

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ SSCP ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗΝ  
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΗΜΕΙΑΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗ β-  
ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΣΕ ΑΛΛΑ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Β. ΚΑΚΑΒΑΣ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2004**



Στην σεβαστή μου καθηγήτρια

κ. Μπονάνου-Τζεδάκη Σοφία

Στην Ανδριανή που στάθηκε δίπλα μου

Στους γονείς μου για «όλα»

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

*Επιβλέπουσα Καθηγήτρια :*

Σοφία Μπονάνου - Τζεδάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας,  
Διευθύντρια Εργαστηρίου Βιοχημείας,  
Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

*Μέλη :*

Νικόλαος Βαμβακόπουλος, Καθηγητής Βιολογίας,  
Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Έλενα Γεωργιάτσου, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής  
Βιολογίας, Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ**

Βαμβακόπουλος Νικόλαος - Καθηγητής Βιολογίας

Γεωργιάτσου Έλενα - Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μοριακής Βιολογίας

Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος - Καθηγητής Φυσιολογίας

Μολυβδάς Πασχάλης-Αδάμ - Καθηγητής Φυσιολογίας

Μπονάνου-Τζεδάκη Σοφία - Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας

Σίμος Γεώργιος - Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας

Σταθάκης Νικόλαος - Καθηγητής Παθολογίας

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

Γεννήθηκα το 1965. Ζω και εργάζομαι στη Λάρισα. Είμαι πτυχιούχος Χημικός του Αριστοτέλειου Πανεπιστήμιου Θεσσαλονίκης (1989). Από το 1992 έως σήμερα, εργάζομαι ως χημικός σε ιδιωτικό χημικό εργαστήριο και ως εκπαιδευτικός στη Σχολή Ιατρικών Εργαστηρίων του Ανώτατου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Λάρισας.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω την κα Μπονάνου – Τζεδάκη Σοφία, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργασθώ ερευνητικά στο χώρο της Ιατρικής Βιοχημείας, αλλά και την αμέριστη βοήθεια, καθοδήγηση, υπομονή και στήριξή της σε όλη την διάρκεια των σπουδών.

Τον κ. Βαμβακόπουλο Νικόλαο, Καθηγητή Βιολογίας, Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής για τις επισημάνσεις του σχετικά με τις βιολογικές επιπτώσεις αυτής της μελέτης.

Την κα Γεωργιάτσου Έλενα, για την καθοδήγηση σε δύσκολες στιγμές, σε πολλά τεχνικά θέματα στο ξεκίνημα του διδακτορικού και τις εύστοχες παρατηρήσεις της κατά την διάρκεια της συγγραφής του παρόντος συγγράμματος.

Όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας και πιο ειδικά την φοιτήτρια του Προγράμματος Σπουδών Επιλογής Ιατρική Βιοχημεία Τσιάνου Θεοδώρα για την συμβολή της στην ενότητα της Κυστικής Ίνωσης.

Την κα Κόλλια Παναγούλα, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας, Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πολύτιμη βοήθειά της, αλλά και την ευγενή παραχώρηση όλων των μαρτύρων (δειγμάτων DNA ασθενών β-Μεσογειακής αναιμίας) και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιολογίας.

Τον κ. Γεωργίου Ιωάννη, Επίκουρο Καθηγητή Γενετικής, Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και όλα τα μέλη του εργαστηρίου του, για την εμπειρία τους στην μέθοδο ARMS και τη φιλοξενία μου στο εργαστήριό τους για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της τεχνικής ARMS.

Τον κ. Νούλα Αργύρη, Επίκουρο Καθηγητή του ΤΕΙ Λάρισας, για την ευγενή παραχώρηση του εργαστηρίου του Ιδρύματος για την φωτογράφιση των πηκτών.

Τον κ. Χαλκιά Χρίστο και το προσωπικό της Μονάδας Μεταγγίσεων Μεσογειακής Αναιμίας του Περιφερειακού Νοσοκομείου Λάρισας για την βοήθειά τους στην αιμοληψία όλων των ασθενών που συμμετείχαν στην μελέτη αυτή.

Τα μέλη της Μονάδας Μεσογειακής Αναιμίας του Λαϊκού Νοσοκομείου (ειδικότερα τον Δρ Μ. Παπαδάκη), του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ομάδα Δρ Σ. Γκόνου), του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης (Δρ Σουρβίνο), τον Δρ Λαμπρόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και τον κ. Τριανταφυλλίδη, Καθηγητή Βιολογίας του Βιολογικού

Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για τα σχόλιά τους κατά την ανάπτυξη της μεθόδου SSCP.

Τον κ. Καναβάκη Εμμανουήλ, Αναπληρωτή Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και άλλα μέλη του Νοσοκομείου Παιδων Αγία Σοφία για την ευγενή παραχώρηση των δειγμάτων της Κυστικής Ίωσης.

Τέλος τον κ. Χατζηχριστοδούλου Χρίστο για την στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων αυτής της μελέτης.



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

DNA	deoxyribonucleic acid (δεόξυριβονουκλεϊνικό οξύ)
RNA	ribonucleic acid (ριβονουκλεϊνικό οξύ)
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid (εθυλένο διάμινο τετραοξικό οξύ)
PCR	Polymerase chain reaction (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)
SSCP	Single strand conformation polymorphism (ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA)
IVS	intervening sequence (παρεμβαλλόμενη αλληλουχία ή ιντρόνια)
Taq polymerase	Taq πολυμεράση
dNTP	τριφωσφορικό δεόξυ ριβονουκλεοσιδίο
TBE	Tris Borate EDTA
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (αγγελιοφόρο RNA)
bp	base pairs (ζεύγη βάσεων)
β-MA	β-Μεσογειακή αναιμία
KI	Cystic Fibrosis (Κυστική Ίνωση)
ARMS	Amplification refractory mutation system (Ανάλυση μεταλλάξεων με τη μέθοδο ARMS)
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα με κλίση αποδιατακτικού)
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (Ρυθμιστής διαμεμβρανικής διακίνησης ιόντων)
ASO	Allele Specific Oligonucleotide (Υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα)
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Ηλεκτοφόρηση σε πηκτή Πολυακρυλαμιδίου)

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>		Σελίδα
Αφιέρωση		III
Τριμελής	Συμβουλευτική Επιτροπή	IV
Ευχαριστίες		V
Συντομογραφίες		VII
ΠΕΡΙΛΗΨΗ		XVIII
SUMMARY		XX
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>		1
	Γενετικά Νοσήματα	2
	Σκοπός διατριβής	5
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>		7
A.	<b>β-ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ (β-ΜΑ)</b>	8
A.1	Ιστορική ανασκόπηση	8
A.2	Γενικά για τις αιμοσφαιρίνες και τα γονίδιά τους	11
A.3	Δομή και αλληλουχία βάσεων του β-γονιδίου	18
A.4	Μεταγραφή του β-γονιδίου σε m-RNA	22
A.5	Μετάφραση και σύνθεση πρωτεϊνών	28
A.6	Διαφοροποίηση ερυθροποιητικών κυττάρων	28
A.7	Αιμοσφαιρινοπάθειες	29
A.7.α	<i>Η σημασία της ανακάλυψης των μεταλλάξεων των αιμοσφαιρινοπαθειών</i>	31
A.8	Μεσογειακά σύνδρομα	31
A.9	Μοριακή βάση της β-Μεσογειακής αναιμίας	32
A.9.α	<i>Μεταλλάξεις στον προαγωγέα του β-γονιδίου</i>	33
A.9.β	<i>Μεταλλάξεις στην περιοχή έναρξης της μεταγραφής</i>	33
A.9.γ	<i>Μεταλλάξεις στο 3' άκρο του mRNA</i>	34
A.9.δ	<i>Μεταλλάξεις στις περιοχές ματίσματος του mRNA</i>	34
A.9.ε	<i>Μεταλλάξεις στο εσωτερικό τμήμα των ιντρονίων</i>	35
A.9.ζ	<i>Μεταλλάξεις μέσα στα εξόνια</i>	35
A.9.η	<i>Μεταλλάξεις που εμποδίζουν την μετάφραση</i>	36
A.9.θ	<i>Μεταλλάξεις εξ αιτίας ελλείμματος</i>	36
A.9.ι	<i>Πολυμορφισμοί στο β-γονίδιο</i>	36

A.10	Η β-Μεσογειακή αναιμία στον Ελληνικό πληθυσμό	37
A.11	Παθοφυσιολογία της β-Μεσογειακής αναιμίας	38
A.12	Κλινική εικόνα της β-Μεσογειακής αναιμίας	41
A.12.α	<i>Ελάσσων β-Μεσογειακή αναιμία</i>	41
A.12.β	<i>Ενδιάμεση β-Μεσογειακή αναιμία</i>	41
A.12.γ	<i>Μείζων β-Μεσογειακή αναιμία (αναιμία Cooley)</i>	42
A.13	Θεραπευτική προσέγγιση	43
A.14	Σχέση γονότυπου-φαινότυπου	45
A.15	Προγεννητική διάγνωση των αιμοσφαιρινοπαθειών	46
<b>B.</b>	<b>ΚΥΣΤΙΚΗ ΊΝΩΣΗ (ΚΙ)</b>	48
B.1	Γενικά για την Κυστική Ίνωση και την μετάλλαξη ΔF508	48
B.2	Το γονίδιο της CFTR και οι συχνότερες μεταλλάξεις του	50
B.3	Ρόλος της πρωτεΐνης CFTR	51
B.4	Δομή της πρωτεΐνης CFTR	52
B.5	Ρύθμιση της λειτουργίας της πρωτεΐνης CFTR	53
B.6	Κλινικές Εκδηλώσεις της Κυστικής Ίνωσης	54
B.7	Διάγνωση της Κυστικής Ίνωσης	54
B.8	Πρόγνωση – Θεραπεία	55
<b>Γ.</b>	<b>ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ</b>	58
Γ.1	Γενικά για τον Προσδιορισμό Μεταλλάξεων	58
Γ.2	Υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (ASO Hybridization)	59
Γ.3	Ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα (RFLP : Restriction fragment length polymorphism )	61
Γ.4	Ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα με κλίση αποδιατακτικού (DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis)	63
Γ.5	Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (SSCP : Single strand conformation polymorphism)	64

Γ.5.α	<i>Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου SSCP</i>	65
Γ.6	Ανίχνευση μεταλλάξεων με τη μέθοδο ARMS (Amplification refractory mutation system)	66
Γ.7	Ανάλυση της αλληλουχίας του DNA με χημική ή ενζυμική μέθοδο (DNA sequencing–chemical or enzymatic method)	67
Γ.8	Χημική μέθοδος αποκοπής μη συμπληρωματικών βάσεων (Chemical mismatch cleavage method)	69
Γ.9	Ανίχνευση μεταλλάξεων με τη μέθοδο ετεροδιμερών (Heterodublex)	69
Γ.10	Ανίχνευση μεταλλάξεων με τη μέθοδο PAGE	70
Γ.11	Σύγκριση μεθόδων	71
	<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	73
<b>Δ.</b>	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	74
Δ.1	Γενικά	74
Δ.2	Αντιδραστήρια	75
Δ.3	Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα	77
Δ.3.α	<i>Γενικά</i>	77
Δ.3.β	<i>Μέθοδος υψηλής συγκέντρωσης άλατος</i>	77
Δ.3.γ	<i>Σχολιασμός μεθόδου</i>	79
Δ.3.δ	<i>Ποσοτικοποίηση DNA</i>	79
Δ.3.ε	<i>Έλεγχος DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης</i>	80
Δ.4	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	82
Δ.4.α	<i>Γενικά για τη μέθοδο PCR</i>	82
Δ.4.β	<i>Πολλαπλασιασμός τμήματος γονιδίου της β-σφαιρίνης</i>	84
Δ.4.γ	<i>Συνθήκες αντίδρασης PCR για τμήμα του γονιδίου της β- σφαιρίνης</i>	86
Δ.4.δ	<i>Πρωτόκολλο καθαρισμού προϊόντων PCR (Quiagen)</i>	89
Δ.4.ε	<i>Πολλαπλασιασμός εξόνιου 10 του CFTR</i>	90
Δ.4.ζ	<i>Συνθήκες αντίδρασης PCR για το εξόνιο 10 του CFTR</i>	91
Δ.5	Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (SSCP) με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες	92
Δ.5.α	<i>Γενικά για τη μέθοδο SSCP</i>	92
Δ.5.β	<i>Τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες – SSCP</i>	94

Δ.5.γ	<i>Εμφάνιση πηκτής με νιτρικό άργυρο</i>	96
Δ.5.δ	<i>Σχολιασμός της μεθόδου εμφάνισης</i>	97
Δ.5.ε	<i>Φωτογράφιση</i>	97
Δ.6	Η μέθοδος ARMS	98
Δ.6.α	<i>Γενικά για τη μέθοδο ARMS</i>	98
Δ.6.β	<i>Χρησιμοποίηση της μεθόδου ARMS για την ταυτοποίηση των τεσσάρων συνηθέστερων μεταλλάξεων του γονιδίου της β-σφαιρίνης</i>	98
Δ.7	Η μέθοδος PAGE – Χρησιμοποίηση για την ταυτοποίηση της ΔF508 μετάλλαξης του γονιδίου CFTR	100
Δ.8	Η μέθοδος SSCP – Χρησιμοποίηση για την ταυτοποίηση της ΔF508 μετάλλαξης του γονιδίου CFTR	101
<b>E.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	102
	<b><i>β-Μεσογειακή Αναιμία</i></b>	102
E.1	Απομόνωση DNA από ασθενείς με β-MA	102
E.2	Πολλαπλασιασμός με PCR του γονιδίου της β-σφαιρίνης στα δείγματα DNA ασθενών με β-MA	104
E.3	Πειράματα για την βελτιστοποίηση της διεξαγωγής της SSCP	107
E.3.α	<i>Προσδιορισμός βέλτιστης ποσότητας φόρτισης DNA</i>	107
E.3.β	<i>Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης φορμαμιδίου</i>	109
E.3.γ	<i>Έλεγχος επαναληψιμότητας της μεθόδου SSCP</i>	110
E.3.δ	<i>Βελτιστοποίηση μεγέθους και είδους πηκτής κατά τη μέθοδο SSCP</i>	110
E.3.ε	<i>Βελτιστοποίηση χρόνου ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού</i>	111
E.3.ζ	<i>Βελτιστοποίηση θερμοκρασίας και προσθέτων κατά την μέθοδο SSCP</i>	111
E.3.η	<i>Βελτιστοποίηση εμφάνισης ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού κατά την SSCP</i>	112
E.4	Πρότυπα διαχωρισμών με SSCP δειγμάτων DNA φορέων β-Μεσογειακής Αναιμίας που φέρουν τις τέσσερις συνηθέστερες μεταλλάξεις	112
E.5	Πρότυπα διαχωρισμών (patterns) με SSCP δειγμάτων DNA μαρτύρων (controls) που φέρουν γνωστούς συνδυασμούς των τεσσάρων συνηθέστερων μεταλλάξεων του β-γονιδίου	113
E.6	Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων ομοζυγωτών	116

	β-MA	
E.7	Πρότυπα διαχωρισμών με SSCP δειγμάτων DNA ασθενών με β-MA - Πρόβλεψη είδους μεταλλάξεων, μετά από σύγκριση με μάρτυρες	119
E.7.α	<i>Έλεγχος επαναληψιμότητας της μεθόδου</i>	122
E.8	Επιβεβαίωση των προβλέψεων της SSCP για το είδος των μεταλλάξεων που φέρουν ασθενείς με β-MA με τη μέθοδο ARMS	123
	<b>Κυστική Ίνωση</b>	129
E.9	Πολλαπλασιασμός με PCR δειγμάτων DNA ετεροζυγωτών και ομοζυγωτών για την ΔF508 μετάλλαξη του γονιδίου CFTR	129
E.10	Πρότυπα διαχωρισμών με SSCP δειγμάτων DNA μαρτύρων (ετεροζυγωτών και ομοζυγωτών για την ΔF508 μετάλλαξη του γονιδίου CFTR) καθώς και δειγμάτων DNA ατόμων που ενδέχεται να είναι ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες για αυτή την μετάλλαξη	130
E.11	Επιβεβαίωση των προβλέψεων της SSCP για την ύπαρξη της ΔF508 μετάλλαξης στα άγνωστα δείγματα DNA με τη μέθοδο PAGE	131
<b>Z.</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	134
Z.1	Ιατρικές εφαρμογές της SSCP	134
Z.1.α	<i>Ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια καρκίνου</i>	135
Z.1.β	<i>Ανίχνευση πολυμορφισμών</i>	135
Z.1.γ	<i>Άλλες εφαρμογές</i>	136
Z.1.δ	<i>Ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια που αφορούν γενετικές ασθένειες</i>	136
Z.2.	Συμπεράσματα	139
Z.2.α	<i>Εφαρμογή της SSCP στον προσδιορισμό μεταλλάξεων ασθενών με β-MA</i>	139
Z.2.β.	<i>Εφαρμογή της SSCP στον προσδιορισμό μεταλλάξεων ασθενών με κυστική ίνωση</i>	144
Z.3	Προοπτικές	145
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	147

## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Αριθμός	Τίτλος Διαγράμματος	Σελίδα
1.	Χάρτης της Ελλάδας με κατανομή της β-Μεσογειακής αναιμίας.	10
2.	Τεταρτοταγής δομή της αιμοσφαιρίνης Α.	12
3.	α) Σύμπλεγμα των α γονιδίων στο χρωμόσωμα 16. β) Σύμπλεγμα των β γονιδίων στο βραχύ άκρο του χρωμοσώματος 11.	12
4.	Περιοχές ερυθροποίησης και αιμοσφαιρινικές αλυσίδες στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του ανθρώπου.	14
5.	Προϊόντα γονιδίων σφαιρινών που σχηματίζουν τις πρώιμες εμβρυϊκές, εμβρυϊκές και σφαιρίνες ενηλίκου.	16
6.	Εξελικτικό δέντρο των γονιδίων των σφαιρινών.	17
7.	Δομή του β-γονιδίου.	19
8.	Η αλληλουχία των βάσεων στο β-γονίδιο.	20
9.	Σχηματική απεικόνιση της μεταγραφής και μετάφρασης του γονιδίου.	25
10.	Δομή προαγωγέων ευκαριωτικών γονιδίων που μεταγράφονται από την πολυμεράση II.	26
11.	Διαφοροποίηση κυττάρων ερυθράς σειράς.	29
12.	Μορφολογία κυττάρων της αναιμίας Cooley.	43
13.	Τριτοταγής δομή της CFTR.	53
14.	Υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια.	60
15.	Ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα.	62
16.	Διαδικασία ηλεκτροφόρησης DNA σε πηκτή αγαρόζης.	81
17.	Έλεγχος με ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης.	82
18.	Ηλεκτροφόρηση προϊόντων αντίδρασης PCR τμήματος 238 bp του β-γονιδίου σε πηκτή αγαρόζης.	84

19.	Περιοχή του β-γονιδίου όπου απαντώνται οι τέσσερις πιο γνωστές μεταλλάξεις στον ελληνικό πληθυσμό.	85
20.	Η αλληλουχία τμήματος 238bp του β-γονιδίου.	85
21.	Πέψη 238bp προϊόντος PCR β-γονιδίου με το ένζυμο <i>Ava</i> II.	89
22.	Αλληλουχία του εξονίου 10 του γονιδίου της <i>KI</i> .	90
23.	Συνοπτική παρουσίαση της μεθόδου SSCP.	93
24,25,26,27	Απομόνωση δειγμάτων DNA ασθενών με β-MA.	102-104
28 α,β,γ,δ	Ηλεκτοφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης.	105-106
29.	Επίδραση της ποσότητας DNA στη μέθοδο SSCP σε δείγμα DNA υγιούς ατόμου.	108
30.	Επίδραση της ποσότητας φορμαμιδίου στη μέθοδο SSCP σε δείγμα υγιούς ατόμου.	109
31.	Έλεγχος επαναληψιμότητας μεθόδου SSCP σε υγιή άτομα.	110
32.	Πρότυπα διαχωρισμού φορέων β-MA, σε σχέση με υγιές άτομο με τη μέθοδο SSCP.	112
33.	Πρότυπα διαχωρισμού δειγμάτων μαρτύρων (controls) με τη μέθοδο SSCP.	114
34.	Πρότυπα διαχωρισμών (patterns) των δειγμάτων μαρτύρων, που φέρουν γνωστούς συνδυασμούς των τεσσάρων συνηθέστερων μεταλλάξεων. Σχηματική αναπαράσταση των προτύπων αποδιάταξης που ελήφθησαν στο πείραμα του σχήματος 33	115
35.	Ταυτοποίηση συνδυασμών μεταλλάξεων σε σχέση με τις ζώνες.	119
36.	Πρότυπα διαχωρισμού δειγμάτων ασθενών (1-6) σε σύγκριση με δείγματα μαρτύρων (control) με τη μέθοδο SSCP.	120
37.	Πρότυπα διαχωρισμού δειγμάτων ασθενών (7-9) σε σύγκριση με δείγματα μαρτύρων (control) με τη μέθοδο SSCP.	120



38.	Πρότυπα διαχωρισμού δειγμάτων ασθενών (10-17) σε σύγκριση με δείγματα μαρτύρων (control) με τη μέθοδο SSCP.	121
39.	Πρότυπα διαχωρισμού δειγμάτων ασθενών (20-31) σε σύγκριση με δείγματα μαρτύρων (control) με τη μέθοδο SSCP.	121
40.	Πρότυπα διαχωρισμού δειγμάτων ασθενών (18,19 & 32-40) σε σύγκριση με δείγματα μαρτύρων (control) με τη μέθοδο SSCP.	122
41.	Πρότυπα διαχωρισμού δειγμάτων ασθενών σε σύγκριση με δείγματα μαρτύρων (control) με τη μέθοδο SSCP.	123
42.	Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός προϊόντων PCR με τη μέθοδο ARMS για ανίχνευση των IVS-I-6 & IVS-I-1 μεταλλάξεων.	125
43.	Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός προϊόντων PCR με τη μέθοδο ARMS για ανίχνευση των μεταλλάξεων IVS-I-110 & codon-39.	126
44.	Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR τμήματος 98bp του γονιδίου της KI.	130
45.	Πρότυπα διαχωρισμού προϊόντων PCR ατόμων με Κυστική Ίνωση με τη μέθοδο SSCP.	131
46.	Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της SSCP με την μέθοδο PAGE σε δείγματα ατόμων που ενδεχομένως φέρουν τη μετάλλαξη ΔF508.	132
47.	Αύξηση της χρήσης της SSCP στη δεκαετία 1989 έως 1998.	134

## ΠΙΝΑΚΕΣ

Αριθμός	Τίτλος πίνακα	Σελίδα
1.	Σύσταση σε αλυσίδες των ανθρωπίνων αιμοσφαιρινών.	15
2.	Κατηγορίες δομικά μεταλλαγμένων αιμοσφαιρινών.	30
3.	Είδος και συχνότητα μεταλλάξεων β-Μεσογειακής αναιμίας στον Ελληνικό πληθυσμό.	38
4.	Είδος, συχνότητα και πληθυσμός που απαντάται, των πιο συχνών μεταλλάξεων της CFTR.	50
5.	Σύγκριση μεθόδων ανίχνευσης μεταλλάξεων.	71
6.	Κατάλογος αντιδραστηρίων.	75
7.	Αλληλουχία εκκινητών β-γονιδίου.	85
8.	Ζεύγη πιθανών εκκινητών β-γονιδίου.	86
9.	Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR για το τμήμα του β-γονιδίου.	87
10.	Εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό του εξονίου 10 της CFTR.	91
11.	Συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό του εξονίου 10 της CFTR.	91
12.	Διαδικασία εμφάνισης πηκτής πολυακρυλαμιδίου.	96
13.	Ολιγονουκλεοτίδια εκκίνησης που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των τεσσάρων συνηθέστερων μεταλλάξεων στο β-γονίδιο με την μέθοδο ARMS	99
14.	Είδος εκκινητών & συγκέντρωση εκκινητή και Mg	99
15.	Σύσταση της πηκτής πολυακρυλαμιδίου στη μέθοδο PAGE	100
16.	Σύσταση της πηκτής πολυακρυλαμιδίου στη μέθοδο SSCP	101

17.	Συνδυασμοί των τεσσάρων συνηθέστερων μεταλλάξεων του γονιδίου της β-σφαιρίνης	113
18.	Πειραματικά δεδομένα προτύπων διαχωρισμού σε ασθενείς με β-MA	117
19.	Ελάχιστες και μέγιστες τιμές Rf ζωνών που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση μεταλλάξεων στους επιλεγμένους γονότυπους	118
20.	Αντιστοιχία δειγμάτων μεθόδων SSCP και ARMS	127
21.	Αποτελέσματα είδους μεταλλάξεων ασθενών	128
22.	Ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων στη β-MA	142

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η β-Μεσογειακή αναιμία είναι μία γενετική μονογονιδιακή ασθένεια που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Η κλινική εικόνα της β-Μεσογειακής αναιμίας ποικίλει σε βαρύτητα. Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από έλλειψη ή μειωμένη σύνθεση της β-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης Α και προκύπτει από μεταλλάξεις στο γονίδιο της β-σφαιρίνης. Για την προγεννητική διάγνωση της β-Μεσογειακής αναιμίας, την αποκάλυψη των φορέων και το συσχετισμό γονότυπου-φαινότυπου είναι απαραίτητη η δυνατότητα ανίχνευσης και ταυτοποίησης των μεταλλάξεων.

Ανάμεσα στις διάφορες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση μεταλλάξεων η SSCP (πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA) είναι μία από τις πλέον ευαίσθητες και απλές. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη της μεθόδου SSCP στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και η διερεύνηση της χρησιμότητάς της στην ταυτοποίηση, αντί απλά την ανίχνευση, των τεσσάρων συνηθέστερων μεταλλάξεων της β-Μεσογειακής Αναιμίας στον Ελληνικό πληθυσμό. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ταυτοποίηση της συνηθέστερης μετάλλαξης της Κυστικής Ίνωσης, ενός άλλου μονογονιδιακού γενετικού νοσήματος.

Απομονώθηκε DNA από σαράντα ασθενείς με β-Μεσογειακή αναιμία και πολλαπλασιάστηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης τμήμα 238 βάσεων του β-γονιδίου της σφαιρίνης το οποίο περιλαμβάνει τις τέσσερις μεταλλάξεις υπό εξέταση (IVS-I-1, IVS-I-6, IVS-I-110 και cd39) οι οποίες αντιστοιχούν στο 80% του συνόλου των μεταλλάξεων που παρατηρούνται στον ελληνικό πληθυσμό. Αφού βελτιστοποιήσαμε τις συνθήκες της μεθόδου SSCP αναλύσαμε τα προϊόντα της αντίδρασης PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες και οι ζώνες έγιναν ορατές μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο. Βρήκαμε ότι τα μονόκλωνα

DNA έδωσαν ένα επαναλήψιμο πρότυπο διαχωρισμού χαρακτηριστικό του συνδυασμού των μεταλλάξεων που φέρουν. Με τη χρήση δειγμάτων μαρτύρων που έχουν έξι από τους δέκα δυνατούς συνδυασμούς των τεσσάρων συνηθέστερων μεταλλάξεων, μπορέσαμε να προβλέψουμε τις μεταλλάξεις που υπάρχουν σε ένα τέταρτο του δείγματός μας και επιβεβαιώσαμε τις προβλέψεις μας με μία άμεση μέθοδο προσδιορισμού των μεταλλάξεων, την μέθοδο ARMS.

Συμπεραίνουμε ότι η μη ραδιενεργή μέθοδος της PCR-SSCP μπορεί να εφαρμοσθεί για την ταυτοποίηση μεταλλάξεων της β-MA, εφόσον κατάλληλα δείγματα μαρτύρων είναι διαθέσιμα. Επιπλέον η μέθοδος εφαρμόζεται εύκολα σε ετεροζυγώτες, καθιστώντας την ιδιαίτερα χρήσιμη για πληθυσμιακό έλεγχο φορέων.

Τέλος δείξαμε ότι η μέθοδος SSCP μπορεί να εφαρμοσθεί για την ταυτοποίηση της συνηθέστερης μετάλλαξης (ΔF508) του γονιδίου της CFTR (διαμεμβρανικός ρυθμιστής της κυστικής ίνωσης), ανάμεσα σε φορείς και πάσχοντες από Κυστική Ίνωση.

## SUMMARY

Beta-thalassaemia is a single gene genetic disorder which is inherited in an autosomal recessive manner. The clinical symptoms of beta-thalassaemia vary in severity. The disorder is characterized by the complete lack or the reduced production of hemoglobin A  $\beta$ -chains, because of mutations in the  $\beta$ -globin gene. For the prenatal diagnosis of beta-thalassaemia, detection of carriers and the correlation of genotype to phenotype, detection and identification is required.

Among the various methods used for the detection of mutations Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), is one of the simplest and most sensitive. The object of the present study was to establish the method of SSCP in the Laboratory of Biochemistry of the Medical school of the University of Thessaly and to investigate whether can be employed for the identification and not simply the detection of the four commonest mutations beta-thalassaemic mutations in the Greek population. The method was also used for the identification of  $\Delta F508$  mutation of Cystic Fibrosis, another genetic disease.

Genomic DNA was extracted from forty beta-thalassaemic patients and a 238bp fragment of the  $\beta$ -globin gene was amplified by PCR, which contains the mutations under investigation (IVS-I-1, IVS-I-6, IVS-I-110 και cd39), which account 80% of the total mutations present in the Greek population.

After the conditions of the SSCP method were optimized, we analyzed the PCR products by polyacrylamide gel electrophoresis, under non denaturing conditions, and the bands were visualized by silver nitrate. We found that single

stranded DNA gave a reproducible separation pattern, specific for the combination of mutations present. With the use of control beta-thalassaemic samples, containing six out of ten possible different combinations of the four mutations under investigation, we were able to predict the mutations present in a quarter of our samples and we verified the SSCP predictions by the method of ARMS, a direct method for mutation identification.

We conclude that this non-radioactive PCR-SSCP method can be reliably used for the identification of beta-thalassaemic mutations, provided suitable controls are available. Moreover, the method is easy to apply for mutation detection in carriers making it particularly useful in population screening.

Finally, we also showed that the method of SSCP can be employed for the identification of  $\Delta F508$  mutation of CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) gene, among carriers and patients.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ



## ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Το ενδιαφέρον για την κληρονομικότητα είναι πολύ παλιό, σχεδόν όσο και η ύπαρξη του ανθρώπινου είδους. Υπάρχουν πολλές μαρτυρίες σχετικά με τον προβληματισμό που δημιουργήθηκε στους ανθρώπους για θέματα κληρονομικότητας.

Η πρόοδος της Γενετικής, της επιστήμης που μελετά την κληρονομικότητα, ιδίως τα τελευταία 150 χρόνια, κατέδειξε τα υποκυτταρικά συστατικά που ενέχονται και τους νόμους που διέπουν την κληρονομικότητα. Σήμερα όλοι γνωρίζουμε ότι ο φορέας της γενετικής πληροφορίας του οργανισμού μας είναι το DNA, που βρίσκεται στα χρωμοσώματα, τα οποία περιέχονται στον κυτταρικό πυρήνα. Η πρόσφατη αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος έδειξε ότι από τις  $3 \times 10^9$  βάσεις που περιέχονται στο DNA μόνο περίπου το 3% συγκροτούν γονίδια, αποτελούν δηλαδή αλληλουχίες νουκλεοτιδίων οι οποίες μεταγράφονται σε RNA και μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Υπολογίζεται ότι το γονιδιώμα μας έχει γύρω στα 30.000 γονίδια, τα οποία με εναλλακτικό μάτισμα και άλλες διεργασίες, κωδικοποιούν αρκετά περισσότερες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες είναι τα μόρια που είναι τελικά υπεύθυνα για τις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες και για την φαινοτυπική ιδιαιτερότητα των διαφόρων οργανισμών.

Η αλληλουχία νουκλεοτιδίων στο DNA μπορεί να τροποποιηθεί με μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι σημειακές, όπου μια βάση μετατρέπεται σε μια άλλη, ή να οδηγούν σε προσθήκες ή ελλείψεις νουκλεοτιδίων. Οι μεταλλάξεις σε γονίδια οδηγούν σε απουσία, τροποποίηση ή μείωση (αλλά ενίοτε και σε αύξηση) του γονιδιακού προϊόντος, είτε αυτό είναι καταλυτική (ενζυμική) πρωτεΐνη είτε πρωτεΐνη με άλλες λειτουργίες. Οι μεταλλάξεις ευθύνονται για τη δημιουργία γενετικής ποικιλότητας στον πληθυσμό, για πολλές κληρονομικές ασθένειες, καθώς και πολλές περιπτώσεις καρκίνου. Μεταλλάξεις μπορεί να συμβούν σε οποιοδήποτε γεννητικό ή σωματικό κύτταρο. Μόνο

οι μεταλλάξεις στα γεννητικά κύτταρα μπορεί να μεταβιβαστούν από τη μια γενιά στην επόμενη και γι' αυτό ευθύνονται για τη δημιουργία κληρονομικών ασθενειών.

Όπως προαναφέρθηκε, γενετικά ή κληρονομικά αποκαλούνται τα νοσήματα τα οποία οφείλονται σε κληρονομήσιμες βλαπτικές γονιδιακές τροποποιήσεις. Εάν η ασθένεια οφείλεται σε βλάβη σε ένα μόνο γονίδιο αποκαλείται μονογονιδιακή, ενώ αν η ασθένεια εμφανίζεται όταν υπάρχουν βλάβες σε περισσότερα του ενός γονιδίου, τότε αποκαλείται πολυγονιδιακή. Πολλά νοσήματα, ιδιαίτερα τα συνηθέστερα νοσήματα που πλήττουν τις αναπτυγμένες χώρες, είναι πολυπαραγοντικά, προκύπτουν δηλαδή από την αλληλεπίδραση διαφόρων γονιδίων και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Οι κανόνες που διέπουν τον τρόπο κληρονομησης των διαφόρων χαρακτήρων (φαινοτυπικών χαρακτηριστικών της γονιδιακής βλάβης) μελετήθηκαν αρχικά από τον Gregor Mendel και διατυπώθηκαν στους γνωστούς ομώνυμους νόμους. Η μελέτη του τρόπου κληρονομησης γενετικών ασθενειών γίνεται σε άτομα μεγάλων οικογενειών - όσο περισσότερα άτομα μπορούν να μελετηθούν σε μια οικογένεια τόσο ευκολότερο είναι να καθοριστεί ο τύπος κληρονομικότητας. Στον άνθρωπο, τον Μενδελιανό τύπο κληρονομικότητας, ακολουθούν οι χαρακτήρες που καθορίζονται από ένα μόνο γονίδιο (μονογονιδιακοί χαρακτήρες) και σε αυτούς περιλαμβάνονται διάφορες μονογονιδιακές ασθένειες.

Άτομα που φέρουν κληρονομήσιμες μονογονιδιακές βλάβες μπορεί να είναι ομοζυγώτες, όταν η βλάβη υπάρχει και στα δύο αλληλόμορφα (δηλαδή στα αντίγραφα του συγκεκριμένου γονιδίου που υπάρχουν και στα δύο χρωμοσώματα, που κληρονομήθηκαν από τους δύο γονείς) ή ετεροζυγώτες, όταν η γενετική βλάβη παρατηρείται μόνο στο ένα αλληλόμορφο (δηλαδή φέρεται μόνο στο ένα χρωμόσωμα και επομένως κληρονομήθηκε μόνο από τον ένα γονέα). Για μονογονιδιακές ασθένειες που ακολουθούν Μενδελιανή κληρονομικότητα, ένας ετεροζυγώτης εμφανίζει ή όχι την

νόσο, ανάλογα με το αν ο χαρακτήρας κληρονομείται κατά τον επικρατή ή υπολειπόμενο τρόπο. Στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων OMIM (Mendelian Inheritance In Man) αναφέρονται πάνω από 10.000 χαρακτήρες που σχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες και σε ένα μεγάλο και συνεχώς αυξανόμενο αριθμό έχουν ταυτοποιηθεί τα υπεύθυνα γονίδια και οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες.

Υπολογίζεται ότι στις αναπτυγμένες χώρες η συχνότητα όλων των μονογονιδιακών γενετικών νοσημάτων είναι 1/1000 κατά την γέννηση. Η συχνότητα εμφάνισης ενός συγκεκριμένου γενετικού νοσήματος συχνά διαφέρει σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Η κλινική εικόνα των νοσημάτων αυτών ποικίλλει από ασυμπτωματική, ήπιας, μέτριας ή αυξημένης βαρύτητας, έως θανατηφόρα. Η θεραπευτική προσέγγιση εξαρτάται από τις επιπτώσεις της γονιδιακής βλάβης. Σε ορισμένες περιπτώσεις αρκεί η χορήγηση του γονιδιακού προϊόντος που απουσιάζει ή βρίσκεται σε μειωμένα επίπεδα ή η αποφυγή πρόσληψης ουσιών που μεταβολίζονται σε τοξικά προϊόντα. Ωστόσο τέτοιες προσεγγίσεις δεν είναι πάντα εφικτές, ιδίως όταν η βλάβη παρατηρείται σε μη εύκολα προσβάσιμα όργανα. Επιπλέον, παρά τις πρόσφατες θεαματικές προόδους στη γονιδιακή θεραπεία ή στη μεταμόσχευση κυττάρων ή ιστών για την διόρθωση γενετικών βλαβών, οι προσεγγίσεις αυτές παραμένουν πειραματικές και η καλύτερη αντιμετώπιση των γενετικών νοσημάτων εξακολουθεί να είναι η πρόληψη. Ιδίως για τα συνηθέστερα μονογονιδιακά νοσήματα διαφόρων πληθυσμών, η προσπάθεια εστιάζεται στον εντοπισμό των φορέων της νόσου (ετεροζυγώτες) και στον προγεννητικό έλεγχο.

Η δυνατότητα προσδιορισμού βλαβών σε συγκεκριμένα γονίδια και η εγκαθίδρυση μεθοδολογιών που επιτρέπουν την ανίχνευση και ταυτοποίηση μεταλλάξεων είναι επομένως καθοριστικής σημασίας για τη μοριακή διάγνωση, και συχνά για την πρόγνωση και θεραπευτική αντιμετώπιση των κληρονομικών νοσημάτων. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η δυνατότητα ανίχνευσης και ταυτοποίησης

σημειακών μεταλλάξεων με τη μέθοδο της SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism-πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA) στα γονίδια της **β-σφαιρίνης** και **CFTR**(Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά ευθύνονται, αντίστοιχα, για τα γενετικά νοσήματα **β-μεσογειακή αναιμία** και **κυστική ίνωση**. Το Γενικό Μέρος που ακολουθεί περιλαμβάνει τρία κεφάλαια. Στα δύο πρώτα γίνεται ανασκόπηση των προαναφερθέντων γονιδίων και ασθενειών, ενώ στο τρίτο των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό μεταλλάξεων και των συγκριτικών πλεονεκτημάτων/μειονεκτημάτων της μεθόδου SSCP που επιλέξαμε.

## **ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η ανάπτυξη της μεθόδου SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism : ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA) στο εργαστήριο Βιοχημείας του Ιατρικού Τμήματος και η διερεύνηση της χρησιμότητάς της στην ταυτοποίηση μεταλλάξεων στη β-μεσογειακή αναιμία και άλλα γενετικά νοσήματα.

Τα σημεία που δόθηκε μεγάλη βαρύτητα είναι:

- Ο προσδιορισμός των πειραματικών συνθηκών της SSCP για την λήψη διακριτών και επαναλήψιμων προτύπων διαχωρισμού των μονόκλωνων DNA.
- Η εύρεση των προτύπων διαχωρισμού δειγμάτων DNA από φορείς και ασθενείς β-MA που φέρουν γνωστούς συνδυασμούς μεταλλάξεων.
- Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων σε δείγματα πασχόντων με β-MA, μετά από σύγκριση των προτύπων διαχωρισμού τους με αυτά των μαρτύρων.

- Η επιβεβαίωση των προβλέψεων της μεθόδου SSCP για ασθενείς με β-MA με τη χρήση μιας άμεσης μεθόδου προσδιορισμού μεταλλάξεων (ARMS).
- Εφαρμογή της μεθόδου SSCP για την ταυτοποίηση της ΔF508 μετάλλαξης σε δείγματα φορέων ή πασχόντων από Κυστική Ίνωση, μια άλλη γενετική ασθένεια.

# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## A. β-ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ (β-ΜΑ)

### A.1. Ιστορική ανασκόπηση

Μια σοβαρή υπόχρωμη αναιμία περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Cooley και Lee το 1925, σε παιδιά Ελληνικής, Ιταλικής και Συριακής καταγωγής, η οποία τώρα ξέρουμε ότι είναι η β-Μεσογειακή αναιμία. Οι ερευνητές αυτοί περιέγραψαν την κλασική μορφή της νόσου με την τεράστια διόγκωση του ήπατος, τις αλλοιώσεις στα οστά και την μελάχρωση του δέρματος. Από τα εργαστηριακά ευρήματα σε περιφερικό αίμα παρατήρησαν κυρίως την υποχρωμία, την μικροκυττάρωση, την ποικιλοκυττάρωση και την αυξημένη οσμωτική αντίσταση των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε υπότονα διαλύματα<sup>23</sup>.

Σταθμός στη μελέτη της νόσου υπήρξε η παρατήρηση ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια γονέων με παιδιά ασθενείς β-Μεσογειακής αναιμίας παρουσίαζαν επίσης αυξημένη αντίσταση σε υπότονα διαλύματα χλωριούχου νατρίου. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε αργότερα τους επιστήμονες στη διαπίστωση ότι σε ασθενείς με β-Μεσογειακή αναιμία οι αλυσίδες της β-σφαιρίνης είναι σε ανεπάρκεια. Πιο συγκεκριμένα, οι β αλυσίδες είναι λιγότερες από τις α αλυσίδες και τα ερυθροκύτταρα χαρακτηρίζονται από μείωση της αιμοσφαιρίνης Α, αλλά ήπια αύξηση της αιμοσφαιρίνης Α<sub>2</sub> και της αιμοσφαιρίνης F.

Μεγάλο βήμα για την μελέτη της Μεσογειακής αναιμίας, αλλά και όλων των αιμοσφαιρινοπαθειών, αποτέλεσε η εισαγωγή του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού των αιμοσφαιρινών, σαν μέθοδος μελέτης των αιμοσφαιρινοπαθειών.<sup>124</sup>

Αργότερα ο Kunkel<sup>84</sup> και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν αυξημένο ποσοστό αιμοσφαιρίνης με σύσταση αλυσίδων α<sub>2</sub>δ<sub>2</sub> σε άτομα ετεροζυγώτες β-Μεσογειακής αναιμίας, πολύ σημαντική παρατήρηση για την ανίχνευση των ετεροζυγωτών.

Στη συνέχεια η ταχεία πρόοδος της βιοχημείας με την ανακάλυψη της τρισδιάστατης δομής των πολυπεπτιδικών αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης (Perutz 1956) και της μοριακής βιολογίας με τον εντοπισμό του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της β-σφαιρίνης, καθώς και την καταγραφή της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων που το συνθέτουν, έδωσαν σημαντική ώθηση στην κατανόηση τόσο των μορφών της β-Μεσογειακής αναιμίας όσο και της κληρονομικότητάς τους.

Τέλος η ανακάλυψη το 1984 από τον Kary Mullis της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε συνδυασμό με τις νέες τεχνικές της μοριακής βιολογίας, κατέστησαν δυνατό τον έλεγχο των μοριακών βλαβών του γονιδίου της β-σφαιρίνης.

Στον Ελληνικό πληθυσμό περίπου το 7,5% των ατόμων είναι φορείς β-Μεσογειακής αναιμίας. Το ποσοστό αυτό ποικίλει και είναι δυνατό να φτάσει και το 20% σε μερικές περιοχές, π.χ. Μυτιλήνη, Λήμνος, Κέρκυρα, Καρδίτσα (Σχήμα 1).

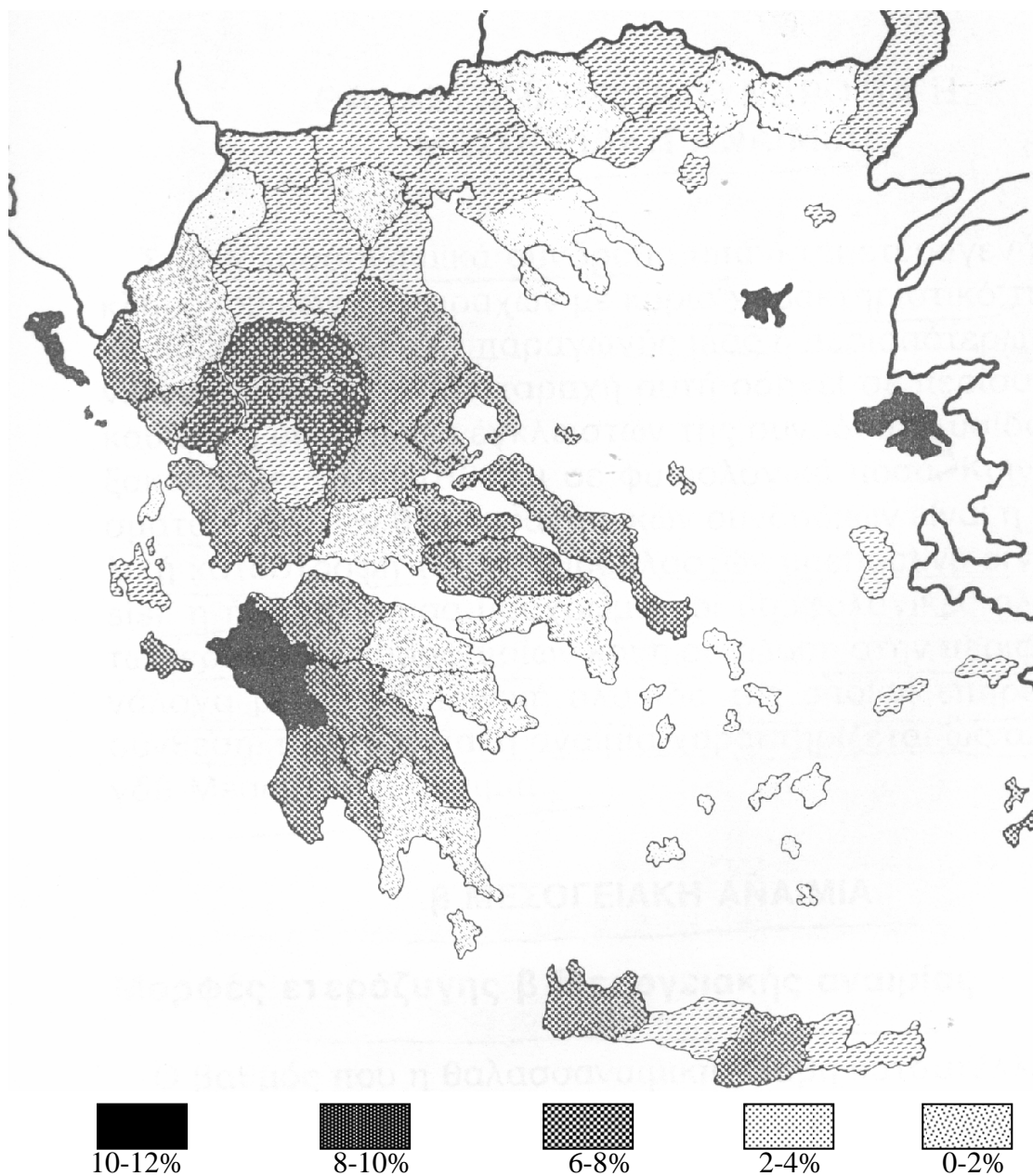
Οι πιθανοί φαινότυποι που προέρχονται από μεταλλάξεις στο γονίδιο της β-σφαιρίνης είναι οι εξής.

Η περισσότερο βαριά μορφή είναι η μείζων β-Μεσογειακή αναιμία που αντιπροσωπεύει την ομόζυγη κατάσταση, στην οποία τα δύο γονίδια της β-σφαιρίνης περιέχουν μεταλλάξεις, που δεν τους επιτρέπουν να παράγουν φυσιολογικές ποσότητες β-σφαιρίνης. Άτομα με μείζονα β-Μεσογειακή αναιμία εξαρτώνται από μεταγγίσεις και έχουν μία ποικιλία σοβαρών ιατρικών προβλημάτων που θα αναπτυχθούν στη συνέχεια. Οι ετεροζυγώτες για τη β-Μεσογειακή αναιμία λέγεται ότι έχουν «ελάσσονα Μεσογειακή αναιμία» και είναι ασυμπτωματικοί. Αυτοί έχουν ένα φυσιολογικό γονίδιο β-σφαιρίνης και ένα που περιέχει μία μετάλλαξη.

Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευθεί περισσότερες από 200 διαφορετικές μεταλλάξεις<sup>36,60,61</sup>, και οι 56 από αυτές συναντώνται σε πληθυσμούς μεσογειακής



καταγωγής<sup>25</sup>. Στην Ελλάδα οι συχνότερες μεταλλάξεις είναι τέσσερις και καλύπτουν περίπου το 80% όλων των μεταλλάξεων.



Σχήμα 1. Χάρτης της Ελλάδας με κατανομή της β-Μεσογειακής αναιμίας.

Η ασθένεια έχει εντοπισθεί σε όλους σχεδόν τους πληθυσμούς της γης με μεγαλύτερη συχνότητα σε εκείνους όπου παλαιότερα μία θανατηφόρα μορφή ελονοσίας ήταν σε εξέλιξη. Το *Plasmodium malariae* δεν μπορούσε να αναπτυχθεί στα ερυθρά αιμοσφαίρια ετεροζυγωτών β-Μεσογειακής αναιμίας, λόγω της

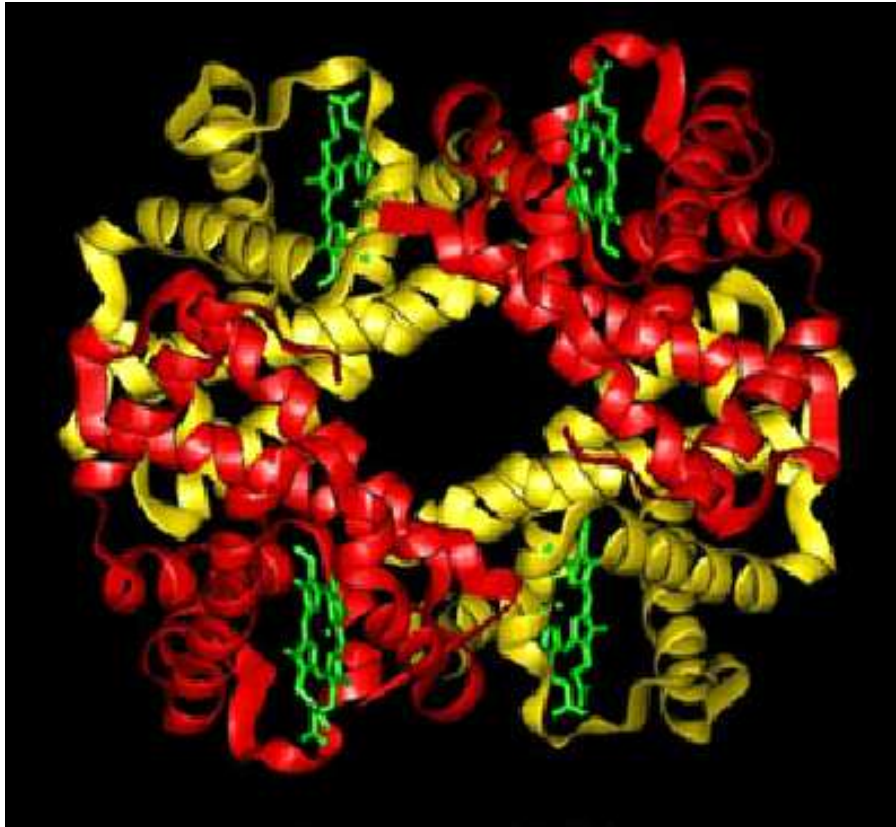
διαφορετικής τους σύστασης σε σχέση με τα φυσιολογικά, τα οποία αποτελούσαν τέλειο χώρο ανάπτυξης του μικροβίου. Αυτό αποτελεί παράδειγμα ισορροπημένου γενετικού πολυμορφισμού. Ο ετεροζυγώτης προστατεύεται από την ελονοσία και δεν υποφέρει, ενώ ο φυσιολογικός ομοζυγώτης είναι ευάλωτος στην ελονοσία, γεγονός που είχε σαν αποτέλεσμα υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης ατόμων φορέων β-MA σε σχέση με τους υγιείς. Έτσι εξηγείται το γεγονός του υψηλού ποσοστού φορέων β-MA σε χώρες όπως εκείνες της Μεσογείου, της Βόρειας Αφρικής, της Μέσης Ανατολής, της Δυτικής Κίνας και της Ινδίας.

## **A.2. Γενικά για τις Αιμοσφαιρίνες και τα γονίδιά τους**

Οι αιμοσφαιρίνες είναι οι πιο καλά μελετημένες πρωτεΐνες του ανθρώπινου οργανισμού. Αποτελούνται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες οι οποίες είναι ανά δύο όμοιες, ενώ η κάθε μία είναι συνδεδεμένη με ένα μόριο αίμης. Οι τέσσερις αλυσίδες συγκρατούνται μεταξύ τους με μη ομοιοπολικές έλξεις (Σχήμα 2).

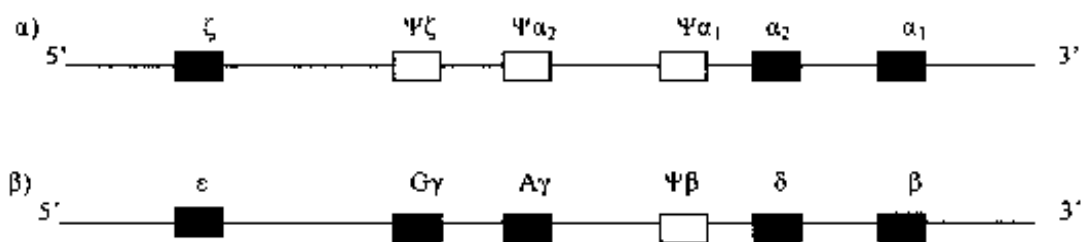
Όλες οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες κωδικοποιούνται από δύο ομάδες γονιδίων. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αλυσίδες τύπου α βρίσκονται στο βραχύ άκρο του χρωμοσώματος 16 με τη σειρά ζ, Ψζ, Ψα<sub>2</sub>, Ψα<sub>1</sub>, α<sub>2</sub>, α<sub>1</sub> σε DNA με έκταση μεγαλύτερη από 30Kb. Το σύμπλεγμα των β γονιδίων βρίσκεται στο βραχύ άκρο του χρωμοσώματος 11 με τη σειρά ε, Γγ, Αγ, Ψβ, δ, β. Τα γονίδια αυτά βρίσκονται σε DNA που έχει έκταση μεγαλύτερη από 50Kb, χωρίζονται μεταξύ τους με ανενεργά τμήματα DNA, ενώ υπάρχουν και ψευδογονίδια (Σχήμα 3).

Η δομή των γονιδίων της σφαιρίνης είναι κοινή. Κάθε γονίδιο αποτελείται από τρεις περιοχές που κωδικοποιούν (εξόνια), οι οποίες διακόπτονται από δύο περιοχές που δεν κωδικοποιούν (ιντρόνια).



Σχήμα 2 Τεταρτοταγής δομή της Αιμοσφαιρίνης Α. Με κόκκινο είναι χρωματισμένες οι β-αλυσίδες ενώ με κίτρινο οι α-αλυσίδες. Με πράσινο φαίνεται η Αίμη.

Και στις δύο οικογένειες τα γονίδια είναι τοποθετημένα με την κατεύθυνση 5' προς 3' και με τη σειρά που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (σχήμα 3).



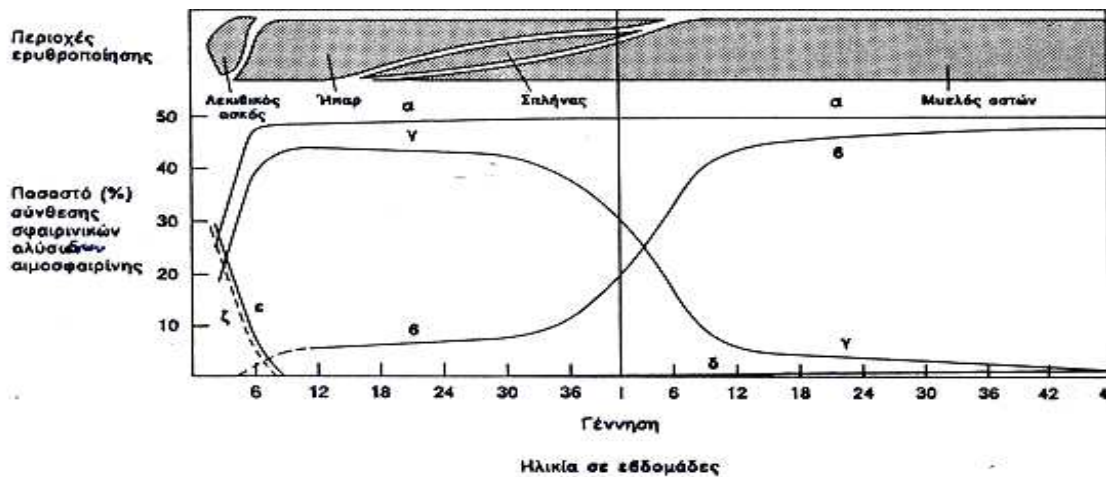
Σχήμα 3 α) Σύμπλεγμα των α γονιδίων στο χρωμόσωμα 16.  
β) Σύμπλεγμα των β γονιδίων στο βραχύ άκρο του χρωμοσώματος 11.  
Τα Ψ είναι τα ψευδογονίδια τα οποία δεν συνθέτουν σφαιρίνες.

Μερικά γονίδια των σφαιρινών προέρχονται από γονιδιακό διπλασιασμό. Αυτό ισχύει κυρίως για τα γονίδια  $\alpha_1$  και  $\alpha_2$  των οποίων η έκφραση οδηγεί σε εντελώς

όμοιες πρωτεΐνες, καθώς και για τα γονίδια  $G\gamma$  και  $A\gamma$ , των οποίων οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν  $\gamma$ -αλυσίδες διαφέρουν σε ένα μόνο αμινοξύ στη θέση 136 ( $\gamma$ γλυκίνη αντί αλανίνης αντίστοιχα). Η διατήρηση αυτών των διπλών γονιδίων πρέπει να σχετίζεται με εξελικτικούς μηχανισμούς.<sup>92</sup>

Στους ερυθροποιητικούς ιστούς του ανθρώπου υπάρχει μία ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων των σφαιρινών σε mRNA ανάλογα με το στάδιο της ανάπτυξης, η οποία εξαρτάται από ανώτερες δομές της χρωματίνης (LCR) και μεταγραφικούς παράγοντες και έχει σαν αποτέλεσμα να παράγονται άλλες πρωτεΐνες στην εμβρυϊκή και άλλες στην ενήλικη ζωή.<sup>34,162</sup>

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ανθρώπου διαπιστώνονται αλλαγές στα όργανα όπου γίνεται η σύνθεση των σφαιρινών, καθώς και στη φύση αυτών (Σχήμα 4). Οι αιμοσφαιρίνες που συντίθενται κατά τα διάφορα στάδια είναι τριών ειδών: **οι πρώιμες εμβρυϊκές, οι εμβρυϊκές<sup>143</sup> και οι κύριες**. Οι πρώιμες εμβρυϊκές αιμοσφαιρίνες περιέχουν αλυσίδες  $\zeta$  &  $\epsilon$  και συντίθενται πολύ πρόωρα, κυρίως στο λεκιθικό ασκό. Κατά τη διάρκεια της 6<sup>ης</sup> προς την 8<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης, οι πρώιμες εμβρυϊκές αιμοσφαιρίνες αντικαθίστανται προοδευτικά από τις σφαιρίνες της εμβρυϊκής περιόδου, με αντικατάσταση της αλυσίδας  $\zeta$  από  $\alpha_1$  και  $\alpha_2$  και της  $\epsilon$  από  $G\gamma$  &  $A\gamma$ . Η μετατροπή  $\zeta$  σε  $\alpha$  προηγείται ελαφρώς χρονικά της μετατροπής  $\epsilon$  σε  $\gamma$ . Κατά τη διάρκεια της υπόλοιπης εμβρυϊκής ζωής το ήπαρ και ο σπλήνας αποτελούν τα κύρια όργανα όπου παράγονται τα ερυθροκύτταρα, παρ' όλο που η δραστηριότητα του μυελού των οστών αρχίζει από το δεύτερο τρίμηνο. Η ερυθροποιητική δραστηριότητα του μυελού θα γίνει κυρίαρχη με το τέλος της εμβρυϊκής ζωής και σε όλη την ενήλικη ζωή.



Σχήμα 4: Περιοχές ερυθροποίησης και αιμοσφαιρινικές αλυσίδες στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του ανθρώπου (Weatherall and Clegg, 1981)

Κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, τα γονίδια  $G\gamma$  και  $A\gamma$  εκφράζονται με μία σχέση σταθερή, η οποία είναι περίπου 3:1 αντίστοιχα. Όσον αφορά τα γονίδια του τύπου  $\beta$  ( $\epsilon$ ,  $G\gamma$ ,  $A\gamma$ ,  $\delta$  και  $\beta$ ), η σύνθεση των αλυσίδων  $\beta$ , η οποία είναι χαμηλή κατά τη διάρκεια αρκετών μηνών, υφίσταται μία απότομη αύξηση λίγο πριν τη γέννηση. Σε αυτή τη χρονική στιγμή αποτελεί περίπου το μισό των αλυσίδων του τύπου  $\beta$ . Η σύνθεση των αλυσίδων  $\delta$ , η οποία χρονικά είναι πιο καθυστερημένη, παραμένει πάντα χαμηλή. Παράλληλα αλλά όχι ταυτόχρονα, υπάρχει αλλαγή στη σχέση έκφρασης των αλυσίδων  $\gamma$ , η οποία από 3:1 γίνεται 2:3.

Οι δύο αυτές μετατροπές (η αλλαγή της έκφρασης των  $G\gamma$  και  $A\gamma$  γονιδίων προς  $\delta$  και  $\beta$ , καθώς και αλλαγή της έκφρασης των γονιδίων  $G\gamma : A\gamma$  από εμβρυϊκή σε κύρια) αποτελούν αντικείμενο ερευνών. Η μετατροπή αυτή βρίσκεται σε στενή σύνδεση με τη χρονική ηλικία της κύησης και είναι χρονικά ταυτόχρονη και με άλλες μετατροπές που γίνονται σε κύτταρα της ερυθράς σειράς.

Κατά τη διάρκεια των πρώτων 10-12 εβδομάδων της εμβρυϊκής ζωής παράγονται οι αιμοσφαιρίνες Gower 1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ) και Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) (Πίνακας 1 & Σχήμα 5), οι οποίες συντίθενται από το λεκιθικό σάκο (Σχήμα 4). Κατά

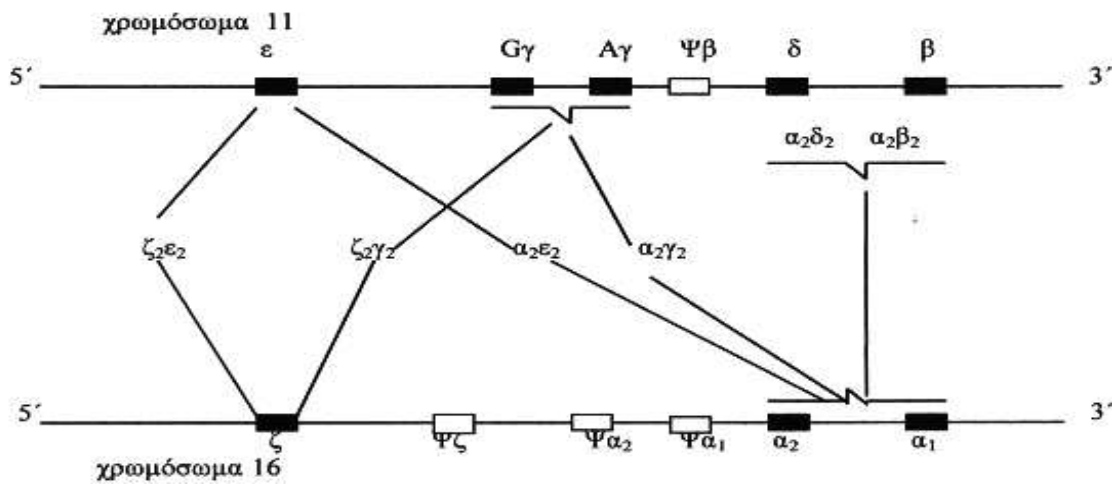
τους πρώτους μήνες μετά τη γέννηση επικρατεί η αιμοσφαιρίνη F ( $\alpha_2\gamma_2$ ), η οποία αποτελεί το 75% της αιμοσφαιρίνης του νεογέννητου παιδιού. Στους επόμενους έξι μήνες της ζωής του, η αιμοσφαιρίνη F προοδευτικά ελαττώνεται, έτσι ώστε στον τρίτο περίπου χρόνο της ζωής να φθάσει στα φυσιολογικά όρια του 0-2% της ολικής αιμοσφαιρίνης.

### Πίνακας 1

Σύσταση σε Αλυσίδες των ανθρώπινων αιμοσφαιρινών

<b>Πρώιμες εμβρυϊκές αιμοσφαιρίνες</b>	
Hb Gower 1	$\zeta_2\varepsilon_2$
Hb Portland	$\zeta_2\gamma_2$
Hb Gower 2	$\alpha_2\varepsilon_2$
<b>Εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη</b>	
HbF	$\alpha_2\gamma_2$
<b>Αιμοσφαιρίνες ενηλίκων</b>	
HbA	$\alpha_2\beta_2$
HbA <sub>2</sub>	$\alpha_2\delta_2$

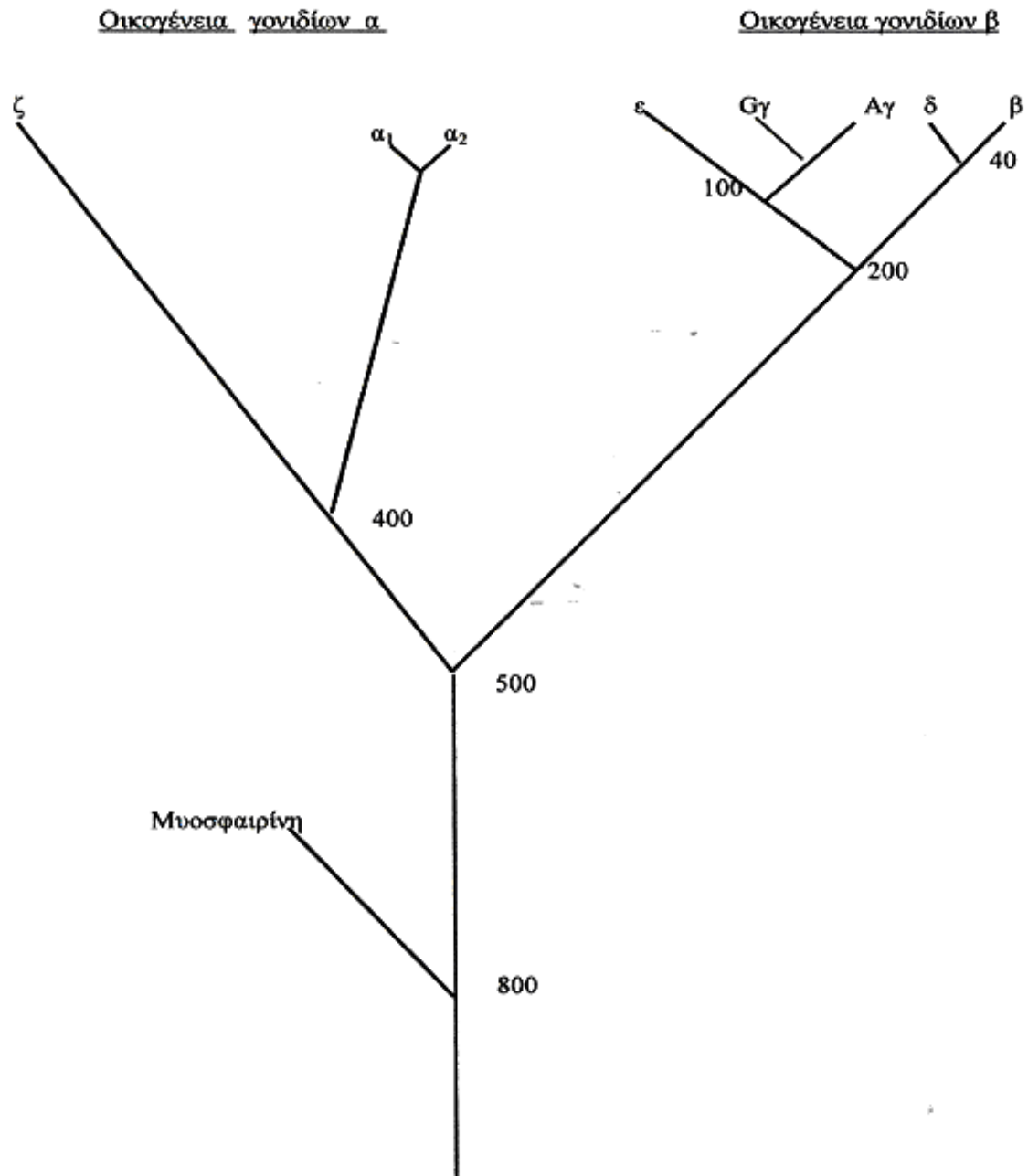
Στους ενήλικες η κύρια αιμοσφαιρίνη είναι η αιμοσφαιρίνη A, η οποία αποτελείται από δύο αλυσίδες άλφα ( $\alpha$ ) και δύο αλυσίδες βήτα ( $\beta$ ). Επίσης στους ενήλικες βρίσκεται και ένα άλλο είδος αιμοσφαιρίνης, σε ποσοστό έως 3% της ολικής αιμοσφαιρίνης, που ονομάζεται αιμοσφαιρίνη A<sub>2</sub> και περιέχει αλυσίδες δέλτα ( $\delta$ ) αντί των αλυσίδων βήτα ( $\beta$ ) της αιμοσφαιρίνης A. Άρα λοιπόν η σύνθεση των αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης A είναι  $\alpha_2\beta_2$  και της αιμοσφαιρίνης A<sub>2</sub> είναι  $\alpha_2\delta_2$  (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Προϊόντα γονιδίων σφαιρινών που σχηματίζουν τις πρώιμες εμβρυϊκές, εμβρυϊκές και σφαιρίνες ενηλίκου.

Στην εμβρυϊκή ζωή υπάρχουν άλλες αιμοσφαιρίνες οι οποίες αποτελούνται από τύπου α και τύπου β αλυσίδες. Οι αλυσίδες τύπου α αποτελούνται από 141 αμινοξέα, ενώ οι β, γ και δ από 146. Οι αλυσίδες των β, γ και δ σφαιρινών περιέχουν τα ίδια περίπου αμινοξέα. Οι β και δ διαφέρουν μόνο σε 10 από τα 146 αμινοξέα ενώ οι β και γ διαφέρουν μεταξύ τους σε 39 από τα συνολικά 146 αμινοξέα που τις αποτελούν.

Η σύνδεση των παραπάνω γονιδίων αντανακλά την εξελικτική τους ιστορία. (Σχήμα 6). Διαφορές μεταξύ των αλληλουχιών του DNA των γονιδίων των αιμοσφαιρινών υπέδειξαν ότι τα προγονικά γονίδια αιμοσφαιρινών διπλασιάστηκαν και διακλαδώθηκαν δίνοντας γονίδια σφαιρίνης α και β περίπου 500 εκατομμύρια χρόνια πριν, πολύ νωρίς στην εξέλιξη των σπονδυλωτών. Η μυσφαιρίνη διαφέρει και από τις δύο αλυσίδες α και β της αιμοσφαιρίνης, περισσότερο απ' ότι αυτές διαφέρουν μεταξύ τους, πράγμα που δείχνει ότι η μυσφαιρίνη διαχωρίστηκε πριν εμφανισθούν τα γονίδια για τις αλυσίδες α και β. Θηλαστικά, ερπετά, πτηνά, αμφίβια και σπονδυλωτοί ιχθείς έχουν διακριτές αλυσίδες α και β ενώ τα πρωτόγονα σπονδυλωτά έχουν μόνο ένα είδος αλυσίδας αιμοσφαιρίνης.



Σχήμα 6. Εξελικτικό δέντρο των γονιδίων των σφαιρινών όπως προέκυψε συμπερασματικά από τις διαφορές ως προς την αλληλουχία βάσεων του DNA και των αμινοξέων. Οι αριθμοί που σημειώνονται στα σημεία των διακλαδώσεων είναι οι υπολογιζόμενοι χρόνοι του διαχωρισμού σε εκατομμύρια χρόνια πριν. Jeffreys, S.Harris, P.A. Barrie, D.Wood, A.Blanchetot and S.M. Adams. Στο Evolution from Molecules to Men, D.S. Bendall, ed (Cambridge University Press 1983 p.176).

Τα γονίδια των αλυσίδων α και β αργότερα διπλασιάστηκαν και παραλλάχθηκαν δίνοντας έτσι δύο σειρές γονιδίων που υπάρχουν σήμερα στους ανθρώπους. Εξελικτικά τα δέντρα που συντάχθηκαν συμπερασματικά από αλληλουχίες DNA και πρωτεϊνών δίνουν εξαιρετικά ενδιαφέρουσες πληροφορίες. Τα βιομόρια είναι



έγγραφα της ιστορίας της εξέλιξης., όπως προτάθηκε από τους E. Zuckerkandl και L. Pauling το 1965.

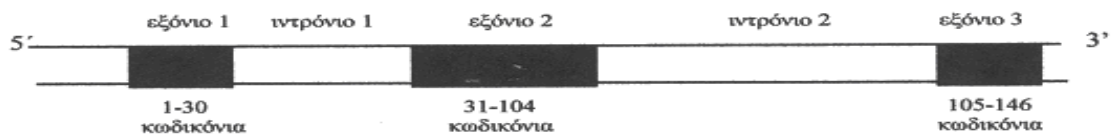
### **A.3. Δομή και αλληλουχία βάσεων του β-γονιδίου**

Τα γονίδια της αιμοσφαιρίνης ήταν από τα πρώτα γονίδια που εξετάστηκαν και μελετήθηκαν σε μοριακό επίπεδο. Το mRNA της σφαιρίνης χρησιμοποιήθηκε στη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA), γεγονός που είχε σαν αποτέλεσμα να γίνει γνωστή η αλληλουχία των βάσεων των γονιδίων των σφαιρινών. Τα γονίδια της αιμοσφαιρίνης ήταν επίσης τα πρώτα γονίδια στα οποία έγινε κλωνοποίηση<sup>101</sup>. Με την παρασκευή cDNA κλωνοποιήθηκαν οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα πολυπεπίδια των σφαιρινών και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν σαν ανιχνευτές των γονιδίων που τις συνθέτουν. Αργότερα έγιναν τράπεζες γονιδιωματικού DNA, ώστε να είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση κάθε γονιδίου για το οποίο υπάρχει ανιχνευτής.<sup>100</sup>

Μετά το σημείο αυτό η πρόοδος ήταν ραγδαία. Προσδιορίστηκαν οι περιοχές μέσα στα γονίδια που δεν μεταγράφονται (Intervening sequences, IVS ή ιντρόνια) και έγινε πλέον γνωστή όλη η οργάνωση και η αλληλουχία του DNA των γονιδίων της αιμοσφαιρίνης.<sup>149</sup> Το σύμπλεγμα των α-γονιδίων τοποθετήθηκε στο χρωμόσωμα 16<sup>28</sup> και των β-γονιδίων στο χρωμόσωμα 11 και έτσι η κατάταξη των επί μέρους γονιδίων έγινε πλέον γνωστή.

Σε όλο το ανθρώπινο γονιδίωμα, υπάρχει ένα μόνο γονίδιο που είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία της πρωτεΐνης β-σφαιρίνη και αυτό καλύπτει έκταση 1500 βάσεων. Η κωδικοποιός περιοχή περιέχεται σε τρία εξόνια ανάμεσα στα οποία παρεμβάλλονται δύο ιντρόνια (IVS). Το πρώτο εξόνιο κωδικοποιεί τα αρχικά 30

αμινοξέα , το δεύτερο τα επόμενα 74 και το τρίτο τα τελευταία 42 αμινοξέα της β-σφαιρίνης (Σχήμα 7).



Σχήμα 7. Δομή του β-γονιδίου. Αποτελείται από τρία εξόνια (μαύρες περιοχές) και δύο ιντρόνια (άσπρες περιοχές).

Πάνω στο β-γονίδιο υπάρχουν και μη κωδικοποιούσες περιοχές ανοδικά και καθοδικά από το 5' και 3' άκρο κωδικοποίησης. Η περιοχή ανοδικά από το 5' άκρο αποτελεί τον προαγωγέα (promoter) και προηγείται από το εναρκτήριο κωδικόνιο AUG, ενώ η περιοχή καθοδικά από το 3' άκρο ακολουθεί το κωδικόνιο τερματισμού UAA και αποτελεί την περιοχή του σημείου πολυαδενυλίωσης (poly adenylation site)<sup>150</sup>. Στο 5' άκρο, σε απόσταση εκατοντάδων bp ανοδικά από το εναρκτήριο AUG, βρίσκονται επιπλέον στοιχεία και αλληλουχίες γνωστές ως ενισχυτές (enhancers), οι οποίοι είναι απαραίτητοι για ισχυρή μεταγραφή.

Σε κάθε γονίδιο το πρώτο νουκλεοτίδιο (η θέση έναρξης) ορίζεται σαν +1, το δεύτερο σαν +2 κ.ο.κ. Το νουκλεοτίδιο που προηγείται της θέσης έναρξης , προς την πλευρά του 5' άκρου, ορίζεται σαν -1 κλπ. Αυτοί οι ορισμοί αναφέρονται στην κωδικοποιούσα αλυσίδα (νοηματική αλυσίδα sense strand) και όχι στην αλυσίδα εκμαγείο (μη νοηματική αλυσίδα - antisense strand) του γονιδίου. Η κωδικοποιούσα (νοηματική) αλυσίδα έχει την ίδια αλληλουχία με αυτήν του RNA, με τη διαφορά ότι αντί της U περιέχει T.

Η αλληλουχία των βάσεων του β-γονιδίου στον άνθρωπο φαίνεται στο σχήμα 8.

## Αλληλουγία βάσεων στο β-γονίδιο

-568	gtatatgtat	gtgtgtatat	atatatatat	atatatatat	ttttttctt	ttcttaccag									
-508	aaggttttaa	tccaataaag	gagaagatat	gattagaatt	gaggtagagt	ttcatccat									
-448	tctgccttgt	aagtattttg	tatattttgg	agacgcagga	agagatccat	ctacatatcc									
-388	caaagctgaa	ttatggtaga	taaagctctt	ccatttttag	tgcattaatt	tcttatttgt									
-328	gtaataagaa	aattgggaaa	acgattttca	atatgettac	taagctgtga	ttccaaatat									
-268	tacgtaata	cacttgcaaa	ggaggatggt	ttagtagca	attgtactg	atggtatggg									
-208	gccaagagat	atatcttaga	gggagggctg	agggtttgaa	gtccaactcc	taagccagtg									
-148	ccagaagagc	caaggacagg	tacggctgct	atcacttaga	cctcacctg	tggagccaca									
-88	ccctagggtt	ggc <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">caat</span> cta	ctcccaggag	cagggagggc	aggagccagg	gctgggc <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">ata</span>									
-28	aaagtcaggg	cagagccatc	tattgcttac	attgcttct	gacacaactg	tgttcactag									
+33	caacctcaaa	cagacacc													
Exon-I	+51	ATG	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">GTG</span>	CAC	CGT	ACT	CCT	GAG	GAG	AAG	TCT				
			<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Val</span>	<i>His</i>	<i>Leu</i>	<i>Thr</i>	<i>Pro</i>	<i>Glu</i>	<i>Glu</i>	<i>Lys</i>	<i>Ser</i>				
			<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">1</span>	2	3	4	5	6	7	8	9				
	+81	GCC	GTT	ACT	GCC	CTG	TGG	GGC	AAG	GTG	AAC	GTG	GAT	GAA	GTT
		<i>Ala</i>	<i>Val</i>	<i>Thr</i>	<i>Ala</i>	<i>Leu</i>	<i>Trp</i>	<i>Gly</i>	<i>Lys</i>	<i>Val</i>	<i>Asn</i>	<i>Val</i>	<i>Asp</i>	<i>Glu</i>	<i>Val</i>
		10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
	+123	GGT	GGT	GAG	GCC	CTG	GGC	AGG							
		<i>Gly</i>	<i>Gly</i>	<i>Glu</i>	<i>Ala</i>	<i>Leu</i>	<i>Gly</i>	<i>Arg</i>							
		24	25	26	27	28	29	30							
IVS-I	+144	ttggtatca	aggttacaag	acaggtttaa	ggagaccaat	agaaattggg	catgtggag								
	+204	cagagaagac	tcttgggttt	ctgataggca	ctgactctct	ctgcctattg	gtctatttt								
	+264	ccacccttagg													

## EXON-II

+274 CTG CTG GTG GTC TAC CCT TGG ACC CAG AGG TTC TTT GAG TCC  
*Leu Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Glu Arg Phe Phe Glu Ser*  
 31 32 33 3 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44

+317 TTT GGG GAT CTG TCC ACT CCT GAT GCT GTT ATG GGC AAC CCT AAG  
*Phe Gly Asp Leu Ser Thr Pro Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys*  
 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59

+362 GTG AAG GCT CAT GGC AAG AAA GTG CTC GGT GCC TTT AGT GAT  
*Val Lys Ala His Gly Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp*  
 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73

+404 GGC CTG GCT CAC CTG GAC AAC CTC AAG GGC ACC TTT GCC ACA  
*Gly Leu Ala His Leu Asp Asn Leu Lys Gly Thr Phe Ala Thr*  
 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87

+445 CTG AGT GAG CTG CAC TGT GAC AAG CTG CAC GTG GAT CCT GAG  
*Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys Leu His Val Asp Pro Glu*  
 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101

+487 AAC TTC AGG  
*Asn Phe Arg*  
 102 103 104

## IVS-II

+496 gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatggtt aagtcatgt

+556 cataggaagg ggagaagtaa cagggtacag ttagaatgg gaaacagacg aatgattgca

+616 tcagtgtgga agtctcagga tcgttttagt ttcttttatt tgctgttcat aacaattggt

+676 ttcttttgt taattcttgc tttctttttt ttcttctcc gcaattttta ctattatact

+736 taatgcctta acattgtgta taacaaaagg aaatatctct gagatacatt aagtaactta

+796 aaaaaaaact ttacacagtc tgcctagtagc attactattt ggaatatatg tgtgcttatt

+856 tgcatttca taatctcct actttatttt cttttatttt taattgatac ataactatta

+916 tacatattta tgggttaaag tgtaattgtt taatatgtgt acacatattg accaaatcag

+976 ggtaattttg catttgaat tftaaaaaat gctttcttct tftaatatac tttttgttt

+1036 atcttatttc taatactttc cctaactctt ttcttcagg gcaataatga tacaatgtat

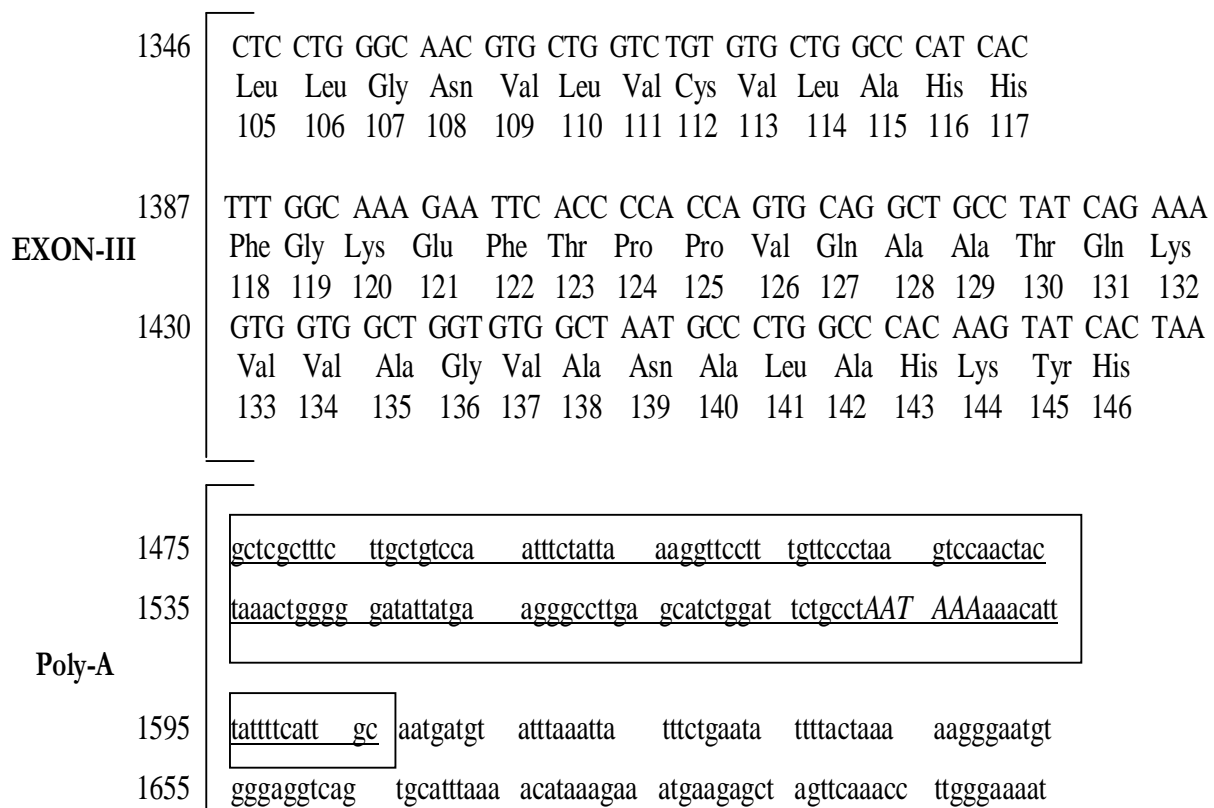
+1096 catgctctt tgcaccattc taaagaataa cagtgataat ttctgggtta aggcaatagc

+1156 aatatttctg catataaata tttctgcata taaattgtaa ctgatgtaag aggtttcata

+1216 ttgctaatag cagctacaat ccagctacca ttctgctttt attttatggt tgggataagg

+1276 ctggattatt ctgagtccaa gctagccctt ttgctaatac atgttcatac ctcttatctt

+1336 cctcccacag



Σχήμα 8 : Η αλληλουχία των βάσεων στο β-γονίδιο. Με κεφαλαία και υπογραμμισμένα γράμματα περιγράφονται οι περιοχές του γονιδίου που μεταγράφονται σε mRNA (626 bp). Κάτω από τις τριπλέτες των εξονίων αναγράφονται τα αμινοξέα που κωδικοποιούνται από το β-γονίδιο και συνθέτουν την β-σφαιρίνη. Σε πλαίσιο φαίνονται τα κυτία CAAT, ATA, η θέση έναρξης μεταγραφής και η αλληλουχία για πολυαδενυλίωση.<sup>66</sup>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> & Lawn R.M., et al (1980) «The Nucleotide Sequence of the Human β-globin Gene». Cell 21: 647-651.]

#### A.4. Μεταγραφή του β-γονιδίου σε m-RNA

Το DNA των ευκαρυωτικών οργανισμών βρίσκεται στην χρωματίνη συμπλεγμένο με θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες ονομαζόμενες ιστόνες (H1, H2A,

H2B, H3, και H4). Δύο μόρια από κάθε ιστόνη, εκτός της H1, συμπλέκονται με την βοήθεια ειδικών, παροδικά συνοδευτικών πρωτεϊνών και σχηματίζουν σωματίο διαστάσεων 11X11X6 nm. Γύρω από αυτό η διαμέτρου 20Å<sup>ο</sup> αλυσίδα του DNA εκτελεί 1,8 αριστερόστροφες περιελίξεις. Το σύμπλοκο αυτό ονομάζεται νουκλεόσωμα. Διαδοχικά νουκλεοσώματα κατά μήκος της αλυσίδας DNA απέχουν μεταξύ τους κατά μέσον όρο 50-60 ζεύγη βάσεων διασυνδέοντος DNA. Η μορφή του νήματος ομοιάζει προς «κομβολόγιον» με χάντρες και έχει διάμετρο 10-περίπου nm. Γονίδια που πρόκειται να μεταγραφούν βρίσκονται σε πιο «χαλαρά» συσκευασμένη χρωματίνη, με πιο αραιά τοποθετημένα νουκλεοσώματα.

Το ένζυμο RNA πολυμεράση II ξεδιπλώνει τη διπλή έλικα του DNA. Από τους δύο κλώνους του DNA, ο ένας (με κατεύθυνση 3'-5') χρησιμεύει σαν εκμαγείο για τον σχηματισμό του mRNA. Στη συνέχεια μεταγράφονται όλες οι αλληλουχίες του β-γονιδίου (προαγωγέας, εξόνια, ιντρόνια) και σχηματίζεται το πρώιμο mRNA. Το σημείο έναρξης της μεταγραφής του RNA στο γονίδιο βρίσκεται αρκετές βάσεις μπροστά από το πρώτο εξόνιο. Η περιοχή αυτή του γονιδίου μεταγράφεται σε mRNA όπως επίσης τα δύο ιντρόνια και στο 3' άκρο του η περιοχή των πολυαδενοσινών.

Στη συνέχεια τα εξόνια αποκόπτονται από τα ιντρόνια και τα γειτονικά εξόνια συγκολλώνται μεταξύ τους. Η διαδικασία της αποκοπής και επανασυγκόλλησης (splicing: μάτισμα) είναι αρκετά πολύπλοκη και είναι απαραίτητο να γίνει με μεγάλη ακρίβεια και σε συγκεκριμένες θέσεις. Λάθος έστω και σε ένα νουκλεοτίδιο στη διαδικασία της αποκοπής και επανασυγκόλλησης, είναι αρκετό για να αλλάξει εξ ολοκλήρου το πλαίσιο της μεταγραφής του mRNA. Είναι φανερό ότι κάτι τέτοιο θα έχει σαν αποτέλεσμα τη σύνθεση ενός τελείως διαφορετικού πολυπεπτιδίου.

Σημαντικές αλληλουχίες για το μάτισμα βρίσκονται στην περιοχή σύνδεσης των εξονίων και των ιντρονίων. Το πρώιμο mRNA σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με

μικρά ενδοπυρηνικά μόρια, αποτελούμενα από μικρά πυρηνικά RNA και πρωτεΐνες. Μετά την απομάκρυνση των ιντρονίων και τη συγκόλληση των εξονίων ένα τμήμα του μη κωδικοποιούμενου 3' άκρου απομακρύνεται και ακολουθεί η προσθήκη μίας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων που είναι πλούσια σε αδερίνη.

Η πλούσια σε αδερίνη ουρά προσδίδει σταθερότητα στο μόριο του mRNA στο κυτταρόπλασμα. Όλη η διαδικασία συντονίζεται από την αλληλουχία AAUAAA, που βρίσκεται στο 3' άκρο της μη μεταφραζόμενης περιοχής σε μία θέση 10 με 30 νουκλεοτίδια πριν από την περιοχή πολυαδενυλίωσης. Παράλληλα στο σημείο έναρξης της μεταγραφής έχει προσκολληθεί, με 3' προς 5' φωσφοδιεστερικό δεσμό, ένα μεθυλιωμένο γουανοσίδιο και με την τελική αυτή τροποποίηση που ονομάζεται capping (από cap: καλύπτρα) το ώριμο mRNA εγκαταλείπει τον πυρήνα και εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα.

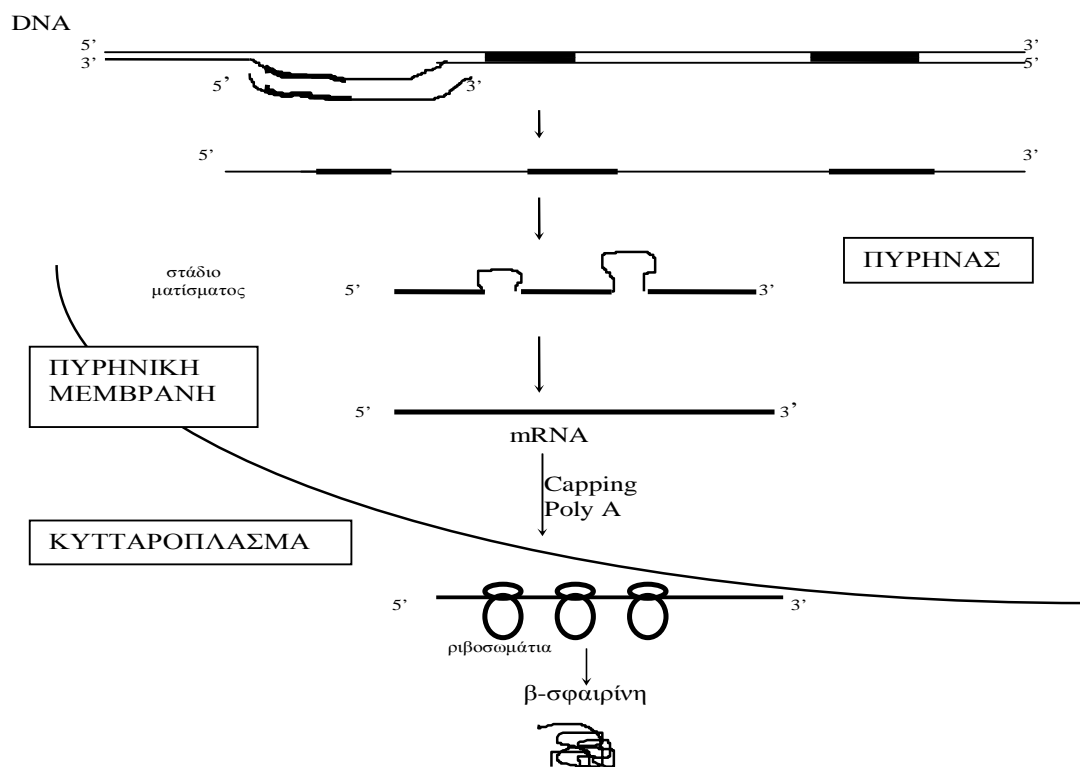
Ο προαγωγέας κάθε γονιδίου αποτελείται από σταθερές αλληλουχίες DNA οι οποίες είναι απαραίτητες για την ακριβή θέση έναρξης της μεταγραφής. Οι αλληλουχίες του προαγωγέα βρίσκονται συνήθως στις θέσεις -260 με -300, αποτελούνται από πολλά λειτουργικά τμήματα και έχουν μέγεθος 6-20 νουκλεοτίδια. Αυτά τα τμήματα θα πρέπει να αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες πρωτεΐνες που δεσμεύοντας το DNA διευκολύνουν και ρυθμίζουν τη μεταγραφή.

Μια τέτοια ρυθμιστική αλληλουχία που βρίσκεται στον προαγωγέα του γονιδίου της β-σφαιρίνης είναι η περιοχή που περιέχει βάσεις A και T πλησιέστερα προς τη θέση έναρξης, η οποία βρίσκεται συμμετρικά τοποθετημένη στη θέση -28 έως -31, γνωστή και σαν περιοχή κυτίο TATA (TATA box). Μετάλλαξη μίας και μόνο βάσης εντός της περιοχής TATA παρεμποδίζει σημαντικά τη δραστηριότητα του προαγωγέα. Κατά παρόμοιο τρόπο, ενδοαλλαγές μεταξύ των βάσεων A και T οδηγούν επίσης σε απώλεια της δραστηριότητας, γεγονός που δείχνει ότι η ακριβής

αλληλουχία και όχι απλά και μόνο η υψηλή περιεκτικότητα ζευγών ΑΤ, είναι ουσιώδης για τη δραστηριότητα του προαγωγέα.

Η περιοχή TATA είναι μεν απαραίτητη αλλά συνήθως δεν είναι επαρκής για τη δραστηριότητα του προαγωγέα. Επιπρόσθετες αλληλουχίες που είναι τοποθετημένες μεταξύ των θέσεων -40 και -110 είναι επίσης απαραίτητες. Πολλοί προαγωγείς περιέχουν μία περιοχή CAAT και μερικοί άλλοι μία περιοχή GC.<sup>150</sup> Οι αλληλουχίες στα κυτία TATA και CAAT αναγνωρίζονται από μεταγραφικούς παράγοντες που συμβάλουν στην έναρξη της μεταγραφής.

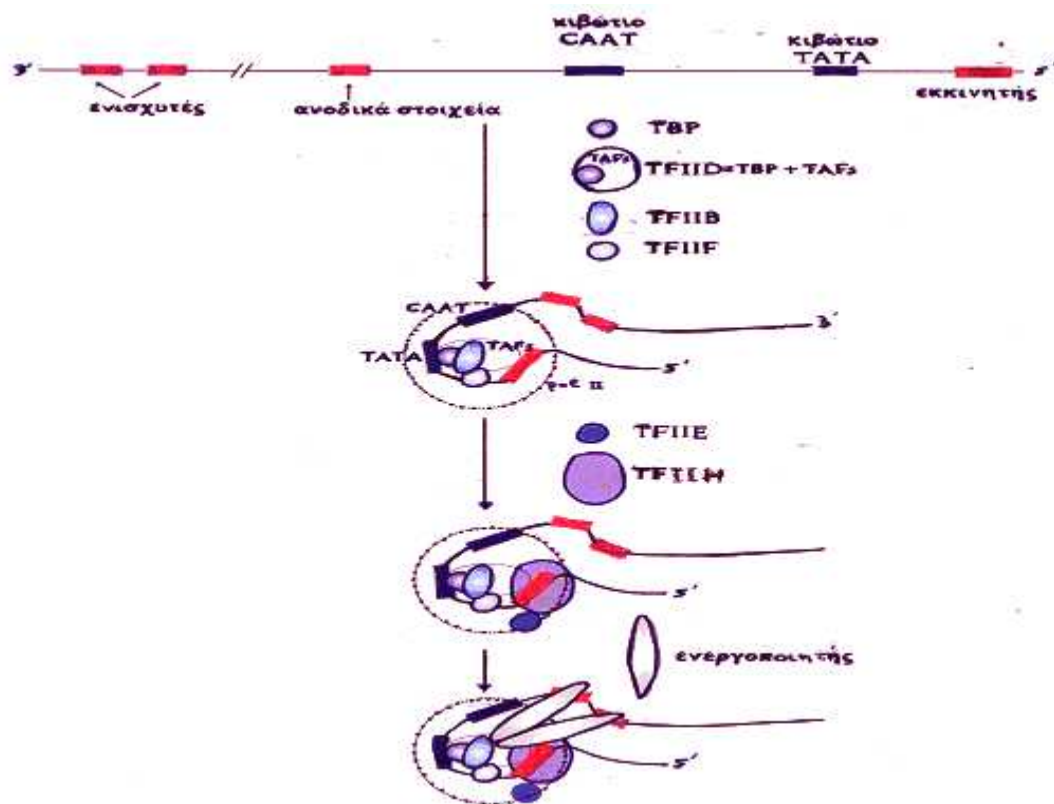
Η διαδικασία του σχηματισμού της β-σφαιρίνης, με βάση τις πληροφορίες που υπάρχουν στο αντίστοιχο γονίδιο, γίνεται σε πολλά στάδια. (Σχήμα 9)



Σχήμα 9. Σχηματική απεικόνιση της μεταγραφής και μετάφρασης του β-γονιδίου. Ο αντινοσηματικός κλώνος του δίκλωνου DNA χρησιμεύει σαν εκμαγείο για να συντεθεί το πρώτο mRNA. Ακολουθεί το μάτισμα του mRNA και η προσθήκη 5' καλύπτρας και 3' πολυΑ ουράς. Το ώριμο mRNA (626 bp) βγαίνει από τον πυρήνα του κυττάρου στο κυτταρόπλασμα και μεταφράζεται με τη βοήθεια των ριβασωμάτων σε β-σφαιρίνη.



Η μεταγραφή αρχίζει με δέσμευση του παράγοντα TBP (TATA binding protein) στην θέση TATA, προκαλώντας κάμψη του DNA κατά  $180^\circ$  (Σχήμα 10). Η TBP είναι μέρος του πολυπεπτιδικού συμπλόκου TFIID αποτελούμενου εκτός της TBP και από άλλες ρυθμιστικές πρωτεϊνικές υπομονάδες ονομαζόμενες TAFs (TBP-binding factors), των οποίων ο ρόλος είναι η αναγνώριση ατομικών προαγωγέων αναγνωρίζοντας την ακολουθία του εκκινήτη. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών προκαλούν την έλξη από τον TFIID του παράγοντα TFIIB, TFIIF και της RNA πολυμεράσης II (Σχήμα 10).



Σχήμα 10 : Δομή προαγωγέων ευκαρυωτικών γονιδίων που μεταγράφονται από την πολυμεράση II. Δεικνύονται η σειρά σύζευξης των διαφόρων πρωτεϊνικών μεταγραφικών παραγόντων , καθώς και η γνωστή αλληλεπίδρασή τους και η επαφή τους με ρυθμιστικές ακολουθίες του προαγωγέα.

Ακολουθεί η πρόσδεση των παραγόντων TFIIΕ και TFIIΗ. Ο TFIIΗ είναι σύμπλοκο εννέα πολυπεπτιδίων, μία από τις οποίες είναι ελικάση και μια άλλη ΑΤΡαση. Τρεις ακόμη παράγοντες, οι TFIIΑ, TFIIΙ και TFIIJ εμπλέκονται στην μεταγραφή. Η ακριβής μορφή της αναδίπλωσης του DNA και η ακριβής θέση των TFII δεν είναι γνωστή. Πάντως οι TFIIΒ, TFIIΕ και TFIIΗ φαίνεται να είναι σε απ'ευθείας επαφή με την πολυμεράση. Η κάμψη του DNA φέρνει τους ενισχυτές και τα ανοδικά στοιχεία σε θέση ώστε οι ενεργοποιητές, ειδικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες προσδεδεμένες σ'αυτά, να εφάπτονται των TFIIΙD, TFIIΒ και TFIIΗ. Επαφή των ενεργοποιητών με την πολυμεράση γίνεται μέσω ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου ονομαζόμενου SRB. Η πολυμεράση II αποτελείται από πολλές υπομονάδες (12 στους ζυμομύκητες), δύο από τις οποίες είναι παρόμοιες με τις προκαρυωτικές β και β'. Οι υπόλοιπες αποτελούν το σύμπλοκο SRB. Η δημιουργία αυτού του συμπλόκου έναρξεως απαιτεί ΑΤΡ.

Οι ενισχυτικές αλληλουχίες ευκαρυωτικών γονιδίων (Σχήμα 10) δρουν από αποστάσεις μερικών χιλιάδων βάσεων (1000-10000 βάσεις) και μπορεί να βρίσκονται στο 5', όπως στο β-γονίδιο, ή στο 3' άκρο ενός γονιδίου, αλλά ενίοτε και μέσα στην κωδικοποιό περιοχή. Μια ελκυστική υπόθεση είναι ότι χρησιμοποιούνται ως θέσεις πρόσδεσης για τη συγκρότηση των συμπλόκων έναρξης τα οποία περιέχουν την RNA πολυμεράση II. Το DNA είναι δυνατόν να αναδιπλωθεί μετά από την δέσμευση ρυθμιστικών πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα θέσεις που απέχουν μεγάλες αποστάσεις στην ευθύγραμμη αλληλουχία του DNA να μπορούν να πλησιάσουν.

## **A.5. Μετάφραση και σύνθεση πρωτεϊνών**

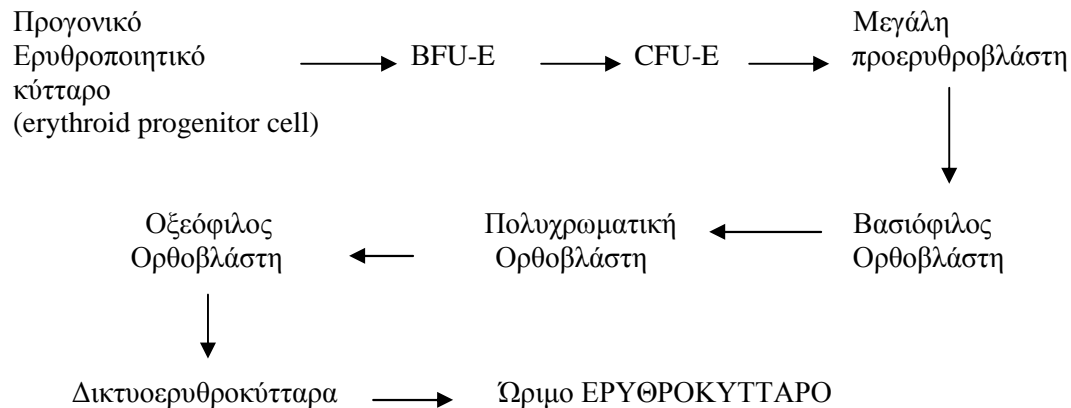
Για να μεταφραστεί το ώριμο mRNA σε πρωτεΐνη, θα πρέπει να ακολουθήσει μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία στην οποία συμμετέχουν πολλοί πρωτεϊνικοί

παράγοντες και η οποία διακρίνεται από τα στάδια έναρξης, επιμήκυνσης και τερματισμού σύνθεσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Αρχικά το μόριο του mRNA δεσμεύεται από ένα ριβόσωμα το οποίο ήδη φέρει το εναρκτήριο tRNA σε σύμπλοκο έναρξης της μετάφρασης. Κάθε κωδικόνιο τριπλέτα του mRNA αναγνωρίζεται από ένα αντικωδικόνιο τριπλέτα του tRNA που είναι αμινοακυλιωμένο με το αντίστοιχο αμινοξύ. Ο πεπτιδικός δεσμός σχηματίζεται ανάμεσα στην αμινομάδα του εισερχόμενου αμινοακυλο-tRNA και την καρβοξυλική ομάδα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας του πεπτιδυλο-tRNA, που είναι ήδη συνδεδεμένο στο ριβόσωμα. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα παραμένει συνδεδεμένη με το ριβόσωμα για όσο χρονικό διάστημα διαρκεί η επιμήκυνσή της με την προσθήκη αμινοξέων στο ένα άκρο της. Ο τερματισμός της σύνθεσης γίνεται σε συγκεκριμένα κωδικόνια (UGA, UAG, UAA) και η αποδέσμευση της πρωτεΐνης από το ριβόσωμα καταλύεται από συγκεκριμένο παράγοντα αποδέσμευσης πρωτεϊνών.

#### **A.6. Διαφοροποίηση ερυθροποιητικών κυττάρων**

Η αιμοσφαιρίνη περιέχεται στα ερυθροκύτταρα, τα τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα της ερυθράς σειράς. Η διαφοροποίηση των ερυθροποιητικών κυττάρων γίνεται μέσα σε περίπου επτά ημέρες και από ένα προγονικό ερυθροποιητικό κύτταρο παράγονται 16 ώριμα ερυθροκύτταρα. Ημερησίως εισέρχονται στην κυκλοφορία  $2 \times 10^{11}$  ερυθροκύτταρα. Υπό την επίδραση της ερυθροποιητίνης (EΠ) τα κύτταρα στόχος [Burst Forming unit Erythroid (BFU-E), Colony Forming unit Erythroid (CFU-E) , και προερυθροβλάστες] επιταχύνουν την ανάπτυξή τους και γίνονται ικανά να εκφράσουν τα γονίδια τους προς την κατεύθυνση σύνθεσης αιμοσφαιρίνης και των άλλων πρωτεϊνών των ερυθροκυττάρων. Η σύνθεση DNA και mRNA μειώνεται σημαντικά στο στάδιο της πολυχρωματικής ορθοβλάστης, όμως στη

συνέχεια, με την αποβολή του πυρήνα στην οξεόφιλη ορθοβλάστη, επιταχύνεται η σύνθεση αιμοσφαιρίνης από το ήδη υπάρχον mRNA μέχρι και στο δικτυοερυθροκύτταρο που διαθέτει ριβοσωμάτια και μιτοχόνδρια <sup>169</sup> (σχήμα 11).



Σχήμα 11 : Διαφοροποίηση κυττάρων ερυθράς σειράς.

## A.7. Αιμοσφαιρινοπάθειες

Οι κληρονομικές διαταραχές που αφορούν το μόριο της αιμοσφαιρίνης (αιμοσφαιρινοπάθειες) υπάγονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με την παθογένειά τους: i) διαταραχές με ανώμαλη δομή του μορίου (ποιοτικές) και ii) διαταραχές με μειωμένη ή ολική έλλειψη σύνθεσης μιας ή περισσότερων σφαιρινικών αλυσίδων (ποσοτικές). Η ποσοτική διαταραχή καλείται Μεσογειακή αναιμία, ενώ όταν υπάρχει και ποσοτική και ποιοτική διαταραχή καλείται θαλασσαιμική αιμοσφαιρινοπάθεια.

Περισσότερες από τριακόσιες πενήντα μεταλλάξεις είναι γνωστές που οδηγούν σε ανώμαλες αιμοσφαιρίνες.

Η φύση της μοριακής βλάβης στις διάφορες αιμοσφαιρίνες με ανώμαλη δομή μπορεί να είναι : α) αντικατάσταση ενός αμινοξέος από άλλο σε μια αλυσίδα σφαιρίνης, β) έλλειψη (deletion) ή προσθήκη ενός ή περισσότερων αμινοξέων κατά μήκος μιας αλυσίδας σφαιρίνης, γ) άνισος χιασμός των ομόλογων χρωμοσωμάτων

κατά την μείωση, δ) επιμήκυνση ή βράχυνση αλυσίδας σφαιρίνης. Συνήθως οι μοριακές αλλαγές στο εξωτερικό του μορίου είναι αβλαβείς (με εξαίρεση την HbS), αλλαγές στον θύλακα της αίμης οδηγούν σε μεθαιμοσφαιριναιμία, αλλαγές στην τριτοταγή δομή οδηγούν σε μετουσίωση και αιμολυτική αναιμία ενώ αλλαγές στην τεταρτοταγή δομή προκαλούν αλλαγές στη σύνδεση του οξυγόνου (κυάνωση).

Οι κατηγορίες των συνηθέστερων δομικά μεταλλαγμένων αιμοσφαιρινών φαίνονται στον επόμενο πίνακα.

## ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Κατηγορίες δομικά μεταλλαγμένων Αιμοσφαιρινών

Όνομα	Μοριακή βάση μετάλλαξης	Αλλαγή στις β,α Αλυσίδες	Παθοφυσιολογία	Αποτέλεσμα
HbS	Σημειακή μετάλλαξη	B <sub>6</sub> Glu→Val	Πολυμερισμός δεόξυ-HbS αιμόλυση	Αιμολυτική αναιμία
HbC	Σημειακή μετάλλαξη	B <sub>6</sub> Glu→Lys	Κρυστάλλωση οξύ-HbC αιμόλυση	Αιμολυτική αναιμία
Hb Hammersmith	Σημειακή μετάλλαξη	B <sub>42</sub> Phe→Ser	Καθίζηση-αιμόλυση	Αστάθεια
Hb Hyde Park	Σημειακή μετάλλαξη	B <sub>92</sub> His→Tyr	Hb M- κυάνωση	Αλλαγή στη μεταφορά οξυγόνου
Hb Kempsey	Σημειακή μετάλλαξη	B <sub>99</sub> Asp→Asn	Υψηλή συγκέντρωση O <sub>2</sub> πολυκυτταραιμία	Αλλαγή στη μεταφορά οξυγόνου
Hb Kansas	Σημειακή μετάλλαξη	β <sub>102</sub> Asn→Thr	Χαμηλή συγκέντρωση O <sub>2</sub> κυάνωση	Αλλαγή στη μεταφορά οξυγόνου
Hb GunHill	Έλλειψη πέντε αμινοξέων	β <sub>92-96</sub>	--	Αστάθεια
Hb Lepore	Ομόλογος, άνισος επιχιασμός σε δ και β αλυσίδες	δβ πρωτεΐνη σύντηξης	--	Θαλασσαιμικό φαινότυπο
Hb Constant Spring	Επιμήκυνση α αλυσίδας	Επιπλέον 31 αμινοξέα	--	--

### **A.7.a. Η σημασία της ανακάλυψης των μεταλλάξεων των αιμοσφαιρινοπαθειών**

Οι αναλύσεις των μεταλλάξεων των αιμοσφαιρινοπαθειών έχουν πολύ μεγάλη σημασία για την Ιατρική, τη Βιοχημεία, τη Μοριακή Βιολογία και Γενετική. Η σημασία τους είναι τετραπλή.

1. Είναι πηγές πολύτιμων πληροφοριών αναφορικά με τις σχέσεις μεταξύ δομής και λειτουργίας της φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης. Οι μεταλλάξεις φωτίζουν τα χαρακτηριστικά μίας πρωτεΐνης που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία της.
2. Η ανακάλυψη των μεταλλαγμένων αιμοσφαιρινών αποκάλυψε ότι μπορεί να προκύψει νόσος από την αλλαγή ενός μόνο αμινοξέος σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Έτσι η μοριακή ασθένεια είναι αναπόσπαστο μέρος της Ιατρικής. Τον όρο «μοριακή ασθένεια» χρησιμοποίησε πρώτος ο L. Pauling, αναφερόμενος στην δρεπανοκυτταρική νόσο που εμφανίζουν άτομα ομόζυγα για την αιμοσφαιρίνη S, αιμοσφαιρίνη όπου το 6<sup>ο</sup> αμινοξύ της β αλυσίδας είναι μεταλλαγμένο από Glu σε Val.
3. Η ανακάλυψη των μεταλλάξεων της αιμοσφαιρίνης επέτρεψε την καλύτερη κατανόηση των εξελικτικών διαδικασιών γιατί οι μεταλλάξεις είναι τρόπος εξέλιξης.
4. Η ανακάλυψη των μεταλλάξεων οδήγησε σε τρόπους αντιμετώπισης των ασθενειών που είναι αποτέλεσμα αυτών.

### **A.8. Μεσογειακά σύνδρομα**

Τα σύνδρομα της Μεσογειακής αναιμίας αποτελούν τα πιο συχνά μονογονιδιακά νοσήματα στον άνθρωπο. Πρόκειται για μια ετερογενή ομάδα

γενετικών ανωμαλιών που χαρακτηρίζονται από ελαττωματική ή ποσοτικά λιγότερη σύνθεση μιας ή περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης. Η ταξινόμησή τους γίνεται ανάλογα με την ποσότητα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που παρατηρείται έλλειψη. Διακρίνονται οι εξής βασικοί τύποι: α, β, γ, δβ, γδβ και δ Μεσογειακή αναιμία. Μία δεύτερη επίσης ταξινόμηση γίνεται ανάλογα με το βαθμό ανεπάρκειας της σύνθεσης πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Έτσι χαρακτηρίζονται σαν τύπου μηδέν (°), όπου υπάρχει πλήρης παύση της σύνθεσης των αλυσίδων και τύπου συν (+), εκεί όπου διατηρείται ένα μέρος της σύνθεσης.

Στην περίπτωση της β-Μεσογειακής Αναιμίας παρατηρείται έλλειψη της β αλυσίδας επομένως μειωμένη ή καθόλου παραγωγή της HbA αιμοσφαιρίνης και ήπια αύξηση των HbA<sub>2</sub> & HbF αιμοσφαιρινών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση σύνθεσης των μορίων της αιμοσφαιρίνης με κλινικό αποτέλεσμα την έντονη υποχρωμία (MCH) και μικροκυττάρωση (MCV). Ο περιορισμός στην σύνθεση της β αλυσίδας δημιουργεί περίσσεια α αλυσίδας, η οποία μερικώς διατίθεται για παραγωγή HbF, αφού ενωθεί με την αλυσίδα γ, και οι άλλες ποσότητες είτε υφίστανται πρωτεολυτική διάσπαση ή σχηματίζουν τετραμερή (α<sub>4</sub>), τα οποία δημιουργούν συσσωματώματα και καθιζάνουν με μορφή εγκλείστων. Τα ερυθροκύτταρα χάνουν νερό (μείωση μεγέθους), κατιόντα και πηγές ενέργειας. Αυτό, σε συνδυασμό με την καθίζηση των εγκλείστων, οδηγεί σε λύση των κυττάρων με άμεσο αποτέλεσμα την αιμόλυση και την αναιμία.

## **A.9. Μοριακή βάση της β-Μεσογειακής αναιμίας**

Όπως αναπτύχθηκε παραπάνω, όταν δεν παράγεται ή παρουσιάζεται μείωση της παραγωγής της β-αλυσίδας τότε μιλάμε για β-Μεσογειακή αναιμία.

Μέχρι σήμερα είναι γνωστές περισσότερες από 200 μεταλλάξεις β-Μεσογειακής αναιμίας<sup>36,60</sup>. Απ' αυτές οι 56 συναντώνται σε πληθυσμούς Μεσογειακής καταγωγής.<sup>13,14,15,36,39</sup> Πρόκειται για μοριακές βλάβες που οφείλονται σε μια απλή αλλαγή μίας μόνο βάσης (σημειακές μεταλλάξεις) που δημιουργήθηκαν από πρόσθεση, αφαίρεση, ή αντικατάσταση, μιας βάσης από κάποια άλλη, ή ακόμη και από μικρά ελλείμματα βάσεων (μικρότερα από 17 βάσεις). Όλες οι μοριακές βλάβες επηρεάζουν πολλές φάσεις στην όλη λειτουργία του β-γονιδίου, π.χ. την μεταγραφή, την αποκοπή και επανασυγκόλληση (μάτισμα) και την μετάφραση του mRNA.

#### ***A.9.a. Μεταλλάξεις του προαγωγέα του β-γονιδίου***

Στην περιοχή του προαγωγέα του β-γονιδίου έχουν ανιχνευθεί πολλές μεταλλάξεις, οι οποίες επικεντρώνονται στην περιοχή TATA<sup>8</sup> και στις CACACCC αλληλουχίες στις θέσεις -30 και -105. Δημιουργούν ήπιους κλινικούς φαινοτύπους λόγω του ότι προκαλούν ελάττωση της παραγωγής mRNA σε ποσοστό 10-25%. Η μετάλλαξη στη θέση -101 (C → T) προκαλεί μία πολύ ήπια μορφή β-Μεσογειακής αναιμίας και βρίσκεται σε διπλούς ετεροζυγώτες όταν συνδυάζεται με μετάλλαξη β-Μεσογειακής αναιμίας βαριάς μορφής.<sup>42,43</sup>

#### ***A.9.β. Μεταλλάξεις στην περιοχή έναρξης της μεταγραφής***

Μέχρι σήμερα έχει περιγραφεί μία μετάλλαξη στη θέση αυτή, η οποία δημιουργεί φαινότυπο β<sup>+</sup> Μεσογειακής αναιμίας. Το νουκλεοτίδιο στη θέση +1 είναι το σημείο έναρξης της μεταγραφής, θέση σημαντική για τη δημιουργία του πρόδρομου RNA. Η μετάλλαξη A → C στη θέση αυτή δημιουργεί ελαττωματικό κάλυμμα.<sup>167</sup>



### ***A.9.γ. Μεταλλάξεις στο 3' άκρο του mRNA***

Στην περιοχή αυτή έχουν βρεθεί τέσσερις διαφορετικές μεταλλάξεις μιας βάσης καθώς επίσης και δύο ελλείμματα, πέντε και δύο βάσεων. Όλες οι παραπάνω δίνουν φαινοτύπους του τύπου β<sup>+</sup> Μεσογειακής αναιμίας (3' UTR +6, 1480 C→G).<sup>66</sup>

### ***A.9.δ. Μεταλλάξεις στις περιοχές ματίσματος του mRNA***

Όλα τα ιντρόνια αρχίζουν με GT και τελειώνουν σε AG. Αλλαγές στα νουκλεοτίδια αυτά παράγουν αλληλόμορφα γονίδια β<sup>0</sup> Μεσογειακής αναιμίας. Τόσο στο πρώτο όσο και στο δεύτερο ιντρόνιο, IVS-I & IVS-II αντίστοιχα, έχουν βρεθεί μεταλλάξεις μιας μόνο βάσης, που έχει σαν αποτέλεσμα να γίνεται λανθασμένα το μάτισμα του mRNA. Σ' αυτά τα γονίδια η αλληλουχία GT έχει μεταλλαχθεί σε AT ή TT<sup>159</sup>.

Το πόσο σημαντικό είναι το δινουκλεοτίδιο AG φαίνεται από μία σημειακή μετάλλαξη A→G στο ιντρόνιο II (IVS-II) σ' ένα γονίδιο β-Μεσογειακής αναιμίας. Εξ' αιτίας αυτής της μετάλλαξης το μάτισμα γίνεται λανθασμένα, επειδή χρησιμοποιείται άλλο δινουκλεοτίδιο AG που βρίσκεται μέσα στο ιντρόνιο II, με αποτέλεσμα να παραμένει στο mRNA ένα μεγάλο τμήμα της αλληλουχίας του ιντρονίου. Γύρω από τους κόμβους αποκοπής ιντρονίων-εξονίων έχουν βρεθεί 15 μεταλλάξεις, οι οποίες δημιουργούν β<sup>0</sup> ή β<sup>+</sup> Μεσογειακή αναιμία. Απ' αυτές οι μεταλλάξεις IVS-I-1 (G→A), IVS-II-1 (G→A), IVS-I-5 (G→T/A) & IVS-I-6 (T→C) παρουσιάζουν ενδιαφέρον, καθώς συναντώνται σε μεσογειακούς πληθυσμούς.<sup>88</sup> Στην περίπτωση της IVS-I-1, η φυσιολογική αλληλουχία GT στη αρχή του πρώτου ιντρονίου καταστρέφεται, η οποία είναι απολύτως απαραίτητη για τη φυσιολογική διαδικασία ματίσματος και δεν παρατηρείται παραγωγή της β αλυσίδας (β<sup>0</sup>). Ενώ στην περίπτωση της IVS-I-6 προκαλείται μείωση της ικανότητας ματίσματος του

RNA αλλά παρ' όλα αυτά παράγεται φυσιολογική β-σφαιρίνη σε μειωμένη όμως ποσότητα ( $\beta^+$ ).

#### ***A.9.ε. Μεταλλάξεις στο εσωτερικό τμήμα των ιντρονίων***

Το πρώτο γονίδιο με μοριακή βλάβη αυτού του τύπου που μελετήθηκε έχει την μετάλλαξη  $G \rightarrow A$  στη θέση 110 του ιντρονίου I (IVS-I-110).<sup>149</sup> Η μετάλλαξη αυτή δημιουργεί την αλληλουχία AG, όμοια με την αλληλουχία τερματισμού του ιντρονίου, με αποτέλεσμα το 90% του mRNA που παράγεται να περιέχει επιπλέον 19 νουκλεοτίδια από την αλληλουχία του πρώτου ιντρονίου, γεγονός που δημιουργεί γονίδιο μη λειτουργικό. Συγχρόνως όμως παράγεται μικρή ποσότητα φυσιολογικού mRNA (10%). Η μετάλλαξη αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την ύπαρξη  $\beta^+$ -Μεσογειακής αναιμίας. Γενικά οι μεταλλάξεις αυτού του τύπου δημιουργούν λανθασμένες θέσεις αποκοπής και επανασυγκόλλησης του mRNA μέσα στα ιντρόνια, με αποτέλεσμα αυτές να συναγωνίζονται τις φυσιολογικές θέσεις και να παράγεται λανθασμένο mRNA.

#### ***A.9.ζ. Μεταλλάξεις μέσα στα εξόνια***

Μεταλλάξεις μέσα στα εξόνια δημιουργούν τροποποιημένες τριπλέτες, οι οποίες δημιουργούν λανθασμένες τοποθετήσεις αμινοξέων στην πρωτεϊνική αλυσίδα, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η λειτουργικότητα ή η σταθερότητα της αλυσίδας. Μία τέτοια μετάλλαξη στο κωδικόνιο 26 οδηγεί σε μία αλλαγή στο αμινοξύ 26 ( $Glu \rightarrow Lys$ ). Επίσης το ίδιο συμβαίνει για τη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 27 (Knossos), το οποίο δημιουργεί λανθασμένο αμινοξύ ( $Ala \rightarrow Ser$ ) στη θέση 27 της πρωτεϊνικής αλυσίδας.<sup>120</sup> Ένα άλλο συχνό παράδειγμα μετάλλαξης χωρίς νόημα (Non sense=NS) αποτελεί η κύρια μετάλλαξη που παρατηρείται στην Σαρδηνία και ονομάζεται cd39.

Στο κωδικόνιο 39 (CAG) που κωδικοποιεί γλουταμινικό οξύ, αντικαθίσταται η κυτοσίνη από την θυμίνη. Η τριάδα TAG που προκύπτει ερμηνεύεται σαν σήμα stop, οπότε σταματά η πρωτεϊνοσύνθεση και το ατελές παράγωγο πρωτεολύεται ταχύτατα, με αποτέλεσμα να μην παράγεται β-αλυσίδα.

### ***A.9.η. Μεταλλάξεις που εμποδίζουν τη μετάφραση***

Οι μεταλλάξεις αυτού του τύπου επηρεάζουν τη μετάφραση του mRNA και οδηγούν σε πλήρη καταστολή της β-αλυσίδας ( $\beta^0$ ). Είναι δυνατό να οφείλονται σε μεταλλάξεις που μετατρέπουν φυσιολογικά κωδικόνια σε κωδικόνια λήξης, οπότε και τελειώνει πολύ νωρίς η μετάφραση, είτε να οφείλονται σε παρεμβολή ή απώλεια 1,2,4 ή και 7 νουκλεοτιδίων σε αλληλουχία εξονίου, είτε ακόμα και σε μεταβολή του κωδικονίου έναρξης (AGT) για τη μετάφραση.

### ***A.9.θ. Μεταλλάξεις εξ αιτίας ελλείμματος***

Ένας μικρός αριθμός ελλειμμάτων του β-γονιδίου έχει περιγραφεί, που έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ελαττωματικού β-γονιδίου.<sup>42,43</sup> Μία τέτοια μετάλλαξη αποτελεί ένα έλλειμμα 44 βάσεων, που αρχίζει από το κωδικόνιο 24 και φτάνει μέχρι το νουκλεοτίδιο 26 του πρώτου ιντρονίου.

### ***A.9.ι. Πολυμορφισμοί στο β-γονίδιο***

Όλα τα φυσιολογικά άτομα δεν έχουν την ίδια επακριβώς αλληλουχία νουκλεοτιδίων του DNA. Υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία που μπορεί να οφείλεται είτε σε αντικατάσταση νουκλεοτιδίων είτε ένθεση ή έλλειμμα. Κατά κανόνα η ποικιλομορφία αυτή βρίσκεται στις παράπλευρες αλληλουχίες μεταξύ των γονιδίων και μέσα στα ιντρόνια ενώ ένα μικρό μέρος αυτής της ποικιλομορφίας οδηγεί σε μεταλλάξεις

που θα προκαλέσουν νόσο. Τέτοιες σιωπηρές ή ουδέτερες ποικιλομορφίες στο μόριο του DNA χαρακτηρίζονται σαν πολυμορφισμοί.<sup>7,10,121</sup>

### **A.10. Η β-Μεσογειακή αναιμία στον ελληνικό πληθυσμό**

Στον Ελληνικό πληθυσμό το 7,5% περίπου είναι φορείς β-Μεσογειακής αναιμίας. Το ποσοστό αυτό ποικίλει και είναι δυνατό να φτάσει και το 20% σε μερικές περιοχές (Μυτιλήνη, Καρδίτσα, Λήμνος).

Σύμφωνα με τη μελέτη των Kattamis et al, 1990, παρατηρούνται 15 διαφορετικές μοριακές μεταλλάξεις, από τις οποίες οι 8 αποτελούν το 94% όλων των μεταλλάξεων που ανιχνεύονται στον Ελληνικό πληθυσμό.<sup>71,73</sup> Η IVS-I-110 (C→A) & Cd 39 (C→T) είναι οι πιο συχνές. (Πίνακας 3).

Μεταγενέστερες μελέτες (Loukoroulos et al, 1996) έδειξαν διαφορετικά ποσοστά και μάλιστα με σημαντική απόκλιση τιμών.<sup>95</sup> Η μετάλλαξη Cd-39, π.χ. βρέθηκε σε ποσοστό 20,9% και η IVS-II-745 σε περίπου 3%. Σημειώνεται ότι οι τέσσερις συνηθέστερες μεταλλάξεις (που δείχνονται με έντονη γραφή στον πίνακα 2) αποτελούν το 79,9% και το 86,8% του συνόλου των μεταλλάξεων που ανιχνεύτηκαν στις δύο μελέτες, αντίστοιχα. Δύο από αυτές τις τέσσερις συχνότερες μεταλλάξεις οδηγούν σε β<sup>0</sup> (IVS-I-1 & cd39) και οι άλλες δύο (IVS-I-6 & IVS-I-110) σε β<sup>+</sup> σύμφωνα με αυτά που αναφέρονται στις παραγράφους A.9.δ, A.9.ε & A.9.ζ.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3**  
**Είδος και συχνότητα μεταλλάξεων β-Μεσογειακής**  
**αναιμίας στον Ελληνικό πληθυσμό**

Είδος μετάλλαξης	Kattamis et al 1990		Loukopoulos et al 1996	
	Αριθμός χρωμοσωμάτων	%	Αριθμός χρωμοσωμάτων	%
<b>IVS-I-110</b>	148	<b>42,55</b>	277	<b>43,2</b>
<b>Cd-39</b>	59	<b>16,95</b>	134	<b>20,9</b>
<b>IVS-I-1</b>	46	<b>13,22</b>	89	<b>13,9</b>
<b>IVS-I-6</b>	25	<b>7,18</b>	56	<b>8,8</b>
IVS-II-745	24	6,9	19	3,0
Cd-6	10	2,87	18	2,8
IVS-II-1	7	2,01	13	2,1
-87	6	1,72	13	2,1
IVS-I-5	3	0,86	-	-
44bp del	2	0,57	7	1,1
Cd-8	2	0,57	-	-
IVS-II-848	2	0,57	-	-
-30	1	0,29	-	-
Cd-8/9	1	0,29	-	-
AATAAA→AATGAA	1	0,29	-	-
Άγνωστες <sup>79</sup>	4	1,15	10	1,6
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	338		642	

### A.11. Παθοφυσιολογία της β-Μεσογειακής Αναιμίας

Η β-Μεσογειακή αναιμία χαρακτηρίζεται, όπως ήδη αναφέρθηκε από μερική ή ολική έλλειψη σύνθεσης β αλυσίδας της σφαιρίνης, ενώ η σύνθεση της α αλυσίδας παραμένει σε φυσιολογικά επίπεδα. Η HbF εξακολουθεί να παράγεται σε ποικίλα ποσά και η HbA<sub>2</sub> αυξάνει σχετικά αλλά και σε απόλυτο βαθμό.

Η μειωμένη σύνθεση β αλυσίδας αλλά και οι δευτερογενείς διαταραχές στα διάφορα στάδια βιοσύνθεσης της αίμης, συνεπάγονται ανάλογη μείωση στη σύνθεση μορίων αιμοσφαιρίνης A, με αποτέλεσμα την έντονη υποχρωμία (MCH) και μικροκυττάρωση (MCV). Ο περιορισμός στη σύνθεση β αλυσίδας δημιουργεί σχετικά περίσσειμα α αλυσίδας η οποία, αν και μερικώς διατίθεται για παραγωγή HbF, αφού ενωθεί με τη γ αλυσίδα, υπόκειται σε πρωτεολυτική διάσπαση ή καθιζάνει υπό μορφή εγκλείστων σωματίων. Στην ετερόζυγη β-Μεσογειακή αναιμία η απομάκρυνση της ελεύθερης α αλυσίδας με την πρωτεόλυση είναι επαρκής και γι'αυτό σπάνια

ανευρίσκονται έγκλειστα στους ερυθροβλάστες. Αντίθετα στην ομόζυγη β Μεσογειακή αναιμία η μαζική προσφορά α αλυσίδας οδηγεί στον κορεσμό των υπεύθυνων πρωτεολυτικών συστημάτων με αποτέλεσμα μεγάλο περίσσειμα ελεύθερης α αλυσίδας, καθίζηση και σχηματισμό εγκλείστων.<sup>35</sup> Κατά τη διαδικασία παραγωγής των εγκλείστων επηρεάζεται η κυτταρική μεμβράνη και εμφανίζονται λειτουργικές και δομικές διαταραχές.<sup>171</sup> Τα ερυθροκύτταρα χάνουν νερό, κατιόντα και άλλες πηγές ενέργειας. Επιπρόσθετα, τα έγκλειστα σε συνδυασμό με τον σε αφθονία αθροιζόμενο σίδηρο στα μιτοχόνδρια, βλάπτουν άμεσα τον μεταβολισμό των ωριμαζόντων ερυθροβλαστών και τους κάνουν ανεπαρκείς όσον αφορά την παραγωγή πηγών ενέργειας (ATP) ή τη χρήση πηγών ενέργειας (γλυκογόνο). Τα φαινόμενα αυτά είναι περισσότερο εμφανή στο στάδιο της πολυχρωματόφιλου ερυθροβλάστης, η οποία αδυνατεί να εξελιχθεί παραπέρα και παραμένει σταθερά στην G<sub>1</sub> φάση.

Οι παραπάνω βλάβες συνεπάγονται ενδομυελική καταστροφή μεγάλου αριθμού ερυθροβλαστών, τα ερυθρά αιμοσφαίρια που προέρχονται από τους μειονεκτικούς αυτούς ερυθροβλάστες, έχουν μικρή επιβίωση και καταστρέφονται στην περιφέρεια ή αποσύρονται από το ΔΕΣ του σπλήνα, ο οποίος υπερπλάσσεται και διογκώνεται σημαντικά. Ο σπλήνας παγιδεύει κατά προτίμηση τα περισσότερο μειονεκτικά ερυθροκύτταρα. Όσα ερυθροκύτταρα διαφύγουν κατά τη διόδό τους από το σπλήνα επιστρέφουν στην περιφέρεια με επαυξημένες τις λειτουργικές και δομικές ανωμαλίες της μεμβράνης τους, ως αποτέλεσμα μηχανικής βλάβης κατά τη διαδικασία αφαίρεσης των εγκλείστων στα κύτταρα του ΔΕΣ. Στην περίπτωση σπληνεκτομής αυξάνουν σημαντικά τα κυκλοφορούντα εμπύρνηνα ερυθροκύτταρα αλλά και τα ερυθροκύτταρα που φέρουν κοκκία σιδήρου και έγκλειστα. Η σημαντική διόγκωση του σπλήνα προκαλεί λίμναση (pool) μεγάλης ποσότητας αίματος και

επιγενή αύξηση του όγκου του πλάσματος (σπληνική υδραιμία), παράγοντες που επιδεινώνουν την αναιμία. Στην περίπτωση αυτή η συνολική μάζα των ερυθρών είναι δυσανάλογα μεγάλη σε σχέση με τον χαμηλό αιματοκρίτη.<sup>162</sup>

Με τους παρακάτω παθογενετικούς μηχανισμούς προκαλείται αναιμία η οποία συνεπάγεται και παραγωγή ερυθροποιητίνης. Η τελευταία διεγείρει τον μυελό προς αιμοποίηση και η μάζα των ερυθροποιητικών κυττάρων αυξάνει κατά 20-30 φορές. Η υπερπλασία αυτή του μυελού των οστών ευθύνεται για τις οστικές παραμορφώσεις. Μερικές φορές συμβαίνει εξωμυελική επέκταση των ερυθροποιητικών κυττάρων τα οποία σχηματίζουν χαρακτηριστικές μάζες κυρίως στο θώρακα και παρασπονδυλικά, με κίνδυνο πίεσης του νωτιαίου μυελού και εγκατάσταση πυραμιδικής συνδρομής ή ακόμη παραπληγίας.

Η μεγάλη αποδόμηση πυρήνων και εγκλείστων εκφράζονται με υπέρμετρη παραγωγή ουρικού οξέος, εμφάνιση πρώιμα σημεινόμενων χολοχρωστικών, αύξηση του ενδογενούς CO και παρουσία στα ούρα β-αμινοϊσοβουτυρικού οξέος και ανώμαλων διπυρρολικών προϊόντων.

Μελέτες κινητικής του σιδήρου με ραδιενεργό σίδηρο έδειξαν ότι ο σίδηρος αποσύρεται γρήγορα από το πλάσμα, αλλά η ενσωμάτωσή του στα κυκλοφορούντα ερυθρά καθυστερεί σημαντικά, γεγονός που επιβεβαιώνει τη μαζική ενδομυελική καταστροφή των ωριμαζόντων ερυθροβλαστών. Η αυξημένη απορρόφηση σιδήρου από το γαστρεντερικό σύστημα, εξαιτίας της αναιμίας, σε συνδυασμό με το προσφερόμενο σίδηρο με τις μεταγίσεις ευθύνονται για την αιμοσιδήρωση των ασθενών με ομόζυγη β-Μεσογειακή αναιμία. Ο αθροιζόμενος σίδηρος μαζί με την ιστική υποξία προκαλεί βλάβη (μέσω ελευθέρωσης δραστικών ριζών), της καρδιάς, ήπατος και ενδοκρινών αδένων.

## **A.12. Κλινική εικόνα της β-Μεσογειακής αναιμίας**

Η κλινική εικόνα της β-Μεσογειακής αναιμίας εμπίπτει σε τρεις κλινικές διαβαθμίσεις : α) ελάσσων β-Μεσογειακή αναιμία β) ενδιάμεση β-Μεσογειακή αναιμία γ) μείζων Μεσογειακή αναιμία ή αναιμία Cooley.

### ***A.12.a. Ελάσσων β-Μεσογειακή αναιμία***

Η ελάσσων β-Μεσογειακή αναιμία είναι σε μεγάλο βαθμό ασυμπτωματική. Μικρός αριθμός ατόμων έχει ήπια αναιμία με ή χωρίς συμπτώματα αδυναμίας και ελαφρό ίκτερο με μικρή σπληνική διόγκωση. Σήμερα γίνεται δεκτό ότι στις αμιγείς περιπτώσεις ετεροζυγώτη β-Μεσογειακής αναιμίας, η διόγκωση του ήπατος και σπλήνα, απαντά σε μικρότερη συχνότητα και σε κάθε αξιόλογη σπληνομεγαλία θα πρέπει να αναζητείται άλλη αιτία. Η κλινική εικόνα της ελάσσονος β-Μεσογειακής αναιμίας κυμαίνεται από την σιωπηρή μορφή, χωρίς καμία κλινική και αιματολογική εκδήλωση, μέχρι την βαρύτερη μορφή με κλινική εικόνα στα όρια της ενδιάμεσης Μεσογειακής αναιμίας.

### ***A.12.β. Ενδιάμεση β-Μεσογειακή αναιμία***

Η κλινική βαρύτητα της ενδιάμεσης Μεσογειακής αναιμίας βρίσκεται μεταξύ της ετερόζυγης μορφής και της ομόζυγης ή μείζονος β-Μεσογειακής αναιμίας. Οι ασθενείς έχουν σπληνομεγαλία, μετρίου βαθμού αναιμία (9-10 g Hb ή λιγότερο) και παρά την έλλειψη μεταγγίσεων δεν εμφανίζουν σημαντικές σκελετικές ανωμαλίες ή αξιόλογες ενδοκρινικές διαταραχές. Η ενδιάμεση Μεσογειακή αναιμία περιλαμβάνει ευρύ φάσμα γενετικών διαταραχών,<sup>46,78</sup> που κυμαίνεται από σπάνιες περιπτώσεις ετερόζυγης β-Μεσογειακής αναιμίας με βαριά έκφραση (βλέπε προηγούμενη παράγραφο) και διπλές ετερόζυγες μορφές [(β<sup>+</sup> ή β<sup>0</sup>/ Hereditary Persistence of Fetal



Hemoglobin,  $\beta^0$  ή  $\beta^+/\delta\beta^0$ <sup>169</sup>) και συνδυασμός  $\alpha$  και  $\beta$  Μεσογειακής αναιμίας] μέχρι και ομόζυγες μορφές (ήπια-silent  $\beta^+$ / βαρύ  $\beta$  θαλ. γονίδιο,  $\delta\beta^0/\delta\beta^0$ ). Η συνήθης ετερόζυγη  $\beta$ -Μεσογειακή αναιμία, όταν προστεθούν επίκτητοι παράγοντες όπως εγκυμοσύνη, έλλειψη σιδήρου ή φυλλικού οξέος, συμπεριφέρεται κλινικά ως ενδιάμεση μορφή. Η ενδιάμεση Μεσογειακή αναιμία συνοδεύεται συχνά από ποικίλης βαρύτητας επιπλοκές όπως είναι : έλλειψη φυλλικού οξέος, αιμοσιδήρωση, υπερσπληνισμός, λοιμώξεις (σταφυλόκοκκο, στρεπτόκοκκο), αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία και εξωμυελική ερυθροποίηση.

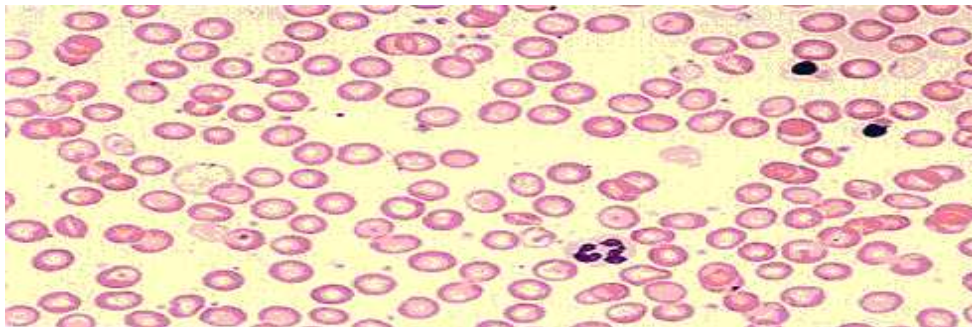
#### ***A.12.γ. Μείζων $\beta$ -Μεσογειακή αναιμία (αναιμία Cooley)***

Η αναιμία Cooley γονοτυπικά αντιπροσωπεύει ομοζυγωτικά άτομα.

Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου, στο 60% των περιπτώσεων εμφανίζονται μέσα στο πρώτο έτος όταν η σύνθεση της  $\gamma$ -αλυσίδας περιορίζεται σημαντικά για να δώσει τη θέση της στη  $\beta$ -αλυσίδα. Αρχικά προέχουν η λεμονοειδής χρώση του δέρματος, η υπικτερική χροιά των επιπεφυκότων και τα γενικά συμπτώματα όπως ανορεξία, πυρετική κίνηση και συχνές λοιμώξεις. Παρατηρείται καθυστέρηση της σωματικής ανάπτυξης, αλλά με φυσιολογική ανάπτυξη νοημοσύνης. Οι μυϊκές μάζες και η εναπόθεση λίπους υστερούν και οι κνήμες είναι συνήθως μακρές και λεπτές. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά γίνονται μογγολοειδή με προβολή των μετωπιαίων και ζυγωματικών, κύρτωση της ράχης της μύτης, προβολή της άνω γνάθου και οδοντικές ανωμαλίες. Ο σπλήνας και το ήπαρ εμφανίζουν προοδευτική διόγκωση.

Η υποτροπιάζουσα περικαρδίτιδα είναι συχνή, κυρίως μετά από σπληνεκτομή. Αν και η  $\beta$ -Μεσογειακή Αναιμία αποτελεί απάντηση, γενετικής βάσης, στην ελονοσία, εντούτοις, η ελονοσία διατρέχει βαρύτατα στους ασθενείς αυτούς. Η ηπατίτιδα Β και τελευταία το AIDS αποτελούν αυξημένο κίνδυνο που συνδέεται με

τις μεταγγίσεις. Αυτό έχει σήμερα περιορισθεί με τη γενίκευση του σχετικού ελέγχου στο μεταγγιζόμενο αίμα. Άλλες επιπλοκές είναι έλλειψη φυλλικού οξέος, χολολιθίαση, άτονα έλκη κνημών, αιμορραγική διάθεση, αυτόματα κατάγματα και εξωμυελική ερυθροποίηση. Οι ασθενείς που δεν υποβάλλονται σε μεταγγίσεις και αποσιδήρωση αποθνήσκουν κατά τη δεύτερη δεκαετία από αιμοσιδήρωση. Η τοξικότητα του σιδήρου αφορά κυρίως το μυοκάρδιο με συχνότερο αίτιο θανάτου την καρδιακή και την ενδοκρινική ανεπάρκεια. Οι κυριότερες ενδοκρινικές ανωμαλίες είναι : η καθυστέρηση της σωματικής ανάπτυξης, ο σακχαρώδης διαβήτης και ο υποπαραθυρεοειδισμός. Με την αιμοσιδήρωση συνδέονται επίσης η ευαισθησία σε λοιμώξεις με υερσίνια, και η μελάχρωση του δέρματος. Η μελάχρωση του δέρματος οφείλεται σε αυξημένη εναπόθεση μελανίνης <sup>162</sup>. Η μορφολογία των κυττάρων της αναιμίας Cooley φαίνεται στο Σχήμα 12.



Σχήμα 12: Μορφολογία των κυττάρων της αναιμίας Cooley

### **A.13. Θεραπευτική Προσέγγιση της β-ΜΑ**

Η θεραπευτική αντιμετώπιση της β-Μεσογειακής αναιμίας βασίζεται κυρίως στις μεταγγίσεις και στην απομάκρυνση του αθροιζόμενου σιδήρου με τη βοήθεια χηλικών ενώσεων. Με τη χρήση των τελευταίων το προσδόκιμο επιβίωσης έχει αυξηθεί στα σαράντα έτη, από τα περίπου είκοσι που ήταν πριν την καθιέρωση της χορήγησης χηλικών ενώσεων για αποσιδήρωση.

Οι μεταγγίσεις συντήρησης που εφαρμόζονταν παλαιότερα, έχουν πλέον οριστικά αντικατασταθεί από το σχήμα των υπέρ-μεταγγίσεων, που αποσκοπεί στη διατήρηση της αιμοσφαιρίνης πάνω από τα 10g %. Η ποσότητα του απαιτούμενου αίματος για το στόχο αυτό είναι περίπου 20ml ερυθρών αιμοσφαιρίων ανά κιλό σώματος κάθε 3-4 εβδομάδες. Η χορήγηση του νεαρού πληθυσμού των ερυθροκυττάρων, εφόσον υπάρχει η κατάλληλη υποδομή, προτιμάται από τη χορήγηση του ολικού πληθυσμού των ερυθρών, διότι λόγω μακράς επιβίωσης των νεοκυττάρων μειώνεται η συχνότητα των μεταγγίσεων. Όταν γίνει η διάγνωση της ομόζυγης β Μεσογειακής αναιμίας απαιτείται προσεκτική μελέτη, καθορισμός του ακριβούς γονότυπου της νόσου, κλινική και εργαστηριακή παρακολούθηση για μερικές εβδομάδες (αν φυσικά η βαρύτητα της αναιμίας επιτρέπει) πριν το παιδί τεθεί σε μόνιμο πρόγραμμα μεταγγίσεων. Διαφορετικά υπάρχει κίνδυνος να τεθούν σε μεταγγίσεις παιδιά που η κλινική συμπεριφορά της νόσου είναι ενδιάμεσης Μεσογειακής αναιμίας. Η πρόιμη κλινική έκφραση μέσα στο πρώτο έτος, υποδηλώνει βαριά και εξαρτώμενη από μεταγγίσεις μορφή της νόσου, χωρίς αυτό να αποτελεί κανόνα. Πρέπει να τονισθεί ότι και το αντίθετο μπορεί να συμβεί, δηλαδή παιδιά που έχουν απόλυτη ανάγκη μεταγγίσεων να αφήνονται χωρίς θεραπεία με σοβαρές επιπτώσεις στην ανάπτυξή τους, σκελετικές παραμορφώσεις και βλάβες οργάνων και κυρίως καρδιάς και ήπατος.

Ο βαθμός της αιμοσιδήρωσης μπορεί να εκτιμηθεί πρακτικά από το συνολικό αριθμό των μεταγγίσεων αν ληφθεί υπόψη ότι μια μονάδα αίματος (500 ml) προσφέρει 250mg σιδήρου. Επιπρόσθετα υπολογίζεται ότι απορροφώνται ημερησίως 4-5mg σιδήρου. Για τον ακριβή προσδιορισμό του υπάρχοντος σιδήρου στον οργανισμό βοηθούν, η φερριτίνη ορού (φυσιολογική τιμή 12-325 ng/ml) και ο προσδιορισμός του σιδήρου στο ηπατικό παρέγχυμα κατόπιν βιοψίας ήπατος (τιμές

0,16g% και πάνω είναι παθολογικές). Τα τελευταία χρόνια σημαντική βοήθεια προσφέρουν οι νεότερες απεικονιστικές μέθοδοι, η αξονική και η μαγνητική τομογραφία. Μια απλή δοκιμασία χρήσιμη για την εκτίμηση του βαθμού της αιμοσιδήρωσης είναι η μέτρηση του αποβαλλόμενου σιδήρου στα ούρα ύστερα από χορήγηση 500mg δεσφερριοξαμίνης IM και 200mg βιταμίνης C. Αποβολή πάνω από 2,5mg σιδήρου στις επόμενες 6 ώρες αποτελεί ένδειξη σημαντικής φόρτισης με σίδηρο.<sup>72</sup> Η σύγχρονη μέθοδος αποσιδήρωσης περιλαμβάνει τη συνεχή ολονύχτια υποδόρια χορήγηση δεσφερριοξαμίνης, σε δόση 25-40 mg/Kg βάρους σώματος για τα παιδιά και 2-4g για τους μεγάλους, με την κατάλληλη ηλεκτρονική αντλία που εφαρμόζεται στο θώρακα του ασθενούς.

Η δεσφερριοξαμίνη είναι σχετικά ατοξικό φάρμακο. Σε υψηλή δοσολογία πάνω από 100mg/Kg βάρους σώματος (στην κλινική πράξη δεν χρησιμοποιείται) υπάρχει κίνδυνος καταρράκτη. Τα τελευταία χρόνια αναφέρονται σε ανησυχητικά αυξανόμενη συχνότητα, σοβαρές παρενέργειες από την όραση και ακοή ως αποτέλεσμα οπτικής και ακουστικής νευρίτιδας αντίστοιχα. Οι παρενέργειες αυτές αποδίδονται στη ελεύθερη δεσφερριοξαμίνη όταν η δοσολογία είναι δυσανάλογα μεγάλη, σχετικά με την ποσότητα του σιδήρου στον οργανισμό. Για τους λόγους αυτούς απαιτείται στενή παρακολούθηση των παραπάνω οργάνων και αν παραστεί ανάγκη, διακόπτεται η χορήγηση δεσφερριοξαμίνης προσωρινά, για να αρχίσει αργότερα με χαμηλότερη δοσολογία.

Η μέθοδος της εμφύτευσης μυελού των οστών, λόγω της πολύ μικρής πιθανότητας εύρεσης κατάλληλου δότη εφαρμόζεται πολύ περιορισμένα.

#### **A.14. Σχέση γονότυπου-φαινότυπου**

Ο γονότυπος αποτελεί τη γενετική σύσταση ή περιεχόμενο ενός ατόμου. Ειδικότερα μπορεί να αναφέρεται στα αλληλόμορφα ενός συγκεκριμένου γενετικού

τόπου. Ο φαινότυπος είναι το παρατηρούμενο αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του γονότυπου με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ειδικότερα η παρατηρούμενη έκφραση ενός συγκεκριμένου γονιδίου ή γονιδίων. Ο συσχετισμός μεταξύ γονότυπου και φαινότυπου στην μοριακή διαγνωστική αποτελεί ένα σημαντικό όπλο της επιστήμης για την πρόβλεψη της βαρύτητας της ασθένειας ενός ατόμου. Για το λόγο αυτό καταβάλλονται μεγάλες προσπάθειες για τον άμεσο συσχετισμό τους.

### **A.15. Προγεννητική Διάγνωση των Αιμοσφαιρινοπαθειών**

Η προγεννητική διάγνωση της Μεσογειακής αναιμίας<sup>70,74,75,76</sup> και των δρεπανοκυτταρικών συνδρόμων έχει γίνει αποδεκτή σήμερα σαν την μόνη λύση για την συρρίκνωση του προβλήματος στο άμεσο μέλλον<sup>2,136,142</sup>. Από την άλλη πλευρά το υπάρχον σύστημα προγεννητικής διάγνωσης στην Ελλάδα έχει μειώσει σημαντικά τον αριθμό νεογέννητων με Μεσογειακή αναιμία και έχει επιτρέψει σε ζευγάρια φορείς β-Μεσογειακής αναιμίας, τα οποία θα ζούσαν μία δυστυχημένη ζωή χωρίς παιδιά, να αποκτήσουν ένα ή και περισσότερα υγιή παιδιά. Για την πρόληψη της νόσου απαιτείται η αποφυγή γάμων μεταξύ ετεροζυγωτών. Αν παρόλα αυτά γίνει αυτό, τότε η πιθανότητα να γεννηθεί παιδί ομοζυγώτης είναι 25%. Ο στόχος αυτός είναι δυνατό να επιτευχθεί με ευρεία ιατρική και κοινωνική ενημέρωση, εντόπιση των φορέων με μαζικές πληθυσμιακές μελέτες ή καλύτερα ίδρυση, κατά προτεραιότητα σε περιοχές μεγάλης επίπτωσης της νόσου, κέντρων αιματολογικού ελέγχου και γενετικής συμβουλής. Η μεθοδολογία αυτή σε συνδυασμό με την προγεννητική διάγνωση θα πρέπει να περιορίσουν σημαντικά ή ακόμη και να μηδενίσουν τη γέννηση ομοζυγωτών, όπως αυτό ήδη έχει συμβεί στην Κύπρο.

Η προγεννητική διάγνωση γίνεται με ανάλυση εμβρυϊκού DNA. Η πηγή του DNA είναι οι ινοβλάστες του αμνιακού υγρού ή οι χοριακές λάχνες. Οι ινοβλάστες

απομονώνονται από το αμνιακό υγρό το οποίο λαμβάνεται με αμνιοκέντηση κατά την 13<sup>η</sup>-15<sup>η</sup> εβδομάδα. Η βιοψία χοριακών λαχνών γίνεται κατά την 8<sup>η</sup>-10<sup>η</sup> εβδομάδα και επιτρέπει τη λήψη μεγαλύτερης ποσότητας κυτταρικού υλικού και συνεπώς και DNA. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι αρχικά η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και στη συνέχεια διάφοροι μέθοδοι προσδιορισμού μεταλλάξεων που αναφέρονται στην παράγραφο Γ.

## **B. ΚΥΣΤΙΚΗ ΙΝΩΣΗ (ΚΙ)**

### **B.1. Γενικά για την Κυστική Ίνωση και την Μετάλλαξη ΔF508**

Η Κυστική Ίνωση (ΚΙ) είναι μια γενετική μονογονιδιακή ασθένεια, η οποία προκαλείται από διάφορες μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί 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 1936 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 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>19</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 (Edwards, J.H. 1997 Arch. Dis. Child.). Μερικά από τα πλεονεκτήματα επιλογής που έχουν προταθεί είναι η ανθεκτικότητα των φορέων της ΚΙ στην οφειλόμενη σε βακτηριδιακή τοξίνη διάρροια, τη χολέρα<sup>55,137</sup>, τη φυματίωση<sup>55</sup> και τον τυφοειδή πυρετό.<sup>126</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. 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%. Στην Ευρώπη, οι βόρειες χώρες φέρουν υψηλότερη συχνότητα της μετάλλαξης σε σύγκριση με τις νότιες χώρες.<sup>69,140</sup> Η μεγαλύτερη συχνότητα παρατηρείται στη Δανία (88%), ενώ η χαμηλότερη στην Τουρκία (30%)<sup>115</sup>. Στην Ελλάδα η συχνότητα της ΔF508 μετάλλαξης βρέθηκε ότι είναι 54.1%.

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<sup>110</sup>. 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, ο οποίος θεωρείται ότι εγκαταστάθηκε στη Δυτική Ευρώπη στα τέλη της Παλαιολιθικής Εποχής.<sup>147</sup>



## B.2. Το Γονίδιο της CFTR και οι Συχνότερες Μεταλλάξεις του

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CFTR εντοπίστηκε σε τμήμα του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 7, χαρτογραφήθηκε στη χρωμοσωμική θέση 7q31.2 και κλωνοποιήθηκε το έτος 1989.<sup>32</sup> Η λεπτομερής ανάλυση του γονιδίου κατέδειξε ότι πρόκειται για γονίδιο το οποίο αποτελείται από 250.000 ζεύγη βάσεων (250 Kbp) και παράγει mRNA μεγέθους 6.5Kb το οποίο περιλαμβάνει 27 εξόνια.

Όλα τα είδη των μεταλλάξεων παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Είδος συχνότητα και πληθυσμός που απαντάται, των πιο συχνών μεταλλάξεων του CFTR.**

Μεταλλάξεις	Συχνότητα	(%)	Πληθυσμός με την υψηλότερη παρουσία
[[Delta]]F508	28.948	(68.0)	
G542X	1.062	(2.4)	Ισπανοί
G551D	717	(1.6)	Αγγλοι
N1303K	589	(1.3)	Ιταλοί
W1282X	536	(1.2)	Εβραίοι-Askhenazi
R553X	322	(0.7)	Γερμανοί
621+1G->T	315	(0.7)	Γαλλο-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		

Με τη λεπτομερή ανάλυση του DNA ασθενών με ΚΙ έχουν ανιχνευθεί μέχρι σήμερα πάνω από 800 μεταλλάξεις,<sup>29</sup> των οποίων η συχνότητα διαφέρει γεωγραφικά και πληθυσμιακά (Πίνακας 4, από μελέτη σε σύνολο 43,849 χρωμοσωμάτων ΚΙ, γενικών και ειδικών πληθυσμών).

### **B.3. Ρόλος της Πρωτεΐνης CFTR**

Ο CFTR είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία λειτουργεί κυρίως ως διάυλος ιόντων χλωρίου, 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>24,93</sup> Στις περισσότερες περιπτώσεις ο CFTR οδηγεί στην έκκριση ιόντων  $\text{Cl}^-$ , αλλά στους ιδρωτοποιούς αδένες οδηγεί στην απορρόφησή τους.

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. Επίσης έχει παρατηρηθεί στο επιθήλιο των ιδρωτοποιών και σιελογόνων αδένων.

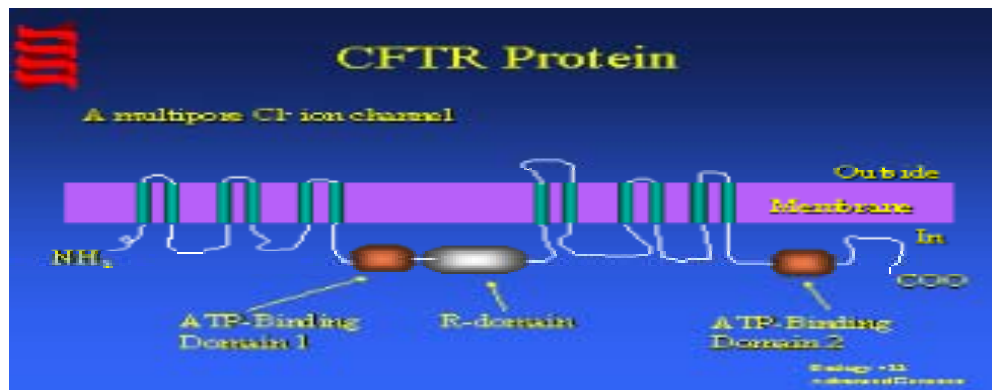
Ο ρόλος του CFTR στο αναπνευστικό σύστημα είναι σημαντικός καθώς παρεμποδίζει την ανάπτυξη αναπνευστικών λοιμώξεων με διάφορους τρόπους, είτε διατηρώντας εκείνη τη συγκέντρωση του άλατος που είναι απαραίτητη για την εξουδετέρωση των βακτηριδίων,<sup>147</sup> είτε συμμετέχοντας άμεσα ή έμμεσα στη μεταφορά ή έκκριση κάποιων αντιβακτηριδιακών παραγόντων.<sup>77</sup> 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 ( $\text{HCO}_3^-$ ) με τα οποία εμπλουτίζεται το παγκρεατικό υγρό. Στους ιδρωτοποιούς αδένες

ο CFTR παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή υπότονου ιδρώτα μέσω της απορρόφησης ιόντων  $\text{Cl}^-$ .

#### **B.4. Δομή της Πρωτεΐνης CFTR**

Ο προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής της CFTR πρωτεΐνης έδωσε τη δυνατότητα να γίνει πρόβλεψη της δυναμικής τριτοταγούς δομής της. Η CFTR πρωτεΐνη<sup>135</sup> είναι μία πολυπεπτιδική αλυσίδα μεγέθους 1480 αμινοξέων και μοριακού βάρους 168,138 Da, για την οποία προτείνεται ότι σχηματίζει πέντε περιοχές (σχήμα 13):

- 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. Τόσο η ρυθμιστική περιοχή R όσο και οι NBD1 και NBD2 περιοχές του CFTR βρίσκονται ενδοκυτταρικά.



Σχήμα 13: Τριτοταγής δομή της CFTR

### B.5. Ρύθμιση της Λειτουργίας της πρωτεΐνης CFTR

Η φυσιολογική λειτουργία του διαύλου  $\text{Cl}^-$  ρυθμίζεται από τη παρουσία cAMP και φωσφορυλίωση της ρυθμιστικής περιοχής R από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) καθώς και από την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ATP. 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>62</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>166</sup> Βρέθηκε ότι αν η R περιοχή φωσφορυλιώνεται, τότε προσδένεται ευκολότερα ATP στο μόριο και έτσι ο διάυλος ανοίγει επιτρέποντας τη διέλευση ιόντων  $\text{Cl}^-$  μέσω αυτού. Αντίθετα, όταν η R περιοχή δεν φωσφορυλιώνεται, λιγότερο ATP προσδένεται στις NBD περιοχές και 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 ικανότητα τους να προσδένουν ATP .

Η πρόσδεση ATP στις NBD περιοχές, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη διάνοιξη του διαύλου,<sup>63</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>6</sup>

## **B.6. Κλινικές Εκδηλώσεις της Κυστικής Ίνωσης**

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  $\text{Cl}^-$  και κατά συνέπεια και των ιόντων  $\text{Na}^+$  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.

## B.7. Διάγνωση της Κυστικής Ίνωσης

Η διάγνωση της ΚΙ αρχικά είναι κλινική και βασίζεται στην ύπαρξη μιας ή περισσοτέρων 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 (test επίδρωσης)
- β) Μέτρηση ρινικών δυναμικών. Η αύξηση των ρινικών δυναμικών αντιπροσωπεύει τη μειωμένη διαβατότητα  $Cl^-$  και την αυξημένη μεταφορά  $Na^+$  και είναι ενδεικτική της ΚΙ.
- γ) Γονιδιακός έλεγχος: Η ανεύρεση δύο μεταλλαγμένων αλληλίων<sup>29</sup> στο γενότυπο του ασθενούς είναι διαγνωστική της νόσου. Ο γονιδιακός 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.

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

- α) Εξέταση των επιπέδων ορισμένων ενζύμων όπως: της αλκαλική φωσφατάση (ALP) καθώς και τα ισοένζυμά της, της γ-γλουταμύλ-τρανσπεπτιδάση (γ-GT) και της αμινοπεπτιδάσης Μ. Μειωμένα επίπεδα αυτών των ενζύμων σε αμνιακό υγρό είναι ενδεικτικά της ΚΙ. Αυτό παρατηρείται λόγω της βλάβης που παρατηρείται στο ήπαρ, εξαιτίας της συγκέντρωσης βλέννας υψηλού ιξώδους.
- β) Ανάλυση του DNA του εμβρύου που λαμβάνεται από: i) υλικό βιοψίας τροφοβλάστης ( $10^{11}$ - $12^{11}$  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).

## **B.8. Πρόγνωση – Θεραπεία**

Από το 1936, μέχρι και το 1940, η επιβίωση των ασθενών σπάνια ξεπερνούσε τα 5 χρόνια ζωής. Στα μέσα της δεκαετίας του '80 η καλύτερη γνώση της παθογένειας της ασθένειας και η εύρεση πιο αποτελεσματικών μορφών αγωγής αύξησε το μέσο όρο ζωής σε 25-26 χρόνια. 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 που χορηγούνται είναι 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.

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.

Η αντιμετώπιση της παγκρεατικής ανεπάρκειας επιτυγχάνεται με τη χορήγηση παγκρεατικών εκχυλισμάτων (τρυψίνη, χυμοτρυψίνη, λιπάση) καθώς και βιταμινών A,D,E και K. 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.

Το μέλλον της γονιδιακής θεραπείας (το 1990 έγιναν οι πρώτες προσπάθειες in vitro μεταφοράς ενός φυσιολογικού γονιδίου σε κύτταρα του αναπνευστικού επιθηλίου από ασθενή με Κυστική Ίνωση) είναι αρκετά ελπιδοφόρο, ενώ φαίνεται ότι η ταυτόχρονη χρήση των λιποσωμάτων και των ανασυνδυασμένων ιών έχει πολύ καλύτερα αποτελέσματα.



## Γ. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

### Γ.1. Γενικά για τον Προσδιορισμό Μεταλλάξεων

Από όσα έχουν αναφερθεί έως τώρα είναι προφανές ότι η έγκαιρη και ακριβής διάγνωση των γενετικών νοσημάτων είναι καθοριστικής σημασίας τόσο για την πρόγνωση της πορείας της ασθένειας στους πάσχοντες, όσο για την μετάδοση της ασθένειας από τους φορείς. Απαραίτητη προϋπόθεση γι' αυτό είναι η ύπαρξη μεθόδων που επιτρέπουν την ανίχνευση μεταλλάξεων στα υπεύθυνα γονίδια.

Διάφοροι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει μια πληθώρα μεθόδων για την ανίχνευση μεταλλάξεων, αλλά οι κυριότερες <sup>12</sup> είναι οι ακόλουθες :

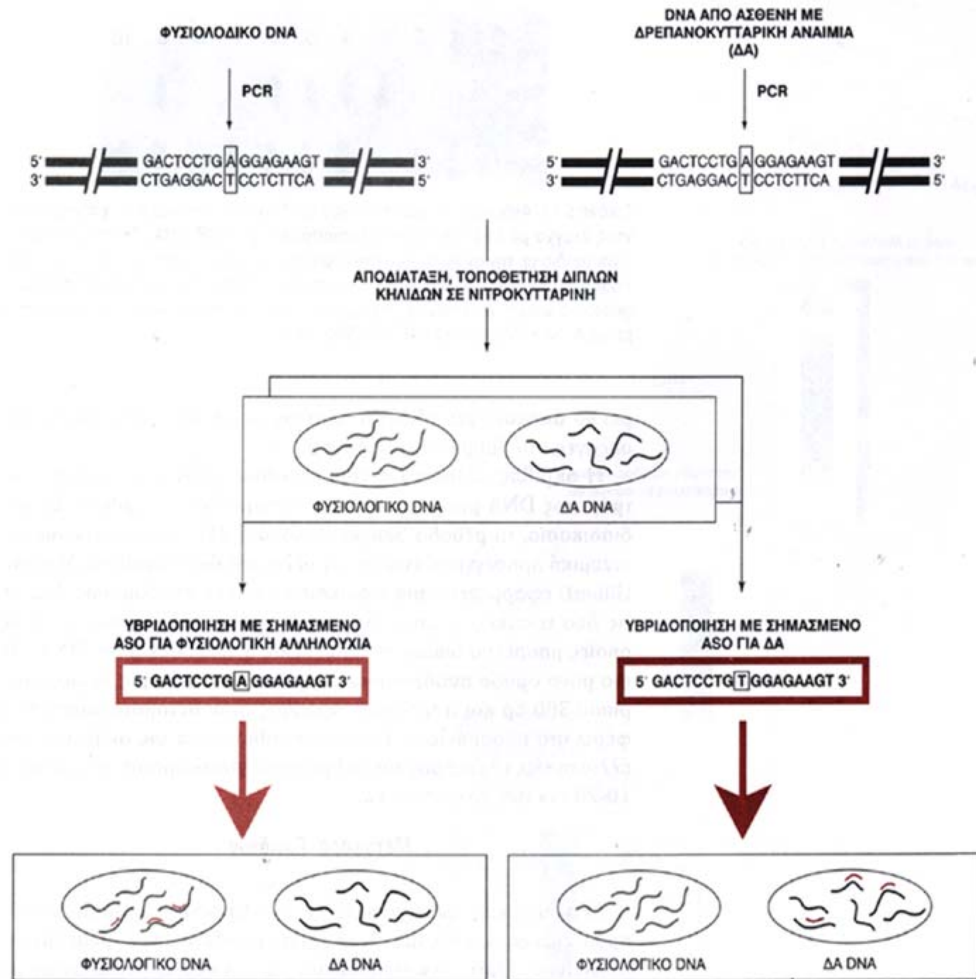
1. Η μέθοδος του υβριδισμού με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια. [Allele Specific Oligonucleotide (ASO)].
2. Ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα. [Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)].
3. Ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα με κλίση αποδιατακτικού [Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)].
4. Ανάλυση διαμόρφωσης της μονόκλωνης δομής DNA. [Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)].<sup>50,51</sup>
5. Ανίχνευση μεταλλάξεων με τη μέθοδο ARMS (Amplification Refractory Mutation System).
6. Ανάλυση αλληλουχίας του DNA (Sequencing) με χημική ή ενζυμική μέθοδο.
7. Χημική μέθοδος αποκοπής μη συμπληρωματικών βάσεων. (Chemical Mismatch Cleavage Method).
8. Ανίχνευση μεταλλάξεων τη μέθοδο Heterodublex.
9. Ανίχνευση μεταλλάξεων με ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

(PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Όλες οι μέθοδοι βασίζονται στον αρχικό πολλαπλασιασμό του DNA με PCR για να αυξηθούν επιλεκτικά οι υπό διερεύνηση αλληλουχίες. Στην συνέχεια γίνεται προσδιορισμός της μεταλλαγμένης αλληλουχίας είτε άμεσα είτε έμμεσα. Άμεσες χαρακτηρίζονται αυτές που προσδιορίζουν απευθείας την νουκλεοτιδική αλληλουχία, ενώ έμμεσες αυτές που χρησιμοποιούν μία ιδιότητα του DNA. Από τις ανωτέρω μεθόδους έμμεσες είναι οι 3, 4 και 8 ενώ οι υπόλοιπες είναι άμεσες. Από τις άμεσες μεθόδους μόνο η 6 και 7 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ταυτοποίηση αγνώστων μεταλλάξεων, ενώ από τις έμμεσες μεθόδους μόνο η 3 (DGGE) έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση αγνώστων μεταλλάξεων με τη χρήση κατάλληλων μαρτύρων.

## **Γ.2. Υβριδισμός με Συνθετικά Ολιγονουκλεοτίδια (ASO Hybridization)**

Στη μέθοδο αυτή (ASO-Allele Specific Oligonucleotide)<sup>87</sup> τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται 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 παρουσία έστω και μιας μόνο μη συμπληρωματικής βάσης αποτρέπει τον υβριδισμό υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Η διαδικασία φαίνεται στο σχήμα 14, για την περίπτωση της δρεπανοκυταρικής αναιμίας. 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.



Σχήμα 14: Υβριδισμός με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια.

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).

Η μέθοδος του υβριδισμού με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια 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 (νιτροκυτταρίνη ή Nylon) και υφίσταται υβριδισμό με τον ανιχνευτή κάτω από συγκεκριμένες αυστηρές συνθήκες (stringent conditions) ειδικές για το ολιγονουκλεοτίδιο.

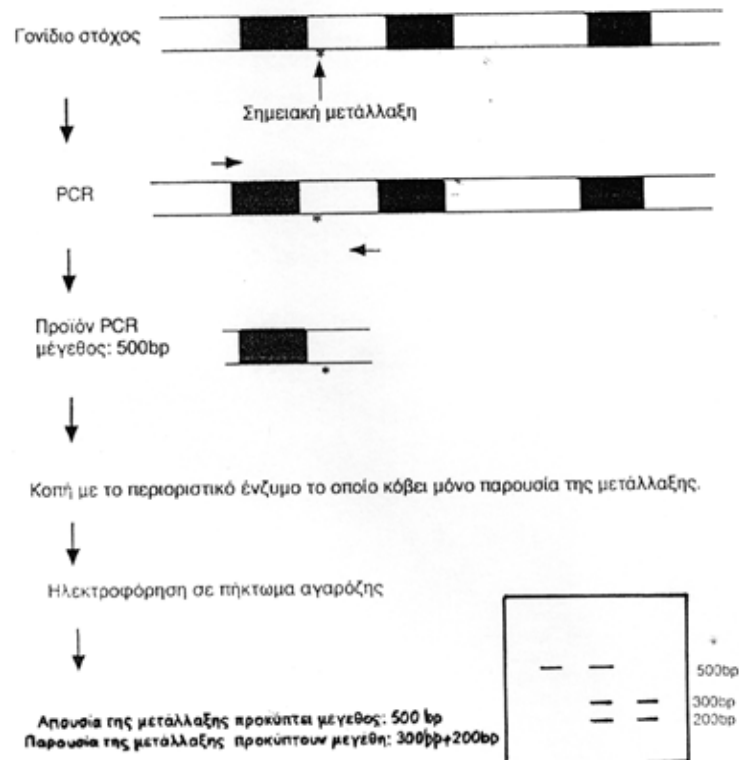
Τα ολιγονουκλεοτίδια–ανιχνευτές πρέπει να σημανθούν ώστε να είναι δυνατή η εξακρίβωση της υβριδοποίησης. Η σήμανση γίνεται με ενσωμάτωση ραδιοϊσοτόπων στο 5' άκρο των ολιγονουκλεοτιδίων – ανιχνευτών, πριν από τον υβριδισμό. Το μειονέκτημα της χρήσης ραδιενεργών ουσιών τείνει τα τελευταία χρόνια να περιορισθεί με την ανάπτυξη μη ραδιενεργών μεθόδων σήμανσης (σήμανση με χρωστικές ή φθορίζουσες ουσίες).

Η όλη διαδικασία είναι γνωστή ως dot blot,<sup>98</sup> όταν τα υπό εξέταση δείγματα DNA τοποθετούνται ως κηλίδες ή ζώνες στην μεμβράνη και υβριδοποιούνται με σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια. Παραλλαγή της μεθόδου αποτελεί το reverse dot blot, όπου στην μεμβράνη καθιλώνονται μη σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία υβριδοποιούνται με σημασμένα δείγματα DNA.

### **Γ.3. Ανάλυση με Περιοριστικά Ένζυμα (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

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.<sup>48</sup> Π.χ. στη δρεπανοκυττάρωση, η αλλαγή της βάσης A σε T στο γονίδιο της β-σφαιρίνης που οδηγεί σε αντικατάσταση του β6 αμινοξέος, από γλουταμινικό σε βαλίνη, καταστρέφει τη θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου MstII (CCTNAGG). Παρομοίως στο γονίδιο CFTR<sup>11</sup> η μετάλλαξη G551D καταστρέφει την αλληλουχία αναγνώρισης για το ένζυμο Hinc II (GTCAAC→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 επωαστεί με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο.



Σχήμα 15: Ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα

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. Η ύπαρξη μετάλλαξης αλλάζει τον αριθμό και μέγεθος των τμημάτων DNA που προκύπτουν (Σχήμα 15). Εναλλακτικά, μετά την ηλεκτροφόρηση τα προϊόντα πέψης μεταφέρονται σε μεμβράνη και ακολουθεί υβριδισμός με κατάλληλα σημασμένους ειδικούς ανιχνευτές.

## Γ.4. Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα με Κλίση Αποδιατακτικού

### (DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Η μέθοδος DGGE<sup>1,112</sup> 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 δίκλωνου 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 το μόριο του DNA θα έχει μια εντελώς διαφορετική κινητικότητα στο πήκτωμα συγκρινόμενο με το δείγμα – μάρτυρα. Επιπλέον πλεονέκτημα της μεθόδου συνιστά το γεγονός ότι, έχουν δημιουργηθεί υπολογιστικά προγράμματα τα οποία επιτρέπουν τον σχεδιασμό της κλίσης του αποδιατακτικού ανάλογα με το μέγεθος και σύσταση σε βάσεις του υπό ανάλυση τμήματος.

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 30-60 bp) το οποίο έχει πολύ υψηλότερο  $T_m$  από το  $T_m$  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.

## **Γ.5. Ανάλυση της Διαμόρφωσης της Μονόκλωνης Δομής του DNA (SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism)**

Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατό να εντοπιστεί σε μια περιοχή DNA οποιαδήποτε σημειακή μετάλλαξη.<sup>56,64,128</sup> Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αρχή ότι η δευτεροταγής δομή μονόκλωνου DNA που οφείλεται σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις είναι χαρακτηριστική της συγκεκριμένης αλληλουχίας του μορίου του DNA. Η διαμόρφωση μορίων DNA που διαφέρουν έστω και κατά μια βάση είναι διαφορετική και μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 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 πολυακρυλαμιδίου. 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. Εναλλακτικά το πήκτωμα μπορεί να βαφεί απ'ευθείας με νιτρικό άργυρο<sup>15</sup> ή βρωμιούχο αιθίδιο.<sup>31</sup>

Όταν το τμήμα του DNA που ελέγχεται με τη μέθοδο δεν φέρει σημειακές μεταλλάξεις εμφανίζονται δύο ζώνες, οι οποίες αντιστοιχούν στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες. Όταν έχουμε μεταλλαγμένα δείγματα το πρότυπο των ζωνών που λαμβάνεται

είναι διαφορετικό : Για ομοζυγώτη με την ίδια μετάλλαξη εμφανίζονται πάλι δύο ζώνες διαφορετικής όμως κινητικότητας. Για ετεροζυγώτη, με δύο διαφορετικές μεταλλάξεις, εμφανίζονται τέσσερις ζώνες. Μπορεί ωστόσο να ληφθεί και άλλος αριθμός ζωνών, εάν η διαμόρφωση των διαφορετικών μονόκλωνων μορίων τυχαίνει να έχει παρόμοια κινητικότητα, κάτι που δεν μπορεί να προβλεφθεί θεωρητικά.<sup>33</sup>

Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της τεχνικής είναι η θερμοκρασία, η προσθήκη κάποιων υλικών όπως η γλυκερόλη, η πολυαιθυλενογλυκόλη<sup>104,130,133</sup> 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.

### **Γ.5.α. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου SSCP**

Τα πλεονεκτήματα της ηλεκτροφόρησης μονόκλωνου DNA σε μη αποδιατακτικές συνθήκες είναι πολλά. Τα βασικότερα είναι :

- επιτρέπει με ασφαλή τρόπο την άμεση παρατήρηση φυσιολογικής ή μη ζώνης του DNA.
- μπορεί να προσδιορίζει με μία ανάλυση άγνωστες μεταλλάξεις.
- μπορεί να προσδιορίζει με μία ανάλυση ακόμα και δύο μεταλλάξεις σε ένα αλληλόμορφο αλλά και πολυμορφισμούς.
- είναι σύντομη, πολύ απλή, πρακτική και εύκολη, εφόσον αναπτυχθεί σε ένα εργαστήριο.
- είναι οικονομική λόγω του χαμηλού κόστους των οργάνων και των αναλωσίμων υλικών που χρησιμοποιούνται.
- δεν απαιτούνται ειδικά όργανα.
- δεν απαιτείται χρήση ραδιενέργειας.



- είναι δυνατό στο ίδιο πήκτωμα ακρυλαμιδίου να αναλυθούν ταυτόχρονα διαφορετικά τμήματα ενός ή και περισσότερων γενετικών περιοχών.
- η ποσότητα του DNA που απαιτείται είναι πάρα πολύ μικρή (της τάξεως των 50ng).
- η αποδοτικότητα ανίχνευσης (detection efficiency) > 90%<sup>94</sup>.

Τα μειονεκτήματα συγκεντρώνονται στα παρακάτω:

- οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης της πηκτής είναι πολύ ευαίσθητες.
- η απουσία θεωρητικής εξήγησης της SSCP. Η αδυναμία δηλαδή πρόβλεψης της κινητικότητας των ζωνών.
- η αποδοτικότητα ανίχνευσης δεν είναι 100%, διότι σε ορισμένες περιπτώσεις η κινητικότητα του μεταλλαγμένου DNA δεν διαφέρει απ' αυτή του φυσιολογικού όταν συνυπάρχουν περισσότερες της μιας διαμορφώσεως για μία συγκεκριμένη αλληλουχία.

## **Γ.6. Ανίχνευση Μεταλλάξεων με τη Μέθοδο ARMS (Amplification Refractory Mutation System)**

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. Η 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 εκκινήτης έχουν μετάλλαξη μιας βάσεως 3 ή 4 νουκλεοτίδια πριν το 3' άκρο τους.

Η αντίδραση ARMS περιλαμβάνει επίσης ένα ζεύγος σταθερών PCR εκκινήτων 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 Αναιμία.

## **Γ.7. Ανάλυση της Αλληλουχίας του DNA με Χημική ή Ενζυμική**

### **Μέθοδο (DNA Sequencing)**

#### **Χημική μέθοδος (Μέθοδος Maxham & Gilbert)**

Η επίδραση ενός χημικού αντιδραστήριου [Διμέθυλο-σουλφοξειδίου (DMS)] σε μονόκλινα μόρια DNA, που έχουν επισημανθεί με  $^{32}\text{P}$  ή άλλου είδους σήμανση στο 5' άκρο τους, καταστρέφει εκλεκτικά τις αδενίνες και οδηγεί σε μια ομάδα τμημάτων DNA, διαφορετικού μήκους, που είναι αντιπροσωπευτικά για τις θέσεις όπου υπάρχουν αδενίνες.

Η αντίδραση εκτελείται και για τις τέσσερις βάσεις, με ειδικά αντιδραστήρια, τα τμήματα DNA που προκύπτουν από κάθε αντίδραση διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση στην ίδια πηκτική πολυακρυλαμιδίου και τα ραδιενεργά επισημασμένα τμήματα ανιχνεύονται με αυτοραδιογραφία. Η αλληλουχία βάσεων 5' προς 3' του DNA προκύπτει τελικά διαβάζοντας από κάτω προς το πάνω μέρος της πηκτής.

### **Ενζυμική μέθοδος (Μέθοδος Sanger)**

Με τη χρήση της DNA πολυμεράσης, το μόριο του δίκλωνου DNA που πρόκειται να αναλυθεί χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τη σύνθεση μερικών αντιγράφων DNA, που όλα έχουν την ίδια αρχή (5' άκρο) αλλά τερματίζονται σε διαφορετικά σημεία της αλυσίδας του DNA. Ο τερματισμός προκαλείται με την εισαγωγή στην αντίδραση, μαζί με τα φυσιολογικά dNTPs, διδεοξυριβονουκλεοζιτών, οι οποίοι αδυνατούν να σχηματίσουν τον 5'-3' φωσφοδιεστερικό δεσμό. Η αντίδραση γίνεται εις τετραπλούν και κάθε φορά περιλαμβάνεται ένας από τους τέσσερις διδεοξυριβονουκλεοζίτες. Αφού διαχωριστούν τα προκύπτοντα DNA μόρια με ηλεκτροφόρηση, βρίσκεται η αλληλουχία διαβάζοντας από το κάτω προς το πάνω μέρος της πηκτής. Για την ανίχνευση εισάγεται ραδιενεργή ή άλλη (π.χ. φθορίζουσα) σήμανση είτε στο σταθερό 5' άκρο του δίκλωνου DNA, είτε σε ένα ή περισσότερα dNTP που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση πολυμερισμού. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται, αντίστοιχα, είτε μετά από έκθεση της ξεραμένης πηκτής σε φιλμ ακτινογραφίας είτε με σάρωση της πηκτής με λέιζερ που ανιχνεύει το φθορισμό των διαφόρων βάσεων σε διαφορετικό μήκος κύματος.

Και οι δύο μέθοδοι επιτρέπουν την εύρεση της αλληλουχίας σε τμήματα DNA που περιέχουν έως 500 βάσεις. Η ενζυμική μέθοδος έχει όμως επικρατήσει γιατί αποφεύγει την χρήση τοξικών αντιδραστηρίων και διότι μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί. Με τη χρήση

τέτοιων DNA Sequenators έχει επιτευχθεί η αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος.

### **Γ.8. Χημική Μέθοδος Αποκοπής Μη Συμπληρωματικών Βάσεων (Chemical Mismatch Cleavage Method )**

Η μέθοδος αυτή ανίχνευσης μεταλλάξεων στηρίζεται στο σχηματισμό ετεροδιμερών υβριδίων από φυσιολογικές και μεταλλαγμένες αλληλουχίες DNA.<sup>144</sup> 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 εκκινητή μέσω της PCR αντίδρασης. Χειρισμός των ετεροδιμερών με υδροξυλαμίνη (Hydroxylamine, H) οδηγεί σε χημική τροποποίηση των μη συμπληρωματικών C βάσεων, ενώ χειρισμός με τετραοξείδιο του όσμιου (osmium tetroxide, OT) τροποποιεί χημικά τις μη συμπληρωματικές T βάσεις. Τα ετεροδιμερή έπειτα επωάζονται 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 πολυακρυλαμιδίου.

### **Γ.9. Ανίχνευση Μεταλλάξεων με τη Μέθοδο των ετεροδιμερών (Heteroduplex)**

Εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον White et al το 1992.

Οι ιδιότητες των ετεροδιμερών μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να ανιχνευθούν διαφορές μεταξύ δύο αλληλουχιών. Στην περίπτωση των ετεροζυγωτών, τα Heteroduplex<sup>103</sup> σχηματίζονται με θέρμανση και ψύξη των προϊόντων PCR. Έτσι λοιπόν τα Heteroduplex (φυσιολογικό/μεταλλαγμένο) έχουν διαφορετικό αποτύπωμα σε μη

αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου από τα φυσιολογικά δίκλιωνα μόρια (φυσιολογικό/φυσιολογικό) και από τα δίκλιωνα μόρια που σχηματίστηκαν από τις δύο μεταλλαγμένες αλυσίδες (μεταλλαγμένο/μεταλλαγμένο). Ειδικές πηκτές αγαρόζης χρησιμοποιούνται για την καλύτερη λειτουργία της μεθόδου, π.χ. MDE, Hydrolink.

Παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο KVLQT1 που έχει σχέση με το σύνδρομο QT.

## **Γ.10. Ανίχνευση Μεταλλάξεων με Ηλεκτροφόρηση DNA σε Πήκτωμα**

### **Πολυακρυλαμίδης (PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis)**

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

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 πολυακρυλαμιδίου 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.

## Γ.11. Σύγκριση Μεθόδων

Όλες οι μέθοδοι που αναφέραμε παραπάνω μπορούν να ανιχνεύσουν μια γνωστή μεταλλάξη. Για να δούμε τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της κάθε μεθόδου αναφορικά με άλλα κριτήρια δημιουργήθηκε ο επόμενος πίνακας.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5**  
**Σύγκριση μεθόδων ανίχνευσης μεταλλάξεων**

	Ανίχνευση Άγνωστων μεταλλάξεων	Ανίχνευση Δύο μεταλλάξεων	Πολλά αλληλόμορφα	Χρήση Ραδιενέργειας
ASO	Όχι	Όχι	Ναι	Ναι
RFLP	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι
DGGE	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι
SSCP	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι
ARMS	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι
Sequencing	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι
Chemical mismatch	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
Heteroduplex	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι
PAGE	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι

Από το συγκεντρωτικό πίνακα βλέπουμε ότι τα περισσότερα πλεονεκτήματα συγκεντρώνουν οι έμμεσες μέθοδοι DGGE, SSCP και Heteroduplex .

Αυτές οι μέθοδοι έχουν την δυνατότητα να ανιχνεύουν άγνωστες μεταλλάξεις, την δυνατότητα ανίχνευσης δύο μεταλλάξεων συγχρόνως, την ικανότητα ανίχνευσης πολλών αλληλομόρφων μαζί και το μεγαλύτερο ίσως πλεονέκτημα είναι το ότι δεν χρειάζεται να γίνει χρήση ραδιενέργειας ή άλλης σήμανσης. Το μειονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι το ότι οι συνθήκες είναι πάρα πολύ ευαίσθητες και θέλουν πολύ καλό χειρισμό.

Όπως προαναφέρθηκε, οι μέθοδοι αυτές δεν χρησιμοποιούνται συνήθως για την ταυτοποίηση αγνώστων μεταλλάξεων. Μόνο η DGGE έχει χρησιμοποιηθεί έτσι με τη χρήση κατάλληλων μαρτύρων.

Εμείς επιλέξαμε να αναπτύξουμε και να εφαρμόσουμε στο εργαστήριο Βιοχημείας τη μέθοδο SSCP, για τους λόγους που αναφέρονται στις παραγράφους Γ.5.α & Γ.11 και ελέγξαμε αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση μεταλλάξεων στη β-MA με τη χρήση μαρτύρων.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## Δ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Δ.1. Γενικά

Το υλικό της μελέτης αυτής για τον προσδιορισμό των μεταλλάξεων ασθενών με β-ΜΑ αποτέλεσαν 40 άτομα με προέλευση από το Νομό Λάρισας που μεταγγίζονται στο Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, από τα οποία απομονώθηκε DNA από περιφερικό αίμα. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα φυσιολογικά άτομα, τέσσερις ετεροζυγώτες και έξι ομοζυγώτες β-ΜΑ οι οποίοι συχνές μεταλλάξεις.

Για τον προσδιορισμό της μετάλλαξης ΔF508 σε άτομα με κυστική ίνωση, χρησιμοποιήθηκε DNA από άτομα φυσιολογικά, ετεροζυγώτες, ή ομοζυγώτες αυτής της μετάλλαξης, που ελήφθησαν από το Νοσοκομείο Παιδών Αγία Σοφία

Για την ανίχνευση των μοριακών βλαβών που εντοπίζονται στο γονίδιο της β-σφαιρίνης χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) για τον πολλαπλασιασμό τμήματος του β-γονιδίου και το προϊόν DNA ηλεκτροφόρηθηκε σε πήκτωμα ακρυλαμίδιου σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της διαμόρφωσης του μονόκλωνου DNA ή Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP). Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων έγινε μετά από σύγκριση των προτύπων που λήφθηκαν με γνωστά δείγματα μαρτύρων. Σαν μέθοδος επιβεβαίωσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ARMS (Amplification Refractory Mutation System).

Για την ανίχνευση της μετάλλαξης ΔF508 του γονιδίου CFTR χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για τον πολλαπλασιασμό του εξονίου 10 και το προϊόν DNA ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο SSCP. Σαν μέθοδος επιβεβαίωσης

χρησιμοποιήθηκε η άμεση μέθοδος ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (PAGE).

## Δ.2. Αντιδραστήρια

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Κατάλογος αντιδραστηρίων**

A/A	Όνομασία Αντιδραστηρίου	Συντακτικός ή Μοριακός Τύπος	Εταιρεία
1.	Hinf I	Περιοριστικό Ένζυμο	NEB*
2.	Tris-(ύδροξυ-μέθυλ) αμινομεθάνιο	$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$	SIGMA
3.	AvaII	Περιοριστικό ένζυμο	NEB*
4.	Ladder 100bp	Δείκτης Μοριακών βαρών	NEB*
5.	Αιθανόλη	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	SIGMA
6.	Ακρυλαμίδιο	$\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$	SIGMA
7.	Ανθρακικό Νάτριο	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	J.TBaker
8.	Βορικό οξύ	$\text{H}_3\text{BO}_3$	SIGMA
9.	Βρωμιούχο αιθίδιο (3,8-diamino-6-ethyl-phenyl-phenatridium-bromide)	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$	SIGMA
10.	Δινάτριο άλας του EDTA	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	SIGMA
11.	Διχρωμικό Κάλιο	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	SIGMA
12.	Εθυλένοδιάμινο τετραοξικό Οξύ (EDTA)	$(\text{HOCOCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$	SIGMA
13.	Θεικό δωδεκυλικό Νάτριο (SDS)	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$	SIGMA
14.	Θεικό Μαγνήσιο	$\text{MgSO}_4$	SIGMA
15.	Κυανόλη του Ξυλενίου (Xylene cyanol)	$\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}_2$	SIGMA
16.	Λάδι	--	SERVA
17.	Λάμδα (λ) Φάγος	λ DNA-HindIII Digest	NEB
18.	Μίγμα Δεόξυ νουκλεοτιδίων (dNTPs)	--	NEB*
19.	Μπλε της Βρωμοφαινόλης (Bromophenol Blue)	$\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{OC}(\text{C}_6\text{H}_2-3,5-\text{Br}_2-\text{OH})_2$	SIGMA
20.	N,N μέθυλένο-δισ-ακρυλαμίδιο(bis)	$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2$	J.TBaker

21.	N,N,N',N'-τέτρα-μέθυλ-έθυλένο-Διαμίνη (TEMED)	C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>	SIGMA
22.	Νιτρικός Άργυρος	AgNO <sub>3</sub>	SIGMA
23.	Οξικό Οξύ	CH <sub>3</sub> COOH	SIGMA
24.	Όξινο ανθρακικό κάλιο	KHCO <sub>3</sub>	SIGMA
25.	Πρωτεΐνωση K	Ένζυμο (MB~27000)	NEB*
26.	Πυκνό Νιτρικό οξύ	HNO <sub>3</sub>	SIGMA
27.	Taq DNA πολυμεράση	Ένζυμο	NEB* & Gibco BRL
28.	Υδροξείδιο του Νατρίου	NaOH	SIGMA
29.	Υπερθειϊκό αμμώνιο	[(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	SIGMA
30.	Φορμαμίδιο απιονισμένο	HCONH <sub>2</sub>	SIGMA
31.	Φωσφορικό οξύ	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	SIGMA
32.	Χλωριούχο αμμώνιο	NH <sub>4</sub> Cl	SIGMA
33.	Χλωριούχο Κάλιο	KCl	SIGMA
34.	Χλωριούχο νάτριο	NaCl	SIGMA

\*NEB (New England Biolabs)

Τα περισσότερα χημικά αντιδραστήρια ήταν υψηλής καθαρότητας.

Το πλασμίδιο PUC18 χρησιμοποιήθηκε μετά από ευγενική παραχώρηση της κα Γεωργιάτσου Έλενας. Χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης μοριακών βαρών μετά από επώαση με το περιοριστικό ένζυμο Hinf I

### **Δ.3. Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα**

#### ***Δ.3.α. Γενικά***

Οι συνηθέστερες μέθοδοι απομόνωσης DNA από περιφερικό αίμα (λευκοκύτταρα) χρησιμοποιούν είτε φαινόλη-χλωροφόρμιο είτε υψηλή συγκέντρωση άλατος για την αποπρωτεΐνωση των δειγμάτων και εκχύλιση του DNA. Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν και οι δύο μέθοδοι αλλά επιλέχθηκε για εφαρμογή η δεύτερη μέθοδος επειδή έτσι αποφεύγεται η χρήση τοξικών αντιδραστηρίων (φαινόλη-χλωροφόρμιο) ενώ δεν επηρεάζεται η ποσότητα και η καθαρότητα του DNA.

#### ***Δ.3.β. Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα-Μέθοδος υψηλής συγκέντρωσης άλατος***

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι του Miller SA.<sup>109</sup>

##### *Αντιδραστήρια*

Lysis I pH 7,4 (NH<sub>4</sub>Cl 155mM, KHCO<sub>3</sub> 10mM, EDTA 1mM)

Lysis II pH 8,2 (Tris 10mM, NaCl 400mM, Na<sub>2</sub>EDTA 2mM)

SDS 10%

Proteinase K 10mg/ml

NaCl 6M

Απόλυτη αλκοόλη

Αιθανόλη 70%

##### Μέθοδος

Αρχικά τοποθετείται σε φιαλίδιο των 15ml, αντιπηκτικό (EDTA) με τελική συγκέντρωση 2,5mM.

1. Τοποθετείται 2ml ολικού αίματος στο φιαλίδιο των 15ml και αραιώνεται ως τα

- 12ml με δις αποσταγμένο νερό. Αναμιγνύονται.
2. Γίνεται φυγοκέντρηση για 15 min στις 3000rpm στους 4°C.  
Αποχύνεται το υπερκείμενο. Τα κύτταρα αραιώνονται σε δις αποσταγμένο νερό ως τα 12ml περίπου. Αναδεύουμε καλά σε vortex.
  3. Γίνεται φυγοκέντρηση για 15 min στις 3000rpm , στους 4°C.  
Αποχύνεται το υπερκείμενο. Προσθέτεται διάλυμα λύσης λεμφοκυττάρων ( lysis I ) μέχρι τα 12 ml.
  4. Γίνεται φυγοκέντρηση για 15 min στις 3000 rpm , στους 4°C.
  5. Επαναλαμβάνεται τα στάδια 3,4 με lysis I.
  6. Αποχύνεται το υπερκείμενο. Προστίθεται διάλυμα λύσης των πυρήνων των λεμφοκυττάρων ( lysis II ) μέχρι τα 6 ml.
  7. Προστίθενται 750μl 10% SDS και 100λ 10mg/ml proteinase K.
  8. Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για μία νύχτα.
  9. Την επόμενη ημέρα προστίθεται 2ml 6M NaCl. Ισχυρή ανάδευση για 15 sec.
  10. Γίνεται φυγοκέντρηση για 15 min στις 3500rpm , στους 4°C.
  11. Μεταγγίζεται το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει το DNA,σε καθαρό σωλήνα των 50ml. Γίνεται φυγοκέντρηση για 15 min στις 3500 rpm στους 4°C.
  12. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε άλλο σωλήνα.
  13. Προστίθενται δύο όγκοι ψυχρής αιθανόλης και ακολουθεί καταβύθιση του DNA. Το μίγμα ανακινείται πολλές φορές και διατηρείται στο ψυγείο για αρκετές ώρες.
  14. Γίνεται φυγοκέντρηση στις 3500 rpm στους 4°C για 50min.
  15. Αποχύνεται το υπερκείμενο. Ξεπλένονται τα τοιχώματα του σωλήνα με 2ml 70% αιθανόλης. Μεταφέρουμε σε σωληνάκι (eppendorf).Αναδεύουμε και ξαναφυγοκεντρούμε.

16. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και καλύπτουμε το σωληνάκι (erpendorf) με parafilm το οποίο τρυπάμε με καρφίτσα. Το αφήνουμε μία νύχτα. Διαλύουμε το τελικό ίζημα σε 100μl δίσταπεσταγμένο H<sub>2</sub>O.

#### ***4.3.γ. Σχολιασμός μεθόδου***

Η τεχνική που εφαρμόστηκε, χρησιμοποιεί αρχικά, δις αποσταγμένο νερό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την λύση των ερυθροκυττάρων λόγω της δημιουργίας υπότονου διαλύματος. Η χρήση του διαλύματος lysis I έχει σαν αποτέλεσμα την λύση των λεμφοκυττάρων, ενώ το lysis II έχει σαν συνέπεια την λύση των πυρήνων των λεμφοκυττάρων. Το EDTA δεσμεύει ιόντα Mg<sup>++</sup>, που απαιτούνται για την δράση της DNAάσης, το SDS αποδιατάσσει και η πρωτεΐνάση K προκαλεί πεπτιδική υδρόλυση και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, ενώ η ίδια παραμένει ενεργή παρουσία SDS. Στη συνέχεια το χλωριούχο νάτριο εκχυλίζει το DNA από την χρωματίνη. Η καθαρή αλκοόλη προκαλεί αφυδάτωση του DNA και συνεπώς την καταβύθισή του. Για την καλύτερη κατακρήμνιση του DNA μπορεί να προστεθεί μικρή ποσότητα οξικού αμμωνίου το οποίο εξουδετερώνει τα αρνητικά φορτία του DNA. Τέλος ξεπλένονται τα άλατα με αιθανόλη και το DNA αφήνεται για ξήρανση στον αέρα για αρκετές ώρες για τη εξάτμιση της αλκοόλης. Επαναδιαλύεται το ίζημα σε δις αποσταγμένο & αποστειρωμένο νερό.

#### ***4.3.δ. Ποσοτικοποίηση DNA***

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του DNA που διαθέτουμε γίνεται φασματοφωτομετρικά. Τοποθετούμε σε φωτομετρική κυψελίδα από χαλαζία (Quartz) συνολικά 1000μl, διαλύματος δις αποσταγμένου νερού και τόσης ποσότητας από το επαναδιαλυμένο DNA, ώστε να βρισκόμαστε σε τιμές απορρόφησης > 0,1 A (A = absorption). Φωτομετρούμε στα 260nm και κατόπιν στα 280nm και υπό την προϋπόθεση

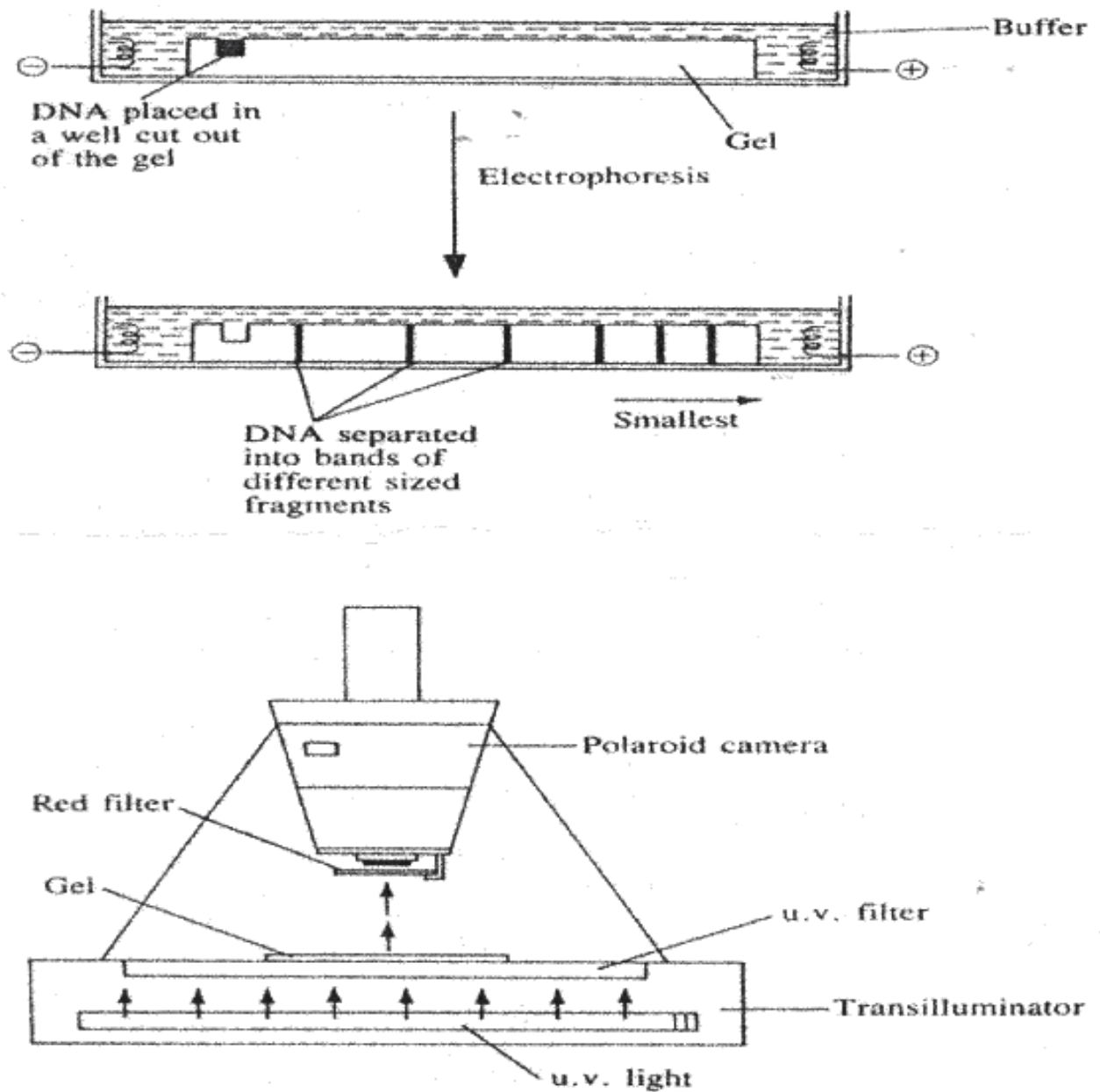
ότι οι απορροφήσεις βρίσκονται για λόγους αξιοπιστίας μεταξύ 0,1 και 0,9, ο λόγος των δύο μετρήσεων προσδιορίζει την καθαρότητα του DNA. Αν ο λόγος  $A_{260}/A_{280}$  βρίσκεται μεταξύ 1,8-2,0, η τιμή της απορρόφησης στα 260nm μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του διαλύματος DNA που φωτομετρούμε και κατ' επέκταση της ποσότητας του DNA που διαθέτουμε (ποσοτικοποίηση). Για δίκλωνο DNA ισχύει:  $A_{260}=1$  ισοδυναμεί με 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNA διαλύματος στην κυψελίδα, και με αυτό το δεδομένο υπολογίζουμε την ποσότητα του DNA που έχουμε απομονώσει. Συνήθως από δύο ml αίματος λαμβάνονται περίπου 10 $\mu\text{g}$  DNA.

#### ***4.3.ε. Έλεγχος DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης***

Η ποιότητα και ποσότητα του DNA που διαθέτουμε ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Μία έντονη ζώνη υψηλού Μοριακού Βάρους, υποδηλώνει την ύπαρξη καθαρού DNA.

Αρχικά παρασκευάζεται η πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 0,8% [0,8 γραμμάρια αγαρόζης και 100ml διαλύματος TAE (Tris-Acetate EDTA) 1X θερμαίνονται στο φούρνο μικροκυμάτων για επτά λεπτά]. Στο διάλυμα της αγαρόζης προστίθενται και 5  $\mu\text{l}$  βρωμιούχου αιθιδίου και το διάλυμα τοποθετείται στο δίσκο συσκευής οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Όταν πήξει η πηκτή της αγαρόζης και εξαχθεί το χτενάκι προσθέτουμε το buffer. Η όλη διαδικασία περιγράφεται στο Σχήμα 16.

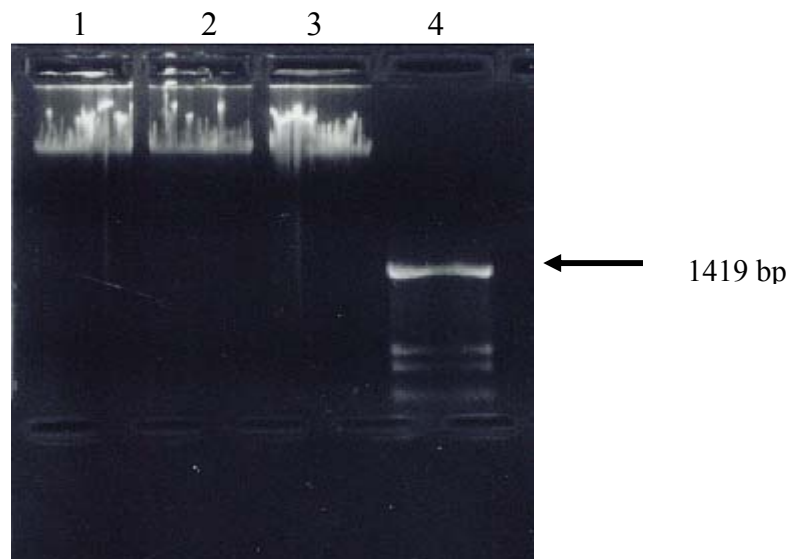
Ποσότητα πέντε  $\mu\text{l}$  του απομονωθέντος DNA μαζί με το διάλυμα φόρτωσης που περιέχει και την χρωστική, τοποθετείται στα πηγαδάκια που ήδη έχουμε δημιουργήσει. Το τροφοδοτικό μπαίνει σε λειτουργία στα 100V για μισή ώρα. Τέλος τοποθετούμε την πηκτή πάνω από λάμπα UV και φωτογραφίζουμε την πηκτή.



Σχήμα 16: Διαδικασία ηλεκτροφόρησης DNA σε πηκτή αγαρόζης.

Οι ζώνες DNA φθορίζουν λόγω της εισχώρησης του βρωμιούχου αιθιδίου ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων. Η εικόνα που παίρνουμε είναι η ακόλουθη.





Σχήμα 17: Έλεγχος με ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 1%. Διαδρομές 1,2,3 DNA από 3 διαφορετικά υγιή άτομα. Διαδρομή 4, δείκτης μοριακών βαρών PUC18/Hinf I

#### Δ.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

##### Δ.4.α. Γενικά

Πρόκειται για τεχνική η οποία δίνει τη δυνατότητα να παραχθούν πολλά αντίγραφα συγκεκριμένου τμήματος DNA με καθορισμένο μήκος και αλληλουχία. Όλη η αντίδραση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ( Polymerase Chain Reaction ) βασίζεται στην δράση του ενζύμου Taq πολυμεράσης, μιας DNA πολυμεράσης η οποία αντέχει σε ψηλές θερμοκρασίες χωρίς να υφίσταται μετουσίωση, η οποία προσθέτει dNTPs στο 3' άκρο μιας αλυσίδας DNA , σύμφωνα με την αλληλουχία βάσεων στην αλυσίδα εκμαγείο. Η ποιότητα του ενζύμου είναι αποφασιστικής σημασίας για το μέγεθος του τμήματος που πρόκειται να πολλαπλασιασθεί. Οι εκκινητές (primers) είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μεγέθους της τάξης των 18-30 βάσεων και αλληλουχία συμπληρωματική με τη μία μόνο από τις δύο αλυσίδες του DNA οι οποίοι λειτουργούν ως αφετηρία για την Taq πολυμεράση.

Η PCR περιλαμβάνει μία κυκλική επανάληψη τριών αντιδράσεων (25-40 κύκλοι) που διαφέρουν μόνο στη θερμοκρασία επώασης. Και οι τρεις αντιδράσεις διενεργούνται μέσα στο ίδιο σωληνάριο με θερμοανθεκτικά αντιδραστήρια. Εκτός από το DNA (template), μέσα στο σωληνάριο της αντίδρασης συνυπάρχουν δύο μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές, ρυθμιστικό διάλυμα, ιόντα μαγνησίου, η θερμοάντοχη Taq πολυμεράση και το ισομοριακό μίγμα των τεσσάρων δεοξυριβοτριφωσφορικών νουκλεοσιδίων (dNTPs : dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

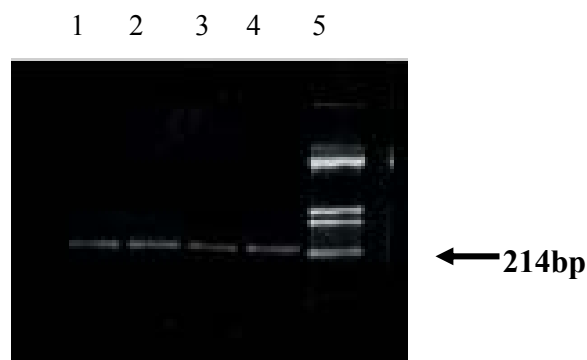
Το **πρώτο στάδιο** κάθε κύκλου αποτελεί η αποδιάταξη (denaturation) που επιτυγχάνεται με υψηλή θερμοκρασία (94 °C για 30sec έως 5min) με σκοπό να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο αλυσίδες της έλικας του DNA.

Στο **δεύτερο στάδιο** τα δύο ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές αναγνωρίζουν και συνδέονται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες που βρίσκονται στις ήδη αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA. Η σύνδεση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία που κυμαίνεται από 40-65°C για 20-60 sec. Στο στάδιο αυτό η ακρίβεια στην θερμοκρασία καθώς και στη συγκέντρωση των ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών είναι καθοριστικής σημασίας για το αποτέλεσμα της αντίδρασης.

Στο **τρίτο στάδιο**, στους 65-72 °C για 60-180sec, πραγματοποιείται η σύνθεση του DNA με επιμήκυνση των εκκινητών (primer extension), που καταλύεται από την Taq DNA πολυμεράση η οποία προσθέτει νουκλεοτίδια στη θέση 3' μίας δίκλωνης περιοχής.

Στο τέλος του πρώτου κύκλου, το προϊόν επιμήκυνσης του κάθε εκκινητή θα αποτελέσει πρότυπο για άλλον εκκινητή στον δεύτερο κύκλο, που θα αρχίσει με αποδιάταξη και επανάληψη του δεύτερου και του τρίτου σταδίου με αποτέλεσμα τον διπλασιασμό της ποσότητας του DNA.

Τα τρία στάδια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επαναλαμβάνονται πολλές φορές, συνήθως 25-35 κύκλοι θεωρούνται αρκετοί για περαιτέρω επεξεργασία του προϊόντος και οδηγούν σε περισσότερα από  $10^7$  αντίγραφα της αρχικής αλληλουχίας. Το κύριο προϊόν της εκθετικής αντίδρασης είναι ένα δίκλωνο τμήμα DNA, μήκους 100-400bp, του οποίου τα άκρα καθορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών. Η έκβαση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (η ύπαρξη ενός τμήματος DNA του απαιτούμενου μεγέθους) πιστοποιείται με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης (Σχήμα 18).



Σχήμα 18 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων αντίδρασης PCR τμήματος 238bp του β-γονιδίου σε πηκτή αγαρόζης. Διαδρομή 1-4 προϊόντα τεσσάρων αντιδράσεων PCR, διαδρομή 5 δείκτης μοριακών βαρών PUC/Hinf I. Το βελάκι αντιστοιχεί σε 214 bp.

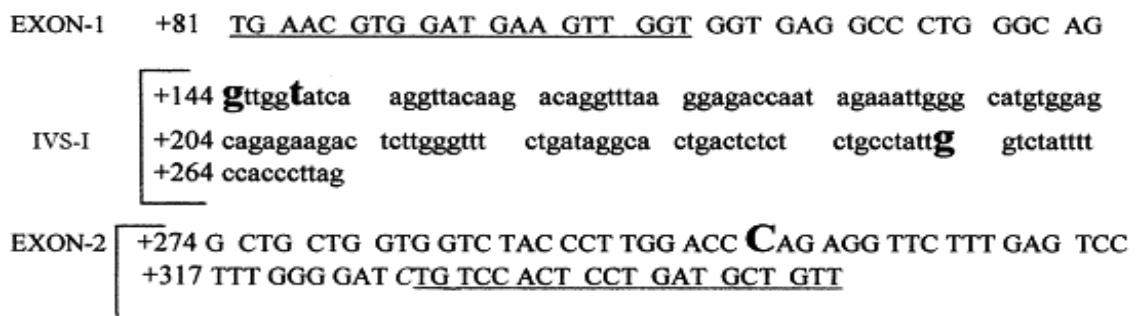
#### **Δ.4.β. Πολλαπλασιασμός τμήματος γονιδίου της β-σφαιρίνης**

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 3 οι τέσσερις πιο συχνές μεταλλάξεις του β-γονιδίου είναι οι : IVS-I-1 (G→A), IVS-I-6 (T→C), IVS-I-110 (G→A) & codon-39 (C→T). Όλες αυτές περιέχονται μέσα στο τμήμα μήκους 238 βάσεων του σχήματος 19.



Σχήμα 19 : Περιοχή του β-γονιδίου όπου απαντώνται οι τέσσερις πιο συχνές μεταλλάξεις (1: IVS-I-1, 2: IVS-I-6, 3: IVS-I-110, 4:cd39) στον ελληνικό πληθυσμό.

Στο σχήμα 20 φαίνεται η αλληλουχία του τμήματος X και οι περιοχές που υβριδοποιούνται οι εκκινητές.



Σχήμα 20: Η αλληλουχία τμήματος 238bp του β-γονιδίου. Με υπογράμμιση φαίνονται οι περιοχές που υβριδοποιούνται οι εκκινητές, ενώ με έντονους & μεγαλύτερους χαρακτήρες φαίνονται οι τέσσερις πιο συχνές μεταλλάξεις.

Για να πολλαπλασιασθεί αυτό το τμήμα του β-γονιδίου που εντοπίζονται οι τέσσερις πιο συχνές μεταλλάξεις σχεδιάσθηκε το νέο ζεύγος εκκινητών που φαίνονται παρακάτω :

### ΠΙΝΑΚΑΣ 7 : Αλληλουχία των εκκινητών β-γονιδίου

Αριθμός	Όνομα	Αλληλουχία	GC περιεκτικότητα %	Tm °C
1	5' GI	TGAACGTGGATGAAGTTGGT	45	52
2	3' GI	AACAGCATCAGGAGTGGACA	50	52

Η σχεδίαση των εκκινητών έγινε με τη χρήση του προγράμματος Primer Pair Data, Saccharomyces Genome Database από τη διεύθυνση [http:// genome-www2.Stanford.edu/](http://genome-www2.Stanford.edu/) για την εύρεση του καταλληλότερου ζεύγους εκκινητών. Αφού δόθηκε η αλληλουχία του κομματιού X του σχήματος 19 το πρόγραμμα έδωσε πολλά ζεύγη εκκινητών, επτά από τα οποία φαίνονται στον παρακάτω πίνακα, κατά σειρά προτεραιότητας:

**ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Ζεύγη πιθανών εκκινητών β-γονιδίου**

	Αλληλουχία εκκινητών	Μήκος	Tm	%GC	Self Aneal
Forward-primer	TGAACGTGGATGAAGTTGGT	20	52	45	12
Reverse-primer	AACAGCATCAGGAGTGGACA	20	52	50	12
Forward-primer	TGAACGTGGATGAAGTTGGT	20	52	45	12
Reverse-primer	AGCTCAAGGAGTGGACAGAT	20	50	50	12
Forward-primer	TGAACGTGGATGAAGTTGG	19	51	47	12
Reverse-primer	AACAGCATCAGGAGTGGACA	20	52	50	12
Forward-primer	AACGTGGATGAAGTTGGTGG	20	54	50	12
Reverse-primer	AACAGCATCAGGAGTGGACA	20	52	50	12
Forward-primer	TGAACGTGGATGAAGTTGGT	20	52	45	12
Reverse-primer	ACAGCATCAGGAGTGGACA	19	50	52	12
Forward-primer	TGAACGTGGATGAAGTTGGT	20	52	45	12
Reverse-primer	CAGCATCAGGAGTGGACAGA	20	53	55	12
Forward-primer	ACGTGGATGAAGTTGGTGGT	20	54	50	12
Reverse-primer	AACAGCATCAGGAGTGGACA	20	52	50	12

Τελικά επιλέχθηκε το πρώτο ζεύγος εκκινητών λόγω του ότι συγκέντρωνε τα περισσότερα πλεονεκτήματα, σε σχέση με τα υπόλοιπα ζεύγη. Αυτά είναι : 1) Τα Tm των δύο αυτών εκκινητών είναι ίδια. 2) Και οι δύο είναι ίδιου μήκους. 3) Η περιεκτικότητα σε GC είναι 45% και 50%, επομένως είναι αρκετά υψηλή. 4) Τέλος η πιθανότητα για υβριδισμό με τον εαυτό τους είναι μικρή.

#### **4.4.γ. Συνθήκες αντίδρασης PCR για τμήμα του γονιδίου της β-σφαιρίνης**

Η αντίδραση του επιλεκτικού πολλαπλασιασμού (PCR) γενωμικού DNA έγινε σε φιαλίδιο (eppendorf) των 500 μl. Όλα τα αντιδραστήρια κατά τη διάρκεια της εργασίας,

τοποθετούνται πάνω σε πάγο. Τα υλικά που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να έχουν αποστειρωθεί. Ο χώρος όπου πραγματοποιείται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πρέπει να διατηρείται καθαρός για να ελαχιστοποιούνται οι τυχόν επιμολύνσεις. Όλες οι εργασίες γίνονται με γάντια. Για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής Eppendorf Mastercycler gradient 5331 Ver 1.2.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR**

Συστατικά	Όγκος (μl)	Τελική Συγκέντρωση ή βάρος (ng)
Γενομικό DNA	X	~400ng
10X PCR buffer	10	1X
dNTPs μίγμα (2mM each)	10	200 μM
Primer 1 (7,5 mM)	2	150 μM
Primer 2 (7,5 mM)	2	150 μM
MgCl <sub>2</sub> (100mM)	1,5	1,5 mM
Taq DNA Polymerase (5U/μl)	0,4	2 unit
ddH <sub>2</sub> O	Έως 100	--
Λάδι	1 σταγόνα	--
Τελικός όγκος	100	--

Το Buffer 10X περιέχει αρχικά 50mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 8,4

#### Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχικά το μίγμα της αντίδρασης εκτίθεται σε θερμοκρασία 94°C για 5 min και

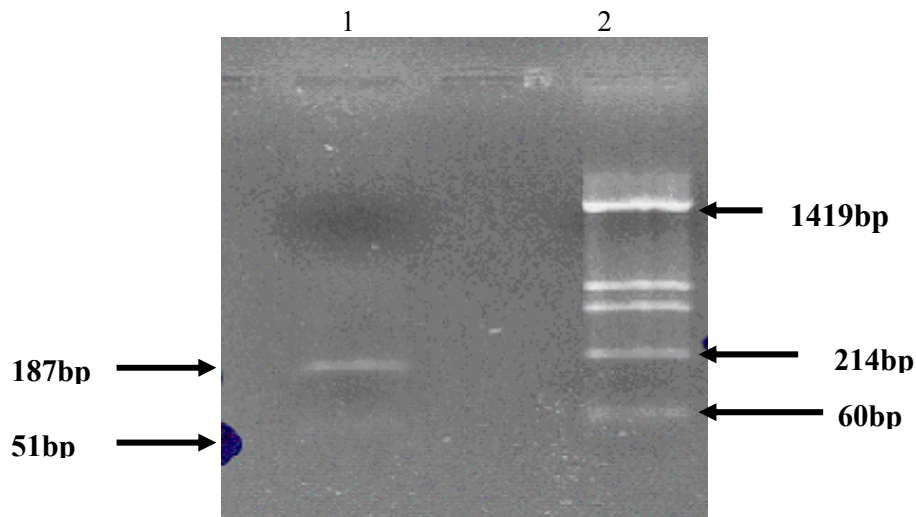
ακολουθεί : αποδιάταξη 94°C 30sec

επανασύνδεση 52°C για 30 sec

επέκταση 65°C για 1min

Τα τρία στάδια της αποδιάταξης, της επανασύνδεσης και της επέκτασης επαναλαμβάνονται για 31 κύκλους και τέλος ακολουθεί τελική επέκταση στους 65 °C για 10min. Ο κυκλοποιητής κρατάει την θερμοκρασία στους 4°C, μέχρι να γίνει έλεγχος της έκβασης της αντίδρασης.





Σχήμα 21 Πέψη 238bp προϊόντος PCR β-γονιδίου με το ένζυμο *AvaII*.  
 Διαδρομή 1, πέψη με το ένζυμο *AvaII*  
 Διαδρομή 2, δείκτης μοριακών βαρών, PUC/Hinf I

#### ***Δ.4.δ. Πρωτόκολλο καθαρισμού προϊόντων PCR (Quiagen kit της Quiagen)***

*Αντιδραστήρια* : PB & PE ρυθμιστικά διαλύματα (περιέχει χαοτροπικά άλατα που είναι ερεθιστικά για το δέρμα)

EB 10mM Tris-Cl, pH 8,5

#### *Διαδικασία*

- 1) Προστίθενται πέντε όγκοι του ρυθμιστικού διαλύματος PB και ένας όγκος του προϊόντος PCR σε φιαλίδιο των 2ml και αναμιγνύονται. Δεν είναι απαραίτητο να απομακρυνθεί το λάδι. Το PB έχει την ιδιότητα να παρέχει τη σωστή συγκέντρωση αλάτων και pH στο διάλυμα για την σωστή πρόσδεση του DNA στην στήλη.
- 2) Τοποθετείται η στήλη QIAquick σε ένα φιαλίδιο των 2ml.
- 3) Ρίχνεται το δείγμα μας στην στήλη, για να δεσμευτεί το DNA και φυγοκεντρείται για 50sec.(Η στήλη πυριτίου [silica membrane] έχει την ιδιότητα να δεσμεύει το DNA



από υδατικά διαλύματα και πηκτές αγαρόζης που περιέχουν έως 10μg DNA).

- 4) Απορρίπτεται το διήθημα. Τοποθετείται η στήλη στο ίδιο φιαλίδιο.
- 5) Ξεπλένεται η στήλη με 0,75 ml ρυθμιστικού διαλύματος PE και φυγοκεντρείται για 50sec (με το PE απομακρύνονται ανεπιθύμητες παρεμβάλλουσες ουσίες, όπως εκκινητές, άλατα, νουκλεοτίδια, χρώματα, λάδια, απορρυπαντικά).
- 6) Απορρίπτεται το διήθημα. Τοποθετείται η στήλη στο ίδιο φιαλίδιο. Φυγοκεντρείται για επιπλέον 1min με την μέγιστη ταχύτητα (Σκοπός της δεύτερης φυγοκέντρωσης είναι να απομακρυνθεί εξ'ολοκλήρου η αιθανόλη του ρυθμιστικού διαλύματος PE).
- 7) Τοποθετείται η στήλη σε ένα φιαλίδιο των 1,5ml. 8) Εκλούεται το DNA με 30μl ρυθμιστικό διάλυμα EB, το οποίο τοποθετείται στο κέντρο της στήλης και φυγοκεντρείται για 1 min (με το EB εκλούεται μόνο το DNA).

#### ***4.4.ε. Πολλαπλασιασμός εξονίου 10 της CFTR***

Ο πολλαπλασιασμός του εξονίου 10 του γονιδίου της ΚΙ που περιέχει την μετάλλαξη ΔF508 δίνει ένα τμήμα Υ μεγέθους 98bp για το φυσιολογικό γονίδιο και 95bp για το μεταλλαγμένο όπως φαίνεται στο σχήμα 22.

```

1   ttccaaact tcacttctaa tgatgattat gggagaactg gaggccttcag agggtaaaat
61  taagcacagt ggaagaattt cattctgttc tcagtttcc tggattatgc ctggcagcat
121 taaagaaaaat atcat ctt tg ggttttcta tgatgaatat agatacagaa ggcgtcatcaa
181 agcatgccaa ctagaagagg taagaa
  
```

Σχήμα 22: Αλληλουχία του εξονίου 10 του γονιδίου της ΚΙ. Με υπογράμμιση επισημαίνονται οι θέσεις υβριδισμού των εκκινητών, ενώ με έντονα γράμματα η πολλαπλασιαζόμενη περιοχή, ενώ μέσα σε κιτίο φαίνεται η μετάλλαξη ΔF508 (απαλοιφή τριών νουκλεοτιδίων).

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Taq DNA Polymerase (5 U/μl) και οι δύο εξής εκκινητές (primers) :

### ΠΙΝΑΚΑΣ 10 : Εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό του εξονίου 10 της CFTR

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'

Οι εκκινητές επιλέχθηκαν από την βιβλιογραφική αναφορά R.K Saiki et al (1985)

Science 230: 1350-1352

#### Δ.4.ζ. Συνθήκες αντίδρασης PCR για το εξόνιο 10 της CFTR

Η PCR αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τις εξής συνθήκες:

##### Πρόγραμμα κυκλοποίησης

5 min για 95°C

30 κύκλοι (1min για 94°C, 50 sec για 62°C, 2 min για 72°C )

7 min 72°C

Ο κυκλοποιητής κρατάει την θερμοκρασία στους 4°C , μέχρι να γίνει έλεγχος της έκβασης της αντίδρασης.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό του εξονίου 10 της CFTR

Συστατικά	Όγκος (μl)	Τελική Συγκέντρωση ή βάρος (ng)
Γενομικό DNA	X	400ng
10X PCR buffer	10	1X
dNTPs μίγμα (10mM)	8	0,8 mM
Primer 1+Primer 2 (20μM)	10	2 μM
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	4	2 mM
Taq DNA Polymerase (5U/μl)	0,4	2units
1% W-1	3	--
ddH <sub>2</sub> O	έως 100	--
Τελικός όγκος	100	--

(Το Buffer 10X περιέχει αρχικά 50mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 8,4).

Με αυτές τις συνθήκες πολλαπλασιάζεται η περιοχή του εξονίου 10 του γονιδίου της KI, μεγέθους 98bp για το φυσιολογικό γονίδιο ή 95bp για το μεταλλαγμένο.

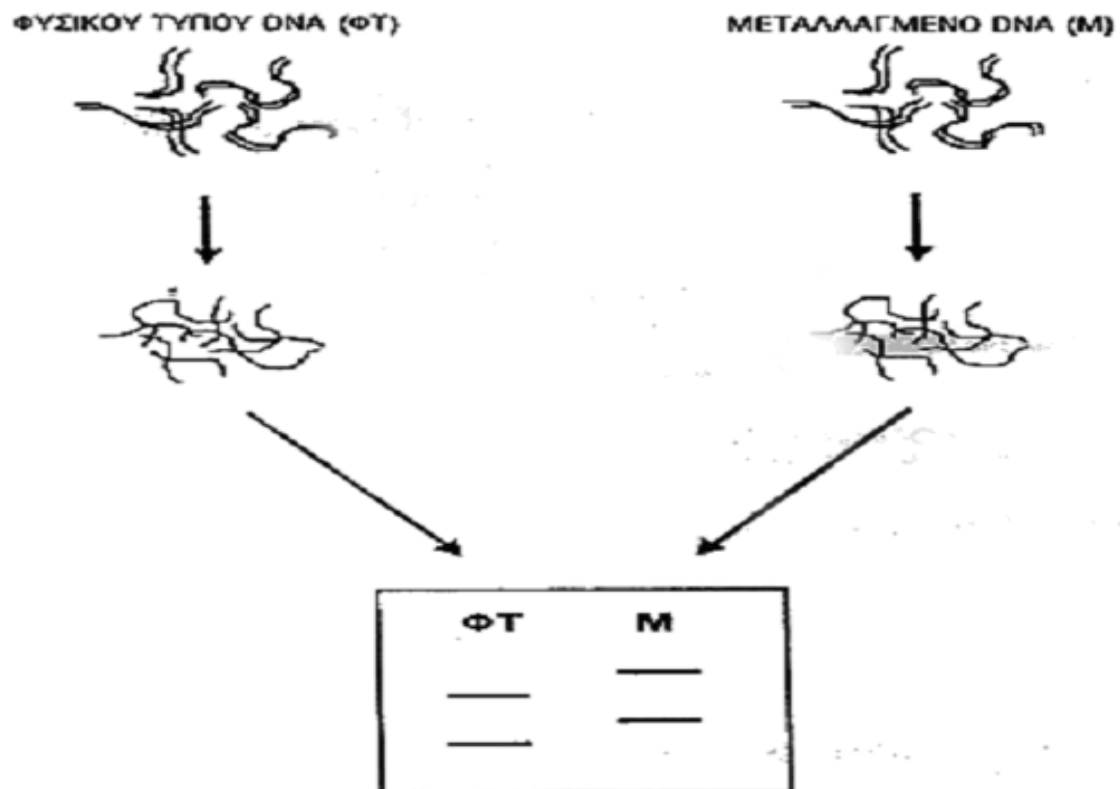
Το αποτέλεσμα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (5 µl του προϊόντος) ελέγχεται σε πηκτή αγαρόζης 3% που περιέχει 0,5mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου και ρυθμιστικό διάλυμα με την χρωστική Bromophenol Blue και Xylene Cyanol. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται διάλυμα TBE (89 mM Tris, 89mM Boric Acid, 2,5mM EDTA). Σαν πρότυπο μοριακών βαρών χρησιμοποιείται το πλασμίδιο PUC το οποίο έχει επωασθεί με το περιοριστικό ένζυμο Hinf I. Ρυθμίζεται το τροφοδοτικό υπό σταθερή τάση 100V, για 30 min περίπου και ακολουθεί φωτογράφιση της πηκτής στο UV.

#### **Δ.5. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (SSCP) με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες**

##### ***Δ.5.α. Γενικά***

Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι η δευτεροταγής δομή μονόκλωνου DNA που οφείλεται σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις είναι χαρακτηριστική της συγκεκριμένης αλληλουχίας του μορίου του DNA. Η διαμόρφωση μορίων DNA που διαφέρουν έστω και κατά μία βάση είναι διαφορετική και μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου χωρίς αποδιατακτικές ουσίες. Η περιοχή που πρέπει να ελεγχθεί για ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων ενισχύεται με PCR και μετά από αποδιάταξη σε υψηλή θερμοκρασία ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Για την ανίχνευση των τμημάτων του DNA μπορεί να γίνει ιχνηθέτηση κατά την αντίδραση PCR ενσωματώνοντας ένα ραδιοεπισημασμένο dNTP οπότε στη συνέχεια το πήκτωμα πρέπει να ξηραθεί και να εκτεθεί σε ακτινογραφικό φιλμ για κάποιες ώρες. Σήμερα μπορεί να γίνει απλούστερα βαφή με νιτρικό άργυρο ή με βρωμιούχο αιθίδιο. Όταν το τμήμα του

DNA που ελέγχεται με τη μέθοδο δεν φέρει σημειακές μεταλλάξεις δύο ταινίες εμφανίζονται και αντιστοιχούν στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες. Διαφορές των υπό εξέταση δειγμάτων από τα φυσιολογικά δείγματα, (δείγματα controls-μάρτυρες), δείχνουν μετάλλαξη (Σχήμα 23).



Σχήμα 23: Συνοπτική παρουσίαση της μεθόδου SSCP

Η ικανότητα να προσδιορίσουμε την αλλαγή της βάσης στηρίζεται στους παρακάτω παράγοντες :

- Το μέγεθος των DNA τμημάτων. Η ικανότητα προσδιορισμού αλλαγής μιας βάσης είναι 90-95% για κομμάτια που είναι κάτω από 350bp. Η ικανότητα αυτή μειώνεται όσο αυξάνεται το μήκος των κομματιών. Όταν υπάρχουν κομμάτια μεγαλύτερα τότε χρησιμοποιούνται περιοριστικά ένζυμα τα οποία κόβουν το κομμάτι σε άλλα μικρότερα.

- Η θερμοκρασία της πηκτής. Οι διαφορές στη δομή εξ αιτίας μιας μετάλλαξης παρατηρείται σε θερμοκρασία 4-25°C. Η άριστη θερμοκρασία προσδιορίζεται εμπειρικά<sup>40</sup>.
- Ποσοστό bis-acrylamide : ο λόγος acrylamide/bis-acrylamide προσδιορίζει το ποσοστό διασύνδεσης (cross linking). Συνήθως στην SSCP χρησιμοποιείται bis-acrylamide σε ποσοστό 1-5% . Το ποσοστό της ακρυλαμίδης κυμαίνεται από 5-10%<sup>51,141,157</sup>.
- Συγκέντρωση και είδος του buffer<sup>157</sup>.
- Συνθήκες ηλεκτροφόρησης. Υψηλή τάση (volt) οδηγούν σε υπερθέρμανση της πηκτής και όχι καλή αποδιάταξη του DNA.

#### ***4.5.β. Τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες – SSCP***

##### Αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό Διάλυμα : Tris Phosphate EDTA (TPE 10 X) (108g Tris base, 15,5ml 85% Φωσφορικό οξύ [1,679g/ml] και 40 ml 0,5M EDTA)
- Stock διάλυμα Acrylamide (50%)– bis acrylamide (bis-acrylamide 5%) (47,5g Ακρυλαμίδιο και 2,5g bis-acrylamide και νερό μέχρι τα 100ml)
- Υπερθειικό αμμώνιο 10%
- TEMED
- 0,1 % SDS / 10mM EDTA
- Stop solution (98% Απιονισμένο Φορμαμίδιο, 15mM NaOH, 0,25% Bromophenol Blue & 0,25 % Xylene cyanol)

### Προετοιμασία για την κατασκευή της πηκτής

Χρησιμοποιείται συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης διαστάσεων 18X20X0,5 cm. Τα τζάμια που θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή του πηκτώματος, θα πρέπει να έχουν καθαρισθεί σχολαστικά με σκληρό σφουγγάρι και απορρυπαντικό. Ξεπλένονται με αποσταγμένο νερό και αφήνονται να στεγνώσουν. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας πολύ καλή ποιότητα απορροφητικό χαρτί, βρέχονται αρχικά με ακετόνη, με αιθανόλη και τέλος με ειδικό λάδι Sigmacote της Sigma, για να ξεκολλάει εύκολα η πηκτή που θα πολυμερισθεί από το τζάμι. Η πολύ καλή και σχολαστική καθαριότητα είναι απαραίτητη για να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων μέσα στα τζάμια. Ενδιάμεσα από τα καθαρά τζάμια τοποθετούνται spacers πάχους 0,5 cm και μονώνονται με ειδική ταινία. Οι εργασίες αυτές είναι απαραίτητο να γίνουν με πολύ λεπτούς χειρισμούς για να αποφευχθεί λάθος που θα οδηγήσει σε διαφυγή του διαλύματος ακρυλαμιδίου από τα τζάμια πριν αυτό πολυμερισθεί. Τα τζάμια συγκρατούνται με ειδικούς σφικτήρες και τοποθετείται το κατάλληλο χτένι για τη δημιουργία των θέσεων (πηγαδάκια) όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα.

Όταν πολυμερισθεί η πηκτή τοποθετείται στην συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, τοποθετώντας ρυθμιστικό διάλυμα 2X TPE<sup>50</sup> στο άνω και κάτω μπάνιο και διατηρείται στο ψυγείο στους 4°C.

### Συνθήκες ηλεκτροφόρησης SSCP

Σε φιαλίδιο (eppendorf) όγκου 500 $\mu$ l τοποθετούμε 50-100 ng (~2  $\mu$ l) δείγματος DNA προϊόντος της αντίδρασης PCR και 8 $\mu$ l [0,1% SDS/EDTA 10mM] (αναλογία DNA/όγκου αντίδρασης 1:5). Το διάλυμα θερμαίνεται στους 65° C για 5 λεπτά. Στα παραπάνω προσθέτονται 15 $\mu$ l stop solution (λόγος όγκων 1:1,5 τελική συγκέντρωση φορμαμιδίου 65%) και το μίγμα θερμαίνεται για 3 min στους 94° C. Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται στον πάγο μέχρι να φορτωθούν στην πηκτή, η οποία ήδη έχει

ψυχθεί στους 4° C. Συνδέουμε στο τροφοδοτικό και ηλεκτροφορούμε στα 10W σταθερά (16 Volt, 60 mA) για τρεις ώρες. Καθ' όλη την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης η πηκτή είναι μέσα σε ψυγείο με σταθερή θερμοκρασία στους 4° C.<sup>148,152,163</sup>

#### **4.5.γ. Εμφάνιση πηκτής με την μέθοδο του νιτρικού αργύρου**

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθείται το πρωτόκολλο του Merrill<sup>107,108</sup> για την εμφάνιση της πηκτής.

Αρχικά η πηκτή αποκολλάται προσεκτικά από τα τζάμια και αφήνεται να πέσει μέσα σε ειδικό δίσκο από πλαστικό, μέσα στον οποίο θα γίνει όλη η διαδικασία της εμφάνισης. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει τη μονιμοποίηση της πηκτής σε διάλυμα 10% οξικού οξέος για σαράντα πέντε λεπτά. Το δεύτερο βήμα περιλαμβάνει πλύσιμο με 10% αιθανόλη. Ακολουθεί προεπεξεργασία με 1% διχρωμικό κάλιο. Στο τέταρτο βήμα η πηκτή ξεπλένεται με δις αποσταγμένο νερό τρεις φορές για να απομακρυνθούν όλα τα εναπομείναντα άλατα.

Τα στάδια φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

**ΠΙΝΑΚΑΣ 12 : Διαδικασία εμφάνισης πηκτής πολυακρυλαμιδίου**

	<b>Διεργασία</b>	<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Διάρκεια (min)</b>
1° βήμα	Μονιμοποίηση	CH <sub>3</sub> COOH 10%	45
2° βήμα	Πλύσιμο	EtOH 10%	5
3° βήμα	Προεπεξεργασία	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 1,0g/lit+ πυκνό HNO <sub>3</sub> 0,4ml/lit	5
4° βήμα	Ξέπλυμα	ddH <sub>2</sub> O	2X3 φορές
5° βήμα	Εμποτισμός	AgNO <sub>3</sub> 4g/lit	40
6° βήμα	Ξέπλυμα	H <sub>2</sub> O	0,1
7° βήμα	Αναγωγή	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 40g/lit	2
8° βήμα	Σταμάτημα	CH <sub>3</sub> COOH 10%	5

Στο πέμπτο βήμα γίνεται πρόσδεση του αργύρου στις βάσεις του DNA για 40min. Στο έκτο βήμα ξεπλένεται ο άργυρος που δεν δεσμεύτηκε. Στο προτελευταίο βήμα γίνεται αναγωγή του αργύρου και η εμφάνιση. Τέλος η αντίδραση της εμφάνισης σταματά με 10% οξικό οξύ.

Τα σημεία που πρέπει να προσέξουμε είναι: δεν χρησιμοποιούμε ποτέ γάντια με πούδρα γιατί η σκόνη δημιουργεί περισσότερα ενεργά κέντρα για τον άργυρο και επομένως δεν γίνεται καλή εμφάνιση. Αποφεύγεται να χρησιμοποιούνται σιδερένια αντικείμενα ή σπάτουλες. Όλα τα σκεύη πριν την διαδικασία της εμφάνισης ξεπλένονται με πυκνό  $\text{HNO}_3$ . Ο άργυρος θεωρείται στοιχείο που επιβαρύνει το περιβάλλον για το λόγο αυτό πρέπει να μην απορρίπτεται απερίσκεπτα στην αποχέτευση.

#### ***4.5.δ. Σχολιασμός της μεθόδου εμφάνισης της πηκτής με $\text{AgNO}_3$***

Η τεχνική που εφαρμόστηκε χρησιμοποιεί το οξικό οξύ για την μονιμοποίηση της πηκτής. Στη συνέχεια το διχρωμικό κάλιο δημιουργεί τα ενεργά κέντρα στα οποία θα δεσμευτεί ο άργυρος. Στο πέμπτο βήμα ο άργυρος προσδένεται πάνω στο DNA. Το ανθρακικό νάτριο ανάγει τον άργυρο και συγχρόνως προκαλεί την εμφάνιση της πηκτής. Τέλος το οξικό οξύ σταματά την αντίδραση της αναγωγής πάνω στην πηκτή.

#### ***4.5.ε. Φωτογράφιση***

Λόγω της μεγάλης ευθραυστότητας της πηκτής λαμβάνεται ειδική μέριμνα για την μεταφορά της μέσα σε ειδικό δίσκο, μέχρι την κάμερα.

Η πηκτή φωτογραφίζεται με κάμερα digital (UVTEC CV-415.LS) σε λευκό φως. Στην κάμερα υπάρχει η δυνατότητα ρύθμισης όλων των παραμέτρων της φωτογράφισης μέσω ενός ειδικού προγράμματος που υπάρχει στον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος.



## **Δ.6. Η μέθοδος ARMS**

### **Δ.6.α. Γενικά για τη μέθοδο ARMS**

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αρχή, ότι ένας εκκινητής επιμηκώνεται και δίνει προϊόν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μόνον στην περίπτωση που έχει πλήρη ομολογία βάσεων με το υπό μελέτη DNA. Η έλλειψη προϊόντος αντίδρασης πιστοποιεί την ύπαρξη κάποιας μετάλλαξης.

### **Δ.6.β. Χρησιμοποίηση της μεθόδου ARMS για την ταυτοποίηση των τεσσάρων συνηθέστερων μεταλλάξεων του γονιδίου της β-σφαιρίνης**

Για κάθε δείγμα DNA έγιναν τέσσερις αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, οι οποίες περιείχαν ένα ζεύγος κοινών εκκινητών ( $C_3$ ,  $C_4$ ) για τον πολλαπλασιασμό ενός 861bp τμήματος του β-γονιδίου της σφαιρίνης (το οποίο αποτελεί και εσωτερικό πρότυπο για την αποδοτικότητα της αντίδρασης PCR) και ένα άλλο ζεύγος δύο εκκινητών, ένα κοινό ( $C_1$ ) και ένα ειδικό για κάθε μία από τις τέσσερις μεταλλαγμένες αλληλουχίες υπό εξέταση, όπως φαίνεται στον πίνακα 13. Ο εκκινητής ο οποίος είναι ομόλογος του μεταλλαγμένου DNA, σε συνδυασμό με τον κοινό εκκινητή, θα δώσει προϊόν αντίδρασης μόνο στην περίπτωση ύπαρξης της συγκεκριμένης μετάλλαξης στο δείγμα DNA.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 25μl, χρησιμοποιώντας δις απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 13

Τα ολιγονουκλεοτίδια εκκίνησης που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των τεσσάρων συνηθέστερων μεταλλάξεων στο β-γονίδιο με την μέθοδο ARMS

IVS-I-1	5'-tta aac ctg tct tgt aac ctt gat acg aat-3'
IVS-I-6	5'-tct cct taa acc tgt ctt cta acc ttc atg-3'
IVS-I-110	5'-acc agc agc cta agg gtg gga aaa tag agt-3'
Codon-39	5'-cag atc ccc aaa gga ctc aaa gaa cct gta-3'
Common C <sub>1</sub>	5'-acc tca ccc tgt gga gcc ac-3'
Common C <sub>3</sub>	5'-gag tca agg ctg aga gat gca gga-3'
Common C <sub>4</sub>	5'-caa tgt atc atg cct ctt tgc acc-3'

Ένα ζεύγος από τους κοινούς εκκινητές (C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>) χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά για έλεγχο επιτυχούς έκβασης της αντίδρασης, που αποτελεί και εσωτερικό πρότυπο. Το τμήμα που δίνει είναι 861 βάσεις.

Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι ακόλουθες:

- Ρυθμιστικό διάλυμα 50mM KCl, 20mM Tris-HCl pH8,4.
- dNTPs : 2mM (ισομοριακό μίγμα dATP, dTTP, dGTP, dCTP).
- Taq DNA polymerase : μία μονάδα (Gibco BRL).
- Γενομικό DNA: 300-500ng.
- Οι συγκεντρώσεις του Mg<sup>++</sup> και εκκινητών για την κάθε αντίδραση φαίνονται στον πίνακα 14. Επίσης φαίνονται οι κοινοί εκκινητές, το μέγεθος του τμήματος DNA που πολλαπλασιάζεται.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 14 : Είδος εκκινητών & συγκέντρωση εκκινητή και Mg

Εκκινητής	Κοινός εκκινητής	Συγκέντρωση εκκινητή (pmol/μl)	Συγκέντρωση Mg <sup>++</sup> (mM)	Μήκος (bp)
IVS-I-1	C <sub>1</sub> [C <sub>3</sub> -C <sub>4</sub> ]	10	3,5	281
IVS-I-6	C <sub>1</sub> [C <sub>3</sub> -C <sub>4</sub> ]	20	4,0	286
IVS-I-110	C <sub>1</sub> [C <sub>3</sub> -C <sub>4</sub> ]	10	3,0	390
Cd39	C <sub>1</sub> [C <sub>3</sub> -C <sub>4</sub> ]	5	3,0	436

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 25μl, χρησιμοποιώντας δις απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.

Το πρόγραμμα κυκλοποίησης είναι το ακόλουθο:

- Αποδιάταξη στους 95°C για 3min.
- Αποδιάταξη στους 94°C για 60 sec.
- Επανασύνδεση 65°C για 60 sec.
- Επέκταση 72°C για 90 sec.

Τα τρία στάδια της αποδιάταξης για 60 sec, της επανασύνδεσης και της επέκτασης, επαναλαμβάνονται για 25 κύκλους και τέλος ακολουθεί τελική επέκταση 72°C για 7 min. Τέλος η έκβαση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πιστοποιείται σε πηκτή αγαρόζης 1,8% (Ultra pure, Gibco BRL) που περιέχει 0,5mg/ml βρωμιούχο αιθίδιο.

#### **Δ.7. Η μέθοδος PAGE – Χρησιμοποίηση για την ταυτοποίηση της**

##### **ΔF508 μετάλλαξης του γονιδίου CFTR**

Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου είναι οι ακόλουθες:

#### **ΠΙΝΑΚΑΣ 15 : Σύσταση της πηκτής πολυακρυλαμιδίου στη μέθοδο PAGE**

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Όγκος</b>
50% acrylamide-bisacrylimide	4,8ml
5X TBE (Tris Boric Acid EDTA)	3ml
ddH <sub>2</sub> O	21,5ml
10% υπερθειϊκό αμμώνιο	630 μl
TEMED	70μl

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 8% πραγματοποιείται υπό σταθερή τάση 200V, για δύο ώρες και 45 λεπτά. Η ανίχνευση γίνεται με βρωμιούχο αιθίδιο 0,5mg/ml, σε ειδικό πλαστικό δίσκο, για 30 λεπτά.

#### **Δ.8. Η μέθοδος SSCP-χρησιμοποίηση για την ταυτοποίηση της ΔF508 μετάλλαξης του γονιδίου CFTR**

Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες (SSCP) είναι οι ακόλουθες.

#### **ΠΙΝΑΚΑΣ 16: Σύσταση της πηκτής πολυακρυλαμιδίου στη μέθοδο SSCP**

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Όγκος</b>
50% acrylamide-bisacrylimide	4,8ml
10X TPE (Tris Boric Acid EDTA)	6ml
ddH <sub>2</sub> O	18,73ml
10% υπερθειικό αμμώνιο	400μl
TEMED	70μl

Η ποσότητα PCR προϊόντος που φορτώνεται είναι 50ng.

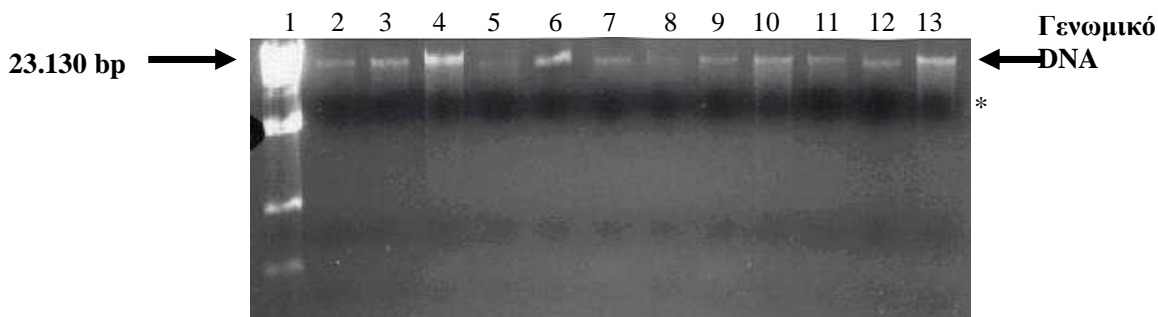
Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 8%, πραγματοποιείται σε 10 Watt σταθερά (τάση 180V), για τρεις ώρες. Η εμφάνιση γίνεται με νιτρικό άργυρο.

## Ε. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

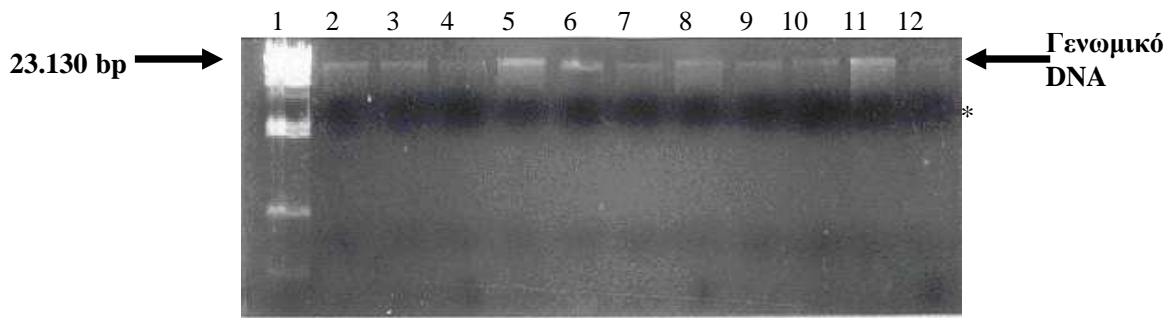
### β-Μεσογειακή Αναιμία

#### Ε.1. Απομόνωση DNA από ασθενείς με β-ΜΑ

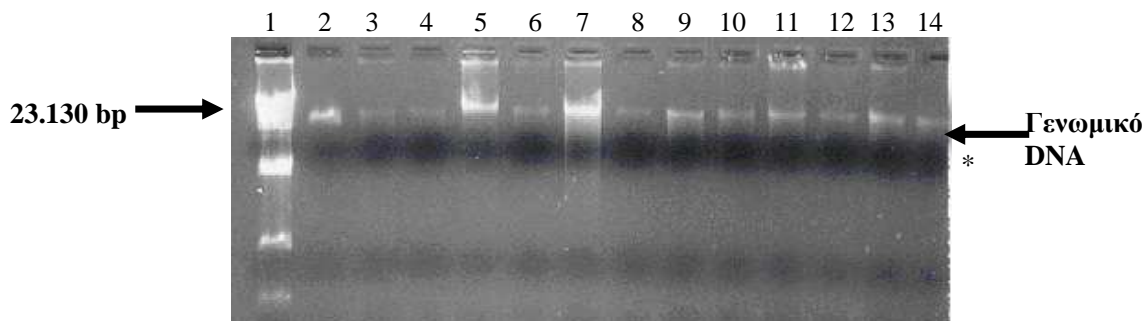
Γενομικό DNA απομονώθηκε από περιφερικό αίμα 40 ασθενών με β-ΜΑ, σύμφωνα με τη μέθοδο Δ.3.β και η ποιότητά του ελέγχθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Δ.3.ε, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για 30min (Σχήματα 24,25,27) ή 60min (Σχήμα 26). Ως δείκτης μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκε ο λ φάγος ο οποίος είχε επωασθεί με το περιοριστικό ένζυμο HindIII. Η μαύρη οριζόντια ζώνη που εμφανίζεται στις διαδρομές και σημειώνεται με αστεράκι (\*) οφείλεται στη χρωστική που βρίσκεται στο διάλυμα φόρτωσης.



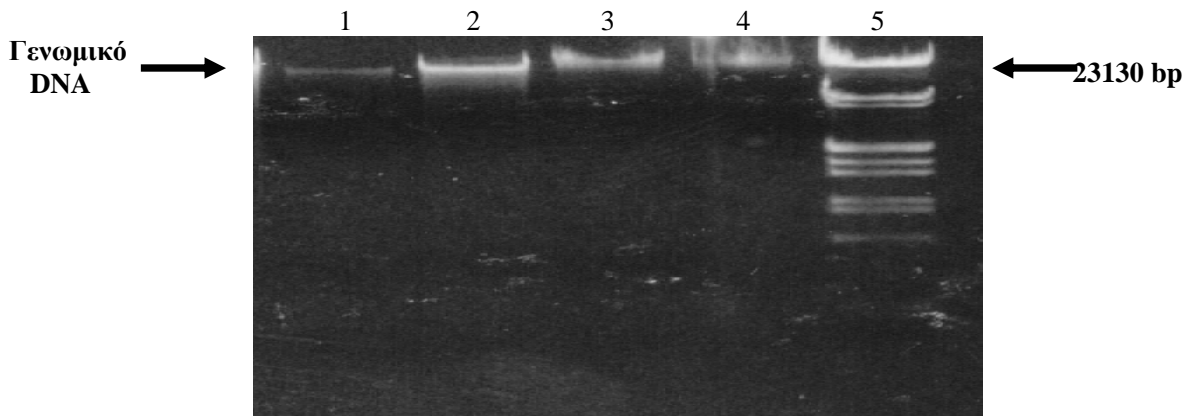
Σχήμα 24: Απομόνωση δειγμάτων DNA ασθενών με β-ΜΑ.  
**Διαδρομή 1**, δείκτης μοριακών βαρών (λ/HindIII).  
**Διαδρομές 2-13** δείγματα DNA ασθενών (1-12).



Σχήμα 25: Απομόνωση δειγμάτων DNA ασθενών με β-ΜΑ.  
**Διαδρομή 1**, δείκτης μοριακών βαρών (λ HindIII).  
**Διαδρομές 2-12** δείγματα DNA ασθενών (13-23).



Σχήμα 26: Απομόνωση δειγμάτων DNA ασθενών με β-ΜΑ.  
**Διαδρομή 1**, δείκτης μοριακών βαρών (λ HindIII).  
**Διαδρομές 2-14** δείγματα DNA ασθενών (24-36).



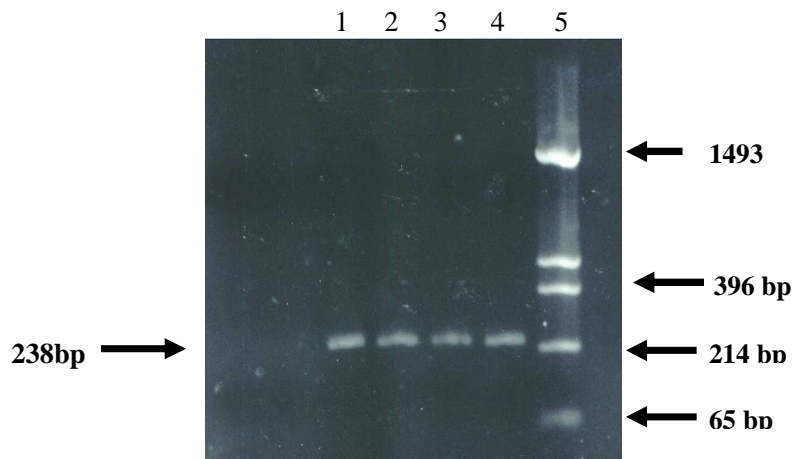
Σχήμα 27: Απομόνωση δειγμάτων DNA ασθενών με β-MA.  
**Διαδρομές 1-4** δείγματα DNA ασθενών (37-40).  
**Διαδρομή 5**, δείκτης μοριακών βαρών (Hind III).

Από τα ανωτέρω σχήματα εμφανίζεται ότι όλα τα δείγματα DNA που απομονώθηκαν ήταν υψηλού μοριακού βάρους και καθαρότητας, αλλά διέφεραν στην ποσότητα. Προσδιορισμός της ποσότητας των διαφόρων DNA από το  $A_{260}$  έδειξε ότι κυμαίνονταν από 3-4μg DNA/ml περιφερικού αίματος.

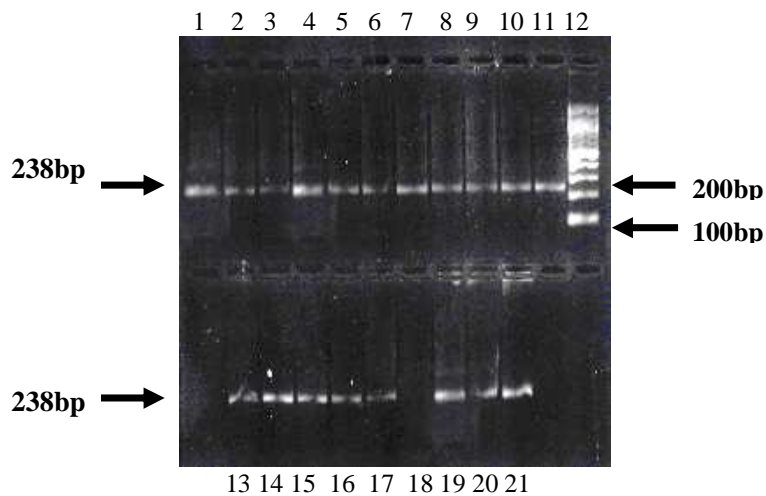
## **Ε.2. Πολλαπλασιασμός με PCR του γονιδίου της β-σφαιρίνης στα δείγματα DNA ασθενών με β-MA**

Τα σαράντα δείγματα DNA ασθενών β-MA πολλαπλασιάστηκαν με PCR (παράγραφος Δ.4.γ) και προέκυψε τμήμα 238bp που περιέχει την αλληλουχία όπου βρίσκονται οι τέσσερις συνηθέστερες μεταλλάξεις.

Μετά την αντίδραση PCR αναμένεται ο σχηματισμός ενός μόνο ειδικού προϊόντος που στην ηλεκτροφόρηση αντιστοιχεί σε μία ζώνη μεγέθους 238 bp. Το μέγεθος και η ποσότητα του προϊόντος ελέγχθηκε σε πηκτή αγαρόζης 2%. Ως δείκτες μοριακών βαρών χρησιμοποιήθηκαν : το πλασμίδιο PUC το οποίο επώασθηκε με το περιοριστικό ένζυμο Hinf I και ο ladder των 100bp (Σχήματα 28 α,β,γ,δ).

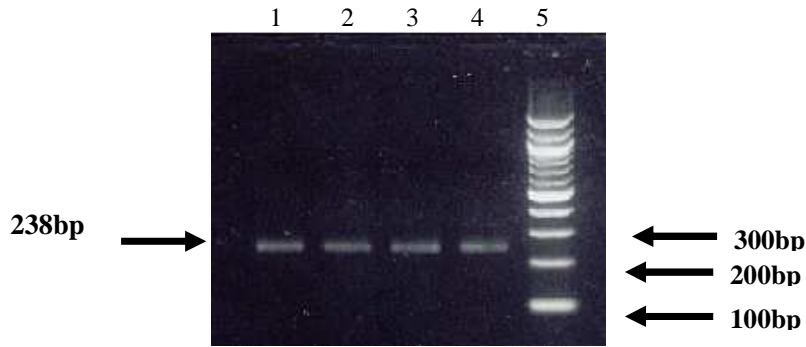


Σχήμα 28 α : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης 2%.  
**Διαδρομές 1-4** αντιστοιχούν σε προϊόντα PCR ασθενών (1-4).  
**Διαδρομή 5** δείκτης μοριακών βαρών (PUC/Hinf I)

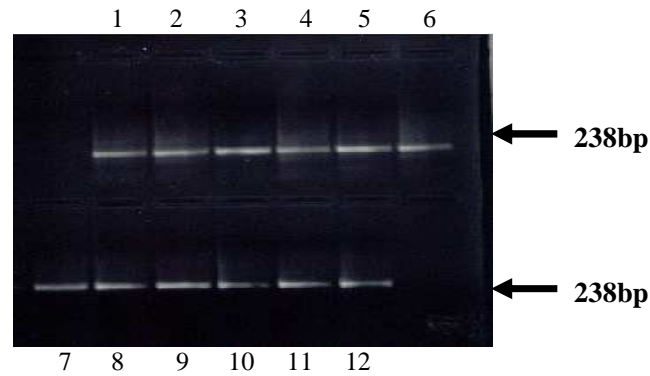


Σχήμα 28 β: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης 2%.  
**Διαδρομές :1-11 &13-21** αντιστοιχούν σε προϊόντα PCR ασθενών (5-24).  
**Διαδρομή :12** δείκτης μοριακών βαρών (100bp ladder).





Σχήμα 28 γ : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης 2%.  
**Διαδρομές 1-4** : αντιστοιχούν σε προϊόντα PCR ασθενών (25-28)  
**Διαδρομή 5**: δείκτης μοριακών βαρών(100bp ladder).



Σχήμα 28 δ : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης 2%.  
**Διαδρομές 1-12**: αντιστοιχούν σε προϊόντα PCR ασθενών (29-40)

Με εξαίρεση το DNA του ασθενή 21 (Σχήμα 28 β Διαδρομή 18) το οποίο δεν έδωσε προϊόν, σ' όλες τις άλλες διαδρομές η αντίδραση PCR δούλεψε πολύ καλά. Συγκρίνοντας τη ζώνη που προκύπτει από τα προϊόντα της PCR με αυτή του δείκτη μοριακών βαρών, παρατηρούμε ότι έχει το αναμενόμενο μέγεθος, δηλαδή είναι η ζητούμενη, χωρίς παραπροϊόντα.

Μετά την αντίδραση PCR τα προϊόντα καθαρίζονται με κολόνα της εταιρείας Qiagen και είναι έτοιμα για την SSCP.

### **E.3. Πειράματα για τη βελτιστοποίηση της διεξαγωγής της SSCP**

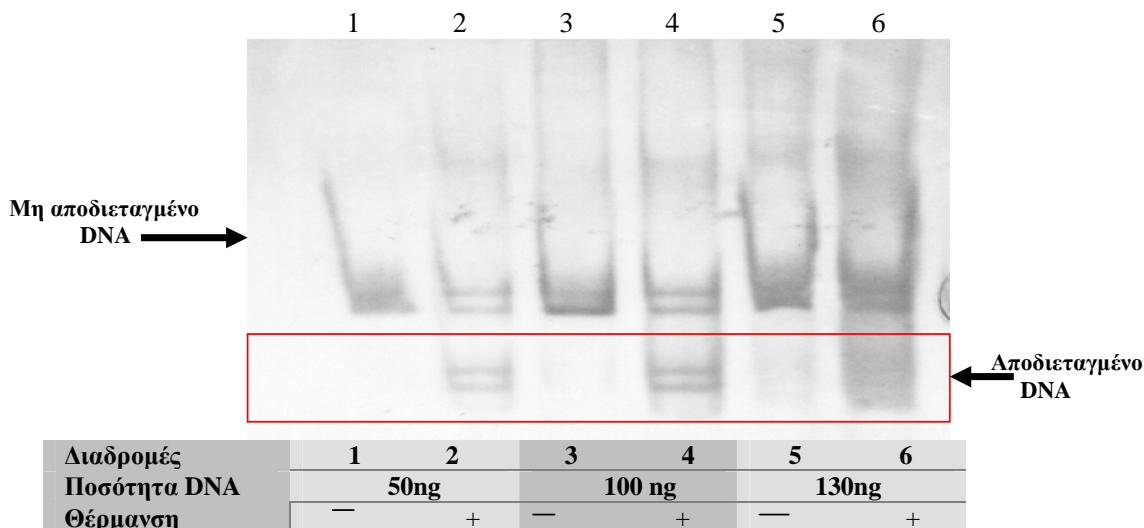
Για να καταλήξουμε στις καλύτερες δυνατές συνθήκες διεξαγωγής της SSCP, δεδομένης της ηλεκτροφορητικής συσκευής που διαθέτουμε, προσδιορίσαμε πειραματικά την ποσότητα DNA και αποδιατακτικού καθώς και τον χρόνο ηλεκτροφόρησης που μας δίνουν ευκρινή και επαναλήψιμα πρότυπα διαχωρισμού μονόκλωνων DNA.

#### ***E.3.a. Προσδιορισμός βέλτιστης ποσότητας φόρτισης DNA***

Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι κατά την ηλεκτροφόρηση της SSCP δεν έχουμε πλήρη αποδιάταξη του DNA και ότι μαζί με τα μονόκλωνα, εμφανίζονται και δίκλωνα μόρια. Κάναμε προσπάθειες να βρεθούν συνθήκες για να αυξηθεί το ποσοστό της αποδιάταξης και η ένταση των ζωνών που οφείλονται στα μονόκλωνα DNA. Τα πρώτα πειράματα που έγιναν ήταν για να ελεγχθεί η σχέση της ποσότητας φόρτισης DNA με το πρότυπο αποδιάταξης που λαμβάνεται, διότι έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι αυξημένες ποσότητες DNA μειώνουν την αποδιάταξη.

Από δύο υγιή άτομα δότες του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, απομονώθηκε DNA, πολλαπλασιάστηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και στην πηκτή της SSCP φορτώθηκαν διαφορετικές ποσότητες PCR προϊόντος (50ng, 100ng και 130ng). Οι ποσότητες αυτές φορτώνονται ανά δύο διαδρομές αφού έχουν υποστεί δύο διαφορετικές μεταχειρίσεις. Για κάθε ποσότητα DNA, αφού έχει προστεθεί το stop solution, ένα δείγμα δεν θερμαίνεται ενώ το άλλο υπόκειται σε θέρμανση στους 93°C παρουσία 65% φορمامιδίου, διαδικασία η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την αποδιάταξη

του DNA. Οι ζώνες που εμφανίζονται μετά την θέρμανση στην περίπτωση του υγιούς ατόμου (διαδρομές 2,4) είναι δύο, φαίνονται μέσα στο κόκκινο κυτρίο του Σχήματος 29 και οφείλονται στα μονόκλωνα DNA. Στη διαδρομή 6 φαίνεται ένα μεγάλο smear. Ακριβώς από πάνω, με μικρότερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα, εμφανίζονται ζώνες που οφείλονται στο μη αποδιαταγμένο DNA. Αυτό το συμπεραίνουμε διότι είναι οι μόνες ζώνες που υπάρχουν στα αθέρμαστα δείγματα και διότι με τη θέρμανση η ένταση των πάνω ζωνών μειώνεται καθώς η ένταση των κάτω ζωνών αυξάνεται. Παρατηρούμε ωστόσο ότι και με τις τρεις διαφορετικές ποσότητες DNA που δοκιμάσαμε η πλειονότητα των μορίων κινείται ως μη αποδιαταγμένο DNA, αλλά ότι με τις χαμηλότερες ποσότητες το ποσοστό αποδιάταξης είναι μεγαλύτερο (σύγκριση διαδρομών 2, 4 και 6 στο σχήμα 29).



Σχήμα 29: Επίδραση της ποσότητας DNA στη μέθοδο SSCP σε δείγμα DNA υγιούς ατόμου.

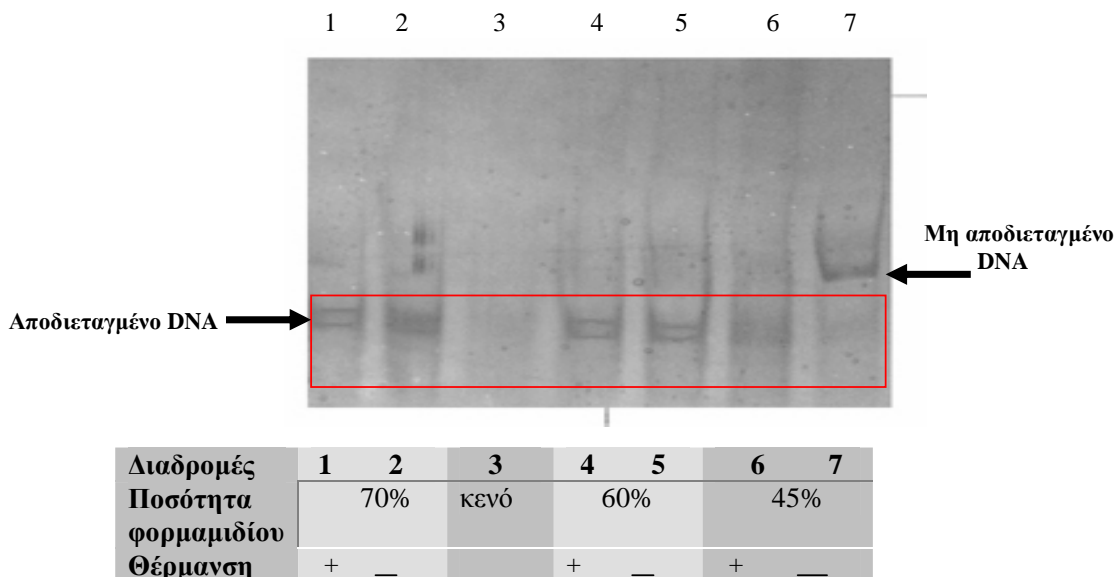
Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η καλύτερη ποσότητα για την διεξαγωγή της SSCP είναι 50-100ng PCR προϊόντος. Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε δύο φορές, με DNA από διαφορετικά άτομα, με πανομοιότυπα αποτελέσματα γεγονός που υποδηλώνει την επαναληψιμότητα της μεθόδου.

### ***E.3.β. Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης φορμαμιδίου***

Στη συνέχεια εξετάστηκε αν η ποσότητα του φορμαμιδίου<sup>170</sup> κατά την θέρμανση αυξάνει την αποδιάταξη.

Τα προϊόντα PCR από τα DNA των ίδιων ατόμων της παραπάνω παραγράφου, φορτώθηκαν στην πηκτή της SSCP. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε σταθερή ποσότητα DNA 50ng αλλά αυξανόμενες ποσότητες αποδιατακτικού παράγοντα (45%, 60% και 70% φορμαμιδίου, στον τελικό όγκο του μίγματος προς ηλεκτροφόρηση). Μέσα στο κόκκινο κυτρίο του σχήματος 30 φαίνονται οι δύο ζώνες του αποδιαταγμένου DNA. Ακριβώς από πάνω φαίνεται η ποσότητα του μη αποδιαταγμένου DNA.

Από τις διαδρομές 1,2 & 4,5 του σχήματος 30, βλέπουμε ότι η καλύτερη αποδιάταξη επιτυγχάνεται με ποσότητα αποδιατακτικού 60% & 70%. Επίσης είναι απαραίτητη και η θέρμανση για την εικόνα που βλέπουμε σ' αυτές τις διαδρομές. Παρατηρούμε ότι η παρουσία 45% φορμαμιδίου (Διαδρομές 6,7) δεν επιτυγχάνει καλή αποδιάταξη του DNA, λόγω της εμφάνισης του smear.

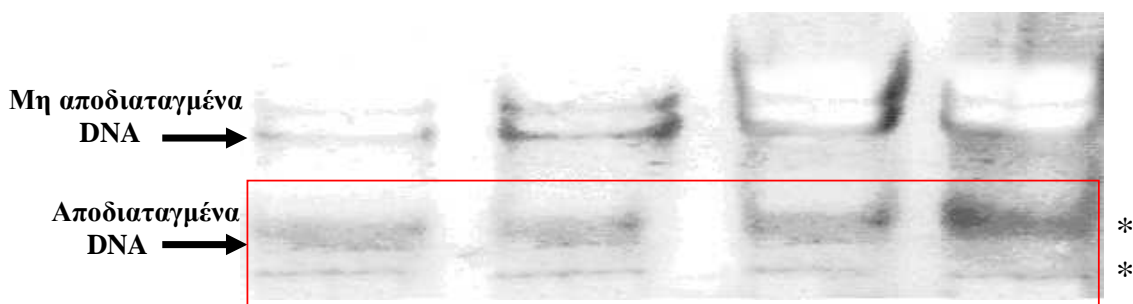


Σχήμα 30: Επίδραση της ποσότητας φορμαμιδίου στη μέθοδο SSCP σε δείγμα υγιούς ατόμου.

Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε δύο φορές, με DNA διαφορετικών ατόμων με πανομοιότυπα αποτελέσματα γεγονός που υποδηλώνει την Επαναληψιμότητα της μεθόδου.

### ***E.3.γ. Έλεγχος επαναληψιμότητας της μεθόδου SSCP σε υγιή άτομα***

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά δείγματα υγιών ατόμων στα οποία εφαρμόστηκε η μέθοδος της SSCP (Δ.5.γ). Τα πρότυπα διαχωρισμών που ελήφθησαν φαίνονται στο σχήμα 31.



Σχήμα 31: Έλεγχος επαναληψιμότητας μεθόδου SSCP σε υγιή άτομα

Ακριβώς το ίδιο πρότυπο διαχωρισμού προέκυψε, δύο φορές που επαναλήφθηκε η SSCP με αυτά τα δείγματα. Και τα τέσσερα δείγματα έδωσαν δύο ζώνες(\*) που αντιστοιχούν στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA (κόκκινο κυτίο).

### **E.3.δ. Βελτιστοποίηση μεγέθους και είδους πηκτής κατά την μέθοδο**

#### **SSCP**

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε μέγεθος πηκτής 10X7X2 cm, αλλά δεν έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, γιατί το πάχος της πηκτής δεν επέτρεπε την ομοιόμορφη ψύξη της, αλλά και το μικρό μέγεθός της δεν επέτρεπε την αποδιάταξη του DNA.

Η πηκτή MDE της Hydrolink, δεν έδωσε καλά αποτελέσματα, για το λόγο αυτό καταφύγαμε στη λύση του απλού πολυακρυλαμίδιου.

Τελικά οι διαστάσεις που καταλήξαμε ήταν 18X20X0,5 cm<sup>52</sup> και απλό πολυακρυλαμίδιο συγκέντρωσης 5%<sup>51</sup>

### **E.3.ε. Βελτιστοποίηση χρόνου ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού κατά την μέθοδο SSCP**

Εξετάστηκε εάν ο διαχωρισμός των ζωνών του αποδιαταγμένου DNA μπορούσε να γίνει πιο ευκρινής, με αύξηση του χρόνου ηλεκτροφόρησης.

Στα πειράματα παρατηρήθηκε ότι κατά την αύξηση του χρόνου (τέσσερις ή τρεις και μισή ώρες, αντί για τρεις ώρες) του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού, η απόσταση μεταξύ των ζωνών των μονόκλωνων DNA αυξήθηκε, αλλά παρουσιάζονταν πιο διάχυτες με αποτέλεσμα να μην μπορούν να ανιχνευθούν εύκολα.

### **E.3.ζ. Βελτιστοποίηση θερμοκρασίας & προσθέτων, ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού κατά την μέθοδο SSCP**

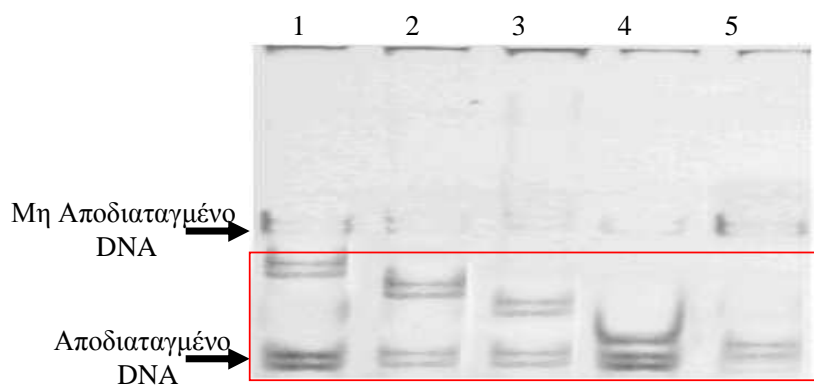
Οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν ήταν τόσο στους τέσσερις βαθμούς Κελσίου (4°C) όσο και στη θερμοκρασία δωματίου, με ή χωρίς γλυκερόλη. Από τις δύο θερμοκρασίες τελικά επιλέχθηκε αυτή των τεσσάρων βαθμών Κελσίου, χωρίς γλυκερόλη, διότι έδινε ένα πιο ευκρινές πρότυπο ζωνών.

### Ε.3.η. Βελτιστοποίηση εμφάνισης ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού κατά την μέθοδο SSCP

Για την επιλογή του τρόπου εμφάνισης της πηκτής δοκιμάστηκαν τόσο ο άργυρος όσο και το βρωμιούχο αιθίδιο. Τελικά επιλέχθηκε ο άργυρος, λόγω του ότι είναι πιο ευαίσθητος, ενώ για την ίδια ποσότητα DNA οι ζώνες δεν ήταν ορατές με βρωμιούχο αιθίδιο.

### Ε.4. Πρότυπα διαχωρισμών με SSCP δειγμάτων DNA φορέων β- Μεσογειακής Αναιμίας που φέρουν τις τέσσερις συνηθέστερες μεταλλάξεις

Για να διερευνήσουμε αν η μέθοδος SSCP μπορεί να εφαρμοσθεί και σε ετεροζυγώτες της β-Μεσογειακής Αναιμίας, προμηθευτήκαμε πρότυπα δείγματα DNA (controls), των τεσσάρων συνηθέστερων μεταλλάξεων. Ποσότητα 50ng των προϊόντων PCR που προήλθαν από τα δείγματα DNA, φορτώθηκαν στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Οι διαδρομές 1-4 αντιστοιχούν σε δείγματα ετεροζυγωτών, ενώ η διαδρομή 5 σε φυσιολογικό άτομο.



Σχήμα 32: Πρότυπα διαχωρισμού δειγμάτων φορέων β-ΜΑ, σε σχέση με υγιές άτομο με τη μέθοδο SSCP. **Διαδρομή 1:** IVS-I-1/Φυσιολογικό, **Διαδρομή 2:** IVS-I-6/Φυσιολογικό, **Διαδρομή 3:** codon39/ Φυσιολογικό, **Διαδρομή 4:** IVS-I-110/Φυσιολογικό, **Διαδρομή 5:** Φυσιολογικό

Παρατηρούμε ότι οι τρεις πρώτοι ετεροζυγώτες (Διαδρομές 1,2,3), εμφανίζουν τέσσερις διακριτές ζώνες διαφορετικής κινητικότητας, ενώ ο ετεροζυγώτης IVS-I-110/φυσιολογικό (διαδρομή 4) τρεις ζώνες. Το φυσιολογικό άτομο εμφανίζει δύο ζώνες. Συνεπώς είναι εύκολο να διακριθούν μεταξύ τους, τα δείγματα φυσιολογικών ατόμων και φορέων, στην περίπτωση του προγεννητικού ελέγχου, λόγω του ότι οι ζώνες με την μικρότερη κινητικότητα χαρακτηρίζουν τον ετεροζυγώτη. Επιπλέον το πρότυπο που προκύπτει από κάθε ετεροζυγώτη είναι διαφορετικό, επομένως μπορεί να ταυτοποιηθεί και ποια από τις τέσσερις συχνότερες μεταλλάξεις φέρει.

### **E.5. Πρότυπα διαχωρισμών (patterns) με SSCP δειγμάτων DNA**

#### **μαρτύρων (controls) που φέρουν γνωστούς συνδυασμούς των τεσσάρων συνηθέστερων μεταλλάξεων του β-γονιδίου**

Για να ελέγξουμε αν μία συγκεκριμένη μετάλλαξη θα δώσει ένα χαρακτηριστικό πρότυπο διαχωρισμού ζωνών μονόκλωνου DNA, χρησιμοποιήσαμε δείγματα DNA ασθενών οι οποίοι φέρουν γνωστές μεταλλάξεις (έχουν προσδιοριστεί με sequencing ή άλλη άμεση μέθοδο).

Για να βρούμε όλους τους θεωρητικούς συνδυασμούς των τεσσάρων πιο γνωστών μεταλλάξεων δημιουργήσαμε τον επόμενο πίνακα.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 17 : Συνδυασμοί των τεσσάρων συνηθέστερων μεταλλάξεων του γονιδίου της β-σφαιρίνης**

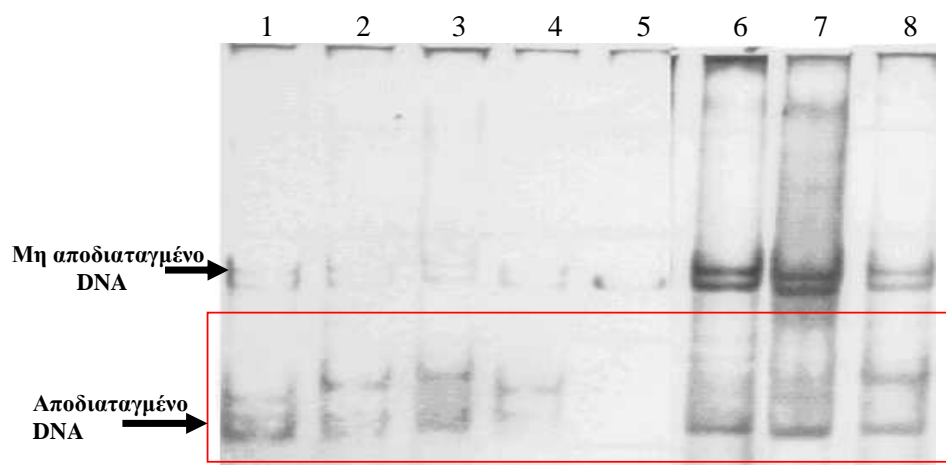
Είδος Μετάλλαξης	IVS-I-1	IVS-I-6	IVS-I-110	Codon 39
IVS-I-1	NAI	NAI	NAI	NAI*
IVS-I-6	NAI	NAI	NAI	OXI
IVS-I-110	NAI	NAI	OXI	OXI
codon 39	NAI**	OXI	OXI	OXI



Παρατηρούμε ότι από τους δεκαέξι δυνατούς συνδυασμούς, μόνο οι δέκα είναι μοναδικοί, διότι οι υπόλοιποι είναι οι επαναλήψεις των άλλων, π.χ. το IVS-I-1/codon 39\* είναι το ίδιο με το codon 39/ IVS-I-1\*\*. Με έντονα γράμματα φαίνονται στον πίνακα οι μοναδικοί συνδυασμοί.

Οι μάρτυρες που μπορέσαμε να βρούμε (δηλώνονται με ΝΑΙ στον Πίνακα 17) ήταν δέκα εκ των οποίων οι ακόλουθοι έξι αντιπροσωπεύουν μοναδικούς συνδυασμούς: IVS-I-1/codon 39, IVS-I-1/IVS-I-1, IVS-I-110/IVS-I-6, IVS-I-6/ IVS-I-6, IVS-I-110/ IVS-I-1, IVS-I-1/ IVS-I-6.

Ποσότητα 50ng από κάθε PCR προϊόν των ανωτέρω έξι μαρτύρων φορτώθηκαν στην πηκτή της πολυακρυλαμίδης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 33. Στο κόκκινο κιτίο φαίνονται τα πρότυπα διαχωρισμών (patterns). Ακριβώς από πάνω φαίνονται τα μη αποδιαταγμένα DNA.



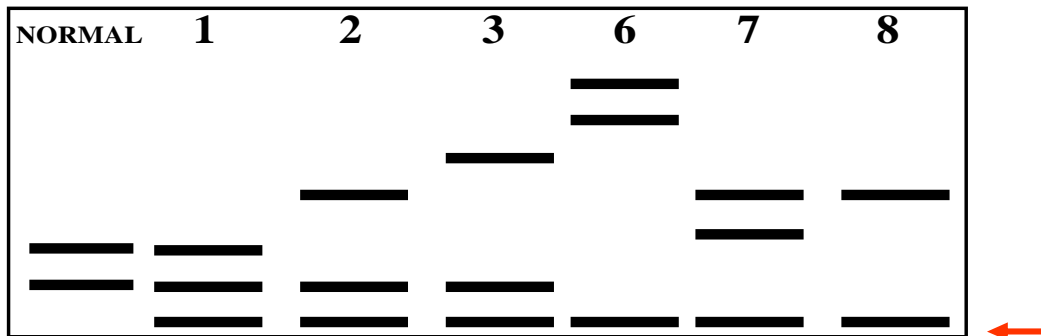
Μετάλλαξη	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>IVS-I-1</b>	+	++					+	+
<b>Codon-39</b>	+							
<b>IVS-I-110</b>			+				+	
<b>IVS-I-6</b>			+					+
<b>Φυσιολογικό</b>				++	++			

Σχήμα 33: Πρότυπα διαχωρισμού δειγμάτων μαρτύρων (controls) με τη μέθοδο SSCP. Οι γονότυποι των ατόμων από τα οποία προήλθαν τα δείγματα,

εμφανίζονται στον παραπάνω πίνακα. Η διαδρομή 5 αντιστοιχεί σε δείγμα υγιούς ατόμου που δεν θερμάνθηκε.

Δείχνοντας σχηματικά τα πρότυπα διαχωρισμών των έξι διαφορετικών δειγμάτων

μαρτύρων της SSCP έχουμε το επόμενο σχήμα.



Σχήμα 34: Πρότυπα διαχωρισμών (patterns) των δειγμάτων μαρτύρων, που φέρουν γνωστούς συνδυασμούς των τεσσάρων συνηθέστερων μεταλλάξεων. Σχηματική αναπαράσταση των προτύπων αποδιάταξης που ελήφθησαν στο πείραμα του σχήματος 33: Διαδρομή1: IVS-I-1/CODON 39, 2: IVS-I-1/IVS-I-1, 3: IVS-I-6/ IVS-I-110, 6: IVS-I-6/ IVS-I-6, 7: IVS-I-1/ IVS-I-110, 8: IVS-I-1/IVS-I-6] Το κόκκινο βέλος δείχνει την ζώνη με την μεγαλύτερη κινητικότητα.

Σχολιάζοντας τα πρότυπα διαχωρισμών, αυτό που εμφανίζεται αμέσως, είναι ότι υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ των υγιών και των παθολογικών δειγμάτων. Στα μεν υγιή δείγματα φαίνονται δύο ζώνες, στα δε παθολογικά φαίνονται τρεις ή δύο ζώνες διαφορετικής κινητικότητας. Συγκεκριμένα τα πρότυπα διαχωρισμού πέντε εκ των έξι παθολογικών δειγμάτων (IVS-I-1/codon 39, IVS-I-1/IVS-I-1, IVS-I-110/IVS-I-6, IVS-I-6/IVS-I-6, IVS-I-110/IVS-I-1) εμφανίζουν τρεις ζώνες. Αυτό σημαίνει είτε ότι τα μονόκλωνα DNA παίρνουν τρεις διαφορετικές διαμορφώσεις, είτε ότι ποσοστό των μονόκλωνων επανέρχονται στη δίκλωνη μορφή [σχηματισμός ετεροδιμερών (Heterodublex)]. Επιπλέον το πρότυπο διαχωρισμού των μονόκλωνων DNA είναι χαρακτηριστικό του συνδυασμού των δύο μεταλλάξεων, διότι η ύπαρξη μιας μετάλλαξης δεν αντιστοιχεί σε μία ζώνη χαρακτηριστικής κινητικότητας (Rf). Το πρότυπο

διαχωρισμού του έκτου παθολογικού δείγματος (IVS-I-1/ IVS-I-6) δίνει δύο ζώνες, που σημαίνει ότι παίρνει δύο μόνο διαμορφώσεις στις συγκεκριμένες συνθήκες.

Μία αλλαγή του προτύπου διαχωρισμού των μονόκλωνων DNA δημιουργείται λόγω του ότι τα PCR προϊόντα μπορεί να έχουν ή όχι, ένα νουκλεοτίδιο περισσότερο (αδερίνη) στον ένα κλώνο του DNA, συνεπώς το ίδιο προϊόν PCR θα δώσει τρεις διαφορετικές διαμορφώσεις<sup>50</sup>. Αναλυτικότερα, η Taq DNA πολυμεράση έχει την τάση να προσαρτά επιπλέον νουκλεοτίδια (συνήθως αδενοσίνες) στο 3' άκρο του δίκλωνου DNA. Αυτά τα προσαρτήματα μπορούν να απομακρυνθούν με επώαση των PCR προϊόντων με το ένζυμο Klenow DNA polymerase I. Έτσι τα μόρια των PCR προϊόντων είναι με ισοτελή άκρα, με αποτέλεσμα να απλοποιούν την εμφάνιση με νιτρικό άργυρο.

Η επίδραση της Klenow στα προϊόντα PCR, στην περίπτωση της β-σφαιρίνης έδειξε ότι δεν έχει επίδραση στα πρότυπα διαχωρισμού των μονόκλωνων DNA. Συνεπώς δεν χρησιμοποιείται στο πρωτόκολλο εργασίας της μεθόδου SSCP.

## **E.6. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων ομοζυγωτών β-ΜΑ**

Σε έξι δείγματα διπλών ετεροζυγωτών και ενός φυσιολογικού, εφαρμόστηκε επτά φορές η μέθοδος SSCP για να εξασφαλίσουμε την επαναληψιμότητα της μεθόδου αλλά και ότι τα πρότυπα διαχωρισμού που λαμβάνονται είναι στατιστικώς διαφορετικά μεταξύ τους.

Στον πίνακα 18 φαίνονται οι Rf των ζωνών (λόγος απόστασης που διέτρεξε η ζώνη προς την απόσταση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης), κατά την διεξαγωγή της SSCP.

Από τα πειραματικά δεδομένα, βλέπουμε ότι πέντε από τους έξι συνδυασμούς μεταλλάξεων χαρακτηρίζονται από τρεις ζώνες, από τις οποίες η πρώτη και η δεύτερη

παρουσιάζουν σημαντική διαφορά στην Rf, ενώ η τρίτη ζώνη είναι παρόμοια σε όλα τα πρότυπα.

Για την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό τεστ των Man-Whitney/Wilcoxon, με το πρόγραμμα SPSS.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 18: Πειραματικά δεδομένα προτύπων διαχωρισμού σε ασθενείς με β-MA

Είδος συνδυασμών Μεταλλάξεων		Rf						
		1 <sup>ο</sup> Πείραμα	2 <sup>ο</sup> Πείραμα	3 <sup>ο</sup> Πείραμα	4 <sup>ο</sup> Πείραμα	5 <sup>ο</sup> Πείραμα	6 <sup>ο</sup> Πείραμα	7 <sup>ο</sup> Πείραμα
<b>IVS-I-1/codon39</b>	1η Ζώνη	0.461	0.460	0.460	0,461	0,461	0,46	0,461
	2η Ζώνη	0.488	0.487	0.487	0,488	0,487	0,487	0,488
	3η Ζώνη	0.526	0.525	0.525	0,525	0,526	0,526	0,526
<b>IVS-I-1/ IVS-I-1</b>	1η Ζώνη	0.410	0.409	0.411	0,41	0,411	0,411	0,411
	2η >>	0.488	0.487	0.487	0,488	0,487	0,488	0,488
	3η >>	0.520	0.521	0.519	0.520	0.520	0.520	0.520
<b>IVS-I-6/IVS-I-110</b>	1η Ζώνη	0,391	0,391	0,39	0,391	0,391	0,391	0,39
	2η >>	0.493	0.492	0.492	0,492	0,493	0,493	0,492
	3η >>	0.520	0.522	0.520	0,521	0,52	0,521	0,521
<b>IVS-I-6/ IVS-I-6</b>	1η Ζώνη	0.330	0.331	0.330	0,331	0,33	0,331	0,33
	2η >>	0.375	0.375	0.375	0,375	0,374	0,375	0,375
	3η >>	0.520	0.519	0.521	0,52	0,52	0,52	0,52
<b>IVS-I-110/ IVS-I-1</b>	1η Ζώνη	0.410	0.411	0.410	0,411	0,411	0,411	0,411
	2η >>	0.438	0.438	0.438	0,438	0,438	0,438	0,437
	3η >>	0.519	0.520	0.521	0,52	0,52	0,52	0,52
<b>IVS-I-1/ IVS-I-6</b>	1η Ζώνη	0.420	0.420	0.420	0,42	0,42	0,42	0,42
	2η >>	0.520	0.521	0.521	0,52	0,521	0,52	0,52
<b>Normal</b>	1η Ζώνη	0.450	0.451	0.450	0,45	0,45	0,45	0,451
	2η >>	0.465	0.465	0.465	0,465	0,465	0,464	0,464

Η πρώτη ή πιο αργή ζώνη (αυτή με το μικρότερο Rf) κάθε συνδυασμού μεταλλάξεων συγκρίθηκε στατιστικά με την πρώτη ζώνη όλων των άλλων γονότυπων (ανά δύο). Επίσης η δεύτερη ζώνη κάθε συνδυασμού μεταλλάξεων, συγκρίθηκε στατιστικά με την δεύτερη ζώνη όλων των άλλων γονότυπων. Και στις δύο περιπτώσεις βρέθηκε ότι

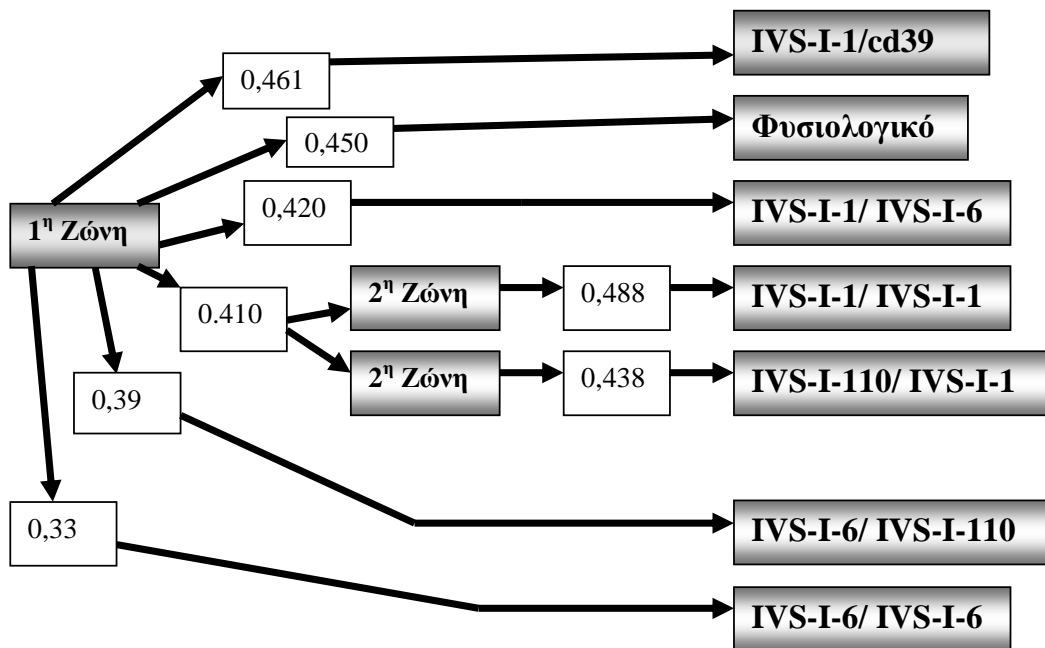
διαφέρουν μεταξύ τους σημαντικά με  $P < 0,001$ . Επομένως μπορούμε να διαχωρίσουμε όλους τους συνδυασμούς των μεταλλάξεων που φαίνονται στον προηγούμενο πίνακα βάσει της **πιο αργής ζώνης**. Οι ελάχιστες, μέγιστες και διάμεσες τιμές Rf της πιο αργής ζώνης του κάθε συνδυασμού μεταλλάξεων που προκύπτουν από τα επτά πειράματα, φαίνονται στον πίνακα 19.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 19** : Ελάχιστες και Μέγιστες τιμές Rf ζωνών που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση μεταλλάξεων στους επιλεγμένους γονότυπους.

Rf πιο αργής ζώνης	Rf δεύτερης αργής ζώνης	Γονότυπος
Min 0.33 Med 0.33 Max 0.331		IVS-I-6 / IVS-I-6
Min 0.39 Med 0.391 Max 0.391		IVS-I-6 / IVS-I-110
Min 0.41 Med 0.411 Max 0.411	Min 0.437 Med 0.438 Max 0.438	IVS-I-1 / IVS-I-110
Min 0.409 Med 0.411 Max 0.411	Min 0.487 Med 0.488 Max 0.488	IVS-I-1 / IVS-I-1
Min 0.42 Med 0.42 Max 0.42		IVS-I-1 / IVS-I-6
Min 0.45 Med 0.45 Max 0.451		Normal
Min 0.46 Med 0.461 Max 0.461		IVS-I-1 / codon 39

Παρατηρούμε λοιπόν ότι όλοι οι γονότυποι μπορούν να προβλεφθούν από μία χαρακτηριστική ζώνη. Εξαιρέση παρουσιάζουν οι γονότυποι IVS-I-1/IVS-I-1 και IVS-I-110/IVS-I-1 στους οποίους είναι απαραίτητη και η παρουσία και δεύτερης ζώνης για τον απόλυτο διαχωρισμό τους.

Όλα αυτά φαίνονται και σχηματικά παρακάτω:

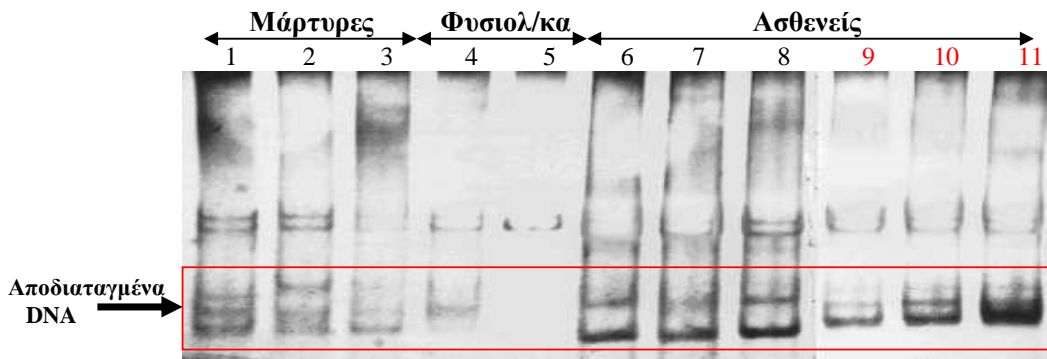


Σχήμα 35: Ταυτοποίηση συνδυασμών μεταλλάξεων σε σχέση με τις ζώνες.

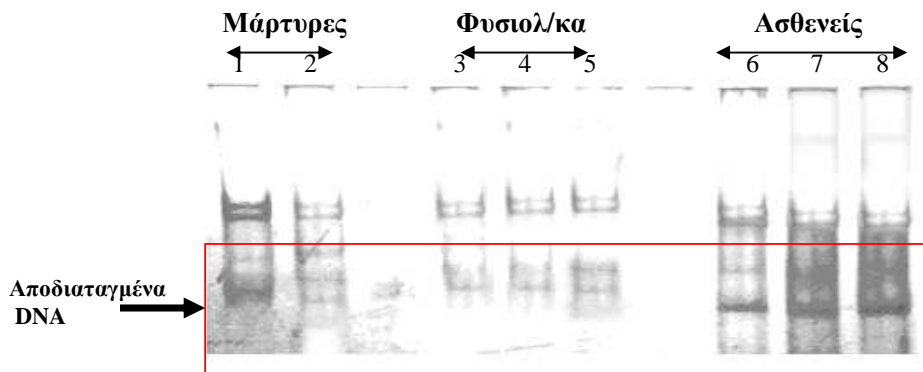
### **E.7. Πρότυπα διαχωρισμών με SSCP δειγμάτων DNA ασθενών με β- MA-Πρόβλεψη είδους μεταλλάξεων, μετά από σύγκριση με μάρτυρες**

Τα πρότυπα των γνωστών μαρτύρων χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη ύπαρξης των αντίστοιχων συνδυασμών μεταλλάξεων σε σαράντα δείγματα ασθενών του Περιφερειακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, με σύγκριση των προτύπων που αυτά δείχνουν. (Σχήματα 36,37,38,39,40). Στο κόκκινο κυτίο φαίνονται τα πρότυπα διαχωρισμών στην SSCP, των μονόκλωνων DNA.

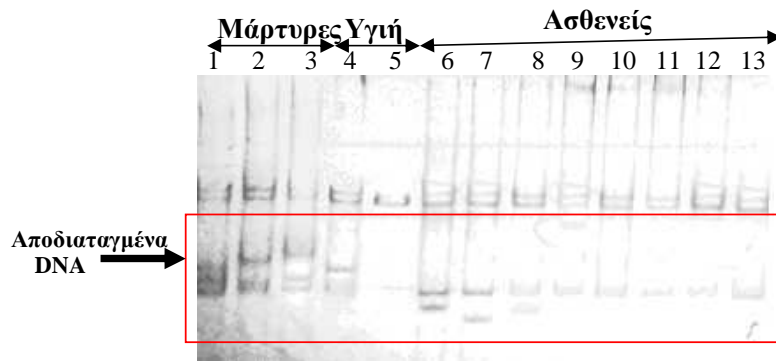
Σχόλιο [1]:



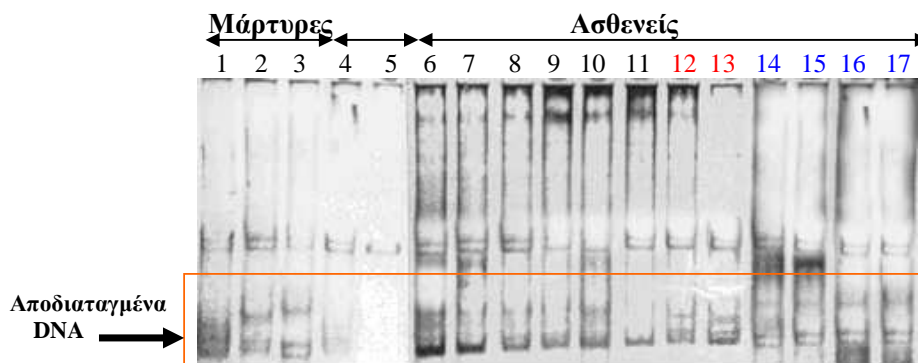
Σχήμα 36: Πρότυπα διαχωρισμού δειγμάτων ασθενών σε σύγκριση με δείγματα μαρτύρων (control) με τη μέθοδο SSCP.  
**Διαδρομές:** 1: IVS-I-1/codon-39, 2:IVS-I-1/IVS-I-1, 3:IVS-I-110/IVS-I-6, 4:φυσιολογικό, 5:αθέρμαστο δείγμα φυσιολογικό, 9-11: αλληλόμορφα ασθενών (1,2,3) 6-8:αλληλόμορφα ασθενών (4,5,6). Με κόκκινο φαίνονται οι ασθενείς για τους οποίους μπορεί να γίνει πρόβλεψη (παρόμοιος διαχωρισμός με μάρτυρα 1).



Σχήμα 37: Πρότυπα διαχωρισμού δειγμάτων ασθενών σε σύγκριση με δείγματα μαρτύρων (control) με τη μέθοδο SSCP.  
**Διαδρομές:** 1: IVS-I-1/cd-39, 2: IVS-I-1/IVS-I-1, 3-5: Φυσιολογικά, 6-8: αλληλόμορφα ασθενών (7-9).

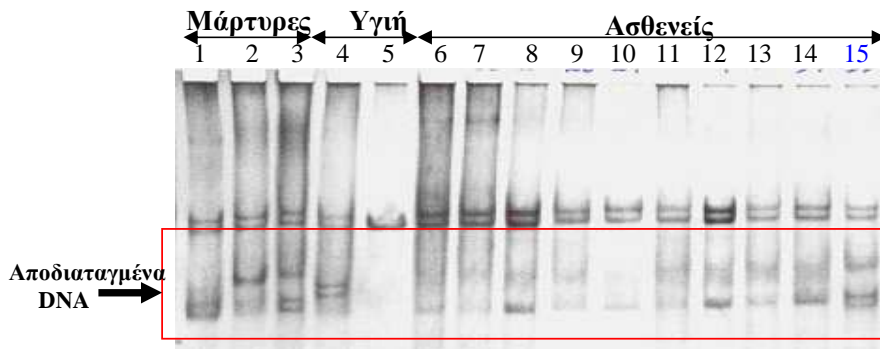


Σχήμα 38: Πρότυπα διαχωρισμού δειγμάτων ασθενών σε σύγκριση με δείγματα μαρτύρων (control) με τη μέθοδο SSCP.  
**Διαδρομές:** 1: IVS-I-1/cd-39, 2: IVS-I-1/IVS-I-1, 3: IVS-I-6/IVS-I-110, 4: Φυσιολογικό, 5: αθέρμαστο δείγμα, 6-13: αλληλόμορφα ασθενών (10-17).



Σχήμα 39: Πρότυπα διαχωρισμού δειγμάτων ασθενών σε σύγκριση με δείγματα μαρτύρων (control) με τη μέθοδο SSCP.  
**Διαδρομές:** 1:IVS-I-1/codon-39, 2: IVS-I-1/IVS-I-1, 3: IVS-I-6/IVS-I-110, 4: Φυσιολογικό, 5:αθέρμαστο δείγμα, 6-17: αλληλόμορφα ασθενών (20-31).Με κόκκινο και μπλε φαίνονται οι ασθενείς για τους οποίους μπορεί να γίνει πρόβλεψη. [(Κόκκινο: παρόμοιος διαχωρισμός με μάρτυρα 2) (Μπλε: παρόμοιος διαχωρισμός με μάρτυρα 3)]





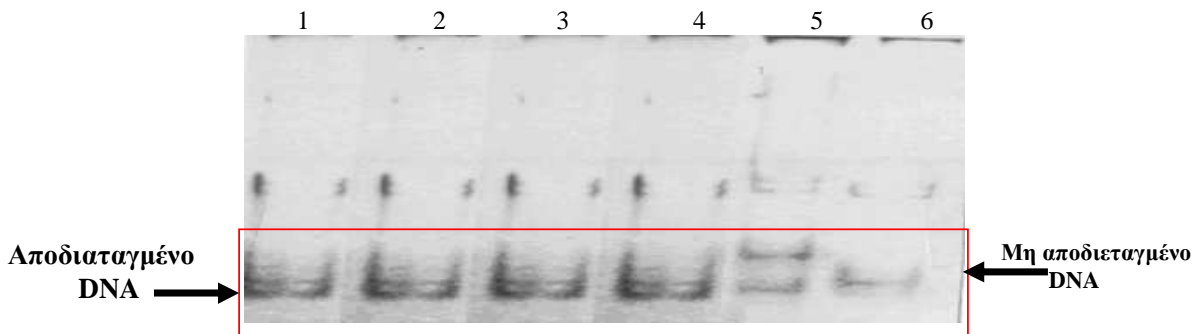
Σχήμα 40: Πρότυπα διαχωρισμού δειγμάτων ασθενών σε σύγκριση με δείγματα μαρτύρων (control) με τη μέθοδο SSCP.  
**Διαδρομές:** **1:** IVS-I-1/codon-39, **2:** IVS-I-1/IVS-I-1, **3:** IVS-I-6/IVS-I-110, **4:** Φυσιολογικό, **5:** αθέρμαστο δείγμα, **6-15:** αλληλόμορφα ασθενών (18,19 & 32-40). Με μπλε φαίνεται ο ασθενής για τον οποίο μπορεί να γίνει πρόβλεψη (παρόμοιος διαχωρισμός με μάρτυρα 3).

Από τα πρότυπα διαχωρισμού της SSCP των σαράντα δειγμάτων ασθενών που φαίνονται στα σχήματα 36-40, μετά από σύγκριση με τα πρότυπα μαρτύρων, έγινε η εξής πρόβλεψη σε δέκα : 1-3 & 26-27: διπλοί ετεροζυγώτες IVS-I-1/codon-39, 28-31 & 40: διπλοί ετεροζυγώτες IVS-I-6/IVS-I-110. Τα υπόλοιπα τριάντα δείγματα ασθενών δεν εμφάνισαν το ίδιο pattern με τα δείγματα μαρτύρων.

### Ε.7.α. Έλεγχος Επαναληψιμότητας της μεθόδου

Για να ελέγξουμε την Επαναληψιμότητα της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα ασθενών, στα οποία ήδη έχει γίνει πρόβλεψη με τη μέθοδο SSCP. Στο σχήμα 41 φαίνεται ότι οι διαδρομές 2,3,4 απεικονίζουν ασθενείς (1,2,3) που είναι διπλοί ετεροζυγώτες (codon-39/IVS-I-1). Τα δείγματα αυτών των ασθενών τα ξανατρέξαμε για να δούμε την κινητικότητα τους, σε σχέση με τρία δείγματα μαρτύρων (control): codon-39/IVS-I-1 (θετικός μάρτυρας), IVS-I-110/IVS-I-6 (αρνητικός μάρτυρας) και υγιές

(φυσιολογικό). Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 41. Μέσα στο κόκκινο κωτίο φαίνεται το αποδιαταγμένο DNA.



Δ	Ι	Α	Δ	Ρ	Ο	Μ	Ε	Σ
1	2	3	4	5	6			
Θετικός Μάρτυρας	Ασθενής	Ασθενής	Ασθενής	Αρνητικός Μάρτυρας	Φυσιολογικό			
Codon- 39/IVS-I-1				IVS-I- 110/IVS-I-6				

Σχήμα 41: Πρότυπα διαχωρισμού δειγμάτων ασθενών σε σύγκριση με δείγματα μαρτύρων (control) με τη μέθοδο SSCP.

Αν λοιπόν συγκρίνουμε τα πρότυπα διαχωρισμών (patterns) δειγμάτων των ασθενών στις διαδρομές 2,3,4 με αυτό των μαρτύρων (controls), θα εξάγουμε το συμπέρασμα ότι οι τρεις διαδρομές είναι όμοιες μόνο με τη διαδρομή 1, όπου έχουμε τον θετικό μάρτυρα. Συμπερασματικά λοιπόν επαληθεύεται η Επαναληψιμότητα της μεθόδου και το αποτέλεσμα της παραγράφου Ε7 (Σχήμα 36).

### **Ε.8. Επιβεβαίωση των προβλέψεων της SSCP για το είδος των μεταλλάξεων που φέρουν ασθενείς με β-MA με τη μέθοδο ARMS**

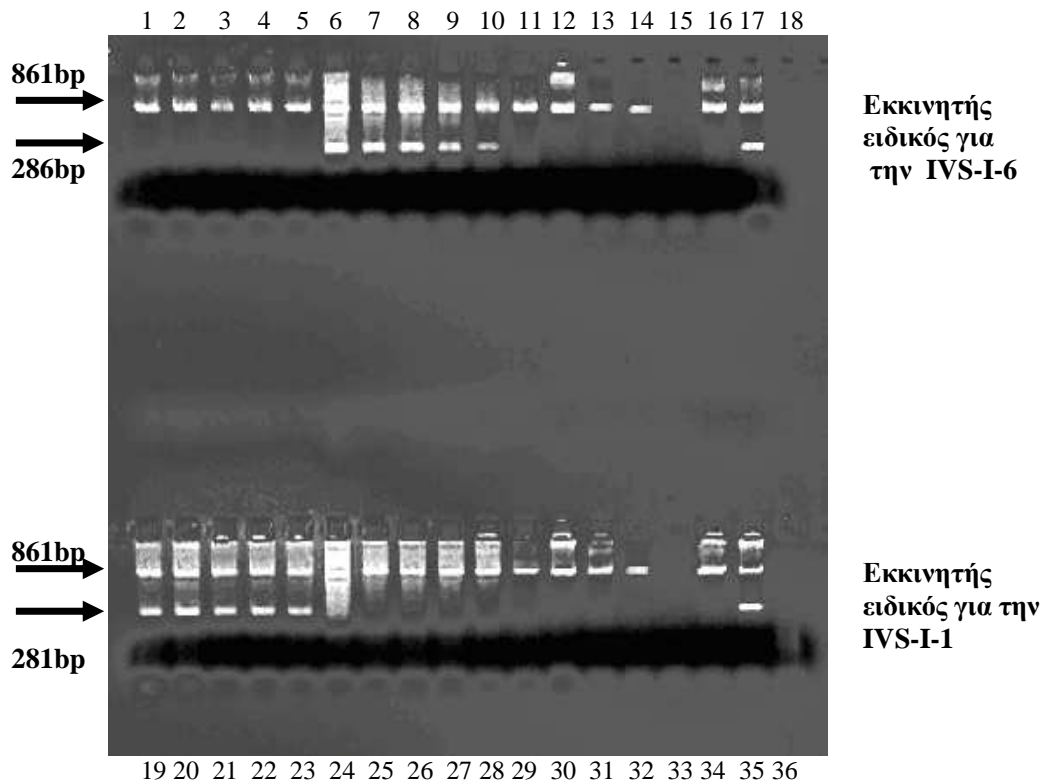
Για επιβεβαίωση της αξιοπιστίας της μεθόδου ελέγχθηκαν τα δέκα δείγματα ασθενών για τα οποία είχαμε πρόβλεψη από την μέθοδο SSCP (Α/Α 1-3,26-31,40 του Πίνακα 21) με μία άλλη άμεση μέθοδο προσδιορισμού μεταλλάξεων (ARMS). Επιπλέον

επιλέχθηκαν τυχαία και πέντε από τα τριάντα δείγματα ασθενών στα οποία δεν μπορούσε να γίνει πρόβλεψη (A/A 20-24 του Πίνακα 21), άρα δεν περιείχαν έναν από τους έξι συνδυασμούς μεταλλάξεων για τους οποίους είχαμε μάρτυρες.

Η μέθοδος ARMS εκτελέστηκε σύμφωνα με τη παράγραφο Δ.6. Οι πρώτες δεκαοκτώ αντιδράσεις αφορούν την μετάλλαξη IVS-I-6 (Σχήμα 42). Σ' αυτές, οι πρώτες δεκαπέντε αντιδράσεις έγιναν με δείγματα DNA ασθενών, ενώ οι τρεις τελευταίες, έγιναν με ένα δείγμα DNA υγιούς ατόμου (διαδρομή 16), ένα δείγμα DNA μάρτυρα (control) που φέρει την μετάλλαξη IVS-I-6 (διαδρομή 17) και η τελευταία αντίδραση έγινε χωρίς DNA (τυφλό) (διαδρομή 18). Στις δεκαπέντε πρώτες διαδρομές παρατηρούμε τα εξής: Στις διαδρομές 1-5 & 11-14 & 16 παρατηρούμε μόνο μία ζώνη που αντιστοιχεί σε τμήμα μήκους 861bp, το οποίο αποτελεί εσωτερικό πρότυπο και μας αποδεικνύει ότι η αντίδραση PCR δούλεψε κανονικά. Η έλλειψη άλλης ζώνης μας διαβεβαιώνει ότι τα δείγματα αυτά δεν έχουν την μετάλλαξη IVS-I-6. Τα υπόλοιπα δείγματα των διαδρομών 6-10 & 17 παρουσιάζουν δύο ζώνες. Η επιπλέον ζώνη η οποία αντιστοιχεί σε τμήμα μήκους 286bp είναι χαρακτηριστική της μετάλλαξης IVS-I-6 και μας διαβεβαιώνει ότι οι ασθενείς αυτοί φέρουν αυτή την μετάλλαξη. Όπως αναμένονταν, στο τυφλό (διαδρομή 18) δεν υπήρχε καμία ζώνη.

Προϊόν PCR δεν ελήφθη και με το δείγμα ασθενούς στη διαδρομή 15, που σημαίνει ότι πιθανόν το DNA δεν ήταν καθαρό και γι' αυτό η αντίδραση δεν δούλεψε. Η μαύρη σκιά δείχνει την παρουσία της χρωστικής του Bromophenol Blue και Xylene cyanol.

Οι υπόλοιπες αντιδράσεις 19-36 (Σχήμα 42) αφορούν τη μετάλλαξη IVS-I-1. Με το ίδιο σκεπτικό συμπεραίνουμε ότι οι διαδρομές 19-23 & 35 φέρουν την μετάλλαξη IVS-I-1, γιατί έχουν την χαρακτηριστική ζώνη των 281 βάσεων.



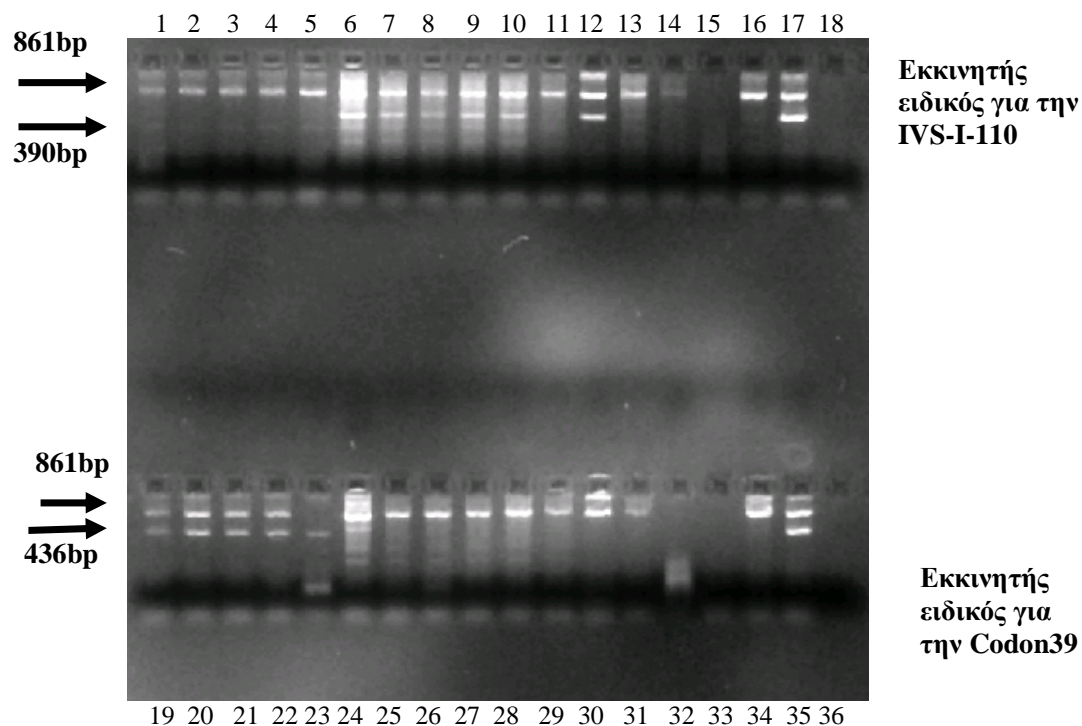
Σχήμα 42: Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός προϊόντων PCR με τη μέθοδο ARMS για ανίχνευση των IVS-I-6 & IVS-I-1 μεταλλάξεων.

Η διαδρομή 35 είναι δείγμα control που φέρει την μετάλλαξη IVS-I-1. Η διαδρομή 36 είναι χωρίς DNA. Τέλος η αντίδραση που αντιστοιχεί στο δείγμα 15 (διαδρομή 33) πάλι δεν δούλεψε.

Η συλλογιστική αυτή επαναλαμβάνεται και για τις υπόλοιπες μεταλλάξεις: την IVS-I-110 και cd-39. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 43.

Πάλι οι διαδρομές 18 και 36 αντιστοιχούν σε αντιδράσεις χωρίς DNA, οι διαδρομές 15 & 33 σε αντίδραση με DNA ασθενούς που δεν δίνει PCR προϊόν και οι διαδρομές 17 & 35 σε δείγματα μαρτύρων που φέρουν τις αντίστοιχες μεταλλάξεις IVS-I-110 & codon-39. Μπροστά από τη μαύρη σκιά (χρωστική του Bromophenol Blue και Xylene cyanol) φαίνεται η περίσσεια των εκκινητών.

Οι διαδρομές 11-15 & 29-33 των σχημάτων 42 & 43, αντιστοιχούν στα πέντε δείγματα ασθενών που δεν είχαμε πρόβλεψη με την μέθοδο SSCP. Αυτό που παρατηρούμε είναι ότι όλες δεν έχουν την δεύτερη χαρακτηριστική ζώνη των τεσσάρων συνηθέστερων μεταλλάξεων που διερευνήσαμε (επιβεβαίωση των προβλέψεων της SSCP). Μόνο η διαδρομή 12 του σχήματος 43 παρουσιάζει την ζώνη των 390 βάσεων που σημαίνει ότι φέρει την IVS-I-110 σε συνδυασμό όμως με μία μετάλλαξη εκτός των τεσσάρων συνηθέστερων.



Σχήμα 43: Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός προϊόντων PCR με τη μέθοδο ARMS για ανίχνευση των μεταλλάξεων IVS-I-110 & codon-39.

Συμπερασματικά λοιπόν (Σχήματα 42 & 43) μπορούμε να πούμε με σιγουριά ότι : στα δέκα δείγματα ασθενών, τα πέντε πρώτα (Σχήμα 42, Διαδρομές 19-23 & Σχήμα 43, Διαδρομές 19-23) είναι του τύπου IVS-I-1/Codon39 & τα άλλα πέντε (Σχήμα 42,

Διαδρομές 6-10 & Σχήμα 43, Διαδρομές 6-10) είναι IVS-I-110/ IVS-I-6. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν απόλυτα με τις προβλέψεις της SSCP. Για πέντε δείγματα των ασθενών που δεν είχαμε πρόβλεψη με την SSCP (A/A ασθενούς 20-24 Πίνακας 21) υπήρξε απόλυτη συμφωνία και με την ARMS (Σχήμα 42, Διαδρομές 11-15 & 29-33, Σχήμα 43, Διαδρομές 11-15 & 29-33) αποδεικνύοντας ότι δεν περιείχαν καμιά από τις τέσσερις συνηθέστερες μεταλλάξεις, στους συνδυασμούς των μαρτύρων που είχαμε διαθέσιμους.

Η αντιστοιχία των αντιδράσεων της μεθόδου ARMS (E.8 Σχήματα 42,43) και της μεθόδου SSCP (E.7 Σχήματα 36-40) είναι η ακόλουθη:

### ΠΙΝΑΚΑΣ 20: Αντιστοιχία δειγμάτων μεθόδων SSCP και ARMS

A/A Ασθενούς του πίνακα 21	SSCP	ARMS	Ευρεθείς Γονότυπος
1.	Σχήμα 36, Διαδρομή 9	Σχήμα 42 & 43 Διαδρομή 19	IVS-I-1/cd39
2.	Σχήμα 36, Διαδρομή 10	Σχήμα 42 & 43 Διαδρομή 20	IVS-I-1/cd39
3.	Σχήμα 36, Διαδρομή 11	Σχήμα 42 & 43 Διαδρομή 21	IVS-I-1/cd39
26.	Σχήμα 39, Διαδρομή 12	Σχήμα 42 & 43 Διαδρομή 22	IVS-I-1/cd39
27.	Σχήμα 39, Διαδρομή 13	Σχήμα 42 & 43 Διαδρομή 23	IVS-I-1/cd39
28.	Σχήμα 39, Διαδρομή 14	Σχήμα 42 & 43 Διαδρομή 6	IVS-I-6/IVS-I-110
29.	Σχήμα 39, Διαδρομή 15	Σχήμα 42 & 43 Διαδρομή 7	IVS-I-6/IVS-I-110
30.	Σχήμα 39, Διαδρομή 16	Σχήμα 42 & 43 Διαδρομή 8	IVS-I-6/IVS-I-110
31	Σχήμα 39, Διαδρομή 17	Σχήμα 42 & 43 Διαδρομή 9	IVS-I-6/IVS-I-110
40.	Σχήμα 39, Διαδρομή 15	Σχήμα 42 & 43 Διαδρομή 10	IVS-I-6/IVS-I-110

Στον πίνακα 21 βλέπουμε όλα τα αποτελέσματα του είδους της μετάλλαξης και τα ονοματεπώνυμα των ασθενών.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 21. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΙΔΟΥΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ  
ΑΣΘΕΝΩΝ**

A/A	Όνοματεπώνυμο (Αρχικά)	Είδος Μετάλλαξης	Είδος Μετάλλαξης
1.	Z.Γ	IVS-I-1	Codon-39
2.	A.Σ	IVS-I-1	Codon-39
3.	Θ.Α.	IVS-I-1	Codon-39
4.	M.A	--	--
5.	Σ.Α	--	--
6.	Σ.Ε	--	--
7.	M.E	--	--
8.	X.A	--	--
9.	A.A	--	--
10.	K.A	--	--
11.	M.Π	--	--
12.	K.Γ	--	--
13.	Δ.Σ	--	--
14.	T.Z	--	--
15.	K.X	--	--
16.	K.A	--	--
17.	N.Σ	--	--
18.	Γ.M	--	--
19.	Z.K	--	--
20.	Δ.Π	--	--
21.	O.H	--	--
22.	Π.Σ	--	--
23.	Π.Σ	--	--
24.	Φ.M	--	--
25.	Π.Γ	--	--
26.	Σ.Γ	IVS-I-1	Codon-39

27.	E.A	IVS-I-1	Codon-39
28.	Δ.Γ	IVS-I-6	IVS-I-110
29.	Κ.Α	IVS-I-6	IVS-I-110
30.	Θ.Ε	IVS-I-6	IVS-I-110
31.	Ο.Μ	IVS-I-6	IVS-I-110
32.	Π.Ρ	--	--
33.	Π.Θ	--	--
34.	Γ.Ε	--	--
35.	Κ.Φ	--	--
36.	Σ.Μ	--	--
37.	Β.Ε	--	--
38.	Β.Ε	--	--
39.	Π.Ι	--	--
40.	Τ.Ν	IVS-I-6	IVS-I-110

## **Κυστική Ίνωση**

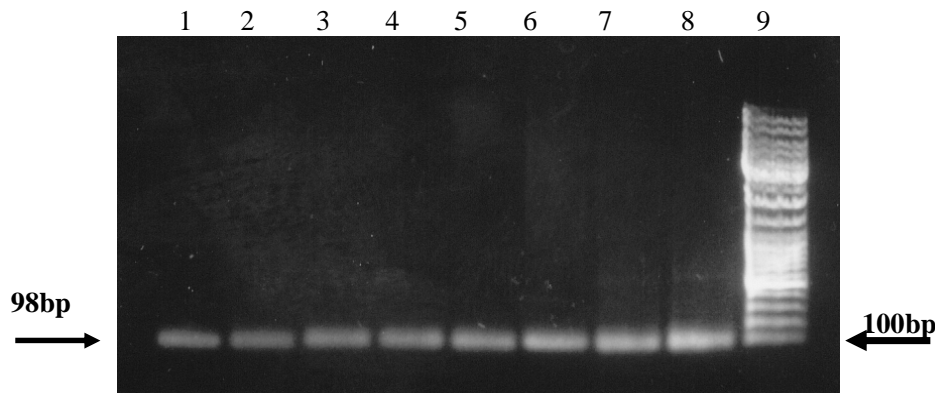
### **Ε.9. Πολλαπλασιασμός με PCR δειγμάτων DNA ετεροζυγωτών**

#### **και ομοζυγωτών για την ΔF508 μετάλλαξη του γονιδίου CFTR**

Τόσο για τα 3 άγνωστα δείγματα DNA, τα οποία ελήφθησαν από το κέντρο αναφοράς της Κυστικής Ίνωσης του Νοσοκομείου «Παιδών», καθώς επίσης και για 5 δείγματα μαρτύρων DNA (ένας ομοζυγώτης, δύο ετεροζυγώτες της ΔF508 μετάλλαξης και δύο φυσιολογικά), τα οποία ελήφθησαν από το ίδιο κέντρο, πραγματοποιήθηκε PCR αντίδραση. Μετά την αντίδραση PCR αναμένεται ο σχηματισμός ενός μόνο ειδικού προϊόντος που αντιστοιχεί σε μία ζώνη. Τα προϊόντα της αντίδρασης ελέγχθηκαν σε



πηκτή αραρόζης 3% και όλα έδωσαν μία ζώνη μήκους 98bp και μεγάλης καθαρότητας (Σχήμα 44).

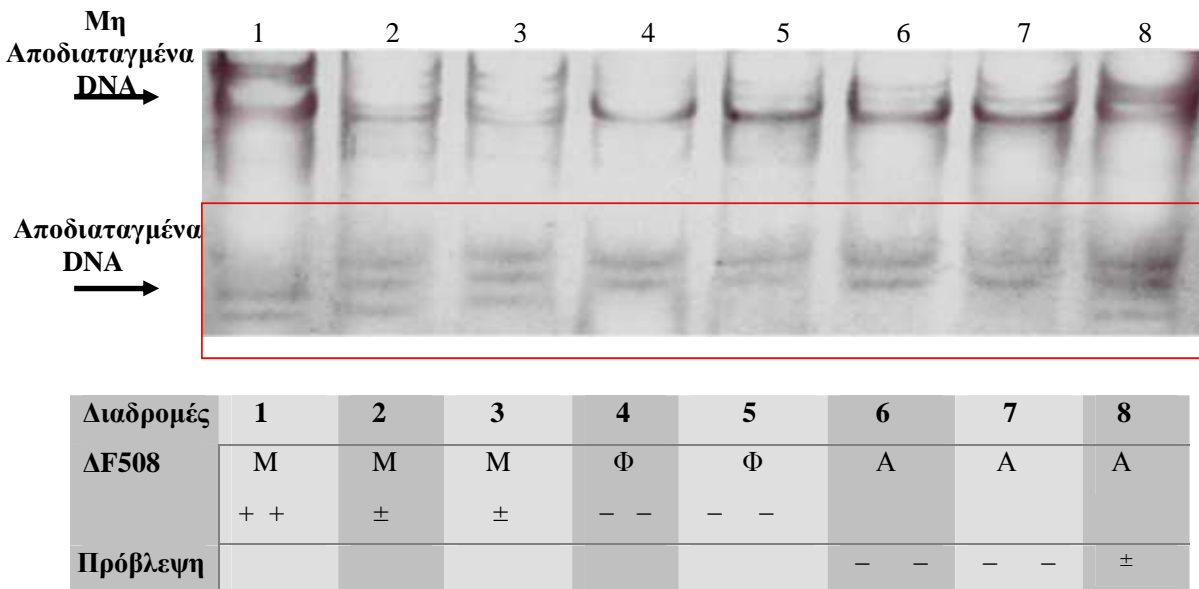


Σχήμα 44 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR τμήματος 98bp του γονιδίου της ΚΙ. Διαδρομές 1-8 αντιστοιχούν σε προϊόντα PCR οκτώ διαφορετικών DNA δειγμάτων. Διαδρομή 9 αντιστοιχεί σε δείκτη μοριακών βαρών (ladder mix).

#### **E.10. Πρότυπα διαχωρισμών με SSCP δειγμάτων DNA μαρτύρων**

**(ετεροζυγωτών και ομοζυγωτών για την ΔF508 μετάλλαξη του γονιδίου CFTR) καθώς και δειγμάτων DNA ατόμων που ενδέχεται να είναι ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες για αυτή τη μετάλλαξη**

Στα ανωτέρω οκτώ προϊόντα PCR φορτώθηκαν στην πηκτή και εφαρμόστηκε η μέθοδος SSCP. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 45. Τα πρότυπα διαχωρισμών των μονόκλωνων DNA της SSCP φαίνονται μέσα σε κόκκινο κωδείο, ενώ ακριβώς πάνω από αυτό τα μη αποδιαταγμένα DNA. Ο χρόνος ηλεκτροφόρησης ήταν τρεις ώρες.



Σχήμα 45: Πρότυπα διαχωρισμού προϊόντων PCR ατόμων με Κυστική Ίνωση με τη μέθοδο SSCP. M= Μάρτυρας, Φ= Φυσιολογικό, A= άγνωστο

Στη διαδρομή 1 (ομοζυγώτης ΔF508) φαίνονται καθαρά δύο ζώνες. Στη 2<sup>η</sup> & 3<sup>η</sup> διαδρομή (ετεροζυγώτες ΔF508) φαίνονται τρεις ζώνες, όπως και στην διαδρομή οκτώ (άγνωστο). Συνεπώς η διαδρομή αυτή αντιπροσωπεύει έναν ετεροζυγώτη της ΔF508.

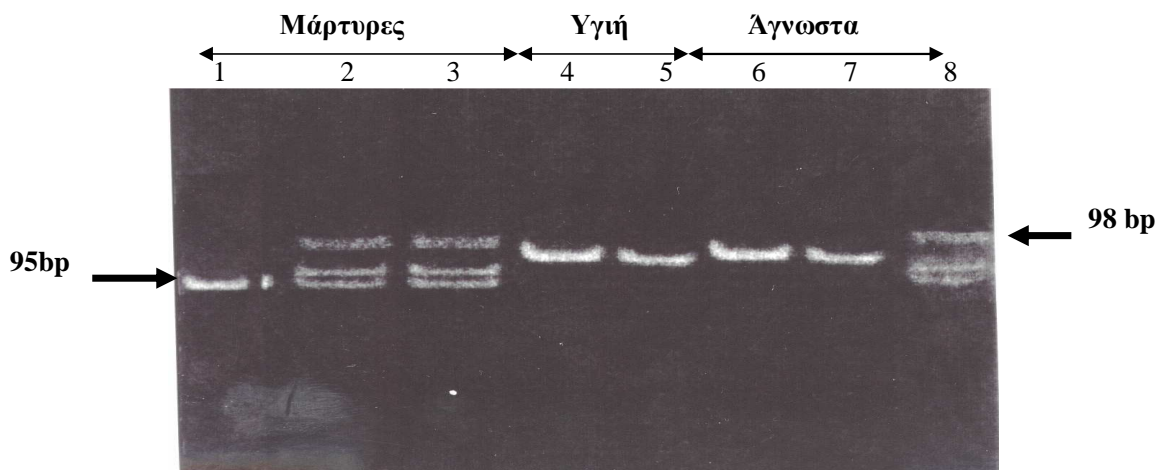
Στην 4<sup>η</sup> & 5<sup>η</sup> διαδρομή φαίνονται δύο ζώνες που αντιστοιχούν σε υγιή άτομα, όπως και στην 6<sup>η</sup> & 7<sup>η</sup> διαδρομή. Συμπερασματικά λοιπόν οι διαδρομές 6,7 δεικνύουν υγιή άτομα. Τα αποτελέσματα της SSCP θα επαληθευτούν και με την μέθοδο PAGE.

### **E.11. Επιβεβαίωση των προβλέψεων της SSCP για την ύπαρξη της ΔF508 μετάλλαξης στα άγνωστα δείγματα DNA με τη μέθοδο PAGE**

Η επιβεβαίωση έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 8% (PAGE). Ο διαχωρισμός μεταξύ φυσιολογικών ομοζυγωτών, ετεροζυγωτών της ΔF508 μετάλλαξης και ομοζυγωτών της μετάλλαξης είναι πολύ ευδιάκριτος (Σχήμα 46). Το

προϊόν PCR που προέρχεται από DNA ομοζυγών της ΔF508 μετάλλαξης (ΔF508/ΔF508 Διαδρομή 1) εμφανίζεται ως μια ζώνη μεγαλύτερης κινητικότητας σε σύγκριση με το προϊόν PCR που προέρχεται από DNA φυσιολογικών ομοζυγών (Φυσιολογικό/Φυσιολογικό Διαδρομές 4,5), όπως φαίνεται από τη μεταξύ τους απόσταση. Το προϊόν PCR των ΔF508/ΔF508 έχει μέγεθος 95 bp και των Φυσιολογικό/Φυσιολογικό 98 bp. Οι ετεροζυγώτες της ΔF508 μετάλλαξης εμφανίζουν τρεις ζώνες χαμηλότερης έντασης, όπως αναμενόταν (Διαδρομές 2,3). Οι δύο αντιστοιχούν στα φυσιολογικά και μεταλλαγμένα προϊόντα PCR [η μια ζώνη (φυσιολογική) μεγέθους 98bp και η άλλη (μεταλλαγμένη) μεγέθους 95bp]. Η τρίτη σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της PCR αντίδρασης και αντιστοιχεί σε ετεροδιμερή σύζευξη μεταξύ της φυσιολογικής και μεταλλαγμένης αλληλουχίας DNA του ετεροζυγώτη.

Αν λοιπόν συγκρίνουμε τις ζώνες των διαδρομών 6,7 του σχήματος 46, με τις ζώνες των διαδρομών 4,5, θα δούμε ότι και οι δύο αντιστοιχούν σε υγιή άτομα. Τέλος συγκρίνοντας τις ζώνες της διαδρομής 8 του σχήματος 46, με τις ζώνες των διαδρομών 2,3 του σχήματος 46, θα δούμε ότι συμπίπτουν και υποδεικνύουν άτομο ετεροζυγώτη της ΔF508 (ΔF508/Φυσιολογικό).



Σχήμα 46: Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της SSCP με την μέθοδο PAGE σε δείγματα ατόμων που ενδεχομένως φέρουν τη μετάλλαξη ΔF508.

**Διαδρομές 1:** ομοζυγώτης ΔF508 **2,3:** ετεροζυγώτες ΔF508, **4,5:** Υγιή, **6-8** Άγνωστα δείγματα.

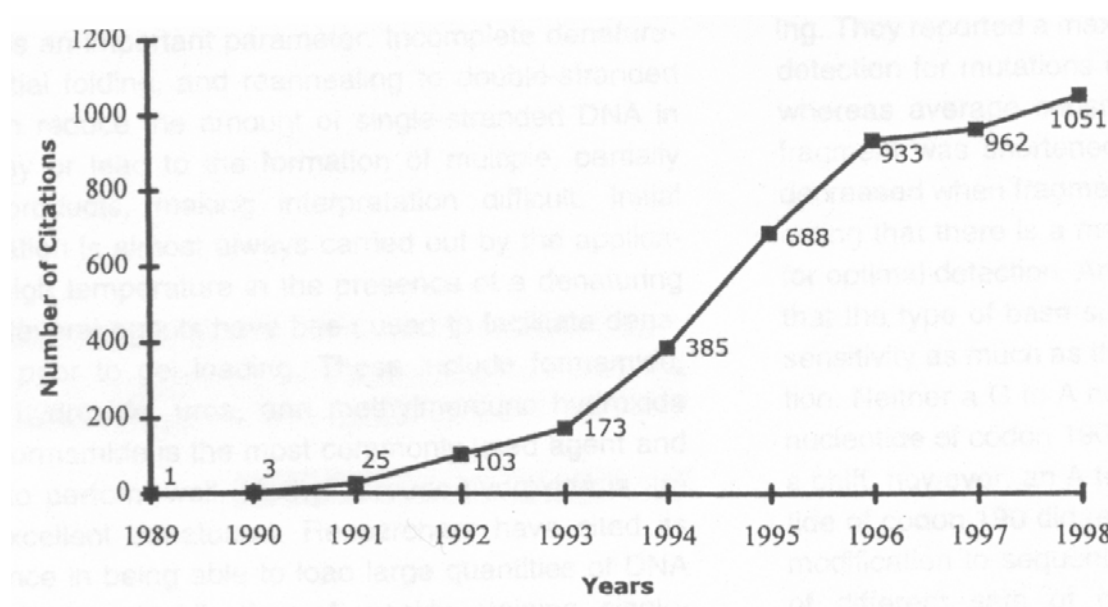
Συμπερασματικά λοιπόν τα αποτελέσματα της SSCP συμφωνούν απόλυτα με τα αποτελέσματα της PAGE.

## Z. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### Z.1. Ιατρικές εφαρμογές της SSCP

Οι εφαρμογές της SSCP είναι πάρα πολλές και συνεχώς μεγαλύτερης αποδοχής.

Σύμφωνα με το άρθρο του Arun J. Nataraj et al (1999), βλέπουμε ότι τα άρθρα που χρησιμοποιούσαν την SSCP το 1989 ήταν μόλις ένα<sup>118</sup>, ενώ το 1998 έφταναν τα 1051. (Σχήμα 47).



Σχήμα 47 : Αύξηση της χρήσης της SSCP στη δεκαετία 1989 έως 1998

Η μέθοδος SSCP εξάλλου προτείνεται από το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Ποιότητας Μοριακής Γενετικής [European Molecular Genetics Quality Network (EMQN)], σαν μία μέθοδος προσδιορισμού αγνώστων μεταλλάξεων. Οι άλλες δύο μέθοδοι που προτείνονται είναι η μέθοδος DGGE και η μέθοδος Sequencing. Ειδικά μάλιστα στις περιπτώσεις που δεν μπορεί να εφαρμοσθεί η DGGE [(δεν εφαρμόζεται σε περιπτώσεις υψηλής περιεκτικότητας σε βάσεις GC), αλλά και λόγω του ότι η SSCP είναι πολύ

ευαίσθητη στον προσδιορισμό απαλείψεων και ενθέσεων], επιβάλλεται η χρήση της SSCP (Best Practice Guidelines for carrier identification and prenatal diagnosis of haemoglobinopathies J. Traeger-Synodinos 2002)<sup>158</sup>. Η μέθοδος Sequencing χρησιμοποιείται για επιβεβαίωση των προβλέψεων, τόσο της DGGE όσο και της SSCP.

Οι τέσσερις κύριες εφαρμογές της SSCP στην Ιατρική είναι :

- ❖ Ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια καρκίνου.
- ❖ Ανίχνευση πολυμορφισμών.
- ❖ Άλλες εφαρμογές.
- ❖ Ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια γενετικών ασθενειών.

### **Z.1.α. Ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια καρκίνου**

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα ογκογονίδια K-Ras<sup>57,151,154</sup> και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια p53<sup>20,54,67,86,99,106,164</sup>, BRCA1<sup>47,53</sup>, BRCA2<sup>58</sup> και Rb (κληρονομικό ρετινοβλάστωμα).<sup>117</sup> Η απώλεια της λειτουργικότητας, των καρκινικών ογκοκατασταλτικών γονιδίων (tumor-suppressor genes), περιπλέχθηκε με την ογκογένεση. Έτσι ποικίλες μεταλλάξεις (απαλείψεις ή ενθέσεις) σ' αυτά τα γονίδια, πιθανόν να αντιπροσωπεύουν σημαντικές αλλαγές στα καρκινικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό οι ερευνητές εξερευνούν όλη την αλληλουχία αυτών των γονιδίων. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε μη αποδιατακτική πηκτή [ανάλυση διαμόρφωσης μονόκλωνο DNA (SSCP)] αποτελεί μία γρήγορη και απλή μέθοδο για την ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια καρκίνου.

### **Z.1.β. Ανίχνευση πολυμορφισμών**

Στην *ανίχνευση πολυμορφισμών* αναφέρονται τα εξής γονίδια: η δεαμινάση της αδενοσίνης<sup>49</sup>, η λευκωματίνη ορού<sup>49</sup>, η α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη<sup>49</sup>, η απολίποπρωτεΐνη<sup>49</sup>,

η ερυθροποιητίνη<sup>49</sup>, η γαστρίνη<sup>49</sup>, η ιντερλευκίνη 1α, ο υποδοχέας της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης<sup>146</sup>, ο D<sub>2</sub> υποδοχέας της ντοπαμίνης<sup>27</sup>, ο μεταφορέας της γλυκόζης (GLUT4)<sup>111</sup>, το β-γονίδιο της σφαιρίνης και ο υποδοχέας του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα 1 (IGFR-1)<sup>49</sup>. Η δομή ενός χάρτη σύνδεσης (linkage map) που είναι μεγάλης λεπτομέρειας αλλά και ακρίβειας, εξαρτάται από τον αριθμό των διαθέσιμων πολυμορφικών σημείων, αλλά και τις πληροφορίες αυτών. Η μόνη μέθοδος που ήταν διαθέσιμη μέχρι σήμερα ήταν η RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism-παράγραφος Γ.3). Με την μέθοδο της PCR-SSCP έχουν βρεθεί ποικίλοι πολυμορφισμοί και ακόμη ένα όπλο έχει προστεθεί στην ανίχνευση των πολυμορφισμών.

### **Z.1.γ. Άλλες εφαρμογές**

Η χρήση της PCR-SSCP μεθόδου, βοήθησε στην εύρεση της θέσης των μεταλλάξεων σε βακτηριακά γονίδια, πολύ γρήγορα. Τέτοια γονίδια είναι το *gyrA* του *B. subtilis*, το *dive* του *E.coli*, το *proB* του *Mycobacterium tuberculosis*. Η μέθοδος έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για εντοπισμό μεταλλαγμένων αλληλουχιών στον ιό της ηπατίτιδας C<sup>89</sup> και στον papillomavirus type 16<sup>4</sup>. Τέλος έχει χρησιμοποιηθεί σε ανίχνευση μιτοχονδριακών μεταλλάξεων<sup>65,85</sup> όπως το LHON (Οπτική κληρονομική νευροπάθεια του Leber).

### **Z.1.δ. Ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια που αφορούν γενετικές**

#### **ασθένειες**

Η SSCP έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια που αφορούν τις εξής γενετικές ασθένειες: την νευροϊνωμάτωση (NF1)<sup>26</sup>, την οικογενή πολυποδίαση (APC)<sup>45</sup>, το XY θήλυ (SRY)<sup>16</sup>, το σύνδρομο Marfan (γονίδιο

φιλιμπρίνης)<sup>30</sup>, την υπερκαλιμική περιοδική παράλυση (SCN4A)<sup>37</sup>, τον όγκο του Wilms (WT1)<sup>125</sup>, την κυστική ίνωση (CFTR)<sup>44</sup>, την υπερτριγλυκεριδαιμία [λιποπρωτεϊνική λιπάση (LP)]<sup>138</sup>, την ασθένεια Tay-Sachs τύπου B1 (το γονίδιο της α-υπομονάδας της β-εξοζαμινιδάσης)<sup>3</sup>, την φαινυλκετονουρία (το γονίδιο της υδροξυλάσης της φαινυλαλανίνης, PAH)<sup>22</sup>, την αιμοφιλία B (γονίδιο του παράγοντα IX)<sup>116</sup>, την ραχίτιδα [εξαρτώμενη από τη βιταμίνη D-τύπος 2, (VDR)]<sup>156</sup>, την retinitis pigmentosa (γονίδιο ροδοψίνης)<sup>17</sup>, την ασθένεια Pelizaeus Mertzacher (το γονίδιο της πρωτεολιπιδικής πρωτεΐνης), την αιμοχρωμάτωση, την νόσο Alzheimer και την αιμοφιλία A (γονίδιο του παράγοντα VIII). Η ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια γενετικών ασθενειών είναι κλινικά σημαντική κυρίως για προγενετικό έλεγχο.

Η SSCP έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στην ανίχνευση μεταλλάξεων σε ένζυμα και ορμόνες, όπως το μεταλλαγμένο γονίδιο της ανθρώπινης γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH)<sup>97</sup>, η αφυδρογονάση της ακεταλδεΐδης (ALDH<sub>2</sub>) σε μελέτες αλκοολισμού<sup>173</sup>, η περιφερίνη (RDS)<sup>68</sup>, η γλυκοκινάση (GCK)<sup>18</sup> και η ωχροποιητική ορμόνη (LH)<sup>139</sup>.

Στη συνέχεια περιγράφεται η χρήση της SSCP στο γονίδιο της β-σφαιρίνης. Οι εργασίες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα είναι οι ακόλουθες.

Η εργασία του Agarwal S. & Gupta A. (2003), που περιγράφεται στο περιοδικό *Molecular Pathology*<sup>5</sup>, περιγράφει την ανίχνευση αγνώστων μεταλλάξεων σε όλο το β-γονίδιο, με τη χρήση τριών συστημάτων (Phast gels, MDE gels, πηκτές πολυακρυλαμίδης) κάθετης ηλεκτροφόρησης. Οι συγγραφείς χρησιμοποιούν την μέθοδο SSCP και σαν μέθοδο επιβεβαίωσης την εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA (sequencing). Από τα τρία συστήματα υποδεικνύουν ότι τα καλύτερα είναι το Phast-gel και οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου.

Ένα άλλο άρθρο του Glavac D. et al (2002), που αναπτύσσεται στο περιοδικό *Human Mutation*<sup>41</sup>, περιγράφει πολλές μεταλλάξεις του προαγωγέα του β-γονιδίου



μεγέθους 52 bp έως 193 bp. Πιο συγκεκριμένα το άρθρο προσπαθεί να διαλευκάνει αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ενέργειας, της δευτεροταγούς δομής των δύο συμπληρωματικών κλώνων του DNA και των ζωνών που δίνουν αυτές στην φθορίζουσα τριχοειδή ηλεκτροφόρηση της SSCP (CE-SSCP), τόσο για υγιή όσο και για μεταλλαγμένα αλληλόμορφα. Τελικά μόνο για τα μικρά τμήματα από 50bp έως 100 bp μπορεί να προσδιοριστούν οι συνθήκες (θερμοκρασία) που μπορεί να πετύχει η μέθοδος SSCP.

Η εργασία του Teschauer W. et al (1996), που περιγράφεται στο περιοδικό Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.<sup>157</sup>, περιγράφει, ποιες πρέπει να είναι οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης, του πολυακρυλαμιδίου και η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων του Buffer, της γλυκερόλης και του πολυακρυλαμιδίου, στα γονίδια του p53 και της β-σφαιρίνης, για την ανίχνευση αγνώστων μεταλλάξεων με τη μέθοδο SSCP.

Η εργασία του Braun A. et al (1995), που αναπτύσσεται στο περιοδικό Human Genetics<sup>21</sup>, περιγράφει την διασπορά του IVS-II-666 πολυμορφισμού σε πληθυσμούς της Γερμανίας και του Καμερούν με την μέθοδο SSCP. Η συχνότητα των αλληλομόρφων ήταν 0,86 για το T και 0,14 για το C για την νότια Γερμανία. Η μέθοδος SSCP επιβεβαιώνεται και με την εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA (Sequencing).

Η εργασία του Asako Takahashi-Fujii et al (1994), αναπτύσσεται στο περιοδικό Molecular and Cellular Probes<sup>155</sup>. Πιο συγκεκριμένα προσδιορίζονται οι μεταλλάξεις που βρίσκονται από τον προαγωγέα μέχρι το δεύτερο εξόνιο του β-γονιδίου. Οι εκκινητές είναι επισημασμένοι με Ροδαμίνη X και έτσι όταν τα PCR προϊόντα αποδιατάσσονται στην SSCP, είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με φθορισμό (Fluorescence). Τέλος προτείνουν ότι η μέθοδος ανίχνευσης μεταλλάξεων με φθορισμό (Fluorescence-based PCR-SSCP), είναι καλύτερη από το βρωμιούχο αιθίδιο καθώς και το νιτρικό άργυρο.

Έτσι, συνιστά αρχικά κλωνοποίηση και στη συνέχεια SSCP και εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA με Sequencing, σαν μέθοδο επιβεβαίωσης για τις άγνωστες μεταλλάξεις. Παρ' όλα αυτά δεν κάνει ταυτοποίηση των μεταλλάξεων με την μέθοδο SSCP.

Η εργασία του Hayashi K. and Yandell DW (1993), που περιγράφεται στο περιοδικό Human Mutation<sup>51</sup>, περιγράφει τους παράγοντες (μήκος προϊόντος PCR, θερμοκρασία πηκτής, συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου) που επιδρούν στην ευαισθησία της SSCP (που είναι κυρίως εμπειρική), σε διάφορα γονίδια (p53, β-γονίδιο, υποδοχέας της ινσουλίνης, γονίδιο Ras). Οι συνθήκες του άρθρου αυτού χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων της SSCP, στην παρούσα εργασία.

Σε όλες τις περιπτώσεις που αναφέραμε η SSCP χρησιμοποιείται για την **ανίχνευση μεταλλάξεων και όχι για την ταυτοποίηση του είδους των μεταλλάξεων**. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος χρησιμοποιείται για ένα αρχικό **screening** (προϊόντων PCR) ατόμων που πιθανόν φέρουν μεταλλάξεις σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Όταν διαπιστωθεί ότι το DNA τους έχει διαφορετική κινητικότητα, (εμφανίζει διαφορετικές ζώνες, σε σύγκριση με το φυσιολογικό, συνεπώς περιέχει μετάλλαξη), ακολουθεί ταυτοποίηση των μεταλλάξεων με μία άμεση μέθοδο (συνήθως Sequencing).

## **Z.2. Συμπεράσματα**

### **Z.2.a. Εφαρμογή της SSCP στον προσδιορισμό μεταλλάξεων ασθενών και φορέων με β-MA**

Παρότι η συμπεριφορά διαφορετικών αλληλουχιών DNA κατά την SSCP δεν μπορεί να προβλεφθεί θεωρητικά, η μέθοδος βασίζεται στο ότι συγκεκριμένη αλληλουχία θα έχει επαναλήψιμο πρότυπο διαχωρισμού ζωνών μονόκλωνου DNA κατά την ηλεκτροφόρηση κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες. Επομένως θεωρητικά μία

συγκεκριμένη μετάλλαξη θα μπορεί να προσδιοριστεί μετά από σύγκριση με ένα γνωστό μάρτυρα που φέρει την ίδια μετάλλαξη, εφ' όσον τα δύο δείγματα αναλύονται παράλληλα στην SSCP. Λόγω της σχετικής απλότητάς της θεωρήσαμε ότι θα άξιζε να διερευνηθεί κατά πόσο αυτή η προσέγγιση χρήσης μαρτύρων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση γνωστών μεταλλάξεων.

Αρχικά **προσδιορίσαμε** τις πειραματικές συνθήκες (εξαγωγή DNA, PCR, SSCP) του γονιδίου της β-σφαιρίνης του ενδιαφέροντός μας (optimization). Από τις δημοσιευμένες μελέτες γνωρίζαμε ότι κάθε περιοχή που διερευνήθηκε με την μέθοδο SSCP απαιτεί ειδικές και καλά ορισμένες πειραματικές συνθήκες.<sup>5,41,157</sup> Εμείς καταλήξαμε στις συνθήκες που περιγράφονται στην παράγραφο Δ.5.

**Μελετήσαμε** την περιοχή του τέλους του πρώτου εξονίου έως την αρχή του δεύτερου εξονίου, που αντιπροσωπεύει τμήμα 238bp και καλύπτει το 80% των συνηθέστερων μεταλλάξεων του Ελληνικού πληθυσμού, για το β-γονίδιο. Οι τέσσερις πιο γνωστές μεταλλάξεις της β-Μεσογειακής αναιμίας είναι οι IVS-I-110, codon-39, IVS-I-1, IVS-I-6. Προμηθευτήκαμε δείγματα μαρτύρων που κάλυπταν ένα ευρύ φάσμα των συνδυασμών των δύο μεταλλάξεων (Πίνακας 17, σελ. 110). Στα έξι δείγματα μαρτύρων που είχαμε στη διάθεσή μας [(IVS-I-1/codon-39, IVS-I-1/IVS-I-1, IVS-I-110/IVS-I-6, IVS-I-6/ IVS-I-6, IVS-I-110/ IVS-I-1, IVS-I-1/ IVS-I-6) και το φυσιολογικό], **εντοπίσαμε** τα πρότυπα διαχωρισμών (patterns) των μονόκλωνων DNA κατά την SSCP και δείξαμε ότι αυτά είναι επαναλήψιμα και οι διαφορές στην Rf των ζωνών είναι στατιστικά σημαντικές. Τα γνωστά πια πρότυπα διαχωρισμών, χρησιμοποιήθηκαν για να **διερευνήσουμε** τη δυνατότητα ταυτοποίησης (και όχι απλώς **ανίχνευσης**) των μεταλλάξεων σε δείγματα ασθενών.

Περιμέναμε ότι στην SSCP μία γνωστή μετάλλαξη θα δίνει μία συγκεκριμένη ζώνη χαρακτηριστικής κινητικότητας (Rf) και ότι ο διπλός ετεροζυγώτης θα δίνει δύο

διαφορετικές ζώνες, χαρακτηριστικές της κάθε μετάλλαξης. Επομένως, με μία γρήγορη επισκόπηση θα ήταν δυνατόν ο προσδιορισμός κάθε μίας από τις τέσσερις γνωστές μεταλλάξεις σε κάθε δείγμα ασθενούς. **Καταλήξαμε όμως** ότι :

α) σε ένα διπλό ετεροζυγώτη συνήθως λαμβάνονται 3 αντί των δύο αναμενόμενων ζωνών

β) το πρότυπο (pattern) των ζωνών που προκύπτει είναι χαρακτηριστικό του συνδυασμού των δύο μεταλλάξεων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η εμφάνιση περισσότερων των δύο ζωνών μονόκλωνων DNA για ένα διπλό ετεροζυγώτη έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία και αποδίδεται στην ύπαρξη δομών παρόμοιας διαμόρφωσης. Επομένως η αρχική ιδέα (**χωρίς χρήση μαρτύρων**), ότι θα είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η ύπαρξη μιας μετάλλαξης από την παρουσία μιας ζώνης χαρακτηριστικής κινητικότητας δεν ισχύει και επιβάλλεται η χρήση των αντίστοιχων μαρτύρων.

Η δυσκολία στη χρήση της SSCP προκύπτει στην εύρεση των μαρτύρων όλων των δυνατών συνδυασμών. Έτσι και εάν είχαμε δέκα αντί των έξι δειγμάτων μαρτύρων που αντιστοιχούν σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς των τεσσάρων γνωστότερων μεταλλάξεων (Αποτελέσματα E.4 Πίνακας 17) πάλι δεν θα μπορούσαμε να ταυτοποιήσουμε με σιγουριά αυτές τις μεταλλάξεις στα άγνωστα δείγματά μας, δεδομένου ότι εάν μία συνήθης μετάλλαξη βρίσκεται σε συνδυασμό με μία άλλη, εκτός των τεσσάρων συνηθέστερων, θα έδινε ένα πρότυπο διαχωρισμού που δεν θα μπορούσε να ταυτοποιηθεί. Αυτός είναι ένας **περιορισμός** της χρησιμότητας της μεθόδου. Ένα άλλο χαρακτηριστικό σημείο το οποίο δεν καταφέραμε να διαλευκάνουμε είναι, αν υπήρχε η περίπτωση δύο διαφορετικών συνδυασμών μεταλλάξεων να δίνουν το ίδιο πρότυπο αποδιάταξης.

Με βάση το ποσοστό συχνότητας της κάθε μεταλλάξης (Πίνακας 3, σελίδα 37) στους έξι συνδυασμούς μεταλλάξεων που είχαμε στη διάθεσή μας (Πίνακας 17, σελίδα 111), μπορούμε να υπολογίσουμε ότι το θεωρητικώς αναμενόμενο ποσοστό ταυτοποίησης μεταλλάξεων είναι 33%, που είναι πολύ κοντά στο 25% που εμείς τελικά προσδιορίσαμε. Αυτό το ποσοστό επιτυχίας μπορεί να φαίνεται μικρό. Ωστόσο ο σκοπός της μελέτης δεν ήταν να ταυτοποιήσουμε όλες τις μεταλλάξεις αλλά να δείξουμε ότι η ταυτοποίηση μεταλλάξεων μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση της μεθόδου SSCP, με την προϋπόθεση ότι υπάρχουν τα κατάλληλα δείγματα μαρτύρων που περιέχουν γνωστούς συνδυασμούς μεταλλάξεων.

Τελικά από τα ογδόντα χρωμοσώματα των σαράντα ασθενών **προσδιορίσαμε** τις μεταλλάξεις σε **είκοσι** (Πίνακες 18,21,22). Τα είκοσι αυτά χρωμοσώματα έχουν τις τέσσερις συνηθέστερες μεταλλάξεις. Τα αποτελέσματα αρχικά προσδιορίστηκαν με την μέθοδο SSCP και στην συνέχεια επιβεβαιώθηκαν με την μέθοδο ARMS. Είναι σημαντικό ότι με τη δεύτερη μέθοδο βρέθηκαν και **τα δέκα διαγνωσμένα δείγματα αληθώς θετικά** (δηλαδή η ARMS έδωσε τα ίδια αποτελέσματα με την SSCP) και **τα πέντε μη διαγνωσμένα δείγματα που εξετάστηκαν αληθώς αρνητικά** (δηλαδή η ARMS δεν έδωσε προβλέψεις, όπως και η SSCP). Άρα οι προβλέψεις-υποθέσεις που αρχικά έγιναν με την SSCP, συμπίπτουν με τα αποτελέσματα της μεθόδου ARMS. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται όλα τα πειράματα που έγιναν και τα αποτελέσματά τους.

## ΠΙΝΑΚΑΣ 22: ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΗΝ β-MA

Συνολικός Αριθμός Ασθενών	Πρόβλεψη ασθενών με τη μέθοδο SSCP	Επιβεβαίωση ασθενών με τη μέθοδο ARMS	Είδος Μεταλλάξεων
40	10	10+5 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 Αληθώς θετικά (μέθοδος SSCP)</li> <li>• 5 Αληθώς αρνητικά (χωρίς πρόβλεψη με SSCP)</li> </ul>	IVS-I-110, Cd 39, IVS-I-1, IVS-I-6

Τα υπόλοιπα τριάντα δείγματα ασθενών δεν παρουσίασαν τα ίδια πρότυπα διαχωρισμού με τα δείγματα μαρτύρων. Συνεπώς δεν μπορούσε να γίνει πρόβλεψη. Αυτό σημαίνει ότι τα συγκεκριμένα δείγματα ασθενών δεν είχαν τους συγκεκριμένους συνδυασμούς των δειγμάτων μαρτύρων. Πιθανόν επίσης αν υπήρχαν περισσότερα δείγματα μαρτύρων να μπορούσαμε να ταυτοποιήσουμε περισσότερα δείγματα ασθενών.

**Συμπερασματικά** λοιπόν, η μέθοδος SSCP, δεν είναι απλά, όπως μέχρι τώρα πιστεύαμε, μία εμπειρική μέθοδος ανίχνευσης, αλλά και μία μέθοδος ταυτοποίησης μεταλλάξεων. Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους βλέπουμε ότι η μέθοδος ARMS δίνει πιο ξεκάθαρο αποτέλεσμα, είναι όμως πιο δαπανηρή (απαιτεί τέσσερις αντιδράσεις PCR το πολύ για την ανίχνευση της κάθε μετάλλαξης). Συγκρίνοντας επίσης τις δύο έμμεσες μεθόδους, την SSCP και DGGE, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι είναι σε γενικές γραμμές είναι ισότιμες. Η μέθοδος DGGE, ενώ στηρίζεται σε ένα θεωρητικό υπόβαθρο, γιατί η θερμοκρασία τήξεως μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μπορεί να προσδιορισθεί θεωρητικά, χρησιμοποιεί όμως ένα βήμα παραπάνω σε σχέση με την SSCP.

Μέχρι τώρα μόνο η μέθοδος DGGE είχε χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση μεταλλάξεων με τη χρήση μαρτύρων,<sup>38</sup> αλλά με τη μελέτη αυτή και η μέθοδος SSCP μπορεί να το καταφέρει με την ίδια ευκολία.

Το **σημαντικότερο** όμως είναι η εφαρμογή της SSCP στην μοριακή διάγνωση των **φορέων β-MA**. Οι τρεις ετεροζυγώτες IVS-I-1/Φυσιολογικό, IVS-I-6/Φυσιολογικό και cd39/Φυσιολογικό, εμφανίζουν τέσσερις διακριτές ζώνες διαφορετικής κινητικότητας. Ο τέταρτος ετεροζυγώτης IVS-I-110/Φυσιολογικό, παρουσιάζει τρεις ζώνες. Μπορούν συνεπώς να διαχωριστούν όλοι μεταξύ τους. Συνεπώς η μέθοδος SSCP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την **ταυτοποίηση ετεροζυγωτών β-MA** και για **προγεννητικό έλεγχο (population screening)**.

Ο μικρός αριθμός των ασθενών των οποίων βρήκαμε το γονότυπο, δεν μπορεί να αποτελέσει μέτρο σύγκρισης με τα αποτελέσματα των Kattamis et al 1990 & Loukoroulos 1996, για να έχουμε μία ολοκληρωμένη άποψη για την περιοχή της Κεντρικής Ελλάδας. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη της τεχνικής της SSCP και η διερεύνηση της δυνατότητας εφαρμογής της για τον προσδιορισμό των τεσσάρων συνηθέστερων μεταλλάξεων. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως αυτό αποδείχθηκε μόνο μερικώς εφικτό.

Η πιο αξιόπιστη μέθοδος που θα επέτρεπε την ταυτοποίηση όλων των μεταλλάξεων σε όλα τα δείγματα ασθενών, είναι η εξής: τα προϊόντα PCR θα έπρεπε να κλωνοποιηθούν και να βρεθεί η αλληλουχία τους με Sequencing. Ωστόσο η διαδικασία αυτή δεν ενδείκνυται ως μέθοδος ρουτίνας σε ένα διαγνωστικό εργαστήριο διότι είναι δαπανηρή και χρονοβόρα και γι' αυτό δεν εφαρμόστηκε.

## **Z.2.β. Εφαρμογή της SSCP στον προσδιορισμό της μετάλλαξης**

### **ΔF508 του γονιδίου της CFTR στην κυστική ίνωση**

Στην περίπτωση της κυστικής ίνωσης **μελετήσαμε** έξι χρωμοσώματα, ένα από τα οποία βρέθηκε ετεροζυγώτης με την μετάλλαξη ΔF508. Τα υπόλοιπα πέντε χρωμοσώματα ήταν φυσιολογικά. Τα αποτελέσματα **λήφθηκαν** με την **μέθοδο SSCP** και **επιβεβαιώθηκαν**, με την **μέθοδο PAGE**. Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους για την ταυτοποίηση της συγκεκριμένης μετάλλαξης, η μέθοδος PAGE φαίνεται να υπερτερεί στην ευκρίνεια του αποτελέσματος. Ωστόσο η SSCP εφαρμόζεται πιο εύκολα στην Κυστική Ίνωση<sup>44,67</sup>, δεδομένου ότι η ΔF508 μετάλλαξη εμφανίζεται με τόση μεγάλη συχνότητα (70% όλων των μεταλλάξεων στους Καυκάσιους).

### **Z.3. Προοπτικές**

Ο αρχικός σκοπός της ανάπτυξης της μεθόδου SSCP **επιτεύχθηκε και εφαρμόστηκε σε δύο γενετικές ασθένειες.**

Επίσης λόγω των πολλών **πλεονεκτημάτων της** (παράγραφος Γ.5), μπορεί να **εγκατασταθεί σε εργαστήριο μοριακής** διαγνωστικής. Ωστόσο η ταυτοποίηση μεταλλάξεων αντί για απλή ανίχνευση, με αυτή τη μέθοδο υπόκειται σε περιορισμούς.

Η μέθοδος SSCP έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία τόσο στην β-Μεσογειακή Αναιμία όσο και στην Κυστική Ίνωση για την απλή ανίχνευση μεταλλάξεων (απλό screening). Εμείς **κάναμε ένα βήμα παραπάνω, καταφέραμε να ταυτοποιήσουμε (και όχι να ανιχνεύσουμε)** τις μεταλλάξεις με τη χρήση μαρτύρων. Στην περίπτωση της **β-MA μπορεί να προσδιορισθεί το σύνολο των μεταλλάξεων**, σε διάφορους συνδυασμούς, για τους οποίους όμως υπάρχουν γνωστοί μάρτυρες. Πρότυπα διαχωρισμών που δεν είναι όμοια με αυτά των μαρτύρων υποδεικνύουν ασθενείς με άγνωστες μεταλλάξεις. Για μία ασθένεια όπως η β-MA, όπου έχουν αναφερθεί πάνω από 200 διαφορετικές μεταλλάξεις<sup>36</sup>, η αναγκαιότητα ύπαρξης μαρτύρων όλων των δυνατών συνδυασμών των μεταλλάξεων, δεν είναι εφικτή και περιορίζει την χρησιμότητα της μεθόδου. Πολύ καλά αποτελέσματα πήραμε στην ταυτοποίηση φορέων β-MA, που κάνει την μέθοδο SSCP **πολύ καλή τεχνική για προγεννητικό έλεγχο.** Η μέθοδος SSCP **εφαρμόστηκε επιτυχώς** και στην περίπτωση του προσδιορισμού της μετάλλαξης ΔF508 στην **Κυστική Ίνωση**. Εδώ επειδή η ΔF508 είναι η συνηθέστερη μετάλλαξη (70%), η μέθοδος SSCP έχει μεγαλύτερη εφαρμογή.

Σε μία πρόσφατη εργασία του Γεωργίου Ι.<sup>36</sup> συγκρίθηκε η DGGE (μια έμμεση μέθοδος) με την ARMS και τη μέθοδο Reverse Dot Blot (άμεσες μέθοδοι), για τον προσδιορισμό των συνηθέστερων μεταλλάξεων της β-MA στην βορειοανατολική και κεντρική Ελλάδα. Η μελέτη έγινε σε 1130 άτομα (φορείς β-MA, με μείζονα και



ενδιάμεση MA). Τα ποσοστά που ευρέθησαν είναι παρόμοια με αυτά των άλλων βαλκανικών χωρών, αλλά και με αυτά των Kattamis και Loukoroulos (Πίνακας 3). Μια **τέτοια προοπτική διανοίγεται και για την μέθοδο SSCP (έμμεση μέθοδος).**

Λόγω του ότι δεν έχει γίνει συγκριτική μελέτη μεταξύ της SSCP και της DGGE για το β γονίδιο (έχει όμως γίνει παρόμοια μελέτη για το α γονίδιο, Heister AJ., et al «Rapid detection of point mutations and polymorphisms of the alpha-globin genes by DGGE and SSCA»<sup>52</sup>), **μία άλλη προοπτική** που διανοίγεται είναι μία τέτοιου είδους μελέτη δηλαδή αν οι προβλέψεις της **SSCP και DGGE συμπίπτουν για τις μεταλλάξεις φορέων β-MA.**

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abrams ES, et al. Comprehensive detection of single base changes in human genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis and a GC clamp. *Genomics* (1990); 7: 463-475.
2. Ahmed S, Petrou M, et al. Molecular genetics of  $\beta$ -thalassemia in Pakistan: a basis for prenatal diagnosis. *Brit J Haem* (1996); 94: 476-482.
3. Ainsworth PJ, Surh LC and Coulter-Mackie MB. Diagnostic single strand conformational polymorphism (SSCP): a simplified non-radioisotopic method as applied to a Tay-sachs B1 variant. *Nucleic Acids Res* (1990); 19(2): 405-406.
4. Alex VB. Low-stringency single specific primer PCR, DNA sequencing and single strand conformation polymorphism of PCR products for identification of genetic variants of human papillomavirus type 16. *J Virol Methods*. (1995); 55: 435-443.
5. Agarwal S and Gupta A. Efficiency and cost effectiveness: PAGE-SSCP versus MDE and Phast gels for the identification of unknown  $\beta$ -thalassemia mutations. *J Clin Pathol: Mol Pathol* (2003); 56: 237-239.
6. Anderson MD and Welsh MJ. Identification and regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel. *Science* (1992); 267: 5727-5730.
7. Antonarakis SE, et al. DNA polymorphisms and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Hum Genet* (1985); 69: 1-14.
8. Antonarakis SE, et al.  $\beta$ -thalassemia in American Blacks: novel mutations in the TATA box and IVS-II acceptor site. *Proc Natl Acad Sci* (1984); 81: 1154-1158.
9. Antonarakis SE, Kazazian HHJr and Orkin S. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Hum Genet* (1985); 69: 1-14.

10. Antonarakis SE, et al. Non-random association of polymorphic restriction sites in the  $\beta$ -globin gene cluster. *Proc Natl Acad Sci* (1982); 79: 137-141.
11. Balassopoulou A, et al. Studies of RFLP closely linked to the cystic fibrosis locus throughout Europe lead to new considerations in populations genetics. *Hum Genet* (1990), 84(5): 449-454
12. Barbar LP and Heflich R. Genotyping selection methods for the direct analysis of point mutations. *Mutat Res* (1997); 387: 97-121.
13. Basak AN, et al. The molecular basis of  $\beta$ -thalassemia in Turkey. *Hum Genet* (1992); 89: 315-318.
14. Baysal E, et al.  $\beta$ -thalassemia mutations in the population of Cyprus. *Brit J Haem* (1992); 81: 607-609.
15. Benhattar J, Dolores Bautista and Chaubert Pascal. An improved method for rapid screening of DNA mutations by non-radioactive single strand conformation polymorphism procedure. *Biotechniques* (1993); 15: 4.
16. Berta P, et al. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor *Nature* (1990); 348: 448-450.
17. Berson EL, et al. Mutation spectrum of the rhodopsin gene among patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991); 88: 9370-74.
18. Blanche H, Valette C and Bellanne-Chantelot C. Optimization of Nonisotopic PCR-Single strand conformation polymorphism analysis. *Clin Chem* (1997); 43(11): 2190-2192.
19. Boat, et al. *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (1989); 6th edn, pp 2649-2680.

20. Bosari S, Marchetti A, Buttitta F, Graziani D, Borsani G, Loda M, Bevilacqua G and Coggi G. Detection of p53 by single strand conformation polymorphisms (SSCP) gel electrophoresis. *Diagn Mol Pathol* (1995); 4(4): 249-255.
21. Braun A, Amdach H, Bichlmaier R, Kammerer S and Roscher A. Population study of a sequence polymorphism in intron 2 of the human  $\beta$ -globin gene. *Hum Genet* (1995); 95:352.
22. Brommelkamp L, et al. Non isotopic detection of single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) a rapid and sensitive technique in diagnosis of phenylketonuria. *Nucleic Acids Res* (1991); 19: 2500.
23. Caminopetros J. Recherches sur l'anemie erythroblastique infantile des peuples de la Mediteranee orientale; étude anthropologique, étiologique et pathologique ; la transmission héréditaire de la maladie. *Ann Med* (1938); 43: 27-61,104-125.
24. Canessa CM, et al. Amiloride-sensitive epithelial  $\text{Na}^+$  channel is made of three homologous subunits. *Nature* (1994); 367 : 463-467
25. Cao A, Gossens M and Pirastu M.  $\beta$ -Thalassaemia mutations in Mediterranean populations. *British Journal of Hematology* (1989); 71: 309-312.
26. Cawthon RM, et al. A major segments of the neurofibromatosis type 1 gene : cDNA sequence, genomic structure and point mutations. *Cell* (1990); 62: 193-201.
27. Dean M, et al. Population and pedigree studies reveal a lack of association between the dopamine D2 receptor gene and alcoholism. *J Am Med Assoc* (1990); 264: 3156-3160.
28. Deisseroth A, Nienhuis A, et al. Localization of the human alpha-globin. Structural gene to chromosome 16 in somatic cell hybrids by molecular hybridisation assay. *Cell* (1977); 12: 205-207.

29. Dean M, White MB, Amos J, Gerrard B, Stewart C, Khaw K-T, Leppert M. 1990. Identification of cystic fibrosis mutations. *Cell*. 61: 863-870.
30. Dietz HC, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* (1991); 352: 337-339.
31. Eric PH. Nonisotopic SSCP detection in PCR products by ethidium bromide staining. *Technical Tips* (1992); 8(2): 49.
32. Estivill X, et al. A candidate for the cystic fibrosis locus isolated by selection for methylation-free islands. *Nature* (1987); 326: 840-845.
33. Fan E, Levin D and Levin DB, Glickman BW, Logan DM. Limitations in the use of SSCP analysis. *Mutat Res* (1993); 288: 85-92.
34. Fantoni A, et al. Embryonic haemoglobins in man and other mammals. *Blood* (1981); 57: 623-633.
35. Fessas P. Inclusions of hemoglobin in erythroblasts and erythrocytes of thalassemia. *Blood* (1963); 21: 21-23.
36. Georgiou I, Makis A, Chaidos A, Bouda I, Hatzi E, Kranas V, Zilidis C and Bourantas KL. Distribution and frequency of  $\beta$ -thalassemia mutations in northeastern and central Greece. *Eur J Haematol* (2003); 70: 75-78.
37. George AL, et al. Identification of a mutation in the gene causing hyperkalemic periodic paralysis. *Cell* (1991); 67: 1021-1027.
38. Ghanem N, Girodon E, Vidaud M, Martin J, Fanen P and Plassa F. A comprehensive scanning method for rapid detection of  $\beta$ -globin gene mutations and polymorphisms. *Hum Mutat* (1992); 1: 229-239.
39. Giambona A, et al. The great heterogeneity of thalassemia molecular defects in Sicily. *Hum Genet* (1995); 95: 526-530.

40. Glavac D and Dean M. Optimization of Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Technique for the Detection of Point Mutations. *Hum Mutat* (1993); 2:404-414.
41. Glavac D, Potocnick U, Podpecnik D, Zizek T, Smerkolj S and Ravnik-Glavac M. Correlation of MFOLD –predicted DNA secondary structures separation patterns obtained by capillary electrophoresis single strand conformation polymorphism (CE-SSCP) analysis. *Hum Mutat* (2002); 19(4): 384-94.
42. Gonzalez-Redondo JM, et al. Characterization of three types of  $\beta^0$ -thalassemia resulting from partial deletion of the  $\beta$ -globin gene. *Haemoglobin* (1989); 13:377-392.
43. Gonzalez-Redondo JM, et al. AC $\rightarrow$ T substitution at nt-101 in a conserved DNA sequence of the promoter region of the  $\beta$ -globin gene is associated with silent  $\beta$ -thalassemia. *Blood* (1989); 73: 1705-1711.
44. Grade K, et al. Identification of three novel mutations in the CFTR gene using temperature-optimised non-radioactive conditions for SSCP analysis. *Hum Genet* (1994); 94: 154-158.
45. Groden J, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* (1991);66: 589-600.
46. Haig H, Kazazian HHJr, et al. The Molecular Basis of Thalassemia Intermedia. A Region I Conference, U.S Department of Health & Human Services Public Health Service. *The genetic Resource: Special issue* (1997); volume 11, Number 2 p.27
47. Hannessy LK, Teare J and Ko C. PCR conditions and DNA denaturants affect reproducibility of single strand conformation polymorphism analysis patterns for BRCA1 mutations. *Clin Chem* (1998); 44: 879-882.

48. Hatzidimitriou Gr and Zoulas D. Evaluation-standardization study of the PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) technique for human platelet alloantigen (HPA) typing. *Haema* (2001); 4(3): 181-184.
49. Hayashi K. PCR-SSCP: A method for Detection of Mutations. Elsevier Science Publishing Co., Inc., *Genetic Analysis: Techniques and Applications (GATA)* (1992); 9(3): 73-79.
50. Hayashi K. Recent enhancements in SSCP. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* (1999); 14:193-196.
51. Hayashi K. and Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP. *Hum Mutat* (1993); 2:338-346.
52. Heister AJ, et al. Rapid detection of point mutations and polymorphisms of the alpha-globin genes by DGGE and SSCA. *Hum Mutat* (1996); 7(2): 114-122.
53. Hennesey KL, et al. PCR conditions and DNA denaturants affect reproducibility of SSCP patterns for BRACA1 mutations. *Clin Chem* (1998); 44(4): 879-883.
54. Hensel CH, Xiang Rui Hua, Sakaguchi AY and Naylor SL. Use of the single strand conformation polymorphism technique and PCR to detect p53 gene mutations in small cell lung cancer. *Oncogene* (1991); 6: 1067-1071.
55. Hollander DH. Etiogenesis of the European cystic fibrosis polymorphism: heterozygote advantage against venereal syphilis? *Med Hypotheses* (1982); 8: 191-197.
56. Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ and Weghost CM. «Cold SSCP»: a simple, rapid and non-radioactive method for optimizing single strand conformation polymorphism analysis. *Nucleic Acids* (1993); 21(16): 3637-3642.

57. Hruszkewycz AM, Delgadp R, Kban MA and Bennett W. Semi automated sequence-specific mutation detection of human K-ras oncogene using “Cold SSCP” analysis. *Clin Chem* (1996); 42(10) 1717-1719.
58. Huijun Tian, Jaquins-Gerstl A, Munro N, Trucco M, Brody L and Landers J. Single strand conformation polymorphism analysis by capillary and microchip electrophoresis: a fast, simple method for detection of common mutations in BRACA1 and BRACA2. *Genomics* (2000); 63: 25-34.
59. Huisman THJ. The beta and delta thalassemia repository (seventh edition). *Hemoglobin* (1993); 17: 479-499.
60. Huisman THJ, et al. A syllabus of Thalassemia Mutations. The sickle cell anaemia foundation. Augusta, GA, USA (1997).
61. Huisman THJ.  $\beta$ -thalassemia in four Mediterranean countries an editorial commentary. *Hemoglobin* (1990); 14:35-39.
62. Hwang TC, et al. Regulation of the gating of CFTR C1 channels by phosphorylation and ATP. *Proc Natl Acad Sci USA* (1994); 91: 4698-4702
63. Ikuma M. and Welsh MJ. Regulation of CFTR C1-channel gating by ATP binding and hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000); 97: 8675-8680.
64. Jaeckel S, Epplen J, Kayth M, Mitterski B, Tschentscher F and Epplen C. Polymerase chain reaction - single strand conformation polymorphism or how to detect reliably and efficiently each sequence variation in many samples and many genes. *Electrophoresis* (1998); 19: 3055-3061.
65. Jaksch M, Gerbitz KD and Kilger C. Screening for mitochondrial DNA point mutations using nonradioactive single strand conformation polymorphism analysis. *Clin Biochem* (1995); 28(5) 503-509.



66. Jancovic L, Efremov GD, Petkov G, Kattamis C, George E and Yang KG, Stoming TA, Huisman THJ. Two novel polyadenylation mutations leading to  $\beta^+$ -thalassaemia. *Brit J Haematol* (1990); 75: 122-126.
67. Jordanova AI, Kalaydjieva L, Savov A, Clausters M, Schwartz M, Estivil X, Angelicheva D, Haworth A, Casals T and Kremensky I. SSCP Analysis: A blind sensitivity Trial. *Hum Mutat* (1997); 10:65-70.
68. Jordan SA, et al. A three-base pair deletion in the peripherin-RDS gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* (1991); 354: 478-480.
69. Kalaydjieva L, Plageras P and Horst J. Further evidence for Cystic Fibrosis in Southern Europe. *Hum Hered* (1991); 41: 65-68.
70. Kanavakis E, Trager-Synodinos J, et al. Prenatal diagnosis of the thalassaemia syndromes by rapid DNA analytical methods. *Mol Human Repr* (1997); 3: 523-528.
71. Καράμπαμπα Φ, Σινοπούλου Κ, Μπουσίου Μ, Κόλια Π, Παπαδάκης Μ, Αντσακλής Α, Μεσογίτης Σ, Χατζή Α και Λουκόπουλος Δ. Προγεννητική διάγνωση της μεσογειακής αναιμίας και των δρεπανοκυτταρικών συνδρόμων στην Ελλάδα. *Ιατρική* (1991); 59:361-369.
72. Kattamis C, et al. The heterogeneity of normal HbA2  $\beta$ -thalassaemia in Greece. *Brit. J. Haematology* (1979); 42: 109-123.
73. Kattamis C, Cheng HH, Reese AL, Gonzalez-Redondo JM, Kutlar A, Kutlar F and Huisman THJ. Molecular characterization of  $\beta$ -thalassaemia in 174 Greek patients with thalassaemia major. *Brit J Haematol* (1990); 74: 342-346.
74. Kazazian HHJr and Boehm DC. Molecular basis and prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassaemia. *Blood* (1988); 72: 1107-1119.

75. Kazazian HHJr, Dowling CA, Boehm CD, Warren TC, Economou EP, Katz J and Antonarakis SE. Gene defects in  $\beta$ -thalassemia and their prenatal diagnosis. *Ann NY Acad Sci* (1990); 612: 1-5.
76. Kazazian HH. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Haematol* (1990); 27(3): 209-228.
77. Ko YH, et al. Modelling of nucleotide binding domains ABC transporter proteins of a  $F_1$ -ATPase/recA topology: structural model of the nucleotide binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett* (1997); 405: 200-208.
78. Kollia P, et al. Prenatal diagnosis of thalassemia intermedia. Is it justified? *Ann NY Acad Sci* (1990); 612, 521-523.
79. Kollia P, et al. (1989) Frameshift codon 5 [FSC-5 (-CT)] thalassemia; a novel mutation detected in a Greek patient. *Hemoglobin* (1990); 13:597-604.
80. Kollia P, et al.  $\beta$ -thalassemia mutations and the underlying  $\beta$  gene cluster haplotypes in the Greek population. *Gene Geogr* (1992); 6: 59-70.
81. Kollia P, et al. Modifications of RNA processing modulate the expression of Hemoglobin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996); 93:5693-5698.
82. Kollia P, et al. Modification of globin gene expression in cultured erythroid precursors derived from normal individuals: transcriptional and post-transcriptional regulation by haemin. *Proc Am Assoc Phys* (1997); 109:420-429.
83. Kollia P, et al. Hydroxyurea and hemin affect both the transcriptional and post-transcriptional mechanisms of some globin genes in human adult erythroid cells. *Ann NY Acad Sci* (1998); 815:405-406.

84. Kunkel HG, et al. Observations on the minor basic hemoglobin component in the blood of normal individuals and patients with thalassemia. *J Clin Invest* (1957); 36: 1615-1618.
85. Kurihara A, Tawata M, Ikegishi Y, Aida K and Onaya T. The procedure of polymerase chain reaction–restriction fragment–single strand conformation polymorphism analysis by HHA I/Hinc II to detect mitochondrial DNA mutations. *Life Sci* (1999); 64(14): 1223-1230.
86. Kurvinen K, Heitanen S, Kari Syrjanen and Syrjanen S. Rapid and effective detection of mutations in the p53 gene using nonradioactive single strand conformation polymorphism technique applied on Phastsystem. *J Virol Methods* (1995); 51: 43-54.
87. Labuda D, Krajcinovic M, Richer C, Skoll A, Sinnet H, Yotova V and Sinnett D. Rapid detection of CYP1A1, CYP2D6, and NAT variants by multiplex polymerase chain reaction and Allele-Specific Oligonucleotide Assay. *Anal Biochem* (1999); 275:84-92.
88. Lapoumerie C, et al.  $\beta$ -thalassemia due to a novel mutation in IVS-1 sequence donor site consensus sequence creating a restriction site. *Biochem Biophys Res Commun* (1986); 139: 709-713.
89. Lareu RR, Swanson NR and Fox SA. Rapid and sensitive genotyping of hepatitis C virus by single strand conformation polymorphism. *J Virol Methods* (1997); 64: 11-18.
90. Larsen LA, Andersen PS, Kanters JK, Jacobsen JR, Vuust V and Christiansen MA. Single strand conformation polymorphism/heteroduplex method for detection of mutations in 15 exons of the KVLQT1 gene associated with long QT syndrome. *Clin Chim Acta* (1999); 280: 113-125.

91. Lawn RM, et al. The Nucleotide Sequence of the Human  $\beta$ -globin Gene. *Cell* (1980); 21: 647-651.
92. Liebhaber SA, Goosens M and Kan YW. Homology and concerted evolution at the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  loci in human alpha-globin. *Nature* (1981); 290: 26-28.
93. Lingueglia E, et al. Expression cloning of an epithelial amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$  channel. A new type with homologies to caenorhabditis. *FEBS Lett* (1993); 318 : 95-99.
94. Liu Q and Sommer SS. Detection of virtually all mutations—SSCP (DOVAM-S): a rapid method for mutation scanning with virtually 100% sensitivity. *Biotechniques* (1999); 26: 932-942.
95. Loukopoulos D. Current status of thalassemia and sickle cell syndromes in Greece. *Semin Haematol* (1996); 33 (1): 76-86.
96. Maekawa M, Sugano K, Kashiwabara H, Ushiyama M, Fujita S, Yoshimori M and Kakizoe T. DNA methylation analysis using bisulphite treatment and PCR -Single strand conformation polymorphism in colorectal cancer showing microsatellite instability. *Biochem Biophys Res Commun* (1999); 262: 671-676.
97. Maekawa M, Sudo K, Kitajima M, Matsuura Y, Steven S, Li L and Kanno T. Detection and characterization of new genetic mutations in individuals heterozygous for lactate dehydrogenase-B (H) deficiency using DNA conformation polymorphism analysis and silver staining. *Hum Genet* (1993); 91: 163-168.
98. Maggio A, et al. Rapid and Simultaneous Typing of Hemoglobin S, Hemoglobin C, and seven Mediterranean  $\beta$ -thalassemia Mutations by Covalent Reverse Dot-Blot Analysis: Application to prenatal Diagnosis in Sicily. *Blood* (1993); 81: 239-242.

99. Makino R, Kaneko K, Kurahashi T, Matsumura T and Mitamura K. Detection of mutation of the p53 gene with high sensitivity by fluorescence –based PCR-SSCP analysis using low-pH buffer and an automated DNA sequencer in large number of DNA samples. *Mutat Res* (2000); 452: 83-90.
100. Maniatis T, Hardison R, Lacy E, Lauer J, O’Connell C, Quon D, Sim GK and Efstratiadis A. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. *Cell* (1978); 15: 687-701.
101. Maniatis T, Sim GK, Efstratiadis A and Kafatos FC. Amplification and characterization of a  $\beta$ -globin gene synthesized in vitro. *Cell* (1976); 8:163-182.
102. Maragoudaki E, Vrettou E, Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Metaxotou-Mavromati A and Kattamis C. Molecular, haematological and clinical studies of a silent  $\beta$ -gene C  $\rightarrow$  G mutation at 6bp 3’ to termination codon (+1480 C  $\rightarrow$  G) in twelve Greek families. *Brit J Haematol* (1998); 103: 45-51.
103. Marga BW, Carvalho M, Derse D, Obrien SJ and Dean M. Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* (1992); 12: 301-306.
104. Markoff A, Savov A, Vladimir V, Bogdanova N, Kremensky I and Ganey V. Optimization of single strand conformation polymorphism analysis in the presence of polyethylene glycol. *Clin Chem* (1997); 43: 30-33.
105. Martins-Lopes P, et al. Detection of single nucleotide mutations in wheat using Single strand conformation polymorphism gels. *Plant Mol Biol Rep* (2001); 19: 159-162.
106. Mashiyama S, Murakami Y, Yoshimoto T, Sekiya T and Hayashi K. Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene* (1991); 6: 1313-1318.

107. Merril CR. Silver staining of proteins and DNA. *Nature* (1990); 343:779-780.
108. Merril CR, Goldman D, et al. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrilamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* (1981); 211:1437-1438.
109. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* (1988); 16(3): 1215.
110. Morral N, et al. The origin of the major cystic fibrosis mutation  $\Delta F508$  in European populations. *Nat Genet* (1994); 7: 169-175.
111. Muraoka A, et al. Polymorphism in exon 4 $\alpha$  of the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter gene detected by SSCP. *Nucleic Acids Res* (1991); 19: 4313.
112. Myers M, Maniatis T and Lerman L. Detection and localization of single base changes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Method Enzymol* (1987); 155: 499-527.
113. Nagamiah S, Beichuan D and Wilson MS. Separation of DNA strands facilitates detection of point mutations by PCR-SSCP. *Biotechniques* (1997); 22: 604-606.
114. Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusukawa N and Hihhsmith WE. Single strand conformation polymorphism and heterodublex analysis for gel-based detection. *Electrophoresis* (1999); 20:1177-1185.
115. Nielsen OH. Cystic fibrosis in Denmark 1945 to 1985. An analysis of incidence, mortality and influence of centralized treatment on survival. *Acta Paediatr Scand* (1988); 77: 836-841.
116. Odelberg SJ, et al. Identification of factor IX point mutations using SSCP analysis and direct sequencing. *Nucleic Acids Res* (1994); 18: 5575.

117. Ohtani N, et al. Oncogenic germ-line mutations in Sp1 and ATF sites in the human retinoblastoma gene. *Nature* (1991); 353: 83-86.
118. Orita M, Suzuki Y and Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics* (1989); 5: 874-879.
119. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K and Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as a single strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989); 86: 2766-2770.
120. Orkin SH and Kazazian HHJr. The mutation and polymorphism of the human  $\beta$ -globin gene and its surrounding DNA. *Ann Rev Genet* (1984); 18: 131-171.
121. Orkin SH, Kazazian HHJr and Antonarakis ES, et al. Linkage of  $\beta$ -thalassemia mutations and  $\beta$ -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in the human  $\beta$ -globin gene cluster. *Nature* (1982); 296: 627-631.
122. Paccoud B, et al. Transverse formamide gradients as a simple and easy way to optimize DNA single strand conformation polymorphism analysis. *Nucleic Acids Res* (1998); 26 (9) 2245-2246.
123. Papadakis MN and Patrinos GP. Contribution of gene conversion in the evolution of the human  $\beta$ -like globin gene family. *Hum Genet* (1999); 104:117-125.
124. Pauling L and Itano HA. Sickle cell anaemia, a molecular disease. *Science* (1949); 110: 543-545.
125. Pelletier J, et al. WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms tumor. *Oncogene* (1991); 353: 431-439.
126. Pier GB, et al. *Salmonella typhis* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* (1998); 393: 79-82.

127. Pinheiro NA, Moura RP, Monteiro E and Villa LL. Detection of point mutations by non-isotopic single strand conformation polymorphism. *Braz J Med Biol Res* (1999); 32: 55-58.
128. Pogue R, West S and Bushby K. Multiplex SSCP and Heterodublex analysis with southern hybridization for large-scale mutation detection. *Genomics* (1998); 54: 1-4.
129. Pokorny RM, Allan B, Dietz M, Galandiuk S and Neiberghs HL. Improved resolution of asymmetric-PCR SSCP products. *Biotechniques* (1997); 22: 606-608.
130. Qiang L and Sommer S. The SSCP phenomenon: addition of HEPES buffer dramatically affects electrophoretic mobility. *Biotechniques* (1998); 25(1): 50-56.
131. Qiang L, et al. Restriction endonuclease fingerprinting (REF): a sensitive method for screening mutations in long, continuous segments of DNA. *Biotechniques* (1995); 18 (3): 470-473.
132. Qiang L, et al. Bi-directional dideoxy fingerprinting (Bi-ddF): a rapid method for quantitative detection of mutations in genomic regions of 300-600bp. *Hum Mol Genet* (1995); 5(1) 107-114.
133. Qiu-Qiong and Touitou I. Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency. *Nucleic Acids Res* (1993); 21(16): 3909-3910.
134. Ramjeesingh M, et al. Novel method for evaluation of the oligomeric structure of membrane proteins. *Biochemistry* (1999); 38: 1463-1468.
135. Riordan JR, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* (1989); 245, 1066-1073.
136. Rsaleti MC, et al. Molecular screening and fetal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia in Italian population. *Hum Genet* (1992); 89: 585-589.



137. Rodman DM and Zamudio S. The cystic fibrosis heterozygote advantage in surviving cholera? *Med Hypotheses* (1991); 36: 253-258.
138. Robertson M, et al. Direct detection and automated sequencing of individual alleles after electrophoretic strand separation: identification of a common nonsense mutation in exon 9 of the human lipoprotein lipase gene. *Nucleic Acids Res* (1990); 18: 5407-5411.
139. Roy AC, Wu-Xiang L, Chen Y, Arulkumaran S and Ratnan SS. Identification of seven novel mutations in LH  $\beta$ -subunit gene by SSCP. *Mol Cell Biochem* (1996); 165: 151-153.
140. Savov A., et al. Identification of six novel mutations in the CFTR gene of patients from Bulgaria by screening the twenty seven exons and exon/intron boundaries using DGGE and direct DNA sequencing. *Hum Mol Genet* (1994); 3(1): 57-60.
141. Savov A, Angelicheva D, Jordanova A, Eigel A and Kalaydjieva L. High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Res* (1992); 20(24): 6741-6742.
142. Saxena R, Jain PK, et al. Prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia: experience in a developing country. *Prenatal Diag* (1998); 18: 1-7.
143. Schroeder WA. The synthesis and chemical heterogeneity of human fetal hemoglobin. *Hemoglobin* (1980); 4: 431-441.
144. Schwaab R, Oldenburg J, Lalloz MRA, Schwaab U, Pemberton S, Hanffland P, Brackmann HH, Tuddenham EGD and Michaelides K. Factor VIII gene mutations found by comparative study of SSCP, DGGE and CMC and their analysis on molecular model of factor VIII protein. *Hum Genet* (1997); 101: 323-332.

145. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW and Stone EM. The Sensitivity of Single Strand Conformation Polymorphism Analysis for the detection of Single base Substitutions. *Genomics* (1993); 16:325-332.
146. Sekiya T, et al. DNA sequence polymorphisms in Alu repeats. *Genomics* (1990); (1990); 8: 271-278.
147. Smith JJ, et al. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* (1996); 85: 229-236.
148. Spinardi L, Mazars R and Theillet C. Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res* (1991); 19(14): 4009.
149. Spritz RA, et al. Base substitution in an intervening sequence of a  $\beta$ -thalassemic human globin gene. *Proc Natl Acad Sci* (1981); 78: 2455-2459.
150. Stryer L. Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο (1995) σ. 73-179, 707-745, 769-800.
151. Sugano K, Kyogokun A, Fukayama N, Ohkura H, Shimosato Y, Skiya T and Hayashi K. Rapid and simple detection of c-Ki-ras2 gene codon 12 mutations by nonradioisotopic single strand conformation polymorphism analysis. *Methods in Laboratory Investigations* (1993); 68(3) 361-366.
152. Sunnucks P, Wilson CC, Beheregaray LB, Zenger K, French J and Taylor AC. SSCP is not so difficult: the application and utility of Single Strand Conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol* (2000); 9:1669-1710.
153. Suzuki Y, et al. Allele-specific polymerase chain reaction: a method for amplification and sequence determination of a single component among a mixture of sequence variants. *Anal Biochem* (1991); 192: 82-84.

154. Suzuki Y, Orita M, Shiraishi M, Hayashi K and Sekiya T. Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene* (1990); 5: 1037-1043.
155. Takahashi A, Ishino Y, Kato Y and Fukumaki Y. Rapid and practical detection of  $\beta$ -globin mutations causing  $\beta$ -thalassemia by fluorescence-based PCR- single strand conformation polymorphism analysis. *Mol Cell Probe* (1994); 8: 385-393.
156. Takeda E, et al. A unique mutation in the vitamin D receptor gene in three Japanese patients with vitamin D-dependent rickets type II: utility of SSCP analysis for heterozygous carrier detection *Am J Hum Genet* (1991); 49: 668-673.
157. Teschauer W, Mussack T, Braun A, Waldner H and Fink E. Conditions for SSCP Analysis with Broad Applicability: A study on effects of Acrylamide, Buffer and Glycerol Concentrations in SSCP Analysis of exons of the p53 Gene. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* (1996); 34:125-131.
158. Traeger-Synodinos J. Best Practice for carrier identification and prenatal diagnosis of haemoglobinopathies. *European Molecular Genetics Quality Network (EMQN)*(2002).
159. Treisman R, et al. A single base change at a splice site in  $\beta$ -thalassemia gene causes abnormal RNA splicing. *Cell* (1982); 29: 903-911.
160. Thomas B. Gelether and Francis S. Collins «Ιατρική Γενετική», p. 295
161. Vogel–Motulsky. *Human Genetics*, 2<sup>nd</sup> Completely Revised Edition. p. 151.
162. Weatherall DJ and Clegg JB. *The thalassemia syndromes*, 3<sup>rd</sup> edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1981); 1: 221-319.
163. Weghorst CM and Buzard GS. Enhanced single strand conformation polymorphism (SSCP) detection of point mutations utilizing methyl mercury Hydroxide. *Biotechniques* (1993); 5(3): 397-400.

164. Welsh JA, Cstren K and Vahakangas KH. Single strand conformation polymorphism analysis to detect p53 mutations: characterization and development of controls. *Mol Pathol Genet* (1997); 43(12): 2251-2255.
165. Wenz HM. Capillary electrophoresis as a technique to analyse sequence-induced anomalously migrating DANN fragments. *Nucleic Acids* (1994); 22(19): 4002-4008.
166. Winter MC and Welsh MJ. Stimulation of cystic fibrosis transmembrane regulator activity by its phosphorylated R domain. *Nature* (1997); 389: 296-297
167. Wong C, et al. Characterization of  $\beta$ -thalassemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature* (1987); 330: 384–386.
168. Wu JK, Delgado R, Sunderland T and Csako G. Sensitivity of single strand conformation polymorphism analysis in detecting p53 point mutations in tumors with mixed cell populations. *Am J Hum Genet* (1993); 52:1273-1275.
169. Χαλεβελάκης ΓΕ. Αιμοσφαιρινοπάθειες, σ. 121-135.
170. Xie T, Ho SL and Ma OCK. High resolution single strand conformation polymorphism analysis using formamide and ethidium bromide staining. *J Clin Pathol: Mol Pathol* (1997); 50:276-278.
171. Yataganas X. The pattern of hemoglobin precipitation in thalassemia and its significance. *Ann NY Acad Sci* (1969); 165: 270-287.
172. Yan-Yun Wu, et al. Semiautomated PCR single strand conformation polymorphism Method for detection of novel sequence polymorphism in human  $\alpha_2$ -macroglobulin. *Clin Chem* (2000); 46(5) 715-717.
173. Yuasa I, Umetsu K, Nakagawa M, Ikebuchi J, Terutaka I and Irizawa Y. Simple and rapid determination of acetaldehyde dehydrogenase (ALDH2) genotypes by

nonradioactive single strand conformation polymorphism analysis.

Electrophoresis (1997); 8: 1940-1941.