



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ΣΧΟΛΗ
ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ,
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ,
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της μεθυλίωσης του DNA σε ασθενείς με
αλληλοεπικαλυπτόμενα μυελικά νεοπλάσματα**

ΜΑΡΙΑ Π. ΓΙΑΝΝΟΥΛΗ

A.M. 1113201400015

Επιβλέπουσα: Μαριάννα Αντωνέλου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Επιστημονική υπεύθυνη: Κατερίνα Ζώη, Ειδική Λειτουργική Επιστήμονας (ΕΛΕ) Β΄
βαθμίδος

Εργαστήριο Αιματολογίας, Κέντρο Κλινικής Έρευνας, Πειραματικής Χειρουργικής και
Μεταφραστικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών
(ΙΙΒΕΑΑ)

Διευθυντής: Καθηγητής Δημήτρης Λουκόπουλος

ΑΘΗΝΑ 2020

Πρόλογος

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αιματολογίας του Κέντρου Κλινικής Έρευνας, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών κατά την διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2018-2019.

Από τη θέση αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Αιματολογίας Ομότιμο Καθηγητή κ. Δημήτρη Λουκόπουλο για την δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την Διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επιστημονική μου υπεύθυνη κ. Κατερίνα Ζώη που με δέχτηκε στο εργαστήριο της και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας καθώς και για την βοήθεια, το ενδιαφέρον και τις παρατηρήσεις της κατά τη διάρκεια τόσο του πειραματικού μέρους όσο και της συγγραφής της εργασίας.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Μαριάννα Αντωνέλου που με δέχτηκε σαν διπλωματική φοιτήτρια της και για την βοήθεια που μου έδωσε τόσο με τις συμβουλές και με τις διορθώσεις της κατά την διάρκεια της συγγραφής της διπλωματικής εργασίας όσο και με την πραγματικά άμεση ανταπόκρισή της σε κάθε μου απορία καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Τελειώνοντας, ένα τεράστιο ευχαριστώ στον Ανδρέα Γιαννόπουλο, πρώην μεταδιδακτορικό ερευνητή του εργαστηρίου, που από την πρώτη στιγμή μου στο εργαστήριο με έκανε να νιώθω μέρος του και με υπομονή με δίδαξε ό,τι χρειαζόταν να ξέρω, καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια και συνεισφορά του σε όλη την πορεία εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, η οποία ήταν καθοριστική για το τελικό αποτέλεσμα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω δύο σημαντικά μέλη του εργαστηρίου, τον Θεοδωρή Λούπη για τη σημαντική συνεισφορά του, τόσο πρακτικά όσο και θεωρητικά, σε αυτή τη διπλωματική εργασία, και τη Γεωργία Αρβανίτη, που σε συνδυασμό, που προσέφεραν πολύτιμες συμβουλές και ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο. Ενώ, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την Ελπίδα Γκιουλαφέντη για την σημαντική βοήθειά της αλλά και την παρέα της όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1	Τα μυελοδυσπλαστικά/μυελουπερπλαστικά νεοπλάσματα	8
1.1.1	Ορισμός	8
1.1.2	Ταξινόμηση.....	10
1.1.3	Κλινικά Χαρακτηριστικά και Μοριακά Δεδομένα	10
1.1.4	Μοριακή γενετική και ανωμαλίες στη σηματοδότηση	10
1.1.5	Εκτροπή σε οξεία μυελογενή λευχαιμία.....	11
1.1.6	Μοριακές βλάβες στα ΜΔΣ/ΜΥΝ	12
1.1.6.1.	Παράγοντες του μηχανισμού ωρίμανσης του RNA.....	12
1.1.6.1.1.	Το γονίδιο <i>SF3B1</i>	13
1.1.6.1.2.	Το γονίδιο <i>SRSF2</i>	14
1.1.6.1.3.	Το γονίδιο <i>U2AF1</i>	14
1.1.6.2.	Επιγενετικοί ρυθμιστές- Μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στον μηχανισμό επιγενετικής ρύθμισης του κυττάρου.	15
1.1.6.2.1.	Το γονίδιο <i>DNMT3A</i>	16
1.1.6.2.2.	Το γονίδιο <i>TET2</i>	17
1.1.6.2.3.	Τα γονίδια <i>IDH1</i> και <i>IDH2</i>	18
1.1.6.2.4.	Το γονίδιο <i>EZH2</i>	20
1.1.6.2.5.	Το γονίδιο <i>ASXL1</i>	20
1.2	Επιγενετική	21
1.2.1	Μεθυλίωση του DNA	22
1.2.1.1.	Θέσεις Μεθυλίωσης	23
1.2.1.1.1.	Διαγονιδιακές περιοχές.....	23
1.2.1.1.2	Νησίδες CpG	29
2	ΣΚΟΠΟΣ.....	32
3.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33

3.1. Αντιδραστήρια	33
Grant	34
3.2. Κλινικό Υλικό	34
3.2.1. Προέλευση Δειγμάτων Ασθενών	35
3.3. Βασικές αρχές τεχνικών.....	36
3.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	36
3.3.2. Σύστημα Ανίχνευσης Μεταλλάξεων Ανθεκτικών στην Ενίσχυση (Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction, ARMS-PCR).....	39
3.3.3. Αλληλοειδική PCR (Allele Specific Polymerase Chain Reaction, AS-PCR).....	41
3.3.4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real-Time PCR).....	41
3.3.4.1. Φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται μη-ειδικά στο υπόστρωμα	42
3.3.4.2. Φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται ειδικά επί συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής ακολουθίας του υποστρώματος.....	43
3.3.5. Ανάδειξη των προϊόντων της PCR.....	45
3.3.5.1. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	45
3.3.6. Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων μέσω πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing)	47
3.4. Μεθοδολογία.....	51
3.4.1 Απομόνωση γενωμικού DNA.....	51
3.4.2 Καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο (Phenol-Chloroform extraction/clean up).....	52
3.4.3 Ανίχνευση μεταλλάξεων με ARMS-PCR και AS-PCR	53

3.4.3.1.	Ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης V617F του γονιδίου JAK2 με την τεχνική της ARMS-PCR.	53
3.4.4	Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων με Real time PCR HRM ανάλυση	55
	Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης των εκκινητών με gradient PCR.....	55
	Ανάδειξη των προϊόντων της gradient PCR, με ανάλυση καμπύλης τήξης και ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης.....	57
3.4.5	Επεξεργασία δειγμάτων αναφοράς για μελέτες Μεθυλίωσης.....	60
3.4.6	Μοριακή διερεύνηση μεθυλίωσης με Real time PCR HRM ανάλυση ..	63
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	64
4.1	Ανίχνευση μεταλλάξεων με την τεχνική της ARMS PCR σε ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ.....	64
	Ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης V617F του γονιδίου JAK2 με την τεχνική της ARMS PCR σε ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ.....	64
	Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων σε κωδικές περιοχές των προς μελέτη γονιδίων.....	65
4.2	Προσδιορισμός του επιπέδου μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1.....	72
4.2.1	Μεθυλοειδική HRMA (MS-HRMA).....	74
4.2.1.1.	Κλινικό υλικό.....	74
4.2.1.2.	Σχεδιασμός εκκινητών για MS-HRMA και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας.....	76
4.2.1.3.	Πρότυπη καμπύλη αναφοράς	77
4.2.1.4.	Στατιστική ανάλυση δεδομένων.....	80
4.2.2	Μεθυλοειδική Πυροαλληλούχιση (MSP).....	85
4.2.2.1.	Κλινικό Υλικό.....	85

4.2.2.2.	Σχεδιασμός εκκινητών για MSP και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας.....	85
4.2.2.3.	Προετοιμασία των δειγμάτων για MSP	86
4.2.2.4.	Αποτελέσματα MSP.....	87
4.2.2.5.	Στατιστική ανάλυση των δεδομένων	88
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	91
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	95
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	99
	Παράρτημα Ι - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για HRMA και ARMS	101
	Παράρτημα ΙΙ - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για MS-HRMA	102
	Παράρτημα ΙV - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για PCR ενίσχυση πρίν από πυροαλληλούχιση	102
	Παράρτημα V- Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για πυροαλληλούχιση	103

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

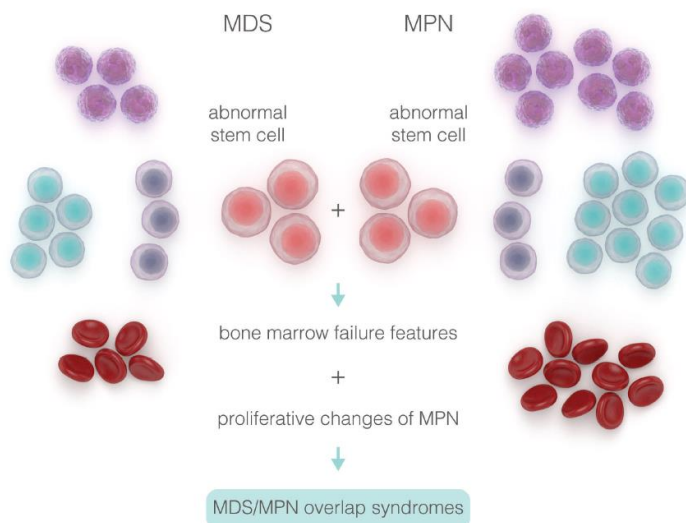
1.1 Τα μυελοδυσπλαστικά/μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα

1.1.1 Ορισμός

Τα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα/Μυελοϋπερπλαστικές Νεοπλάσματα (ΜΔΣ/ΜΥΝ) είναι μυελικές νεοπλασίες στις οποίες παρατηρούνται χαρακτηριστικά τόσο των μυελοδυσπλαστικών (ΜΔΣ), όσο και των μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων (ΜΥΝ). Στα αλληλεπικαλυπτόμενα αυτά σύνδρομα, η κυτταροπενία και η δυσπλασία οποιασδήποτε κυτταρικής σειράς προσομοιάζει με το χαρακτήρα των ΜΔΣ, ωστόσο συνήθως συνδυάζεται με αυξημένο κλάσμα λευκοκυττάρων (white blood cells, WBC), που αποτελεί χαρακτηριστικό των ΜΥΝ. Η παρουσία ίνωσης, μόνο, σε περιπτώσεις που κατά τα άλλα είναι χαρακτηριστικές της μυελοδυσπλασίας δεν πρέπει να δικαιολογεί την τοποθέτηση σε αυτή την κατηγορία, αλλά να θεωρηθεί ως ΜΔΣ με ίνωση.¹

Σύμφωνα με την ταξινόμηση των μυελικών νεοπλασιών, το 2008, από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.), στα ΜΔΣ/ΜΥΝ, περιλαμβάνονται η Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΜΜΛ), η Νεανική Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία (ΝΜΜΛ), η άτυπη Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (αΧΜΛ), η Ανθεκτική Αναιμία με Δακτυλιωτούς Σιδηροβλάστες και Θρομβοκυττάρωση (ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ), και τα αταξινόμητα ΜΔΣ/ΜΥΝ.

Με εξαίρεση την ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ, οι περισσότερες κατηγορίες εμφανίζουν επικαλύψεις μεταξύ τους τόσο σε μοριακό, όσο και σε κλινικό επίπεδο. Για το λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητος ο περαιτέρω χαρακτηρισμός τους, μέσα από βαθύτερη κατανόηση της βιολογίας της εκάστοτε νόσου, αλλά και των επί μέρους μοριακών και κλινικών δεικτών.²



Εικόνα 1: Σχηματική περιγραφή της γενετικής πολυπλοκότητας σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα.²

Στα ΜΔΣ/ΜΥΝ, ο καρυότυπος είναι συχνά φυσιολογικός ή παρουσιάζει ανωμαλίες ανάλογες εκείνων που εμφανίζονται στα ΜΔΣ. Ο στοχευμένος προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής ακολουθίας γονιδίων που εντοπίζονται συχνά μεταλλαγμένα στις μυελικές νεοπλασίες, συμβάλει στην ανάδειξη μεταλλάξεων σε ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών με ΧΜΜΛ και άλλα ΜΔΣ/ΜΥΝ.

Στη ΧΜΜΛ συγκεκριμένα, συχνότερα (>80% των περιπτώσεων) ανιχνεύονται μεταλλάξεις στα γονίδια *SRSF2*, *TET2* και *ASXL1*. Άλλες μεταλλάξεις εντοπίζονται σπανιότερα στα γονίδια *SETBP1*, *NRAS/KRAS*, *RUNX1*, *CBL*, και *EZH2*. Ορισμένα από αυτά τα γονίδια (*DNMT3*, *ASXL1*, *TET2*) παρατηρούνται μεταλλαγμένα τόσο σε ασθενείς με μυελικές νεοπλασίες, μάλιστα στις περισσότερες περιπτώσεις σε συνδυασμό με φυσιολογικό καρυότυπο, όσο και στον υγιή πληθυσμό, ιδιαίτερα κατά το γήρας με χαμηλή συχνότητα ανίχνευσης (Variant allele frequency, VAF~2-5%), ως εκ τούτου δεν αποτελούν από μόνα τους απόδειξη κακοήθειας.

Ανεξάρτητα, το γονίδιο *ASXL1* αποτελεί παράγοντα κακής πρόγνωσης νόσου, μάλιστα αποτελεί προγνωστικό κριτήριο της πορείας της νόσου, σε συνδυασμό με άλλες καρυοτυπικές και κλινικοπαθολογικές παραμέτρους.³

1.1.2 Ταξινόμηση

Οι πιο καλά χαρακτηρισμένες κατηγορίες των ΜΔΣ/ΜΥΝ είναι η ΧΜΜΛ, η αΧΜΛ και η ΝΜΜΛ. Η τελευταία αποτελεί λευχαιμική κατάσταση που παρατηρείται σε νεότερες ηλικίες και ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των παιδιατρικών μυελικών νεοπλασιών.

Επιπλέον, σε νεότερη ταξινόμηση των μυελικών νεοπλασιών από τον Π.Ο.Υ., το 2016, η ΑΑΔΣ-Θ, μετονομάστηκε σε ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ.³

Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα/ Μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα (ΜΔΣ/ΜΥΝ)
Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΜΜΛ)
Νεανική Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία (ΝΜΜΛ)
Άτυπη Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (αΧΜΛ)
Ανθεκτική Αναιμία με Δακτυλιωτούς Σιδηροβλάστες και Θρομβοκυττάρωση (ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ)
Αταξινόμητα ΜΔΣ/ΜΥΝ (αΜΔΣ/ΜΥΝ)

Πίνακας 1: Η ταξινόμηση των ΜΔΣ/ΜΥΝ σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. (2016).

1.1.3 Κλινικά Χαρακτηριστικά και Μοριακά Δεδομένα

Στην παθοφυσιολογία των ΜΔΣ/ΜΥΝ συχνά παρατηρείται απορρύθμιση της σηματοδότησης RAS/MAPK ή και πληθώρας άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών, που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην ωρίμανση, στην επιβίωση και σε άλλες διεργασίες του κυττάρου.¹

1.1.4 Μοριακή γενετική και ανωμαλίες στη σηματοδότηση

Κυτταρογενετικές αναλύσεις έχουν αποκαλύψει χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε περίπου 70% των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ. Οι περισσότερες από αυτές αφορούν σε ανευπλοειδίες (τρισωμία 8, μονοσωμία 7) ή σε ελλείψεις (del7q, del13q, del20q).

Εκτός όμως από τις ευρείες χρωμοσωμικές αλλαγές, συχνά ανιχνεύονται σημειακές ή άλλες μεταλλάξεις μικρής κλίμακας σε γονίδια που συμμετέχουν στην κυτταρική σηματοδότηση, στη ρύθμιση της επιγενετικής κατάστασης του κυττάρου, στην ωρίμανση του RNA και στη μεταγραφή.

Οι μεταλλάξεις σε γονίδια σηματοδότησης έχουν ως αποτέλεσμα τη μη φυσιολογική ενεργοποίηση αντιαποπτωτικών μονοπατιών, που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τα οποία, υπό φυσιολογικές συνθήκες, ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες (growth factors, GFs).

Από τα γονίδια του επιγενετικού μηχανισμού, οι μεταλλάξεις στα γονίδια *TET2* και *IDH1/2* είναι αμοιβαία αποκλειόμενες.

Αρκετά συχνές είναι και οι μεταλλάξεις σε γονίδια που συμμετέχουν στην ωρίμανση του RNA. Σε περίπου 50% των ασθενών με ΧΜΜΛ εντοπίζονται μεταλλάξεις στα γονίδια *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *SF3B1* παρατηρούνται σε περίπου 72% των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ. Μάλιστα, αυτές δεν είναι αποκλειστικές, αλλά μπορεί να συνοδεύονται από μεταλλάξεις στα γονίδια *DNMT3*, *JAK2*, *ASXL1* και *TET2*.

Το γονίδιο *RUNX1* είναι μεταλλαγμένο σε 15%-30% των ασθενών με ΧΜΜΛ. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί τον παράγοντα Α πρόσδεσης πυρήνα (core-binding factor alpha/CBFα). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη δέσμευσης SET1 (*SETBP1*), εμφανίζεται μεταλλαγμένο στο 25% των περιπτώσεων της αΧΜΛ, και λιγότερο συχνά στις υπόλοιπες κατηγορίες των ΜΔΣ/ΜΥΝ.

1.1.5 Εκτροπή σε οξεία μυελογενή λευχαιμία

Η θεραπευτική παρέμβαση σε ασθενείς με ΟΜΛ σε εξέλιξη από ΜΔΣ/ΜΥΝ συχνά αποτελεί πρόκληση. Η πρόοδος νόσου σε ασθενείς με ΧΜΜΛ συμβαίνει στο 15%-52% των περιπτώσεων, όπου μάλιστα παρατηρείται λευκοκυττάρωση και αυξημένη κυτταροβρίθεια στο μυελό των οστών.

Η εμφάνιση μεταλλάξεων στα γονίδια *ASXL1* και *RUNX1*, καθώς και διάφορες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, φαίνεται πως αυξάνουν τον κίνδυνο λευχαιμικής εκτροπής.

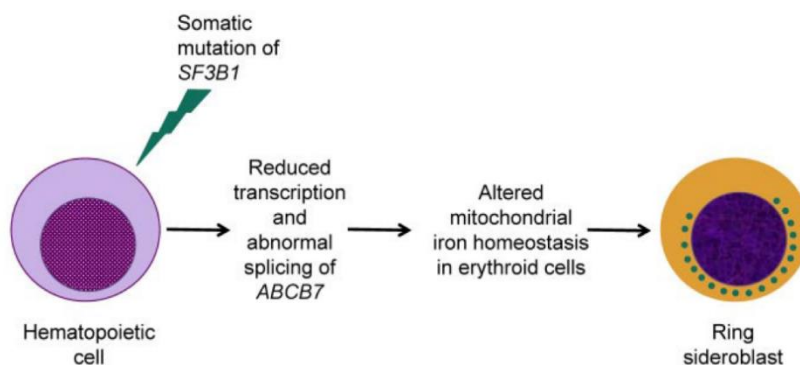
1.1.6 Μοριακές βλάβες στα ΜΔΣ/ΜΥΝ

1.1.6.1. Παράγοντες του μηχανισμού ωρίμανσης του RNA

Η πιο συχνά μεταλλαγμένη κατηγορία γονιδίων σε ασθενείς με ΜΔΣ κωδικοποιούν πρωτεΐνες- παράγοντες ωρίμανσης που συμμετέχουν στην αποκοπή των εσονίων και στη συρραφή των εξονίων από το pre-mRNA, στο ώριμο RNA. Υπάρχουν τουλάχιστον 8 γονίδια παραγόντων ωρίμανσης που εμφανίζονται συχνά μεταλλαγμένα, και έχουν αναγνωριστεί στα ΜΔΣ και σχεδόν στα 2/3 των ασθενών θα φέρουν μεταλλάξεις σε ένα μέλος από την οικογένεια αυτών των γονιδίων⁴. Οι μεταλλάξεις σε παράγοντες ωρίμανσης είναι σε μεγάλο βαθμό αμοιβαία αποκλειόμενες μεταλλάξεις. Ασθενείς με μετάλλαξη σε έναν παράγοντα ωρίμανσης, σπανίως παρουσιάζουν μετάλλαξη σε άλλον παράγοντα ωρίμανσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτές οι μεταλλάξεις είτε δεν συνδυάζονται, ή πιθανότερα, έχουν ένα κοινό μηχανισμό δράσης. Έτσι, ένα ασθενές βλαστοκύτταρο που αποκτά επιπλέον μετάλλαξη σε παράγοντα ωρίμανσης δεν θα εμφανίσει επιλεκτικό πλεονέκτημα, αλλά μπορεί εύκολα να εμφανίσει ένα επιλεκτικό μειονέκτημα ως συνέπεια της δεύτερης μετάλλαξης. Παρά τον υποτιθέμενο κοινό παθογόνο ρόλο, ασθενείς με μεταλλάξεις σε διαφορετικά γονίδια παραγόντων ωρίμανσης, συχνά εμφανίζουν διαφορετικούς κλινικούς φαινοτύπους⁵. Αυτό οφείλεται εν μέρει στο γεγονός ότι οι εκδηλώσεις της νόσου καθορίζονται συχνά από την επίδραση των μεταλλάξεων-οδηγών στη διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων της νόσου. Μεταλλάξεις σε διαφορετικούς παράγοντες ωρίμανσης μπορεί επίσης να σχετίζονται με ορισμένους κλινικούς φαινοτύπους λόγω των προτύπων συμμετάλλαξης με άλλα γονίδια που σχετίζονται με τα ΜΔΣ^{6,7}. Η αξιολόγηση της συνύπαρξης μεταλλάξεων μπορεί, για παράδειγμα, να καθοδηγήσει την πρόγνωση ή τις εκδηλώσεις της νόσου. Αν υπάρχει ένας κοινός μηχανισμός με τον οποίο οι μεταλλάξεις σε παράγοντες ωρίμανσης καθοδηγούν την εξέλιξη των ΜΔΣ, δεν είναι ακόμα κατανοητός σε ένα ικανοποιητικό επίπεδο. Αυτές οι μεταλλάξεις δεν εμφανίζονται αποκλειστικά στα ΜΔΣ, καθώς είναι πιθανό να βρεθούν και σε άλλες κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένων μερικών όγκων, όπου εμφανίζονται με μικρή συχνότητα. Ορισμένες μελέτες έχουν αναγνωρίσει αλλαγές στην αποτελεσματικότητα του ωρίμανσης και στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τις μεταλλάξεις σε παράγοντες ωρίμανσης, ωστόσο μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει κατανοητός ο υποκείμενος παθογενετικός μηχανισμός.⁸

1.1.6.1.1. Το γονίδιο *SF3B1*

Το *SF3B1* είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο παραγόντων ωρίμανσης και κωδικοποιεί τη U2 μικρή πυρηνική υπομονάδα του ριβοπρωτεϊνικού συμπλόκου (snRNP), υπεύθυνη για την αναγνώριση του σημείου διακλάδωσης (branch site). Μεταλλάξεις στο *SF3B1* είναι παρούσες στο 20-30% των ασθενών και είναι οι μοναδικές επίκτητες μεταλλάξεις, όπως και στα υπόλοιπα γονίδια αυτής της κατηγορίας, και σχετίζονται με ευνοϊκή πρόγνωση. Αυτές οι μεταλλάξεις εμφανίζονται στο ενδιάμεσο ορισμένων αυτοτελών δομικών ή και λειτουργικών περιοχών (domains) HEAT πρωτεϊνών⁹. Η μετάλλαξη με τη μεγαλύτερη συχνότητα είναι παρανοηματική και οδηγεί σε αντικατάσταση της λυσίνης στη θέση 700 από γλουταμινικό οξύ (K700E), καθώς εμφανίζεται σε περισσότερες από τις μισές μεταλλάξεις του *SF3B1*. Κλινικά, οι μεταλλάξεις του *SF3B1* είναι πολύ στενά συνδεδεμένες με την παρουσία δακτυλιωτών σιδηροβλαστών (εικόνα 2). Περισσότερο από το 85% των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ θα εμφανίζουν μία μετάλλαξη στο *SF3B1*. Οι *SF3B1* μεταλλάξεις έχουν συσχετιστεί με μία πιο ευνοϊκή πρόγνωση αλλά δεν είναι πλήρως κατανοητό αν αυτό το γεγονός είναι ανεξάρτητο από άλλους παράγοντες κινδύνου.



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της διαπίστωσης της σχέσης μεταξύ της ύπαρξης μετάλλαξης *SF3B1* και του σχηματισμού δακτυλιωτών σιδηροβλαστών σε ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ.¹⁰

Για παράδειγμα, οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο *SF3B1* είναι λιγότερο πιθανό να έχουν κυτταρογενετικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένου περίπλοκου καρυότυπου, και είναι λιγότερο πιθανό να εμφανίζουν μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με κακή πρόγνωση. Μόνο οι μεταλλάξεις στο *DNMT3A* εμφανίζονται μαζί με τις μεταλλάξεις στο *SF3B1* πιο συχνά απ' ότι θα προβλεπόταν τυχαία, γεγονός που πιθανόν υποδηλώνει συνεργατική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο.⁶ Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *SF3B1* είναι επίσης συχνές στη ΧΛΛ, όπου εμφανίζεται στο 15-20% των περιπτώσεων.

1.1.6.1.2. Το γονίδιο *SRSF2*

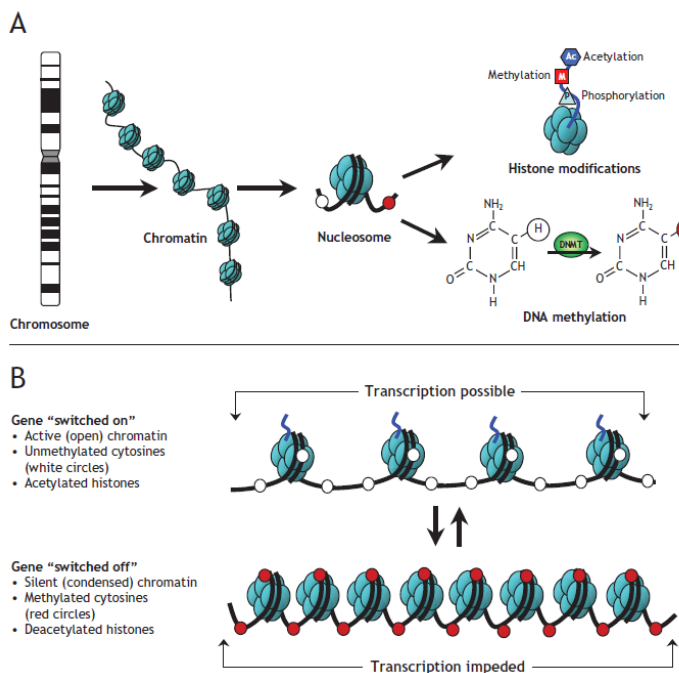
Το *SRSF2* είναι το δεύτερο σε σειρά πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο παράγοντα ωρίμανσης. Κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη πλούσια σε σερίνη-αργινίνη που αλληλεπιδρά με τα U2 και U1 συστατικά του σωματίου ωρίμανσης. Η πιο συχνή μετάλλαξη σε αυτό το γονίδιο οδηγεί σε αντικατάσταση προλίνης στην αμινοξική αλληλουχία, αν και μικρές προσθήκες και διαγραφές σε αυτή τη θέση που διατηρούν το πλαίσιο ανάγνωσης, έχουν επίσης αναφερθεί. Μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο εμφανίζονται στο 10-15% των περιπτώσεων ΜΔΣ και στο 40% των ΧΜΜΛ.⁶ Συνύπαρξη μεταλλάξεων του *SRSF2* έχουν παρατηρηθεί με ένα εύρος άλλων γονιδίων, όπως *TET2*, *ASXL1*, *CUX1*, *IDH2* και *STAG2*, πολλές από τις οποίες εμφανίζονται σε ασθενείς με ΧΜΜΛ.⁸

1.1.6.1.3. Το γονίδιο *U2AF1*

Το *U2AF1* είναι το τρίτο σε σειρά πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο παράγοντα ωρίμανσης. Το *U2AF1* κωδικοποιεί ένα βοηθητικό παράγοντα στο U2 σωματίο ματίσματος που είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση του δινουκλεοτιδίου AG (υποδοχέας) στο 3' άκρο των εσονίων. Οι μεταλλάξεις του *U2AF1* έχουν ανιχνευθεί κυρίως σε δύο περιοχές, οι οποίες βοηθούν την πρόσδεση του DNA με την πρωτεΐνη, με δομή δακτύλου ψευδαργύρου (zinc finger).^{4,11} Οι μεταλλάξεις στο *U2AF1* φαίνεται να επηρεάζουν το μάτισμα, αλλά δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητό πως αυτές οι μεταλλάξεις προσδίδουν ένα πλεονέκτημα επιλογής στα μεταλλαγμένα κύτταρα. Οι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο εμφανίζονται σχεδόν στο 12% των περιπτώσεων των ασθενών. Κλινικά, οι μεταλλάξεις στο *U2AF1* σχετίζονται με μικρότερο προσδόκιμο επιβίωσης και αυξημένο κίνδυνο εκτροπής σε ΟΜΛ.¹² Ορισμένοι επιπλέον παράγοντες ματίσματος μπορεί να είναι μεταλλαγμένοι στα ΜΔΣ, συμπεριλαμβανομένων των *ZRSR2*, *SF1* και *U2AF2*. Οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις εμφανίζονται ως μεταλλάξεις απώλειας λειτουργικότητας.⁸

1.1.6.2. Επιγενετικοί ρυθμιστές- Μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στον μηχανισμό επιγενετικής ρύθμισης του κυττάρου.

Ως επιγενετικές αλλαγές, χαρακτηρίζονται οι κληρονομήσιμες τροποποιήσεις της χρωματίνης και του DNA, που δεν αλλοιώνουν την αλληλουχία των βάσεων του DNA (εικόνα 3). Η μεθυλίωση των καταλοίπων κυτοσίνης στο DNA αντιπροσωπεύει μία μορφή επιγενετικής τροποποίησης που μπορεί να είναι απορυθμισμένη στα ΜΔΣ. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς μπορεί να εμφανίζουν υπομεθυλίωση του DNA καθολικά, αλλά αποδεικνύεται ότι μπορεί να εμφανίζεται υπερμεθυλίωση σε συγκεκριμένες περιοχές όπως οι νησίδες CpG (περιοχές που είναι πλούσιες σε δινουκλεοτίδια CG) που εντοπίζονται σε ή κοντά σε υποκινητές γονιδίων. Αυτά τα επιγενετικά σήματα έχουν συσχετιστεί με την κλειστή διαμόρφωση της χρωματίνης και τη σχετική αποσιώπηση σε κοντινά γονίδια. Η εξήγηση στο παραπάνω είναι ότι η μη φυσιολογική μεθυλίωση του DNA οδηγεί σε παθογενετική αποσιώπηση σημαντικών ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

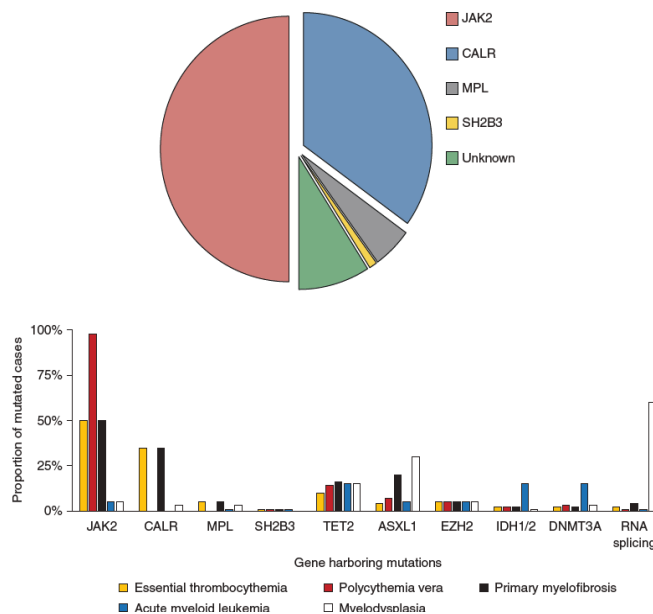


Εικόνα 3: (Α) Σχηματική αναπαράσταση των επιγενετικών τροποποιήσεων.

Οι αλυσίδες του DNA τυλίγονται γύρω από το οκταμερές των ιστονών, σχηματίζοντας νουκλεοσώματα. Αναστρέψιμες και εξειδικευμένες ως προς τη θέση μεταβολές ιστονών συμβαίνουν σε πολλαπλές θέσεις μέσω ακετυλίωσης, μεθυλίωσης και φωσφορυλίωσης. Η μεθυλίωση του DNA λαμβάνει χώρα στη θέση 5 των καταλοίπων κυτοσίνης, σε μία αντίδραση που καταλύεται από τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs). Σε συνεργασία, αυτές οι τροποποιήσεις παρέχουν μία μοναδική επιγενετική «υπογραφή» που ρυθμίζει την οργάνωση της χρωματίνης και την έκφραση των γονιδίων. (Β) Σχηματική αναπαράσταση των αντιστρεπτών αλλαγών στην οργάνωση της χρωματίνης που επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση: τα γονίδια εκφράζονται όταν η χρωματίνη είναι ανοιχτή (ενεργή),

και είναι απενεργοποιημένα όταν η χρωματίνη είναι συμπυκνωμένη. Λευκοί κύκλοι= μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες, κόκκινοι κύκλοι= μεθυλιωμένες κυτοσίνες.¹³

Τα περισσότερα μεταλλαγμένα γονίδια που εμπλέκονται στο μηχανισμό επιγενετικής ρύθμισης πολύ συχνά συνυπάρχουν και δεν είναι αποκλειστικά για τη συγκεκριμένη νόσο.⁸



Εικόνα 4: Το φάσμα και η συχνότητα των σωματικών μεταλλάξεων στα μυελικές νεοπλασίες.⁸

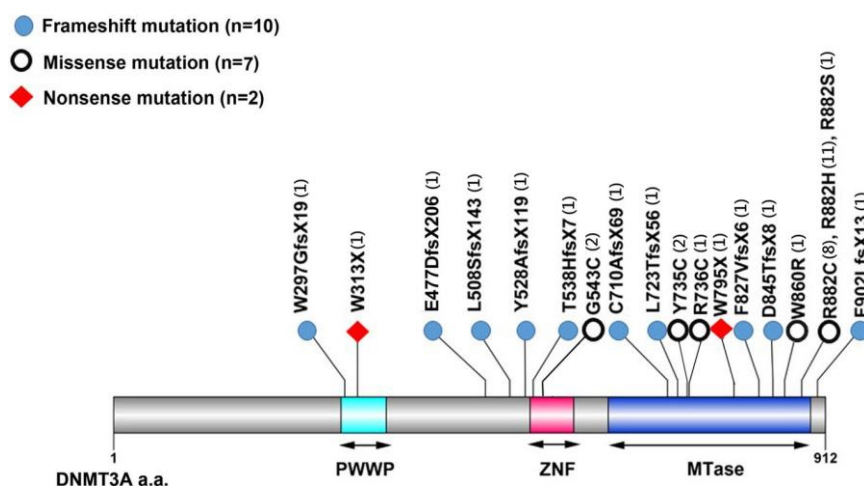
Γονίδια που εμπλέκονται στη μεθυλίωση του DNA

1.1.6.2.1. Το γονίδιο *DNMT3A*

Το *DNMT3A* είναι μέλος της οικογένειας γονιδίων *DNMT*, που κωδικοποιούν DNA μεθυλοτρανσφεράσες και εδράζεται στο χρωμόσωμα 2p23.3.¹⁴ Είναι το μόνο γονίδιο της οικογένειας που είναι συχνά μεταλλαγμένο στα ΜΔΣ. Εμφανίζεται να είναι μεταλλαγμένο σχεδόν στο 15% των περιπτώσεων. Οι μεταλλάξεις περιλαμβάνουν μετατοπίσεις πλαισίου και πρώιμα κωδικόνια λήξης, όπως και παρανοηματικές μεταλλάξεις που εντοπίζονται σε όλο το μήκος του γονιδίου. Η μόνη εξαίρεση είναι η υψηλή συχνότητα παρανοηματικών μεταλλάξεων κωδικονίου 882, η οποία έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την καταλυτική ενεργότητα.¹⁵⁻¹⁷ Από σχεδόν όλα τα γονίδια που εντοπίζονται μεταλλαγμένα στα ΜΔΣ, οι μεταλλάξεις του *DNMT3A* δεν είναι αποκλειστικές για τα ΜΔΣ/ΜΥΝ, αλλά ανιχνεύονται και σε άλλες μυελικές νεοπλασίες και είναι πιθανό να εντοπιστούν στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ),

στα μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα (MYN), ή ακόμα και σε λεμφοϋπερπλαστικές κακοήθειες.⁸

Οι μεταλλάξεις στο *DNMT3A* είναι συχνές σε ασθενείς με ΟΜΛ και σχετίζονται με χαμηλή πιθανότητα επιβίωσης, ανεξάρτητα από την ηλικία και την παρουσία των μεταλλάξεων στα γονίδια *FLT3* ή *NPM1* και ανεξάρτητα από τον τύπο της μετάλλαξης και της τοποθεσίας των γονιδίων. Αυτό το εύρημα υποστηρίζει πολύ ισχυρά, ότι οι μεταλλάξεις στο *DNMT3A* είναι πιθανόν σχετικές με την παθογένεση της ΟΜΛ. Οι μεταλλάξεις στο *DNMT3A* δεν προκαλούν γονιδιακή αστάθεια, δεν μεταβάλλουν την συνολική περιεκτικότητα 5-μεθυλοκυτοσίνης ή τα γενικά πρότυπα μεθυλίωσης και δεν μεταβάλλουν δραματικά την γονιδιακή έκφραση.¹⁵



Εικόνα 5: Μοτίβα και τοποθεσία των μεταλλάξεων του *DNMT3A*.¹⁸

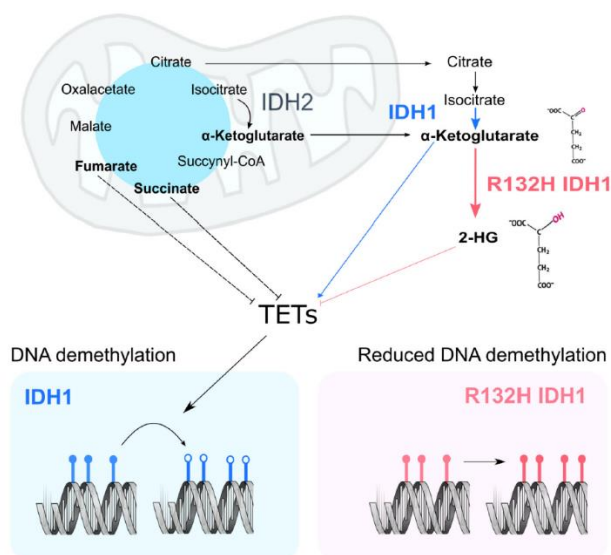
Οι μεταλλάξεις που συνυπάρχουν ή οι αλλαγές στο μικροπεριβάλλον είναι καθοριστικοί παράγοντες της νόσου. Μεταλλάξεις του *DNMT3A* εντοπίζονται πιο συχνά σε ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο και συνεντοπίζονται με μεταλλάξεις *SF3B1*.¹⁹ Οι μεταλλάξεις του *DNMT3A* σε ασθενείς με ΜΔΣ συσχετίζονται με κακή πρόγνωση.⁸

1.1.6.2.2. Το γονίδιο *TET2*

Το *TET2* ανήκει στην οικογένεια των *TET* γονιδίων. Κωδικοποιεί μία οξυγενάση της μεθυλκυτοσίνης που μετατρέπει τη 5-μεθυλκυτοσίνη (5-mC) σε 5-υδροξυμεθυλκυτοσίνη (5-hmC) με τη βοήθεια σιδήρου και α-κετογλουταρικού (αKG) ως συμπαραγοντες.²⁰ Το ένζυμο *TET2* μπορεί να οξειδώσει περαιτέρω τη 5-hmC και 5-καρβοξυκυτοσίνη (5-fC και 5-caC, αντίστοιχα).²¹ Το παραπάνω μπορεί να παρουσιάζει ένα μηχανισμό για την ενεργή απομεθυλίωση κυτοσινών καθώς η 5-caC

μπορεί να αποκαρβοξυλιωθεί για να σχηματίσει κυτοσίνη ή να επεξεργαστεί ως ένα μη σωστά ζευγαρωμένο νουκλεοτίδιο από το μονοπάτι επισκευής DNA με εκτομή βάσης. Μεταλλάξεις στο *TET2* συνήθως συσσωρεύονται σε περιοχές που κωδικοποιούν καταλυτικές περιοχές και έχουν ως αποτέλεσμα μία σχετική απώλεια λειτουργικότητας.²² Βρίσκεται ανάμεσα στα πιο συχνά μεταλλαγμένα γονίδια στα ΜΔΣ και εμφανίζεται στο 20-30% των περιπτώσεων, και σε περισσότερο από το 40% των ασθενών με ΧΜΜΛ.

Ασθενείς με μεταλλάξεις στο *TET2* παρουσιάζουν αυξημένη καθολική μεθυλίωση του DNA, χαμηλότερα επίπεδα 5-hmC και είναι πιο πιθανό να έχουν ένα αυξημένο αριθμό μονοκυττάρων.^{8,23,24} Όπως και στην περίπτωση των μεταλλάξεων στο γονίδιο *DNMT3A*, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TET2* εντοπίζονται τόσο σε μυελικές όσο και σε λεμφικές κακοήθειες, καθώς επίσης και σε ανθρώπους με κλωνική αιματοποίηση χωρίς υποκείμενη αιματολογική νόσο.²⁵⁻²⁸ Κλινικά, οι *TET2* μεταλλάξεις δεν καθοδηγούν την πρόγνωση των ΜΔΣ και έχουν ποικίλως συσχετιστεί με ευνοϊκές, ουδέτερες ή κακές εκβάσεις.^{8,29,30}



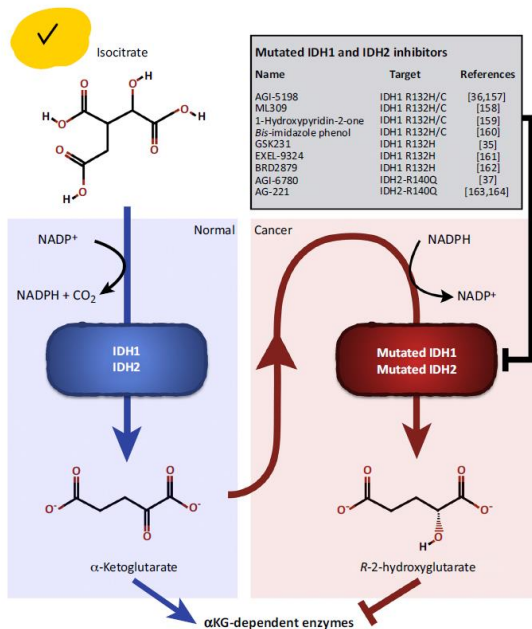
Εικόνα 6: Πρόσφατο μοντέλο της επίδρασης των μεταλλάξεων του IDH1 στην αναδόμηση της χρωματίνης. [ENREF 17](#)³¹

1.1.6.2.3. Τα γονίδια *IDH1* και *IDH2*

Το φυσιολογικό γονίδιο *IDH1* παράγει α-κετογλουταρικό (α-KG) από ισοκιτρικό με παραγωγή ενός NADPH από NADP+, όπου είναι απαραίτητο για την ενεργότητα ορισμένων πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των απομεθυλασών του DNA και των ιστονών.³¹ Αντί της μετατροπής του ισοκιτρικού σε αKG, οι μεταλλαγμένες μορφές

των *IDH1* και *IDH2* καταλύουν τη μετατροπή του αΚG σε ένα 2-υδροξυγλουταρικό (2-HG), με οξείδωση του NADPH σε NADP⁺ (εικόνα 7).³² Το 2-HG που παράγεται μπορεί να παρέμβει με ενεργότητα αΚG-εξαρτώμενης οξυγενάσης και να επηρεάσει την λειτουργία του ενζύμου *TET2*, προπυλ-υδροξυλασών, ενζύμων σύνθεσης κολλαγόνου, και ποικίλων ιστονών απομεθυλίωσης.^{8,33-37}

Μόνο οι μεταλλάξεις στα γονίδια 1 και 2 της ισοδρικής αφυδρογονάσης (*IDH1* και *IDH2*, αντίστοιχα) είναι αμοιβαία αποκλειόμενες με τις μεταλλάξεις του γονιδίου *TET2*, υποδηλώνοντας ότι μοιράζονται έναν κοινό παθογενετικό μηχανισμό. Οι μεταλλάξεις των *IDH* γονιδίων είναι κοινές στην ΟΜΛ και στα γλοιώματα, αλλά σχετικά σπάνια στο ΜΔΣ, που ανιχνεύονται περίπου στο 5% των περιπτώσεων. Οι μεταλλάξεις *IDH* ανιχνεύονται πάντοτε σε κατάσταση ετεροζυγωτίας και έχουν ως αποτέλεσμα όχι την απώλεια αλλά την αλλαγή (neomorphic) της ενζυμικής λειτουργίας.⁸



Εικόνα 7: Τα μεταλλαγμένα *IDH1* και *IDH2* καταλύουν την παραγωγή 2-υδροξυγλουταρικού (*R-2HG*) από α-κετογλουταρικό (*αΚG*).³⁸

Η αυξημένη μεθυλίωση των υποκινητών μπορεί να έχει διαφορετικές συνέπειες από την αυξημένη μεθυλίωση των μονωτών, δεδομένου ότι η μετάλλαξη στο γονίδιο *IDH1* είναι αρκετή για να οδηγήσει σε φαινότυπο μεθυλωμένων νησίδων CpG.³¹

Γονίδια που εμπλέκονται σε τροποποιήσεις των ιστονών

1.1.6.2.4. Το γονίδιο *EZH2*

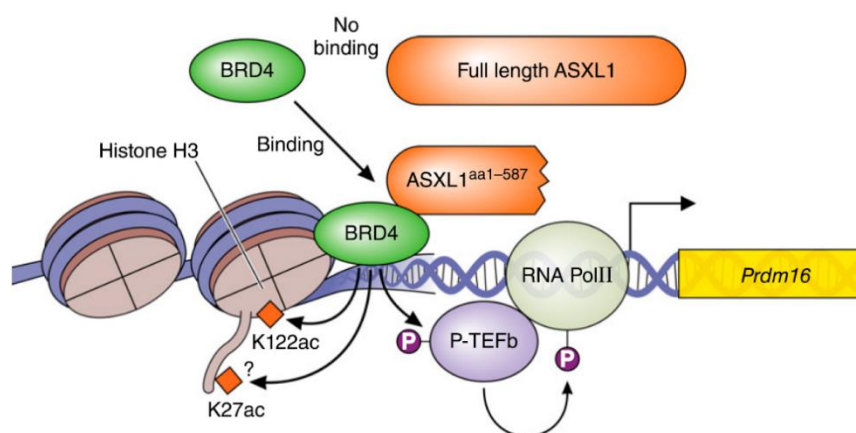
Το γονίδιο *EZH2* κωδικοποιεί για μία μεθυλάση των ιστονών, που αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα του κατασταλτικού πρωτεϊνικού συμπλέγματος 2 (Polycomb Repressor Complex 2, PRC2) και είναι υπεύθυνη για τη μεθυλίωση της λυσίνης 27 στην ιστόνη 3 (H3K27). Η μεθυλίωση της λυσίνης 27 στην H3K27 σχετίζεται με διαμόρφωση της χρωματίνης στην «κλειστή» της μορφή και κατά συνέπεια και μειωμένη έκφραση γειτονικών γονιδίων. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *EZH2* είναι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργικότητας, ανιχνεύονται στο 6% των ΜΔΣ και συσχετίζονται με κακή πρόγνωση.³⁹ Αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο γεγονός ότι οι μεταλλάξεις *EZH2* συνδέονται στενά με αρνητικά κλινικά χαρακτηριστικά, όπως αυξημένα ποσοστά βλαστών, σύνθετος καρυότυπος ή σοβαρές κυτταροπενίες. Άλλα μέλη του συμπλέγματος PRC2, αποτελούν οι πρωτεΐνες EED και SUZ12, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα ομώνυμα γονίδια και μεταλλάξεις αυτών ανιχνεύονται σπάνια σε περιπτώσεις ΜΔΣ.⁴⁰ Η απώλεια της λειτουργικότητας του συμπλέγματος PRC2 φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη και την εξέλιξη ΜΔΣ μέσω της απορρύθμισης της λειτουργίας των γονιδίων *HOX*, τα οποία είτε υπερεκφράζονται ή εκφράζονται ανώμαλα, αποδιοργανώνοντας τον μηχανισμό αυτό-ανανέωσης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και επάγοντας την εξαλλαγή τους.⁴¹

1.1.6.2.5. Το γονίδιο *ASXL1*

Το γονίδιο *ASXL1* αλληλοεπιδρά απευθείας με το σύμπλεγμα PRC2, κατευθύνοντας τη δραστηριότητα της *EZH2*. Η απώλεια λειτουργικότητας της πρωτεΐνης *ASXL1* σχετίζεται με την απουσία τριμεθυλίωσης H3K27 στο σύμπλεγμα γονιδίων *HOXA*.⁴² Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *ASXL1* είναι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργικότητας και συχνά συν-ανιχνεύονται με μεταλλάξεις σε γονίδια όπως τα *SRSF2*, *U2AF1*, *TET2* και *NRAS*.^{39,43,44} Σε ασθενείς με κληρονομήσιμες μεταλλάξεις του μεταγραφικού παράγοντα *GATA2*, η παρουσία επίκτητων μεταλλάξεων στο γονίδιο *ASXL1* φαίνεται να παίζει ρόλο στην εξέλιξη προς ΜΔΣ ή/και ΟΜΛ.^{45,46}

Το *ASXL1* είναι ένα συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο στα ΜΔΣ και θεωρείται ότι παίζει ρόλο επιγενετικού «οδηγού», ικανού να προσδένεται σε συγκεκριμένα αποτυπώματα ιστονών λόγω της υψηλά συντηρημένης περιοχής PHD (plant homeodomain). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *ASXL1* ανευρίσκονται περίπου στο 20%

των ασθενών ΜΔΣ και σε ποσοστό 40% των ασθενών με ΧΜΜΛ και συσχετίζονται με κακή πρόγνωση.



Εικόνα 8: Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *ASXL1* είναι μεταλλάξεις ενίσχυσης λειτουργικότητας (gain-of-function).⁴⁷

Συνήθως, οι μεταλλάξεις του γονιδίου *ASXL1* ανιχνεύονται σε κατάσταση ετεροζυγωτίας και οδηγούν σε αποκοπή του τελικού εξονίου. Η μεταλλαγμένη *ASXL1* προσβάλλει τη δραστηριότητα της BRD4. Η BRD4 ακετυλιώνει τη λυσίνη 122 της ιστόνης H3 (H3K122) και ενεργοποιεί τον παράγοντα pTEFb επάγοντας τη φωσφορυλίωση της RNA pol II, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της μεταγραφής (εικόνα 8).

1.2 Επιγενετική

Ως επιγενετική ονομάζουμε τις αλλαγές που προκύπτουν στην έκφραση των γονιδίων, που εμφανίζουν κληρονομικότητα μέσω πολλαπλών κυτταρικών διαιρέσεων και δεν οφείλονται σε μεταβολές στην αλληλουχία της πρώιμης DNA αλληλουχίας. Για να διατηρηθεί η αδιαφοροποίητη κατάσταση στα κύτταρα απαιτείται σταθερή καταστολή των γονιδίων διαφοροποίησης, τα οποία μπορεί να είναι από εμβρυικά βλαστοκύτταρα μέχρι προγονικά σωματικών βλαστικών κυττάρων.⁴⁸

Οι ρυθμιστές της μεθυλίωσης του DNA και της τροποποίησης των ιστονών, καθώς επίσης και τα ένζυμα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (ATP εξαρτώμενα), αποτελούν τους κύριους τελεστές του επιγενετικού ελέγχου. Αυτοί αλληλεπιδρούν

με άλλους ρυθμιστές, όπως μεταγραφικοί παράγοντες ειδικοί για μια αλληλουχία και RNA, τα οποία δεν κωδικοποιούνται, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και του καρκίνου.

1.2.1 Μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί το βασικό επιγενετικό μηχανισμό για τη χημική τροποποίηση του DNA. Ιστορικά, η μεθυλίωση του DNA ανακαλύφθηκε στα θηλαστικά, όταν και το DNA πιστοποιήθηκε ως το γενετικό υλικό. Το 1948, ο Rollin Hotchkiss πρώτος ανακάλυψε τροποποιημένη κυτοσίνη σε προετοιμασία θύμου μόσχου χρησιμοποιώντας χρωματογραφία χαρτιού. Ο Hotchkiss (1948) υπέθεσε ότι αυτό το κλάσμα ήταν 5-μεθυλκυτοσίνη (5mC), επειδή διαχωρίστηκε από την κυτοσίνη με τρόπο παρόμοιο του διαχωρισμού της θυμίνης από την ουρακίλη, και στη συνέχεια πρότεινε ότι αυτή η τροποποιημένη κυτοσίνη υπήρχε φυσικά στο DNA. Αν και, πολλοί ερευνητές πρότειναν ότι η μεθυλίωση του DNA μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση γονιδίων, από το 1980 και μετά, έρευνες απέδειξαν ότι η μεθυλίωση του DNA εμπλέκεται στη ρύθμιση γονιδίων και στη διαφοροποίηση κυττάρων. Τώρα είναι ευρέως αναγνωρισμένο ότι η μεθυλίωση του DNA, σε συνδυασμό με άλλα ρυθμιστικά στοιχεία, είναι ο βασικός επιγενετικός μηχανισμός που επηρεάζει τη δραστηριότητα των γονιδίων.⁴⁹

Η μεθυλίωση του DNA καταλύεται από DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs), οι οποίες είναι ισχυροί ρυθμιστές έκφρασης γονιδίων, καθώς πραγματοποιούν μεθυλίωση 5' άνθρακα των υπολειμμάτων κυτοσίνης εντός δινουκλεοτιδίων CpG. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το μεθυλιωμένο DNA που προκύπτει με τη δράση των DNMTs, συμβάλει στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και στη χρωμοσωμική σταθερότητα. Σε περιπτώσεις κατά τις οποίες προκύπτει τροποποιημένη ρύθμιση των DNMTs, μπορεί να οδηγηθούμε σε καρκινογένεση.⁴⁹

Στους όρους της μεθυλίωσης του DNA, υπάρχουν δύο τύποι γονιδίων υποκινητών. Ο πρώτος εντοπίζεται στο ~50% των γονιδίων στο γονιδίωμα των θηλαστικών και περιλαμβάνει CpG νησίδες που δεν είναι μεθυλιωμένες. Ο άλλος τύπος υποκινητή είναι φτωχός σε CpG σε σύγκριση με τον προηγούμενο, όπου εντοπίζεται στο υπόλοιπο γονιδίωμα.⁵⁰

1.2.1.1. Θέσεις Μεθυλίωσης

Η μεθυλίωση του DNA είναι απαραίτητη για την εξάλειψη των ρετροϊκών στοιχείων, τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, του γονιδιωματικού αποτυπώματος και της απενεργοποίησης των χρωμοσωμάτων X. Είναι σημαντικό ότι η μεθυλίωση του DNA σε διαφορετικές περιοχές γονιδιώματος μπορεί να ασκεί διαφορετικές επιδράσεις στις γονιδιακές δραστηριότητες με βάση την υποκείμενη γενετική ακολουθία.⁴⁹

Σε καθολικό επίπεδο μεθυλίωσης του γονιδιώματος ανακαλύφθηκε ότι η συχνότητα της μεθυλίωσης του DNA εμφανίζει μεγάλες παραλλαγές μεταξύ χρωμοσωμάτων. Οι υπο-τελομερείς περιοχές των χρωμοσωμάτων συχνά εμφανίζουν υψηλότερη συχνότητα μεθυλίωσης του DNA.⁵¹

Συνολικά, στο γονιδίωμα των θηλαστικών μειώνονται οι θέσεις CpG που προκύπτουν από το μεταλλαξογόνο δυναμικό των 5mC που μπορεί να οδηγήσει σε απελευθέρωση θυμίνης (συνολικά, τα γονιδιώματα θηλαστικών στερούνται θέσεων CpG, που μπορεί να προκύψει από το μεταλλαξογόνο δυναμικό των 5mC που μπορεί να απομακρυνθεί από την θυμίνη). Οι υπολειπόμενες θέσεις των CpG βρίσκονται διασκορπισμένες σε όλο το γονιδίωμα, όπου είναι μεθυλιωμένες σε υψηλό ποσοστό με εξαίρεση τις νησίδες CpG. Αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχουν ενδείξεις μεθυλίωσης σε περιοχές πέρα των CpG σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού και ανθρώπου, ωστόσο αυτή η μεθυλίωση χάνεται στους ώριμους ιστούς.⁴⁹

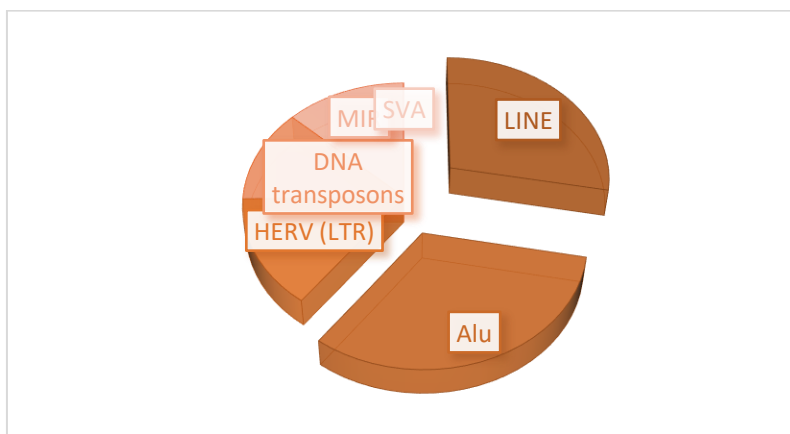
1.2.1.1.1. Διαγονιδιακές περιοχές

Περίπου το 45% του γονιδιώματος των θηλαστικών αποτελείται από (ρετρο)μεταθετά (π.χ. LINES) και ιικά στοιχεία που αποσιωπούνται μέσω μεθυλίωσης μεγάλης έκτασης. Η συντριπτική πλειονότητα αυτών των στοιχείων απενεργοποιούνται με μεθυλίωση του DNA ή με μεταλλάξεις που αποκτώνται με την πάροδο του χρόνου ως αποτέλεσμα της απαμίνωσης των 5mC. Σε περίπτωση που εκφραστούν τα στοιχεία αυτά είναι δυνητικά επιβλαβή, καθώς η αντιγραφή τους και η εισαγωγή τους σε άλλες περιοχές μπορεί να οδηγήσει σε διάσπαση γονιδίων και μεταλλάξεις στο DNA.⁴⁹

Μερικά μεταθετά στοιχεία (TEs) είναι ικανά να δημιουργούν νέες ενθέσεις μέσω των ενδιάμεσων RNA. Στον καρκίνο, η διάσπαση των κυτταρικών μηχανισμών που κανονικά καταστέλλουν την δραστηριότητα των TE μπορεί να διευκολύνουν τη μεταλλαξογόνο ρετρομεταφορά.⁵²

Ενώ τα περισσότερα TE είναι ανενεργά, τα μικρότερα σε ηλικία TE αντιπροσωπεύουν μεγάλο μέρος της διακύμανσης της δομής σε επιμέρους γονιδιώματα. Η

δραστηριότητα των TE σε σωματικούς ιστούς καταστέλλεται κανονικά μέσω επιγενετικών και μετα-μεταγραφικών μηχανισμών, αλλά μερικά μπορούν να αποφύγουν την καταστολή και να δημιουργήσουν νέες πολυμορφικές εισαγωγές κατά την προσωρινή απελευθέρωση αυτών των μηχανισμών καταστολής.⁵²



Πίνα 1: Αντίγραφα των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο γονιδίωμα, M.Giannouli⁵³

Τα μεγάλου μήκους διασκορπισμένα πυρηνικά στοιχεία (LINEs) και τα μικρού μήκους διασκορπισμένα πυρηνικά στοιχεία (SINEs) συνεισφέρουν σε μεγάλο βαθμό στη δυναμική, την πλαστικότητα και την ακεραιότητα του ανθρώπινου γονιδιώματος. Τα LINE-1s είναι τα μόνα προς το παρόν ενεργά αυτόνομα κινητά στοιχεία DNA σε ανθρώπους και υπολογίζεται ότι υπάρχουν τουλάχιστον 100 πιθανά κινητά αντίγραφα σε κάθε διπλοειδές γονιδίωμα. Μέσα στον εξελικτικό χρόνο τα στοιχεία αυτά έχουν εξαπλωθεί μαζικά στο γονιδίωμα σε βαθμό που πλέον εντοπίζονται περίπου 500.000 αντίγραφα, τα οποία καταλαμβάνουν περίπου το 17% του ανθρώπινου DNA. Ωστόσο μόνο περίπου 100 αντίγραφα δεν έχουν απενεργοποιηθεί από κάποια μετάλλαξη ή δεν έχουν αποκοπεί από το γονιδίωμα. Στα στοιχεία Alu αποτελούν ρετρομεταθετά στοιχεία SINEs με περίπου ένα εκατομμύριο αντίγραφα στο γονιδίωμα. Σε αυτά απουσιάζει μια κωδική αλληλουχία και βασίζονται σε ένα ενεργοποιημένο LINE-1 ρετρομεταθετό στοιχείο ούτως ώστε να μπορέσουν να κινηθούν στο γονιδίωμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα LINE-1 μεσολαβούν σε μεγάλο βαθμό στην μετάθεση των στοιχείων Alu. Τα στοιχεία LINE-1 πραγματοποιούν την ρετρομετάθεση βάσει ενός μηχανισμού «αντιγραφής– επικόλλησης» που εμπλέκεται μια DNA ενδονουκλεάση του LINE-1, ούτως ώστε να σχηματιστεί μια θηλιά στο DNA–στόχος στην πλευρά της. Γεγονότα ανασυνδυασμού και προσθήκης από τα ενεργά στοιχεία LINE-1 και Alu θεωρείται ότι συμβάλλουν σε ένα σημαντικό ποσοστό των γενετικών ασθενειών και καρκίνου του ανθρώπου. Μέχρι σήμερα υπάρχουν ενδείξεις ότι 124 LINE-1 στοιχεία μεσολαβούν σε προσθήκες που αφορούν ανθρώπινες γενετικές ασθένειες. Επιπλέον κάποιες προσθήκες LINE-1 στοιχείων που οδηγούν σε αναστολή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Κατά συνέπεια υποθέτουμε

ότι τα ρετρομεταθετά στοιχεία συμβάλλουν στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη του καρκίνου.⁵⁴

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1

Περίπου το ήμισυ του ανθρώπινου γονιδιώματος αποτελείται από ρετρομεταθετά στοιχεία με ή χωρίς LTRs (τερματικές αλληλουχίες μεγάλου μήκους). Ανάμεσα σε αυτά, το LINE1 (L1) είναι ένα μοναδικό ρετρομεταθετό μη-LT, επειδή μερικά από αυτά είναι ακόμα ικανά να μετατεθούν/μεταφερθούν στο ανθρώπινο γονιδίωμα.

Τα μεγάλοι μήκους διασκορπισμένα πυρηνικά στοιχεία (LINEs) αποτελούν το 17% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Επί του παρόντος υπάρχουν 80-100 ανθρώπινα L1 στοιχεία που θεωρείται ότι είναι ενεργά στο διπλοειδές ανθρώπινο γονιδίωμα. Αποτελούν έναν από τους νεότερους τύπους μεταθετών στοιχείων και εμφανίζουν προσθήκες σε όλο το μήκος των χρωμοσωμάτων. Τα L1 είναι πολύ αποτελεσματικά στο να προσδένονται στο ανθρώπινο γονιδίωμα (περίπου 100.000 αντίγραφα είναι εγκαθιδρυμένα και αποτελούν το 5% του πυρηνικού DNA).⁵⁵ Αυτά τα στοιχεία μπορούν να μετατεθούν σε νέες περιοχές του γονιδιώματος, με αποτέλεσμα να υπάρχουν αλλαγές στη γενετική πληροφορία. Έτσι, τα ενεργά L1, θεωρείται ότι είναι ένα ενδογενές μεταλλαξογόνο, και οι εισαγωγές τους μπορεί να προκαλέσουν ασθένειες. Μεταλλαξογόνοι παράγοντες όπως η ακτινοβολία γ, το οξειδωτικό στρες και η επεξεργασία με συγκεκριμένους παράγοντες, μπορεί να προκαλέσει την έκφραση ή/και την κινητικότητα των ρετρομεταθετών στοιχείων.⁵⁶

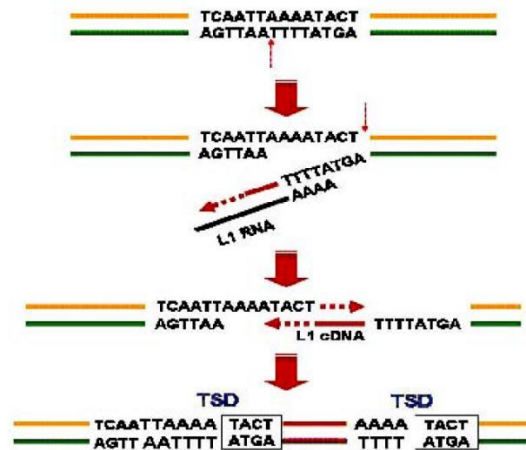
Σύμφωνα με παλαιότερες έρευνες (1996), τα L1 δεν εμφανίζουν ειδικότητα αλληλουχία και δεν υπήρχαν στοιχεία για την ύπαρξη δράσης ενδονουκλεάσης που να συνδέεται με τα L1.⁵⁵

Σε νεότερες έρευνες έχει αποδειχθεί, ότι τα L1 περιέχουν μία 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (UTR), δύο ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) που κωδικοποιούν δύο πρωτεΐνες, τα ORF1p και ORF2p, και μία 3' UTR με ένα σήμα πολυαδενυλίωσης. Το ORF1p είναι μία πρωτεΐνη δέσμησης RNA με δραστικότητα συνοδού νουκλεϊκού οξέος, η οποία είναι απαραίτητη για την ρετρομετάθεση του L1. Το ORF2p έχει δράση ενδονουκλεάσης και αντίστροφης μεταγραφάσης (εικόνα 9).



Εικόνα 9: Δομή του ανθρώπινου στοιχείου L1. EN (περιοχή ενδονουκλεάσης), RT (περιοχή αντίστροφης μεταγραφάσης), C putative zinc finger-like domain^{55 57}

Το L1 μεταγράφει αντίστροφα και ενσωματώνεται σε περιοχές του νέου γονιδιώματος με target-primed reverse transcription (TPRT), όπως φαίνεται και στην εικόνα 10. Κατά τη διάρκεια του TPRT, το L1 δημιουργεί ένα εκμαγείο στο DNA, το οποίο χρησιμεύει ως εκκινήτης για αντίστροφη μεταγραφή, χρησιμοποιώντας την δραστικότητα ενδονουκλεάσης του ORF2p. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως οι χημικές ουσίες, το οξειδωτικό στρες και η μόλυνση, μπορούν να επηρεάσουν τη ρετρομετάθεση του L1. Για παράδειγμα, μόλυνση με ιό ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1) ενισχύει την ρετρομετάθεση του L1 και αυξάνει την ποσότητα του DNA του L1. Οι πρωτεΐνες HIV-1 Vpr και Vif παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση της ρετρομετάθεσης του L1. Επομένως, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι το HBV μπορεί να ενεργοποιήσει την ρετρομετάθεση του L1.



Εικόνα 10: Μηχανισμός αντίστροφης μεταγραφής (TPRT).⁵⁸

Η ενεργή ρετρομετάθεση του L1 μπορεί να ενισχύσει τις διαδικασίες ογκογένεσης με διάφορους τρόπους. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δεδομένου ότι το L1 προκαλεί μεταλλάξεις προσθήκης, οποιαδήποτε πιθανή διάσπαση ογκοκατασταλτικών γονιδίων με την ρετρομεταφορά του L1 θα μπορούσε να συμβάλει στην ανάπτυξη όγκων. Οι προσθήκες de novo του L1 μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των γονιδίων στα οποία έχουν εισαχθεί και των γειτονικών γονιδίων. Εάν η προσθήκη/ένθεση του L1 πραγματοποιηθεί κοντά σε ογκογονίδιο ή σε ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το εισαγόμενο L1 μπορεί να αυξήσει την έκφραση του ογκογονιδίου ή να μειώσει την έκφραση του ογκοκατασταλτικού αντίστοιχα, υποστηρίζοντας έτσι την ανάπτυξη του όγκου. Είναι, επιπλέον, δυνατό να προκληθεί γονιδιωματική αστάθεια από τις θραύσεις/ κομμάτια του DNA που παράγονται από το ORF2p κατά τη διάρκεια του TPRT, αλλά και από τις θέσεις προτίμησης του L1 για ρετρομετάθεση.⁵⁴

Οι *de novo* προσθήκες του L1 κατηγοριοποιούνται σε δύο τύπους, αυτές της βλαστικής γραμμής (germline) και τις σωματικές (σωματικών κυττάρων). Οι ενθέσεις του L1 στη γενετική αλληλουχία με ρετρομεταφορά σε κύτταρα βλαστικής σειράς, συμβάλλουν σε όλους τους ιστούς του ατόμου.⁵⁴

Οι θέσεις εισαγωγής των L1 στα σωματικά και στα βλαστοκύτταρα διαφέρουν ως προς τη γονιδιωματική τους κατανομή και τα επιγενετικά χαρακτηριστικά τους. Οι εισαγωγές των L1 στα βλαστοκύτταρα είναι σημαντικά μειωμένες (από τα γονίδια), πιθανώς λόγω της ισχυρής αρνητικής επιλογής που δρα σε τέτοια γεγονότα. Οι εισαγωγές των L1 στα σωματικά κύτταρα δεν παρουσιάζουν τόσο αξιοσημείωτη μείωση, αλλά παρόλα αυτά υποκινούνται από μεταγραφικώς ενεργές περιοχές (housekeeping genes και περιοχές ευχρωματίνης). Η μεθυλίωση του DNA καταστέλλει τόσο την έκφραση όσο και την ενσωμάτωση του TE RNA, και η γενικευμένη διάσπαση της μεθυλίωσης του DNA στο γονιδίωμα έχει ταυτοποιηθεί σε καρκίνους.⁵²

Πλήθος επιπτώσεων στην μεταγραφή των γονιδίων οφείλονται σε ρυθμιστικά στοιχεία L1 και σε μεταγραφικές αλληλουχίες (κοντά ή εντός αυτών). Καθώς ο υποκινητής του L1 δεν είναι αρκετά ισχυρός και το σήμα πολυαδενυλίωσης είναι σχετικά αδύναμο επιτρέπεται η ανάγνωση σε έναν ικανοποιητικό βαθμό. Οπότε οι ενεργοί υποκινητές των L1 όταν βρεθούν σε προσανατολισμό 5' σε ένα γονίδιο μπορεί να υπερισχύσουν έναντι των φυσιολογικών μεταγραφικών ελέγχων του γονιδίου. Αρά καταλαβαίνουμε ότι είναι πιθανό να δημιουργηθούν εναλλακτικά μεταγραφικά τμήματα 5', τα οποία δεν είναι επεξεργασμένα. Πράγματι, πολλά ρυθμιστικά στοιχεία ανθρώπινων γονιδίων προέρχονται από αλληλουχίες L1 ή HERV.

Εναλλακτικά μεταγραφήματα μπορούν επίσης να δημιουργηθούν με τη χρήση θέσεων πολυαδενυλίωσης ενδογενών αλληλουχιών L1. Ωστόσο, παρόλο που γνωρίζουμε ότι τα σήματα είναι πολύ ασθενή, δεν έχει εξακριβωθεί ακόμα ποιος μηχανισμός εξασφαλίζει την αποσιώπησή των αλληλουχιών αυτών σε φυσιολογικές συνθήκες μέσα σε μια μεταγραφική μονάδα. Συνεπώς, είναι διφορούμενο να εκτιμηθεί ο τρόπος με τον οποίο η τροποποιημένη μεθυλίωση και η δομή της χρωματίνης στα καρκινικά κύτταρα θα είχαν ως αποτέλεσμα την αναγνώρισή τους.

Υπάρχουν πολλοί πιθανοί μηχανισμοί δράσης των στοιχείων L1 κατά την μεταγραφή. Ο πρώτος είναι παρόμοιος με εκείνον των μεταγραφημάτων που περιέχουν αλληλουχίες Alu στην κωδική αλυσίδα.

Πρόσφατη ανακάλυψη ενός υποκινητή μη κωδικής αλυσίδας κοντά στο 5' άκρο των ακέραιων L1 αλληλουχιών, δείχνει ότι όταν είναι ενεργός θα μπορούσε να προκαλέσει διάφορες επιπτώσεις σε κυτταρικά γονίδια, ανάλογα με τον προσανατολισμό του. Στην περίπτωση που βρίσκονται σε κατεύθυνση κωδικής, τα μετάγραφα μη κωδικής αλυσίδας μπορεί να οδηγήσουν σε μείωση της φυσιολογικής λειτουργίας (downregulation), ενώ στην αντίθετη περίπτωση, μπορεί να οδηγήσουν σε υπερέκφραση των φυσιολογικών μεταγράφων ή στην εμφάνιση νέων

μεταγράφων. Συνεπώς, η απομεθυλίωση των αλληλουχιών L1 σε καρκινικά κύτταρα μπορεί όχι μόνο να ενεργοποιήσει τους υποκινητές της κωδικής αλυσίδας (canonical sense), αλλά και τους υποκινητές της μη κωδικής αλυσίδας τους.

Επιπλέον, οι παράγοντες γονιδιοτοξικότητας ((βενζο [α] πυρένιο, καμπθοθεικίνη, κυτοχλαζίνη D, μερβαρόνη και βινβλαστίνη), αγωνιστές PPARα (bezafibrate και fenofibrate) και μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (diflunisal, flufenamic acid, σαλικυλαμίδιο και σουλινδάκ) μπορούν να προκαλέσουν την ενεργοποίηση των L1.⁵⁶

Γενικότερα, η επανενεργοποίηση των LINE1 σε καρκινικά κύτταρα εγκυμονεί πολλούς κινδύνους. Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι άμεσες δυσμενείς επιπτώσεις της ρетроμεταφοράς, η ενίσχυση του μη φυσιολογικού ανασυνδυασμού και η πιθανή παρεμπόδιση της μεταγραφικής δραστηριότητας και της γονιδιακής ρύθμισης. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, λιγότερα από 100 στοιχεία L1 θεωρούνται ότι μπορούν να εκδηλώσουν τις αρνητικές επιπτώσεις της ρетроμεταφοράς, καθώς αυτά παραμένουν ακέραια. Ωστόσο, άλλες δυσμενείς συνέπειες μπορούν να ασκηθούν από ένα μεγαλύτερο αριθμό στοιχείων. Επιπροσθέτως, η επανενεργοποίηση επηρεάζει την καθολική και τοπική οργάνωση του γονιδιώματος και την προστασία των ρυθμιστικών γονιδιακών αλληλουχιών.⁵³

Η μεθυλίωση DNA είναι ένας επιγενετικός μηχανισμός που είναι ικανός να καταστάλλει την γονιδιακή έκφραση, που αρχικά μπορεί να έχει εξελιχθεί ως ο κύριος αμυντικός μηχανισμός έναντι της «παρασιτικής» μετάθεσης γενετικών στοιχείων για την προστασία της λειτουργικής ακεραιότητας του γονιδιώματος. Πράγματι πάνω από το 90% όλων των CpGs τα οποία παρουσιάζουν μια διαφορετική μεθυλίωση βρίσκονται σε περιοχές πλούσιες σε CpGs των μεταθετών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, συμπεριλαμβανόμενου των LINE-1 και Alu στοιχείων. Η μεθυλίωση των υποκινητών των LINE-1 οδηγεί σε αποσιώπησή της έκφρασης των LINE-1 σε διαφοροποιημένα κύτταρα και απουσία της μεθυλίωσης του DNA είναι επιτρεπτή η μετάθεση των LINE-1.

Η υπομεθυλίωση των LINE-1 είναι κοινή σε περιπτώσεις καρκίνου, μια σχετιζόμενη με την ηλικία ασθένεια που χαρακτηρίζεται από συσσώρευση μεταλλάξεων και επιγενετικών αλλαγών.

Μια γενική μείωση της μεθυλοκυτοσίνης σχετίζεται με την ηλικία, που δεν μπορεί να εξηγηθεί από την μεθυλίωση ενός μόνο αντίγραφου γονιδίου, καθώς αυτό αφορά το λιγότερο από το 5% του ανθρώπινου DNA. Επιπλέον, συμπεραίνεται ότι μια γενική απώλεια της 5- μεθυλοκυτοσίνης με τη πάροδο του χρόνου μπορεί να οδηγήσει σε αποκαταστολή της αποσιώπησης των LINE-1 και σε γονιδιακή σταθερότητα.⁵⁹

Σε έρευνες έχει αποδειχθεί, ότι τα επίπεδα της υπομεθυλίωσης των LINE-1 στο λέμφωμα, το καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων και το θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς δεν διέφεραν σημαντικά από τους φυσιολογικούς τους ιστούς.⁶⁰

1.2.1.1.2 Νησίδες CpG

Έχουν περάσει περίπου 30 με 40 χρόνια από τότε που υποδείχτηκε ότι η μεθυλίωση της κυτοσίνης στο DNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς μπορεί να δράσει ως μια σταθερή και κληρονομική τροποποίηση που επηρεάζει τη γονιδιακή ρύθμιση και την κυτταρική διαφοροποίηση.⁵¹

Οι νησίδες CpG είναι τμήματα DNA περίπου 1000 ζευγών βάσεων έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα CpG από το υπόλοιπο γονιδίωμα αλλά συχνά δεν είναι μεθυλιωμένες. Η πλειοψηφία των υποκινητών των γονιδίων, σχεδόν το 70%, βρίσκεται ανάμεσα σε CpG νησίδες. Συγκεκριμένα, οι υποκινητές σημαντικών γονιδίων (housekeeping genes) συχνά ενσωματώνονται σε νησίδες CpG. Οι νησίδες CpG, είναι συντηρημένες περιοχές μεταξύ του ποντικού και του ανθρώπου, ειδικά αυτές που σχετίζονται με υποκινητές. Η θέση και το γεγονός ότι οι νησίδες CpG είναι συντηρημένες καθ' όλη την εξελικτική πορεία υποδηλώνει ότι αυτές οι περιοχές έχουν μια λειτουργική σημασία. Παρόλα αυτά οι νησίδες CpG που σχετίζονται με γονιδιακούς υποκινητές σπάνια μεθυλιώνονται.

Φαίνεται ότι οι νησίδες CpG έχουν διατηρηθεί εξελικτικά για να προάγουν τη γονιδιακή έκφραση ρυθμίζοντας τη δομή της χρωματίνης και τη δέσμευση του παράγοντα μεταγραφής. Γνωρίζουμε ότι το DNA τυλίγεται γύρω από ιστόνες σχηματίζοντας νουκλεοσώματα. Το νουκλεόσωμα εντοπίζεται σε δύο μορφές, μία αρκετά συσπειρωμένη (ετεροχρωματίνη) και μία λιγότερο- ανοιχτή δομή (ευχρωματίνη)-, οι οποίες καθορίζουν την έκφραση του γονιδίου. Πιο συγκεκριμένα, η δομή της ευχρωματίνης είναι αυτή που επάγει την έκφραση. Οι νησίδες CpG γενικότερα περιέχουν λιγότερα νουκλεοσώματα σε σχέση με άλλες περιοχές του DNA. Τα νουκλεοσώματα αυτά περιέχουν τροποποιημένες ιστόνες που ενισχύουν τη γονιδιακή έκφραση. Παρόλο που περίπου το 50% των νησίδων CpG περιέχουν γνωστές θέσεις έναρξης μεταγραφής, συχνά στερούνται κοινών υποκινητών, όπως τα στοιχεία TATA. Καθώς πολλές θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα είναι πλούσιες σε GC, οι νησίδες CpG είναι πιθανό να ενισχύσουν τη πρόσδεση σε θέσεις μεταγραφής. Παρά την έλλειψη κοινών υποκινητών, οι νησίδες CpG ενισχύουν την προσβασιμότητα του DNA και προάγουν τη δέσμευση μεταγραφικών παραγόντων.

Οι περισσότερες νησίδες CpG έχουν βρεθεί σε περιοχές υποκινητών στα μισά σχεδόν γονίδια στο γονιδίωμα θηλαστικών, και γενικά δεν είναι μεθυλιωμένες στα φυσιολογικά κύτταρα.⁵⁰

Είναι ευρέως γνωστό ότι αν και οι περισσότερες θέσεις CpG έχουν χαθεί από τα γονιδιώματα των θηλαστικών κατά το πρίσμα της εξέλιξης, ακόμα μικρές περιοχές CpG αποτελούν το 1% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Οι περισσότερες από τις υπολειπόμενες θέσεις CpG είναι φυσιολογικά μεθυλιωμένες στα ενήλικα κύτταρα. Το γεγονός ότι περίπου το ήμισυ όλων των γονιδίων έχουν CpG νησίδες στη θέση του υποκινητή τους, προσέκλυσε το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών. Οι περισσότερες νησίδες CpG στους υποκινητές είναι φυσιολογικά μη μεθυλιωμένες, ανεξάρτητα από

την κατάσταση έκφρασης του κάθε γονιδίου. Ωστόσο, σε περιοχές που δεν εκφράζονται, όπως το ανενεργό X-χρωμόσωμα στις γυναίκες, οι CpG νησίδες που σχετίζονται/εντοπίζονται στον υποκινητή, είναι μεθυλιωμένες και αυτή η μεθυλίωση σχετίζεται με τη διατήρηση της κατάστασης που δεν εκφράζεται το γονίδιο.

Η μεθυλίωση προκαλεί τη σύνδεση συγκεκριμένων πρωτεϊνών πρόσδεσης, ειδικές για μεθυλιωμένο DNA σε θέσεις CpG, προσελκύοντας ένζυμα τροποποίησης ιστόνης τα οποία, με τη σειρά τους, καθιερώνουν μια κατάσταση χρωματινής που δεν είναι δυνατό να εκφραστεί.

Η *de novo* μεθυλίωση των νησίδων CpG εντοπίζεται στα πρωταρχικά στάδια της καρκινογένεσης και μπορεί ακόμα να ανιχνευθεί στα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα των ασθενών. Η παραπάνω διαδικασία σχετίζεται με το γήρας και τη φλεγμονή.⁵⁰

Η μεθυλίωση των νησίδων CpG οδηγεί σε σταθερή αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης. Κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης και της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης, οι νησίδες CpG υποβάλλονται σε διαφοροποιημένη μεθυλίωση. Η ικανότητα της μεθυλίωσης να ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση μέσω των νησίδων CpG είναι ιδιαίτερα σημαντική για την διατήρηση ενός σταθερού μεταγραφικού προφίλ. Πέρα από τα παραπάνω γονίδια, η μεθυλίωση των νησίδων CpG ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση στα στάδια της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης. Καθώς οι νησίδες CpG συνδέονται με τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, θα αναμενόταν ότι θα μπορούσαν να εμφανίσουν διαφορετικό προφίλ ανά ιστό. Παρόλο που σε πολλές περιοχές πράγματι υπάρχει συγκεκριμένο ιστολογικό προφίλ, οι νησίδες που συνδέονται με τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής, σπάνια εμφανίζουν κάποιο πρότυπο μεθυλίωσης, ειδικά ανά ιστό (ιστοειδικό).

Νεοπλαστικά κύτταρα

Η μη φυσιολογική μεθυλίωση δεν περιορίζεται σε μερικά γονίδια ή σε περιοχές του υποκινητή, αλλά έχει βρεθεί και σε διάφορες άλλες θέσεις στο γονιδίωμα σε πολλές περιπτώσεις νεοπλασίων, συμπεριλαμβανομένης της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας.

Τα πρότυπα μεθυλίωσης υποδεικνύουν ότι οι εξονικές CpG είναι πιο επιρρεπείς στη μεθυλίωση *de novo* από τις νησίδες CpG του υποκινητή και ότι η μεθυλίωση μπορεί να ξεκινήσει σε εξονικές περιοχές και στην συνέχεια να εξαπλωθεί σε άλλες νησίδες.

Η τροποποίηση των μοτίβων μεθυλίωσης είναι ένα σύνηθες συμβάν στην ανθρώπινη νεοπλασία. Αυτές οι αλλαγές συμβαίνουν σε συγκεκριμένες περιοχές του DNA, τις νησίδες CpG, που εμφανίζουν την αναμενόμενη κατανομή των δινουκλεοτιδίων CpG σε σχέση με το υπόλοιπο γονιδίωμα που έχει εξαντλήσει τις CpG. Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή των νησίδων CpG σε σημαντικά γονίδια για τον έλεγχο του κυτταρικού

κύκλου συμβαίνει συχνά στην καρκινογένεση και έχει συσχετιστεί με μειωμένη έκφραση αυτών των γονιδίων. Έτσι, η μεθυλίωση δινοκλεοτιδίων CpG στους υποκινητές ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχει εμπλακεί ως μια οδός κατά την οποία τα γονίδια αυτά μπορούν να αποσιώπηση τους συμβάλλοντας στην απώλεια ελέγχου πολλαπλασιασμού σε μετασχηματισμένα κύτταρα. Απενεργοποίηση κυττάρων λόγω της μεθυλίωσης όπως αυτά της οικογένειας αναστολέων εξαρτώμενων από κυκλίνη κινάσης (p15INK4B και p16INK4A), έχει αποδειχθεί σε μια ποικιλία καρκίνων, όπως σε λευχαιμίες και λεμφώματα.

Η υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG που δεν αφορούν γνωστούς υποκινητές δεν έχει μελετηθεί αρκετά. Δεν εντοπίζονται όλες οι νησίδες CpG σε υποκινητές και έχει αποδειχθεί ότι η υπερμεθυλίωση των εξονικών CpG νησίδων μπορεί να συμβεί χωρίς ταυτόχρονη μεθυλίωση του υποκινητή ή αδρανοποίηση του ίδιου του γονιδίου.

Σε μελέτη μεθυλίωσης εξονικών περιοχών με νησίδες CpG, και νησίδων CpG των υποκινητών, παρατηρήθηκε υπερμεθυλίωση των εξονικών περιοχών στις μυελογενείς νεοπλασίες και ότι η μεθυλίωση των νησίδων ήταν πολύ πιο περιορισμένη και εμφάνιζε εξειδίκευση στον τύπο του καρκίνου.

Τα δεδομένα δείχνουν επίσης ότι τα μεταγενέστερα στάδια της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (ΧΜΛ) συνδέονται με υψηλότερα ποσοστά ασθενών που εμφανίζουν μεθυλίωση σε πολλαπλές νησίδες CpG καθώς και αύξηση του απόλυτου αριθμού μεθυλωμένων νησίδων σε όλους τους ασθενείς (όπου δεν υπάρχουν δεδομένα ότι οφείλονται σε διαφορές ηλικίας μεταξύ των δειγμάτων ασθενών). Επιπλέον, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική τάση μεταξύ των επιπέδων μεθυλίωσης των ΜΔΣ και ΟΜΛ. Εντούτοις, τα προφίλ εξονικής μεθυλίωσης των ασθενών με ΧΜΛ ήταν σημαντικά διαφορετικά από εκείνα των ασθενών με ΜΔΣ και ΟΜΛ, βασισμένα σε ζεύγη δοκιμών που συγκρίνουν τους μέσους όρους μεθυλίωσης των τριών εξονικών CpG νησίδων. Ενώ όλοι οι τύποι καρκίνου που αναλύθηκαν παρουσιάζουν υπερμεθυλίωση και των τριών εξονικών CpG νησίδων, το προφίλ μεθυλίωσης του υποκινητή αποδείχθηκε πολύ πιο ειδικό μεταξύ των διαφόρων νεοπλασιών.⁶¹

Μέχρι και σήμερα δεν έχουμε κατανοήσει πλήρως τον ρόλο των νησίδων CpG στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Γενικότερα η μεθυλίωση των νησίδων μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων, στη προσέλκυση κατασταλτικών πρωτεϊνών που δεσμεύουν μεθυλομάδες και σε σταθερή καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Αξίζει να αναφερθεί ότι δεν γνωρίζουμε ακόμα με ακρίβεια το απαιτούμενο ποσοστό της μεθυλίωσης των νησίδων CpG που επηρεάζει την γονιδιακή έκφραση.

2 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας ήταν η κατά προσέγγιση εκτίμηση της μεθυλίωσης του γονιδιώματος μέσω ανάλυσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, τα οποία απαντώνται διάσπαρτα στο γονιδίωμα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική post Real-time PCR HRMA, ακολουθούμενη από πυροαλληλούχιση για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, σε δείγματα DNA από περιφερικό αίμα ή/και μυελό των οστών από ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Αντιδραστήρια

- Χημικά - Βιολογικά αντιδραστήρια

Όνομα	Εταιρία	Αριθμός καταλόγου
Μπλε της βρωμοφαινόλης	Panreac-Applichem	A2331,0025
Water for injection	Fresenius Kabi	K584231
Απόλυτη αιθανόλη	VWR International GmbH	20821
2-Προπανόλη	PanReac AppliChem	CR131090
Κιτ απομόνωσης DNA FlexiGene blood genomic	Qiagen	51206
Qiaquick gel extraction	Qiagen	28706
100mM (4x25μmol) dNTP Set, PCR Grade	Invitrogen (Thermo-Fischer Sci.)	10297-018
Ένζυμο Thermo Platinum Taq DNA Πολυμεράση	Qiagen	
Αγαρόζη για Μοριακή χρήση	Merck (Sigma-Aldrich)	A9539-500GR
UltraClean® Χαμηλής τήξης αγαρόζη	Mo-Bio	15005-100
LightCycler 480 High Resolution Melting Master (2x concentrated)	Roche	04909631001
Βορικό οξύ	Merck (Sigma-Aldrich)	B6768
EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)	PanReac AppliChem	A1104
TRI-Reagent	Molecular Research Center, Inc. (MRC)	TR118
100 bp DNA ladder (0.1 to 1.5 kb)	Invitrogen (Thermo-Fischer Sci.)	15628-019
Βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/mL)	Invitrogen (Thermo-Fischer Sci.)	15585-011
Φορμαμίδιο	Sigma-Aldrich	4311320
ABIPrism BigDye Terminator v1.1	Applied Biosystems	4337450

- Συσσκευές και όργανα

Ονομασία συσκευής – οργάνου	Εταιρία	Λειτουργία
<i>LightCycler® 480</i>	Roche	<i>HRM Real-time PCR</i>
<i>Programmable Thermal Controller PTC-200</i>	MJ Research Inc	<i>PCR , Gradient PCR</i>
<i>EC1000-90</i>	Thermo electron corporation	<i>Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης</i>
<i>Grant sub</i>	Grant	<i>Υδατόλουτρο</i>
<i>Easycast Mini Electrophoresis Systems</i>	Owl Seperation Systems	<i>Δοχείο ηλεκτροφόρησης</i>
<i>Eppendorf centrifuge 5804</i>	Fischer Scientific	<i>Φυγόκεντρος falcon</i>
<i>Biofuge pico Heraeus</i>	Fischer Scientific	<i>Φυγόκεντρος eppendorf</i>
<i>Eppendorf concetrator 5301</i>	Sigma-Aldrich	<i>Όργανο εξάτμισης υπό κενό</i>
ABI3100 SDS	Applied Biosystems	Sanger Sequencing

3.2. Κλινικό Υλικό

Σε πρώτο στάδιο απομονώθηκε DNA από περιφερικό αίμα ή/και μυελό των οστών από 60 ασθενείς, οι οποίοι στη συνέχεια χαρακτηρίστηκαν με βάσει τα κριτήρια του WHO 2016 για τα ΜΔΣ/ΜΥΝ. Σύμφωνα με το μοριακό τους προφίλ, επιλέχθηκαν 15 ασθενείς, εκ των οποίων:

- 6 με ΧΜΜΛ
- 7 με ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ
- 2 με αταξινόμητα ΜΔΣ/ΜΥΝ

(οι ασθενείς που επιλέχθηκαν βρίσκονταν σε στάδιο πρωτοδιάγνωσης και όχι σε στάδιο θεραπείας)

- Φυσιολογικά δείγματα αναφοράς

Για τον προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των LINE-1, για τις αναλύσεις του πρότυπου της καμπύλης τήξης, χρησιμοποιήθηκαν 6 δείγματα DNA ατόμων χωρίς αιματολογικές διαταραχές, χωρίς άλλο υποκείμενο νόσημα ή θεραπεία και φυσιολογικό γονότυπο όσον αφορά τα υπό μελέτη γονίδια.

- Παθολογικά δείγματα αναφοράς

Ως παθολογικοί μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα DNA από άτομα με αιματολογικές διαταραχές, στους εκάστοτε υπό μελέτη γονιδιακού στόχους, οι οποίοι έχουν ταξινομηθεί κατά την πειραματική διαδικασία.

3.2.1. Προέλευση Δειγμάτων Ασθενών

Οι ασθενείς που μελετήθηκαν προέρχονται από την Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Λαϊκό Νοσοκομείο, την Α΄ Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Λαϊκό Νοσοκομείο, τη Θεραπευτική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα», την Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, την Αιματολογική Κλινική του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου, την Αιματολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ευρωκλινική», και την Αιματολογική Κλινική του Νοσοκομείου «Γ. Γεννηματάς»,

Έγγραφη συγκατάθεση κατόπιν ενημέρωσης από τον θεράποντα ιατρό ζητήθηκε και ελήφθη από όλους τους ασθενείς που μελετήθηκαν.

Η διαχείριση των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι.

3.3. Βασικές αρχές τεχνικών

3.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (**PCR**) είναι μια κλασική μεθοδολογία για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA. Κατά την PCR το ένζυμο DNA-πολυμεράση οδηγεί σε σύνθεση νέων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών χρησιμοποιώντας ως δεοξυριβονουκλεοτιδικά υποστρώματα. Η DNA-πολυμεράση προσθέτει νουκλεοτίδια στο 3' άκρο ενός τεχνητού ολιγονουκλεοτιδίου, το οποίο προσδένεται στο υπόστρωμα. Εφόσον το συνθετικό ολιγονουκλετίδιο είναι συνδεδεμένο σε ένα μονόκλωνο εκμαγείο που περιέχει μια περιοχή συμπληρωματική προς το ολιγονουκλετίδιο, η DNA-πολυμεράση μπορεί να χρησιμοποιήσει το ολιγονουκλετίδιο αυτό ως εκκινητή (primer) και να επιμηκύνει το 3' άκρο του παράγοντας μια εκτεταμένη περιοχή δίκλωνου DNA.

Συντίθενται δύο συνθετικά, μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια, το ένα συμπληρωματικό προς το 5' άκρο της μία αλυσίδας του προς ενίσχυση DNA και το άλλο συμπληρωματικό προς το 5' άκρο της άλλης αλυσίδας. Το προς ενίσχυση DNA, στη συνέχεια αποδιάτασσεται και τα ολιγονουκλεοτίδια συνδέονται στις αντίστοιχες αλληλουχίες-στόχους. Στο χρονικό αυτό σημείο, προστίθενται στην αντίδραση DNA-πολυμεράση και δεοξυνουκλεοτιδικά υποστρώματα και το ένζυμο επεκτείνει και τους δύο εκκινητές. Αυτή η αντίδραση παράγει δίκλωνο DNA στην περιοχή που ενδιαφέρει και στις δύο αλυσίδες του DNA. Συνεπώς, σε αυτόν, τον πρώτο κύκλο της PCR, παράγονται δύο δίκλιωνα αντίτυπα του αρχικού τμήματος DNA.

Στη συνέχεια, το DNA υποβάλλεται σε δεύτερο κύκλο αποδιάταξης και σύνθεσης DNA χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές (στην πραγματικότητα μόνο η αλληλουχία μεταξύ των εκκινητών ενισχύεται με ακρίβεια). Αυτή η διαδικασία παράγει τέσσερα αντίτυπα του τμήματος που μας ενδιαφέρει. Επιπρόσθετοι, επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποδιάταξης και σύνθεσης DNA εξαρτώμενης από εκκινητή ενισχύουν την περιοχή μεταξύ των εκκινητών με γεωμετρική πρόοδο. Ένα τμήμα DNA που υπήρχε αρχικά σε ίχνη ποσότητας ενισχύεται με την PCR σε μεγάλες ποσότητες δίκλωνου DNA.

Γενικά, η απόδοση της αντίδρασης εξαρτάται από πολλές παραμέτρους όπως καθαρότητα και υψηλή ποιότητα των αντιδραστηρίων και της μήτρας-DNA, σχετική ποσότητα των ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών και της μήτρας-DNA, συγκέντρωση $MgCl_2$, αποφυγή δημιουργίας διμερών μεταξύ των ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών, αλλά και σωστή επιλογή χρόνου και θερμοκρασίας στα βήματα κάθε κύκλου της PCR. Για κάθε νέο ζευγάρι εκκινητών και μήτρας-DNA απαιτείται εκ νέου έλεγχος όλων των

παραμέτρων προκειμένου να βρεθούν οι ιδανικές συνθήκες για τη μέγιστη απόδοση της αντίδρασης.

Συστατικά και συνθήκες της αντίδρασης:

DNA-μήτρα: οποιοδήποτε DNA (ολικό χρωμοσωμικό, μιτοχονδριακό, βακτηριακό, πλασμιδιακό) από οποιοδήποτε ιστό ή οργανισμό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μήτρα. Βασική προϋπόθεση να είναι όσο το δυνατόν πιο ακέραιο και καθαρό (απαλλαγμένο από προσμίξεις που μπορεί να αναστείλουν τη δράση του ενζύμου όπως απορρυπαντικά, EDTA, ίχνη φαινόλης). Η ποσότητα που χρησιμοποιείται εξαρτάται από την πολυπλοκότητα του DNA (δηλαδή το βαθμό αντιπροσώπευσης της αλληλουχίας στόχου στο συνολικό) και από το είδος της αντίδρασης (συμβατική ή ποσοτική PCR). Η ποσότητα του DNA προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm ($1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ mg/ml}$) και η καθαρότητά του ελέγχεται από το λόγο $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ που πρέπει να κυμαίνεται από 1.8-2.0). Επίσης, ως μήτρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί cDNA (DNA που έχει προκύψει με αντίστροφη μεταγραφή του mRNA) αν θέλουμε να μελετήσουμε την έκφραση γονιδίων.

Ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές: για κάθε αντίδραση σχεδιάζονται δύο ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές, μήκους 18-30 βάσεων. Οι εκκινητές πρέπει να βρίσκονται σε συμπληρωματικές αλυσίδες στα άκρα της περιοχής DNA που θέλουμε να απομονώσουμε και με κατεύθυνση προς το εσωτερικό της. Κατά το σχεδιασμό κάθε ζεύγους πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε οι εκκινητές να έχουν παραπλήσιο σημείο τήξης και αλληλουχία που να μην επιτρέπει τη δημιουργία δομών και τη συμπληρωματικότητα μεταξύ τους. Το σημείο τήξης (T_m) του κάθε εκκινητή προσδιορίζεται από τον εμπειρικό τύπο $T_m = 4x(G+C) + 2x(A+T)$, όπου G, C, A και T ο αριθμός των αντίστοιχων νουκλεοτιδίων που περιέχονται στον εκκινητή, και έχει σημασία για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας αναδιάταξης της αντίδρασης.

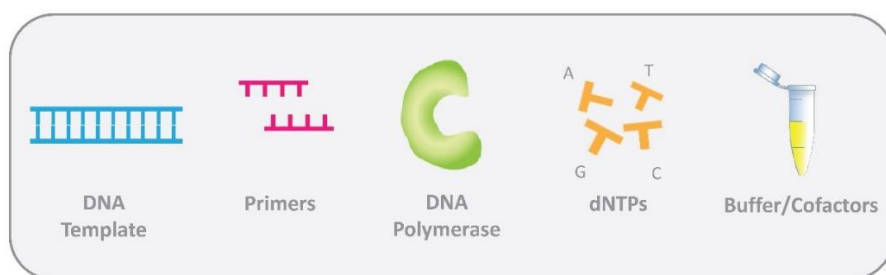
Δεοξυριβονουκλεοτίδια: Χρησιμοποιείται μίγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) σε τελική συγκέντρωση 200 μM το καθένα.

Συγκέντρωση MgCl_2 : η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} επηρεάζει την ειδικότητα και απόδοση της αντίδρασης και είναι διαφορετική για κάθε συνδυασμό μήτρας-DNA και εκκινητών. Το Mg^{2+} βοηθά την αναδιάταξη των εκκινητών με τις αλυσίδες της μήτρας DNA και σταθεροποιεί την πρόσδεση της DNA-πολυμεράσης στο σύμπλοκο της αντιγραφής. Χαμηλή συγκέντρωση Mg^{2+} αυξάνει την ειδικότητα (αυστηρό κριτήριο) αλλά μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια του προϊόντος, λόγω αποτυχίας αναδιάταξης των εκκινητών με τη μήτρα, ενώ υψηλή συγκέντρωση Mg^{2+} αυξάνει την απόδοση

αλλά μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή μη επιθυμητών προϊόντων, λόγω μη ειδικής αναδιάταξης (χαμηλό κριτήριο). Συνήθως χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις 0,5-5 mM, αλλά η άριστη συγκέντρωση προσδιορίζεται ξεχωριστά για κάθε περίπτωση με δοκιμαστικές αντιδράσεις.

DNA-πολυμεράση: Κατά κανόνα χρησιμοποιείται το ένζυμο Taq DNA polymerase, που παρέχεται από διάφορες εταιρίες, σε τελική συγκέντρωση 0.5-5 units ανά αντίδραση. Η θερμοκρασία δράσης του ενζύμου είναι 72°C.

Ρυθμιστικό διάλυμα: Ανάλογα με το είδος της πολυμεράσης, από την εταιρία παραγωγής του ενζύμου, παρέχεται και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα σε συγκέντρωση δεκαπλάσια (10X) της απαιτούμενης για την αντίδραση. Η συνήθης σύσταση του 10X διαλύματος είναι 100 mM Tris-HCl pH 9 (25°C), 500 mM KCl και 1% μη ιονικό απορρυπαντικό Triton X-100.

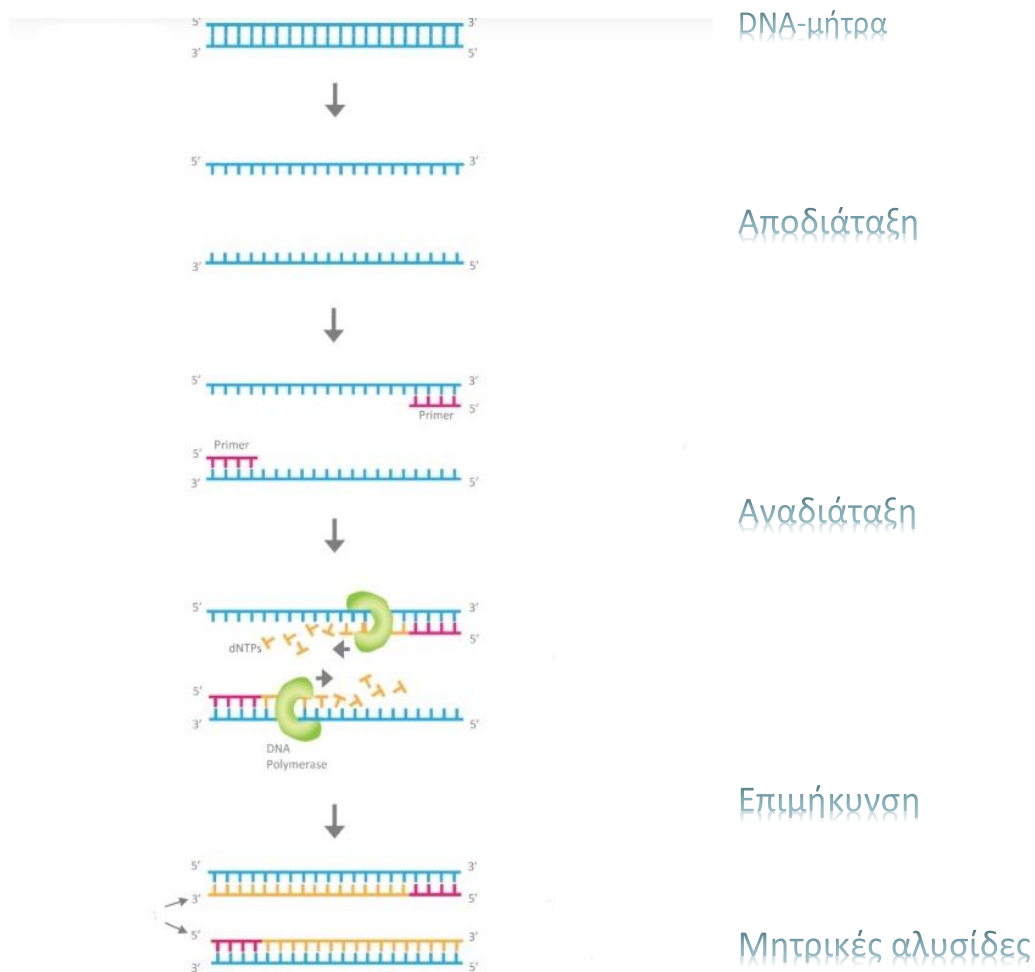


Εικόνα 15: Στοιχεία της αντίδρασης PCR

<https://www.goldbio.com/goldbios-pcr-overview>

Κύκλοι της αντίδρασης: κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει (α) αποδιάταξη στους 94-96°C για 1 λεπτό, (β) αναδιάταξη σε θερμοκρασία λίγο χαμηλότερη του T_m των εκκινητών (κατά 2-6 °C) για 30-60 sec, (γ) επιμήκυνση στους 72 °C για 30-90 sec, ανάλογα με το μήκος της αλληλουχίας που πολλαπλασιάζεται. Κάθε κύκλος επαναλαμβάνεται 20-40 φορές ανάλογα με την ποσότητα του DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Πριν από την έναρξη των κύκλων γίνεται αποδιάταξη στους 94-96 °C για 5 λεπτά, ενώ, στο τέλος γίνεται επιμήκυνση στους 72 °C για 5 min.

Τα παραπάνω συστατικά αναμιγνύονται σε σωλήνα τύπου erpendorf του 0,5 ml και τα δείγματα τοποθετούνται στη συσκευή PCR. Μετά το τέλος των αντιδράσεων τα προϊόντα ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.⁶²



Εικόνα 16: Τα στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Τροποποίηση από <https://www.goldbio.com/goldbios-pcr-overview>

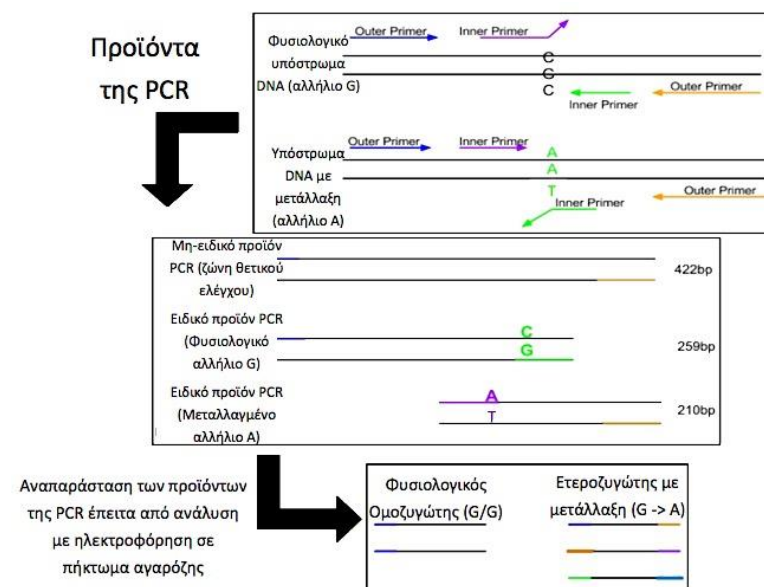
3.3.2. Σύστημα Ανίχνευσης Μεταλλάξεων Ανθεκτικών στην Ενίσχυση (Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction, ARMS-PCR)

Η μέθοδος αναφέρεται ως σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση (Amplification Refractory Mutation System, ARMS-PCR) και εμπλέκει δύο ζεύγη εκκινητών. Οι δύο εξωτερικοί μη-ειδικοί εκκινητές (outer primers) ενισχύουν μία ευρύτερη ζώνη θετικού ελέγχου, ενώ οι δύο εσωτερικοί αλληλοειδικοί εκκινητές (inner primers), οι οποίοι καταλήγουν στο ίδιο υπό διερεύνηση νουκλεοτίδιο, χρησιμεύουν υπό περιπτώσεις όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

Η τεχνική βασίζεται στη διαπίστωση ότι η ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων με PCR έχει μικρή απόδοση ή και αποτυγχάνει πλήρως εάν υπάρχει ασυμφωνία ζευγαρώματος ανάμεσα στο 3' τελικό νουκλεοτίδιο του εκκινητή και της αντίστοιχης μήτρας.

Ως εκ τούτου, η επιλογή ενός εσωτερικού φυσιολογικού εκκινητή, ο οποίος είναι συμπληρωματικός με το φυσιολογικό αλληλόμορφο, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζει ασυμφωνία βάσεως στο 3' άκρο του, με το αντίστοιχο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, θα οδηγήσει σε επιλεκτική ενίσχυση του πρώτου, σε συνδυασμό πάντα με τον αντιπαράλληλο εξωτερικό μη-ειδικό εκκινητή. Ομοίως, ο μεταλλαγμένος εσωτερικός εκκινητής θα ενισχύσει μόνο το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, με το οποίο παρουσιάζει συμπληρωματικότητα στο 3' άκρο του, σε συνδυασμό με τον αντιπαράλληλο εξωτερικό μη-ειδικό εκκινητή.

Η τοποθέτηση των εξωτερικών μη-ειδικών εκκινητών σε διαφορετική απόσταση από το προς διερεύνηση νουκλεοτίδιο επιτρέπει τον ευδιάκριτο διαχωρισμό των συντιθέμενων προϊόντων κατά την ανάδειξη αυτών σε πηκτή αγαρόζης, καθότι διαφέρουν σε μέγεθος (Hu et al. 2012, Landsverk and Wong 2013).



Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση ARMS-PCR (με χρήση διπλού ζεύγους εκκινητών) (<http://35.9.122.10/inquiriesS2013/FOP/figure.jpg>)

3.3.3. Αλληλοειδική PCR (Allele Specific Polymerase Chain Reaction, AS-PCR)

Πρόκειται για παραλλαγή της ARMS-PCR, η οποία βασίζεται στο σχεδιασμό ενός μόνο εσωτερικού εκκινητή, του οποίου το 3' άκρο, είναι πλήρως συμπληρωματικό με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (specific allele), φέρει όμως δυσαρμονία ενός νουκλεοτιδίου σε σχέση με το φυσιολογικό (non-specific allele). Ο εσωτερικός εκκινητής συνθέτει προϊόν σε συνδυασμό με τον αντιπαράλληλό του, εξωτερικό μη-ειδικό εκκινητή, μόνον στην περίπτωση όπου υπάρχει μετάλλαξη.

Παράλληλα οι δύο εξωτερικοί εκκινητές είναι υπεύθυνοι για την ενίσχυση μίας ζώνης θετικού ελέγχου. Η αντίδραση ελέγχου πραγματοποιείται προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η έλλειψη προϊόντος από την εκάστοτε αντίδραση, οφείλεται στην απουσία μετάλλαξης και όχι σε αποτυχία διεξαγωγής της αντίδρασης πολυμεράσης



Εικόνα 18: Βασική αρχή της μεθόδου AS-PCR. Αριστερά: Απουσία μετάλλαξης συντίθενται μόνο ένα προϊόν που αφορά στη ζώνη θετικού ελέγχου. Δεξιά: Όταν υπάρχει μετάλλαξη, τότε αναδεικνύονται δύο προϊόντα κατά την ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης σε πηκτή αγαρόζης, η ζώνη θετικού ελέγχου, καθώς και ένα μικρότερο προϊόν, ειδικό του πολυμορφισμού.

3.3.4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real-Time PCR)

Μια παραλλαγή της κλασικής PCR είναι η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real-time PCR). Σε αυτή την τεχνική το προϊόν της PCR καταγράφεται καθ' όλη τη διάρκεια των κύκλων της αντίδρασης. Αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση μιας κάμερας, η οποία προσμετρά και ποσοτικοποιεί τη φθορίζουσα ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος που εκπέμπεται από το μείγμα κατά την αντίδραση. Για τον φθορισμό χρησιμοποιούνται διάφορα αντιδραστήρια που

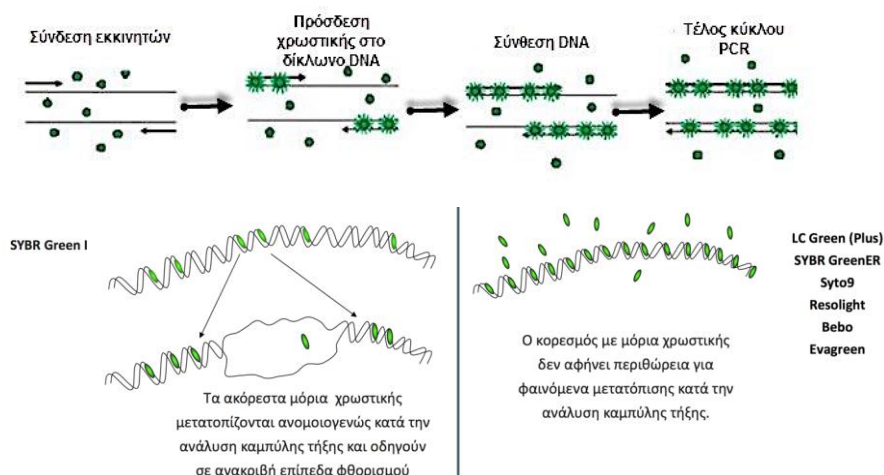
προστίθενται στο μείγμα της PCR. Αυτά μπορεί να είναι είτε φθορίζουσες χρωστικές, είτε σημασμένα με φθορίζοντα μόρια ολιγονουκλεοτίδια-ιχνηθέτες (probes). Η σύνθεση του υπόλοιπου μείγματος είναι παρόμοια με αυτή της κλασικής PCR.⁶³

Οι φθορίζουσες χρωστικές ουσίες είναι μη-ειδικές και έχουν την ικανότητα να προσδένονται κατά μήκος του δίκλωνου DNA (dsDNA) με υψηλή συγγένεια. Διέγερσή τους από το κατάλληλο μήκος κύματος έχει ως αποτέλεσμα τον φθορισμό τους, με ένταση πολλές φορές ισχυρότερη από ότι αν είχαν προσδεθεί σε μονόκλωνο DNA, σε RNA ή αν ήταν ελεύθερες στο διάλυμα. Το κύριο μειονέκτημα των χρωστικών αυτών είναι, πως συνδέονται και σε μη ειδικά προϊόντα, όταν η ειδικότητα της αντίδρασης είναι μειωμένη, με αποτέλεσμα να πρέπει να γίνει διάκριση του ειδικού και του μη ειδικού σήματος κατά την ανάλυση. Με κατάλληλο σχεδιασμό εκκινητών, προκύπτει ένα μοναδικό προϊόν από την αντίδραση PCR, έτσι το μειονέκτημα αυτό παρακάμπτεται.⁶⁴

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου είναι μια ευαίσθητη, ακριβής και γρήγορη τεχνική που δίνει την δυνατότητα σχετικής και απόλυτης ποσοτικοποίησης, ποιοτικής ανάλυσης και χαρακτηρισμού των αλληλομόρφων, σε επιθυμητά τμήματα DNA ενός δείγματος.⁶³

3.3.4.1. Φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται μη-ειδικά στο υπόστρωμα

Υπάρχουν δύο ειδών φθορίζουσες χρωστικές. Οι πρώτες αφορούν σε μη-ειδικά μόρια που κυκλοφορούν ελεύθερα στο διάλυμα της αντίδρασης και προσδένονται με υψηλή συγγένεια σε όλο το μήκος των δίκλωνων τμημάτων DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση PCR, όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί. Τότε φθορίζουν με ένταση πολλές φορές ισχυρότερη, απ' ότι όταν βρίσκονται ελεύθερες στο διάλυμα, με αποτέλεσμα να γίνονται ανιχνεύσιμες από την κάμερα της συσκευής.



Εικόνα 19: PCR πραγματικού χρόνου με μη-ειδικά φθοριοχρώματα. Οι μη-ειδικές φθορίζουσες χρωστικές προσδένονται κατά τρόπο ανεξάρτητο της αλληλουχίας του προϊόντος που επεκτείνεται κατά τη Real Time PCR (Τροποποίηση από van der Velden et al. 2003).

Το βασικό μειονέκτημα αυτών, είναι πως συνδέονται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο, ακόμη και σε ανεπιθύμητα μη-ειδικά προϊόντα και διμερή εκκινητών, που ενδέχεται να προκύψουν κατά τη διαδικασία της ενίσχυσης. Το σήμα που εκπέμπουν αυτά, συνυπολογίζεται σε εκείνο που παρέχεται από τα υπο διερεύνηση, ειδικά προϊόντα της αντίδρασης, οδηγώντας σε ψευδή αποτελέσματα.

Ωστόσο, με κατάλληλο σχεδιασμό εκκινητών και βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης, το μειονέκτημα αυτό μπορεί να καμφθεί, αφού έτσι ουσιαστικά προκύπτει αποκλειστικά το επιθυμητό προϊόν ενίσχυσης της αντίδρασης.

Προκειμένου να εκτιμηθεί ο σχηματισμός μη-ειδικών προϊόντων, μετά το πέρας της αντίδρασης, μπορεί να ακολουθήσει επιπρόσθετη ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων της Real Time PCR (post-Real Time PCR melting curve analysis), αφού δυνητικά μπορεί να αποτελέσει ξεχωριστή μεθοδολογία, με δική της παραμετροποίηση, που σήμερα χρησιμοποιείται ως τεχνική ταχείας ανίχνευσης νουκλεοτιδικών αλλαγών.

3.3.4.2. Φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται ειδικά επί συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής ακολουθίας του υποστρώματος

Η δεύτερη κατηγορία φθορίζουσων χρωστικών αποτελείται από τεχνητά ολιγονουκλεοτίδια με συγκεκριμένη αλληλουχία, τα οποία είναι ειδικά για το υπόστρωμα και αναφέρονται ως ιχνηθέτες (probes). Αυτά τα μόρια είναι σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες, ενώ έχουν παρόμοιες λειτουργικές ιδιότητες με τα μη-ειδικά φθοριοχρώματα.

Οι ιχνηθέτες της αντίδρασης δεν συμμετέχουν λειτουργικά στη διαδικασία της επέκτασης των προϊόντων, αφού ο ρόλος τους περιορίζεται στην παρακολούθηση αυτής. Η αλληλουχία του εκάστοτε ιχνηθέτη, είναι κατάλληλα σχεδιασμένη για να προσδένεται συμπληρωματικά, με μία νουκλεοτιδική ακολουθία, οπουδήποτε εντός της περιοχής που επεκτείνεται κατά την PCR.

Τα δύο πιο διαδεδομένα ειδικά φθοριοχρώματα, αφορούν στους ιχνηθέτες υδρόλυσης και στους ιχνηθέτες υβριδοποίησης.

1) Οι ιχνηθέτες υδρόλυσης είναι διπλά σημασμένοι, αφού στο ένα άκρο της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας, φέρουν ένα φθορίζον μόριο-δότη (reporter fluorochrome, π.χ. FAM, VIC, JOE), ενώ στο άλλο άκρο, ένα μόριο-δέκτη (quencher fluorochrome, π.χ. TAMRA) που απορροφά την ακτινοβολία που εκπέμπει το πρώτο (Εικόνα κάτω Α).

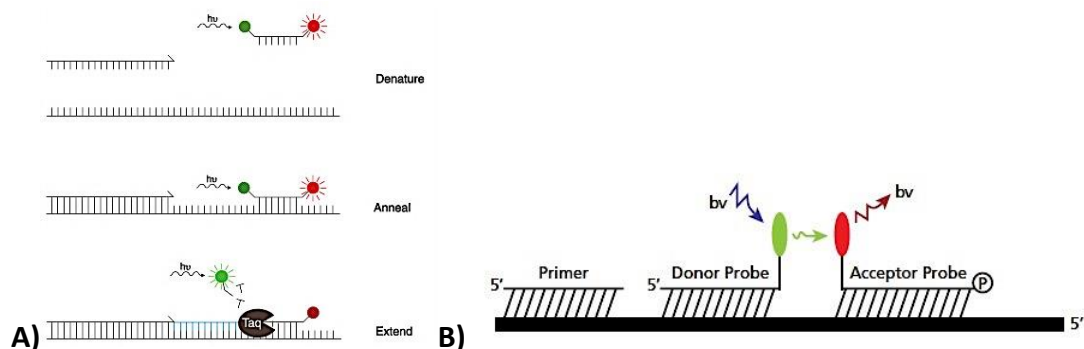
Όταν ο ιχνηθέτης είναι άθικτος και σε ελεύθερη κατάσταση στο διάλυμα τότε τα μόρια δότης και δέκτης είναι πλησίον. Ο συνδυασμός αυτός οδηγεί σε αποσιώπηση του εκπεμπόμενου σήματος.

Εφόσον ο ιχνηθέτης προσδεθεί στην συμπληρωματική του αλληλουχία εντός της περιοχής ενίσχυσης, τότε κατά το στάδιο της επέκτασης του προϊόντος της αντίδρασης, αυτός κατακερματίζεται από την πολυμεράση, μέσω της δράσης 5'-3' εξωνουκλεάσης που διαθέτει η τελευταία. Σε αυτή την περίπτωση τα μόρια δότης και δέκτης απομακρύνονται μεταξύ τους, έτσι το πρώτο κυκλοφορεί ελεύθερο στο διάλυμα και παράγει φθορίζουσα σήμανση που γίνεται αντιληπτή από τη συσκευή.

2) Οι ιχνηθέτες υβριδοποίησης προστίθενται σε ζευγάρια ανά αντίδραση. Σε αυτή τη διάταξη ο φθορισμός επιτυγχάνεται κατόπιν πρόσδεσης και των δύο μορίων, σε παραπλήσια σημεία επί του νουκλεϊκού οξέος που ενισχύεται με PCR (Εικόνα κάτω Β).

Ο ένας ιχνηθέτης εκπέμπει φθορισμό συγκεκριμένου μήκους κύματος ώστε διεγείρει το ζευγάρι του, το οποίο εκπέμπει ακτινοβολία διαφορετικού μήκους κύματος, η οποία γίνεται αντιληπτή και προσμετράται από την κάμερα της συσκευής. Η διαδικασία αυτή αναφέρεται ως αρχή συντονισμένης μεταφοράς της ενέργειας φθορισμού (fluorescence resonance energy transfer, FRET).

Η διάταξη αυτή παρέχει ένα σημαντικό πλεονέκτημα, συγκριτικά με τους ιχνηθέτες υδρόλυσης, αφού η μη αποικοδόμηση των ολιγονουκλεοτιδίων που μεταφέρουν τα φθοριοχρώματα, καθιστά εφικτή την επιπρόσθετη ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων της PCR πραγματικού χρόνου, μετά το πέρας της αντίδρασης

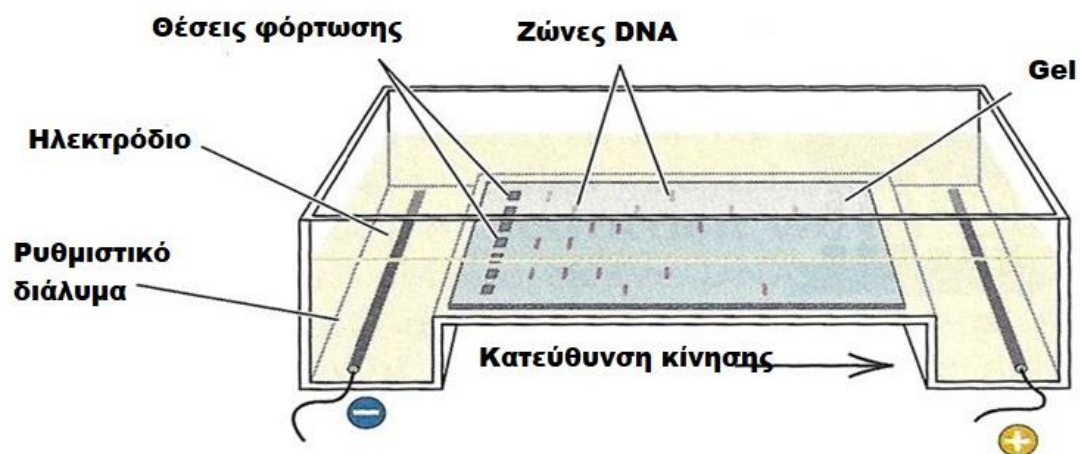


Εικόνα 20: PCR πραγματικού χρόνου με ειδικά φθοριοχρώματα. (Α) ιχνηθέτες υδρόλυσης και (Β) ιχνηθέτες υβριδοποίησης (Sigma-Aldrich 2008).

3.3.5. Ανάδειξη των προϊόντων της PCR

3.3.5.1. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Όταν εκτίθενται σε ηλεκτρικό πεδίο μέσω μιας μήτρας πηκτώματος, ενός αδρανούς, πορώδους υλικού παρόμοιου με ζελέ, τα γραμμικά μόρια DNA διαχωρίζονται κατά το μέγεθός τους. Όταν υποβάλλεται σε ηλεκτρικό πεδίο με τον τρόπο αυτό, το DNA, το οποίο φέρει αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο, μετακινείται μέσω του πηκτώματος προς τον θετικό πόλο (άνοδος). Τα μόρια DNA είναι ευέλικτα και καταλαμβάνουν έναν ζωτικό όγκο. Η μήτρα του πηκτώματος λειτουργεί ως ηθμός μέσω του οποίου διέρχονται τα μόρια DNA: τα μεγαλύτερα μόρια (με μεγαλύτερο ζωτικό όγκο) είναι δυσκολότερο να διέλθουν από τους πόρους του πηκτώματος και, επομένως, μετακινούνται βραδύτερα από τα μικρότερα μόρια DNA. Αυτό σημαίνει ότι, αφού τα πηκτώματα ηλεκτροφορηθούν ή αφεθούν να “τρέξουν” για ορισμένο χρόνο, τα διαφορετικού μεγέθους μόρια διαχωρίζονται γιατί έχουν μετακινηθεί μέσω του πηκτώματος σε διαφορετικές αποστάσεις.



Εικόνα 21: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Τροποποίηση από <https://microbiologyonlinenotes.com/agarose-gel-electrophoresis/>

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους:

1. Το μέγεθος του DNA.

Γραμμικά δίκλινα DNA κινούνται με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του log του Μοριακού Βάρους.

2. Τη συγκέντρωση της αγαρόζης.

Η κινητικότητα ενός κομματιού DNA διαφέρει σε πηκτώματα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA

% αγαρόζης στο πήκτωμα	Καλός διαχωρισμός γραμμικών DNA (kb)
0.3	60-5
0.6	20-1
0.7	10-0.8
0.8	7-0.5
0.9	6-0.4
1.2	4-0.2
2.0	3-0.1

3. Τη στερεοδιάταξη του DNA.

Τα κυκλικά μόρια DNA υφίσταται συνήθως σε 3 μορφές: κλειστή κυκλική υπερελικωμένη (μορφή I), η ανοιχτή κυκλική (μορφή II) και γραμμική (μορφή III). Παρόλο που και οι τρεις έχουν το ίδιο μοριακό βάρος η κινητικότητά τους διαφέρει. Οι σχετικές κινητικότητες των τριών μορφών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα, αλλά επηρεάζονται επίσης από την ένταση του ρεύματος, την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και το βαθμό υπερελίκωσης της μορφής I του DNA. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, η μορφή I κινείται γρηγορότερα από τη μορφή III. Κάτω από άλλες συνθήκες συμβαίνει το αντίστροφο. Μια μέθοδος αναγνώρισης των διαφορετικών στερεοδιατάξεων του DNA είναι να κάνουμε την ηλεκτροφόρηση παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων βρωμιούχου αιθιδίου. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου, περισσότερη χρωστική δεσμεύεται στο DNA. Έτσι, αφαιρούνται προοδευτικά οι αρνητικές στροφές υπερέλικας της μορφής I και μειώνεται η κινητικότητά της. Στο κρίσιμο σημείο συγκέντρωσης ελεύθερου βρωμιούχου αιθιδίου, όταν δηλαδή δεν υπάρχουν πλέον στροφές υπερέλικας, η μορφή I αποκτά την ελάχιστη κινητικότητά της. Αν αυξήσουμε ακόμα περισσότερο τη συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου, δημιουργούνται θετικές στροφές υπερέλικας και η κινητικότητα της μορφής I αυξάνεται γρήγορα. Συγχρόνως, οι κινητικότητες των μορφών II & III μειώνονται με διαφορετικό ρυθμό η κάθε μια, πράγμα που είναι αποτέλεσμα της εξουδετέρωσης των φορτίων και της μεγαλύτερης “δυσκαμψίας” που αποκτά το DNA από τη δράση του βρωμιούχου αιθιδίου. Για τα περισσότερα δείγματα της μορφής I, η κρίσιμη συγκέντρωση ελεύθερου βρωμιούχου αιθιδίου είναι από 0.1 ως 0.5 $\mu\text{g/ml}$.

4. Την ένταση του ρεύματος.

Σε χαμηλή τάση (volts), που σημαίνει μικρό ρεύμα, η κινητικότητα γραμμικών κομματιών DNA είναι ανάλογη με τα volts που χρησιμοποιούνται. Όμως, αν αυξήσουμε την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (αύξηση των volts), η κινητικότητα κομματιών DNA μεγάλου μοριακού βάρους αυξάνεται με διαφορετικό συντελεστή για κάθε κομμάτι DNA. Για το λόγο αυτό, μειώνεται η αξιοπιστία και η διαχωριστική ικανότητα των πηκτωμάτων αгарόζης καθώς αυξάνονται τα volts που χρησιμοποιούνται. Πηκτώματα αгарόζης που ηλεκτροφορούνται εντελώς βυθισμένα στο ρυθμιστικό διάλυμα είναι φυσικό να ανέχονται πολύ περισσότερο ρεύμα από αντίστοιχα που ηλεκτροφορούνται χωρίς να είναι βυθισμένα. Στα τελευταία, η εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου επιτυγχάνεται με γέφυρες διηθητικού χαρτιού που ενώνουν την κάθε άκρη του πηκτώματος με τα αντίστοιχα δοχεία ηλεκτροδίων ανόδου και καθόδου κι επομένως το ρεύμα διέρχεται αποκλειστικά από το πήκτωμα. Σε αυτή την περίπτωση και για πάχος πηκτώματος 56 mm εφαρμόζεται τάση περίπου 5 V/cm μήκους πηκτώματος.

5. Ρυθμιστικά διαλύματα

Χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν Tris-Βορικό οξύ-EDTA ή Tris-οξικό οξύ-EDTA ή Tris-φωσφορικό οξύ-EDTA, σε συγκέντρωση 50-100 mM και pH περίπου 8.0. Συνήθως τα παρασκευάζουμε σε πενταπλάσια (5X) ή δεκαπλάσια (10X) συγκέντρωση και τα διατηρούμε σε θερμοκρασία δωματίου. Η ρυθμιστική ικανότητα του Tris-οξικού-EDTA είναι μάλλον χαμηλή και γι' αυτό είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται το Tris-φωσφορικό-EDTA ή το Tris-βορικό-EDTA (TBE) που δίνουν εξίσου καλό διαχωρισμό κι έχουν υψηλή ρυθμιστική ικανότητα. Στην άσκηση θα χρησιμοποιηθεί TBE (100 mM Tris, 85 mM βορικό οξύ, 1 mM EDTA).

3.3.6. Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων μέσω πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing)

Η πυροαλληλούχιση περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1998 και έχει καθιερωθεί εδώ και αρκετό καιρό ως μια αξιόπιστη μέθοδος, για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής ακολουθίας, αλλά και για την ποσοτική ανάλυση της μεθυλίωσης του γονιδιώματος. Για τη μελέτη της μεθυλίωσης προηγείται κατεργασία του γονιδιώματος με δισουλφίδιο του νατρίου.

Προετοιμασία της αντίδρασης

Αρχικά, πραγματοποιείται ενίσχυση με PCR με τη χρήση ενός εκκινητή που φέρει ένα μόριο βιοτίνης στο 5' άκρο του. Έτσι, οι κλώνοι της αντίδρασης που προέρχονται από τον παραπάνω εκκινητή θα είναι σημασμένες με βιοτίνη.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιούνται μαγνητικά σφαιρίδια για την απομόνωση του επισημασμένου προϊόντος της PCR. Μέσω του βιοτυνιλιωμένου άκρου της σημασμένης αλυσίδας, το οποίο συνδέεται με μόρια στρεπταβιδίνης (επαλείφουν τα σφαιρίδια), το δίκλωνο προϊόν προσκολλάται στα μαγνητικά σφαιρίδια.

Με εφαρμογή μαγνητικού πεδίου, τα σφαιρίδια συγκεντρώνονται σε ειδικές κυψέλες, όπου αποδιατάσσονται χημικά, σε μονόκλωνες αλυσίδες.

Ακολουθεί έκπλυση κατά την οποία η μη-βιοτυνιλιωμένη αλυσίδα απομακρύνεται, αφού δεν μπορεί να συνδεθεί με τη στρεπταβιδίνη των σφαιριδίων. Ο χειρισμός αυτός εξασφαλίζει την απόλυτη καθαρότητα του υλικού (Harrington et al. 2013).

Κυρίως αντίδραση

Ένας εκκινητής, με καθορισμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία, προσδέεται συμπληρωματικά στην αλυσίδα που είναι σημασμένη με βιοτίνη.

Έπειτα στην αντίδραση προστίθενται τα ένζυμα DNA πολυμεράση, ATP θειουυλάση (ATP sulfurylase), λουσιφεράση και απυράση, καθώς επίσης και τα υποστρώματα 5'-φωσφοθειϊκής αδενοσίνης (adenosine 5' phosphosulfate, APS) και λουσιφερίνη.

Η DNA πολυμεράση καταλύει την ενσωμάτωση των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), ξεκινώντας από το ελεύθερο 3' άκρο του εκκινητή, με συγκεκριμένη σειρά, με βάση των κλώνο-εκμαγείο.

Σε περίπτωση που το dNTP που προστίθεται δεν είναι συμπληρωματικό προς το νουκλεοτίδιο της αλληλουχίας, τότε το ένζυμο απυράση το αποικοδομεί.

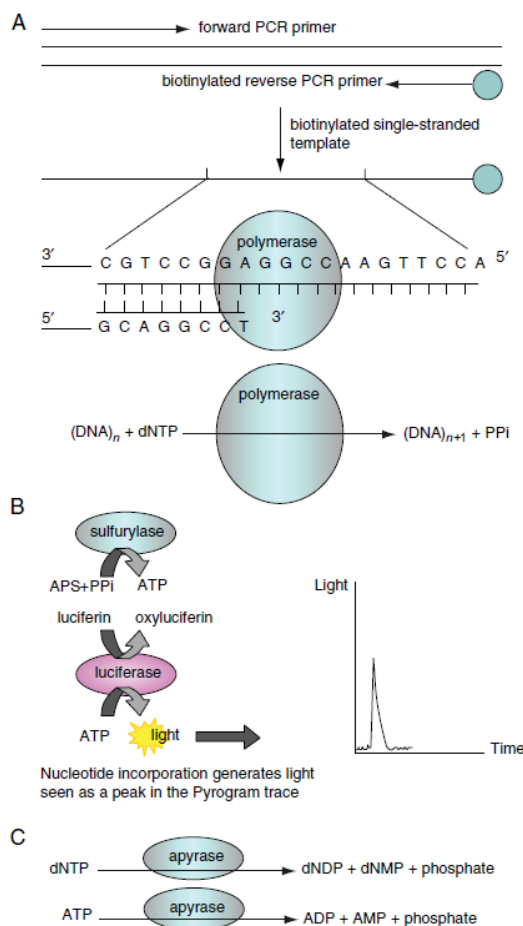
Αντίθετα, όταν υπάρχει συμπληρωματικότητα και πραγματοποιείται ενσωμάτωση, αυτή συνοδεύεται από απελευθέρωση ανόργανου πυροφωσφορικού οξέος (PPi), σε ποσότητα ίση με την ποσότητα ενσωματωμένου νουκλεοτιδίου, και ένα πρωτόνιο (Nyren, 1987).

Το PPi μετατρέπεται σε τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate, ATP), από την ATP θειουυλάση (ATP sulfurylase), παρουσία 5'-φωσφοθειϊκής αδενοσίνης (adenosine 5' phosphosulfate, APS).

Το ATP δρα ως υπόστρωμα για τη μετρατροπή της λουσιφερίνης (luciferin), προς οξυλουσιφερίνη (oxyluciferin), από το ένζυμο λουσιφεράση (luciferase). Ταυτόχρονα, με την ενζυμική αυτή μετατροπή, απελευθερώνεται ορατό φως, σε ποσότητες που είναι ανάλογες με την ποσότητα του ATP.

Το ATP και τα dNTPs που δεν ενσωματώθηκαν στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, αποικοδομούνται από το ένζυμο απυράση για να ξεκινήσει ένας νέος γύρος διαδοχικής προσθήκης καθενός από τα τέσσερα διαφορετικά dNTPs, προκειμένου να ανιχνευθεί εκείνο που είναι συμπληρωματικό με το επόμενο στη σειρά νουκλεοτίδιο της αλυσίδας-μήτρας (Harrington et al. 2013).

Το φως που παράγεται στην αντίδραση που καταλύεται με λουσιφεράση ανιχνεύεται από μια κάμερα συσκευής συζευγμένου φορτίου (CCD) και καταγράφεται ως κορυφή στο πυρογράμμα εξόδου πρώτων δεδομένων. Το ύψος κάθε κορυφής αντιστοιχεί στο σήμα φωτός και είναι ανάλογο με τον αριθμό των ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων. Έτσι, όταν για παράδειγμα, στην αλυσίδα-μήτρα υπάρχουν κατά σειρά, δύο ή τρία όμοια νουκλεοτίδια, τότε προστίθενται ισόποσα συμπληρωματικά dNTPs, ενώ παράλληλα, η φωτεινή ακτινοβολία που εκλύεται είναι δύο ή τρεις φορές πιο ισχυρή, αντίστοιχα.



Εικόνα 22: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου pyrosequencing. (A) Μία μονόκλωνη αλυσίδα DNA με σήμανση βιοτίνης χρησιμεύει ως εκμαγείο για την αντίδραση. (B) Καθώς τα νουκλεοτίδια ενσωματώνονται στον κλώνο του DNA, απελευθερώνεται το πυροφωσφορικό και μετατρέπεται σε ATP. Το παραγόμενο ATP οδηγεί στην αντίδραση φωτός που εμφανίζεται ως κορυφή σε ένα πυρογράφημα. (C) Η απυράση αποικοδομεί τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια πριν την προσθήκη του επόμενου νουκλεοτιδίου.⁶⁵

Η μέθοδος ανάλυσης Pyrosequencing, είναι κατάλληλη για de novo αλληλούχιση, καθιστώντας την πολύτιμη για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων από την αλληλούχιση του Sanger.

Χρησιμοποιείται επίσης για την ανάλυση των πολυμορφισμών των single nucleotides (SNPs), καθώς και για την ποσοτικοποίηση διαφορετικών αλληλόμορφων. Η υψηλή ευαισθησία και η ακρίβεια της ανίχνευσης σήματος στην μέθοδο, επιτρέπει στους ερευνητές να προσδιορίσουν την κατανομή των διαφορετικών νουκλεοτιδίων σε μεταβλητές θέσεις και να εκφράσουν αυτή την ποσοτικοποίηση.

Δεδομένου ότι το επίπεδο κατανομής μερικών μεταλλάξεων μπορεί να συνδεθεί με ορισμένες ασθένειες, η χρήση του pyrosequencing έχει αυξηθεί στην έρευνα για τον καρκίνο. Παρομοίως, χρησιμοποιήθηκε το pyrosequencing για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό διαφορετικών γονότυπων για άλλους σκοπούς, συμπεριλαμβανομένης της αντοχής στα φάρμακα, της συχνότητας επεξεργασίας του RNA, της ανίχνευσης των μοτίβων συρραφής, της ταξινόμησης, της ανάλυσης της βιοποικιλότητας και ακόμη και της αρχαιολογίας.

Το Pyrosequencing έχει επίσης γίνει μια δημοφιλής μέθοδος για την ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA. Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για ανάλυση της μεθυλίωσής τους, συχνά περιέχουν ένα μείγμα γενωμικού DNA από διαφορετικούς τύπους κυττάρων, έτσι ώστε οι αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης να μην είναι αισθητές σε μεγάλο βαθμό.

Ανάλογα με την φύση της ανάλυσης, το Pyrosequencing μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της κατάστασης μεθυλίωσης μεμονωμένων ή πολλαπλών θέσεων CpG, οι οποίες δυνητικά ρυθμίζουν τα γονίδια που μας ενδιαφέρουν, ή για την ανάλυση του ολικού επιπέδου μεθυλίωσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα.

Για την ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA, είναι απαραίτητη η πλήρης μετατροπή με δισουλφίδιο όλων των μη μεθυλιωμένων κιτοσίνων σε κατάλοιπα ουρακίλης, για την ορθή ερμηνεία των δεδομένων του Pyrosequencing.

3.4. Μεθοδολογία

3.4.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

Η απομόνωση γενωμικού DNA μεγάλου μοριακού βάρους, από εμπύρηννα κύτταρα, περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών πραγματοποιήθηκε απευθείας από δείγματα ολικού περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών με τη βοήθεια του FlexiGene blood genomic kit, από την εταιρεία Qiagen, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθεί.

Αντιδραστήρια

- ✚ ddH₂O για λύση των κυττάρων
- ✚ Διάλυμα θραύσης κυτταρικών μεμβρανών FG1
- ✚ Διάλυμα θραύσης πυρήνων FG2
- ✚ Πρωτεάση Qiagen (PrK)
- ✚ Ισοπροπανόλη 100%
- ✚ Διάλυμα αιθανόλης 70%
- ✚ Διάλυμα ενυδάτωσης DNA FG3 (10mM Tris.Cl , pH 8.5)

Τεχνική

1. Λύση των κυττάρων του περιφερικού αίματος ή του μυελού των οστών. Προσθήκη H₂O στο falcon tube που βρίσκεται το δείγμα του αίματος έως το σημείο των 40ml.
2. Φυγοκέντρηση 20 λεπτά, 4.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature-RT).
3. Απόρριψη υπερκείμενου.
4. Μηχανική επαναιώρηση pellet.
5. Προσθήκη 5 ml FG1, για την θραύση πυρηνικών μεμβρανών.
6. Έντονη ανάδευση, Vortex.
7. Φυγοκέντρηση 10 λεπτά, 2.000 rpm, RT.
8. Απόρριψη υπερκείμενου.
9. Προσθήκη 1 ml διαλύματος FG2/PrK (100:1), για απομάκρυνση πρωτεϊνών.

10. Μηχανική επαναϊώρηση pellet.
 11. Επώαση σε υδατόλουτρο 65°C, 10 λεπτά.
 12. Προσθήκη propanol-2, συμπύκνωση του DNA.
 13. Ανάδευση, Πιστοποίηση οπτικοποίησης-καθίζησης DNA.
 14. Μεταφορά σε erpendorf tube 2 ml.
 15. Φυγοκέντρηση 10 min, 3.000 rpm, RT.
 16. Απόρριψη υπερκείμενου.
 17. DNA pellet, επαναδιαλύεται με προσθήκη δ/τος EtOH 70%.
 18. Φυγοκέντρηση 10 min, 3.000 rpm, RT.
 19. Απόρριψη υπερκείμενου.
 20. Αφαίρεση περίσσειας EtOH με πιπέτα.
 21. Πλήρης εξάτμιση του διαλύτη σε speed vac. (~60 sec).
 22. Το καθαρό DNA επαναδιαλύεται σε κυμαινόμενη ποσότητα δ/τος FG3 (50-500 μl).
 23. Thermoblock στους 65°C overnight (12-24 h).
 24. Φωτομέτρηση δείγματος σε δύο μήκη κύματος (260nm και 280nm). Ο λόγος O.D260/O.D280 πρέπει να είναι περίπου 1.9 για υψηλής καθαρότητας ακέραια δείγματα DNA.
 25. Φύλαξη στους 4°C.
- Τροποποίηση πρωτοκόλλου FlexiGene DNA Handbook (QIAGEN).

3.4.2 Καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο (Phenol-Chloroform extraction/clean up)

- Αν ο όγκος του διαλύματος είναι <150μL γίνεται προσθήκη H₂O τουλάχιστον μέχρι τελικό όγκο 200μL
- Προσθήκη 1:1 όγκου (φαινόλη: χλωροφόρμιο: ισομικλή αλκοόλη) (25:24:1)
- Γίνεται ανάδευση με vortex για 5sec
- Επώαση σε κανονικές συνθήκες για 5'
- Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm για 10' σε κανονικές συνθήκες

-
- Δημιουργούνται 2 φάσεις
 - Απομόνωση υδατικής φάσης και τοποθέτηση σε καινούριο σωλήνα erpedorf
 - Προσθήκη 1:1 όγκου (χλωροφόρμιο: ΙΑΑΑ) (24:1), ανάδευση
 - Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm για 10' σε κανονικές συνθήκες
 - Απομόνωση πάνω φάσης και τοποθέτηση σε καινούριο σωλήνα erpedorf
 - Προσθήκη αιθανόλης 100% (αποθηκευμένη στους -20°C) σε όγκο x2,5 (500μL στο καθένα)
 - Προσθήκη 1:10 (του αρχικού όγκου) sodium acetate 3M pH 5.2
 - Ανάδευση, επώαση στους -80°C για 30 λεπτά
 - Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm για 30' αμέσως μετά την επώαση
 - Απόρριψη υπερκείμενου
 - Προσθήκη αιθανόλης 75%, και ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το ίζημα
 - Επώαση σε κανονικές συνθήκες για 5'
 - Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm για 15'
 - Απόρριψη υπερκείμενου
 - Τοποθέτηση του σωλήνα erpedorf σε speed vac., με ανοιχτό καπάκι έτσι ώστε να εξατμιστεί πλήρως η αιθανόλη (10')
 - Διαλυτοποίηση με νερό

3.4.3 Ανίχνευση μεταλλάξεων με ARMS-PCR και AS-PCR

3.4.3.1. Ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης V617F του γονιδίου JAK2 με την τεχνική της ARMS-PCR.

Προκειμένου να γίνει η ανίχνευση της μετάλλαξης V617F στην περιοχή του εξονίου 14 του γονιδίου JAK2, ενισχύθηκε το αντίστοιχο τμήμα DNA με ARMS-PCR σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

ARMS V617F

Αντιδραστήρια	
Υπόστρωμα DNA (25ng/μl)	25ng
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X*	10 μl
Εκκινητές (FO, RO, Fwt, Rmt)**	10 pmol
Ένζυμο HotStart Taq DNA πολυμεράση	2,5 units
dNTPs (40mM)	2 μl
ddH ₂ O	Μέχρι τελικού όγκου 100μl
Τελικός όγκος	100 μl

*Σύνθεση διαλύματος 10x: 10.0 mM Tris-HCL, pH 8.3; 50.0 mM KCL; 1.5 mM MgCl₂ (Qiagen)

**Η αλληλουχία των εκκινητών δίνεται στο παράρτημα 1.

Καθ' όλη τη διαδικασία τα υλικά διατηρούνται σε πάγο. Παρασκευάζουμε το μείγμα της αντίδρασης, χωρίς προσθήκη υποστρώματος, ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση (spin down).

Στη συνέχεια το μείγμα ισομοιράζεται σε σωληνάκια τύπου Eppendorf και σε κάθε σωληνάκι προστίθεται το υπόστρωμα DNA του κάθε προς εξέταση δείγματος με την ποσότητα που αναφέρεται στο πρωτόκολλο. Τα σωληνάκια τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή (MJ Research Inc. Programmable Thermal Controller PTC-200).

Οι συνθήκες της αντίδρασης για την ενίσχυση του τμήματος είναι:

1. Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 10 λεπτά
2. Αντίδραση ενίσχυσης:
 - a. Φάση αποδιάταξης: 95°C για 1 λεπτό 7
 - b. Φάση σύνδεσης εκκινητών: 60°C για 1 λεπτό X30 κύκλους
 - c. Φάση επέκτασης: 72°C για 1 λεπτό 7
3. Τελική επέκταση συντιθέμενων μορίων: 72°C για 10 λεπτά.

Για τον αποκλεισμό της περίπτωσης επιμόλυνσης της αντίδρασης και των αντιδραστηρίων σε κάθε πείραμα περιλαμβάνεται ένα τυφλό δείγμα το οποίο περιέχει όλα τα αντιδραστήρια, όχι όμως DNA. Τέλος τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης.

3.4.4 Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων με Real time

PCR HRM ανάλυση

Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης των εκκινητών με gradient PCR

Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf παρασκευάζεται διάλυμα προσθέτοντας διαδοχικά τα απαραίτητα αντιδραστήρια, όπως φαίνεται στα πρωτόκολλα που ακολουθούν. Το εκάστοτε πρωτόκολλο αφορά σε οκτώ αντιδράσεις gradient PCR.

A.	<i>CALR</i> εξόνιο 9	<i>CSF3R</i> εξόνιο 14	<i>DNMT3A</i> εξόνιο 23	<i>IDH2</i> εξόνιο 4	<i>SETBP1</i> εξόνιο 4	<i>SF3B1</i> εξόνιο 14	<i>SF3B1</i> εξόνιο 15	<i>SRSF2</i> εξόνιο 1
Υπόστρωμα DNA (5ng/uL)	20uL (1.25 ng/uL)	20uL (1.25 ng/uL)	20uL (1.25 ng/uL)	20uL (1.25 ng/uL)	20uL (1.25 ng/uL)	20uL (1.25 ng/uL)	20uL (1.25 ng/uL)	20uL (1.25 ng/uL)
HRM mix (2x)*	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)
MgCl₂ (25mM)	8uL (2.5mM)	8.0uL (2.5mM)	8.0uL (2.5mM)	9.6uL (3.0mM)	8.0uL (2.5mM)	9.6uL (3.0mM)	8.0uL (2.5mM)	8.0uL (2.5mM)
Εκκινητής 1 (25uM)	3.2uL (1.0uM) CALR. e9.HF	1.6uL (0.5uM) CSF3R. e14.HF	1.6uL (0.5uM) DNMT3A. e23.HF	1.12uL (0.35uM) IDH2. e4.HF	1.28uL (0.4uM) SETBP1. e4.HF	3.2uL (1.0uM) SF3B1. e14.HF	1.6uL (0.5uM) SF3B1. e15.HF	1.6uL (0.5uM) SRSF2. e1.HF
Εκκινητής 2 (25uM)	1.6uL (0.5uM) CALR. e9.HR	1.6uL (0.5uM) CSF3R. e14.HR	1.6uL (0.5uM) DNMT3A. e23.HR	1.12uL (0.35uM) IDH2. e4.HR	1.28uL (0.4uM) SETBP1. e4.HR	3.2uL (1.0uM) SF3B1. e14.HR	1.6uL (0.5uM) SF3B1. e15.HR	1.6uL (0.5uM) SRSF2. e1.HR
ddH₂O	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL

A.	<i>U2AF1</i> εξόνιο 2	<i>U2AF1</i> εξόνιο 6
Υπόστρωμα DNA (5ng/uL)	20uL (1.25 ng/uL)	20uL (1.25 ng/uL)
HRM mix (2x)*	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)
MgCl₂ (25mM)	8.0uL (2.5mM)	6.4uL (2.0mM)
Εκκινητής 1 (25uM)	1.6uL (0.5uM) U2AF1. e2.HF	0.96uL (0.3uM) U2AF1. e6.HF

B.	<i>ASXL1</i> εξόνιο 12	<i>IDH1</i> εξόνιο 4	<i>KIT</i> εξόνιο 17
Υπόστρωμα DNA (5ng/uL)	20uL (1.25 ng/uL)	20uL (1.25 ng/uL)	20uL (1.25 ng/uL)
HRM mix (2x)**	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)	40.0uL (1x)
MgCl₂ (25mM)	8uL (2.5mM)	9.6uL (3.0mM)	8.0uL (2.5mM)
Εκκινητής 1 (25uM)	1.28uL (0.4uM) ASXL1. e12.HF	0.64uL (0.2uM) IDH1. e4.HF	0.96uL (0.3uM) KIT. e17.HF

Εκκινητής 2 (25uM)	1.6uL (0.5uM) U2AF1. e2.HR	0.96uL (0.3uM) U2AF1. e6.HR	Εκκινητής 2 (25uM)	1.28uL (0.4uM) ASXL1. e12.HR	2.56uL (0.8uM) IDH1. e4.HR	0.96uL (0.3uM) KIT. e17.HR
ddH₂O	Έως 80uL	Έως 80uL	ddH₂O	Έως 80uL	Έως 80uL	Έως 80uL

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια για 8 αντιδράσεις gradient PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των HRMA ειδικών εκκινητών, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης στο υπόστρωμα, για καθεμιά από τις υπο διερεύνηση γενωμικές περιοχές. MgCl₂: Δισθενή Κατιόντα Μαγνησίου ddH₂O: Νερό * Χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα LightCycler 480 High Resolution Melting Master (Roche Diagnostics, USA), το οποίο περιέχει ήδη ένζυμο (πολυμεράση), φθορίζουσα χρωστική υψηλής διακριτικής ικανότητας (ResoLight HRM dye), καθώς και όλα τα υπόλοιπα απαραίτητα στοιχεία της αντίδρασης πλην των ιόντων μαγνησίου, τα οποία προστίθενται ξεχωριστά. ** Χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα KAPA HRM FAST Master Mix (Kapa Biosystems, USA), το οποίο περιέχει ήδη ένζυμο (πολυμεράση), φθορίζουσα χρωστική υψηλής διακριτικής ικανότητας (EvaGreen HRM dye), καθώς και όλα τα υπόλοιπα απαραίτητα στοιχεία της αντίδρασης πλην των ιόντων μαγνησίου, τα οποία προστίθενται ξεχωριστά.

Καθόλη τη διαδικασία τα υλικά διατηρούνται στον πάγο. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση. Το διάλυμα που παρασκευάστηκε, διαμοιράζεται ισόποσα, σε οκτώ ανεξάρτητα σωληνάρια τύπου Eppendorf, καθένα εκ των οποίων τοποθετείται σε διαφορετική σειρά (row) της συσκευής PCR, ώστε πραγματοποιούνται οκτώ διαφορετικές αντιδράσεις πολυμερισμού.

Σε κάθε αντίδραση, η ικανότητα πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα, καθορίζεται από τις διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες που επικρατούν στην εκάστοτε θέση του block της συσκευής. Η παράμετρος που τροποποιείται σε κάθε περίπτωση, αφορά στη θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα (annealing temperature, Ta), η οποία κυμαίνεται σε διαφορετικά επίπεδα ανάλογα με τη σειρά (row) του block της συσκευής, όπου τοποθετείται το σωληνάριο στο οποίο πραγματοποιείται ο εκάστοτε πολυμερισμός.

Οι υπόλοιπες συνθήκες παραμένουν όμοιες μεταξύ τους. Για τις αντιδράσεις που περιγράφονται χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Bio-Rad T100 Thermal Cycler.

Συνθήκες αντίδρασης gradient PCR

- Αρχική αποδιάταξη: 95°C - 10'
- Κυρίως αντίδραση: Διεξάγεται σε 47 κύκλους.
Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - Αποδιάταξη: 95°C - 15"
 - Πρόσδεση εκκινητών: 52-67°C - 30"
 - Επέκταση αλληλουχίας: 72°C - 15'' και μέτρηση επιπέδων φθορισμού

Πίνακας 3: Συνθήκες αντιδράσεων gradient PCR για τους HRMA ειδικούς εκκινητές, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης στο υπόστρωμα.

Ανάδειξη των προϊόντων της gradient PCR, με ανάλυση καμπύλης τήξης και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Τα προϊόντα της gradient PCR χαρακτηρίζονται αρχικά μέσω ανάλυσης καμπύλης τήξης (HRMA), όπου διεξάγονται συνεχόμενες μετρήσεις των επιπέδων φθορισμού.

Συνθήκες ανάλυσης καμπύλης τήξης

- Αποδιάταξη των προϊόντων: 95°C - 1'
- Επαναδιάταξη των προϊόντων: 40°C - 1'
- Θερμοκρασιακή σταθεροποίηση πριν την έναρξη των μετρήσεων: 65°C - 1''
 - Συνεχόμενες μετρήσεις επιπέδων φθορισμού (17 μετρήσεις ανά °C):
 - Αρχική θερμοκρασία: 65°C
 - Τελική θερμοκρασία: 99°C

Πίνακας 4: Συνθήκες ανάλυσης καμπύλης τήξης, των προϊόντων των αντιδράσεων gradient PCR, για τους HRMA ειδικούς εκκινητές, προκειμένου να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία πρόσδεσης στο υπόστρωμα

Τα προϊόντα της gradient PCR αναδεικνύονται επιπροσθέτως με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή.

Ανίχνευση μεταλλάξεων με post Real Time PCR HRMA

Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf παρασκευάζεται διάλυμα προσθέτοντας διαδοχικά τα απαραίτητα αντιδραστήρια, όπως φαίνεται στα πρωτόκολλα που ακολουθούν. Κάθε πρωτόκολλο αφορά σε μία αντίδραση Real-Time PCR ακολουθούμενη από HRMA. Με κατάλληλες αναγωγές υπολογίζεται η ποσότητα που απαιτείται για περισσότερες αντιδράσεις.

A1.	CALR εξόνιο 9	CSF3R εξόνιο 14	DNMT3A εξόνιο 23	IDH2 εξόνιο 4	SETBP1 εξόνιο 4	SF3B1 εξόνιο 14	SF3B1 εξόνιο 15	SRSF2 εξόνιο 1
HRM mix (2x)*	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)
MgCl ₂ (25mM)	1.0uL (2.5mM)	1.0uL (2.5mM)	1.0uL (2.5mM)	1.2uL (3.0mM)	1.0uL (2.5mM)	1.2uL (3.0mM)	1.0uL (2.5mM)	1.0uL (2.5mM)
Εκκινητής 1 (25uM)	0.4uL (1.0uM) CALR. e9.HF	0.2uL (0.5uM) CSF3R. e14.HF	0.2uL (0.5uM) DNMT3A. e23.HF	0.14uL (0.35uM) IDH2. e4.HF	0.16uL (0.4uM) SETBP1. e4.HF	0.4uL (1.0uM) SF3B1. e14.HF	0.2uL (0.5uM) SF3B1. e15.HF	0.2uL (0.5uM) SRSF2. e1.HF
Εκκινητής 2 (25uM)	0.2uL (0.5uM) CALR.	0.2uL (0.5uM) CSF3R.	0.2uL (0.5uM) DNMT3A.	0.14uL (0.35uM) IDH2.	0.16uL (0.4uM) SETBP1.	0.4uL (1.0uM) SF3B1.	0.2uL (0.5uM) SF3B1.	0.2uL (0.5uM) SRSF2.

	e9.HR	e14.HR	e23.HR	e4.HR	e4.HR	e14.HR	e15.HR	e1.HR
ddH ₂ O	0.9uL	1.1uL	1.1uL	1.02uL	1.18uL	0.5uL	1.1uL	1.1uL
Συνολικός όγκος αντίδρασης	7.5uL	7.5uL	7.5uL	7.5uL	7.5uL	7.5uL	7.5uL	7.5uL

A2.	U2AF1 εξόνιο 2	U2AF1 εξόνιο 6
HRM mix (2x)*	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)
MgCl ₂ (25mM)	1.0uL (2.5mM)	0.8uL (2.0mM)
Εκκινητής 1 (25uM)	0.2uL (0.5uM) U2AF1. e2.HF	0.12uL (0.3uM) U2AF1. e6.HF
Εκκινητής 2 (25uM)	0.2uL (0.5uM) U2AF1. e2.HR	0.12uL (0.3uM) U2AF1. e6.HR
ddH ₂ O	1.1uL	1.46uL
Συνολικός όγκος αντίδρασης	7.5uL	7.5uL

B.	ASXL1 εξόνιο 12	IDH1 εξόνιο 4	KIT εξόνιο 17
HRM mix (2x)**	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)	5.0uL (1x)
MgCl ₂ (25mM)	1.0uL (2.5mM)	1.2uL (3.0mM)	1.0uL (2.5mM)
Εκκινητής 1 (25uM)	0.16uL (0.4uM) ASXL1. e12.HF	0.08uL (0.2uM) IDH1. e4.HF	0.12uL (0.3uM) KIT. e17.HF
Εκκινητής 2 (25uM)	0.16uL (0.4uM) ASXL1. e12.HR	0.32uL (0.8uM) IDH1. e4.HR	0.12uL (0.3uM) KIT. e17.HR
ddH ₂ O	1.68uL	0.9uL	1.26uL
Συνολικός όγκος αντίδρασης	8.0uL	7.5uL	7.5uL

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια για 1 αντίδραση Real-Time PCR ενίσχυσης του υποστρώματος των HRMA ειδικών εκκινητών, σε καθεμιά από τις υπο διερεύνηση γενωμικές περιοχές. MgCl₂: Διοσθενή Κατιόντα Μαγνησίου ddH₂O: Νερό * Χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα LightCycler 480 High Resolution Melting Master (Roche Diagnostics, USA), το οποίο περιέχει ήδη ένζυμο (πολυμεράση), φθορίζουσα χρωστική υψηλής διακριτικής ικανότητας (ResoLight HRM dye), καθώς και όλα τα υπόλοιπα απαραίτητα στοιχεία της αντίδρασης πλην των ιόντων μαγνησίου, τα οποία προστίθενται ξεχωριστά. ** Χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα KAPA HRM FAST Master Mix (Kapa Biosystems, USA), το οποίο περιέχει ήδη ένζυμο (πολυμεράση), φθορίζουσα χρωστική υψηλής διακριτικής ικανότητας (EvaGreen HRM dye), καθώς και όλα τα υπόλοιπα απαραίτητα στοιχεία της αντίδρασης πλην των ιόντων μαγνησίου, τα οποία προστίθενται ξεχωριστά.

Καθόλη τη διαδικασία τα υλικά διατηρούνται στον πάγο. Ακολουθεί vortex και σύντομη φυγοκέντρηση. Το διάλυμα ισοκατανέμεται σε ειδικά διαμορφωμένα ξεχωριστά κελιά μίας πλάκας μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων, σε ποσότητα ίση με εκείνη που αναφέρεται στον πίνακα ως συνολικός όγκος αντίδρασης. Κατόπιν, στις διαφορετικές θέσεις της πλάκας, διαμοιράζεται ποσότητα διαλύματος DNA με συγκέντρωση 5ng/uL, μέχρι τελικού όγκου 10uL. Στη συνέχεια, η πλάκα καλύπτεται με διαφανή μεμβράνη (sealing film) για αποφυγή εξάτμισης του μείγματος κατά την αντίδραση. Έπεται σύντομη φυγοκέντρηση της πλάκας (90", 1500rpm) και αντίδραση

πολυμερισμού ακολουθούμενη από ανάλυση καμπύλης τήξης των προϊόντων σε κλειστό σύστημα LightCycler480 Real Time PCR, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

Συνθήκες αντίδρασης Real-Time PCR

- Αρχική αποδιάταξη: 95°C - 10'
- Κυρίως αντίδραση: Διεξάγεται σε 47 κύκλους.
Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - Αποδιάταξη: 95°C - 15''
 - Πρόσδεση εκκινητών: x°C - 30''
x°C = 52°C (*SF3B1* εξόνιο 14)
x°C = 59°C (*IDH1* εξόνιο 4, *IDH2* εξόνιο 4, *SF3B1* εξόνιο 15, *U2AF1* εξόνιο 2, *KIT* εξόνιο 17)
x°C = 67°C (*CALR* εξόνιο 9, *ASXL1* εξόνιο 12, *DNMT3A* εξόνιο 23, *U2AF1* εξόνιο 6, *SETBP1* εξόνιο 4, *SRSF2* εξόνιο 1, *CSF3R* εξόνιο 14)
 - Επέκταση αλληλουχίας: 72°C - 15'' και μέτρηση επιπέδων φθορισμού

Συνθήκες HRMA

- Αποδιάταξη των προϊόντων: 95°C - 1'
- Επαναδιάταξη των προϊόντων: 40°C - 1'
- Θερμοκρασιακή σταθεροποίηση πριν την έναρξη των μετρήσεων: 65°C - 1''
- Συνεχόμενες μετρήσεις επιπέδων φθορισμού (17 μετρήσεις ανά °C):
 - Αρχική θερμοκρασία: 65°C
 - Τελική θερμοκρασία: 99°C

Πίνακας 6: Συνθήκες αντιδράσεων Real-Time PCR ενίσχυσης και ανάλυσης καμπύλης τήξης για τους HRMA ειδικούς εκκινητές.

Η καταγραφή της αύξησης των επιπέδων φθορισμού ανά το χρόνο, που οφείλεται στη συνθετική διαδικασία, καθώς και η καταγραφή των επιπέδων φθορισμού για το σχεδιασμό της καμπύλης τήξης των προϊόντων της Real Time PCR, πραγματοποιείται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού (LightCycler 480 Gene Scanning Software v.1.5.1.74, Roche Diagnostics, USA), όπου αποθηκεύονται τα δεδομένα της αντίδρασης.

3.4.5 Επεξεργασία δειγμάτων αναφοράς για μελέτες Μεθυλίωσης

1) Για τον προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, παρασκευάστηκε τεχνητό πλήρως μεθυλιωμένο (100% 5mC) γονιδίωμα ανθρώπου, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η ενζυμική μεταφορά μεθυλομάδων στη θέση 5, του δακτυλίου της κυτοσίνης (5mC), όταν η τελευταία ακολουθείται από μία βάση γουανίνης (CpG), επιτελείται από το ένζυμο CpG μεθυλοτρανσφεράση (M.SssI, NEB).

Προετοιμασία μεθυλιωμένου δείγματος / MSssI (NEB) Methylation of DNA

Αντιδραστήριο	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Όγκος
<i>SAM</i>	32mM	1600μM	1μL
<i>ddH₂O</i>	-	-	19 μL
<i>Τελικός όγκος</i>	-	-	20 μL

Αντιδραστήριο	Όγκος
<i>ddH₂O</i>	10.80μL
<i>10xbuffer</i>	2.00 μL
<i>SAM</i>	2.00μL
<i>DNA</i>	4.20μL
<i>MSssI</i>	1.00 μL
<i>Τελικός όγκος</i>	20.00 μL

- Μηχανική ανάδευση με τη χρήση πιπέτας
- Επώαση για 4 ώρες στους 30° C
- Επώαση για 20 λεπτά στους 65°C
- Επώαση στους 4°C μέχρι τη χρήση

2) Για τον προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, παρασκευάστηκε τεχνητό πλήρως μη-μεθυλιωμένο (0% 5mC) γονιδίωμα ανθρώπου.

Η διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε αφορά στην τεχνητή (*in vitro*) επέκταση μέσω PCR, ολόκληρου του γονιδιώματος (multiple displacement-whole genome amplification, WGA), με χρήση του ενζύμου phi29 DNA Polymerase (Thermo-Fischer), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Τυχαίες εξαμερείς αλληλουχίες (Exo-Resistant Random Primer, Thermo-Fischer), οι οποίες ανθίστανται της 3'-5' δράσης εξονουκλεάσης του ενζύμου, ενσωματώνονται σε πολλαπλές θέσεις στο γονιδίωμα, με τον τρόπο αυτό επεκτείνεται έως και 1000 φορές.

Δεδομένου ότι το ένζυμο δεν έχει τη δυνατότητα να εισαγάγει μεθυλομάδες στο γονιδίωμα που συνθέτει, αυτό οδηγεί στο σχηματισμό πλήρως μη-μεθυλιωμένου υποστρώματος (0% 5'-mC), το οποίο χρησιμοποιείται ως δείγμα αναφοράς (Hughes and Jones 2007).

Προετοιμασία μη μεθυλιωμένου δείγματος / WGA

phi 29 (Thermo Scientific)

Αντιδραστήριο	Όγκος
DNA	2.00μL
exo resistant RP	2.00 μL
2x annealing buffer	2.00μL
ddH ₂ O	2.00μL
Τελικός όγκος	8.00 μL

(2x annealing buffer

- 100mM TusHCl
- pH 8.0
- 25mM MgCl₂)

Επώαση για 3 λεπτά στους 94 °C

Επώαση για 3 λεπτά στον πάγο

Αντιδραστήριο	Όγκος
10xbuffer	2.00μL
phi29 pol (5u)	0.50 μL
dNTPs(4mM)	2.00μL
Ppase(0.02u)	1.00 μL
ddH ₂ O	6.50μL
Τελικός όγκος	12.00 μL

Προσθήκη στο δείγμα που προετοιμάστηκε παραπάνω, με όγκο τελικού δείγματος 20μL.

- Επώαση για 12 ώρες στους 30° C (lid 70 °C)
- Επώαση για 10 λεπτά στους 65 °C
- Επώαση στους 4 °C μέχρι τη χρήση

Για την χρήση του μη μεθυλιωμένου δείγματος στις περαιτέρω αντιδράσεις, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα κατάλοιπα των αντιδραστηρίων, από την παρασκευή του μη μεθυλιωμένου δείγματος, τα οποία μπορεί να επηρεάσουν την αντίδραση.

Αντιδραστήρια	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Όγκος (μL)
DNA	6 ng/μL	3 ng/μL	10.00
10x buffer	10x	1x	2.00
MgCl ₂	50 mM	2.5 mM	1.00
LINE-1 FOR	25 uM	0.4 uM	0.32
LINE- REV	25 uM	0.4 uM	0.32
dNTPs	40 mM	1 mM	0.50
Ένζυμο Thermo Platinum Taq DNA πολυμεράση	-	-	0.10
20x Evagreen	5x	1x	4.00
ddH ₂ O	-	-	5.76
Τελικός Όγκος	-	-	20.00

Σημειώνεται πως για τα δείγματα αναφοράς, που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες της μεθυλίωσης, υπάρχει έγγραφη συγκατάθεση, σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι.

3.4.6 Μοριακή διερεύνηση μεθυλίωσης με Real time PCR HRM ανάλυση

Συνθήκες αντίδρασης για την ενίσχυση του τμήματος με Real-time PCR

Πρόγραμμα	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	94°C	8'
Αντίδραση ενίσχυσης		
Φάση αποδιάταξης εκκινητών	94 °C	15''
Φάση σύνδεσης εκκινητών	60 °C	30''
	72 °C	15''
Φάση επέκτασης	72 °C	10'
	40 °C	10''
Προσθήκη 4mL χρωστικής EvaGreen		

Συνθήκες αντίδρασης για το σχηματισμό καμπύλης τήξης

HRM	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη ενισχυμένου τμήματος	95 °C	1'
Υβριδοποίηση ενισχυμένου τμήματος	40 °C	1'
*	50 °C	1''
*	99 °C	
	40 °C	10''

*Σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας και αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων με λήψη συνεχών μετρήσεων φθορισμού: Από 50 °C έως 99 °C με αύξηση 0,02 °C/ δευτερόλεπτο και 25 μετρήσεις/1 °

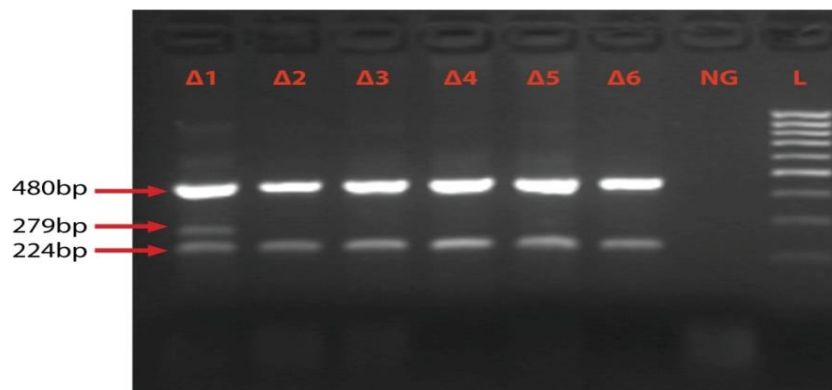
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Ανίχνευση μεταλλάξεων με την τεχνική της ARMS PCR σε ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ.

Ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης V617F του γονιδίου JAK2 με την τεχνική της ARMS PCR σε ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ.

Η ύπαρξη ή μη της σημειακής μετάλλαξης V617F ανιχνεύθηκε με την τεχνική της ARMS PCR όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.3.2. Η ανίχνευση της μετάλλαξης γίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3%, όπου στην περίπτωση θετικού δείγματος για την μετάλλαξη JAK2V617F εμφανίζεται μια ζώνη ενίσχυσης 279b.p. του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου ανάμεσα στην ζώνη ελέγχου των 480b.p. και της ζώνης του φυσιολογικού αλληλομόρφου των 224b.p. με τον τρόπο που φαίνεται στην εικόνα 23.

Κατά τον έλεγχο η σημειακή μετάλλαξη V617F ανιχνεύθηκε σε 28 από τις 60 περιπτώσεις που μελετήθηκαν.



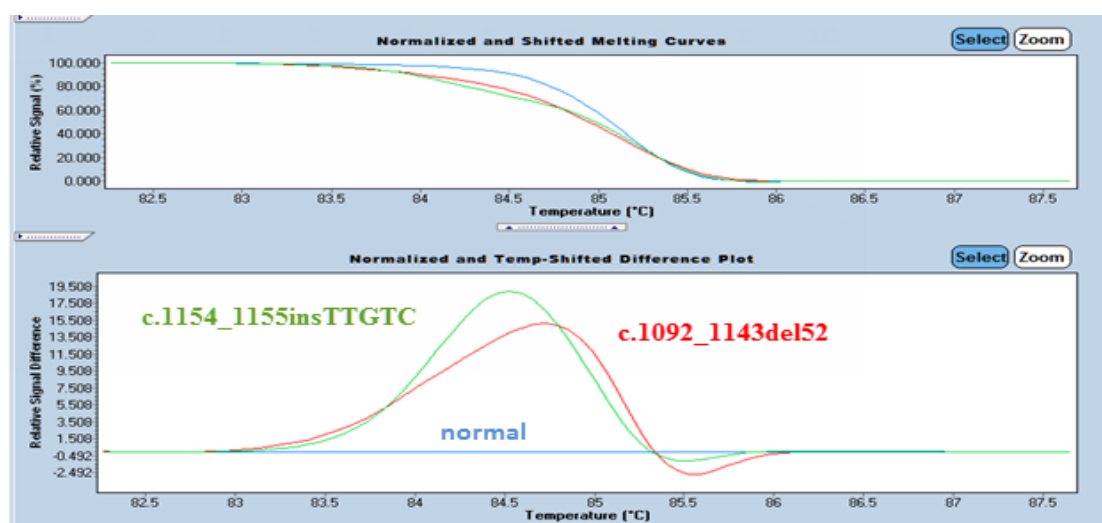
Εικόνα 23 : Ενδεικτικά αποτελέσματα της ανίχνευσης της μετάλλαξης JAK2 V617F (αντικατάσταση μιας γουανίνης από θυμίνη στη θέση 1849 κωδικής αλληλουχίας (c.1849G>T) του γονιδίου JAK2. Δείγματα που φέρουν τη μετάλλαξη εμφανίζουν τρεις ζώνες (Δ1) ενώ δείγματα που δε φέρουν τη μετάλλαξη εμφανίζουν δύο ζώνες (Δ2-6). Δ: δείγμα, NG: αρνητικός μάρτυρας, L: μοριακός μάρτυρας DNA μεγέθους 100bp.

Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων σε κωδικές περιοχές των προς μελέτη γονιδίων.

- Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων στην κωδική περιοχή c.1074-c.1236 του γονιδίου *CALR*

Η μοριακή διερεύνηση των μεταλλάξεων στην κωδική περιοχή c.1074-c.1236 του γονιδίου *CALR* έγινε με την τεχνική της HRM ανάλυσης μετά από Real-time PCR όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.3.4.

Κατά τον έλεγχο ανιχνεύθηκε σε 3 από τις 60 περιπτώσεις που μελετήθηκαν, μετάλλαξη στην κωδική περιοχή c.1074-c.1236 του γονιδίου *CALR*. Οι δυο τύποι μετάλλαξης που ανιχνεύθηκαν στα θετικά δείγματα ήταν η τύπου I μετάλλαξη διαγραφής 52 b.p (c.1092_1143del52) και η τύπου II μετάλλαξη προσθήκης 5 b.p (c.1154_1155insTTGTC). Η ανίχνευση τους έγινε με την ανάλυση της καμπύλης τήξης (HRM analysis) των δειγμάτων έπειτα από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της HRM και την ανάλυση της μετατόπισης της καμπύλης τήξης των μεταλλαγμένων δειγμάτων σε σχέση με φυσιολογικά δείγματα σε σχετικό διάγραμμα (difference plot) με τον τρόπο που φαίνεται στην εικόνα 24.

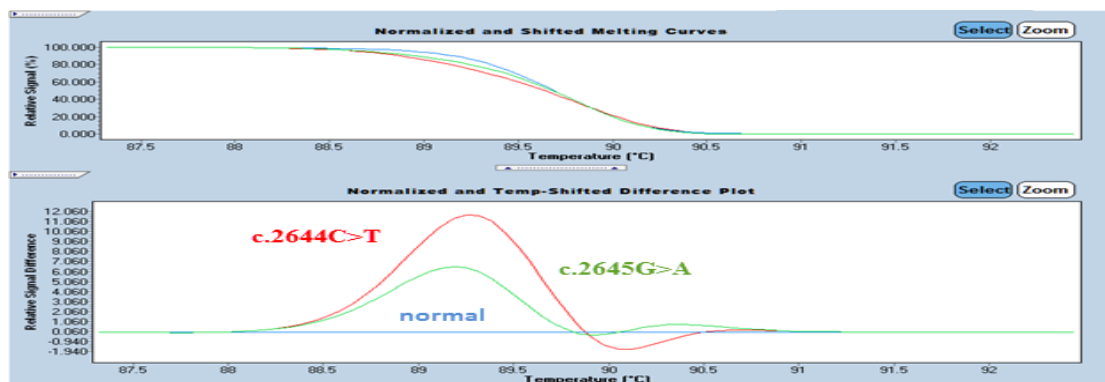


Εικόνα 24: Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων στη κωδική περιοχή c.1074-c.1236 του γονιδίου *CALR*. Διακρίνονται τρεις (3) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με κόκκινο φαίνεται δείγμα που φέρει την τύπου I μετάλλαξη διαγραφής 52 b.p (c.1092_1143del52) ενώ με πράσινο φαίνεται δείγμα που φέρει την τύπου II μετάλλαξη προσθήκης 5 b.p (c.1154_1155insTTGTC). Οι μεταλλάξεις αυτές επιβεβαιώθηκαν με ανάλυση αλληλουχίας κατά Sanger.

- Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων στη κωδική περιοχή c.2598-c.2686 του γονιδίου *DNMT3A*.

Η μοριακή διερεύνηση των μεταλλάξεων στην κωδική περιοχή c.2598-c.2686 του γονιδίου *DNMT3A* έγινε με την τεχνική της HRM ανάλυσης μετά από Real-time PCR όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.3.4.

Κατά τον έλεγχο ανιχνεύθηκε σε 8 από τις 60 περιπτώσεις που μελετήθηκαν, μετάλλαξη στην κωδική περιοχή c.2598-c.2686 του γονιδίου *DNMT3A*. Ανιχνεύθηκαν δυο τύποι μεταλλάξεων, η αντικατάσταση μιας κυτοσίνης από μια θυμίνη στην θέση 2644 της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου (c.2644C>T) και η αντικατάσταση μιας γουανίνης από μια αδενίνη στην θέση 2645 της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου (c.2645G>A). Η ανίχνευση τους έγινε με την ανάλυση της καμπύλης τήξης (HRM analysis) των δειγμάτων έπειτα από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της HRM και την ανάλυση της μετατόπισης της καμπύλης τήξης των μεταλλαγμένων δειγμάτων σε σχέση με φυσιολογικά δείγματα σε σχετικό διάγραμμα (difference plot) με τον τρόπο που φαίνεται στην εικόνα 25.

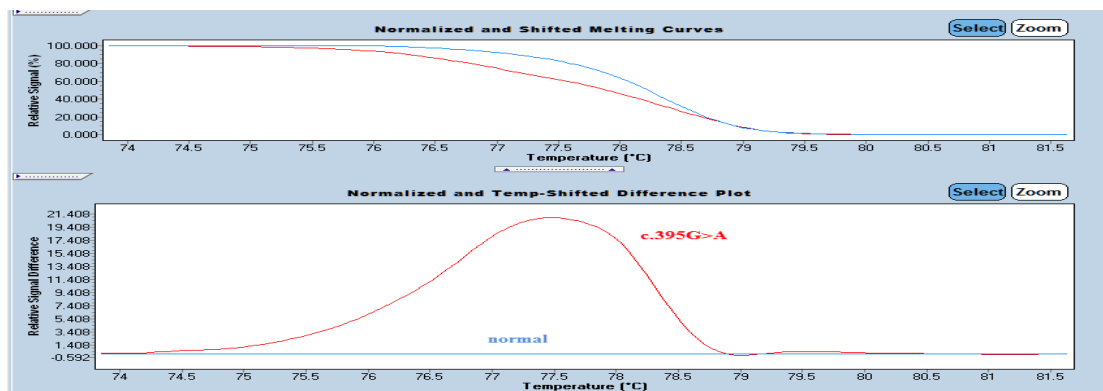


Εικόνα 25: Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων της κωδικής περιοχής c.2598-c.2686 του γονιδίου *DNMT3A*. Διακρίνονται τρεις (3) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με κόκκινο φαίνεται δείγμα που φέρει την μετάλλαξη αντικατάστασης μιας κυτοσίνης από μια θυμίνη στην θέση 2644 της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου (c.2644C>T) ενώ με πράσινο φαίνεται δείγμα που φέρει μετάλλαξη αντικατάστασης μιας γουανίνης από μια αδενίνη στην θέση 2645 της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου (c.2645G>A). Οι μεταλλάξεις αυτές επιβεβαιώθηκαν με ανάλυση αλληλουχίας κατά Sanger.

- Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων στη κωδική περιοχή c.378-c.411 του γονιδίου *IDH1*.

Η μοριακή διερεύνηση των μεταλλάξεων στην κωδική περιοχή c.378-c.411 του γονιδίου *IDH1* έγινε με την τεχνική της HRM ανάλυσης μετά από Real-time PCR όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.3.4.

Κατά τον έλεγχο δεν ανιχνεύθηκε σε καμία από τις 60 περιπτώσεις που μελετήθηκαν, μετάλλαξη στην κωδική περιοχή c.378-c.411 του γονιδίου *IDH1*.

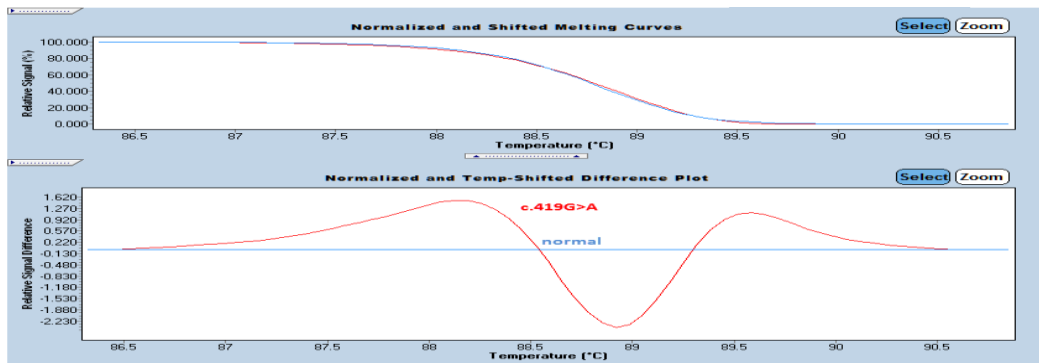


Εικόνα 26: Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων στην κωδική περιοχή c.2598-c.2686 του γονιδίου *IDH1*. Διακρίνονται δύο (2) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με κόκκινο φαίνεται δείγμα που φέρει την μετάλλαξη αντικατάστασης μιας γουανίνης από μια αδενίνη στην θέση 395 της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου (c.395G>A).

- Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων στη κωδική περιοχή c.402-c.526 του γονιδίου *IDH2*.

Η μοριακή διερεύνηση των μεταλλάξεων στην κωδική περιοχή c.402-c.526 του γονιδίου *IDH2* έγινε με την τεχνική της HRM ανάλυσης μετά από Real-time PCR όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.3.4.

Κατά τον έλεγχο δεν ανιχνεύθηκε σε καμία από τις 60 περιπτώσεις που μελετήθηκαν, μετάλλαξη στην κωδική περιοχή c.402-c.526 του γονιδίου *IDH2*.

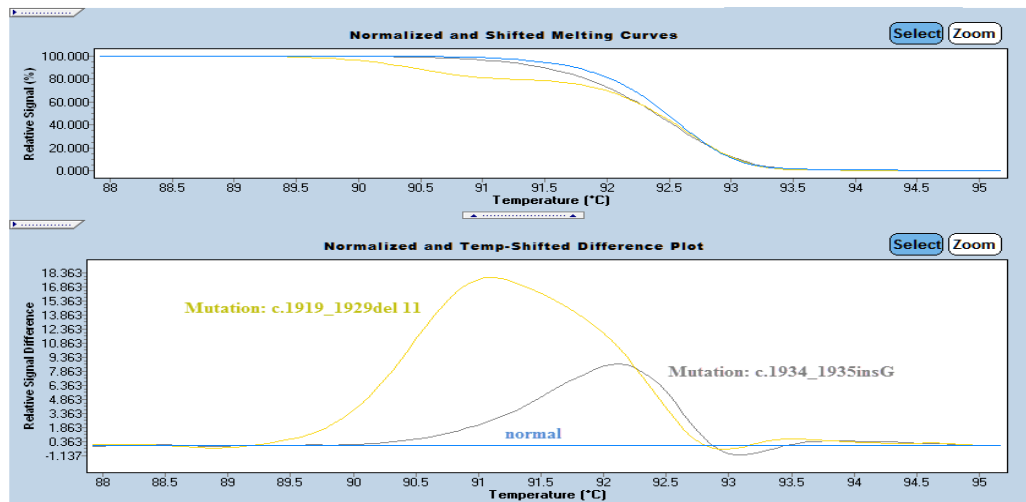


Εικόνα 27: Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων στην κωδική περιοχή c.402-c.526 του γονιδίου IDH2. Διακρίνονται δύο (2) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με κόκκινο φαίνεται δείγμα που φέρει την μετάλλαξη αντικατάστασης μιας γουανίνης από μια αδενίνη στην θέση 419 της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου (c.419G>A).

- Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων στη κωδική περιοχή c.1850-c.1963 του γονιδίου ASXL1.

Η μοριακή διερεύνηση των μεταλλάξεων στην κωδική περιοχή c.1850-c.1963 του γονιδίου ASXL1 έγινε με την τεχνική της HRM ανάλυσης μετά από Real-time PCR όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.3.4.

Κατά τον έλεγχο ανιχνεύθηκε σε 7 από τις 60 περιπτώσεις που μελετήθηκαν, μετάλλαξη στην κωδική περιοχή c.1850-c.1963 του γονιδίου ASXL1. Στα θετικά δείγματα βρέθηκαν δύο τύποι μεταλλάξεων, μια μετάλλαξη διαγραφής 11 b.p από τη θέση 1919 έως την 1929 της κωδικής αλληλουχίας (c.1919_1929del11) του γονιδίου ASXL1 και μια μετάλλαξη προσθήκης μιας βάσης γουανίνης (G) ανάμεσα στις θέσεις 1934 και 1935 της κωδικής αλληλουχίας (c.1934_1935insG) του γονιδίου ASXL1. Η ανίχνευση τους έγινε με την ανάλυση της καμπύλης τήξης (HRM analysis) των δειγμάτων έπειτα από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της HRM και την ανάλυση της μετατόπισης της καμπύλης τήξης των μεταλλαγμένων δειγμάτων σε σχέση με φυσιολογικά δείγματα σε σχετικό διάγραμμα (difference plot) με τον τρόπο που φαίνεται στην εικόνα 28.

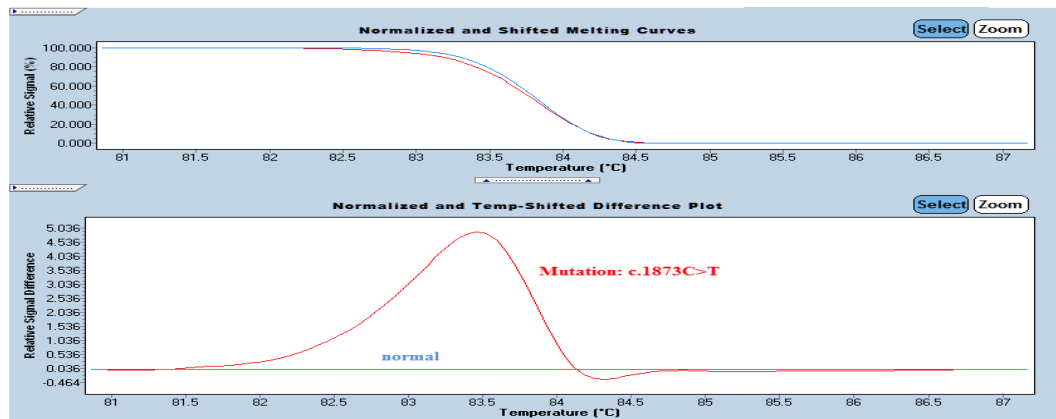


Εικόνα 28: Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων στην κωδική περιοχή c.1850-c.1963 του γονιδίου ASXL1. Διακρίνονται τρεις (3) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με κίτρινο φαίνεται δείγμα που φέρει μετάλλαξη διαγραφής 11 b.p από τη θέση 1919 έως την 1929 της κωδικής αλληλουχίας (c.1919_1929del11) του γονιδίου ASXL1 ενώ με γκρι φαίνεται δείγμα που φέρει μετάλλαξη προσθήκης μιας βάσης γουανίνης (G) ανάμεσα στις θέσεις 1934 και 1935 της κωδικής αλληλουχίας (c.1934_1935insG) του γονιδίου ASXL1. Οι μεταλλάξεις αυτές επιβεβαιώθηκαν με ανάλυση αλληλουχίας κατά Sanger και οδηγούν στην μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου.

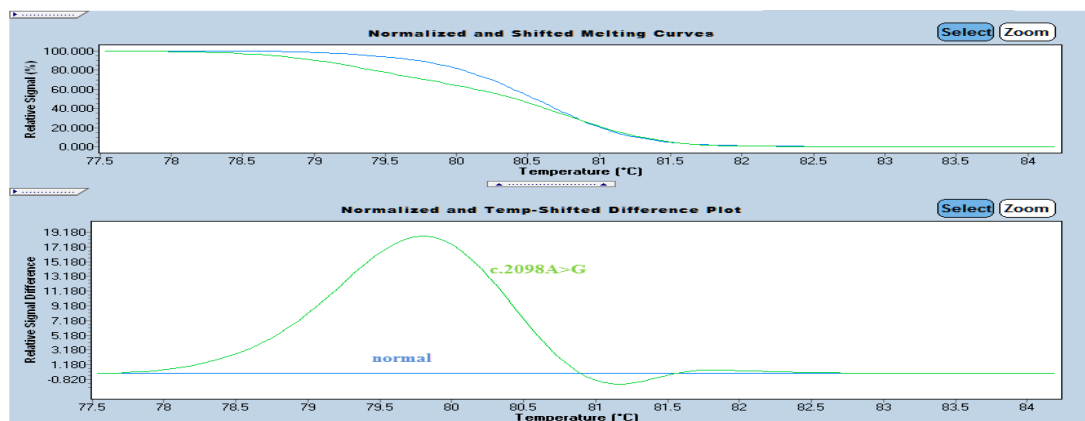
- Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων στις κωδικές περιοχές c.1858-c.2007 και c.2078-c.2101 του γονιδίου SF3B1.

Η μοριακή διερεύνηση των μεταλλάξεων στις κωδικές περιοχές c.1858-c.2007 και c.2078-c.2101 του γονιδίου SF3B1 έγινε με την τεχνική της HRM ανάλυσης μετά από Real-time PCR όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.3.4.

Κατά τον έλεγχο ανιχνεύθηκε σε 19 από τις 60 περιπτώσεις που μελετήθηκαν, μετάλλαξη σε μια από τις κωδικές περιοχές c.1858-c.2007 και c.2078-c.2101 του γονιδίου SF3B1. Η ανίχνευση τους έγινε με την ανάλυση της καμπύλης τήξης (HRM analysis) των δειγμάτων έπειτα από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της HRM και την ανάλυση της μετατόπισης της καμπύλης τήξης των μεταλλαγμένων δειγμάτων σε σχέση με φυσιολογικά δείγματα σε σχετικό διάγραμμα (difference plot) με τον τρόπο που φαίνεται στις εικόνες 29 και 30.



Εικόνα 29: Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων στην κωδική περιοχή c.1858-c.2007 του γονιδίου SF3B1. Διακρίνονται δύο (2) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με κόκκινο φαίνεται δείγμα που φέρει την μετάλλαξη αντικατάστασης μιας κυτοσίνης από μια θυμίνη στην θέση 1873 της κωδικής αλληλουχίας (c.1873C>T).

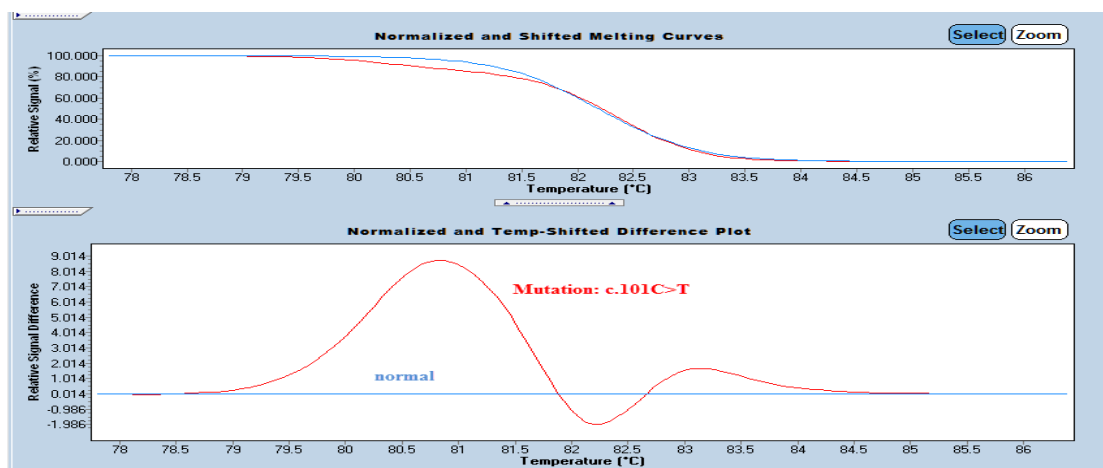


Εικόνα 30: Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων στην κωδική περιοχή c.2078-c.2101 του γονιδίου SF3B1. Διακρίνονται δύο (2) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με πράσινο φαίνεται δείγμα που φέρει την μετάλλαξη αντικατάστασης μιας αδενίνης από μια γουανίνη στην θέση 2098 της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου (c.2098A>G).

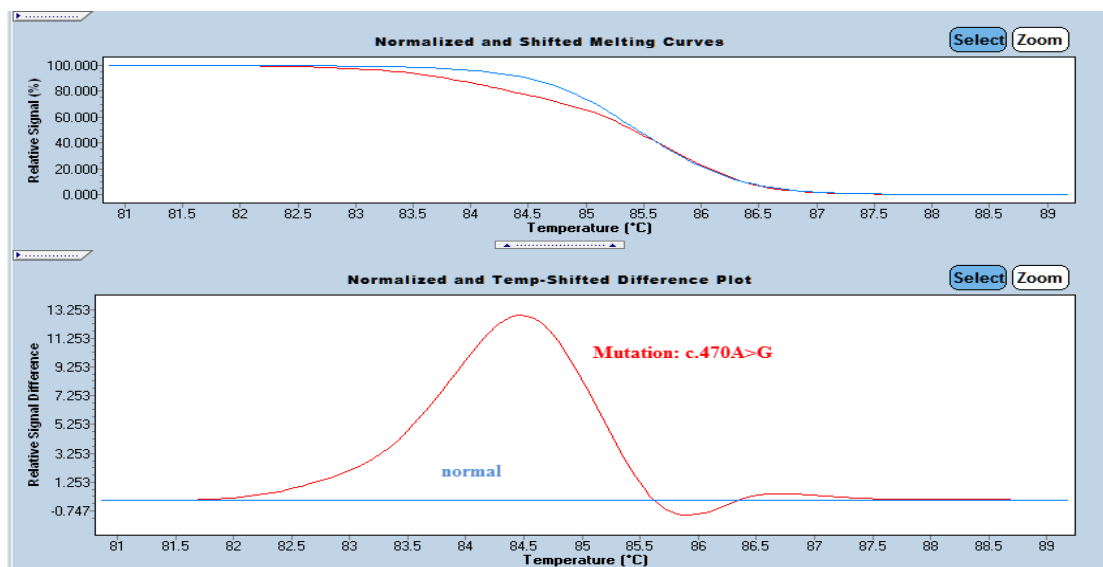
- Μοριακή διερεύνηση μεταλλάξεων στις κωδικές περιοχές c.85-122 και c.436-473 του γονιδίου *U2AF1*.

Η μοριακή διερεύνηση των μεταλλάξεων στις κωδικές περιοχές c.85-122 και c.436-473 του γονιδίου *U2AF1* έγινε με την τεχνική της HRM ανάλυσης μετά από Real-time PCR όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.3.4.

Κατά τον έλεγχο δεν ανιχνεύθηκε σε καμία από τις 60 περιπτώσεις που μελετήθηκαν, μετάλλαξη σε μια από τις κωδικές περιοχές c.85-122 και c.436-473 του γονιδίου *U2AF1*.



Εικόνα 31: Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο του *U2AF1*. Διακρίνονται δύο (2) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με κόκκινο φαίνεται δείγμα που φέρει την μετάλλαξη αντικατάστασης μιας κυτοσίνης από μια θυμίνη στην θέση 101 της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου (c.101C>T).



Εικόνα 32: Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο

γονίδιο του U2AF1. Διακρίνονται δύο (2) διακριτές καμπύλες τήξης μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με μπλε φαίνεται ένα φυσιολογικό δείγμα. Με κόκκινο φαίνεται δείγμα που φέρει την μετάλλαξη αντικατάστασης μιας αδενίνης από μια γουανίνη στην θέση 470 της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου (c.470A>G).

4.2 Προσδιορισμός του επιπέδου μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1

Η μεθυλίωση αποτελεί έναν εν δυνάμει αναστρέψιμο κατασταλτικό μηχανισμό της γονιδιακής έκφρασης. Εικάζεται πως αρχικά, είχε εξελιχθεί ως κύριος αμυντικός μηχανισμός ενάντια στην παρασιτική ενσωμάτωση και διάσπαρτη μετάθεση γενωμικού υλικού, από άλλους οργανισμούς, κυρίως ιούς, συμβάλλοντας έτσι στην διατήρηση της ακεραιότητας της γονιδιακής έκφρασης.⁵⁹

Σε πολλούς τύπους καρκίνου ή σε άλλες παθολογικές καταστάσεις η μεθυλίωση του DNA απουσιάζει ή αλλορυθμίζεται. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η μετάθεση των διάσπαρτων πολύ-επαναλαμβανόμενων μικρών ή μεγάλων μεταθετών στοιχείων, όπως οι αλληλουχίες SINE (short interspersed nucleotide elements, π.χ. Alu repetitive elements) και LINE (long interspersed nucleotide elements), αντίστοιχα, είναι ανεξέλεγκτη. Ως αποτέλεσμα παρατηρείται γενωμική αστάθεια και αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης.

Στα βιβλιογραφικά δεδομένα, παρατηρείται ασυμφωνία, όσον αφορά στην κατάσταση μεθυλίωσης τόσο καθολικά στο γονιδίωμα, όσο και συγκεκριμένα στα μεταθετά στοιχεία και στους υποκινητές τους, σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες των πολύ-επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ), αναφέρονται σε μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, γεγονός που συνάδει με την εκτεταμένη υπομεθυλίωση των καρκινικών κυττάρων, που παρατηρείται στους συμπαγείς όγκους. Ωστόσο, σε

αντίθεση με τη γενικότερη απώλεια σήμανσης 5mC στο καρκινικό γονιδίωμα, οι υποκινητές συγκεκριμένων γονιδίων παρουσιάζουν υπέρμετρη μεθυλίωση.⁶⁶

Οι νησίδες CpG εντοπίζονται στους υποκινητές περίπου των μισών γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος, όπου μάλιστα, στα υγιή κύτταρα, δεν είναι μεθυλιωμένες. Καθώς τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία περιέχουν ένα μεγάλο αριθμό από δινουκλεοτίδια CpG, η κατάσταση της μεθυλίωσης αυτών των αλληλουχιών συμβάλλει στην κατανόηση της καθολικής μεθυλίωσης του DNA.

Σε πιο πρόσφατες έρευνες, για την κατάσταση της μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, παρατηρήθηκε ότι σε ένα μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων καρκίνου τα στοιχεία χαρακτηρίζονται από ελλιπή μεθυλίωση, σε συνδυασμό με μία γενικότερη απώλεια μεθυλοκυτοσίνης, η οποία σχετίζεται με την ηλικία και δεν μπορεί να εξηγηθεί από την μεθυλίωση ενός μόνο αντίγραφου γονιδίου, καθώς αυτό αφορά λιγότερο από το 5% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Επιπλέον, συμπεραίνεται ότι μια γενική απώλεια της 5mC με τη πάροδο του χρόνου μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση των στοιχείων LINE-1 και γονιδιακή αστάθεια.⁵⁹

Κύριοι ρυθμιστές των επιπέδων μεθυλίωσης του γονιδιώματος είναι τα ένζυμα DNMT, TET και IDH1/2, τα οποία, σε συνδυασμό με ένζυμα που τροποποιούν τις ιστόνες, όπως τα ASXL1 και EZH2, έχουν απώτερο στόχο τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Για τον κατά προσέγγιση προσδιορισμό, των επιπέδων μεθυλίωσης του γονιδιώματος, έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνολογίες για την ανάλυση των μεταθετών στοιχείων LINE-1. Αυτά τα στοιχεία εντοπίζονται στο 45% του ανθρώπινου γονιδιώματος, και σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, υπό φυσιολογικές συνθήκες ανιχνεύονται έντονα μεθυλιωμένα.

Για την ανίχνευση πιθανών μεταλλάξεων στο πρότυπο μεθυλίωσης του γονιδιώματος σε ασθενείς με μυελικές νεοπλασίες και μεταλλάξεις σε γονίδια που συμμετέχουν σε διάφορες διεργασίες του κυττάρου, μελετήσαμε τα επίπεδα μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, σε φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα, τόσο μέσω

μεθυλοειδικής HRMA (MS-HRMA) (LightCycler480, Roche), όσο και μέσω μεθυλοειδικής πυροαλληλούχισης (MSP) (Pyromark Q96, Qiagen).

4.2.1 Μεθυλοειδική HRMA (MS-HRMA)

4.2.1.1. Κλινικό υλικό

Για τον προσδιορισμό πιθανών αποκλίσεων στο πρότυπο μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, σε ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ, συγκριτικά με άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού, χρησιμοποιήσαμε MS-HRMA. Με την τεχνική αυτή έγινε επιλογή 15 ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ, από σύνολο 60 ασθενών, με τις παρακάτω μεταλλάξεις.

Για τον προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκαν 6 άτομα με φυσιολογική αιμοποίηση.

Δείγμα	Κύρια μετάλλαξη	Τροποποιητικά γονίδια	Διάγνωση
1	NEG	DNMT3A	ΧΜΜΛ
2	JAK2	SF3B1	ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ
3	NEG	SF3B1	ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ
4	CALR	NEG	α-ΜΔΣ/ΜΥΝ
5	JAK2	DNMT3A	ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ
6	JAK2	ASXL1	ΧΜΜΛ
7	JAK2	SF3B1	ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ
8	NEG	SRSF2	ΧΜΜΛ
9	JAK2	SRSF2	ΧΜΜΛ
10	NEG	SRSF2	ΧΜΜΛ
11	NEG	SF3B1	ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ
12	NEG	ASXL1	α-ΜΔΣ/ΜΥΝ
13	JAK2	SF3B1	ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ
14	NEG	SRSF2	ΧΜΜΛ
15	JAK2	NEG	ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ

Πίνακας 7: Προσδιορισμός μεταλλάξεων σε ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ

- ❖ Ασθενής Νο1: Έπειτα από ανάλυση με τη μέθοδο MS-HRMA εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *DNMT3A*. Ο ασθενής προσήλθε με διάγνωση ΧΜΜΛ.

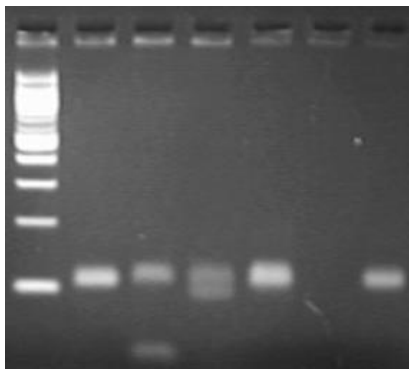
- ❖ Ασθενής Νο2: Έπειτα από ανάλυση με τη μέθοδο MS-HRMA εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *SF3B1* και η μετάλλαξη *JAK2V617F* μετά από ανάλυση με *ARMS-PCR*. Ο ασθενής προσήλθε με διάγνωση ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ
- ❖ Ασθενής Νο3: Έπειτα από ανάλυση με τη μέθοδο MS-HRMA εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *SF3B1*. Ο ασθενής προσήλθε με διάγνωση ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ.
- ❖ Ασθενής Νο4: Έπειτα από ανάλυση με τη μέθοδο MS-HRMA εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *CALR*. Ο ασθενής προσήλθε με διάγνωση α-ΜΔΣ/ΜΥΝ
- ❖ Ασθενής Νο5: Έπειτα από ανάλυση με τη μέθοδο MS-HRMA εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *DNMT3A* και *JAK2*. Ο ασθενής προσήλθε με διάγνωση ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ.
- ❖ Ασθενής Νο6: Έπειτα από ανάλυση με τη μέθοδο MS-HRMA εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *ASXL1* και η μετάλλαξη *JAK2V617F* μετά από ανάλυση με *ARMS-PCR*. Ο ασθενής προσήλθε με διάγνωση ΧΜΜΛ.
- ❖ Ασθενής Νο7: Έπειτα από ανάλυση με τη μέθοδο MS-HRMA εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *SF3B1* και η μετάλλαξη *JAK2V617F* μετά από ανάλυση με *ARMS-PCR*. Ο ασθενής χαρακτηρίστηκε με RARS-T.
- ❖ Ασθενής Νο8: Έπειτα από ανάλυση με τη μέθοδο MS-HRMA εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *SRSF2*. Ο ασθενής προσήλθε με διάγνωση ΧΜΜΛ.
- ❖ Ασθενής Νο9: Έπειτα από ανάλυση με τη μέθοδο MS-HRMA εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *SRSF2* και *JAK2*. Ο ασθενής προσήλθε με διάγνωση ΧΜΜΛ.
- ❖ Ασθενής Νο10: Έπειτα από ανάλυση με τη μέθοδο MS-HRMA εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *SRSF2* και η μετάλλαξη *JAK2V617F* μετά από ανάλυση με *ARMS-PCR*. Ο ασθενής προσήλθε με διάγνωση ΧΜΜΛ.
- ❖ Ασθενής Νο11: Έπειτα από ανάλυση με τη μέθοδο MS-HRMA εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *SF3B1*. Ο ασθενής προσήλθε με διάγνωση ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ.

- ❖ Ασθενής Νο12: Έπειτα από ανάλυση με τη μέθοδο MS-HRMA εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *ASXL1*. Ο ασθενής προσήλθε με διάγνωση α-ΜΔΣ/ΜΥΝ
- ❖ Ασθενής Νο13: Έπειτα από ανάλυση με τη μέθοδο MS-HRMA εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *SF3B1* και η μετάλλαξη *JAK2V617F* μετά από ανάλυση με *ARMS-PCR*. Ο ασθενής προσήλθε με διάγνωση ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ
- ❖ Ασθενής Νο14: Έπειτα από ανάλυση με τη μέθοδο MS-HRMA εντοπίστηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *SRSF2*. Ο ασθενής προσήλθε με διάγνωση ΧΜΜΛ.
- ❖ Ασθενής Νο15: Έπειτα από ανάλυση με *ARMS-PCR* εντοπίστηκε η μετάλλαξη V617F στο γονίδιο *JAK2*. Ο ασθενής προσήλθε με διάγνωση με ΜΔΣ/ΜΥΝ-ΔΣ-Θ.

4.2.1.2. Σχεδιασμός εκκινητών για MS-HRMA και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας

Για την ανάλυση με MS-HRMA σχεδιάστηκαν εκκινητές κατάλληλοι για επεξεργασμένα με δισουλφίδιο του νατρίου υποστρώματα (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research).

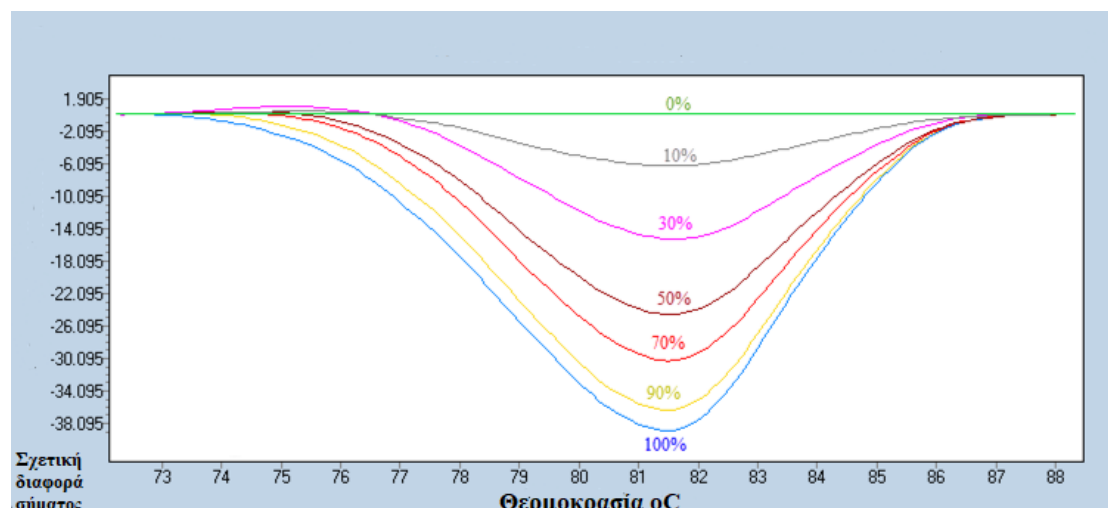
Η θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στο προηγουμένως επεξεργασμένα υποστρώματα καθορίστηκε μέσω ταυτόχρονης ενίσχυσης, σε κυμαινόμενες τιμές θερμοκρασίας (gradient PCR) (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad). Κατόπιν, τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης πυκνότητας 3%.



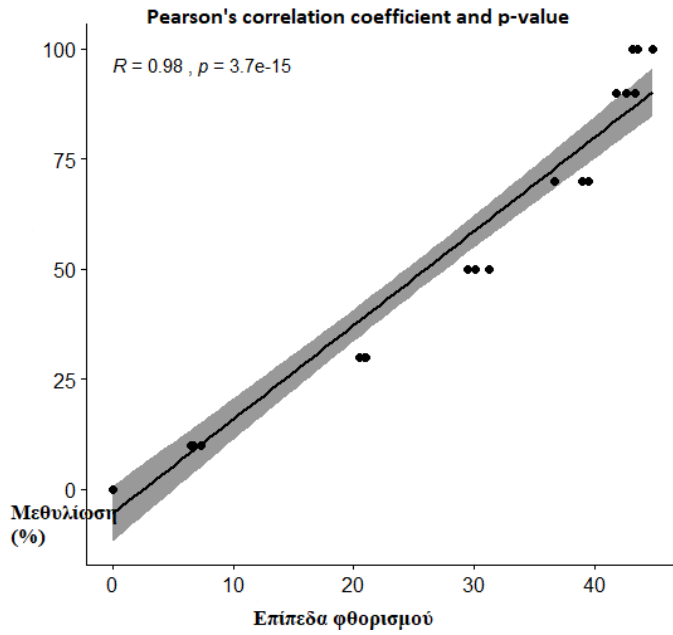
Εικόνα 33: Gradient PCR για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης των MS-HRMA ειδικών εκκινητών, προς ανάλυση των στοιχείων LINE-1 και ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή. Από αριστερά προς δεξιά οι θερμοκρασίες πρόσδεσης κυμαίνονται, από τους 50 έως τους 67 °C.

4.2.1.3. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

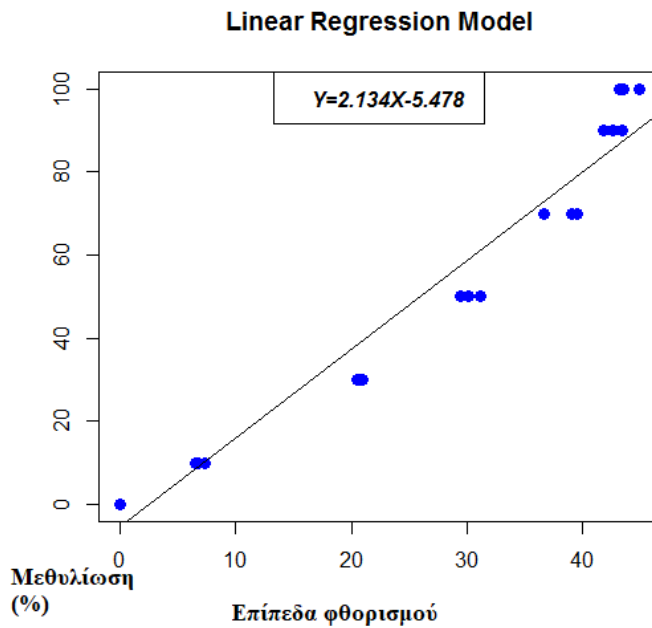
Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αναφοράς (εικόνα 26) παρασκευάστηκαν δείγματα αναφοράς με ακραίες τιμές μεθυλίωσης 0% και 100%, μέσω WGA και τεχνητής μεταφοράς μεθυλομάδων, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναφοράς, όπως και τα προς ανάλυση δείγματα, προηγουμένως, επεξεργάστηκαν με δισουλφίδιο του νατρίου, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research). Τα δείγματα αναφοράς αναμείχθηκαν σε διαφορετικές αναλογίες. Με τον τρόπο αυτό παρασκευάστηκαν πρότυπα με διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης, τα οποία αναλύθηκαν παράλληλα με τα προς διερεύνηση δείγματα, σε συσκευή Real Time PCR (LightCycler480, Roche).



Εικόνα 34: Πρότυπη καμπύλη μεθυλίωσης. Καμπύλες φθορισμού των πρότυπων δειγμάτων μεθυλίωσης όπως προκύπτουν από κανονικοποίηση των δεδομένων, έπειτα από ανάλυση με το λογισμικό LightCycler 480 Gene Scanning Software v.1.5.1.74 (Roche Diagnostics, USA). Ως σημείο αναφοράς (baseline) χρησιμοποιήθηκε το μη-μεθυλωμένο πρότυπο δείγμα (0%).



(A)



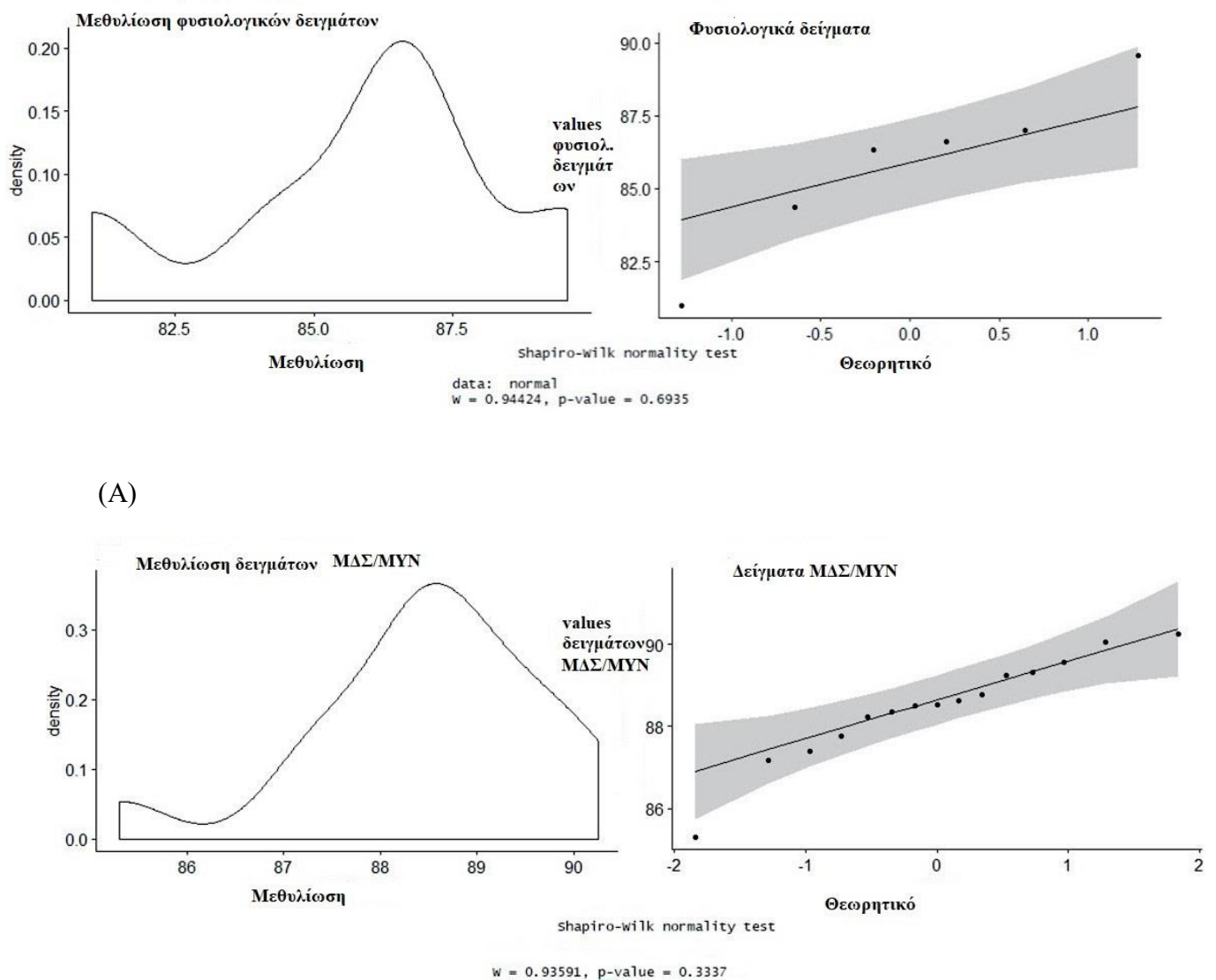
(B)

Εικόνα 35: Πρότυπη καμπύλη μεθυλίωσης. (α) Υπολογισμός του συντελεστή συσχέτισης μεθυλίωσης και επιπέδων φθορισμού ($R=0.98, p\text{-value}=3.7 \times 10^{-15}$), προκειμένου να διαπιστωθεί η αξιοπιστία των δεδομένων (Pearson's correlation coefficient). (β) Τα επίπεδα φθορισμού στο σημείο τήξης, όπου τα μισά προϊόντα ενίσχυσης, κάθε πρότυπου δείγματος, εντοπίζονται σε μονόκλωνη κατάσταση (50%), χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό της καμπύλης αναφοράς μέσω γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression model).

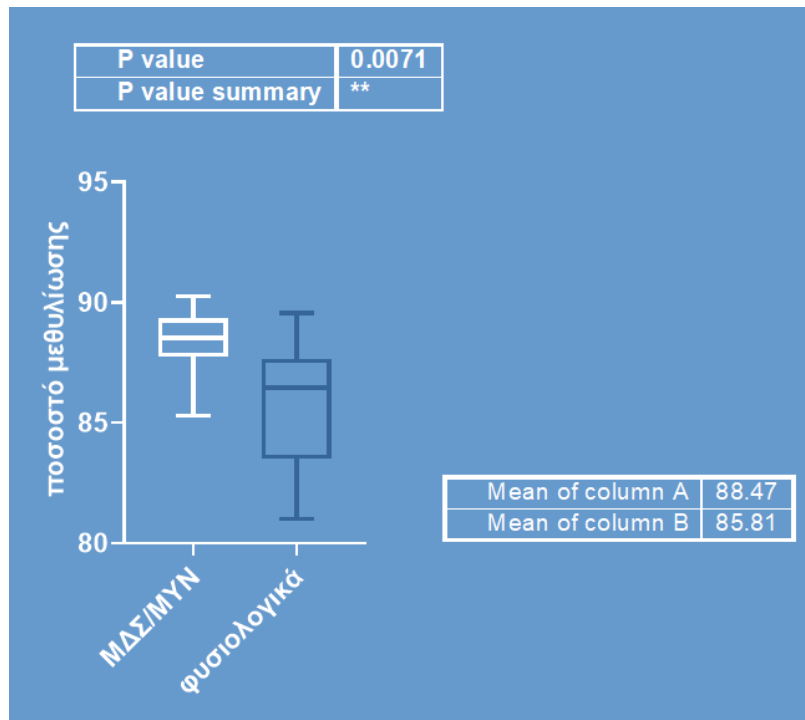
Δείγμα	Ποσοστό μεθυλίωσης	Κύρια μετάλλαξη	Τροποποιητικά γονίδια	Αμινοξική μετάλλαξη	Διάγνωση	Διάγνωση
1	85,305	NEG	DNMT3A	R882H	mds_mpn	CMML
2	87,17468	JAK2	SF3B1	H662Y	mds_mpn	RARS-T
3	87,40028	NEG	SF3B1	K700E	mds_mpn	RARS-T
4	87,76476	CALR	NEG	NEG	mds_mpn	N/A
5	88,24039	JAK2	DNMT3A	R882C	mds_mpn	RARS-T
6	88,34216	JAK2	ASXL1	G646fs*12	mds_mpn	CMML
7	88,51089	JAK2	SF3B1	K700E	mds_mpn	RARS-T
8	88,52174	NEG	SRSF2	P95L	mds_mpn	CMML
9	88,61913	JAK2	SRSF2	P95H	mds_mpn	CMML
10	88,77425	NEG	SRSF2	P95H	mds_mpn	CMML
11	89,24624	NEG	SF3B1	K700E	mds_mpn	RARS-T
12	89,30531	NEG	ASXL1	G646fs*12	mds_mpn	N/A
13	89,56179	JAK2	SF3B1	K700E	mds_mpn	RARS-T
14	90,0601	NEG	SRSF2	P95H	mds_mpn	CMML
15	90,25012	JAK2	NEG	NEG	mds_mpn	RARS-T

Πίνακας 8 : Αποτελέσματα επιπέδου μεθυλίωσης σε ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ

4.2.1.4. Στατιστική ανάλυση δεδομένων

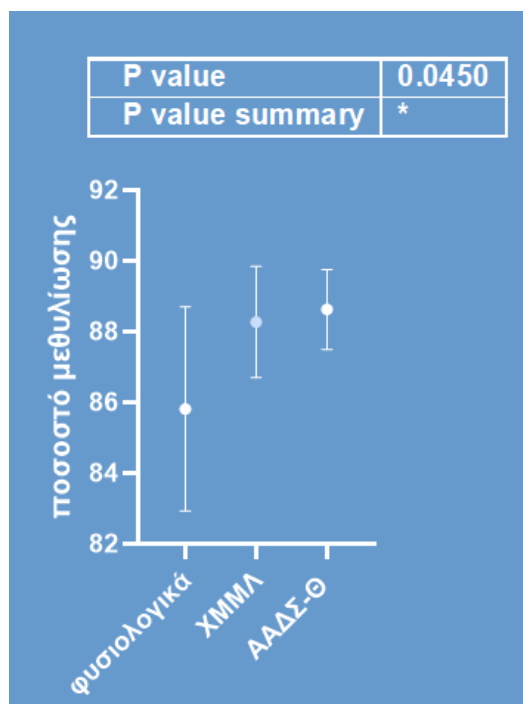


Εικόνα 36: Ανάλυση της κατανομής των δεδομένων, όπως προκύπτουν από MS-HRMA. Τόσο, η κοορτή των ατόμων του φυσιολογικού πληθυσμού (A), όσο και εκείνη των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ (B), παρουσιάζουν τιμές μεθυλίωσης που ακολουθούν κανονική κατανομή, η οποία επιτρέπει την εφαρμογή παραμετρικών στατιστικών αναλύσεων.



Εικόνα 37: Στατιστική ανάλυση των δεδομένων μεθυλίωσης, όπως προκύπτουν από MS-HRMA. Εφαρμόστηκε παραμετρικός έλεγχος (t-test) για συγκριτική ανάλυση των τιμών μεθυλίωσης μεταξύ των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ, με άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού.

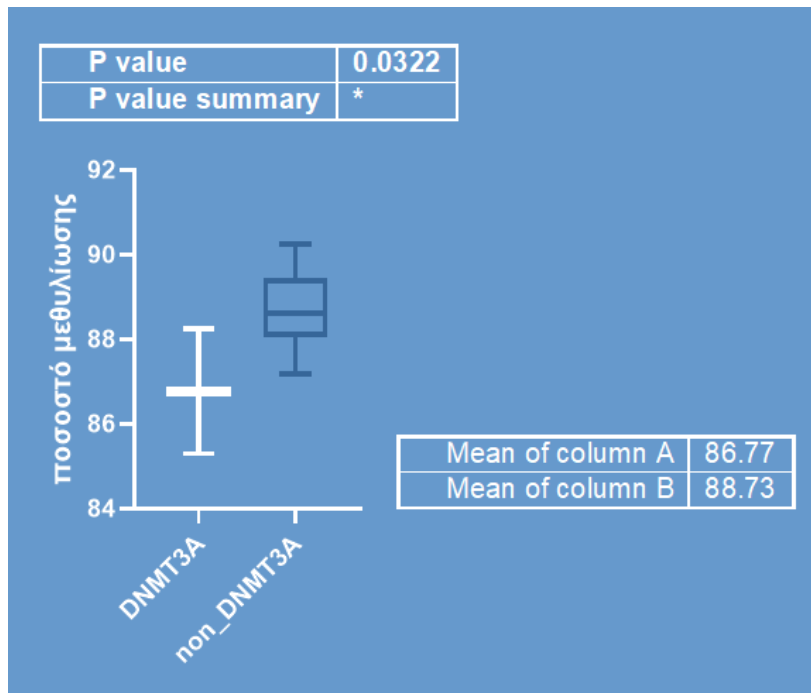
Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, συμπερένεται πως τα μεταθετά στοιχεία LINE-1, των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά (**p-value=0.0071**), αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης (**88.47%**), συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα στα άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού (**85.81%**), όπως αυτά καθορίζονται από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς (εικόνα 29).



Εικόνα 38: Στατιστική ανάλυση των δεδομένων μεθυλίωσης, όπως προκύπτουν από MS-HRMA. Εφαρμόστηκε παραμετρικός έλεγχος (ANOVA) για συγκριτική ανάλυση των τιμών μεθυλίωσης μεταξύ των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ, με άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού.

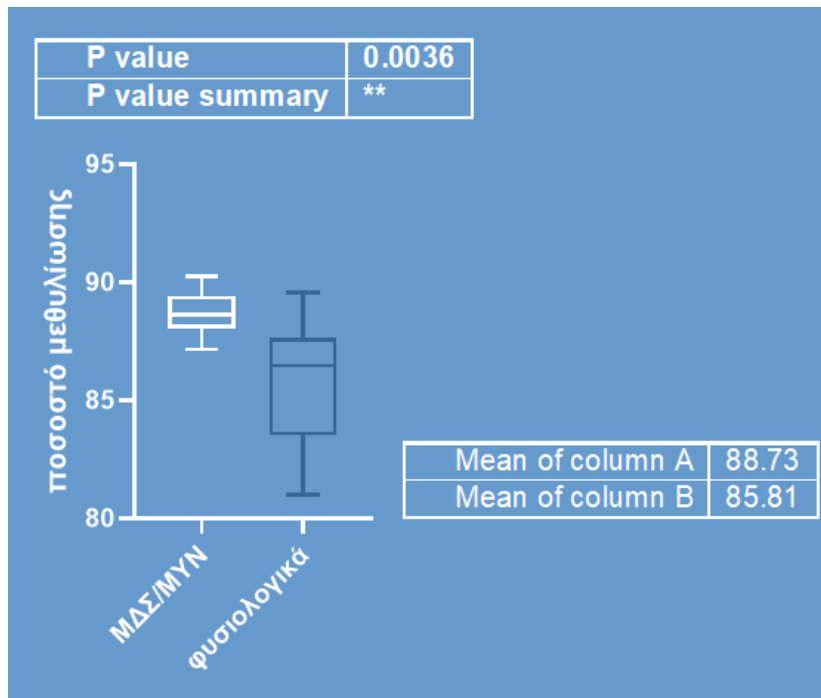
Σε περαιτέρω διαχωρισμό των ασθενών σε ασθενείς με ΧΜΜΛ και σε ασθενείς με ΑΑΔΣ-Θ, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης και στις δύο κοορτές των ασθενών σε σύγκριση με τα άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού (εικόνα 30).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω αναλύσεις, όπου έγινε σύγκριση μεταξύ των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ, με μετάλλαξη στο γονίδιο *DNMT3A*, με ασθενείς με μετάλλαξη σε άλλο γονίδιο.



Εικόνα 39: Στατιστική ανάλυση των δεδομένων μεθυλίωσης, όπως προκύπτουν από MS-HRMA. Εφαρμόστηκε παραμετρικός έλεγχος (t-test) για συγκριτική ανάλυση των τιμών μεθυλίωσης μεταξύ των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ, με μετάλλαξη στο γονίδιο DNMT3A, με ασθενείς με μετάλλαξη σε άλλο γονίδιο.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, συμπερνεται πως τα μεταθετά στοιχεία LINE-1, των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ, που έχουν μετάλλαξη στο γονίδιο DNMT3A, εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά (**p-value=0.0322**), μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης (**86.77%**), συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα στους ασθενείς με μετάλλαξη σε άλλο γονίδιο (**88.73%**), όπως αυτά καθορίζονται από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς (εικόνα 31).



Εικόνα 40: Στατιστική ανάλυση των δεδομένων μεθυλίωσης, όπως προκύπτουν από MS-HRMA. Εφαρμόστηκε παραμετρικός έλεγχος (t-test) για συγκριτική ανάλυση των τιμών μεθυλίωσης μεταξύ των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ, με άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού.
(σημείωση: από τους ασθενείς έχουν παραληφθεί αυτοί με μετάλλαξη στο γονίδιο DNMT3A)

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, συμπερνεται πως τα μεταθετά στοιχεία LINE-1, των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά (**p-value=0.0036**), αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης (**88.73%**), συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα στα άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού (**85.81%**), όπως αυτά καθορίζονται από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς (εικόνα 32).

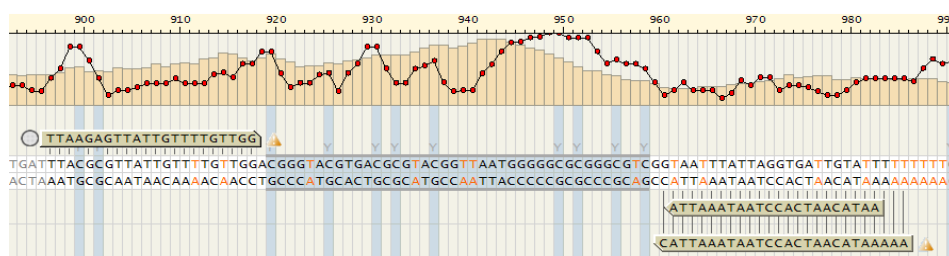
4.2.2 Μεθυλοειδική Πυροαλληλούχιση (MSP)

4.2.2.1. Κλινικό Υλικό

Χρησιμοποιήσαμε MSP για να επαληθεύσουμε τα δεδομένα της MS-HRMA. Έτσι, μελετήθηκαν 8 ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ, στους οποίους με βάση την ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1, προσδιορίστηκε κατά προσέγγιση το πρότυπο μεθυλίωσης, συγκριτικά με 7 άτομα τα οποία παρουσιάζουν φυσιολογική αιμοποίηση.

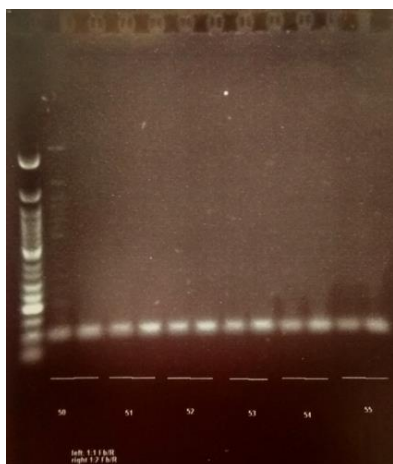
4.2.2.2. Σχεδιασμός εκκινητών για MSP και έλεγχος πρόσδεσης στο υπόστρωμα μέσω PCR διαβαθμιζόμενης θερμοκρασίας

Για την ανάλυση με MSP σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές, ειδικοί για επεξεργασμένα με δισουλφίδιο του νατρίου υποστρώματα (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research).



Εικόνα 41: Σχεδιασμός εκκινητών για MSP. Ο μοναδικός αριστερά εκκινητής σε συνδυασμό με τον δεξιά κάτω εκκινητής, ενισχύουν την περιοχή που εσωκλείουν μέσω PCR. Ο πρώτος φέρει μία ομάδα βιοτίνης (biotin group) στο 5' άκρο του, χημική τροποποίηση που χρησιμεύει στη δέσμευση της συγκεκριμένης συντιθέμενης αλυσίδας, σε μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (streptavidin beads). Τα σφαιρίδια διατηρούν την αλληλουχία που φέρει την ομάδα της βιοτίνης σε μονόκλωνη κατάσταση, ενώ παράλληλα η συμπληρωματική αλυσίδα απορρίπτεται. Κατά την MSP ο δεξιά επάνω εκκινητής προσδέεται συμπληρωματικά στην απομονωθείσα αλυσίδα και ενισχύει το προς ανάλυση τμήμα DNA

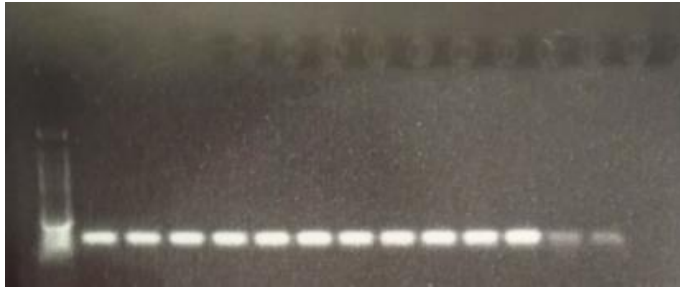
Η θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στα επεξεργασμένα με δισουλφίδιο του νατρίου υποστρώματα (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research) καθορίστηκε μέσω ταυτόχρονης ενίσχυσης σε κυμαινόμενες τιμές θερμοκρασίας (gradient PCR) (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad), ενώ κατόπιν, τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή.



Εικόνα 42: Gradient PCR για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πρόσδεσης των MSP ειδικών εκκινητών προς ανάλυση των στοιχείων LINE-1 και ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή. Από αριστερά προς τα δεξιά αναλύθηκε η ικανότητα ενίσχυσης των εκκινητών, σε κυμαινόμενες θερμοκρασίες πρόσδεσης, από τους 50 έως τους 60 βαθμούς κελσίου. Σε κάθε θερμοκρασία, οι εκκινητές δοκιμάστηκαν στη μία περίπτωση σε ισομοριακές συνθήκες, στη δεύτερη περίπτωση, ο ανάστροφος εκκινητής σε διπλάσια ποσότητα συγκριτικά με τον ορθό.

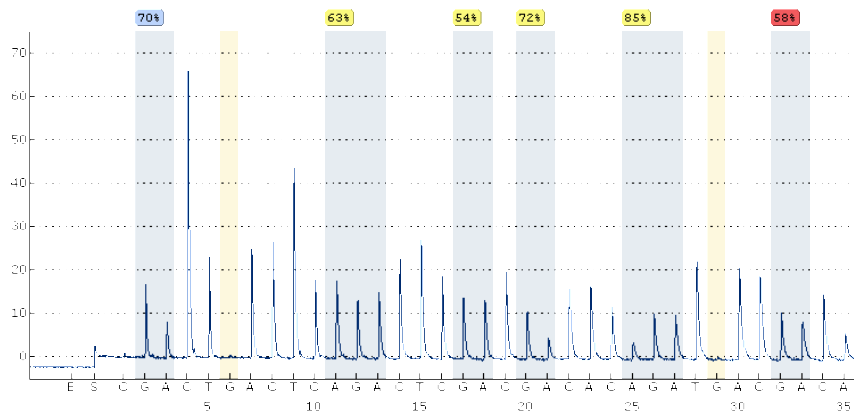
4.2.2.3. Προετοιμασία των δειγμάτων για MSP

Ακολούθησε επεξεργασία των υποστρωμάτων και των δειγμάτων αναφοράς, με δισουλφίδιο του νατρίου, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo Research), ενίσχυση μέσω PCR, προετοιμασία των δειγμάτων για ανάλυση και προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των νουκλεϊκών οξέων με MSP.

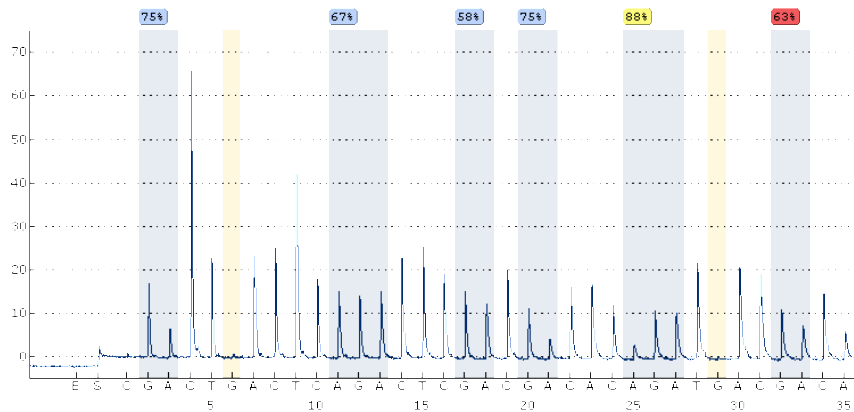


Εικόνα 43: PCR ενίσχυση του υποστρώματος των MSP ειδικών εκκινήτων προς ανάλυση της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 και ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 3% πυκνή. Τα υπό διερεύνηση δείγματα, τα οποία υπέστησαν επεξεργασία με δισουλφίδιο του νατρίου και PCR, αναλύθηκαν κατόπιν σε πηκτή αγαρόζης, για να επιβεβαιωθεί η ικανοποιητική ενίσχυση.

4.2.2.4. Αποτελέσματα MSP



(A)

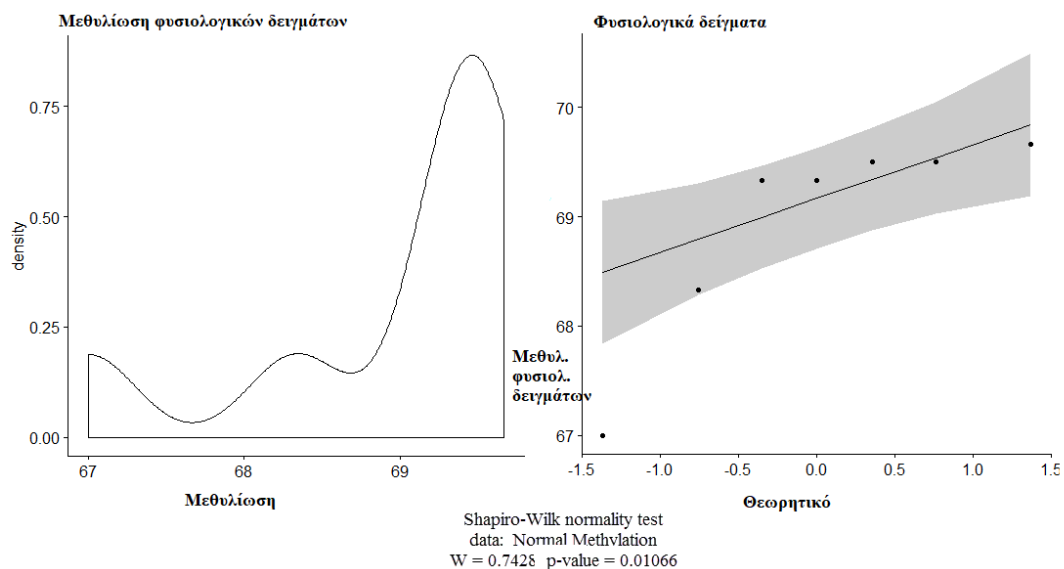


(B)

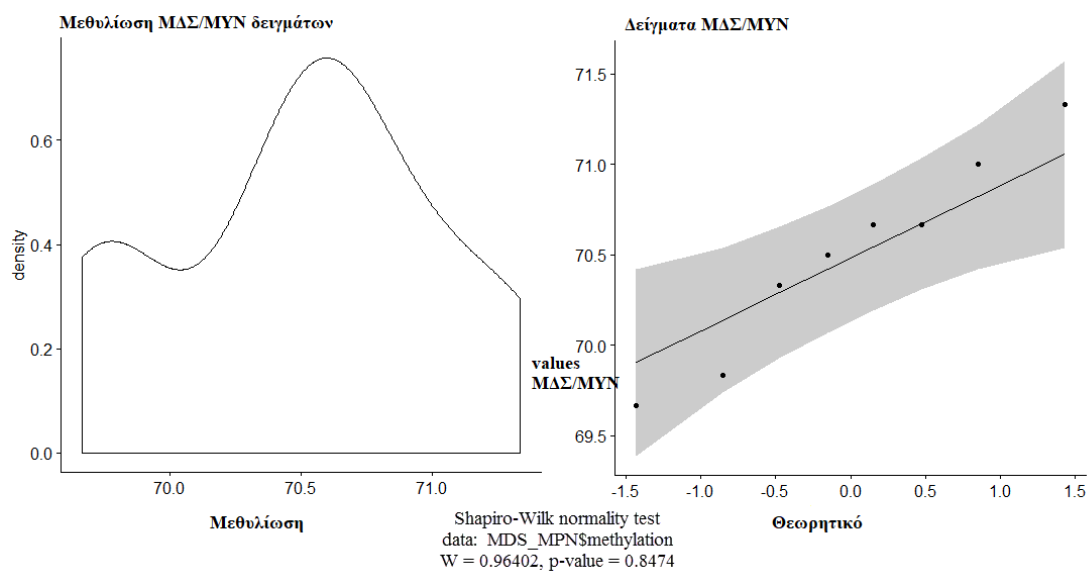
Εικόνα 44: Χρωματογραφήματα από ανάλυση της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1. Από επάνω προς τα κάτω παρουσιάζονται, ένα δείγμα ατόμου από το φυσιολογικό πληθυσμό (α) και ένα δείγμα ασθενούς με ΜΔΣ/ΜΥΝ (β). Τα επίπεδα μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 στα ΜΔΣ/ΜΥΝ εμφανίζονται αυξημένα, σε σύγκριση με τις άλλες δύο κοορτές που μελετήθηκαν, οι οποίες παρουσιάζουν παραπλήσια επίπεδα της συγκεκριμένης επιγενετικής τροποποίησης.

4.2.2.5. Στατιστική ανάλυση των δεδομένων

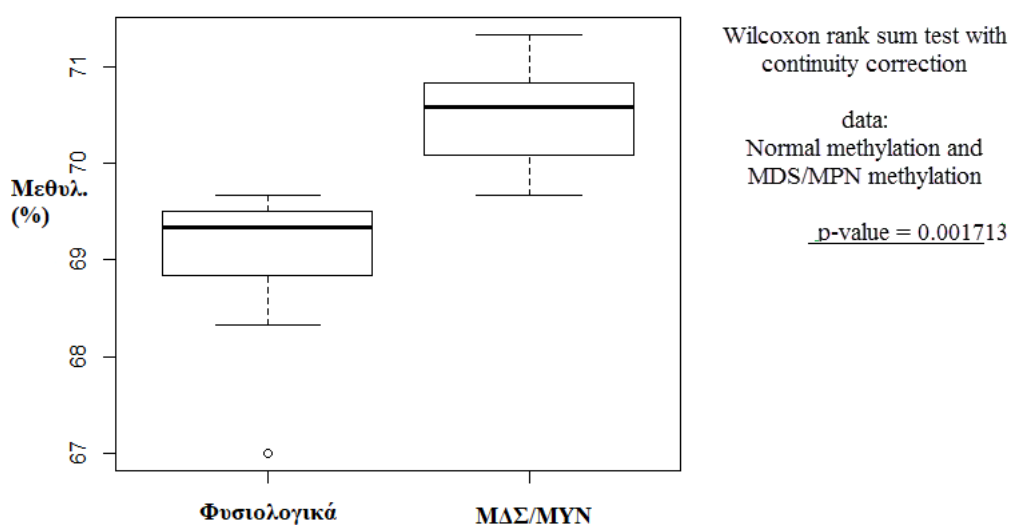
(A)



(B)

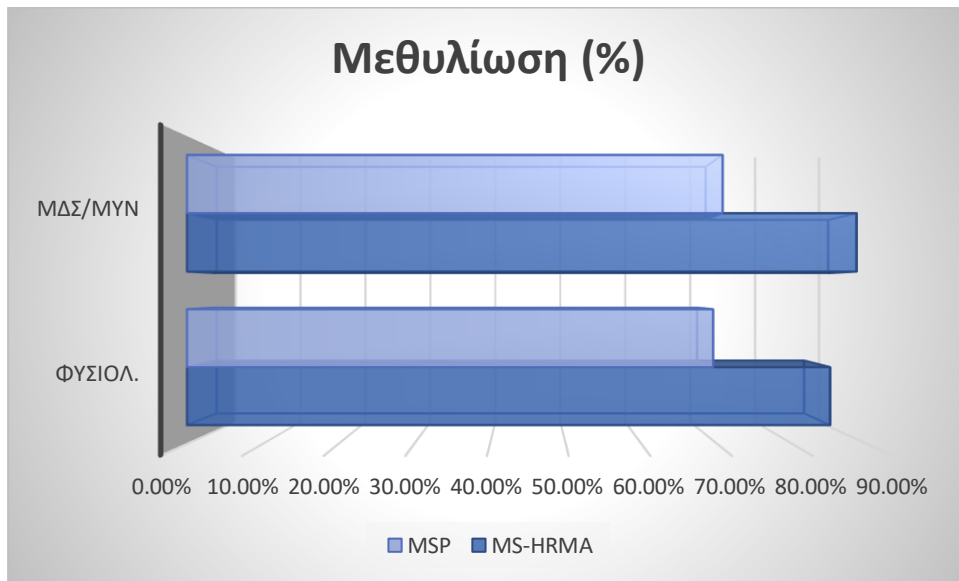


Εικόνα 45: Ανάλυση της κατανομής των δεδομένων, όπως προκύπτουν από MSP. Η κοορτή των ατόμων του φυσιολογικού πληθυσμού (α) παρουσιάζει τιμές μεθυλίωσης που ακολουθούν μη κανονική κατανομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων, παρόλο που οι κοορτές των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ (β) ακολουθούν κανονική κατανομή.



Εικόνα 46: Στατιστική ανάλυση των δεδομένων μεθυλίωσης, όπως προκύπτουν από MSP. Εφαρμόστηκε μη παραμετρικός έλεγχος (Mann-Whitney-Wilcoxon) για συγκριτική ανάλυση των τιμών μεθυλίωσης μεταξύ των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ, με άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα πειράματα με MSP, έρχονται σε συμφωνία με αυτά που προκύπτουν από τις αναλύσεις MS-HRMA. Με τις παραπάνω μεθόδους προκύπτει ότι παρουσιάζονται στατιστικώς σημαντικά, αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης των μεταθετών στοιχείων LINE-1, σε ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα σε άτομα του πληθυσμού με φυσιολογική αιμοποίηση (p -value=0.001713), όπως αυτά καθορίζονται από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς (εικόνα 38).



Γράφημα 1: Ποσοστό μεθυλίωσης ασθενών και ατόμων φυσιολογικού πληθυσμού, όπως προκύπτουν με τη μέθοδο της MS-HRMA και MSP.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ΜΔΣ/ΜΥΝ θεωρούνται ως μία ξεχωριστή κατηγορία από τα ΜΔΣ και τα ΜΥΝ, σύμφωνα με την ταξινόμηση του Π.Ο.Υ. Περιλαμβάνουν περιπτώσεις με πολύ διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις, γενετική και πρόγνωση. Τα χαρακτηριστικά που μοιράζονται οι ομάδες που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνουν κυτταρική δυσπλασία ή κυτταροπενία.

Σε μοριακό επίπεδο, στα ΜΔΣ/ΜΥΝ είναι πιο πιθανό να εντοπίζονται γονιδιακές μεταλλάξεις που σχετίζονται με ανωμαλίες στη μεταγωγή σήματος του μονοπατιού JAK2/STAT5, σε συνδυασμό με μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στον επιγενετικό μηχανισμό ρύθμισης του κυττάρου ή/και σε παράγοντες ωρίμανσης του RNA, γεγονός που σχετίζεται με τη μορφολογική δυσπλασία.⁶⁷

Στα ΜΔΣ/ΜΥΝ έχει αναφερθεί απορρύθμιση της μεθυλίωσης των καταλοίπων κυτοσίνης. Συγκεκριμένα, ασθενείς εμφανίζουν υπομεθυλίωση του DNA καθολικά, αλλά αποδεικνύεται ότι μπορεί να εμφανίζεται υπερμεθυλίωση σε συγκεκριμένες περιοχές όπως οι νησίδες CpG που εντοπίζονται σε ή κοντά σε υποκινητές γονιδίων, όπου μπορεί άμεσα να πραγματοποιηθεί αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Υπερμεθυλίωση, μπορεί επίσης να παρατηρηθεί και σε άλλα ρυθμιστικά στοιχεία, όπως ενισχυτές και μονωτές.⁶⁸

Η υπέρμετρη μεθυλίωση του DNA, στην περιοχή του υποκινητή συγκεκριμένων γονιδίων με ογκοκατασταλτική δράση, αποτελεί πιθανή ένδειξη καρκίνου.⁷⁵ Ομοίως η μετάθεση των στοιχείων LINE-1, ενδέχεται να οδηγήσει σε αναστολή ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Φαίνεται λοιπόν ότι τα ρετρομεταθετά στοιχεία συμμετέχουν στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη του καρκίνου. Στην τελευταία περίπτωση, η μεθυλίωση αποτελεί επιγενετικό μηχανισμό, που λειτουργεί ως κύριος αμυντικός μηχανισμός έναντι της μετάθεσης αυτών των στοιχείων, για την προστασία της λειτουργικής ακεραιότητας του γονιδιώματος.

Η μεθυλίωση των υποκινητών των στοιχείων LINE-1 οδηγεί σε αποσιώπηση της έκφρασης αυτών σε διαφοροποιημένα κύτταρα και επί απουσίας μεθυλίωσης του DNA είναι επιτρεπτή η μετάθεση των LINE-1. Η υπομεθυλίωση των LINE-1 είναι κοινή σε περιπτώσεις καρκίνου, μια σχετιζόμενη με την ηλικία ασθένεια που χαρακτηρίζεται από συσσώρευση μεταλλάξεων και επιγενετικών αλλαγών.⁵⁹

Σύμφωνα με ορισμένα βιβλιογραφικά δεδομένα, θεωρείται ότι τα επαναλαμβανόμενα μεταθετά στοιχεία, είναι υπερμεθυλιωμένα σε φυσιολογικούς σωματικούς ιστούς, αλλά σε κακοήθεις ιστούς είναι μεθυλιωμένα σε μικρότερο βαθμό, γεγονός που εξηγεί και την καθολική υπομεθυλίωση του γονιδιώματος που παρατηρείται σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου. Η υπομεθυλίωση που παρατηρείται σε αυτές τις περιπτώσεις και επηρεάζει τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και τα ρετρομεταθετά στοιχεία, θεωρείται, ότι επιδρά στη χρωμοσωμική αστάθεια και σε αυξημένο ρυθμό μεταλλαξιγένεσης.⁶⁶

Οι μεταλλάξεις σε παράγοντες ωρίμανσης του RNA συχνότερα ανιχνεύονται στα γονίδια *SF3B1*, *SRSF2* και *U2AF1*. Ενώ, μεταλλάξεις σε επιγενετικούς ρυθμιστές συχνότερα ανιχνεύονται στα γονίδια *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*, *EZH2*, και *ASXL1*.

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *DNMT3A*, γενικά σχετίζονται με καθολική υπομεθυλίωση, ενώ οι μεταλλάξεις στα γονίδια *TET2* και *IDH1/2* έχουν ως αποτέλεσμα την υπερμεθυλίωση του DNA.^{69,70} Η παραπάνω παρατήρηση υποδηλώνει ότι η ανισορροπία που υπάρχει στη μεθυλίωση του DNA σε οποιαδήποτε κατεύθυνση (μεταλλάξεις σε διαφορετικά γονίδια έχουν ως αποτέλεσμα καθολική υπερμεθυλίωση ή υπομεθυλίωση), φαίνεται να παίζει ρόλο στην εξέλιξη της νόσου.⁶⁸

Η εκτροπή σε οξεία λευχαιμία (ΟΜΛ) αποτελεί συχνά την κατάληξη της νόσου ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ, γι' αυτό αποτελεί μεγάλη πρόκληση η έγκαιρη θεραπευτική παρέμβαση.

Οι τρέχουσες θεραπευτικές αγωγές στα ΜΔΣ/ΜΥΝ περιλαμβάνουν χημειοθεραπεία, ανοσοθεραπεία, θεραπείες που περιλαμβάνουν αναστολείς κινασών, αλλά και «επιγενετικές» θεραπείες.

Στις «επιγενετικές» θεραπείες περιλαμβάνεται η χορήγηση παραγόντων υπομεθυλίωσης και αναστολέων των γονιδίων *IDH1/2*. Τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ως παράγοντες υπομεθυλίωσης είναι ανάλογα νουκλεοσιδίων.⁶⁸

Παράγοντες υπομεθυλίωσης όπως η αζακετιδίνη και η δεσιταβίνη δρουν επιγενετικά και έχουν ως στόχο την αποσιώπηση των DNA μεθυλοτρανσφερασών, ειδικά της *DNMT3A*.⁷¹

Ο πρωταρχικός μηχανισμός με τον οποίο θεωρούταν ότι δρουν οι παράγοντες υπομεθυλίωσης ήταν η επανενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων που έχουν αποσιωπηθεί από τη μη φυσιολογική μεθυλίωση του DNA.⁷² Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να υπάρχει η πεποίθηση ότι οι ασθενείς που εμφάνιζαν μεταλλάξεις που εμπλέκονται στην υπερμεθυλίωση του DNA, να έχουν καλύτερη απόκριση στους παράγοντες υπομεθυλίωσης. Ενώ υπάρχουν στοιχεία ότι οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *TET2* έχουν κάποιο πλεονέκτημα από τη χορήγηση αυτών των φαρμάκων, αυτά τα αποτελέσματα δεν είναι ορατά σε όλους τους ασθενείς με καθολική υπερμεθυλίωση, συμπεριλαμβανομένων και των ασθενών αυτών με μεταλλάξεις στα γονίδια *IDH1/2*.^{73,74}

Η επιτυχία της θεραπείας των ΜΔΣ/ΜΥΝ (και άλλων μορφών καρκίνου), με βάση την επιγενετική θεραπεία εξαρτάται από την ταυτοποίηση του σωστού συνδυασμού φαρμάκων που απαιτούνται. Πολλά από αυτά τα φάρμακα χρειάζονται αρκετό χρόνο για να φτάσουν στη μέγιστη αποτελεσματικότητά τους, και πολύ σημαντικά στοιχεία προτείνουν ότι το ανοσοποιητικό σύστημα του κάθε ασθενή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κλινική τους ενεργότητα.⁶⁸

Για την εξυπηρέτηση του παραπάνω στόχου, μελετήσαμε την επιγενετική κατάσταση των στοιχείων LINE-1 σε ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ, μέσω MS-HRMA, ενώ τα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν μέσω MSP.

Συνολικά, χαρακτηρίστηκαν 60 ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ και σύμφωνα με το μοριακό τους προφίλ, χαρακτηρίστηκαν τα επίπεδα μεθυλίωσης σε 15 ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ, οι οποίοι βρίσκονταν σε στάδιο πρωτοδιάγνωσης και δεν τους είχε χορηγηθεί θεραπεία.

Ο χαρακτηρισμός της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της MS-HRMA και σε 8 ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ με τη μέθοδο MSP, για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Ως φυσιολογικά δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα επίπεδα 6 ατόμων με φυσιολογική αιμοποίηση, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

Τα αποτελέσματα από τις δύο διαφορετικές τεχνικές ήρθαν σε συμφωνία, και βρέθηκε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (**p-value=0.0071**, όπως προκύπτει από MS-HRMA, και **p-value=0.001713**, όπως προκύπτει από MSP) στο πρότυπο μεθυλίωσης των μεταθετών στοιχείων LINE-1, σε ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ, σε σύγκριση με άτομα φυσιολογικού πληθυσμού.

Το παραπάνω επαληθεύεται και στην περίπτωση που πραγματοποιηθεί σύγκριση των επιπέδων μεθυλίωσης και ανά κοορτή ασθενών με ΧΜΜΛ και ΑΑΔΣ-Θ. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις ασθενών παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης των μεταθετών στοιχείων LINE-1, σε σύγκριση με άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού (**p-value=0.0450**).

Από την άλλη πλευρά, αν επεκταθούμε ακόμα περισσότερο σε διαφορετικές κοορτές ασθενών με μεταλλάξεις σε διαφορετικά γονίδια, σε σύγκριση με άτομα φυσιολογικού πληθυσμού, δεν παρατηρείται κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά στο πρότυπο της μεθυλίωσης των στοιχείων.

Με περαιτέρω ανάλυση και διαχωρισμό των ασθενών σε αυτούς που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *JAK2* και αυτούς που δεν φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *JAK2*, όπως και με τις παραπάνω περιπτώσεις και τα παραπάνω διαφορετικά γονίδια, δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφορά στα επίπεδα της μεθυλίωσης.

Ίσως, μοναδική εξαίρεση θα μπορούσε να αποτελεί το γονίδιο *DNMT3A*. Σε περαιτέρω ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για την σύγκριση ασθενών με μετάλλαξη στο γονίδιο *DNMT3A* με ασθενείς με μετάλλαξη σε άλλο γονίδιο, παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά (**p-value=0.0322**) στα επίπεδα μεθυλίωσης, και συγκεκριμένα παρουσιάστηκαν μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης.

Ωστόσο, το παραπάνω χρειάζεται παραπάνω διερεύνηση, σε κοορτή ασθενών μεγαλύτερου μεγέθους, για να επαληθευθεί, κάτι που πιθανώς θα είχε αξία, δεδομένου της φύσης του συγκεκριμένου γονιδίου και της σημαντικής επίδρασης στο μηχανισμό της μεθυλίωσης.

Επιπλέον, κάποια επίδραση στο αποτέλεσμα των πειραμάτων (υπομεθυλίωση των στοιχείων) θα μπορούσε να έχει το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις του συγκεκριμένου γονιδίου είναι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργικότητας.

Στην παρούσα εργασία, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων μεθυλίωσης στους ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ, αλλά αν πραγματοποιηθεί σύγκριση ανάμεσα σε διαφορετικές ομάδες ασθενών, οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *DNMT3A* παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης σε σχέση με τους ασθενείς με μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των επιπέδων μεθυλίωσης των φυσιολογικών ατόμων σε σχέση με αυτά των ασθενών, έχοντας εξαιρέσει τους ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο *DNMT3A*.

Από την παρούσα εργασία, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά των επιπέδων μεθυλίωσης (**p-value=0.0036**) των ασθενών (έχουν παραληφθεί αυτοί με μετάλλαξη στο γονίδιο *DNMT3A*), σε σχέση με τα άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδηλώνουν ότι είναι απαραίτητο να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες για την πλήρη διερεύνηση του δυναμικού της ανάλυσης μεθυλίωσης του DNA και σε μεγαλύτερες και πιο ετερογενείς κοορτές καλά χαρακτηρισμένων ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ, προκειμένου να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 Orazi, A. & Germing, U. The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features. *Leukemia* **22**, 1308-1319, doi:10.1038/leu.2008.119 (2008).
- 2 al., T. I. M. e. An International MDS/MPN Working Group's perspective and recommendations on molecular pathogenesis, diagnosis and clinical characterization of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. (2015).
- 3 Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391-2405, doi:10.1182/blood-2016-03-643544 (2016).
- 4 Yoshida, K. *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64-69, doi:10.1038/nature10496 (2011).
- 5 Malcovati L, P. E., Ambaglio I, *et al.* Driver somatic mutations identify distinct disease entities within myeloid neoplasms with myelodysplasia. . *Blood* **26: 2014–2003** (2014).
- 6 Papaemmanuil, E. *et al.* Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* **122**, 3616-3627; quiz 3699, doi:10.1182/blood-2013-08-518886 (2013).
- 7 Haferlach, T. *et al.* Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **28**, 241-247, doi:10.1038/leu.2013.336 (2014).
- 8 al., K. K. e. *WILLIAMS Hematology, 9E.* (2016).
- 9 Papaemmanuil, E. *et al.* Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *The New England journal of medicine* **365**, 1384-1395, doi:10.1056/NEJMoa1103283 (2011).
- 10 al, M. C. e. Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms. (2019).
- 11 Graubert, T. A. *et al.* Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nature genetics* **44**, 53-57, doi:10.1038/ng.1031 (2011).
- 12 Patnaik, M. M. *et al.* Spliceosome mutations involving SRSF2, SF3B1, and U2AF35 in chronic myelomonocytic leukemia: prevalence, clinical correlates, and prognostic relevance. *American journal of hematology* **88**, 201-206, doi:10.1002/ajh.23373 (2013).
- 13 al, D. R. e. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. (2006).
- 14 al., J. J. T. e. DNA Methyltransferase 1 Is Essential for and Uniquely Regulates Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. (2009).
- 15 Ley, T. J. *et al.* DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* **363**, 2424-2433, doi:10.1056/NEJMoa1005143 (2010).
- 16 Walter, M. J. *et al.* Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **25**, 1153-1158, doi:10.1038/leu.2011.44 (2011).
- 17 Kim, S. J. *et al.* A DNMT3A mutation common in AML exhibits dominant-negative effects in murine ES cells. *Blood* **122**, 4086-4089, doi:10.1182/blood-2013-02-483487 (2013).
- 18 Lin, M. E. *et al.* Dynamics of DNMT3A mutation and prognostic relevance in patients with primary myelodysplastic syndrome. *Clinical epigenetics* **10**, 42, doi:10.1186/s13148-018-0476-1 (2018).

- 19 Bejar, R. *et al.* Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**, 3376-3382, doi:10.1200/JCO.2011.40.7379 (2012).
- 20 Tahiliani, M. *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**, 930-935, doi:10.1126/science.1170116 (2009).
- 21 Ito S, S. L., Dai Q, *et al.* Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. . *Science* **333**, 1300–1303 (2011).
- 22 Jankowska, A. M. *et al.* Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* **113**, 6403-6410, doi:10.1182/blood-2009-02-205690 (2009).
- 23 Ko, M. *et al.* Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* **468**, 839-843, doi:10.1038/nature09586 (2010).
- 24 Yamazaki, J. *et al.* Effects of TET2 mutations on DNA methylation in chronic myelomonocytic leukemia. *Epigenetics* **7**, 201-207, doi:10.4161/epi.7.2.19015 (2012).
- 25 Ko, M. *et al.* Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 14566-14571, doi:10.1073/pnas.1112317108 (2011).
- 26 Moran-Crusio, K. *et al.* Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer cell* **20**, 11-24, doi:10.1016/j.ccr.2011.06.001 (2011).
- 27 Quivoron C, C. L., Della Valle V, *et al.* . TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* **20(1):25–38** (2011).
- 28 Li, Z. *et al.* Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood* **118**, 4509-4518, doi:10.1182/blood-2010-12-325241 (2011).
- 29 Kosmider O, G.-B. V., Cheok M, *et al.* TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDS). *Blood* **114(15):3285–3291** (2009).
- 30 Kosmider O, G.-B. V., Ciudad M, *et al.* TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. . *Haematologica* **94(12):1676–1681** (2009).
- 31 Raineri, S. & Mellor, J. IDH1: Linking Metabolism and Epigenetics. *Frontiers in genetics* **9**, 493, doi:10.3389/fgene.2018.00493 (2018).
- 32 Ward PS, P. J., Wise DR, *et al.* The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. . *Cancer Cell* **17(3):225–234** (2010).
- 33 Figueroa, M. E. *et al.* Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer cell* **18**, 553-567, doi:10.1016/j.ccr.2010.11.015 (2010).
- 34 Koivunen, P. *et al.* Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature* **483**, 484-488, doi:10.1038/nature10898 (2012).
- 35 Cairns, R. A. & Mak, T. W. Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities. *Cancer discovery* **3**, 730-741, doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0083 (2013).

- 36 Xu W, Y. H., Liu Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. . *Cancer Cell* **19**(1):17–30 (2011).
- 37 Lu, C. *et al.* IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* **483**, 474-478, doi:10.1038/nature10860 (2012).
- 38 L, M. G., Boulay, K., Topisirovic, I., Huot, M. E. & Mallette, F. A. Oncogenic Activities of IDH1/2 Mutations: From Epigenetics to Cellular Signaling. *Trends in cell biology* **27**, 738-752, doi:10.1016/j.tcb.2017.06.002 (2017).
- 39 Bejar, R. *et al.* Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *The New England journal of medicine* **364**, 2496-2506, doi:10.1056/NEJMoa1013343 (2011).
- 40 Score, J. *et al.* Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* **119**, 1208-1213, doi:10.1182/blood-2011-07-367243 (2012).
- 41 Khan, S. N. *et al.* Multiple mechanisms deregulate EZH2 and histone H3 lysine 27 epigenetic changes in myeloid malignancies. *Leukemia* **27**, 1301-1309, doi:10.1038/leu.2013.80 (2013).
- 42 Abdel-Wahab O, A. M., LaFave Lindsay M, et al. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell* **22**(2): 180–193 (2012).
- 43 Itzykson, R. *et al.* Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**, 2428-2436, doi:10.1200/JCO.2012.47.3314 (2013).
- 44 Thol, F. *et al.* Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 2499-2506, doi:10.1200/JCO.2010.33.4938 (2011).
- 45 Micol JB, A.-W. O. Collaborating constitutive and somatic genetic events in myeloid malignancies: ASXL1 mutations in patients with germline GATA2 mutations. . *Haematologica* **99**(2):201–203 (2014).
- 46 West, R. R., Hsu, A. P., Holland, S. M., Cuellar-Rodriguez, J. & Hickstein, D. D. Acquired ASXL1 mutations are common in patients with inherited GATA2 mutations and correlate with myeloid transformation. *Haematologica* **99**, 276-281, doi:10.3324/haematol.2013.090217 (2014).
- 47 Kitamura, T. ASXL1 mutations gain a function. *Blood* **131**, 274-275, doi:10.1182/blood-2017-12-816595 (2018).
- 48 Khavari, D. A., Sen, G. L. & Rinn, J. L. DNA methylation and epigenetic control of cellular differentiation. *Cell cycle* **9**, 3880-3883, doi:10.4161/cc.9.19.13385 (2010).
- 49 Moore, L. D., Le, T. & Fan, G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **38**, 23-38, doi:10.1038/npp.2012.112 (2013).
- 50 B.Baylin†, P. A. J. a. S. THE FUNDAMENTAL ROLE OF EPIGENETIC EVENTS IN CANCER. (2002).
- 51 al., R. L. e. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. (2009).
- 52 Lee, E. *et al.* Landscape of somatic retrotransposition in human cancers. *Science* **337**, 967-971, doi:10.1126/science.1222077 (2012).
- 53 Schulz, W. A. L1 retrotransposons in human cancers. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2006**, 83672, doi:10.1155/JBB/2006/83672 (2006).

- 54 Honda, T. & Rahman, M. A. Profiling of LINE-1-Related Genes in Hepatocellular
Carcinoma. *International journal of molecular sciences* **20**,
doi:10.3390/ijms20030645 (2019).
- 55 al., Q. F. e. Human L1 Retrotransposon Encodes a Conserved Endonuclease Required
for Retrotransposition. (1996).
- 56 al., N. T. e. In Vitro Screening for Compounds That Enhance Human L1 Mobilization.
(2013).
- 57 Beck, C. R. *et al.* LINE-1 retrotransposition activity in human genomes. *Cell* **141**,
1159-1170, doi:10.1016/j.cell.2010.05.021 (2010).
- 58 al., M. T. e. Role of Alu Element in Detecting Population Diversity. (2017).
- 59 Erichsen, L. *et al.* Genome-wide hypomethylation of LINE-1 and Alu retroelements in
cell-free DNA of blood is an epigenetic biomarker of human aging. *Saudi journal of
biological sciences* **25**, 1220-1226, doi:10.1016/j.sjbs.2018.02.005 (2018).
- 60 Chalitchagorn, K. *et al.* Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal
tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene* **23**, 8841-8846,
doi:10.1038/sj.onc.1208137 (2004).
- 61 Nguyen, C. *et al.* Susceptibility of nonpromoter CpG islands to de novo methylation
in normal and neoplastic cells. *Journal of the National Cancer Institute* **93**, 1465-1472
(2001).
- 62 *Εργαστηριακές Ασκήσεις Μοριακής Βιολογίας* (2018).
- 63 Peter Hu MH, P. A. L. *Modern Clinical Molecular Techniques*. (2012).
- 64 F, Z. H. B. H. B. J. V. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR
Green I, its structure determination and methodological implications. (2004).
- 65 al., M. K. e. Pyrosequencing: Powerful and Quantitative Sequencing Technology
(2013).
- 66 Roman-Gomez, J. *et al.* Repetitive DNA hypomethylation in the advanced phase of
chronic myeloid leukemia. *Leukemia research* **32**, 487-490,
doi:10.1016/j.leukres.2007.07.021 (2008).
- 67 al., T. N. T. e. MDS overlap disorders and diagnostic boundaries. *Blood* (2019).
- 68 al., K. A. F. e. Epigenetic therapies in acute myeloid leukaemia: where to from here?
Blood (2019).
- 69 al., F. M. e. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in hypermethylation
phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiaion. *Cancer
cell* (2010).
- 70 al., R.-G. D. e. The R882H DNMT3A mytation associated with AML dominantly
inhibits wild-type DNMT3A by blocking its ability to form active tetramers. *Cancer
cell* (2014).
- 71 al., T. C. e. Suboptimal response rates to hypomethylating agent therapy in chronic
myelomonocytic leukemia; a single institutional study of 121 patients. *American
journal of hematology* (2019).
- 72 Issa, J. P. e. a. Azacitidine. *Nat Rev Drug Discov*. (2005).
- 73 al., B. R. e. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in
myelodysplastic syndrome patients. *Blood* (2014).
- 74 DiNardo, C. D. e. a. Lack of association of IDH1, IDH2 and DNMT3A mutations with
outcome in older patients with acute myeloid leukemia treated with
hypomethylating agents. *Leuk Lymphoma* (2014).
- 75 Rodriguez, R. M. *et al.* DNA methylation dynamics in blood after hematopoietic cell
transplant. *PLoS one* **8**, e56931, doi:10.1371/journal.pone.0056931 (2013).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Τα μυελοδυσπλαστικά/μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα (ΜΔΣ/ΜΥΝ) είναι μυελικές νεοπλασίες στις οποίες παρατηρούνται χαρακτηριστικά τόσο των μυελοδυσπλαστικών (ΜΔΣ), όσο και των μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων (ΜΥΝ). Σε μεγάλο ποσοστό των ασθενών συχνά ανιχνεύονται σημειακές ή άλλες μεταλλάξεις μικρής κλίμακας σε γονίδια που συμμετέχουν στην κυτταρική σηματοδότηση, στη ρύθμιση του επιγενετικού μηχανισμού του κυττάρου (*TET2* και *IDH1/2*), στην ωρίμανση του RNA (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*). Μάλιστα, οι τελευταίες δεν είναι αποκλειστικές, αλλά μπορεί να συνοδεύονται από μεταλλάξεις *DNMT3*, *JAK2*, *ASXL1* και *TET2*. Σκοπός της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας ήταν η κατά προσέγγιση εκτίμηση της μεθυλίωσης του γονιδιώματος μέσω ανάλυσης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, τα οποία απαντώνται διάσπαρτα στο γονιδίωμα, με την τεχνική post Real-time PCR HRMA σε δείγματα από ασθενείς με ΜΔΣ/ΜΥΝ.

Υλικά και Μέθοδοι: Σε αυτή την εργασία χαρακτηρίστηκαν 60 ασθενείς με βάσει τα κριτήρια του WHO 2016 για τα ΜΔΣ/ΜΥΝ και σύμφωνα με το μοριακό τους προφίλ, επιλέχθηκαν 15 ασθενείς κατά τη διάγνωση. Για τον προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των LINE-1, για τις αναλύσεις του πρότυπου της καμπύλης τήξης, χρησιμοποιήθηκαν 6 δείγματα DNA ατόμων χωρίς αιματολογικές διαταραχές. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MS-HRMA και η μέθοδος MSP για την επαλήθευση των δεδομένων.

Αποτελέσματα: Τα μεταθετά στοιχεία LINE-1, των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά (p -value=0.0071), αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης (88.47%), συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα στα άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού (85.81%). Επιπλέον, τα μεταθετά στοιχεία LINE-1, των ασθενών με ΜΔΣ/ΜΥΝ, που έχουν μετάλλαξη στο γονίδιο *DNMT3A*, εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά (p -value=0.0322), μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης (86.77%), συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα στους ασθενείς με μετάλλαξη σε άλλο γονίδιο (88.73%). Τα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν με τη μέθοδο MSP.

Συμπεράσματα: Στην παρούσα εργασία, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά των επιπέδων μεθυλίωσης (p -value=0.0036) των ασθενών (έχουν παραληφθεί αυτοί με μετάλλαξη στο γονίδιο *DNMT3A*), σε σχέση με τα άτομα του φυσιολογικού πληθυσμού. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδηλώνουν ότι είναι απαραίτητο να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες, προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Abstract

Objective: Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms are myeloid disorders characterized by both dysplastic and proliferative features. Molecular lesions in genes involved in cell signaling, epigenetic regulation (*TET2* and *IDH1 / 2*), and RNA splicing (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*) are often detected in a large proportion of patients. The latter are not exclusive, and are usually detected with mutation in other genes, i.e. *DNMT3*, *JAK2*, *ASXL1* and *TET2*. The purpose of this thesis was to estimate the gene methylation by analyzing the LINE-1 retrotransposon elements that are dispersed in the genome utilizing α post-Real-Time PCR HRMA technique in samples of patients with MDS/MPN.

Methods: In this study, 60 patients were included based on WHO 2016 criteria for MDS/MPN and according to their molecular profile, 15 patients were selected for methylation analysis. To determine the methylation status of the LINE-1, a standard curve was prepared using 6 DNA samples from healthy donors. For this purpose, the MS-HRMA method was used and the MSP method was used to verify the data.

Results: The LINE-1 retrotransposon elements of MDS/MPN patients showed statistically significant (p -value = 0.0071), increased methylation levels (88.47%) in samples from patients with MDS/MPN, compared to the methylation levels iDNA samples from healthy donors (85.81%). Additionally, in MDS/MPN patients with a mutation in the *DNMT3A* gene, the LINE-1 transposons methylation status significantly reduced (86.77%; p -value = 0.0322), in comparison to methylation levels in patients with mutations in other genes (88.73%). The results were verified by the MSP method.

Conclusions: In this study, we showed a statistically significant difference in the methylation levels of LINE-1 retrotransposon elements (p -value = 0.0036) in patients with MDS/MPN compared to the normal population. Further analysis should be performed in larger cohorts of patients to confirm these results.

Παράρτημα Ι - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για HRMA και ARMS

Όνομασία	Εμπρόσθιος εκκινητής	nt	Όνομασία	Ανάστροφος εκκινητής	nt	Μέγεθος προϊόντος (nt)	Αντιπρόσωπος HRM mix	Ta (°C)
CALRe9HF	CAGCAGAGAAAACAAATG AATCA	22	CALRe9HR	ACAGCTCGTCCTTGGCTCT	19	204	ROCHE	67
ASXL1e12HF	GGACCCTCGCAGACACT G	18	ASXL1e12HR	GCCACCTCCCTCATCGGTCT	20	152	KAPA	67
JAK2 FO	TCAGAACGTTGATGGCA GTGG	21	JAK2 RO	TTTCCTTTTTCACAAGATATT GC	23			
JAK2 Fwt	CAGGCATTTGGTTTTAAA TTATGGAGTAT	29	JAK2 Rmt	TACTTACCTCGTCTCCACAA AAGTTA	27			
DNMT3Ae23 HF	TGTGGTTAGACGGCTTCC CA	20	DNMT3Ae23H R	AGGTGGCGGATGACTGACA	19	184	ROCHE	67
IDH1e4HF	TTGTGAGTGGATGGGTA AAAAG	22	IDH1e4HR	TTATTGCCAACATGACTTAC TTGAAG	26	82	KAPA	59
IDH2e4HF	CTGAAGAAGATGTGGAA AAGGGC	23	IDH2e4HR	GCCTACCTGGTCGCCAT	17	165	ROCHE	59
SF3B1e14HF	CCTGATATAGATAACTGT	18	SF3B1e14HR	AAGAATAGCTATCTGCTG	18	186	ROCHE	52
SF3B1e15HF	AGGTCTTGTTGGATGAAG A	18	SF3B1e15HR	GGCCAAAGCACTGATGGC	18	55	ROCHE	59
U2AF1e2HF	ATTGGAGCATGTCGTATC	18	U2AF1e2HR	AAACAAACCTGGCTAAACA AT	21	77	ROCHE	59
U2AF1e6HF	CACGCCGAGCTGTCAAAT	18	U2AF1e6HR	CCTCACTCACCCATCTCATC CG	23	78	ROCHE	67
CSF3Re14HF	ACAGTACAGTCCTCACTA A	19	CSF3Re14HR	CTCTCCCCTTACCTGACT	18	54	ROCHE	67
SETBP1e4HF	AGGAAATCACGCTGTCCC CTGTCCA	25	SETBP1e4HR	GAGCAGAAATCAAAAAGAGT ACCTTTC	26	154	ROCHE	67
KITe17HF	TCCTTACTCATGGTCCGA	18	KITe17HR	CTTTAACCACATAATTAGAA AGG	23	90	KAPA	59
SRSF2e1HF	CGCTGAGGACGCTATTCC	18	SRSF2e1HR	GGCTGTGGTGTGAGTGGC	18	110	ROCHE	67

Πίνακας 9: Εκκινητές που σχεδιάστηκαν για Real-Time PCR ενίσχυση των γενομικών περιοχών ενδιαφέροντος, προκειμένου αυτές να αναλυθούν μέσω HRMA. Συντμήσεις: nt = πλήθος νουκλεοτιδίων, HRM mix = προπαρασκευασμένο διάλυμα πολυμεράσης, Ta = θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα σε βαθμούς κελσίου (°C).

Παράρτημα II - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για MS-HRMA

Όνομασία	Εμπρόσθιος εκκινητής	nt	Όνομασία	Ανάστροφος εκκινητής	nt	Μέγεθος προϊόντος (nt)	Ta (°C)
LINE1hF	TAGGGAGTGTTAGATAGTGG	20	LINE1hR	AAACTCCCTAACCCCTTAC	19	109	60

Πίνακας 10: Εκκινητές για PCR ενίσχυση του υποστρώματος πριν από προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 μέσω MS-HRMA. Συντμήσεις: nt = πλήθος νουκλεοτιδίων, Ta = θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα σε βαθμούς κελσίου (°C).

Παράρτημα IV - Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για PCR ενίσχυση πριν από πυροαλληλούχιση

Όνομασία	Εμπρόσθιος εκκινητής	nt	Όνομασία	Ανάστροφος εκκινητής	nt	Μέγεθος προϊόντος (nt)	Ta (°C)
LINE1psPF	ΤΤΑΑΓΑΓΤΤΑΤΤΓΤΤΤΤΓΤΤΓΓ	22	LINE1psPR	ΤΤΑΤΓΤΤΑΓΤΓΓΑΤΤΑΤΤΤΑΑΤ	22	90	53

Πίνακας 11: Εκκινητές για PCR ενίσχυση του υποστρώματος πριν από προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 μέσω MSP Συντμήσεις: nt = πλήθος νουκλεοτιδίων, Ta = θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών στο υπόστρωμα σε βαθμούς κελσίου (°C).

Παράρτημα V- Τεχνητοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για πυροαλληλούχιση

Όνομασία	Εμπρόσθιος εκκινητής	nt	Κατεύθυνση	Μέγεθος διαβάσματος (nt)
LINE1psSR	TTTTATGTTAGTGGATTATTTAATG	26	Reverse	65

Εικόνα 12: Εκκινητές για προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης των στοιχείων LINE-1 μέσω MSP
Συντμήσεις: nt = πλήθος νουκλεοτιδίων.