

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΠΣΕ ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Ανίχνευση της ΔF508 μετάλλαξης του γονιδίου CFTR  
σε ασθενείς με Κυστική Ίνωση**

**ΤΣΙΑΝΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**  
**ΜΠΟΝΑΝΟΥ ΣΟΦΙΑ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ:**  
**ΜΠΟΝΑΝΟΥ ΣΟΦΙΑ**  
**ΓΕΩΡΓΑΤΣΟΥ ΕΛΕΝΗ**  
**ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2003**

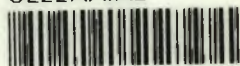
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ  
Μικρ. αριθ. .... 07/05/2003 .....  
Αριθ. Πρωτ. .... 2527 .....



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

Αριθ. Εισ.: 2851/1  
Ημερ. Εισ.: 17-06-2009  
Δωρεά:  
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ  
2003  
ΤΣΙ

✓ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083612



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Μπονάνου Σ., Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την υποστήριξη, επίβλεψη και καθοδήγηση μέσα από πολύτιμες συμβουλές καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας καθώς και για τον καθορισμό του θέματος αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Γουργουλιάνη Κ., Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και την κα. Γεωργιάτσου Ε., Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας, για τις υποδείξεις και την αξιολόγηση του συνόλου της εργασίας.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Βαλασσοπούλου Α., από το κέντρο αναφοράς της Κυστικής Ίνωσης του Νοσοκομείου “Λαϊκό”, για τις πολύτιμες τεχνικές συμβουλές της, καθώς και τον κ. Καναβάκη Ε. και την κα. Τζέτη Μ., από το Α Τμήμα Παιδιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παιδών “Αγία Σοφία”, για την παροχή των δειγμάτων.

Τέλος, ευχαριστώ την κα. Πούλιου για την βοήθειά της στην πραγμάτωση της εργασίας μου και τον κ. Κακάβα Κ., υποψήφιο Διδάκτορα, για την ουσιαστική συμβολή του και συνεργασία.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΕΛΙΔΑ

<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	5
<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	6
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	7
<b>ΓΟΝΙΔΙΟ CFTR</b> .....	9
<b>ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ CFTR</b> .....	10
<b>ΠΡΩΤΕΪΝΗ CFTR</b> .....	12
<b>ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ CFTR</b> .....	15
<b>ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ CFTR ΓΟΝΙΔΙΟ</b> .....	15
<b>ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΔF508 ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ CFTR</b> .....	18
<b>ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ</b> .....	27
<b>α. ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ</b> .....	27
<b>β. ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ</b> .....	28
ΠΑΓΚΡΕΑΣ.....	28
ΗΠΙΑΡ ΚΑΙ ΧΟΛΗΦΟΡΟΙ ΑΓΩΓΟΙ.....	30
ΕΝΤΕΡΟ.....	31
<b>γ. ΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ</b> .....	31
<b>δ. ΙΔΡΩΤΟΠΟΙΟΙ ΑΔΕΝΕΣ</b> .....	31
<b>ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ</b> .....	32
<b>ΠΡΟΓΝΩΣΗ-ΘΕΡΑΠΕΙΑ</b> .....	33
<b>ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ</b> .....	36
ΑΜΕΣΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ CFTR ΓΟΝΙΔΙΟ.....	37
ΕΜΜΕΣΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ CFTR ΓΟΝΙΔΙΟ.....	41
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	44
<b>ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	45
<b>ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ</b> .....	46
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ.....	46
ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ DNA ΜΕ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ.....	49
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ( PAGE ).....	51
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	52
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	57
ΑΠΟΚΑΛΥΨΗ ΦΟΡΕΩΝ.....	60
ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	61
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	63

## ABSTRACT

Cystic Fibrosis is one of the most frequent hereditary diseases in the Caucasian population and also one of the most common causes of death during childhood. It is a polysystematic disease that is phenotypically characterized by dysfunction of exocrine glands with main clinical manifestations from the respiratory, the digestive and the genital system and also from the sweat glands. These main manifestations are due to disturbance in transmembrane movement of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}$  ions and as a result this creates sticky mucus that leads to obstructive pulmonary disease and dysfunction of the pancreas and the sweat glands.

This is a single-gene disease that is transmitted by the autosomal recessive manner and affects about 1 in 2.500 newborns. It shows genotypic heterogeneity as more than 800 mutations have been detected at the gene that codes for the protein CFTR. The most common mutation is the  $\Delta\text{F508}$  mutation, that has been found in about 70% of chromosomes in patients with Cystic Fibrosis in the Caucasian population .

The aim of this research work is the development of a method for the detection of the  $\Delta\text{F508}$  mutation in samples of human DNA, in the Laboratory of Biochemistry of the Medical School of the University of Thessaly. For this purpose a 98bp sequence of exon 10 of the CFTR gene was multiplied by the polymerase chain reaction (PCR) and appropriate primers. In the presence of the  $\Delta\text{F508}$  mutation the product is 3bp shorter in the mutant allele than that in the normal. The two PCR products can be separated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), a simple, cheap and quick diagnostic technique. The band given by the homozygote for the  $\Delta\text{F508}$  mutation migrates faster than the band given by the normal homozygote, while the heterozygote exhibits four bands, two that are due to the mutant and the normal allele correspondingly, and two that are due to the creation of heterodimer formations between the two alleles.

The method was successfully applied to 17 DNA samples of normal, homozygote and heterozygote of  $\Delta\text{F508}$  mutation. We hope to apply this method to a larger sample of individuals from the area of Thessaly in order to investigate the frequency of this mutation in this population.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Κυστική Ίνωση (ΚΙ) αποτελεί μια από τις πιο συχνές κληρονομικές νόσους της Καυκάσιας φυλής καθώς και μια από τις πιο κοινές αιτίες θανάτου στην παιδική ηλικία. Πρόκειται για ένα πολυσυστηματικό νόσημα, το οποίο φαινοτυπικά χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργία των εξωκρινών αδένων με κύριες κλινικές εκδηλώσεις από το αναπνευστικό, το πεπτικό και το γεννητικό σύστημα καθώς και τους ιδρωτοποιούς αδένες. Οι κύριες αυτές εκδηλώσεις οφείλονται σε διαταραχή της διαμεμβρανικής διακίνησης ιόντων  $\text{Na}^+$  και  $\text{Cl}^-$ , με αποτέλεσμα τη δημιουργία παχύρρευστης βλέννης, η οποία οδηγεί σε αποφρακτική πνευμονοπάθεια και δυσλειτουργία του παγκρέατος και των ιδρωτοποιών αδένων.

Η νόσος είναι αμιγώς γενετική μονογονιδιακή, μεταβιβάζεται κατά τον υποτελή αυτοσωμικό χαρακτήρα και προσβάλλει περίπου 1 στα 2.500 νεογέννητα. Εμφανίζει γενοτυπική ετερογένεια, καθώς έχουν εντοπισθεί μέχρι σήμερα περισσότερες από 800 μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικεύει την πρωτεΐνη CFTR. Η ΔF508 μετάλλαξη, η οποία έχει βρεθεί περίπου στο 70% των χρωμοσωμάτων σε ασθενείς με ΚΙ στον Καυκάσιο πληθυσμό, αποτελεί την πιο συχνή μετάλλαξη που προκαλεί την ασθένεια.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η ανάπτυξη μεθοδολογίας, στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανίχνευση της ΔF508 μετάλλαξης σε δείγματα ανθρώπινου DNA. Για το σκοπό αυτό πολλαπλασιάστηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και κατάλληλους εκκινητές αλληλουχία 98bp στο εξόνιο 10 του γονιδίου CFTR. Παρουσία της μετάλλαξης ΔF508 λαμβάνεται προϊόν κατά 3bp μικρότερο στο μεταλλαγμένο αλληλίο σε σχέση με το φυσιολογικό. Τα δύο προϊόντα PCR μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (PAGE), μια απλοποιημένη, χαμηλού κόστους και ταχεία διαγνωστική τεχνική. Ομοζυγώτης της ΔF508 μετάλλαξης εμφανίζει ζώνη μεγαλύτερης κινητικότητας από τη ζώνη του ομοζυγώτη φυσιολογικού, ενώ ο ετεροζυγώτης εμφανίζει τέσσερις ζώνες, δύο που αντιστοιχούν στο μεταλλαγμένο και στο φυσιολογικό αλληλίο, καθώς και δύο που οφείλονται στη δημιουργία ετεροδιμερών σχηματισμών μεταξύ των δύο αλληλίων.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε επιτυχώς σε 17 δείγματα DNA φυσιολογικών, ομοζυγωτών και ετεροζυγωτών της ΔF508 μετάλλαξης. Η μελέτη αυτή ελπίζουμε να συνεχιστεί σε μεγαλύτερο δείγμα ατόμων της περιφέρειας Θεσσαλίας για να διερευνηθεί η συχνότητα αυτής της μετάλλαξης σ' αυτό τον πληθυσμό.

## **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Κυστική Ίνωση (ΚΙ) είναι μια αμιγώς γενετική μονογονιδιακή ασθένεια, η οποία προκαλείται από διάφορες μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικεύει την πρωτεΐνη «ρυθμιστής διαμεμβρανικής διακίνησης ιόντων» (CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Αποτελεί μια από τις πιο συχνές κληρονομικές νόσους της Καυκάσιας φυλής καθώς και μία από τις πιο κοινές αιτίες θανάτου στη παιδική ηλικία. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1938<sup>1</sup> και ακόμη μέχρι σήμερα η αντιμετώπιση της νόσου αποτελεί ένα από τα βασικά προβλήματα των παιδιάτρων με κοινωνικές και οικονομικές προεκτάσεις. Πρόκειται για μια πολύπλοκη νόσο η οποία χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργία των εξωκρινών αδένων με κλινικά συμπτώματα που αφορούν το αναπνευστικό, το πεπτικό, το γεννητικό σύστημα και τους ιδρωτοποιούς αδένες. Η αλματώδης όμως ανάπτυξη που σημειώθηκε τα τελευταία χρόνια στην έρευνα πάνω στην ΚΙ οδήγησε στην καλύτερη γνώση της παθογένειας της ασθένειας και την εύρεση πιο αποτελεσματικών μορφών αγωγής, με αποτέλεσμα να αυξηθεί ο μέσος όρος ζωής των ασθενών με ΚΙ περίπου στα τριάντα χρόνια.

Η ΚΙ χαρακτηρίζεται ως υποτελής αυτοσωμική νόσος, η οποία προσβάλλει περίπου 1 στα 2.500 νεογέννητα αλλά η ακριβής συχνότητα στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές ποικίλει από 1 στα 1.700 στη βόρεια Ιρλανδία έως 1 στα 7.700 στη Σουηδία<sup>2</sup>.

Η συχνότητα των φορέων της ΚΙ εκτιμάται ότι είναι περίπου 1 στα 25 άτομα στον Καυκάσιο πληθυσμό. Η υψηλή αυτή συχνότητα των φορέων στο Καυκάσιο πληθυσμό σε σύγκριση με άλλους πληθυσμούς οφείλεται στο φαινόμενο που ονομάζεται πλεονέκτημα επιλογής του ετεροζυγώτη<sup>3</sup>. Μερικά από τα πλεονεκτήματα επιλογής που έχουν προταθεί είναι η ανθεκτικότητα των φορέων της ΚΙ στην οφειλόμενη σε βακτηριδιακή τοξίνη διάρροια<sup>4</sup>, τη χολέρα<sup>5</sup>, τη φυματίωση<sup>5</sup> και τον τυφοειδή πυρετό<sup>6</sup>.

Η ΔF508 μετάλλαξη, η οποία έχει βρεθεί περίπου στο 70% των χρωμοσωμάτων σε ασθενείς με ΚΙ στον Καυκάσιο πληθυσμό, αποτελεί την πιο συχνή μετάλλαξη που προκαλεί την ασθένεια<sup>7</sup>. Η ΔF508 μετάλλαξη (όπου Δ σημαίνει deletion δηλαδή απαλοιφή) χαρακτηρίζεται από έλλειμμα του αμινοξέος φαινυλαλανίνη στη θέση 508 της πρωτεΐνης CFTR. Η συχνότητα αυτής της μετάλλαξης, αν και ποικίλλει στους διάφορους πληθυσμούς, έχει βρεθεί παγκοσμίως ότι είναι περίπου 68%<sup>7</sup>.





**Εικόνα 1:** Χάρτης γεωγραφικής κατανομής της σχετικής συχνότητας της ΔF508 μετάλλαξης στην Ευρώπη

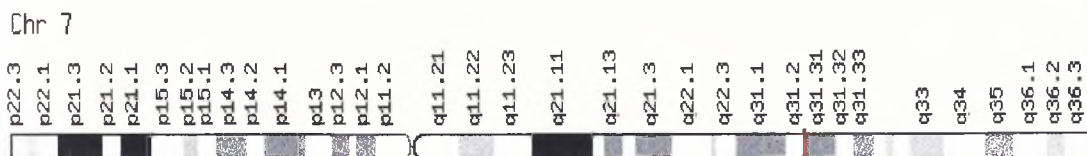
Όπως φαίνεται από τον χάρτη κατανομής της σχετικής συχνότητας της ΔF508 μετάλλαξης στην Ευρώπη, οι βόρειες χώρες φέρουν υψηλότερη συχνότητα της μετάλλαξης σε σύγκριση με τις νότιες χώρες (εικόνα 1). Η μεγαλύτερη συχνότητα παρατηρείται στη Δανία (88%), ενώ η χαμηλότερη στην Τουρκία (30%)<sup>8</sup>. Στην Ελλάδα σε μελέτη η οποία δημοσιεύτηκε το 1990 και αφορούσε 97 ασθενείς της ΚΙ, η συχνότητα της ΔF508 μετάλλαξης στα μεταλλαγμένα χρωμοσώματα βρέθηκε ότι είναι 54.1%<sup>9</sup> και σε νεώτερη μελέτη η οποία αφορούσε 437 ασθενείς της ΚΙ, η συχνότητα της μετάλλαξης υπολογίστηκε επίσης ότι είναι 53.4<sup>10</sup>.

Η πολυποίκιλη αυτή κατανομή της ΔF508 μετάλλαξης στην Ευρώπη, με υψηλότερη συχνότητα στη βόρεια Ευρώπη και χαμηλότερη στη νότια, έχει αποδοθεί στη διάδοση της μετάλλαξης από τους πρώτους γεωργούς, οι οποίοι μετανάστευσαν από τη Μέση Ανατολή προς τη Βορειοδυτική Ευρώπη κατά τη διάρκεια της Νεολιθικής Εποχής. Έχει διατυπωθεί όμως και η άποψη ότι η ΔF508 μετάλλαξη είναι παρούσα στην Ευρώπη για περισσότερο από 10.000 χρόνια, γεγονός το οποίο αποδεικνύεται από την υψηλή συχνότητα της μετάλλαξης (87%) στο πληθυσμό των Βάσκων, ενός από τους πιο παλιούς πληθυσμούς της Ευρώπης, ο οποίος θεωρείται ότι εγκαταστάθηκε στη Δυτική Ευρώπη στα τέλη της Παλαιολιθικής Εποχής<sup>11</sup>.

## ΓΟΝΙΔΙΟ CFTR

Η ανίχνευση του γονιδίου της Κυστικής Ίνωσης έγινε με τη χρήση ενός μεγάλου αριθμού πολυμορφικών δεικτών καθώς επίσης και με ένα συνδυασμό τεχνικών φυσικής χαρτογράφησης, απομόνωσης εξονίων και γενετικής ανάλυσης. Η ΚΙ αντιπροσώπευε ένα πρωταρχικό στόχο για γονιδιακή χαρτογράφηση με ανάλυση σύνδεσης και αυτή η προσπάθεια ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του '80 από διάφορες ομάδες. Το 1985 βρέθηκε σύνδεση με δείκτες από το χρωμόσωμα 7. Σε σύντομο χρονικό διάστημα ελέγχθησαν πολλοί περισσότεροι δείκτες στο χρωμόσωμα 7 και το γονίδιο της ΚΙ βρέθηκε να κείται πολύ κοντά στους δείκτες met και J 3.11<sup>12,13</sup>. Τεχνικές φυσικής χαρτογράφησης έδειξαν ότι η απόσταση ανάμεσα σ' αυτούς τους δείκτες ήταν περίπου 1.6 εκατομμύρια bp (base pair), μια αρκετά μεγάλη περιοχή, που περικλείει περίπου 50 γονίδια. Στη συνέχεια βρέθηκαν περισσότεροι δείκτες μέσα σ' αυτή τη περιοχή, όπως ο XV-2C και ο KM-19, οι οποίοι ήταν στενά συνδεδεμένοι δείκτες κοντά στο γονίδιο της ΚΙ και οι οποίοι επέτρεψαν να επικεντρωθεί ακόμα περισσότερο η θέση του γονιδίου της ΚΙ.<sup>14,15</sup>

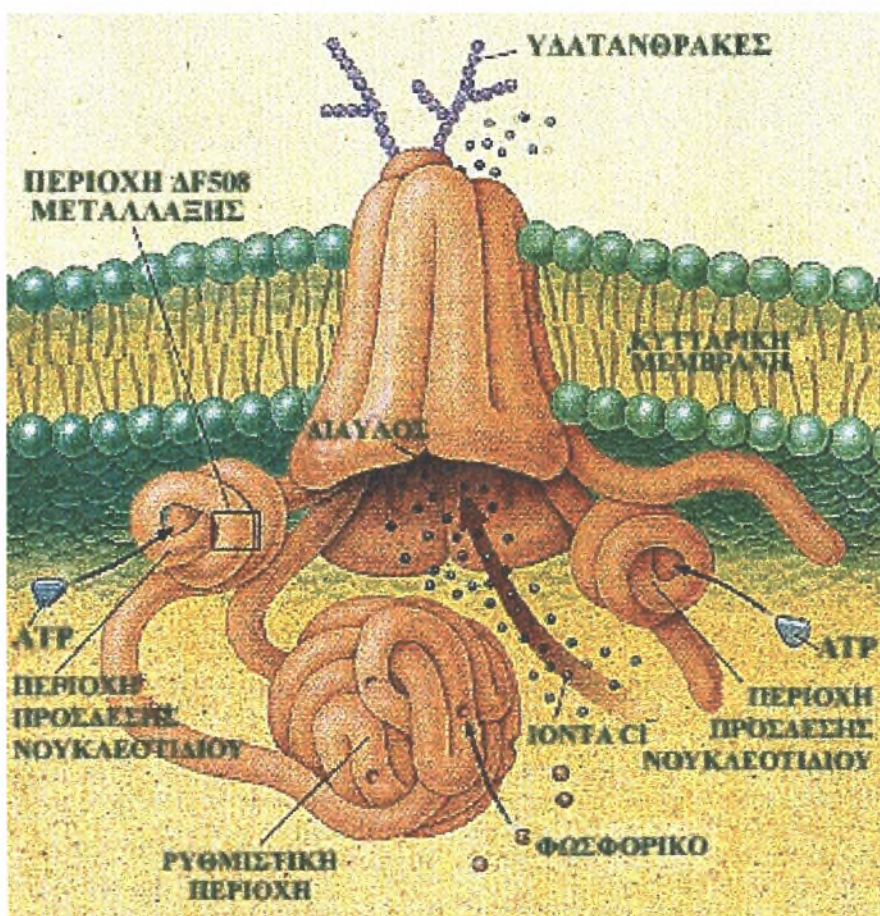
Το γονίδιο που κωδικεύει την πρωτεΐνη CFTR εντοπίστηκε τελικά σε τμήμα του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 7, χαρτογραφήθηκε στη χρωμοσωμιακή θέση 7q31.2 (εικόνα 2) και κλωνοποιήθηκε το έτος 1989<sup>16,17,18</sup>. Η λεπτομερής ανάλυση του γονιδίου κατέδειξε ότι πρόκειται για γονίδιο, το οποίο αποτελείται από 250.000 ζεύγη βάσεων (250Kbp) και παράγει mRNA μεγέθους 6.5Kb το οποίο περιλαμβάνει 27 εξόνια.



**Εικόνα 2:** Απεικόνιση της θέσης του γονιδίου CFTR στο χάρτη του χρωμοσώματος 7.

## ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ CFTR

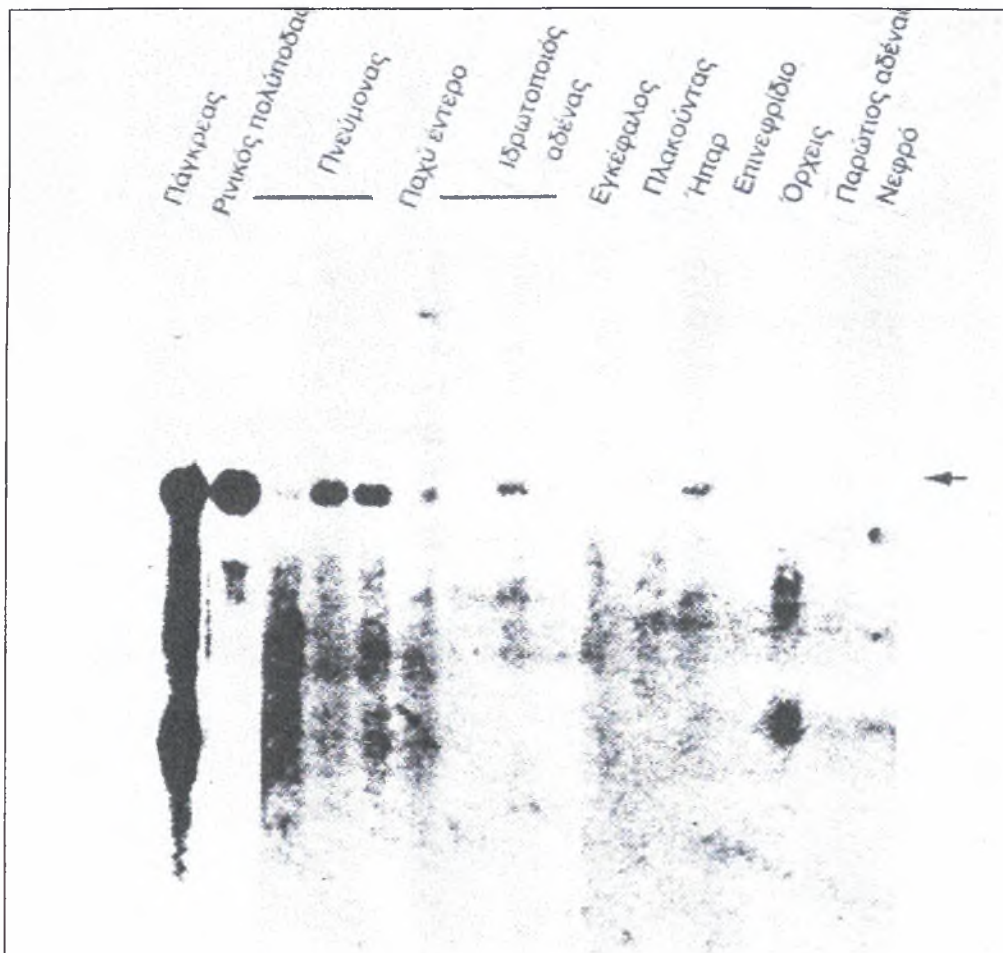
Ο CFTR είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία λειτουργεί κυρίως ως διάυλος  $\text{Cl}^-$  αλλά πιστεύεται ότι μπορεί να έχει και άλλους ρόλους όπως τη μεταφορά κάποιου υποστρώματος ή τη ρύθμιση της λειτουργίας άλλων διαύλων ιόντων ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  και  $\text{Na}^+$ )<sup>18,19</sup> (εικόνα 3).



Εικόνα 3: Μοντέλο της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης CFTR.

Ανάλυση του CFTR mRNA με αποτύπωση κατά Northern έδειξε ότι ο CFTR εκφράζεται στο επιθήλιο και στους υποβλεννογόνιους αδένες της αναπνευστικής οδού, στο επιθήλιο του παγκρέατος και πιο συγκεκριμένα στους παγκρεατικούς πόρους καθώς επίσης και στο επιθηλιακό στρώμα του εντέρου και ιδιαίτερα στους αδένες του Brunner<sup>13</sup>. Επίσης έχει παρατηρηθεί στο επιθήλιο των ιδρωτοποιών και σιελογόνων αδένων (εικόνα 4).

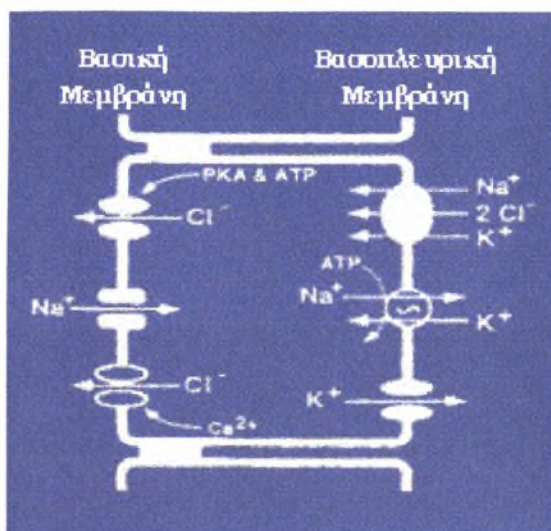




**Εικόνα 4:** Ανάλυση κατά Northern της έκφρασης του γονιδίου CFTR σε διάφορους ιστούς. Το βέλος δείχνει το CFTR mRNA.

Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά το επιθήλιο των αεροφόρων οδών και του εντερικού αυλού, ο CFTR εντοπίζεται στη μεμβράνη της βασικής πλευράς των επιθηλιακών κυττάρων. Η έκκριση ιόντων  $\text{Cl}^-$  διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων είναι αποτέλεσμα της συντονισμένης δραστηριότητας των μεταφορέων στη βασική και βασοπλευρική μεμβράνη. Ιόντα  $\text{Cl}^-$  εισέρχονται στο επιθηλιακό κύτταρο μέσω του συνμεταφορέα  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  στη βασοπλευρική μεμβράνη του κυττάρου, και εκκρίνονται στις αεροφόρες οδούς και στον εντερικό αυλό μέσω του CFTR και του εξαρτώμενου από  $\text{Ca}^+$  διαύλου  $\text{Cl}^-$  στη βασική μεμβράνη του κυττάρου (εικόνα 5).

Ο ρόλος του CFTR στο αναπνευστικό σύστημα είναι σημαντικός καθώς παρεμποδίζει την ανάπτυξη αναπνευστικών λοιμώξεων με διάφορους τρόπους, είτε διατηρώντας εκείνη τη συγκέντρωση του άλατος που είναι απαραίτητη για την εξουδετέρωση των βακτηριδίων,<sup>20</sup> είτε συμμετέχοντας άμεσα ή έμμεσα στη μεταφορά ή έκκριση κάποιων αντιβακτηριακών παραγόντων<sup>21</sup>.



**Εικόνα 5:** Διακίνηση ιόντων μέσω της βασικής (apical) και βασοπλευρικής (basolateral) μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων των αεροφόρων οδών και εντερικού αυλού.

Όσον αφορά το πάγκρεας, ιόντα  $\text{Cl}^-$  εκκρίνονται στον αυλό των παγκρεατικών πόρων διαμέσου της CFTR πρωτεΐνης στη βασική πλευρά του επιθηλιακού κυττάρου και στη συνέχεια εισέρχονται ξανά στο κύτταρο σε ανταλλαγή με ενδοκυτταρικά ιόντα διττανθρακικών με τα οποία εμπλουτίζεται το παγκρεατικό υγρό. Στους ιδρωτοποιούς αδένες ο CFTR παίζει σημαντικό ρόλο στη παραγωγή υπότονου ιδρώτα μέσω της απορρόφησης ιόντων  $\text{Cl}^-$ .

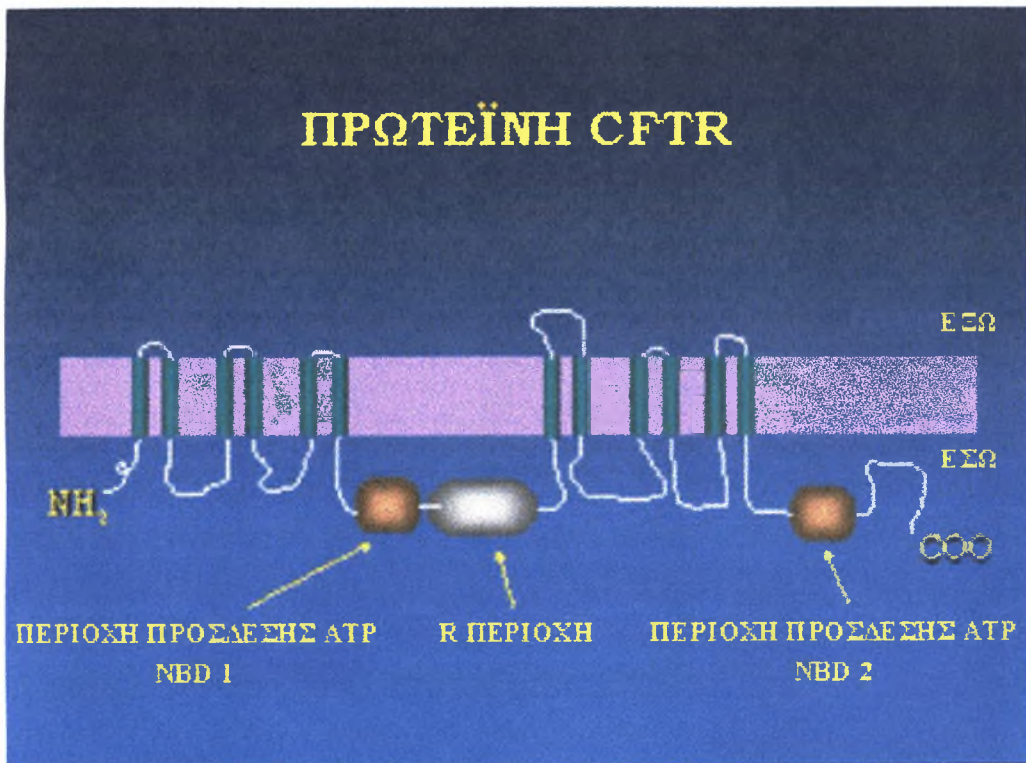
## ΠΡΩΤΕΪΝΗ CFTR

Ο προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης CFTR έδωσε τη δυνατότητα να γίνει πρόβλεψη της δυναμικής τριτοταγούς δομής της. Η πρωτεΐνη CFTR<sup>13</sup> είναι μία πολυπεπτιδική αλυσίδα μεγέθους 1480 αμινοξέων και μοριακού βάρους 168,138 Da, για την οποία προτείνεται ότι σχηματίζει πέντε περιοχές (εικόνα 6):

α) Δύο διαμεμβρανικές περιοχές (membrane-spanning domains) MSD1 και MSD2, κάθε μία από τις οποίες αποτελείται από έξι διαμεμβρανικά τμήματα .

β) Μία ενδοκυτταρική ρυθμιστική περιοχή (R domain), η οποία περιέχει αρκετές ομόλογες αλληλουχίες φωσφορυλίωσης από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) .

γ) Δύο περιοχές πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (nucleotide-binding domains) NBD1 και NBD2, οι οποίες πιστεύεται ότι αλληλεπιδρούν με ATP. Η NBD1 περιοχή αποτελείται από 244 κατάλοιπα (L441-K684), ενώ η NBD2 περιοχή αποτελείται από 254 κατάλοιπα (L11227-L11480)<sup>22</sup>. Τόσο η ρυθμιστική περιοχή R όσο και οι NBD1 και NBD2 περιοχές του CFTR βρίσκονται ενδοκυτταρικά.



Εικόνα 6: Δομή πρωτεΐνης CFTR.





## ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ CFTR

Η φυσιολογική λειτουργία του διαύλου  $\text{Cl}^-$  ρυθμίζεται από τη παρουσία cAMP και τη φωσφορυλίωση της ρυθμιστικής περιοχής R από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) καθώς και από την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ATP<sup>25</sup>. Πιο συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της ρυθμιστικής περιοχής R οδηγεί στην ενεργοποίηση του διαύλου  $\text{Cl}^-$  μέσω πρόσδεσης του ATP στις NBD περιοχές του CFTR<sup>26</sup>.

Η R περιοχή απομονώθηκε από τον CFTR χρησιμοποιώντας γενετική μηχανική, για να μελετηθεί ο ακριβής ρόλος της στη ρύθμιση της λειτουργίας της πρωτεΐνης<sup>27,28</sup>. Βρέθηκε ότι αν η R περιοχή φωσφορυλιώνεται, τότε προσδένεται ευκολότερα ATP στο μόριο και μ' αυτό το τρόπο ο διάυλος ανοίγει επιτρέποντας έτσι τη διέλευση ιόντων  $\text{Cl}^-$  μέσω αυτού. Αντίθετα, όταν η R περιοχή δεν φωσφορυλιώνεται, λιγότερο ATP προσδένεται στις NBD περιοχές και άρα το κανάλι παραμένει κλειστό. Απ' αυτό συμπεραίνεται ότι η φωσφορυλίωση της R περιοχής επιφέρει αλλαγές στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις εντός του μορίου και πιο συγκεκριμένα στο εσωτερικό των NBD περιοχών με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ικανότητά τους να προσδένουν ATP.

Η πρόσδεση ATP στις NBD περιοχές, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη διάνοιξη του διαύλου<sup>29,30,31</sup>, ακολουθείται στη συνέχεια από υδρόλυση του ATP, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε απενεργοποίηση και κλείσιμο τελικά του διαύλου. Επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι οι δύο NBD περιοχές του CFTR συνεργάζονται και αλληλεπιδρούν λειτουργικά μεταξύ τους, ρυθμίζοντας έτσι μ' αυτό τον τρόπο την αγωγιμότητα του διαύλου<sup>32,33,34</sup>.

## ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ CFTR ΓΟΝΙΔΙΟ

Με τη λεπτομερή ανάλυση του DNA ασθενών με ΚΙ έχουν ανιχνευθεί μέχρι σήμερα πάνω από 800 μεταλλάξεις, των οποίων η συχνότητα διαφέρει γεωγραφικά και πληθυσμιακά (Πίνακας 1, από μελέτη σε σύνολο 43,849 χρωμοσωμάτων ΚΙ, γενικών και ειδικών πληθυσμών)<sup>35</sup>.

**Πίνακας 1: Συχνότερες μεταλλάξεις στο γονίδιο CFTR παγκοσμίως.**

Μεταλλαξη	Συχνότητα	(%)	Πληθυσμός με την υψηλότερη παρουσία
[[Delta]]F508	28.948	(68.0)	
G542X	1.062	(2.4)	Ισπανοί
G551D	717	(1.6)	Άγγλοι
N1303K	589	(1.3)	Ιταλοί
W1282X	536	(1.2)	Εβραίοι-Askhenazi
R553X	322	(0.7)	Γερμανοί
621+1G->T	315	(0.7)	Γάλλο-Καναδοί
1717-1G->A	284	(0.6)	Ιταλοί
R117H	133	(0.3)	
R1162X	125	(0.3)	Ιταλοί
R347P	106	(0.2)	
3849+10kbC->T	104	(0.2)	
[[Delta]]I507	93	(0.2)	
394delTT	78	10-30%	Νορβηγοί, Φιλανδοί
G85E	67		
R560T	67		
A455E	62		
1078delT	57		
2789+5G->A	54	Ισπανοί	
3659delC	54		
R334W	53		
1898+1G->T	53		
711+1G->T	49		Γάλλο-Καναδοί
2183AA->G	40		Ιταλοί
3905insT	38	6-17%	Ελβετοί, Amish, Acadian
S549N	30		
2184delA	29		
Q359K/T360K		87.5%	Εβραίο-Γεωργιανοί
M1101K		69%	Hutterite
Y122X		48%	Γάλλοι, νήσος Reunion
1898+5G->T		30%	Κινέζοι (Taiwan)
3120+1G->A		11%	Αφρο-Αμερικανοί
I148T		9.1%	Γάλλο-Καναδοί

Οι ανωμαλίες αυτές του CFTR γονιδίου εντοπίζονται κυρίως στις κωδικεύουσες περιοχές και περιλαμβάνουν μικρά ελλείμματα και προσθήκες νουκλεοτιδίων που προκαλούν μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης (Frameshift), ανεμνηεύσιμες μεταλλάξεις (Nonsense), παρεμνηεύσιμες (Missense) καθώς και σημειακές μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη διαδικασία της αποκοπής και επανασυγκόλλησης (Splicing-ματίσματος) και τη σύνθεση του RNA.



Ανάλογα με το είδος της μετάλλαξης και την περιοχή της πρωτεΐνης που επηρεάζεται, οι διάφορες βλάβες στο γονίδιο διακρίνονται σε 4 τύπους (εικόνα 8):

#### **Ομάδα I: Μεταλλάξεις που επηρεάζουν την παραγωγή της πρωτεΐνης :**

Αφορούν μεταλλάξεις (W1282X, R553X, R1162) που οδηγούν στη διακοπή της σύνθεσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, με αποτέλεσμα τη παραγωγή πρωτεΐνης με μήκος μικρότερο του φυσιολογικού. Ανάλογα με το τμήμα που λείπει ορίζεται και το ποσοστό παραγωγής ενεργού πρωτεΐνης<sup>36</sup>.

#### **Ομάδα II: Μη αποτελεσματική επεξεργασία της πρωτεΐνης :**

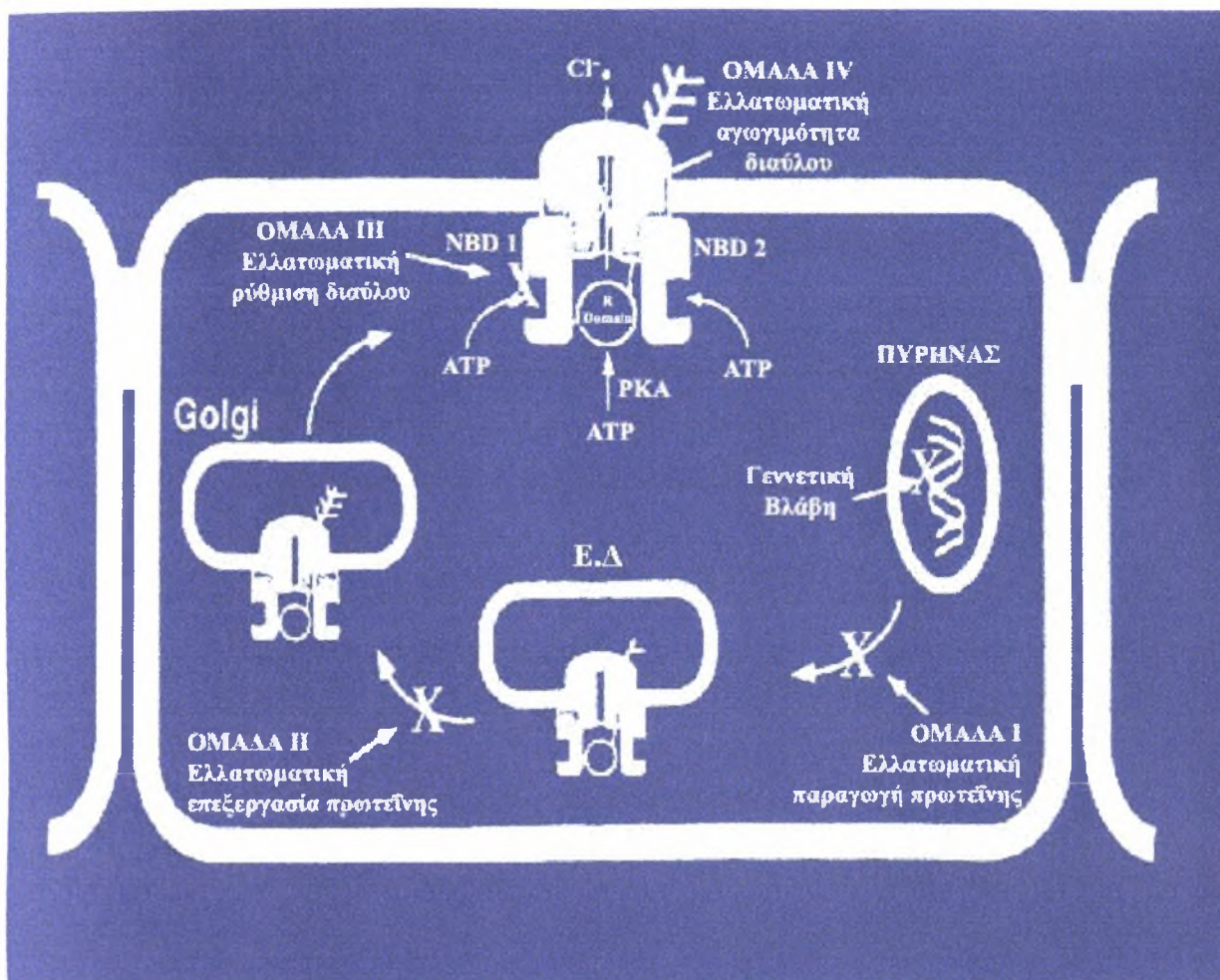
Εδώ ανήκουν οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν την τελική δομή της πρωτεΐνης και οδηγούν σε ελαττωματική ωρίμανση του CFTR μέσα στο κύτταρο<sup>37</sup>. Σε αυτή την ομάδα ανήκει και η πιο κοινή μετάλλαξη της νόσου, η ΔF508, η οποία χαρακτηρίζεται από έλλειμμα του αμινοξέος φαινυλαλανίνη στη θέση 508 της πρωτεΐνης, στην NBD1 περιοχή καθώς και η παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη N1303K στην NBD2 περιοχή.

#### **Ομάδα III: Μη αποτελεσματική ρύθμιση του διαύλου Cl<sup>-</sup> :**

Αφορά μεταλλάξεις (G551D, G1224E, J1225) που βρίσκονται στις περιοχές NBD του CFTR και επηρεάζουν τη δέσμευση και υδρόλυση του ATP με αποτέλεσμα τη μη αποτελεσματική ρύθμιση του καναλιού Cl<sup>-</sup><sup>38,50</sup>.

#### **Ομάδα IV: Βλάβες στις διαμεμβρανικές περιοχές της πρωτεΐνης :**

Αντιπροσωπεύεται από μεταλλάξεις που προκαλούν βλάβες στις διαμεμβρανικές περιοχές του CFTR<sup>38</sup> και είναι συνήθως παρερμηνεύσιμες. Πιο συγκεκριμένα μεταλλάξεις στην MSD1 περιοχή όπως οι R117H, R334W, R347P και R347H επηρεάζουν κατάλοιπα αργινίνης σε δυναμικές διαμεμβρανικές αλληλουχίες με αποτέλεσμα να παρατηρείται μειωμένη αγωγιμότητα μέσω του διαύλου Cl<sup>-</sup>, ενώ η εξαρτώμενη από cAMP ρυθμιστική λειτουργία του CFTR παραμένει ανεπηρέαστη<sup>39</sup>.



**Εικόνα 8:** Οι 4 κύριες ομάδες μεταλλάξεων και οι επιπτώσεις τους στην έκφραση και λειτουργία του CFTR.

## ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΔF508 ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ CFTR

Η ΔF508 μετάλλαξη αφορά την απαλοιφή τριών νουκλεοτιδίων (CTT), η οποία εντοπίζεται στο εξόνιο 10 του γονιδίου CFTR και η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αφαίρεση μιας φαινυλαλανίνης στη θέση 508, εντός της NBD1 περιοχής του CFTR όπου προσδέεται το ATP (εικόνα 9).

## ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ 7

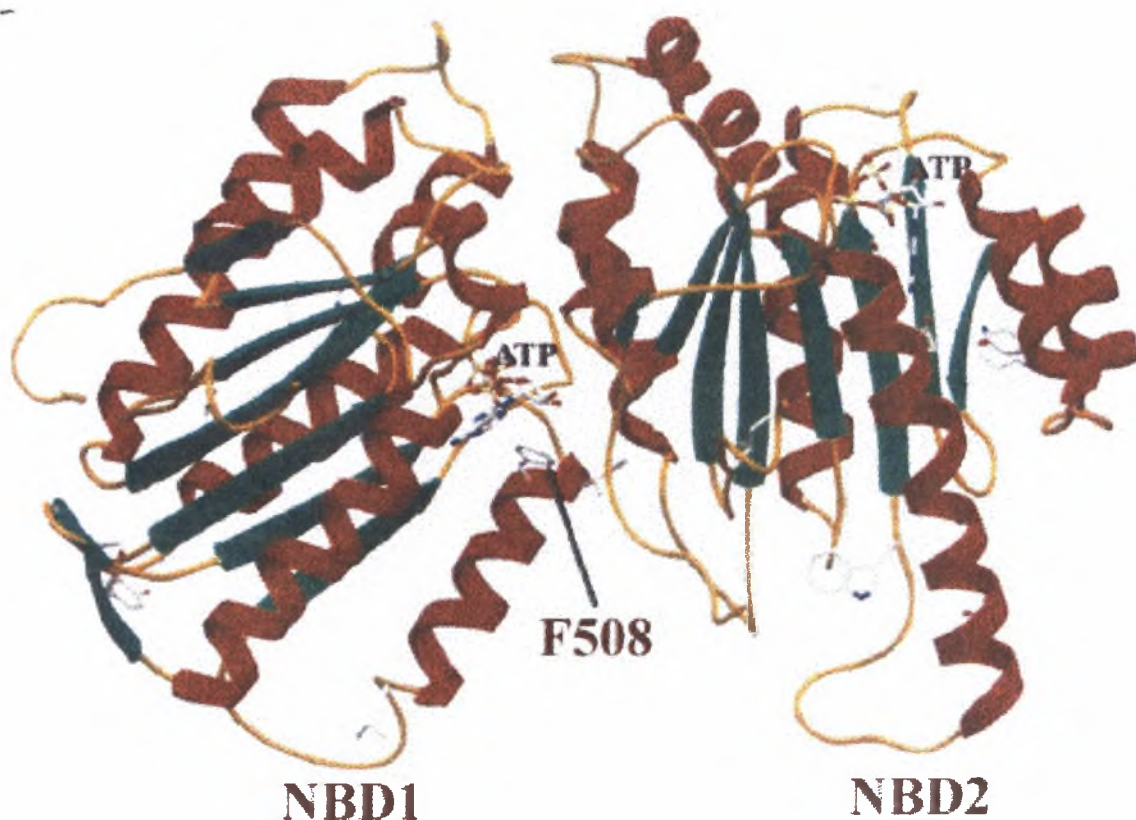


Εικόνα 9: Μετάλλαξη ΔF508 του γονιδίου CFTR.

Παλαιότερες μελέτες που έγιναν σε συνθετικό πεπτικό, το οποίο αντιστοιχεί στην αλληλουχία γύρω από φαινυλαλανίνη 508 (Phe508) υποστήριξαν ότι το φυσιολογικό πεπτικό λαμβάνει κυρίως δομή β-πτυχωτού φύλλου ενώ η απαλοιφή της Phe508 προκαλεί μεταβολές στη διαμόρφωση του πεπτιδίου<sup>40</sup>. Βρέθηκε ότι το μεταλλαγμένο πεπτικό είναι λιγότερο σταθερό σε σύγκριση με το φυσιολογικό πεπτικό με αποτέλεσμα να χάνει σε μεγάλο ποσοστό την ικανότητά του να προσδένει το ATP κάτω από μη φυσιολογικές συνθήκες (π.χ σε ουρία 4M).



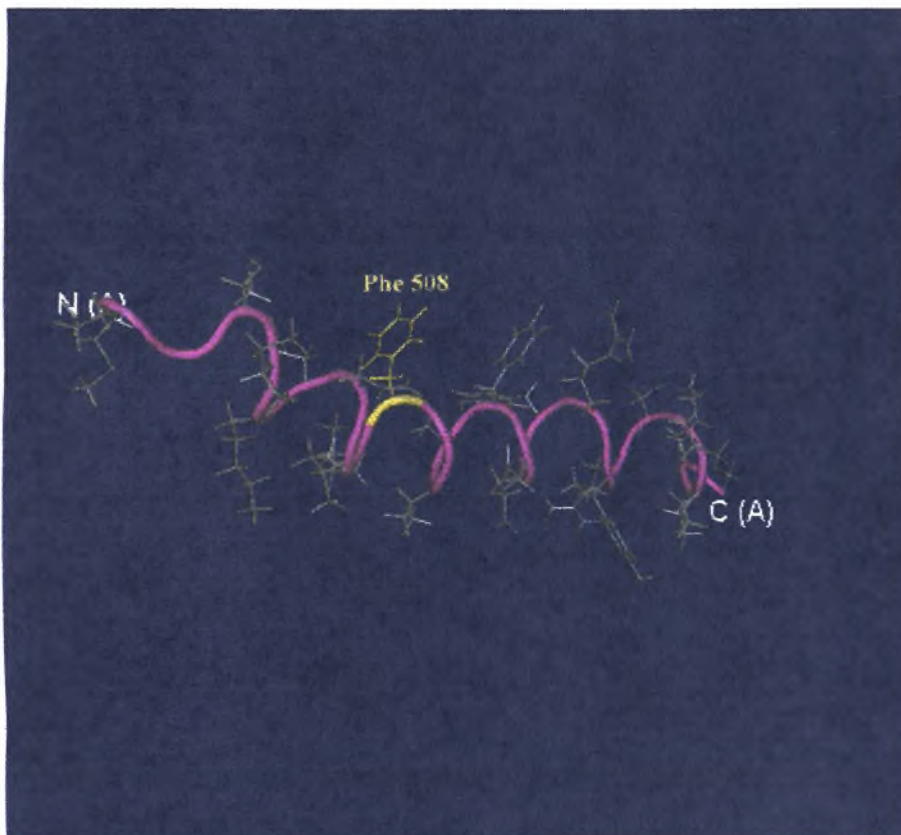
Μέχρι σήμερα τρισδιάστατο μοντέλο του CFTR δεν έχει προσδιοριστεί καθώς η πρωτεΐνη αυτή είναι δύσκολο να εκφραστεί σε μεγάλες ποσότητες, τέτοιες ώστε να μπορέσει να κρυσταλλογραφηθεί. Κατασκευάστηκαν όμως τρισδιάστατα θεωρητικά μοντέλα και για τις δύο περιοχές που προσδέκουν ATP, NBD1 και NBD2, βασιζόμενα στην F1 ATPase και RecA πρωτεΐνη<sup>41</sup>. Τα μοντέλα αυτά μπόρεσαν να κατασκευαστούν καθώς οι NBD1 και NBD2 περιοχές του CFTR εμφανίζουν σημαντική ομολογία, όσον αφορά την αλληλουχία, με τις β και α υπομονάδες της F1 ATPase αντίστοιχα. Σύμφωνα μ'αυτά τα μοντέλα, σε αντίθεση με τις παλαιότερες μελέτες, στον φυσιολογικό CFTR το αμινοξύ Phe508 βρίσκεται εντός μιας α-έλικας και συμβάλλει στην διαμόρφωση της NBD1 περιοχής, η οποία αλληλεπιδρά με το δακτύλιο πουρίνης του ATP (εικόνα 10).



**Εικόνα 10:** Μοντέλο α-έλικας της NBD1 περιοχής όπου περιέχεται το αμινοξύ Phe508.

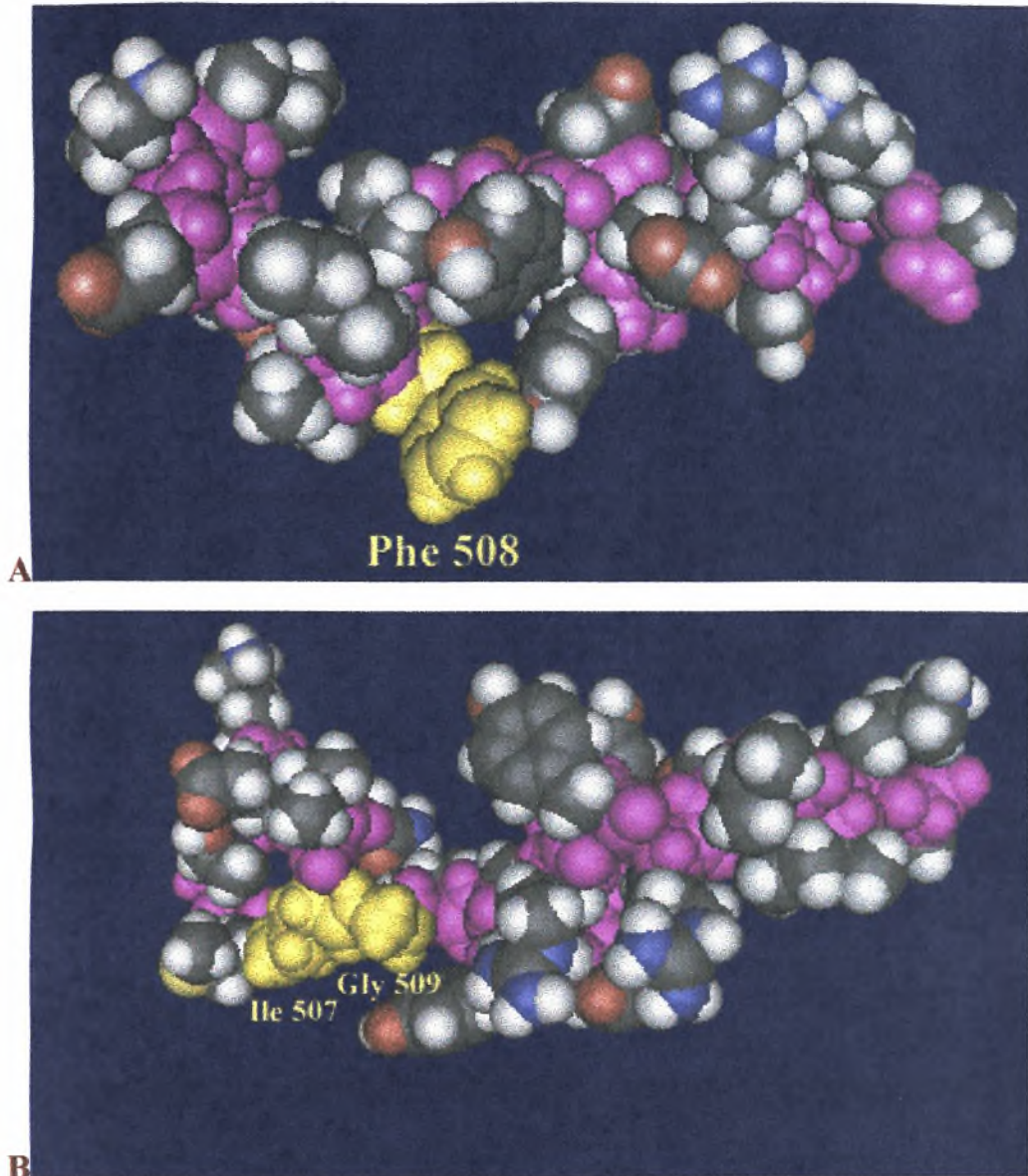
Απεικονίζονται επίσης δύο μόρια ATP, τα οποία είναι προσδεδεμένα στην NBD1 και NBD2 περιοχή αντίστοιχα.

Στη CFTR όμως πρωτεΐνη με τη ΔF508 μετάλλαξη, η απαλοιφή της Phe508 προκαλεί απώλεια της ελικοειδούς α-δομής εντός της NBD1 περιοχής του CFTR, με αποτέλεσμα το μόριο να είναι δομικά ασταθές και να εμφανίζει μειωμένη ευαισθησία στη πρόσδεση ATP. Αυτές οι προβλέψεις, ότι δηλαδή η περιοχή που περιέχει την Phe508 έχει την τάση να σχηματίζει μια α-έλικα και ότι η ΔF508 μετάλλαξη προκαλεί απώλεια της α-ελικοειδούς δομής, επιβεβαιώνονται με διαλυτές δομές, που έχουν αναλυθεί με NMR (Nuclear Magnetic Resonance), τόσο συνθετικού φυσιολογικού πεπτιδίου το οποίο αποτελείται από τα κατάλοιπα Met498-Ala523, όσο και μεταλλαγμένου πεπτιδίου<sup>42</sup> (εικόνες 11, 12 και 13).



**Εικόνα 11:** Απεικόνιση NMR ανάλυσης (σε 43% TFE) συνθετικού φυσιολογικού πεπτιδίου (Met498-Ala523).

Η Phe508 (κίτρινο) περιέχεται εντός α-ελικοειδούς δομής.

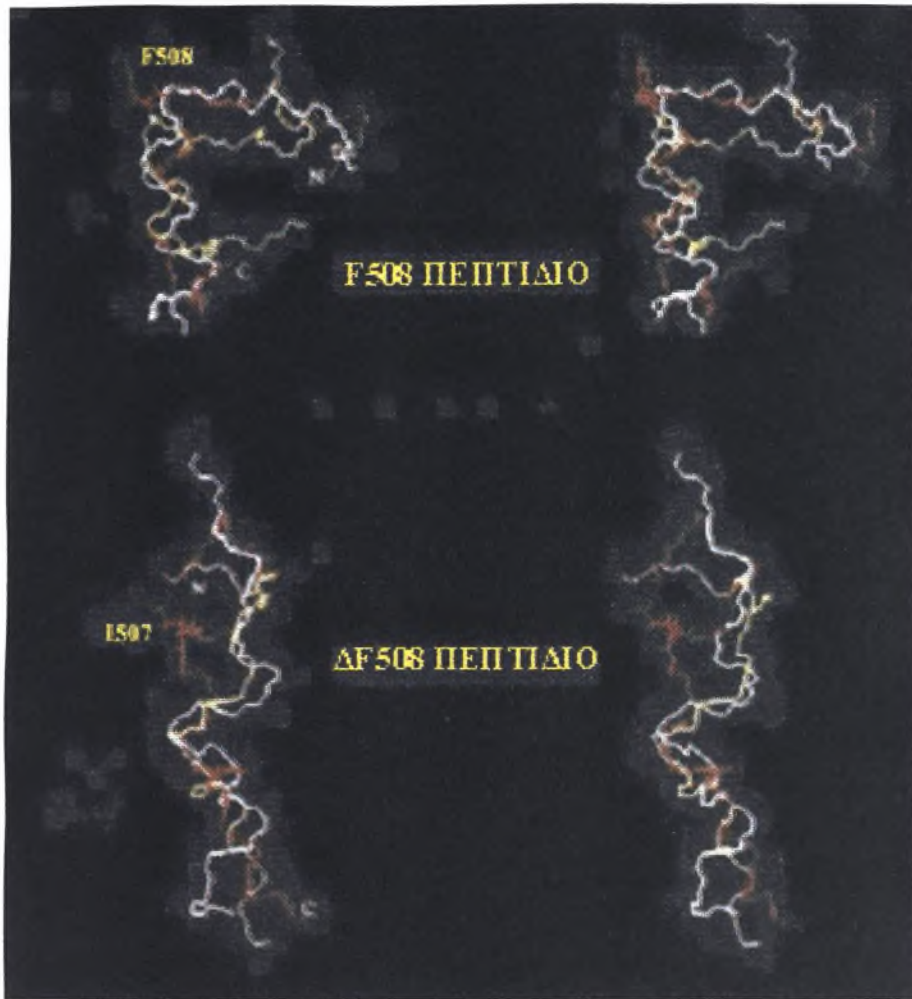


Εικόνα Α	Εικόνα Β
<span style="color: pink;">■</span>	<span style="color: pink;">■</span>
<span style="color: grey;">■</span>	<span style="color: grey;">■</span>
<span style="color: blue;">■</span>	<span style="color: blue;">■</span>
<span style="color: red;">■</span>	<span style="color: red;">■</span>
<span style="color: yellow;">■</span> Phe508	<span style="color: yellow;">■</span> Ile507, Gly509

■ κύρια πεπτιδική αλυσίδα  
■ άνθρακας πλευρικών ομάδων  
■ υδρογόνο πλευρικών ομάδων  
■ άζωτο πλευρικών ομάδων  
■ οξυγόνο πλευρικών ομάδων

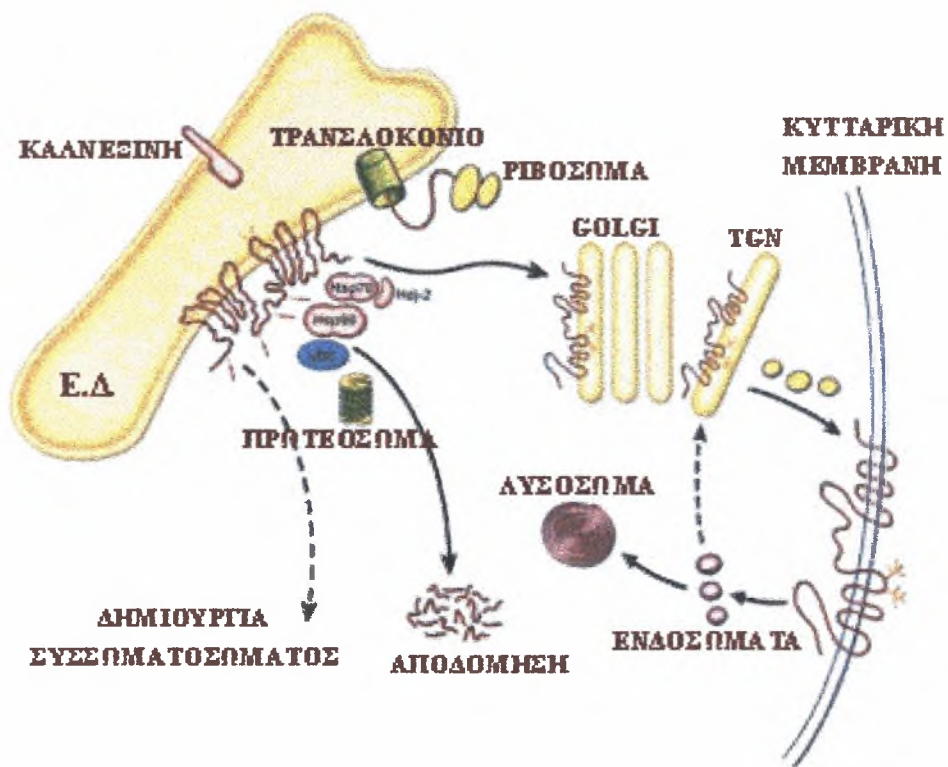
**Εικόνα 12:** **A)** Χωροπληρωτική απεικόνιση NMR ανάλυσης (σε H<sub>2</sub>O) συνθετικού φυσιολογικού πεπτιδίου (Met498-Ala523) όπου η Phe508 (κίτρινο) περιέχεται εντός ελικοειδούς δομής. **B)** Χωροπληρωτική απεικόνιση NMR ανάλυσης (σε H<sub>2</sub>O) συνθετικού μεταλλαγμένου πεπτιδίου, όπου η ΔF508 μετάλλαξη προκαλεί απώλεια της ελικοειδούς δομής. Με κίτρινο επισημαίνεται η περιοχή όπου φυσιολογικά βρίσκεται η Phe508.





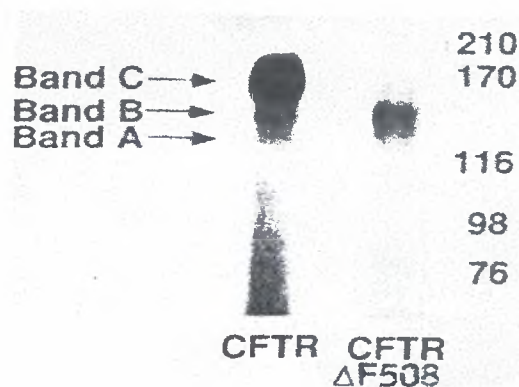
**Εικόνα 13:** Απόλεια της α-ελικοειδούς δομής συνθετικού πεπτιδίου (Met498-Ala523) του CFTR, λόγω της ΔF508 μετάλλαξης.

Η CFTR πρωτεΐνη καθώς συντίθεται από μεμβρανοσύνδετα ριβοσώματα, ενσωματώνεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ), ενώ παράλληλα προστίθενται ολιγοσακχαρικές αλυσίδες στις οποίες προσδένονται η καλνεξίνη και οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες συνοδοί (chaperones) Hsp70, Hdj-2 και Hsp90 (εικόνα 14). Για να μπορέσει η πρόωμη πρωτεΐνη να εξαχθεί από το ΕΔ μέσω των COPII καλυμμένων κυστιδίων<sup>43</sup>, θα πρέπει η πρωτεΐνη να λάβει μια ανώτερη δομή. Η ωρίμανση της πρωτεΐνης, η οποία είναι ATP εξαρτώμενη, συνοδεύεται από απελευθέρωσή της από την καλνεξίνη και τις συνοδούς πρωτεΐνες. Μόρια τα οποία δεν λαμβάνουν αυτή τη διαμόρφωση κατακρατούνται από τις πρωτεΐνες συνοδούς και υπόκεινται σε πρωτεόλυση από πρωτεασώματα ή σχηματίζουν συσσωματώματα (aggresomes)<sup>44</sup>, όταν η πρωτεόλυση παρεμποδίζεται. Σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες προστατεύονται από την πρωτεόλυση, μεταφέρονται στη συσκευή Golgi, όπου ολοκληρώνεται η γλυκοσυλίωση της πρωτεΐνης και κυστίδια στη συνέχεια μεταφέρουν τον CFTR από το trans-Golgi στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τέλος η πρωτεΐνη μεταφέρεται με τα ενδοσωμάτια στα λυσοσώματα όπου και αποδομείται.



**Εικόνα 14:** Ωρίμανση, ενδοκυττάρια μεταφορά και αποδόμηση της πρωτεΐνης CFTR.

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο μεταλλαγμένος ΔF508 CFTR δεν μπορεί να υποστεί ωρίμανση στο ΕΔ, η οποία είναι ATP εξαρτώμενη, με αποτέλεσμα να κατακρατείται από τις πρωτεΐνες συνοδούς και να υφίσταται πρωτεόλυση. Επομένως η ΔF508 μετάλλαξη δεν επιτρέπει στον μεταλλαγμένο CFTR να ωριμάσει και να εξαχθεί από το ΕΔ και να φτάσει τελικά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη<sup>45,46</sup>, πράγμα το οποίο αποτελεί επεξήγηση της μοριακής και χημικής βάσης της γενετικής ασθένειας που προκαλείται δηλαδή της κυστικής ίνωσης. Η αποτυχία της CFTR πρωτεΐνης να εξελιχθεί βιοσυνθετικά μπορεί να εκτιμηθεί πειραματικά με βάση τη κατάσταση γλυκοσυλίωσης της πρωτεΐνης<sup>47</sup>. Σε κύτταρα στα οποία έχει εισαχθεί το γονίδιο της ΚΙ με τεχνικές ανασυνδυασμού, ο φυσιολογικός CFTR και ο ΔF508 CFTR μετά από ανοσοκαθίζηση φωσφορυλιώνονται με PKA και [<sup>32</sup>P] ATP και διαχωρίζονται έπειτα σε πηκτή αγαρόζης. Όπως φαίνεται στην εικόνα, η ζώνη Α αντιστοιχεί στο πρώιμο CFTR που δεν έχει γλυκοσυλιωθεί. Η ζώνη Β αντιπροσωπεύει τη πρωτεΐνη που έχει υποστεί μερική γλυκοσυλίωση στο ΕΔ. Η ζώνη C αντιστοιχεί στον ώριμο CFTR του οποίου η γλυκοσυλίωση έχει ολοκληρωθεί στη συσκευή Golgi. Ο ΔF508 CFTR δεν εμφανίζει C ζώνη, επειδή πρωτεολύεται μετά τη μερική γλυκοσυλίωσή του στο ΕΔ και έτσι η πρωτεΐνη δεν ανιχνεύεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (εικόνα 15).

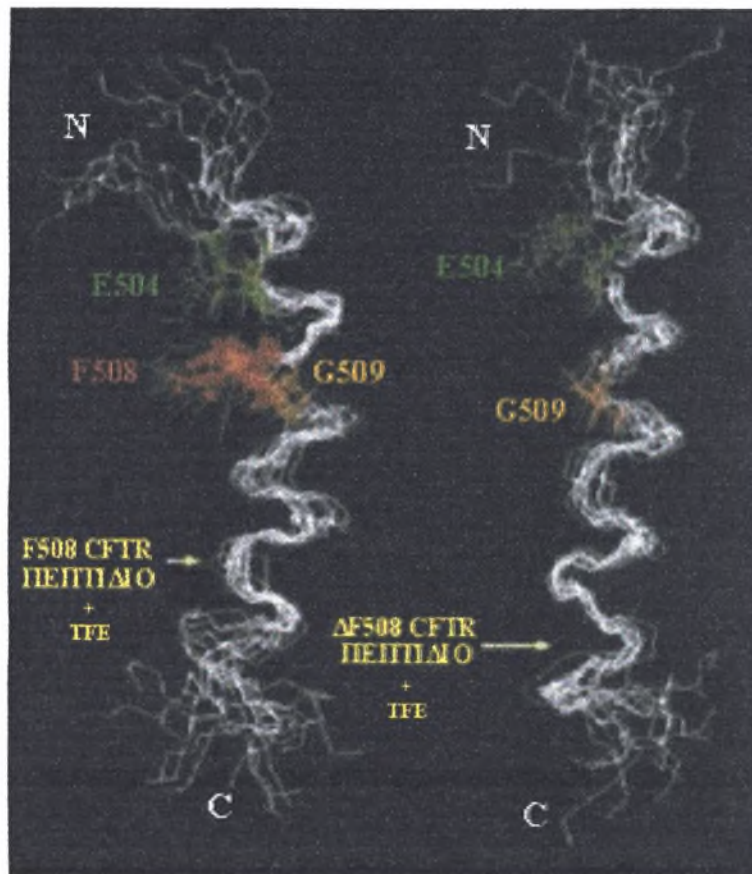


**Εικόνα 15:** Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός ραδιενεργά σημασμένων ανώριμων (A), μερικώς γλυκοσυλιωμένων (B) και ώριμων (C) μορφών CFTR και ΔF508 CFTR.

Έχει παρατηρηθεί ότι σε χαμηλή θερμοκρασία, μικρότερη των 37°C, μερικές από τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες μπορούν να διαφύγουν τη πρωτεόλυση και αφού γλυκοσυλιωθούν στη συσκευή Golgi, μεταφέρονται στη κυτταρική μεμβράνη και λειτουργούν εκεί ως διάλυτοι Cl<sup>-</sup>. Οι περισσότερες όμως μελέτες υποστηρίζουν ότι η δραστηριότητα του ΔF508 CFTR είναι μειωμένη στο 1/3 από αυτήν του φυσιολογικού CFTR<sup>49,50,48</sup>. Αυτό σημαίνει ότι η ΔF508 μετάλλαξη επιφέρει τοπικές μεταβολές στη δομή του μορίου, προκαλώντας έτσι μειωμένη πρόσδεση του ATP στην NBD1 περιοχή και άρα μειωμένη δραστηριότητα της συνολικής πρωτεΐνης.



Η μελέτη της επίπτωσης της ΔF508 μετάλλαξης στη δομή της CFTR πρωτεΐνης οδήγησε στο να γίνουν προσπάθειες *in vitro*, ώστε να προαχθεί η ωρίμανση της πρωτεΐνης παρεμποδίζοντας με διάφορους τρόπους τη κακή αναδίπλωση του μορίου στο ΕΔ. Μια απόπειρα *in vitro* αφορούσε τη χρήση διαφόρων παραγόντων όπως είναι η γλυκερόλη<sup>51</sup> και η τριφθοροαιθανόλη (TFE)<sup>42</sup>, οι οποίοι επιδρούν χημικά στη δομή της ΔF508 πρωτεΐνης, επιφέροντας έτσι τη σωστή διαμόρφωση (α έλικα) στο μεταλλαγμένο πεπτίδιο, το οποίο αντιστοιχεί στην αλληλουχία γύρω από τη Phe508 (εικόνα 16).



**Εικόνα 16:** Επίδραση της TFE στην επαναφορά της α-έλικας στο πεπτίδιο του ΔF508 CFTR.

Επιπλέον άλλοι χημικοί παράγοντες όπως ο IBMX (3-ισοβούτυλο-1 μέθυλο - ξανθίνη)<sup>52</sup>, ο οποίος είναι μια φωσφοδιεστεράση που αναστέλλει την αποικοδόμηση του cAMP, και η δεοξυσπεργουαλίνη<sup>53</sup>, η οποία επηρεάζει τη πρόσδεση της Hsp70, καθώς επίσης και η χαμηλή θερμοκρασία<sup>48</sup> επάγουν μερικώς τη λειτουργία του ΔF508 CFTR στη κυτταροπλασματική μεμβράνη σταθεροποιώντας την ενεργοποιημένη μορφή του. Προς το παρόν όμως καμιά από αυτές τις θεραπευτικές προσεγγίσεις δεν μπορούν να εφαρμοστούν *in vivo*, παρά το γεγονός ότι όλες τους δίνουν αρκετά ενθαρρυντικά αποτελέσματα *in vitro*.

## ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ

Η ΚΙ είναι μια πολύπλοκη νόσος, η οποία χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργία των εξωκρινών αδένων με κλινικά συμπτώματα που αφορούν το αναπνευστικό, το πεπτικό (πάγκρεας, ήπαρ και χοληφόροι αγωγοί, έντερο) και το γεννητικό σύστημα καθώς επίσης και τους ιδρωτοποιούς αδένες. Τα διάφορα κλινικά συμπτώματα της ΚΙ οφείλονται είτε στο μειωμένο αριθμό μορίων CFTR στη κυτταροπλασματική μεμβράνη είτε σε διαταραχή της διακίνησης των ιόντων  $Cl^-$  και κατά συνέπεια και των ιόντων  $Na^+$  μεταξύ του ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού υγρού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι επιθηλιακές εκκρίσεις να είναι ιξώδεις, λόγω της χαμηλής περιεκτικότητάς τους σε νερό, η μεταφορά του οποίου εξαρτάται άμεσα από τις κινήσεις αυτών των ιόντων, καθώς επίσης και λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνες, πράγμα το οποίο οδηγεί σε απόφραξη των εκφορητικών πόρων των εξωκρινών αδένων.

### ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Στο αναπνευστικό σύστημα οι αεροφόρες οδοί καλύπτονται επιφανειακά από ένα λεπτό στρώμα βλέννας, η οποία παράγεται από ειδικούς εξωκρινείς αδένες που βρίσκονται στο συνδετικό υπόστρωμα. Η βλέννα αυτή είναι υδαρής φυσιολογικά και αποτελείται από πρωτεάσες, οξειδάσες, αντιβιοτικές ουσίες, αντισώματα και άλλες αντιμικροβιακές ουσίες που όλες μαζί αδρανοποιούν και καταστρέφουν κάθε ξένη προς τον οργανισμό ουσία ή μικροοργανισμό που θα παγιδευτεί σε αυτή. Η απομάκρυνσή τους επιτυγχάνεται συνήθως μηχανικά διαμέσω του βήχα.

Το κύριο χαρακτηριστικό σύμπτωμα των ασθενών με ΚΙ είναι η υπερβολική παραγωγή παχύρρευστης, κολλώδους βλέννας στις αεροφόρους οδούς λόγω μειωμένης μεταφοράς άλατος και νερού μέσω των επιθηλιακών κυττάρων. Παρατηρούνται επίσης μεταβολές στις χημικές ιδιότητες της βλέννας με αποτέλεσμα οι πνεύμονες να είναι ευαίσθητοι σε λοιμώξεις από κοινούς παθογόνους μικροοργανισμούς, καθώς και μικρόβια τα οποία κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δε θα ήταν παθογόνα. Το ήδη υψηλό ιξώδες των παχύρρευστων εκκρίσεων αυξάνεται ακόμα πιο πολύ λόγω του DNA που απελευθερώνεται από τα νεκρά λευκά αιμοσφαίρια, τα οποία έχουν ως στόχο τη καταπολέμηση των πνευμονικών λοιμώξεων<sup>54</sup>.

Κατά τη γέννηση οι πνεύμονες σε ασθενείς με ΚΙ είναι απόλυτα φυσιολογικοί. Καθώς όμως αυξάνεται ο όγκος της πνευμονικής χωρητικότητας, παρατηρείται μια πρωτοπαθής αναπνευστική δυσλειτουργία, η οποία είναι αποτέλεσμα της απόφραξης των αεροφόρων οδών από την υπερβολική συσσώρευση παχύρευστης βλέννας. Η αδυναμία απορρόφησης ή αποβολής των παχύρευστων αυτών εκκρίσεων στο κατώτερο αναπνευστικό έχει ως αποτέλεσμα τη διάταση των βρόγχων και των βρογχιολίων και τη δημιουργία δευτερογενώς βρογχίτιδας και βρογχοεκτασιών. Στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα οι φλεγμονώδεις παθήσεις των ρινικών κόλπων είναι σύνηθες εύρημα σε ασθενείς με ΚΙ, ενώ οι ρινικοί πολύποδες είναι συχνοί στους ενήλικες ασθενείς. Το 80% των ασθενών που περνά τα δεκατέσσερα χρόνια του αρχίζει να παρουσιάζει αποφρακτικού τύπου λειτουργικό σύνδρομο, το οποίο προοδευτικά επιδεινώνεται<sup>55</sup>.

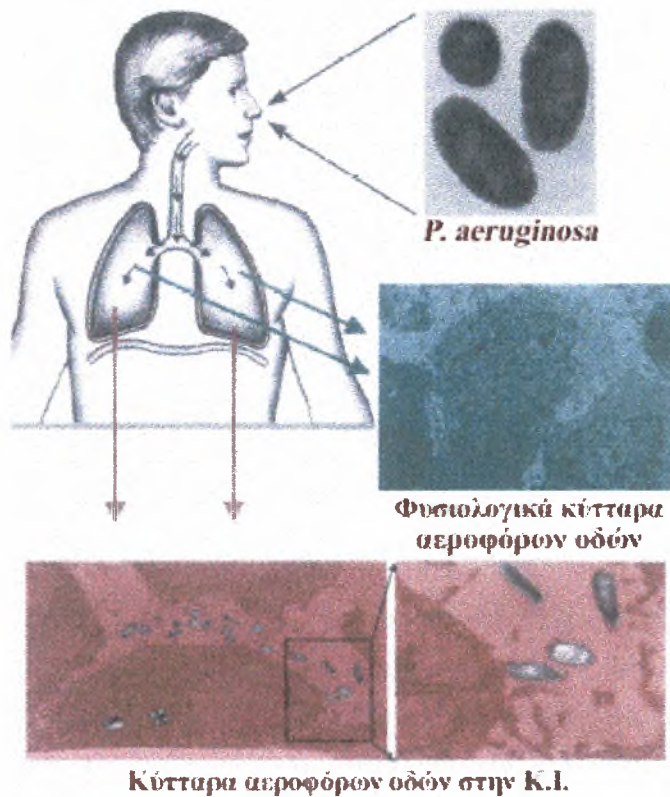
Από την άλλη πλευρά οι υποτροπιάζουσες βρογχοπνευμονικές λοιμώξεις, οι οποίες είναι παρούσες στο 97% των ενήλικων ασθενών<sup>56</sup>, αποτελούν καθοριστικό παράγοντα για τη πρόγνωση της νόσου. Το κυριότερο παθογόνο μικρόβιο, το οποίο προκαλεί λοιμώξεις των πνευμόνων σε ασθενείς με ΚΙ είναι η *Pseudomonada aeruginosa*<sup>57</sup>. Ο αποικισμός των αεροφόρων οδών με *Pseudomonada aeruginosa* συνοδεύεται από φλεγμονή, η οποία με τη μεσολάβηση ανοσοσυμπλεγμάτων, πρωτεασών, και οξειδωτικών μεταβολιτών αραχιδονικού οξέος, οδηγεί σταδιακά σε βρογχοπνευμονικές βλάβες προκαλώντας αναπνευστική ανεπάρκεια, η οποία αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου σε ασθενείς με ΚΙ<sup>58</sup> (εικόνα 17).

## ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

### ΠΑΓΚΡΕΑΣ

Το 85% περίπου των ασθενών με ΚΙ εμφανίζουν παγκρεατική ανεπάρκεια<sup>59</sup>. Πρώιμες ενδείξεις παγκρεατικής ανεπάρκειας παρατηρούνται στη 32<sup>η</sup> έως και 38<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης, πράγμα το οποίο σημαίνει διαταραχή ωρίμανσης του εξωκρινούς παγκρεατικού ιστού κατά την ενδομήτριο ζωή. Έχει δειχτεί ότι ο γενότυπος και πιο συγκεκριμένα η ΔF508 μετάλλαξη παίζει σημαντικό ρόλο στη σοβαρότητα της παγκρεατικής ανεπάρκειας. Σύμφωνα με μια μελέτη, η παγκρεατική ανεπάρκεια ήταν παρούσα στο 99% των ασθενών, που ήταν ομόζυγοι για τη ΔF508 μετάλλαξη, στο 72% των ασθενών οι οποίοι ήταν ετερόζυγοι για τη ΔF508 μετάλλαξη και μόνο στο 36% των ασθενών με άλλη μετάλλαξη<sup>60</sup>. Αντίθετα δεν έχει δειχτεί συσχέτιση ανάμεσα στη σοβαρότητα της πνευμονικής βλάβης και τη παρουσία ή την απουσία της ΔF508 μετάλλαξης ή οποιασδήποτε άλλης μετάλλαξης<sup>61</sup>.





**Εικόνα 17:** Σύγκριση κυττάρων αεροφόρων οδών προερχόμενα από φυσιολογικό άτομο και απο ασθενή με ΚΙ. μετά από έκθεση σε *Pseudomonada aeruginosa*. Μετά από 10 ώρες το μέσο το οποίο περιβάλλει τα φυσιολογικά κύτταρα δεν περιέχει βακτηρίδια σε αντίθεση με το μέσο των κυττάρων του ασθενούς με ΚΙ, στο οποίο περιέχονται αρκετά βακτηρίδια, μερικά απο τα οποία έχουν προσδεθεί στα κύτταρα ενώ άλλα έχουν εισαχθεί σ'αυτά.

Η πρωτοπαθής βιοχημική βλάβη στο πάγκρεας σε ασθενείς με ΚΙ είναι η διαταραχή στην έκκριση ιόντων  $\text{Cl}^-$  μέσω των επιθηλιακών κυττάρων του παγκρεατικού εκφορητικού πόρου, η οποία με τη σειρά της επηρεάζει την έκκριση των διττανθρακικών ιόντων ( $\text{HCO}_3^-$ ) και του νερού<sup>62,63</sup>. Έτσι η παγκρεατική έκκριση είναι αφυδατωμένη, φτωχή σε νερό, διττανθρακικά ιόντα, χλωριούχα και πλούσια αντίθετα σε πρωτεΐνες<sup>64</sup>. Η αυξημένη συγκέντρωση βλέννας στο παγκρεατικό πόρο έχει ως αποτέλεσμα την απόφραξή του. Δευτεροπαθώς παρατηρείται ατροφία των κυψελιδικών πόρων εξαιτίας της πίεσης που δέχονται, με τελικό αποτέλεσμα τη ρήξη του εκφορητικού πόρου και τη βαθμιαία απώλεια των παγκρεατικών ενζύμων (λιπάση, αμυλάση, τρυψίνη, χυμοτρυψίνη κ.α.). Όλες οι παραπάνω αλλοιώσεις οδηγούν σε κλινικές εκδηλώσεις, όπως είναι το σύνδρομο της δυσασπορρόφησης εξαιτίας της ανεπάρκειας της εξωκρινούς μοίρας, η στεατόρροια και η μειωμένη ανάπτυξη κατά την παιδική ηλικία και εφηβεία λόγω υποσιτισμού και έλλειψης λιποδιαλυτών βιταμινών<sup>65,66</sup>.

Τα ιστολογικά ευρήματα στο πάγκρεας εξαρτώνται από την ηλικία του ασθενούς και τη βαρύτητα της παγκρεατικής νόσου. Πρώιμη βλάβη είναι τα ηωσινοφιλικά συγκρίματα τα οποία αποφράσσουν τους μικρούς παγκρεατικούς πόρους. Ακολούθως έχουμε διεύρυνση των πόρων και διόγκωση των κυψελών με συνοδευόμενη ατροφία των κυψελιδικών κυττάρων και προοδευτική ανάπτυξη ινώδους συνδετικού ιστού στην εξωκρινή μοίρα του παγκρέατος. Όσον αφορά την ενδοκρινή μοίρα, αρχικά τα νησίδια του Langerhans είναι άθικτα, αλλά η προοδευτική ανάπτυξη του συνδετικού ιστού επιφέρει τη μηχανική παραμόρφωση των νησιδίων με αποτέλεσμα την εκφύλιση και νέκρωση των ενδοκρινών κυττάρων. Έτσι ένα ποσοστό 40-50% των ενηλίκων με ΚΙ φαίνεται να παρουσιάζει ανοχή στη γλυκόζη ενώ ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη αναπτύσσει το 15% των ασθενών περίπου<sup>67,68</sup>. Έχει παρατηρηθεί πάντως ότι οι ασθενείς με φυσιολογική παγκρεατική λειτουργία έχουν γενικά μεγαλύτερο χρόνο διαβίωσης.

### ΗΠΑΡ ΚΑΙ ΧΟΛΗΦΟΡΟΙ ΑΓΩΓΟΙ

Η πρωτοπαθής βλάβη στο ήπαρ, την οποία εκδηλώνει περίπου το 2-5% των ασθενών με ΚΙ, εντοπίζεται στα ενδο και εξωηπατικά χοληφόρα αγγεία εξαιτίας της συγκέντρωσης βλέννας υψηλού ιξώδους και απόφραξης αυτών<sup>69</sup>. Το αποτέλεσμα είναι η μικρή εκροή της χολής προς το έντερο και η μη καλή πέψη των τροφών.

Σε κάποιες περιπτώσεις, λόγω συνεχιζόμενης καταστροφής του ηπατικού παρεγχύματος, εντοπίζεται και εστιακή χολική κίρρωση, ενώ αποφρακτικός ίκτερος δεν παρατηρείται παρά μόνο στα τελευταία στάδια της νόσου. Επιπλέον το 30% των ενηλίκων ασθενών εμφανίζει ηπατομεγαλία και το 12% των ασθενών εκδηλώνει χολολιθίαση<sup>70</sup>.

## ΕΝΤΕΡΟ

Στο 10-20% των νεογέννητων με ΚΙ παρατηρείται ειλεός εκ μηκωνίου εξαιτίας της απόφραξης του εντέρου από παχύρευστο μηκόνιο<sup>71</sup>. Το 5-15% των ενήλικων ασθενών με ΚΙ παρουσιάζει και αυτό επεισόδια οξείας εντερικής απόφραξης από μάζες κοπράνων<sup>72</sup>. Η πρόπτωση του ορθού είναι μια κοινή επιπλοκή τα πρώτα 2-3 χρόνια της ζωής του ατόμου με ΚΙ. Αυτή η επιπλοκή οφείλεται σε μια σειρά από παραμέτρους με κυριότερες το μικρό μέγεθος και την κάθετη πορεία του ορθού, τη συνεχιζόμενη διάρροια, τον έντονο βήχα και τη φτωχή διατροφή.

## **ΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ**

Η σεξουαλική ζωή των ασθενών με ΚΙ είναι φυσιολογική, η αναπαραγωγική όμως ανικανότητα στους άνδρες λόγω της αποφρακτικής αζωοσπερμίας φτάνει περίπου το 98%<sup>73</sup>. Ανατομικά η αζωοσπερμία οφείλεται σε ατροφία ή και έλλειψη της επιδιδυμίδας, ενώ η ωρίμανση των σπερματογονίων δε γίνεται σωστά με αποτέλεσμα να παρατηρείται ασπερμία και ελάτωση του σπερματικού όγκου<sup>74</sup>. Αντίθετα με τους άνδρες, οι γυναίκες σε ποσοστό 80% είναι γόνιμες. Η γονιμότητα στις υπόλοιπες μειώνεται εξαιτίας της συσσώρευσης βλέννας υψηλού ιξώδους στη μήτρα<sup>75</sup>.

## **ΙΔΡΩΤΟΠΟΙΟΙ ΑΔΕΝΕΣ**

Όπως και στους άλλους ορώδεις αδένες έτσι και στη περίπτωση των ιδρωτοποιών αδένων αυτοί είναι δομικά φυσιολογικοί. Σε φυσιολογικό ρυθμό εφίδρωσης τα ποσοστά των ηλεκτρολυτών (NaCl) που αποβάλλονται από τους αδένες είναι μέσα στα φυσιολογικά όρια. Σε πρόκληση όμως υψηλού ρυθμού εφίδρωσης, η συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών που αποβάλλονται είναι πολύ υψηλή (>60mmol/l) σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα<sup>76</sup>.

Σε νεογνά μικρότερα των 3 μηνών με ΚΙ, η συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου και νατρίου είναι >40mmol/l, τιμή που δεν είναι φυσιολογική. Η ανακάλυψη όμως υψηλών συγκεντρώσεων NaCl στον ιδρώτα θα πρέπει να συνδυάζεται με το φαινότυπο και το γενότυπο του ασθενούς με ΚΙ, ώστε να αποφευχθεί κάποιο λάθος στη διάγνωση. Η υπερβολική απώλεια ιδρώτα, ιδίως κατά τους θερινούς μήνες, προκαλεί το λεγόμενο “καρδιοκυκλοφορικό collapsus”, εξαιτίας της μεγάλης αφυδάτωσης με αποτέλεσμα τη θερμοπληξία και τη πτώση της συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης.

## ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΚΙ

Η διάγνωση της ΚΙ αρχικά είναι κλινική και βασίζεται στην ύπαρξη μιας ή περισσότερων κλινικών εκδηλώσεων ή στο οικογενειακό ιστορικό της νόσου ή στο θετικό αποτέλεσμα του ελέγχου νεογνών για ΚΙ. Σχεδόν όλοι οι ασθενείς με ΚΙ εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα που αφορούν το αναπνευστικό, το πεπτικό σύστημα, ενώ η αποφρακτική αζωοσπερμία, που φτάνει το 98% στους άνδρες με ΚΙ, αποτελεί σταθερό κλινικό εύρημα για τη τεκμηρίωση και διάγνωση της νόσου. Η κλινική υποψία επιβεβαιώνεται εργαστηριακά ως εξής:

α) **Προσδιορισμός των ηλεκτρολυτών στον ιδρώτα (τέστ εφίδρωσης)<sup>77</sup>**: Ο προσδιορισμός των ηλεκτρολυτών (ιόντων  $Cl^-$ ) στον ιδρώτα παραμένει ο κυριότερος τρόπος διάγνωσης της ΚΙ. Ο μόνος αποδεκτός τρόπος προσδιορισμού των ηλεκτρολυτών στον ιδρώτα είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός τους μετά από ιοντοφόρηση με πιλοκαρπίνη. Συγκεντρώσεις ιόντων  $Cl^-$  στον ιδρώτα μεγαλύτερες από 60mmol/l είναι διαγνωστικές της νόσου.

β) **Μέτρηση ρινικών δυναμικών<sup>78</sup>**: Η μέτρηση των ρινικών δυναμικών είναι χρήσιμη εκεί που το τεστ εφίδρωσης αδυνατεί να θέσει τη διάγνωση. Η αύξηση των ρινικών δυναμικών αντιπροσωπεύει τη μειωμένη διαβατότητα  $Cl^-$  και την αυξημένη μεταφορά  $Na^+$  και είναι ενδεικτική της ΚΙ. Εκείνο όμως που θέτει τη διάγνωση είναι ο τρόπος μεταβολής των ρινικών δυναμικών κατά την έκπλυση του βλεννογόνου από διάφορα διαλύματα.

γ) **Γενοτυπικός έλεγχος<sup>79</sup>**: Η ανεύρεση δύο μεταλλαγμένων αλληλίων στο γενότυπο του ασθενούς είναι διαγνωστική της νόσου. Ο γενοτυπικός έλεγχος είναι απαραίτητο να γίνεται σε όλους τους ασθενείς με ΚΙ, όχι μόνο για την επιβεβαίωση της διάγνωσης, αλλά και για να δοθούν γενετικές συμβουλές για την πρόληψη της νόσου. Επίσης ο γενότυπος είναι απαραίτητο να αναζητάται σε όλους εκείνους τους ασθενείς με οριακό «τεστ ιδρώτα».

Τα τελευταία χρόνια η διάγνωση της ΚΙ έχει συμπεριληφθεί σε προγράμματα νεογνικού ελέγχου. Ο έγκαιρος γενετικός έλεγχος έχει συσχετισθεί με σημαντική βελτίωση θρέψης (τουλάχιστον μέχρι την εφηβεία) μειωμένη θνησιμότητα, καλύτερη λειτουργία του αναπνευστικού και γαστρεντερικού συστήματος, ενώ η πρόγνωση στην ΚΙ βελτιώνεται σημαντικά αν η διάγνωση τεθεί πριν η κατάσταση εμφανισθεί κλινικώς.



Νεογνά με ΚΙ έχουν υψηλή συγκέντρωση ανοσοαντιδρώσας θρυψίνης (IRT) στο πλάσμα και αυτό είναι η βάση ελέγχου νεογνών σε πολλές χώρες, σε συνδυασμό με εξέταση του DNA<sup>80</sup>. Έχει διαπιστωθεί ότι με το συνδυασμό των εξετάσεων IRT και DNA ανάλυσης μπορεί να ανιχνευθεί με χαμηλό κόστος τουλάχιστον το 95% των ασθενών.

Τέλος η εφαρμογή του προγεννητικού ελέγχου αποτελεί αυτή τη στιγμή την πιο αποδοτική μέθοδο πρόληψης της ΚΙ<sup>81</sup>. Ο προγεννητικός έλεγχος περιλαμβάνει:

α) Εξέταση των επιπέδων ορισμένων ενζύμων σε αμνιακό υγρό που λαμβάνεται μετά από αμνιοκέντηση την 16<sup>η</sup> με 18<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης. Τα ένζυμα που μετρώνται είναι η αλκαλική φωσφατάση (ALP), τα ισοένζυμά της, η γ-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάση (GTP) και η αμινοπεπτιδάση Μ. Μειωμένα επίπεδα αυτών των ενζύμων σε αμνιακό υγρό είναι ενδεικτικά της ΚΙ.

β) Ανάλυση του DNA του εμβρύου που λαμβάνεται από i) υλικό βιοψίας τροφοβλάστης (10<sup>η</sup>-12<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης), ii) κύτταρα αμνιακού υγρού (αμνιοπαρακέντηση περί τη 16<sup>η</sup> εβδομάδα), iii) εμβρυϊκό αίμα (παρακέντηση ομφαλικής αρτηρίας, 2<sup>ο</sup> ή 3<sup>ο</sup> τρίμηνο).

## ΠΡΟΓΝΩΣΗ-ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Από το 1938, που περιγράφηκε για πρώτη φορά η ΚΙ μέχρι και το 1940, η επιβίωση των ασθενών σπάνια ξεπερνούσε τα 5 χρόνια ζωής. Το 80% των άρρωστων παιδιών πέθαιναν τον 1<sup>ο</sup> χρόνο της ζωής τους. Γύρω στο 1960 ο μέσος χρόνος ζωής, με τη βοήθεια μιας υποτυπώδους αγωγής αυξήθηκε στα 9 χρόνια. Αργότερα η καλύτερη γνώση της παθογένειας της ασθένειας και η εύρεση πιο αποτελεσματικών μορφών αγωγής αύξησε το μέσο όρο ζωής σε 25-26 χρόνια μέσα στη δεκαετία του '80. Τα τελευταία χρόνια πάντως έχει αλλάξει σημαντικά η πρόγνωση της νόσου. Σημερινές μελέτες δείχνουν ότι ο μέσος όρος ζωής έχει αυξηθεί φτάνοντας και ξεπερνώντας τα 30 χρόνια.

Η αύξηση αυτή του μέσου όρου ζωής αποδίδεται σε τρεις κυρίως παράγοντες: α) στη πρόωμη διάγνωση της νόσου β) στη δημιουργία ειδικών κέντρων σε όλο τον κόσμο για την αντιμετώπισή της γ) στην επιθετικότερη και πιο αποτελεσματική θεραπεία. Μέχρι σήμερα δυστυχώς αποτελεσματική θεραπεία δεν υπάρχει. Η θεραπεία αποβλέπει μόνο στη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών με ΚΙ καθώς και στη μεγαλύτερη διάρκειά της. Η θεραπεία που εφαρμόζεται σήμερα είναι δύο τύπων: α) η συντηρητική θεραπεία και β) η χειρουργική.

Σήμερα η φυσικοθεραπεία ως συντηρητική θεραπεία αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο αντιμετώπισης της αναπνευστικής δυσλειτουργίας, γιατί με την αγωγή που περιλαμβάνει ειδικές ασκήσεις, απομακρύνεται η ιξώδης και παχύρρευστη βλέννα που αποφράσσει τους βρόγχους. Η συντηρητική θεραπεία με χρήση αντιβιοτικών χρησιμοποιείται επίσης για τη καταπολέμηση των λοιμώξεων που προσβάλλουν το αναπνευστικό σύστημα. Τα αντιβιοτικά χορηγούνται είτε από το στόμα, είτε παρεντερικώς είτε με τη μορφή αεροζόλ ανάλογα με το είδος και την ευαισθησία του μικροβίου που αναπτύσσεται στα πτύελα. Τα φάρμακα που χορηγούνται με τη μορφή εισπνοών είναι βλεννολυτικά, βρογχοδιασταλτικά, αντιβιοτικά και DNAση. Το τελευταίο είναι ένα εισπνεόμενο φάρμακο που χορηγείται τα τελευταία χρόνια με καλά αποτελέσματα, καθώς διασπά το DNA που υπάρχει στις παχύρρευστες εκκρίσεις, οπότε τις ρευστοποιεί ώστε να μπορούν να φεύγουν πιο εύκολα μέσα από τις αεροφόρους οδούς<sup>82</sup>. Επίσης και τα άλλα εισπνεόμενα φάρμακα έχουν ως κύριο σκοπό την αποβολή των βλεννών ελαττώνοντας το ιξώδες τους (εμποδίζουν δηλαδή την υπερβολική επαναρρόφηση του  $\text{Na}^+$  από τις εκκρίσεις) και την αποτροπή του βρογχόσπασμου που πολλοί ασθενείς παρουσιάζουν.

Οι καρδιαγγειακές ανωμαλίες εμφανίζονται τα τελευταία χρόνια πιο συχνά ως αποτέλεσμα της αύξησης του ορίου επιβίωσης. Αυτό καθώς και οι εκτεταμένες βλάβες στους πνεύμονες οδήγησαν στη χειρουργική θεραπεία. Η μεταμόσχευση ενός πνεύμονα αποτελεί ίσως σήμερα μια αρκετά καλή αντιμετώπιση της νόσου. Η κοινή μεταμόσχευση καρδιάς-πνεύμονα εφαρμόζεται σε ασθενείς που βρίσκονται στα τελικά στάδια της νόσου και αποτελεί τη μοναδική ελπίδα σωτηρίας. Με τη βελτίωση των χειρουργικών τεχνικών και με τα νεώτερα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την αποφυγή της απόρριψης, τα ποσοστά επιβίωσης από μεταμόσχευση συνεχώς θα αυξάνονται.

Η αντιμετώπιση της παγκρεατικής ανεπάρκειας επιτυγχάνεται με τη χορήγηση παγκρεατικών εκχυλισμάτων (τρυψίνη, χυμοτρυψίνη, λιπάση) καθώς και βιταμινών A,D,E και K<sup>83</sup>. Παρόλα αυτά όμως στην αρχή η επιτυχία ήταν μερική και αυτό διότι η πέψη και η απορρόφηση των τροφών γίνονταν στο όξινο περιβάλλον του στομάχου και του δωδεκακαδακτύλου, το οποίο καταστρέφει τα χορηγούμενα ένζυμα. Σήμερα τα παγκρεατικά εκχυλίσματα χορηγούνται με αντιόξινους αναστολείς των υποδοχέων της ισταμίνης και αυτό βελτιώνει την απορρόφηση των λιπών ελαττώνοντας την στεαττόροια. Η νέα γενιά πάντως παγκρεατικών εκχυλισμάτων και βιταμινών φέρει ειδικό οξεάντοχο περίβλημα έτσι ώστε να μη καταστρέφονται στο όξινο pH του στομάχου και να επιτυγχάνεται καλύτερη πέψη των τροφών με μικρότερες δόσεις ενζύμων, ενώ οι ασθενείς έχουν ελεύθερο διαιτολόγιο. Επιπλέον γίνονται προσπάθειες παρασκευής συνθετικής γλωσσικού τύπου λιπάσης, με τη μέθοδο του ανασυνδυασμένου DNA.

Όλες οι παραπάνω μορφές θεραπείας παρατείνουν όπως είπαμε το χρόνο ζωής των ασθενών και βελτιώνουν τη ποιότητα ζωής τους. Η γονιδιακή θεραπεία όμως έρχεται να δώσει πολλά ενθαρρυντικά αποτελέσματα για τη ριζική θεραπεία των ασθενών με ΚΙ. Το 1990 έγιναν οι πρώτες προσπάθειες in vitro μεταφοράς ενός φυσιολογικού γονιδίου σε κύτταρα του αναπνευστικού επιθηλίου από ασθενή με ΚΙ<sup>84</sup>. Χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικά διάφοροι φορείς όπως μικρόβια, αδενοϊοί, ρετροϊοί και πλασμίδια προκειμένου να γίνει ο αρχικός ανασυνδυασμός του φυσιολογικού γονιδίου. Ως πιο κατάλληλος φορέας κρίθηκε ο αδενοϊός, ο οποίος και τροποποιήθηκε έτσι ώστε να χάσει τόσο τη λοιμογόνο δύναμη όσο και την αναπαραγωγική του ικανότητα<sup>85,86</sup>. Προέκυψαν όμως κάποια βασικά μειονεκτήματα από τη χρήση του αδενοϊού ως μεταφορέα του ανασυνδυασμένου γονιδίου της ΚΙ και είναι τα εξής:

α) ότι δεν μπορούσαν να ξέρουν τη δόση του ανασυνδυασμένου ιού που θα έπρεπε να δώσουν, ώστε να επιτύχουν τη θεραπεία όσο το δυνατόν περισσότερων επιθηλιακών κυττάρων in vivo, καθώς και πόσο καιρό θα διαρκούσε αυτή η θεραπεία.

β) επίσης παρατηρήθηκε ότι στον οργανισμό που ήταν εκτεθειμένος σε επανειλημμένες δόσεις τέτοιων ιών κάποια στιγμή αντιδρούσε το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς.

Παρόλα αυτά η εισαγωγή του ανασυνδυασμένου με το φυσιολογικό γονίδιο αδενοϊού μέσα σε καλλιέργειες κυττάρων του αναπνευστικού επιθηλίου έδειξε αποκατάσταση της λειτουργίας των διαύλων χλωρίου. Η παραπάνω ανακάλυψη πιστοποιήθηκε με την απομόνωση της φυσιολογικής πρωτεΐνης CFTR από εκχύλισμα CF κυττάρων. Κατόπιν έγιναν περαιτέρω μελέτες εφαρμογής της γονιδιακής θεραπείας σε ποντίκια που έπασχαν από ΚΙ, όπου τα αποτελέσματα ήταν επίσης ενθαρρυντικά.

Προκειμένου να εξαφανιστεί τελείως ο κίνδυνος μιας επιπλέον λοίμωξης από κάποιο ιό-μεταφορέα οι επιστήμονες δίνουν μια νέα διάσταση στη γονιδιακή θεραπεία με τη χρήση των λιποσωμάτων ως φορέων του φυσιολογικού γονιδίου στα επιθηλιακά κύτταρα. Τα λιποσώματα είναι λεπτά γεμάτα σφαιρίδια, τα οποία φέρουν στην εξωτερική τους επιφάνεια καθλωμένο το φυσιολογικό γονίδιο της ΚΙ και έτσι διευκολύνεται η απορρόφησή του από τη κυτταρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων. Τα λιποσώματα έχουν το πλεονέκτημα της καλύτερης απορρόφησης και θεωρούνται λιγότερα τοξικά και ανοσογόνα σε σχέση με τους ανασυνδυασμένους ιούς<sup>87</sup>.

Το μέλλον της γονιδιακής θεραπείας είναι αρκετά ελπιδοφόρο, ενώ φαίνεται ότι η ταυτόχρονη χρήση των λιποσωμάτων και των ανασυνδυασμένων ιών έχει πολύ καλύτερα αποτελέσματα. Πέραν όμως από την εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας στο αναπνευστικό σύστημα σε ασθενείς με ΚΙ, δεν φαίνεται να μπορεί να εφαρμοστεί το ίδιο και στη περίπτωση της παγκρεατικής ανεπάρκειας ή της βλάβης άλλων οργάνων στους ενήλικες, ενώ είναι ενθαρρυντική η χρήση της γονιδιακής θεραπείας στο προγεννητικό στάδιο.

## **ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΚΥΣΤΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ**

Η ανίχνευση μεταλλάξεων με εφαρμογή μοριακών τεχνικών πραγματοποιείται κυρίως για τη διάγνωση γενετικών νοσημάτων περιλαμβανομένων ορισμένων ειδών καρκίνου αλλά και για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών. Για τη μοριακή διάγνωση γενετικών νοσημάτων είναι απαραίτητη η γνώση του γονιδίου (ή των γονιδίων, όταν πρόκειται για πολυπαραγοντικό νόσημα) που είναι υπεύθυνο για το νόσημα, το μέγεθος και η αλληλουχία του γονιδίου καθώς και το είδος και η συχνότητα των μεταλλάξεων που απαντώνται στον υπο μελέτη πληθυσμό. Με την αποκρυπτογράφηση του Γενετικού Κώδικα του ανθρώπου έχουν χαρτογραφηθεί πάνω από 30.000 γονίδια, στα περισσότερα από τα οποία είναι γνωστές οι αλληλουχίες των εξονίων. Τα γονίδια αυτά με εναλλακτικό μάτισμα και άλλες διεργασίες, είναι υπεύθυνα για την σύνθεση των περίπου 300.000 πρωτεϊνών που υπολογίζονται ότι εκφράζονται στους ανθρώπινους ιστούς<sup>88</sup>.

Μοριακή διάγνωση γενετικών νοσημάτων γίνεται για την ανίχνευση των φορέων με σκοπό την πρόληψη, δηλαδή τον προγεννητικό έλεγχο, αλλά και την προκλινική διάγνωση. Ιδιαίτερη σημασία αποκτά η μοριακή διάγνωση στην περίπτωση εκείνη όπου οι βιοχημικοί δείκτες δεν προσφέρονται για τον εντοπισμό των φορέων της νόσου. Σήμερα πολλά γενετικά νοσήματα είναι δυνατό να διαγνωστούν με αυτό τον τρόπο.



Η πλειονότητα σχεδόν των μοριακών τεχνικών βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), η οποία επέτρεψε την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων και ελλειμμάτων που οδηγούν σε γενετικές διαταραχές προσφέροντας μεγαλύτερη ταχύτητα και ακρίβεια στη διάγνωση πλήθους γενετικών νοσημάτων. Μοριακές τεχνικές που εφαρμόζονται για την ανίχνευση μεταλλάξεων διακρίνονται σε άμεσες και έμμεσες. Οι άμεσες τεχνικές δίνουν τη δυνατότητα ανίχνευσης γνωστών μεταλλάξεων καθώς και απόλυτου χαρακτηρισμού της μετάλλαξης και της θέσης της στο γονίδιο. Άμεσες μέθοδοι είναι: υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (ASO Hybridization), ανίχνευση μεταλλάξεων με τη μέθοδο ARMS (Amplification Refractory Mutation System), ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα (RFLP), ανίχνευση μεταλλάξεων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (PAGE), εύρεση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων της υπό μελέτης γονιδιακής περιοχής (Sequencing).

Με τις έμμεσες τεχνικές προσδιορίζεται η περιοχή στην οποία εντοπίζεται μια γνωστή ή άγνωστη μετάλλαξη και στη συνέχεια απαιτείται η εφαρμογή μιας άμεσης μεθόδου για τον πλήρη χαρακτηρισμό της μετάλλαξης. Βέβαια με τις έμμεσες μεθόδους μπορεί να γίνει ανίχνευση μεταξύ γνωστών μεταλλάξεων χωρίς τη μεσολάβηση άμεσων μεθόδων, σε γονίδια στα οποία δεν έχει βρεθεί πολύ μεγάλος αριθμός πολυμορφισμών και μεταλλάξεων ( υπάρχουν δηλαδή διακριτά patterns). Ως έμμεσοι μέθοδοι χαρακτηρίζονται οι: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με κλίση αποδιατακτικού (DGGE), ανάλυση της διαμόρφωσης της μονόκλωνης δομής του DNA (SSCP), αποκοπή μη συμπληρωματικών βάσεων με χημική μέθοδο (chemical mismatch cleavage method).

### **Άμεσες Τεχνικές Ανάλυσης Μεταλλάξεων στο γονίδιο CFTR**

Αρκετές τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων έχουν εφαρμοστεί και στο γονίδιο της Κυστικής Ίνωσης τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο. Άμεσες τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων σ' αυτό το γονίδιο, όπως είναι η ΔF508 είναι οι εξής:

- **Υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (ASO Hybridization)<sup>89</sup>:**

Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται για έλεγχο σημειακών μεταλλάξεων (allele specific oligonucleotide – ASO) είναι μικρά συνθετικά μόρια DNA που κατασκευάζονται έτσι ώστε να ανιχνεύουν γνωστές σημειακές μεταλλάξεις. Τα ολιγονουκλεοτίδια ανιχνευτές θα υβριδιστούν μόνο με αλληλουχίες με τις οποίες παρουσιάζουν απόλυτη συμπληρωματικότητα ενώ η παρουσία έστω και μιας μόνο μη συμπληρωματικής βάσης αποτρέπει τον υβριδισμό υπό συγκεκριμένες συνθήκες.

Οι συνθετικοί ανιχνευτές είναι συνήθως μικρού μεγέθους (περίπου 20 νουκλεοτίδια σε μήκος) και η θέση του τροποποιημένου νουκλεοτιδίου που ανιχνεύεται βρίσκεται περίπου στο μέσο. Για τη διερεύνηση κάθε μιας μετάλλαξης κατασκευάζονται δύο ανιχνευτές, ένας συμπληρωματικός της φυσιολογικής αλληλουχίας και ένας ίδιος με τον προηγούμενο που διαφέρει μόνο στη βάση που αντιστοιχεί στη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Με κατάλληλη ρύθμιση των συνθηκών υβριδισμού, ο φυσιολογικός ανιχνευτής θα υβριδιστεί μόνο με δείγματα που περιέχουν φυσιολογική αλληλουχία του DNA και ο μεταλλαγμένος θα υβριδιστεί μόνο με δείγματα που περιέχουν τη μεταλλαγμένη αλληλουχία (δείγματα DNA ετερόζυγα για τη μετάλλαξη θα υβριδιστούν και με τους δύο ανιχνευτές).

Τα oligονουκλεοτίδια – ανιχνευτές πρέπει να σημαθούν ώστε να είναι δυνατή η εξακρίβωση της υβριδοποίησης. Η σήμανση γίνεται με ενσωμάτωση ραδιοϊσοτόπων στο 5' άκρο των oligονουκλεοτιδίων – ανιχνευτών, πριν από τον υβριδισμό. Το μειονέκτημα της χρήσης ραδιενεργών ουσιών τείνει τα τελευταία χρόνια να περιορισθεί με την ανάπτυξη μη ραδιενεργών μεθόδων σήμανσης. Η μέθοδος του υβριδισμού με συνθετικά oligονουκλεοτίδια περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό του τμήματος του γονιδίου που περιέχει μια γνωστή μετάλλαξη, με τη μέθοδο PCR. Το προϊόν της PCR στη συνέχεια μεταφέρεται σε μεμβράνη υβριδισμού (νιτρογλυκερίνη ή Nylon) και υφίσταται υβριδισμό με τον ανιχνευτή κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ειδικές για το oligονουκλεοτίδιο.

- **Ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα ( Restriction fragment length polymorphism)<sup>90</sup> :**

Τα περιοριστικά ένζυμα έχουν την ιδιότητα να τέμνουν το DNA μόνο όπου υπάρχει συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων στο μόριο του. Δεν είναι σπάνιο μια σημειακή μετάλλαξη στο DNA ενός γονιδίου να καταστρέφει ή να δημιουργεί ένα σημείο αναγνώρισης - τομής ενός περιοριστικού ενζύμου π.χ. στο γονίδιο του CFTR η μετάλλαξη G551D καταστρέφει την αλληλουχία αναγνώρισης για το ένζυμο Hinc II (GT CAAC → ATCAAC) και επίσης δημιουργεί μια περιοχή η οποία αναγνωρίζεται από το ένζυμο MboI (GGTC → GATC).

Στις περιπτώσεις αυτές η σημειακή μετάλλαξη αναγνωρίζεται εύκολα, εάν πολλαπλασιαστεί το τμήμα του DNA το οποίο περιλαμβάνει την υπό αναζήτηση μετάλλαξη και κατόπιν το τμήμα αυτό επωάζεται με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο. Ακολουθεί ανάλυση των προϊόντων της επώασης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο, άμεση επισκόπηση και ανάλυση των αποτελεσμάτων σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας.

- **Ανίχνευση μεταλλάξεων με τη μέθοδο ARMS (Amplification Refractory Mutation System)<sup>91</sup>:**

Η μέθοδος ARMS αποτελεί μια παραλλαγή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης που επιτρέπει τον εξειδικευμένο πολλαπλασιασμό ενός τμήματος αλληλομόρφου από το σύνολο του γονιδιακού DNA. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα των PCR εκκινητών σύμφωνα με την οποία ένα ολιγονουκλεοτίδιο με ένα μη συμπληρωματικό 3' άκρο δεν θα λειτουργήσει ως εκκινητής σε μια PCR αντίδραση υπό ορισμένες συνθήκες. Οι εκκινητές για την αντίδραση ARMS σχεδιάζονται για να προσδιορίζουν τη φυσιολογική και τη μεταλλαγμένη αλληλουχία στο DNA για κάθε μια από τις από τις μεταλλάξεις που ελέγχονται.

Παρασκευάζονται δύο αντιδράσεις πολλαπλασιασμού για κάθε δείγμα. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιείται ένας εκκινητής που είναι κοινός για τις δύο αντιδράσεις και ένας άλλος που είναι συμπληρωματικός προς τη θέση που εξετάζεται για τη παρουσία μιας συγκεκριμένης μετάλλαξης. Ο δεύτερος διαφέρει στις δύο αντιδράσεις ως προς το 3' άκρο του. Στη μια αντίδραση αντιστοιχεί στη φυσιολογική αλληλουχία και στην άλλη στη μεταλλαγμένη. Για να γίνει πιο συγκεκριμένος ο υβριδισμός τους στη συμπληρωματική τους αλληλουχία στο DNA τόσο ο φυσιολογικός όσο και ο μεταλλαγμένος εκκινητής έχουν μετάλλαξη μιας βάσεως 3 ή 4 νουκλεοτίδια πριν το 3' άκρο τους.

Η αντίδραση ARMS περιλαμβάνει επίσης ένα ζεύγος σταθερών PCR εκκινητών που πολλαπλασιάζει μια γειτονική περιοχή του DNA γεγονός που επιτρέπει ένα εσωτερικό έλεγχο της PCR αντίδρασης. Τελικά το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο και μετά επισκοπείται άμεσα σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας.

Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η δυνατότητα άμεσης αξιολόγησης των αποτελεσμάτων μετά την αντίδραση PCR χωρίς να υπάρχει ανάγκη υβριδισμού με ραδιενεργά ολιγονουκλεοτίδια. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων σε αρκετά γενετικά νοσήματα όπως είναι η Κυστική Ίνωση και η Μεσογειακή Αναμία.

- **Ανίχνευση μεταλλάξεων με ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis)<sup>92</sup>:**

Είναι μια χρήσιμη μέθοδος στην οποία προσθήκες ή ελλείμματα ενός ή περισσοτέρων νουκλεοτιδίων μπορούν να ανιχνευτούν με την αντίδραση PCR και ανάλυση των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Συγκεκριμένα στο γονίδιο της Κυστικής Ίνωσης η μετάλλαξη ΔF508 αποτελεί γνωστό έλλειμμα τριών νουκλεοτιδίων. Γι' αυτό το έλλειμμα σχεδιάζονται ειδικοί εκκινητές, τόσο για το φυσιολογικό όσο και για το μεταλλαγμένο γονίδιο, οι οποίοι κατά τη διάρκεια της PCR τοποθετούνται ο ένας προς το 5' άκρο του και ο άλλος προς το 3' άκρο του. Στη συνέχεια ακολουθεί ανάλυση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 8% όπου το φυσιολογικό γονίδιο δίνει τμήμα μεγέθους 98bp, ενώ το μεταλλαγμένο γονίδιο λόγω της ΔF508 μετάλλαξης είναι μεγέθους 95bp. Έτσι τα δύο γονίδια μπορούν να διαχωριστούν εύκολα κατά την ηλεκτροφόρηση με βάση το μέγεθός τους.

Επιπλέον μ' αυτή τη μέθοδο μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα αν κάποιος είναι ετεροζυγώτης για την ΔF508 μετάλλαξη ή όχι. Η ετεροζυγωτία μπορεί εύκολα να ανιχνευθεί από την παρουσία ετεροδιμερών, τα οποία σχηματίζονται μεταξύ φυσιολογικής και μεταλλαγμένης αλληλουχίας DNA κατά την PCR αντίδραση. Αυτά τα ετεροδιμερή έχουν διαφορετική κινητικότητα λόγω διαφορετικής τριτοταγούς δομής κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης και μπορούν εύκολα να αναγνωριστούν.

- **Ανάλυση της αλληλουχίας του DNA (sequencing) με χημική μέθοδο ή ενζυμική μέθοδο :**

- Χημική μέθοδος<sup>93</sup>

Η επίδραση ενός χημικού αντιδραστηρίου στα μονόκλιωνα μόρια DNA, που έχουν επισημανθεί με <sup>32</sup>P, καταστρέφει εκλεκτικά τις αδενίνες και οδηγεί σε μια ομάδα τμημάτων DNA διαφορετικού μήκους, που είναι αντιπροσωπευτικά για τις θέσεις όπου υπάρχουν αδενίνες. Τα τμήματα διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή και τα ραδιενεργά επισημασμένα ανιχνεύονται με αυτοραδιογραφία. Επαναλαμβάνοντας την διαδικασία και για τις τέσσερις βάσεις προκύπτει τελικά η αλληλουχία διαβάζοντας από κάτω προς το πάνω μέρος της πηκτής.

- Ενζυμική μέθοδος<sup>94</sup>

Το μόριο του δίκλωνου DNA που πρόκειται να αναλυθεί χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τη σύνθεση μερικών αντιγράφων DNA, που όλα έχουν την ίδια αρχή αλλά τερματίζονται σε διαφορετικά σημεία της αλυσίδας του DNA. Ο τερματισμός γίνεται με την εισαγωγή διδέοξυριβονουκλεοζιτών. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται και με τους τέσσερις διδέοξυριβονουκλεοζίτες και μ' αυτό τον τρόπο προκύπτει μια διαβάθμιση DNA τμημάτων τα οποία ανιχνεύονται με επισήμανση (χημική ή ραδιενεργή) που είτε ενσωματώνεται στον εκκινητήρα ολιγονουκλεοτιδίου είτε σε έναν από τους τριφωσφορικούς δέοξυριβονουκλεοζίτες που χρησιμοποιούνται για την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA. Αφού διαχωριστούν τα προκύπτοντα DNA τμήματα με ηλεκτροφόρηση, βρίσκεται η αλληλουχία διαβάζοντας από το κάτω προς το πάνω μέρος της πηκτής.



## Έμμεσες Τεχνικές Ανάλυσης Μεταλλάξεων στο γονίδιο CFTR

Οι έμμεσες μέθοδοι δίνουν τη δυνατότητα ανίχνευσης (screening) φορέων της Κυστικής Ίνωσης στο γενικό πληθυσμό με ένα γρήγορο και οικονομικό τρόπο. Ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων στο γονίδιο της Κυστικής Ίνωσης με έμμεσες τεχνικές δε μπορεί να γίνει χωρίς τη μεσολάβηση άμεσων μεθόδων λόγω του μεγάλου αριθμού πολυμορφισμών και μεταλλάξεων που απαντώνται στο γονίδιο της Κυστικής Ίνωσης (μη διακριτά patterns). Έμμεσες μέθοδοι που εφαρμόζονται για την ανίχνευση κυρίως αγνώστων αλλά και γνωστών μεταλλάξεων που απαντώνται σε μικρότερη συχνότητα από τις άλλες μεταλλάξεις στο γονίδιο της Κυστικής Ίνωσης είναι οι εξής:

- **Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με κλίση αποδιατακτικού (DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)<sup>95</sup> :**

Η μέθοδος DGGE επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων DNA που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους όπως σε περίπτωση αντικατάστασης μιας μόνο βάσης με άλλη. Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός βασίζεται στα χαρακτηριστικά τήξεως του DNA. Οι δύο συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA μπορούν να διαχωρίζονται (τήκονται) όχι μόνο σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας αλλά και υπό την επίδραση συγκεκριμένων χημικών αποδιατακτικών ουσιών όπως φορμαμίδιο και ουρία.

Κατά μήκος ενός μορίου DNA (ιδανικά όχι μεγαλύτερο από 500bp) η τήξη θα γίνει σε συγκεκριμένα τμήματα όσο αυξάνεται η θερμοκρασία ή η συγκέντρωση του χημικού αποδιατακτικού. Τα τμήματα αυτά ονομάζονται «κύριες περιοχές» ή «επίτοποι» και καθένα από αυτά τήκεται σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία που ονομάζεται θερμοκρασία τήξεως ( $T_m$ ). Η  $T_m$  μιας «κύριας περιοχής» εξαρτάται στενά από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και αλλάζει σημαντικά με την αντικατάσταση έστω και μιας μόνο βάσης. Η ηλεκτροφόρηση του DNA γίνεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που περιέχει σταδιακά αυξανόμενη (από την κορυφή προς τη βάση) συγκέντρωση χημικού αποδιατακτικού. Καθώς ένα τμήμα DNA εισέρχεται στη συγκέντρωση του αποδιατακτικού, όπου τήκεται η «κύρια περιοχή» με την χαμηλότερη  $T_m$ , η περιοχή «ανοίγει» σχηματίζοντας ένα μόριο DNA με διακλαδιζόμενη δομή το οποίο κινείται στο πήκτωμα πολύ αργά (σχεδόν ακινητοποιείται). Εάν το δείγμα DNA σε αυτή την περιοχή περιέχει μια σημειακή μετάλλαξη, η  $T_m$  θα διαφέρει και θα έχει το μόριο του DNA μια εντελώς διαφορετική κινητικότητα στο πήκτωμα συγκρινόμενο με το δείγμα-μάρτυρα.

Για να εντοπιστούν οι μεταλλάξεις σε όλο το τμήμα του DNA που μελετάμε, προστίθεται στη μια άκρη του μορίου ένα τμήμα DNA πλούσιο σε GC βάσεις, “GC clamp”, ( συνήθως μήκους 30-60bp) το οποίο έχει πολύ υψηλότερο Tm από το Tm του υπόλοιπου τμήματος DNA. Έτσι με τη μέθοδο DGGE, η οποία θεωρείται η πιο ευαίσθητη από τις έμμεσες μεθόδους, είναι δυνατή η ανίχνευση κάθε αλλαγής νουκλεοτιδίου στο μόριο του DNA.

- **Ανάλυση της διαμόρφωσης της μονόκλωνης δομής του DNA (SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism)<sup>96</sup>:**

Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατό να εντοπιστεί σε μια περιοχή DNA οποιαδήποτε σημειακή μετάλλαξη. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αρχή ότι η δευτεροταγής δομή μονόκλωνου DNA που οφείλεται σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις είναι χαρακτηριστική της συγκεκριμένης αλληλουχία του μορίου του DNA. Η διαμόρφωση μορίων DNA που διαφέρουν έστω και κατά μια βάση είναι διαφορετική και μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης χωρίς αποδιατακτικές ουσίες.

Η περιοχή που ελέγχεται για την ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων ενισχύεται με PCR και μετά από αποδιάταξη σε υψηλή θερμοκρασία ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Για την ανίχνευση των τμημάτων του DNA μπορεί να γίνει ιχνηθέτηση κατά την αντίδραση PCR ενσωματώνοντας ένα ραδιοσημασμένο dNTP, οπότε στη συνέχεια το πήκτωμα πρέπει να ξηραθεί και να εκτεθεί σε ακτινογραφικό φιλμ για κάποιες ώρες. Επίσης το πήκτωμα μπορεί απ' ευθείας να βαφεί με νιτρικό άργυρο ή βρωμιούχο αιθίδιο. Όταν το τμήμα του DNA που ελέγχεται με τη μέθοδο δεν φέρει σημειακές μεταλλάξεις δύο ζώνες εμφανίζονται και αντιστοιχούν στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες. Όταν όμως υπάρχει μετάλλαξη εμφανίζονται τέσσερις ζώνες που αντιστοιχούν δυο στην μεταλλαγμένη και δυο στη φυσιολογική αλληλουχία του DNA.

Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της τεχνικής είναι η θερμοκρασία, η προσθήκη κάποιων υλικών όπως η γλυκερόλη και το μέγεθος των προϊόντων. Το μέγεθος των προϊόντων συνήθως δεν ξεπερνά τις 300bp και για μεγαλύτερα μεγέθη μπορούν να χρησιμοποιηθούν περιοριστικά ένζυμα που δίνουν προϊόντα μικρότερα και κατάλληλα για τη τεχνική.

- **Chemical mismatch cleavage method (Χημική μέθοδος αποκοπής μή συμπληρωματικών βάσεων)<sup>97</sup>:**

Η μέθοδος αυτή ανίχνευσης μεταλλάξεων στηρίζεται στο σχηματισμό ετεροδιμερών υβριδίων από φυσιολογικές και μεταλλαγμένες αλληλουχίες DNA. Ακολουθεί έπειτα αποκοπή των σημείων εκείνων στα ετεροδιμερή όπου δεν σχηματίζονται συμπληρωματικά ζεύγη βάσεων με τη χρήση χημικών αντιδραστηρίων.

Οι φυσιολογικές αλληλουχίες αρχικά σημαίνονται με ραδιοσημασμένο primer μέσω της PCR αντίδρασης. Χειρισμός των ετεροδιμερών με υδροξυλαμίνη (H) οδηγεί σε χημική τροποποίηση των μη συμπληρωματικών C βάσεων, ενώ χειρισμός με osmium tetroxide (OT) τροποποιεί χημικά τις μη συμπληρωματικές T βάσεις. Τα ετεροδιμερή έπειτα επώάζονται με πιπεριδίνη, η οποία έχει ως τελικό αποτέλεσμα την αποκοπή των τροποποιημένων βάσεων. Τα ραδιοσημασμένα κομμάτια που παράγονται μπορούν να γίνουν διακριτά με αυτοραδιογραφία σε υψηλής διακριτικής ικανότητας πηκτωμα πολυακρυλαμίδης.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη μεθοδολογίας στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ανίχνευση της ΔF508 μετάλλαξης του γονιδίου της Κυστικής Ίνωσης.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού χρησιμοποιήθηκαν 14 άγνωστα δείγματα ανθρώπινου DNA, 11 εκ των οποίων προέρχονται από το κέντρο αναφοράς της Κυστικής Ίνωσης του Νοσοκομείου «Παιδών» και 3 από εθελοντική αιμοδοσία τριών ατόμων στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Ως controls χρησιμοποιήθηκαν τρία γνωστά δείγματα DNA, 1 από ομοζυγώτη και 1 από ετεροζυγώτη της ΔF508 μετάλλαξης και 1 δείγμα φυσιολογικού ατόμου, που είχαν προσδιοριστεί στο Νοσοκομείο «Παιδών».

Η μέθοδος που θα εφαρμοστεί για την ανίχνευση της ΔF508 μετάλλαξης στα παραπάνω δείγματα DNA, μετά τον πολλαπλασιασμό του κατάλληλου τμήματος με PCR, είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (PAGE).

Εφόσον εδραιωθεί, η μεθοδολογία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό αυτής της μετάλλαξης αρχικά στους ασθενείς με ΚΙ που παρακολουθούνται στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας και στη συνέχεια σε μεγαλύτερο δείγμα ατόμων από την περιφέρεια Θεσσαλίας για να διερευνηθεί η συχνότητα αυτής της μετάλλαξης στο πληθυσμό αυτό αλλά και για ανίχνευση φορέων της νόσου ή για προγεννητικό έλεγχο.

## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ

Από 2 ml αίματος από κάθε μια από τις 3 εθελοντικές αιμοδοσίες απομονώνεται DNA σύμφωνα με το εξής πρωτόκολλο<sup>98</sup>:

#### ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ (EXTRACTION) DNA ΜΕ ΕΞΑΛΑΤΩΣΗ ΑΠΟ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΑ ΟΛΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

1. Μετά την αιμοληψία, προσθέτουμε EDTA στο αίμα, ως αντιπηκτικό, τόσο ώστε η συγκέντρωσή του στο αίμα να είναι 5 mM.
2. Τοποθετούμε τα 2 ml αίματος από κάθε δείγμα σε σωληνάριο των 15ml και αραιώνουμε ως 12 ml περίπου με ddH<sub>2</sub>O (δισαπασταγμένο) και ανακατεύουμε με pasteur (τα ερυθροκύτταρα σπάνε σε υπότονο περιβάλλον).
3. Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3000 rpm, στους 4°C.
4. Αφαιρούμε το υπερκείμενο. Το ίζημα αραιώνεται σε ddH<sub>2</sub>O ως 12ml περίπου. Διαλύουμε σε Vortex.
5. Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3000 rpm στους 4°C.
6. Αφαιρούμε το υπερκείμενο. Το ίζημα αραιώνεται σε ddH<sub>2</sub>O ως 12ml περίπου. Διαλύουμε σε Vortex.
7. Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3000 rpm στους 4°C.
8. Αδειάζουμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε διάλυμα λύσης λευκοκυττάρων (lysis I) (πίνακας 2) μέχρι τα 12ml (το lysis I σπάει την κυτταρική μεμβράνη των λευκοκυττάρων).
9. Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3000 rpm στους 4°C.
10. Επαναλαμβάνουμε τα στάδια 8, 9 με lysis I.
11. Αδειάζουμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε διάλυμα λύσης των πυρήνων των λευκοκυττάρων (lysis II) (πίνακας 2) μέχρι τα 6 ml. Ανακινούμε καλά και επωάζουμε για 30 min (το lysis II σπάει τους πυρήνες των λευκοκυττάρων και παίρνουμε DNA).
12. Προσθέτουμε 750μl SDS 10% και 100μl proteinase K συγκέντρωσης 10 mg/ml (το SDS ανοίγει την πυρηνική μεμβράνη, η πρωτεϊνάση K συμβάλλει στη πεπτιδική υδρόλυση και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών).

13. Επώαση στους 37°C overnight.
14. Προσθέτουμε 2ml 6M NaCl. Αναδεύουμε ισχυρά για 15 sec (το NaCl σε μεγάλη συγκέντρωση προκαλεί κατακρήμνιση των πρωτεϊνών).
15. Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3.500 rpm στους 4°C (με τη φυγοκέντρωση παίρνουμε το DNA στο υπερκείμενο).
16. Στο υπερκείμενο υπάρχει το DNA. Μεταγγίζουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάκι (των 50 ml falcon).
17. Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 3.500 rpm στους 4°C.
18. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε άλλο falcon (των 50 ml).
19. Ακολουθεί καταβύθιση (precipitation) με 2 όγκους αιθανόλης 100%. Προσθέτουμε CH<sub>3</sub>COONa, όγκου ίσου με 1/10 του όγκου που είχαμε πριν τη καταβύθιση (το DNA κατακρημνίζεται με ανάμειξη με αιθανόλη 100%, το άλας CH<sub>3</sub>COONa οδηγεί σε συσσωμάτωση των μορίων του DNA μέσω εξουδετέρωσης των αρνητικών φορτίων τους).
20. Επιάζουμε στην κατάψυξη overnight.
21. Φυγοκεντρούμε για 50min στις 3500rpm στους 4°C (ή αν πιάνει η φυγόκεντρος πολλές στροφές για 30min στις 8000rpm).
22. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και το ίζημα το βάζουμε σε eppendorf των 2ml.
23. Ξεπλένουμε το ίζημα με 2ml 70% αιθανόλης και φυγοκεντρούμε για 30min στις 12000rpm στους 4°C
24. Επαναλαμβάνουμε το στάδιο 23 άλλες δύο φορές, με τη διαφορά ότι η διάρκεια της φυγοκέντρωσης είναι 20min.
25. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και καλύπτουμε το σωληνάκι το οποίο τρυπάμε με καρφίτσα. Το αφήνουμε overnight.
26. Διαλύουμε το τελικό ίζημα σε 100μl H<sub>2</sub>O.

**Πίνακας 2: Παρασκευή των lysis I και lysis II.**

<b>Lysis I</b>	<b>Lysis II</b>
NH <sub>4</sub> Cl: 155mM	Tris: 10mM
KHCO <sub>3</sub> : 10mM	NaCl: 400mM
EDTA: 1mM	EDTA: 2mM
pH: 7.4	pH : 8.2

Τα αποτελέσματα της απομόνωσης ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση 10μl δ/τος DNA από κάθε δείγμα και σε πηκτή αγαρόζης 1% για 30 λεπτά περίπου υπο σταθερή τάση 100V και ακολουθεί φωτογράφιση της πηκτής. Ως μάρτυρας (marker) χρησιμοποιείται ο PvuI 18 που έχει καταταμηθεί με το περιοριστικό ένζυμο *HinfI*.

## **ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ DNA**

Στη συνέχεια προχωράμε στη ποσοτικοποίηση του DNA που διαθέτουμε. Για το σκοπό αυτό σε φωτομετρική κυψελίδα βάζουμε 1000μl, συνολικά, δ/τος ddH<sub>2</sub>O και ποσότητας τόσης από το επαναδιαλυμένο DNA του κάθε δείγματος, ώστε να βρισκόμαστε σε τιμές απορρόφησης > 0,1 A ( A = Absorption). Φωτομετρούμε στα 260nm και κατόπιν στα 280nm και υπό την αίρεση ότι οι απορροφήσεις βρίσκονται για λόγους αξιοπιστίας μεταξύ 0,1 και 0,9nm, ο λόγος των δύο μετρήσεων προσδιορίζει την καθαρότητα του DNA. Αν ο λόγος βρίσκεται μεταξύ 1,8-2,0, η τιμή της απορρόφησης στα 260nm μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του δ/τος DNA που φωτομετρούμε και κατ' επέκταση της ποσότητας του DNA που διαθέτουμε (ποσοτικοποίηση). Μικρότερες τιμές υποδηλώνουν πρόσμειξη πρωτεϊνών, ενώ μεγαλύτερες πρόσμειξη RNA. Για δίκλωνο DNA ισχύει:  $A_{260} = 1$  ισοδυναμεί με 50 μg/ ml DNA δ/τος στην κυψελίδα, και με αυτό το δεδομένο υπολογίζουμε την ποσότητα του DNA που έχουμε απομονώσει.



## ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).

Η PCR είναι μια μέθοδος για την *in vitro* κλωνοποίηση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, εκμεταλλευόμενη ορισμένα χαρακτηριστικά του *in vivo* μηχανισμού αντιγραφής του DNA. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου ενώ απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Το σημείο έναρξης της σύνθεσης μπορεί να καθοριστεί με τη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδικού εναρκτηρίου μορίου (εκκινητή, primer) που συνδέεται με τη μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο. Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR περιλαμβάνει πολλούς κύκλους, ο καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες, με βάση τα ακόλουθα βήματα:

1. αποδιάταξη (διαχωρισμός των δίκλωνων μορίων DNA σε μονόκλωνες αλυσίδες)
2. υβριδοποίηση (σύζευξη των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μόρια του μονόκλωνου DNA)
3. προέκταση (σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA)

Για τον πολλαπλασιασμό περιοχής του γονιδίου CFTR με PCR χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *Taq* DNA Polymerase (5 U/μl)(BioLabs) και οι εξής δύο εκκινητές (primers)<sup>99</sup>:

**Primer 1 (C16B) 5'- GTT TTC CTG GAT TAT GCC TGG CAC - 3'**

**Primer 2 (C16D) 5'- GTT GGC ATG CTT TGA TGA CGC TTC -3'**

Η PCR αντίδραση πραγματοποιείται σε ένα πρώτο στάδιο στους 95°C για 5 λεπτά, ακολουθούμενο από 30 κύκλους σε θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf). Κάθε κύκλος περιλαμβάνει ένα στάδιο αποδιάταξης (1 λεπτό στους 94°C), ένα στάδιο σύζευξης των εκκινητών με τη μητρική αλυσίδα (50 δευτερόλεπτα στους 62°C) και ένα στάδιο επέκτασης των εκκινητών (2 λεπτά στους 72°C). Μετά το τέλος των κύκλων ακολουθεί το στάδιο προέκτασης με στόχο τη σταθεροποίηση του προϊόντος της αντίδρασης (7 λεπτά στους 72°C), (Πίνακας 3).

**Πίνακας 3:** Συνθήκες της PCR

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	
95	5 min	
94	1 min	} 30 κύκλοι
62	50sec	
72	2 min	
72	7 min	

Τα συστατικά της PCR αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4:

**Πίνακας 4:** Συστατικά της PCR αντίδρασης

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
Γενομικό DNA	Χμl (500ng)	
10X PCR buffer	10μl	1X
dNTPs μίγμα (10mM)	2μl	0.8mM
Primer 1+Primer2 (20μM)	10μl	2μM
MgCl <sub>2</sub>	4μl	2mM
Taq DNA Polymerase(5U/μl)	0,4μl	2 units
1% W-1 (απορρυπαντικό)	3μl	
ddH <sub>2</sub> O	Εως 100μl	
Τελικός όγκος	100μl	

Κατά τη διάρκεια της PCR αντίδρασης, ο primer1 τοποθετείται προς το 5' άκρο της περιοχής που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε και ο primer2 τοποθετείται προς το 3' άκρο της. Μ' αυτό τον τρόπο πολλαπλασιάζεται περιοχή στο εξόνιο 10 του γονιδίου της KI, μεγέθους 98bp για το φυσιολογικό γονίδιο ή 95bp για το μεταλλαγμένο, όπως φαίνεται στην εικόνα 18.

```

1  ttccaaact  tcacttctaa  tgatgattat  gggagaactg  gaggccttcag  agggtaaaat
61 taagcacagt  ggaagaattt  cattctgttc  tcagttttcc  tggattatgc  ctggcagcat
121 taaagaaaat  atcatctttg  gtgtttccta  tgatgaatat  agatacagaa  gcgtcatcaa
181 agcatgccaa  ctagaagagg  taagaa

```

**Εικόνα 18:** Στην αλληλουχία του εξονίου 10 του γονιδίου της KI, με πράσινο χρώμα επισημαίνονται οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών, με μπλε η πολλαπλασιαζόμενη με PCR περιοχή, και με κόκκινο η θέση της μετάλλαξης ΔF508 (απαλοιφή των τριών νουκλεοτιδίων).

Στη συνέχεια η επιτυχία και η απόδοση της PCR αντίδρασης ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 3% για 15 λεπτά περίπου υπο σταθερή τάση 100V και ακολουθεί φωτογράφιση της πηκτής. Ως marker χρησιμοποιείται ο 100bp DNA Ladder (BioLabs).

## ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ( PAGE )

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR αντίδρασης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8%<sup>92</sup>, η σύσταση της οποίας παρουσιάζεται στον πίνακα 5.

**Πίνακας 5:** Σύσταση της πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%

Αντιδραστήρια	Όγκος
50% acrylamide - bisacrylamide	4,8 ml
5 X TBE (Tris Boric Acid EDTA)	3 ml
ddH <sub>2</sub> O	22 ml
10% υπερθειικό αμμώνιο	200μl
TEMED	20 μl

## ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ PAGE

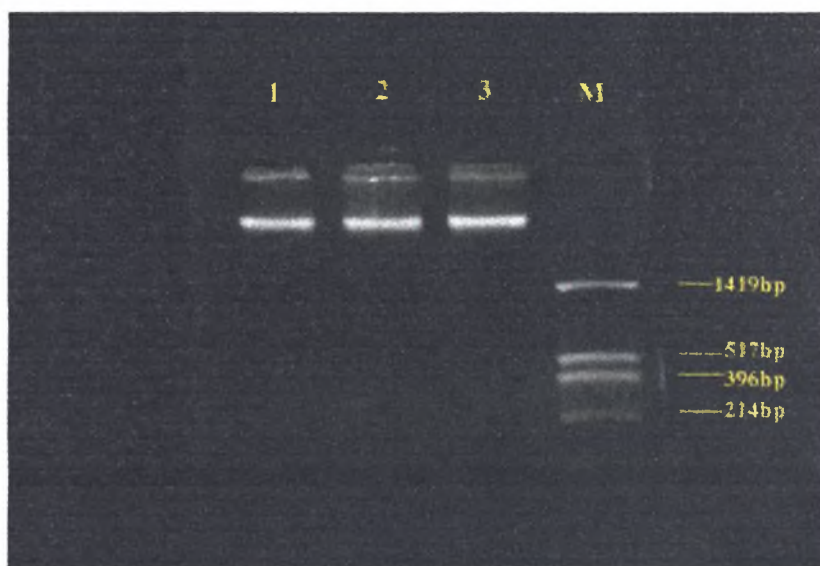
Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% πραγματοποιείται υπό σταθερή τάση 200V για 2 ώρες και 45 λεπτά. Ακολουθεί χρώση της πηκτής με εμβάπτιση σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου για 30λεπτά, έκθεση σε υπεριώδες φως και φωτογράφιση.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ

Παρασκευάστηκε DNA από 2ml αίματος από κάθε μια από τις 3 εθελοντικές αιμοδοσίες σύμφωνα με το πρωτόκολλο το οποίο περιγράφεται στη μεθοδολογία.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 1% του δ/τος DNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα παρουσιάζονται στην εικόνα 15:



**Εικόνα 19:** Σειρά 1: Δείγμα 1. Σειρά 2: Δείγμα 2. Σειρά 3: Δείγμα 3. Σειρά M: marker (puq)

Όπως φαίνεται στην εικόνα 15, το DNA που απομονώθηκε και στα τρία δείγματα είναι υψηλής καθαρότητας και υψηλού μοριακού βάρους.

Ο λόγος των απορροφήσεων 260/280 και για τα 3 δείγματα ήταν μέσα στα αποδεκτά όρια. Τα αποτελέσματα του υπολογισμού της ποσότητας DNA που απομονώσαμε παρουσιάζονται στον Πίνακα 6



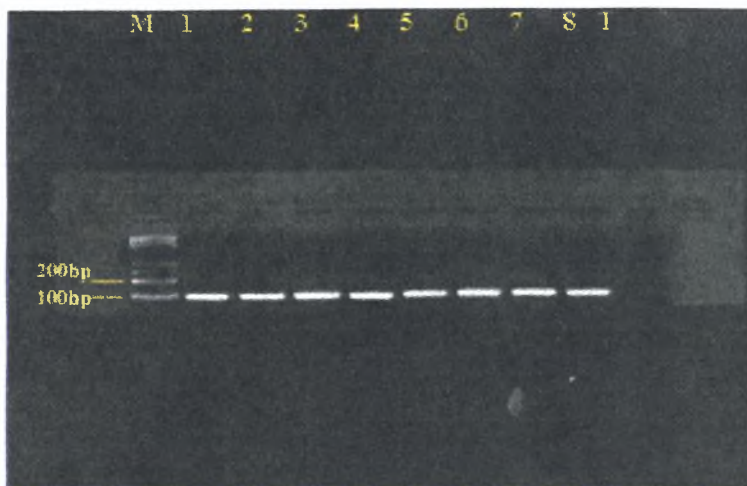
**Πίνακας 6: Ποσότητα DNA που απομονώθηκε.**

	<b>Ποσότητα δ/τος DNA στη κυψελίδα (μl)</b>	<b>Τιμή απορρόφησης στα 260 nm</b>	<b>Συγκέντρωση δ/τος DNA στη κυψελίδα (μg/ml)</b>	<b>Ποσότητα DNA που απομονώθηκε (μg)</b>
<b>Δείγμα 1</b>	20	0,209	10,45	52,25
<b>Δείγμα 2</b>	20	0,237	11,85	59,25
<b>Δείγμα 3</b>	20	0,227	11,4	57

## **ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA ΜΕ PCR**

Τόσο για τα 3 δείγματα DNA που απομονώσαμε όσο και για τα 11 άγνωστα δείγματα DNA, τα οποία ελήφθησαν από το κέντρο αναφοράς της Κυστικής Ινωσης του Νοσοκομείου «Παιδων», καθώς επίσης και για 3 δείγματα controls DNA, δηλαδή γνωστού γενοτύπου (ένα ομοζυγωτικό και ένα ετεροζυγωτικό της ΔF508 μετάλλαξης και ένα φυσιολογικό), τα οποία ελήφθησαν από το ίδιο κέντρο, πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 3% των προϊόντων PCR για τα 17 δείγματα DNA παρουσιάζονται στις εικόνες 20 και 21.



**Εικόνα 20:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR 1-8.  
 Σειρές 1-8: Άγνωστα δείγματα DNA. M: 100bp DNA Ladder.



**Εικόνα 21:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR 9-17.  
 Σειρές 9-14: Άγνωστα δείγματα DNA. Σειρά 15: Γνωστός ομοζυγώτης της ΔF508.  
 Σειρά 16: Γνωστός ετεροζυγώτης της ΔF508. Σειρά 17: Γνωστός ομοζυγώτης φυσιολογικός  
 M: 100bp DNA Ladder

Από τις εικόνες 20 και 21 φαίνεται ότι η αντίδραση PCR έδωσε καθαρό προϊόν με κινητικότητα παρόμοια με αυτήν της 100bp ζώνης του 100bp ladder. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος PCR ήταν 98bp για το φυσιολογικό αλληλίο ή 95 για το μεταλλαγμένο. Και στις δυο εικόνες η κινητικότητα του προϊόντος φαίνεται ίση με την κινητικότητα της 100bp ζώνης του 100bp ladder, επομένως ο διαχωρισμός δεν είναι δυνατός σε πηκτή αγαρόζης.

## ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ( PAGE )

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση 17 συνολικά προϊόντων PCR σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, τα 11 από τα οποία προέρχονται από τα άγνωστα δείγματα DNA, τα 3 από την εθελοντική αιμοδοσία και τα υπόλοιπα 3 από τα controls DNA. Όπως προαναφέρθηκε από τα 3 controls τα 2 προέρχονται από δείγματα DNA ομοζυγώτη και ετεροζυγώτη της ΔF508 μετάλλαξης και το 1 από δείγμα DNA φυσιολογικού ατόμου.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% των 17 προϊόντων PCR παρουσιάζονται στην εικόνα 18.



**Εικόνα 22:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR σε PAGE.

Σειρές 1-14 : Άγνωστα δείγματα DNA. Σειρά 15: Γνωστός ομοζυγώτης της ΔF508.

Σειρά 16: Γνωστός ετεροζυγώτης της ΔF508. Σειρά 17: Γνωστός ομοζυγώτης φυσιολογικός.

M: 100bp DNA Ladder

Τα άγνωστα δείγματα 1-14, τα οποία φαίνονται στην εικόνα 22, ερμηνεύονται (σε σύγκριση με τα 3 controls και τον 100bp DNA ladder) ως εξής:

- Σειρές 1, 2, 3, 5, 11: Ομοζυγώτες φυσιολογικοί, ( μια ζώνη μεγέθους 98bp).
- Σειρές 4, 6, 8, 13, 14: Ομοζυγώτες ΔF508 μετάλλαξης,( μια ζώνη μεγέθους 95bp).
- Σειρές 7, 9, 10, 12: Ετεροζυγώτες ΔF508, ( τέσσερις ζώνες 98bp, 95b και ετεροδιμερή ).

Ο διαχωρισμός μεταξύ φυσιολογικών ομοζυγωτών, ετεροζυγωτών της ΔF508 μετάλλαξης και ομοζυγωτών της μετάλλαξης είναι πολύ ευδιάκριτος. Το προϊόν PCR που προέρχεται από DNA ομοζυγωτών της ΔF508 μετάλλαξης (ΔF508/ΔF508) εμφανίζεται ως μια ζώνη μεγαλύτερης κινητικότητας σε σύγκριση με το προϊόν PCR που προέρχεται από DNA φυσιολογικών ομοζυγωτών (N/N), όπως φαίνεται από τη μεταξύ τους απόσταση. Το προϊόν PCR των ΔF508/ΔF508 έχει μέγεθος 95bp και των N/N 98 bp, όπως αναμενόταν και όπως φαίνεται από τις σχετικές αποστάσεις μεταξύ τους αλλά και από τις αποστάσεις τους από την μεγέθους 100bp ζώνη του 100bp DNA ladder που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μεγέθους. Οι ετεροζυγώτες της ΔF508 μετάλλαξης εμφανίζουν τέσσερις ζώνες χαμηλότερης έντασης, όπως αναμενόταν. Οι δύο αντιστοιχούν στα φυσιολογικά και μεταλλαγμένα προϊόντα PCR και μεταναστεύουν μαζί τους, η μια ζώνη (φυσιολογική) μεγέθους 98bp και η άλλη ( μεταλλαγμένη ) μεγέθους 95bp. Οι άλλες δύο σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της PCR αντίδρασης και αντιστοιχούν σε ετεροδιμερή σύζευξη μεταξύ της φυσιολογικής και μεταλλαγμένης αλληλουχίας DNA του ετεροζυγώτη. Αυτά τα ετεροδιμερή έχουν διαφορετική κινητικότητα κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης λόγω διαφορετικής τριτοταγούς δομής.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ΚΙ αποτελεί μια από τις πιο συχνές κληρονομικές νόσους της Καυκάσιας φυλής καθώς και μια από τις πιο κοινές αιτίες θανάτου στην παιδική ηλικία. Είναι ένα πολυσυστηματικό νόσημα, το οποίο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1938 και φαινοτυπικά χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργία των εξωκρινών αδένων με κύριες εκδηλώσεις από το αναπνευστικό, το πεπτικό και το γεννητικό σύστημα και τους ιδρωτοποιούς αδένες. Οι κύριες αυτές εκδηλώσεις αποδίδονται σε διαταραχή της διαμεμβρανικής διακίνησης ιόντων  $\text{Na}^+$  και  $\text{Cl}^-$ , με αποτέλεσμα τη δημιουργία παχύρρευστης βλέννας, η οποία οδηγεί σε αποφρακτική πνευμονοπάθεια, παγκρεατική δυσλειτουργία και δυσλειτουργία των ιδρωτοποιών αδένων. Οι αλματώδεις πρόοδοι στη θεραπευτική και στις συνθήκες διαβίωσης είχαν ως αποτέλεσμα την παράταση της επιβίωσης των πασχόντων μέχρι την 3<sup>η</sup> δεκαετία περίπου και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής. Εντούτοις ακόμη απαιτείται μακροχρόνια θεραπευτική υποστήριξη των ασθενών και η νόσος εξακολουθεί να παραμένει σοβαρό κοινωνικοοικονομικό πρόβλημα.

Η ΚΙ είναι μια αμιγώς γενετική μονογονιδιακή ασθένεια, η οποία εμφανίζει γενοτυπική ετερογένεια, καθώς έχουν εντοπισθεί περισσότερες από 800 μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικεύει την πρωτεΐνη CFTR. Χαρακτηρίζεται ως υποτελής αυτοσωμική νόσος, η οποία προσβάλλει περίπου 1 στα 2.500 ενώ η συχνότητα των φορέων της ΚΙ υπολογίζεται ότι είναι περίπου 1 στα 25 άτομα στον Καυκάσιο πληθυσμό. Στη χώρα μας αποτελεί τη συχνότερη μετά τη Μεσογειακή Αναιμία μη ιάσιμη κληρονομική νόσο, αφού η συχνότητα φορέων υπολογίζεται σε 5% περίπου και αναμένεται η γέννηση περισσότερων από 50 ασθενών ετησίως. Η υψηλή αυτή συχνότητα των φορέων στο Καυκάσιο πληθυσμό σε σύγκριση με άλλους πληθυσμούς οφείλεται στο λεγόμενο πλεονέκτημα επιλογής του ετεροζυγώτη.

Το υπεύθυνο για τη νόσο γονίδιο εντοπίστηκε το 1989 σε τμήμα του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 7 (7q31). Το ίδιο έτος η απομόνωση και η λεπτομερής ανάλυση του γονιδίου οδήγησε στην ανίχνευση της ΔF508 μετάλλαξης, η οποία αφορά την απαλοιφή τριών νουκλεοτιδίων (CTT) στο εξόνιο 10, με αποτέλεσμα την αφαίρεση μιας φαινυλαανίνης στη θέση 508. Η ΔF508 μετάλλαξη, η οποία έχει βρεθεί περίπου στο 70% των χρωμοσωμάτων σε ασθενείς με ΚΙ στο Καυκάσιο πληθυσμό, αποτελεί την πιο συχνή μετάλλαξη που προκαλεί την ασθένεια. Η συχνότητα της ΔF508 έχει βρεθεί παγκοσμίως ότι είναι περίπου 68%, ενώ οι πληθυσμοί της Νότιας Ευρώπης παρουσιάζουν μεγαλύτερη μοριακή ετερογένεια από τους πληθυσμούς στο Βόρειοευρωπαϊκό χώρο.

Ο CFTR είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία λειτουργεί κυρίως ως διάυλος  $Cl^-$  και εκφράζεται στο επιθήλιο και στους υποβλεννογόνιους αδένες της αναπνευστικής οδού, στο επιθήλιο του παγκρέατος και του εντέρου καθώς επίσης και στους ιδρωτοποιούς αδένες. Από την ομάδα των ABC πρωτεϊνών μόνο ο CFTR λειτουργεί κυρίως σαν διάυλος παρά σαν μεταφορέας και περιέχει ρυθμιστική R περιοχή. Η φυσιολογική λειτουργία του CFTR ρυθμίζεται από αυτή την περιοχή, η οποία όταν φωσφορυλιωθεί οδηγεί στην ενεργοποίηση του διαύλου  $Cl^-$  μέσω πρόσδεσης του ATP στις NBD περιοχές του CFTR, ενώ η επακόλουθη υδρόλυση του ATP έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση και τελικά το κλείσιμο του διαύλου.

Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευθεί πάνω από 800 μεταλλάξεις στο γονίδιο του CFTR. Η ΔF508 μετάλλαξη, μέσω απαιολογίας της *phe-508*, προκαλεί απώλεια της ελικοειδούς α δομής της NBD1 περιοχής του CFTR, με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να είναι δομικά ασταθής και να εμφανίζει μειωμένη ευαισθησία στη πρόσδεση ATP. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο μεταλλαγμένος ΔF508 CFTR να μη μπορεί να υποστεί ωρίμανση στο ΕΔ, η οποία είναι ATP εξαρτώμενη και επομένως αδυνατεί να εξαχθεί από το ΕΔ και να φτάσει τελικά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η μελέτη της επίπτωσης της ΔF508 μετάλλαξης οδήγησε στο να γίνουν *in vitro* προσπάθειες, ώστε να παρεμποδιστεί με τη χρήση διαφόρων χημικών παραγόντων η κακή αναδίπλωση της CFTR πρωτεΐνης και να προαχθεί έτσι η ωρίμανσή της στο ΕΔ.

Η διάγνωση της ΚΙ αρχικά είναι κλινική και στη συνέχεια επιβεβαιώνεται εργαστηριακά με :

- α) Προσδιορισμό των ηλεκτρολυτών στον ιδρώτα (τέστ εφίδρωσης)
- β) Μέτρηση ρινικών δυναμικών
- γ) Γενοτυπικό έλεγχο
- δ) Γεννητικό - προγεννητικό έλεγχο

Όσον αφορά τη μοριακή διάγνωση της ΚΙ, άμεσες τεχνικές που έχουν εφαρμοστεί για την ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων στο γονίδιο της ΚΙ όπως η ΔF508 μετάλλαξη είναι οι εξής :

- α) Υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (ASO)
- β) Ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα (RFLP)
- γ) Ανίχνευση με τη μέθοδο ARMS
- δ) Ανίχνευση μεταλλάξεων με τη μέθοδο PAGE
- ε) Ανάλυση της αλληλουχίας του DNA ( Sequencing) με χημική ή ενζυμική μέθοδο

Έμμεσες μέθοδοι που εφαρμόζονται για την ανίχνευση αγνώστων αλλά και γνωστών μεταλλάξεων που απαντώνται σε μικρότερη συχνότητα από τις υπόλοιπες μεταλλάξεις στο γονίδιο της ΚΙ είναι οι εξής :

- α) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με κλίση αποδιατακτικού (DGGE)
- β) Ανάλυση της διαμόρφωσης της μονόκλωνης δομής του DNA (SSCP)
- γ) Χημική μέθοδος αποκοπής μη συμπληρωματικών βάσεων.

Η μέθοδος PAGE, η οποία χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία είναι μια διαγνωστική μέθοδος, η οποία προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα όπως:

- α) Είναι μια ευαίσθητη μέθοδος η οποία έχει μεγάλη διακριτική ικανότητα στο να διαχωρίζει το αλλήλιο με τη ΔF508 μετάλλαξη από το φυσιολογικό αλλήλιο σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.
- β) Επιτρέπει την ανίχνευση των φορέων της Κυστικής Ίνωσης που έχουν τη ΔF508 μετάλλαξη.
- γ) Είναι μια άμεση μέθοδος, η οποία αποτρέπει τη χρήση επικίνδυνων ραδιενεργών ανιχνευτών.
- δ) Το κόστος αυτής της μεθόδου είναι χαμηλότερο σε σύγκριση με άλλες μεθόδους.
- ε) Είναι γρήγορη, πρακτική και εύκολη μέθοδος.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προκύπτει ότι από τα 14 άγνωστα δείγματα, 5 είναι ομοζυγώτες φυσιολογικοί, 5 ομοζυγώτες της ΔF508 μετάλλαξης και 4 ετεροζυγώτες της συγκεκριμένης μετάλλαξης. Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μεταξύ των τριών καταστάσεων είναι αρκετά ευδιάκριτος. Το προϊόν PCR, το οποίο προέρχεται από DNA ομοζυγωτών της ΔF508 μετάλλαξης και είναι μεγέθους 95bp, εμφανίζει μεγαλύτερη κινητικότητα σε σύγκριση με το προϊόν PCR, το οποίο προέρχεται από DNA φυσιολογικών ομοζυγωτών και είναι μεγέθους 98bp. Οι ετεροζυγώτες της ΔF508 εμφανίζουν τέσσερις ζώνες χαμηλότερης έντασης, δύο από τις οποίες αντιστοιχούν στο φυσιολογικό και μεταλλαγμένο αλλήλιο αντίστοιχα καθώς και δύο άλλες ζώνες, οι οποίες είναι αποτέλεσμα ετεροδιμερούς σύζευξης μεταξύ της φυσιολογικής και μεταλλαγμένης αλληλουχίας του DNA και έχουν διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα λόγω διαφορετικής τριτοταγούς δομής

Η μέθοδος PAGE λοιπόν είναι μια ευαίσθητη μέθοδος, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση των αλληλίων που φέρουν τη ΔF508 μετάλλαξη. Τα αλλήλια αυτά στον ελληνικό πληθυσμό έχουν βρεθεί να αντιπροσωπεύουν το 54,1%<sup>9</sup> ή το 53.4%<sup>10</sup> των μεταλλαγμένων αλληλίων. Με την εφαρμογή και άλλων έμμεσων μεθόδων, όπως DGGE ή SSCP, μπορούν να ανιχνευθούν και οι υπόλοιπες μεταλλάξεις, άγνωστες και μη, του γονιδίου της ΚΙ.

Η μέθοδος PAGE είναι μια χρήσιμη διαγνωστική τεχνική με την οποία μπορούν να ανιχνευθούν οι ασθενείς ομοζυγώτες της ΔF508 μετάλλαξης, αλλά το κυριότερο μπορεί να αποκαλύπτει τους φορείς, οι οποίοι δεν έχουν κλινικές εκδηλώσεις, θέτοντας έτσι τις προϋποθέσεις για γενετικό έλεγχο πρόληψης του πληθυσμού. Με απώτερο στόχο τη μείωση της επίπτωσης της νόσου στο γενικό πληθυσμό, δύο είναι τα βασικά σκέλη της πρόληψης : η πρωτοβάθμια πρόληψη που περιλαμβάνει την αποκάλυψη των φορέων, ώστε να μειωθούν οι πιθανότητες σύλληψης παιδιών με τη νόσο και η δευτεροβάθμια με την προγεννητική διάγνωση και επιλεκτική διακοπή της εγκυμοσύνης παθολογικού εμβρύου.

### **ΑΠΟΚΑΛΥΨΗ ΦΟΡΕΩΝ**

Η αποκάλυψη φορέων, δηλαδή ατόμων που είναι υγιείς αλλά έχουν κίνδυνο να αποκτήσουν παιδί με ΚΙ, μπορεί να γίνει είτε σε ευρύτερο επίπεδο πληθυσμιακού γενετικού ελέγχου (population genetic screening), είτε με εστίαση σε ομάδες υψηλού κινδύνου (focused genetic screening), στις περισσότερες από τις οποίες αναμένεται να αποκαλυφθούν φορείς σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (πίνακας 7). Οι φορείς που εντοπίζονται ανάλογα με την επιθυμία τους, μπορεί να αγνοήσουν την πληροφορία, να αλλάξουν σύντροφο, να αποφύγουν την τεκνοποίηση ή να επιλέξουν να προχωρήσουν σε κύηση με την προϋπόθεση της προγεννητικής ή προεμφυτευτικής διάγνωσης.

Το θέμα της αποκάλυψης φορέων της ΚΙ στον πληθυσμό έχει απασχολήσει ιδιαίτερα τη διεθνή επιστημονική κοινότητα και έχουν ήδη δημοσιευθεί τα συμπεράσματα από τη δοκιμαστική εφαρμογή αρκετών πιλοτικών μελετών. Σχεδιάστηκαν για να αξιολογηθούν ερευνητικά προγράμματα αποκάλυψης φορέων, τόσο σε επιστημονικό όσο και σε οργανωτικό επίπεδο, δηλαδή ως προς : την αξιοπιστία και το κόστος της μοριακής ανάλυσης, τη διαθεσιμότητα εξειδικευμένων εργαστηρίων και μονάδων γενετικής συμβουλευτικής, την επιλογή της καταλληλότερης ηλικίας, την γενικότερη αποδοχή από τις κοινωνικές ομάδες καθώς και τις ψυχολογικές επιπτώσεις των εξεταζομένων.



**Πίνακας 7: Ομάδες υψηλού κινδύνου για αποκάλυψη φορέων ΚΙ στις οποίες πρέπει να εφαρμοσθεί ο ανιχνευτικός έλεγχος.**

1. Ενήλικες μέλη οικογενειών με ιστορικό ΚΙ.
2. Ο άλλος σύντροφος σε ζευγάρια που ο ένας είναι γνωστός φορέας της νόσου.
3. Άνδρες με υπογονιμότητα – στειρότητα λόγω αποφρακτικής αζωοσπερμίας, με ή χωρίς συγγενή αμφοτερόπλευρη ή ετερόπλευρη απουσία του σπερματικού πόρου.
4. Άτομα με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια αδιευκρίνιστης αιτιολογίας, ιδιοπαθή διάχυτη βρογχοεκτασία, χρόνια παραρρινοκολπίτιδα και ιδιοπαθή παγκρεατίτιδα.
5. Δωρητές σπέρματος - ωαρίων.

## **ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ**

Με τον προγεννητικό έλεγχο της ΚΙ παρέχεται η δυνατότητα στις οικογένειες με θετικό ιστορικό να αποκτήσουν φυσιολογικό παιδί. Ο προγεννητικός έλεγχος προσφέρεται επιλεκτικά σε εγκύους που είναι ήδη γνωστό ότι έχουν παιδί με ΚΙ ή ακόμα και όταν δεν υπάρχει αυτό το ιστορικό, αλλά οι γονείς ελέγχθηκαν και βρέθηκαν να είναι και οι δύο φορείς της νόσου. Δεν συνίσταται όταν μόνον ο ένας γονέας είναι φορέας της ΚΙ, ενώ ο άλλος είναι αναμφισβήτητα φυσιολογικός, διότι τότε είναι σπάνιο να γεννηθεί παθολογικό έμβρυο. Πάντως έχει υπολογισθεί ότι το κόστος από την εφαρμογή μαζικής αποκάλυψης φορέων κατά την εγκυμοσύνη, δεν είναι ουσιαστικά μεγαλύτερο από άλλα προγεννητικά ανιχνευτικά προγράμματα (βιοχημικοί δείκτες, υπερηχογραφήματα για χρωμοσωμικές κυρίως ανωμαλίες).

Απαραίτητη προϋπόθεση για το σχεδιασμό προγεννητικού ελέγχου είναι να έχει γίνει ο καθορισμός των μεταλλάξεων που φέρουν οι δυο γονείς και το πάσχον άτομο στην οικογένεια, πριν την παρούσα σύλληψη ή έστω μετά τη διαπίστωση κύησης. Έτσι ο προγεννητικός έλεγχος κατευθύνεται στην άμεση ανίχνευση των συγκεκριμένων μεταλλάξεων στα εμβρυϊκά κύτταρα με έναν απλό, γρήγορο και οικονομικό τρόπο.

“Έχουν ήδη αρχίσει να διαφαίνονται τα αποτελέσματα από τα μέτρα πρόληψης για τη ΚΙ. Είναι ενδεικτικό ότι κατά την τελευταία δεκαετία στην Βρετανία παρουσιάζεται μείωση του αριθμού γεννήσεων με ΚΙ κατά 7-8% ετησίως<sup>100</sup>. Στη χώρα μας, με την εφαρμοζόμενη μοριακή μεθοδολογία αποκάλυψης των φορέων, παρέχεται η δυνατότητα εντόπισης τουλάχιστον των 2/3 των ζευγαριών που βρίσκονται σε κίνδυνο για γέννηση άρρωστου παιδιού, με αποτέλεσμα τη μείωση των νέων περιπτώσεων σε λιγότερες από 20 ετησίως<sup>101</sup>.

Είναι προφανές ότι η επιστημονική γνώση και η εμπειρία που αποκτήθηκε και τα νεότερα ερευνητικά δεδομένα επιτρέπουν όχι μόνο να ελπίζουμε, αλλά και βέβαια να περιμένουμε ότι σε σύντομο χρονικό διάστημα θα έχουν αλλάξει ριζικά πολλά στοιχεία που σχετίζονται τόσο με τη θεραπευτική αντιμετώπιση, όσο και με τη πρόληψη της νόσου. Με τις αλματώδεις εξελίξεις της μοριακής γενετικής και μετά την εντόπιση και την ταυτοποίηση του γονιδίου CFTR, η ΚΙ είναι από τα πλέον προσφερόμενα νοσήματα για την εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας. Μέχρις ότου όμως τελειοποιηθεί η θεραπεία αυτή τεχνικά, σημαντικό στοιχείο για την αντιμετώπιση της νόσου αποτελεί η έγκαιρη διάγνωση και η πρόληψη, με την αποκάλυψη φορέων και τον προγεννητικό έλεγχο.

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε με επιτυχία η μεθοδολογία η οποία επιτρέπει την ανίχνευση ομοζυγωτών και ετεροζυγωτών για την ΔF508 μετάλλαξη του γονιδίου CFTR, την συχνότερη μετάλλαξη υπεύθυνη για την ΚΙ στον Καυκάσιο πληθυσμό. Η μέθοδος αυτή είναι απλή, ευαίσθητη και φτηνή και μπορεί εύκολα να εγκατασταθεί στην Ιατρική Σχολή ή / και στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας και να προσφέρεται ως μέθοδος ρουτίνας για την ανακάλυψη φορέων της νόσου ή προγεννητικό έλεγχο. Λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων που εξετάστηκαν δεν είναι δυνατή η εκτίμηση της συχνότητας της συγκεκριμένης μετάλλαξης και η επιβεβαίωση του ποσοστού της στον ελληνικό πληθυσμό, που έχει βρεθεί σε άλλες μελέτες<sup>9,10</sup>. Ωστόσο θα άξιζε να γίνει ο προσδιορισμός της συγκεκριμένης μετάλλαξης στον πληθυσμό της Θεσσαλίας σε ένα δείγμα αρκούντως μεγάλο για να μπορούν να εξαχθούν στατιστικά έγκυρα συγκριτικά συμπεράσματα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Andersen, D.H. (1936) *Am. J. Dis. Child.* 56: 344-399.
2. Boat, T.F., Welsh, M.J., and Beaudet, A.L. (1989) *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th edn, pp 2649-2680.
3. Edwards, J.H (1997) *Arch. Dis. Child.* 52: 343-344.
4. Hanson, G.C. (1998) (Letter) *Nature* 333: 711
5. Hollander, D.H. (1982) *Med.Hypothesis* 8: 191-197.
6. Pier, G.B., Grout, M., Zaidi, T., Meluleni, G., et al (1998) *Nature* 393: 79-82.
7. Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Tsui, L-C., et al (1989) *Science* 245: 1073-1080.
8. Nielsen O.H.(1988) *Acta Paediatr Scand* 77: 836-841.
9. Balassopoulou, A., Loukopoulos, D., Kollia, P., et al (1990) *Human Genetics* 85: 393-394.
10. Μεταξωτού Μ., Καναβάκης Ε., Τσεγκή Χ., (2002) *Ινοκυστική νόσος,, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.*
11. Morral, N., Bertranpetit, J., Estivill, X., et al (1994) *Nat.Genet.* 7: 169-175.
12. Rommens, J.M., Jannuzzi, M.C., Kerem, B., et al (1989) *Science* 245: 1059-1065.
13. Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., et al (1989) *Science* 245: 1066-1073.
14. Wainwright, B.J., et al (1985) *Nature* 318 : 384-385.
15. White, R., Woodward, S., Leppert, M., et al (1985) *Nature* 318: 322-384.
16. Estivill, X., et al (1987) *Nature* 326 : 840-845.
17. Estivill, X., et al (1988) *Genomics* 1 : 257-263.
18. Canessa, C.M., et al (1994) *Nature* 367 : 463-467.
19. Lingueglia, E., et al (1993) *FEBS Lett* 318 : 95-99.
20. Smith, J.J., et al (1996) *Cell* 85, 229-236.
21. Ko, Y.H., et al (1997) *FEBS Lett.* 405: 200-208.
22. Bianchet, M.A et al (1997) *J Bioenerg. Biomembr.* 29: 503-524.
23. Doidge, C.A, et al (1993) *Annu. Rev. Microbiol.*47: 291-319
24. Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J. et.al. (1982) *EMBO J.* 1: 945-951.
25. Cheng, S.H, Rich, D.P., Marshal, J., et al (1991) *Cell* 66: 1027-1036.
26. Hwang, T-C., Nagel, G., Nairn, A.C., et al (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4698-4702.
27. Winter M.C. and Welsh M.J (1997) *Nature* 389: 296-297.
28. Mattheus, C.J., et al (1998) *J. Physiol.* 508: 365-377.
29. Daniel, J., Hennager, et al (2000) *PNAS* 98: 3594-3599.
30. Ramjeesingh, M., et al (1999) *Biochemistry* 38: 1463-1468.
31. Ikuma, M., Welsh, M.J., (2000) *Proc. Natl. Acad Sci USA* 97: 8675-8680.
32. Zeltwanger, S, et al (1999) *J. Gen. Physiol.* 113: 541-554.
33. Li, C., et al (1996) *J. Biol. Chem.* 271 : 28463-28468.
34. Anderson, PS. & Welsh, M.J (1992) *Science* 267 : 5727-5730.

35. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (1994) *Hum. Mutat.* 4:167-177.
36. Hamosh, A., Trapnell, B.C., Zeitlin, P.L., et al (1991) *J. Clin. Invest.* 88: 1880-1885
37. Cheng, S.H., Gregory, R.J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D.W., et al. (1990) *Cell* 63: 827-834.
38. Anderson, P.S. & Welsh, M.J (1992) *Science* 257: 1701-1704.
39. Sheppard, D.N., Rich, D.P., Ostegaard, L.S., et al (1993) *Nature* 362: 160-164.
40. Thomas PJ et al (1992) *J. Biol. Chem* 267: 5727-5730.
41. Bianchet, M.A., Ko, Y.H., Amzel, L.M., and Pedersen, P.L. (1997) *J. Bioenerg. Biomembr.* 29: 503-524.
42. Massiah, M.A., Ko, Y.H., Pedersen, P.L., and Mildvan, A.S. (1999) *Biochemistry* 38: 7453-7461.
43. Nichols, W.C., Ginsburg, D. (1999) *Am. J. Hum. Genet.* 64:1493-1498
44. Johnston, J.A., Ward, C.L., Kopito, R.R. (1998) *J. Cell Biol.* 143: 1883-1898.
45. Cheng, S.H., Gregory, R.J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D.W., et al. (1990) *Cell* 63: 827-834.
46. Gregory, R.J., Rich, D.P., Cheng, S.H., Souza, D.W., Welsh, M.J. (1991) *Mol. Cell Biol.* 11:3886-3893.
47. Denning, G.M., Ostedgaard, L.S., and Welsh, M.J. (1992) *J. Cell Biol.* 118: 551-559.
48. Denning, G.M., Anderson, M.P., Amara, J., Marshal, J., Smith, A.E., and Welsh, M.J. (1992) *Nature* 358: 761-764.
49. Dalemans, W., Barbry, P., Champigny, G., Jallat, S., et al (1991) *Nature* 354 : 526-528.
50. Drumm, M.L, Wilkinson, D.J., Smit, L.S., Worrel, R.T., et al (1991) *Science* 254: 1797-1799.
51. Brown, C.R., Hong-Brown, L.Q., Biwersi, J., Verkman, A.S., Welsh, W.J. (1996) *Cell Stress Chaperons* 1: 117-125.
52. Haws, C.M., Nepomuceno, I.B., Krouse, M.E., Wakelee, H., Law, T., Wine, J.J. (1996) *Am. J. Physiol.* 270: C1544-C1555.
53. Jiang, C., Fang, S.L., Xiao, Y.F., O'Connor, S.P., Nadler, S.G., Lee, D.W., Jefferson, D.M., et al (1998) *Am. J. Physiol.* 275: C171-C178.
54. Di Sant' Agnese, P.A & Davis, P.B (1976) *N. Engl. J. Med.* 295: 481-485.
55. Khan T.Z., Wagener J.J., Bost T., Martinez J., Accurso F.J., Riches D.W. (1995) *Am J Respir. Crit Care Med* 151: 1075-82.
56. Burke W., Aitken M.L., Chen S.H., Scott C.R. (1992) *Chest* 102: 506-509.
57. Fitz Simmons S.C. (1993) *J. Pediatr.* 122: 1-9.
58. Konstan M.W., Hillard K.A., Norvell T.M., Berger M. (1994) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: 448-54.
59. Chase H.P., Long M.A., Lavin M.H. (1979) *J. Pediatr.* 95: 337-346.
60. Kerem E., Corey M., Kerem, B.J., Rommens, J., Markiewicz D, Levison H., Tsui L-C & Durie P. (1990) *N. Engl. J. Med.* 323: 1517-1522.
61. Santis G., Osborne L., Knight R.A & Hodson M. (1990) *Lancet* 336: 1081-1084.
62. Gray M.A., Harris A., Coleman L., Greenwell J.R., Argent B.E. (1989) *Am. J. Physiol.* 257: C 240-C251.
63. Gray M.A., Plant J., Argent B.E. (1993) *Am. J. Physiol.* 264: C591-C602.
64. Kopelman H., Durie P., gaskin K., Weizman Z., Forstner. G. (1985) *N. Engl. J. Med.* 312: 329.
65. Farrel P.M., Hubbard V.S. (1983) Lloyd-still JD. Textbook of CF. John Wright- PSG, Boston: 263-292.
66. Underwood B.A., Denning C.R. (1972) *Pediatr. Res* 6: 26-31.



67. Lanng S. (1996) *Eur. J. Gastroenterol Hepatol* 8: 744-747.
68. Hardin D.S., Le Blanc A., Lukenbough J., Seilheimer D.K. (1997) *J. Pediatr.* 130: 948-56.
69. Stern R.C., Stevens D.P., Boat T.F., et al. (1976) *Gastroenterology* 70: 645-649.
70. Taylor C. J., Baxter P.S., Hardcastle J., Hardcastle P.T. (1988) *Gut* 29: 957-962.
71. Allan J.R., Robbie M., Phelan P.D. & Danks D.M. (1981) *Eur. J. Pediatr.* 135 : 291-292.
72. Talamo R.C., Rosenstein B.J. & Berninger R.W. (1983) *The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5<sup>th</sup> edn*, p.p. 1889-1917.
73. Welsh M.J., Tsui L-C, Boat TF, Beaudet AL (1996) *In The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases*: 3799-3876.
74. Honig S.C., Lamont J., Oates R.D (1991) *J Urol. Suppl.* 145: 326a
75. Stutts M.J., Boucher R.C. (1999) *In Cystic Fibrosis in Adults*: 3-25.
76. Sato F. (1984) *J. Clin. Invest.* 73: 1763-1771.
77. Le Grys VA (1996) *J. Pediatr.* 129 : 892-897.
78. Chinet T. (1994) *Eur. Resp. J.* 7 : 1917-1920.
79. Rosenstein B.J., Cutting G.R. (1998) *J. Pediatr.* 132: 589-595.
80. Zeitlin P. (2001) *J. Pediatr.* 139: 345.
81. Wilmot R. (1998) *J. Pediatr.* 132: 563-564.
82. Rosenstein, B.J. & Zeitlin, P.L. (1991) *Curr. Sci.* 3: 392-398.
83. Sokol R.J., Accurso F.J., Abman S.H., Hammondk (1989) *Pediatr Pulmonol.* [suppl.] 4: 63-65.
84. Rich D.P. Anderson M.P., Gregory R.J., Cheng S.H., Welsh M.J., et al. (1990) *Nature* 347: 358-363.
85. Zabner J, Couture R.A., Gregory R.J., Graham S.M., Smith A.E., Welsh M.J. (1993) *Cell* 75: 207-216.
86. Crystal R.G., McElvaney N.G., Rsenfeld M.A., Chu C.S., et. al. (1994) *Nat. Genet.* 8: 42-51.
87. Caplen N.J., Alton E.W., Middleton P.G., Dorin J.R., Gaox, et. al. (1995) *Nat. Med.* 1: 39-46.
88. J.M. Claverie (2001) *Science* 291: 1255-1257.
89. Saiki R.K., Bugawan T.L., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1986) *Nature* 324 : 163-166.
90. Kazazian H.H. (1989) *In Erlich HA(ed) "PCR Technology"*: 153.
91. Newton C.R., Graham A., Powell S.J., Smith J.C., et al. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17: 2503-2516.
92. Rommens J., Kerem B-S., Greer, W. Chang P., Tsui L-C & Ray P. (1990) *Am. J. Hum. Genet.* 46: 395-396.
93. Maxam A.M., Gilbert W. (1980) *Methods Enzymol, C.J.*: 499-559.
94. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
95. Myers R.M., Sheffield V.C., Cox D.R. (1989) *In Erlich H.A. (ed) "PCR Technology"*: 71.
96. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 2766-2770.
97. Cotton R.G.H. (1989) *Biochem. J.* 263: 1-10.
98. Miller S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.
99. R.K. Saiki et. al. (1985) *Science* 230 : 1350.
100. Farrel P.M., Kosorok M.R., Rock M.J., Laxova A., Zeng L., Lai H-CL et. al. (2001) *Pediatrics* 107 : 1-13.
101. Μαραγκός X.E., Βαλάσση – Αδάμ Ε. (1999) *Παιδιατρική* 62: 490-498.