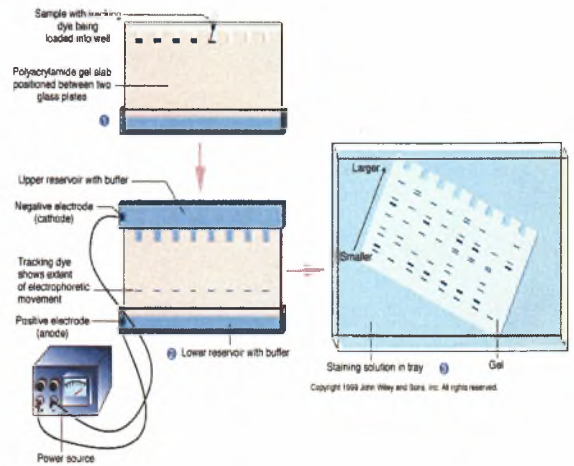
Η πηκτή παρασκευάζεται με διάλυση 2,25γρ. αгарόζης σε 200ml 1X TBE, το οποίο αποτελείται από Tris, βορικό οξύ και EDTA. Το διάλυμα αυτό θερμαίνεται για 3-4 λεπτά μέχρι την πλήρη διάλυση της αгарόζης και αφήνεται για λίγο σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί η προσθήκη 4μl EtBr, το οποίο δεσμεύεται στο δίκλωνο DNA, και γρήγορη ανάδευση. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ειδικό δίσκο για τη δημιουργία πηκτής και η προσθήκη πλαστικών χτενών οδηγεί στη δημιουργία κελιών, μέσα στα οποία γίνεται η φόρτωση του DNA.

Για την παρατήρηση της μετακίνησης των τμημάτων του DNA κατά την εξέλιξη της ηλεκτροφόρησης γίνεται ανάμιξη του με χρωστική κυανού της

βρωμοφαινόλης, πριν τη μεταφορά του DNA στα κελιά. Η χρωστική αυτή προκαλεί επίσης αύξηση του ειδικού βάρους των προϊόντων της PCR, η οποία οδηγεί στην ευκολότερη κατακάθεισή τους στα κελιά της πηκτής και στην αποτροπή της διάχυσής τους στο ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου είναι μια μήτρα διαχωρισμού που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση βιομορίων, όπως πρωτεΐνες ή τμήματα DNA, καθώς και για τον προσδιορισμό του μοριακού τους βάρους. Σε παραδοσιακές τεχνικές αλληλούχισης DNA, όπως οι μέθοδοι Maxam-Gilbert ή Sanger χρησιμοποιούνται



πηκτές πολυακρυλαμιδίου για το διαχωρισμό τμημάτων DNA που διαφέρουν κατά ένα ζεύγος βάσεων σε μήκος, ώστε η ακολουθία θα μπορούσε να διαβαστεί. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για ιδιαίτερα μικρά τμήματα DNA.

Σήμερα, χρησιμοποιείται πιο συχνά στον τομέα της ανοσολογίας και της ανάλυσης πρωτεϊνών, για το διαχωρισμό διαφορετικών πρωτεϊνών ή ισομορφών της ίδιας πρωτεΐνης σε ξεχωριστές ζώνες. Αυτά μπορούν να μεταφερθούν σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή μεμβράνη PVDF για να τρέξουν με αντισώματα και τους αντίστοιχους δείκτες, όπως σε ένα Western Blot. Η PAGE είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, όπου ηλεκτροφόρηση σημαίνει την εφαρμογή ενός ηλεκτρικού πεδίου για να πετύχει την κυκλοφορία σωματιδίων μέσω της πηκτής πολυακρυλαμιδίου²⁹.

Για την παρασκευή 12% πηκτής πολυακρυλαμιδίου σε Ντελικό = 20ml χρησιμοποιούμε:

- Διάλυμα ακρυλαμιδής (30% stock): 8ml
- TBE (10X): 2ml (1X)

- Νερό: μέχρι τα 20ml
- APS (10% stock): 200μl (1%)
- TEMED (100% stock): 20μl (1%)

Μετά τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, ηλεκτροφορούνται τα αποδιεταγμένα δείγματα με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος 1X.

Χρώση: Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση των πηκτών με βρωμιούχο αιθύλιο και στη συνέχεια πλύσεις με απεσταγμένο νερό.

Ανάλυση με μικροδορυφορικούς δείκτες (Fragment Analysis)

Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των γονιδιωμάτων είναι ότι περιέχουν αλληλουχίες οι οποίες, αν και μοιάζουν με δορυφόρους, επειδή αποτελούνται από διαδοχικές επαναλήψεις μιας μικρής μονάδας, είναι γενικά πολύ μικρότερες από αυτούς και αποτελούνται, π.χ. από 5-50 επαναλήψεις. Αυτές οι αλληλουχίες ανακαλύφθηκαν τυχαία, σε γονιδιακές



βιβλιοθήκες ανθρώπινου DNA, ως τμήματα των οποίων το μέγεθος διαφέρει από άτομο με άτομο. Από την εξέταση του DNA μεμονωμένων ατόμων φάνηκε ότι υπάρχει εκτεταμένη ποικιλότητα και ότι μέσα στον πληθυσμό μπορούν να βρεθούν πολλά διαφορετικά αλληλόμορφα, που διαφέρουν ως προς τον αριθμό των επαναλήψεων της επαναλαμβανόμενης μονάδας.

Οι δείκτες αυτοί χρησιμοποιούνται σήμερα επιτρέποντας μας να παρατηρήσουμε τα συγκεκριμένα μοτίβα τους, καθώς και τον τρόπο κληρονόμησης μιας γενετικής περιοχής σε μια οικογένεια. Η αρχή της μεθόδου είναι απλή. Αν ο γενετικός τόπος της ασθένειας είναι αρκετά κοντά σε έναν άλλο πολυμορφικό τόπο, του οποίου η κληρονόμηση μπορεί να ακολουθηθεί σε μια προσβεβλημένη οικογένεια, είναι δυνατό να προβλέψει κανείς ποιος πρόκειται να προσβληθεί από την ασθένεια, ακολουθώντας την κληρονόμηση του γενετικού τόπου-δείκτη.

Φθορίζοντα σεσημασμένα θραύσματα ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας τα Applied Biosystems 3130XL ή τον 3730 Genetic Analyzer ή τον Beckman Coulter Genetic Analyzer και στη συνέχεια ερμηνεύονται με το GeneMapper ή GeneMarker ή CEQ8000 λογισμικό ανάλυσης αντίστοιχα. Τέσσερις

διαφορετικού χρώματος χρωστικές φθορισμού μπορούν να ανιχνευθούν σε ένα δείγμα. Η μία χρωστική χρησιμοποιείται για ένα σεσημασμένο δείκτη μεγέθους - size standard που προστίθεται σε κάθε σειρά για να καταστεί δυνατή η σύγκριση των δειγμάτων από σειρά σε σειρά ή πηκτή σε πηκτή. Το λογισμικό ανάλυσης χρησιμοποιεί το δείκτη μεγέθους για να δημιουργήσει μια πρότυπη καμπύλη για κάθε σειρά και στη συνέχεια να καθορίσει το μήκος του κάθε σεσημασμένου με χρωστική θραύσματος συγκρίνοντας το με την καμπύλη αναφοράς για τη συγκεκριμένη σειρά. Ακρίβεια κάτω από μία διαφορετική βάση διακρίνεται μεταξύ των επαναλήψεων του δείγματος. Υψηλότερη απόδοση μπορεί να επιτευχθεί με πολυπλεγμένες διαφορετικές χρωστικές και διαφορετικά μεγέθη θραυσμάτων από κοινού³².

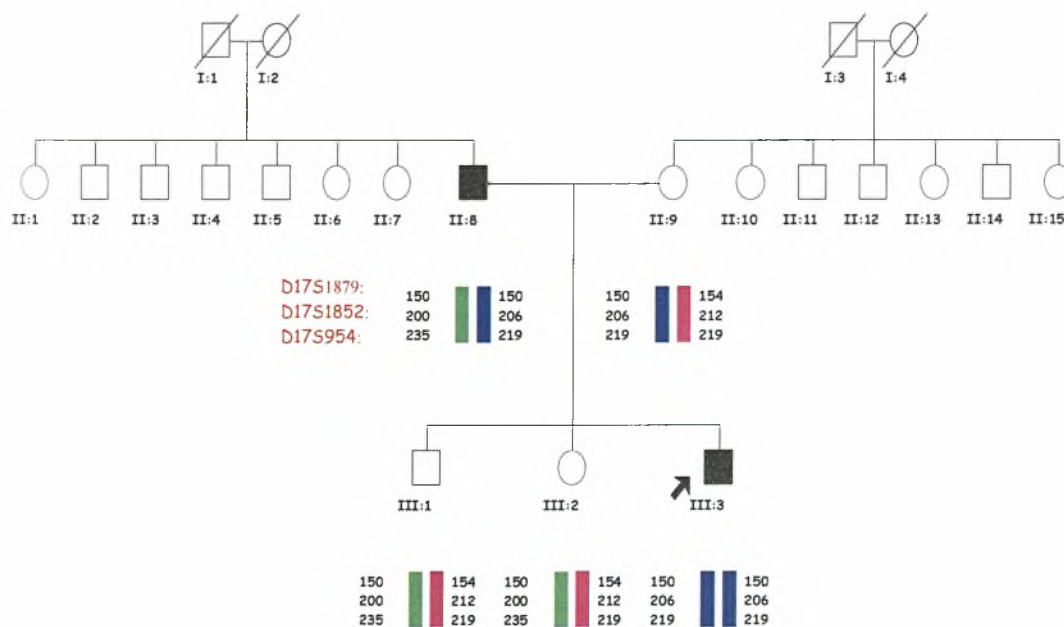
Για την επιμήκυνση των κομματιών DNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης με DNA πολυμεράση χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές, ο ένας από τους οποίους ήταν σεσημασμένος με συγκεκριμένη φθορίζουσα χρωστική, η οποία αναγνωρίζεται από τον αυτόματο αναλυτή. Η εύρεση του μήκους των δύο αλληλομόρφων για τον κάθε δείκτη γινόταν με τη βοήθεια αυτού του φθοροφόρου, το οποίο διεγείρεται από το laser της εκπομπής από τον ασύρματο αναλυτή και εκπέμπει σε ορισμένο μήκος κύματος. Η ανίχνευση αυτής της εκπομπής από τον ασύρματο αναλυτή, δίνει και το πραγματικό μήκος του κάθε αλληλομόρφου αφού πρώτα συγκριθεί με μία σειρά πρότυπων μεγεθών. Με αυτό τον τρόπο υπάρχει μια αντικειμενική και σίγουρα επαναλήψιμη μέτρηση των μεγεθών αυτών.

Η ανάλυση έγινε στον αυτόματο αναλυτή Beckman Coulter και χρησιμοποιήθηκαν τρεις πολυμορφικοί δείκτες: D17S1879, D17S1852, D17S954, τα χαρακτηριστικά των οποίων αναγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Δείκτης	Αλληλουχία Εκκινητή	Μέγεθος	Επαναλήψεις	Tm (°C)
D17S1879 F*	GAAGTTTACGAAAATTGCTGTC	22	δινουκλεοτιδίων (di) CA	59
D17S1879 R	AAGGGTAGTTCTGCGTGC	18		60
D17S1852 F*	TACAGTTTCTTGTGTGCC	19	δινουκλεοτιδίων (di) CA	59
D17S1852 R	AGTAACTCTGAGGACTTGCTCAT	23		60
D17S954 F*	ACCTCCATCATGTGGCT	17	δινουκλεοτιδίων (di) CA	59
D17S954 R	ATAAACGCCCGATTCTT	18		59

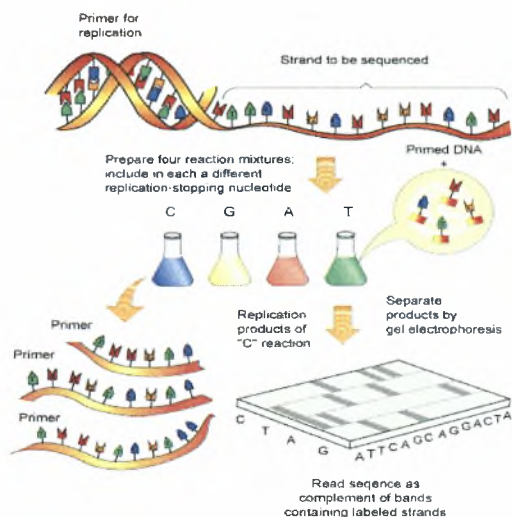
*: φθορίζον

Η σχεδίαση του γενεαλογικού δέντρου και η επεξεργασία των απλοτύπων έγινε με το λογισμικό Cytilliac V2.1.3.



Αλληλούχιση DNA ακολουθιών σε αυτόματο αναλυτή (Sequencing)

Ο όρος αλληλούχιση DNA αλληλουχιών αναφέρεται σε βιοχημικές μεθόδους, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της σειράς των νουκλεοτιδικών βάσεων σε μια αλληλουχία DNA. Η διαδικασία αυτή βρίσκει εφαρμογή σε διάφορες επιστήμες, τόσο της γενετικής όσο και της εξέλιξης, της βιοτεχνολογίας και της μοριακής βιολογίας³³.



Στη συγκεκριμένη εργασία, κύριος σκοπός ήταν η εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των 38 εξονίων του γονιδίου MYH2 στον ασθενή proband και η σύγκρισή τους με κάποια αλληλουχία αναφοράς που πήραμε από βάση δεδομένων, ώστε να βρούμε τη μετάλλαξη στην οποία οφείλεται η εκδήλωση της ασθένειας στο συγκεκριμένο άτομο.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την ανάλυση της αλληλουχίας των συγκεκριμένων εξονίων ήταν:

- Ενίσχυσή τους με PCR: με τη χρήση της αλληλουχίας αναφοράς του γονιδίου MYH2, σχεδιάσαμε τους εκκινητές, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των 38 εξονίων του συγκεκριμένου γονιδίου και την έπειτα αλληλούχισή του. Οι εκκινητές που σχεδιάσαμε αναφέρονται στον πίνακα που ακολουθεί.

ΕΞΟΝΙΟ (MYH2ex)	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ (5' → 3')	ΜΕΓΕ- ΘΟΣ	T _M (°C)	PCR PRODUCT (bp)
1F	CAACTGGGCCTATGAAATACAA	22	56,5	488
1R	CATGGCCATATCCTCGATCT	20	57,3	
2F	GTAGAATCCCAGGAGCTTGC	20	59,4	354
2R	TGCTGCAATGAAAGTGAAATG	21	54,0	
3F	AACAGGAAAGGTCTTTGGGTA	21	55,9	273
3R	TGCCTCGAGTCTCTTTCTCC	20	59,4	
4/5/6F	GCCCTAAAGGTTGCAAAGTC	20	57,3	625
4/5/6R	TGGGAATGAAAAAGATTCAGAGA	23	55,3	
7/8F	CACCTTTTTCTACCTGATGCAA	22	56,5	485
7/8R	AGGTTGGACTGTGCATTGAT	20	55,3	
9F	CTTCAGCCGGTCCCTCTATT	20	59,4	349
9R	CCATTTGCATCCTGGAATCT	20	55,3	
10F	TTGTCTCCCATTAGCACTGGT	21	57,9	400
10R	TTTCCCATTCACATTATTTAGG	23	55,3	
11/12F	TTTTTAAGGAAGTGGGTTTCTTTG	24	55,9	515
11/12R	TGGTAAGAAAAGGTCATAGTCTTCA	25	58,1	
13F	AAAGGCTCTTGGACACATATTTT	23	55,3	400
13R	GCCCATAGGCTAAAAAGCAG	20	57,3	
14F	AACCATATTTTGC GGCAACT	20	53,2	499
14R	TTCTGCCAGACCTAAGAGATCA	22	58,4	
15F	TTCAGGCTCAATCAGAGAGG	20	57,3	278
15R	TTCAGAAAAACAGACCCATGT	21	54,0	
16/17F	GCAGTCCATACTGGTCATTCAA	22	64,0	481
16/17R	TACTAAATTGTTTGCTTGCAAT	24	63,0	
18F	CCAAAGGGTTGACCATTCA	19	54,5	367
18R	CCTGTGAATGGAAAGAGTTGC	21	57,9	
19F	ATTTGGGCACACCAAGGTAA	20	55,3	369
19R	TTCCCACTTCATTATAGGACTCTT	24	57,6	
20F	AGGTGAAGCAGAACCTCCAA	20	57,3	442
20R	TGTCTCCCTTGCAATTACCC	20	57,3	
21F	TGCAGAAACATACTCTTATCCA	24	62,0	384
21R	TGCTATAAAGCACCTTTGTTGG	22	63,0	
22/23F	TAGAGGTTCTGCCACCCAAC	20	64,0	553
22/23R	CCTTTTAGAAAAGTAGCAAAGGACA	25	62,0	
24F	CCATAATGGACATTGAAAATGA	22	52,8	298
24R	TGGAAAATACAACTCAGCTTCTT	24	55,9	
25F	TGCAGAAGAAAATTAAGAATTGC	24	54,2	574
25R	AAAAAGTGCCCTGTGCAAAC	20	55,3	
26F	AACTGCAAAGGTGATTATTATTCG	24	55,9	280
26R	ATTAGGCTCCCACTTCACCA	20	57,3	
27F	AAAACCTGCATTGAGCATGA	20	53,2	328
27R	CAGGCTCCATGTAGAATCAGC	21	59,8	
28F	GAGCCTGTTATACCAGCTTTCAA	23	58,9	396

28R	GCAGATTAATGAGCATTTGTGG	22	56,5	
29F	GGGCAGCATTAATGTGAAGTT	21	55,9	393
29R	CACATTTCTGTTCCATTCTGC	22	56,5	
30F	GCCCTTGACAAAAAGCAAAG	20	55,3	353
30R	AGGGATTTGGTTAAACATGTGA	22	54,7	
31F	ACCCTGAAGCGAGAGAACAA	20	57,3	400
31R	GGTGACATTAGCAAGGAACCA	21	57,9	
32F	GCTGCTTTAGAAGAAGCAGAGG	22	60,3	595
32R	TCCAGGTGGATCTGGGTATC	20	59,4	
33F	CAAGGTAAATATGTCCAAGAGATGG	25	59,7	375
33R	GCTGTCTTATGAAAACCTCAGGCTTA	25	59,7	
34F	TTTTGACTTGCAAATTTTATCTGA	25	53,1	294
34R	CCAAGAAAGTTATAGATGTCAGGAA	25	58,1	
35F	CAGGCACACTTGTCCACTGA	20	59,4	348
35R	GCTCCCGTACCTGCAAATAA	20	57,3	
36F	GGGTGGGTCTCCCAATATCT	20	59,4	272
36R	CACATGACTATTGCATCATTGC	22	56,5	
37F	GGCTAAGCACTGGTTCGAAGT	20	59,4	290
37R	GCAGTAGTCTTTAAAGCAAACAGCTT	26	60,1	
38F	TCCCTAGATGTTGCTTCTCCA	21	57,9	485
38R	CACCAATTGAATGTGATTGTTTG	23	55,3	

- Καθαρισμός των προϊόντων της PCR με τη χρήση του ενζύμου *ExoSAP-IT*[®]: πριν από την αντίδραση αλληλούχισης είναι αναγκαίο τα προϊόντα των επιμέρους PCR να καθαρίζονται από υπολείμματα dNTPs και εκκινητών για να διαφυλάξουμε την καλή ποιότητα των αποτελεσμάτων μας. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούμε το ένζυμο *ExoSAP*, το οποίο έχει διπλή δράση εξωνουκλεάσης και φωσφατάσης. Ως αποτέλεσμα, η εξωνουκλεάση αποικοδομεί την περίσσεια των εκκινητών και η φωσφατάση αποφωσφορυλιώνει τα dNTPs. Η ποσότητα προϊόντος PCR που χρησιμοποιείται στην κάθε περίπτωση, προκύπτει αναλογικά συγκρίνοντας τη φωτεινότητα και το βάρος του μοριακού δείκτη (ladder) που χρησιμοποιείται όταν ηλεκτροφορούνται τα προϊόντα σε πηκτή αгарόζης με την αντίστοιχη φωτεινότητα του προϊόντος που έδωσε το υπό μελέτη κομμάτι. Για κάθε 2,5μl προϊόντων PCR που θα χρησιμοποιήσουμε στην κυκλική αντίδραση

αλληλούχισης, προσθέτουμε 1,2μl ενζύμου. Η αντίδραση γίνεται σε δύο στάδια, ένα πρώτο στάδιο ενεργοποίησης του ενζύμου στους 37°C για 15 λεπτά και ένα δεύτερο απενεργοποίησης του στους 80°C για 15 λεπτά³⁴.

- Κυκλική αντίδραση αλληλούχισης (Cycle Sequencing - CEQ): Η κυκλική αντίδραση αλληλούχισης έχει τα χαρακτηριστικά μιας PCR. Διαφέρουν στο ότι στην αντίδραση αλληλούχισης, χρησιμοποιείται μόνο ένας εκκινητής (F ή R), και το εκμαγείο δεν είναι γενωμικό αλλά προϊόν PCR. Η έλλειψη του ενός εκκινητή χρησιμεύει στην παραγωγή αντιτύπων μόνο του ενός από τους δύο κλώνους και η αντίδραση θεωρείται ως αριθμητικά αυξανόμενη. Στην κυκλική αλληλούχιση, εκτός από το προϊόν της PCR, προστίθεται επίσης εκκινητής 5'ppoles, ready mix και νερό.

- Καθαρισμός δειγμάτων με χρήση αιθανόλης: Μετά το τέλος της κυκλικής αντίδρασης αλληλούχισης, τα δείγματα καθαρίζονται με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις με αιθανόλη. Στα δείγματα προστίθεται stop solution, το οποίο αποτελείται από γλυκογόνο, EDTA και οξικό νάτριο (sodium acetate) και δεσμεύει το DNA. Ακολούθως με χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθανόλης (100% και 70%) και διαδοχικών φυγοκεντρήσεων, τα δείγματά μας καθαρίζονται. Μετά τον καθαρισμό με αιθανόλη προστίθεται SLS στα καθαρά πλέον δείγματα³⁵.

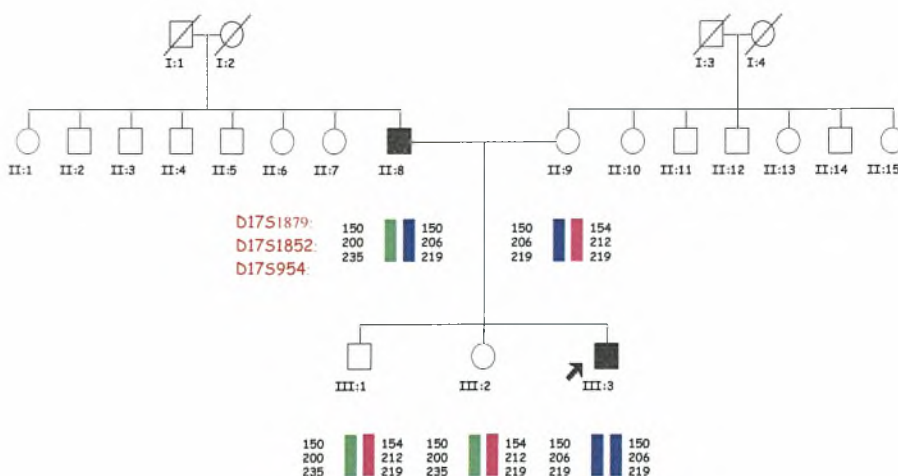
- Φόρτωση πιάτου στον αυτόματο αναλυτή και έναρξη αλληλούχισης: Τα διάφορα κομμάτια DNA που προκύπτουν, ηλεκτροφορούνται μέσα σε ένα πολυμερές και διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους. Τα μικρότερα κομμάτια εξέρχονται πρώτα και ακολουθούν τα μεγαλύτερα. Η φορά που ακολουθούν είναι από τον αρνητικό πόλο προς το θετικό. Όταν τα κομμάτια φτάσουν στο σημείο ανίχνευσης του σήματος, ο αυτόματος αναλυτής διεγείρει το κάθε φθοροφόρο με laser και με τη χρήση μιας CCD camera προσλαμβάνει το εκπεμπόμενο σήμα.

Συνεπώς, η νουκλεοτιδική αλληλουχία του κομματιού DNA, σχηματίζεται σταδιακά από το λογισμικό του αναλυτή, από την αρχή μέχρι το τέλος, με την αρχή να θεωρείται ο εκκινητής³⁶.

Αποτελέσματα

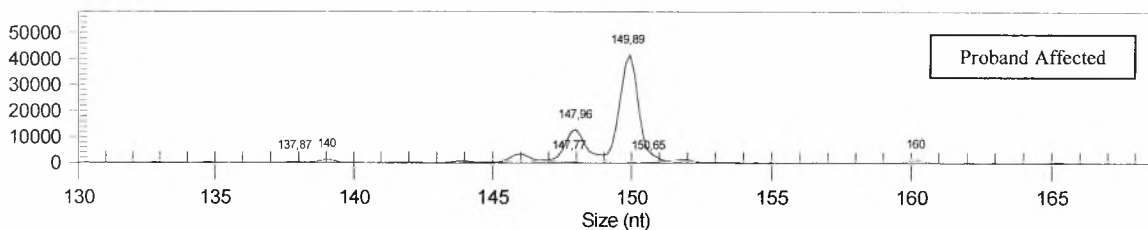
Σκοπός της εργαστηριακής άσκησης ήταν, όπως προαναφέρθηκε, η μοριακή διερεύνηση μιας οικογένειας, δύο μέλη της οποίας πάσχουν από το σύνδρομο HIBM (Hereditary Inclusion Body Myopathy).

Αρχικά, έγινε χρήση των δεικτών D17S974 και D17S1303 ανάμεσα στους οποίους βρίσκεται το γονίδιο MYH2. Η κατάλληλη θερμοκρασία υβριδοποίησης του δείκτη D17S1303 βρέθηκε με PCR Touchdown 55-60°C. Το ίδιο όμως δεν ήταν εφικτό για το δείκτη D17S974, για τον οποίο πραγματοποιήθηκαν πολλές και διαφορετικές διαδικασίες χωρίς κάποιο αποτέλεσμα, όπως PCR σε διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδοποίησης, DMSO, Touchdown PCR, Gradient PCR, ακόμα και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Τελικά οι συγκεκριμένοι δείκτες δεν μας έδωσαν αποτέλεσμα γι' αυτό και έγινε ανάλυση των μικροδορυφορικών δεικτών D17S1879, D17S1852 και D17S954, οι οποίοι βρίσκονται εκατέρωθεν του γονιδίου MYH2 στο χρωμόσωμα 17. Με τη μέθοδο αυτή δημιουργήσαμε τους απλότυπους των μελών της οικογένειας και βρήκαμε ότι ο ασθενής proband είναι ομόζυγος, όπως φαίνεται και από το γενεαλογικό δέντρο.

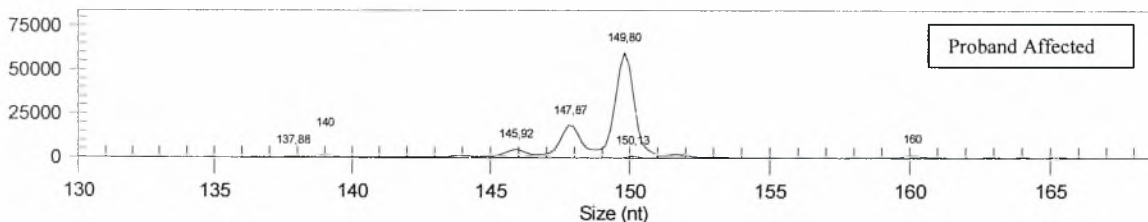


Ένα παράδειγμα των αποτελεσμάτων της ανάλυσης με μικροδορυφορικούς δείκτες (fragment analysis) φαίνεται παρακάτω. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα βλέπουμε το χρωμοσωμικό δείκτη D17S1879 σε σχέση με τα μέλη της οικογένειας που μελετήσαμε. Παρατηρούμε ότι όλα τα μέλη της οικογένειας έχουν μία ίδιου μεγέθους αλληλουχία. Όσον αφορά τη δεύτερη αλληλουχία, είναι ίδια μεταξύ ασθενή πατέρα και ασθενή γιου, και ίδια μεταξύ μητέρας και δύο άλλων παιδιών. Να διευκρινήσουμε ότι τα δύο πρώτα δείγματα που ανήκουν στον ασθενή proband είναι παρμένα διαφορετικές χρονιές.

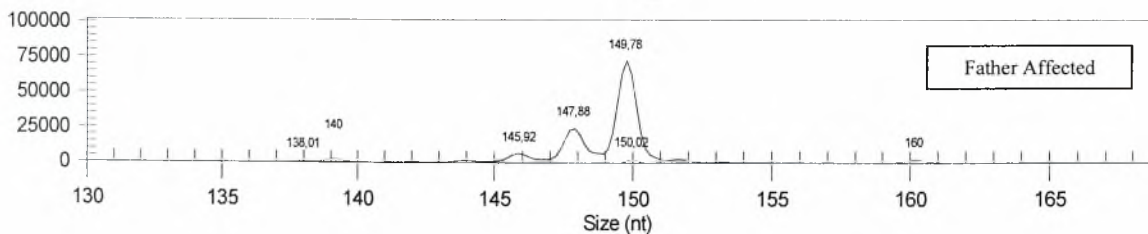
D17S1879 030188.A01_09042917PS



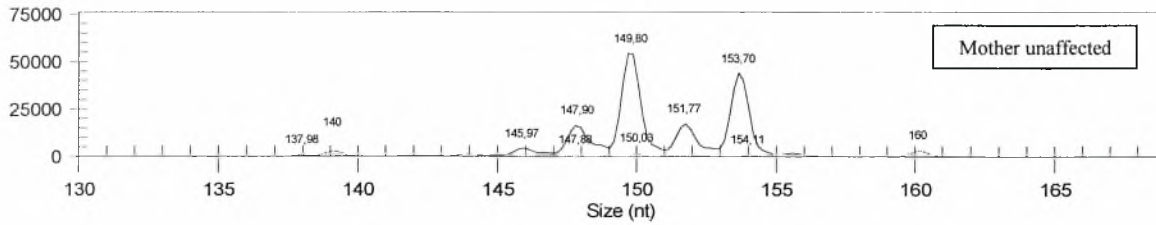
D17S1879 060339.B01_09042917PT



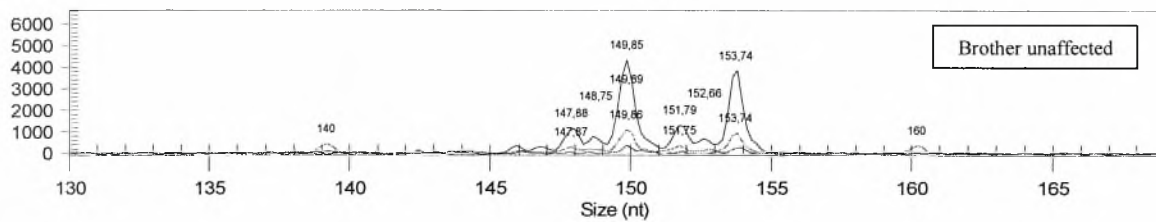
D17S1879 060358.C01_09042917PT



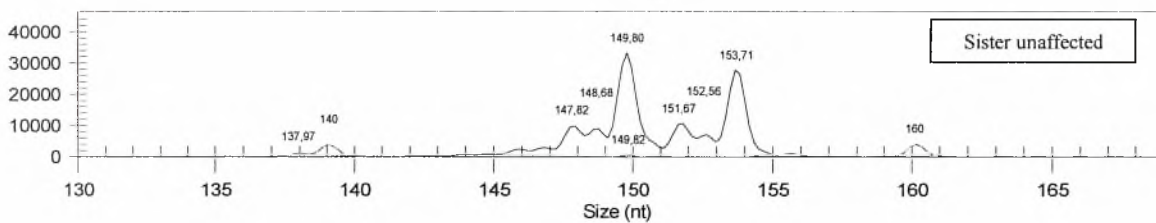
D17S1879 060359.D01_09042917PU



D17S1879 060362.F01_09042917PU



D17S1879 060361.E01_09042917PU

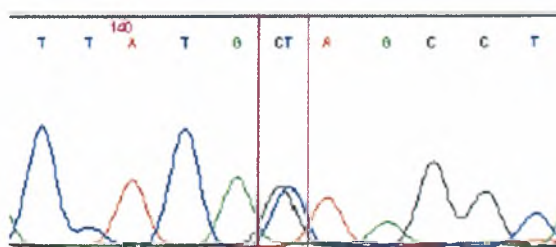


Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε νουκλεοτιδική αλληλούχιση του γονιδίου MYH2 στον ασθενή proband. Τα πρώτα εξόνια που αλληλουχήθηκαν ήταν τα εξόνια 16/17, 21 και 22/23 γιατί αυτά ήταν τα πιο πιθανά να έχουν κάποια μετάλλαξη, μιας και οι τρεις μεταλλάξεις που έχουν καταγραφεί για τη δεδομένη ασθένεια βρίσκονται στα συγκεκριμένα εξόνια. Οι μεταλλάξεις αυτές παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Accession number	Αλλαγή κωδικονίου	Αλλαγή αμινοξέος	Αριθμός κωδικονίου	Φαινότυπος	Βιβλιογραφία
CM003157	gGAA-AAA	Glu-Lys	706 (ex.17)	IBM	Martinsson (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97, 14614
CM051560	gGTT-ATT	Val-Ile	970 (ex.21)	IBM	Tajsharghi (2005) Eur J Hum Genet 13, 617
CM051561	aCTT-GTT	Leu-Val	1061 (ex.23)	IBM	Tajsharghi (2005) Eur J Hum Genet 13, 617

Η ανάλυση των πιο πάνω εξονίων έδωσε φυσιολογικά αποτελέσματα οπότε προχωρήσαμε στο σχεδιασμό εκκινήτων για όλα τα κωδικοποιόντα εξόνια του γονιδίου MYH2. Συνολικά, αναλύθηκαν 38 εξόνια.

Στην αρχική ανάλυση του ασθενούς βρέθηκαν κάποιες σημειακές αλλαγές σε ορισμένα εξόνια. Όμως, περαιτέρω ανάλυση των μελών της οικογένειας έδειξε ότι οι αλλαγές αυτές υπήρχαν και σε υγιή μέλη, οδηγώντας στον αποκλεισμό τους. Ένα παράδειγμα των αποτελεσμάτων αλληλούχισης της εργασίας μου παρουσιάζεται πιο κάτω.



Έτσι, λοιπόν, στην ουσία δεν καταλήξαμε σε θετικό αποτέλεσμα, αφού δεν βρήκαμε μετάλλαξη που να υπάρχει μόνο στο γονιδίωμα των δύο ασθενών μας και άρα να μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη ασθένεια κληρονομήθηκε από τον πατέρα στο γιο του.

Συζήτηση

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, όπως προαναφέρθηκε, στόχος μας ήταν η μοριακή διερεύνηση μίας οικογένειας με δύο ασθενείς που πάσχουν από μυοσίτιδα με έγκλειστα, ώστε να βρεθεί η μεταλλαγή που προκαλεί τη συγκεκριμένη ασθένεια.

Στην περίπτωση μας, δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις που να οδηγούν στο υπεύθυνο γονίδιο. Όπως αναφέραμε βάσει των κλινικών χαρακτηριστικών καταλήξαμε στον τύπο IBM₃ και μελετήσαμε το γονίδιο MYH2 στο οποίο βρέθηκαν παθογόνες μεταλλάξεις σε προηγούμενες μελέτες άλλων οικογενειών. Δυστυχώς η νουκλεοτιδική ανάλυση δεν έδειξε την παρουσία μιας υπεύθυνης μετάλλαξης.

Ωστόσο, η μετάλλαξη στην οποία οφείλεται η ανάπτυξη της ασθένειας μπορεί να μην εντοπίζεται μέσα στα εξόνια, αλλά στα ιντρόνια του γονιδίου MYH2, καθώς και στην 5' μη μεταφραζόμενη οδηγό αλληλουχία (5'-UTR), ή στην 3' μη μεταφραζόμενη οδηγό αλληλουχία (3'-UTR).

Αν βασιστούμε πάνω στην υπόθεση του εντοπισμού της μετάλλαξης στα ιντρόνια ή τις 5' και 3' UTR περιοχές, τότε θεωρείται άμεσα απαραίτητη η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδίου MYH2 και όχι μόνο των εξονίων του.

Στο σημείο αυτό, καλό είναι να αναφέρουμε ότι εκτός από το γονίδιο MYH2, λίγα χρόνια πριν αποκλείστηκε σε αυτή την οικογένεια ένα επιπλέον γονίδιο, το GNE, από άλλους ερευνητές. Το γονίδιο αυτό βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 9 και παλαιότερα είχε θεωρηθεί το πιο ύποπτο γονίδιο για την ασθένεια IBM, μεταλλάξεις του οποίου δίνουν το φαινότυπο του τύπου IBM₂³⁷. Επαναξιολόγηση όμως του κλινικού φαινοτύπου των ασθενών θεωρήθηκε ότι ανήκαν στον τύπο IBM₃.

Τη σημερινή εποχή πολλοί είναι εκείνοι που υποφέρουν από αυτή την ασθένεια χωρίς όμως να υπάρχει ουσιαστική θεραπεία. Είναι, λοιπόν, απαραίτητο να συνεχιστεί η διερεύνηση της συγκεκριμένης ασθένειας στην κυπριακή αλλά και άλλες μοριακά αδιάγνωστες οικογένειες που καταγράφηκαν παγκόσμια ώστε τελικά να βρεθεί κάποια μετάλλαξη σε άλλο γονίδιο ή γονίδια, τα οποία δεν έχουν ακόμα μελετηθεί.

Για τη διερεύνηση της ασθένειας σημαντικό ρόλο θα παίξει η χρήση νέων τεχνολογιών που θα μπορούσαν να εντοπίσουν τη μεταλλαγή σε αυτή την οικογένεια (microarrays, next generation sequencing) στο μέλλον με πολύ πιο γρήγορους ρυθμούς. Μέσα από αυτά καταλαβαίνουμε την ανάγκη συνεργασίας μεταξύ των επιστημών παγκόσμια για την μοριακή γενετική μελέτη αυτών και πολλών άλλων σπάνιων νόσων. Οι πιθανότητες να βρεθεί η αιτία διάφορων ασθενειών, όπως επίσης και η θεραπεία τους, αν υπάρχει, αυξάνονται από τη στιγμή που επιστήμονες από όλο τον κόσμο συνδιάζουν τις γνώσεις τους.

Βιβλιογραφία

- [1] Παναγιώτα Μαντά, Ειδική Νευρολογική Νοσολογία
- [2] Inclusion Body Myositis, MedPedia
- [3] <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr>
- [4] Tajsharghi H, Darin N, Rekabdar E, Kyllerman M, Wahlström J, Martinsson T, Oldfors A: Mutations and sequence variation in the human myosin heavy chain IIa gene (MYH2), *European journal of Human Genetics* (2005) 13, 617-622; Nature Publishing Group
- [5] Mahjneh I, Haravuori H, Paetau A, Anderson LV, Saarinen A, Udd B, Somer H: A distinct phenotype of distal myopathy in a large Finnish family, *Neurology*. 2003 Jul 8;61(1):87-92
- [6] Inclusion body myopathy 3, autosomal dominant, WD, 2009
- [7] Erin O'Ferrall, Michael Sinnreich: Distal Myopathy with Rimmed Vacuoles (DMRV), IBM2, *GeneReviews*, 2009
- [8] A Oldfors, H Tajsharghi, N Darin, C Lindberg: Myopathies associated with myosin heavy chain mutations, *Acta Myologica*, 2004
- [9] T. Martinsson, N. Darin, M. Kyllerman, A. Oldfors, B. Hallberg, J. Wahlström: Dominant Hereditary Inclusion-Body Myopathy Gene (IBM3) Maps to Chromosome Region 17p13.1, *Am. J. Hum. Genet.* 64, 1420-1426, 1999
- [10] Kimonis VE, Mehta SG, Fulchiero EC, Thomasova D, Pasquali M, Boycott K, Neilan EG, Kartashov A, Forman MS, Tucker S, Kimonis K, Mumm S, Whyte MP, Smith CD, Watts GD: Clinical studies in familial VCP myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia, *Am J Med Genet A*. 2008 Mar 15;146A(6):745-57
- [11] Oldfors A.: Hereditary myosin myopathies, *Neuromuscul Disord.* 17 355-367. Epub 2007
- [12] <http://en.wikipedia.org/wiki/MYH3>

- [13] http://www.gfmer.ch/genetic_diseases_v2/gendis_detail_list.php?cat3=358
- [14] Freeman Sheldon Syndrome, Cigna
- [15] <http://en.wikipedia.org/wiki/MYH8>
- [16] Veugelers M, Bressan M, McDermott DA, Weremowicz S, Morton CC, Mabry CC, Lefaiivre JF, Zunamon A, Destree A, Chaudron JM, Basson CT: Mutation of perinatal myosin heavy chain associated with a Carney complex variant, *N Engl J Med*. 2004 Jul 29;351(5):460-9.
- [17] Trismus Pseudocamptodactyly Syndrome, National Organization for Rare Disorders, Inc, 2008, HealthLinkBC
- [18] <http://www.biobase-international.com/>
- [19] Martinsson T, Oldfors A, Darin N, Berg K, Tajsharghi H, Kyllerman M, Wahlstrom J.: Autosomal dominant myopathy: missense mutation (Glu-706 --> Lys) in the myosin heavy chain IIa gene, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19;97(26):14614-9.
- [20] Βασίλης Σπυρόπουλος: Μαθήματα Βιοχημείας, ΤΕΙ Αθήνας
- [21] Mullis, Kary (1998). *Dancing Naked in the Mind Field*. New York: Pantheon Books. ISBN 0-679-44255-3.
- [22] http://el.wikipedia.org/wiki/Αλυσιδωτή_αντίδραση_πολυμεράσης
- [23] Κ. Αναστασιάδου, Ν. Καπράνος (1998). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και οι κλινικές της εφαρμογές. (άρθρο ανασκόπησης: Αρχεία παθολογικής ανατομικής)
- [24] PCR Station, PCR ENZYMES: PCR Polymerases, 2006
- [25] http://biotech.aua.gr/EPEAEK/site_Biotech/gewp_biot/Gen_Mechan/course_material/pcr1_1.htm
- [26] Tavi's page: *Designing PCR programs*, 2000
- [27] Molecular Station: PCR
- [28] Ασκληπιακό Πάρκο Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR - Polymerase Chain Reaction), 2008

- [29] The BioMed Labs Mag. Community: Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών, "SDS PAGE" και "2D Ηλεκτροφόρηση", The BioMed Labs Magazine, 2009
- [30] http://en.wikipedia.org/wiki/Agarose_gel_electrophoresis
- [31] Agarose gel electrophoresis (basic method), Methodbook
- [32] DNA Sequencing Facility: Fragment Analysis, The University of Texas at Austin, Institute for Cellular and Molecular Biology
- [33] <http://en.wikipedia.org/wiki/Sequencing>
- [34] PCR Tools, ExoSAP-IT® For PCR Product Clean-Up, Affymetrix, Usb
- [35] DNA Sequencing Protocol Tips, Nucleics, 2009
- [36] Facts about Genome Sequencing, Human Genome Project Information, 2008
- [37] I. Yabe, MD PhD, T. Higashi, MD, S. Kikuchi, MD PhD, H. Sasaki, MD PhD, T. Fukazawa, MD PhD, K. Yoshida, MD PhD and K. Tashiro, MD PhD: GNE mutations causing distal myopathy with rimmed vacuoles with inflammation, Neurology 2003;61:384-386

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Με το τέλος της εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Ρούλα Χριστοδούλου που με δέχτηκε στο εργαστήριο της, όπως επίσης και για τη σημαντική βοήθεια της στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω την ομάδα του εργαστηρίου της κας. Χριστοδούλου και ειδικότερα τους υποψήφιους διδάκτορες Λίνα Κουτσού και Πασχάλη Νικολάου για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Ευχαριστίες χρωστάω επίσης στον υπεύθυνο καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Ματθιόπουλο καθώς και στον καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη που δέχτηκαν να επιβλέψουν αυτή τη διπλωματική εργασία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω ακόμα στους φίλους μου που με στήριξαν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Για το τέλος αφήνω την οικογένεια μου και κυρίως τους γονείς και τον αδελφό μου, στους οποίους οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ για τη στήριξη τους όχι μόνο σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου αλλά και σε κάθε στάδιο της ζωής μου.

