



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Ανάλυση περιοχών με διαφορετική μεθυλίωση σε ανευπλοειδίες

Γεωργία Χριστοπούλου
Βιολόγος BSc, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Ανάλυση περιοχών με διαφορετική μεθυλίωση σε ανευπλοειδίες

Γεωργία Χριστοπούλου
Βιολόγος BSc, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης της κ. Χριστοπούλου Γεωργίας: 8-12-2011

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 726^α/17-1-2012

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Σύρρου Μαρίκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής

Μέλη

Λαμπρόπουλος Αλέξανδρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Γενετικής, Παν/μίου ΑΠΘ

Μιχαηλίδης Θεολόγος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής, Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Παν/μίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 8-2-2012

«Ανάλυση περιοχών με διαφορεική μεθυλίωση σε ανευπλοειδίες».

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 777^α/19-5-2015

1. Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Λαμπρόπουλος Αλέξανδρος, Καθηγητής Βιολογικής Γενετικής, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου ΑΠΘ
3. Μιχαηλίδης Θεολόγος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής, του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Παπαχατζοπούλου Αδαμαντία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Πατρών
5. Σύρρου Μαρίκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Βρεκούσης Θωμάς, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ογκολογία του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Σισμάνη Καρολίνα, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Κυτταρογενετικής και Γονιδιωματικής του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 24-6-2015

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Πασχόπουλος Μηνάς

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



*Στο Γιώργο και στους Ήλιους της ζωής μας,
τις κόρες μας Μαριλένα, Μελίνα και Δανάη*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή δεν αποτελεί, χρονικά, συνέχεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών μου σπουδών. Αποτέλεσε ώριμη απόφαση μετά από μια διαδρομή στο χώρο της γενετικής και ιδιαίτερα της προγεννητικής διάγνωσης χρωμοσωματικών ανωμαλιών.

Η πρώτη μου γνωριμία με τη γενετική έγινε κατά την εκπόνηση της διπλωματικής πτυχιακής εργασίας, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Δρ Αντιγόνης Ζαχαροπούλου, στο εργαστήριο Γενετικής του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών απ' όπου και αποφοίτησα. Η Δρ Ζαχαροπούλου, ως πρώτη μου δασκάλα, με ενέπνευσε και μου άνοιξε το δρόμο για τη μετέπειτα πορεία μου. Σε εκείνη τη φάση συνειδητοποίησα ότι με ενδιαφέρει ο τομέας της Γενετικής. Στη συνέχεια είχα την τύχη να συνεργαστώ με τη Δρ Αγγελική Μπαλασοπούλου, στο Κέντρο Μεσογειακής Αναιμίας του νοσοκομείου «Λαϊκό», η οποία όχι μόνο με μύησε στο χώρο της προγεννητικής γενετικής διάγνωσης, αλλά μέσω της καθοδήγησής της στα χρόνια των μεταπτυχιακών μου σπουδών στην Ιατρική Σχολή του ΕΚΠΑ, έθεσα τις εργαστηριακές, ηθικές και δεοντολογικές βάσεις για τη μετέπειτα πορεία μου.

Αργότερα έγινα μέλος της ομάδας του τμήματος Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας του μαιευτηρίου «ΜΗΤΕΡΑ» με διευθύντρια τη Δρ Βούλα Βελισσαρίου. Εκεί απέκτησα εμπειρία στη μελέτη χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Αρχικά «στήσαμε» την Ταχεία Προγεννητική Διάγνωση των συχνότερων ανευπλοειδιών με QF-PCR και για 9 χρόνια πραγματοποιήσαμε περισσότερες από 16.000 προγεννητικές διαγνώσεις. Εισάγαμε στο εργαστήριο τη Μοριακή Ανίχνευση Συνδρόμων μικροελλειμμάτων/μικροδιπλασιασμών με MLPA με την οποία διαγνώστηκαν περισσότερα από 1800 περιστατικά στο ίδιο διάστημα. Η εμπειρία μου στην ομάδα με οδήγησε στην εμβάθυνση όλων των συνιστωσών που αποτελούν την προγεννητική διάγνωση χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Στα χρόνια αυτά, η ανακάλυψη αρχικά εμβρυϊκών κυττάρων στο αίμα της εγκύου και στη συνέχεια ελεύθερου εμβρυϊκού DNA, όρισαν μια νέα εποχή για την προγεννητική διάγνωση με την ανάδειξη της δυνατότητας μη επεμβατικής προγεννητικής διερεύνησης της γενετικής σύστασης του εμβρύου. Για όλους όσους ασχολούμαστε με την προγεννητική διάγνωση, η ασφαλής διάγνωση γενετικών ανωμαλιών χωρίς να τίθεται σε κίνδυνο η υγεία της εγκύου και η

κύηση αποτελεί ευσεβή πόθο. Η ερευνητική ομάδα με επικεφαλής τον Δρ Φίλιππο Πατσαλή, στο Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής της Κύπρου, ανέπτυξε μια μεθοδολογία για τη μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση του συνδρόμου Down. Η μέθοδος αξιοποιεί τη διαφορική μεθυλίωση του εμβρυϊκού σε σχέση με το μητρικό DNA και η καινοτόμος αυτή προσέγγιση είναι ιδιαίτερα ελκυστική σε σχέση με τις μεθοδολογίες που εφαρμόζονται παγκοσμίως και που βασίζονται σε NGS.

Την εποχή που από την αποκρυπτογράφηση του ανθρωπίνου γονιδιώματος προσανατολιζόμαστε στην αποκρυπτογράφηση του ανθρωπίνου μεθυλιώματος, το πάντρεμα της μη επεμβατικής προγεννητικής ανίχνευσης ανευπλοειδιών με τις επιγενετικές τροποποιήσεις του DNA, με οδήγησε στην επιθυμία και ανάγκη να εμβαθύνω στο πεδίο αυτό, με την παρούσα διδακτορική διατριβή.

Από τη θέση αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω τις ομάδες των γενετιστών με τις οποίες συνεργάστηκα, για τις εποικοδομητικές αλληλεπιδράσεις μας και ιδιαίτερα τη Δρ Βούλα Βελισσαρίου στην οποία είμαι ευγνώμων για την επιστημονική και ηθική στήριξη και καθοδήγηση που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια. Για την ενθάρρυνση, όταν όλα φαίνονταν δύσκολα και για τη σοφία της, που ελπίζω να συνεχίσει να μας μεταλαμπαδεύει. Ευχαριστώ τη Δρ Αγγέλα Χατζάκη, η οποία ως υπεύθυνη της Μοριακής Βιολογίας ήταν εκεί σε κάθε βήμα τα τελευταία 10 χρόνια αλλά και που ως φίλη με βοηθάει να δω πολλά από μια διαφορετική οπτική. Επίσης, τον Δρ Φίλιππο Πατσαλή που με εμπιστεύτηκε στην ομάδα του και τη Δρ Ελίζα Παπαγεωργίου, επιστημονική υπεύθυνη του εργαστηρίου στην Κύπρο, για τη συνεργασία, την εκπαίδευση και πολύπλευρη στήριξη κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω εκ βαθέων τη Δρ Λίνα Φλωρεντίν, διευθύντρια του Κέντρου Γενετικής ΆλφαLab για την ειλικρινή στήριξη της κατά την τελική φάση της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, Αν. Καθηγήτρια Δρ Μαρία Σύρρου, η οποία με τις βαθιές γνώσεις της στην κυτταρογενετική και επιγενετική, στάθηκε αρωγός μου σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της. Την ευχαριστώ, όχι μόνο για την επιστημονική στήριξη, αλλά και για την αισιοδοξία που μου μετέδιδε ως κινητήρια δύναμη σ' αυτήν μου την προσπάθεια. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Αν. Καθηγητές Δρ Αλ. Λαμπρόπουλο και Δρ

Θ. Μιχαηλίδη, οι οποίοι με τον καθοριστικό τους ρόλο στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή, συντέλεσαν στην πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1	ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ	7
1.1.1	Αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες.....	8
1.1.2	Δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες.....	15
1.2	ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ	18
1.2.1	Κλασσική Κυτταρογενετική (7,10-11)	18
1.2.2	Μοριακή Κυτταρογενετική.....	19
1.3	ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ (18)	27
1.3.1	Επεμβατικές Μέθοδοι.....	27
1.3.2	Μη επεμβατικές μέθοδοι.....	29
1.4	Η ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA.....	36
1.5	ΣΚΟΠΟΣ	39
2	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	41
2.1	ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (73-76)	41
2.1.1	Προετοιμασία φλασκών δειγματοληψίας	41
2.1.2	Εμβολιασμός	42
2.1.3	Ανακαλλιέργεια	44
2.1.4	Συγκομιδή κυττάρων	45
2.1.5	Επίστρωση κυττάρων σε αντικειμενοφόρους πλάκες	47
2.1.6	GTG Χρώση	48
2.1.7	Ανάλυση	49
2.2	ΤΑΧΕΙΑ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΣΥΧΝΟΤΕΡΩΝ ΑΝΕΥΠΛΟΕΙΔΙΩΝ ΜΕ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (QF-PCR, Quantitative Fluorescent Polymerase Reaction).....	50
2.2.1	Απομόνωση DNA από δείγμα χοριοκικών λαχνών.	50
2.2.2	QF-PCR.....	50
2.2.3	Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης QF-PCR.....	53
2.2.4	Ανάλυση δεδομένων ηλεκτροφόρησης στον αυτόματο αναλυτή.....	54
2.3	ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΕΓΚΥΟΥ ΚΑΙ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ	56
2.3.1	Επεξεργασία δειγμάτων από εγκύους	56
2.4	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΛΑΣΜΑ.....	57

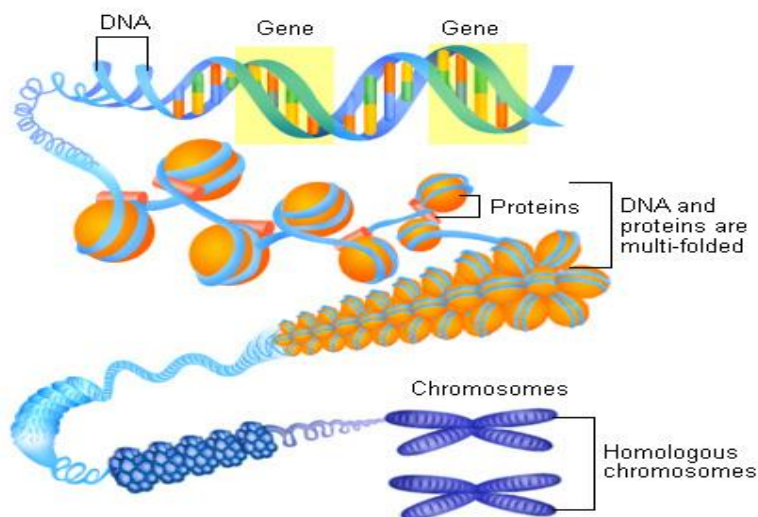
2.5	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ DNA ΜΕ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (Real-Time qPCR, Real-Time Quantitative PCR)	58
2.5.1	Αρχή της μεθόδου	58
2.6	ΚΑΤΑΤΜΗΣΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ	61
2.7	ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΜΕ ΨΗΦΙΑΚΗ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΟΥ DNA (MeDIP-Digital PCR).....	62
2.7.1	Ανοσοκατακρήμιση μεθυλιωμένου DNA	62
2.7.2	Ποσοτική ανίχνευση μεθυλιωμένων περιοχών του εξωκυττάριου DNA με Droplet Digital PCR (ddPCR)	65
3	ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ	69
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	73
4.1	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΩΛΗΝΑΡΙΩΝ STRECK	73
4.2	ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ.....	76
4.2.1	Απλοποίηση σταδίου ανοσοκατακρήμισης μεθυλιωμένου DNA	76
4.2.2	Μείωση όγκου αντίδρασης της ανοσοκατακρήμισης.....	79
4.2.3	Βέλτιστη συγκέντρωση αντισώματος.....	80
4.2.4	Βέλτιστη συγκέντρωση μαγνητικών σφαιριδίων.....	82
4.3	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΔΙΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ DNA	83
4.3.1	Δημιουργία τεχνητών δειγμάτων προσομοίωσης	83
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	89
6	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	95
7	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	97
8	SUMMARY	101
9	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	103
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	113

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ

Το γενετικό υλικό στα σωματικά κύτταρα ενός φυσιολογικού ανθρώπου οργανώνεται σε 46 χρωμοσώματα, τα οποία ταξινομούνται σε 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων. Κάθε ζεύγος (ομόλογα χρωμοσώματα) αποτελείται από χαρακτηριστικού μεγέθους και αλληλουχίας δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA-Deoxy Nucleic Acid) το οποίο είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες, ιστόνες και μη ιστόνες. Τα 22 ζεύγη είναι μορφολογικά ίδια και στα δύο φύλα και ονομάζονται αυτοσωμικά χρωμοσώματα, ενώ το 23^ο ζεύγος αποτελεί το ζεύγος των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Στα θήλεα, το ζεύγος των φυλετικών χρωμοσωμάτων είναι και αυτό μορφολογικά όμοιο (XX) ενώ στα άρρενα αποτελείται από ένα X και ένα μικρότερου μεγέθους Y χρωμόσωμα (XY).

Χρωμοσωματικές ανωμαλίες ονομάζονται οι ανωμαλίες στον αριθμό ή τη δομή των χρωμοσωμάτων. Ταξινομούνται σε ανευπλοειδίες ή πολυπλοειδίες στις περιπτώσεις που η ανωμαλία αφορά τον αριθμό τους και σε δομικές όταν η ανωμαλία σχετίζεται με την αλλαγή στη μορφολογία τους. Τόσο οι αριθμητικές όσο και οι δομικές ταξινομούνται περεταίρω σε αυτές που εμπλέκονται αυτοσωμικά και αυτές που εμπλέκονται φυλετικά χρωμοσώματα. (1)

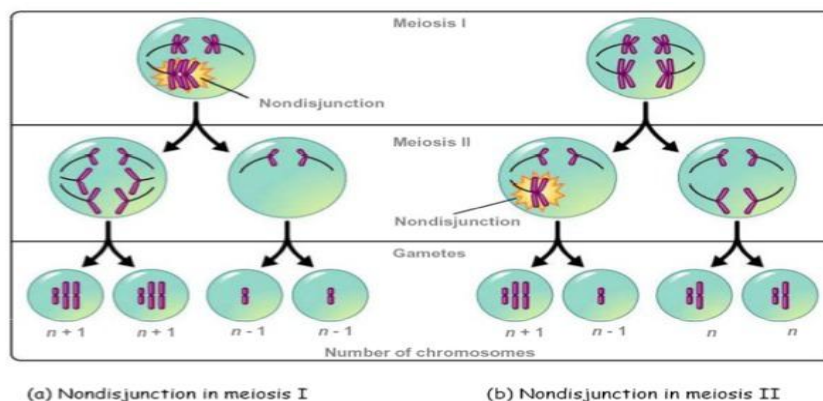


Εικόνα 1.1. Διαγραμματική απεικόνιση της οργάνωσης του γενετικού υλικού σε χρωμοσώματα.
 Πηγή: platypus-chromosomesandgenes.blogspot.com

1.1.1 Αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες

Αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες ονομάζουμε τις ανωμαλίες στον αριθμό των χρωμοσωμάτων. (2,3) Διακρίνονται σε πολυπλοειδίες, όταν παρουσιάζονται υπεράριθμα χρωμόσωμα σε όλα τα ζεύγη (π.χ. τριπλοειδία, τετραπλοειδία) και σε ανευπλοειδίες όταν διαταράσσεται ο φυσιολογικός αριθμός ενός ή περισσότερων χρωμοσωμάτων. Οι ανευπλοειδίες ταξινομούνται περαιτέρω σε τρισωμίες, στις περιπτώσεις όπου εμφανίζεται ένα υπεράριθμο χρωμόσωμα και μονοσωμίες όταν λείπει ένα χρωμόσωμα από ένα ζεύγος χρωμοσωμάτων.

Ο μηχανισμός σχηματισμού των αριθμητικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών αποδίδεται σε ανωμαλίες κατά την κυτταρική διαίρεση. Έτσι, είτε στην πρώτη μειωτική είτε τη δεύτερη μειωτική διαίρεση, μπορεί να συμβεί μη-αποχωρισμός των ομολόγων χρωμοσωμάτων ή των αδελφών χρωματίδων αντίστοιχα, με αποτέλεσμα τον τελικό σχηματισμό γαμετών με ανώμαλο αριθμό χρωμοσωμάτων. Το ίδιο σφάλμα μπορεί να συμβεί και σε μιτωτική διαίρεση το οποίο θα οδηγήσει σε ανώμαλο σχηματισμό σωματικών κυττάρων. Επίσης, η καθυστέρηση της μετακίνησης ενός ή περισσότερων χρωμοσωμάτων προς τον αντίστοιχο πόλο του διαιρούμενου κυττάρου μπορεί να οδηγήσει σε ανευπλοειδικά θυγατρικά κύτταρα. Αν το σφάλμα δεν συμβεί κατά τη γαμετογένεση αλλά σε μιτωτική διαίρεση, μετά το σχηματισμό του ζυγωτού, τότε η αριθμητική χρωμοσωματική ανωμαλία θα εμφανιστεί με τη μορφή μωσαϊκού, δηλαδή στο έμβryo θα συνυπάρχουν κυτταρικές σειρές διαφορετικής χρωμοσωματικής σύστασης. Το ποσοστό του μωσαϊκισμού και οι συνακόλουθες επιπτώσεις στο φαινότυπο εξαρτώνται από το χρόνο που θα συμβεί το σφάλμα κατά την εμβρυογένεση.



Εικόνα 1.2. Διαγραμματική απεικόνιση του μηχανισμού γένεσης ανευπλοειδιών.
Πηγή: bvmed1.blogspot.gr

Οι συχνότερες αριθμητικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες που είναι συμβατές με τη ζωή είναι η τρισωμία 21 (σύνδρομο Down), η τρισωμία 18 (σύνδρομο Edwards), η τρισωμία 13 (σύνδρομο Patau) είτε σε αμιγή είτε μωσαϊκή μορφή. Σπανιότερα απαντώνται τρισωμίες άλλων αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων σε μωσαϊκό πλην των χρωμοσωμάτων 1, 11 και 19. Συχνά απαντώνται ανευπλοειδίες των χρωμοσωμάτων του φύλου, ωστόσο, η μόνη βιώσιμη μονοσωμία είναι αυτή του χρωμοσώματος X, η οποία, είτε σε αμιγή είτε σε μωσαϊκή μορφή, οδηγεί στην κλινική εικόνα του συνδρόμου Turner.

Τρισωμία 21 (σύνδρομο Down)

Η τρισωμία του χρωμοσώματος 21 (***τρισωμία 21***) οδηγεί στην κλινική εικόνα του συνδρόμου Down. (4,5) Το σύνδρομο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1866 από τον Δρ Langdon Down από τον οποίο πήρε το όνομά του ενώ η γενετική χρωμοσωματική του βάση μελετήθηκε το 1959 από ομάδα ερευνητών με επικεφαλής τον Lejeune. (1,3)

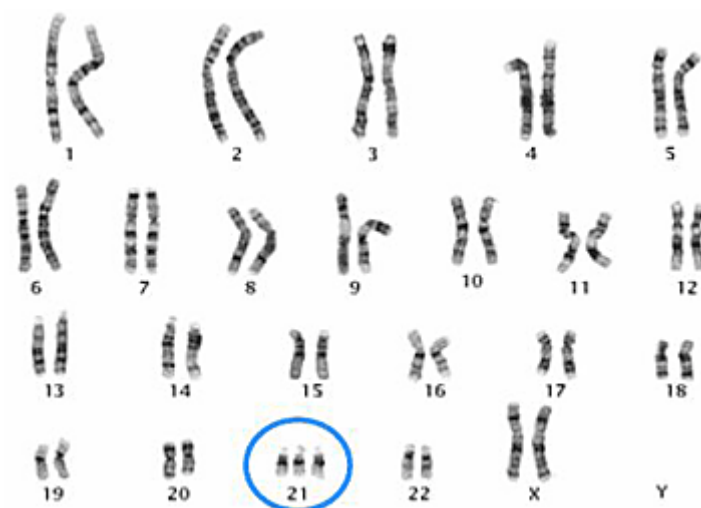
Η συχνότητα του συνδρόμου διεθνώς είναι 1:700 ως 1:800 γεννήσεις. Παράγοντας που εμφανίζει ισχυρή συσχέτιση με τη συχνότητα εμφάνισης του συνδρόμου αποτελεί η ηλικία της μητέρας. (1) Άλλοι παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα γέννησης παιδιού με σύνδρομο Down είναι η γέννηση προηγούμενου πάσχοντος παιδιού από τους ίδιους γονείς και η περίπτωση ένας γονέας να είναι φορέας ισοζυγισμένης μετάθεσης η οποία να περιλαμβάνει την κρίσιμη για την εμφάνιση του συνδρόμου Down περιοχή στο χρωμόσωμα 21. Τα χρωμοσώματα τα οποία συνήθως εμπλέκονται είναι το χρωμόσωμα 21 με το 14 [t(21;14)] και σπανιότερα το 22 [t(21;22)] ή άλλο ακροκεντρικό χρωμόσωμα. Το σύνδρομο Down από μετάθεση (ή μερική τρισωμία 21) αποτελεί περίπου το 4% των περιστατικών. Άλλη περίπτωση μερικής τρισωμίας 21 είναι η παρουσία χρωμοσώματος δείκτη το οποίο να προέρχεται από το χρωμόσωμα 21. (1) Σε περίπου 1-2% των πασχόντων η τρισωμία 21 εμφανίζεται με τη μορφή μωσαϊκού, όπου η βαρύτητα του συνδρόμου εξαρτάται από το ποσοστό της παθολογικής κυτταρικής σειράς και την κατανομή της στους ιστούς του οργανισμού.

Η κλινική εικόνα του συνδρόμου Down περιλαμβάνει ποικίλες εκδηλώσεις από διάφορα συστήματα του οργανισμού χωρίς να εμφανίζονται όλα απαραίτητα και με την ίδια βαρύτητα στα πάσχοντα άτομα.

Η νοητική υστέρηση στους πάσχοντες κυμαίνεται από βαριά (IQ: 20-35) ως ελαφριά (IQ: 50-75). Καταγράφεται αυξημένη συχνότητα εμφάνισης αυτισμού, όπως και πρόωμης νόσου Alzheimer (από 35 ετών).

Τα νεογνά εμφανίζουν υποτονία. Στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων παρουσιάζουν χαρακτηριστικό προσωπείο το οποίο περιλαμβάνει αποπλατυσμένα χαρακτηριστικά προσώπου, μικροκεφαλία, μικρά στρογγυλά αυτιά και μικρή μύτη. Οι έξω κανθοί των οφθαλμών έχουν κλίση προς τα πάνω. Ιδιαίτερα χαρακτηριστική είναι η προέχουσα γλώσσα στην οποία απουσιάζει η μέση αύλακα. Άλλα εξωτερικά χαρακτηριστικά είναι μια δερματική πτυχή στον αυχένα, τα κοντά και πλατιά χέρια και δάκτυλα και η μονή χειρομαντική γραμμή στην παλάμη (Simian crease).

Σχεδόν τα μισά παιδιά που γεννιούνται με το σύνδρομο εμφανίζουν συγγενείς καρδιακές βλάβες, με κυριότερες το μεσοκοιλιακό έλλειμμα και την πρόπτωση μιτροειδούς βαλβίδας. Σε ποσοστό 5% υπάρχουν βλάβες του πεπτικού σωλήνα, όπως συγγενές megacolon (Νόσος Hirschsprung), κοιλιοκάκη και ατρησία ή στένωση δωδεκαδακτύλου. Αρκετοί πάσχοντες εμφανίζουν ενδοκρινοπάθειες, όπως υποθυρεοειδισμό ή σακχαρώδη διαβήτη. Άλλα συστήματα από τα οποία μπορεί να εκδηλωθούν βλάβες είναι η όραση, η ακοή, το αιμοποιητικό και το αναπνευστικό. Οι άρρενες πάσχοντες είναι στείροι, με εξαίρεση τις περιπτώσεις μωσαϊκισμών, ενώ οι γυναίκες έχουν 50% πιθανότητα να γεννήσουν μωρό, που επίσης θα φέρει το σύνδρομο.



Εικόνα 1.3. Καρυότυπος θήλεος με ελεύθερη τρισωμία του χρωμοσώματος 21.

Τρισωμία 18 (σύνδρομο Edwards)

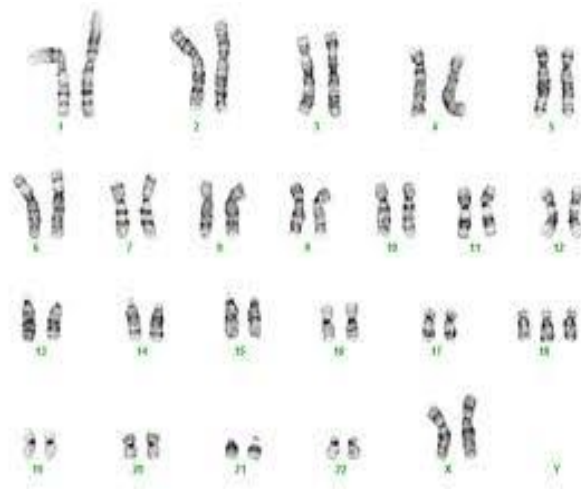
Η τρισωμία του χρωμοσώματος 18 είναι η δεύτερη σε συχνότητα αυτοσωμική χρωμοσωματική ανωμαλία μετά την τρισωμία 21 με συχνότητα περίπου 1 στις 7000-8000 γεννήσεις. (1) Ωστόσο, η συχνότητα ανίχνευσης της τρισωμίας 18 κατά την κύηση είναι σημαντικά υψηλότερη, γεγονός το οποίο οφείλεται στην αυτόματη αποβολή του 95% περίπου των εμβρύων με την παραπάνω ανωμαλία. Η παρουσία ολόκληρου επιπλέον χρωμοσώματος 18 ή μέρους αυτού (μερική τρισωμία 18) είτε σε αμιγή είτε σε μωσαϊκή μορφή οδηγεί στην εμφάνιση του συνδρόμου Edwards. (1)

Όπως στο σύνδρομο Down έτσι και στο σύνδρομο Edwards, η χρωμοσωματική ανωμαλία οδηγεί σε εκδηλώσεις από πολλά συστήματα του οργανισμού. Στις αμιγείς μορφές το προσδόκιμο επιβίωσης είναι μερικοί μόλις μήνες, ενώ η επιβίωση αυξάνει στις περιπτώσεις με μερική τρισωμία ή μωσαϊκά έχοντας καταγραφεί περιπτώσεις πασχόντων τα οποία έχουν ξεπεράσει τα 15 έτη.

Οι πάσχοντες παρουσιάζουν πολλαπλά δυσμορφικά χαρακτηριστικά όπως μικροκεφαλία, μικρογναθία, μικροφθαλμία, χαμηλή πρόσφυση ώτων με ανώμαλη ελίκωση, καθυστέρηση της ανάπτυξης και ανωμαλίες των άκρων. Το 90% των ατόμων με σύνδρομο Edwards παρουσιάζουν συγγενείς καρδιακές ανωμαλίες ενώ όλα εμφανίζουν εκδηλώσεις από το νευρικό σύστημα όπως νοητική υστέρηση και εγκεφαλικές ατέλειες. Άλλα συστήματα που παραβλάπτονται είναι το γεννητικό, ουροποιητικό και πεπτικό με συχνή την εμφάνιση κηλών οι οποίες μπορεί να

διαπιστωθούν κατά τους υπερηχογραφικούς ελέγχους κατά τη διάρκεια της κύησης.

(1)



Εικόνα 1.4 Καρυότυπος θήλεος με ελεύθερη τρισωμία του χρωμοσώματος 18

Τρισωμία 13 (σύνδρομο Patau)

Το σύνδρομο Patau οφείλεται στην τρισωμία ολόκληρου του χρωμοσώματος 13 είτε σε τρισωμία μέρους αυτού (μερική τρισωμία 13). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων πρόκειται για ελεύθερη τρισωμία, ωστόσο σε ποσοστό περίπου 20% αποδίδεται σε μη ισοζυγισμένη μετάθεση που εμπλέκει το χρωμόσωμα 13. Η συχνότητα του συνδρόμου Patau είναι περίπου 1 στις 25000 γεννήσεις. (1)

Η εξαιρετικά βαριά κλινική εικόνα των πασχόντων δεν επιτρέπει την επιβίωση τους περισσότερο από μερικούς μήνες.

Οι κυριότερες κλινικές εκδηλώσεις είναι σοβαρές συγγενείς καρδιακές ανωμαλίες, ανωμαλίες του εγκεφάλου, όπως η ολοπροσεγκεφαλία καθώς και προβλήματα από το ουροποιητικό και γεννητικό σύστημα. Επίσης εμφανίζουν μορφολογικές δυσμορφίες, όπως σχιστίες προσώπου (λαγόχειλο-λυκόστομα), ανωμαλίες των αυτιών και πολυδακτυλία. (1) Πολλά από τα χαρακτηριστικά αυτά είναι ανιχνεύσιμα ήδη κατά τους υπερηχογραφικούς ελέγχους στη διάρκεια της κύησης.

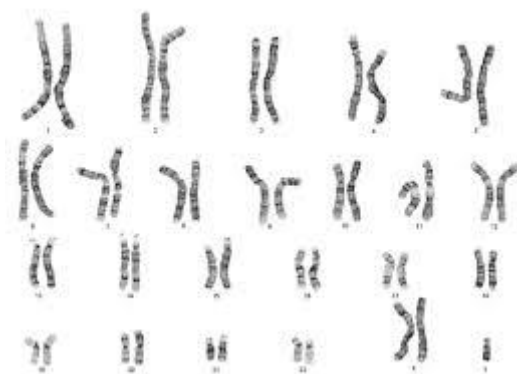


Εικόνα 1.5 Καρυότυπος άρρενος με ελεύθερη τρισωμία του χρωμοσώματος 13

Άρρενα με καρυότυπο 47,XXY (σύνδρομο Klinefelter)

Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά άρρενα, στα οποία το ζεύγος των φυλετικών χρωμοσωμάτων αποτελείται από ένα X και ένα Y χρωμόσωμα, τα άτομα τα οποία εμφανίζουν το σύνδρομο Klinefelter έχουν ένα επιπλέον χρωμόσωμα X. Η συχνότητα του συνδρόμου είναι 1 στις 1000 γεννήσεις αρρένων. (1,3) Σε ότι αφορά την αιτιολόγησή του, κυτταρογενετικές και μοριακές μελέτες έχουν δείξει ότι το 1/2 των περιπτώσεων οφείλεται σε σφάλμα κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση κατά τη σπερματογένεση (πατρικής προέλευσης υπεράριθμο χρωμόσωμα X), το 1/3 σε σφάλμα κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση κατά την ωογένεση (μητρικής προέλευσης υπεράριθμο χρωμόσωμα X), ενώ οι υπόλοιπες περιπτώσεις σε σφάλματα κατά τη δεύτερη μητρική μειωτική διαίρεση ή μεταζυγωτικά σε μιτωτική διαίρεση από όπου προκύπτουν μωσαϊκισμοί. (1)

Τα άτομα με σύνδρομο Klinefelter είναι στην πλειονότητά τους στείρα με μικρούς όρχεις. Εμφανίζουν διαταραχές των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου όπως γυναικομαστία ενώ το ανάστημά τους είναι συνήθως υψηλό με μακριά άκρα. Τα προβλήματα στη νοητική τους ανάπτυξη περιλαμβάνουν μαθησιακές δυσκολίες και ενδεχομένως προβλήματα συμπεριφοράς και αντικοινωνικότητας. (1) Ωστόσο, η εμφάνιση των κλινικών εκδηλώσεων του συνδρόμου παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια.

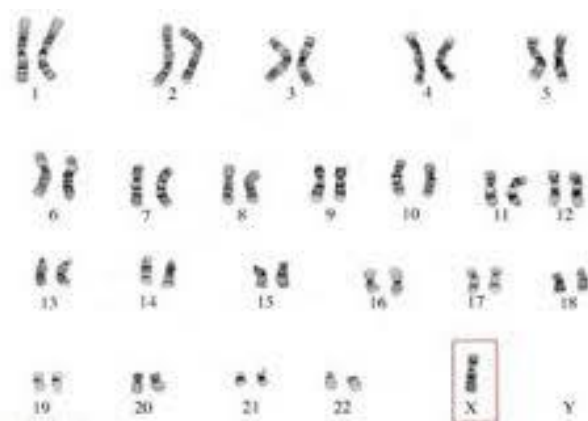


Εικόνα 1.6 Καρυότυπος άρρενος με σύνδρομο Klinefelter

Μονοσωμία του χρωμοσώματος X (σύνδρομο Turner)

Η συχνότητα εμφάνισης του συνδρόμου Turner είναι περίπου 1 στις 5000 γεννήσεις θηλέων. (1) Περίπου στο 50% των ατόμων με σύνδρομο Turner εμφανίζεται ένα μόνο φυλετικό χρωμόσωμα X. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις ποικίλλει η χρωμοσωματική σύσταση. Έτσι μπορεί να συνυπάρχει κυτταρική σειρά με μονοσωμία του χρωμοσώματος X με φυσιολογική κυτταρική σειρά (μωσαϊκισμός), να εμφανίζεται ισοχρωμόσωμα Xq ή να παρουσιάζεται μεγάλο έλλειμμα Xp σε ένα εκ των δύο χρωμοσωμάτων X. Φαίνεται ότι ανάλογα με τη χρωμοσωματική σύσταση σε κάθε περίπτωση η κλινική εικόνα μπορεί να κυμαίνεται από τυπική έως πολύ ήπια με την εμφάνιση χαμηλού αναστήματος και συγγενείς δυσμορφίες όπως στην περίπτωση πασχόντων με έλλειμμα Xp . (1,6)

Οι τυπικές κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου Turner είναι το χαμηλό ανάστημα (συνήθως μικρότερο από 1,50m), η στειρότητα η οποία οφείλεται στην καταστροφή των ωοκυττάρων λόγω ατρησίας πριν τη γέννηση, ποικίλες σωματικές δυσμορφίες και ανωμαλίες, όπως κοντός και φαρδύς λαιμός με πτερύγιο, ευρείς ώμοι και καρδιακή και νεφρική δυσλειτουργία. Τα άτομα με το σύνδρομο παρουσιάζουν ήπια νοητική υστέρηση σε επίπεδο λίγο χαμηλότερο από το φυσιολογικό.



Εικόνα 1.7 Καρυότυπος θήλεος με σύνδρομο Turner

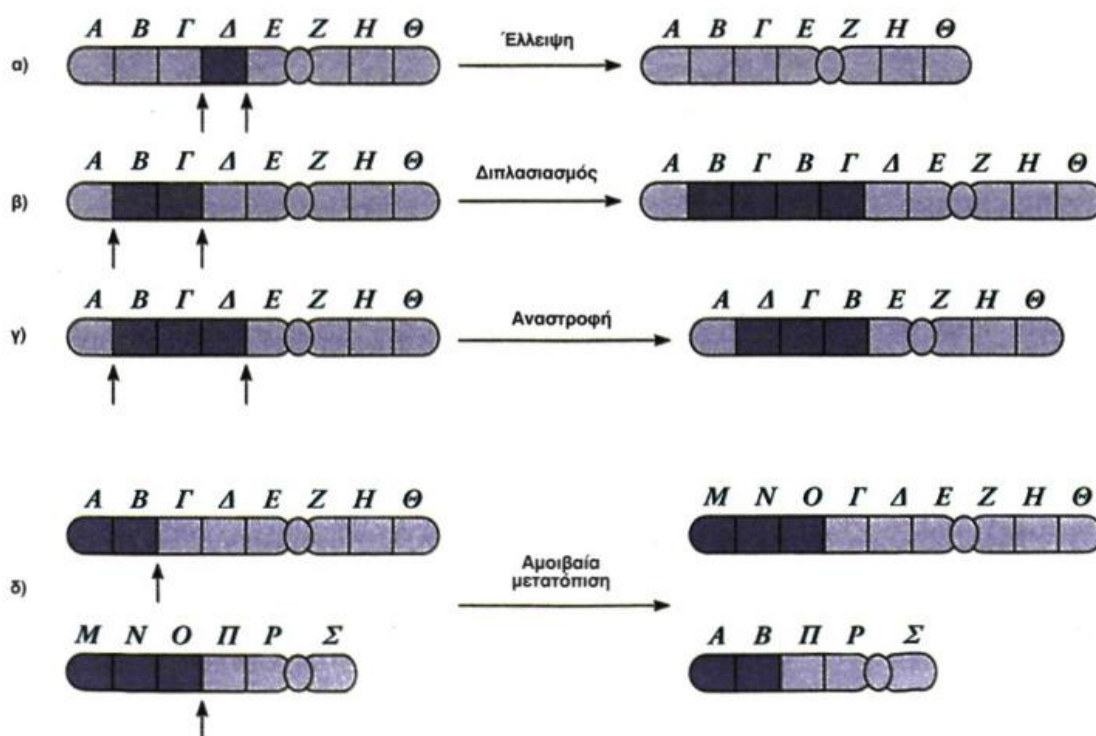
Σύνδρομο	Συχνότητα στις γεννήσεις	Κλινική εικόνα
Down	1:700-1:800	Νοητική υστέρηση, χαρακτηριστικό πρόσωπο, δερματική πτυχή αυχένα, κοντά χέρια, μονή χειρομαντική γραμμή παλάμης, συγγενείς καρδιακές ανωμαλίες, βλάβες πεπτικού σωλήνα, ενδοκρινοπάθειες, όραση, ακοή, αιμοποιητικό, αναπνευστικό.
Edwards	1:7000-1:8000	Νοητική υστέρηση, συγγενείς καρδιοπάθειες, δυσμορφικά χαρακτηριστικά, καθυστέρηση ανάπτυξης, ανωμαλίες άκρων, γεννητικού.
Patau	1:25000	Σοβαρές καρδιακές ανωμαλίες, ανωμαλίες εγκεφάλου, ουροποιητικού, γεννητικού, σχιστίες προσώπου, πολυδακτυλία.
Klinefelter	1:1000 αρρένων	Στειρότητα, διαταραχές δευτερογενών χαρακτηριστικών φύλου, ήπια προβλήματα νοητικής ανάπτυξης.
Turner	1:5000 θηλέων	Χαμηλό ανάστημα, στειρότητα, σωματικές δυσμορφίες, διαταραχές καρδιακής και νεφρικής λειτουργίας, ήπια νοητική υστέρηση.

Πίνακας 1.1 Τα κυριότερα κλινικά χαρακτηριστικά των συνδρόμων και οι συχνότητες τους

1.1.2 Δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες

Οι δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες αφορούν αλλαγές στη μορφολογία των χρωμοσωμάτων και περιλαμβάνουν μεταθέσεις, ελλείμματα, διπλασιασμούς, αναστροφές, ενθέσεις και τη δημιουργία δακτυλιοειδών χρωμοσωμάτων, χρωμοσωμάτων δεικτών και ισοχρωμοσωμάτων. Κατά τη δημιουργία δομικών

χρωμοσωματικών ανωμαλιών μπορεί να εμπλέκονται περισσότερα του ενός χρωμοσώματα. (7,8)



Εικόνα 1.8 Διαγραμματική απεικόνιση της δημιουργίας δομικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών

Μετάθεση ονομάζεται η ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ μη ομολόγων χρωμοσωμάτων. (1) Είναι η συχνότερη δομική χρωμοσωματική ανωμαλία που ανιχνεύεται σε μελέτες κλασσικής κυτταρογενετικής και διακρίνεται σε δύο βασικές κατηγορίες: την αμοιβαία μετάθεση κατά την οποία δύο χρωμοσωματικά τμήματα από δύο διαφορετικά χρωμοσώματα σπάνε και ανταλλάσσουν θέσεις μεταξύ τους και τη μετάθεση κατά Robertson (ροβερτσόνιος μετάθεση) κατά την οποία δυο ακροκεντρικά χρωμοσώματα συνενώνονται μεταξύ τους με σύντηξη στο κεντρομερίδιο και συνακόλουθη απώλεια των βραχέων σκελών και δορυφόρων τους. Παρ' ότι 1 στα 500 άτομα διαθέτει μια μετάθεση, δεν είναι ακόμα πλήρως διευκρινισμένο γιατί συμβαίνουν. (9)

Αναστροφή (inversion) είναι η τομή ενός χρωμοσωματικού τμήματος και η επανένωσή του μετά από στροφή 180° . (1) Οι αναστροφές διακρίνονται σε περικεντρικές στις περιπτώσεις που το ανεστραμμένο τμήμα περιλαμβάνει το κεντρομερίδιο και παρακεντρικές στις περιπτώσεις στις οποίες δεν περιλαμβάνεται το

κεντρομερίδιο. Στην κατηγορία των ενθέσεων (insertions), ένα τμήμα ενός χρωμοσώματος εισάγεται σε άλλο μη ομόλογο του χρωμόσωμα.

Το δακτυλιοειδές χρωμόσωμα (ring chromosome) σχηματίζεται όταν τα άκρα ενός χρωμοσώματος ενώνονται με τη μορφή δακτύλιου. Αυτό συνήθως συμβαίνει με ταυτόχρονη απώλεια γενετικού υλικού από τα δύο άκρα του χρωμοσώματος. Τα κομμένα άκρα του χρωμοσώματος είναι «κολλώδη» και ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας έναν δακτύλιο. Οι συνέπειες του δακτυλιοειδούς χρωμοσώματος στο άτομο συνήθως εξαρτώνται από το χρωμοσωματικό υλικό που έχει απολεσθεί κατά το σχηματισμό του. (9) Το ισοχρωμόσωμα (isochromosome) είναι τύπος ανώμαλου χρωμοσώματος το οποίο προκύπτει από τη θραύση του χρωμοσώματος στο κεντρομερίδιο και διπλασιασμό είτε του βραχέος σκέλους και έλλειψη του μακρού (ISOp) είτε το αντίστροφο (ISOq).

Ο κύριος μηχανισμός δημιουργίας δομικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών περιλαμβάνει αρχικά τη θραύση χρωμοσώματος, η οποία προκαλείται από κάποιον μεταλλαξιγόνο παράγοντα και στη συνέχεια λανθασμένη επανασύνδεση των τμημάτων. Ένας δεύτερος μηχανισμός δημιουργίας χρωμοσωματικών αναδιατάξεων είναι ο άνισος ανασυνδιασμός. Στο στάδιο της ζυγοταινίας, στη μειωτική διαίρεση, τα χρωμοσώματα μπορεί να συναφθούν λανθασμένα με αποτέλεσμα τον άνισο ανασυνδιασμό ανάμεσα σε μη ομόλογες περιοχές μη αδελφών χρωματίδων. (1)

Οι δομικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων διακρίνονται σε ισοζυγισμένες και μη ισοζυγισμένες ανάλογα με το αν διατηρείται σταθερή η ποσότητα του γενετικού υλικού ή αν αυτή μεταβάλλεται, αντίστοιχα. Στις ισοζυγισμένες, συνήθως δεν υπάρχει παθολογικός φαινότυπος εκτός από τις περιπτώσεις στις οποίες η αναδιάταξη του γενετικού υλικού τροποποιεί την έκφρασή του. Στις μη ισοζυγισμένες χρωμοσωματικές ανωμαλίες υπάρχει συνήθως επίπτωση στην κλινική εικόνα του ατόμου η οποία εξαρτάται από την ποσότητα και το είδος της γενετικής πληροφορίας που λείπει ή πλεονάζει.

Η διάγνωση των χρωμοσωματικών συνδρόμων πραγματοποιείται κλινικά με βάση τις φαινοτυπικές εκδηλώσεις του πάσχοντος ατόμου, ωστόσο η εργαστηριακή τεκμηρίωση συντελεί στην ακριβέστερη διάγνωση και αποτελεσματικότερη διαχείριση. Η εργαστηριακή διάγνωση των χρωμοσωματικών ανωμαλιών διεξάγεται

με κλασσικές μεθόδους της κυτταρογενετικής ανάλυσης και με νέες μεθόδους μοριακής κυτταρογενετικής.

1.2 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ

Ο κλάδος της Γενετικής ο οποίος ασχολείται με τη μελέτη των χρωμοσωμάτων και της κυτταρικής διαίρεσης ονομάζεται Κυτταρογενετική. Περιλαμβάνει την κλασσική κυτταρογενετική ανάλυση με τη διεξαγωγή του καρυοτύπου, ο οποίος αποτελεί την απεικόνιση μεταφασικών χρωμοσωμάτων ανά ζεύγη και με σειρά μειούμενου μεγέθους και μεθόδους μοριακής κυτταρογενετικής οι οποίες περιλαμβάνουν κυρίως την *in situ* υβριδοποίηση φθοροφόρων ανιχνευτών (FISH-Fluorescent In Situ Hybridization) σε μεσοφασικά και μεταφασικά χρωμοσώματα, τον ποσοτικό φθορίζοντα εκλεκτικό πολλαπλασιασμό αλληλουχιών του DNA (QF-PCR-Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction) και τον συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό αλληλουχιών του DNA (CGH-Comparative genomic Hybridization).

1.2.1 Κλασσική Κυτταρογενετική (7,10-11)

Από το 1956 όπου δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά ο καρυότυπος ανθρώπινου κυττάρου (12) μέχρι και σήμερα, η διεξαγωγή του συμβατικού καρυοτύπου αποτελεί το χρυσό κανόνα για τη διάγνωση χρωμοσωματικών ανωμαλιών.

Τα βασικά στάδια της μεθοδολογίας που ακολουθείται είναι η καλλιέργεια κυττάρων, το σταμάτημα της κυτταρικής διαίρεσης στη φάση της μετάφασης όπου τα χρωμοσώματα είναι περισσότερο ευδιάκριτα, η ρήξη των μεμβρανών του κυττάρου με χρήση υπότονου διαλύματος και η επίστρωσή τους σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Προκειμένου να είναι ορατά στο μικροσκόπιο, τα μεταφασικά χρωμοσώματα υφίστανται επεξεργασία η οποία μπορεί να οδηγήσει σε χαρακτηριστικό πρότυπο ζώνωσης. Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη τεχνική ζώνωσης είναι η GTG (G banding) στην οποία τα μεταφασικά χρωμοσώματα επεξεργάζονται με θρυψίνη και στη συνέχεια βάφονται με Giemsa. Κατ' αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα πρότυπο ζώνωσης χαρακτηριστικό για κάθε χρωμόσωμα στο οποίο οι σκουρόχρωμες ζώνες αντιστοιχούν σε περιοχές φτωχές σε γονίδια ενώ οι ανοιχτόχρωμες σε περιοχές με πλούσιο γονιδιακό περιεχόμενο. Το αντίστροφο πρότυπο ζώνωσης προκύπτει με την τεχνική RHG. Αφού σημανθούν, τα χρωμοσώματα παρατηρούνται σε μικροσκόπιο

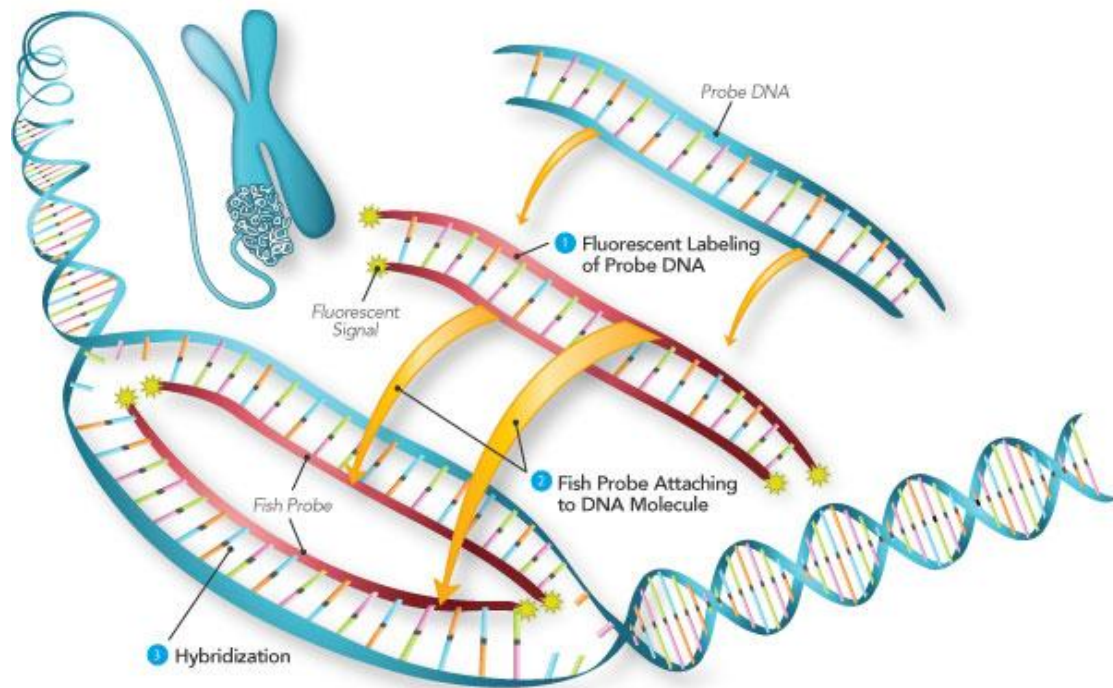
και γίνεται η ανάλυσή τους μελετώντας έναν αριθμό διαφορετικών μεταφάσεων. Με τη ζώνωση των χρωμοσωμάτων είναι δυνατή η ταυτοποίησή τους και η ανίχνευση τόσο αριθμητικών όσο δομικών ανωμαλιών μέχρι το επίπεδο που επιτρέπει η διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου. Η μελέτη μεγάλου αριθμού μεταφάσεων επιτρέπει τη διερεύνηση πιθανών μωσαϊκισμών. Τέλος, τα χρωμοσώματα σε κάθε μετάφαση φωτογραφίζονται και πλέον, με τη χρήση εξειδικευμένου λογισμικού ταξινομούνται ανά ζεύγη και σειρά μειούμενου μεγέθους (καρυότυπος) και οι εικόνες αποθηκεύονται ώστε να είναι εφικτή η καλύτερη ανάλυσή τους.

Η μεθοδολογία της διεξαγωγής του καρυοτύπου παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα. Η ανάγκη της καλλιέργειας κυττάρων στην πλειονότητα των περιπτώσεων (εξαιρέση αποτελεί ο άμεσος καρυότυπος) την καθιστά χρονοβόρα και κοστοβόρα ενώ η διαδικασία της ανάλυσης είναι επίπονη και απαιτητική. Επιπλέον, η διακριτική ικανότητα του συμβατικού καρυοτύπου, κάτω από τις καλύτερες προϋποθέσεις, φθάνει τις 3-5 Mb, με αποτέλεσμα να μην είναι ανιχνεύσιμες μικρότερου μεγέθους χρωμοσωματικές ανωμαλίες οι οποίες είναι δυνατό να οδηγούν σε σοβαρά γενετικά σύνδρομα όπως μικροελλείμματα και μικροδιπλασιασμοί.

1.2.2 Μοριακή Κυτταρογενετική

A) *In situ* υβριδοποίηση φθορίζόντων ανιχνευτών (FISH- Fluorescent In Situ Hybridization)

Η μεθοδολογία FISH ήταν μέχρι πριν από μερικά χρόνια η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη τεχνική της μοριακής κυτταρογενετικής από τις αρχές της δεκαετίας του '80. Εφαρμόζεται για την ανίχνευση της παρουσίας ή απουσίας ειδικών αλληλουχιών του DNA στα χρωμοσώματα με τη χρήση φθοροφόρων αλληλουχιών DNA-ανιχνευτών οι οποίοι υβριδίζονται μόνο στις θέσεις των χρωμοσωμάτων με τις οποίες εμφανίζουν υψηλό βαθμό ομολογίας. Στη συνέχεια με την παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού μπορεί να διαπιστωθεί η παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων αλληλουχιών καθώς και η θέση τους στα χρωμοσώματα. Εφαρμόζεται σε παρασκευάσματα κλασσικής κυτταρογενετικής σε αντικειμενοφόρες πλάκες αλλά και σε μονιμοποιημένο ιστό, επίχρισμα αίματος ή μυελού των οστών, σε άμεσα μονιμοποιημένα κύτταρα και σε μεσοφασικούς πυρήνες.



Εικόνα.1.9 Διαγραμματική απεικόνιση της αρχής της μεθοδολογίας της FISH

Η μεθοδολογία FISH χρησιμοποιείται για να αυξήσει τη διαγνωστική δύναμη της κυτταρογενετικής ανάλυσης εφόσον δύναται να ξεπεράσει τον περιορισμό της διακριτικής ικανότητας του συμβατικού καρυοτύπου επιτρέποντας την ανίχνευση μικροελλειμμάτων, μικροδιπλασιασμών και άλλων μικρού μεγέθους δομικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Μέχρι πρόσφατα είχε ευρεία εφαρμογή στην εργαστηριακή διάγνωση συνδρόμων μικροελλειμμάτων όπως το DiGeorge, Prader Will/Angelman, Williams κ.α.. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η συμβολή της στην ταχεία προγεννητική και προεμφυτευτική διάγνωση ανευπλοειδιών. Σήμερα, τείνει να αντικατασταθεί από περισσότερο σύγχρονες μεθοδολογίες, ωστόσο παραμένει ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο για τη χρωμοσωματική ανάλυση.

B) Ποσοτική φθορίζουσα αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (QF-PCR, Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction)

Οι αλληλουχίες του ανθρωπίνου γονιδιώματος διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αντιγράφων τους: το μοναδιαίο DNA, στο οποίο περιλαμβάνονται τα περισσότερα γονίδια, το μετρίως επαναλαμβανόμενο DNA (βραχείες αλληλουχίες οι οποίες επαναλαμβάνονται 10-1000 φορές στο γονιδίωμα) και το πολύ-επαναλαμβανόμενο DNA (μικροδορυφορικό και μινιδορυφορικό).

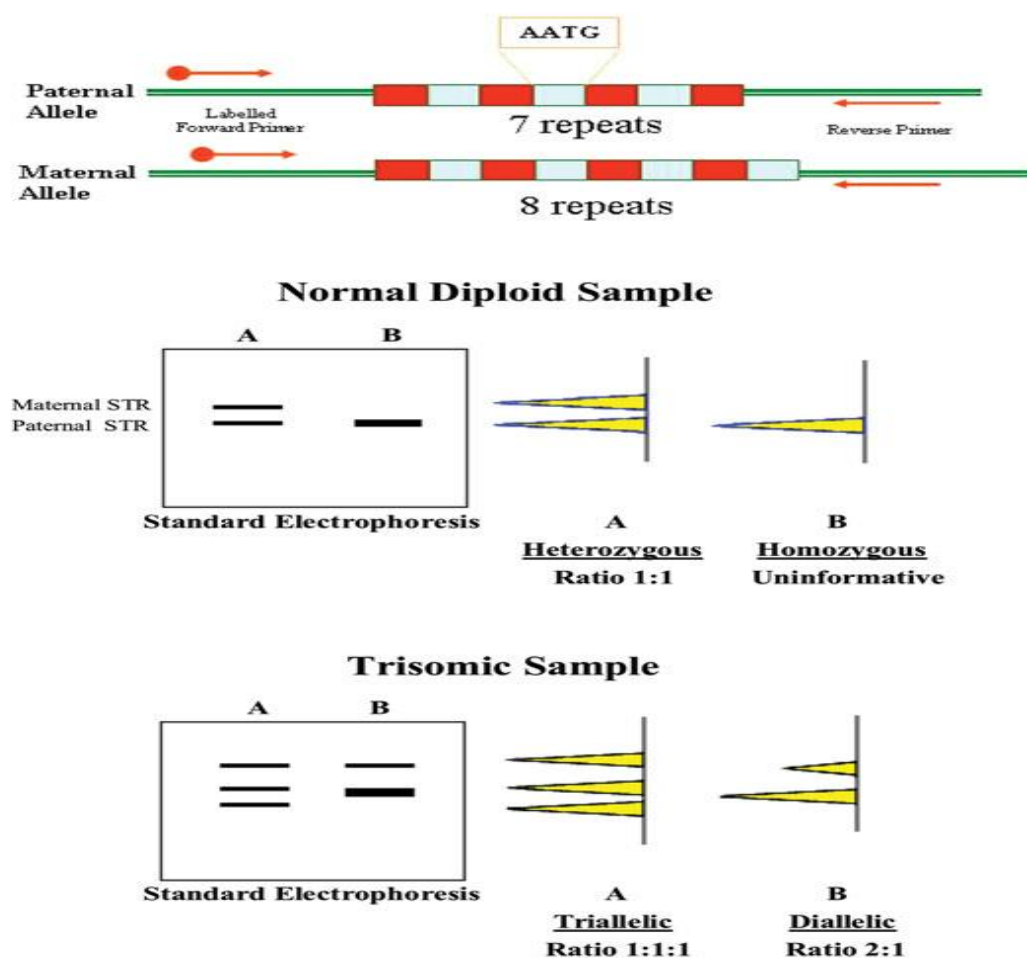
Οι μικρές εν σειρά επαναλήψεις (STRs, Short Tandem Repeats) κατατάσσονται στο μικροδορυφορικό πολύ-επαναλαμβανόμενο DNA και αποτελούνται από μονάδες επανάληψης 1-10 ζευγών βάσεων (bp). Το συνολικό τους μήκος δεν ξεπερνά τα 100 bp ενώ, λόγω της ποικιλίας του αριθμού επαναλήψεων της μονάδας τους, εμφανίζουν υψηλό ποσοστό ετεροζυγωτίας. Η υψηλή πολυμορφικότητα των STRs καθιστά τις αλληλουχίες αυτές χρήσιμους δείκτες με εφαρμογές όπως την ταυτοποίηση ατόμων, τη χαρτογράφηση του γονιδιώματος και την ανίχνευση ανευπλοειδιών τόσο προγεννητικά όσο μεταγεννητικά σε έμβρυα που γεννήθηκαν και ιστούς προϊόντων αποβολής. (13,14)

Για την ανίχνευση ανευπλοειδιών χρησιμοποιείται η μεθοδολογία QF-PCR η οποία επιτρέπει την ενίσχυση επιλεγμένων STRs για κάθε υπό εξέταση χρωμόσωμα με τρόπο ώστε να προκύπτει ποσοτική σχέση μεταξύ των αλληλομόρφων ενός δείκτη. Τα βασικά κριτήρια για την επιλογή κατάλληλων δεικτών είναι:

- Η εμφάνιση υψηλής πολυμορφικότητας στον υπό μελέτη πληθυσμό ούτως ώστε η πιθανότητα ετεροζυγωτίας να είναι υψηλή και κατ' αυτόν τον τρόπο να επιτρέπεται η ποσοτική σύγκριση μεταξύ των αλληλομόρφων.
- Η μονάδα επανάληψης να είναι τετρανουκλεοτιδική ή πεντανουκλεοτιδική. Όσο μικρότερη είναι η μονάδα επανάληψης τόσο υψηλότερη είναι η πολυμορφικότητα, ωστόσο για αυτόν το λόγο τα STRs με μικρή μονάδα επανάληψης εμφανίζουν μεγάλη αστάθεια και ως εκ τούτου δεν επιτρέπουν την ασφαλή διεξαγωγή συμπερασμάτων.
- Η θέση των STRs στο χρωμόσωμα είναι σημαντική καθώς είναι γνωστό ότι για την εμφάνιση ορισμένων συνδρόμων δεν είναι απαραίτητη η τρισωμία ολόκληρου του χρωμοσώματος αλλά αρκεί να είναι τριπλασιασμένη μια κρίσιμη για την εμφάνιση του συνδρόμου περιοχή (critical region) όπως συμβαίνει στο σύνδρομο Down (21q22.3).

Μετά την απομόνωση του DNA ακολουθεί η QF-PCR η οποία είναι κατάλληλα τροποποιημένη ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση και ποσοτικοποίηση των αλληλομόρφων των υπό ανάλυση STRs. (15) Όταν ένας δείκτης είναι ετερόζυγος (πληροφοριακός) εμφανίζει, σε ευπλοειδικά άτομα, δυο αλληλόμορφα με σχέση 1:1 μεταξύ τους υποδεικνύοντας την παρουσία δυο χρωμοσωμάτων από τα οποία

προέρχονται ενώ στις περιπτώσεις τρισωμιών ανιχνεύονται, είτε τρία διαφορετικά αλληλόμορφα είτε δυο με αναλογία 2:1 μεταξύ τους, υποδεικνύοντας την παρουσία τριών χρωμοσωμάτων. Στις περιπτώσεις όπου ένας δείκτης είναι ομόζυγος δεν είναι δυνατή η σύγκριση των αλληλομόρφων οπότε ο δείκτης θεωρείται μη-πληροφοριακός. Προκειμένου να αυξηθεί η πληροφορία συνήθως εξετάζονται περισσότεροι του ενός δείκτες για κάθε χρωμόσωμα.



Εικόνα 1.10 Διαγραμματική απεικόνιση της μεθοδολογίας QF-PCR
 Πηγή: www.landesbioscience.com

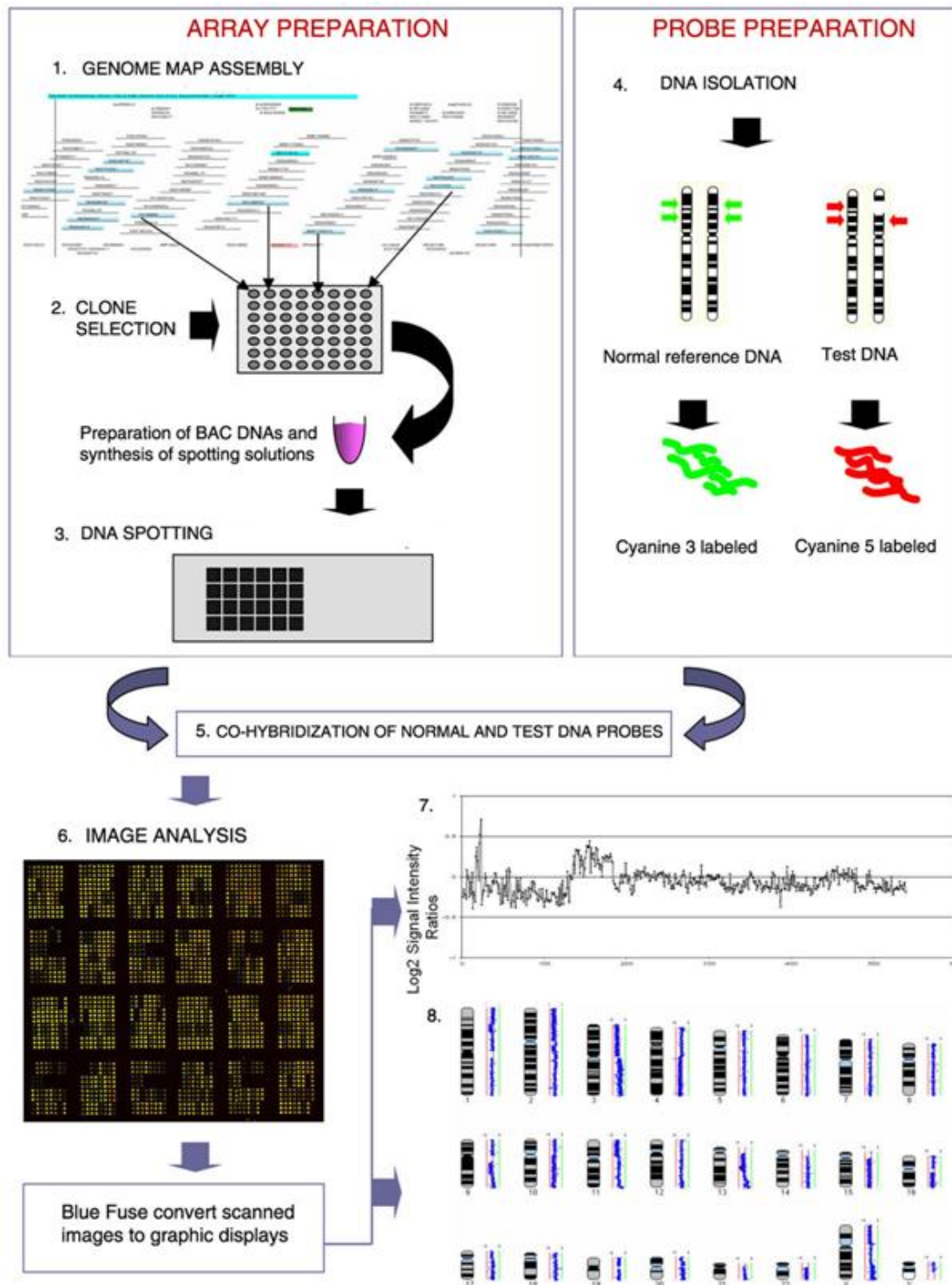
Στην προγεννητική διάγνωση, μπορεί να εφαρμοσθεί σε εμβρυϊκό DNA το οποίο απομονώνεται από δείγμα χοριοτικών λαχνών, αμνιακού υγρού και σπανιότερα εμβρυϊκού αίματος. Έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση ανευπλοειδιών των χρωμοσωμάτων 13, 18, 21 και των χρωμοσωμάτων του φύλου ωστόσο σχεδόν παντού παραμένει ως μέθοδος που συμπληρώνει τον καρυότυπο αφού δεν είναι δυνατό να ανιχνεύσει μωσαϊκισμούς χαμηλότερους από το 10-15%, αριθμητικές ανωμαλίες άλλων χρωμοσωμάτων καθώς και δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Η

μεθοδολογία QF-PCR εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα καθώς είναι ταχεία, αποδοτική, αξιόπιστη και με χαμηλό κόστος. Μπορεί να ανιχνεύσει μητρική πρόσμιξη DNA, μικροελλείματα/μικροδιπλασιασμούς οι οποίοι δύναται να έχουν κλινική σημασία και μπορεί να γίνει ταυτοποίηση διδύμων.

Γ) Συγκριτικός Γονιδιωματικός Υβριδισμός (CGH, Comparative Genomic Hybridization)

Η μεθοδολογία CGH χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μη ισοζυγισμένων χρωμοσωματικών ανωμαλιών μεγέθους 1-3 Mb. Στη CGH δυο δείγματα γονιδιωματικού DNA σημαίνονται διαφορεικά με φθοροφόρα μόρια και υβριδοποιούνται ταυτόχρονα *in situ* σε επιχρίσματα φυσιολογικών μεταφάσεων. Η αναλογία της έντασης των δύο σημάτων φθορισμού αποτελεί μέτρο της αναλογίας του αριθμού αντιγράφων των δύο δειγμάτων DNA. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί σε μεσοφασικούς ή μεταφασικούς πυρήνες ωστόσο οι σύγχρονες εφαρμογές αντικαθιστούν τους πυρήνες με μικροσυστοιχίες BAC DNA, ολιγονουκλειοτιδίων και μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms).

Η εξέλιξη της μεθόδου με τη χρήση μικροσυστοιχιών καλά καθορισμένων και χαρτογραφημένων τμημάτων γονιδιωματικού DNA ακινητοποιημένων σε γυάλινη επιφάνεια αντί των μεταφασικών χρωμοσωμάτων οδήγησε στη σημαντική αύξηση της διακριτικής της ικανότητας. Αυτή εξαρτάται από το σχεδιασμό της και κυρίως από τον αριθμό των καθηλωμένων αλληλουχιών, τη θέση τους στο γονιδίωμα και τη μεταξύ τους απόσταση. Είναι διαθέσιμες μικροσυστοιχίες γονιδιωματικού DNA με διακριτική ικανότητα κάτω από 150 Kb έως 1 Mb οι οποίες επιτρέπουν την ανίχνευση υπομικροσκοπικών μικροελλειμμάτων/μικροδιπλασιασμών καθώς και την ακριβή θέση των σημείων τομής μιας δομικής χρωμοσωματικής ανωμαλίας. Η μέθοδος μπορεί να συμπληρώσει τις συνήθεις μεθόδους χρωμοσωματικής ανάλυσης αυξάνοντας σημαντικά τη διαγνωστική δύναμη. (16, 17)



Εικόνα 1.11 Διαγραμματική απεικόνιση της μεθοδολογίας arrayCGH
 Πηγή: embryology.med.unsw.au

Ωστόσο, η ανίχνευση ευρημάτων άγνωστης κλινικής σημασίας, ιδιαίτερα στην προγεννητική διάγνωση, καθιστά ορισμένες φορές, δυσχερή την ερμηνεία των αποτελεσμάτων και τη γενετική συμβουλευτική. Για το λόγο αυτό, συχνά ο σχεδιασμός των μικροσυστοιχιών είναι περισσότερο πυκνός σε περιοχές με γνωστή κλινική σημασία, κάνοντας τη μέθοδο περισσότερο στοχευμένη.

Υπάρχουν και άλλες στοχευμένες μέθοδοι της μοριακής κυτταρογενετικής οι οποίες μπορούν να ανιχνεύσουν μικροελλείμματα/μικροδιπλασιασμούς, όπως η πολλαπλή ενίσχυση ανιχνευτών εξαρτώμενη από τη δράση της λιγάσης (MLPA, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).

Συνοψίζοντας, η ανάπτυξη της μοριακής κυτταρογενετικής έχει διευρύνει τους ορίζοντες της χρωμοσωματικής ανάλυσης υπερβαίνοντας ορισμένους από τους σοβαρούς περιορισμούς της Κλασικής Κυτταρογενετικής. Οι αλματώδεις εξελίξεις στην τεχνολογία οδήγησε στην ανάπτυξη τεχνικών και μεθοδολογιών οι οποίες επιτρέπουν την ανίχνευση υπομικροσκοπικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών, όπως μικροελλείμματα και μικροδιπλασιασμούς, αυξάνοντας τη διαγνωστική δύναμη της χρωμοσωματικής διερεύνησης. Επιπλέον, δίνεται η δυνατότητα μελέτης της οργάνωσης των χρωμοσωμάτων, της σχέσης της με την έκφραση των γονιδίων και την ιστοειδικότητα και είναι δυνατόν να μελετηθούν μηχανισμοί γένεσης χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Επίσης, σημαντικό πλεονέκτημα είναι η εφαρμογή των μεθοδολογιών αυτών και σε μη διαιρούμενα κύτταρα ή η εφαρμογή αναδρομικά σε μονιμοποιημένα κύτταρα, παρακάμπτοντας με αυτόν τον τρόπο την ανάγκη κυτταροκαλλιιεργειών φρέσκων διαιρούμενων κυττάρων.

Οι μεθοδολογίες της Μοριακής Κυτταρογενετικής χρησιμεύουν και ως «εργαλεία» για τη διερεύνηση και διευκρίνιση ευρημάτων στον καρυότυπο. Για παράδειγμα, σε περιπτώσεις υπεράριθμων χρωμοσωμάτων δεικτών όπου το πρότυπο ζώνωσης δεν επιτρέπει το χαρακτηρισμό τους, οι μοριακές μεθοδολογίες μπορούν εύκολα και γρήγορα να προσδιορίσουν με ακρίβεια την προέλευση του γενετικού υλικού. Επίσης, σε περιπτώσεις δομικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών μπορεί να αποκαλυφθούν ανισοζυγίες του γενετικού υλικού προσδιορίζοντας με ακρίβεια το γονιδιακό τους περιεχόμενο. Οι πληροφορίες που συνεισφέρουν οι μεθοδολογίες της Μοριακής Κυτταρογενετικής στη χρωμοσωματική ανάλυση οδηγούν σε καλύτερη πρόβλεψη του φαινοτύπου του πάσχοντος και ως εκ τούτου, καλύτερη διαχείριση των περιστατικών.

Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Διακριτική ικανότητα	Χρόνος
Καρυότυπος	Απεικόνιση όλων των χρωμοσωμάτων, διάγνωση αριθμητικών/δομικών ανωμαλιών και μωσαϊκισμών, διαθεσιμότητα γενετικού υλικού μετά από καλλιέργεια	Απαιτεί διαιρούμενους ιστούς, χρονοβόρος, κοστοβόρος, δεν ανιχνεύει μικροελλειμματα/μικροδιπλασιασμούς, μονογονεϊκή δισωμία.	3-5 Mb	15-20 ημέρες
FISH	Ανίχνευση μικρότερων χρωμοσωματικών ανωμαλιών, ταυτοποίηση markers, μωσαϊκισμοί, ταχεία	Κοστοβόρος, λιγότερο αποδοτική	Kb (εξαρτάται από ανιχνευτές και μικροσκοπία)	1-2 ημέρες (άμεσο)
QF-PCR	Ταχεία, οικονομική, απλή, αποδοτική, ανίχνευση μητρικής πρόσμιξης και μικροελλειμμάτων/μικροδιπλασιασμών, ταυτοποίηση διδύμων	Στοχευμένες αριθμητικές ανωμαλίες, δεν ανιχνεύει δομικές, τετραπλοειδία	1-2 bp, 10-15% μωσαϊκισμοί	Λίγες ώρες
Array CGH	Αποδοτική, ανίχνευση μικροελλειμμάτων μικροδιπλασιασμών	Περιορισμένη ανίχνευση μωσαϊκισμού, δεν ανιχνεύει ισοζυγισμένες ανωμαλίες, τριπλοειδίες, κοστοβόρος, ευρήματα άγνωστης κλινικής σημασίας	100Kb-1Mb	2 ημέρες

Πίνακας 1.2 Βασικά χαρακτηριστικά των μεθόδων που χρησιμοποιούνται στην προγεννητική διάγνωση χρωμοσωματικών ανωμαλιών

1.3 ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ (18)

Η προγεννητική διάγνωση είναι το σύνολο των ελέγχων οι οποίοι διενεργούνται προκειμένου να διερευνηθεί η υγεία του εμβρύου. Οι γνώση που προκύπτει κατά τους προγεννητικούς ελέγχους συντελεί στη δυνατότητα λήψης αποφάσεων για τη συνέχιση ή διακοπή της κύησης, την πρόβλεψη της κλινικής εικόνας του νεογέννητου καθώς στην καλύτερη διαχείριση της κύησης με γνώμονα την ομαλή έκβασή της τόσο για το έμβρυο όσο για τη μητέρα.

Οι προσεγγίσεις της προγεννητικής διάγνωσης διακρίνονται σε επεμβατικές και μη επεμβατικές ανάλογα με τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται.

1.3.1 Επεμβατικές Μέθοδοι

A) Δειγματοληψία χοριονικών λαχνών (CVS, Chorionic Villus Sampling)

Στη μεθοδολογία αυτή λαμβάνεται μικρό τμήμα της τροφοβλάστης, η οποία προκύπτει από το ζυγωτό και σε μεγάλο βαθμό αντανακλά τη γενετική σύσταση του εμβρύου. Διενεργείται με τη διακοιλιακή εισαγωγή λεπτής βελόνας, όπου με υπερηχογραφική καθοδήγηση, λαμβάνεται ένα μικρό μέρος τροφοβλαστικού ιστού. Τα κύτταρα των χοριονικών λαχνών μπορούν να καλλιεργηθούν ή να αναλυθούν άμεσα με σκοπό τη διερεύνηση χρωμοσωματικών ανωμαλιών ή γονιδιακών μεταλλαγών. (19) Συνήθως, πραγματοποιείται μεταξύ 11^{ης} και 13^{ης} εβδομάδας της κύησης, ωστόσο λήψη τμήματος του πλακούντα μπορεί να γίνει και αργότερα στην κύηση, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που δεν είναι προτιμητέα η λήψη αμνιακού υγρού.

Η λήψη χοριονικών λαχνών απευθύνεται σε περιπτώσεις:

- Γυναικών με αυξημένη αναπαραγωγική ηλικία (άνω των 35 ετών) λόγω της συσχέτισης της ηλικία της εγκύου με τον κίνδυνο ανευλοειδιών.
- Αυξημένης αυχενικής διαφάνειας ή άλλου ευρήματος στον υπέρηχο 1^{ου} τριμήνου.

- Αυξημένου κινδύνου τρισωμίας από τους βιοχημικούς ελέγχους 1^{ου} τριμήνου.
- Οικογενειακού ιστορικού χρωμοσωματικής ανωμαλίας όπως στις περιπτώσεις ύπαρξης ήδη ενός παιδιού με *de novo* χρωμοσωματική ανωμαλία και παρουσίας δομικής ανωμαλίας σε έναν εκ των δύο γονέων.
- Οικογενειακού ιστορικού γενετικού ή μεταβολικού νοσήματος όπως στις περιπτώσεις ύπαρξης ήδη ενός παιδιού που πάσχει από μονογονιδιακή ασθένεια, γονείς φορείς για την ίδια μονογονιδιακή ασθένεια κ.α..

Παρά τα οφέλη της CVS, η επεμβατική διαδικασία της λήψης συνοδεύεται από κίνδυνο ~1% αυτόματης αποβολής, κίνδυνος ο οποίος είναι μεγαλύτερος από αυτόν της αμνιοπαρακέντησης. (20)

B) Αμνιοπαρακέντηση

Αμνιοπαρακέντηση ονομάζεται η λήψη μιας ποσότητας αμνιακού υγρού, με τη διακοιλιακή χρήση λεπτής βελόνας, υπό υπερηχογραφική παρακολούθηση. Το αμνιακό υγρό περιβάλλει το έμβρυο στο εσωτερικό της μήτρας και σε αυτό αιωρούνται κύτταρα του εμβρύου τα οποία προέρχονται από την επιφάνειά του, το ουροποιητικό σύστημα, το αναπνευστικό σύστημα κ.α.. (19) Η αμνιοπαρακέντηση διεξάγεται συνήθως μεταξύ 15^{ης} και 20^{ης} εβδομάδας της κύησης, ωστόσο μπορεί να πραγματοποιηθεί και αργότερα. Τα εμβρυϊκά κύτταρα του αμνιακού υγρού μπορούν να καλλιεργηθούν ή να αναλυθούν άμεσα προκειμένου να διερευνηθεί η γενετική σύσταση του εμβρύου.

Η αμνιοπαρακέντηση προτείνεται σε περιπτώσεις ανάλογες με τη λήψη χοριονικών λαχνών. Όπως και στη CVS, η επεμβατική διαδικασία της λήψης αμνιακού υγρού συνδέεται με κίνδυνο αποβολής του εμβρύου ο οποίος είναι λίγο μικρότερος. (20)

Γ) Λήψη εμβρυϊκού αίματος (FBS, Fetal Blood Sampling)

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται, κατά κανόνα, στο 3^ο τρίμηνο της κύησης με τη διακοιλιακή λήψη εμβρυϊκού αίματος, από αγγείο του ομφάλιου λώρου, με τη χρήση βελόνας, υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση. Από το δείγμα εμβρυϊκού αίματος

μπορεί να γίνει, είτε άμεσα είτε μετά από καλλιέργεια, διερεύνηση της γενετικής σύστασης του εμβρύου.

Ο κίνδυνος αποβολής ή εμβρυϊκού θανάτου που συνδέεται με την επεμβατική διαδικασία, είναι αρκετά υψηλότερος από της CVS και της αμνιοπαρακέντησης και εκτιμάται ότι αυξάνει κατά 3-5%. Για το λόγο αυτό η μέθοδος συστήνεται σε σπάνιες περιπτώσεις όπου ο κίνδυνος παθογένειας είναι μεγαλύτερος από αυτόν της αποβολής και σήμερα έχει πρακτικά εγκαταληφθεί.

1.3.2 Μη επεμβατικές μέθοδοι

A) Υπερηχογραφικοί έλεγχοι

Οι υπερηχογραφικοί έλεγχοι κατά τη διάρκεια της κύησης μπορούν να διεξαχθούν οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της κύησης μετά την 5^η εβδομάδα. Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο υπερηχογραφικός έλεγχος 1^{ου} τριμήνου (11^η-13^η εβδ. κύησης) και 2^{ου} τριμήνου (18^η-20^η εβδ. κύησης), γνωστός και ως υπερηχογραφικός έλεγχος β' επιπέδου.

Κατά τις μετρήσεις και παρατηρήσεις που γίνονται στη διάρκεια της υπερηχογραφίας ελέγχεται η ηλικία της κύησης, το μέγεθος, η ανάπτυξη και η κινητικότητα του εμβρύου, ο αριθμός των εμβρύων, η κατάσταση και θέση του πλακούντα και η παρουσία τυχόν ανωμαλιών στο έμβρυο.

Η διεξαγωγή των υπερηχογραφικών ελέγχων δεν συνδέεται με κινδύνους.

B) NT-plus

Η μέθοδος αυτή αποτελεί συνδυασμό συνεκτίμησης ευρημάτων στον υπερηχογραφικό έλεγχο 1^{ου} τριμήνου και μετρήσεων βιοχημικών δεικτών στο περιφερικό αίμα της εγκύου κατά την ίδια περίοδο (11^η-13^η εβδ. κύησης). Μετράται το πάχος της αυχενικής διαφάνειας του εμβρύου και τα επίπεδα δυο πρωτεϊνών στο αίμα της εγκύου (ελεύθερη β-hCG και PAPP-A) σε συνδυασμό με την ηλικία της μέλλουσας μητέρας.

Σε όλα τα έμβρυα, μεταξύ 9 και 14 εβδομάδων κύησης, συσσωρεύεται υγρό κάτω από το δέρμα στο πίσω μέρος της κεφαλής και του τραχήλου. Έχει βρεθεί ότι η

αύξηση του υγρού συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις μεταξύ των οποίων συχνές ανευπλοειδίες και ιδιαίτερα την τρισωμία 21. (21)

Έχουν προταθεί κατά καιρούς διάφοροι βιοχημικοί δείκτες στο αίμα της εγκύου ως προγνωστικοί για τον κίνδυνο τρισωμιών και ιδιαίτερα της τρισωμίας 21. Η πρωτεΐνη PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein-A, σχετιζόμενη με την κύηση πρωτεΐνη του πλάσματος A) και η β-hCG (beta human chorionic gonadotrophin, β ανθρώπινη χοριονική γοναδοτροπίνη) εξετάζονται με απλή αιμοληψία είτε πριν είτε την ημέρα της υπερηχογραφικής μέτρησης της αυχενικής διαφάνειας. (22) Το γονίδιο *PAPPA* κωδικοποιεί μια εκκρινόμενη μεταλλοπρωτεΐνάση η οποία συνδέεται με πρωτεΐνες πρόσδεσης σε ινσουλινοειδείς αυξητικούς παράγοντες (IGFBPs, Insulin-like Growth Factor Binding Proteins). Πιστεύεται ότι εμπλέκεται σε τοπικού χαρακτήρα διαδικασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού όπως κατά την επούλωση τραυμάτων και την αναδόμηση οστών. Ως βιοχημικός προγνωστικός δείκτης κατά την κύηση, τα επίπεδα της PAPP-A τείνουν να είναι χαμηλότερα συγκρινόμενα με φυσιολογικές κυήσεις, σε κυήσεις με έμβρυα με τρισωμία 21. Χαμηλά επίπεδα PAPP-A μπορεί επίσης να αποτελέσουν προγνωστικό δείκτη δυσλειτουργίας του πλακούντα, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη του εμβρύου, προεκλαμψία, αποκόλληση του πλακούντα, προωρότητα ή και ενδομήτριο θάνατο του εμβρύου. Η β-hCG αποτελεί υπομονάδα μιας γλυκοπρωτεϊνικής φύσης ορμόνης, η οποία παράγεται φυσιολογικά από κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης του πλακούντα μετά την εμφύτευση του εμβρύου κατά την κύηση ωστόσο, παρατηρείται και σε παθολογικές καταστάσεις εκτός κύησης όπως σε περιπτώσεις καρκίνου. Ως βιοχημικός προγνωστικός δείκτης κατά την κύηση, τα επίπεδα της ελεύθερης υπομονάδας της β-hCG τείνουν να είναι υψηλότερα συγκρινόμενα με φυσιολογικές κυήσεις, σε κυήσεις με έμβρυα με τρισωμία 21.

Με τη συνεκτίμηση της ηλικίας της εγκύου, τη μέτρηση της αυχενικής διαφάνειας, των αποτελεσμάτων του βιοχημικού ελέγχου και ορισμένων παραμέτρων ακόμα προκύπτει ένας συνολικός κίνδυνος ο οποίος εντάσσει την εγκυμοσύνη σε ομάδα υψηλού κινδύνου και συστήνεται χρωμοσωματικός έλεγχος.

Οι παραπάνω μη επεμβατικές προσεγγίσεις για τον υπολογισμό του κινδύνου να εμφανίσει ένα έμβρυο κάποια από τις συχνότερες ανευπλοειδίες έφεραν επανάσταση στα πρωτόκολλα προγεννητικών ελέγχων και χρησιμοποιούνται ευρύτατα. Ωστόσο,

τα ποσοστά ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων οδηγούν εγκύους με φυσιολογικά έμβρυα σε επεμβατική προγεννητική διάγνωση με αποτέλεσμα να εκτίθενται στον κίνδυνο αποβολής, προσθέτουν άγχος στους μελλοντικούς γονείς και επιβαρύνουν οικονομικά είτε το ζευγάρι είτε το σύστημα δημόσιας υγείας. Από την άλλη, τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα είναι δυνατόν, αν δεν υπάρξουν άλλες ενδείξεις κατά την κύηση, να οδηγήσουν στη γέννηση πάσχοντος παιδιού με όλες τις δυσμενείς συνέπειες του γεγονότος. Τέτοιες περιπτώσεις έχουν καταγραφεί σε περιστατικά παιδιών που γεννήθηκαν με σ. Down, καθώς είναι δυνατόν να διαφύγει της διάγνωσης το 4-19% των παθολογικών εμβρύων ανάλογα με το συνδυασμό των βιοχημικών και υπερηχογραφικών ελέγχων που διεξάγονται. Για τους λόγους αυτούς γίνονται προσπάθειες για ανάπτυξη ακριβέστερων μη επεμβατικών μεθόδων.

Γ) Μη επεμβατική προγεννητική διερεύνηση χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου από το αίμα της εγκύου (NIPT, Non Invasive Prenatal Testing).

Η διαπίστωση της κυκλοφορίας εμβρυϊκών κυττάρων καθώς και ελεύθερου εξωκυττάρου εμβρυϊκού DNA (*cffDNA*, cell free fetal DNA) στο περιφερικό αίμα της εγκύου έδωσε νέα κατεύθυνση στη μη επεμβατική προγεννητική διερεύνηση της γενετικής σύστασης του εμβρύου.

Ανίχνευση εμβρυϊκών κυττάρων στην αιματική κυκλοφορία της εγκύου

Παρ' ότι η ανίχνευση εμβρυϊκών κυττάρων στο περιφερικό αίμα της εγκύου έχει γίνει πολλές δεκαετίες πριν, τη δεκαετία του 70 έγινε εφικτός ο χαρακτηρισμός της προέλευσης των κυττάρων αυτών. (23)

Η ομάδα της DW Bianchi (2002) ήταν πρωτοπόρος στη διερεύνηση της δυνατότητας προγεννητικής διάγνωσης γενετικών νοσημάτων σε εμπύρηννα εμβρυϊκά κύτταρα στο αίμα της εγκύου και ειδικότερα για τη διάγνωση του φύλου του εμβρύου και ανευπλοειδιών. (24) Η μελέτη των εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθροκυττάρων στηρίζεται στην απομόνωσή τους με ειδικές μεθόδους και στη συνέχεια την εφαρμογή της FISH. (25,26)

Παρ' ότι η διαπίστωση της κυκλοφορίας εμβρυϊκών κυττάρων στο αίμα της εγκύου φαίνονταν υποσχόμενη, η προσπέλαση ορισμένων περιορισμών που εμφανίζει δεν έχει επιτρέψει την ευρεία εφαρμογή της στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση

μέχρι σήμερα. Ένας σημαντικός περιορισμός είναι η σπανιότητα αυτών των κυττάρων. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες ο μέσος όρος τους σε κήσεις με φυσιολογικά άρρενα έμβρυα είναι περίπου 1 κύτταρο ανά mL (6 κύτταρα/mL το μέγιστο) (27,28), ενώ αντίστοιχα σε κήσεις με άρρενα έμβρυα με τρισωμία 21 είναι μεγαλύτερος. (29) Άλλος ανασταλτικός παράγοντας είναι η δυσκολία στην απομόνωση των εμβρυϊκών κυττάρων και η κακή ποιότητα των πυρήνων τους, η οποία δυσχεραίνει την επιτυχή εφαρμογή της FISH. Τέλος, ένα σημαντικό μειονέκτημα είναι η διαπίστωση της παραμονής κυττάρων εμβρυϊκής προέλευσης στην κυκλοφορία της γυναίκας ακόμα και για δεκαετίες. (30,31) Το γεγονός αυτό παρεμποδίζει την ακριβή γενετική διερεύνηση εμβρύων σε περιπτώσεις που έχει προηγηθεί άλλη κύηση.

Εξωκυττάριο ελεύθερο εμβρυϊκό DNA (cffDNA)

Η παρουσία ελεύθερου DNA στην αιματική κυκλοφορία καθώς και η καταλληλότητα της μελέτης του ήταν ήδη γνωστά πολλές δεκαετίες πριν. (32) Η πρώτη διαπίστωση της παρουσίας ελεύθερου **εμβρυϊκού** DNA στο πλάσμα/ορρό περιφερικού αίματος εγκύου, από την ερευνητική ομάδα του Dennis Lo (33) το 1997, διεύρυνε εκ νέου τον ορίζοντα της μη επεμβατικής προγεννητικής διάγνωσης αλλάζοντάς της κατεύθυνση. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι το *cffDNA* προέρχεται είτε από κυκλοφορούντα εμβρυϊκά κύτταρα τα οποία αποδομούνται (32,33), είτε είναι από αποπτωτικά κύτταρα πλακουντιακής (τροφοβλαστικής) προέλευσης (34-36). Η δεύτερη υπόθεση είναι ισχυρότερη λόγω της ανεύρεσης *cffDNA* σε ανεμβρυϊκές κήσεις. Το ελεύθερο μητρικό DNA είναι λευκοκυτταρικής προέλευσης. (37)

Το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA αποτελεί ένα μικρό κλάσμα του συνολικού ελεύθερου DNA το οποίο κυκλοφορεί στο περιφερικό αίμα της εγκύου. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ανίχνευση του *cffDNA* είναι εφικτή από τις πρώτες εβδομάδες της κύησης και ότι το ποσοστό αυτό αυξάνει με το χρόνο σε κήσεις με φυσιολογικά έμβρυα σε ποσοστά 3-10% του συνολικού ελεύθερου DNA. (38-40) Η περιοριστική ποσότητα του *cffDNA* αποτελεί πρόκληση για τη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις όπου ο γενετικός δείκτης ο οποίος μελετάται είναι κοινός για τη μητέρα και το έμβρυο. Το ποσοστό του *cffDNA* αυξάνει σε περιπτώσεις προεκλαμψίας (41,42), ανευπλοειδίας του εμβρύου (27) και προωρότητας (43), ενώ φαίνεται ότι το ποσοστό του στο πλάσμα είναι υψηλότερο από το αντίστοιχο στον

ορρό. Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό είναι ότι, σε αντίθεση με τα εμβρυϊκά κύτταρα στο περιφερικό αίμα της εγκύου, το *cffDNA* απομακρύνεται από την κυκλοφορία αμέσως μετά τον τοκετό (44-46). Η διαπίστωση αυτή είναι σημαντική διότι τα αποτελέσματα από τη μελέτη του *cffDNA* δεν επηρεάζονται από προηγούμενες κυήσεις.

Εφόσον το μικρό ποσοστό του *cffDNA* σε σχέση με το συνολικό ελεύθερο DNA είναι περιοριστικός παράγοντας για τη μελέτη του, θα πρέπει είτε να εμπλουτιστεί επιλεκτικά το *cffDNA* είτε να μειωθεί το ελεύθερο μητρικό DNA ή να εξαλειφθεί το μητρικό υπόβαθρο εμπλουτίζοντας εμβρυοειδικές περιοχές του *cffDNA*, όπως με την αξιοποίηση εμβρυοειδικών επιγενετικών τροποποιήσεων. Έχει βρεθεί ότι το *cffDNA* είναι μικρότερου μεγέθους από το αντίστοιχο μητρικό. (47) Με βάση το χαρακτηριστικό αυτό, επιχειρήθηκε ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός του *cffDNA* με βάση τη διαφορά του μοριακού του μεγέθους σε σχέση με το αντίστοιχο μητρικό. (48) Ωστόσο, αυτή η μέθοδος εμπλουτισμού αποδείχθηκε χρονοβόρος, επίπονη και με αυξημένο κίνδυνο επιμολύνσεων. Προς την κατεύθυνση της μείωσης της ελευθέρωσης εξωκυττάριου μητρικού DNA, δοκιμάστηκε η σταθεροποίηση των μητρικών λευκοκυττάρων με τη χρήση φορμαλδεΰδης (49), εφόσον είναι γνωστό ότι η κύρια πηγή ελεύθερου μητρικού DNA είναι αιμοποιητικά κύτταρα (37). Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτής της προσέγγισης εμπλουτισμού δεν επιβεβαιώθηκαν από άλλες ομάδες (50,51).

Η αξιοποίηση επιγενετικών τροποποιήσεων στο DNA του εμβρύου αποτελεί πολύ ενδιαφέρουσα προσέγγιση για την προσπέλαση των εμποδίων που θέτει το χαμηλό ποσοστό του *cffDNA*. Επιγενετικές ονομάζονται οι τροποποιήσεις του DNA οι οποίες επηρεάζουν την έκφραση του χωρίς να αλλάζει η νουκλεοτιδική αλληλουχία. Η καλύτερα μελετημένη επιγενετική τροποποίηση είναι η μεθυλίωση του DNA. Η πρώτη υπόθεση ότι γενετικοί τόποι με διαφορετική μεθυλίωση μεταξύ DNA μητέρας και εμβρύου (DMRs, Differentially Methylated Regions) μπορούν να αξιοποιηθούν στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση έγινε το 2002 από τον LL Poon και τους συνεργάτες του (52). Ο πρώτος επιγενετικός δείκτης που προτάθηκε για τη μελέτη DNA του πλακούντα στο πλάσμα της εγκύου είναι στην περιοχή του γονιδίου *SERPINB5* (18q) το οποίο εκφράζει το προϊόν της μασπίνης (maspin) (45). Το γονίδιο *SERPINB5* είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο το οποίο εκφράζεται στον πλακούντα και

του οποίου η μεθυλίωση παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ιστοειδικής έκφρασης του. Βρέθηκε ότι η περιοχή αυτή είναι υπομεθυλιωμένη στον πλακούντα ενώ είναι υπερμεθυλιωμένη στα κύτταρα του αίματος της εγκύου. Έκτοτε έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ανεύρεσης και αξιοποίησης τέτοιου είδους δεικτών (46,53). Ιδιαίτερα σημαντική είναι η εργασία της E. Παπαγεωργίου (2009) και των συνεργατών της, οι οποίοι ταυτοποίησαν περισσότερες από 2000 περιοχές με διαφορετική μεθυλίωση (DMRs) για καθένα από τα χρωμοσώματα 13, 18, 21, X και Y τα οποία είναι τα χρωμοσώματα ενδιαφέροντος στην ανίχνευση των συχνότερων ανευπλοειδιών στην προγεννητική διάγνωση. (54) Χρησιμοποίησαν μικροσυστοιχίες νουκλεοτιδίων υψηλής ανάλυσης και βρήκαν ότι το 56-83% των DMRs βρίσκονται σε εξωγονιδιακές περιοχές ενώ μόλις το 1-11% βρίσκονται σε νησίδες CpG. Από τις τελευταίες δε, το 65% εντοπίζεται σε περιοχές υποκινητών γονιδίων.

Οι κυριότερες μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για τον εμπλουτισμό του *cffDNA* και οι οποίες βασίζονται στη διαφορετική μεθυλίωση του DNA μεταξύ μητέρας και εμβρύου είναι οι εξής:

- Χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών ευαίσθητων στη μεθυλίωση. (46,55)
Η μεθοδολογία είναι πολύ ευαίσθητη ωστόσο, παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα όπως η απαίτηση μεγαλομοριακού DNA, περιορισμός των περιοχών δράσης των περιοριστικών ενδονουκλεασών καθώς και το γεγονός της πιθανότητας ατελούς πέψης του ενζύμου, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα.
- Ειδική για τη μεθυλίωση αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (methylation specific PCR) με πρώτο στάδιο τη χρήση όξινου θεικού νατρίου (NaHSO₄). (45,46,55) Η μεθοδολογία βασίζεται στη μετατροπή των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες και το σχεδιασμό δύο ειδών εκκινητών για την PCR, άλλους για τις μεθυλιωμένες και άλλους για τις μη μεθυλιωμένες αλληλουχίες. Συγκεκριμένη μεθοδολογία διάκρισης του εμβρυϊκού από το μητρικό ελεύθερο DNA μπορεί να συνδυαστεί με διάφορες μεθοδολογίες ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Ωστόσο, πρόκειται για επίπονη και πολύπλοκη διαδικασία, συχνά οδηγεί σε αποδόμηση του DNA και ατελή μετατροπή των αμεθυλιωτών κυτοσινών σε ουρακίλες και ως εκ τούτου συχνά δεν οδηγεί σε ασφαλή συμπεράσματα.

- Ανοσοκατακρήμνιση μεθυλιωμένου DNA (MeDIP, Methylated DNA Immunoprecipitation). (56,57) Η μεθοδολογία αυτή βασίζεται στον εμπλουτισμό αλληλουχιών του *cffDNA* οι οποίες είναι υπερμεθυλιωμένες στο DNA του πλακούντα και υπομεθυλιωμένες στο ελεύθερο DNA του αίματος της μητέρας. Για τη διερεύνηση ανευπλοειδιών στην προγεννητική διάγνωση, μπορεί να συνδυαστεί με μεθοδολογίες ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης όπως η ποσοτική PCR (qPCR, quantitative PCR) και η ψηφιακή PCR (dPCR, digital PCR).

Με τη μελέτη του *cffDNA* στο πλάσμα της εγκύου είναι δυνατή σήμερα η διάγνωση μονογονιδιακών νοσημάτων, όπως η χορεία του Huntington, η αχονδροπλασία και η β-θαλασσαιμία σε περιπτώσεις όπου διερευνάται *de novo* ή πατρικής προέλευσης μεταλλαγή η οποία ωστόσο, απουσιάζει από τη μητέρα. (58-62) Επίσης μπορεί να διαγνωσθεί το φύλο του εμβρύου σε περιπτώσεις φυλοσύνδετων νοσημάτων, ώστε να οδηγούνται σε επεμβατική προγεννητική διάγνωση μόνο αυτές όπου το κυοφορούμενο έμβryo είναι άρρεν. (63) Ακόμα, είναι εφικτός ο προσδιορισμός του παράγοντα Rhesus (RhD) στο έμβryo σε περιπτώσεις όπου η μητέρα είναι RhD(-), περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο τη χορήγηση ανθρώπινου παράγοντα αντι-D μόνο στις γυναίκες οι οποίες κυοφορούν RhD(+) έμβρυα. (64,65) Μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση ανευπλοειδιών πραγματοποιείται σήμερα με αλληλούχιση του *cffDNA*, με τη βοήθεια τεχνολογιών επόμενης γενιάς (NGS, Next Generation Sequencing) με πολύ καλά αποτελέσματα. (66)

Άλλες προσεγγίσεις μη επεμβατικής προγεννητικής ανίχνευσης από το αίμα της εγκύου.

- Εξωκυτταρικό εμβρυϊκό RNA (*cffRNA*) (67,68)
Τα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις προσεγγίσεις μέσω του *cffDNA* είναι η δυνατότητα απομόνωσης μορίων RNA τα οποία εκφράζονται αποκλειστικά στον πλακούντα και ότι τα διάφορα είδη *cffRNA* βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με τα αντίστοιχα μόρια *cffDNA*.
- Εμβρυοειδικές πρωτεΐνες στο πλάσμα της εγκύου (69)
Στην προσέγγιση αυτή μελετώνται πρωτεΐνες οι οποίες ανιχνεύονται στο πλάσμα της εγκύου, σε σχετικά μικρές ποσότητες οι οποίες διαφοροποιούνται ανάλογα με την κυοφορία φυσιολογικού ή παθολογικού εμβρύου. Η παρουσία

μικροποσοτήτων τέτοιου είδους πρωτεϊνών δυσχεραίνει τη μελέτη τους καθιστώντας αναγκαίο τον εμπλουτισμό τους.

	Μη-επεμβατικός έλεγχος	Ανιχνευσιμότητα τρισωμίας 21 (%)
1^ο Τρίμηνο	NT	64-70
	NT+PAPP-A+βhCG	82-87
2^ο Τρίμηνο	Τριπλό τεστ (AFP, hCG, uE3)	69
	Τετραπλό τεστ (AFP, hCG, uE3, inhibin A)	81
1^ο και 2^ο Τρίμηνο	Συνδυασμένο τεστ (NT, PAPP-A, τετραπλό)	94-96
	Συνδυασμένο βιοχημικό τεστ (PAPP-A, τετραπλό)	85-88
	NIPT μέσω ελεύθερου εμβρυϊκού DNA	>99

Πίνακας 1.3 Ανιχνευσιμότητα της τρισωμίας 21 με τις μη επεμβατικές προσεγγίσεις

1.4 Η ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA

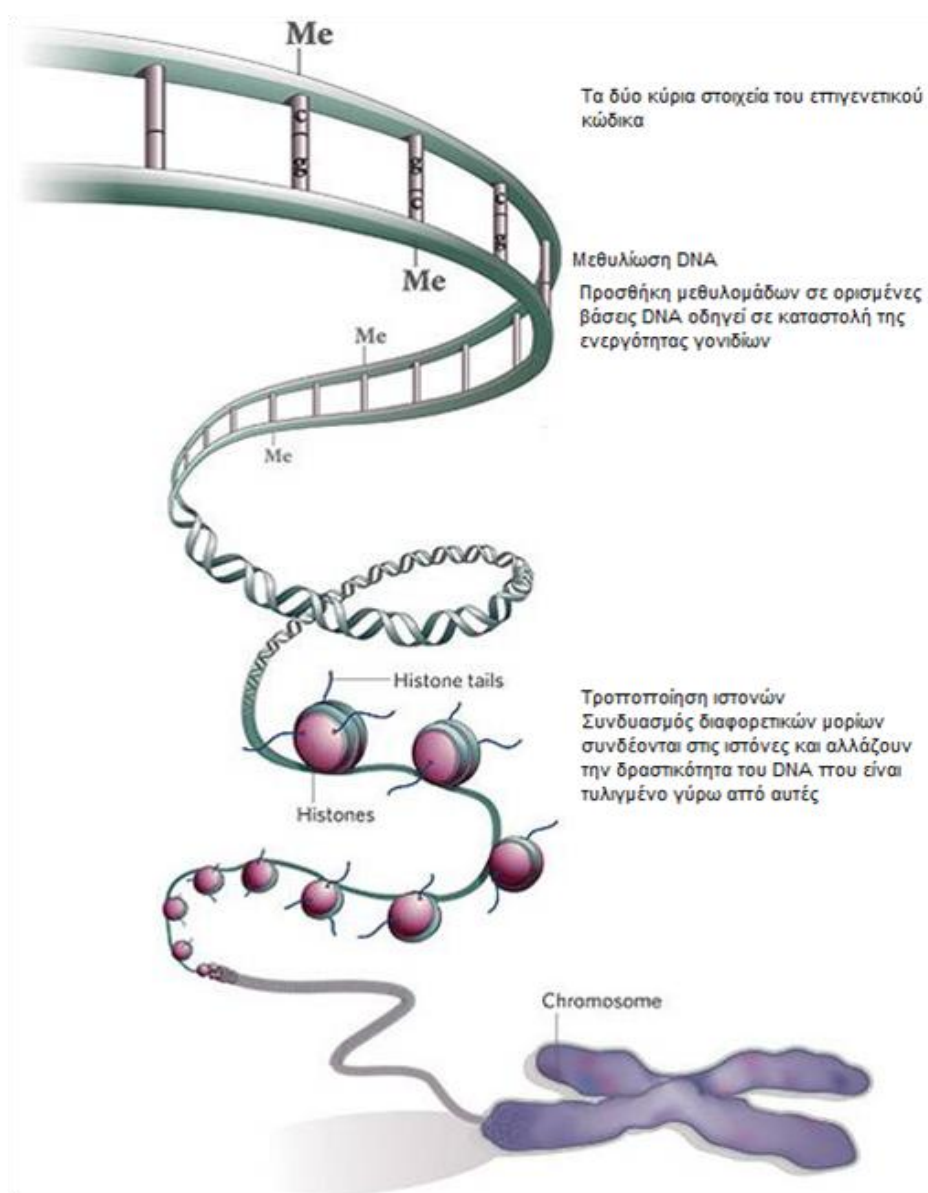
Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί ένα είδος επιγενετικής τροποποίησης του γενετικού υλικού, δηλαδή τροποποίηση η οποία δεν περιλαμβάνει αλλαγή στην αλληλουχία του. Ωστόσο, κληρονομείται και συντελεί στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων. (70) Περιλαμβάνει την προσθήκη μεθυλομάδας (-CH₃) στον ⁵C του πυριμιδινικού δακτυλίου της κυτοσίνης, η οποία οδηγεί στη δημιουργία 5-μεθυλοκυτοσίνης. Η μεθυλίωση του DNA παρατηρείται συνήθως σε δινουκλεοτίδια CpG. Μη μεθυλωμένα δινουκλεοτίδια CpG σχηματίζουν ομάδες στην 5' ρυθμιστική περιοχή ενεργών γονιδίων, γνωστών ως CG νησίδες (CG islands). Η υπερμεθυλίωση του DNA παρατηρείται στην ετεροχρωματίνη και σχετίζεται με την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Για παράδειγμα, σε καρκινικά κύτταρα εμφανίζεται υπερμεθυλίωση υποκινητών ογκο-κατασταλτικών γονιδίων οδηγώντας στην απενεργοποίησή τους. Άλλο παράδειγμα επιγενετικής τροποποίησης του DNA με μεθυλίωση είναι η τυχαία απενεργοποίηση του ενός χρωμοσώματος X σε θήλεα άτομα (XX). Το πρότυπο μεθυλίωσης ελέγχεται από τρεις τύπους ενζύμων: τις *de novo* DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMT-DNA methyl-transferase 3a και 3b) οι

οποίες προσθέτουν μεθυλομάδες στα δινουκλεοτίδια CpG, τις μεθυλοτρανσφεράσες διατήρησης (maintenance DNMT1) οι οποίες συντηρούν τη μεθυλίωση και τις απομεθυλάσες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την απομεθυλίωση του DNA και δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμα. Η απομεθυλίωση συνίσταται στην αφαίρεση της μεθυλομάδας ή της μεθυλιωμένης βάσης ή ακόμα και ολόκληρου του μεθυλιωμένου νουκλεοτιδίου. Στις δυο τελευταίες περιπτώσεις είναι απαραίτητη η δράση επιδιορθωτικού μηχανισμού για την αποκατάσταση του νουκλεοτιδίου. Το πρότυπο μεθυλίωσης επαναφέρεται στην αρχική του κατάσταση από γενιά σε γενιά και μπορεί να διαιωνιστεί από τη δράση ενός ενζύμου που αναγνωρίζει ως υπόστρωμα ημιμεθυλιωμένες θέσεις.

Σε ένα κύτταρο και κατ' επέκταση σε έναν ιστό παρατηρούνται διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Λόγω του ρόλου της μεθυλίωσης στη γονιδιακή έκφραση, παρατηρούνται διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης στους διαφορετικούς ιστούς του οργανισμού καθώς και μεταβολές στον ίδιο ιστό σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Έχει αποδειχθεί ότι η μεθυλίωση του DNA επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων καταστέλλοντας τη λειτουργία ρυθμιστικών αλληλουχιών όπως υποκινητών, ενισχυτών, απομονωτών και αναστολέων ενισχυτών. Ειδικές πρωτεΐνες που συνδέονται στο μεθυλιωμένο DNA δημιουργούν κατασταλτικά συμπλέγματα σχηματίζοντας χρωματίνη ανενεργού δομής. (71) Η μεθυλίωση του DNA παρατηρείται κυρίως σε δινουκλεοτίδια CpG τα οποία κατανέμονται ανομοιόμορφα στο γονιδίωμα σε αντίθεση με τις νησίδες CpG οι οποίες είναι συνήθως μη μεθυλιωμένες. Το 50-60% των νησίδων CpG στο ανθρώπινο γονιδίωμα εντοπίζονται σε περιοχές υποκινητών γονιδίων. Ωστόσο, οι νησίδες αποτυπωμένων γονιδίων και του ανενεργού χρωμοσώματος X είναι κατά κύριο λόγο μεθυλιωμένες. Οι ιστοειδικά διαφορεικά μεθυλιωμένες περιοχές (TDMRs, Tissue Differentially Methylated Regions) μπορεί να εντοπίζονται τόσο σε πλούσιες σε CpG περιοχές όσο και σε νησίδες, σε περιοχές υποκινητών ή εντός γονιδίων.

Το πρότυπο μεθυλίωσης του DNA είναι πολύ σημαντικό διότι διαταραχές του μπορεί να οδηγήσουν σε ανωμαλίες του ανοσοποιητικού συστήματος, σύνδρομα, νοητική υστέρηση και καρκίνο. (72) Πιστεύεται ότι το πρότυπο μεθυλίωσης δεν είναι στατικό και ότι μπορεί να μεταβληθεί κατά το αναπτυξιακό μετα-αναπτυξιακό στάδιο από παράγοντες οι οποίοι μελετούνται. Θεωρείται ότι το 60% των TDMRs είναι

μεθυλιωμένες στα εμβρυϊκά κύτταρα και ότι απομεθυλιώνονται κατά τη διαφοροποίηση των ιστών στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης σε επιλεγμένες περιοχές του γονιδιώματος του εμβρύου έχει δείξει διαφορές στη μεθυλίωση των περιοχών αυτών κατά τη διάρκεια της κύησης. Επίσης, στις ίδιες μελετώμενες περιοχές έχουν διαπιστωθεί διαφορές στα επίπεδα μεθυλίωσης μεταξύ ατόμων (intra-individual variation). Τα τελευταία χρόνια έχουν εντοπιστεί διαφορές στα επίπεδα μεθυλίωσης επιλεγμένων περιοχών μεταξύ του DNA του εμβρύου και της εγκύου (DMRs-Differentially Methylated Regions). Η διαπίστωση αυτή επιτρέπει τον εμπλουτισμό του *cfDNA* στο περιφερικό αίμα της εγκύου.



Εικόνα 1.12 Διαγραμματική απεικόνιση της μεθυλίωσης του DNA

1.5 ΣΚΟΠΟΣ

Τα προηγούμενα χρόνια αναπτύχθηκε μια μεθοδολογία για την μη επεμβατική ανίχνευση ανευλοειδίων του εμβρύου με μελέτη του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA το οποίο κυκλοφορεί στο περιφερικό αίμα της εγκύου. Η μεθοδολογία βασίζεται στη διαφορική μεθυλίωση περιοχών του εμβρυϊκού και μητρικού εξωκυττάρου DNA.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η τροποποίηση της αρχικής μεθοδολογίας με σκοπό τη βελτιστοποίησή της. Οι τροποποιήσεις αφορούν το στάδιο της ανοσοκατακρήμνισης μεθυλιωμένου DNA το οποίο έχει ως κύριο στόχο τον εμπλουτισμό του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA σε σχέση με το συνολικό ελεύθερο DNA στο περιφερικό αίμα της εγκύου. Οι τροποποιήσεις πραγματοποιήθηκαν ώστε να μειωθεί η πολυπλοκότητα της διαδικασίας μειώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο το χρόνο, τον κόπο και την πιθανότητα εισαγωγής σφαλμάτων τα οποία θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη διεξαγωγή αναξιόπιστων αποτελεσμάτων. Άλλος στόχος των τροποποιήσεων ήταν η μείωση της ποσότητας του απαιτούμενου ελεύθερου DNA ώστε να γίνεται αποτελεσματικότερη διαχείριση της ήδη περιορισμένης διαθεσιμότητάς του. Επιπλέον έγιναν τροποποιήσεις ώστε να μειωθεί το κόστος της μεθοδολογίας.

Στη συνέχεια, στόχος ήταν η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ τροποποιημένης και αρχικής μεθοδολογίας σε μία προς μία τις αλλαγές που έγιναν με σκοπό να διαπιστωθεί αν είναι εφικτή η ενσωμάτωσή τους.

Έπειτα, εφόσον οι αλλαγές αποδεικνύονταν αποδεκτές, σκοπός ήταν η μελέτη της αποτελεσματικότητας και της ευαισθησίας της ανίχνευσης των διαφορικά μεθυλιωμένων περιοχών DNA (DMRs) με εφαρμογή του βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου.

Λόγω της ευαισθησίας του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA, του οποίου η ποσότητα επηρεάζεται σε δεδομένο δείγμα από διάφορες παραμέτρους, εξετάστηκε η καταλληλότητα της χρήσης σωληναρίων Cell-Free DNA BCT[®] (STRECK) τα οποία περιέχουν μεταξύ άλλων συντηρητικό στο οποίο δεν περιλαμβάνεται φορμαλδεΰδη και συνεπώς δεν αποδομείται το ελεύθερο DNA και που το οποίο σταθεροποιεί τα λευκοκύτταρα αποτρέποντας την ελευθέρωση κυτταρικού DNA στο πλάσμα. Σκοπός

αυτής της σειράς πειραμάτων ήταν η αναζήτηση τρόπου να είναι εφικτή η διατήρηση, αποθήκευση και μεταφορά των δειγμάτων έτσι ώστε να διατηρείται η καταλληλότητα τους.

Τέλος, σκοπός είναι η ανάδειξη επιπλέον παραμέτρων προς μελέτη και βελτιστοποίηση προκειμένου να είναι εφικτή η αντίχνευση ανευπλοειδιών του εμβρύου, μη επεμβατικά, μέσω της μελέτης της μεθυλίωσης του DNA.

2 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (73-76)

2.1.1 Προετοιμασία φιασκών δειγματοληψίας

Εξοπλισμός

1. Θάλαμος νηματικής ροής (laminar air flow), Holten S2000 1.2

Αναλώσιμα υλικά

1. Φιάσκες καλλιεργείων, 50 mL, 25cm², στείρες χωρίς φίλτρο, Greiner bio-one, GERMANY
2. Πιπέτες Pasteur 3 mL, στείρες, μιας χρήσης, LP Italiana Spa, ITALY
3. Σύριγγες ινσουλίνης 1 ml, BD Plastipak, BECTON DICKINSON S.A., SPAIN

Καλλιεργητικά υλικά και διαλύματα

1. HBSS, Hank's Balanced Salt Solution 1x, +CaCl₂, +MgCl₂, 100 mL, INVITROGEN, USA
2. Pen/strep 10,000 U/10,000 µg/mL, BIOCHROM AG, GERMANY
3. Heparin LEO 5000 IU/mL, LEO, DENMARK
4. Amphotericin B 250 µg/mL, BIOCHROM AG, GERMANY

Διαδικασία

Προετοιμασία υλικού μεταφοράς

1. Σε 100 mL HBSS, προσθέτουμε 1.5 ml Pen/strep, 1 mL Heparin, 0.2 mL Amphotericin B σε στείρες συνθήκες.
2. Το υλικό μεταφέρεται σε κλίβανο στους 37°C overnight για έλεγχο στείριότητας.

Προετοιμασία φιασκών για μεταφορά

1. Προσθέτουμε ~ 10 mL υλικού μεταφοράς HBSS σε φλάσκες χωρίς φίλτρο υπό στείρες συνθήκες.
2. Τα δείγματα χοριονικών λαχνών συλλέγονται με διακοιλιακή λήψη και μεταφέρονται κατευθείαν από τη σύριγγα στη φλάσκα μεταφοράς και έπειτα στο εργαστήριο. Πριν τον εμβολιασμό, το δείγμα καθαρίζεται από την παρουσία μακροσκοπικά παρατηρούμενων ιστών οι οποίοι είναι πιθανό να είναι μητρικής προέλευσης.

2.1.2 Εμβολιασμός

Εξοπλισμός

1. Θάλαμος νηματικής ροής (laminar air flow), Holten S2000 1.2
2. Φυγόκεντρος, Hettich Rotina 48
3. Κλίβανοι CO₂, Narco
4. Ειδικά μεταλλικά δισκάκια τοποθέτησης φλασκών κλιβάνου 14 x 35 cm
5. Χειρουργικά μεταλλικά ψαλίδια, στείρα

Αναλώσιμα υλικά

1. Φλάσκες καλλιέργειών, 50 mL, 25cm², στείρες με φίλτρο, Greiner bio-one, GERMANY
2. Πιπέτες Pasteur 3 mL, στείρες, μιας χρήσης, LP Italiana Spa, ITALY
3. Σωλήνες φυγοκέντρωσης γενικής χρήσης 30 mL (Universal tubes), στείροι, Greiner bio-one, GERMANY
4. Σωλήνες φυγοκέντρωσης 15 mL, στείροι, 17,0/120 MM, Greiner bio-one, GERMANY
5. Φιαλίδια Bijoux 7 ml, στείροι, Screw-Capped, Greiner bio-one, GERMANY
6. Φιαλίδια Nunc, Nuclon Delta Tube, flat w/screw cap, Thermo Fisher Scientific, DENMARK
7. Φίλτρα, FILTER DEVICE, PURADISC 25 AS, Sterile and non-pyrogenic, 0.2 μm Polyethersulfone Membrane with Polypropylene Housing, 50 units-25 mm Dia, WHATMAN Inc, USA

Καλλιεργητικά υλικά και διαλύματα

1. AMNIOMAX II 100 mL, INVITROGEN, USA
2. CHANG MEDIUM C lyophilized, 100 mL, IRVINE SCIENTIFIC, USA

3. TRYPSIN/ EDTA Solution, 0.05% / 0.02% (w/v) in PBS w/o Ca^{+2} , Mg^{+2} , 100 mL, BIOCHROM AG, GERMANY
4. COLLAGENASE from Clostridium histolytica, Type IA, 513 units/mg solid, SIGMA-ALDRICH, USA
5. Pen/strep 10,000 U/10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, BIOCHROM AG, GERMANY
6. Amphotericin B 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, BIOCHROM AG, GERMANY

Διαδικασία

1. Για κάθε δείγμα χοριονικών λαχνών που θα εμβολιάσουμε, προθερμαίνουμε 1 mL κολλαγενάσης, 1 mL θρυψίνης, 2.5 mL Chang's medium και 5 mL Amniomax σε κλίβανο ή υδατόλουτρο 37°C .
2. Όταν όλα τα υλικά έχουν ανακτήσει τη θερμοκρασία που απαιτείται, μεταφέρουμε το δείγμα στο θάλαμο νηματικής ροής. Η διαδικασία που ακολουθεί πραγματοποιείται υπό στείρες συνθήκες.
3. Αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο HBSS με στείρα πιπέττα των 3 mL.
4. Μεταφέρουμε τις λάχνες στο bijou με την κολλαγενάση.
5. Μεταφέρουμε στο ίδιο bijou 1 mL θρυψίνης.
6. Κόβουμε τις λάχνες σε μικρά κομμάτια με την χρήση στείρου χειρουργικού ψαλιδιού.
7. Μεταφέρουμε τις λάχνες σε φιαλίδιο NUNC που φέρει αυτοκόλλητη ετικέτα με τα στοιχεία του δείγματος (ονοματεπώνυμο, αύξοντα αριθμό δείγματος).
8. Επιάζουμε το δείγμα με τα ένζυμα στους 37°C για 40 λεπτά.
9. Φυγοκεντρούμε στις 1800 rpm για 7 λεπτά.
10. Απορρίπτουμε προσεκτικά το υπερκείμενο.
11. Προσθέτουμε 2 mL Amniomax με διαφορετική πιπέττα των 3 mL.
12. Αναδιαλύουμε το ίζημα, αναρροφώντας και προσροφώντας συνεχώς.
13. Φυγοκεντρούμε στις 1800 rpm για 7 λεπτά.
14. Απορρίπτουμε προσεκτικά το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε το ίζημα σε 0.5 mL Amniomax.
15. Μεταφέρουμε το δείγμα σε 2 φλάσκες που φέρουν το όνομα, τον αριθμό δείγματος.
16. Προσθέτουμε 2.5 mL Chang's medium στη φλάσκα No 1 και 2.5 mL Amniomax στη φλάσκα No 2.

17. Τοποθετούμε τις φλάσκες σε μεταλλικά δισκάκια στον κλίβανο CO₂ θερμοκρασίας 37°C και 5% CO₂ όπου και παραμένουν χωρίς να μετακινηθούν για 6-7 ημέρες.

Οι καλλιέργειες παρακολουθούνται και ανάλογα με το βαθμό ανάπτυξης γίνονται αλλαγές στα καλλιεργητικά μέσα μέχρι να γίνει ανακαλλιέργεια.

2.1.3 Ανακαλλιέργεια

Εξοπλισμός

1. Θάλαμος νηματικής ροής (laminar air flow), Holten S2000 1.2
2. Κλίβανοι CO₂, Narco
3. Ανάστροφο μικροσκόπιο Olympus IX 70

Αναλώσιμα υλικά

1. Πιπέτες Pasteur 3 mL, στείρες, μιας χρήσης, LP Italiana Spa, ITALY

Καλλιεργητικά υλικά και διαλύματα

1. AMNIOMAX II 100 mL, Invitrogen, USA
2. TRYPSIN/ EDTA Solution, 0.05% / 0.02% (w/v) in PBS w/o Ca⁺², Mg⁺², 100 mL, BIOCHROM AG, GERMANY
3. CETAVLON, πυκνό διάλυμα 20%, CANA, GREECE

Διαδικασία

1. Παρατηρούμε τις καλλιέργειες στο ανάστροφο μικροσκόπιο.
2. Απορρίπτουμε το καλλιεργητικό υλικό σε δοχείο που περιέχει Cetavlon.
3. Ξεπλένουμε τις φλάσκες με 1-2 mL διαλύματος TRYPSIN/ EDTA θερμοκρασίας 37°C χρησιμοποιώντας στείρα πιπέτα και απορρίπτουμε.
4. Προσθέτουμε 2 mL διαλύματος TRYPSIN/ EDTA θερμοκρασίας 37°C.
5. Τοποθετούμε τις φλάσκες στον κλίβανο CO₂ στους 37° C, 5% CO₂ για 3-4 λεπτά.
6. Παρατηρούμε τις καλλιέργειες στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Αν η πυκνότητα των καλλιεργειών είναι μεγαλύτερη από την επιθυμητή, αφαιρούμε λίγα κύτταρα χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη πιπέτα.
7. Προσθέτουμε σε κάθε φλάσκα 2,5 mL AMNIOMAX II θερμοκρασίας 37°C.
8. Τοποθετούμε τις φλάσκες στον κλίβανο CO₂ στους 37° C, 5% CO₂ για τουλάχιστον 3 ώρες χωρίς να μετακινηθούν.
9. Παρατηρούμε τις καλλιέργειες στο ανάστροφο μικροσκόπιο και ελέγχουμε αν έχουν κολλήσει τα κύτταρα.

10. Υπό στείρες συνθήκες απορρίπτουμε το υπερκείμενο από κάθε φλάσκα και προσθέτουμε 2,5 mL AMNIOMAX II θερμοκρασίας 37°C.

11. Τοποθετούμε τις φλάσκες στον κλίβανο CO₂ στους 37° C, 5% CO₂.

2.1.4 Συγκομιδή κυττάρων

Εξοπλισμός

1. Κλίβανοι CO₂, Narco
2. Ανάστροφο μικροσκόπιο, Olympus IX 70
3. Φυγόκεντρος, Hettich Rotina 48
4. Υδατόλουτρο

Αναλώσιμα υλικά

1. Σωλήνες φυγοκέντρωσης 15 mL, στείροι, 17,0/120 MM, Greiner bio-one, GERMANY

Υλικά και διαλύματα

1. COLCEMIDE (Demecolcine), 10 µg/mL in PBS w/o Ca⁺², Mg⁺², 25 mL, BIOCHROM AG, GERMANY
2. TRYPSIN/ EDTA Solution, 0.05% / 0.02% (w/v) in PBS w/o Ca⁺², Mg⁺², 100 mL, BIOCHROM AG, GERMANY
3. HBSS, Hank's Balanced Salt Solution 1x, + CaCl₂, +MgCl₂, 100 mL, INVITROGEN, USA
4. KCL Solution, 75mM Hypotonic, 100 mL, BIOCHROM AG, GERMANY
5. Tri-SODIUM CITRATE extra pure, 5,5 hydrate, extra pure, MERCK, GERMANY
6. 0.8% SODIUM CITRATE (4 g Sodium Citrate σε 500 mL αποστειρωμένο νερό)
7. METHANOL Gr for analysis, 2.5 l, MERCK, GERMANY
8. ACETIC ACID (glacial) 100% anhydrous GR for analysis, 2.5 l, MERCK, GERMANY
9. FIX (3 METHANOL : 1 ACETIC ACID)

Διαδικασία

1. Παρατηρούμε την πυκνότητα και την ενεργότητα των καλλιιεργειών στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Αν η εικόνα των καλλιιεργειών είναι η επιθυμητή, μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής, προσθέτουμε 100 µL COLCEMIDE ανά φλάσκα και αναδεύουμε ελαφρά.

2. Τοποθετούμε τις φλάσκες στον κλίβανο CO₂ στους 37 °C, 5% CO₂ για 2.5-3 ώρες.
3. Παρατηρούμε τις φλάσκες στο ανάστροφο μικροσκόπιο.
4. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε σωλήνα φυγοκέντρου 15 mL που φέρει το όνομα της ασθενούς, τον αριθμό δείγματος και τον αριθμό της φλάσκας.
5. Ξεπλένουμε τις φλάσκες με 1-2 mL διαλύματος TRYPsin/ EDTA θερμοκρασίας 37°C και μεταφέρω στο σωλήνα φυγοκέντρου.
6. Προσθέτουμε στη φλάσκα 2 mL διαλύματος TRYPsin/ EDTA θερμοκρασίας 37°C.
7. Τοποθετούμε τις φλάσκες στον κλίβανο CO₂ στους 37°C, 5% CO₂ για 4-5 λεπτά.
8. Χτυπάμε ελαφρά τις φλάσκες και ελέγχουμε στο ανάστροφο μικροσκόπιο αν ξεκόλλησαν τα κύτταρα.
9. Μεταφέρουμε τα κύτταρα στους σωλήνες φυγοκέντρου.
10. Ξεπλένουμε τις φλάσκες με 4-5 mL HBSS θερμοκρασίας 37°C, χωρίς αντιβιοτικά και μεταφέρουμε στους σωλήνες φυγοκέντρου.
11. Προσθέτουμε επιπλέον HBSS, αν χρειαστεί, ώστε στους σωλήνες φυγοκέντρου να υπάρχουν 10 mL διαλύματος.
12. Φυγοκεντρούμε το δείγμα στις 1800 rpm για 7 λεπτά και απορρίπτουμε το υπερκείμενο.
13. Αναδιαλύουμε το ίζημα και προσθέτουμε 3 mL KCL και 3 mL 0.8% SODIUM CITRATE θερμοκρασίας 37 °C και αναδεύουμε.
14. Μεταφέρουμε τα δείγματα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 30min.
15. Προμονιμοποιούμε τα δείγματα, προσθέτοντας 5 σταγόνες διαλύματος FIX - 20°C και αναδεύουμε.
16. Φυγοκεντρούμε στις 1800 rpm για 7 λεπτά.
17. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε το ίζημα.
18. Προσθέτουμε 3 σταγόνες διαλύματος FIX -20°C και αναδεύουμε.
19. Προσθέτουμε 6-7 mL διαλύματος FIX -20°C και τοποθετούμε στους 4°C για 30 λεπτά.
20. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 1800 rpm για 7 λεπτά.
21. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε το ίζημα.
22. Προσθέτουμε 6-7 mL διαλύματος FIX -20°C και τοποθετούμε τα δείγματα στους 4°C μέχρι την επόμενη μέρα.

2.1.5 Επίστρωση κυττάρων σε αντικειμενοφόρους πλάκες

Εξοπλισμός

1. Φυγόκεντρος, Hettich Rotina 48
2. Μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης Olympus CX41
3. Συσκευή καθαρισμού αέρα με φίλτρο άνθρακα.
4. Θερμαινόμενη πλάκα.

Αναλώσιμα υλικά

1. Πιπέτες Pasteur 1 mL, μη στείρες, μιας χρήσης
2. Αντικειμενοφόρες πλάκες Superfrost, 76x26mm, ground edges, pre-cleaned, MENZEL-GLÄSER, GERMANY

Υλικά και διαλύματα

1. METHANOL Gr for analysis, 2.5 l, MERCK, GERMANY
2. ACETIC ACID (glacial) 100% anhydrous GR for analysis, 2.5 l, MERCK, GERMANY
3. FIX (3 METHANOL : 1 ACETIC ACID)

Διαδικασία

Η διαδικασία επίστρωσης πλακιδίων πραγματοποιείται σε απαγωγούς που βρίσκονται σε ειδικό θάλαμο διατήρησης σταθερών συνθηκών υγρασίας και θερμοκρασίας οι οποίες είναι κρίσιμες παράμετροι για την επιτυχία του πειράματος.

1. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 1800 rpm για 7 λεπτά.
2. Μεταφέρουμε τα δείγματα στον απαγωγό του ειδικού θαλάμου, αφαιρούμε το υπερκείμενο αφήνοντας μικρή ποσότητα FIX ανάλογα με το ίζημα και αναδιαλύουμε το ίζημα.
3. Πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα που αναγράφονται τα απαραίτητα στοιχεία, ρίχνουμε μια σταγόνα υλικού και αφήνουμε να στεγνώσει.
4. Παρατηρούμε την πλάκα στο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεως.
5. Για κάθε καλλιέργεια χοριοδικών λαχνών στρώνουμε 6 πλάκες.
6. Μεταφέρουμε τις αντικειμενοφόρους πλάκες στην θερμαινόμενη πλάκα σε θερμοκρασία 70°C, όπου και παραμένουν μέχρι την επόμενη ημέρα.
7. Προσθέτουμε στους σωλήνες φυγοκέντρου 3-4 mL διαλύματος FIX.
8. Την επόμενη μέρα συλλέγουμε τις αντικειμενοφόρους πλάκες οι οποίες είναι έτοιμες για χρώση

2.1.6 GTG Χρώση

Εξοπλισμός

1. Δοχεία Coplin

Αναλώσιμα υλικά

1. Σύριγγες Monosteril 5mL, NOVICO, ITALY
2. Καλυπτρίδες 24x50 mm, 100 St/pcs

Υλικά και διαλύματα

1. FETAL BOVINE SERUM (FBS) tested for mycoplasma, tested for endotoxin, 100mL, BIOCHROM, GERMANY
2. NaCl 0.9 %, 250 mL, ΒΙΟΣΕΡ, ΕΛΛΑΔΑ
3. LIESHMANS eosin methylene blue solution modified for microscopy, 500 mL, MERCK, GERMANY
4. PBS Dulbecco 1x w/o Ca⁺², Mg⁺² low endotoxin, 500mL, BIOCHROM AG, GERMANY
5. TRYPSIN/ EDTA Solution (1:250), 2.5% (w/v), 100 mL, BIOCHROM AG, GERMANY
6. BUFFER TABLETS “GURR” POWDER, pH app. 6.8, INVITROGEN, GERMANY
7. ΕΝΕΣΙΜΟ ΝΕΡΟ, 1000 mL
8. LIESHMANS’S BUFFER (1 BUFFER TABLET “GURR” POWDER σε 1000 mL ενέσιμο νερό)
9. DPX mountant for microscopy, 500 mL, BDH, ENGLAND

Διαδικασία

1. Σε δοχείο Coplin προσθέτουμε 95 mL PBS και 5 mL TRYPSIN/ EDTA Solution 1:250 σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύουμε.
2. Σε άλλο δοχείο προσθέτουμε 100 mL NaCl 0.9% και μερικές σταγόνες FBS και αναδεύουμε.
3. Καθορίζουμε το χρόνο επώασης στο διάλυμα θρυψίνης, ο οποίος ποικίλει κάθε φορά ανάλογα με τις συνθήκες επίστρωσης.
4. Βυθίζουμε τη μισή πλάκα για 5 δευτερόλεπτα στο πρώτο δοχείο και έπειτα την υπόλοιπη για τον προκαθορισμένο χρόνο και ξεπλένουμε στο δεύτερο δοχείο.
5. Χρησιμοποιώντας τη σύριγγα των 5 mL ετοιμάζουμε το διάλυμα χρώσης με σύσταση 4 Buffer:1 Lieshmans.

6. Τοποθετούμε την πλάκα σε οριζόντια θέση και την καλύπτουμε με το διάλυμα χρώσης για 45 δευτερόλεπτα περίπου.
7. Ξεπλένουμε με νερό βρύσης και αφήνουμε να στεγνώσει.
8. Προσθέτουμε 3 μερικές σταγόνες DPX, τοποθετούμε την καλυπτρίδα και αφήνουμε για λίγο το DPX να απλώσει.
9. Παρατήρηση των παρασκευασμάτων στο μικροσκόπιο.

2.1.7 Ανάλυση

Εξοπλισμός

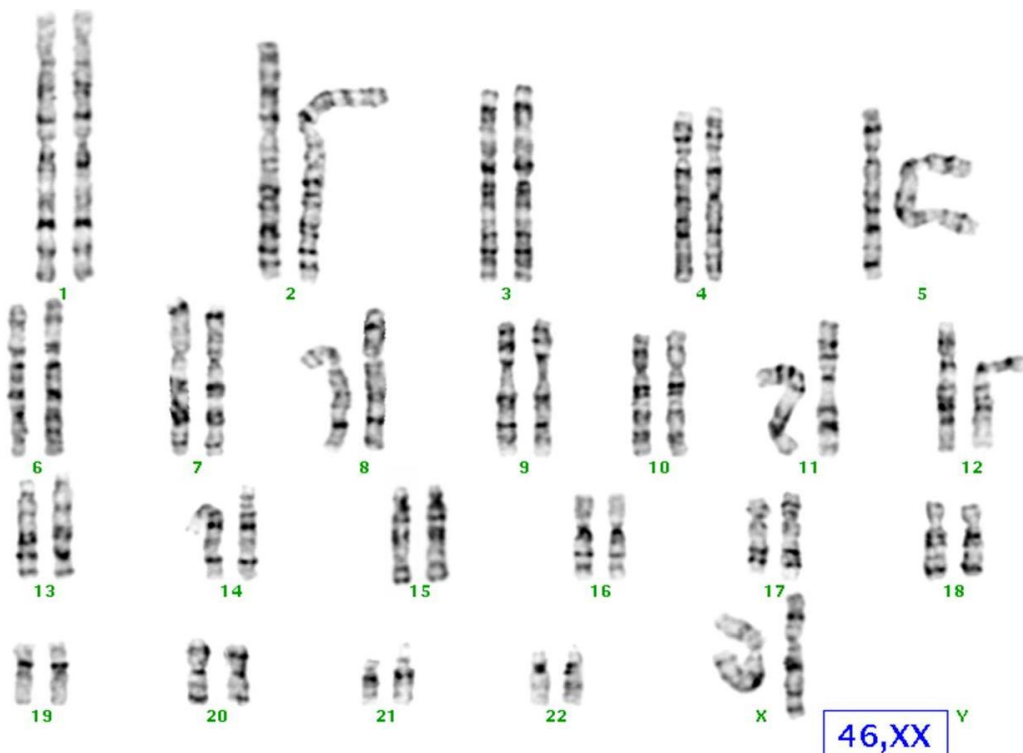
1. Οπτικό μικροσκόπιο με καταδυτικό φακό 100x, Olympus BX41 και BX60, Zeiss Axioscop 2
2. Αυτόματο σύστημα καρυτύπησης METASYSTEM ANALYSIS

Υλικά και διαλύματα

1. Λάδι μικροσκοπίου IMMERSION OIL for microscopy, 500 mL, MERCK, GERMANY

Διαδικασία

Η ανάλυση πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες της ACC (Association for Clinical Cytogenetics).



Εικόνα 2.1 Καρυότυπος φυσιολογικού θήλεος

2.2 ΤΑΧΕΙΑ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΣΥΧΝΟΤΕΡΩΝ ΑΝΕΥΠΛΟΕΙΔΙΩΝ ΜΕ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (QF-PCR, Quantitative Fluorescent Polymerase Reaction)

Η μέθοδος αυτή είναι μια μοριακή προσέγγιση για την ανίχνευση αριθμητικών ανωμαλιών των χρωμοσωμάτων 13, 18, 21, X και Y. Αποτελείται από το στάδιο απομόνωσης DNA από ιστό χοριονικών λαχνών, την ποσοτική φθορίζουσα αντίδραση της πολυμεράσης (QF-PCR), τον ηλεκτοφορητικό διαχωρισμό των προϊόντων της αντίδρασης QF-PCR και την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

2.2.1 Απομόνωση DNA από δείγμα χοριονικών λαχνών.

Η απομόνωση DNA από δείγμα χοριονικών λαχνών πραγματοποιείται με τη χρήση προτυπωμένης μεθοδολογίας κατασκευαστή (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN) (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α)

Το εκλούμενο DNA διατηρείται στους 4°C. Για μακράς διάρκειας αποθήκευση μπορεί να παραμείνει στους -20 ° C (ή στους -80 °C).

2.2.2 QF-PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης αποτελεί εργαστηριακή προσομοίωση της διαδικασίας της αντιγραφής ενός ή περισσότερων περιοχών στόχων στο γονιδίωμα. Οι περιοχές οι οποίες θα ενισχυθούν εκλεκτικά οριοθετούνται με το σχεδιασμό κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία είναι συμπληρωματικά προς τα όρια των επιλεγμένων περιοχών. Αφού αποδιαταχθεί το DNA, υβριδίζονται οι εκκινητές τους οποίους η TaqDNA πολυμεράση θα επιμηκύνει με βάση τον κανόνα συμπληρωματικότητας των αζωτούχων βάσεων. Τα στάδια αποδιάταξη-υβριδισμός-επιμήκυνση αποτελούν έναν κύκλο της αντίδρασης, ο οποίος επαναλαμβάνεται όσες φορές είναι απαραίτητο προκειμένου να ενισχυθούν τα αντίγραφα της περιοχής στόχου οδηγώντας σε εκθετική αύξηση του αριθμού τους. Στο τέλος των επαναλαμβανόμενων κύκλων ακολουθεί ένα στάδιο τελικής επιμήκυνσης όπου συμπληρώνονται τα προϊόντα της αντίδρασης. Ο σχεδιασμός της QF-PCR για την

ανίχνευση ανευπλοειδιών έχει ορισμένες ιδιαιτερότητες σε σχέση με άλλες αντιδράσεις PCR.

Περιοχές-στόχοι που επιλέγονται είναι STRs τα οποία εδράζονται στα χρωμοσώματα 13, 18, 21, X και Y. Τα κριτήρια επιλογής των STRs αφορούν τη θέση τους στο χρωμόσωμα (κοντά σε κρίσιμες για την εμφάνιση συνδρόμων περιοχές) και την πολυμορφικότητα τους στον υπό μελέτη πληθυσμό, σε συνδυασμό με τη σταθερότητα τους κατά την κληρονομηση (STRs με τετρανουκλεοτιδική μονάδα επανάληψης θεωρούνται καταλληλότερα λόγω του μεγάλου βαθμού ετεροζυγωτίας και σταθερότητας τους).

Από το ζεύγος εκκινητών που σχεδιάζονται για κάθε STR, ο πρόσθιος έχει συνδεδεμένο στο 5' άκρο του ένα φθοροφόρο μόριο το οποίο ενσωματώνεται στα προϊόντα της αντίδρασης PCR και επιτρέπει την ανίχνευση και σχετική ποσοτικοποίηση τους.

Η αντίδραση σταματάει σε εκείνον τον αριθμό κύκλων όπου έχει ενισχυθεί ικανοποιητικά η περιοχή στόχος, αλλά που ωστόσο τα προϊόντα βρίσκονται περίπου στο μέσον της εκθετικής φάσης της παραγωγής τους. Σε αυτή τη φάση της αντίδρασης διατηρείται γραμμική ποσοτική σχέση των προϊόντων της αντίδρασης με τις αρχικές περιοχές στόχους, οπότε αντικατοπτρίζεται η ποσοτική σχέση των αλληλομόρφων στο γονιδίωμα. Αργότερα, με την πρόοδο των κύκλων της αντίδρασης, τείνουν να εξισώνονται οι ποσότητες των μικρότερου μεγέθους προϊόντων με αυτές των μεγαλύτερων (πλατό), χάνοντας την ιδιότητα της ποσοτικοποίησης των αρχικών περιοχών στόχων. Προκειμένου να είναι περισσότερο αποδοτική η ανάλυση, οι αντιδράσεις είναι πολλαπλές, δηλαδή σε κάθε αντίδραση ενισχύονται περισσότερες από μία περιοχές στόχους (multiplex PCR).

Εξοπλισμός

1. Θερμικός κυκλοποιητής (CreaCon TC-Y, Verity-Applied Biosystems)
2. Μικροπιπέττες των 1-20 μ L, 1-100 μ L, 1-1000 μ L
3. 1-20 μ L, 1-100 μ L, 1-1000 μ L filter tips
4. Σωληνάρια τύπου eppendorf των 1.5 mL, 0.5 mL, 0.2 mL
5. Μικροφυγόκεντρος (Fisher Scientific)

Αντιδραστήρια

1. Ζευγάρια εκκινητών (5-10μM)
2. Magnesium free PCR buffer
3. 50mM MgCl₂
4. dNTPs
5. Platinum Taq DNA πολυμεράση
6. ddH₂O

Δείκτης	Μέγεθος	Αλληλουχία πρόσθιου εκκινητή	Αλληλουχία οπίσθιου εκκινητή
D21S1411	256-340bp	5' GTA GAT ACA TAA ATA TGA TGA ATG C 3'	5' TAT TAA TGT GTG TCC TTC CAG GC 3'
D18S386	330-400bp	5' CTC TTC CAT GAA GTA GCT AAG CAG 3'	5' TGA GTC AGG AGA ATC ACT TGG AAC 3'
D13S631	189-223bp	5' GGC AAC AAG AGC AAA ACT CT 3'	5' TAG CCC TCA CCA TGA TTG G 3'
D21S11	214-242bp	5' TAT GTG AGT CAA TTC CCC AAG TGA 3'	5' GTT GTA TTA GTC AAT GTT CTC CAG 3'
D18S535	126-160bp	5' TCA TGT GAC AAA AGC CAC AC 3'	5' AGA CAG AAA TAT AGA TGA GAA TGC A 3'
D13S634	385-440bp	5' GGC AGA TTC AAT AGG ATA AAT AGA 3'	5' GTA ACC CCT CAG GTT CTC AAG TCT 3'
AMXY	X:106bp / Y:112bp	5' CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG 3'	5' ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG 3'

Διαδικασία

1. Σημαίνουμε τα 0,2mL erpendorf tubes με βάση τον κωδικό του δείγματος και το είδος της αντίδρασης.
2. Παρασκευάζουμε mastermix με τους όγκους των αντιδραστηρίων όπως περιγράφονται παρακάτω, προσθέτοντας στο τέλος την πολυμεράση.

Αντιδραστήρια	×1 (μL)
Buffer (×1)	5
Mg ²⁺ (50mM)	1.5
dNTPs (100mM)	5
D21S11 (15 pmoles)	1.5

D18S535 (10 pmoles)	1
D13S634 (10 pmoles)	1
AMXY (5 pmoles)	0.5
D21S1411 (15 pmoles)	1.5
D18S386 (10 pmoles)	1
D13S631 (5 pmoles)	0.5
Platinum Taq DNA pol	0.6
ddH ₂ O	13.25

3. Διαμοιράζουμε 22μL μίγματος για τελικό όγκο αντίδρασης 25 μl στα σημασμένα 0,2mL eppendorfs.
4. Προσθέτουμε τον κατάλληλο όγκο δ/τος DNA ανάλογα με τη συγκέντρωσή του όπως αυτή προκύπτει από φωτομέτρηση. Η ποσότητα DNA που μπαίνει στις αντιδράσεις είναι 50-60 ng για τελικό όγκο αντίδρασης 25 μL.
5. Τοποθετούμε τα eppendorfs στο θερμικό κυκλοποιητή στο παρακάτω θερμικό προφίλ:
 1. 94°C for 15 min
 2. 94°C for 45 sec
 3. 58°C for 45 sec
 4. 72°C for 45 sec
 5. 2 to 4 for 25 cycles
 6. 72°C for 30 min
 7. 10°C hold

2.2.3 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης QF-PCR

Με την ολοκλήρωση της πολλαπλής αντίδρασης QF-PCR, παράγεται ένα μίγμα προϊόντων διαφορετικών μοριακών μεγεθών τα οποία είναι αποτέλεσμα της ενίσχυσης διαφορετικών αλληλομόρφων των επιλεγμένων STRs, είτε ως ομοδιμερή είτε ως ετεροδιμερή. Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους μέγεθος σε αυτόματο αναλυτή DNA, αφού προηγουμένως αποδιαταχθούν και γίνουν μονόκλιωνα .

Συσκευές

1. Αυτόματος αναλυτής αλληλουχιών DNA (310 ABI PRISM GENETIC ANALYSER, APPLIED BIOSYSTEMS)
2. Λογισμικό Data Collection v3.0.0

3. Θερμικός κυκλοποιητής (CreaCon TC-Y)
4. Μικροπιπέτες των 1-20 μL , 1-100 μL , 1-1000 μL
5. Σειρές των 8 σωληναρίων χωρητικότητας 0.2 μL (8-tube strips)
6. Σωληνάρια τύπου erpendorf των 0.2 mL, 0.5 mL, 1.5 mL

Αντίδραστήρια

1. Φορμαμίδη Hi-Di (Applied Biosystems)
2. Πρότυπο προσδιορισμού μοριακών μεγεθών LIZ_500 (Applied Biosystems)
3. ddH₂O
4. Προϊόντα αντίδρασης QF-PCR

Διαδικασία

Στον αυτόματο αναλυτή αλληλουχιών DNA (DNA sequencer) μπορούν να αναλυθούν με fragment analysis, προϊόντα αντίδρασης PCR οποιασδήποτε προέλευσης με σκοπό το διαχωρισμό τους με βάση το μοριακό τους μέγεθος.

Η προετοιμασία του λογισμικού, του αυτόματου αναλυτή καθώς και η προετοιμασία των δειγμάτων πραγματοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Μετά την ολοκλήρωση των ηλεκτροφορήσεων, τα δεδομένα αναλύονται σε ειδικό λογισμικό επεξεργασίας GeneMapper v3.7.

2.2.4 Ανάλυση δεδομένων ηλεκτροφόρησης στον αυτόματο αναλυτή

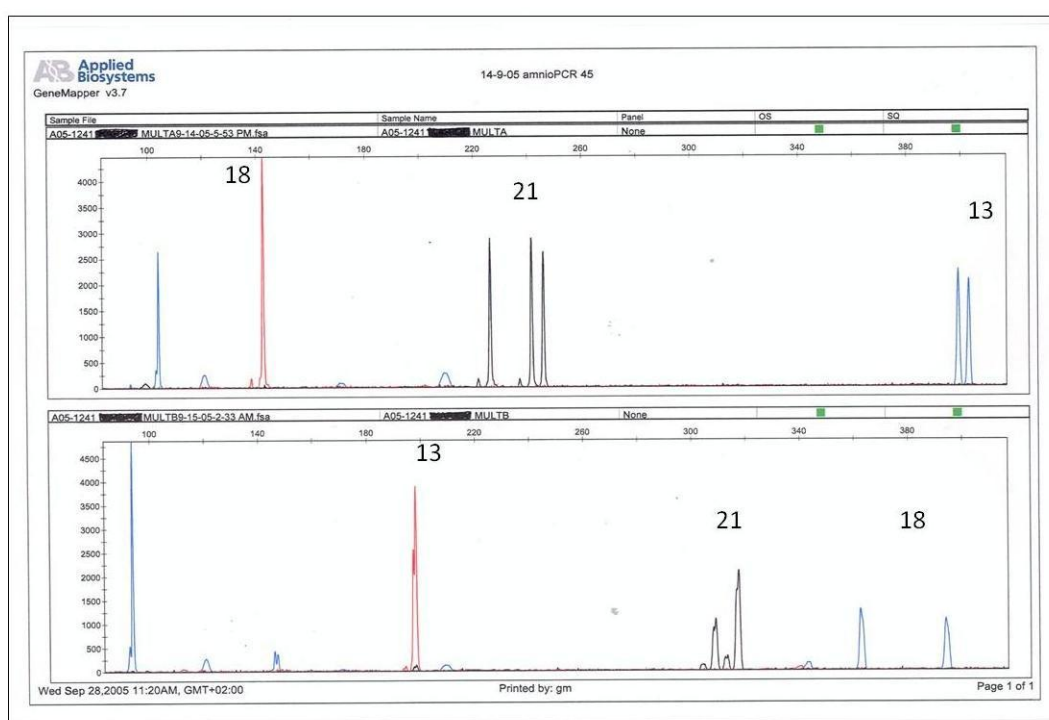
Για την ανάλυση των δεδομένων της ηλεκτροφόρησης στον αυτόματο αναλυτή απαιτείται H/Y και ειδικό λογισμικό (GeneMapper v3.7) το οποίο παρέχεται μαζί με τον αυτόματο αναλυτή ABI 310 PRISM GENETIC ANALYSER.

Διαδικασία

Ακολουθείται η διαδικασία επεξεργασίας των δεδομένων όπως αυτή περιγράφεται στις οδηγίες του κατασκευαστή.

Μετά την ανάλυση των δεδομένων προκύπτουν ηλεκτροφοριογραφήματα και πίνακες δεδομένων στους οποίους περιλαμβάνονται δεδομένα όπως το μοριακό μέγεθος των αλληλομόρφων (peak size) και η ένταση του φθορισμού που εκπέμπουν (peak height, peak area). Για κάθε αλληλόμορφο, καταγράφουμε το μοριακό του μέγεθος από το οποίο προκύπτει ο γονότυπος και την ένταση φθορισμού. Σε κάθε πολυμορφική

περιοχή που εξετάζεται (STR) γίνεται σύγκριση μεταξύ αλληλομόρφων. Αν ο λόγος της έντασης φθορισμού μεταξύ αλληλομόρφων του ίδιου πολυμορφικού δείκτη είναι 1, η περιοχή είναι ευπλοειδική (φυσιολογική). Αν είναι 2:1 ή εμφανίζονται 3 αλληλόμορφα είναι τρισωμική (ανευπλοειδική-παθολογική) (Εικόνα 2.2). Για να χαρακτηριστεί ένα αποτέλεσμα συμβατό με αριθμητική χρωμοσωματική ανωμαλία πρέπει να υπάρχει εύρημα σε 2 τουλάχιστον πολυμορφικούς δείκτες με τους υπόλοιπους να είναι ομόζυγοι (μη πληροφοριακοί). Σε περιπτώσεις που η ανάλυση δείχνει ότι δεν υπάρχει επαρκής πληροφορία για κάποιο χρωμόσωμα, αναλύονται περισσότεροι πολυμορφικοί δείκτες για το συγκεκριμένο χρωμόσωμα.



Εικόνα 2.2 Ηλεκτροφορογράφημα θήλεος με τρισωμία του χρωμοσώματος 21

Εκτός από τους πολυμορφικούς δείκτες στα χρωμοσώματα 13, 18, 21, X και Y εξετάζονται και μη πολυμορφικοί δείκτες. Το γονίδιο της αμυλογενίνης εδράζεται στην ψευδοαυτοσωμική περιοχή των φυλετικών χρωμοσωμάτων (PAR1). Το χαρακτηριστικό της περιοχής του γονιδίου που ενισχύεται εκλεκτικά είναι ότι με το ίδιο ζεύγος εκκινητών προκύπτει διαφορετικού μεγέθους προϊόν αντίδρασης PCR ανάλογα με το αν προέρχεται από το χρωμόσωμα X ή το Y. Έτσι, είναι δυνατή η ποιοτική ανίχνευση αλληλουχιών των φυλετικών χρωμοσωμάτων (ένδειξη άρρενος ή θήλεος εμβρύου) καθώς και η ποσοτική ανάλυση σε περιπτώσεις ανευπλοειδίων των φυλετικών χρωμοσωμάτων σε άρρενα (π.χ. 47,XXY και 47,XYY). Η ένταξη στην

αντίδραση, εκκινητών για το γονίδιο SRY, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα Y και παίζει σημαντικό ρόλο στο φυλοκαθορισμό αρρένων, ενισχύει περισσότερο την ένδειξη του προβλεπόμενου φύλου του εμβρύου. Τέλος, η ανάλυση του δείκτη TAF9L αποδεικνύεται εξαιρετικά πληροφοριακή για τον αριθμό των χρωμοσωμάτων X. Με το ίδιο ζεύγος εκκινητών ενισχύονται διαφορετικού μεγέθους προϊόντα αντίδρασης PCR προερχόμενα από παράλογες αλληλουχίες στο χρωμόσωμα 3 και το χρωμόσωμα X. Με δεδομένο ότι η ανευπλοειδία του χρωμοσώματος 3 στις μελετώμενες ηλικίες κύησης δεν είναι συμβατή με τη ζωή, ο λόγος των αλληλομόρφων του χρωμοσώματος 3/X μπορεί να είναι ενδεικτικός για ανευπλοειδία του χρωμοσώματος X (π.χ. λόγος 3/X=2 αντιστοιχεί σε 46,XY ή 45,X, λόγος 0.7 αντιστοιχεί σε 47,XXX κοκ).

2.3 ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΕΓΚΥΟΥ ΚΑΙ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ

2.3.1 Επεξεργασία δειγμάτων από εγκύους

Δείγμα πλακούντα

Το συνολικό διαθέσιμο δείγμα πλακούντα το οποίο προέρχεται από CVS διαχωρίζεται σε 2 τμήματα. Από το πρώτο τμήμα γίνεται απομόνωση DNA (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α). Το απομονωμένο DNA αποθηκεύεται στους -80°C. Το δεύτερο τμήμα πλακούντα αποθηκεύεται στους -80°C.

Περιφερικό αίμα εγκύου πριν την επεμβατική διαδικασία λήψης CVS

Σε κάθε έγκυο συλλέγονται έως 20mL περιφερικού αίματος σε φιαλίδια που περιέχουν αντιπηκτικό (K2/EDTA), τα οποία φυλάσσονται άμεσα στους 4°C μέχρι την επεξεργασία τους, η οποία πρέπει να γίνει το αργότερο μέσα στις επόμενες 4 ώρες. Είναι επιθυμητό, η λήψη αίματος να γίνεται πριν την επεμβατική διαδικασία για την αποφυγή ελευθέρωσης επιπλέον *cffDNA* λόγω της μηχανικής διαταραχής του πλακούντα.

1. Το περιφερικό αίμα της εγκύου φυγοκεντρείται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στα 1600g, για 10min, στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρωση, γίνεται διαχωρισμός του πλάσματος και ελέγχεται η πιθανή αιμόλυση του δείγματος.

2. Το πλάσμα μεταφέρεται σε στείρα φιαλίδια τύπου erpendorf και φυγοκεντρείται στα 1600g, για 10min, στους 4 °C.
3. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης το πλάσμα μεταφέρεται σε νέα στείρα φιαλίδια τύπου erpendorf. Τα φιαλίδια φυλάσσονται προσωρινά στους -20 °C, μέχρι την ολοκλήρωση της επεξεργασίας των δειγμάτων.
4. Παράλληλα, η στιβάδα των λευκοκυττάρων (buffy coat), μετά την αρχική φυγοκέντρωση, μεταφέρεται σε στείρο φιαλίδιο τύπου erpendorf που φυγοκεντρείται στα 2500g, για 10min, στους 4 °C.
5. Μετά τη φυγοκέντρωση, απομακρύνεται προσεκτικά το πλάσμα. Τα λευκοκύτταρα της εγκύου μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως πηγή καθαρού μητρικού DNA. Τα φιαλίδια φυλάσσονται προσωρινά στους -20°C, μέχρι την ολοκλήρωση της επεξεργασίας των δειγμάτων.
6. Μετά την ολοκλήρωση της παραπάνω επεξεργασίας, τα δείγματα φυλάσσονται στους -80°C μέχρι τη χρήση τους.

Η τήρηση των χρόνων και των θερμοκρασιών είναι σημαντική, καθώς η απόκλιση από τις συνθήκες αυτές μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην ποσότητα του *cffDNA* με αποτέλεσμα την εισαγωγή σφαλμάτων στην ανάλυση.

Συλλογή περιφερικού αίματος εγκύου μπορεί να γίνει και πριν τη διακοπή της κύησης σε περιπτώσεις παθολογικών κυήσεων, ωστόσο πρέπει να γίνει πριν τη χορήγηση φαρμάκων για τη διακοπή. Η επεξεργασία τους γίνεται όπως περιγράφεται παραπάνω.

Σε όσες περιπτώσεις είναι διαθέσιμο περιφερικό αίμα του βιολογικού πατέρα, αυτό συλλέγεται και φυλάσσεται στους -80°C.

2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΛΑΣΜΑ

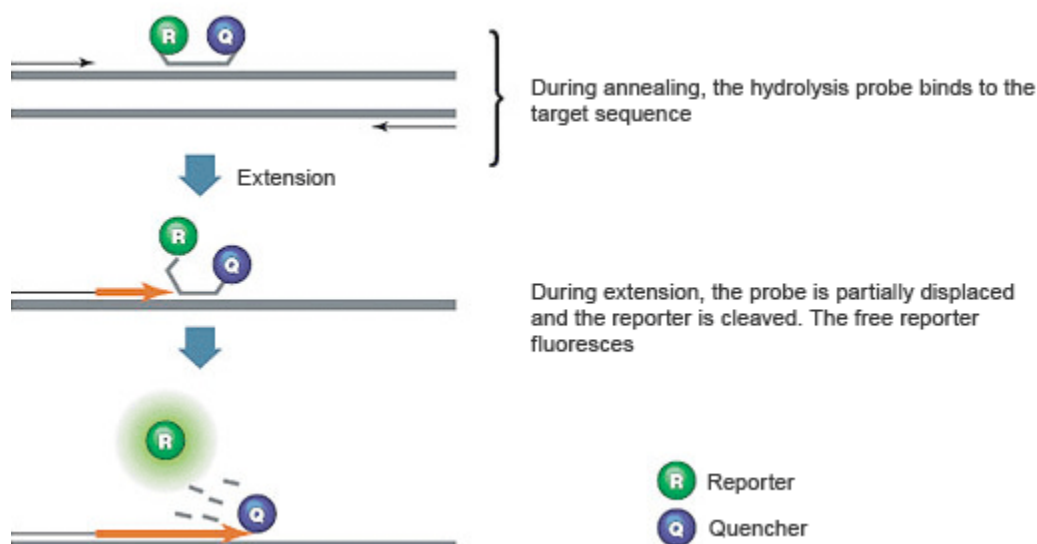
Για την απομόνωση ελεύθερου DNA από πλάσμα αίματος χρησιμοποιείται προτυπωμένη μεθοδολογία κατασκευαστή (QIAamp® Circulating Nucleic Acid, QIAGEN). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι σύμφωνη με τις οδηγίες του κατασκευαστή (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α).

2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ DNA ΜΕ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (Real-Time qPCR, Real-Time Quantitative PCR)

2.5.1 Αρχή της μεθόδου

Η ποσοτική αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time qPCR) βασίζεται στην υψηλής ειδικότητας και επάρκειας ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου και την ενσωμάτωση φθοροφόρων μορίων τα οποία επιτρέπουν την ποσοτικοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο.

Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές. Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε μεθοδολογία TaqMan. Στα πλαίσια της τεχνολογίας αυτής, χρησιμοποιούνται τόσο ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές όσο και ανιχνευτές οι οποίοι φέρουν φθοροφόρα μόρια, ούτως ώστε να ανιχνεύεται φθορισμός μόνο κατά τη σύνθεση ειδικού προϊόντος της αντίδρασης. Η μεθοδολογία αξιοποιεί την 5'→3' εξωνουκλεοτιδική δράση της Taq DNA πολυμεράσης. Ο ανιχνευτής σημαίνεται με φθοροφόρο μόριο στο 5' άκρο του και με μόριο αποσβέστη στο 3' άκρο του. Όταν ο ανιχνευτής είναι υβριδοποιημένος δεν εκπέμπεται φθορισμός λόγω της εγγύτητάς του με το μόριο-αποσβέστη. Η αντίδραση περιλαμβάνει ένα κοινό στάδιο υβριδοποίησης-επιμήκυνσης κατά το οποίο ο ανιχνευτής υβριδοποιείται στην περιοχή στόχο και στη συνέχεια η πολυμεράση αποσυνδέει το φθοροφόρο μόριο με αποτέλεσμα την απομάκρυνσή του από το μόριο-αποσβέστη και τη συνακόλουθη εκπομπή φθορισμού, η οποία είναι ανάλογη με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος της αντίδρασης.



Εικόνα 2.3 Σχηματική απεικόνιση της αρχής της μεθοδολογίας από τον ιστότοπο www.bio-rad.com.

Συσκευές/Αντιδραστήρια

1. Θερμικός κυκλοποιητής για real-time PCR CFX384 (BIO-RAD)
2. SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix (Taqman mix) (BIO-RAD)
3. Ανιχνευτές και εκκινητές για το γονίδιο της β-σφαιρίνης και του δείκτη DYS14 (IDT-Integrated DNA Technologies).
4. Πλάκες για PCR 384 θέσεων (BIO-RAD).
5. Φυγόκεντρος για πλάκες (Eppendorf)

Λαδιακασία

1. Τα αντιδραστήρια αποψύχονται πλήρως και τοποθετούνται σε πάγο σε σκοτάδι λόγω της φωτοευαισθησίας των σημασμένων εκκινητών και ανιχνευτών.
2. Τα μίγματα εκκινητών/ανιχνευτών για το γονίδιο της β-σφαιρίνης και του δείκτη DYS14 στο χρωμόσωμα Y παρασκευάζονται ως εξής:

Ολιγονουκλεοτίδιο	Αλληλουχία	Συγκέντρωση
b-globin-354F	5'-GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA-3'	25 nmole
b-globin-455R	5'-CCTTGATACCAACCTGCCAG-3'	25 nmole
b-globin ανιχνευτής	5'-6- FAM/AAGGTGAAC/ZEN/GTGGATGAAGTT GGTGG-3'IABkFQ	100 nmole

DYS14-F	5'-GGGCCAATGTTGTATCCTTCTC-3'	25 nmole
DYS14-R	5'-GCCCATCGGTCACTTACACTTC-3'	25 nmole
DYS14 ανιχνευτής	5'-6-FAM/TCTAGTGGA/ZEN/GAGGTGCTC-3'IABkFQ	100 nmole

Εκκινητής 1(F)	4.5ul
Εκκινητής 2(R)	4.5ul
Ανιχνευτής	3ul
dH2O	288ul
Σύνολο	300ul

3. Κάθε αντίδραση qPCR πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20μL και προετοιμάζεται ως εξής:

Αντιδραστήρια	Όγκοι (ul) για μια αντίδραση
TaqmanMix	10
Μίγμα εκκινητών/ανιχνευτή	4
H ₂ O	1
DNA	5
Σύνολο	20ul

4. Διαμοιράζονται 15μL μίγματος αντιδραστηρίων σε κάθε χρησιμοποιούμενη θέση του δίσκου 384 θέσεων.
5. Προσθήκη του DNA δείγματος στις αντίστοιχες θέσεις.
6. Προετοιμασία προτύπων DNA άρρενος με γνωστές συγκεντρώσεις για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Πραγματοποιούνται 4 διαδοχικές αραιώσεις 1:10 (D1-D5) ξεκινώντας από 15-20ng/μL για το πυκνότερο (D1).
7. Εκτός από τα δείγματα που πρόκειται να ποσοτικοποιηθούν και τα πρότυπα, χρησιμοποιούνται και ένα DNA θήλεος και ένα άρρενος ως θετικοί μάρτυρες σε συγκέντρωση 4ng/μL.
8. Μετά από σύντομη φυγοκέντρηση, ο δίσκος τοποθετείται στη συσκευή CFX384 και τίθεται σε λειτουργία σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή ακολουθώντας το παρακάτω πρόγραμμα:
1. 95°C for 3:00
 2. 95°C for 0:15

3. 60°C for 0:30
 4. + Plate Read
 5. GOTO 2, 39 more times
 6. END
9. Η ανάλυση των δεδομένων και ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.6 ΚΑΤΑΤΜΗΣΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ

Συσκευές/Αντιδραστήρια

1. Diagenode Bioruptor ® sonicator (standard model)-συσκευή παραγωγής υπερήχων.
2. Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Amersham Biosciences).
3. Συσκευή εκπομπής υπεριώδους φωτός με ενσωματωμένη φωτογραφική μηχανή – Ultraviolet Transilluminator (GelDoc-It Imaging System).
4. Πήκτωμα αγαρόζης 2%.
5. Βρωμιούχο αιθίδιο.

Διαδικασία

1. Διαμοιράζουμε τον επιθυμητό όγκο διαλύματος DNA σε φιαλίδια τύπου erpendorf των 1.5 mL (βέλτιστος όγκος για την επιθυμητή κατάτμηση).
2. Το DNA υφίσταται επεξεργασία με υπερήχους για 30 κύκλους (30×30sec σε μέγιστη ισχύ). Τα δείγματα διατηρούνται σε χαμηλή θερμοκρασία μέσω της κυκλοφορίας παγωμένου νερού στη συσκευή.
3. Μετά την ολοκλήρωση της κατάτμησης, ηλεκτροφορούμε 10μL από κάθε δείγμα σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για να ελέγξουμε την κατάτμηση, προσδιορίζοντας τα μεγέθη του κατατετημένου DNA. Τα μεγέθη του DNA πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ 250-300bp ώστε να προσομοιάζει το μέγεθος όλων των ελεύθερων μορίων του DNA στο πλάσμα με αυτό του *cffDNA*.
4. Αν δεν είναι ικανοποιητική η κατάτμηση του DNA επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία από την αρχή.

2.7 ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΜΕ ΨΗΦΙΑΚΗ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΟΥ DNA (MeDIP-Digital PCR)

2.7.1 Ανοσοκατακρήμιση μεθυλιωμένου DNA

Αντιδραστήρια/Συσκευές

1. Πλάκες Eppendorf LoBind® των 96 θέσεων.
2. Μαγνήτης για πλάκες για τη δέσμευση των μαγνητικών σφαιριδίων.
3. Ανακινούμενη θερμαινόμενη πλάκα με υποδοχές για πλάκες.
4. Διάλυμα IP 10× (IP buffer): 100 mM Na-phosphate pH 7.0, 1.4 M NaCl, 0.5% Triton X-100. Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Ρυθμιστικό διάλυμα 1 M Na-phosphate pH 7.0: αναμιγνύουμε 39mL μονόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH₂PO₄) (276 g/L), 61 mL 2 M δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaHPO₄) (284 g/L) και 100 mL H₂O.
6. Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι 5-methylcytidine, κλώνος 33D3, 1mg/mL (Serotec). Αποθήκευση σε όγκους των 5μL στους -20°C.
7. Vortex με θέσεις πλάκες σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Περιστρεφόμενος τροχός για πλάκες στους 4°C.
9. Μαγνητικά σφαιρίδια: Dynabeads M-280 Sheep anti-mouse IgG (Invitrogen).
10. PBS-BSA 0.05%: 9.5 mL PBS, 0.5mL BSA 10mg/mL.
11. Ρυθμιστικό διάλυμα για επώαση με Proteinase K: 50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% SDS.
12. Proteinase K, 10 mg/mL stock. Αποθήκευση στους -20°C.
13. PCI (phenol-chloroform-isoamyl alcohol 25:24:1).
14. Ψυχόμενη μικροφυγόκεντρος (Eppendorf)

Διαδικασία

Τα δείγματα που επεξεργάζονται είναι απομονωμένο DNA από πλάσμα περιφερικού αίματος εγκύου το οποίο έχει υποστεί κατάτμηση με επίδραση υπερήχων.

Δημιουργία δειγμάτων προσομοίωσης με διαβαθμιζόμενο ποσοστό εμβρυϊκού DNA (spike samples)

Στην περίπτωση προσομοίωσης δειγμάτων με αυτά εγκύων, προηγείται η ακόλουθη διαδικασία:

1. Απομόνωση DNA από δείγματα χοριονικών λαχνών (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α) και πλάσμα γυναικών οι οποίες δεν είναι σε εγκυμοσύνη (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α)
2. Κατάτμηση του CVS DNA (βλ. 2.6). Η κατάτμηση γίνεται για να δημιουργηθούν εμβρυϊκά μόρια DNA μεγέθους όσο περίπου και του *cffDNA* σε πραγματικές κυήσεις. Έλεγχος κατάτμησης.
3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA πλάσματος και του κατατετημένου CVS-DNA με qPCR (βλ. 2.5).
4. Υπολογισμός κατάλληλων όγκων, ώστε με προσθήκη CVS-DNA στο DNA του πλάσματος να προκύπτουν οι επιθυμητές ποσοστώσεις εμβρυϊκού DNA σε σχέση με το συνολικό DNA στο πλάσμα.

Διαδικασία ανοσοκατακρήμνισης

1. Κατάτμηση DNA (βλ. παράγραφο 2.6). Στο στάδιο αυτό η κατάτμηση γίνεται για να αποκτήσουν όλα τα μόρια εξωκυττάρου DNA (μητρικής και εμβρυϊκής προέλευσης) το ίδιο μοριακό μέγεθος.
2. Σε κάθε αντίδραση ανοσοκατακρήμνισης (IP, Immuno Precipitation) θα χρειαστούν 7ng DNA σε τελικό όγκο 50μL και οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται εις τριπλούν προκειμένου να εξομαλύνεται η ετερογένεια μεταξύ των αποτελεσμάτων εφόσον πρόκειται για στοχαστική μέθοδο. Στα αραιωμένα δείγματα τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για IP γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA με qPCR ως στάδιο ελέγχου ποιότητας του πειράματος.
3. Προετοιμασία μαγνητικών σφαιριδίων πριν την ανοσοκατακρήμνιση για κάθε αντίδραση.
 - a. Προσθήκη 3μL μαγνητικών σφαιριδίων σε περίσσεια διαλύματος PBS-BSA 0.05%. Μέχρι 50 μL μαγνητικών σφαιριδίων επαρκούν 1700 μL διαλύματος.

- b. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανακίνηση (vortex).
 - c. Τοποθέτηση των φιαλιδίων σε μαγνήτη και προσεκτική αφαίρεση του διαλύματος.
 - d. Επανάληψη των βημάτων b-c. Προσθήκη διαλύματος 1×IP. Σύντομη ανάδευση.
 - e. Τοποθέτηση σε μαγνήτη και προσεκτική αφαίρεση του διαλύματος.
 - f. Αναδιάλυση των μαγνητικών σφαιριδίων σε 33μL διαλύματος IP (για 9 IPs).
4. Προσθήκη 44μL δείγματος σε 96-well LoBind plate.
 5. Αποδιάταξη στους 95°C για 10 min σε θερμικό κυκλοποιητή και άμεση τοποθέτηση σε πάγο.
 6. Προσθήκη 5μL 10×IP buffer και 1μL Ab (αραιωμένο 1:10 σε 1×IP buffer) σε κάθε αντίδραση IP διαδοχικά.
 7. Προσθήκη 3μL προετοιμασμένων μαγνητικών σφαιριδίων σε κάθε αντίδραση IP.
 8. Επώαση στους 4°C, υπό συνεχή περιστροφή (20rpm), για 3 ώρες.
 9. Τοποθέτηση σε μαγνήτη για 2 λεπτά και προσεκτική απομάκρυνση του διαλύματος.
 10. Προσθήκη 150μL 1×IP buffer σε κάθε IP και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή περιστροφή (40rpm), για 10 λεπτά.
 11. Επανάληψη των σταδίων 9-10 δύο φορές.
 12. Μετά την τοποθέτηση στον μαγνήτη για τελευταία φορά και απομάκρυνση του διαλύματος ακολουθεί πρωτόκολλο αποδέσμευσης του συμπλόκου Ab-meDNA οπότε τα μαγνητικά σφαιρίδια αναδιαλύονται σε 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος πρωτεΐνης K. Έντονη ανάδευση.
 13. Προσθήκη 1μL πρωτεΐνης K και επώαση υπό περιστροφή (20rpm) στους 50°C για 2 ώρες προκειμένου να αποδεσμευθεί το DNA από το αντίσωμα.
 14. Φυγοκέντρηση ώστε να καθιζάνουν τα μαγνητικά σφαιρίδια.
 15. Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρά σωληνάρια 1.5mL
 16. Καθαρισμός του διαλύματος DNA με QIAquick PCR Purification kit (βλ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α).
 17. Μετά τον καθαρισμό εκλούεται καθαρισμένο μεθυλιωμένο κλάσμα του DNA.

18. Συνένωση των τριάδων αντιδράσεων IP για κάθε δείγμα και αποθήκευση στους -80°C μέχρι τη χρήση τους.

2.7.2 Ποσοτική ανίχνευση μεθυλιωμένων περιοχών του εξωκυττάριου DNA με Droplet Digital PCR (ddPCR)

Η ddPCR είναι μια μέθοδος ψηφιακής PCR η οποία βασίζεται στη δημιουργία γαλακτώματος νερού-ελαίου. Κάθε συνολική αντίδραση κλασματοποιείται σε 20.000 σταγονίδια μεγέθους της τάξης του νανόλιτρου και η αντίδραση PCR πραγματοποιείται ανεξάρτητα σε καθένα από τα σταγονίδια. Έτσι, είναι δυνατόν να γίνουν έως 20.000 μετρήσεις στην ίδια αρχική αντίδραση αντί της μίας στις συνήθεις μεθοδολογίες, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την ακρίβεια και ευαισθησία της ποσοτικοποίησης. Για την ddPCR ακολουθούνται διαδικασίες και χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια αντίστοιχα με αυτά των πρωτοκόλλων TaqMan.

Συσκευές/Αντιδραστήρια

1. QX100™ Droplet Generator (BIO-RAD)
2. PXITM PCR plate sealer (BIO-RAD)
3. QX100™ Droplet Reader (BIO-RAD)
4. Ανιχνευτές και εκκινητές (Integrated DNA Technologies-IDT)
5. 2×ddPCR supermix (BIO-RAD)
6. ddPCRTM Droplet Reader Oil (BIO-RAD)
7. Θερμικός κυκλοποιητής
8. Πλάκες 96 θέσεων για PCR

Διαδικασία

Η συσκευή QX100™ Droplet Generator δημιουργεί τα σταγονίδια για 8 δείγματα παράλληλα σε 2 λεπτά για κάθε οκτάδα (20-30 λεπτά για ολόκληρο το δίσκο 96 θέσεων).

1. Αποψύχουμε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Παρασκευάζουμε μίγματα εκκινητών/ανιχνευτών σε τελική συγκέντρωση 2μM ως εξής:

TaqMan (FAM)	
Primer (F)	9ul
Primer (R)	9ul

Probe	2.5ul
H2O	29.5ul
Total	50ul

TaqMan (HEX)	
Primer (F)	9ul
Primer (R)	9ul
Probe	2.5ul
H2O	29.5ul
Total	50ul

3. Παρασκευάζουμε νέο μίγμα με το μίγμα εκκινήτων/ανιχνευτών και το supermix ανάλογα με τον αριθμό των αντιδράσεων που πρόκειται να γίνουν:

Αντιδραστήρια	Όγκος για κάθε αντίδραση
2x ddPCR supermix για ανιχνευτές	10ul
20x target primers	1ul
20X Reference probe	1ul
DNA	8ul
Τελικός όγκος	20ul

4. Μεταφέρουμε 12 μL supermix σε κάθε θέση του δίσκου προσέχοντας να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες.
5. Προσθέτουμε 8 μL DNA και αναδεύουμε ήπια με την πιπέτα.
6. Τοποθετούμε το εξάρτημα δημιουργίας σταγονιδίων στη βάση του και προσθέτουμε το μίγμα της αντίδρασης και το έλαιο στις θέσεις σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Προσοχή στις φυσαλίδες αέρα διότι παρεμποδίζουν τη διαδικασία σχηματισμού σταγονιδίων.
7. Τοποθετούμε το εξάρτημα στο QX100TM Droplet Generator και ενεργοποιούμε τη συσκευή.
8. Μετά τη δημιουργία των σταγονιδίων, μεταφέρουμε προσεκτικά τις αντιδράσεις στο δίσκο που θα πραγματοποιηθεί η PCR.
9. Καλύπτουμε το δίσκο της PCR με ειδικό κάλυμμα στο QX100TM Droplet sealer ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση.
10. Τοποθετούμε το δίσκο PCR στο θερμικό κυκλοποιητή στο ακόλουθο πρόγραμμα:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
<i>Ενεργοποίηση ενζύμου</i>	95°C	10min	1
<i>Αποδιάταξη</i>	95°C	30sec	45
<i>Υβριδοποίηση/επιμήκυνση</i>	60°C	1min	
<i>Αδρανοποίηση ενζύμου</i>	98°C	10min	1
<i>Διατήρηση (προαιρετική)</i>	4°C	∞	1

11. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης τοποθετούμε το δίσκο στο QX100™ Droplet Reader. Απαιτούνται 1.5 λεπτά για να «διαβαστεί» κάθε πηγαδάκι.
12. Αναλύουμε τα δεδομένα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

3 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΗ

ΕΞΕΤΑΣΗ

Η συλλογή δειγμάτων, η επεξεργασία τους και η αποθήκευση μέχρι την ανάλυση αποτελούν διαδικασίες χρονοβόρες και επίπονες. Ωστόσο, η σωστή δειγματοληψία και τα αρχικά στάδια επεξεργασίας των δειγμάτων είναι κρίσιμα για τη συνέχεια της μελέτης, έτσι ώστε να είναι εφικτή η διεξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων.

Κατά το διάστημα 2012-2014 συνελέγησαν και επεξεργάστηκαν αρχικά, 366 δείγματα περιφερικού αίματος εγκύων, οι οποίες προσήλθαν στο Τμήμα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας του μαιευτηρίου «ΜΗΤΕΡΑ», μετά από παραπομπή του θεράποντα ιατρού γυναικολόγου τους, για επεμβατική προγεννητική διάγνωση χρωμοσωματικών ανωμαλιών. Οι συμμετέχουσες ενημερώνονταν αναλυτικά είτε από τον ιατρό τους είτε από τον υπεύθυνο του εργαστηρίου για τη διεξαγόμενη μελέτη, και στη συνέχεια υπέγραφαν έντυπο συγκατάθεσης, το οποίο είναι εγκεκριμένο από την Επιστημονική Επιτροπή του νοσοκομείου και την αρμόδια Επιτροπή Βιοηθικής.

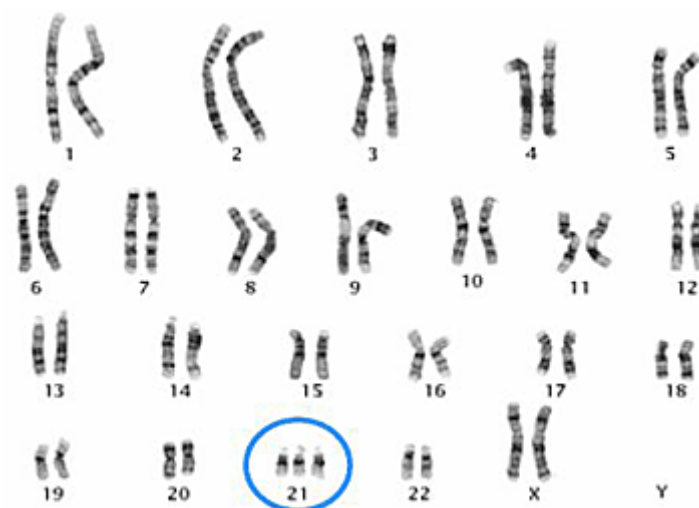
Η αιμοληψία πραγματοποιούνταν πριν από την επεμβατική διαδικασία λήψης εμβρυϊκού υλικού (λήψη τροφοβλάστης ή αμνιοπαρακέντηση), αφού υπήρχαν ενδείξεις από τη διεθνή βιβλιογραφία ότι οι επεμβατικές μέθοδοι μπορεί να επηρεάσουν την ποσότητα του *cffDNA* στην αιματική κυκλοφορία της εγκύου. (77,78) Τα δείγματα περιφερικού αίματος συλλέγονταν είτε σε φιαλίδια με αντιπηκτικό $K^+/EDTA$ είτε σε ειδικά σωληνάρια STRECK τα οποία περιέχουν επιπλέον και συστατικό το οποίο σταθεροποιεί το εξωκυττάριο DNA. Στην πρώτη περίπτωση η επεξεργασία των δειγμάτων έπρεπε να γίνει το ταχύτερο δυνατόν (το αργότερο μέσα σε 4 ώρες από τη δειγματοληψία), ενώ στη δεύτερη η επεξεργασία θα μπορούσε να γίνει μέσα στις επόμενες 48 ώρες.

Η αρχική επεξεργασία περιλαμβάνει τη φυγοκέντρηση των δειγμάτων περιφερικού αίματος και το συνακόλουθο διαχωρισμό του πλάσματος, της στοιβάδας των λευκοκυττάρων και των ερυθρών αιμοσφαιρίων, όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο των Υλικών και Μεθόδων. Η μακροσκοπική εξέταση του πλάσματος ήταν απαραίτητη προκειμένου να διαπιστωθεί η απουσία αιμόλυσης του αίματος, καθώς η καταστροφή των ερυθροκυττάρων και η συνακόλουθη ελευθέρωση αιμοσφαιρίνης είναι δυνατόν να παρεμποδίσει αντιδράσεις στα επόμενα στάδια της μελέτης. Στη

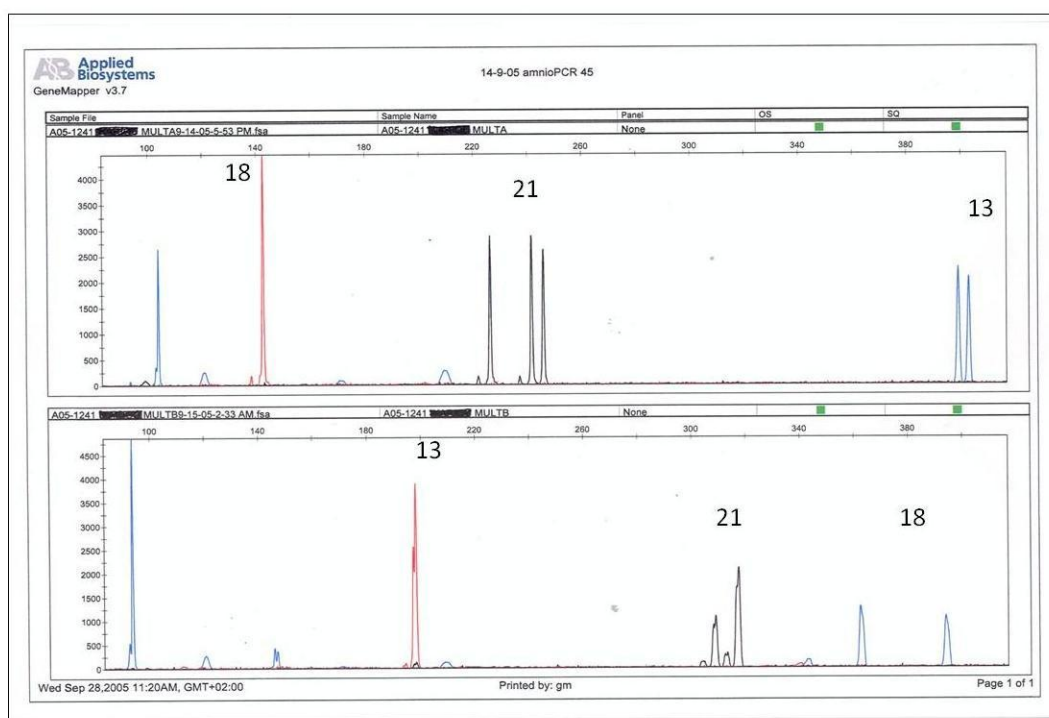
συνέχεια τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -80°C μέχρι τη χρήση τους, αφού στις συνθήκες αυτές διατηρείται μακροχρόνια το DNA χωρίς να αποδομείται ή να αλλάζει το πρότυπο μεθυλίωσης του. Για κάθε δείγμα τηρούνταν αρχείο με στοιχεία όπως η ημερομηνία συλλογής και αποθήκευσης, ο χρόνος που μεσολάβησε μεταξύ λήψης και επεξεργασίας, η ηλικία της κύησης και της εγκύου καθώς και το βάρος της, ο αριθμός των προηγούμενων κύσεων, η έκβασή τους και ο χρόνος που μεσολάβησε από την τελευταία κύηση, η αιτία παραπομπής και η μέθοδος σύλληψης. Τα στοιχεία του αρχείου είχαν ως σκοπό τη διερεύνηση παραμέτρων οι οποίες θα μπορούσαν, είτε σε αυτή τη φάση είτε μελλοντικά, να επηρεάσουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων και της διεξαγωγής συμπερασμάτων από την εφαρμοζόμενη μεθοδολογία.

Μετά τη λήψη αίματος από τις εγκύους, ακολουθούσε η προγραμματισμένη λήψη χοριονικών λαχνών ή αμνιακού υγρού και ο χρωμοσωματικός έλεγχος. Η πληροφορία της χρωμοσωματικής σύστασης του εμβρύου ήταν απαραίτητη για την ασφαλή ταξινόμηση των περιστατικών σε φυσιολογικά και παθολογικά. Με την εφαρμογή της QF-PCR διαπιστώνονταν το φύλο του εμβρύου και ο αριθμός των χρωμοσωμάτων 13, 18, 21, X και Y, ενώ με τη διεξαγωγή του καρυότυπου του εμβρύου επιβεβαιώθηκαν οι τρισωμίες για τα παθολογικά έμβρυα αναφορικά με τα παραπάνω χρωμοσώματα, διαπιστώθηκε αν πρόκειται για ελεύθερες τρισωμίες ή αποτέλεσμα δομικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών και επιπλέον αποκαλύπτονταν άλλες χρωμοσωματικές ανωμαλίες.

Κατά το διάστημα 2012-2014 από τα 366 δείγματα περιφερικού αίματος εγκύων που συλλέχθηκαν, τα 330 ήταν από κύσεις με φυσιολογικά έμβρυα ενώ σε 36 περιπτώσεις βρέθηκε ανευπλοειδία: 27 έμβρυα με τρισωμία 21, 4 με τρισωμία 18, 2 με τρισωμία 13, 2 με μονοσωμία του χρωμοσώματος X και 1 με καρυότυπο 47,XXY.



Εικόνα 3.1 Καρύοτυπος θήλεος με τρισωμία 21



Εικόνα 3.2 Ηλεκτροφοριογράφημα θήλεος με τρισωμία 21

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, το ενδιαφέρον εστιάστηκε σε φυσιολογικά περιστατικά και παθολογικά με τρισωμία του χρωμοσώματος 21. Τα υπόλοιπα περιστατικά θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την επίτευξη μελλοντικών στόχων της ερευνητικής ομάδας. Στις περιπτώσεις που, μετά από τη διάγνωση χρωμοσωματικής ανωμαλίας, επιλέγονταν η διακοπή της κύησης, συλλέγονταν επιπλέον δείγματα πριν και μετά τη διακοπή, τα οποία επεξεργάστηκαν και αποθηκεύτηκαν με τον προαναφερόμενο τρόπο (βλ. κεφάλαιο Υλικών και Μεθόδων

παρ 2.3). Σε όσες περιπτώσεις ήταν εφικτό, συλλέχθηκε περιφερικό αίμα του πατέρα ώστε να διευκολυνθεί ο προσδιορισμός του ποσοστού του *cffDNA* μέσω πατρικής προέλευσης πολυμορφισμών (SNPs) στις περιπτώσεις που αυτό θα ήταν επιθυμητό. Για παράδειγμα, σε κυήσεις με θήλα έμβρυα η ποσοτικοποίηση του *cffDNA* δεν είναι εφικτή μέσω αλληλουχιών του Y χρωμοσώματος όπως στις περιπτώσεις κυήσεων αρρένων εμβρύων, οπότε η διάκριση του εμβρυϊκού από το ολικό ελεύθερο DNA θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσω των πατρικής προέλευσης αλληλουχιών του εμβρύου. Ως εκ τούτου, η δυνητική μελέτη του DNA του πατέρα καθίσταται χρήσιμη.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εντάσσεται στα πλαίσια ευρύτερης ερευνητικής μελέτης για την ανάπτυξη μη επεμβατικής μεθοδολογίας, για τη ανίχνευση χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου, μέσω της μελέτης του εξωκυττάριου DNA που κυκλοφορεί στο πλάσμα του περιφερικού αίματος της εγκύου. Στόχοι της παρούσας μελέτης είναι η διαπίστωση της καταλληλότητας της συλλογής περιφερικού αίματος της εγκύου σε σωληνάκια STRECK, ώστε να διευκολύνεται η διακίνηση των δειγμάτων, η μελέτη των διαφόρων τροποποιήσεων που πραγματοποιήθηκαν στα διαφορετικά στάδια της μεθοδολογίας και πώς αυτά επέδρασαν στη βελτιστοποίηση της και τέλος η μελέτη της αποτελεσματικότητας και της ευαισθησίας της ανίχνευσης των διαφορεικά μεθυλιωμένων περιοχών του DNA (DMRs) που μελετώνται.

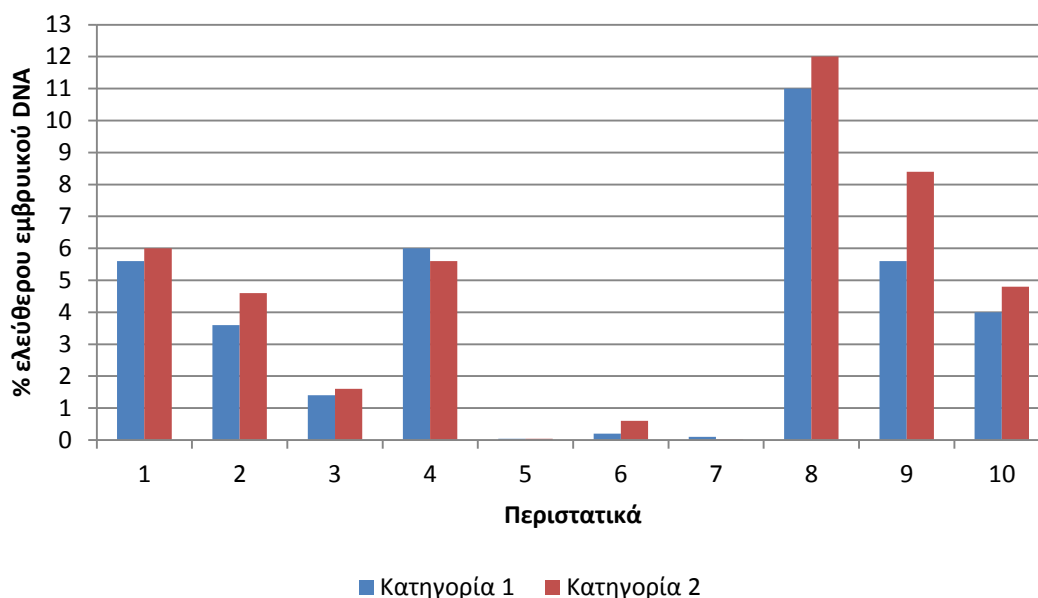
4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΩΛΗΝΑΡΙΩΝ STRECK

Η διαδικασία της αιμοληψίας, τα φιαλίδια συλλογής του περιφερικού αίματος, οι συνθήκες και ο χρόνος διακίνησης και διατήρησης των δειγμάτων μέχρι την απομόνωση πλάσματος και την απομόνωση ελεύθερου DNA από αυτό, είναι σημαντικές παράμετροι οι οποίες δύναται να επηρεάσουν την καταλληλότητα των δειγμάτων προς εξέταση. Δείγματα τα οποία έχουν συλλεχθεί σε σωληνάκια με αντιπηκτικό K^+ /EDTA μπορούν να διατηρηθούν στους $4^{\circ}C$ το πολύ για 4 ώρες και στη συνέχεια είναι απαραίτητη η απομόνωση πλάσματος και η αποθήκευση και διατήρησή των πλασμάτων στους $-80^{\circ}C$ μέχρι την απομόνωση του DNA και την περεταίρω ανάλυσή του. Η απόκλιση από τις παραπάνω συνθήκες οδηγεί στην αποδόμηση του ελεύθερου DNA με αποτέλεσμα την ακαταλληλότητα των δειγμάτων προς ανάλυση. Η διαδικασία αυτή δυσχεραίνει τη συλλογή δειγμάτων από απομακρυσμένες περιοχές σε σχέση με το εργαστήριο ανάλυσης. Εναλλακτικά, η χρήση σωληναρίων STRECK για τη συλλογή περιφερικού αίματος επιτρέπει τη διατήρηση του ελεύθερου DNA, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μέχρι και για μία εβδομάδα μέχρι την απομόνωση του πλάσματος. Το χαρακτηριστικό αυτό οφείλεται σε συστατικό διατήρησης του ελεύθερου DNA και πιο συγκεκριμένα τα σωληνάκια περιέχουν συστατικό ελεύθερο φορμαλδεΰδης το οποίο σταθεροποιεί τα

λευκοκύτταρα αποτρέποντας την αύξηση του μητρικού υποβάθρου χωρίς να αποδομείται το ήδη υπάρχον *cffDNA*. Συνεπώς, άρει τους περιορισμούς που θέτει η συλλογή δειγμάτων σε φιαλίδια με $K^+/EDTA$. Τα σωληνάρια αυτού του τύπου χρησιμοποιούνται σήμερα από εργαστήρια και εταιρείες που παρέχουν υπηρεσίες μη επεμβατικής προγεννητικής ανίχνευσης με άλλες μεθοδολογίες.

Προκειμένου να ελεγχθεί η επίπτωση του χρόνου που μεσολαβεί μεταξύ της αιμοληψίας σε σωληνάρια STRECK και της απομόνωσης πλάσματος από το περιφερικό αίμα, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

Συλλέχθηκαν, προοπτικά, 32 δείγματα περιφερικού αίματος εγκύων, οι οποίες στη συνέχεια προχώρησαν σε επεμβατική (CVS ή αμνιοπαρακέντηση) προγεννητική διάγνωση χρωμοσωματικών ανωμαλιών του εμβρύου με QF-PCR και καρυότυπο. Οι αιμοληψία έγινε σε δυο σωληνάρια STRECK για κάθε περιστατικό. Από το ένα σωληνάριο απομονώθηκε πλάσμα μέσα σε 4 ώρες από τη λήψη και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους $-80^{\circ}C$ (κατηγορία 1) και από το άλλο ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία μετά από 3-5 ημέρες (κατηγορία 2). Σε όλα τα περιστατικά εφαρμόστηκε η μεθοδολογία QF-PCR για την ταχεία διάγνωση ανευπλοειδιών των χρωμοσωμάτων 13, 18, 21, X και Y στα δείγματα χοριονικών λαχνών ή αμνιακού υγρού που ελήφθησαν. Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης, επιλέχθηκαν 10 περιστατικά τα οποία αντιστοιχούσαν σε κυήσεις φυσιολογικών αρρένων εμβρύων για τα υπό εξέταση χρωμοσώματα. Στη συνέχεια, απομονώθηκε DNA από τα πλάσματα των δυο διαφορετικών διαδικασιών προκαταρκτικής επεξεργασίας (κατηγορίες 1 και 2) και ποσοτικοποιήθηκε το ολικό και το εμβρυϊκό ελεύθερο DNA σε κάθε περίπτωση. Σκοπός ήταν η σύγκριση του ποσοστού του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA, σε σχέση με το ολικό, μεταξύ των δειγμάτων της κατηγορίας 1 και 2 για κάθε περιστατικό.



Εικόνα 4.1. Διαγραμματική απεικόνιση της σύγκρισης του ποσοστού του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στις 2 κατηγορίες επεξεργασίας των δειγμάτων.

Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει ένδειξη σημαντικής διαφοράς στο ποσοστό του *cffDNA* στις δυο κατηγορίες. Ωστόσο, ο περιορισμένος αριθμός περιστατικών δεν επιτρέπει τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Στα περισσότερα περιστατικά φαίνεται να είναι μεγαλύτερο το ποσοστό του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στα δείγματα που η απομόνωση πλάσματος έγινε 3-5 ημέρες μετά τη συλλογή του δείγματος (κατηγορία 2). Φαίνεται να μην είναι τόσο κρίσιμη η άμεση επεξεργασία των δειγμάτων και ότι είναι εφικτή η παραμονή του αίματος σε σωληνάρια STRECK για λίγες ημέρες, κάνοντας τη διαχείριση των δειγμάτων λιγότερο απαιτητική.

Μια άλλη ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι η διακύμανση του ποσοστού του εμβρυϊκού DNA μεταξύ περιστατικών (Πίνακας 4.1). Ενώ είναι γνωστό ότι το ποσοστό του *cffDNA* αυξάνει κατά τη διάρκεια της κύησης, δεν παρατηρήθηκε τα μεγαλύτερα ποσοστά *cffDNA* να αντιστοιχούν στις περισσότερο προχωρημένες κύσεις. Χαρακτηριστικό είναι ότι στο περιστατικό 7, όπου το *cffDNA* είναι πρακτικά μη-ανιχνεύσιμο στις 2 κατηγορίες δειγμάτων, η κύηση βρισκόταν στις 17 εβδομάδες κατά την αιμοληψία. Αντίθετα, στο περιστατικό 8, όπου ανιχνεύθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό *cffDNA*, η κύηση ήταν 13 εβδομάδων. Σε κανένα από τα δείγματα που επεξεργάστηκαν σε αυτή τη σειρά πειραμάτων δεν παρατηρήθηκε

αιμόλυση, η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα με την ελευθέρωση DNA μητρικής προέλευσης.

Περιστατικό	% <i>cffDNA</i> κατηγορίας 1	% <i>cffDNA</i> κατηγορίας 2	Ηλικία κύησης
1	5.6	6	14εβδ.+5ημ.
2	3.6	4.6	17εβδ.+4ημ.
3	1.4	1.6	18εβδ.+5ημ.
4	6	5.6	19εβδ.+5ημ.
5	0.04	0.04	16εβδ.+5ημ.
6	0.2	0.6	12εβδ.+6ημ.
7	0.1	0.02	17εβδ.
8	11	12	13εβδ.+1ημ.
9	5.6	8.4	18εβδ.+6ημ.
10	4	4.8	21εβδ.+1ημ.

Πίνακας 4.1. Ποσοστό του εμβρυϊκού DNA που ανιχνεύθηκε στις 2 κατηγορίες επεξεργασίας και η ηλικία κύησης κάθε περιστατικού.

4.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ

Προκειμένου να αναπτυχθεί η μεθοδολογία με τη μορφή που εφαρμόζεται επί του παρόντος (βλ. κεφάλαιο Υλικών και Μεθόδων παρ.2.7.1), χρειάστηκε να γίνουν τροποποιήσεις επί του αρχικού πρωτοκόλλου (57), προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η μέθοδος. Εξετάστηκαν ορισμένα από τα σημεία-κλειδιά της συνολικής μεθοδολογίας και αξιολογήθηκαν για την επίδραση που είχαν οι τροποποιήσεις στην τελική έκβαση των αποτελεσμάτων. Σε όλες τις σειρές πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα προσομοίωσης εγκυμοσυνών εισάγοντας προκαθορισμένες ποσότητες εμβρυϊκού DNA σε πλάσμα γυναικών που δεν είναι έγκυες, προκειμένου να αξιολογηθεί η ευαισθησία της μεθόδου. Σε κάθε ομάδα πειραμάτων για την αξιολόγηση της τροποποίησης στο σημείο-κλειδί της μεθοδολογίας, διατηρήθηκαν όλες οι υπόλοιπες παράμετροι σταθερές. Επίσης, όλες οι αντιδράσεις ανοσοκατακρήμνισης έγιναν εις τριπλούν για να μπορεί να γίνει εξομάλυνση των αποτελεσμάτων λόγω της διακύμανσης που οφείλεται στο στοχαστικό χαρακτήρα της μεθοδολογίας. Τα βασικά σημεία τα οποία μελετήθηκαν είναι τα ακόλουθα.

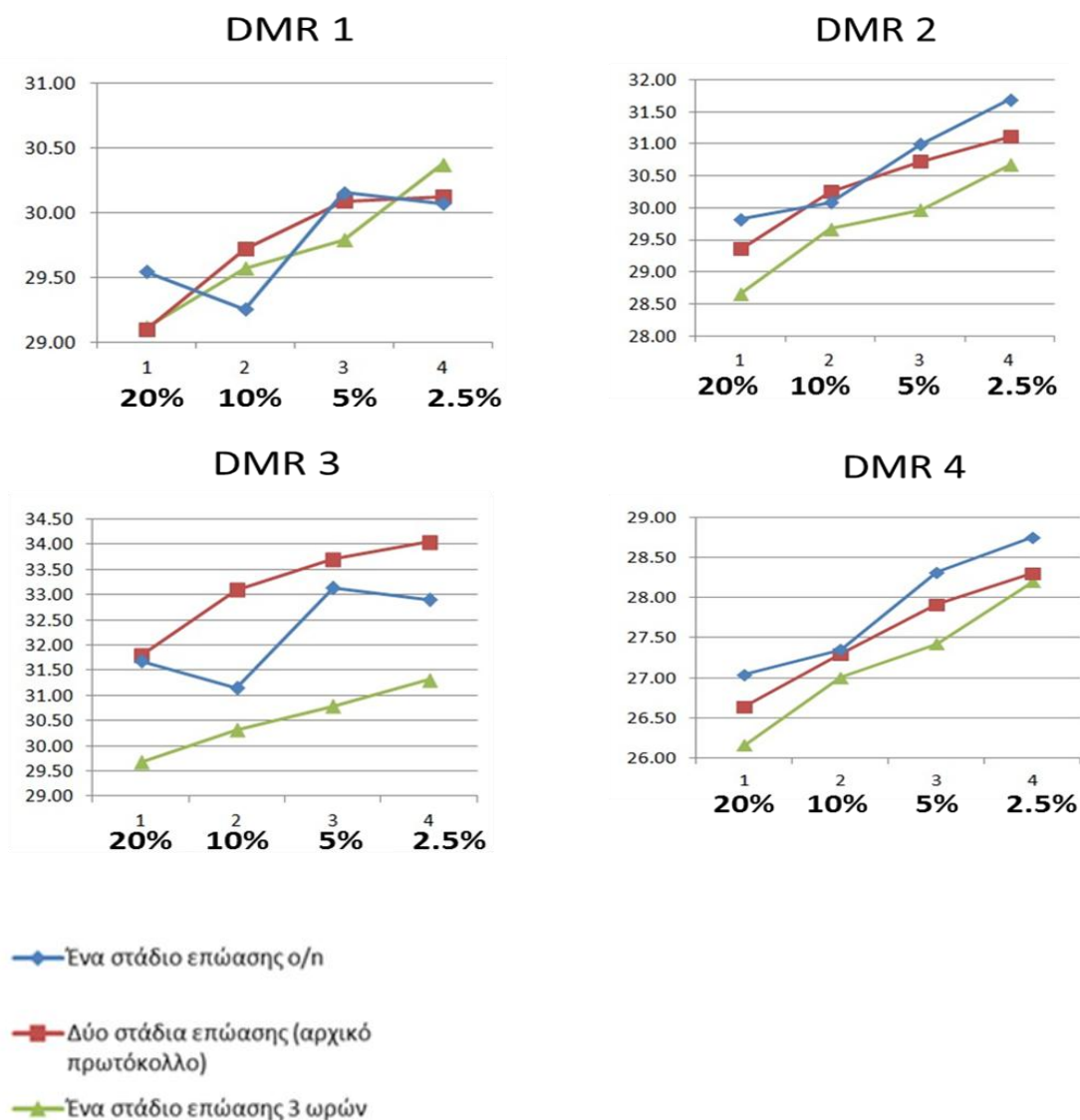
4.2.1 Απλοποίηση σταδίου ανοσοκατακρήμνισης μεθυλιωμένου DNA

Το στάδιο της ανοσοκατακρήμνισης του μεθυλιωμένου DNA αποτελεί ένα από τα πιο κρίσιμα στάδια της μεθοδολογίας. Στο στάδιο αυτό επιλέγονται οι μεθυλιωμένες αλληλουχίες του DNA και, με βάση την αρχή της μεθοδολογίας που στηρίζεται στη

διαφορική μεθυλίωση DNA μητέρας-εμβρύου, εμπλουτίζεται το δείγμα σε αλληλουχίες εμβρυϊκής προέλευσης ώστε να καταστεί δυνατή η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση τους σε επόμενο στάδιο. Αρχικά, ακολουθούνταν δυο στάδια επώσεων: ένα δίωρο για τη σύνδεση του αντισώματος, που αναγνωρίζει μεθυλιωμένες αλληλουχίες DNA (5MeC-mAb) με το DNA και ένα δεύτερο δίωρο για τη σύνδεση του συμπλόκου Ab-DNA με τα μαγνητικά σφαιρίδια ώστε να γίνει ο διαχωρισμός μεθυλιωμένου-μη μεθυλιωμένου DNA.

Για τη μείωση της πολυπλοκότητας της διαδικασίας ώστε να είναι ευκολότεροι οι χειρισμοί, αλλά και για τη μείωση της εισαγωγής σφαλμάτων, δοκιμάστηκε η σύμπτυξη των δυο επώσεων σε μία. Δοκιμάστηκε κοινό στάδιο σύνδεσης αντισώματος-DNA-μαγνητικών σφαιριδίων διάρκειας 3 ωρών και 16 ωρών (o/n) και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά του πρωτοκόλλου με δυο επώσεις. Πραγματοποιήθηκαν τρεις σειρές πειραμάτων με τα παρακάτω κοινά χαρακτηριστικά:

- Δείγματα προσομοίωσης κήσεων με 20%, 10%, 5% και 2,5% εμβρυϊκό DNA (CVS spike-in samples).
- 3 αντιδράσεις ανοσοκατακρήμνισης για κάθε δείγμα προσομοίωσης.
- Όγκος αντίδρασης ανοσοκατακρήμνισης 150 μ L.
- Ποσότητα αντισώματος ανά αντίδραση 0.3ng (1.5 μ L 0.2ng/ μ L).
- Ποσότητα μαγνητικών σφαιριδίων ανά αντίδραση 5 μ L.



Εικόνα 4.2. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκριτικής ποσοτικής ανίχνευσης 4 διαφορετικών περιοχών DMRs σε δείγματα προσομοίωσης με διαβαθμιζόμενο ποσοστό εμβρυϊκού DNA (spikes). Ο άξονας Y αντιπροσωπεύει τις τιμές C_i (κύκλοι αντίδρασης qPCR).

Για την αξιολόγηση της επίδρασης των τροποποιήσεων στην ανίχνευση των διαφορετικά μεθυλιωμένων περιοχών του DNA εξετάστηκαν 4 διαφορετικές περιοχές DMRs στο χρωμόσωμα 21.

Παρατηρούμε ότι από τις δυο τροποποιήσεις που έγιναν, το πρωτόκολλο με ένα στάδιο επώασης διάρκειας 3 ωρών εμφανίζει καλύτερη απόδοση και ευαισθησία και τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με το αρχικό πρωτόκολλο. Ωστόσο, είναι εμφανής η τάση καθυστέρησης της ανίχνευσης των DMRs όσο μειώνεται το ποσοστό του εμβρυϊκού DNA στα δείγματα προσομοίωσης.

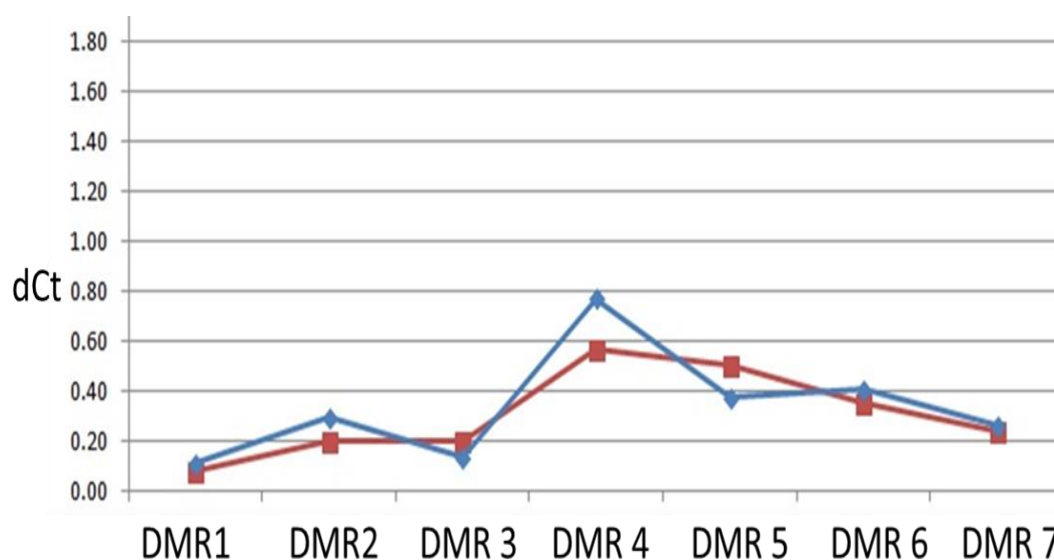
4.2.2 Μείωση όγκου αντίδρασης της ανοσοκατακρήμνισης

Ο σκοπός της μείωσης του όγκου αντίδρασης της ανοσοκατακρήμνισης μεθυλιωμένου DNA είναι η οικονομικότερη διαχείριση της ήδη πολύ περιορισμένης ποσότητας *cffDNA*, ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη διαθεσιμότητα γενετικού υλικού προς μελέτη. Το αρχικό πρωτόκολλο απαιτούσε 75-100 ng DNA ανά αντίδραση σε αρχικό όγκο αντίδρασης 150 μL . Δοκιμάστηκε τροποποίηση του πρωτοκόλλου με αρχικό όγκο αντίδρασης 50 μL και αρχική ποσότητα DNA 7 ng και συγκρίθηκε με το αρχικό πρωτόκολλο. Τα κοινά χαρακτηριστικά των δυο πρωτοκόλλων είναι τα εξής:

- Δείγματα προσομοίωσης κήσεων με 20%, 10%, 5% και 2,5% εμβρυϊκό DNA (CVS spike-in samples).
- 3 αντιδράσεις ανοσοκατακρήμνισης για κάθε δείγμα προσομοίωσης.
- Ποσότητα αντισώματος ανά αντίδραση 0.3ng (1.5 μL 0.2ng/ μL).
- Ποσότητα μαγνητικών σφαιριδίων ανά αντίδραση 5 μL .

Για την αξιολόγηση της επίδρασης των τροποποιήσεων στην ανίχνευση των διαφορεικά μεθυλιωμένων περιοχών του DNA εξετάστηκαν 7 διαφορετικές περιοχές DMRs στο χρωμόσωμα 21.

Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των δυο πρωτοκόλλων, συνεπώς υιοθετήθηκε το πρωτόκολλο με τον μειωμένο όγκο αντίδρασης.



Εικόνα 4.3 Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της μείωσης του όγκου αντίδρασης ανοσοκατακρήμνισης. Ο άξονας Y αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των διαφορών των τιμών C_t μεταξύ

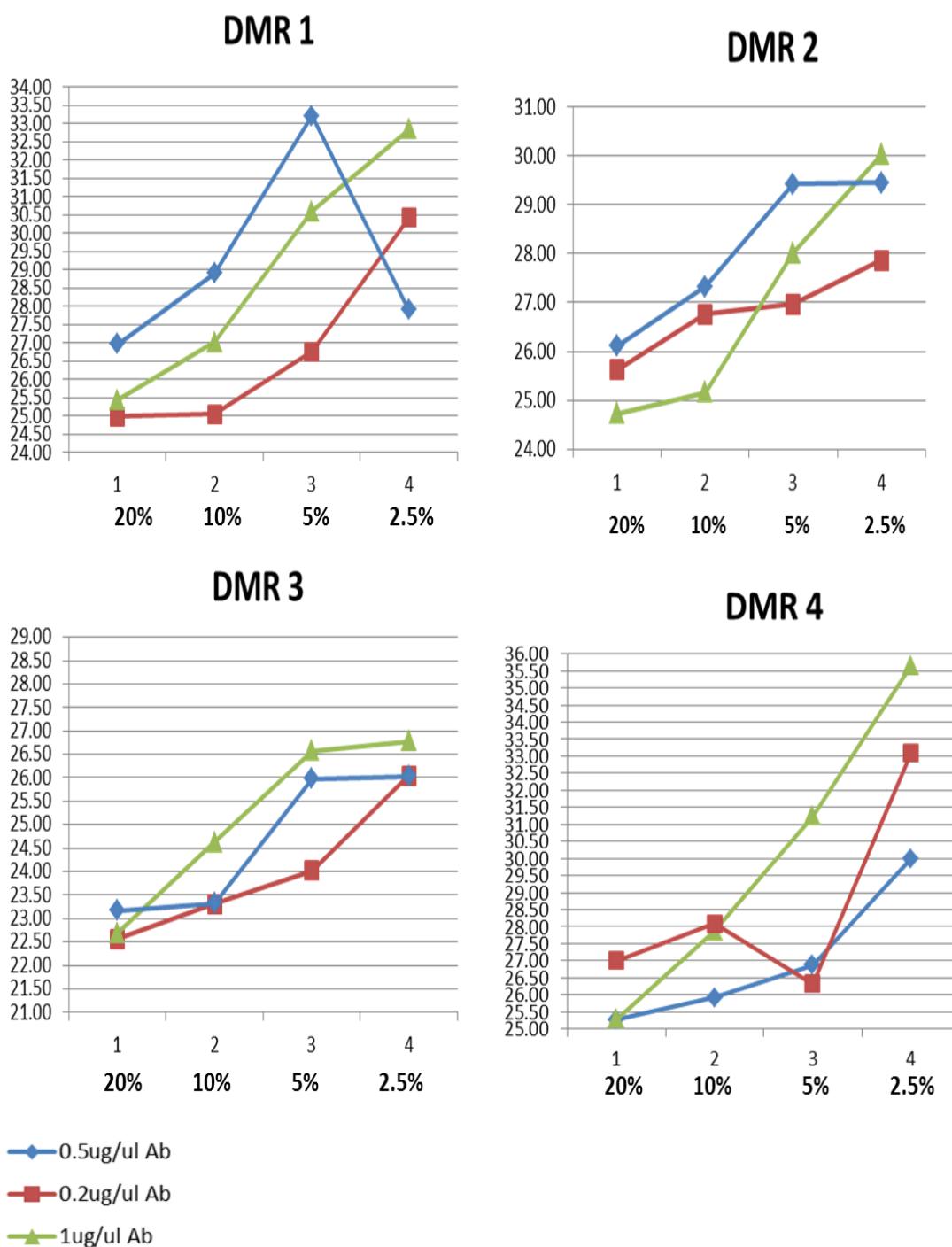
διαδοχικών spikes π.χ. $dCt = [(Ct_{2.5\%} - Ct_{5\%}) + (Ct_{5\%} - Ct_{10\%}) + (Ct_{10\%} - Ct_{20\%})] / 3$. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα με το αρχικό πρωτόκολλο (150μL) και με κόκκινο με το τροποποιημένο (50μL).

4.2.3 Βέλτιστη συγκέντρωση αντισώματος

Εφόσον το πρωτόκολλο τροποποιήθηκε ώστε ο αρχικός όγκος της αντίδρασης ανοσοκατακρήμνισης μεθυλιωμένου DNA να είναι 50μL και να γίνεται ένα κοινό στάδιο επώασης, δοκιμάστηκε η τροποποίηση της συγκέντρωσης του αντισώματος με σκοπό τη μείωση του κόστους της αντίδρασης. Δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αντισώματος, 0.2 μg/μl, 0.5 μg/μl και 1 μg/μl, και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Τα κοινά χαρακτηριστικά των πρωτοκόλλων είναι τα εξής:

- Δείγματα προσομοίωσης κήσεων με 20%, 10%, 5% και 2,5% εμβρυϊκό DNA (CVS spike-in samples).
- 3 αντιδράσεις ανοσοκατακρήμνισης για κάθε δείγμα προσομοίωσης.
- 1 στάδιο επώασης διάρκειας 3 ωρών.
- Ποσότητα μαγνητικών σφαιριδίων ανά αντίδραση 5μL.

Για την αξιολόγηση της επίδρασης των τροποποιήσεων στην ανίχνευση των διαφορεικά μεθυλιωμένων περιοχών του DNA εξετάστηκαν 4 διαφορετικές περιοχές DMRs στο χρωμόσωμα 21.



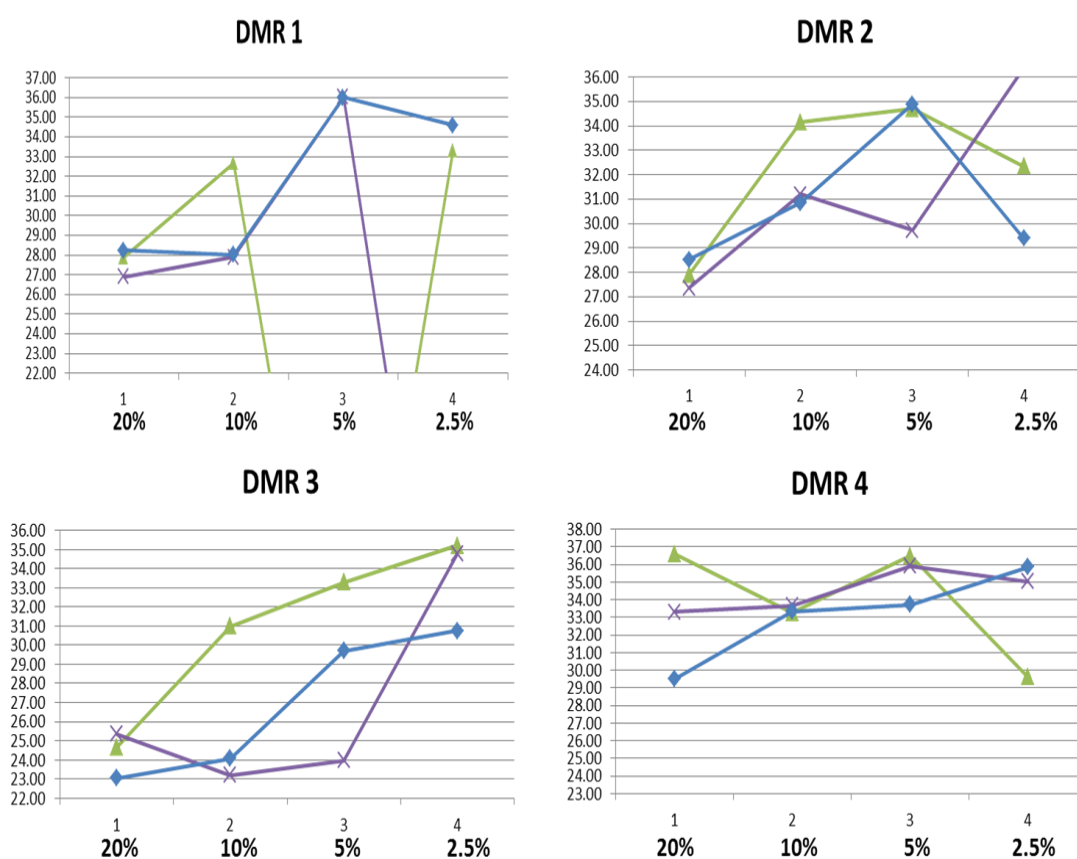
Εικόνα 4.4. Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων ανίχνευσης 4 διαφορετικών DMRs με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων αντισώματος (Ab). Ο άξονας Y αντιπροσωπεύει τις τιμές C_t (κύκλοι αντίδρασης qPCR) και ο άξονας X τα διαφορετικά δείγματα προσομοίωσης.

Με βάση τα αποτελέσματα επιλέχθηκε ως βέλτιστη, η συγκέντρωση αντισώματος 0.2μg/μl. Οι τιμές C_t είναι μικρότερες σε αυτήν τη συγκέντρωση αντισώματος, για τις περισσότερες περιοχές DMRs που εξετάστηκαν, γεγονός που υποδεικνύει την αποτελεσματικότερη ανοσοκατακρήμνιση των περιοχών στόχων.

4.2.4 Βέλτιστη συγκέντρωση μαγνητικών σφαιριδίων

Ο σκοπός της αναζήτησης βέλτιστης συγκέντρωσης μαγνητικών σφαιριδίων είναι η μείωση του κόστους της μεθοδολογίας εξασφαλίζοντας ωστόσο, ικανοποιητικά αποτελέσματα. Δοκιμάστηκαν 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις μαγνητικών σφαιριδίων (3μl, 5μl και 7μl Dynabeads M-280 Sheep anti-mouse IgG-Invitrogen) και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Τα κοινά χαρακτηριστικά των πρωτοκόλλων είναι τα εξής:

- Δείγματα προσομοίωσης κηύσεων με 20%, 10%, 5% και 2,5% εμβρυϊκό DNA (CVS spike-in samples).
- 3 αντιδράσεις ανοσοκατακρήμνισης για κάθε δείγμα προσομοίωσης.
- 1 στάδιο επώασης διάρκειας 3 ωρών.
- Συγκέντρωση αντισώματος 0.2μg/μl.



Εικόνα 4.5 Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων ποσοτικής ανίχνευσης 4 διαφορετικών DMRs μετά από χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων μαγνητικών σφαιριδίων κατά τη ανοσοκατακρήμνιση μεθυλιωμένου DNA. Ο άξονας X αντιπροσωπεύει τα διαφορετικά δείγματα προσομοίωσης και ο άξονας Y τις τιμές C_t (κύκλοι αντίδρασης qPCR). Με μπλε, μοβ και πράσινο απεικονίζεται η χρήση 3, 5 και 7μl μαγνητικών σφαιριδίων, αντίστοιχα.

Για την αξιολόγηση της επίδρασης των τροποποιήσεων στην ανίχνευση των διαφορεικά μεθυλιωμένων περιοχών του DNA εξετάστηκαν 4 διαφορετικές περιοχές DMRs στο χρωμόσωμα 21.

Ως βέλτιστη ποσότητα μαγνητικών σφαιριδίων, επιλέχθηκαν τα 3μL καθώς παρατηρήθηκε το καλύτερο πρότυπο αποτελεσμάτων με τις μικρότερες τιμές C_i (μεγαλύτερη ευαισθησία). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι αυτή η συγκέντρωση μαγνητικών σφαιριδίων οδηγεί σε καλύτερη δέσμευση του συμπλόκου Ab-DNA κατά τη διάρκεια της ανοσοκατακρήμνισης του μεθυλιωμένου DNA σε σχέση με τις άλλες που εξετάστηκαν.

4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΔΙΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ DNA

Μετά από τις τροποποιήσεις της μεθόδου στα προαναφερόμενα σημεία-κλειδιά και την επιλογή των βέλτιστων παραμέτρων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τη μελέτη της αποτελεσματικότητας και ευαισθησίας της μεθοδολογίας όπως αυτή διαμορφώθηκε.

4.3.1 Δημιουργία τεχνητών δειγμάτων προσομοίωσης

Προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα και η ευαισθησία της ανίχνευσης των διαφορεικά μεθυλιωμένων περιοχών του DNA (DMRs), δημιουργήθηκαν τεχνητά δείγματα τα οποία προσομοιάζουν δείγματα πραγματικών κυήσεων. Για τη δημιουργία των τεχνητών δειγμάτων απομονώθηκε DNA από πλάσμα περιφερικού αίματος γυναικών, οι οποίες δεν είναι έγκυες, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο κεφάλαιο των Υλικών και Μεθόδων. Το υλικό από το οποίο απομονώθηκε το DNA προέκυψε από δείγματα διαφορετικών γυναικών, τα οποία συνενώθηκαν (pooled plasma DNA) προκειμένου να γίνει εξομάλυνση της διαφορετικότητας της μεθυλίωσης η οποία παρατηρείται μεταξύ ατόμων. Στη συνέχεια απομονώθηκε DNA από χοριονικές λάχνες οι οποίες είχαν συλλεχθεί από 4 διαφορετικές κυήσεις με φυσιολογικά άρρενα έμβρυα (CVS1-4).

Έπειτα, φωτομετρήθηκαν τα DNA των CVS και αραιώθηκαν ώστε να φθάσουν σε συγκέντρωση 10 ng/μl. Η συγκέντρωση αυτή βρέθηκε ότι είναι η βέλτιστη ώστε να επιτευχθεί ομοιογενώς, η κατάτμηση του DNA των CVS. Όλα τα DNA κατατμήθηκαν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο των Υλικών και Μεθόδων. Η κατάτμηση του DNA, που προήλθε από τα CVS είναι απαραίτητη ώστε, το CVS-DNA να αποκτήσει το μέγεθος του αντίστοιχου ελεύθερου εμβρυϊκού DNA. Μετά τον έλεγχο της κατάτμησης πραγματοποιήθηκε εκ νέου αραιώση των δειγμάτων CVS 1:10 και ποσοτικοποίηση τους (εις τριπλούν) με qPCR, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στον Πίνακα 4.2:

Είδος δείγματος	Κωδικός	Μέση Συγκέντρωση (ng/μl)
Πλάσμα	140918	0.71
CVS1	140447	0.51
CVS2	140909	0.45
CVS3	140910	0.51
CVS4	140911	0.53

Πίνακας 4.2. Συγκεντρώσεις DNA πλάσματος και των 4 διαφορετικών CVS που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία δειγμάτων προσομοίωσης.

Παρ' ότι η θεωρητικώς αναμενόμενη συγκέντρωση είναι 1 ng/μl, οι τιμές που πήραμε ήταν οι παραπάνω και συμφωνούν με αυτές που πήραμε σε άλλα επαναληπτικά πειράματα. Η απόκλιση από το θεωρητικώς αναμενόμενο θα μπορούσε να εξηγηθεί από την απώλεια περιοχών στόχων της qPCR κατά την κατάτμηση του DNA. Ωστόσο, αυτό που έχει σημασία είναι η ομοιογένεια των δειγμάτων. Στη συνέχεια προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα CVS-DNA (1-4) στο DNA πλάσματος ώστε το εμβρυϊκό DNA να είναι το 5%, 10% και 20% του συνολικού αντίστοιχα. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκαν δείγματα προσομοίωσης 4 διαφορετικών «κυήσεων» (1-4) με τρία διαφορετικά ποσοστά «ελεύθερου εμβρυϊκού DNA» στην κάθε μία (CVS spike-in samples). Έπειτα ακολούθησε νέος κύκλος κατάτμησης DNA των δειγμάτων προσομοίωσης για περαιτέρω ομογενοποίηση των μεγεθών των μορίων DNA. Για να διαπιστωθεί η ορθότητα της κατασκευής των συνολικά 12 δειγμάτων, ποσοτικοποιήθηκε τόσο το ολικό όσο το εμβρυϊκό DNA, με qPCR χρησιμοποιώντας ως στόχους το γονίδιο της β-σφαιρίνης και το δείκτη DYS14 εφόσον τα CVS-DNAs είναι αρρένων, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 4.3.

Δείγμα	Συγκέντρωση ολικού DNA (ng/μl)	Ποσοστό εμβρυϊκού DNA (%)
Πλάσμα 0.16	0.17	-
CVS1 0.16	-	0.22
CVS2 0.16	-	0.18
CVS3 0.16	-	0.17
CVS4 0.16	-	0.18
NA 20%	0.13	29.0008
NA 10%	0.11	13.66387
NA 5%	0.10	9.587019
NB 20%	0.12	35.33783
NB 10%	0.10	22.69727
NB 5%	0.12	12.66116
NC 20%	0.12	32.44636
NC 10%	0.11	20.48458
NC 5%	0.09	13.17419
ND 20%	0.14	29.09478
ND 10%	0.11	17.53543
ND 5%	0.10	12.50098

Πίνακας 4.3. Συγκεντρώσεις DNA πλάσματος, CVS1-4. Συγκεντρώσεις ολικού DNA και εμβρυϊκού DNA στα δείγματα προσομοίωσης διαβαθμισμένης ποσόστωσης εμβρυϊκού DNA NA-ND.

Παρατηρούμε ότι και πάλι υπάρχουν αποκλίσεις από τα θεωρητικώς αναμενόμενα, οι οποίες μπορούν και πάλι να αποδοθούν στην απώλεια αλληλουχιών στόχων λόγω της κατάτμησης. Παρ' όλα αυτά, η συνολική συγκέντρωση του DNA είναι περίπου σταθερή και, από τα ποσοστά ανίχνευσης της αλληλουχίας του *DYS14*, φαίνεται η διαβάθμιση του 20%, 10% και 5% εμβρυϊκού DNA στα δείγματα προσομοίωσης.

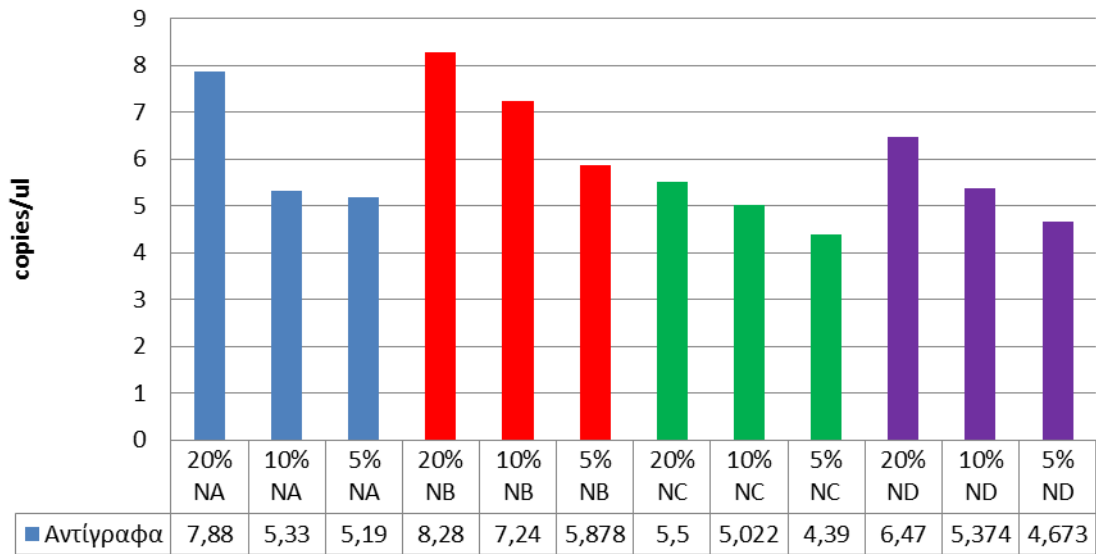
Στη συνέχεια έγινε ανοσοκατακρήμιση του μεθυλιωμένου DNA, όπως αυτή περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο των Υλικών και Μεθόδων. Μετά την ανοσοκατακρήμιση, ακολούθησε ποσοτική ανίχνευση δυο διαφορετικών περιοχών DMRs (H2 και H4), οι οποίες εδράζονται στο χρωμόσωμα 21 (54), με ddPCR για όλα τα δείγματα προσομοίωσης. Μαζί με την ποσοτική ανίχνευση των περιοχών DMRs, διεξήχθη ποσοτική ανίχνευση και μιας περιοχής η οποία είναι υπερμεθυλιωμένη τόσο στον πλακούντα όσο και στο περιφερικό αίμα (hyper-hyper SMR, Same Methylation Region). Ο σκοπός της ανάλυσης της περιοχής αυτής είναι ο έλεγχος της επιτυχούς ανοσοκατακρήμισης του μεθυλιωμένου DNA. Τα αποτελέσματα για τις περιοχές H4 και H2 παρατίθενται στον Πίνακα 4.4.

Δείγμα	Αντίγραφα H4/μL	Αντίγραφα H2/μL	Μέσος όρος αντιγράφων H4&H2/μL
20% NA	1,75	6,13	7,88
10% NA	0,86	4,47	5,33
5% NA	0,53	4,66	5,19
20% NB	1,76	6,52	8,28
10% NB	1,18	6,06	7,24
5% NB	0,868	5,01	5,878
20% NC	0,84	4,66	5,5
10% NC	0,522	4,5	5,022
5% NC	0,2	4,19	4,39
20% ND	1,24	5,23	6,47
10% ND	0,814	4,56	5,374
5% ND	0,353	4,32	4,673

Πίνακας 4.4. Αντίγραφα των DMRs H4 και H2 καθώς και οι μέσοι όροι αυτών. NA, NB, NC, ND αντιστοιχούν στα δείγματα προσομοίωσης, τα οποία προέκυψαν από τα DNA δειγμάτων χοριονικών λαχνών CVS1, CVS2, CVS3 και CVS4 αντίστοιχα.

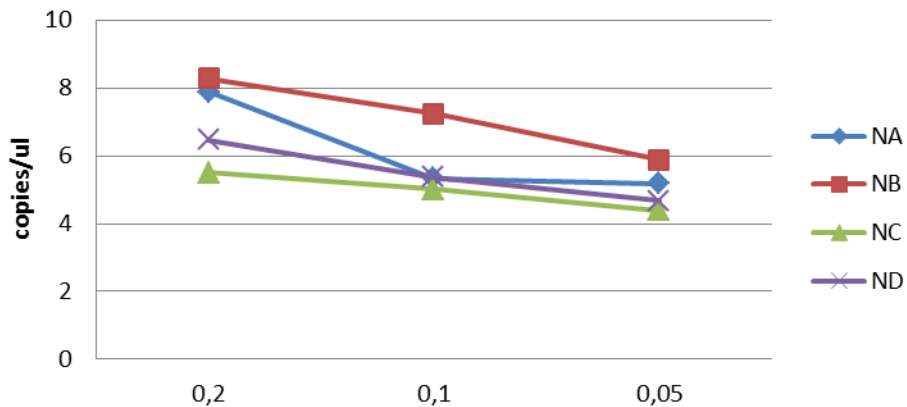
Στον Πίνακα 4.4 παρατηρείται η μείωση των αντιγράφων των DMRs όσο μειώνεται το ποσοστό του εμβρυϊκού DNA, τόσο για κάθε DMR χωριστά όσο και για τις μέσες τιμές τους. Η διαβάθμιση είναι περισσότερο χαρακτηριστική για την περιοχή DMR H4 σε σχέση με την H2. Επίσης παρατηρείται διακύμανση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών ατόμων εφόσον τα NA-ND δημιουργήθηκαν από διαφορετικά δείγματα CVS (CVS1-4).

Δείγματα προσομοίωσης NA, NB, NC, ND



Εικόνα 4.6. Ιστογράμμα των μέσων τιμών των αντιγράφων DMRs στα δείγματα προσομοίωσης NA-ND.

Δείγματα προσομοίωσης 20%, 10%, 5% NA, NB, NC, ND



Εικόνα 4.7. Διαγραμματική απεικόνιση των μέσων τιμών αντιγράφων των δειγμάτων προσομοίωσης NA-ND.

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μεθυλίωση του DNA στα σπονδυλωτά αποτελεί την περισσότερο συντηρημένη επιγενετική τροποποίηση του DNA και παράλληλα την καλύτερα μελετημένη. Ο ρόλος της στη φύση έχει συσχετισθεί στενά με τη σταθερότητα των χρωμοσωμάτων, τον έλεγχο της γενετικής αποτύπωσης, τη ρύθμιση σύνθεσης της χρωματίνης και την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων στα πλαίσια της ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων. (70,79,80) Τα πρότυπα μεθυλίωσης συνδέονται με ιστοειδικότητα και η ιδιότητα αυτή έχει στρέψει την επιστημονική κοινότητα στη διερεύνηση των μεθυλιωμένων περιοχών ώστε να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί δείκτες για τη διάγνωση, παρακολούθηση και πρόγνωση ασθενειών, όπως ο καρκίνος. (81)

Η διαπίστωση ότι στο περιφερικό αίμα της εγκύου κυκλοφορεί ελεύθερο εμβρυϊκό DNA (31), σε συνδυασμό με την ανίχνευση διαφορεικά μεθυλιωμένων περιοχών του DNA εμβρύου-μητέρας (DMRs) κατέστησε δυνατή τη μελέτη της μεθυλίωσης, ως βιολογικού δείκτη, για τη μη επεμβατική ανίχνευση ανευπλοειδιών του εμβρύου. (54) Οι μεθοδολογίες που αναπτύσσονται με βάση τα δεδομένα αυτά εστιάζουν το ενδιαφέρον τους κυρίως στην ανίχνευση της τρισωμίας 21, αφενός μεν λόγω της συχνότητάς της στις γεννήσεις, αφετέρου λόγω της πιθανότητας να διαφύγει της προγεννητικής διάγνωσης στα πλαίσια των εφαρμοζόμενων μη επεμβατικών μεθόδων (βιοχημικών και υπερηχογραφικών).

Τα τελευταία χρόνια, μεγάλος αριθμός ερευνητικών ομάδων παγκοσμίως, καταβάλλουν προσπάθειες για την ανάπτυξη μεθοδολογιών για την μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση ανευπλοειδιών των χρωμοσωμάτων 13, 18, 21 και των χρωμοσωμάτων του φύλου (82), κυρίως με τεχνολογίες αλληλούχησης του DNA επόμενης γενιάς (NGS). Οι μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν υποβλήθηκαν σε δοκιμές επαλήθευσης και επικύρωσης εξετάζοντας μεγάλο αριθμό δειγμάτων, αποδείχθηκε ότι έχουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και έχουν οδηγήσει στη δημιουργία εμπορικά διαθέσιμων τεστ. (83-90) Παρά το γεγονός ότι πρόκειται για τεχνολογίες με μεγάλη δυναμική, εμφανίζουν σημαντικούς περιορισμούς καθιστώντας τες δύσκολα προσβάσιμες στο ευρύ κοινό. Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα προκύπτουν από την περιορισμένη διαθεσιμότητα του *cffDNA* (91,92) και τη μεγάλη πολυπλοκότητα των μεθοδολογιών αυτών, τόσο σε εργαστηριακό όσο και στο επίπεδο της ανάλυσης του μεγάλου όγκου δεδομένων που δύναται να

παράγουν. Κατά συνέπεια, οι μεθοδολογίες βασισμένες σε NGS είναι επίπονες και μέχρι σήμερα έχουν αρκετά υψηλό κόστος.

Οι μεθοδολογίες που βασίζονται σε επιγενετικές τροποποιήσεις του DNA, όπως αυτές που αξιοποιούν περιοχές με διαφορεική μεθυλίωση μεταξύ DNA μητέρας και εμβρύου (DMRs), είναι δυνατόν να άρουν τους παραπάνω περιορισμούς. Η ανοσοκατακρήμνιση μεθυλιωμένων αλληλουχιών DNA (MeDIP) σε συνδυασμό με τις περιοχές διαφορεικής μεθυλίωσης, οδηγεί στον εμπλουτισμό του εξωκυττάρου εμβρυϊκού DNA στο πλάσμα της εγκύου, αυξάνοντας την ευαισθησία των ακολουθούμενων μεθοδολογιών. Ωστόσο, το στάδιο της ανοσοκατακρήμνισης όπου οι υπερμεθυλιωμένες αλληλουχίες του *cffDNA* εμπλουτίζονται επιλεκτικά, είναι ένα στάδιο κατά το οποίο μπορούν να εισαχθούν σφάλματα τα οποία δύναται να επηρεάσουν την αξιοπιστία και ασφάλεια των αποτελεσμάτων. Ως εκ τούτου, είναι πολύ σημαντική η προσεκτική επιλογή των βέλτιστων DMRs, η βελτιστοποίηση του σταδίου αυτού και η συνολική αξιολόγηση της απόδοσης του σταδίου της ανοσοκατακρήμνισης. Επιπλέον, πρόκειται για προσεγγίσεις λιγότερο πολύπλοκες και απαιτητικές, που χρησιμοποιούν εξοπλισμό τον οποίο ήδη διαθέτουν εργαστήρια τα οποία παρέχουν σύγχρονες υπηρεσίες γενετικής, καθιστώντας τις με αυτόν τον τρόπο μεθοδολογίες δυναμικές και υποσχόμενες. Παρ' ολ' αυτά, οι μεθοδολογίες που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα αξιοποιώντας τις επιγενετικές τροποποιήσεις περιορίζονται στην ανίχνευση της τρισωμίας 21 ενώ τεχνολογίες βασισμένες σε NGS έχουν αποδείξει τη δυνατότητα περισσότερων ανευπλοειδιών ή/και λεπτότερων χρωμοσωματικών ανωμαλιών όπως μικροελλείμματα και μικροδιπλασιασμοί.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή στοχεύει στη διερεύνηση παραμέτρων για τη βελτιστοποίηση της διαχείρισης δειγμάτων και της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε για την μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση ανευπλοειδιών του εμβρύου (57) η οποία βασίζεται σε επιγενετικές τροποποιήσεις του DNA (MeDIP-based).

Μελέτη της καταλληλότητας της χρήσης των σωληναρίων STRECK για τη δειγματοληψία

Το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA στο περιφερικό αίμα της εγκύου είναι αρκετά ασταθές και εύκολα αποδομείται. Επιπλέον, ανάλογα με τις συνθήκες διατήρησης μέχρι την επεξεργασία των δειγμάτων, είναι δυνατή η ελευθέρωση μητρικού DNA στο πλάσμα με αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού του *cffDNA* σε σχέση με το ολικό. Είτε η

αποδόμηση του εμβρυϊκού, είτε η ελευθέρωση μητρικού εξωκυττάριου DNA στο πλάσμα οδηγούν σε δυσχερέστερη ανάλυση του *cffDNA*. Κατά συνέπεια, οι χειρισμοί των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται στη μελέτη του, πρέπει να είναι εξαιρετικά προσεκτικοί, ώστε να παίρνονται όλες οι απαραίτητες προφυλάξεις και να διασφαλίζεται η ακεραιότητα του προκειμένου η μελέτη του να οδηγεί σε αξιόπιστα αποτελέσματα.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες στις οποίες διερευνώνται παράμετροι όπως τα σωληνάρια συλλογής αίματος, ο χρόνος απομόνωσης πλάσματος, οι συνθήκες διατήρησης των δειγμάτων και αποστολής τους σε εργαστήρια που διεξάγουν τις αναλύσεις (93-97) και άλλες.

Στη μελέτη που κάναμε για τη σύγκριση του ποσοστού του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA μετά από άμεση απομόνωση πλάσματος και αποθήκευση στους -80°C και την απομόνωση πλάσματος μετά από συλλογή σε σωληνάρια STRECK, διατήρησή τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αποστολή και επεξεργασία τους μετά από 24-72 ώρες, παρατηρήσαμε ότι στις περισσότερες περιπτώσεις, το ποσοστό του *cffDNA* είναι λίγο υψηλότερο όταν η απομόνωση του πλάσματος ήταν άμεση. Ωστόσο, παρ' ότι ο μικρός αριθμός δειγμάτων δεν επιτρέπει τη γενίκευση συμπερασμάτων, φαίνεται ότι η επεξεργασία των δειγμάτων περιφερικού αίματος δεν είναι απαραίτητο να γίνει άμεσα και ότι είναι δυνατή η μεταφορά τους χωρίς ο χρόνος που μεσολαβεί και οι δεδομένες συνθήκες μεταφοράς να είναι καθοριστικές παράμετροι για την καταλληλότητα των δειγμάτων και τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Σε αυτήν την πειραματική σειρά δεν υπήρχε ένδειξη της συσχέτισης της ηλικίας της κύησης και του ποσοστού του εξωκυττάριου εμβρυϊκού DNA. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το ποσοστό του *cffDNA* σε σχέση με το ολικό στο πλάσμα της εγκύου είναι αντικείμενο μελέτης (98-100) και φαίνεται ότι υπάρχει σημαντικότερη συσχέτιση με το δείκτη μάζας σώματος της εγκύου, ο οποίος αυξανόμενος οδηγεί σε μικρότερη αναλογία εμβρυϊκού-μητρικού DNA. (101,102)

Τροποποιήσεις της μεθοδολογίας

Η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε από την ομάδα μας (MeDIP-qPCR, NIPD21) δοκιμάστηκε αρχικά σε 80 δείγματα, ώστε να αποδειχθεί η ορθότητα της αρχής της (57) και στη συνέχεια επαληθεύτηκε σε 175 περιστατικά (103) ώστε να προσδιοριστεί

η ακρίβεια και η ευαισθησία της (99.2% ειδικότητα, 100% ευαισθησία). Παρά τα πολύ καλά αποτελέσματα που έδωσαν οι παραπάνω μελέτες, η μεθοδολογία επιδέχεται βελτιστοποιήσεις.

Το πιο κρίσιμο στάδιο της μεθοδολογίας είναι η ανοσοκατακρήμνιση του μεθυλιωμένου DNA, εφόσον κατά το στάδιο αυτό το ολικό ελεύθερο DNA εμπλουτίζεται σε εμβρυϊκές αλληλουχίες, οι οποίες είναι υπερμεθυλιωμένες σε σχέση με τις αντίστοιχες οι οποίες είναι υπομεθυλιωμένες στο ελεύθερο DNA της μητέρας (DMRs). Ο εμπλουτισμός επιτρέπει τη μείωση του υπόβαθρου μητρικής προέλευσης και την καλύτερη μελέτη των εμβρυϊκών αλληλουχιών. Ωστόσο, αποτελεί στάδιο της μεθοδολογίας το οποίο είναι σχετικά πολύπλοκο, απαιτεί ακριβείς και λεπτούς χειρισμούς και κατά το οποίο είναι δυνατή η εισαγωγή σφαλμάτων.

Η σύμπτυξη των δυο σταδίων επώασης (αντίσωμα-DNA και συμπλόκου Ab-DNA-μαγνητικών σφαιριδίων) ήταν επιτυχής μειώνοντας το χρόνο από 4 σε 3 ώρες, την πολυπλοκότητα και τον κόπο για τους χειρισμούς καθώς και την συνακόλουθη εισαγωγή σφαλμάτων.

Η μείωση του όγκου της αντίδρασης ανοσοκατακρήμνισης του μεθυλιωμένου DNA οδήγησε σε αποτελέσματα τα οποία είναι το ίδιο καλά σε σχέση με το αρχικό πρωτόκολλο, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την οικονομικότερη διαχείριση της ήδη περιορισμένης ποσότητας του *cffDNA*, εξασφαλίζοντας τη μεγαλύτερη διαθεσιμότητά του για περεταίρω διερευνήσεις.

Η μείωση της ποσότητας του αντισώματος και των μαγνητικών σφαιριδίων ανά αντίδραση ανοσοκατακρήμνισης οδήγησε και αυτή σε αποτελέσματα συγκρίσιμα με αυτά της αρχικής μεθοδολογίας μειώνοντας το κόστος της.

Μελέτη της αποτελεσματικότητας και ευαισθησίας της ανίχνευσης διαφορικά μεθυλιωμένων περιοχών του DNA

Μετά από την υιοθέτηση των τροποποιήσεων για τη βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας, διεξήχθη μελέτη της αποτελεσματικότητας και της ευαισθησίας της ανίχνευσης διαφορικά μεθυλιωμένων περιοχών του DNA (DMRs).

Δείχθηκε ότι η τροποποιημένη μεθοδολογία επιτρέπει την αποτελεσματική ανίχνευση των DMRs. Η διαπίστωση ότι η ανίχνευση της περιοχής H4 πραγματοποιήθηκε με

μεγαλύτερη ευαισθησία από την H2 δείχνει ότι η αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης των DMRs διαφέρει από περιοχή σε περιοχή. Το εύρημα μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές διαφορές μεθυλίωσης εμβρυϊκού-μητρικού DNA, σε μεγαλύτερη επιρρέπεια σε σφάλματα κατά την εφαρμογή της μεθοδολογίας για ορισμένους δείκτες και σε άλλες πιθανές παραμέτρους, οι οποίες πρέπει να διερευνηθούν. Γι' αυτό είναι απαραίτητο να μελετηθεί μεγάλος αριθμός DMRs και να αξιολογηθούν για την ευαισθησία τους προκειμένου να επιλεγούν οι βέλτιστες περιοχές ως δείκτες της μελέτης ανευπλοειδιών του εμβρύου.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει διακύμανση τιμών, όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών περιοχών αλλά και μεταξύ ατόμων. Το εύρημα αυτό αναφέρεται και στη διεθνή βιβλιογραφία. (104) Ως παράμετρος, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ιδιαίτερα αν η μεθοδολογία που ακολουθείται για το διαχωρισμό των φυσιολογικών περιστατικών από τα παθολογικά βασίζεται στη σύγκριση των δειγμάτων που ελέγχονται με δείγματα από γνωστές φυσιολογικές κυήσεις. Ωστόσο, έχειδειχθεί ότι η διακύμανση του *cffDNA* στο πλάσμα της εγκύου δεν αποτρέπει την ορθή ταξινόμηση των περιστατικών σε φυσιολογικά και με τρισωμία 21 όταν εφαρμόζεται η μεθοδολογία MeDIP-qPCR. (105)

Η ευαισθησία της μεθόδου φαίνεται να είναι οριακά κοντά στο 5% του *cffDNA* σε σχέση με το ολικό στο πλάσμα της εγκύου, δεδομένο το οποίο συμφωνεί με τις παρατηρήσεις που έχουν γίνει σε μεθοδολογίες που βασίζονται σε NGS. (102)

6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη του εξωκυττάριου εμβρυϊκού DNA στην αιματική κυκλοφορία της εγκύου μπορεί να οδηγήσει τόσο σε συμπεράσματα για την υγεία του ίδιου του εμβρύου, όσο και της μητέρας και την έκβαση της κύησης. Για τη διερεύνηση ανευπλοειδιών του εμβρύου με τη μελέτη του *cffDNA* στο πλάσμα της εγκύου, έχουν αναπτυχθεί μεθοδολογίες που βασίζονται είτε στην αλληλούχηση του DNA είτε σε επιγενετικές τροποποιήσεις. Επί του παρόντος, οι εφαρμοζόμενες μεθοδολογίες είναι βασισμένες σε NGS τεχνολογίες και αποδεικνύονται περισσότερο αποτελεσματικές από τις μη επεμβατικές προσεγγίσεις με τη μέτρηση βιοχημικών δεικτών στο αίμα της εγκύου σε συνδυασμό με υπερηχογραφικούς δείκτες (106,107) ωστόσο, δεν είναι ακόμα σε θέση να οδηγήσουν σε διάγνωση αλλά εκτίμηση κινδύνου. (108)

Η επιγενετική προσέγγιση μπορεί να προσπελάσει ορισμένους από τους περιορισμούς των τεχνολογιών με NGS. Η ανοσοκατακρήμνιση μεθυλιωμένου DNA φαίνεται να είναι το κλειδί στην προσέγγιση αυτή και γίνεται προσπάθεια της βελτιστοποίησης της υπάρχουσας μεθοδολογίας με σκοπό τη δημιουργία διαγνωστικής μεθόδου.

Μελλοντικοί στόχοι

Έχει δειχθεί η δυνατότητα ανίχνευσης τρισωμίας του χρωμοσώματος 21, μη επεμβατικά, στο πλάσμα της εγκύου με MeDIP-qPCR. (54,57,103) Η γνώση που αποκομίστηκε από τις μέχρι τώρα μελέτες ανοίγει το δρόμο για την ανάπτυξη μεθόδου, η οποία θα περιλαμβάνει και άλλες συχνές ανευπλοειδίες του εμβρύου όπως αυτές των χρωμοσωμάτων 13, 18, και των χρωμοσωμάτων του φύλου. Οι τεχνολογίες βασισμένες σε NGS φαίνεται ότι μπορούν να επεκταθούν και σε ανίχνευση μικρότερων χρωμοσωματικών ανωμαλιών, όπως είναι τα μικροελλείμματα και οι μικροδιπλασιασμοί (109,110) ωστόσο, απαιτούνται μεγαλύτερες μελέτες προκειμένου αυτό να αποδειχθεί. Πιστεύεται ότι οι μεθοδολογίες που βασίζονται σε επιγενετικά φαινόμενα σε συνδυασμό με γενετικές προσεγγίσεις και προηγμένες τεχνολογίες όπως digital PCR και NGS, θα συνεισφέρουν στο μέλλον σημαντικά στον τομέα της μη επεμβατικής προγεννητικής ανίχνευσης λεπτότερων γενετικών ανωμαλιών του εμβρύου (111) όπως σημειακές μεταλλάξεις, μικροελλείμματα/μικροδιπλασιασμοί κ.α.

7 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις του DNA αποτελούν ευρύ αντικείμενο μελέτης σε ότι αφορά τους μηχανισμούς, το ρόλο τους και τις δυνητικές εφαρμογές τους στην πρόβλεψη, διάγνωση και παρακολούθηση παθολογικών καταστάσεων. Η καλύτερα μελετημένη επιγενετική τροποποίηση είναι η μεθυλίωση του DNA, η οποία χρησιμοποιείται ως εργαλείο-δείκτης στη βιολογία του καρκίνου αλλά και στην ιατρική εμβρύου.

Η διερεύνηση της γενετικής σύστασης του εμβρύου αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ζητήματα στην προγεννητική διάγνωση. Η διάγνωση ανευπλοειδιών του εμβρύου, με συχνότερη την τρισωμία 21 (σύνδρομο Down), πραγματοποιείται με τη διεξαγωγή του καρυοτύπου του εμβρύου και μεθοδολογίες της μοριακής κυτταρογενετικής μετά από επεμβατική λήψη ιστών του. Τέτοιες διαδικασίες είναι η λήψη χοριοϊκών λαχνών και η αμνιοπαρακέντηση, ενώ σπανιότερα γίνεται λήψη εμβρυϊκού αίματος. Οι μέθοδοι αυτές συνδέονται με κίνδυνο επιπλοκών στην κύηση και αποβολής του εμβρύου. Για την αποφυγή επιπλοκών, πραγματοποιούνται βιοχημικοί και υπερηχογραφικοί έλεγχοι οι οποίοι οδηγούν σε εκτίμηση του κινδύνου να πάσχει ένα έμβρυο. Τέτοιου είδους μη επεμβατικές προσεγγίσεις εφαρμόζονται ευρέως ωστόσο, η ανιχνευσιμότητά τους δεν είναι αρκετά ικανοποιητική.

Η ανακάλυψη της κυκλοφορίας εμβρυϊκών κυττάρων και ελεύθερου εμβρυϊκού DNA (*cffDNA*, *cell free fetal DNA*) στο περιφερικό αίμα της εγκύου άνοιξε νέους ορίζοντες για την μη επεμβατική ανίχνευση ανευπλοειδιών. Τα τελευταία χρόνια, οι περισσότερες έρευνες εστιάζουν στη μελέτη του *cffDNA* μέσω τεχνολογιών αλληλούχησης του DNA (NGS, Next Generation Sequencing) και μελέτης της διαφορικής μεθυλίωσης του DNA μητέρας και εμβρύου. Οι τεχνολογίες οι οποίες βασίζονται σε NGS είναι δυναμικές και έχουν σήμερα κλινική εφαρμογή. Παρουσιάζουν, παρ' όλα αυτά, σημαντικούς περιορισμούς ορισμένους από τους οποίους θα μπορούσαν οι «επιγενετικές» προσεγγίσεις να υπερκεράσουν.

Μια από τις επιγενετικές προσεγγίσεις βασίζεται στις διαφορές μεθυλίωσης μητρικού και εμβρυϊκού DNA (DMRs, Differentially Methylated Regions) στο περιφερικό αίμα της εγκύου και τον εμπλουτισμό του *cffDNA* με την ανοσοκατακρήμιση μεθυλιωμένου DNA (MeDIP, Methylation Dependent Immuno Precipitation). Μετά

τον εμπλουτισμό του *cffDNA* με MeDIP ακολουθεί ποσοτική ανίχνευση των περιοχών DMRs με τελικό αποτέλεσμα την ανίχνευση ή όχι τρισωμίας 21 στο έμβρυο. Η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε αποδείχθηκε ότι έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα ωστόσο, επιδέχεται βελτιώσεων.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν τροποποιήσεις σε ορισμένα κομβικά σημεία της μεθοδολογίας, οι οποίες αξιολογήθηκαν για την επίδραση τους στην απόδοση των σταδίων αυτών προκειμένου να ενσωματωθούν σε αυτήν. Επιπλέον, λόγω της κρισιμότητας της διαδικασίας της συλλογής, διατήρησης και μεταφοράς των δειγμάτων μέχρι την ανάλυση, εξετάστηκε η καταλληλότητα της συλλογής δειγμάτων περιφερικού αίματος της εγκύου σε ειδικά σωληνάρια STRECK αντί των συνηθέστερα χρησιμοποιούμενων, τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό $K^+/EDTA$.

Η μελέτη έδειξε ότι η επεξεργασία των δειγμάτων περιφερικού αίματος δεν είναι απαραίτητο να γίνει άμεσα και ότι είναι δυνατή η μεταφορά τους χωρίς ο χρόνος που μεσολαβεί και οι δεδομένες συνθήκες μεταφοράς να είναι καθοριστικές παράμετροι για την καταλληλότητα των δειγμάτων και τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Το στάδιο της ανοσοκατακρήμνισης μεθυλιωμένου DNA είναι ίσως το κρισιμότερο στάδιο της μεθοδολογίας, καθώς είναι σχετικά πολύπλοκο, απαιτεί ακριβείς και λεπτούς χειρισμούς και κατά το οποίο είναι δυνατή η εισαγωγή σφαλμάτων. Η σύμπτυξη των δυο σταδίων επώασης (αντίσωμα-DNA και συμπλόκου Ab-DNA-μαγνητικών σφαιριδίων) ήταν επιτυχής μειώνοντας το χρόνο από 4 σε 3 ώρες, την πολυπλοκότητα και τον κόπο για τους χειρισμούς καθώς και την συνακόλουθη εισαγωγή σφαλμάτων. Η μείωση του όγκου της αντίδρασης ανοσοκατακρήμνισης του μεθυλιωμένου DNA οδήγησε σε αποτελέσματα τα οποία είναι το ίδιο καλά σε σχέση με το αρχικό πρωτόκολλο, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την οικονομικότερη διαχείριση της ήδη περιορισμένης ποσότητας του *cffDNA*, εξασφαλίζοντας τη μεγαλύτερη διαθεσιμότητά του για περαιτέρω διερευνήσεις. Η μείωση της ποσότητας του αντισώματος και των μαγνητικών σφαιριδίων ανά αντίδραση ανοσοκατακρήμνισης οδήγησε και αυτή σε αποτελέσματα συγκρίσιμα με αυτά της αρχικής μεθοδολογίας μειώνοντας το κόστος της.

Μετά από την υιοθέτηση των τροποποιήσεων για τη βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας, διεξήχθη μελέτη της αποτελεσματικότητας και της ευαισθησίας της

ανίχνευσης DMRs. Δείχθηκε ότι η τροποποιημένη μεθοδολογία επιτρέπει την αποτελεσματική ανίχνευση των DMRs.

Η παρούσα μελέτη έδειξε την επιτυχή βελτιστοποίηση της υπάρχουσας προσέγγισης (MeDIP-qPCR) για την μη επεμβατική ανίχνευση της τρισωμίας 21 από το περιφερικό αίμα της εγκύου. Η μέθοδος είναι υποσχόμενη, με δυνατότητα επέκτασης σε περισσότερες ανευπλοειδίες ή και άλλες χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Είναι σημαντική η διερεύνηση παραμέτρων για την περαιτέρω βελτιστοποίηση της προκειμένου να είναι εφικτή η μελέτη της γενετικής σύστασης του εμβρύου με επιγενετικές προσεγγίσεις.

8 SUMMARY

Title: “Differentially methylated region analysis in aneuploidies”

Candidate Doctor: Georgia Christopoulou

Epigenetic DNA modifications are widely investigated in respect of their mechanisms, their role and potential applications for the prediction, diagnosis and monitoring of abnormalities. The most studied epigenetic modification is DNA methylation which is used as a marker in cancer genetics and fetal medicine.

The investigation of the fetal genetic constitution is one of the most important concerns in prenatal diagnosis. Fetal aneuploidy, with trisomy 21 (Down syndrome) being the most frequent, is detected by fetal karyotype and molecular cytogenetics techniques subsequent to invasive procedures. Such procedures are chorionic villus sampling (CVS) and amniocentesis, while fetal blood sampling is rare. These procedures implicate a relative risk for pregnancy loss and other complications. In order to avoid this risk, maternal serum biochemical screening and ultrasonography is conducted; nevertheless their detection rate is unsatisfactory.

The discovery that fetal cells and cell free DNA (*cffDNA*) circulates in maternal peripheral blood has given a new perspective to the non-invasive prenatal detection of fetal aneuploidy. The past few years, research has focused on the study of *cffDNA* by Next Generation Sequencing (NGS) based technologies as well as fetal-maternal methylation differences. NGS-based technologies are proven to be of great potential and are currently used for clinical applications. However, they present certain limitations, some of which could be overcome by epigenetic-based methodologies.

One of the epigenetic approaches is based on fetal-maternal differentially methylated regions (DMRs) which are used for the enrichment of the fetal cell free DNA fraction in maternal plasma by Methylation Dependent Immuno Precipitation (MeDIP). MeDIP is combined with real time quantitative PCR (qPCR) so that fetal trisomy 21 could be detected. This method is proven to be of high sensitivity and specificity; however there is a great deal of improvement that could be done.

In this study, some of the method’s key points were modified and changes were evaluated in order to adapt them in an improved version. Moreover, due to the

importance of sampling, storing and shipping procedures, the efficiency of blood sampling in STRECK tubes was tested instead of sampling in standard K+/EDTA tubes. It was shown that maternal blood samples in STRECK tubes do not require immediate processing and the given time frame and shipping conditions do not affect *cff*DNA in a way that might interfere with producing reliable results.

The MeDIP step is very important since it is relatively complicated; it requires precise and accurate handling and is a stage where bias could be introduced. The one-step vs two-step incubation (Ab-DNA and Ab-DNA-magnetic bead) comparison shows that the one step protocol is as efficient, thus reducing time, complexity, labor and bias. Reducing the MeDIP reaction volume generated comparable results, allowing testing with less starting *cff*DNA quantity, which is already limited. The reduction of the amount of antibody and magnetic beads used per MeDIP reaction produced good results making the new version more cost effective.

Following the adoption of the improved modifications there was an efficiency test for the method's new version. It is shown that the modified protocol can efficiently detect and quantify DMRs for the non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21.

This study demonstrated the successful improvement of the previously developed MeDIP-qPCR methodology for non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) of Down syndrome. This method is promising, with great potential for expanding towards more aneuploidy or even other chromosomal abnormalities detection. The continuous improvement is important in order to investigate the fetal genetic constitution exploiting epigenetic procedures.

9 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αλεπόρου Β. & Παταργιάς Θ. Γενετική ανθρώπου. Εκδόσεις Συμμετρία;1998.
2. Mosby. Mosby's dictionary of medicine, nursing and allied health. The CV Mosby Company;1990.
3. Grimshaw G., Szczepura A., Hulten M., *et al.* Evaluation of molecular tests for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. *Health Technol Assess* 2003;7(10):1-146.
4. Roizen NJ., Patterson D. Downs's syndrome. *Lancet* 2003. 12;361(9365):1281-9.
5. Liptak GS. Down Syndrome (Trisomy 21; Trisomy G). Merck Manual. Retrieved 2010-12-04. "Symptoms".
6. Turner Syndrome Society. Turner syndrome: The basics. Retrieved Oct 2, 2014 from: www.turnersyndrome.org. (2009).
7. White MJD. 1973. The chromosomes. 6th edition, Chapman &Hall, London.
8. Levitsky GA. The morphology of chromosomes. *Bull. Applied Bot. Genet. Plant Breed* 1931. 27:19-174.
9. Eurogentest. Patients, Public & Policy. Retrieved 03-10-2014.
10. White MJD. The chromosomes. 6th edition, Chapman &Hall, London; 1973.
11. King RC, Stansfield WD and Mulligan PK. A dictionary of genetics. 7th edition, Oxford U. P. Oxford & NY; 2006.
12. Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas* 1956;42: 1-6.
13. Mansfield ES. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet* 1993;2:43-50.
14. Strachan T, Read A. Human Molecular Genetics. Oxford. Bios Scientific Publishers;1996.
15. Pertl B., Kopp S., Kroisel PM., *et al.* Rapid detection of chromosome aneuploidies by quantitative fluorescence PCR: first application on 247 chorionic villus samples. *J Med Genet* 1999;36(4):300-303.
16. Carter NP. Methods and strategies for analyzing copy number variations using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 2007;39, S16-21.

17. Pinkel D, Sagraves R, Sudar D, *et al.* High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative hybridization microarrays. *Nat Genet.* 1998;20(2):207-211.
18. Wikipedia. Prenatal Diagnosis; [cited Oct 2014]. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Prenatal_diagnosis
19. Wapner RJ. Invasive prenatal diagnosis techniques. *Semin Perinatol.*2005; 29:401-4.
20. Caughey AB, Hopkins LM, Norton ME. Chorionic villus sampling compared with amniocentesis and the difference in the rate of pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 2006; 108 (3 Pt 1): 612-6.
21. Nicolaidis KH, Azar G, Byrne D, *et al.* Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ* 1992;304:867-9.
22. Spencer K, Aitken DA, Crossley JA, *et al.* First trimester biochemical screening for trisomy 21: the role of free beta hCG, alpha fetoprotein and pregnancy associated plasma protein A. *Ann Clin Biochem* 1994;31(Pt 5):447-54.
23. Schroder J. Transplacental passage of blood cells. *J Med Genet* 1975;12(3):230-42.
24. Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, *et al.* Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study. *Prenat Diagn.* 2002;22(7):609-15.
25. Jansen MW, von Lindern M, Beug H, *et al.* The use of in vitro expanded erythroid cells in a model system for the isolation of fetal cells from maternal blood. *Prenat Diagn* 1999;19:323-9.
26. Krabchi K, Gros-Louis F, Yan J, *et al.* Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. *Clin Genet.* 2001; 60(2):145-50.
27. Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, *et al.* PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploidy pregnancies. *Am J Hum Genet.* 1997; 61(4):822-9.

28. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, *et al.* Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996. 23;93(2):705-8.
29. Evans PC, Lambert N, Maloney S, *et al.* Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood.* 1999. 15;93(6):2033-7.
30. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, *et al.* Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977 ;37(3):646-50.
31. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997;350(90076):485-7.
32. Bianchi DW, Shuber AP, DeMaria MA, *et al.* Fetal cells in maternal blood: determination of purity and yield by quantitative polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;171:922-926.
33. Lo YM, Lau TK, Chan LY, *et al.* Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clin Chem.* 2000; 46:1301-9.
34. Alberry M, Maddocks D, Jones M, *et al.* Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn.* 2007;27(5):415-8.
35. Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, *et al.* Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-paternal DNA. *Am J Path.* 2006; 169: 400-4.
36. Smid M, Galbiati S, Lojacono A, *et al.* Correlation of fetal DNA levels in maternal plasma with Doppler status in pathological pregnancies. *Prenat Diagn.* 2006; 26(9):785-790.
37. Partsalis T, Chan LY, Hurworth M, *et al.* Evidence of circulating donor genetic material in bone allotransplantation. *Int J Mol Med.* 2006; 17:1151-5.
38. Lo YM, Tein MS, Lau LY, *et al.* Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998; 62(4):768-775.
39. Sekizawa A, Kondo T, Iwasaki M, *et al.* Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2001; 47: 1856-8.

40. Birch L, English CA, O'Donoghue K, *et al.* Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clin Chem.* 2005; 51(2): 312-20.
41. Zhong XY, Holzgreve W & Hahn S. Circulatory fetal and maternal DNA in pregnancies at risk and those affected by preeclampsia. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 945:138-40.
42. Farina A, Sekizawa A, Iwasaki M, *et al.* Total free DNA (beta-globin gene) distribution in maternal plasma at the second trimester: a new prospective for preeclampsia screening. *Prenat Diagn.* 2004; 24(9): 722-6.
43. Leung TN, Zhang J, Lau TK, *et al.* Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet.* 1998; 352: 1904-5.
44. Lo YM, Zhang J, Leung TN, *et al.* Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 1999;64(1): 218-24.
45. Chim SS, Tong YK, Chiu RW, *et al.* Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(41): 14753-8.
46. Tong YK, Chiu RW, Akolekar R, *et al.* Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach. *Clin Chem.* 2010; 5(12):e15244.
47. Chan KC, Zhang J, Hui AB, *et al.* Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2004; 50: 88-92.
48. Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, *et al.* Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem.* 2004; 50(6): 1002-11.
49. Dhallan R, Au WC, Mattagajasingh S, *et al.* Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered by the maternal circulation. *JAMA.* 2004; 291(9): 1114-9.
50. Chinnapagarini SK, Holzgreve W, Lepaire O, *et al.* Treatment of maternal blood samples with formaldehyde does not alter the proportion of circulatory fetal nucleic acids (DNA and mRNA) in maternal plasma. *Clin Chem.* 2005; 51: 652-5.
51. Chung GT, Chiu RW, Chan KC, *et al.* Lack of dramatic enrichment of fetal DNA in maternal plasma by formaldehyde treatment. *Clin Chem.* 2005; 51(3): 655-8.

52. Poon LL, Leung TN, Lau TK, *et al.* Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2002; 48(1): 35-41.
53. Chu T, Burke B, Bunce K, *et al.* A microarray-based approach for the identification of epigenetic biomarkers for the noninvasive diagnosis of fetal disease. *Prenat Diagn.* 2009;29(11):1020-30.
54. Papageorgiou EA, Fiegler H, Rakyan V, *et al.* Sites of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood: molecular markers for noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am J Pathol.* 2009; 174: 1609-18.
55. Old RW, Crea F, Puszyk W & Hulten MA. Candidate epigenetic markers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome. *Reprod Biomed Online.* 2007; 15: 227-35.
56. Tsui DW, Lam YM, Lee WS, *et al.* Systematic identification of placental epigenetic signatures for the noninvasive prenatal detection of Edwards syndrome. *PLoS One.* 2010;5(11):e15069.
57. Papageorgiou EA, Karagrigoriou A, Tsaliki E, *et al.* Fetal specific DNA methylation ratio permits non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat Med.* 2011; 17(4): 510-3.
58. Fucharoen G, Tungwiwat W, Ratanasiri T, *et al.* Prenatal detection of fetal hemoglobin E gene from maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2003; 23: 393-6.
59. Gonzalez-Gonzalez MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, *et al.* Prenatal diagnosis of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2002; 22:946-8.
60. Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, *et al.* Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet.* 2000; 356(9236): 1170.
61. Papasavva T, Kalakoutis G, Kalikas I, *et al.* Noninvasive prenatal diagnostic assay for the detection of beta-thalassemia. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1075: 148-53.
62. Papasavva T, Kalikas I, Kyrri A, *et al.* Arrayed primer extension for the noninvasive prenatal diagnosis of beta-thalassemia based on detection of single nucleotide polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1137: 302-8.

63. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, *et al.* Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet.* 2002; 110: 75-9.
64. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, *et al.* Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med.* 1998; 339(24): 1734-8.
65. Daniels G, Finning K, Martin P, *et al.* Fetal blood group genotyping: present and future. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1075: 88-95.
66. Hahn S, Lapaire O, Tercanli S, *et al.* Determination of fetal chromosome aberrations from fetal DNA in maternal blood: has the challenge finally been met? *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e16.
67. Lo YM, Tsui NB, Chui RW, *et al.* Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med.* 2007; 13: 218-23.
68. Tsui NB, Akolekar R, Chiu RW, *et al.* Synergy of total PLAC4 RNA concentration and measurement of the RNA single-nucleotide polymorphism allelic ratio for the noninvasive prenatal detection of trisomy 21. *Clin Chem.* 2010; 56(1):73-81.
69. Kolialexi A, Tsangaris GT, Papantoniou N, *et al.* Application of proteomics for the identification of differentially expressed protein markers for Down syndrome in maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2008; 28: 691-8.
70. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002; 16:6-21.
71. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature.* 1986; 321: 209-13.
72. Bird AP. The relationship of DNA methylation to cancer. *Cancer Serv* 1996; 28:87-101.
73. Wagner RD. DIAGNOSTIC CYTOGENETICS. 1999. SPRINGER LAB Manual.
74. Rooney DE, Czepulkowski BH. 1986. HUMAN CYTOGENETICS a practical approach. IRL Press.
75. Verma RS, Babu A. HUMAN CHROMOSOMES, Manual of basic techniques. 1989. PERGAMON press.

76. Professional Guidelines for Clinical Cytogenetics. General best practice Guidelines (2007) v1.01. Association for Clinical Cytogenetics (ACC).
77. Vora NL, Johnson KL, Peter I, *et al.* Circulating cell-free DNA levels increase variably following chorionic villus sampling. *Prenat Diagn.* 2010; 30(4):325-8.
78. Samura O, Miهارu N, Hyodo M, *et al.* Cell-free fetal DNA in maternal circulation after amniocentesis. *Clin Chem.* 2003;49(7):1193-5.
79. Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD. DNA methylation in development and human disease. *Mutat Res.* 2008. 1;647(1-2):30-8.
80. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer.* 2011. 23;11(10):726-34.
81. Rawson JB, Bapat B. Epigenetic biomarkers in colorectal cancer diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2012 ;12(5):499-509.
82. Papageorgiou EA, Patsalis PC. Non-invasive prenatal diagnosis of aneuploidies: new technologies and clinical applications. *Genome Med.* 2012. 28;4(5):46.
83. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, *et al.* "Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing," *Obstet Gynecol.* 2012;119(5):890-901.
84. Nicolaidis KH, Syngelaki A, Ashoor G, *et al.* "Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population" *Am J Obstet Gynecol.* 2012 ;207(5):374.e1-6.
85. Nicolaidis KH, Syngelaki A, Gil M, *et al.* Validation of targeted sequencing of single nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn.* 2013;33(6):575-9.
86. Ehrich M, Deciu C, Zwielfhofer T, *et al.* Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol.* 2011 ;204(3):205.e1-11.
87. M. Savage, "Merging into clinical practice: updates in noninvasive prenatal testing," in Proceedings of the 31st NSGC Annual Education Conference, Boston, Mass, USA, 2012.

88. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, *et al.* Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 23;105(51):20458-63.
89. Verinata Health, “Analytical Validation of the Verifi Prenatal Test: Enhanced Test Performance for Detecting Trisomies 21, 18 and 13 and the Option for Classification of Sex Chromosome Status,” Redwood City, Calif, USA, 2012.
90. Zhang H, Gao Y, Jiang F, *et al.* Noninvasive Prenatal Testing for Trisomy 21, 18 and 13 - Clinical Experience from 146,958 Pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jan 19. doi: 10.1002/uog.14792. [Epub ahead of print]
91. Hui L, Bethune M, Weeks A, *et al.* Repeated failed non-invasive prenatal testing owing to low cell-free fetal DNA fraction and increased variance in a woman with severe autoimmune disease. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;44(2):242-3.
92. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, *et al.* Circulating cell free DNA testing: are some test failures informative? *Prenat Diagn.* 2014. doi: 10.1002/pd.4541. [Epub ahead of print]
93. Barrett AN, Thadani HA, Laureano-Asibal C, *et al.* Stability of cell-free DNA from maternal plasma isolated following a single centrifugation step. *Prenat Diagn.* 2014. 34(13):1283-8.
94. Ordoñez E, Rueda L, Cañadas MP, *et al.* Evaluation of sample stability and automated DNA extraction for fetal sex determination using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Biomed Res Int.* 2013;2013:195363.
95. Clausen FB, Jakobsen TR, Rieneck K, *et al.* Pre-analytical conditions in non-invasive prenatal testing of cell-free fetal RHD. *PLoS One.* 2013;8(10):e76990.
96. Wong D, Moturi S, Angkachatchai V, *et al.* Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing. *Clin Biochem.* 2013;46(12):1099-104.
97. Hidestrand M, Stokowski R, Song K, *et al.* Influence of temperature during transportation on cell-free DNA analysis. *Fetal Diagn Ther.* 2012;31(2):122-8.

98. Irena Hudecova, Daljit Sahota, Macy M. S. Heung, *et al.* Maternal Plasma Fetal DNA Fractions in Pregnancies with Low and High Risks for Fetal Chromosomal Aneuploidies. *PLoS One*. 2014; 9(2): e88484.
99. Schlütter JM, Hatt L, Bach C, *et al.* The cell-free fetal DNA fraction in maternal blood decreases after physical activity. *Prenat Diagn*. 2014;34(4):341-4.
100. Brar H, Wang E, Struble C, *et al.* The fetal fraction of cell-free DNA in maternal plasma is not affected by a priori risk of fetal trisomy. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013. 26(2):143-5.
101. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, *et al.* Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013.41(1):26-32.
102. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, *et al.* The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn*. 2013. 33(7):667-74.
103. Tsaliki E, Papageorgiou EA, Spyrou C, *et al.* MeDIP real-time qPCR of maternal peripheral blood reliably identifies trisomy 21. *Prenat Diagn*. 2012;32(10):996-1001.
104. Ioannides M, Papageorgiou EA, Keravnou A, *et al.* Inter-individual methylation variability in differentially methylated regions between maternal whole blood and first trimester CVS. *Mol Cytogenet*. 2014.1;7(1):73.
105. Kyriakou S, Kypri E, Spyrou C, *et al.* Variability of cfDNA in maternal plasma does not prevent correct classification of trisomy 21 using MeDIP-qPCR methodology. *Prenat Diagn*. 2013. 33(7):650-5.
106. Quezada MS, Gil MM, Francisco C, *et al.* Screening for trisomies 21, 18 and 13 by cell-free DNA analysis of maternal blood at 10-11 weeks' gestation and the combined test at 11-13 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015. 45(1):36-41.
107. Wright D, Wright A, Nicolaidis KH. A unified approach to risk assessment for fetal aneuploidies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015; 45(1):48-54.
108. <https://www.eshg.org/fileadmin/eshg/documents/consultations/NIPT-ChallengeOfresponsibleInnovationInPrenatalScreeningDraftOctober2014.docx>. Latest access: Dec 30th 2014.

109. Rabinowitz M, Savage M, Pettersen B, *et al.* Noninvasive Cell-Free DNA-Based Prenatal Detection of Microdeletions Using Single Nucleotide Polymorphism-Targeted Sequencing. *Obstet Gynecol.* 2014. 123 Suppl 1:167S.
110. Benn P, Cuckle H. Theoretical performance of non-invasive prenatal testing for chromosome imbalances using counting of cell-free DNA fragments in maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2014. 34(8):778-83.
111. Papageorgiou EA, Koumbaris G, Kypri E, *et al.* The Epigenome View: An Effort towards Non-Invasive Prenatal Diagnosis. *Genes (Basel).* 2014 9;5(2):310-29.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

ΠΡΟΤΥΠΩΜΕΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗ

1. Απομόνωση DNA από δείγμα χοριονικών λαχνών (QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN))

Αντιδραστήρια και συσκευές που δεν παρέχονται από τον κατασκευαστή.

1. 0.9 % NaCl
2. Kit απομόνωσης DNA –
3. Αιθανόλη 100%
4. Υδατόλουτρο ή heat block στους 56°C
5. Σωληνάρια τύπου erpendorf 1.5 mL
6. Μικροπιπέτες 1-1000 και 1-100 µL
7. 1-1000 µL, 1-100 µL filter tips
8. Πλαστικές πιπέτες Pauster
9. Φυγόκεντρος
10. Μικροφυγόκεντρος

Διαδικασία

1. Μεταφορά του ιστού σε στείρο σωληνάριο 1.5 mL τύπου erpendorf.
2. Προσθήκη 1 mL 0,9% NaCl (ή έως πλήρωσης του erpendorf).
3. Φυγοκέντρηση για 5 min/14.000 rpm. Αφαίρεση του υπερκειμένου.
4. Επανάληψη βημάτων 2-3.
5. Απόρριψη υπερκειμένου και προσθήκη 180µL ATL buffer και 25µL Proteinase K. Μηχανική ανάδευση (vortex).
6. Επώαση για 20-40 min σε 56°C ανάλογα με την ποσότητα του ιστού.
7. Προσθήκη 200µL AL buffer, ακολουθεί μηχανική ανάδευση (vortex) και επώαση για 5min στους 70° C.
8. Προσθήκη 210 µL 100% αιθανόλη και μηχανική ανάδευση (vortex).
9. Μεταφορά του μείγματος σε κολόνα απομόνωσης και φυγοκέντρηση για 1min/12.500 rpm.
10. Απόρριψη του διηθήματος και μεταφορά σε νέο σωληνάριο συλλογής εκλούσματος.

11. Προσθήκη 500μL ρυθμιστικού διαλύματος AW1. Φυγοκέντρηση για 1min 12.500 rpm.
12. Απόρριψη του διηθήματος και μεταφορά σε νέο σωληνάριο συλλογής εκλούσματος.
13. Προσθήκη 500μL ρυθμιστικού διαλύματος AW2. Φυγοκέντρηση για 3 min/14.000 rpm.
14. Μεταφορά της κολόνας απομόνωσης σε στείρο σωληνάριο τύπου erpendorf 1,5 mL όπου αναγράφονται τα στοιχεία του ασθενούς, ο κωδικός εργαστηρίου και οποιαδήποτε άλλη πληροφορία είναι απαραίτητη.
15. Έκλουση με 50-100 μL ddH₂O και επώαση για 1-2 min σε θερμοκρασία δωματίου. (Ο όγκος έκλουσης μπορεί να μεταβληθεί ανάλογα με την ποσότητα του αρχικού υλικού που απομονώθηκε.)
16. Φυγοκέντρηση για 1min/12.000 rpm.

2. Απομόνωση ελεύθερου DNA από πλάσμα αίματος

Αντιδραστήρια και συσκευές που δεν παρέχονται από τον κατασκευαστή.

1. Ρυθμιζόμενες πιπέτες.
2. Στείρα βαμβακοφόρα ρύγχη (filter tips).
3. Υδατόλουτρο ή θερμαινόμενη πλάκα με υποδοχές για σωληνάρια 50mL στους 60°C.
4. Θερμαινόμενη πλάκα με υποδοχές σωληναρίων 2mL στους 56°C.
5. Μικροφυγόκεντρος.
6. Σωλήνες φυγοκέντρου 50mL.
7. QIAVAC 24 Plus vacuum manifold (cat. No. 19413).
8. QIAVAC Connecting System (cat.no. 19419) ή ανάλογο.
9. Αντλία κενού με δυνατότητα δημιουργίας κενού -800 έως -900mbar.
10. Αιθανόλη 96-100%.
11. Ισοπροπανόλη 100%.
12. Θρυμματισμένος πάγος.

Διαδικασία

1. Προσθέστε 400μL QIAGEN Proteinase K σε σωλήνες φυγοκέντρου 50mL.
2. Προσθέστε 4mL πλάσματος στο σωλήνα.

3. Προσθέστε 3.2mL ρυθμιστικού διαλύματος ACL (περιέχει 1.0μg carrier RNA). Αναμίξτε με παλμική ανάδευση (pulse-vortexing) για 30 sec.
4. Επώαση στους 60°C για 30 min.
5. Προσθέστε 7.2mL ρυθμιστικού διαλύματος ACB στο διάλυμα λυμένων κυττάρων. Αναμίξτε καλά με pulse-vortexing για 15-30 sec.
6. Επώαση για 5 min σε πάγο.
7. Εισάγετε τη στήλη QIAamp Mini Column στο VacConnector στο QIAvac 24 Plus. Εισάγετε το 20mL tube extender στην ανοικτή στήλη. Κρατήστε το σωληνάριο συλλογής για το στάδιο dry spin (βήμα 12).
8. Μεταφέρετε προσεκτικά το μίγμα από το βήμα 6 στο tube extender. Ανοίξτε την αντλία κενού. Όταν όλα τα προϊόντα λύσης έχουν πλήρως περάσει από τη στήλη, κλείστε την αντλία κενού και ελευθερώστε την πίεση στα 0mbar. Αφαιρέστε προσεκτικά το tube extender και απορρίψτε το.
9. Προσθέστε 600μL ρυθμιστικού διαλύματος ACW1 στη στήλη. Αφήστε το καπάκι ανοικτό και ανοίξτε την αντλία κενού. Αφού περάσει όλο το ρυθμιστικό διάλυμα ACW1, κλείστε την αντλία κενού και ελευθερώστε την πίεση στα 0mbar.
10. Προσθέστε 750μL ρυθμιστικού διαλύματος ACW2 στη στήλη και ακολουθήστε τη διαδικασία που περιγράφεται στο βήμα 9.
11. Προσθέστε 750μL αιθανόλης (96-100%) στη στήλη και ακολουθήστε τη διαδικασία που περιγράφεται στο βήμα 9.
12. Κλείστε το καπάκι της στήλης και τοποθετήστε την σε καθαρό σωλήνα συλλογής 2mL και φυγοκεντρήστε (20,000×g;14,000rpm) για 3 min.
13. Τοποθετήστε τη στήλη σε νέο σωλήνα συλλογής 2mL. Ανοίξτε το καπάκι και επώαση στους 56°C για 10min για να στεγνώσει πλήρως η μεμβράνη.
14. Τοποθετήστε τη στήλη σε καθαρό σωλήνα έκλυσης 1.5mL και απορρίψτε το σωλήνα συλλογής από το προηγούμενο βήμα. Προσθέστε προσεκτικά 20-150μL ρυθμιστικού διαλύματος AVE στο κέντρο της μεμβράνης. Κλείστε το καπάκι και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 min.
15. Φυγοκεντρήστε σε μικροφυγόκεντρο (20,000×g;14,000rpm) για 1 min για να εκλουσθεί το DNA.

3. Πρωτόκολλο καθαρισμού QIAquick PCR purification kit

Αυτό το πρωτόκολλο έχει σχεδιαστεί για τον καθαρισμό κλασμάτων μονόκλωνου ή δίκλωνου DNA από αντιδράσεις PCR ή άλλες ενζυμικές αντιδράσεις. Για τον καθαρισμό από άλλες ενζυμικές αντιδράσεις, ακολουθήστε το πρωτόκολλο όπως περιγράφεται για δείγματα από PCR ή χρησιμοποιείτε το MinElute Reaction Cleanup Kit. Κλάσματα που κυμαίνονται από 100 bp έως 10 Kb καθαρίζονται από εκκινητές, νουκλεοτίδια, πολυμεράσες και άλατα με τη χρήση QIAquick κολώνων περιστροφής σε μικροφυγόκεντρο.

Σημείωση: Προσθέστε αιθανόλη (96-100%) στο ρυθμιστικό διάλυμα PE πριν τη χρήση (δείτε την ετικέτα του μπουκαλιού για τον όγκο). Όλα τα βήματα φυγοκέντρωσης είναι σε $\geq 100,000 \times g$ (~13,000 rpm) σε συμβατική επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο.

1. Προσθέστε 5 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος PB για κάθε 1 όγκο PCR δείγματος και αναμίξτε. Δεν είναι απαραίτητο να απομακρύνετε το έλαιο. Για παράδειγμα, προσθέστε 500 μ l ρυθμιστικού διαλύματος PB σε 100 μ l PCR δείγματος (μη συμπεριλαμβανομένου του ελαίου).
2. Τοποθετήστε μια QIAquick κολώνα περιστροφής σε έναν παρεχόμενο σωλήνα συλλογής των 2 ml.
3. Για να προσδεθεί το DNA, επιθέστε το δείγμα στην QIAquick κολώνα και φυγοκεντρήστε για 30-60 δευτερόλεπτα.
4. Απορρίψτε το διήθημα. Τοποθετήστε την QIAquick κολώνα πίσω στον ίδιο σωλήνα.
5. Για το πλύσιμο, προσθέστε 750 μ l ρυθμιστικού διαλύματος PE στην QIAquick κολώνα και φυγοκεντρήστε για 30-60 δευτερόλεπτα.
6. Απορρίψτε το διήθημα και τοποθετήστε την QIAquick κολώνα πίσω στον ίδιο σωλήνα. Φυγοκεντρήστε την κολώνα για 1 επιπρόσθετο λεπτό σε μέγιστη ταχύτητα.
7. ΣΗΝΑΝΤΙΚΟ: Τα υπολείμματα αιθανόλης από το ρυθμιστικό διάλυμα PE δεν θα απομακρυνθούν πλήρως εκτός και αν απορριφθεί το διήθημα πριν από αυτή την επιπρόσθετη φυγοκέντρωση.
8. Τοποθετήστε την QIAquick κολώνα σε ένα καθαρό σωληνάριο μικροφυγοκέντρου του 1.5 ml.

9. Για να εκλούσετε το DNA, προσθέστε 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος EB (10 mM Tris-Cl pH 8.5) ή H₂O στο κέντρο της QIAquick μεμβράνης και φυγοκεντρήστε την κολώνα για 1 λεπτό. Εναλλακτικά, για αυξημένη συγκέντρωση DNA, προσθέστε 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης στο κέντρο της QIAquick μεμβράνης, αφήστε την κολώνα ακίνητη για 1 λεπτό και μετά φυγοκεντρήστε.
10. ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ: Βεβαιωθείτε ότι το διάλυμα έκλουσης τοποθετήθηκε απευθείας στην QIAquick μεμβράνη για πλήρη έκλουση του προσδεδεμένου DNA. Ο μέσος όγκος έκλουσης είναι 48 μl από 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος και 28 μl από 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης. Η απόδοση της έκλουσης εξαρτάται από το pH. Η μέγιστη απόδοση έκλουσης επιτυγχάνεται μεταξύ pH 7.0 και 8.5. Όταν χρησιμοποιείτε νερό, βεβαιωθείτε ότι η τιμή pH είναι εντός αυτού του εύρους και αποθηκεύστε το DNA στους -20°C αφού το DNA μπορεί να υποβαθμιστεί εξαιτίας της απουσίας ρυθμιστικού παράγοντα. Το καθαρισμένο DNA μπορεί να επίσης να εκλουσθεί σε TE (10 mM Tris Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), αλλά το EDTA μπορεί να παρεμποδίσει ακολουθούμενες ενζυμικές αντιδράσεις.