

ALAN TAYLOR

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS
50 EAST LAKE STREET, CHICAGO, ILL. 60607
LONDON: ROUTLEDGE AND KEGAN PAUL
27, AVONDALE DRIVE, WESTPORT, N.Y. 10996



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

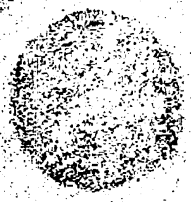


026000199877

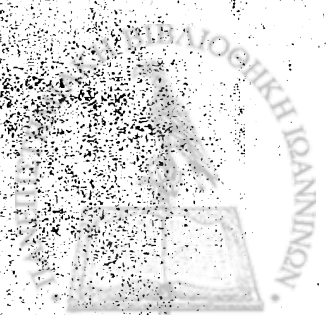


A

502



REPUBLIC OF INDONESIA
MINISTRY OF EDUCATION AND CULTURE
GENERAL DIRECTORATE OF HIGHER EDUCATION
STATE UNIVERSITY OF PADJARAN
JOURNAL OF PEDAGOGICAL RESEARCH
Volume 1, No. 1, 2008
Penerbit: Universitas Padjadjaran
Cirebon, Jawa Barat





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ & ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Ευάγγελος Παρασκευαΐδης, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

**ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΚΑΙ ΠΑΤΡΙΚΗ ΣΥΝΕΙΣΦΟΡΑ ΣΤΟ
ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΕΜΒΡΥΪΚΟ DNA ΣΤΗ ΜΗΤΡΙΚΗ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ
ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΥΗΣΗ**

ΛΕΑΝΔΡΟΣ Α. ΔΑΖΑΡΟΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2006



Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καθηγητής

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καθηγητής

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

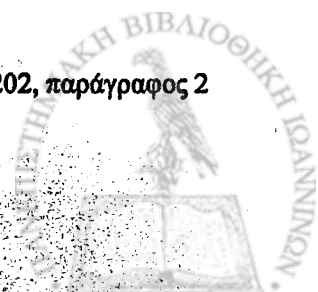
Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα».

N. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2



ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Επαμεινώνδας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας

Αίτηση εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής: 18-03-2003

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Συνεδρίαση αριθμ. 502α/13-05-2003

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων Καθηγητής

Ιωάννης Γεωργίου, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με γνώσεις Κλινικής Γενετικής

Μέλη

Θεόδωρος Στέφος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Βασίλειος Ντούσιας, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Ορισμός θέματος: 26-05-2003

Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: Συνεδρίαση αριθμ. 592α/24-10-2006

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ευάγγελος Παρασκευαΐδης, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, μέλος

Κωνσταντίνος Μπουραντάς, Καθηγητής Παθολογίας Αιματολογίας, μέλος

Άγγελος Καππός, Καθηγητής Χειρουργικής, μέλος

Ιωάννης Γεωργίου, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας, επιβλέπων

Θεόδωρος Στέφος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, μέλος

Βασίλειος Ντούσιας, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ογκολογία, μέλος

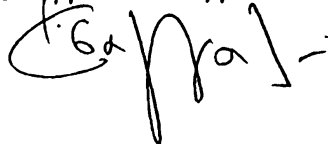
Γεώργιος Μακρυδήμας, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, μέλος

Κατάθεση Διδακτορικής Διατριβής: 8-11-2006

Βαθμός Διδακτορικής Διατριβής: «ΑΡΙΣΤΑ»

ΓΡΑΜΜΑΤΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Ευαγγελία Τσαγγαλά



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η προγεννητική διάγνωση των μονογονιδιακών νοσημάτων βασίζεται σε επεμβατικές μεθόδους όπως η αμνιοπαρακέντηση και η λήψη χοριακών λαχνών, οι οποίες όμως, παρουσιάζουν μικρό αλλά αξιοσημείωτο κίνδυνο για την υγεία του εμβρύου. Η ανίχνευση λειτουργικών εμβρυϊκών κυττάρων και ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία κατά τη διάρκεια της κύησης, έδωσε τη δυνατότητα για μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση των νοσημάτων αυτών.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια προσπάθεια μη επεμβατικής προγεννητικής ανίχνευσης των μεταλλάξεων, πατρικής προέλευσης, που προκαλούν β-αιμοσφαιρινοπάθειες, καθώς και του εμβρυϊκού φύλου με την ανάλυση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε άτομα που προσήλθαν στην Γυναικολογική και Μαιευτική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και η γενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής της Ανθρώπινης Αναπαραγωγής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή συμβουλευτική επιτροπή και συγκεκριμένα τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής Ιωάννη Γεωργίου, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας Θεόδωρο Στέφο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας Βασίλειο Ντούσια για τις ουσιαστικές υποδείξεις και τις χρήσιμες συμβουλές τους σε όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της διδακτορικής διατριβής.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής Ιωάννη Γεωργίου, που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του.



Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ευάγγελο Παρασκευαΐδη, στον Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας Θεόδωρο Στέφο και στον Επίκουρο Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας Γεώργιο Μακρυδήμα για την πολύτιμη συμβολή τους στην συλλογή των δειγμάτων.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τις βιολόγους του Εργαστηρίου Γενετικής, Ελισάβετ Χατζή, Ιωάννα Μπούμπα και Ανθούλα Χατζηκυριακίδου, καθώς και την ιατρό Νεκταρία Ξήτα για την πρόθυμη βοήθεια και τις χρήσιμες συμβουλές τους. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τις παρασκευάστριες του Εργαστηρίου Γενετικής, Αλεξάνδρα Μπέλλου και Χρυσάνθη Κώστα για την πολύτιμη βοήθειά τους στο χώρο του εργαστηρίου.

Τέλος, ιδιαίτερα ευχαριστώ την οικογένειά μου, που πέρα από την οικονομική τους υποστήριξη, στάθηκαν δίπλα μου με πολλή υπομονή, μοιράστηκαν τις αγωνίες και τις αμφιβολίες μου και μου έδωσαν την ενθάρρυνση που χρειαζόμουν.



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

σελ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

| | |
|--|----|
| 1. Ελεύθερο εμβρυϊκό DNA..... | 3 |
| 1.1. Εισαγωγή..... | 3 |
| 1.2. Ελεύθερο εμβρυϊκό DNA στο μητρικό πλάσμα και ορό..... | 4 |
| 1.3. Προσωρινές αλλαγές στο ελεύθερο DNA..... | 6 |
| 1.3.1. Συνολικό DNA..... | 6 |
| 1.3.2. Εμβρυϊκό DNA..... | 6 |
| 1.4. Προέλευση του εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία..... | 7 |
| 1.4.1. Αιμοποιητικά κύτταρα..... | 7 |
| 1.4.2. Πλακούντας..... | 9 |
| 1.4.3. Απευθείας μεταφορά μορίων DNA..... | 10 |
| 1.5. Κλινικές εφαρμογές..... | 10 |
| 1.5.1. Μη επεμβατική διάγνωση του φύλου του εμβρύου..... | 11 |
| 1.5.2. Μη επεμβατική διάγνωση των εμβρυϊκών ανευπλοειδιών..... | 12 |
| 1.5.3. Ανίχνευση κήσεων με κίνδυνο για προεκλαμψία..... | 13 |
| 1.5.4. Άλλες επιπλοκές της κήσης..... | 14 |
| 1.5.5. Μονογονιδιακές διαταραχές..... | 15 |
| 1.6. Εκκαθάριση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA από τη μητρική κυκλοφορία..... | 16 |
| 1.7. Ελεύθερο εμβρυϊκό RNA στη μητρική κυκλοφορία..... | 17 |



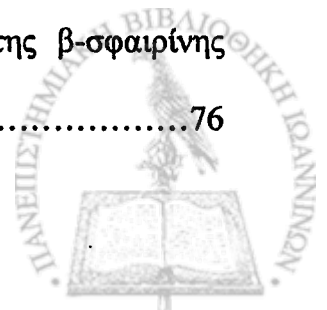
| | |
|---|----|
| 2. Γενετικοί πολυμορφισμοί..... | 19 |
| 2.1. Γενικά..... | 19 |
| 2.2. Οι πολυμορφισμοί ως γενετικοί δείκτες..... | 20 |
| 2.3. Κατηγορίες πολυμορφισμών..... | 21 |
| 2.4. Πολυμορφισμοί μεγέθους περιοριστικού τμήματος (RFLPs)..... | 22 |
| 2.5. Ανίχνευση ασθενειών με τη βοήθεια των RFLPs..... | 23 |
| 2.6. Τρόπος χρήσης των RFLPs..... | 25 |
| 3. Αιμοσφαιρίνες..... | 27 |
| 3.1. Γενικά..... | 27 |
| 3.2. Γονίδια των αιμοσφαιρινών..... | 30 |
| 3.3. Πολυμορφισμοί DNA στα γονίδια των σφαιρινών..... | 33 |
| 3.4. Διαταραχές της σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης-Μεσογειακές Αναιμίες..... | 34 |
| 3.5. Β-Μεσογειακή αναιμία..... | 35 |
| 3.5.1. Μεταλλάξεις μεταγραφής ή υποκινητών..... | 35 |
| 3.5.2. Μεταλλάξεις διάσπασης του RNA..... | 35 |
| 3.5.3. Ανερμηνεύσιμες και πλαισιοτροποποιητικές μεταλλάξεις..... | 36 |
| 3.5.4. Μεταλλάξεις επεξεργασίας RNA..... | 36 |
| 3.5.5. Ελλείψεις..... | 37 |
| 4. Χρωμόσωμα Υ..... | 39 |
| 4.1. Γενικά..... | 39 |
| 4.2. Χαρτογράφηση του χρωμοσώματος Υ..... | 40 |
| 4.3. Γονίδια και μεταγραφικές μονάδες..... | 41 |
| 4.4. Κατηγορίες αλληλουχιών στην ευχρωματινική περιοχή της MSY..... | 42 |
| 4.5. Ειδικές αλληλουχίες του χρωμοσώματος Υ..... | 43 |



Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

| | |
|---|----|
| 1. Σκοπός της μελέτης..... | 53 |
| 2. Υλικό της μελέτης..... | 54 |
| 3. Γενετικός έλεγχος..... | 55 |
| 3.1. Γενετικός έλεγχος πολυμορφισμών..... | 55 |
| 3.2. Γενετικός έλεγχος μεταλλάξεων..... | 56 |
| 3.3. Γενετική ανάλυση εμβρυϊκού DNA..... | 56 |
| 4. Χρησιμοποιούμενες τεχνικές..... | 57 |
| 4.1. Εξαγωγή DNA από περιφερικά λευκοκύτταρα..... | 57 |
| 4.2. Εξαγωγή εμβρυϊκού DNA από το μητρικό ορό..... | 59 |
| 4.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)..... | 60 |
| 4.4. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες..... | 63 |
| 4.5. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αгарόζης..... | 64 |
| 4.6. Ηλεκτροφόρηση σε κλίση πυκνότητας αποδιατακτικών παραγόντων..... | 65 |
| 4.6.1. Γενικά..... | 65 |
| 4.6.2. Η αρχή της μεθόδου DGGE..... | 66 |
| 4.6.3. Κατασκευή του πηκτώματος..... | 70 |
| 4.6.4. Η Ηλεκτροφόρηση..... | 71 |
| 4.6.5. Χρησιμοποιούμενα Διαλύματα..... | 72 |
| 4.7. Μέθοδος ARMS..... | 75 |
| 5. Γονοτυπικοί προσδιορισμοί..... | 76 |
| 5.1. Καθορισμός γονοτύπων των πολυμορφισμών του γονιδίου της β-σφαιρίνης..... | 76 |



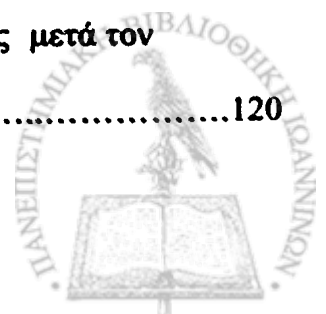
| | |
|---|----|
| 5.2. Καθορισμός γονοτύπων των μεταλλάξεων του γονιδίου της β-σφαιρίνης..... | 81 |
| 6. Μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση της μετάλλαξης IVSI-110 του γονιδίου της β-σφαιρίνης..... | 85 |
| 7. Μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση της παθολογικής αιμοσφαιρίνης Lepore..... | 86 |
| 8. Μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση αλληλουχιών του Y χρωμοσώματος..... | 88 |

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

| | |
|---|-----|
| 1. Μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί του γονιδίου της β-σφαιρίνης..... | 91 |
| 2. Μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση της μετάλλαξης IVSI-110 του γονιδίου της β-σφαιρίνης..... | 99 |
| 3. Μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση της αιμοσφαιρίνης Lepore..... | 100 |
| 4. Μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση του εμβρυϊκού φύλου..... | 102 |
| 5. Ανίχνευση του εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία 24 ώρες μετά τον τοκετό..... | 103 |

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

| | |
|---|-----|
| 1. Ανάλυση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών του γονιδίου της β-σφαιρίνης..... | 107 |
| 2. Μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση της μετάλλαξης IVSI-110 του γονιδίου της β-σφαιρίνης..... | 111 |
| 3. Μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση της παθολογικής αιμοσφαιρίνης Lepore..... | 114 |
| 4. Μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση του εμβρυϊκού φύλου..... | 117 |
| 5. Ανίχνευση του εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία 24 ώρες μετά τον τοκετό..... | 120 |



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....125

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....129

SUMMARY.....131

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....133



A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



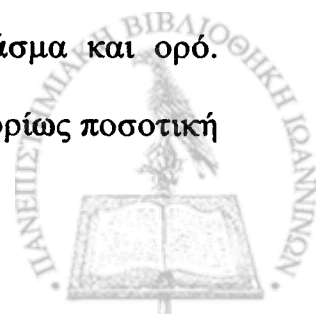
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΕΜΒΡΥΪΚΟ DNA

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε αντίθεση με την παραδοσιακή θεωρία ότι ο πλακούντας δημιουργεί ένα αδιαπέραστο φράγμα ανάμεσα στη μητέρα και το έμβρυο, πολλές μελέτες έδειξαν ότι τόσο εμβρυϊκά κύτταρα όσο και ελεύθερα εμβρυϊκά νουκλεϊκά οξέα κυκλοφορούν στο μητρικό αίμα. Επειδή οι τεχνικές επεμβατικής προγεννητικής διάγνωσης, όπως η λήψη χοριακών λαχνών (CVS) και η αμνιοπαρακέντηση, παρουσιάζουν αξιοσημείωτο ποσοστό κινδύνου για την υγεία της μητέρας και του εμβρύου, οι εναλλακτικές μη επεμβατικές μέθοδοι αποτελούν αντικείμενο έντονης μελέτης. Αρχικά επιτεύχθηκε η απόμόνωση λειτουργικών εμβρυϊκών κυττάρων από τη μητρική κυκλοφορία [1]. Με τη βοήθεια νέων και ευαίσθητων τεχνικών της μοριακής βιολογίας έγινε εφικτή η γενετική ανάλυση των εμβρυϊκών κυττάρων. Ο βασικός περιορισμός για την χρήση των τεχνικών αυτών σε κλινική βάση, είναι ο μικρός αριθμός εμβρυϊκών κυττάρων στη μητρική κυκλοφορία (περίπου ένα εμβρυϊκό κύτταρο ανά ml μητρικού αίματος) [2].

Μετά την ανακάλυψη μεγάλων ποσοτήτων ελεύθερου νεοπλασματικού DNA, στο πλάσμα και τον ορό καρκινοπαθών [3,4], η έρευνα για τη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση άλλαξε πορεία. Παραλληλίζοντας τη γρήγορη αύξηση του εμβρύου και του πλακούντα με τα νεοπλάσματα, οι Lo et. al. [5] δημοσίευσαν πρώτοι την παρουσία αλληλουχιών του Y χρωμοσώματος στο μητρικό πλάσμα και ορό. Ακολούθησαν αρκετές μελέτες, που στηρίχθηκαν στην τεχνική αυτή, κυρίως ποσοτική



αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Real-time PCR) για την προγεννητική ανάλυση και διάγνωση, επιπλοκών της εγκυμοσύνης και γενετικών ανωμαλιών. Η χρήση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA ως υλικού στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση μπορεί να εξασφαλίσει εύκολα γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα για ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Ο μόνος περιορισμός είναι η διαθεσιμότητα μιας ειδικής αλληλουχίας του εμβρυϊκού γονιδιώματος, για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του εμβρυϊκού DNA τόσο σε άρρενα, όσο και σε θήλεα έμβρυα. Αντίθετα, τα εμπύρηνια εμβρυϊκά κύτταρα απαιτούν ιδιαίτερα πολύπλοκες τεχνικές για την ανάλυσή τους, καθιστώντας ανέφικτη τη χρήση τους σε κλινική βάση.

1.2. ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΕΜΒΡΥΪΚΟ DNA ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ ΚΑΙ ΟΡΟ

Μετά την ανακάλυψη της παρουσίας ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία [5] κατά τη διάρκεια της κύησης, οι μελέτες στράφηκαν στην ποσοτικοποίηση του. Χρησιμοποιώντας την κατάλληλη τεχνική (quantitative real-time PCR) βρέθηκε ότι η μέση συγκέντρωση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA είναι αρκετά υψηλή (6,2% του συνολικού DNA του πλάσματος) [6]. Στην αρχή της κύησης η συγκέντρωση ήταν 0,014-0,54% (μέσος όρος 0,13%) στον ορό και 0,39-11.9% (μέσος όρος 3,4%) στο πλάσμα. Στο τέλος της κύησης η συγκέντρωση ήταν 0,032-3.97% (μέσος όρος 1%) στον ορό και 2,33-11.4% (μέσος όρος 6,2%) στο πλάσμα. Η απόλυτη συγκέντρωση εμβρυϊκού DNA ήταν παρόμοια στο μητρικό πλάσμα και ορό. Η μοναδική διαφορά που υπάρχει, είναι η παρουσία μεγαλύτερων ποσοτήτων μητρικού DNA στον ορό σε σύγκριση με το πλάσμα. Η συγκέντρωση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA αυξάνεται με την πρόοδο της κύησης, παρουσιάζοντας μια αξιοσημείωτη



αύξηση κατά τη διάρκεια των οκτώ τελευταίων εβδομάδων. Από την ανάλυση του αριθμού των αντιγράφων του SRY (μιας μοναδικής αλληλουχίας του Y χρωμοσώματος) βρέθηκε ότι η ποσότητα του εμβρυϊκού DNA που απομονώνεται από το πλάσμα είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή που προκύπτει από την λύση άθικτων εμβρυϊκών κυττάρων.

Οι Jimenez et. al. (2003) [7] δημοσίευσαν την ανίχνευση εμβρυϊκού DNA στο μητρικό ορό πιθήκων Rhesus. Η συγκέντρωση του εμβρυϊκού DNA σε συνάρτηση με την ηλικία κύησης και η μετά τον τοκετό εκκαθάριση του, παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες με το ανθρώπινο. Η διαθεσιμότητα αυτού του μοντέλου βοήθησε πολύ την έρευνα, σχετικά με την προέλευση, τη φύση και το μηχανισμό κυκλοφορίας του εμβρυϊκού DNA.

Τα βιολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά του εμβρυϊκού DNA δεν είναι πλήρως γνωστά. Το γεγονός του ότι η ευαισθησία των τεχνικών ανίχνευσης είναι αυξημένη όταν γίνεται προσπάθεια ενίσχυσης αμπλικονίων μικρότερου μεγέθους, αποτελεί έμμεση ένδειξη ότι το εμβρυϊκό DNA είναι στην πλειοψηφία του κατακερματισμένο σε τμήματα με μεγέθη μικρότερα από 450bp. Λόγω του ότι το εμβρυϊκό DNA δεν μεταβολίζεται άμεσα και ότι απομονώνεται τόσο εύκολα από το μητρικό πλάσμα και ορό, έχει αναφερθεί η προστασία του από τα αποπτωτικά σωματίδια και η προσκόλλησή του σε νουκλεοσωμάτια. Οι Halicka et. al. [8], δημοσίευσαν το ξεχωριστό πακετάρισμα του DNA και του RNA σε διαφορετικά αποπτωτικά σωματίδια κατά την απόπτωση. Αργότερα αποδείχθηκε η παρουσία αποπτωτικών σωματίων στο μητρικό πλάσμα και η δυνατότητα ανίχνευσης αλληλουχιών του Y χρωμοσώματος σε αυτά [9].



1.3. ΠΡΟΣΩΡΙΝΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΕΛΕΥΘΕΡΟ DNA

1.3.1. Συνολικό DNA

Η συγκέντρωση του συνολικού DNA στο πλάσμα υγιών ενηλίκων ατόμων κυμαίνεται από 10-100 ng ή 10^3 - 10^4 GEq/ml (10). Τα επίπεδα του συνολικού DNA του πλάσματος (μητρικού και εμβρυϊκού) είναι πολύ υψηλότερα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (11,12), όπως και στην περίπτωση καρκίνου (10,13). Η εξήγηση της αυξημένης συγκέντρωσης του συνολικού DNA, κατά τη διάρκεια της κύησης, είναι ακόμα άγνωστη. Το εμβρυϊκό DNA αποτελεί το 5-7% του συνολικού DNA. Η σταθερή παρουσία του εμβρυϊκού DNA κατά τη διάρκεια της κύησης προϋποθέτει την συνεχή τροφοδοσία της μητρικής κυκλοφορίας με αυτό. Αυτές οι αλλαγές στα επίπεδα του συνολικού DNA του πλάσματος κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορούν να βοηθήσουν την ανίχνευση ευπλοειδικών και ανώμαλων κύσεων.

1.3.2. Εμβρυϊκό DNA

Η ανίχνευση των χαμηλών συγκεντρώσεων των αλληλουχιών του εμβρυϊκού DNA (σε σύγκριση με τα επίπεδα των μητρικών) εξαρτάται από την ευαισθησία των τεχνικών αλλά και από την ποσότητα των ίδιων των αλληλουχιών. Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι η ηλικία κύησης συνδέεται θετικά με την ποσότητα του εμβρυϊκού DNA στο μητρικό πλάσμα ή ορό, παρουσιάζοντας παράλληλη αύξηση [11]. Οι Ariga et. al. (2001) [14] μελέτησαν ειδικές αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος σε ομάδα γυναικών που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα και ανέφεραν ότι οι συγκεντρώσεις τους αυξάνονταν από 10,1 αντίγραφα ανά 0.5ml (1^ο τρίμηνο) σε 130,5 αντίγραφα ανά



0.5ml (3^ο τρίμηνο). Οι Rijnders et. al. (2003) [15] μελέτησαν εγκύους γυναίκες μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση και ανίχνευσαν εμβρυϊκές αλληλουχίες την πέμπτη εβδομάδα της κύησης σε ποσοστό 50% και την ένατη εβδομάδα σε ποσοστό 100% των δειγμάτων.

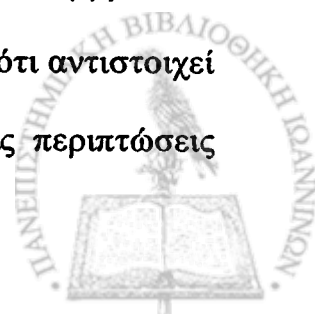
Κατά τη διάρκεια των 8 τελευταίων εβδομάδων της κύησης το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA παρουσιάζει μια απότομη αύξηση. Παρατηρείται μια μέση αύξηση του 29,3% κάθε εβδομάδα [16]. Αυτό οφείλεται στις σταδιακές αλλαγές του πλακούντα [17]. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στα διάφορα στάδια των φυσιολογικών κυήσεων, βοήθησε την ανίχνευση παθολογικών περιπτώσεων κύησης όπως η προεκλαμψία και ο πρόωρος τοκετός.

1.4. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΪΚΟΥ DNA ΣΤΗ ΜΗΤΡΙΚΗ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ

Έχουν εκφραστεί πολλές απόψεις σχετικά με την προέλευση του εμβρυϊκού DNA που κυκλοφορεί στο μητρικό αίμα. Οι τρεις επικρατέστερες απόψεις για την πηγή του είναι: τα εμβρυϊκά αιμοποιητικά κύτταρα, ο πλακούντας και η απευθείας μεταφορά μορίων DNA.

1.4.1. Αιμοποιητικά κύτταρα

Αρχικά τα εμβρυϊκά αιμοποιητικά κύτταρα θεωρήθηκαν μια πιθανή πηγή του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA, εξαιτίας της γνώσης ότι μια ποικιλία εμβρυϊκών κυτταρικών τύπων κυκλοφορεί στο μητρικό αίμα [1]. Βρέθηκε μάλιστα ότι αντιστοιχεί ένα εμπύρηνο εμβρυϊκό κύτταρο σε κάθε ml μητρικού αίματος, στις περιπτώσεις



φυσιολογικών κυήσεων [2]. Λόγω του ότι το DNA του πλάσματος θεωρείται δείκτης του κυτταρικού θανάτου [18], έγινε η υπόθεση ότι το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA μπορεί να ελευθερώνεται στη μητρική κυκλοφορία μετά από λύση εμβρυϊκών κυττάρων που εισήλθαν σε αυτή. Μετά από μία σειρά αναλύσεων [19], βρέθηκε ότι το 42,7 % των εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθροκυττάρων στη μητρική κυκλοφορία παρουσιάζουν απόπτωση λόγω της δράσης των ανοσοποιητικών μηχανισμών της μητέρας. Παρόλα αυτά, ένα μεγάλο μέρος υπολειμμάτων αποπτωτικών εμβρυϊκών κυττάρων παραμένει στο μητρικό πλάσμα [20]. Υπάρχει δηλαδή η άποψη ότι ένα μεγάλο μέρος εμβρυϊκών κυττάρων που διαπερνά τον πλακούντα δέχεται διαδοχικές αποπτωτικές αλλαγές, και ότι η λύση τους μπορεί να ευθύνεται για μέρος του εμβρυϊκού DNA που ανιχνεύεται στις εγκύους γυναίκες.

Παρόλα αυτά, τα λειτουργικά εμβρυϊκά κύτταρα που ανιχνεύονται στη μητρική κυκλοφορία είναι πολύ λίγα, δημιουργώντας ερωτηματικά για το πώς είναι υπεύθυνα για την παρουσία αλλά και τη διακύμανση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA. Η συγκέντρωση των εμβρυϊκών κυττάρων και νουκλεϊκών οξέων είναι αυξημένη σε περιπτώσεις επιπλοκών της εγκυμοσύνης, όπως η προεκλαμψία και η εμβρυϊκή ανευπλοειδία, φανερώνοντας ότι υπάρχει σχέση ανάμεσα στους δύο παράγοντες [21]. Από προσπάθειες για την καταμέτρηση των εμβρυϊκών κυττάρων και του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο μητρικό αίμα, με τη βοήθεια της *in situ* υβριδοποίησης ειδικών αλληλουχιών του Y και X χρωμοσώματος και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε ένα μόνο κύτταρο, δεν βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα τους στις φυσιολογικές κυήσεις και στις κυήσεις με κίνδυνο για προεκλαμψία ή πρόωρο τοκετό [22]. Ιδίως στην περίπτωση του πρόωρου τοκετού τα αυξημένα ποσοστά εμβρυϊκού DNA, δεν συνοδεύονταν από αύξηση των εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθροκυττάρων.



1.4.2. Πλακούντας

Ο πλακούντας είναι μια λογική πηγή για το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA εξαιτίας του μεγέθους του και την άφθονη κυτταρική δραστηριότητα. Πολλές μελέτες έχουν δείξει την σχέση που υπάρχει ανάμεσα στην ποσότητα του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία και την ηλικία της κύησης [6,23,24]. Σε περιπτώσεις εγκύων γυναικών, μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση, ανιχνεύθηκαν αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος 37 ημέρες μετά την εμβρυομεταφορά [25]. Η εμβρυοπλακουντική κυκλοφορία δεν υπάρχει πριν την 28^η με 30^η ημέρα της κύησης, αλλά από την 30^η ημέρα υπάρχουν ανιχνεύσιμες ποσότητες εμβρυϊκού DNA στο μητρικό αίμα. Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την άποψη ότι η πηγή του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA δεν είναι τα αιμοποιητικά, αλλά η τροφοβλάστη [21,22]. Η πιο άμεση απόδειξη είναι ότι ειδικά μόρια mRNA του πλακούντα ανιχνεύονται στη μητρική κυκλοφορία [26].

Για την επιβεβαίωση της προέλευσης του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία, οι Sekizawa et. al. [27] ανέλυσαν δείγματα αίματος από 15 γυναίκες που ελήφθησαν την στιγμή της Καισαρικής τομής καθώς και τα αντίστοιχα δείγματα αίματος από τον ομφάλιο λώρο των εμβρύων τους. Χρησιμοποιήθηκαν επτά διαφορετικοί δείκτες, υψηλής πολυμορφικότητας, στα χρωμοσώματα 13, 18 και 21 για το διαχωρισμό του εμβρυϊκού από το μητρικό DNA. Το 70% των δειγμάτων ήταν πληροφοριακό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέση συγκέντρωση του εμβρυϊκού DNA στο μητρικό πλάσμα ήταν 14.3% ενώ η μέση συγκέντρωση του μητρικού DNA στο πλάσμα των δειγμάτων ομφαλίου 0,9%. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν την άνιση μεταφορά DNA και την προέλευση του εμβρυϊκού DNA από την απόπτωση λαχνών της τροφοβλάστης.



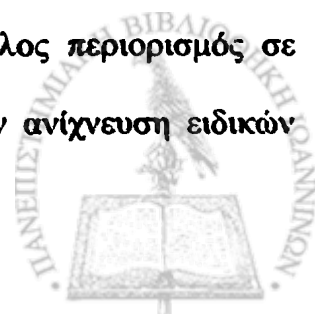
1.4.3. Απευθείας μεταφορά μορίων DNA

Αλληλουχίες του εμβρυϊκού DNA έχουν βρεθεί σε διάφορα μητρικά σωματικά υγρά κατά τη διάρκεια της κύησης, όπως το αμνιακό υγρό [28], τα μητρικά ούρα [29,30], το εγκεφαλονωτιαίο υγρό [31] και το μητρικό περιτοναϊκό υγρό [32]. Η συγκέντρωση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο αμνιακό υγρό είναι 200 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη στο πλάσμα. Το εύρημα αυτό οδηγεί στη διαπίστωση ότι μεγάλο μέρος του εμβρυϊκού DNA προέρχεται από την απευθείας μεταφορά μορίων του διαμέσου του πλακούντα ή των μεμβρανών.

Συνοψίζοντας, η πλειοψηφία του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία πιθανώς προέρχεται από τον πλακούντα, με μια επιπλέον συμβολή από τα αιμοποιητικά κύτταρα και ενδεχομένως από το ίδιο το έμβρυο μέσω απευθείας μεταφοράς.

1.5 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Η δυνατότητα μη επεμβατικής μέτρησης του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA, γρήγορα και εύκολα, οδήγησε στη δημιουργία νέων κλινικών εφαρμογών. Αυτές οι νέες εφαρμογές στηρίχθηκαν στην ποσοτικοποίηση αλληλουχιών του εμβρυϊκού DNA και την ανίχνευση (παρουσία ή απουσία) μοναδικών εμβρυϊκών αλληλουχιών [33]. Πολλές διαφορετικές επιπλοκές της εγκυμοσύνης συνδέονται με αυξημένα ποσά ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία. Ο μεγάλος περιορισμός σε αυτές τις μεθόδους ποσοτικοποίησης είναι ότι στηρίζονται στην ανίχνευση ειδικών



αλληλουχιών του Y χρωμοσώματος, αποκλείοντας με τον τρόπο αυτό τις εγκύους που κυοφορούν θήλεα έμβρυα. Τελευταία όμως, έχει γίνει μια προσπάθεια ανεύρεσης δεικτών που θα είναι χρήσιμοι και στις περιπτώσεις θηλέων εμβρύων. Οι δείκτες αυτοί περιλαμβάνουν: αυτοσωμικούς πολυμορφισμούς DNA [34], εμβρυϊκούς επιγενετικούς δείκτες [35] και μέτρηση mRNA αντιγράφων από γονίδια που εκφράζονται στον πλακούντα [36].

1.5.1. Μη επεμβατική διάγνωση του φύλου του εμβρύου

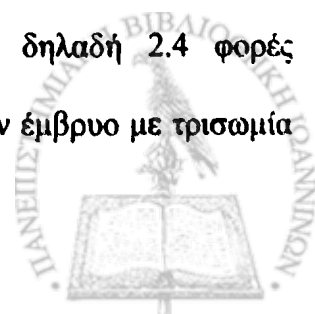
Δεδομένης της δυνατότητας ανίχνευσης άρρενος DNA στο μητρικό πλάσμα και ορό, μια σημαντική κλινική εφαρμογή είναι η μη επεμβατική ανίχνευση αρρένων εμβρύων με κίνδυνο για φυλοσύνδετα νοσήματα συνδεδεμένα με το X χρωμόσωμα (X-linked). Αρχικά οι Smid et. al. (1997) [37], παρουσίασαν μία μέθοδο ανίχνευσης αλληλουχιών του Y χρωμοσώματος με ευαισθησία 94% χρησιμοποιώντας έμβρυα με ηλικίες κύησης κυμαινόμενες από 7 έως 12 εβδομάδες. Αντίθετα, οι Lo et. al. (1998b) [11] χρησιμοποιώντας παρόμοιες ηλικίες κύησης (7^η-14^η εβδομάδα) πέτυχαν μια ευαισθησία της τάξης του 79%. Τέλος, οι Honda et. al. (2002) [38] χρησιμοποιώντας Real-Time PCR πέτυχαν ευαισθησία ανίχνευσης 95% σε πιο προχωρημένες όμως ηλικίες κύησης (10^η-17^η εβδομάδα της κύησης). Με τη βελτίωση των μεθόδων αυτών, θα γίνει δυνατή η μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση του φύλου του εμβρύου. Θα αποτελέσει με τον τρόπο αυτό ένα προ-έλεγχο για το αν θα χρειαστεί κάποια επεμβατική μέθοδος για κάποιο έμβρυο με κίνδυνο κληρονόμησης κάποιου X-συνδεδεμένου νοσήματος. Θα χρησιμοποιηθεί επίσης για τη διάκριση των εγκύων γυναικών που έχουν ανάγκη χορήγησης δεξαμεθαζόνης ως αγωγή για το έμβρυο που πάσχει από συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων [39,40].



1.5.2. Μη επεμβατική διάγνωση των εμβρυϊκών ανευπλοειδιών

Το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση των ανευπλοειδιών, βοηθώντας την ανίχνευση εμβρύων με αυξημένο κίνδυνο για τρισωμία 13 ή 21, στα οποία η χρήση επεμβατικών μεθόδων προγεννητικής διάγνωσης είναι απαραίτητη. Χρησιμοποιώντας αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση αλληλουχιών του Y χρωμοσώματος, αναφέρθηκε ότι στην περίπτωση της τρισωμίας 21 η συγκέντρωση του ελεύθερο εμβρυϊκό DNA στην μητρική κυκλοφορία είναι δύο με τρεις φορές υψηλότερη από ότι στην περίπτωση των φυσιολογικών αρρένων εμβρύων [41]. Οι Zhong et. al. (2000a) [42] ανέφεραν για διπλάσια συγκέντρωση του εμβρυϊκού DNA στην περίπτωση αυτής της τρισωμίας, ενώ οι Ohashi et. al. (2001) [43] δημοσίευσαν ότι δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή στην ποσότητα του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στις περιπτώσεις των τρισωμιών 18 και 21. Τα δείγματα όμως που χρησιμοποιήθηκαν στην τελευταία μελέτη ήταν πολύ λίγα, τρία και πέντε αντίστοιχα, επομένως δεν δόθηκε βάση σε αυτά. Αυτή η διαφοροποίηση που παρατηρείται στις διάφορες μελέτες οφείλεται στα διαφορετικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση.

Σε μία άλλη μελέτη, που πραγματοποιήθηκε αργότερα, βρέθηκε ότι όταν τα έμβρυα έπασχαν από τρισωμία 21 ο μέσος όρος του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA ήταν 41.2 GE/ml, ενώ όταν τα έμβρυα ήταν φυσιολογικά ο μέσος όρος ήταν 24.2 GE/ml [44]. Παρατηρήθηκε δηλαδή 1,7 φορές περισσότερο εμβρυϊκό DNA στον ορό των γυναικών που κυοφορούσαν έμβρυο με τρισωμία 21 σε σύγκριση με τον ορό των γυναικών με φυσιολογικά έμβρυα. Από την πειραματική μελέτη των τρισωμιών 13 και 18 βρέθηκε ότι ο μέσος όρος του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στον ορό της μητέρας ήταν 97.5 GE/ml και 31.5 GE/ml αντίστοιχα, ενώ για τα φυσιολογικά έμβρυα ήταν 40.3 GE/ml [45]. Παρατηρήθηκε δηλαδή 2.4 φορές περισσότερο εμβρυϊκό DNA στον ορό των γυναικών που κυοφορούσαν έμβρυο με τρισωμία

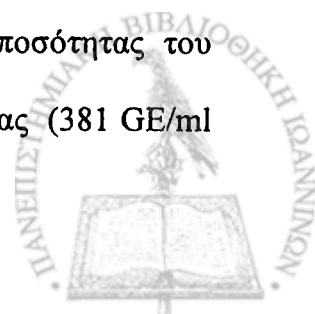


13 σε σύγκριση με τα φυσιολογικά επίπεδα. Αντίθετα στην περίπτωση της τρισωμίας 18 τα αποτελέσματα δεν παρουσίαζαν κάποια σημαντική διαφοροποίηση από τα φυσιολογικά.

Παρατηρείται, δηλαδή, αύξηση της ποσότητας του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στον ορό των γυναικών που κυοφορούν έμβρυα με τρισωμία 21 ή 13 σε σχέση με αυτών που φέρουν φυσιολογικά ή με τρισωμία 18 έμβρυα. Αυτή η αύξηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης για την μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση των δύο αυτών ανευπλοειδιών. Όπως προαναφέρθηκε, μία πηγή ελευθέρωσης εμβρυϊκού γενετικού υλικού στη μητρική κυκλοφορία είναι η απόπτωση του πλακούντα ή η αναδημιουργία αυτού με την ταυτόχρονη λύση της τροφοβλάστης. Έχει αναφερθεί ότι πιθανώς οι έγκυες γυναίκες που φέρουν ανευπλοειδικά έμβρυα παρουσιάζουν αυξημένο ποσοστό απόπτωσης του πλακούντα [46,47]. Για το λόγο αυτό μια πιθανή εξήγηση των αυξημένων επιπέδων ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στον ορό των γυναικών αυτών είναι ο παθολογικός τους πλακούντας που επιτρέπει την εύκολη διάχυση ή διαπερατότητα των νουκλεϊκών οξέων. Σε αυτούς τους ανευπλοειδικούς πλακούντες παρατηρείται αυξημένη αιμορραγία των τριχοειδών αγγείων, καθώς και παρουσία ανώριμων ή δύσμορφων τριχοειδών της τροφοβλάστης [48,49]. Στις τρισωμίες 13 και 21 οι πλακούντες είναι μεγαλύτεροι και με αυξημένο αριθμό δύσμορφων τριχοειδών, ενώ στη τρισωμία 18 είναι μικρότεροι με λιγότερα αγγεία [48]. Έτσι στην τρισωμία 18 η επιφάνεια απ' όπου γίνεται η εμβρυομητρική επικοινωνία ελαττώνεται, με αποτέλεσμα να έχουμε φυσιολογικά επίπεδα ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο μητρικό αίμα. Το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση των τρισωμιών 13 και 21.

1.5.3. Ανίχνευση κύησης με κίνδυνο για προεκλαμψία

Πολλές μελέτες έχουν αναφερθεί στην πενταπλάσια αύξηση της ποσότητας του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA σε εγκύους γυναίκες με συμπτώματα προεκλαμψίας (381 GE/ml



σε σύγκριση με τα 76 GE/ml των φυσιολογικών κύσεων) [50-54]. Τα επίπεδα του εμβρυϊκού DNA είναι επίσης αυξημένα σε εγκύους που θα παρουσιάσουν προεκλαμψία [53,55,56], καθιστώντας ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα την ποσοτικοποίηση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA ως δείκτη πρόβλεψης της προεκλαμψίας.

Η προεκλαμψία είναι μια πολυπαραγοντική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από υπέρταση και πρωτεϊνουρία. Αποτέλεσε, για μεγάλο διάστημα, την κυριότερη αιτία μητρικής θνησιμότητας. Παρόλο που υπάρχουν αξιόπιστα διαγνωστικά κριτήρια [57,58], η διάγνωση είναι εφικτή σε σχετικά μεγάλες ηλικίες κύησης. Στην προεκλαμψία, ο πλακούντας αποτυγχάνει να επέμβει και να αναδημιουργήσει το μητρικό περιβάλλον, μέσω των τροφοβλαστικών κυττάρων [59]. Η αποτυχία αναδημιουργίας των μητρικών σπειροειδών αρτηριών, περιορίζει τη ροή αίματος προς το έμβρυο προκαλώντας προεκλαμψία. Ανάμεσα στις πιθανές εξηγήσεις της αποτυχίας της τροφοβλάστης να λειτουργήσει σωστά είναι ο αυξημένος ρυθμός απόπτωσης. Εναλλακτικά, η κινητικότητα και η επεμβατικότητα των τροφοβλαστών μπορεί να μεταβληθεί. Σύμφωνα με τις τελευταίες μελέτες, η πιο πιθανή εξήγηση είναι η αυξημένη απόπτωση του πλακούντα, παρόλο που η βιολογική βάση του φαινομένου παραμένει ασαφής.

Οι Byrne et. al. (2003) [60] ανέφεραν ότι η συγκέντρωση του εμβρυϊκού DNA δεν συνδέεται με τη δριμύτητα της προεκλαμψίας, όταν πραγματοποιήθηκε ανάλυση του ολικού αίματος. Αυτό ενισχύει την άποψη ότι το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA στο πλάσμα των ασθενών αυτών οφείλεται στην υφιστάμενη απόπτωση του πλακούντα και των εμβρυϊκών κυττάρων και όχι στην κυκλοφορία των άθικτων εμβρυϊκών κυττάρων. Αυτά τα ευρήματα ενισχύουν την άποψη ότι δεν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στο ελεύθερο εμβρυϊκό DNA και τα άθικτα εμβρυϊκά κύτταρα [61,62].



1.5.4. Άλλες επιπλοκές της κύησης

Τα αυξημένα επίπεδα ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο μητρικό ορό μπορούν να αποτελέσουν επίσης δείκτη για τον πρόωρο τοκετό. Στις φυσιολογικές κύσεις, η συνεχής μέτρηση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο μητρικό πλάσμα και ορό έδειξε μια σταδιακή αύξηση με την πρόοδο της ηλικίας κύησης. Μετά την 32^η εβδομάδα της κύησης παρατηρείται μια ραγδαία αύξηση [6], που οφείλεται σε αλλαγές στην εμβryo-μητρική επιφάνεια [63]. Η αύξηση της συγκέντρωσης του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA ίσως αποτελεί προάγγελο ενός επικείμενου τοκετού. Οι Leung et. al. 1998 με την μελέτη τους αποδεικνύουν αυτή την υπόθεση. Μελετώντας γυναίκες με άρρενα έμβρυα, βρήκαν πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στις γυναίκες με πρόωρο τοκετό μεταξύ 26^{ης} και 35^{ης} εβδομάδας της κύησης.

Τα επίπεδα του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA είναι επίσης αυξημένα στο πλάσμα εγκύων γυναικών με διεισδυτικό πλακούντα [64], με υπερέμεση της εγκύου [65,66], με εμβryoμητρική αιμορραγία [67] και με πολυδράμνιον [68]. Αυτές οι κλινικές συσχετίσεις αποδεικνύουν ότι η πηγή του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA είναι ο πλακούντας.

1.5.5. Μονογονιδιακές διαταραχές

Μια άλλη κλινική εφαρμογή του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA είναι η μη επεμβατική διάγνωση του εμβρυϊκού παράγοντα Rhesus (RhD). Συγκεκριμένα, η ταυτοποίηση του παράγοντα Rh είναι ιδιαίτερα σημαντική σε κύσεις με μητέρα αρνητική για τον παράγοντα που μπορεί να κυοφορεί έμβryo θετικό για τον παράγοντα RhD [69,70]. Πολλές μελέτες που ακολούθησαν ασχολήθηκαν με την ευαισθησία ανίχνευσης του εμβρυϊκού γονοτύπου Rh με



τη χρήση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA [70-73]. Η ανάλυση αυτή, λόγω της υψηλής ευαισθησίας που παρουσιάζει, έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται σε κλινική βάση [74].

Η μυοτονική δυστροφία είναι μια επικρατής αυτοσωμική διαταραχή που συνδέεται με την επέκταση των επαναλήψεων του ασταθούς τρινουκλεοτιδίου CTG στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου της DM κινάσης. Σε μία μελέτη, αλληλόμορφα πατρικής προέλευσης ανιχνεύθηκαν στη μητρική κυκλοφορία [75]. Σε μία άλλη μελέτη, ένα έμβρυο με κοντά άκρα ήταν ύποπτο για αχονδροπλασία. Μετά την εξαγωγή ελεύθερου εμβρυϊκού DNA από το μητρικό πλάσμα αναλύθηκε ένα τμήμα του γονιδίου FGFR3. Εντοπίστηκε μια αντικατάσταση γουανίνης από αδενίνη στη θέση 1138, χρησιμοποιώντας ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα [76]. Έχει περιγραφεί ακόμα η μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση της κυστικής ίνωσης, της συγγενούς υπερπλασίας των επινεφριδίων και της νόσου του Huntington [77-80].

1.6. ΕΚΚΑΘΑΡΙΣΗ ΤΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΕΜΒΡΥΪΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΗ ΜΗΤΡΙΚΗ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ

Η εκκαθάριση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA από τη μητρική κυκλοφορία μελετήθηκε για πρώτη φορά από τους Lo et. al. (1999) [81]. Οι περισσότερες γυναίκες που μελετήθηκαν είχαν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα ελεύθερου εμβρυϊκού DNA δύο ώρες μετά τον τοκετό. Αργότερα οι Invernizzi et. al. [82], ανέφεραν ότι το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA μπορεί να παραμείνει μήνες ή και χρόνια μετά τον τοκετό, θέτοντας πάλι το ερώτημα αν το εμβρυϊκό DNA προέρχεται από τον πλακούντα. Ακολούθησαν μελέτες που στην πλειοψηφία τους ήταν αντίθετες με την άποψη αυτή [83-86]. Εκφράστηκε η άποψη ότι το DNA που ανιχνεύθηκε



προέρχεται από εμβρυϊκά αρχέγονα κύτταρα ή από λευκοκύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα της μητέρας για πολλά χρόνια μετά τον τοκετό [87,88].

1.7. ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΕΜΒΡΥΪΚΟ RNA ΣΤΗ ΜΗΤΡΙΚΗ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ

Ο κύριος περιορισμός στη χρήση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο μητρικό αίμα είναι το γεγονός ότι το έμβρυο και η μητέρα μοιράζονται μισές από τις γονιδιωματικές DNA αλληλουχίες. Είναι, δηλαδή, δυνατόν να ανιχνευθούν μόνο οι εμβρυϊκές αλληλουχίες πατρικής προέλευσης. Μετά τη δημοσίευση της παρουσίας RNA αλληλουχιών στο αίμα καρκινοπαθών, οι Roon et. al. [89] ανέφεραν ότι εμβρυϊκές ZFY mRNA αλληλουχίες μπορούν να ανιχνευθούν στο 22% των γυναικών στην αρχή της κύησης και στο 63% των γυναικών στο τέλος της κύησης. Αργότερα δημοσιεύθηκε ότι το mRNA είναι αξιοσημείωτα σταθερό στο περιφερειακό αίμα [90]. Η ανίχνευση ελεύθερου εμβρυϊκού mRNA στη μητρική κυκλοφορία ήταν απρόσμενη λόγω της γνωστής αστάθειας του και της παρουσίας ριβονουκλεασών στο πλάσμα. Οι Tsui et. al. [90] υποστήριξαν ότι το mRNA προστατεύεται στην κυκλοφορία λόγω της σχέσης του με σωματίδια και ότι εμβρυϊκές ή πλακουντικές mRNA αλληλουχίες μπορούν να ανιχνευθούν στο μητρικό πλάσμα ή ορό με τον κατάλληλο τρόπο επεξεργασίας. Αργότερα, ανιχνεύθηκαν αλληλουχίες από δύο ειδικά γονίδια του πλακούντα, της ανθρώπινης χοριονικής γοναδοτροπίνης και προλακτίνης [26]. Πρόσφατα χρησιμοποιήθηκε το ελεύθερο εμβρυϊκό RNA στην προγεννητική διάγνωση της προεκλαμψίας ανιχνεύοντας mRNA του γονιδίου της ορμόνης απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης (CRH). Η συγκέντρωση του CRH mRNA είναι ιδιαίτερα αυξημένη στο τρίτο τρίμηνο της κύησης σε εγκύους με κλινική διάγνωση προεκλαμψίας, σε σχέση με τις φυσιολογικές κυήσεις.



Η μέτρηση της έκφρασης συγκεκριμένων εμβρυϊκών γονιδίων με την ανάλυση του ελεύθερου εμβρυϊκού RNA θα μπορέσει στο μέλλον να χρησιμοποιηθεί σε κλινική βάση για την ανίχνευση παθολογικών καταστάσεων του πλακούντα.



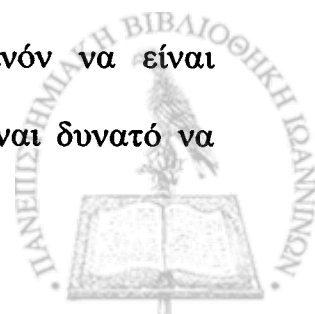
2. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ

2.1. ΓΕΝΙΚΑ

Πολλές γενετικές περιοχές χαρακτηρίζονται από τη παρουσία αλληλόμορφων γονιδίων, με αποτέλεσμα τα άτομα ενός πληθυσμού να εμφανίζουν διαφορετικούς φαινότυπους. Ο γενετικός πολυμορφισμός είναι η εμφάνιση πολλαπλών αλληλόμορφων σε μια γενετική θέση, στην οποία τα δύο αλληλόμορφα εμφανίζονται με συχνότητα μεγαλύτερη από 1%.

Πολυμορφικές γενετικές θέσεις είναι εκείνες στις οποίες τουλάχιστον το 2% του πληθυσμού παρουσιάζει ετερόζυγο γονότυπο. Παρόλα αυτά, επειδή πολλές πολυμορφικές θέσεις χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό αλληλόμορφων, η αναλογία ετεροζύγων σε πολλές περιπτώσεις είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή που αναφέρθηκε. Τα αλληλόμορφα με συχνότητα μικρότερη του 1% ονομάζονται σπάνια αλληλόμορφα. Στην τελευταία κατηγορία των σπάνιων αλληλόμορφων γονιδίων ανήκουν οι περισσότερες από τις επιβλαβείς μεταλλάξεις, που οδηγούν σε γενετικές νόσους.

Μέχρι σήμερα, έχει ελεγχθεί ηλεκτροφορητικά ένας μεγάλος αριθμός πολυμορφισμών σε γονίδια που ελέγχουν την παραγωγή ενζύμων και πρωτεϊνών του ανθρώπου. Από όλες τις γενετικές περιοχές που έχουν ελεγχθεί, περίπου το 1/3 εμφανίζει ανιχνεύσιμους πολυμορφισμούς. Το είδος καθώς και η συχνότητα των πολυμορφισμών παρουσιάζει, πολλές φορές, σημαντική διαφοροποίηση σε πληθυσμούς ατόμων διαφορετικών ή ακόμα και ίδιων φυλών. Η μεγάλη εξάπλωση των γενετικών πολυμορφισμών υποδηλώνει ότι κάθε άτομο πιθανόν να είναι ετερόζυγο για διάφορες γενετικές θέσεις. Επομένως, σ' ένα άτομο είναι δυνατό να



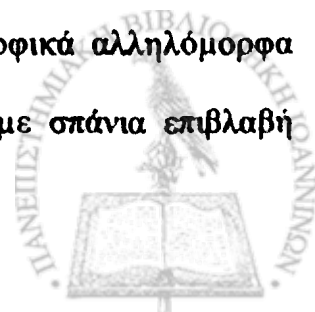
υπάρχουν πολλές γενετικές θέσεις στις οποίες υπάρχουν δυο διαφορετικά αλληλόμορφα, καθένα από τα οποία θα καθορίζει ένα διαφορετικό δομικό γονιδιακό προϊόν.

Από τη μελέτη διαφόρων πρωτεϊνών και ενζύμων έχει αναφερθεί ότι κάθε άτομο εμφανίζει σοβαρή πιθανότητα να είναι ετερόζυγο στο 6% περίπου των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή ένζυμα. Εάν ληφθούν υπόψη οι περιπτώσεις που αφορούν σιωπηρές μεταλλάξεις που δεν μπορούν να ανιχνευθούν ηλεκτροφορητικά, τότε υπολογίζεται ότι κάθε άτομο είναι πιθανόν ετερόζυγο σε ποσοστό 12% με 18% των γενετικών θέσεων του. Ο αριθμός αυτός ονομάζεται μέση ετεροζυγωτία.

Σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις, οι πολυμορφισμοί δεν συνδέονται άμεσα με μια συγκεκριμένη ασθένεια. Πολύ σπάνια ένας πολυμορφισμός επηρεάζει την έκφραση και σταθερότητα του γονιδίου του, ενώ η πλειοψηφία των πολυμορφισμών δεν έχει λειτουργική σημασία, αλλά δρουν συνεργικά με άλλους γενετικούς πολυμορφισμούς και συμβάλλουν έτσι στην ανάπτυξη πολυπαραγοντικών νοσημάτων.

2.2. ΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΩΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Αρχικά αναλύθηκαν οι γενετικοί πολυμορφισμοί που παρατηρούνται στις ομάδες αίματος, ενώ αργότερα μελετήθηκαν και οι πολυμορφισμοί πολλών άλλων γενετικών θέσεων. Τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα που οδηγούν σε σοβαρές γενετικές ασθένειες είναι συνήθως η πιο εμφανής μορφή γενετικής ποικιλότητας. Από τις αναλύσεις διαπιστώθηκε ότι πολλές πρωτεΐνες υπάρχουν σε διαφορετικούς πληθυσμούς σε διακριτές μορφές. Πολλά απ' αυτά τα πολυμορφικά αλληλόμορφα είναι κλινικά σημαντικά είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με σπάνια επιβλαβή



αλληλόμορφα.

Οι πολυμορφισμοί χρησιμοποιούνται ως γενετικοί δείκτες με σκοπό να διαχωριστούν διάφορες κληρονομικές μορφές ενός γονιδίου σε μελέτες οικογενειών. Οι πολυμορφισμοί χρησιμοποιούνται στην ιατρική γενετική:

- Στην προγεννητική διάγνωση γενετικών ασθενειών.
- Στην χαρτογράφηση γονιδίων με ανάλυση σύνδεσης.
- Στον έλεγχο πατρότητας.
- Σε ιατροδικαστικές αναλύσεις.
- Στην αναγνώριση ετεροζύγων - φορέων μιας ασθένειας.
- Στον προσδιορισμό ατόμων που αποτελούν κατάλληλους δότες για τη μεταμόσχευση οργάνων και ιστών.
- Στον γονοτυπική ανάλυση ατόμων με προδιάθεση για ορισμένες ασθένειες, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης κ.ά.

2.3. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ

Η πλειοψηφία των πολυμορφισμών του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι σημειακοί πολυμορφισμοί (SNPs, single nucleotide polymorphisms) και απαντώνται σε συχνότητα περίπου ένας πολυμορφισμός κάθε 1000 ζεύγη βάσεων. Μια υποκατηγορία των SNPs είναι οι πολυμορφισμοί μεγέθους περιοριστικού τμήματος (RFLPs, restriction fragment length polymorphisms), που προκαλούνται από την αντικατάσταση μιας βάσης από άλλη δημιουργώντας θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα [91].



Οι ποικίλου αριθμού διαδοχικών επαναλήψεων πολυμορφισμοί (VNTRs, variable number of tandem repeats) αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και μπορεί να είναι μινιδορυφορικοί δείκτες (minisatellites) όταν οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες είναι 10-60 ζεύγη βάσεων ή μικροδορυφορικοί δείκτες (microsatellites) που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες δύο ως τεσσάρων νουκλεοτιδίων. Όταν ο αριθμός των επαναλήψεων των VNTR ποικίλλει στα διάφορα άτομα τότε ο γενετικός δείκτης θεωρείται πολυμορφικός [92].

2.4. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ (RFLPs)

Οι πολυμορφισμών μεγέθους περιοριστικού τμήματος (RFLPs) οφείλονται στην ποικιλομορφία που παρουσιάζουν οι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων κατά μήκος του DNA. Αυτοί οι πολυμορφισμοί δεν συνοδεύονται από ορατές φαινοτυπικές μεταβολές.

Οι πολυμορφισμοί αυτοί πιθανόν να προήλθαν από:

- μικρές ελλείψεις ή προσθήκες αλληλουχιών DNA.
- την παρουσία επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών.

Αυτή η πολυμορφία του DNA είναι αρκετά συχνή και εμφανίζεται τυχαία μία φορά κάθε 200 περίπου βάσεις κατά μήκος ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος. Οι αλλαγές των αλληλουχιών αυτού του τύπου έχουν αποτέλεσμα την παραγωγή κομματιών DNA ποικίλου μεγέθους (RFLPs) μετά τη δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών. Αυτές οι γονοτυπικές αλλαγές μπορούν ν' αναγνωριστούν μετά από ηλεκτροφόρηση επειδή εμφανίζουν διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Κάθε RFLP κληρονομείται με απλό μενδελικό τρόπο.

Η μελέτη των RFLPs είναι εξαιρετικά χρήσιμη στην ιατρική γενετική διότι:



- Μπορούν να δράσουν ως γενετικοί δείκτες για τη μελέτη των γενετικών παραλλαγών στον ανθρώπινο πληθυσμό.
- Πολλά RFLPs είναι συνδεδεμένα με περιοχές γονιδίων, που εμφανίζουν συχνά μεταλλάξεις υπεύθυνες για πολλές ασθένειες . Αυτή η μικρή απόσταση τούς επιτρέπει να συγκληρονομούνται από γενεά σε γενεά και επομένως είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες γνωστών μεταλλάξεων σε σημαντικά γονίδια.
- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την προσυμπτωματική διάγνωση, την αναγνώριση φορέων, καθώς και για τον προγεννητικό έλεγχο.

2.5. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΩΝ RFLPs

Η χρήση των RFLPs ως γενετικών δεικτών, συνδεδεμένων με τις μεταλλάξεις, βοήθησε στην ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού γενετικών περιοχών υπεύθυνων για πολλές ασθένειες [93]. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν πολυμορφισμοί για την χαρτογράφηση του X-χρωμοσώματος. Η πρώτη ασθένεια που συνδέεται με το X-χρωμόσωμα και αναγνωρίστηκε με τη βοήθεια των RFLPs ήταν η μυϊκή δυστροφία Duchenne [94]. Μέχρι σήμερα έχει βρεθεί ένας μεγάλος αριθμός πολυμορφικών δεικτών που βοήθησε την χαρτογράφηση του ίδιου του γονιδίου [95-97]. Η ευκολία στην ανάλυση ασθενειών συνδεδεμένων με το X-χρωμόσωμα οφείλεται στην παρουσία ενός μόνο αλληλομόρφου στα άρρενα άτομα. Αυτό το γεγονός επέτρεψε την ανίχνευση συνδεδεμένων δεικτών για το σύνδρομο Alport, τη μυϊκή δυστροφία Becker, το σύνδρομο Charcot-Marie-Tooth, το σύνδρομο διανοητικής καθυστέρησης λόγω του ευθραύστου X, την ασθένεια Menkes, τον οφθαλμικό αλφισμό, τη μελαγχρωματική αμφιβληστροειδίτιδα [98]. Δεδομένων των 68 πολυμορφισμών που βρέθηκαν στο χρωμόσωμα X, είναι κατ' ουσία εγγυημένη η



σύνδεση κάθε ανωμαλίας συνδεδεμένης με το X χρωμόσωμα με κάποιο αριθμό πολυμορφισμών.

Η πρώτη επιτυχία στην ανάλυση των RFLPs στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα ήταν η ανακάλυψη ενός δείκτη συνδεδεμένου με την ασθένεια του Huntington το 1983 [99,100] που εντοπίστηκε αργότερα στην τερματική περιοχή του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος 4 [101]. Αργότερα, αναφέρθηκε ότι η γενετική περιοχή του γονιδίου της άλφα γλοβίνης συνδέεται γενετικά με την πολυκυστική ασθένεια των νεφρών [102]. Πολλά εργαστήρια ασχολήθηκαν με την σχέση των RFLPs με πολλές ασθένειες όπως η νόσος Alzheimer, τη νευροινωμάτωση Von Recklinghausen, την κεντρική νευροινωμάτωση Von Hippel-Lindau, την πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία, το σύνδρομο Tourette, την μυϊκή παραμορφωτική δυστονία και άλλες. Η ανάλυση των RFLPs δε περιορίζεται μόνο στις επικρατείς ανωμαλίες αλλά και σε υπολειπόμενες όπως η κυστική ίνωση, η πιο συνήθης υπολειπόμενη ασθένεια στους καυκάσιους. Βρέθηκαν πολλοί δείκτες στο χρωμόσωμα 7 που συνδέονται με την κυστική ίνωση [103-106].

Η γενετική ανάλυση σύνδεσης είναι μία από τις ταχύτερες μεθόδους διάκρισης του αν ένα γονίδιο είναι υποψήφιο για την εμφάνιση κάποιας ασθένειας. Η παρατήρηση ενός απλού ανασυνδυασμού ανάμεσα σε ένα γονίδιο υπεύθυνο για την παραγωγή μιας γνωστής πρωτεΐνης και σε μια γενετική περιοχή υπεύθυνη για κάποια ασθένεια μπορεί να γλιτώσει μήνες βιοχημικών αναλύσεων για το συσχετισμό της πρωτεΐνης με την συγκεκριμένη ασθένεια [107,108].



2.6. ΤΡΟΠΟΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΩΝ RFLPs

Για την ανίχνευση ενός RFLP, που από την ανάλυση του οικογενειακού δένδρου φαίνεται να είναι συνδεδεμένο με τη γενετική μεταλλαγή που εξετάζεται, σχεδιάζεται μία ειδική αλληλουχία DNA. Ακολούθως η ανάλυση είναι η ίδια όπως και στις κλασικές μελέτες συνδέσεων σε οικογένειες.

Για να χρησιμοποιηθεί η τεχνική αυτή σε όσο το δυνατόν περισσότερες περιπτώσεις, είναι απαραίτητο να προσδιοριστούν διάφορα RFLPs που είναι συνδεδεμένα με το γονίδιο της ασθένειας. Διότι λόγω του πολυμορφισμού που υπάρχει στο DNA, ένα ειδικό RFLP δεν θα εμφανίζεται σε όλες τις εξεταζόμενες οικογένειες, δηλαδή αυτές δεν θα είναι πληροφοριακές. Αν ακολουθηθεί το πρότυπο διαχωρισμού των στενά συνδεδεμένων RFLPs για τα οποία η οικογένεια είναι πληροφοριακή, τότε είναι δυνατόν να ανιχνευθούν οι φορείς της ασθένειας και να δοθεί μια απάντηση μετά τον προγεννητικό έλεγχο.

Αν σε μια γενετική ασθένεια δεν υπάρχει RFLP ειδικό της μετάλλαξης, αλλά χρησιμοποιούνται RFLPs στενά συνδεδεμένα με το γονίδιο για την ανίχνευση φορέων ή για τον προγεννητικό έλεγχο, τότε σίγουρα θα υπάρχουν οικογένειες για τις οποίες τα αποτελέσματα αυτά δεν θα είναι πληροφοριακά. Οι οικογένειες αυτές συνεπώς δεν έχουν την απαραίτητη ποικιλομορφία σε στενά συνδεδεμένα πολυμορφικά σημεία για να καθοριστεί το χρωμόσωμα στο οποίο βρίσκεται το αλληλόμορφο της ασθένειας μέσα στην οικογένεια. Είναι όμως δυνατόν αν εξεταστεί ο αριθμός των διαφόρων στενά συνδεδεμένων RFLPs στα διάφορα μέλη της οικογένειας, να καταλήξει η οικογένεια να γίνει πληροφοριακή με τον καθορισμό του απλότυπου. Δηλαδή του προτύπου του συνόλου των RFLPs στο χρωμόσωμα με το αλληλόμορφο της ασθένειας και το αντίστοιχο φυσιολογικό [109].



[The page contains extremely faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the paper.]



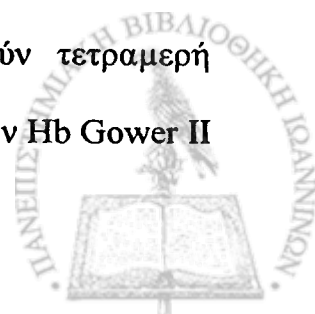
3. ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ

3.1. Γενικά

Η αιμοσφαιρίνη του ανθρώπου αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, τις σφαιρίνες. Οι τέσσερις αλυσίδες της σφαιρίνης είναι ανά δυο όμοιες και κάθε μία συνδέεται με ένα μόριο αίμης. Αυτή η δομή αποτελεί το ενεργό μόριο της αιμοσφαιρίνης που μεταφέρει οξυγόνο από τους πνεύμονες στους ιστούς.

Η κύρια αιμοσφαιρίνη, τόσο στην παιδική όσο την ενήλικη ζωή, είναι η αιμοσφαιρίνη A. Αποτελείται από δύο αλυσίδες άλφα (α) και δύο αλυσίδες βήτα (β). Οι α αλυσίδες αποτελούνται από 141 αμινοξέα, ενώ οι β από 146. Οι αλυσίδες α και β παρουσιάζουν πολλές αμινοξικές διαφορές [110]. Στους ενήλικες παρατηρείται και ένα άλλο είδος αιμοσφαιρίνης, σε ποσοστό περίπου 2% της ολικής αιμοσφαιρίνης, που ονομάζεται αιμοσφαιρίνη A_2 και αποτελείται από δύο αλυσίδες άλφα (α) και δύο αλυσίδες δέλτα (δ). Συνεπώς η σύνθεση των υπομονάδων της αιμοσφαιρίνης A είναι $\alpha_2\beta_2$ και της αιμοσφαιρίνης A_2 είναι $\alpha_2\delta_2$.

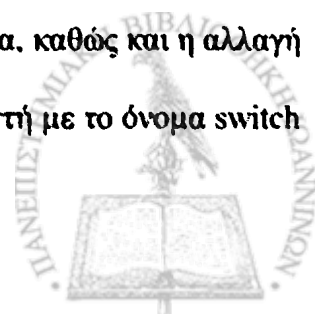
Ανάλυση των αιμοσφαιρινών εμβρύων στο πρώτο τρίμηνο της κύησης αποκάλυψε την παρουσία και άλλων τύπων αιμοσφαιρινών. Η κύρια εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη είναι η αιμοσφαιρίνη F, η οποία αποτελείται από δύο α και δύο γ αλυσίδες. Έξι μήνες μετά τη γέννηση, η αιμοσφαιρίνη F ελαττώνεται προοδευτικά, έτσι ώστε στον τρίτο περίπου χρόνο της ζωής να φθάσει στα φυσιολογικά όρια του 0-2% της ολικής αιμοσφαιρίνης [111]. Άλλες εμβρυϊκές αιμοσφαιρίνες είναι οι Hb Gower I και II και η Hb Portland. Οι αιμοσφαιρίνες αυτές, εμφανίζονται σταδιακά κατά την ανάπτυξη και εξαφανίζονται μετά τον τρίτο μήνα της εμβρυϊκής ζωής. Αποτελούν τετραμερή διαφόρων σφαιρικών αλυσίδων, όπως $\zeta_2\epsilon_2$ για την Hb Gower I, $\alpha_2\epsilon_2$ για την Hb Gower II



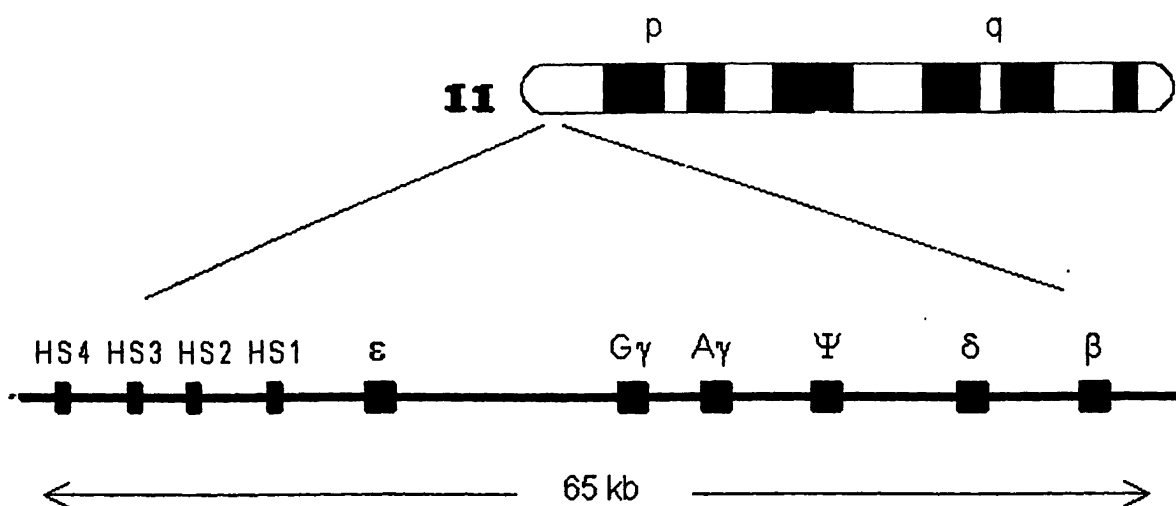
και ζ₂γ₂ για την Hb Portland [112]. Οι ζ αλυσίδες εμφανίζουν ομολογία στην πρωτοταγή τους διάταξη με τις α, ενώ οι ε με τις β. Όλες οι σφαιρινικές αλυσίδες των διαφόρων αιμοσφαιρινών έχουν την ίδια εξελικτική προέλευση και προέρχονται η μία από την άλλη με γενετικό διπλασιασμό (ανασυνδυασμό).

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ανθρώπου παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στα όργανα όπου γίνεται σύνθεση σφαιρινών, με αποτέλεσμα να παράγονται άλλες πρωτεΐνες στην εμβρυϊκή και άλλες στην ενήλικη ζωή [110,112,113]. Οι αιμοσφαιρίνες που συντίθενται κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξης του ανθρώπου είναι οι πρώιμες εμβρυϊκές, οι εμβρυϊκές και οι κύριες. Η κατηγοριοποίηση αυτή δεν είναι απόλυτη αφού σε διάφορα στάδια της ανθρώπινης ζωής είναι δυνατό να ανιχνευθούν διάφορες αιμοσφαιρίνες. Οι πρώιμες εμβρυϊκές αιμοσφαιρίνες με αλυσίδες ζ και ε συντίθενται πολύ πρόωρα, κυρίως στο αμνιακό ασκό. Κατά τη διάρκεια της 6ης προς την 8η εβδομάδα, αντικαθίσταται προοδευτικά από τις σφαιρίνες της εμβρυϊκής περιόδου σύμφωνα με τις μετατροπές ζ σε α₁ και α₂, καθώς και ε σε Γγ και Αγ. Στην υπόλοιπη εμβρυϊκή ζωή το ήπαρ και δευτερευόντως ο σπλήνας αποτελούν τα κύρια όργανα παραγωγής των ερυθροκυττάρων. Η δραστηριότητα του μυελού των οστών αρχίζει από το δεύτερο τρίμηνο της κύησης και γίνεται κυρίαρχη στο τέλος της εμβρυϊκής ζωής.

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, τα γονίδια Γγ και Αγ εκφράζονται με μια σταθερή αναλογία 3:1 αντίστοιχα. Όσον αφορά τα γονίδια του τύπου β (εικόνα 1), η σύνθεση των αλυσίδων β είναι ιδιαίτερα χαμηλή κατά τη διάρκεια της κύησης και παρουσιάζει μια απότομη αύξηση λίγο πριν από τη γέννηση. Σε αυτή τη χρονική στιγμή αποτελεί περίπου το μισό των αλυσίδων του τύπου β (β, δ, Γγ, Αγ). Η σύνθεση των αλυσίδων δ διατηρείται πάντα χαμηλή. Παράλληλα παρατηρείται αλλαγή στη σχέση έκφρασης των αλυσίδων γ, η οποία από 3:1 γίνεται 2:3 [114]. Η μετατροπή των Γγ και Αγ σε δ και β αντίστοιχα, καθώς και η αλλαγή της έκφρασης των γονιδίων Γγ:Αγ (από εμβρυϊκή σε κύρια) είναι γνωστή με το όνομα switch



(εναλλαγή) και παρατηρείται ταυτόχρονα σε όλα τα ερυθροποιητικά όργανα. Η μετατροπή αυτή συνδέεται με τη χρονική ηλικία της κύησης και είναι ταυτόχρονη και με άλλες μετατροπές που γίνονται στα κύτταρα της ερυθράς σειράς, ενώ συνεχίζεται και για 6 με 12 μήνες μετά τον τοκετό. Στην περίοδο αυτή τείνει προς μια κύρια κατάσταση της σύνθεσης των αλυσίδων της σφαιρίνης. Η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη F κυμαίνεται σε ποσοστό 1 % και απαντάται σε μια μικρή κατηγορία κυττάρων που ονομάζονται κύτταρα F [115].



εικόνα 1. Τα γονίδια του συμπλέγματος β των αιμοσφαιρινών

Οι μηχανισμοί διαδοχικής ενεργοποίησης των γονιδίων της σφαιρίνης έχουν μελετηθεί με δύο τρόπους. Ο πρώτος έγκειται στην παρατήρηση των φυσικών μεταβολών αυτής της ενεργοποίησης, οι οποίες τις πιο πολλές φορές είναι παθολογικές. Ο δεύτερος τρόπος έγκειται στη χρήση πειραματικών μοντέλων.

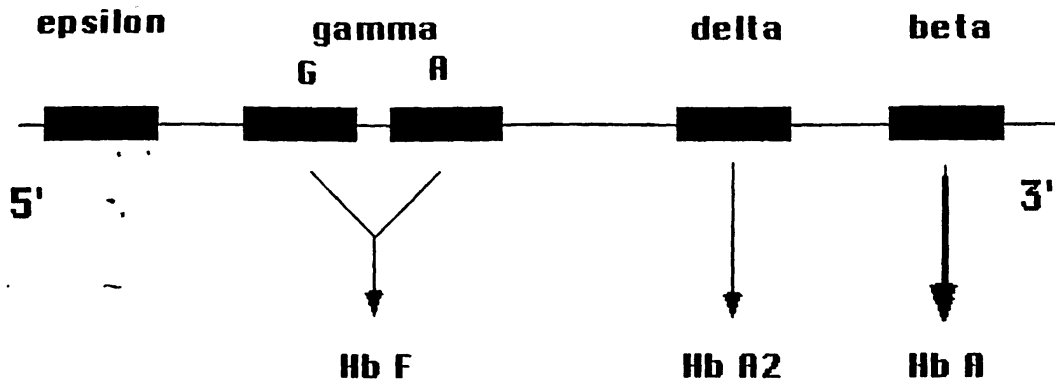
3.2. ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΩΝ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Όλα τα γονίδια των αιμοσφαιρινών έχουν αναλυθεί διεξοδικά και ήταν από τα πρώτα γονίδια του γενώματος που έχει προσδιοριστεί η δομή τους [116-118]. Τα γονίδια της αιμοσφαιρίνης βρίσκονται οργανωμένα σε δύο χωριστά συμπλέγματα συγγενών πολυγονιδιακών οικογενειών. Το σύμπλεγμα των α γονιδίων βρίσκεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 16 σε τμήμα DNA μεγέθους 26 kb [119]. Η οικογένεια β, γ, δ βρίσκεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 11 κατά μήκος μιας περιοχής 60 kb [120]. Οι γενετικοί μηχανισμοί ρυθμίζουν την συγχρονισμένη λειτουργία των γονιδίων στα δύο διαφορετικά χρωμοσώματα, επιτρέποντας ίση παραγωγή α και μη α-αλυσίδων.

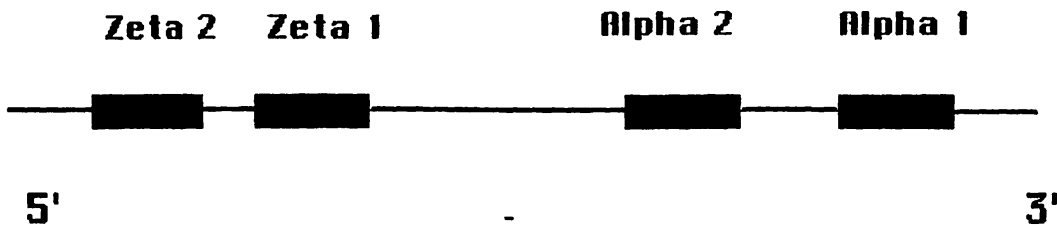
Τα δομικά γονίδια του συμπλέγματος α περιλαμβάνουν το εμβρυονικό γονίδιο ζ, το ψευδογονίδιο ζ, ένα ψευδογονίδιο α και τα δύο ίδια γονίδια α (α_1 και α_2). Παρά την ομοιότητα που παρουσιάζουν τα δύο α γονίδια μεταξύ τους, έχει διαπιστωθεί ότι η παραγωγή mRNA από το α_2 γονίδιο είναι μεγαλύτερη από την παραγωγή του α_1 γονιδίου σε όλη τη διάρκεια τόσο της εμβρυϊκής όσο και της ενήλικης ζωής με αναλογία 60/40 περίπου. Παρομοίως, η σειρά των γονιδίων του β συμπλέγματος περιλαμβάνει το εμβρυονικό ε γονίδιο, τα δύο εμβρυϊκά γονίδια γ (A_γ και G_γ), το ψευδογονίδιο β και τα δ και β γονίδια (εικόνα 2).



Beta Globin Gene Cluster Chromosome 11



Alpha Globin Gene Cluster Chromosome 16



εικόνα 2. Τα χρωμοσώματα 11 και 16 που περιέχουν τα γονίδια του τύπου β (ε, Γγ, Αγ, δ και β) και του τύπου α (ζ, α₂ και α₁).

Τα ψευδογονίδια είναι αλληλουχίες DNA που μοιάζουν με εκείνες των φυσιολογικών ομολόγων τους. Παρόλα αυτά διάφορες μεταλλακτικές διεργασίες έχουν αδρανοποιήσει τη μεταγραφή με αποτέλεσμα να μην εκφράζονται. Τα ψευδογονίδια αποτελούν προϊόντα διπλασιασμού που εμφανίστηκαν κατά την εξέλιξη και δεν ενεργοποιήθηκαν κατά τη φυσιολογική επιλογή. Το δ γονίδιο της αιμοσφαιρίνης HbA₂, του οποίου το προϊόν αποτελεί μόνο 2%-3% της ολικής αιμοσφαιρίνης μπορεί να

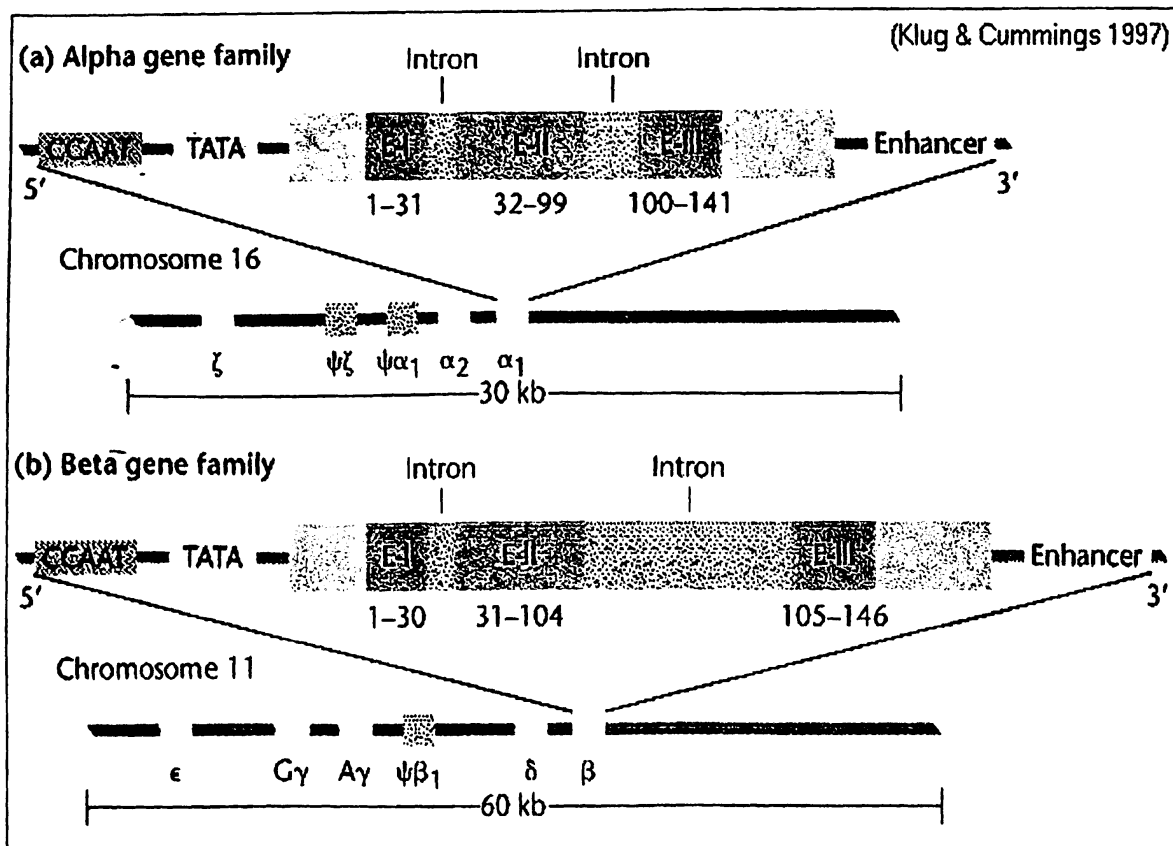


θεωρηθεί ως ένα γονίδιο που βρίσκεται στη διαδικασία μετατροπής του σε ψευδογονίδιο.

Όλα τα γονίδια έχουν δομικές και λειτουργικές ομοιότητες. Τρία εξώνια κωδικοποιούν τη μοναδική αμινοξική αλληλουχία κάθε γονιδίου σφαιρίνης τα οποία χωρίζονται από δύο εσώνια που ονομάζονται IVS-I και IVS-II αντίστοιχα (εικόνα 3). Το δεύτερο εξώνιο κωδικοποιεί το κομμάτι της σφαιρίνης που είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση της αίμης και την παραγωγή διμερών μορφών α-β, ενώ το τρίτο εξώνιο κωδικοποιεί αμινοξέα υπεύθυνα για τις αλληλεπιδράσεις των υπομονάδων των σφαιρινών που είναι απαραίτητες για τη δέσμευση του οξυγόνου [121].

Τα εσώνια μεταγράφονται παράλληλα με τα εξώνια, έτσι ώστε τα αρχικά αντίγραφα των γονιδίων να αντανakλούν τόσο κωδικοποιούσες όσο και μη κωδικοποιούσες αλληλουχίες του αντίστοιχου γονιδίου. Τα εσώνια απομακρύνονται κατά τη διαδικασία επεξεργασίας του πρωτογενούς RNA, έτσι ώστε το τέλος του πρώτου εξωνίου να ενώνεται με το δεύτερο εξώνιο και το τέλος του δεύτερου εξωνίου με το τρίτο εξώνιο, σχηματίζοντας λειτουργικό mRNA που κατευθύνει την παραγωγή αιμοσφαιρινών στα ριβοσώματα. Τα δύο εσώνια των διαφόρων γονιδίων στο σύμπλεγμα β-γ-δ είναι πανομοιότυπα, αλλά διαφέρουν από εκείνα του συμπλέγματος των α γονιδίων που είναι μικρότερα. Όλα τα εσώνια αρχίζουν με το δινουκλεοτίδιο GT και τελειώνουν με το AG. Αυτά τα δινουκλεοτίδια είναι μέρος των συναινετικών αλληλουχιών (consensus) στα σημεία ματίσματος.

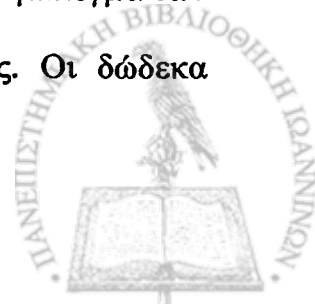




εικόνα 3. Αναλυτική δομή των γονιδίων α₁ και β των αιμοσφαιρινών. Αποτελούνται και τα δύο από τρία εξώνια και δύο εσώνια.

3.3. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ DNA ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΩΝ ΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Η χαρτογράφηση των γονιδίων με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών οδήγησε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία στην αλληλουχία του DNA μεταξύ διαφόρων ατόμων. Οι ποικιλομορφίες στο σύμπλεγμα του γονιδίου β δημιουργούνται από αντικαταστάσεις ενός νουκλεοτιδίου και συμβολίζονται με (+) όταν υπάρχουν και (-) όταν δεν βρίσκονται στη συγκεκριμένη θέση. Στο σύμπλεγμα των γονιδίων της β σφαιρίνης υπάρχουν δεκαεπτά πολυμορφικές περιοχές. Οι δώδεκα



βρίσκονται εκτός εσώνιων και εξωνίων, οι τρεις σε εσώνια, μία σ' ένα ψευδογονίδιο και μία στην κωδικοποιούσα περιοχή του β γονιδίου.

Στο σύμπλεγμα του γονιδίου α υπάρχουν δύο πολυμορφισμοί DNA που δείχνουν έναν άλλο συχνό τύπο παραλλαγών, τις υπερμεταβλητές περιοχές (HRV). Αυτές αποτελούνται από διαφορετικών μεγεθών επαναλαμβανόμενα τμήματα DNA. Μια σειρά 5 πολυμορφισμών που συμβολίζεται + - + - + με κατεύθυνση 5' → 3' ονομάζεται απλότυπος.

3.4. ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ- ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΕΣ ΑΝΑΙΜΙΕΣ

Οι μεσογειακές αναιμίες είναι οι αυτοσωματικές υπολειπόμενες νόσοι στις οποίες υπάρχει γενετικά καθοριζόμενη έλλειψη ή απουσία σύνθεσης μιας από τις αλυσίδες της αιμοσφαιρίνης. Ο όρος επελέγη για να περιγράψει τη μεσογειακή προέλευση πολλών φορέων αυτών των αυτοσωματικών υπολειπόμενων νόσων. Οι μεσογειακές αναιμίες χωρίζονται σε α- και β- μεσογειακές αναιμίες.

Η ελαττωμένη παραγωγή αλυσίδων προκαλείται από διαφορετικούς γενετικούς μηχανισμούς και η αιτιολογία της μεσογειακής αναιμίας είναι ετερογενής. Η διαλεύκανση της κανονικής δομής, οργάνωσης και λειτουργίας των γονιδίων της σφαιρίνης έχει βοηθηθεί σημαντικά από τη μελέτη των διαφόρων γονιδίων της μεσογειακής αναιμίας.



3.5. Β-ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ

Η β-μεσογειακή αναιμία διακρίνεται σε δύο τύπους. Στη β⁺-μεσογειακή αναιμία όπου συντίθεται β-σφαιρίνη σε μικρό βαθμό και στη β⁰-μεσογειακή αναιμία όπου δεν συντίθεται καθόλου β-σφαιρίνη. Η αιτιολογία της νόσου είναι σε μεγάλο βαθμό ετερογενής, το ίδιο και τα κλινικά συμπτώματα. Στη συνέχεια αναφέρονται οι μεταλλάξεις οι οποίες δημιουργούν τις διάφορες μορφές της νόσου.

3.5.1. Μεταλλάξεις μεταγραφής ή υποκινητών

Οι μεταλλάξεις της μεσογειακής αναιμίας που αφορούν τη μη κωδικοποιούσα περιοχή πριν από το 5' άκρο του β-γονιδίου είναι εκείνες που επηρεάζουν τη μεταγραφή του γονιδίου. Έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στην περιοχή TATA καθώς και στις CACCC αλληλουχίες στις θέσεις -30 και -105. Αυτές οι μεταλλάξεις ελαττώνουν τη σύνθεση αιμοσφαιρίνης και προκαλούν ήπιας μορφής μεσογειακή αναιμία. Δεν έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στο κουτί CCAAT. Η μετάλλαξη στη θέση -101 προκαλεί ήπιας μορφής β-μεσογειακή αναιμία που στους ετεροζυγώτες είναι σιωπηλή ενώ όταν συνδυάζεται με άλλη μετάλλαξη προκαλεί β⁰-μεσογειακή αναιμία [122].

3.5.2. Μεταλλάξεις διάσπασης του RNA

Έχει βρεθεί μια μετάλλαξη β⁺-μεσογειακής αναιμίας η AATAAA→AACAAA μετά το 3' άκρο του β γονιδίου. Αυτή απαντιάνται συχνά στους μαύρους της Αμερικής και επηρεάζει την ικανότητα μεταγραφής [123,124].



3.5.3. Ανερμηνεύσιμες και πλαισιοτροποποιητικές μεταλλάξεις

Μεταλλάξεις που οδηγούν σε κωδικόνια λήξης μέσα στα εξώνια του γονιδίου της β-σφαιρίνης θα παραγάγουν μια μικρή μη λειτουργική β-αλυσίδα και οδηγούν σε β⁰-μεσογειακή αναιμία. Έχουν βρεθεί τρεις τέτοιες μεταλλάξεις (Codon 39, Codon 15, Codon 17). Η Codon 39 είναι μια μετάλλαξη κοινή στη Μεσόγειο (C → T).

Ελλείψεις ή προσθήκες λιγότερων ή περισσότερων των τριών βάσεων δημιουργούν πλαίσια που προκαλούν τερματισμό της σύνθεσης σφαιρίνης. Έχουν βρεθεί επτά τέτοιες περιπτώσεις β⁰-μεσογειακής αναιμίας σε διάφορους πληθυσμούς, από τις οποίες η Codon 6 εμφανίζεται συχνότερα στην Ελλάδα.

3.5.4. Μεταλλάξεις επεξεργασίας RNA

Επεξεργασία του πρωτογενούς RNA περιλαμβάνει κοπή των εσώνων με μάτισμα των εξωνίων προκειμένου να σχηματιστεί ένα λειτουργικό μόριο m RNA. Έχουν περιγραφεί πολλές μεταλλάξεις που αφορούν αυτή τη διαδικασία (IVSI-1, IVSI-6, IVSII-1). Μια πρώτη μετάλλαξη σχετίζεται με τα δινουκλεοτίδια GT και AG στις θέσεις δότη και με δέκτη και τη διαδικασία του ματίσματος. Αυτά τα δινουκλεοτίδια είναι μέρος αλληλουχιών που είναι χρήσιμες για το μάτισμα. Εάν στις αλληλουχίες αυτές συμβούν σημειακές μεταλλάξεις, είναι δυνατόν να προκληθεί β⁰- ή β⁺-μεσογειακή αναιμία.

Μερικές φορές, λόγω μεταλλάξεων, ενεργοποιούνται δινουκλεοτίδια GT ή AG που βρίσκονται σε άλλες κρυμμένες περιοχές, τα οποία, αν λάβουν μέρος στη διαδικασία του ματίσματος του RNA, θα δημιουργήσουν λανθασμένα μόρια m RNA. Μεταλλάξεις στα εσώνια μπορεί να δημιουργήσουν νέες περιοχές ματίσματος που προκαλούν διατάραξη της φυσιολογικής διεργασίας και τη δημιουργία μεσογειακής αναιμίας (IVSI-110, IVSII-745).

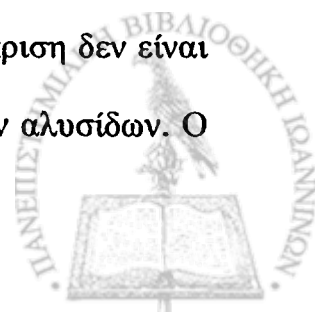


Μια άλλη κατηγορία μεταλλάξεων ενεργοποιεί ήδη υπάρχουσες κρυμμένες αλληλουχίες. Μια τέτοια μετάλλαξη στο κωδικόνιο 26 προκαλεί αμινοξική αλλαγή (Glu→Lys) [125]. Μία άλλη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 27 (Knossos) προκαλεί την αμινοξική αλλαγή Ala→Ser στην θέση 27 της πρωτεϊνικής αλυσίδας [126,127].

3.5.5. Ελλείμματα

Οι περισσότερες β-θαλασσαιμίες δεν οφείλονται σε ελλείμματα γονιδίων, σε αντίθεση με την α-θαλασσαιμία. Από ελλείμματα στην περιοχή των γονιδίων β-γ-δ προέκυψαν οι αιμοσφαιρίνες Lepore και Kenya. Τα ελλείμματα αυτά άφησαν μέρος του γονιδίου ανέπαφο και σχημάτισαν υβριδικά γονίδια δ-β (HbLepore) και γ-β (Hb Kenya). Αυτή η σύντηξη γονιδίων είναι το αποτέλεσμα άνισου ανασυνδυασμού. Η ομολογία των διαφόρων γονιδίων των σφαιρινών μπορεί να οδηγήσει σε άνισο επιχιασμό (ανασυνδυασμό) μεταξύ ομόλογων, αλλά και πανομοιότυπων γονιδίων, που οδηγεί σε ένωση του αμινοτελικού άκρου μιας σφαιρινικής αλυσίδας και του καρβοξυτελικού άκρου μιας άλλης. Βρέθηκαν διάφορα είδη της Hb Lepore με διαφορετικό μέγεθος δ και β γονιδίων, που εξαρτώνται από το σημείο που συμβαίνει επιχιασμός. Στις διάφορες Hb Lepore και το δ και το β γονίδιο έχουν ελλείμματα και δημιουργείται ένα νέο, το δ-β που προέρχεται από τη συνένωσή τους.

Διάφορες ελλείμματα έχουν προκαλέσει ολικό έλλειμμα όλων των γονιδίων του συμπλέγματος γ, δ, β, με αποτέλεσμα την αδυναμία σύνθεσης των αντίστοιχων αλυσίδων. Δημιουργήθηκε με τον τρόπο αυτό μια λειτουργική διάκριση ανάμεσα στα ελλείμματα που προκαλούν μεσογειακές αναιμίες και τα ελλείμματα όπου η σύνθεση εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης αντισταθμίζει την έλλειψη δ και β. Αυτή η διάκριση δεν είναι απόλυτη, μια και δεν προκαλείται πλήρης αντιστάθμιση στη σύνθεση των αλυσίδων. Ο



λόγος για τον οποίο ενεργοποιείται το γονίδιο της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης σε μερικά ελλείμματα δεν είναι γνωστός και αποτελεί ακόμη αντικείμενο έρευνας.



4. ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ Υ

4.1. ΓΕΝΙΚΑ

Το ανθρώπινο χρωμόσωμα Υ περιέχει πάνω από 6 Mb DNA. Σε σύγκριση με οποιοδήποτε άλλο χρωμόσωμα περιέχει ένα μικρό αριθμό γονιδίων και αποτελεί ένα γενετικό καθοριστή των ανδρικών χαρακτηριστικών. Η αρρενο-ειδική περιοχή MSY (Male Specific Region), που αποτελεί το 95% του χρωμοσώματος Υ αντιπροσωπεύει ένα μωσαϊκό ετεροχρωματικών και ευχρωματικών αλληλουχιών και η οποία περιέχει 156 μεταγραφόμενες γονιδιακές μονάδες. Από τις 8 μεγάλες παλίνδρομες αλληλουχίες που έχουν ταυτοποιηθεί στο χρωμόσωμα Υ, οι 6 περιέχουν ζωτικής σημασίας ειδικά για τη σπερματογένεση γονίδια. Η υπογονιμότητα, όπως επίσης και αρκετές γονιδιακές δυσλειτουργίες του παρακρινικού ελέγχου στον άνδρα, έχουν αποδοθεί σε γονίδια του χρωμοσώματος Υ καθώς επίσης και σε γονίδια αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων.

Το ανθρώπινο χρωμόσωμα Υ αποτελείται από ένα βραχύ και έναν μακρό βραχίονα που συμβολίζονται Υ_p και Υ_q αντίστοιχα. Στα τελομεριδιακά τμήματα αυτών των βραχιόνων υπάρχουν περιοχές νουκλεοτιδικής ταυτότητας με το χρωμόσωμα Χ που επιτρέπουν το ζευγάρωμα και τον ανασυνδυασμό κατά την μείωση στους άνδρες και γι' αυτό το λόγο αναφέρονται σαν ψευδοαυτοσωματικές περιοχές. Η περιοχή μετά τις ψευδοαυτοσωματικές περιοχές που διαφεύγει από τον ανασυνδυασμό, αναφέρεται ως μη-ανασυνδυαζόμενη περιοχή του χρωμοσώματος Υ και περιλαμβάνει μερικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που είναι είτε ομόλογες με περιοχές στο χρωμόσωμα Χ ή ειδικές για το χρωμόσωμα Υ [128]. Η Υ_p αλλά και η κεντρομεριδιακή περιοχή του Υ_q αποτελούνται από ευχρωματίνη, ενώ το τελομεριδιακό τμήμα του Υ_q αποτελείται από ετεροχρωματίνη. Έτσι, ο μακρός βραχίονας του χρωμοσώματος Υ διχοτομείται κυτταρογενετικά σε μία ευχρωματινική κεντρική περιοχή

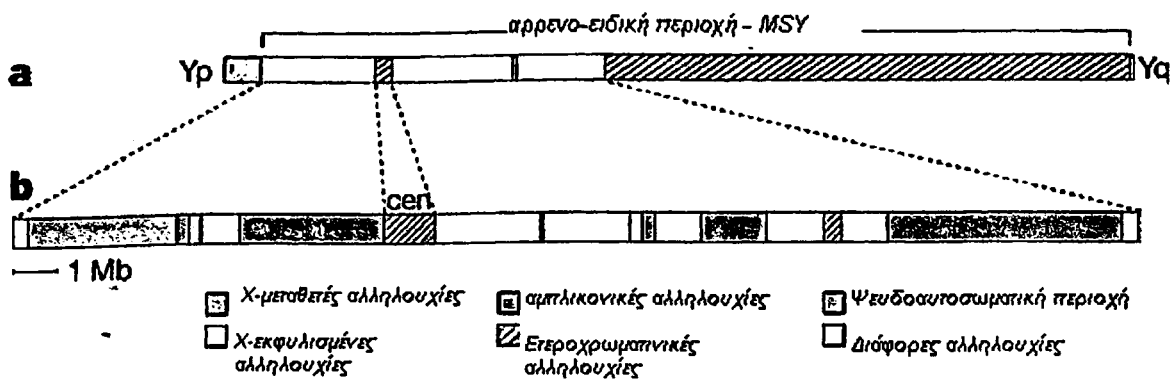


(την Yq11) και σε μία ετεροχρωματινική τελομεριδιακή περιοχή (Yq12). Η ευχρωματινική περιοχή του μακρού βραχίονα Yq αντιπροσωπεύεται από τα τμήματα 5 και 6, ενώ η ετεροχρωματινική περιοχή προς το τελομεριδιακό άκρο του χρωμοσώματος Y θεωρείται διάστημα 7.

4.2 ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ Y

Τις τελευταίες δεκαετίες η κατανόηση των βιολογικών λειτουργιών του χρωμοσώματος Y έχει αρχίσει να αναδύεται από μελέτες του DNA σε άτομα με περιορισμένα ελλειμματικά τμήματα του χρωμοσώματος Y, που συνοδεύτηκαν από τον μοριακό χαρακτηρισμό συνδεδεμένων με το χρωμόσωμα Y γονιδίων εμπλεκόμενων στη γοναδική αντιστροφή φύλου, το σύνδρομο του Turner, και την απόρριψη μοσχευμάτων [129]. Γονιδιακές μελέτες αποκάλυψαν ότι η αρρενο-ειδική περιοχή MSY του χρωμοσώματος Y, στην οποία δεν γίνεται ανασυνδυασμός ανάμεσα στα χρωμοσώματα X-Y, περιβάλλεται από και από τις δύο πλευρές από ψευδοαυτοσωμικές περιοχές, όπου ο ανασυνδυασμός ανάμεσα στα χρωμοσώματα X-Y είναι ένα συχνό και φυσιολογικό γεγονός κατά τη μείωση στους άνδρες [130]. Η ευχρωματινική περιοχή της MSY καλύπτει στο σύνολο περίπου 23 Mb , 8 Mb στο βραχύ βραχίονα Yp και 14.5 Mb στο μακρό βραχίονα του Yq (εικόνα 4).



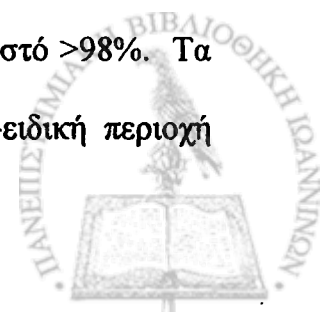


Εικόνα 4

Η αρρενο-ειδική περιοχή του χρωμοσώματος Y. a) Σχηματική απεικόνιση ολόκληρου του χρωμοσώματος Y, περιλαμβανομένης και της ψευδοαυτοσωμικής και ετροχρωματικής περιοχής. b) Μεγέθυνση της περιοχής μήκους 24Mb της MSY όπου απεικονίζονται και οι τρεις τάξεις ευχρωματικών αλληλουχιών, όπως επίσης και οι ετεροχρωματικές περιοχές [130]. Cent: κεντρομερίδιο

4.3. ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΜΕΝΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ

Πρόσφατα έχει βρεθεί πως η αρρενο-ειδική περιοχή περιλαμβάνει τουλάχιστον 156 μεταγραφόμενες γονιδιακές μονάδες, οι μισές από τις οποίες πιθανόν να κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Και οι 156 μεταγραφόμενες γονιδιακές μονάδες που ταυτοποιήθηκαν βρίσκονται σε ευχρωματικές περιοχές. Δεν υπάρχουν ενδείξεις για την ύπαρξη μεταγραφής στην ετεροχρωματική της αρρενο-ειδική περιοχής. Από τις 78 μονάδες που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, περίπου 60 είναι μέλη εννέα διαφορετικών, MSY ειδικών οικογενειών γονιδίων, κάθε μία από τις οποίες είναι ταυτόσημη νουκλεοτιδική αλληλουχία σε ποσοστό >98%. Τα υπόλοιπα 18 γονίδια υπάρχουν σε ένα μόνο αντίγραφο. Έτσι, η αρρενο-ειδική περιοχή



φαίνεται να κωδικοποιεί για τουλάχιστον 27 διακριτές πρωτεΐνες ή οικογένειες πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, η περιοχή MSY περιλαμβάνει 78 μεταγραφόμενες μονάδες από τις οποίες φαίνεται πως οι περισσότερες δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες.

4.4. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΥΧΡΩΜΑΤΙΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ MSY

Οι ευχρωματινικές αλληλουχίες της αρρενο-ειδική περιοχής ανήκουν σε τρεις κατηγορίες: τις X-μεταθετές αλληλουχίες, τις X-εκφυλισμένες αλληλουχίες και τις αμπλικονικές αλληλουχίες.

Οι X-μεταθετές αλληλουχίες είναι κατά 99% ταυτόσημες με αλληλουχίες DNA στο χρωμόσωμα X. Οι αλληλουχίες αυτές ονομάζονται έτσι, γιατί η παρουσία τους στην ανθρώπινη αρρενο-ειδική περιοχή είναι το αποτέλεσμα μαζικών μεταθέσεων από το χρωμόσωμα X στο Y που συνέβησαν πριν από 3-4 εκατομμύρια χρόνια, μετά την γενεαλογική απόκλιση του ανθρώπου από τον χιμπατζή [131,132].

Οι X-εκφυλισμένες αλληλουχίες της αρρενο-ειδικής περιοχής περιέχουν γονίδια που βρίσκονται σε ένα μόνο αντίγραφο ή ψευδογονίδια ομόλογα με 27 γονίδια που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα X. Οι παραπάνω αλληλουχίες επιδεικνύουν 60%-96% νουκλεοτιδική ταυτότητα με τις ομόλογές τους αλληλουχίες στο χρωμόσωμα X και μοιάζουν να είναι κατάλοιπα αρχέγονων αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων από τα οποία εξελίχθηκαν τα χρωμοσώματα X και Y.

Τα αμπλικονικά τμήματα, είναι μεγάλες σε μήκος επαναλαμβανόμενες μονάδες, οι αλληλουχίες των οποίων επιδεικνύουν αξιοσημείωτη ομοιότητα (ως και 99% ταυτότητα σε έκταση δεκάδων ή και εκατοντάδων χιλιοβάσεων).



4.5. ΕΙΔΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ Y

DYS14

Το ανθρώπινο ειδικό γονίδιο του χρωμοσώματος Y TSPY (testis-specific protein Y-encoded) καθορίστηκε με τη βοήθεια της ειδικής γενετικής αλληλουχίας pJA36B2 (DYS14), η οποία ανιχνεύει μια poly (A)⁺ αλληλουχία που μεταγράφεται σε RNA στον ανθρώπινο ορχικό ιστό. Το pJA36B2 (DYS14), όπως αποδείχθηκε, είναι ένα ψευδογονίδιο στο pJA923 (TSPY), διότι μόνο pJA923-ειδικές αλληλουχίες ανακαλύφθηκαν στο mRNA. Η PCR ανάλυση γενωμικού DNA απέδειξε την παρουσία του στο μέσο του βραχέος βραχίονα του χρωμοσώματος Y. Η ανάλυση της αλληλουχίας του DNA, αποκάλυψε μία περιοχή 522 ζευγών βάσεων από τη θέση 97 ως τη θέση 618, χωρίς την παρουσία κάποιας αλληλουχίας που να ρυθμίζει την μεταγραφή. Αυτό αποδεικνύει ότι μόνο ένα εξόνιο μεταφραζόμενης περιοχής είναι παρόν στο pJA36B2.

DYZ1

Το μεγαλύτερο μέρος του μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος Y είναι ετεροχρωματικό. Το μήκος του παρουσιάζει ποικιλομορφία στον ανθρώπινο ανδρικό πληθυσμό. Η οικογένεια DYZ1 αποτελεί το κύριο συστατικό της ετεροχρωματικής περιοχής του μακρού βραχίονα. Το μέγεθός της είναι 3,56 kb και αποτελείται από επαναλαμβανόμενα πεντανουκλεοτίδια που διαχωρίζονται από πέντε νουκλεοτίδια. Η Southern ανάλυση άρρενος γενωμικού DNA απέδειξε την παρουσία πολλών θέσεων αναγνώρισης από ενδονουκλεάσες στα 3,56 kb της DYZ1 οικογένειας. Αυτό αποδεικνύει ότι η επαναλαμβανόμενη DYZ1 οικογένεια προέκυψε από άνισες γενετικές διασταυρώσεις μέσα



στο τμήμα των 3,56 kb. Η αλληλουχία DYZ1 που μελετήθηκε, παρουσιάζει 800 με 5000 αντίγραφα.

DYZ3

Η οικογένεια DYZ3 (alphoid satellite DNA) αποτελεί το κύριο συστατικό του κεντομεριδίου του χρωμοσώματος Y. Το μέγεθός της είναι 5,7 kb και παρουσιάζει περιοδικότητα 170 bp. Τα μεγέθη των τμημάτων κυμαίνονται από 250 ως 1400 bp. Το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης αλληλουχίας με PCR ανάλυση είναι 10^{-5} μl αίματος, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των αντιγράφων.

AMELY

Η αμυλογενίνη είναι μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στην ανάπτυξη της οδοντικής αδαμαντίνης μετριάζοντας το μέγεθος των κρυστάλλων υδροξυαπατίτη. Μια γενετική διαταραχή στην ανάπτυξη της αδαμαντίνης συνδέθηκε με το γονίδιο της αμυλογενίνης, το οποίο ρυθμίζει το πάχος της αδαμαντίνης και το μέγεθος των δοντιών και βρίσκεται στα φυλετικά χρωμοσώματα. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, υπάρχουν δύο AMEL περιοχές με ένα αντίγραφο σε κάθε φυλετικό χρωμόσωμα (AMELX και AMELY) (εικόνα 5), ενώ στα ποντίκια μόνο το AMELX είναι παρόν. Έχουν παρατηρηθεί διαφορές στις πρωτεΐνες που παράγονται από τα δύο αντίγραφα του γονιδίου αυτού. Το γονίδιο της αμυλογενίνης ανήκει στην κατηγορία των ευχρωματινικών αλληλουχιών της MSY και συγκεκριμένα στις X-μεταθετές αλληλουχίες και βρίσκεται στον βραχύ βραχίονα του Y χρωμοσώματος (εικόνα 6).

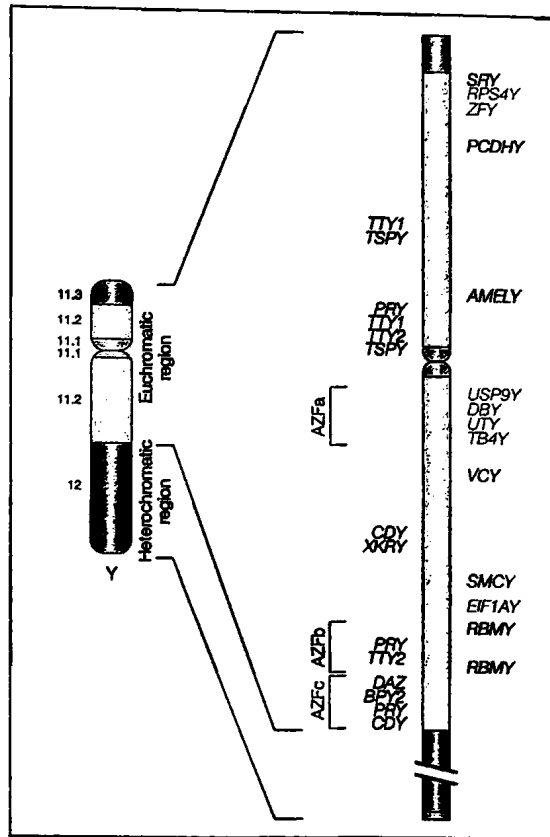


SRY

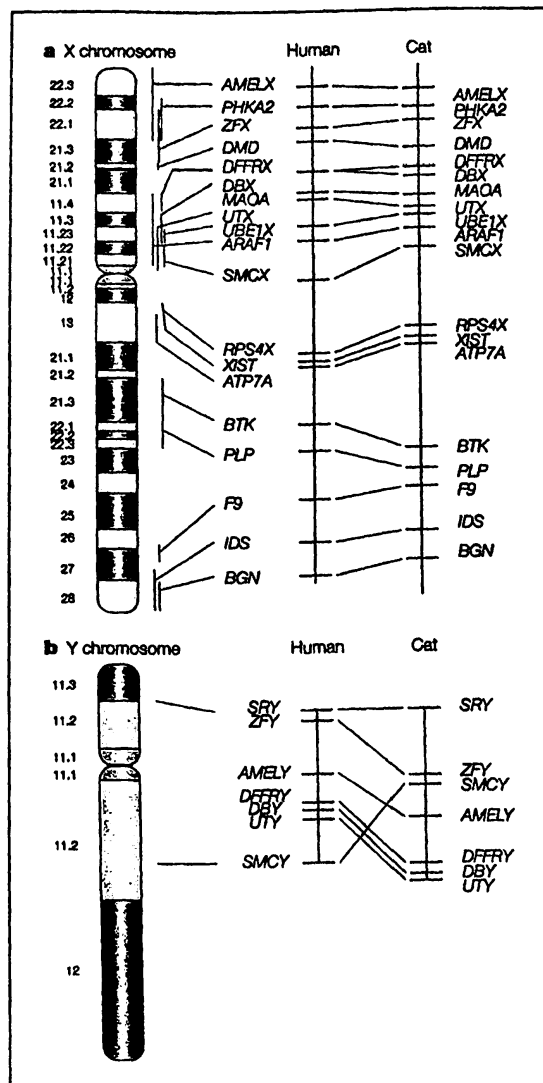
Οι πρώτες ενδείξεις ότι το χρωμόσωμα Y εμπλέκεται με τον καθορισμό του φύλου, προήλθαν από την παρατήρηση ότι τα άτομα XY και XYY (Σύνδρομο Klinefelter) αναπτύσσουν αρρενα γεννητικά όργανα ενώ τα άτομα XX και XO (Σύνδρομο Turner) θήλεα γεννητικά όργανα [133]. Αργότερα, μελέτες έδειξαν ότι ποντίκια με γονότυπο XX, παρουσίαζαν άρρεν φαινότυπο λόγω της παρουσίας ειδικής γεννητικής αλληλουχίας του χρωμοσώματος Y [134]. Αυτή η ειδική γεννητική αλληλουχία, που ήταν υπεύθυνη για την παρουσία άρρενων γεννητικών οργάνων, περιείχε ένα γονίδιο το οποίο αργότερα ανιχνεύθηκε από τους Sinclair et. al. [135], και ονομάστηκε SRY (Sex-determining Region).

Το γονίδιο SRY κλωνοποιήθηκε με την απομόνωση αλληλουχιών του χρωμοσώματος Y από ασθενείς με γονότυπο XX. Το γονίδιο αυτό βρίσκεται στο βραχύ βραχίονα του χρωμοσώματος Y, κοντά στην ψευδοαυτοσωμική περιοχή (εικόνα 6). Αποτελείται από ένα εξόνιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 204 αμινοξέων, η οποία ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση. Το γονίδιο αυτό βρέθηκε να είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των άρρενων γεννητικών οργάνων και τη διαφοροποίηση των αδιαφοροποίητων γονάδων προς αυτή την οδό. Επιπλέον, το γονίδιο SRY προτάθηκε ως το κύριο γονίδιο που ρυθμίζει το σύνολο των διεργασιών για την ανάπτυξη των όρχεων.





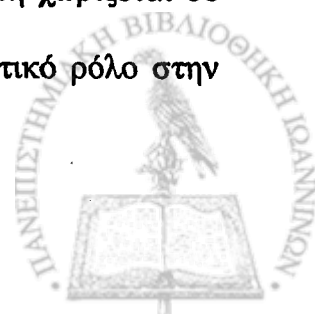
Εικόνα 5. Ενεργά γονίδια του ανθρώπινου χρωμοσώματος Y. Η ευχρωματινική περιοχή του χρωμοσώματος Y περιέχει γονίδια που παρουσιάζουν ενεργά ομόλογα στο χρωμόσωμα X (δεξιά πλευρά) και κάποια που δεν παρουσιάζουν ομόλογα (αριστερή πλευρά). Κάποια γονίδια παρουσιάζουν εκφράζονται γενικά (κόκκινο χρώμα), κάποια άλλα εκφράζονται μόνο στους όρχεις (μαύρο χρώμα), ενώ κάποια άλλα εκφράζονται σε άλλα όργανα (πράσινο χρώμα), όπως το γονίδιο της αμυλογενίνης (AMELY). Εκτός από το SRY, όλα τα γονίδια που εκφράζονται στους όρχεις παρουσιάζουν πολλά αντίγραφα. Στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος Y παρατηρούνται τρεις περιοχές, που παρουσιάζουν συχνά ελλείμματα στους υπογόνιμους άνδρες, οι AZF a,b,c (azoospermia factor region a,b,c).



Εικόνα 6. Τα φυλετικά χρωμοσώματα στα θηλαστικά. Ομολογία γονιδίων στα φυλετικά χρωμοσώματα.

AZF Αλληλουχίες

Η ανίχνευση του Y χρωμοσώματος στηρίζεται σε μεγάλο μέρος σε αλληλουχίες της περιοχής AZF που βρίσκεται στην περιοχή Yq11 (εικόνα 7). Η περιοχή αυτή χωρίζεται σε τρεις υποπεριοχές (AZFa, AZFb, AZFc) που όπως βρέθηκε παίζουν σημαντικό ρόλο στην



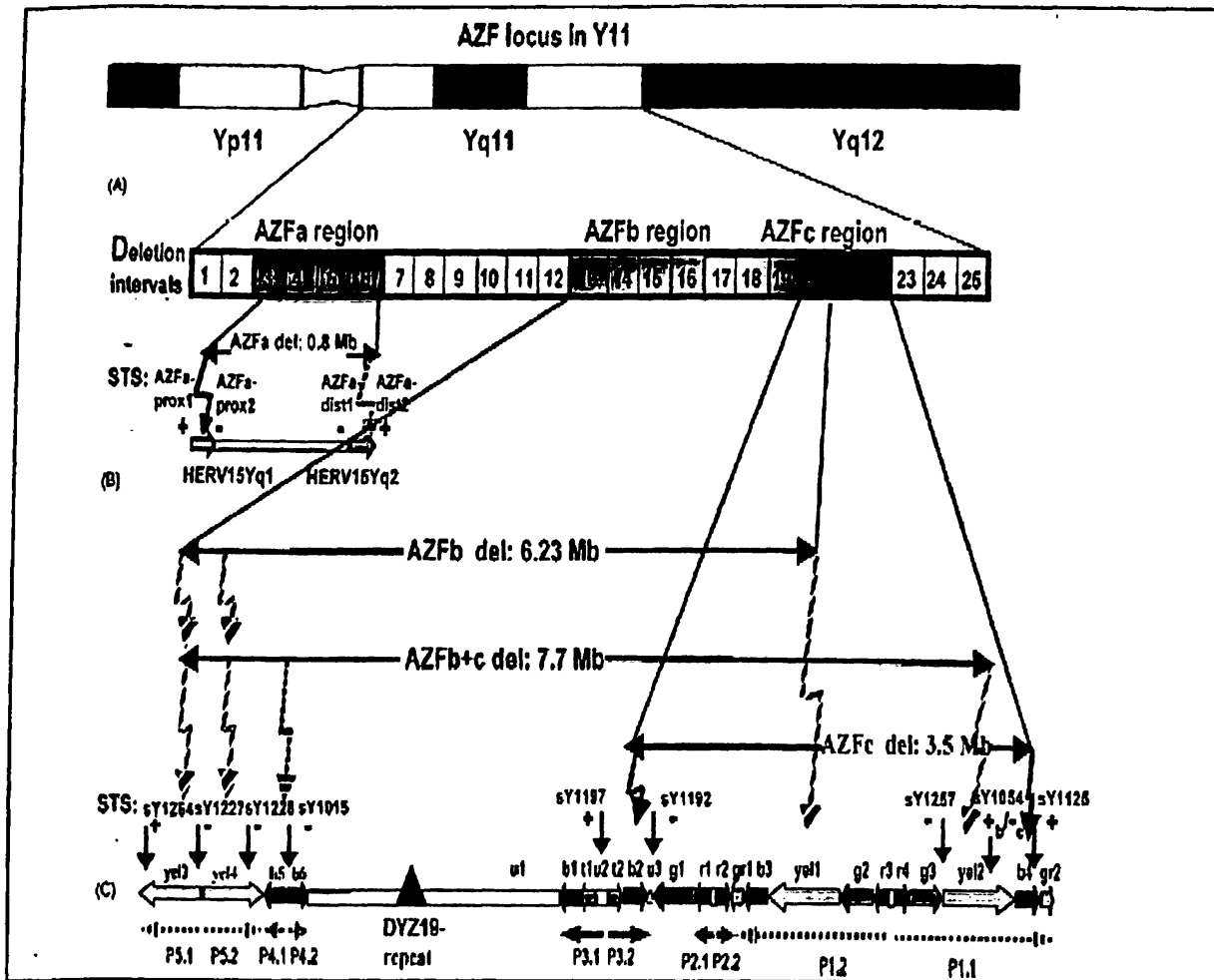
σπερματογένεση. Η πρώτη από αυτές, η AZFa, βρίσκεται στο κεντρικό τμήμα του διαστήματος 5 (υποδιάστημα 5C). Η AZFb εκτείνεται από την ακριανή περιοχή του διαστήματος του 5 στο εγγύ τμήμα του 6 (υποδιαστήματα 5O-6B). Η AZFc βρίσκεται ακριβώς δίπλα στην ετεροχρωματινική περιοχή του Y χρωμοσώματος, ανάμεσα στα υποδιαστήματα 6C και 6E.

AZFa: Η AZFa περιοχή βρίσκεται στο κεντρικό τμήμα της περιοχής Yq11. Η μοριακή ανάλυση της AZFa περιοχής περιλαμβάνει την χρήση των δύο ανώνυμων μοριακών δεικτών STS sY84 και sY86 και επιβεβαιώνεται με τη χρησιμοποίηση των εκκινητών STS sY82 για το εγγύ άκρο της περιοχής και τον sY88 για το μακρινό άκρο της περιοχής (εικόνα 8).

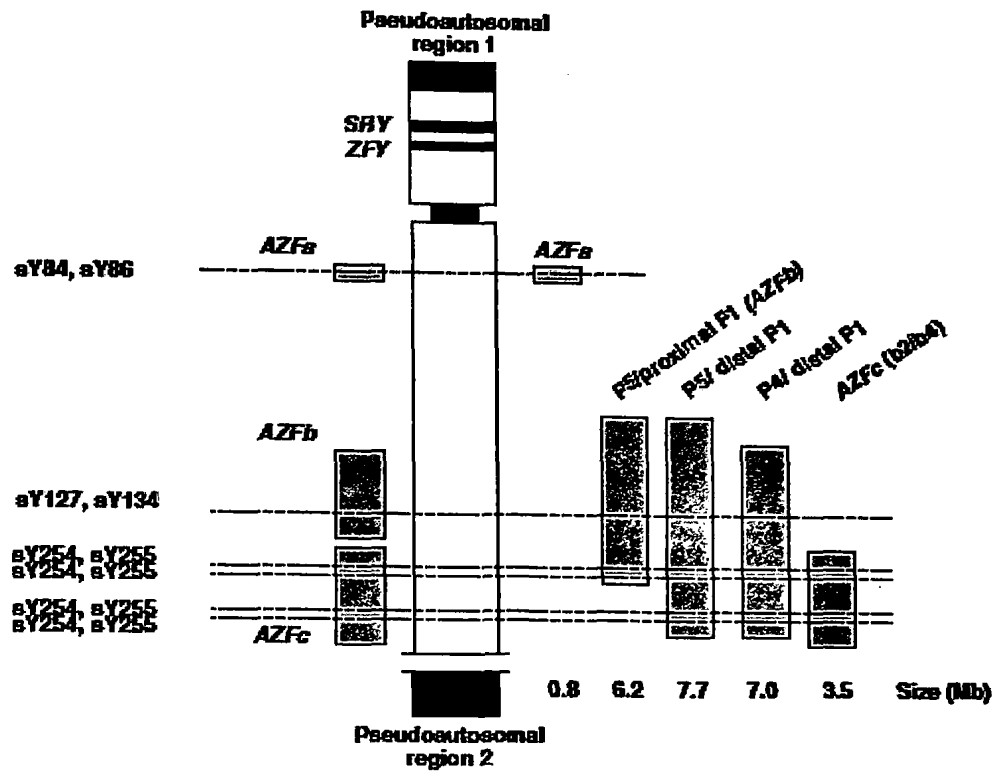
AZFb: Η AZFb έχει μέγεθος 6.2 Mb (περιλαμβάνει 32 αντίγραφα γονιδίων και μεταγραφικές μονάδες) και αποτελεί συνέπεια του ομόλογου ανασυνδιασμού ανάμεσα στα παλίνδρομα P5/εγγύ P1 [133]. Οι δύο ανώνυμοι δείκτες sY127 και sY134 βρίσκονται στο μεσαίο και ακραίο τμήμα της AZFb. Αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί και με τη χρησιμοποίηση των δύο ακόλουθων δεικτών: sY105 για το εγγύ άκρο και το sY152 για το μακρινό άκρο (εικόνα 8).

AZFc: Η AZFc περιλαμβάνει 12 γονίδια και μεταγραφικές μονάδες, κάθε ένα παρών σε μεταβαλλόμενο πλήθος αντιγράφων συνιστώντας στο σύνολο 32 αντίγραφα [133]. Οι δύο δείκτες sY254 και sY255 είναι ειδικοί για το γονίδιο DAZ, που είναι παρών σε τέσσερα αντίγραφα τοποθετημένα σε δύο σύμπλοκα δύο γονιδίων το καθένα σε αντίθετο προσανατολισμό στα παλίνδρομα P2 και P1 αντίστοιχα στην αλληλουχία MSY [134] (εικόνα 8).





Εικόνα 7. Σχηματική άποψη της AZF περιοχής στην Yq11. (A) Η AZF περιοχή διαιρέθηκε για πρώτη φορά σε τρεις περιοχές με τη χρήση μοριακής ανάλυσης στο χάρτη του Vogt et al (1996) [136], ο οποίος χώρισε την Yq11 σε διαστήματα (D1-D25).



Εικόνα 8. Σχηματική άποψη της AZF περιοχής στο χρωμόσωμα Y. Η AZF περιοχή αποτελείται από τρεις περιοχές (AZFa, AZFb, AZFc). Απεικόνιση των κύριων μοριακών δεικτών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των τριών περιοχών της AZF.

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

•••••

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

•••••



ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της μελέτης αυτής είναι ο έλεγχος της παρουσίας μεταλλάξεων και πολυμορφισμών πατρικής προέλευσης στο γονίδιο της β-σφαιρίνης στην κυκλοφορία της μητέρας κατά την κύηση. Οι πολυμορφισμοί είναι εξίσου χρήσιμοι στην προγεννητική διάγνωση με τις μεταλλάξεις επειδή συγκληρονομούνται με αυτές. Η απομόνωση από το μητρικό αίμα και ορό, του μητρικού και εμβρυϊκού DNA αντίστοιχα δίνει τη δυνατότητα να πραγματοποιηθεί ανάλυση των γονοτύπων της μητέρας και του εμβρύου. Από την ανάλυση αυτή, μπορεί να επιτευχθεί έμμεση εύρεση του παθολογικού γονοτύπου του πατέρα και της πατρικής συνεισφοράς στο έμβρυο. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατό να μειωθεί ο αριθμός επεμβάσεων του προγεννητικού ελέγχου κατά το ήμισυ, επιτυγχάνοντας πρόβλεψη του κινδύνου και ταχύτερα αποτελέσματα στις προγεννητικές διαγνώσεις.

Το γονεϊκό DNA χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση των μεταλλάξεων ή γενετικών πολυμορφισμών του γονιδίου της β-σφαιρίνης που φέρουν τα άτομα αυτά. Μελετήθηκαν επτά από τους συχνότερους πολυμορφισμούς που παρουσιάζει το γονίδιο της β-σφαιρίνης τόσο σε οικογένειες ετεροζυγωτών, όσο και σε ζευγάρια του γενικού πληθυσμού. Στα ζευγάρια των ετεροζυγωτών για τη β-μεσογειακή αναιμία πραγματοποιήθηκε ανάλυση των απλοτύπων καθώς και των μεταλλάξεων που φέρουν. Με τον τρόπο αυτό, βρέθηκε το ποσοστό των ζευγαριών που παρουσιάζουν ένα τουλάχιστον πληροφοριακό πολυμορφισμό, το ποσοστό πληροφοριακότητας κάθε πολυμορφισμού, καθώς και αν τα ποσοστά αυτά παρουσιάζουν διαφοροποίηση ανάμεσα στους πληθυσμούς φορέων και μη-φορέων ατόμων. Από την ανάλυση αυτή, βρέθηκε το αν οι μεταλλάξεις ή οι πολυμορφισμοί αποτελούν



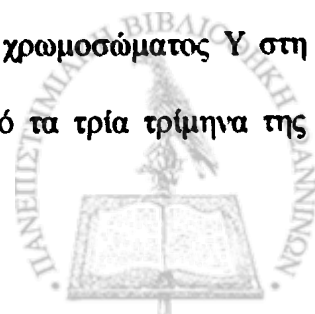
καλύτερο δείκτη για τη μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση των αιμοσφαιρινοπαθειών, με τη χρήση ελεύθερου εμβρυϊκού DNA.

Το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA χρησιμοποιήθηκε για την μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Ελέγχθηκε επίσης η παρουσία ειδικών αλληλουχιών του χρωμοσώματος Y στη μητρική κυκλοφορία και πραγματοποιήθηκε συνεπώς έμμεση εύρεση του φύλου του εμβρύου. Η ανίχνευση αλληλουχιών του Y χρωμοσώματος στο μητρικό ορό κατά τη διάρκεια της κύησης αποτελεί τον κυριότερο δείκτη πατρικής συνεισφοράς. Μελετήθηκε επίσης η πιθανή παραμονή ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία μετά τον τοκετό και οι συνέπειες που μπορεί αυτή να έχει.

2. ΥΛΙΚΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ζευγάρια που επιθυμούν τον προγεννητικό έλεγχο της μεσογειακής αναιμίας, καθώς και σε ζευγάρια που ανήκουν στον γενικό πληθυσμό, τα οποία παρακολουθούνται στην Γυναικολογική και Μαιευτική Κλινική του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Όλα τα άτομα που συμμετείχαν σε αυτή τη μελέτη έδωσαν την συγκατάθεσή τους για την επεμβατική και τη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση, σύμφωνα με τη διακήρυξη του Ελσίνκι και τους κανόνες βιοηθικής. Για την ανάλυση των μεταλλάξεων ή γενετικών πολυμορφισμών του γονιδίου της β-σφαιρίνης συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από 97 ζευγάρια ετεροζυγωτών της β-μεσογειακής αναιμίας και από 100 ζευγάρια που ανήκουν στον γενικό πληθυσμό.

Για την μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου της β-σφαιρίνης και τον έλεγχο παρουσίας των ειδικών αλληλουχιών του χρωμοσώματος Y στη μητρική κυκλοφορία, πραγματοποιήθηκε συλλογή δειγμάτων και από τα τρία τρίμηνα της



κήσης. Συλλέχθηκαν οροί γυναικών που διανύουν το τρίτο τρίμηνο της κύησης, στους οποίους το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA παρουσιάζει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Συλλέχθηκαν επίσης οροί γυναικών και από τα άλλα τρίμηνα της κύησης για να διαπιστωθεί η ειδικότητα και η ευαισθησία της μεθόδου σε αυτά. Για την ανίχνευση ειδικών γενετικών αλληλουχιών του χρωμοσώματος Y στη μητρική κυκλοφορία την 7^η εβδομάδα της κύησης συλλέχθηκαν 60 δείγματα ορού εγκύων γυναικών. Για τον έλεγχο της παραμονής ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία μετά τον τοκετό, συλλέχθηκαν 30 δείγματα ορού γυναικών που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα 24 ώρες μετά τον τοκετό. Ως δείγματα ελέγχου συλλέχθηκαν 20 δείγματα ορού 24 ώρες μετά τον τοκετό θηλέων εμβρύων. Σε 37 από τα 97 ζευγάρια ετεροζυγωτών που μελετήθηκαν, συλλέχθηκαν επίσης δείγματα ορού για την επίτευξη μη επεμβατικής προγεννητικής ανίχνευσης μεταλλάξεων του γονιδίου της β-σφαιρίνης στο έμβρυο.

3. ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

3.1. Γενετικός έλεγχος πολυμορφισμών

Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν είναι πολυμορφισμοί μεγέθους περιοριστικού τμήματος (RFLPs) του γονιδίου της β-σφαιρίνης, οι εξής:

AvaII/β, AvaII/ψβ, HindII/5'ψβ, HindII/3'ψβ, HindIII/Gγ, XmnI/Gγ, HinfI/β

Η γενετική ανάλυση των πολυμορφισμών περιλαμβάνει:

- Εξαγωγή DNA από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος



- Εκλεκτική ενίσχυση του γενωμικού DNA που περιέχει τους αντίστοιχους πολυμορφισμούς με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).
- Πέψη των προϊόντων της αντίδρασης PCR με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και προσδιορισμός των μοριακών παραλλαγών των πολυμορφισμών μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης σε πηκτή αγαρόζης.

3.2. Γενετικός έλεγχος μεταλλάξεων

Η γενετική ανάλυση των μεταλλάξεων του γονιδίου της β-σφαιρίνης στα ζευγάρια των ετεροζυγωτών περιλαμβάνει:

- Εξαγωγή DNA από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος
- Εκλεκτική ενίσχυση του γενωμικού DNA που περιέχει τις αντίστοιχες μεταλλάξεις με τη μέθοδο της PCR και ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου που περιέχει κλίση πυκνότητας αποδιατακτικών παραγόντων (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE).
- Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με την μέθοδο ARMS (Amplification refractory mutation system).

3.3. Γενετική ανάλυση εμβρυϊκού DNA

Οι γενετικές αλληλουχίες που μελετήθηκαν στο ελεύθερο εμβρυϊκό DNA είναι οι εξής:



1. Ειδικές γενετικές αλληλουχίες του χρωμοσώματος Y (DYS14, DYZ1, DYZ3, AMELY, SRY, sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255 και άλλες) για την ανίχνευση του φύλου του εμβρύου.
2. Γενετικές αλληλουχίες του γονιδίου της β-σφαιρίνης, που φέρουν μεταλλάξεις υπεύθυνες για αιμοσφαιρινοπάθειες, για την ανίχνευση της πατρικής συνεισφοράς.

Η παραπάνω γενετική ανάλυση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA περιλαμβάνει:

- Εξαγωγή εμβρυϊκού DNA από το μητρικό ορό.
- Εκλεκτική ενίσχυση του εμβρυϊκού DNA που περιέχει τις αντίστοιχες γενετικές αλληλουχίες με τη μέθοδο της PCR.
- Προσδιορισμός του εμβρυϊκού γονοτύπου μετά από ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης.

4. ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

4.1. ΕΞΑΓΩΓΗ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΑ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΑ

Για την απομόνωση DNA από τα περιφερικά λευκοκύτταρα χρησιμοποιείται περιφερικό αίμα που έχει συλλεχθεί σε δοχεία που περιέχουν EDTA ως αντιπηκτικό. Από κάθε δείγμα λαμβάνονται 750μl αίματος και προστίθονται 750μl TKM και 25μl IGEPAL για την λύση και απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Μετά από ανάδευση το μείγμα φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 10.000 στροφές/sec.

Το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα πλένεται με 500μl TKM και μετά από καλή ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 sec στις 10.000 στροφές/sec. Αυτή η διαδικασία



επαναλαμβάνεται για 3-4 φορές μέχρι να εξαλειφθεί πλήρως το σκούρο χρώμα των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Στο καθαρό ίζημα των λευκών αιμοσφαιρίων προστίθενται 200μl TKM και 15μl SDS 10% και μετά από καλή ανάδευση τοποθετείται για τουλάχιστον 5 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 55° C προκειμένου να γίνει λύση των λευκών αιμοσφαιρίων. Στη συνέχεια προστίθενται 80μl διαλύματος χλωριούχου νατρίου 6M για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Ακολουθεί και πάλι καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 12.000 στροφές/sec.

Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο διάλυμα, το οποίο περιέχει διαλυμένο το DNA, μεταφέρεται προσεκτικά, σε 750μl απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης θερμοκρασίας – 20°C. Μετά από ελαφρά ανάδευση, η αιθανόλη απομακρύνει τα μόρια νερού και το διαλυμένο DNA αποκτά μορφή επιπλέοντος βλενώδους υλικού. Ακολουθεί απομόνωση του DNA με τη βοήθεια του ρύγχους μιας πιπέτας και διάλυση σε 50 μl TE, το οποίο φυλάσσεται για όσο διάστημα χρειαστεί στους 4°C.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή του DNA είναι τα εξής:

TKM: 10mM Tris-HCl (pH=7,6), 10mM KCl, 2mM EDTA, 4mM MgCl₂

IGEPAL (Sigma)

SDS: Sodium dodecyl sulphate 10% (Sigma)

TE: 10mM Tris-HCl (pH=7,8), 1mM EDTA (pH=8)



4.2. ΕΞΑΓΩΓΗ ΕΜΒΡΥΪΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΟΡΟ

Για την απομόνωση εμβρυϊκού DNA από το μητρικό ορό χρησιμοποιείται περιφερικό αίμα που έχει συλλεχθεί σε δοχεία Wasserman. Το αίμα φυγοκεντρείται στις 3000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Ο ορός φυγοκεντρείται ξανά στις 3000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά και απομονώνεται το υπερκείμενο. Η απομόνωση του εμβρυϊκού DNA πραγματοποιείται με τη βοήθεια του QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), ακολουθώντας το πρωτόκολο για το αίμα και τα υγρά σώματος μετά από κατάλληλες τροποποιήσεις.

Από κάθε δείγμα λαμβάνονται 5 ml αίματος και προστίθενται 500 μl πρωτεάσης και 5 ml διαλύματος AL. Μετά από ανάδευση το μείγμα τοποθετείται για τουλάχιστον 10 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 56° C προκειμένου να γίνει λύση των λευκών αιμοσφαιρίων. Μετά το πέρας των 10 λεπτών, προστίθενται 5 ml απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης για τον τερματισμό της δράσης της πρωτεάσης. Μετά από καλή ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 sec στις 10.000 στροφές/λεπτό. Το μείγμα τοποθετείται ανά 700 μl στην κολώνα καθαρισμού και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να περάσει όλο το μείγμα από τον ηθμό της κολώνας.

Στον ηθμό της κολώνας κατακρατείται το DNA, το οποίο όμως δεν είναι καθαρό. Στη συνέχεια προστίθενται 500 μl διαλύματος AW1 για τον καθαρισμό του DNA και την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Ακολουθεί και πάλι φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 8.000 στροφές/λεπτό. Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία για το διάλυμα AW2 αλλά αυτή τη φορά η φυγοκέντρηση γίνεται στις 13000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά.

Μετά τη φυγοκέντρηση, στον ηθμό περιέχεται διαλυμένο το DNA. Στη συνέχεια προστίθενται 60 μl απεσταγμένου νερού στον ηθμό και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές/λεπτό για 2 λεπτά



κατακρημνίζεται το καθαρό DNA, το οποίο φυλάσσεται για όσο διάστημα χρειαστεί στους 4°C.

4.3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια μέθοδος η οποία δίνει τη δυνατότητα παραγωγής πολλών αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος DNA με μεγάλη ταχύτητα και ευαισθησία (εικόνα 1). Αναλυτικότερα η PCR αποτελείται από τρία στάδια:

1. Στάδιο αποδιάταξης του DNA (denaturation)

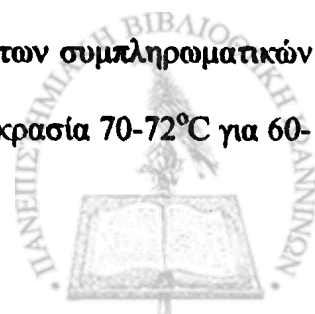
Η αντίδραση επιτυγχάνεται σε υψηλή θερμοκρασία (92-96°C για 30-60sec). Με αυτό τον τρόπο σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν της δύο αλυσίδες της διπλής έλικας του DNA και το DNA αποδιατάσσεται σε μονόκλωνο.

2. Στάδιο υβριδισμού του γενωμικού DNA με τους εκκινητές (annealing)

Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται με μείωση της θερμοκρασίας στους 35°C με 70°C για 20-60 sec. Σε αυτό επιτυγχάνεται υβριδισμός των εκκινητών (primers) στα αντίστοιχα σημεία των ανοικτών αλυσίδων του DNA. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μεγέθους 15-30 βάσεων τα οποία απομονώνουν την αλληλουχία του DNA που επιθυμούμε να πολλαπλασιάσουμε. Αποτελούνται από διαφορετικές μη συμπληρωματικές αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να μην υβριδίζονται μεταξύ τους, αλλά με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA. Η θερμοκρασία αυτού του σταδίου καθώς και η συγκέντρωση των εκκινητών είναι καθοριστικοί παράγοντες για την επιτυχία της αντίδρασης.

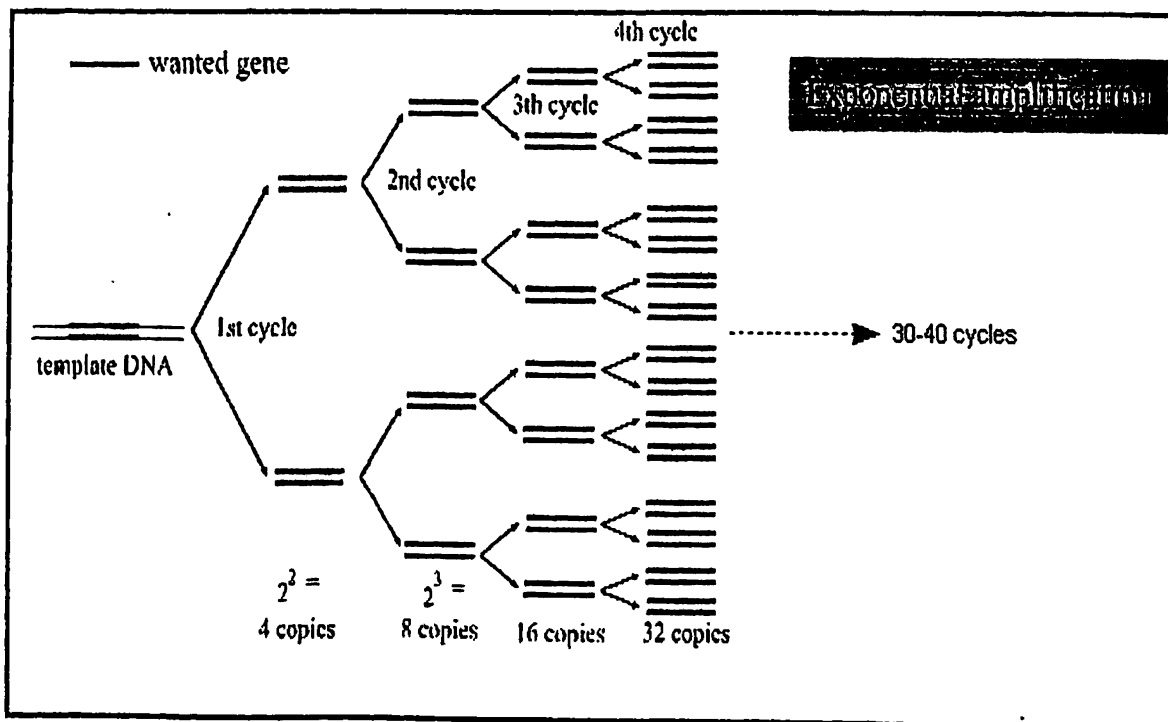
3. Στάδιο επιμήκυνσης-σύνθεσης νέου DNA (extension)

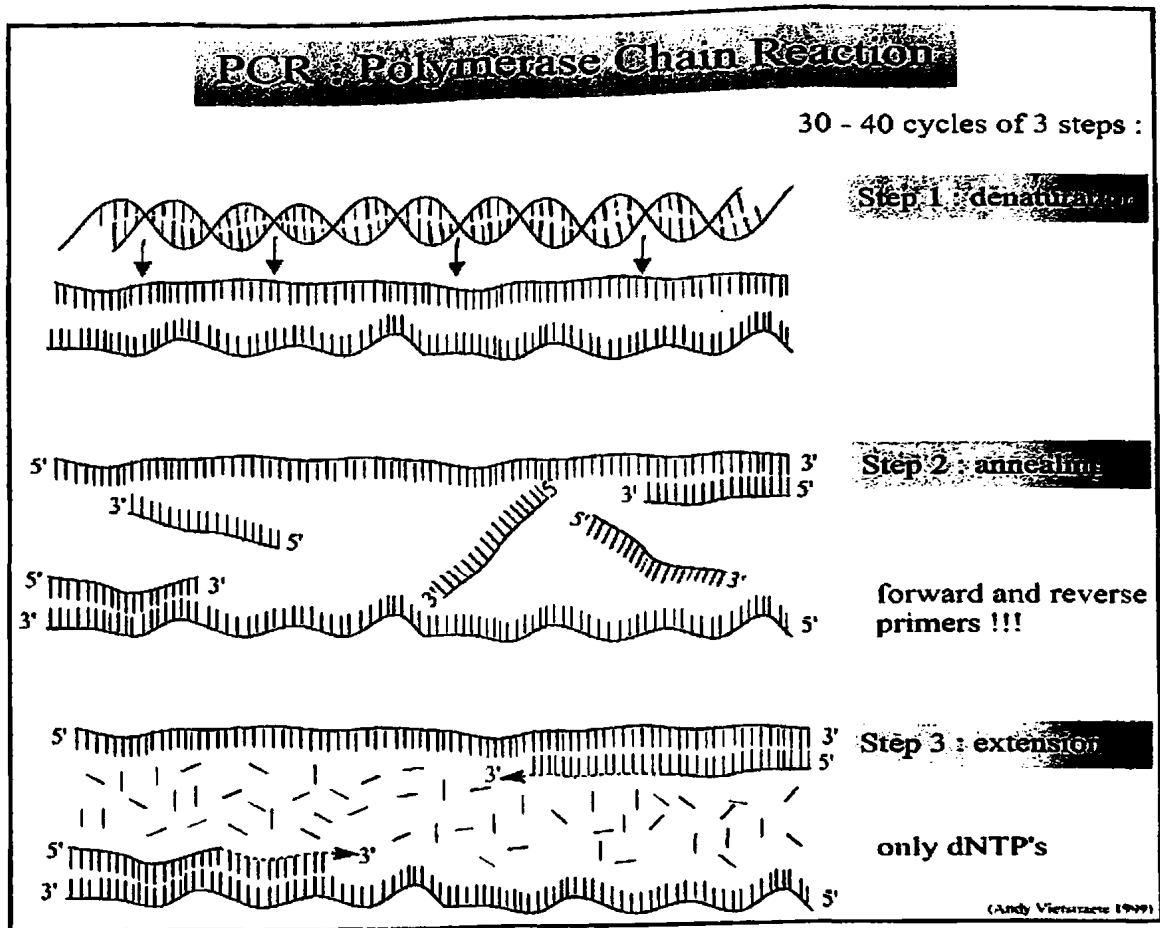
Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών σε θερμοκρασία 70-72°C για 60-



180 sec. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται με τη χρήση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης (Taq DNA polymerase). Πρόκειται για ένα θερμοανθεκτικό ένζυμο που μιμείται τον τρόπο με τον οποίο τα ένζυμα του κυτταρικού πυρήνα διπλασιάζουν το DNA προκειμένου το κύτταρο να προχωρήσει σε μίτωση.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ένα διάλυμα που αποτελείται από το DNA, το κατάλληλο ζεύγος εκκινητών, ιόντα μαγνησίου, ισομοριακό μείγμα των τεσσάρων δεοξυριβοτριφωσφωρικών νουκλεοτιδίων [dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP]





Εικόνα 1. Διαγραμματική απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης

(Promega) και Taq DNA πολυμεράση (Invitrogen, Life Technologies, USA) με το συνοδό ρυθμιστικό διάλυμά της. Σε μια τυπική PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης νέου DNA μπορεί να επαναληφθεί συνήθως 30-40 φορές. Η διαδικασία είναι εκθετική αφού τα πολλαπλασιασμένα προϊόντα από τον προηγούμενο κύκλο χρησιμοποιούνται ως νέα καλούπια για τον επόμενο κύκλο πολλαπλασιασμού καταλήγοντας έτσι στο σχηματισμό περισσότερων από 2^{30} ή 1 δισεκατομμυρίου ακριβών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA.

Όλη η διαδικασία προετοιμασίας του διαλύματος της αντίδρασης γίνεται με γάντια. μέσα σε ειδικές θήκες με πάγο και τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα. Στο

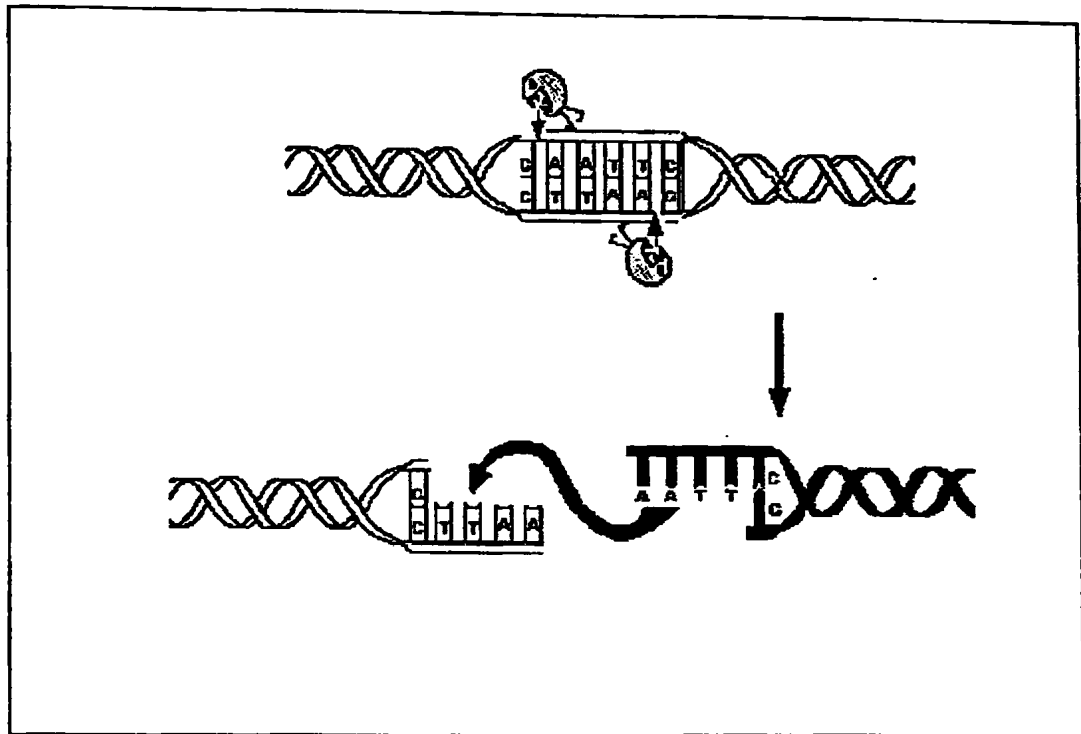


διάλυμα προστίθεται παραφινέλαιο σαν επικάλυψη για προστασία από την εξάτμιση καθώς στη συνέχεια θα εκτεθεί σε υψηλές θερμοκρασίες. Το μηχάνημα που χρησιμοποιείται για τις αντιδράσεις PCR είναι αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής PTC-100 (Peltier-Effect Cycling, MJ Research, Inc, USA). Η ανάλυση των PCR προϊόντων γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

• 4.4. ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες του DNA και κόβουν το μόριο μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν μήκος συνήθως 4-8 νουκλεοτίδια και συχνά είναι παλίνδρομες, δηλαδή διαβάζονται το ίδιο και από τις δύο κατευθύνσεις του DNA ($5' \rightarrow 3'$ και $3' \rightarrow 5'$) (Εικόνα 2). Ένας πολυμορφισμός μπορεί να εξαλείψει ή να δημιουργήσει μια θέση αναγνώρισης από περιοριστική ενδονουκλεάση. Μετά την επώαση του PCR προϊόντος με τη κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση κάτω από κατάλληλες συνθήκες, θα πάρουμε τμήματα διαφορετικού μεγέθους ως προϊόντα της πέψης με αποτέλεσμα να ταυτοποιηθεί ο πολυμορφισμός.



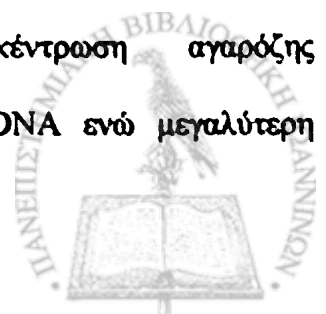


Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της δράσης των περιοριστικών ενδονουκλεασών. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα η περιοριστική ενδονουκλεάση αναγνωρίζει την αλληλουχία CTTAA

4.5. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει το διαχωρισμό των τμημάτων DNA σύμφωνα με το μέγεθος τους. Η πηκτή αγαρόζης είναι εμπλουτισμένη με 0,5mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διάλυμα TBE (89mM Tris-HCl, 89mM Boric acid, 2.5mM EDTA pH=8.0). Η ταχύτητα κίνησης και επομένως η απόσταση που διανύουν μέσα στη πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από:

- Το μοριακό βάρος του DNA (αντιστρόφως ανάλογη)
- Τη διαμόρφωση του DNA (κυκλικό, γραμμικό)
- Τη συγκέντρωση της αγαρόζης (μικρή συγκέντρωση αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μεγάλων τμημάτων DNA ενώ μεγαλύτερη



συγκέντρωση χρησιμοποιείται για τα μικρά τμήματα. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε πηκτή αгарόζης 2% και 3%.)

- Τη διαφορά τάσης του ηλεκτροφορητικού πεδίου. Σε χαμηλή τάση ρεύματος (Volt) η κινητικότητα του γραμμικού DNA είναι ανάλογη της τάσης και η δυνατότητα διαχωρισμού ελαττώνεται όταν αυξάνεται η τάση του ρεύματος.

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η HORIZON 11-14 (GIBRO BRL, USA). Οι ηλεκτροφορητικές ζώνες των PCR προϊόντων φωτογραφίζονται σε υπεριώδες φως στο τέλος της ηλεκτροφόρησης και ακολουθεί ανάλυση αυτών. Το βρωμιούχο αιθίδιο όταν είναι δεσμευμένο σε DNA δίνει έντονο πορτοκαλί χρώμα φθορισμού.

4.6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΚΛΙΣΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ (D.G.G.E.)

4.6.1. Γενικά

Με την ηλεκτροφόρηση σε κλίση πυκνότητας αποδιατακτικών παραγόντων (DGGE) μπορούμε να ανιχνεύσουμε απλές αλλαγές βάσεων (αντικατάσταση, αφαίρεση, πρόσθεση), καθώς επίσης και ελλειμάτων μερικών δεκάδων βάσεων στο μόριο του DNA. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στο διαχωρισμό δύο τύπων δίκλωνου μορίου DNA, του αγρίου και του μεταλλαγμένου, σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου που περιέχει αποδιατακτικές ουσίες (ουρία και φορμαμίδιο) με συγκεκριμένη κλίση συγκέντρωσης.

Ο διαχωρισμός των δύο αλυσίδων του DNA εξαρτάται από τη συχνότητα των βάσεων αδενίνης-θυμίνης και γουανίνης-κυτοσίνης. Οι δεσμοί που συγκρατούν τις αλυσίδες του DNA σε δίκλωνη μορφή είναι υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων.



Οι υδρογονικοί δεσμοί δεν είναι σταθεροί, αλλά στο σύνολο τους δίνουν μεγάλη σταθερότητα στη στερεοδιάταξη του μορίου του DNA. Το DNA έχει την τάση να αποδιατάσσεται σαν σύνολο. Η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA σε μονόκλωνο γίνεται αρκετά άπλοτα μέσα σε λίγους βαθμούς θερμοκρασίας. Αυτό οφείλεται στο φαινόμενο της συνεργατικότητας των βάσεων. Η σύνδεση ενός ζευγαριού βάσεων σταθεροποιεί και τα γειτονικά ζευγάρια, ενώ αντίθετα η αποδιάταξή του τα εξασθενεί.

Αποδιάταξη είναι δυνατόν να επιτευχθεί όταν κάποιος περιβαλλοντικός παράγοντας ελαττώσει την ισχύ των δεσμών αυτών:

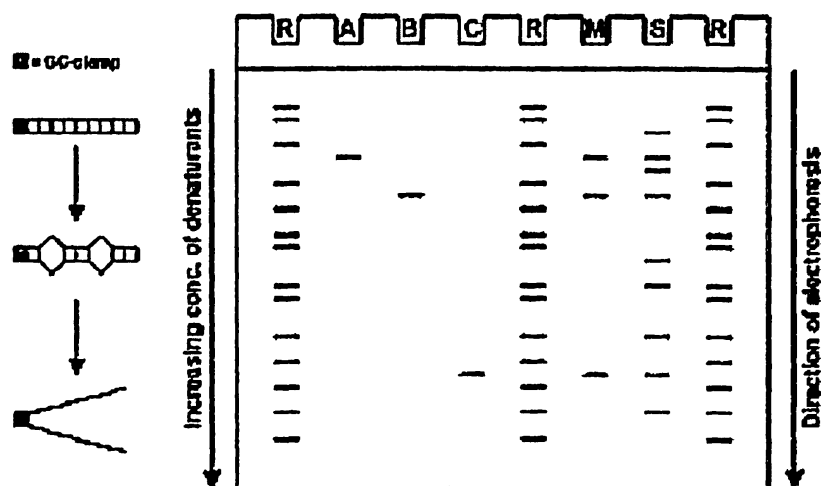
- Αύξηση του pH (αρνητική φόρτιση των βάσεων με αποτέλεσμα τη μεταξύ τους απώθηση).
- Αύξηση της θερμοκρασίας (αύξηση της κινητικής ενέργειας των μορίων)
- Επίδραση οργανικών αποδιατακτικών ουσιών, όπως το φορμαμίδιο και η ουρία, που διαταράσσουν τους υδρόφοβους ή υδρογονικούς δεσμούς.
- Μείωση της ιοντικής ισχύος (αμοιβαία απώθηση των αρνητικών φορτίων των φωσφορικών ομάδων).

4.6.2. Η αρχή της μεθόδου DGGE

Το DNA παρουσιάζει αποδιάταξη σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία T_m , η οποία καθορίζεται από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων που το αποτελούν. Θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m) ονομάζεται η θερμοκρασία στην οποία χάνεται η μισή ελικοειδής δομή του DNA. Η διπλή έλικα του DNA παρουσιάζει δομή υψηλής συνεργατικότητας που οφείλεται στους πολλούς δεσμούς που την ενισχύουν, όπως και στο στοίβαγμα και το ζευγάρωμα των βάσεων.



Τα PCR προϊόντα κινούνται στο πήκτωμα του ακρυλαμιδίου, που περιέχει αυξανόμενη συγκέντρωση σε ουρία και φορμαμίδιο. Η συγκέντρωση των αποδιατακτικών παραγόντων αυξάνει παράλληλα με την κατεύθυνση της ηλεκτροφόρησης. Αν αλληλουχίες DNA που διαφέρουν μόνο σε μια βάση νουκλεοτιδίου κινηθούν σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου, αρχικά θα κινηθούν με σταθερή τροχιά. Όταν όμως βρεθούν σε μια κρίσιμη αποδιατακτική συγκέντρωση αποδιατάσσονται και παράγεται μερικά αποδιαταγμένο DNA, που συνοδεύεται από μια ξαφνική μείωση της κινητικότητας του. Η ειδική περιοχή μέσα στο τμήμα του DNA που αποδιατάσσεται ονομάζεται πλαίσιο. Η ακριβής θέση πάνω στο πήκτωμα όπου παρατηρήθηκε η μείωση της κινητικότητας αντιστοιχεί με την T_m και είναι διαφορετική για την κάθε αλληλουχία. Μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου, οι αλληλουχίες του αγρίου και του μεταλλαγμένου τύπου θα διαχωριστούν με βάση τα διαφορετικά T_m . Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ακινητοποίησή τους σε διαφορετικά σημεία του πηκτώματος (εικόνα 3).



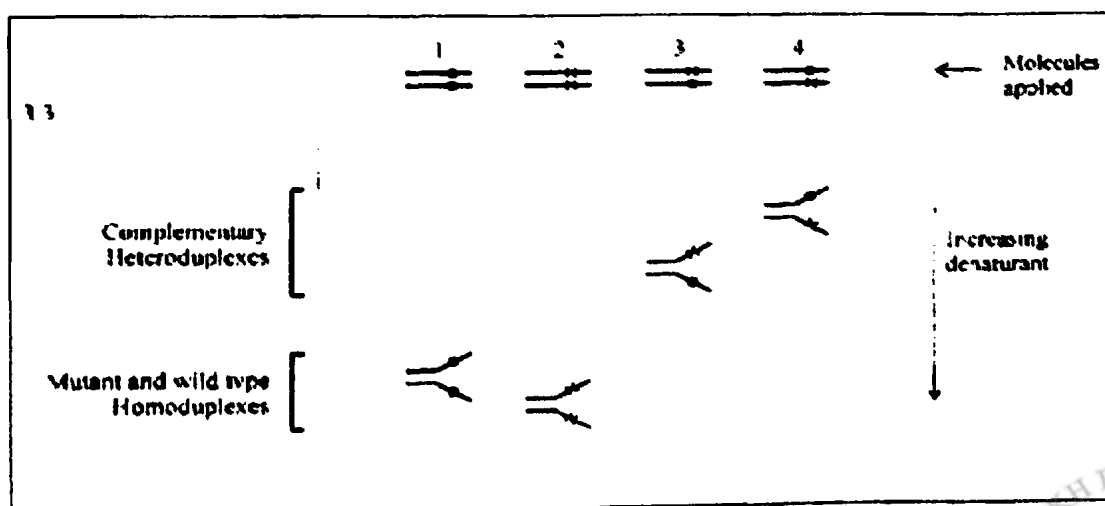
R = Reference pattern, A = Organism 1, B = Organism 2, C = Organism 3,
M = Mix of organisms 1, 2 and 3, S = unknown sample

εικόνα 3. Πρότυπα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα με κλίση πυκνότητας αποδιατακτικών παραγόντων.



Στην αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης δημιουργούνται επαναδιατάξεις των συμπληρωματικών μονόκλωνων μορίων DNA (ομοδιμερή), αλλά και μη συμπληρωματικών τμημάτων (ετεροδιμερές) στη περίπτωση ετεροζυγωτίας του νουκλεοτιδίου. Τα ετεροδιμερή έχουν πάντα μικρότερη T_m από οποιοδήποτε ομοδιμερές, γιατί έχουν μεγαλύτερη χημική αστάθεια. Κατά τη διάρκεια του θερμικού κύκλου της PCR σχηματίζονται ετεροδιμερή μόρια με την σύνδεση ίσων ποσοτήτων από πολλαπλασιασμένα τμήματα άγριου και μεταλλαγμένου τύπου. Με τον τρόπο αυτό τελικά σχηματίζονται τέσσερις ευδιάκριτες περιοχές στο αποδιατακτικό πήκτωμα, δηλαδή τα αγρίου τύπου ομοδιμερή, τα μεταλλαγμένα ομοδιμερή και δύο διαφορετικές ζώνες ετεροδιμερών (εικόνα 4).

Στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με κλίση πυκνότητας αποδιατακτικών παραγόντων τα ετεροδιμερή μόρια μεταξύ άγριου και μεταλλαγμένου τύπου είναι πάρα πολύ σημαντικά. Ο σχηματισμός ετεροδιμερών που θα προκύψουν από ένα τμήμα DNA που περιέχει μία μετάλλαξη, που οφείλεται είτε σε αντικατάσταση, είτε σε πρόσθεση, είτε σε απλή έλλειψη μιας βάσης κάνει πάρα πολύ εύκολη την διάγνωση της μετάλλαξης μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με κλίση πυκνότητας αποδιατακτικών παραγόντων [136].



εικόνα 4. Τα αγρίου τύπου ομοδιμερή, τα μεταλλαγμένα ομοδιμερή και οι ζώνες ετεροδιμερών που παρατηρούνται με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με κλίση πυκνότητας αποδιατακτικών παραγόντων

Αν η παραπάνω αλλαγή βάσης συμβεί στην άκρη του τμήματος DNA, δεν είναι δυνατό να ελεγχθεί, διότι καθώς αποδιατάσσεται το DNA οι δύο κλώνοι αποχωρίζονται εντελώς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η αλληλουχία των βάσεων να καταστραφεί, με συνέπεια την καταστροφή της κινητικότητας του μορίου. Ανάλυση στην άκρη είναι εφικτή μετά από πρόσδεση ενός μικρού ολιγονουκλεοτιδίου που περιέχει αποκλειστικά βάσεις γουανίνης και κυτοσίνης στο τμήμα του DNA που εξετάζουμε. Το μήκος του σφικτήρα GC, ποικίλει από 5 μέχρι 65 ζευγάρια βάσεων, κολλάει στο τμήμα του υπό μελέτη DNA και υπολογίζεται σαν επί πλέον τμήμα του DNA.

Τα τμήματα DNA που μπορούν να αναλυθούν σε ένα πήκτωμα ακρυλαμιδίου, έχουν μέγεθος που ποικίλει από 100 μέχρι 1000 ζευγάρια βάσεων. Ένα τέτοιο τμήμα DNA είναι δυνατό να περιέχει ένα ή και περισσότερα αποδιαταγμένα πλαίσια, με μήκος που να ποικίλει από 20 μέχρι πολλές εκατοντάδες ζευγάρια βάσεων. Τα τμήματα DNA που έχουν μεγάλη συχνότητα σε κυτοσίνη και γουανίνη παρουσιάζουν μεγάλη T_m . Η θερμοδυναμική σταθερότητα σε δίκλωνο DNA εξαρτάται επίσης από την αλληλεπίδραση μεταξύ των γειτονικών βάσεων. Ο τρόπος που οι βάσεις τοποθετούνται στον κλώνο καθορίζουν τον βαθμό σταθερότητας του.

Οι εκκινήτες αποτελούνται από 20 με 25 νουκλεοτίδια περίπου και επί πλέον περιέχουν ένα κομμάτι με CG τουλάχιστον σε ποσοστό 50%. Η αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης εξασφαλίζει το δέσιμο του σφικτήρα GC και την επέκταση της αλληλουχίας προσθέτοντας απλά ένα πλούσιο σε GC τμήμα στο 5' άκρο του ενός από τα νουκλεοτίδια κατά τη διάρκεια της σύνθεσης. Η υψηλή απόδοση της αλυσιδωτής αντίδρασης



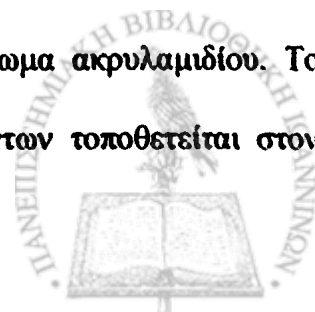
πολυμεράσης επιτρέπει τα μη ραδιενεργά πειράματα και την ανίχνευση των προϊόντων στο πήκτωμα μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο .

4.6.3. Κατασκευή του πηκτώματος

Τα τζάμια που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή του πηκτώματος, καθαρίζονται με ειδικό απορρυπαντικό, ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό και αφήνονται να στεγνώσουν. Τέλος, καθαρίζονται σχολαστικά με αιθανολη. Η καθαριότητα των τζαμιών είναι απαραίτητη καθώς αποτρέπει τη δημιουργία φυσαλίδων κατά την έγχυση του διαλύματος ακρυλαμιδίου. Στα καθαρά τζάμια, τοποθετείται η ειδική ταινία στεγανοποίησης γύρω από το λεπτό τζάμι καθώς και οι δύο ταινίες πλάτους 0,9 mm (spacers) που θα κρατήσουν τον απαιτούμενο χώρο μεταξύ των τζαμιών για τον πολυμερισμό του πηκτώματος. Οι εργασίες αυτές πρέπει να γίνονται προσεκτικά για να αποφευχθεί λάθος που θα οδηγήσει σε διαφυγή του διαλύματος ακρυλαμιδίου από τα τζάμια, πριν αυτό πολυμερισθεί. Τα τζάμια συγκρατούνται με τους ειδικούς σφικτήρες και τοποθετείται το κατάλληλο χτένι για τη δημιουργία των θέσεων (πηγαδάκια) όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα.

Ο βαθμιδωτής συγκέντρωσης του πηκτώματος καθαρίζεται σχολαστικά και ξεπλένεται με απεσταγμένο νερό. Έπειτα, προστίθεται ένας μαγνήτης σε κάθε σωλήνα και τοποθετείται πάνω στον μαγνητικό αναδευτήρα. Για την σύνδεση του βαθμιδωτή συγκέντρωσης με τα τζάμια χρησιμοποιείται βελόνη Micro-Flο 21G 0.8 (Industria Biomedica, Italy).

Προετοιμάζονται 12 μl από το κάθε διάλυμα για το πήκτωμα ακρυλαμιδίου. Το διάλυμα με την μικρότερη συγκέντρωση αποδιατακτικών παραγόντων τοποθετείται στον



πίσω χώρο του βαθμιδωτή και εκείνο με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στον πρώτο χώρο όπου γίνεται και η σύνδεση με τα τζάμια. Δεν πρέπει να παραμείνουν φυσαλίδες αέρα στον λεπτό σωλήνα που συνδέει τους δύο χώρους του βαθμιδωτή συγκέντρωσης.

Ο μαγνητικός αναδευτήρας τίθεται σε λειτουργία και προστίθενται 100 μl APS 10% και 10 μl TEMED σε κάθε διάλυμα. Μετά από 5 έως 10 δευτερόλεπτα ανοίγει η βρύση και αρχίζει η έκχυση του διαλύματος, η οποία ολοκληρώνεται σε περίπου 10 min. Όταν ο χώρος των τζαμιών γεμίσει, απομακρύνεται η βελόνη σύνδεσης τζαμιών και βαθμιδωτή συγκέντρωσης. Το πήκτωμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου ολοκληρώνεται σε περίπου 40-60 min.

4.6.4. Η Ηλεκτροφόρηση

Όταν ο πολυμερισμός του πηκτώματος ολοκληρωθεί, απομακρύνεται με μεγάλη προσοχή το χτένι και η ειδική ταινία στεγανοποίησης. Τα τζάμια με το πήκτωμα στερεώνονται στην ειδική βάση, βυθίζονται στο διάλυμα TAE της συσκευής ηλεκτροφόρησης και συνδέονται με την αντλία, με τη βοήθεια σύριγγας, για να απομακρυνθούν οι κρύσταλλοι ουρίας που επικάθονται εκεί. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης τίθεται σε λειτουργία και η θερμοκρασία του διαλύματος TAE ρυθμίζεται στους 60°C. Το πήκτωμα συνδέεται με τάση 60 Volts για 30 min.

Μετά την πάροδο των 30 min κλείνεται η τάση των 60 Volts, οι θέσεις όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα ξεπλένονται ξανά με διάλυμα TAE και εν συνεχεία τοποθετούνται τα αντίστοιχα δείγματα. Χρησιμοποιούνται 18 μl PCR προϊόντος και 2 μl διαλύματος χρωστικής φόρτωσης. Για την εύκολη τοποθέτηση των δειγμάτων στο πήκτωμα χρησιμοποιείται ειδικό τριχοειδές ρύγχος.



Τα δείγματα παραμένουν στο πήκτωμα σε τάση 60 Volts για περίπου 24 ώρες. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης ελέγχονται, τουλάχιστον δύο φορές, οι συνδέσεις των σωλήνων του διαλύματος TAE. Διότι κακή σύνδεση μπορεί να οδηγήσει σε πλημμελή τροφοδοσία με διάλυμα TAE της δεξαμενής των τζαμιών, με πιθανό αποτέλεσμα ζώνες πολύ κακής αναγνωσιμότητας. Πριν διακόψουμε την ηλεκτροφόρηση, θα πρέπει να ελέγξουμε κατά πόσο οι χρωστικές έχουν βγει ολοκληρωτικά έξω από το πήκτωμα ακρυλαμιδίου. Σε αντίθετη περίπτωση οι ζώνες δεν θα έχουν αποχωρισθεί αρκετά και η ανάγνωση του αποτελέσματος θα είναι δυσχερής.

Μετά το πέρας του εικοσιτετραώρου διακόπεται η παροχή τάσης και η λειτουργία της αντλίας, αποσυνδέονται οι σωληνώσεις του πηκτώματος και αφαιρείται η βάση συγκράτησής του από τη συσκευή. Απομακρύνονται τα τζάμια από τη βάση και με προσοχή αφαιρείται το ένα, ενώ το άλλο θα χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά και την περαιτέρω επεξεργασία του πηκτώματος. Σε σκοτεινό χώρο το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου, 0,5 mg/ml για περίπου 15-20 min. Ξεπλένεται με νερό και φωτογραφίζεται σε υπεριώδες φως μήκους κύματος 250 nm, με φωτογραφική μηχανή Polaroid (διάφραγμα 4,8 ταχύτητα 2 sec).

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή: denaturing gradient gel electrophoresis system, C.B.S. Scientific Company, Inc. California USA.

4.6.5. Χρησιμοποιούμενα Διαλύματα

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση σε κλίση πυκνότητας αποδιατακτικών παραγόντων είναι τα εξής:



40% ακρυλαμίδιο: acrylamide.....100 gr
N', N'-methylene-bis-acrylamide.....2,7 gr
H₂O μέχρι τα.....250 ml

acrylamide: C₃H₅NO (MB 71,08)

N', N'-methylene-bis-acrylamide: C₇H₁₀N₂O₂ (MB 154,2)

20X TAE, pH 8.0 : Tris HCl.....800 mM...96,912 gr
Na₂EDTA.....20 mM ...7,445 gr
NaAcetate.....400 mM...54,432 gr
H₂O μέχρι τελικού όγκου.....1 lit.

Το pH επιτυγχάνεται με περίπου 36 ml CH₃COOH

Το διάλυμα ακρυλαμιδίου με αποδιατακτικούς παράγοντες περιεκτικότητας 100% περιέχει ουρία 7 M και φορμαμίδιο 40%. Αναλογικά υπολογίζονται όλες οι ποσότητες που αντιστοιχούν σε οποιοδήποτε αποδιατακτικό διάλυμα. Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο αποδιατακτικά διαλύματα, ένα 80% και ένα 0%, από τα οποία με ανάλογη ανάμιξη προέκυπτε κάθε φορά το απαιτούμενο διάλυμα.

Αποδιατακτικό διάλυμα 80%

6% acrylamide.....75 ml από το 40%
32% formamide160 ml
5,6 M Ουρία.....170 gr



1x TAE.....25 ml από 20x TAE

H₂O μέχρι τα.....500 ml

Αποδιατακτικό διάλυμα 0%

6% acrylamide.....75 ml από το 40% stock

1x TAE.....25 ml από το 20x TAE

H₂O μέχρι τα.....500 ml

Όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια είναι της εταιρίας Bio-Rad Laboratories Inc. California USA.

APS: ammonium persulfate (NH₄)₂S₂O₈ με MB 228,2

Το διάλυμα APS είναι 10% και διατηρείται στους -20°C.

TEMED: N,N,N',N'- Tetramethylenediamine C₆H₁₆N₂ με MB 116,2

Τα APS και TEMED είναι απαραίτητα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου.

Ethidium Bromide: 3,8-diamino-6-ethyl-5-phenyl-phenatridium bromide C₂₁H₂₀BrN₃
με MB 394,31

Βάφει το πήκτωμα και δίνει έντονο πορτοκαλί χρώμα φθορισμού όταν είναι δεσμευμένο σε δίκλωνο DNA.



4.7. ΜΕΘΟΔΟΣ ARMS

Με τη μέθοδο ARMS ένας εκκινητής επιμηκώνεται και δίνει προϊόν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μόνον στην περίπτωση που υπάρχει πλήρη ομολογία βάσεων με το υπό μελέτη DNA. Η παρουσία προϊόντος πιστοποιεί την ύπαρξη κάποιας μετάλλαξης. Για να αναγνωρισθούν λοιπόν αυτές οι σημειακές μεταλλάξεις απαιτούνται τρεις διαφορετικοί εκκινητές. Ο ένας εκκινητής είναι κοινός για όλες τις περιπτώσεις μεταλλάξεων του β-γονιδίου της γλοβίνης, ενώ ο άλλος έχει πλήρη ομολογία βάσεων με το μεταλλαγμένο DNA και σε συνδυασμό με τον κοινό εκκινητή θα δώσει προϊόν αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μόνο στην περίπτωση μεταλλαγμένου DNA. Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για το δεύτερο ζεύγος των εκκινητών, χρησιμοποιείται σαν δείκτης για την επιτυχία της αντίδρασης. Για την παραπάνω διαδικασία είναι απαραίτητο οι αλυσιδωτές αντιδράσεις της πολυμεράσης να γίνουν δύο φορές, μία για το φυσιολογικό και μία για το μεταλλαγμένο DNA, χρησιμοποιώντας διαφορετικό συμπληρωματικό reverse εκκινητή στο πρώτο ζεύγος.



5. ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ

5.1. ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ Β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

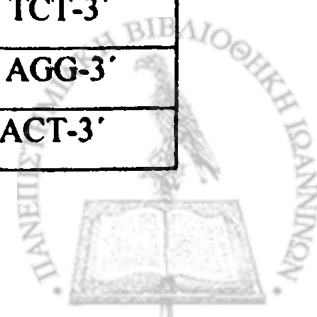
Συνθήκες αντίδρασης PCR

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων της αντίδρασης : Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο 25μl που περιείχε:

| | |
|--|---------------------------|
| DNA (300-500ng) | 2 μl |
| Ρυθμιστικό διάλυμα (500mM KCl, 200mM Tris-HCl, pH=8,4) | 1x |
| dNTPs (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | 0,08 mM |
| Ιόντα μαγνησίου (MgCl ₂) | 1,5 mM |
| Εκκινητής (forward) | 1,2 pmol/μl |
| Εκκινητής (reverse) | 1,2 pmol/μl |
| Taq DNA πολυμεράση (1U/μl) | 0,2 U |
| Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό | μέχρι τελικού όγκου 25 μl |

Αλληλουχίες εκκινητών

| | |
|-------------|---------------------------------------|
| HindIII/Gγ | 5'-AGT GCT GCA AGA AGA ACA ACT ACC-3' |
| | 5'-CTC TGC ATC ATG GGC ACT GAG CTC-3' |
| AvaII/ψβ | 5'-TCC TAT CCA TTA CTG TTC CTT GAA-3' |
| | 5'-ATT GTC TTA TTC TAG AGA CGA TTT-3' |
| HindII/5'ψβ | 5'-TCC TAT CCA TTA CTG TTC CTT GAA-3' |
| | 5'-ATT GTC TTA TTC TAG AGA CGA TTT-3' |
| HindII/3'ψβ | 5'-GTA CTC ATA CTT TAA GTC CTA ACT-3' |
| | 5'-TAA GCA AGA TTA TTT CTG GTC TCT-3' |
| AvaII/β | 5'-GTG GTC TAC CCT TGG ACC CAG AGG-3' |
| | 5'-TTC GTC TGT TTC CCA TTC TAA ACT-3' |



| | |
|---------|--------------------------------------|
| HinfI/β | 5'-TGG ATT CTG CCT AAT AAA A-3' |
| | 5'-GGG CCT ATG ATA GGG TAA T-3' |
| XmnI/Γγ | 5'-AAC TGT TGC TTT ATA GGA TTT T-3' |
| | 5'-AGG AGC TTA TTG ATA ACT CAG AC-3' |

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη στους 93°C για 1 λεπτό

Ακολουθεί: Αποδιάταξη (denaturing): 93°C για 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός (annealing): 56°C για 1 λεπτό

Σύνθεση (extension): 72°C για 1 λεπτό

Η αποδιάταξη, ο υβριδισμός και η σύνθεση του DNA επαναλαμβάνονται για 28 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με ένα τελικό κύκλο:

93°C για 1 λεπτό

56°C για 1 λεπτό

72°C για 3 λεπτά

Ακολουθεί ολονύκτια επώαση των προϊόντων PCR με τις αντίστοιχες περιοριστικές ενδονουκλεάσες HindIII, HincII, AvaII, HinfI, XmnI (BioLabs Inc, New England) στους 37°C.

Οι συνθήκες πέψης με τα ένζυμα AvaII και HinfI είναι οι ακόλουθες:

| | |
|---|---------|
| Προϊόν PCR | 5 μl |
| Ρυθμιστικό διάλυμα (50mM potassium acetate, 20mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1mM DTT) pH=7,9 | 1 μl |
| AvaII, HinfI (10000 U/ml) | 0,25 μl |
| Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 10 μl | 3,75 μl |



Οι συνθήκες πέψης με το ένζυμο HincII είναι οι ακόλουθες:

| | |
|--|--------------|
| Προϊόν PCR | 5 μ l |
| Ρυθμιστικό διάλυμα (100mM NaCl, 50 mM Tris -HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1Mm DTT) pH=7,9 | 1 μ l |
| HincII (10000 U/ml) | 0,25 μ l |
| BSA | 0,1 μ l |
| Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 10 μ l | 3,65 μ l |

Οι συνθήκες πέψης με το ένζυμο XmnI είναι οι ακόλουθες:

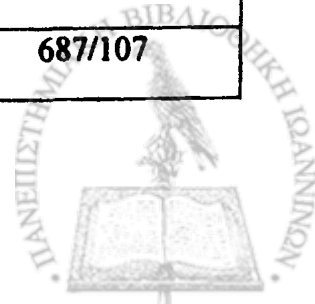
| | |
|---|-------------|
| Προϊόν PCR | 5 μ l |
| Ρυθμιστικό διάλυμα (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10 Mm MgCl ₂ , 1mM DTT) pH=7,9 | 1 μ l |
| XmnI (20000 U/ml) | 0,5 μ l |
| BSA | 0,1 μ l |
| Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 10 μ l | 3,4 μ l |

Οι συνθήκες πέψης με το ένζυμο HindIII είναι οι ακόλουθες:

| | |
|--|-------------|
| Προϊόν PCR | 5 μ l |
| Ρυθμιστικό διάλυμα (10mMBisTris Propane-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1mM DTT) pH=7,0 | 1 μ l |
| HindIII (20000 U/ml) | 0,5 μ l |
| Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 10 μ l | 3,5 μ l |

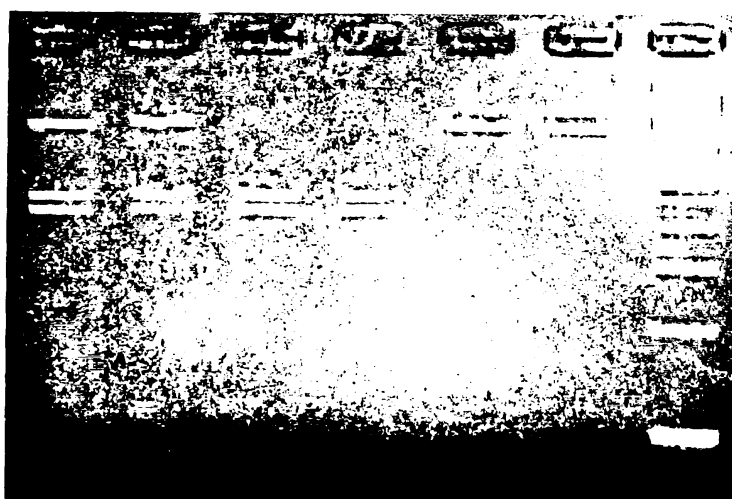
Προϊόντα πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες:

| | -/- | +/- | +/+ |
|--------------------------|-----|-------------|---------|
| HindIII/G γ | 323 | 323/235/98 | 235/98 |
| AvaII/ ψ β | 794 | 794/442/352 | 442/352 |
| HindII/5' ψ β | 794 | 794/687/107 | 687/107 |



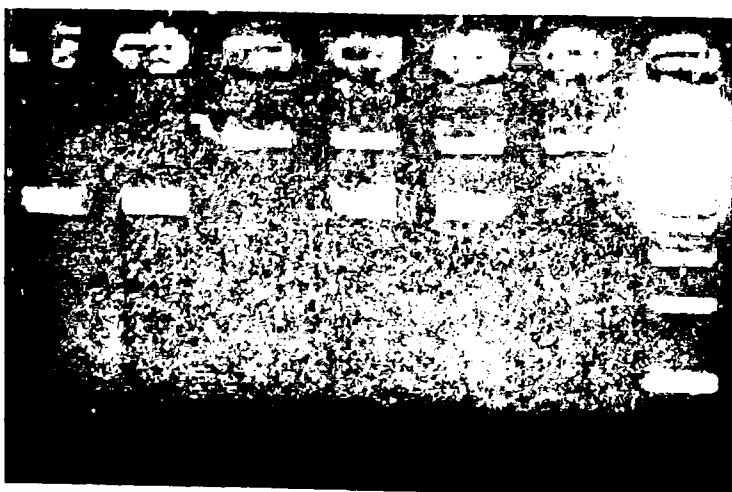
| | | | |
|-------------|-------------|---------------------|-----------------|
| HindII/3'ψβ | 914 | 914/480/434 | 480/434 |
| AvaII/β | 315/13 | 315/214/101/13 | 214/101/13 |
| HinfI/β | 341/244/154 | 341/244/154/213/128 | 244/154/213/128 |
| XmnI/Gγ | 740 | 740/545/195 | 545/195 |

Ηλεκτροφορητικά πρότυπα πολυμορφισμών



++ ++ +/- +/- -/- -/-

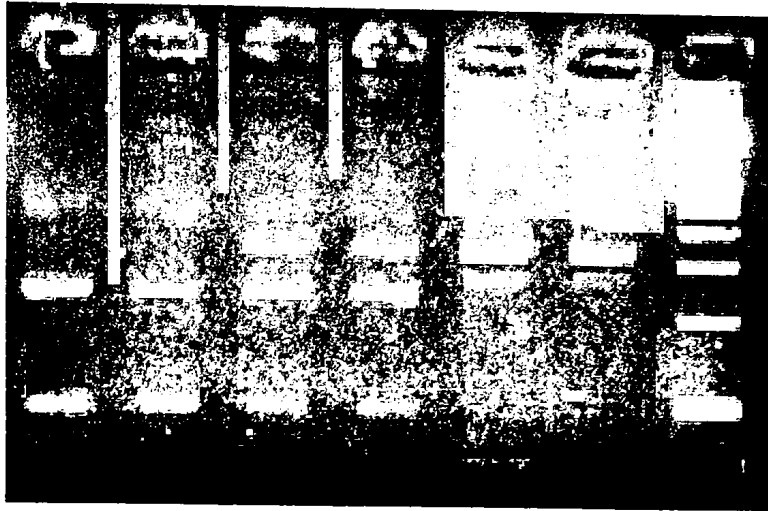
HINDII-5



++ ++ -/- +/- +/- -/-

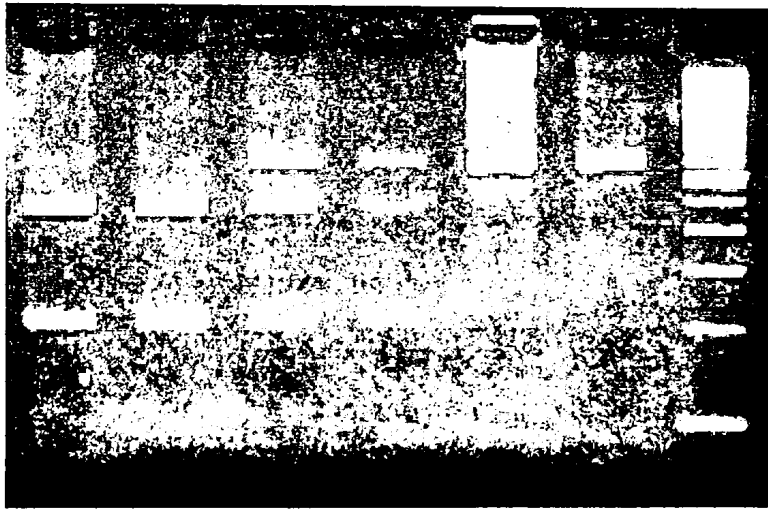
HINDII-3





++ ++ +/- +/- -/- -/-

HINDIII



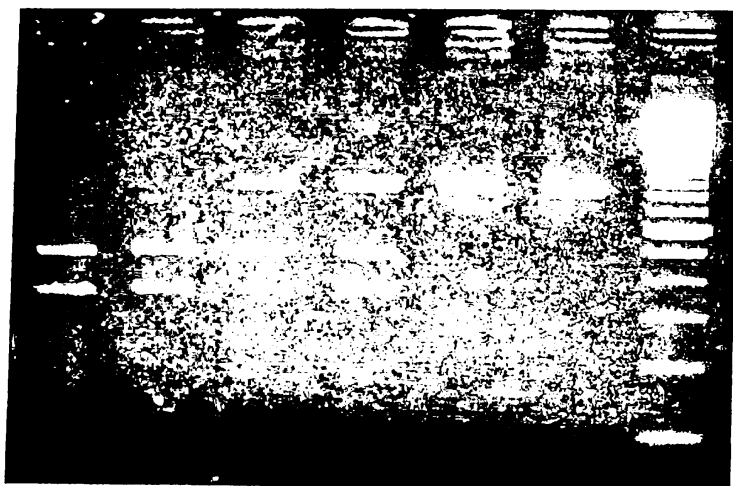
++ ++ +/- +/- -/- -/-

XMNI



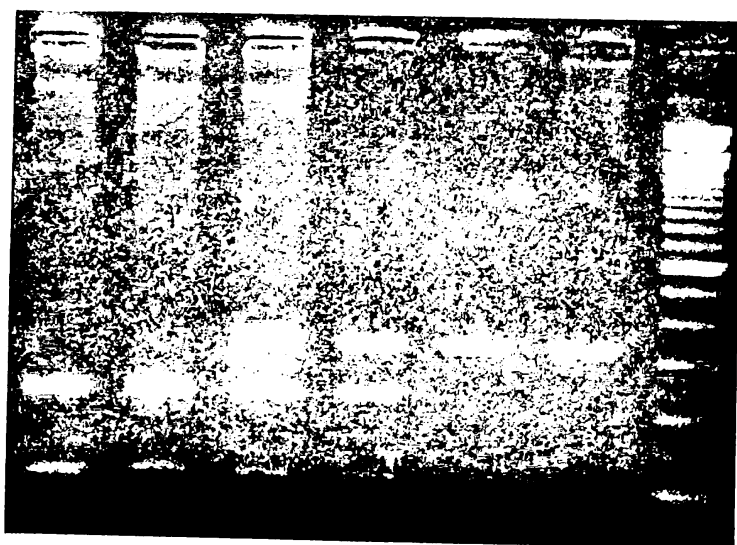
HINF1





+/+ +/+ +/- +/- -/- -/-

AVAI ψ β



+/+ +/+ +/- +/- -/- -/-

AVAI β

5.2. ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ Β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

5.2.1. Μέθοδος DGGE

Συνθήκες αντίδρασης PCR

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων της αντίδρασης : Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο

50 μl που περιείχε:

| | | |
|--|---------------|------------------------------|
| DNA (300-500ng) | | 1 μl |
| Ρυθμιστικό διάλυμα (500mM KCl, 200mM Tris-HCl, pH=8,4) | | 1x |
| dNTPs (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | | 0,2 mM |
| Ιόντα μαγνησίου (MgCl ₂) | Fragment A | 3 mM |
| | Fragments B,D | 1,5 mM |
| Εκκινητής (forward & reverse) | Fragment A | 0,2 pmol/μl |
| | Fragment B | 0,4 pmol/μl |
| | Fragment D | 0,3 pmol/μl |
| Ταq DNA πολυμεράση (1U/μl) | | 0,5 U |
| Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό | | μέχρι τελικού όγκου 25 μl |

Αλληλουχίες εκκινητών

| | | |
|------------|-------------------|--|
| Fragment A | GCA | 5'-CGC CCG CCC CGC CCC CGT GCC CCC CGC GCC GCC CGC CCC GCC CCC GTA CGG CTG TCA TCA CTT AG ACCT CA-3' |
| | pCO ₄ | 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3' |
| Fragment B | GCB | 5'-CGC CCG CCC CGC CCC CGT GCC CCC CGC GCC GCC CGC CCC GCC CCC TGC AGC TTG TCA CAG TGC AGC TCA CT-3' |
| | apCO ₄ | 5'-GGT GAA CGT GGA TGA AGT T-3' |
| Fragment D | G | 5'-GTG TAC ACA TAT TGA CCA AA-3' |
| | H | 5'-AGC ACA CAG ACC AGC ACG TT-3' |

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 1 λεπτό

Ακολουθεί: Αποδιάταξη (denaturing): 94°C για 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός (annealing): 55°C για 30 δευτερόλεπτα



Σύνθεση (extension): 72°C για 1 λεπτό

Η αποδιάταξη, ο υβριδισμός και η σύνθεση του DNA επαναλαμβάνονται για 50 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το τελικό στάδιο της επέκτασης στους 72°C για 10 λεπτά.

5.2.2. Μέθοδος ARMS

Συνθήκες αντίδρασης PCR

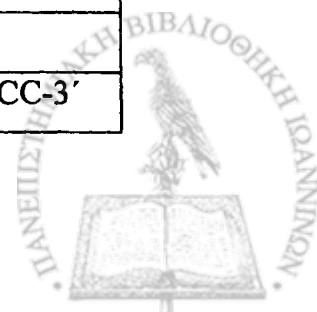
Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων της αντίδρασης : Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο

25μl που περιείχε:

| | |
|--|---------------------------|
| DNA (μίγμα μητρικού και εμβρυϊκού) | 1 μl |
| Ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH=8,4) | 1x |
| dNTPs (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | 0.2 mM |
| Ιόντα μαγνησίου (MgCl ₂) | 3,5 mM |
| Εκκινητής C1 | 0,6 pmol/μl |
| Εκκινητής 2 (reverse) | 0,6 pmol/μl |
| Εκκινητής C3 | 0,4 pmol/μl |
| Εκκινητής C4 | 0,4 pmol/μl |
| Taq DNA πολυμεράση (1 U/μl) | 0.5 U |
| Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό | μέχρι τελικού όγκου 25 μl |

Αλληλουχίες εκκινητών:

| | |
|----------------|---|
| C1 | 5'-ACC TCA CCC TGT GGA GCC AC-3' |
| C1 (IVSII-745) | 5'-CCC CTT CCT ATG ACA TGA ACT TAA-3' |
| C3 | 5'-GAG TCA AGG CT GAGA GAT GCA GGA-3' |
| C4 | 5'-CAA TGT ATC ATG CCT CTT TGC ACC-3' |
| Cd6 (-A) | 5'-CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAG ACT TCT GCC-3' |



| | |
|-----------------|--|
| Cd39 (C→T) | 5'-CAG ATC CCC AAA GGA CTC AAA GAA CCT GTA-3' |
| IVSI-1 (G→A) | 5'-TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAT-3' |
| IVSI-6 (T→C) | 5'-TCT CCT TAA ACC TGT CTT CTA ACC TTC ATG-3' |
| IVSI-110 (G→A) | 5'-ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAG AGT-3' |
| IVSII-1 (G→A) | 5'-AAG AAA ACA TCA AGG GTC CCA TAG ACT GAT-3' |
| IVSII-745 (C→G) | 5'-TCA TAT AGC TAA TAG CAG CTA CAA TCG AGG-3' |
| HbS | 5'- CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAG ACT TCT GCA-3' |

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 3 λεπτά

Ακολουθεί: Αποδιάταξη (denaturing): 94°C για 1 λεπτό

Υβριδισμός (annealing): 65°C για 1 λεπτό

Σύνθεση (extension): 72°C για 1,5 λεπτά

Η αποδιάταξη, ο υβριδισμός και η σύνθεση του DNA επαναλαμβάνονται για 50 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το τελικό στάδιο της επέκτασης στους 72°C για 7 λεπτά.

Ηλεκτροφορητικά πρότυπα μεταλλάξεων



CD39 IVSI-110 IVSI-6 NORMAL IVSI-1

6. ΜΗ ΕΠΕΒΑΤΙΚΗ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ IVS1-110 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ Β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Συνθήκες αντίδρασης PCR

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων της αντίδρασης : Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο

50 μl που περιείχε:

| | |
|--|---------------------------|
| DNA (μίγμα μητρικού και εμβρυϊκού) | 10 μl |
| Ρυθμιστικό διάλυμα (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, pH=8,4) | 1x |
| dNTPs (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | 0.2 mM |
| Ιόντα μαγνησίου (MgCl ₂) | 3 mM |
| Εκκινητής 1 (forward) | 1 μM |
| Εκκινητής 2 (reverse) | 1 μM |
| Ampli Taq Gold πολυμεράση (5 U/μl) | 5 U |
| Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό | μέχρι τελικού όγκου 50 μl |

Αλληλουχία εκκινητών:

Εκκινητής BF': 5'-CAA CTG TGT TCA CTA GCA AC-3'

Εκκινητής BR': 5'- TAA AAG AAA CTA GAA CGA TCC-3'

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη στους 96°C για 10 λεπτά

Ακολουθεί: Αποδιάταξη (denaturing): 96°C για 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός (annealing): 52°C για 30 δευτερόλεπτα

Σύνθεση (extension): 72°C για 30 δευτερόλεπτα



Η αποδιάταξη, ο υβριδισμός και η σύνθεση του DNA επαναλαμβάνονται για 40 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το τελικό στάδιο της επέκτασης στους 72°C για 5 λεπτά. Το προϊόν PCR που προκύπτει έχει μέγεθος 637 ζεύγη βάσεων.

Μετά την πρώτη PCR αντίδραση, ακολουθεί μια δεύτερη στην οποία χρησιμοποιείται, στη θέση του DNA, 1μl από τα προϊόντα της πρώτης αντίδρασης. Οι συνθήκες της αντίδρασης και η ακόλουθη DGGE ανάλυση περιγράφηκε παραπάνω. Η μόνη τροποποίηση είναι η χρήση διαφορετικής πολυμεράσης (Ampli Taq Gold polymerase). Τα προϊόντα του πρώτου PCR κύκλου παράγουν επίσης πληροφοριακές ζώνες στην DGGE ανάλυση.

7. ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ LEPORÉ

Αλληλουχία εκκινητών

Εκκινητής 1: LEP1: 5'-GAC ACA CAT GAC AGA ACA GCC AAT-3'

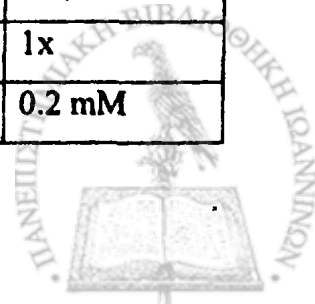
Εκκινητής 2: LEP2: 5'-CGA TCT TCA ATA TGC TTA CCA AG-3'

Εκκινητής 3: LEP3: 5'-CAT TCG TCT GTT TCC CAT TCT A-3'

Συνθήκες simplex αντίδρασης PCR

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων της αντίδρασης : Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο 25μl που περιείχε:

| | |
|--|--------|
| DNA (μίγμα μητρικού και εμβρυϊκού) | 10 μl |
| Ρυθμιστικό διάλυμα (500 mM KCl, 200 Mm Tris-HCl, pH=8,4) | 1x |
| dNTPs (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | 0.2 mM |



| | |
|--|--------------------------------|
| Ιόντα μαγνησίου ($MgCl_2$) | 3 mM |
| Εκκινητής 1 (LEP1) | 0,4 μ M |
| Εκκινητής 2 (LEP3) | 0,4 μ M |
| Platinum Taq DNA πολυμεράση High Fidelity (1 U/ μ l) | 5 U |
| Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό | μέχρι τελικού όγκου 25 μ l |

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 10 λεπτά

Ακολουθεί: Αποδιάταξη (denaturing): 94°C για 1 λεπτό

Υβριδισμός (annealing): 57°C για 1 λεπτό

Σύνθεση (extension): 72°C για 2 λεπτό

Η αποδιάταξη, ο υβριδισμός και η σύνθεση του DNA επαναλαμβάνονται για 50 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το τελικό στάδιο της επέκτασης στους 72°C για 10 λεπτά. Το προϊόν PCR που προκύπτει έχει μέγεθος 808 ζεύγη βάσεων.

Συνθήκες multiplex αντίδρασης PCR

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων της αντίδρασης : Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο 25 μ l που περιείχε:

| | |
|--|---------------|
| DNA (μίγμα μητρικού και εμβρυϊκού) | 10 μ l |
| Ρυθμιστικό διάλυμα (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, pH=8,4) | 1x |
| dNTPs (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | 0.2 mM |
| Ιόντα μαγνησίου ($MgCl_2$) | 3 mM |
| Εκκινητής 1 (LEP1) | 0,4 μ M |
| Εκκινητής 2 (LEP2) | 0,4 μ M |
| Εκκινητής 3 (LEP3) | 0,4 μ M |
| Platinum Taq DNA πολυμεράση High Fidelity (1 U/ μ l) | 5 U |
| Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό | μέχρι τελικού |



Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 4 λεπτά

Ακολουθεί: Αποδιάταξη (denaturing): 94°C για 1 λεπτό

Υβριδισμός (annealing): 58°C για 1 λεπτό

Σύνθεση (extension): 72°C για 2 λεπτό

Η αποδιάταξη, ο υβριδισμός και η σύνθεση του DNA επαναλαμβάνονται για 50 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το τελικό στάδιο της επέκτασης στους 72°C για 10 λεπτά. Τα προϊόντα PCR που προκύπτουν έχουν μέγεθος 915 και 808 ζεύγη βάσεων.

8. ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΤΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ Y

Γενετική αλληλουχία DYS14 (χρωμόσωμα Y)

Συνθήκες αντίδρασης PCR

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων της αντίδρασης : Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο

25 μ l που περιείχε:

| | |
|--|-----------|
| DNA (μίγμα μητρικού και εμβρυϊκού) | 5 μ l |
| Ρυθμιστικό διάλυμα (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, pH=8,4) | 1x |
| dNTPs (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | 0.2 mM |
| Ιόντα μαγνησίου (MgCl ₂) | 1,5 mM |
| Εκκινητής 1 (forward) | 2 μ M |
| Εκκινητής 2 (reverse) | 2 μ M |

| | |
|--|---------------------------|
| Taq DNA πολυμεράση (1 U/μl) | 2.5 U |
| Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό | μέχρι τελικού όγκου 25 μl |

Αλληλουχία εκκινητών:

Εκκινητής Y1.7: 5'-CAT CCA GAG CGT CCC TGG CTT-3'

Εκκινητής Y1.8: 5'-CTT TCC ACA GCC ACA TTT GTC-3'

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 10 λεπτά

Ακολουθεί: Αποδιάταξη (denaturing): 94°C για 1 λεπτό

Υβριδισμός (annealing): 58°C για 1 λεπτό

Σύνθεση (extension): 72°C για 1 λεπτό

Η αποδιάταξη, ο υβριδισμός και η σύνθεση του DNA επαναλαμβάνονται για 50 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το τελικό στάδιο της επέκτασης στους 72°C για 10 λεπτά. Το προϊόν PCR που προκύπτει έχει μέγεθος 198 ζεύγη βάσεων.

Γενετική αλληλουχία DYZ1 (χρωμόσωμα Y)

Συνθήκες αντίδρασης PCR

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων της αντίδρασης : Η αντίδραση PCR έγινε σε συνολικό όγκο

25μl που περιείχε:



| | |
|--|---------------------------|
| DNA (μίγμα μητρικού και εμβρυϊκού) | 5 μl |
| Ρυθμιστικό διάλυμα (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, pH=8,4) | 1x |
| dNTPs (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | 0.2 mM |
| Ιόντα μαγνησίου (MgCl ₂) | 3 mM |
| Εκκινητής 1 (forward) | 2 μM |
| Εκκινητής 2 (reverse) | 2 μM |
| Taq DNA πολυμεράση (1 U/μl) | 2.5 U |
| Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό | μέχρι τελικού όγκου 25 μl |

Αλληλουχία εκκινητών:

Εκκινητής Y1.1: 5'- TCC ACT TTA TTC CAG GCC TGT CC-3'

Εκκινητής Y1.2: 5'-TTG AAT GGA ATG GGA ACG AAT GG-3'

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά

Ακολουθεί: Αποδιάταξη (denaturing): 94°C για 1 λεπτό

Υβριδισμός (annealing): 58°C για 1,5 λεπτό

Σύνθεση (extension): 72°C για 1 λεπτό

Η αποδιάταξη, ο υβριδισμός και η σύνθεση του DNA επαναλαμβάνονται για 50 κύκλους και η διαδικασία ολοκληρώνεται με το τελικό στάδιο της επέκτασης στους 72°C για 10 λεπτά. Το προϊόν PCR που προκύπτει έχει μέγεθος 145 ζεύγη βάσεων.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ Β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Ο επτά πολυμορφισμοί του γονιδίου της β-σφαιρίνης αναλύθηκαν τόσο στα 72 άτομα των ετεροζυγωτών, όσο και στα 200 άτομα του γενικού πληθυσμού. Η κατανομή των γονότυπων και των αλληλομόρφων φαίνεται στον Πίνακα 1. Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στη συχνότητα αυτών των πολυμορφισμών ανάμεσα στα άτομα του γενικού πληθυσμού και τους ετεροζυγώτες. Αναλύθηκε επίσης η στατιστική διαφορά που υπάρχει ανάμεσα στις δύο κατηγορίες ατόμων.

Πίνακας 1

| | | | Ζευγάρια Ετεροζυγωτών | Γενικός Πληθυσμός |
|----------------|------------------|-----|--------------------------|----------------------|
| Αριθμός ατόμων | | | 72 | 200 |
| ΑναII/β | Γονότυποι n(%) | +/+ | 56 (77,78%) | 183 (91,5%) |
| | | +/- | 15 (20,83%) | 16 (8%) |
| | | -/- | 1 (1,39%) | 1 (0,5%) |
| | Αλληλόμορφα n(%) | + | 127 (88,2%) | 382 (95,5%) |
| | | - | 17 (11,8%) | 18 (4,5%) |

| | | | P values |
|---------|-----------|-----|----------|
| | | | P<0,0009 |
| ΑναII/β | Γονότυποι | +/+ | P<0,002 |
| | | +/- | P<0,003 |
| | | -/- | P>0,005 |



| | | | |
|--|--------------------|--|-------------------|
| | Αλληλόμορφα | | P<0,002 |
|--|--------------------|--|-------------------|

| | | | Ζευγάρια Ετεροζυγωτών | Γενικός Πληθυσμός |
|-----------------------|-------------------------|------------|----------------------------------|------------------------------|
| Αριθμός ατόμων | | | 72 | 200 |
| AvaII/ψβ | Γονότυποι n(%) | +/+ | 51 (70,83%) | 147 (73,5%) |
| | | +/- | 17 (23,61%) | 51 (25,5%) |
| | | -/- | 4 (5,55%) | 2 (1%) |
| | Αλληλόμορφα n(%) | + | 119 (82,64%) | 345 (86,25%) |
| | | - | 25 (17,36%) | 55 (13,75%) |

| | | | P values |
|-----------------|--------------------|------------|-------------------|
| | | | P>0,005 |
| AvaII/ψβ | Γονότυποι | +/+ | P>0,005 |
| | | +/- | P>0,005 |
| | | -/- | P<0,02 |
| | Αλληλόμορφα | | P>0,005 |

| | | | Ζευγάρια Ετεροζυγωτών | Γενικός Πληθυσμός |
|-----------------------|-------------------------|------------|----------------------------------|------------------------------|
| Αριθμός ατόμων | | | 72 | 200 |
| HindII-5 | Γονότυποι n(%) | +/+ | 3 (4,17%) | 16 (8%) |
| | | +/- | 15 (20,83%) | 80 (40%) |
| | | -/- | 54 (75%) | 104 (52%) |
| | Αλληλόμορφα n(%) | + | 21 (14,58%) | 112 (28%) |
| | | - | 123 (85,42%) | 288 (72%) |



| | | | P values |
|-----------------|--------------------|-----|----------|
| | | | P<0,003 |
| HindII-5 | Γονότυποι | +/+ | P>0,005 |
| | | +/- | P<0,003 |
| | | -/- | P<0,006 |
| | Αλληλόμορφα | | P<0,001 |

| | | | Ζευγάρια Ετεροζυγωτών | Γενικός Πληθυσμός |
|-----------------------|-------------------------|-----|----------------------------------|------------------------------|
| Αριθμός ατόμων | | | 72 | 200 |
| HindIII | Γονότυποι n(%) | +/+ | 16 (22,22%) | 45 (22,5%) |
| | | +/- | 26 (36,11%) | 89 (44,5%) |
| | | -/- | 30 (41,67%) | 66 (33%) |
| | Αλληλόμορφα n(%) | + | 58 (40,28%) | 179 (44,75%) |
| | | - | 86 (59,72%) | 221 (55,25%) |

| | | | P values |
|----------------|--------------------|-----|----------|
| | | | P>0,005 |
| HindIII | Γονότυποι | +/+ | P>0,005 |
| | | +/- | P>0,005 |
| | | -/- | P>0,005 |
| | Αλληλόμορφα | | P>0,005 |



| | | | Ζευγάρια Ετεροζυγωτών | Γενικός Πληθυσμός |
|-----------------------|-------------------------|------------|----------------------------------|------------------------------|
| Αριθμός ατόμων | | | 72 | 200 |
| XmnI | Γονότυποι n(%) | +/+ | 4 (5,55%) | 18 (9%) |
| | | +/- | 15 (20,83%) | 75 (37,5%) |
| | | -/- | 53 (73,61%) | 107 (53,5%) |
| | Αλληλόμορφα n(%) | + | 23 (15,97%) | 111 (27,75%) |
| | | - | 121 (84,03%) | 289 (72,25%) |

| | | | P values |
|-------------|--------------------|------------|-----------------|
| | | | P<0,01 |
| XmnI | Γονότυποι | +/+ | P>0,005 |
| | | +/- | P<0,009 |
| | | -/- | P<0,009 |
| | Αλληλόμορφα | + | P<0,004 |

| | | | Ζευγάρια Ετεροζυγωτών | Γενικός Πληθυσμός |
|-----------------------|-------------------------|------------|----------------------------------|------------------------------|
| Αριθμός ατόμων | | | 72 | 200 |
| HindII-3 | Γονότυποι n(%) | +/+ | 11 (15,28%) | 42 (21%) |
| | | +/- | 30 (41,67%) | 96 (48%) |
| | | -/- | 31 (43,05%) | 62 (31%) |
| | Αλληλόμορφα n(%) | + | 52 (36,11%) | 180 (45%) |
| | | - | 92 (63,89%) | 220 (55%) |

| | | | P values |
|-----------------|--------------------|-----|----------|
| | | | P>0,005 |
| HindII-3 | Γονότυποι | +/+ | P>0,005 |
| | | +/- | P>0,005 |
| | | -/- | P>0,005 |
| | Αλληλόμορφα | | P>0,005 |

| | | | Ζευγάρια Ετεροζυγωτών | Γενικός Πληθυσμός |
|-----------------------|-------------------------|-----|----------------------------------|------------------------------|
| Αριθμός ατόμων | | | 72 | 200 |
| HinfI | Γονότυποι n(%) | +/+ | 38 (52,78%) | 92 (46%) |
| | | +/- | 29 (40,28%) | 91 (45,5%) |
| | | -/- | 5 (6,94%) | 17 (8,5%) |
| | Αλληλόμορφα n(%) | + | 105 (72,92%) | 275 (68,75%) |
| | | - | 39 (27,08%) | 125 (31,25%) |

| | | | P values |
|--------------|--------------------|-----|----------|
| | | | P>0,005 |
| HinfI | Γονότυποι | +/+ | P>0,005 |
| | | +/- | P>0,005 |
| | | -/- | P>0,005 |
| | Αλληλόμορφα | | P>0,005 |



Το ποσοστό των ζευγαριών που παρουσιάζουν ένα τουλάχιστον πληροφοριακό πολυμορφισμό παρουσιάζει διαφοροποίηση ανάμεσα στα άτομα του γενικού πληθυσμού και τους ετεροζυγώτες, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική ($P > 0.05$). Ένας πολυμορφισμός θεωρείται πληροφοριακός σε ένα ζευγάρι, όταν οι δύο γονείς είναι ομοζυγώτες για τα δύο διαφορετικά αλληλόμορφα της γενετικής θέσης (Πίνακας 2).

Πίνακας 2

| Αριθμός πληροφοριακών πολυμορφισμών | Ποσοστό ζευγαριών ετεροζυγωτών | Ποσοστό ζευγαριών γενικού πληθυσμού |
|--|---------------------------------------|--|
| 1 | 28 % | 9 % |
| 2 | 5.5 % | 10 % |
| 3 | | 3 % |
| 4 | 5.5 % | 6 % |
| 5 | | 1 % |
| | 39 % | 29 % |

Το ποσοστό των πληροφοριακών ζευγαριών για κάθε πολυμορφισμό παρουσιάζει διαφοροποίηση ανάμεσα στα άτομα του γενικού πληθυσμού και τους ετεροζυγώτες, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική ($P > 0.05$) (Πίνακας 3).



Πίνακας 3

| | Ποσοστό πληροφοριακών ζευγαριών ετεροζυγωτών | Ποσοστό πληροφοριακών ζευγαριών γενικού πληθυσμού |
|--------------------|---|--|
| AvaII/ψβ | 3.1 % | 1 % |
| AvaII/β | 5.15 % | 2 % |
| HindII/5'ψβ | 8.25 % | 8 % |
| HindIII/Gγ | 13.4 % | 15 % |
| XmnI/Gγ | 8.25 % | 10 % |
| HindII/3'ψβ | 13.4 % | 16 % |
| HinfI/β | 8.25 % | 8 % |

Από την ανάλυση των μεταλλάξεων των γονιδίων του β-συμπλέγματος της σφαιρίνης στα 96 ζευγάρια φορέων με τις μεθόδους ARMS (Amplification refractory mutation system) και DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) βρέθηκε το ποσοστό εμφάνισης της κάθε μετάλλαξης (Πίνακας 4) καθώς και ότι το 80.4 % των ζευγαριών παρουσίαζαν πληροφοριακές μεταλλάξεις. Βρέθηκε ότι οι μεταλλάξεις IVS1-110, Codon 39 and IVS1-1 ήταν οι πιο συχνές μεταλλάξεις (33,5 %, 19% και 10,8%, αντίστοιχα).

Πίνακας 4

| Είδος μετάλλαξης | Ποσοστό % |
|---------------------|--------------|
| IVS1-110 | 33,5 |
| Cd-39 | 19 |
| IVS1-1 | 10,8 |

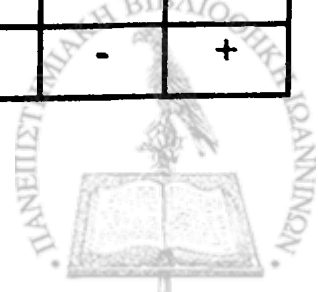


| | |
|--------------------|------------|
| HbS | 9,8 |
| IVSII-1 | 8,3 |
| IVSI-6 | 6,7 |
| IVSII-745 | 3,1 |
| Cd-6 | 2,6 |
| δβ sicilian | 1,5 |
| Lepore | 1 |
| 44 bp del | 1 |
| IVSI-5 | 1 |
| -87 | 1 |
| Cd-5 | 0,5 |
| Cd-22 | 0,5 |

Όπως έχει αποδειχθεί, κάθε μετάλλαξη χαρακτηρίζεται από έναν ή περισσότερους απλότυπους. Στη μελέτη αυτή, από τη συσχέτιση των μεταλλάξεων με τους πολυμορφισμούς βρέθηκε συγκεκριμένο πρότυπο πολυμορφισμών για κάθε μετάλλαξη, συγκεκριμένος δηλαδή απλότυπος (Πίνακας 5).

Πίνακας 5

| Μετάλλαξη | AvaII/β | AvaII/ψβ | HindIII | HindII-5 | HindII-3 | Xmnl | HinfI |
|------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------|--------------|
| IVSI-110 | + | + | - | - | - | - | + |
| Cd-39 | + | + | + | - | + | - | + |
| IVSI-1 | + | + | - | - | - | - | - |
| IVSI-6 | - | + | + | - | - | - | + |
| IVSII-745 | - | + | - | - | - | - | + |

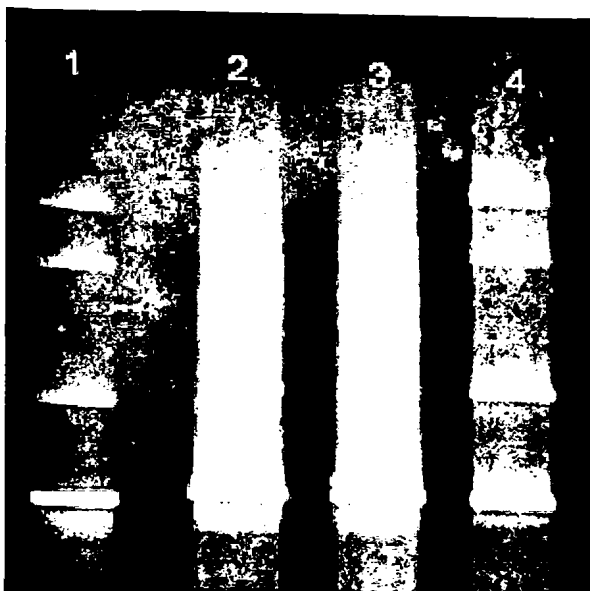


| | | | | | | | |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|
| Cd-6 | + | + | - | - | - | - | + |
| IVSII-1 | + | + | + | + | + | + | - |
| 44 bp del | + | + | - | - | - | + | - |
| HbS | + | + | - | - | - | - | - |
| Lepore- | + | + | - | - | - | - | - |

2. ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ IVSI-110 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ Β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Η IVSI-110 μετάλλαξης του γονιδίου της β-σφαιρίνης καλύπτει το 1/3 των παρατηρούμενων μεταλλάξεων. Προσπαθήσαμε να επιτύχουμε μη επεμβατική ανίχνευση αυτής της μετάλλαξης χρησιμοποιώντας δείγματα μητρικού ορού. Από τα 97 ζευγάρια ετεροζυγωτών που μελετήσαμε με μη επεμβατικές μεθόδους, τα πληροφοριακά ζευγάρια με πατρική μετάλλαξη την IVSI-110 ήταν 37. Σε 25 από αυτά τα ζευγάρια το έμβρυο βρέθηκε να είναι φορέας της πατρικής μετάλλαξης. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με τη λήψη χοριακών λαχνών την 12^η εβδομάδα της κύησης και την μοριακή ανάλυση του εμβρυϊκού DNA. Η μη επεμβατική ανίχνευση της IVSI-110 μετάλλαξης του γονιδίου της β-σφαιρίνης επιτεύχθηκε με 97% ευαισθησία και 100% ειδικότητα. Η πατρική μετάλλαξη IVSI-110 δεν ανιχνεύθηκε μόνο σε ένα δείγμα ορού, το οποίο συλλέχθηκε την 7^η εβδομάδα της κύησης, ίσως λόγω της πολύ χαμηλής συγκέντρωσης του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA. Αυτό το δείγμα οδήγησε στο ψευδές συμπέρασμα του μηδενικού κινδύνου για β-μεσογειακή αναιμία και μείωσε την ευαισθησία της μεθόδου στο 97%.





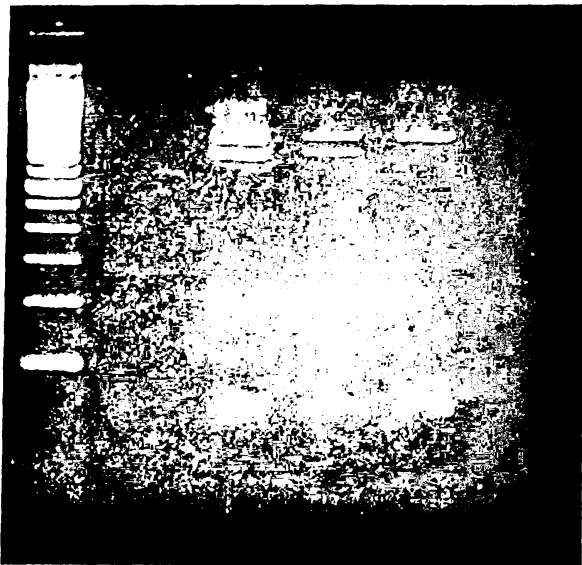
- 1 DNA από δείγμα μητρικού ορού
(έμβryo IVSI-110/N; μητέρα IVSII-745/N)
- 2 δείγμα μητρικού DNA (IVSII-745/N)
- 3 δείγμα φυσιολογικού DNA (N/N)
- 4 δείγμα πατρικού DNA (IVSI-110/N)

3. ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ LEPORE

Στην περίπτωση των φορέων της αιμοσφαιρίνης Lepore παρατηρούνται δύο ζώνες 808 bp και 915 bp. Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της multiplex και simplex PCR αντίδρασης. Ο ετερόζυγος πατέρας (δείγματα 1 και 5) δίνει και τις δύο ζώνες. Το ίδιο πρότυπο παρατηρείται και στο δείγμα DNA του μητρικού ορού (δείγματα 2 και 6). Αντίθετα στο μητρικό περιφερικό αίμα ανιχνεύεται μόνο η ζώνη των 915 bp (δείγματα 3 και 7). Στα κενά δείγματα (4 και 8) όλες οι ζώνες απουσιάζουν, αποκλείοντας κάθε μορφής επιμόλυνση.

Multiplex PCR

100bp ladder 1 2 3 4



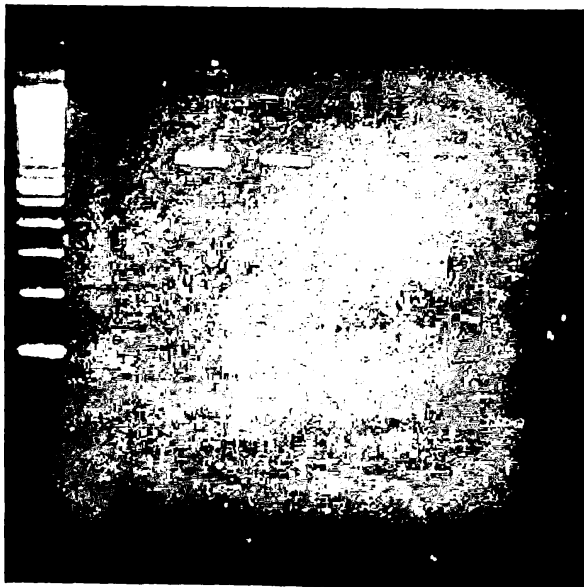
- 1 πατρικό DNA
- 2 DNA από δείγμα μητρικού ορού
- 3 μητρικό DNA
- 4 blank

Lep1/Lep3 808 bp

Lep2/Lep3 915 bp

Simplex PCR

100bp ladder 5 6 7 8



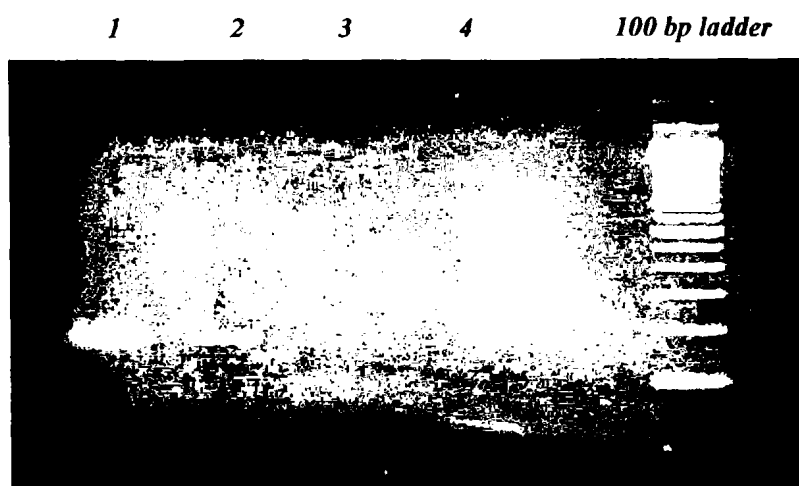
- 5 πατρικό DNA
- 6 DNA από δείγμα μητρικού ορού
- 7 μητρικό DNA
- 8 blank

Lep1/Lep3 808 bp

4. ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ

Από την ανάλυση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στα 60 δείγματα ορού γυναικών που συλλέχθηκαν την 7^η εβδομάδα της κύησης, οι ειδικές γενετικές αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος DYS14 και DYZ1 ανιχνεύθηκαν στα 32 δείγματα ορού γυναικών που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα. Στα 28 δείγματα ορού γυναικών που κυοφορούσαν θήλεα έμβρυα καμία από τις δύο αλληλουχίες δεν ανιχνεύθηκαν. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν μετά τον τοκετό ή σε κάποιες περιπτώσεις από τη λήψη χοριακών λαχνών την 12^η εβδομάδα της κύησης.

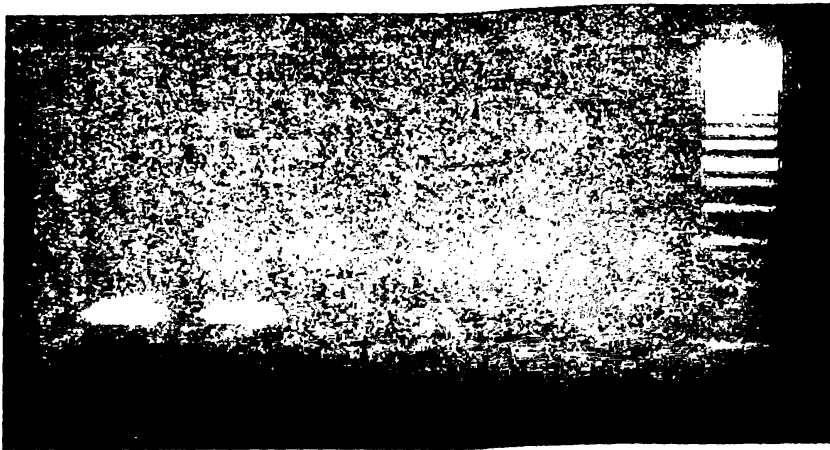
Γονίδιο DYS14



- 1: DNA από άρρεν άτομο
- 2: εμβρυϊκό DNA (άρρεν έμβρυο)
- 3: DNA από θήλυ άτομο
- 4: εμβρυϊκό DNA (θήλυ έμβρυο)

Γονίδιο DYZ1

1 . . 2 3 4 100 bp ladder



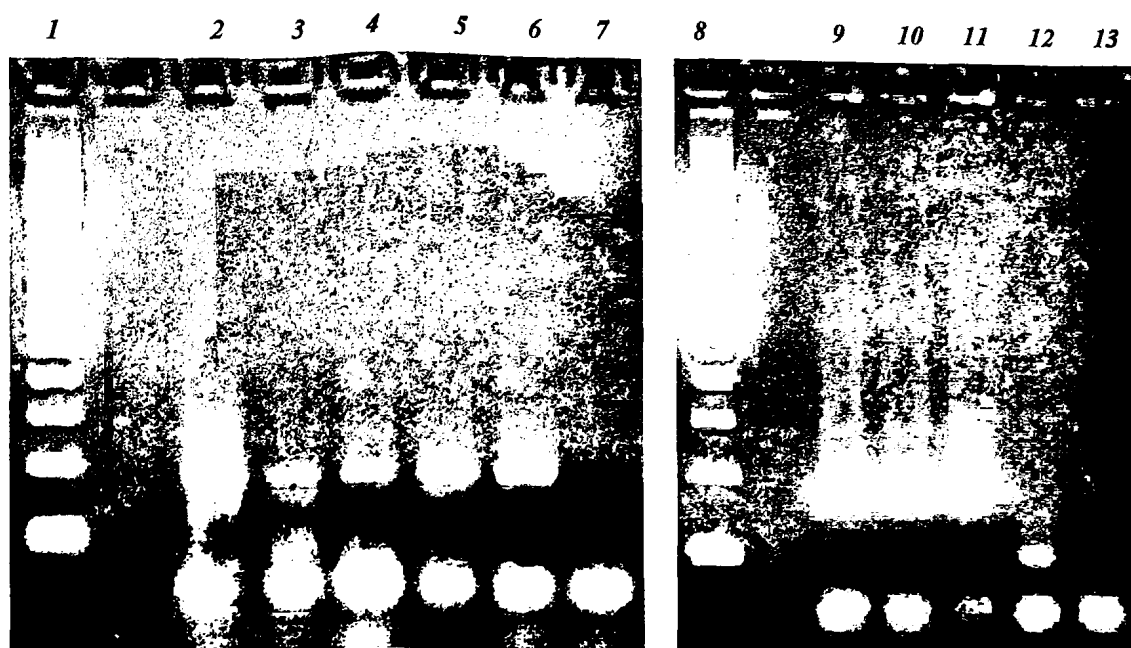
- 1: DNA από άρρεν άτομο
- 2: εμβρυϊκό DNA (άρρεν έμβρυο)
- 3: DNA από θήλυ άτομο
- 4: εμβρυϊκό DNA (θήλυ έμβρυο)

5. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΪΚΟΥ DNA ΣΤΗ ΜΗΤΡΙΚΗ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ 24 ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΤΟΚΕΤΟ

Από την ανάλυση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA, οι ειδικές γενετικές αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος DYS14 and DYZ1 ανιχνεύθηκαν στα 30 δείγματα ορού γυναικών που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα, που συλλέχθηκαν 24 ώρες μετά τον τοκετό. Ως δείγματα control χρησιμοποιήθηκαν 20 δείγματα ορού που συλλέχθηκαν από γυναίκες 24 ώρες μετά τον τοκετό θηλέων εμβρύων. Σε αυτά τα δείγματα καμία από τις δύο αλληλουχίες δεν ανιχνεύθηκε.



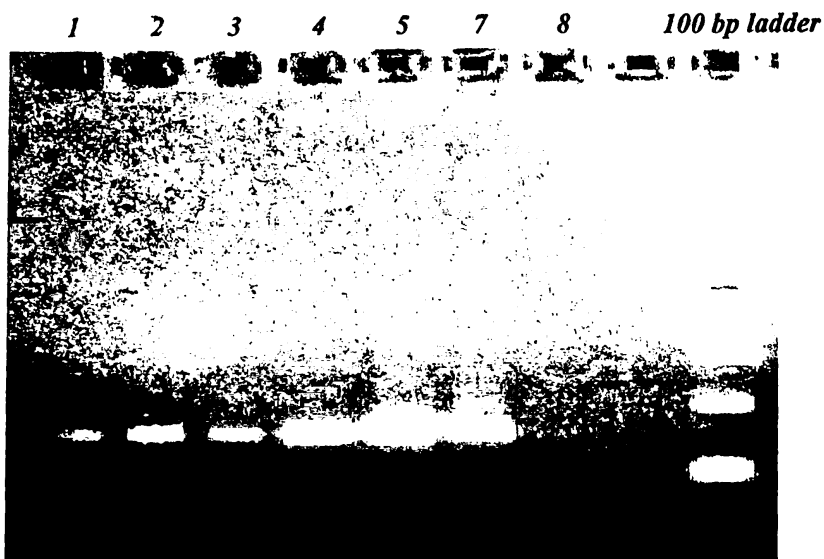
Γονίδιο DYS14



1. 100 bp DNA ladder
- 2-6 DNA από δείγματα ορού γυναικών που κυοφορούσαν αρρενα έμβρυα στο πρώτο τρίμηνο της κύησης
7. κενό δείγμα
8. 100 bp DNA ladder
- 9-11 DNA από δείγματα ορού γυναικών που κυοφορούσαν αρρενα έμβρυα 24 ώρες μετά τον τοκετό
12. DNA από δείγμα ορού γυναίκας που κυοφορούσε θήλυ έμβρυο 24 ώρες μετά τον τοκετό.
13. κενό δείγμα

DYS14 198b

Γονίδιο DYZ1



- 1-3 DNA από δείγματα ορού γυναικών που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα στο πρώτο τρίμηνο της κύησης
 - 4-6 DNA από δείγματα ορού γυναικών που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα 24 ώρες μετά τον τοκετό
 7. DNA από δείγμα ορού γυναίκας που κυοφορούσε θήλυ έμβρυο 24 ώρες μετά τον τοκετό
 8. κενό δείγμα
 9. 100 bp DNA ladder
- DYZ1 149 bp**

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ Β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Η β-μεσογειακή αναιμία είναι μία αυτοσωματική υπολειπόμενη νόσος που οφείλεται σε ετερογενείς διαταραχές της έκφρασης του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Περισσότερες από 170 διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου της β-σφαιρίνης έχουν περιγραφεί. Οι χρωμοσωμικές περιοχές που φέρουν τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα βρίσκονται σε ισχυρή ισορροπία με ειδικά πρότυπα των πολυμορφισμών μεγέθους περιοριστικού τμήματος (RFLPs) [125]. Αυτά τα πρότυπα, είναι γνωστά ως απλότυποι και η ανάλυσή τους βοηθάει στην προγεννητική διάγνωση της β-μεσογειακής αναιμίας [137] ως έμμεση επιβεβαίωση των μεταλλάξεων.

Η ανάλυση των πολυμορφισμών του γονιδίου της β-σφαιρίνης, τόσο στα ζευγάρια των ετεροζυγωτών όσο και στα άτομα του γενικού πληθυσμού, με τεχνικές PCR-RFLPs αποκάλυψε τη συχνότητα του κάθε γονοτύπου καθώς και των αλληλομόρφων για κάθε πολυμορφισμό. Συγκρίνοντας τους δύο πληθυσμούς ατόμων, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στη συχνότητα των γονοτύπων και των αλληλομόρφων. Στην περίπτωση των πολυμορφισμών *AvaII/β*, *HindII/5'ψβ* και *XmnI/Gγ*, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ήταν στατιστικά σημαντικές ($P < 0,05$) ενώ για τους υπόλοιπους πολυμορφισμούς οι κατανομές ήταν παρόμοιες στους δύο πληθυσμούς.

Αναλύοντας τους γονοτύπους των ζευγαριών για κάθε πολυμορφισμό, βρέθηκε ότι το 39% των ζευγαριών ετεροζυγωτών και το 29% των ζευγαριών του γενικού πληθυσμού παρουσιάζουν τουλάχιστον ένα πληροφοριακό πολυμορφισμό. Ένας πολυμορφισμός



θεωρείται πληροφοριακός σε ένα ζευγάρι, όταν οι δύο γονείς είναι ομοζυγώτες για τα δύο διαφορετικά αλληλόμορφα της γενετικής θέσης. Η ανάλυση χ^2 χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς. Το στατιστικό πρότυπο $P > 0.05$ που βρέθηκε, ήταν στατιστικά μη σημαντικό. Συγκρίθηκε επίσης το ποσοστό των πληροφοριακών ζευγαριών για κάθε πολυμορφισμό. Παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση ανάμεσα στα άτομα του γενικού πληθυσμού και τους ετεροζυγώτες. Οι πολυμορφισμοί HindIII/Gγ και HindII/3Ψβ ήταν οι πιο πληροφοριακοί πολυμορφισμοί, ενώ οι AnaII/β και AnaII/ψβ παρουσίαζαν δύο με τρεις φορές υψηλότερη πληροφοριακότητα στα ζευγάρια των ετεροζυγωτών σε σχέση με τα ζευγάρια του γενικού πληθυσμού. Η μελέτη των ποσοστών αυτών είναι ιδιαίτερα σημαντική, διότι δίνει πληροφορίες σχετικά με τη δυνατότητα χρήσης των πολυμορφισμών ως δείκτες μη επεμβατικής προγεννητικής ανίχνευσης των εμβρυϊκών μεταλλάξεων του γονιδίου της β-σφαιρίνης.

Όπως έχει περιγραφεί [125,138] κάθε μετάλλαξη συνδέεται με έναν ή περισσότερους διαφορετικούς απλοτύπους. Σε αυτή τη μελέτη, από τη συσχέτιση των μεταλλάξεων με τους πολυμορφισμούς, παρατηρήθηκε ένας συγκεκριμένος απλότυπος για κάθε μετάλλαξη, πιθανώς λόγω του κλειστού πληθυσμού που μελετήθηκε. Αυτό το εύρημα ενισχύει την πληροφοριακότητα των πολυμορφισμών και την χρήση τους ως δείκτες μη επεμβατικής ανίχνευσης της πατρικής μετάλλαξης στη μητρική κυκλοφορία. Δεν βοηθάει όμως όταν και οι δύο γονείς φέρουν την ίδια μετάλλαξη.

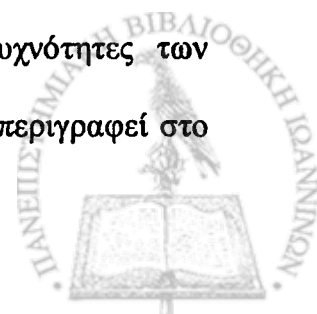
Από την ανάλυση των μεταλλάξεων του γονιδίου της β-σφαιρίνης στα 100 ζευγάρια των ετεροζυγωτών, με τις μεθόδους DGGE και ARMS, βρέθηκε ότι οι μεταλλάξεις IVS1-110, Codon 39, IVS1-1, HbS και IVSII-1 ήταν οι πιο συχνές



| | Κατταμής 1990 | Καραμπαμπά 1991 | Λουκόπουλος 1996 | Γεωργίου 2003 | Λάζαρος 2005 |
|---------------------|------------------|--------------------|---------------------|------------------|-----------------|
| Είδος μετάλλαξης | % | % | % | % | % |
| IVSI-110 | 42,55 | 41,94 | 43,2 | 42,9 | 33,5 |
| Cd-39 | 16,95 | 19,35 | 20,9 | 23,7 | 19 |
| IVSI-1 | 13,22 | 16,13 | 13,9 | 9,8 | 10,8 |
| IVSI-6 | 7,18 | 11,52 | 8,8 | 3,6 | 6,7 |
| IVSII-745 | 6,9 | 1,38 | 3 | 2,5 | 3,1 |
| Cd-6 | 2,87 | 2,3 | 2,8 | 5,8 | 2,6 |
| IVSII-1 | 2,01 | 2,3 | 2,1 | 9 | 8,3 |
| -87 | 1,72 | 2,3 | 2,1 | - | 1 |
| IVSI-5 | 0,86 | - | - | 0,9 | 1 |
| 44 bp del | 0,57 | - | - | 0,5 | 1 |
| Cd-8 | 0,57 | 0,46 | 1,1 | - | - |
| IVSII-848 | 0,57 | - | - | - | - |
| -30 | 0,29 | - | - | - | - |
| Cd-8/9 | 0,29 | - | - | - | - |
| HbS | - | - | - | - | 9,8 |
| Lepore | - | - | - | - | 1 |
| δβ sicilian | - | - | - | - | 1,5 |
| Cd-5 | - | - | - | 1,4 | 0,5 |
| Cd-22 | - | - | - | - | 0,5 |
| άγνωστες | 1,44 | 2,3 | 1,6 | - | 0 |

Πίνακας 1. Είδος και συχνότητες των μεταλλάξεων του γονιδίου της β-σφαιρίνης.

μεταλλάξεις (33,5 %, 19% , 10,8%, 9,8% και 8,3% αντίστοιχα). Αυτές οι μεταλλάξεις αποτελούν το 81,4% των μοριακών βλαβών του γονιδίου της β-σφαιρίνης στην περιοχή της Ηπείρου. Συνολικά παρατηρήθηκαν 15 διαφορετικές μεταλλάξεις. Οι συχνότητες των μεταλλάξεων του γονιδίου της β-σφαιρίνης στον Ελληνικό πληθυσμό έχουν περιγραφεί στο



παρελθόν σε τέσσερις μελέτες (Πίνακας 1) [139,140,141,142]. Η μετάλλαξη IVSI-110 και στην Ήπειρο, όπως συμβαίνει και σε ολόκληρο τον Ελληνικό πληθυσμό, εντοπίστηκε με τη μεγαλύτερη συχνότητα σε ένα ποσοστό 33,5% των φορέων β-μεσογειακής αναιμίας. Πρόκειται για μετάλλαξη που ανιχνεύεται με μεγάλη συχνότητα σε όλες τις χώρες τις Μεσογείου. Η δεύτερη σε σειρά σημαντικότερη μετάλλαξη είναι η Codon 39, η οποία συμβαδίζει με το γενικό ποσοστό του Ελληνικού πληθυσμού που περιγράφηκε σε προηγούμενες μελέτες [142]. Και αυτή η μετάλλαξη ανιχνεύεται με μεγάλη συχνότητα στις χώρες τις Μεσογείου.

Από τη σύγκριση των παρόντων αποτελεσμάτων με αυτά των προηγούμενων μελετών, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην μετάλλαξη IVSII-1 η οποία στην περιοχή της Ηπείρου βρίσκεται σε ποσοστό 8,3%, δηλαδή σε τετραπλάσια συχνότητα απ' ότι ανιχνεύεται στην υπόλοιπη Ελλάδα. Επίσης, στην Ήπειρο παρατηρήθηκαν κάποιες άλλες μεταλλάξεις που δεν αναφέρθηκαν στον υπόλοιπο Ελληνικό πληθυσμό όπως οι Cd-5 και Cd-22. Η Cd-22 έχει παρατηρηθεί στην Τουρκία, ενώ η Cd-5 στην Τουρκία και τα Σκόπια. Από την ανάλυση των μεταλλάξεων στα 97 ζευγάρια των ετεροζυγωτών, παρατηρήθηκε ιδιαίτερα αυξημένο ποσοστό της μετάλλαξης δβ sicilian. Η μετάλλαξη αυτή είναι ιδιαίτερα συχνή στην περιοχή της Σικελίας, αλλά και στην βορειο-δυτική Ελλάδα. Η μοριακή βάση της δβ μεσογειακής αναιμίας περιγράφηκε σε προηγούμενη μελέτη [143]. Παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την αιμοσφαιρίνη Lepore, για την οποία επιτεύχθηκε μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση με τη χρήση ελεύθερου εμβρυϊκού DNA. Είναι πιθανό στο άμεσο μέλλον να πραγματοποιηθεί μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση της μετάλλαξης δβ sicilian, αν βρεθούν τα κατάλληλα πληροφοριακά ζευγάρια.

Το 80.4 % των ζευγαριών παρουσίαζε πληροφοριακές μεταλλάξεις , δηλαδή διαφορετική πατρική και μητρική μετάλλαξη. Από την άλλη πλευρά, όπως προαναφέρθηκε, το 39% των ζευγαριών ετεροζυγωτών παρουσίαζαν έναν τουλάχιστον πληροφοριακό



πολυμορφισμό. Δηλαδή, η πληροφοριακότητα των μεταλλάξεων είναι διπλάσια από αυτή των πολυμορφισμών. Επομένως, οι μεταλλάξεις αποτελούν καλύτερους δείκτες για την μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση των αιμοσφαιρινοπαθειών από τους πολυμορφισμούς. Βρίσκοντας τον πιο πληροφοριακό δείκτη, οι μη επεμβατικές τεχνικές θα μπορέσουν μελλοντικά να χρησιμοποιηθούν για την προγεννητική ανίχνευση των εμβρυϊκών μεταλλάξεων και συνεπώς για την υγεία του εμβρύου. Εξαιτίας του ότι κάθε μετάλλαξη συνδυάζεται με ένα συγκεκριμένο απλότυπο, τα ζευγάρια με κοινές μεταλλάξεις δεν παρουσιάζουν πληροφοριακούς πολυμορφισμούς. Επομένως το ποσοστό πληροφοριακότητας των πολυμορφισμών δεν μπορεί να δράσει αθροιστικά με το ποσοστό πληροφοριακότητας των μεταλλάξεων.

2. ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ IVS1-110 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ Β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις του γονιδίου της β-σφαιρίνης είναι σημειακές μεταλλάξεις και οφείλονται σε μονονουκλεοτιδικές αλλαγές. Η ανίχνευση αυτών των μονογονιδιακών διαταραχών απαιτεί ευαίσθητες τεχνικές, ώστε να διαχωριστεί το μεταλλαγμένο από το φυσιολογικό αλληλόμορφο. Η προγεννητική διάγνωση αυτών των μεταλλάξεων βασίζεται σε επεμβατικές μεθόδους όπως η αμνιοπαρακέντηση και η λήψη χοριακών λαχνών. Αυτές οι τεχνικές, όμως, παρουσιάζουν μικρό αλλά αξιοσημείωτο κίνδυνο για το έμβρυο [144,145].

Λειτουργικά εμβρυϊκά κύτταρα, απομονωμένα από το μητρικό αίμα, έχουν αναλυθεί με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ενός κυττάρου για τη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση των αιμοσφαιρινοπαθειών [146, 147]. Οι κύριοι περιορισμοί για τη χρήση των



τεχνικών αυτών σε κλινική βάση είναι ο χαμηλός και ασταθής αριθμός εμβρυϊκών κυττάρων κατά τη διάρκεια της κύησης (περίπου ένα εμβρυϊκό κύτταρο/ml μητρικού αίματος) [2] και η πολυπλοκότητα των τεχνικών απομόνωσης των κυττάρων. Αντίθετα, το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA έχει το πλεονέκτημα της ταχύτητας και της αξιοπιστίας. Η πρώτη μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση μιας μετάλλαξης του γονιδίου της β-σφαιρίνης, χρησιμοποιώντας ελεύθερο εμβρυϊκό DNA, έγινε δυνατή από τους Chiu et. al. (2002) [148].

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η IVSI-110 μετάλλαξης του γονιδίου της β-σφαιρίνης καλύπτει το 1/3 των παρατηρούμενων μεταλλάξεων. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να επιτευχθεί μη επεμβατική ανίχνευση αυτής της μετάλλαξης χρησιμοποιώντας δείγματα μητρικού ορού. Από τα 97 ζευγάρια ετεροζυγωτών που μελετήθηκαν με μη επεμβατικές μεθόδους, τα πληροφοριακά ζευγάρια με πατρική μετάλλαξη την IVSI-110 ήταν 37. Σε 25 από αυτά τα ζευγάρια το έμβρυο βρέθηκε να είναι φορέας της πατρικής μετάλλαξης. Η ανίχνευση αυτή επιτεύχθηκε μη επεμβατικά με 97% ευαισθησία και 100% ειδικότητα. Η πατρική μετάλλαξη IVSI-110 δεν ανιχνεύθηκε μόνο σε ένα δείγμα ορού, το οποίο συλλέχθηκε την 7^η εβδομάδα της κύησης, ίσως λόγω της πολύ χαμηλής συγκέντρωσης του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA. Αυτό το δείγμα οδήγησε στο ψευδές συμπέρασμα του μηδενικού κινδύνου για β-μεσογειακή αναιμία. Οι εμβρυϊκοί γονότυποι για τη μετάλλαξη IVSI-110 ανιχνεύθηκαν την 7^η με 9^η εβδομάδα της κύησης, δηλαδή 3 με 5 εβδομάδες πριν τη 12^η εβδομάδα που είναι δυνατή η λήψη χοριακών λαχνών.

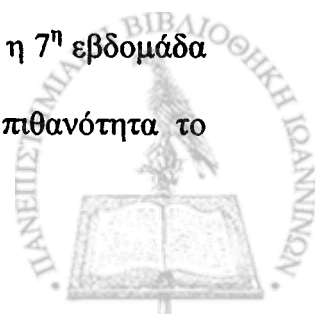
Έχει αναφερθεί ότι το συντριπτικό ποσοστό του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA έχει μοριακό βάρος μικρότερο των 0,3 κιλοβάσεων, ενώ στην αρχή της κύησης μόνο το 0.4% (0-5.2%) του συνολικού ελεύθερου εμβρυϊκού DNA έχει μέγεθος 0.5-1 κιλοβάσεων [149]. Παρόλο αυτά, η εμβρυϊκή αλληλουχία των 637 ζευγών βάσεων για τις ανάγκες της μεθόδου DGGE στη μελέτη μας ανιχνεύθηκε επιτυχώς. Οι παρατηρούμενες ζώνες, βέβαια, δεν είναι



ιδιαίτερα έντονες λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA και της μητρικής επιμόλυνσης στα δείγματα ορού.

Πρόσφατα, περιγράφηκε η ανίχνευση πατρικά κληρονομούμενων μεταλλάξεων του γονιδίου της β-σφαιρίνης χρησιμοποιώντας κλασμάτωση μεγέθους του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA [150]: Τέσσερις σημειακές μεταλλάξεις (IVSI-1, IVSI-110, IVSI-6, Codon 39) ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε συνδυασμό με ένα πεπτιδο-νουκλεϊκό σφιγκτήρα για την καταστολή ενίσχυσης του φυσιολογικού μητρικού αλληλομόρφου και μία ειδική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση του πατρικού μεταλλαγμένου αλληλομόρφου. Οι ηλικίες κύησης κυμαίνονταν από δέκα με δώδεκα εβδομάδες και η ευαισθησία ανίχνευσης από 81 έως 100%. Η συγκέντρωση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA αυξάνεται καθώς η κύηση προοδεύει [6]. Πέντε περιπτώσεις πατρικής IVSI-110 μετάλλαξης του γονιδίου της β-σφαιρίνης μελετήθηκαν με ευαισθησία 100%. Με περισσότερα δείγματα θα μπορούσε να προσδιοριστεί η θετική και η αρνητική προγνωστική αξία της μεθόδου. Αντίθετα, στην παρούσα μελέτη τα δείγματα μητρικού ορού συλλέχθηκαν την 7^η με 9^η εβδομάδα της κύησης, δηλαδή το λιγότερο τρεις εβδομάδες νωρίτερα. Όπως είναι γνωστό, η συγκέντρωση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA αυξάνεται όσο η κύηση προοδεύει [6]. Δεν πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση μεγέθους του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA λόγω της ιδιαίτερα χαμηλής συγκέντρωσης του την 7^η με 9^η εβδομάδα της κύησης.

Σε περιπτώσεις εμβρύων σε κίνδυνο για β-μεσογειακή αναιμία και άλλες αιμοσφαιρινοπάθειες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA για τη μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση πατρικά κληρονομούμενων μεταλλάξεων της β-σφαιρίνης. Όταν οι γονείς είναι φορείς διαφορετικών μεταλλάξεων είναι δυνατό να διακριθεί η πιθανότητα το έμβryo να έχει επηρεαστεί από τη διαταραχή τόσο νωρίς όσο η 7^η εβδομάδα της κύησης. Αν η πατρική μετάλλαξη είναι παρούσα, τότε υπάρχει 50% πιθανότητα το



έμβρυο να έχει μείζονα β-μεσογειακή αναιμία. Στις περιπτώσεις αυτές, είναι απαραίτητη η χρήση επεμβατικών μεθόδων για την εμβρυϊκή γονοτυπική ανάλυση. Επομένως, η απουσία της πατρικής μετάλλαξης μειώνει την πιθανότητα το έμβρυο να πάσχει στο 0%, καθιστώντας τις επεμβατικές τεχνικές μη απαραίτητες. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να περιοριστούν οι επεμβατικές τεχνικές στο μισό, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο για το έμβρυο και επιτυγχάνοντας γρήγορα αποτελέσματα προγεννητικής ανίχνευσης.

Θα μπορούσε επίσης η τεχνική αυτή να συνδυαστεί με προγεννητική διάγνωση πρώτου τριμήνου (coelomic fluid cells) γιατί ακόμη και αν ο κίνδυνος της μεθόδου αυτής ήταν μεγαλύτερος από των καθιερωμένων μεθόδων (<3%) [151], ο κίνδυνος για μεσογειακή αναιμία στο επίπεδο του 50% είναι πολλαπλάσιος [152,153].

Στο άμεσο μέλλον, θα είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν οι τεχνικές μη επεμβατικής προγεννητικής ανίχνευσης σαν ένα “τέστ” πριν τις επεμβατικές μεθόδους, όπως η αμνιοπαρακέντηση και η λήψη χοριακών λαχνών.

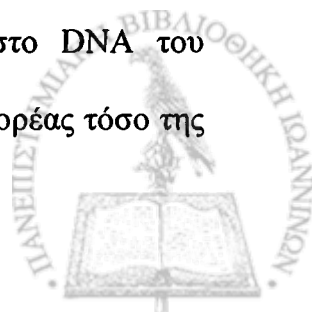
3. ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ LEPORE

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε η περίπτωση μιας εγκύου γυναίκας, πρωτοτόκου, που ήταν ετεροζυγώτης για τη β-μεσογειακή αναιμία (φορέας της μετάλλαξης IVSI-110). Ο σύζυγος της ήταν ετεροζυγώτης για το γονίδιο της αιμοσφαιρίνης Lepore. Επομένως, υπήρχε κίνδυνος το έμβρυο να είναι διπλός ετεροζυγώτης, δηλαδή φορέας αιμοσφαιρίνης Lepore και της μετάλλαξης IVSI-110 του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Σε αυτή την περίπτωση θα παρουσίαζε τα συμπτώματα που παρουσιάζει ένα άτομο που πάσχει από μείζονα μεσογειακή αναιμία και η διακοπή της κύησης θα ήταν απαραίτητη.



Το γονίδιο της αιμοσφαιρίνης Lepore προκύπτει από μία αναδιάταξη των βήτα και δέλτα γονιδίων της οικογένειας των βήτα σφαιρινών. Με τον τρόπο αυτό παράγεται μια αιμοσφαιρίνη που αποτελείται από δύο φυσιολογικές άλφα και δύο δέλτα-βήτα ανασυνδυασμένες αλυσίδες. Το αποτέλεσμα της αναδιάταξης είναι ένα έλλειμμα 7.4 κιλοβάσεων, το οποίο περιέχει το 3' άκρο του δέλτα γονιδίου, το 5' άκρο του βήτα γονιδίου και την ανασυνδυασμένη διαγονιδιακή περιοχή [154]. Η αιμοσφαιρίνη Lepore παρουσιάζει μεγάλη εξάπλωση σε πολλούς διαφορετικούς πληθυσμούς συμπεριλαμβανομένων των Ελλήνων, των Κυπρίων, των Ιταλών, των Βουλγάρων, των Ρουμάνων, των Τούρκων, των Αφροαμερικανών και των Ινδών. Τρεις διαφορετικές μορφές αιμοσφαιρίνης Lepore έχουν περιγραφεί: της Βοστώνης, της Βαλτιμόρης, της Ολλανδίας, με παρόμοιες χρωματογραφικές και ηλεκτροφορητικές ιδιότητες [111]. Στους ετεροζυγώτες, η αιμοσφαιρίνη Lepore συντίθεται σε χαμηλές ποσότητες που κυμαίνονται από 5 με 15%. Οι Hb Lepore/β-μεσογειακή αναιμία σύνθετοι ετεροζυγώτες παρουσιάζουν συμπτώματα σοβαρής αναιμίας κατά τη διάρκεια των πρώτων χρόνων της ζωής και συχνά υπόκεινται σε σπληνεκτομή σε πιο προχωρημένη ηλικία. Παρουσιάζουν δηλαδή συμπτώματα παρόμοια με τη μείζονα β-μεσογειακή αναιμία [155].

Με τη χρήση ελεύθερου εμβρυϊκού DNA που απομονώθηκε από τη μητρική κυκλοφορία την έβδομη εβδομάδα της κύησης βρέθηκε ότι το έμβρυο ήταν φορέας της πατρικής μετάλλαξης, δηλαδή φορέας του γονιδίου της Lepore. Ο γονότυπος του εμβρύου για την αιμοσφαιρίνη Lepore ανιχνεύθηκε την έβδομη εβδομάδα της κύησης, δηλαδή πέντε εβδομάδες πριν την ηλικία κύησης που είναι δυνατή η λήψη χοριακών λαχνών [156]. Επίσης, η μη επεμβατική ανίχνευση του φύλου του εμβρύου πραγματοποιήθηκε στην ίδια ηλικία κύησης. Ο εμβρυϊκός γονότυπος επιβεβαιώθηκε την δωδέκατη εβδομάδα της κύησης όταν πραγματοποιήθηκε λήψη χοριακών λαχνών και ανάλυση μεταλλάξεων στο DNA του εμβρύου. Από την ανάλυση βρέθηκε ότι το έμβρυο ήταν άρρεν και ότι ήταν φορέας τόσο της



πατρικής όσο και της μητρικής μετάλλαξης, δηλαδή ήταν ένας σύνθετος ετεροζυγώτης IVSI-110/Hb Lepore.

Έχει αναφερθεί ότι το μεγαλύτερο μέρος του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA έχει μοριακό βάρος μικρότερο των 0,3 κιλοβάσεων, ενώ στην αρχή της κύησης μόνο το 0.4% (0-5.2%) του συνολικού ελεύθερου εμβρυϊκού DNA έχει μέγεθος 0.5-1 κιλοβάσεων [149]. Παρόλο που η ποσότητα του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA είναι αρκετά χαμηλή, με το πρωτόκολλο αυτό, η 808 ζευγών βάσεων αλληλουχία του ανασυνδυασμένου δέλτα-βήτα γονιδίου ανιχνεύθηκε επιτυχώς.

Το πρωτόκολλο αυτό βασίστηκε στο ελεύθερο εμβρυϊκό DNA, το οποίο είναι πολύ ευκολότερα απομονώσιμο από τη μητρική κυκλοφορία σε σχέση με τα εμβρυϊκά κύτταρα, και στην simplex PCR ανάλυση, ώστε να επιτευχθεί μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση της παθολογικής αιμοσφαιρίνης Lepore την έβδομη εβδομάδα της κύησης. Η μοριακή διάγνωση της αιμοσφαιρίνης Lepore σε έμβρυα επιτεύχθηκε παλιότερα χρησιμοποιώντας μητρικό αίμα ως πηγή εμβρυϊκών κυττάρων σε τρεις περιπτώσεις κύσεων με έμβρυα σε κίνδυνο για Hb Lepore/ β -μεσογειακή αναιμία σύνθετη ετεροζυγωτία [157] μετά την όγδοη εβδομάδα της κύησης. Στο πρωτόκολλο αυτό, χρησιμοποιήθηκε PCR ανάλυση δύο σταδίων με τέσσερις διαφορετικούς εκκινητές σε διάφορους συνδυασμούς και πέψη των PCR προϊόντων με περιοριστικά ένζυμα (PvuII and AvaII).

Σύμφωνα με το παρόν πρωτόκολλο τα έμβρυα που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο για θαλασσαιμία ή άλλες αιμοσφαιρινοπάθειες είναι δυνατό να ανιχνευθούν από την έβδομη εβδομάδα της κύησης, όταν οι γονείς τους είναι φορείς διαφορετικών μεταλλάξεων. Σε αυτές τις περιπτώσεις η παρουσία της πατρικής μετάλλαξης οι επεμβατικές μέθοδοι προγεννητικής διάγνωσης, όπως η λήψη χοριακών λαχνών και η αμνιοπαρακέντηση, είναι απαραίτητες. Αντίθετα, η απουσία της πατρικής μετάλλαξης από τη μητρική κυκλοφορία αποκλείει την πιθανότητα το έμβρυο να πάσχει, καθιστώντας τις επεμβατικές μεθόδους προγεννητικής



διάγνωσης προαιρετικές. Αυτή η μέθοδος ανίχνευσης της πατρικής συνεισφοράς είναι αξιόπιστη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί με την ίδια βαρύτητα για την παρουσία ή απουσία της πατρικής μετάλλαξης.

Ο μητρικός ορός χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς ως πηγή ελεύθερου εμβρυϊκού DNA για τη μη επεμβατική ανίχνευση μιας πατρικά κληρονομούμενης μετάλλαξης την έβδομη εβδομάδα της κύησης [156].

4. ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΪΚΟΥ ΦΥΛΟΥ

Πραγματοποιήθηκε μη επεμβατική ανίχνευση του εμβρυϊκού φύλου ανιχνεύοντας ειδικές γενετικές αλληλουχίες του χρωμοσώματος Y στο μητρικό ορό. Η ευαισθησία μη επεμβατικής ανίχνευσης άρρενων εμβρύων χρησιμοποιώντας την τεχνική PCR στο μητρικό αίμα ήταν 83-94% [158,159,160] τη 10^η με τη 17^η εβδομάδα της κύησης, ενώ η ευαισθησία της *in situ* υβριδοποίησης ή της PCR επεξεργασίας των ελεύθερων εμβρυϊκών κυττάρων κυμαίνονταν από 55-86% [161,162,163]. Παρόλα αυτά, οι τεχνικές αυτές είναι ιδιαίτερα πολύπλοκες και χρονοβόρες και με ιδιαίτερα χαμηλή ευαισθησία ώστε να χρησιμοποιηθεί σε κλινική βάση. Από την άλλη πλευρά, στην παρούσα μελέτη, όταν χρησιμοποιήθηκε μητρικός ορός η ευαισθησία της μεθόδου άγγιξε το 100% ενώ με την χρήση μητρικού πλάσματος η ευαισθησία μειώθηκε στο 90%. Επειδή θεωρητικά δεν υπάρχει διαφορά στη συγκέντρωση του εμβρυϊκού DNA ανάμεσα στο μητρικό πλάσμα και ορό, η διαφορά στην ευαισθησία ανίχνευσης του πιθανώς οφείλεται: (α) στην μεγαλύτερη δυνατότητα εξαγωγής εμβρυϊκού DNA από τον ορό σε σχέση με το πλάσμα, ή (β) στη χαμηλότερη συγκέντρωση του εμβρυϊκού DNA στο μητρικό πλάσμα, σε σχέση με τον ορό, στην αρχή της εγκυμοσύνης.



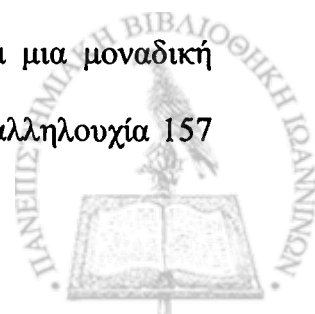
Η μεγάλη ευαισθησία ανίχνευσης εμβρυϊκών αλληλουχιών στη μητρική κυκλοφορία με την τεχνική PCR πιστοποιεί την αρκετά υψηλή συγκέντρωση του εμβρυϊκού DNA στο μητρικό πλάσμα και ορό. Η ανίχνευση των ειδικών γενετικών αλληλουχιών DYZ1 και DYS14 στις περιπτώσεις κήσεων αρρένων εμβρύων δείχνει ότι η συγκέντρωση του εμβρυϊκού DNA στο μητρικό ορό είναι μεγαλύτερη από 1%, δεδομένου ότι η συγκέντρωση του συνολικού DNA είναι η ίδια σε δείγματα ορού αρρένων ατόμων και εγκύων γυναικών και ότι δεν υπάρχει διαφορά στον αριθμό των DYZ1 αντιγράφων στα άρρενα άτομα. Αυτή η συγκέντρωση είναι 385 φορές υψηλότερη από αυτή που ανέφεραν οι Hamada et. al. (1993) [164] στο κυτταρικό κλάσμα. Με την χρήση ποσοτικής αντίδρασης πολυμεράσης αληθινού χρόνου (Real-time PCR) αποδείχθηκε ότι στην αρχή της εγκυμοσύνης (11-17 εβδομάδες κύησης) η συγκέντρωση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA κυμαίνεται από 0.014-0.54% (Μέσος όρος 0.13%) [6]. Αυτή η συγκέντρωση είναι παρόμοια με αυτή του DNA των ελεύθερων εμβρυϊκών κυττάρων στη μητρική κυκλοφορία (0.001-5%) [165].

Η χαμηλή συγκέντρωση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία κατά την κύηση μπορεί να οδηγήσει σε λάθος διάγνωση του εμβρυϊκού φύλου. Λόγω του ότι η συγκέντρωση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο μητρικό πλάσμα και ορό αυξάνεται με την ηλικία κύησης [6], μια λάθος διάγνωση του εμβρυϊκού φύλου είναι πιο πιθανή σε μικρότερες από ότι σε μεγαλύτερες ηλικίες. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε μητρικό πλάσμα ως πηγή εμβρυϊκού DNA, όπου σε δύο περιπτώσεις κήσεων αρρένων εμβρύων καμία από τις αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος δεν ανιχνεύθηκαν οδηγώντας σε λάθος διάγνωση (ευαισθησία 90%). Για το λόγο αυτό η μελέτη αυτή στηρίχθηκε μόνο στη χρήση δειγμάτων μητρικού ορού. Σε αυτά η διάγνωση του εμβρυϊκού φύλου ήταν 100% επιτυχής. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν μετά τον τοκετό ή σε ορισμένες περιπτώσεις από τη λήψη χοριακών λαχνών.



Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης διαφέρουν από τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών. Η διαφορά παρατηρείται στο πεδίο της ευαισθησίας της τεχνικής. Αρχικά οι Smid et. al. (1997) [159], παρουσίασαν μία μέθοδο ανίχνευσης αλληλουχιών του Y χρωμοσώματος με ευαισθησία 94% χρησιμοποιώντας έμβρυα με ηλικίες κύησης κυμαινόμενες από 7 έως 12 εβδομάδες. Αντίθετα, οι Lo et. al. (1998) [6] χρησιμοποιώντας παρόμοιες ηλικίες κύησης (7^η-14^η εβδομάδα) πέτυχαν μια ευαισθησία της τάξης του 79%. Οι Honda et. al. (2001) [166] χρησιμοποιώντας πιο προχωρημένες ηλικίες κύησης (10^η-17^η εβδομάδα της κύησης) πέτυχαν μια ευαισθησία της τάξης του 87%. Τέλος, η ίδια ερευνητική ομάδα [38] χρησιμοποιώντας Real-Time PCR πέτυχαν ευαισθησία ανίχνευσης 95%. Οι μελέτες αυτές παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία, σε σχέση με την παρούσα μελέτη, παρά το γεγονός που οι ηλικίες κύησης είναι πιο προχωρημένες, γεγονός που εξασφαλίζει μεγαλύτερες ποσότητες ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία. Αυτή η μειωμένη ευαισθησία μπορεί να οφείλεται: (α) στην μικρότερη ποσότητα μητρικού πλάσματος ή ορού που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή ελεύθερου εμβρυϊκού DNA ή (β) στις διαφορετικές ειδικές γενετικές αλληλουχίες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του χρωμοσώματος Y.

Για την ανίχνευση του φύλου του εμβρύου αναλύθηκε ένας μεγάλος αριθμός ειδικών αλληλουχιών του χρωμοσώματος Y, ώστε να βρεθούν αυτές που παρουσιάζουν την μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν πειραματικά οι εξής αλληλουχίες: DYZ3, DYZ1, DYS14, SRY (sex-determining region), AMELY (γονίδιο της αμυλογενίνης στο Y χρωμόσωμα), AZFa (sY84, sY86, sY82, sY88), AZFb (sY127, sY134, sY105, sY152), AZFc (sY254, sY255). Επιλέχθηκαν τελικά οι DYZ1 και DYS14, διότι παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης. Η DYS14 είναι μια μοναδική αλληλουχία 198 ζευγών βάσεων ενώ η DYZ1 είναι μία επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 157



ζευγών βάσεων. Στη διαφορετική επαναληψιμότητα των δύο αυτών αλληλουχιών, καθώς και στο μέγεθος των αλληλουχιών οφείλεται και η μεγάλη διαφορά των κύκλων στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Η μοναδική αλληλουχία DYS14 απαιτεί διπλάσιο αριθμό κύκλων για την ανίχνευσή της. Παρόλα αυτά όμως, η ευαισθησία και των δύο αλληλουχιών για την ανίχνευση άρρενος εμβρυϊκού DNA την έβδομη εβδομάδα της κύησης είναι ακριβώς ίδια.

Το φύλο του εμβρύου μπορεί να ανιχνευθεί μη επεμβατικά με τη χρήση μητρικού ορού την 7^η εβδομάδα της κύησης. Σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες, η παρούσα τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένα τεστ πριν τη λήψη χοριακών λαχνών ή την αμνιοπαρακέντηση, οι οποίες παρουσιάζουν κάποιο βαθμό επικινδυνότητας για το έμβρυο. Αν ένα έμβρυο έχει αυξημένες πιθανότητες να φέρει κάποια υπολειπόμενη διαταραχή συνδεδεμένη με το X χρωμόσωμα και βρεθεί ότι είναι θήλυ με την μέθοδο αυτή, δεν θα είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί κάποια επεμβατική μέθοδος προγεννητικής διάγνωσης. Το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης στη μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση πατρικά κληρονομούμενων αυτοσωμικών επικρατών νοσημάτων που προκαλούνται από μεταλλάξεις στην αναπαραγωγική σειρά (germ cells) ή του εμβρυϊκού παράγοντα RhD και της συγγενούς υπερπλασίας των επινεφριδίων του εμβρύου.

5. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΪΚΟΥ DNA ΣΤΗ ΜΗΤΡΙΚΗ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ 24 ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΤΟΚΕΤΟ

Εμπύρηννα εμβρυϊκά κύτταρα βρέθηκαν στη μητρική κυκλοφορία κατά τη διάρκεια της κύησης και η χρήση τους στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση έχει αποδειχθεί [167,168]. Με την βοήθεια της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) επιβεβαιώθηκε η παρουσία εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα δεκαετίες μετά την κύηση

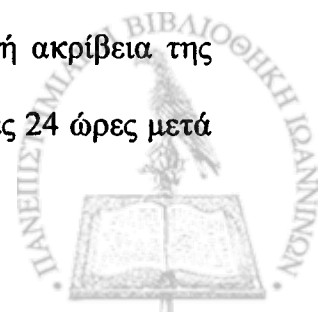


[169], καθώς και ότι τα μητρικά κύτταρα παραμένουν στο έμβρυο ακόμα και μετά την εηλικίωση [170]. Αυτό το εύρημα επιβεβαιώνει έναν μεγάλης διάρκειας μικροχαιρισμό που δημιουργείται στη μητέρα και το έμβρυο μετά την κύηση.

Έχει προταθεί ότι η παρουσία χαιρικών κυττάρων στο μητρικό αίμα συνδέεται με την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων, πιθανώς ως αποτέλεσμα μιας αντίδρασης του μητρικού οργανισμού στα κύτταρα αυτά παρόμοια με αυτή στις περιπτώσεις εισβολέα-ξενιστή [171]. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε σε περιπτώσεις συστηματικού σκληροδέρματος [172,173,174,175] και της θυρεοειδίτιδας του Χασιμότο. Αντίθετα, τα χαιρικά εμβρυϊκά κύτταρα δεν βρέθηκε να παίζουν κάποιο ρόλο στην πρωτογενή κίρρωση των χοληφόρων [176,177,178,179].

Εκτός από την παρουσία του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία κατά τη διάρκεια της κύησης, έχει επίσης δημοσιευθεί η παρουσία ελεύθερου DNA από νεοπλασματικούς ιστούς ή από μολυσματικούς παράγοντες στο ανθρώπινο αίμα [180,181]. Το ερώτημα για το αν ελεύθερο εμβρυϊκό DNA παραμένει στο μητρικό πλάσμα ή ορό μετά τον τοκέτο δεν έχει ακόμα διασαφηνιστεί. Υποθέτοντας ότι όχι μόνο εμβρυϊκά κύτταρα αλλά και θραύσματα ελεύθερου εμβρυϊκού DNA μπορούν να παραμείνουν στη μητρική κυκλοφορία μετά τον τοκετό μελετήσαμε 50 υγιείς γυναίκες.

Όπως αναφέρθηκε και στην αντίστοιχη ενότητα των αποτελεσμάτων μελετήθηκε η παρουσία ή απουσία του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στον μητρικό ορό μετά τον τοκετό. Επειδή το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA μπορεί να ανιχνευθεί μόνο μέσω κάποιων ειδικών αλληλουχιών του χρωμοσώματος Y, πραγματοποιήθηκε συλλογή 30 δειγμάτων ορού, γυναικών που κυοφορούσαν άρρενα έμβρυα. Τα δείγματα συλλέχθηκαν 24 ώρες μετά τον τοκετό και οι ειδικές γενετικές αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος DYS14 and DYZ1 ανιχνεύθηκαν στα με ευαισθησία 100%. Για να επιβεβαιωθεί η διαγνωστική ακρίβεια της τεχνικής, χρησιμοποιήθηκαν 20 δείγματα ορού που συλλέχθηκαν από γυναίκες 24 ώρες μετά



τον τοκετό θηλέων εμβρύων. Σε αυτά τα δείγματα καμία από τις δύο αλληλουχίες δεν ανιχνεύθηκε.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να εξαλειφθούν όλοι οι γνωστοί παράγοντες και πηγές μη εμβρυϊκού αλλογενούς γενετικού υλικού που κυκλοφορεί στο μητρικό αίμα. Για το λόγο αυτό η επιλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με αυστηρά κριτήρια αποκλείοντας γυναίκες με ιστορικό μεταγγίσεων αίματος, αμβλώσεων ή διδύμων κύσεων, όπως και γυναίκες με αυτοάνοσα νοσήματα. Επιπλέον, στο εργαστήριο πάρθηκαν όλα τα απαραίτητα μέτρα ώστε να αποφευχθεί κάθε περίπτωση επιμόλυνσης, που μπορεί να δώσει λάθος θετικό σήμα [182,183]. Τέλος, η μελέτη δειγμάτων ορού από γυναίκες που κυοφόρησαν θήλα εμβρυα επιβεβαίωσε την εγκυρότητα και την ακρίβεια της τεχνικής.

Είναι η πρώτη φορά που τέτοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί. Το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA ανακαλύφθηκε στη μητρική κυκλοφορία κατά τη διάρκεια της κύησης [5], αλλά η γρήγορη κάθαρση και η ολική εξαφάνισή του δύο ώρες μετά την κύηση δημοσιεύθηκε αργότερα σε μία μελέτη που συμμετείχαν δώδεκα γυναίκες [81]. Αντίθετα, τα περισσότερα εμβρυϊκά κύτταρα εκκαθαρίζονται δύο με τρεις μήνες μετά τον τοκετό [184,185]. Παρόλα αυτά, οι Invernizzi et. al. 2002 δημοσίευσαν την παρουσία αρρενος ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο 22% των γυναικών που κυοφόρησαν αρρενα εμβρυα μέχρι και δεκαετίες μετά την κύηση. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πλάσματος γυναικών που κυοφόρησαν αρρενα εμβρυα και η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε εβδομάδες ή και χρόνια μετά τον τοκετό.

Οι Smid et. al. (2003) [85] μελέτησαν αργότερα τη βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη παρουσία του εμβρυϊκού DNA στο μητρικό πλάσμα. Η βραχυπρόθεσμη παρουσία σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση ανιχνεύθηκε στις 47 από τις 105 γυναίκες που μελετήθηκαν μέσα σε διάστημα δύο ημερών από την κύηση. Δώδεκα από τα δεκατρία δείγματα που ξανά-αναλύθηκαν την τρίτη ημέρα έδωσαν αρνητικό σήμα. Μελετήθηκε επίσης



η μακροπρόθεσμη παρουσία εμβρυϊκού DNA σε 172 γυναίκες που είχαν στο ιστορικό τους κάποιο άρρεν έμβρυο. Σε καμία δεν ανιχνεύθηκαν αλληλουχίες του εμβρυϊκού DNA. Οι λόγοι για τους οποίους πιθανώς υπάρχει διαφορά στα αποτελέσματά των δύο μελετών είναι οι παρακάτω. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης εμβρυϊκού DNA το γονίδιο SRY που βρίσκεται στο Y χρωμόσωμα και όχι οι πιο ευαίσθητοι δείκτες DYS14 και DYZ1. Επίσης για την εξαγωγή του εμβρυϊκού DNA χρησιμοποιήθηκαν 400 μl πλάσματος, ενώ στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 5ml ορού που πιθανώς εξασφαλίζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση εμβρυϊκού DNA.

Δεν είναι ακόμα γνωστό πώς το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA μπορεί να είναι παρόν στη μητρική κυκλοφορία για μεγάλο διάστημα μετά την κύηση, αλλά η σχέση ανάμεσα στη συγκέντρωσή του και το χρόνο που μεσολάβησε από τον τοκετό δείχνει ότι είναι μια σταθερή και πιθανώς μόνιμη συνθήκη. Παρόλα αυτά, το εμβρυϊκό DNA που ανιχνεύθηκε στην παρούσα μελέτη 24 ώρες μετά τον τοκετό όπως και αυτό που ανίχνευσαν οι Invernizzi et. al. (2002) πιθανώς προέρχεται από την συνεχή λύση εναπομεινάντων εμβρυϊκών κυττάρων. Όπως προαναφέρθηκε, πολλά εμβρυϊκά κύτταρα μπορεί να εποικήσουν τους διάφορους ιστούς ή τον μυελό των οστών της μητέρας [169]. Συνεπώς μπορεί να ειπωθεί, ότι βλαστικά κύτταρα εμβρυϊκής προέλευσης απελευθερώνουν συνεχώς ελεύθερο εμβρυϊκό DNA στη μητρική κυκλοφορία. Στην παρούσα μελέτη, η ανίχνευση ελεύθερου εμβρυϊκού DNA, 24 ώρες μετά τον τοκετό, πιθανώς οφείλεται στη συνεχή λύση εναπομεινάντων εμβρυϊκών στη μητρική κυκλοφορία και όχι εμβρυϊκών κυττάρων που ενσωματώθηκαν σε ιστούς και όργανα της μητέρας.

Τελικά, θα πρέπει να διασαφηνιστεί γιατί τα δείγματα του μητρικού ορού και πλάσματος περιέχουν υψηλότερη συγκέντρωση εμβρυϊκού DNA από ότι λειτουργικών εμβρυϊκών κυττάρων [12], ακόμα και μετά τον τοκετό. Θα είναι επίσης σημαντικό να διευκρινιστεί γιατί η συγκέντρωση του εμβρυϊκού DNA στα δείγματα του μητρικού ορού και



πλάσματος κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι παρόμοια με αυτή 24 ώρες μετά τον τοκετό. Ο ρυθμός της εκκαθάρισης του εμβρυϊκού DNA θα προσφέρει πληροφορίες σχετικά με την εφαρμοσιμότητα της ποσοτικοποίησης του εμβρυϊκού DNA κατά τη διάρκεια της κύησης, καθώς και για το ρυθμό απελευθέρωσης του εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία. Θα βοηθήσει επίσης στην κατανόηση του ρόλου των νουκλεασών στην εκκαθάριση του εμβρυϊκού DNA από τη μητρική κυκλοφορία.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Το ποσοστό των πληροφοριακών ζευγαριών για κάθε πολυμορφισμό παρουσιάζει σημαντική διαφοροποίηση ανάμεσα στα άτομα του γενικού πληθυσμού και τους ετεροζυγώτες. Η μελέτη των ποσοστών αυτών είναι ιδιαίτερα σημαντική, διότι δίνει πληροφορίες σχετικά με τη δυνατότητα χρήσης των πολυμορφισμών ως δείκτες μη επεμβατικής προγεννητικής ανίχνευσης των εμβρυϊκών μεταλλάξεων του γονιδίου της β-σφαιρίνης.
- Κάθε μετάλλαξη συνδέεται με έναν ή περισσότερους διαφορετικούς απλοτύπους. Σε αυτή τη μελέτη, από τη συσχέτιση των μεταλλάξεων με τους πολυμορφισμούς, παρατηρήθηκε ένας συγκεκριμένος απλότυπος για κάθε μετάλλαξη, πιθανώς λόγω του κλειστού πληθυσμού που μελετήθηκε. Αυτό το εύρημα ενισχύει την πληροφοριακότητα των πολυμορφισμών και την χρήση τους ως δείκτες μη επεμβατικής ανίχνευσης της πατρικής μετάλλαξης στη μητρική κυκλοφορία.
- Το 80.4 % των ζευγαριών παρουσιάζουν πληροφοριακές μεταλλάξεις του γονιδίου της β-σφαιρίνης, ενώ οι μεταλλάξεις IVSI-110, Codon 39, IVSI-1, HbS και IVSII-1 είναι οι πιο συχνές.
- Η πληροφοριακότητα των μεταλλάξεων είναι διπλάσια από αυτή των πολυμορφισμών. Επομένως, οι μεταλλάξεις αποτελούν καλύτερους δείκτες για την μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση των αιμοσφαιρινοπαθειών από τους πολυμορφισμούς.
- Με τη χρήση ελεύθερου εμβρυϊκού DNA που απομονώνεται από τη μητρική κυκλοφορία είναι δυνατή η μη επεμβατική ανίχνευση της παθολογικής αιμοσφαιρίνης Lepore την 7^η εβδομάδα της κύησης με ευαισθησία 100%. Ενώ η ανίχνευση της μετάλλαξης IVSI-110 του γονιδίου της β-σφαιρίνης είναι δυνατόν να ανιχνευθεί μη επεμβατικά με 97%



ευαισθησία και 100% ειδικότητα την 7^η με 9^η εβδομάδα της κύησης, δηλαδή 3 με 5 εβδομάδες πριν τη 12^η εβδομάδα που είναι δυνατή η λήψη χοριακών λαχνών.

- Το φύλο του εμβρύου είναι δυνατό να ανιχνευθεί μη επεμβατικά με τη χρήση ελεύθερου εμβρυϊκού DNA που απομονώθηκε από τον μητρικό ορό την 7^η εβδομάδα της κύησης με 100% ευαισθησία και ειδικότητα.
- Το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA μπορεί να είναι παρόν στη μητρική κυκλοφορία για μεγάλο διάστημα μετά την κύηση και η σχέση ανάμεσα στη συγκέντρωσή του και το χρόνο που μεσολάβησε από τον τοκετό δείχνει ότι είναι μια σταθερή και πιθανώς μόνιμη συνθήκη. Το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA που ανιχνεύεται στη μητρική κυκλοφορία μέχρι και δεκαετίες μετά την κύηση προέρχεται από τη λύση εμβρυϊκών κυττάρων που έχουν εποικήσει τους διάφορους ιστούς ή τον μυελό των οστών της μητέρας. Στην παρούσα μελέτη, η ανίχνευση ελεύθερου εμβρυϊκού DNA, 24 ώρες μετά τον τοκετό, πιθανώς οφείλεται στη συνεχή λύση εναπομεινάντων εμβρυϊκών στη μητρική κυκλοφορία και όχι εμβρυϊκών κυττάρων που ενσωματώθηκαν σε ιστούς και όργανα της μητέρας.
- Στο άμεσο μέλλον, θα είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν οι τεχνικές μη επεμβατικής προγεννητικής ανίχνευσης σαν ένα “τέστ” πριν τις επεμβατικές μεθόδους, όπως η αμνιοπαρακέντηση και η λήψη χοριακών λαχνών.
- Σε περιπτώσεις γονέων που είναι φορείς διαφορετικών μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών, συνδεδεμένων με τις μεταλλάξεις, θα μπορούσαμε να μειώσουμε τις επεμβατικές προγεννητικές διαγνώσεις στο 50%. Η παρουσία της πατρικής μετάλλαξης στη μητρική κυκλοφορία δίνει μία πιθανότητα 50% το έμβρυο να πάσχει από μεσογειακή αναιμία, μία πιθανότητα τόσο υψηλή όπως στην περίπτωση των αυτοσωματικών επικρατών νοσημάτων. Αντίθετα, η απουσία της πατρικής μετάλλαξης στη μητρική κυκλοφορία μπορεί να μειώσει την πιθανότητα αυτή σε 0%, αποτελώντας μία ισχυρή ένδειξη ότι το έμβρυο δεν πάσχει.



- Οι τεχνικές μη επεμβατικής προγεννητικής ανίχνευσης θα μπορούσαν επίσης να συνδυαστούν με προγεννητική διάγνωση πρώτου τριμήνου (coelomic fluid cells), γιατί ακόμη και αν ο κίνδυνος της μεθόδου αυτής ήταν μεγαλύτερος από των καθιερωμένων μεθόδων (<3%), ο κίνδυνος για μεσογειακή αναιμία στο επίπεδο του 50% είναι πολλαπλάσιος.

- Η μόνη αδυναμία της προσέγγισης αυτής εμφανίζεται όταν και οι δύο γονείς είναι φορείς της ίδιας μετάλλαξης.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η β-μεσογειακή αναιμία είναι μία αυτοσωματική υπολειπόμενη νόσος που οφείλεται σε ετερογενείς διαταραχές της έκφρασης του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Περισσότερες από 170 διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου της β-σφαιρίνης έχουν περιγραφεί. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις του γονιδίου της β-σφαιρίνης είναι σημειακές μεταλλάξεις και οφείλονται σε μονονουκλεοτιδικές αλλαγές. Η ανίχνευση τους απαιτεί ευαίσθητες τεχνικές, ώστε να διαχωριστεί το μεταλλαγμένο από το φυσιολογικό αλληλόμορφο. Η προγεννητική διάγνωση αυτών των μεταλλάξεων βασίζεται σε επεμβατικές μεθόδους όπως η αμνιοπαρακέντηση και η λήψη χοριακών λαχνών, οι οποίες όμως, παρουσιάζουν μικρό αλλά αξιοσημείωτο κίνδυνο για την υγεία του εμβρύου.

Η ανίχνευση λειτουργικών εμβρυϊκών κυττάρων και ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία κατά τη διάρκεια της κύησης έκανε εφικτή την μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση. Λειτουργικά εμβρυϊκά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ενός κυττάρου για τη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση των αιμοσφαιρινοπαθειών. Οι κύριοι περιορισμοί για τη χρήση των τεχνικών αυτών σε κλινική βάση είναι ο χαμηλός αριθμός εμβρυϊκών κυττάρων κατά τη διάρκεια της κύησης και η πολυπλοκότητα των τεχνικών αυτών. Αντίθετα, η ανάλυση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA εξασφαλίζει γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα.

Οι χρωμοσωμικές περιοχές που φέρουν τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα βρίσκονται σε ισχυρή ισορροπία με τους απλοτύπους των πολυμορφισμών και η ανάλυσή τους βοηθά την προγεννητική διάγνωση της β-μεσογειακής αναιμίας. Στην παρούσα μελέτη, συγκρίθηκε η πληροφοριακότητα των μεταλλάξεων και των πολυμορφισμών του γονιδίου της β-σφαιρίνης ώστε να βρεθεί ο καλύτερος δείκτης για τη μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση των β-αιμοσφαιρινοπαθειών. Το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA



χρησιμοποιήθηκε επίσης για την μη επεμβατική ανίχνευση των μεταλλάξεων της β-σφαιρίνης και του εμβρυϊκού φύλου.

Από την ανάλυση των μεταλλάξεων των γονιδίων του β-συμπλέγματος της σφαιρίνης στα 96 ζευγάρια φορέων με τις μεθόδους ARMS και DGGE βρέθηκε το ποσοστό εμφάνισης της κάθε μετάλλαξης. Το 80.4 % των ζευγαριών παρουσίαζε πληροφοριακές μεταλλάξεις, δηλαδή διαφορετική πατρική και μητρική μετάλλαξη. Η ανάλυση των πολυμορφισμών του γονιδίου της β-σφαιρίνης, στους δύο πληθυσμούς ατόμων, με τεχνικές PCR-RFLPs αποκάλυψε ότι το 39% των ζευγαριών ετεροζυγωτών και το 29% των ζευγαριών του γενικού πληθυσμού παρουσιάζουν τουλάχιστον ένα πληροφοριακό πολυμορφισμό. Επίσης βρέθηκε η πληροφοριακότητα κάθε πολυμορφισμού. Από τη συσχέτιση των μεταλλάξεων με τους πολυμορφισμούς βρέθηκε συγκεκριμένος απλότυπος για κάθε μετάλλαξη. Βρέθηκε επίσης ότι η IVSI-110 είναι η συχνότερη μετάλλαξη. Με τη χρήση μητρικού ορού ως πηγή ελεύθερου εμβρυϊκού DNA επιτεύχθηκε η μη επεμβατική ανίχνευση της IVSI-110 μετάλλαξης του β-γονιδίου της σφαιρίνης και του γονιδίου Hb Lepore.

Για την ανίχνευση της πατρικής συνεισφοράς, οι DYS14 και DYZ1 αλληλουχίες του χρωμοσώματος Y χρησιμοποιήθηκαν με ευαισθησία και ειδικότητα 100%. Επίσης, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες, βρέθηκε ότι το DNA παραμένει στη μητρική κυκλοφορία 24 ώρες μετά τον τοκετό και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από την 7^η εβδομάδα της κύησης.

Οι μεταλλάξεις αποτελούν καλύτερους δείκτες για την μη επεμβατική προγεννητική ανίχνευση των αιμοσφαιρινοπαθειών από τους πολυμορφισμούς. Το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για την μη επεμβατική ανίχνευση πατρικά κληρονομούμενων μεταλλάξεων του γονιδίου της β-σφαιρίνης και του χρωμοσώματος Y, δείκτες της πατρικής συνεισφοράς στη μητρική κυκλοφορία την 7^η με 9^η εβδομάδα της κύησης. Στο άμεσο μέλλον, θα είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν οι τεχνικές μη επεμβατικής προγεννητικής ανίχνευσης



σαν ένα “τέστ” πριν τις επεμβατικές μεθόδους, όπως η αμνιοπαρακέντηση και η λήψη χοριακών λαχνών.

SUMMARY

B-thalassemia is a disease caused by highly heterogeneous inherited disorders of beta-globin gene expression. More than 170 different beta-globin gene mutations have been described worldwide. Most of these mutations are point mutations that result from a single nucleotide exchange. The detection of these monogenic disorders demands sensitive procedures so as to distinguish the mutant from the normal allele. The prenatal genetic diagnosis of these mutations relies on invasive procedures such as amniocentesis or chorionic villous sampling (CVS), however, each carries a small but finite risk of fetal loss and injury.

The detection of intact fetal cells and cell-free fetal DNA in maternal circulation during pregnancy has put forward the use of non invasive prenatal diagnosis. Intact fetal cells have been used in a single cell polymerase chain reaction for the non invasive prenatal diagnosis of hemoglobinopathies. The major limitations in applying these techniques clinically is the generally low number of fetal cells in maternal circulation during pregnancy and the complexity of the requested procedures. In contrast, the cell-free fetal DNA analysis has the advantage of being rapid and reliable.

The chromosomal regions bearing the mutant alleles are in strong disequilibrium to polymorphism haplotypes and their analysis has led to prenatal diagnosis of β -thalassemia. In this study, the information content of the polymorphisms and mutations in beta globin gene mutation carriers families was compared so as to find the best marker for non invasive

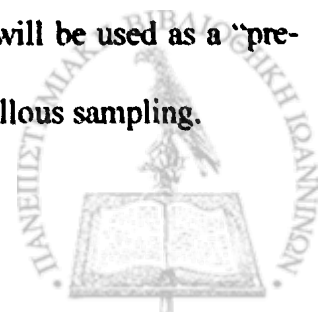


prenatal detection of beta thalassemia. In addition, cell-free fetal DNA was used for the non invasive detection of β -globin gene mutations and the fetal gender determination.

From the β -globin gene mutation analysis in the mutation carrier group, with the ARMS and DGGE techniques, the percentage of each mutation was found. The 80.4 % of the couples presented informative mutations, namely different paternal and maternal mutations. The β -globin gene polymorphism analysis in the mutation carrier group and the control group, with the PCR-RFLP procedures, revealed the percentage of the couples that present at least one informative polymorphism. The 39% of the mutation carrier couples and the 29% of the control couples presented different paternal and maternal polymorphisms. In addition, the information content percentage of each polymorphism was found. From the mutation and polymorphism correlation, a specific haplotype was found for every mutation. From the mutation analysis, it was found that IVSI-110 is the most frequent mutation. The non invasive detection of the IVSI-110 mutation of the beta globin gene and the Hb Lepore gene was achieved.

For the detection of the paternal contribution, DYS14 and DYZ1 Y chromosome-specific STSs were used. The detection rate of the fetal gender determination was found to be 100%. In addition, in contrast to previous studies it was found that the fetal DNA remains 24h postpartum and in higher concentrations than those at the 7th week of pregnancy.

In conclusion, from the mutation and polymorphism correlation, it was found that the mutations constitute a better marker for the non invasive prenatal detection of β -thalassemia syndromes. In addition, maternal serum has been used successfully to identify non invasively paternally inherited mutations of the beta-globin gene and Y chromosome-specific sequences. indications of paternal genetic contribution in maternal circulation, at the 7th-9th week of pregnancy. In near future, non invasive prenatal detection techniques will be used as a "pre-test" prior to invasive procedures such as amniocentesis or chorionic villous sampling.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol* 1999;105:574–83.
2. Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet* 1997;61:822–9.
3. Chen XQ, Stroun M, Magenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J. Microsatellite alterations in plasma DNA of small lung cancer patients. *Nat Med* 1996;2:972–4.
4. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med* 1996;2:972–4.
5. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350:485–7.
6. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62:768–75.
7. Jimenez DF and Tarantal AF. Quantitative analysis of male fetal DNA in maternal serum of gravid rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Pediatr Res* 2003;53, 18–23.
8. Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* 2000;260:248–56.
9. Bischoff FZ, Dang D, Horne C, Marquez-Do D, Brinkley WR, Lewis DE. Fetal DNA in maternal plasma circulates as apoptotic bodies: elucidation of the structural nature of fetal DNA for non-invasive prenatal genetic diagnosis. *Am J Hum Genet* 2003;73(Suppl):189.



10. Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao KH, Sun CF and Wu JT. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin Chim Acta* 2002; 321: 77–87.
11. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM and Hjelm NM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implication for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998b; 62: 768–775.
12. Lo YM. Fetal DNA in maternal plasma. *Ann NY Acad Sci* 2000;906: 141–147.
13. Taback B, O'Day SJ and Hoon DS Quantification of Circulating DNA in the Plasma and Serum of Cancer Patients. *Ann NY Acad Sci* 2004;1022: 17–24.
14. Ariga H, Ohto H, Busch MP, Imamura S, Watson R, Reed W and Lee TH. Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion* 2001;41: 1524–1530.
15. Rijnders RJ, Van der Loo RB, Peters ED, Goeree JK, Van der Schoot CE, Ploos Van Amstel JK and Christiaens GC Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma. *Prenat Diagn* 2003;23: 1042–1044.
16. Chan LY, Leung TN, Chan KC, Tai HL, Lau TK, Wong EM and Lo YM. Serial analysis of fetal DNA concentrations in maternal plasma in late pregnancy. *Clin Chem* 2003;49: 678–680.
17. Bianchi DW Fetal cells in the mother: from genetic diagnosis to diseases associated with fetal cell microchimerism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 92: 103–108.
18. Fournie GJ, Martres F, Pourrat JP, Alary C, Rumeau M. Plasma DNA as cell death marker in elderly patients. *Gerontology* 1993;39: 215–21.



19. Sekizawa A, Samura O, Zhen DK, Falco V, Farina A, Bianchi DW. Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Pren Diagn* 2000;20:886-9.
20. Van Wijk IJ, deHoon AC, Jurhawan R, Tjoa ML, Grioen S, Mulders MA. Detection of apoptotic fetal cells in plasma of pregnant women. *Clin Chem* 2000;46:729-31.
21. Bianchi DW, Lo YM. Fetomaternal cellular and plasma DNA tracking: the Yin and the Yang. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:119-31.
22. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Cell-free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the transplacental passage of fetal erythroblasts. *Mol Hum Reprod* 2002;8:864-70.
23. Honda H, Miهارu N, Ohashi Y, Samura O, Kinutani M, Hara T. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet* 2002; 110:75-9.
24. Chan LY, Leung TN, Chan KC, Tai H-L, Lau TK, Wong EM et al. Serial analysis of fetal DNA concentrations in maternal plasma in late pregnancy. *Clin Chem* 2003;49:678-80.
25. Guibert J, Benachi A, Grebille AG, Ernault P, Zorn JR, Costa JM. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Repr* 2003;18:1733-6.
26. Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4360-2.
27. Sekizawa A, Yokokawa K, Sugito Y, Iwasaki M, Yukimoto Y, Ichizuka K. Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta. *Hum Genet* 2003;113:307-10.
28. Bianchi DW, LeShane ES, Cowan JM. Large amounts of cell-free fetal DNA are present in amniotic fluid. *Clin Chem* 2001;47:1867-9.



29. Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, Alechina R, Molyaka Y. Genetic analysis of DNA extracted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin Chem* 2000;46:1078–84.
30. Al-Yatama MK, Mustafa AS, Ali S, Abraham S, Khan Z, Khaja N. Detection of Y chromosome-specific DNA in the plasma and urine of pregnant women using nested polymerase chain reaction. *Prenat Diagn* 2001;21:399–402.
31. Angert RM, LeShane ES, Yarnell RW, Johnson KL, Bianchi DW. Cell-free fetal DNA in the cerebrospinal fluid of peripartum women. *Am J Obstet Gynecol* 2004;49: 195-198.
32. Cioni R, Bussani C, Scarselli B, Mello G, Mecacci F, Scarselli G. Detection of fetal DNA in the peritoneal cavity during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;107:210–1.
33. Pertl B, Bianchi DW. Fetal DNA in maternal plasma: emerging clinical applications. *Obstet Gynecol* 2001;98:483–90.
34. Pertl B, Sekizawa A, Samura O, Orescovic I, Rahaim PT, Bianchi DW. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum Genet* 2000;106:45–9.
35. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Chow KCK, Lo YM. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2002;48:35–41.
36. Ng EK, Leung TN, Tsui NB, Lau TK, Panesar NS, Chiu RW. The concentration of circulating corticotrophin-releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. *Clin Chem* 2003; 49:727–31.



37. Smid M, Lagona F, Papasergio N, Ferrari A, Ferrari M, Cremonesi L. Influence of gestational age on fetal deoxyribonucleic acid retrieval in maternal peripheral blood. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:1517-1522.
38. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Samura O, Kinutani M, Hara T and Ohama K. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet* 2002;110: 75–79.
39. Rijnders RJ, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede MA, Christaens CJ. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol* 2001;98:374–8.
40. Bianchi DW. Prenatal exclusion of recessively inherited disorders: should maternal plasma analysis precede invasive techniques? *Clin Chem* 2002; 48:689–90.
41. Lo YM, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, Hjelm NM, Elmes RS and Bianchi DW. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem* 1999;45: 1747–1751.
42. Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Jackson LR, Holzgreve W and Hahn S. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat Diagn* 2000;20: 795–798.
43. Ohashi Y, Miharu N, Honda H, Samura O, Ohama K. Quantitation of fetal DNA in maternal serum in normal and aneuploid pregnancies. *Hum Genet* 2001;108:123–7.
44. Lee T, LeShane ES, Messerlian GM, Canick JA, Carpenter M, Heber WW, Farina A, Bianchi DW. Fetal Down syndrome is associated with increased cell-free fetal DNA levels in archived maternal serum samples. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187: 1271-21
45. Wataganara T, LeShane ES, Farina A, Messerlian GM, Lee T, Canick JA and Bianchi DW. Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. *Hum Genet* 2003;112: 204–208.



46. Helperin R, Peller S, Rotschild M, Bukovsky I, Schneider D. Placental apoptosis in normal and abnormal pregnancies. *Gynecol Obstet Invest* 2000;50:84-87
47. Qumsiyeh MB, Kim KR, Ahmed NM, Bradford W. Cytogenetics and mechanisms of spontaneous abortions: increased apoptosis and decreased cell proliferation in chromosomally abnormal villi. *Cytogenet Cell Genet* 2000;88:230-235
48. Arizawa M, Nakayama M. Pathological analysis of the placenta in trisomies 21, 18 and 13. *Nippon Sanka Fujinka Gakki Zasshi* 1992;44:9-13
49. Roberts L, Sebire NJ, Fowler D, Nicolaidis KH. Histomorphological features of chorionic villi at 10-14 weeks of gestation in trisomic and chromosomally normal pregnancies. *Placenta* 2000;21:678-683
50. Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 1999;45:184-8.
51. Holzgreve W, Ghezzi F, DiNaro E, Ganshirt D, Maymon E, Hahn S. Disturbed fetomaternal cell trafficking in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1998; 91: 669-72.
52. Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, Ylikorkala O, Sibai BM, Holzgreve W. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:414-9.
53. Swinkels DW, de Kok JB, Hendriks JC, Wiegerinck E, Zusterzeel PL, Steegers EA. Hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP) syndrome as a complication of preeclampsia in pregnant women increases the amount of cell-free fetal and maternal DNA in maternal plasma and serum. *Clin Chem* 2002;48:650-3.
54. Hahn S, Holzgreve W. Fetal cells and cell-free fetal DNA in maternal blood: new insight into pre-eclampsia. *Hum Reprod Update* 2002; 8:501-8.



55. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Chan LY, Lo YM. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem* 2001;47:137–9.
56. Zhong XY, Holzgreve W and Hahn S. The levels of circulatory cell free fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia. *Hypertens Pregn* 2002;21: 77–83.
57. Roberts JM and Redman CW. Preeclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 1993; 341: 1447–1451.
58. Redman CW, Sacks GP and Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180, 499–506.
59. Redman CW and Sargent IL. The pathogenesis of pre-eclampsia. *Gynecol Obstet Fertil* 2001;29: 518–522.
60. Byrne BM, Crowley A, Taulo F, Anthony J, O'Leary JJ and O'Herlihy C. Fetal DNA quantitation in peripheral blood is not useful as a marker of disease severity in women with preeclampsia. *Hypertens Pregn* 2003;22: 157–164.
61. Bischoff FZ, Sinacori MK, Dang DD, Marquez-Do D, Horne C, Lewis DE and Simpson JL. Cell-free fetal DNA and intact fetal cells in maternal blood circulation: implications for first and second trimester non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2002;8: 493–500.
62. Zhong XY, Holzgreve W and Hahn S. Cell-free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the transplacental passage of fetal erythroblasts. *Mol Hum Reprod* 2002;8: 864–870.
63. Bianchi DW. Fetal DNA in maternal plasma: the plot thickens and the placental barrier thins. *Am J Hum Genet* 1998;62:763–4.



64. Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto Y, Otsuka J and Okai T. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem* 2002;48: 353–354.
65. Sekizawa A, Kondo T, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Saito H and Okai T. Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2001;47: 1856–1858.
66. Sugito Y, Sekizawa A, Farina A, Yukimoto Y, Saito H, Iwasaki M, Rizzo N and Okai T. Relationship between severity of hyperemesis gravidarum and fetal DNA concentration in maternal plasma. *Clin Chem* 2003;49: 1667–1669.
67. Lau TK, Lo KW, Chan LY, Leung TY and Lo YM. Cell-free fetal deoxyribonucleic acid in maternal circulation as a marker of fetal-maternal hemorrhage in patients undergoing external cephalic version near term. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183: 712–716.
68. Zhong XY, Holzgreve W, Li JC, Aydinli K and Hahn S. High levels of fetal erythroblasts and fetal extracellular DNA in the peripheral blood of a pregnant woman with idiopathic polyhydramnios: case report. *Prenat Diagn* 2000;20: 838–841.
69. Faas BH, Beuling EA, Christiaens GC, dem Borne AE and Van der Schoot CE. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet* 1998;352: 1196.
70. Bischoff FZ, Nguyen DD, Marquez-Do D, Moise KJ, Jr, Simpson JL and Elias S. Noninvasive determination of fetal RhD status using fetal DNA in maternal serum and PCR. *J Soc Gynecol Invest* 1999;6: 64–69.
71. Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998;339:1734–8.



72. Faas BHW, Beuling EA, Christiaens GCML, von dem Borne AEGK, Van der Schoot CE. Detection of fetal *RHD*-specific sequences in maternal plasma. *Lancet* 1998;352:1196.
73. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *BJOG* 2000;107:766–9.
74. Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002;42:1079–85.
75. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* 2000;46:301–2.
76. Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* 2000;356:1170.
77. Gonzalez-Gonzalez MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Sanchez IL, Diaz-Rescasens J et al. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Pren Diagn* 2002; 22:946–8.
78. Chiu RW, Lau TK, Cheung PT, Gong ZQ, Leung TN, Lo YM. Non invasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin Chem* 2002;48:778–80.
79. Gonzalez-Gonzalez MC, Trujillo MJ, Rodriguez dA, Garcia-Hoyos M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J, Ayuso C and Ramos C. Huntington disease-unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn* 2003;23: 232–234.



80. Gonzalez-Gonzalez MC, Trujillo MJ, Rodriguez dA and Ramos C. Early Huntington disease prenatal diagnosis by maternal semi-quantitative fluorescent-PCR. *Neurology* 2003;60: 1214–1215.
81. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999; 64:218–24.
82. Invernizzi P, Biondi ML, Battezzati PM, Perego F, Selmi C, Cecchini F. Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy. *Hum Genet* 2002;110:587–91.
83. Benachi A, Steann J, Gautier E, Ernault P, Olivi M, Dumez Y. Fetal DNA in maternal serum: does it persist after pregnancy? *Hum Genet* 2003;113:76–9.
84. Johnson-Hopson CN, Artlett CM. Evidence against the long-term persistence of fetal DNA in maternal plasma after pregnancy. *Hum Genet* 2002;111:575.
85. Smid M, Galbiati S, Vassallo A, Gambini D, Ferrari A, Restagno G. No evidence of fetal DNA persistence in maternal plasma after pregnancy. *Hum Genet* 2003;112:617–8.
86. Invernizzi P, Battezzati PM, Podda M, Simoni G. Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy: further comments. *Hum Genet* 2002;111:576.
87. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:705–8.
88. Evans PC, Lambert N, Maloney S, Furst DE, Moore JM, Nelson JL. Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood* 1999; 93:2033–7.
89. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2000;46:1832–4.
90. Tsui NB, Ng EKO, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 2002;48:1647–53.



91. Claverie JM. Gene number. What if there are only 30,000 human genes? *Science* 2001; 291:1255-1257.
92. Jeffreys AJ, Wilson V, Tein SL Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 1985 ; 314 :67-73
94. Murray JM, Davies KE, Harper PS, Meredith L, Mueller CR, Williamson R. Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. *Nature*. 1982; 300:69-71.
95. Bakker E, Hofker MH, Goor N, Mandel JL, Wrogemann K, Davies KE, Kunkel LM, Willard HF, Fenton WA, Sandkuyl L. Prenatal diagnosis and carrier detection of Duchenne muscular dystrophy with closely linked RFLPs. *Lancet*. 1985;23:655-658.
96. Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Colletti CA, Aldridge J, Fischbeck KH, Bartlett R, Pericak-Vance MA, Roses AD, Kunkel LM. Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature*. 316(6031):842-845.
97. Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C, Kean V, Thompson MW, Sylvester JE, Gorski JL, Schmickel RD, Worton RG. Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature*. 318(6047):672-675.
98. Goodfellow PN, Davies KE, Ropers HH. Report of the Committee on the Genetic Constitution of the X and Y Chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*. 1985;40(1-4):296-352.
99. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306(5940):234-238.



100. Gusella JF, Tanzi RE, Anderson MA, Hobbs W, Gibbons K, Raschtchian R, Gilliam TC, Wallace MR, Wexler NS, Conneally PM. DNA markers for nervous system diseases. *Science*. 1984;225(4668):1320-1326.
101. Gusella JF, Tanzi RE, Bader PI, Phelan MC, Stevenson R, Hayden MR, Hofman KJ, Faryniarz AG, Gibbons K. Deletion of Huntington's disease-linked G8 (D4S10) locus in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Nature*. 318(6041):75-78.
102. Reeders ST, Breuning MH, Davies KE, Nicholls RD, Jarman AP, Higgs DR, Pearson PL, Weatherall DJ. A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. *Nature*. 317(6037):542-544.
103. Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N, et al. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science*. 1985 Nov 29;230(4729):1054-1057.
104. Knowlton RG, Cohen-Haguenuer O, Van Cong N, Frézal J, Brown VA, Barker D, Braman JC, Schumm JW, Tsui LC, Buchwald M, et al. A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature*. 318(6044):380-382.
105. White R, Woodward S, Leppert M, O'Connell P, Hoff M, Herbst J, Lalouel JM, Dean M, Vande Woude G. A closely linked genetic marker for cystic fibrosis. *Nature*. 318(6044):382-384.
106. Wainwright BJ, Scambler PJ, Schmidtke J, Watson EA, Law HY, Farrall M, Cooke HJ, Eiberg H, Williamson R. Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature*. 318(6044):384-385
107. Phillips J.A., Parks J.S., Hjelle B.L., Herd J.A., Plotnick P. *J Clin Invest* 1982; 70:489-495



108. Seizinger B.R., Tanzi R.E., Gilliam T.C., Bader J., Perry D, Spence A., Marazita M., Gibbons K., Hobbs W., Gusella J.F. Genetic linkage analysis of neurofibromatosis with DNA markers. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1986;486:304-10.
109. Anderson W.F. 1984. Prospects for human gene therapy. *Science* 226:401- 409.
110. Bunn F.H., Forget B.G., Rammey H.M. 1977. *Human Hemoglobins*, W.B. Saunders Company, London
111. Weatherall D.J., Clegg J.B. 1981. *The thalassaemia syndromes*, 3rd edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford.1:221-319.
112. Fantoni A., Parace M.G., Gamban R. Embryonic hemoglobins in man and other mammals. *Blood.* 1981; 57: 623-633.
113. Weatherall D.J., Clegg J.B., Boon W.H. The Hemoglobin constitution of infants with the hemoglobin Bart's hydrops fetalis syndrome. *Brit. J. Haem.* 1970;18: 357-367.
114. Labie D., Pagnier J., Lapoumeroulie C. Common haplotype dependency of high γ -globin gene expression and high HbF levels in β -thalassemia and sickle cell anemia patients. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1985; 82: 2111-2114.
115. Stamatoyanopoulos G., Nienhuis A.W. (1987) Hemoglobin switching. The molecular basis of blood diseases. Philadelphia: WB Saunders. Page 61.
116. Liebhaber S.A., Goossens M., Kan Y.W. Homology and concerted evolution at the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ loci in human alpha-globin. *Nature* 1981;290:26-28.
117. Spritz R.A., Orkin S.H. Duplication followed by deletion accounts for the structure of an Indian deletion β -thalassemia gene. *Nucl. Acids Res.* 1982;10:8025-8029.
118. Lawn R.M., Efstratiadis A., O'Connell C., Maniatis T. The Nucleotide Sequence of the Human β -Globin Gene. *Cell.* 1980;21: 647-651



119. Deisseroth A., Nienhuis A., Tumer P., Valez R., Anderson W.F., Ruddle F.H., Lawrence J., Creagan R., Kucherlaparti R. Localization of the human alpha-globin. Structural gene to chromosome 16 in somatic cell hybrids by molecular hybridization assay. *Cell* 1997;12: 205-207.
120. Dickerson RE, Geis I. 1983 Hemoglobin: Structure Function, Evolution and Pathology. Menlo Park, CA Benjamin/Cummings.
121. Eaton W.A. The relationship between coding sequences and function in hemoglobin. *Nature*.1980; 284: 183-185.
122. Gonzalez-Redondo JM., Kattamis C., Huisman T.H.J. Characterization of three types of β -thalassemia resulting from a partial deletion of the β -globin gene. *Hemoglobin* 1989;13: 377-392.
123. Jankovic L., Efremov G.D., Petkov G., Kattamis C., George E., Yang K.G., Stoming T.A., Huisman T.H. Two novel polyadenylation mutations leading to β -thalassaemia. *Brit. J. Haem.* 1990;75: 122-126.
124. Ghanem N., Girodon E., Vidaud M., Martin J., Fanen P., Plassa F., Goossens M. A Comprehensive Scanning Method for Rapid Detection of β -Globin Gene Mutations and Polymorphisms. *Human Mut* 1982;1: 229-239.
125. Orkin S.H., Kazazian H.H.Jr., Antonarakis E.S., Golf C.S., Boehm D.C., Sexton P.J., Waber G.P., Giardina J.V.P. Linkage of β -thalassaemia mutations and β -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in the human β -globin gene cluster. *Nature*. 1982;296: 627-631.
126. Goldsmith M.E., Ley T., Cline A., Kantor J .A., Nienhuis A.W. Silent substitution in β -thalassemia gene activating a cryptic splice site in β -globin RNA coding sequence. *Proc Nat. Acad. Sci.* 1983;80: 2318-2322.



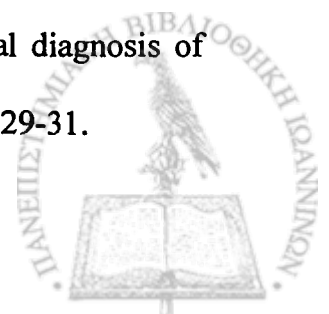
127. Orkin S.H., Kazazian H.H.Jr. The mutation and polymorphism of the human β -globin gene and its surrounding DNA. *Ann. Rev. Genet.* 1984;18: 131-171.
128. Foresta, C., Moro, E. and Ferlin, A. (2001) Y chromosome microdeletions and alterations in spermatogenesis. *Endocr. Rev.*, 22, 226-239.
129. Vogt PH, Affara N, Davey P, Hammer M, Jobling MA, Lan YF, Mitchell M, Schempp W, Tyler-Smith C, Williams G, Yen P, Rappold GA. Report of the Third International Workshop on Y Chromosome Mapping 1997. *Cytogenet Cell Genet* 1997;79:1-20
130. Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P. J., Cordum, H. S., Hillier, L., Brown, L. G. et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003; 423: 825-837.
131. Page, D. C., Harper, M. E., Love, J. & Botstein, D. Occurrence of a transposition from the X-chromosome long arm to the Y-chromosome short arm during human evolution. *Nature* 1984;311: 119-123
132. Mumm, S., Molini, B., Terrell, J., Srivastava, A. & Schlessinger, D. Evolutionary features of the 4-Mb Xq21.3 XY homology region revealed by a map at 60-kb resolution. *Genome Res.* 1997; 7: 307-314.
133. Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 1959;31;183(4657):302-3.
134. Goodfellow PN, Darling SM. Genetics of sex determination in man and mouse. *Development.* 1988;102(2):251-8.
135. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990;19;346(6281):240-4.



136. Vogt P.H., Edelman A., Kirsch S., Henegariu O., Hirschmann P., Kieseewetter F. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum. Mol. Genet.* 1996;5: 933-943.
137. Boehm CD, Antonarakis SE, Phillips JA, Stetten G, Kazazian H.H. Prenatal diagnosis using DNA polymorphisms. Report on 95 pregnancies at risk for sickle-anemia disease or thalassemia. *New England Journal of Medicine* 1983;1054-1058
138. Antonarakis S.E., Boehm C.D., Giardina P.J.V., Kazazian H.H. Non random association of polymorphic restriction sites in the β -globin gene cluster. *Proc.Nat. Acad.Sci.* 1982;79:137-141
139. Kattamis C., Hu H., Cheng G., Reese A.L., Gonzalez-Redondo J.M., Kutlar A., Kutlar F., Huisman T.H.J. Molecular characterization of β -thalassemia in 174 Greek patients with thalassemia major. *Brit J Haem* 1990;74;342-346.
140. Καραμπαμπά Φ., Σινοπούλου Κ., Μπουσίου Μ., Κόλλια Π., Παπαδάκης Μ., Αντσακλής Α., Μεσογίτης Σ., Χατζή Α., Λουκόπουλος Δ. Προγεννητική διάγνωση της μεσογειακής αναιμίας και των δρεπανοκυτταρικών συνδρόμων στην Ελλάδα. *Ιατρική* 1991;159: 361-369.
141. Loukopoulos D. Current Status of Thalassemia and the Sickle Cell Syndromes in Greece. *Semin in Hematology.* 1996;3: 76-86.
142. Georgiou I, Makis A, Chaidos A, Bouba I, Hatzi E, Kranas V, Zilidis C, Bourantas KL. Distribution and frequency of beta-thalassemia mutations in northwestern and central Greece. *Eur J Haematol.* 2003 Feb;70(2):75-8.
143. Georgiou I, Seferiadis K, Lolis D, Tsolas O, Bourantas KL. Gamma-chain heterogeneity in Greek (delta beta) zero-thalassemia. *Eur J Haematol.* 1995 Feb;54(2):101-5.



144. Tabor A, Philip J, Madsen M, Bang J, Obel EB, Norgaard-Pedersen B. Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *Lancet* 1986;1: 1287-1293
145. Jackson LG, Zachary JM, Fowler SE. A randomized comparison of transcervical and transabdominal chorionic-villus sampling : the U.S National Institute of Child Health and Human Development Chorionic-Villus Sampling and Amniocentesis Study Group. *N Engl J Med.* 1992; 327:594-598
146. Cheung MC, Goldberg JD, Kan YW. Prenatal diagnosis of sickle cell anemia and thalassaemia by analysis of fetal cells in maternal blood. *Nat Genet.* 1996 ;14:264-268
147. Di Naro E, Ghezzi F, Vitucci A, et al. Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia using fetal erythroblasts enriched from maternal blood by a novel gradient. *Mol Hum Reprod.* 6:571-574
148. Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* 2002; 360:998-1000.
149. Li Y, Zimmerman B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms *Clin Chem* 2004;50:1-10.
150. Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Zimmerman B, Holzgreve W, Hahn S. Detection of paternally inherited fetal point mutations for b-thalassaemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA* 2005;293 (7) : 843-849
151. Makrydimas G, Georgiou I, Kranas V, Kaponis A, Lolis D. Prenatal paternity testing using DNA extracted from coelomic cells. *Fetal Diagn Ther.* 2004 Jan-Feb;19(1):75-7.
152. Makrydimas G, Georgiou I, Kranas V, Zikopoulos K, Lolis D. Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia by coelocentesis. *Mol Hum Reprod.* 1997 Aug;3(8):729-31.



153. Makrydimas G, Georgiou I, Bouba I, Lolis D, Nicolaidis KH. Early prenatal diagnosis by coelocentesis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004 May;23(5): 482-5.
154. Huisman THJ, Carver MFH, Efremov GD. *A Syllabus of Human Hemoglobin Variants.* The Sickle Cell Anemia Foundation, Augusta, GA, 1996.
155. Marinucci M, Mavilio F, Massa A, Gabbianelli M, Fontanarosa PP, Samoggia P, Tentori L. Haemoglobin Lepore trait: haematological and structural studies on the Italian population. *Br. J. Haematol.* 1979;42: 557-65.
156. Lazaros L, Hatzi E, Bouba I, Paraskevaidis E, Georgiou I: Non invasive prenatal detection of paternal origin Hb Lepore in a male fetus at the 7th week of gestation. *Fetal diagn & Ther* 2006;12;21(6):506-509.
157. Camascella C, Alfarano A, Gottardi E, Travi M, Primignani P, Cappio FC, Saglio G. Prenatal diagnosis of fetal haemoglobin Lepore-Boston disease on maternal Peripheral Blood. *Blood* 1990;75: 2102-2106.
158. Lo YMD, Patel P, Baigent CN, Gillmer MDG, Chamberlain P, Sampietro M. Prenatal sex determination from maternal peripheral blood using the polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1993;90:483-488.
159. Smid M, Lagona F, Papasergio N, Ferrari A, Ferrari M, Cremonesi L. Influence of gestational age on fetal deoxyribonucleic acid retrieval in maternal peripheral blood. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:1517-1522.
160. Thomas MR, Tutschek B, Frost A, Rodeck CH, Yazdani N, Craft I. The time of appearance and disappearance of fetal DNA from the maternal circulation. *Prenat Diagn* 1995;15:641-646.
161. Valerio D, Aiello R, Altieri V. Isolation of fetal erythroid cells from maternal blood based on expression of erythropoietin receptors. *Mol Hum Reprod* 1997;3:451-455.



180. Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, Lederrey C, Anker P. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 1996;2:1033-1035
181. Nawroź H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med* 1996;2:1035-1037
182. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;339:237-238
183. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 1990;93:125-128
184. Hamada H., Arinami T., Hamaguchi H., Kubo T. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood after delivery. *Am Obstet Gynecol* 1994;170: 1188-1193
185. Thomas MR, Tutschek B, Frost A, Rodeck CH, Yazdani N, Craft I and Williamson R. The time of appearance and disappearance of fetal DNA from the maternal circulation. *Prenat Diagn* 1995;15:641-646.

